สำนักหอสมุด แม่โจ้ ๒๕๓๙ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

# รายงานผลการวิจัย

**เรื่อง** การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง

Extraction Purification and Identification of Policosanol from Beeswax

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2558

จำนวน 266,000 บาท

**หัวหน้าโครงการ** นางสาวอนรรฆอร ศรีไสยเพชร

**ผู้ร่วมโครงการ** นายมาโนชย์ ถนอมวัฒน์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30/ก.ย./2559

# กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง (Extraction Purification and Identification of Policosanol from Beeswax) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2558 ผู้วิจัยขอขอบคุณ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่ และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

# คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีเกษตรกรที่ทำฟาร์มเลี้ยงผึ้งอยู่เป็นจำนวนมาก โดยมนุษย์รู้จักและใช้ประโยชน์จากผึ้งมาตั้งแต่โบราณกาล ซึ่งผลิตภัณฑ์จากผึ้งล้วนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง โดยนอกจากน้ำผึ้งและนมผึ้งหรือรอยัลเยลลี ที่เกษตรกรขายเป็นสินค้าเพื่อใช้ในการอุปโภคโดยตรงแล้ว ยังมีไขผึ้งซึ่งถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง โดยใช้ในการผลิตแผ่นรังเทียมเลี้ยงผึ้ง ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นส่วนผสมของครีม โลชัน น้ำมันแต่งผม ลิปสติก เป็นต้น ใช้ในอุตสาหกรรมเทียนไข โดยเฉพาะทางศาสนา นอกจากนี้ยังใช้ไขผึ้งในงานเภสัชกรรม งานทันตแพทย์ งานหล่อแบบต่างๆ ซึ่งคุณสมบัติและองค์ประกอบของไขผึ้งมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับแหล่งที่มา สำหรับโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งที่ศึกษาในต่างประเทศพบว่ามีปริมาณและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยมากเกษตรกรมักขายให้กับพ่อค้าที่มารับซื้อโดยตรง แต่การนำไขผึ้งมาผลิตเป็นสารชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มมูลค่า ยังไม่มีมากเท่าที่ควร ดังนั้น หากสามารถสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งได้ในเวลาอันสั้นและสามารถวิเคราะห์องค์ประกอบรวมทั้งหาจุดเด่นขององค์ประกอบที่มีอยู่ในไขผึ้งที่พบได้ จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของไขผึ้ง โดยอาจมุ่งเน้นให้เกษตรกรปรับปรุงการเลี้ยงผึ้งเพื่อให้ได้ไขผึ้งที่มีมูลค่าสูง หรือทำการเก็บ คัดแยกและรักษาไขผึ้งที่ได้ให้ยังคงมีคุณภาพดี ทั้งนี้ภายใต้การให้คำแนะนำของหน่วยงานการเกษตรที่เกี่ยวข้อง หรือการรวมตัวกันของสมาคมผู้ผลิต ทั้งนี้เพื่อเป็นการต่อรองราคาซื้อขายไขผึ้งหากสามารถผลิตไขผึ้งที่มีคุณภาพดี

หวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับสมบูรณ์นี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับการสนับสนุนข้อมูลด้านงานวิจัยของพันธุ์ข้าว หากมีข้อพบพร่องประการใด คณะผู้วิจัยขอน้อมรับคำติชมด้วยความยินดีเป็นอย่างยิ่ง

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2559

MAEJO UNIVERSITY

# บทคัดย่อ

## การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง

**อนรรฆอร ศรีไสยเพชร และ มาโนชย์ ถนอมวัฒน์**
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

โพลิโคซานอล คือ กลุ่มของแอลกอฮอล์สายโซ่ตรง มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม ใช้ในผลิตภัณฑ์ยาและอาหารเสริม ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งในเวลาอันรวดเร็วโดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน โดยขั้นตอนแรกทำการล้างไขผึ้งด้วยเฮกเซนร้อน และตามด้วยการล้างด้วยไอโซโพรพานอลร้อน เพื่อเป็นการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ นำไขผึ้งที่ปราศจากไตรกลีเซอไรด์มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันโดยมีสารละลายเบสโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ละลายใน 80 % เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้แหล่งพลังงานจากไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที ซึ่งทำให้ไขผึ้งเกิดการไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ ได้เป็นแอลกอฮอล์สายยาว (โพลิโคซานอล) และกรดไขมันสายยาว ตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) จากนั้นเป็นการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ โดยการล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ผสมหลายชนิดที่อัตราส่วนต่างๆ และตามด้วยการทำให้ตกตะกอนภายใต้อุณภูมิต่ำเพื่อกำจัดกรดไขมันสายยาว ซึ่งการตรวจสอบกรดไขมันทำโดยใช้เทคนิค TLC และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลทำโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ซึ่งพบว่าประกอบด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความยาวคาร์บอนตั้งแต่ 20-28 และ 32-34 อะตอม โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาวที่ผ่านการสกัดโดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยพลังงานไมโครเวฟและทำให้บริสุทธิ์ มีปริมาณร้อยละผลผลิตเท่ากับ 16.96 และจากไขผึ้งสีเหลืองที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีปริมาณร้อยละผลผลิตเท่ากับ 10.87

**คำสำคัญ** : ไขผึ้ง ปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน ไมโครเวฟ โพลิโคซานอล

# ABSTRACT

## Extraction Purification and Identification of Policosanol from Beeswax

Anakhaorn Srisaipet and Manoch Thanomwat
Faculty of Science Maejo University, Chiangmai Thailand

Policosanol is a group of long chain aliphatic alcohols of 20–36 carbon atoms. It has been used in pharmaceutical and supplementary products. This research was focus on extraction of policosanol from beeswax for a short time by microwave energy activated hydrolyzation. First of all, the beeswax was washed with hot hexane followed by hot isopropanol for triglyceride elimination. The purified beeswax was hydrolyzed by 0.5 M KOH in 80 % ethanol using microwave irradiation at 100 watts on 5 minutes as energy source. The wax ester was completely hydrolyzed to long chain aliphatic alcohols (Policosanol) and long chain fatty acids in rapid time. Thin layer chromatography (TLC) was used to analyze the products. Thereby, the purification of policosanol was done by washing with the mixture of various organic solvents, ratio and it were precipitated at low temperature for long chain fatty acids separating from policosanol. The technique of TLC and high performance liquid chromatography (HPLC) were applied for the fatty acid checking. The carbon chain lengths of alcohols were found in range 20-28 and 32-34 atoms by gas chromatography (GC) analysis. The policosanol extraction yields from white and yellow beeswax hydrolyzed by microwave activation were found to be in 16.96 % and 10.8, respectively.

**Keywords** : Beeswax, Hydrolyzation, Microwave, Policosanol

# สารบัญเรื่อง


| รายการ | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| สารบัญเรื่อง | ค |
| สารบัญตาราง | ง |
| สารบัญรูป | จ |
| บทนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 3 |
| บทที่ 1 ตรวจเอกสาร | 4 |
| บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย | 29 |
| บทที่ 3 ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย | 37 |
| บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย | 70 |
| เอกสารอ้างอิง | 71 |
| บทความเผยแพร่ | 75 |

# สารบัญตาราง


| ตาราง | | หน้า |
|---|---|---|
| 1.1 | ชนิด และปริมาณของโพลิโคซานอลที่ได้จากข้าวสาลี ไขอ้อย และไขผึ้ง | 6 |
| 1.2 | สัดส่วนของสารประกอบชนิดต่างๆ ในไขผึ้ง | 13 |
| 1.3 | ลักษณะทั่วไปของไขจากพืช จากสัตว์ และแร่ธาตุ | 19 |
| 2.1 | สารเคมี | 29 |
| 2.2 | สารมาตรฐาน | 30 |
| 2.3 | เครื่องมือและอุปกรณ์ | 30 |
| 2.4 | สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วย HPLC | 35 |
| 2.5 | สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วย GC | 36 |
| 3.1 | ร้อยละความชื้นของไขผึ้ง สีขาว และสีเหลือง | 37 |
| 3.2 | ความสามารถในการละลายของ KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวทำละลายอินทรีย์ | 42 |
| 3.3 | ค่าเวลาคงค้าง ($T_R$) ของสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ | 62 |
| 3.4 | ค่าเวลาคงค้าง (TR) และร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาวโดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที | 64 |
| 3.5 | ค่าเวลาคงค้าง (TR) และร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที | 66 |
| 3.6 | เปรียบเทียบร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบแอลกอฮอล์สายยาวของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้ง สีเหลืองและสีขาว | 68 |
| 3.7 | ร้อยละผลผลิตของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (%yield) | 68 |

# สารบัญรูป


| รูป | | หน้า |
|---|---|---|
| 1.1 | โครงสร้างทั่วไปของ octacosanol (C28) และ hexacosanol (C26) | 4 |
| 1.2 | ลักษณะทางกายภาพของโพลิโคซานอล | 4 |
| 1.3 | ปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไข | 8 |
| 1.4 | ไขผึ้ง | 10 |
| 1.5 | กายวิภาคภายนอก และภายในของผึ้ง | 11 |
| 1.6 | โครงสร้างทั่วไปของไข | 12 |
| 1.7 | สมการการสร้างไขผึ้งไมริซิลปาล์มิเตต | 13 |
| 1.8 | โครงสร้างของกรดปาล์มิติก | 17 |
| 1.9 | โครงสร้างของกรดโอเลอิก | 17 |
| 1.10 | โครงสร้างทั่วไปของไขมันและน้ำมัน | 17 |
| 1.11 | การสังเคราะห์ไขมันและน้ำมัน | 18 |
| 1.12 | โครงสร้างของเซทิลปาล์มิเตต | 18 |
| 1.13 | ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสไขมันโดยใช้กรดหรือหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา | 20 |
| 1.14 | ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืช | 21 |
| 1.15 | ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ Alcoholysis | 21 |
| 1.16 | ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ Acidolysis | 22 |
| 1.17 | ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ Ester-ester interchange | 22 |
| 1.18 | ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (Sponification) | 22 |
| 1.19 | สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า | 23 |
| 1.20 | การสะท้อนกลับของคลื่นไมโครเวฟ | 23 |
| 1.21 | การส่งผ่านของคลื่นไมโครเวฟ | 24 |
| 1.22 | การดูดซึมของคลื่นไมโครเวฟ | 24 |
| 1.23 | โมเลกุลของน้ำที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็ว ตามทิศทางของสนามไฟฟ้าทำให้เกิดความร้อน | 25 |
| 1.24 | กลไกการให้พลังงานความร้อน | 25 |
| 3.1 | ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แสดงองค์ประกอบของไขผึ้ง | 38 |
| 3.2 | ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แสดงองค์ประกอบของ ไขผึ้งสีขาว (ก) และสีเหลือง (ข) ที่ทำการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ โดยการล้างด้วยเฮกเซน และไอโซโพรพานอล | 40 |
| 3.14 | โครมาโทแกรมของ (ก) สารมาตรฐานไขผึ้ง (C40) (ข) | |

# สารบัญรูป (ต่อ)


| รูป | | หน้า |
|---|---|---|
| 3.15 | โครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ วิเคราะห์ด้วย (5 % Phenyl-95 % methypolysiloxane) ในช่วงอุณหภูมิ 150-280 องศาเซลเซียส | 61 |
| 3.16 | แสดงโครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ (ก) และโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาวโดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที (ข) ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HP-5 ในช่วงอุณหภูมิ 150-280 องศาเซลเซียส | 63 |
| 3.17 | โครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ (ก) และสารโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีการเร่งปฏิกิริยาเหลืองโดยไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที (ข) ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HP-5 ในช่วงอุณหภูมิ 150-280 องศาเซลเซียส | 65 |
| 3.18 | ลักษณะของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข) | 69 |

# บทนำ

มนุษย์รู้จักผึ้งและใช้ประโยชน์ของผึ้งมาตั้งแต่โบราณกาล โดยที่มนุษย์ได้นำน้ำผึ้งมาเป็นแหล่งให้ความหวานในอาหาร และใช้ไขผึ้งมาทำเป็นเทียนให้แสงสว่าง ไขผึ้งเป็นไขบริสุทธิ์ ผลิตโดยต่อมไขผึ้ง 4 คู่ ซึ่งอยู่ที่ส่วนท้องของลำตัวผึ้งงานที่มีอายุ 2 สัปดาห์ โดยผึ้งสังเคราะห์จากน้ำตาลที่มีโมเลกุลเชิงเดี่ยวภายในระบบย่อยอาหาร โดยปกติไขผึ้งจะมีสีขาวบริสุทธิ์ แต่เมื่อทำการหลอมไขผึ้งออกมาจากรังผึ้ง อาจมีจะมีสีของน้ำผึ้ง เกสรปนออกมา จึงทำให้ไขผึ้งเปลี่ยนสีไปตามสภาพสิ่งเจือปนนั้นๆ [1]

โดยนอกจากน้ำผึ้งและนมผึ้งหรือรอยัลเยลลี ที่เกษตรกรขายเป็นสินค้าเพื่อใช้ในการอุปโภคโดยตรงแล้ว ยังมีไขผึ้งซึ่งถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง โดยใช้ในการผลิตแผ่นรังเทียมเลี้ยงผึ้ง ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นส่วนผสมของครีม โลชัน น้ำมันแต่งผม ลิปสติก เป็นต้น ใช้ในอุตสาหกรรมเทียนไข โดยเฉพาะทางศาสนา นอกจากนี้ยังใช้ไขผึ้งในงานเภสัชกรรม งานทันตแพทย์ งานหล่อแบบต่างๆ [1]

คุณสมบัติและองค์ประกอบของไขผึ้งมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับแหล่งที่มา [2] ซึ่งประกอบไปด้วย ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) 14% โมโนเอสเทอร์ (monoester) 35%, ไดเอสเทอร์ (diester) 14%, ไตรเอสเทอร์ (triester) 3%, ไฮดรอกซีโมโนเอสเทอร์ (hydroxymonoester) 4%, ไฮดรอกซีโพลีเอสเทอร์ (hydroxypolyester) 8%, กรดไขมัน (fatty acid) 12% แอลกอฮอล์ (free alcohol) 1% และอื่นๆ (non identified) 6% [3, 4] ไขผึ้งมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 62 – 65 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นสัมพัทธ์ที่ 15 องศาเซลเซียส มีค่าระหว่าง 0.958 – 0.970 mg/$m^3$ และมีค่าการนำความร้อน 0.25 W $m^{-1}$ $K^{-1}$ [5]

โพลิโคซานอล (Policosanol) คือกลุ่มของแอลกอฮอล์สายตรงยาว (Long chain aliphatic alcohols) ที่มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ docosanol (C22) tetracosanol (C24) hexacosanol (C26) octacosanol (C28) และ triacosanol (C30) [6] พบในไขจากสัตว์และพืชบางชนิด เช่น ไขจากผึ้ง รำข้าว อ้อย ข้าวโอ๊ต และข้าวสาลี เป็นต้น โดยปริมาณและองค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาสกัด เช่น ไขอ้อย มีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 24-34 อะตอม โดยมี ออกตะโคซานอล (octacosanol : C28) มากที่สุด 66 % [7] ส่วนในไขผึ้งพบโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 18-34 อะตอม โดยมีไตรอคอนทานอล (triacontanol : C30) มากที่สุด 30.2 % เป็นต้น [8]

ได้มีการวิจัยถึงผลโพลิโคซานอลทางการแพทย์ครั้งแรกในปี 1984 เนื่องจากพบว่าไขอ้อยสามารถลดระดับไขมันในสัตว์จำพวกหนูได้ [9] มีการศึกษาประโยชน์ของโพลิโคซานอลพบว่า สามารถลดโคเลสเตอรอลในเลือดได้ โดยการบริโภคโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 24-34 อะตอม 5-20 มิลลิกรัม/วัน สามารถลดโคเลสเตอรอลที่ไม่ดี (Low Density Lipoprotein Cholesterol : LDL-C) ได้ 21-29% ในขณะที่มีโคเลสเตอรอลที่ดี (High Density Lipoprotein Cholesterol : HDL-C) เพิ่มขึ้น 8-15% [10] นอกจากนี้มีรายงานว่าโพลิโคซานอลสามารถป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ [11] ช่วยยับยั้งการสังเคราะห์

โคเลสเตอรอลและเพิ่มการย่อยสลาย LDL [12] ลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) ลดอันตรายของเยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial damage) และลดการสร้าง โฟมเซลล์ [13, 14] ส่วนทางด้านความปลอดภัยนั้น พบว่าการให้โพลิโคซานอลไม่มีพิษต่อยีนทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต [15]

จากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้นจึงมีการนำโพลิโคซานอลไปใช้เป็นยา และองค์ประกอบในอาหารเสริมหลายชนิด ส่งผลให้มีการผลิตโพลิโคซานอลเพื่อการค้า โดยส่วนใหญ่สกัดจากไขอ้อยและไขผึ้ง แต่เนื่องจากความต้องการที่มากขึ้นจึงได้มีความพยายามพัฒนากระบวนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในปัจจุบัน การสกัดโพลิโคซานอลสามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ด้วยเบส ที่อุณหภูมิสูง ในตัวทำละลายต่างๆ เช่น เฮพเทน อะซีโตน โทลูอีน เบนซีน เมทานอล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น โดยใช้เวลาและอุณหภูมิแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้

สำหรับการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์นั้น ทำได้ยาก โดยส่วนใหญ่มักนิยมทำโดยการ ชะล้างด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อแยกโพลิโคซานอลออกจากกรดไขมัน [6, 16] การใช้ตัวทำละลายร่วมกับการตกผลึกเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์มากขึ้น [17] นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆที่พยายามลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และพยายามนำเทคโนโลยีอื่นๆมาประยุกต์ใช้ในการสกัดและทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ เช่นการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (Supercritical carbondioxide) แทนการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส (Metanolysis) ใช้เอนไซม์ไลเปสตรึง (Novozyme 435) [18] รวมทั้งมีการใช้อัลตราซาวด์ที่มีความเข้มสูง (high ultrasound : HIU) ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากนั้นจึงสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether : PE) แล้วทำให้บริสุทธิ์บนคอลัมน์ซิลิกาเจล (silicsa gel) โดยใช้ PE เป็นตัวชะ (Eluent) [19]

สำหรับโพลิโคซานอลจากไขผึ้งที่ศึกษาในต่างประเทศพบว่ามีปริมาณและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เช่น Jimenez และคณะ [20] นำตัวอย่าง ไขผึ้งจากเมืองต่างๆ ในประเทศสเปน มาศึกษาองค์ประกอบด้วยเทคนิค GC-MS จากผลการวิเคราะห์พบแอลกอฮอล์สายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 20 - 26 อะตอม และกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 16 - 34 อะตอม ซึ่งอนุพันธ์ ethyl ester ของกรดไขใน C 16:2 และ C34:2 นับว่า เป็นกรดไขมันที่ไม่คาดคิดว่าจะพบอยู่ในไขผึ้ง ในขณะที่ Miguel และ Fernando [21] ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของไขผึ้งที่รวบรวมได้จากตลาดในประเทศโปรตุเกส โดยพบว่า ปาล์มมิเตท และ โอเลเอต เป็นเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นจาก 1- octadecanol (C18) และ 1-eicosanol (C20) เป็นส่วนใหญ่ และ Irmak และคณะ [6] พบว่า ทั้งไขผึ้งสีน้ำตาลและเหลือง มี Triacontanol (C30) เป็นองค์ประกอบหลักเกินกว่า 40% โดยตรวจพบ แอลกอฮอล์สายยาวที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 20 – 30 อะตอม โดยที่ตรวจไม่พบ C22 ในไขผึ้งสีเหลือง ทั้งนี้การที่โพลิโคซานอลจากไขผึ้งมีความแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของไขที่ใช้ วิธีการสกัดและกระบวนการที่ทำให้บริสุทธิ์

อย่างไรก็ตามการนำไขผึ้งมาใช้ประโยชน์มักทำในต่างประเทศ โดยเฉพาะการสกัดโพลิโคซานอล ทั้งๆ ที่ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีเกษตรกรที่ทำฟาร์มเลี้ยงผึ้งอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งผลิตภัณฑ์จากผึ้งล้วนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงและเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะไขผึ้ง ซึ่งโดยมากเกษตรกรมักขายให้กับพ่อค้าที่มารับซื้อโดยตรง โดยไขผึ้งที่ขายปลีกในท้องตลาดทั่วไปราคาขายอยู่ที่กิโลกรัมละ 200 - 250 บาท แต่การนำไขผึ้งมาผลิตเป็นสารชนิดอื่นๆเพื่อเพิ่มมูลค่ายังไม่มากเท่าที่ควร ดังนั้น หากสามารถสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งได้จะช่วยเพิ่มมูลค่าของไขผึ้ง ซึ่งจากข้อมูลของศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ รายงานปริมาณการเลี้ยงผึ้งในเขตจังหวัดภาคเหนือตอนบน พบว่า จังหวัดเชียงใหม่มีเกษตรกรที่ทำฟาร์มเลี้ยงผึ้งมากที่สุด ไม่ว่าจะเป็นฟาร์มขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ ดังนั้น หากนำวัตถุดิบที่มีอยู่เป็นปริมาณมากในพื้นที่มาศึกษาเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ จึงนับได้ว่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

เพื่อศึกษาวิธีการสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโพลิโคซานอลจากไขผึ้งในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

- ได้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของไขผึ้งในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ทั้งคุณสมบัติทางกายภาพ องค์ประกอบทางเคมี และสารที่มีประโยชน์และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจ

- ได้แนวความคิดที่จะนำไขผึ้งไปใช้งานอย่างมีประสิทธิภาพโดยการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบไขผึ้ง

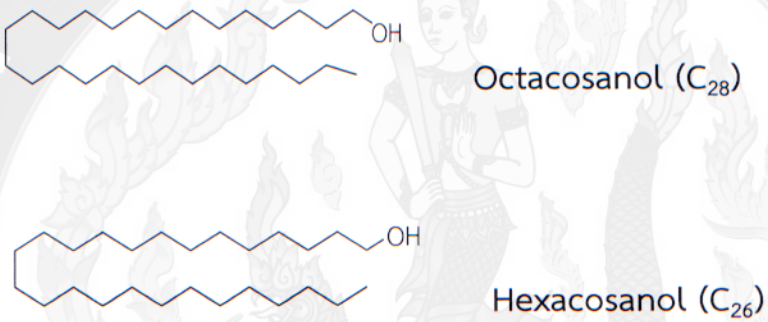
- ได้แนวทางนำโพลิโคซานอลซึ่งเป็นสารสกัดจากไขผึ้ง ที่มีประโยชน์ไปใช้ในอุตสาหกรรม

- นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ หรือตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

# บทที่ 1 ตรวจเอกสาร

## 1.โพลิโคซานอล (Policosanol)

โพลิโคซานอล คือชื่อเรียกทั่วไปของแอลกอฮอล์สายตรงที่มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม มีคุณสมบัติช่วยลดการจับตัวของเกล็ดเลือด ลดอันตรายต่อเยื่อบุหลอดเลือด ลดการสร้างโฟมเซลล์ และลดโคเลสเตอรอลในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับ หัวใจ และเนื้อเยื่อไขมันได้ [22] โดยแอลกอฮอล์สายยาวที่พบมาก ได้แก่ docosanol ($C_{22}$) tetracosanol ($C_{24}$) hexacosanol ($C_{26}$) octacosanol ($C_{28}$) และ triacontanol ($C_{30}$) [6] โครงสร้างทั่วไปของ octacosanol ($C_{28}$) และ hexacosanol ($C_{26}$) แสดงดังรูป 1.1




**รูป 1.1** โครงสร้างทั่วไปของ octacosanol ($C_{28}$) และ hexacosanol ($C_{26}$) [23,24]

โพลิโคซานอลมีลักษณะทางกายภาพเป็นผงละเอียด สีขาว ดังรูป 1.2 สามารถละลายได้ใน คลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทานอล อะซิโตน เบนซิน โทลูอีน และไม่สามารถละลายในน้ำ

**รูป 1.2** ลักษณะทางกายภาพของโพลิโคซานอล [25]

### 1.2.1 แหล่งที่พบโพลิโคซานอล

แหล่งที่พบโพลิโคซานอลส่วนใหญ่พบมากในไข ทั้งไขพืช และไขสัตว์ ดังนี้

#### 1.2.1.1 ไขจากสัตว์

ไขจากสัตว์ที่พบมากที่สุดคือ ไขผึ้ง (Beeswax) เป็นไขที่หาง่าย และมีราคาถูก และเชลแล็ก (Shellac) เป็นสารจากธรรมชาติที่ได้จากการแปรรูปเรซินหรือสารคัดหลั่งที่ได้จากแมลงครั่ง ซึ่งสามารถผลิตได้มากในประเทศไทย อีกทั้งยังมีไขอื่นๆ เช่น ไขสเปอมาซิติ (Spermaceti wax) เป็นไขที่สกัดจากไขสมองของปลาวาฬ ไขลาโนลิน ได้จากขนสัตว์

#### 1.2.1.2 ไขจากพืช

ไขจากพืช เป็นแหล่งทรัพยากรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโพลิโคซานอล เช่น ต้นอ่อนรำข้าว ไขรำข้าว ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ผักขม บร็อคโคลี และไขเปลือกอ้อย

### 1.2.2 องค์ประกอบของโพลิโคซานอล

องค์ประกอบของปริมาณโพลิโคซานอลจะมีความจำเพาะในแต่ละชนิด อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาสกัด และกระบวนการที่ใช้ในการสกัด [22] ชนิด และปริมาณของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากข้าวสาลี ไขอ้อย และไขผึ้ง แสดงดังตาราง 1.1

**ตาราง 1.1** ชนิดและปริมาณของโพลิโคซานอลที่ได้จากข้าวสาลี ไขอ้อย และไขผึ้ง [6]

| โพลิโคซานอล | ปริมาณที่พบ (%) | | |
|---|---|---|---|
| | ข้าวสาลี | ไขอ้อย | ไขผึ้ง |
| Eicosanol (C20) | - | - | - |
| Heneicosanol (C21) | - | - | - |
| Docosanol (C22) | 1.2 | - | - |
| Tricosanol (C23) | - | - | - |
| Tetracosanol (C24) | 14.6 | 0.7 | 18 |
| Pentacosanol (C25) | - | - | - |
| Hexacosanol (C26) | 18.7 | 8.0 | 17 |
| Heptacosanol (C27) | - | 3.5 | - |
| Octacosanol (C28) | 17.0 | 66 | 19 |
| Triacontanol (C30) | 24.5 | 13.5 | 31 |
| Dotriacontanol (C32) | 13.2 | 6.0 | 15 |
| Tetratriacontanol (C34) | 8.6 | 1.5 | - |
| Hexatriacontanol (C36) | 2.2 | - | - |

อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของไขแต่ละชนิดมีความแปรปรวนแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ แหล่งที่มา สายพันธุ์ และแหล่งเพาะปลูก [6]

### 1.2.3 คุณสมบัติและประโยชน์ของโพลิโคซานอล

จากรายงานสารสกัดจากธรรมชาติโพลิโคซานอล โดยเฉพาะที่พบในไขเปลือกอ้อย มีสูตรโครงสร้างคล้าย ยาลดไขมันในเลือดกลุ่ม statin มีประสิทธิภาพสูงในการลดไขมันโคเลสเตอรอล ซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะหลอดเลือดหัวใจ และสมองอุดตัน มีความปลอดภัยสูงแม้ใช้ต่อเนื่องในระยะยาว ในการช่วยป้องกันภาวะหลอดเลือดหัวใจ สมองอุดตัน มีการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ทั่วโลกมากกว่า 60 การวิจัย ซึ่งศึกษากับผู้ป่วย

ไขมันโคเลสเตอรอลสูง จำนวนถึง 3,000 คน จนกระทั่งมีการตีพิมพ์ผลการวิจัยในวารสารทางการแพทย์ American Heart Juoural ปี 2002 [26] ประโยชน์ของสารสกัดโพลิโคซานอล เป็นดังนี้

ช่วยลดระดับไขมัน total Cholesterol ได้ถึง 23 % ลดระดับไขมัน LDL-cholesterol (ไขมันชนิดไม่ดี) ได้ถึง 31 % และช่วยเพิ่มระดับไขมัน HDL-cholesterol (ไขมันชนิดดี) ได้ถึง 29 % และลดการเกาะตัวของเกล็ดเลือด ได้ถึง 50 % ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้ [26,27,28]

1. ลดไขมันโคเลสเตอรอลอย่างเป็นธรรมชาติ ช่วยลดระดับของไขมันโคเลสเตอรอลชนิดรวม (TC) และไขมันโคเลสเตอรอลชนิดร้าย (LDL-cholesterol) โดยปรับสมดุลการสร้างไขมันโคเลสเตอรอล และเสริมการทำงานของตับในการเผาผลาญไขมัน ส่งผลให้ระดับของไขมันโคเลสเตอรอลในเลือดลดลง

2. ช่วยสร้างไขมันโคเลสเตอรอลชนิดดี ลดความเสี่ยงโรคหลอดเลือดหัวใจ ช่วยบำรุงตับให้สร้างไขมันโคเลสเตอรอลชนิดดี (HDL-cholesterol) มากขึ้น โดยปกติไขมันโคเลสเตอรอลชนิดดี (HDL-cholesterol) มีหน้าที่นำพาไขมันที่สะสม และอุดตันตามผนังหลอดเลือดกลับไปทำลายที่ตับ ซึ่งการเพิ่มระดับไขมันโคเลสเตอรอลชนิดดี (HDL-cholesterol) ในกระแสเลือดเพียง 1 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จะสามารถลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันได้ถึง 3-4 %

3. ลดความเสี่ยงภาวะการอุดตันของเกล็ดเลือดได้ถึง 50 % ช่วยปรับลดการสร้างสารที่ก่อให้เกิดการเกาะตัวของเกล็ดเลือด และเพิ่มการไหลเวียนของเลือด จึงช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตัน ป้องกันภาวะหัวใจ และสมองขาดเลือดเฉียบพลัน

4. ป้องกันภาวะความหนาตัวของผนังหลอดเลือด เนื่องจากคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโพลิโคซานอล จึงช่วยลดขบวนการจับตัวเป็นก้อนของไขมันโคเลสเตอรอลที่ผนังหลอดเลือด อันเป็นสาเหตุให้เกิดความเสื่อม และขาดความยืดหยุ่นของหลอดเลือด จนเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) โรคหัวใจ และหลอดเลือด (Cardiovascular Diseases) ภาวะความดันโลหิตสูง (Hypertension) โรคอัมพฤกษ์ อัมพาต และโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน เช่น บริเวณขา เป็นต้น

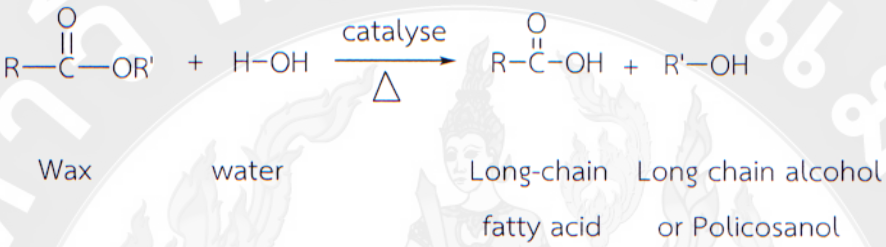
5. ฟื้นฟูสมรรถภาพการทำงานของหัวใจ และตับ ช่วยลดการสะสมเกาะตัวของไขมันที่ตับ หัวใจ และช่วยฟื้นฟูสมรรถภาพของตับที่เสื่อมโทรม อันเกิดจากการรับประทานยาลดไขมันในเลือดต่อเนื่องเป็นเวลานาน

### 1.2.4 กระบวนการสกัดแยกโพลิโคซานอล

การสกัดแยกโพลิโคซานอล แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนหลักคือการสกัดโพลิโคซานอล (Extraction) และการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ (Purification) [22]

### 1.2.4.1 การสกัดโพลิโคซานอล (Extraction)

การสกัดโพลิโคซานอลหรือแอลกอฮอล์สายยาวจากไขที่อยู่ในรูปของแวกซ์ (Waxes) ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน กับแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเพียงหมู่เดียว (Monohydric Alcohol) และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นต้องมีการตัดพันธะเอสเทอร์ของไข (Hydrolyzation) ซึ่งจะได้โพลิโคซานอล และกรดไขมันสายยาว ดังรูป 1.3 ทำโดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเบสที่อุณหภูมิสูง สำหรับเบสที่นิยมใช้ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) โดยทำปฏิกิริยาในตัวทำละลายต่างๆ เช่น เฮพเทน อะซีโตน โทลูอีน เบนซีน เมทานอล เอทานอล และคลอโรฟอร์ม [22]




**รูป 1.3** ปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไข

### 1.2.4.2 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ (Purification)

การทำให้โพลิโคซานอลให้บริสุทธิ์นั้น เป็นการแยกโพลิโคซานอลออกจากกรดไขมันสายยาว แต่พบว่าการทำให้โพลิโคซานอลมีความบริสุทธิ์นั้นทำได้ยาก อาจมาจากปัญหาในเรื่องของปริมาณของโพลิโคซานอลที่สกัดออกมาได้น้อย จึงทำให้มีวิธีการที่จะทำให้โพลิโคซานอลมีความบริสุทธิ์แตกต่างกันออกไป [17]

แต่ส่วนใหญ่นิยมนำตัวอย่างที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ เพื่อแยกโพลิโคซานอลออกจากกรดไขมัน เช่น การใช้ไดเอทิลอีเทอร์ในการสกัด โดยสกัด 3 ครั้ง [6] การใช้ตัวทำละลายร่วมกับการตกผลึกเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์มากขึ้น โดย Gamble และคณะ [17] นำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์มาสกัดด้วยอะซิโตนที่ 50-60 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งกวนเป็นเวลา 3-7 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิลงที่ 2-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 18 ชั่วโมง เพื่อให้โพลิโคซานอลตกตะกอน และนำไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเฮพเทน และอะซิโตน จะได้โพลิโคซานอลที่มีความบริสุทธิ์ 80-99 %

การนำเทคโนโลยีอื่นๆ มาประยุกต์ใช้ในการสกัด และทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์เพื่อที่จะลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ยิ่งยวด (Supercritical Carbon Dioxide) แทนการ

ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ และเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิส (Metanolysis) เพื่อแยกแอลกอฮอล์สายยาวออกจากไขผึ้ง โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึง (Novozyme 435) เป็นต้น

### 1.2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโพลิโคซานอล

การศึกษาลักษณะเฉพาะ พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analyte) ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง และการหาปริมาณที่แท้จริงของสารนั้นๆ ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะได้ผลออกมามีความน่าเชื่อถือหรือไม่ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง การเลือกวิธีวิเคราะห์ก็เป็นหนึ่งในนั้น ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์มีหลายเทคนิคที่นิยมใช้ ตัวอย่างเช่น

จิราภรณ์ และคณะ [22] ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วยเครื่อง GC รุ่น GC-17G เครื่องตรวจวัดชนิด FID ต่อพ่วงกับเครื่องประมวลผล CBM-102 โดยใช้คอลัมน์ ZebronZb-5 (5 % phenyl-95 % Diethylpolysiloxane) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร ตั้งค่าอุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (Injector port) และส่วนเครื่องตรวจวัด (Detector) เท่ากับ 360 องศาเซลเซียส ส่วนเตาอบ (Oven) ตั้งค่าอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส และคงที่ไว้ 10 นาที และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขรำข้าวในเบื้องต้นด้วย TLC จากนั้นเมื่อจึงยืนยันความบริสุทธิ์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ phenogel ที่ต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิด ELSD และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ 0.25 % กรดอะซิติกในโทลูอีน อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 2 บาร์ โดยฉีดตัวอย่างโพลิโคซานอลที่สกัดได้ละลายด้วยโทลูอีน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พบว่า แอลกอฮอล์ที่ได้จากส่วนที่ละลายในไอโซออกเทนและส่วนตกตะกอนมีความบริสุทธิ์ 98.01 % และ 94.54 %

## 1.3 ไขผึ้ง (Beeswax)

ไขผึ้ง หรือที่รู้จักทั่วไปว่าขี้ผึ้งนั้น ที่ถูกควรเรียกว่า ไขผึ้ง ลักษณะแสดงดังรูป 1.6 เพราะเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นไข (Wax) ผลิตจากต่อมไข (Wax glands) ซึ่งมีอยู่ 4 คู่ซ่อนอยู่ภายในปล้องท้องด้านล่างของผึ้งงาน ผึ้งงานตัวเต็มวัย จะมีต่อมไขนี้เจริญดีที่สุดเมื่อมีอายุประมาณ 2 อาทิตย์ โดยที่มันจะผลิตไขผึ้งออกมาในรูปของเกล็ดบางๆ สีขาว บริสุทธิ์เหมือนสีน้ำนม ผึ้งงานใช้เกล็ดไขผึ้งนี้ในการสร้าง ซ่อมแซม และปิดฝาหลอดรวง โดยจะใช้ขาคู่หลังเกี่ยวเกล็ดไข และส่งผ่านไปยังขาคู่หน้าซึ่งจะป้อนเกล็ดไขสู่กรามของผึ้ง ผึ้งงานใช้กรามเคี้ยวและตกแต่งเกล็ดไขในการสร้างรวงผึ้ง ไขผึ้งบริสุทธิ์มีกลิ่นคล้ายน้ำผึ้ง เป็นของแข็ง ลักษณะอ่อนนิ่ม เป็นมัน เมื่อหลอมเหลวจะกลับมีคุณสมบัติดังเดิมเมื่อเย็นตัวเมื่อเกิดการเผาไหม้ให้ควันน้อยปราศจากมลพิษไขผึ้งอาจมีสารอื่นๆ เช่น เกสรพรอพอลิสและน้ำผึ้งเจือปนด้วยทำให้สีและความหนาแน่นแตกต่างกันไป [29]

นักวิทยาศาสตร์ศึกษาพบว่า ไขผึ้งนี้เป็นสารที่สังเคราะห์มาจากน้ำตาลในระบบทางเดินอาหารของตัวผึ้งงาน และสำหรับผึ้งแต่ละรังที่จะผลิตไขผึ้งออกมาได้หนัก 1 หน่วย น้ำหนักนั้น มันจะต้องกินน้ำผึ้งเข้าไป 6.66-8.80 หน่วยน้ำหนัก จากความจริงข้อนี้ เห็นได้ว่ากรรมวิธีปฏิบัติที่คนเลี้ยงผึ้งสามารถทำให้ผึ้งงานสร้างรวงภายในคอนหรือกรอบรวง และนำคอนนั้นมาใช้ซ้ำแล้วซ้ำอีก หลังจากการสกัดน้ำผึ้งออกจากรวง เป็นวิธีปฏิบัติที่มีส่วนช่วยเพิ่มผลผลิตน้ำผึ้งจากรัง เพราะประหยัดพลังงานหรือน้ำผึ้งที่ผึ้งงานจะต้องใช้ในการสร้างรวงใหม่ [30]

รูป 1.4 ไขผึ้ง

**- วิธีการเก็บไขผึ้ง**

1. ไขผึ้งที่หลอมแล้วต้องห่อหุ้มด้วยพลาสติก ระบุขนาด น้ำหนัก และวัน เดือน ปี ที่ผลิต

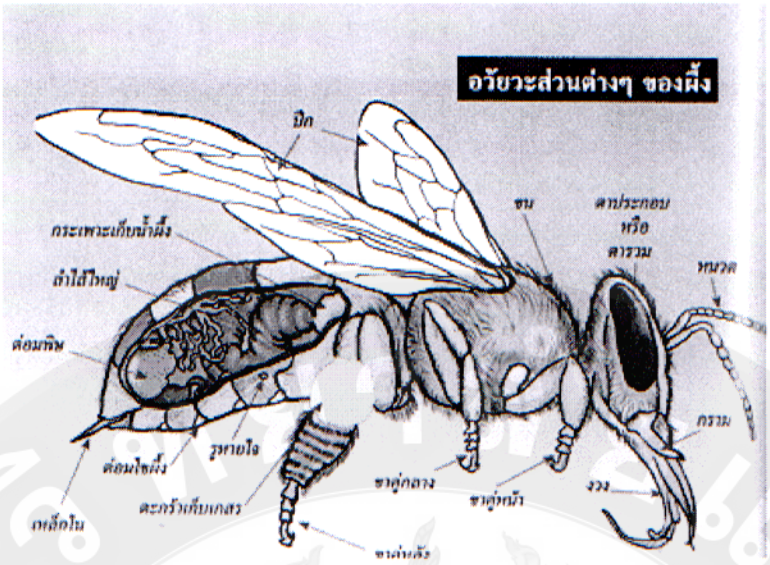
2. สถานที่เก็บไขผึ้ง เก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยห้องนั้นต้องสะอาด แห้ง อากาศถ่ายเทได้สะดวกและไขผึ้งต้องไม่สัมผัสกับ แสงอาทิตย์โดยตรง

**1.3.1 ผึ้ง**

ผึ้งเป็นแมลงสังคมชนิดหนึ่ง ที่จะเก็บสะสมน้ำหวานจากดอกไม้มาบ่มเป็นน้ำผึ้ง เพื่อเป็นอาหารคาร์โบไฮเดรตและเก็บเกสรจากดอกไม้เพื่อเป็นอาหารโปรตีน เกลือแร่ และวิตามิน ในบรรดาผึ้งที่เราพบอยู่ในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกัน 4 ประเภท คือ ผึ้งหลวง ผึ้งมิ้น ผึ้งโพรง เป็นผึ้งที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชีย และผึ้งพันธุ์ เป็นผึ้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศแถบยุโรป อเมริกา เป็นต้น

**ลักษณะทั่วไปของผึ้ง**

ลำตัวของผึ้งแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง แสดงดังรูป 1.7




รูป 1.5 กายวิภาคภายนอก และภายในของผึ้ง [29]

- ส่วนหัว

หนวด เป็นอวัยวะรับความรู้สึก และสัมผัสโดยเฉพาะการดมกลิ่นแทนจมูก

ตา ผึ้งมีตาประกอบใหญ่ 1 คู่ ช่วยให้มองเห็นได้ในระยะไกล และเป็นบริเวณกว้าง สามารถมองเห็นดอกไม้สีต่างๆ ได้ในระยะไกล

ปาก ของผึ้งเป็นแบบกัดดูด ประกอบด้วยอวัยวะเล็กๆ หลายส่วน คือ ปากบนมีกรามแข็งแรง 1 คู่ ด้านข้างเป็นฟัน ตรงกลางเป็นงวงทำหน้าที่ดูดน้ำหวาน

- ส่วนอก

ขา มี 3 คู่ ขาหลังมีอวัยวะพิเศษ สำหรับเก็บเกสรเรียกว่า ตะกร้าเก็บเกสร ผึ้งตัวผู้ และผึ้งนางพญาไม่มีอวัยวะนี้ เพราะไม่ต้องออกไปหาอาหาร

ปีก มี 2 คู่ คู่แรกใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ปีกคู่แรก และคู่หลังเกี่ยวกันด้วยตาขอเล็กๆ เรียงกันเป็นแถวเรียกว่า ฮามูไล (Hamulai)

- ส่วนท้อง

อวัยวะวางไข่ อยู่ที่ปล้องสุดท้ายในผึ้งงาน และผึ้งนางพญา บางส่วนของอวัยวะวางไข่จะดัดแปลงเป็นเหล็กใน มีลักษณะเป็นเข็มแหลม

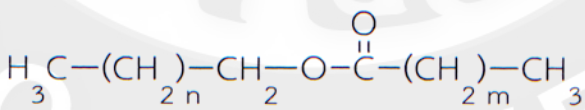
รูหายใจ เป็นรูเปิดด้านข้างส่วนอกและท้อง มีทั้งหมด 10 คู่ 3 คู่แรกอยู่ที่ส่วนอก อีก 7 คู่อยู่ที่ส่วนท้อง รูหายใจจะปิดเปิดตลอดเวลา เพราะมันหายใจเข้าออกทางรูเหล่านี้ รูหายใจจะติดต่อกับท่อลมและถุงลม ผึ้งมีถุงลมใหญ่มากอยู่ภายในลำตัว ช่วยพยุงตัวขณะที่ผึ้งบิน ทำให้ผึ้งสามารถบินเร็ว และบินได้ไกล

ขนตามลำตัว ของผึ้งมีจำนวนมาก เป็นขนละเอียด มีเส้นประสาทรับความรู้สึก และรับสัมผัส ขนที่ติดกับอกและท้องของผึ้ง สามารถรับความรู้สึกเกี่ยวกับแรงดึงดูดของโลก ทำให้สามารถบอกความสูงต่ำได้ในขณะที่บิน นอกจากนั้นขนยังรับสัมผัสการเคลื่อนไหวของศัตรู และรับสัมผัสอาหาร คือ เกสร และน้ำหวานจากพืช

ได้มีการค้นพบว่าผลิตภัณฑ์จากผึ้งมีคุณค่าทางสารอาหารทั้ง เอนไซม์ โคเอนไซม์ วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และฮอร์โมน ซึ่งทำงานประสานกันในการเสริมสุขอนามัย ดังนั้นผลิตภัณฑ์จากผึ้งจึงเหมาะที่จะจัดไว้ในอาหารประเภท อาหารบำบัดโรค อย่างสมบูรณ์แบบที่สุด ซึ่งผ่านการพิสูจน์อันเป็นที่ยอมรับมานานนับพันๆ ปี น้ำผึ้งมิใช่ผลิตภัณฑ์จากผึ้งเพียงอย่างเดียวที่ได้รับการ ค้นพบว่ามีคุณประโยชน์จากมวลมนุษย์ชาติ ยังมีผลิตภัณฑ์อื่นๆ อีกหลายอย่างจากผึ้ง เช่น เกสรดอกไม้จากผึ้ง ไขผึ้ง นมผึ้ง พรอพอลิส แม้กระทั่งพิษผึ้ง ก็พบว่ามีคุณประโยชน์เช่นกัน ผึ้งเป็นแมลงที่มีคุณประโยชน์มากในทางการเกษตรโดยช่วยผสมเกสรพืช ทำให้พืชที่ต้องใช้ผึ้งเป็นแมลงผสมเกสรติดผลมากขึ้น และการเลี้ยงผึ้งยังเป็นอาชีพที่สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งการนำผึ้งมาเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมได้ผลิตภัณฑ์จากผึ้งที่คุณค่าทางเศรษฐกิจได้แก่ น้ำผึ้ง เกสรผึ้ง พรอพอลิส รอยัล เยลลี ไขผึ้ง พิษผึ้ง และตัวอ่อนจากผึ้ง ซึ่งมีคุณค่ามากมาย และสามารถนำมาแปรรูปได้หลากหลายเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตจากผึ้ง [34]

### 1.3.2 องค์ประกอบของไขผึ้ง

ไขผึ้งมีโครงสร้างทางเคมีเหมือนกับไขทั่วไป คือ เอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่กลีเซอรอลที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีสายยาวมาก มีลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้อง แสดงดังรูป 1.8



**รูป 1.6** โครงสร้างทั่วไปของไข

ผึ้งงานต้องกินน้ำตาลหรือน้ำผึ้ง จำนวนมากถึง 8 กิโลกรัม เพื่อผลิตไขผึ้งได้เพียง 1 กิโลกรัม ไขผึ้งจึงมีองค์ประกอบของ โมเลกุลของธาตุหลักเช่นเดียวกับน้ำผึ้ง คือ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยมีสัดส่วนของสารประกอบชนิดต่างๆ ดังตาราง 1.2

**ตาราง 1.2** สัดส่วนของสารประกอบชนิดต่างๆ ในไขผึ้ง [31]

| องค์ประกอบ | ปริมาณ (%) |
|---|---|
| ไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbons) | 14 |
| โมโนเอสเทอร์ (Monoesters) | 35 |
| ไดเอสเทอร์ (Diesters) | 14 |
| ไตรเอสเทอร์ (Triesters) | 3 |
| ไฮดรอกซีโมโนเอสเทอร์ (Hydroxy Monoesters) | 4 |
| ไฮดรอกซีโพลีเอสเทอร์ (Hydroxy Polyesters) | 8 |
| กรดเอสเทอร์ (Acid Esters) | 1 |
| กรดโพลีเอสเทอร์ (Acid Polyesters) | 2 |
| กรดอิสระ (Free Acid) | 12 |
| แอลกอฮอล์อิสระ (Free Alcohols) | 1 |
| สารที่ยังไม่ทราบชนิด (Unidentified) | 6 |

### 1.3.3 แหล่งที่มาของไขผึ้ง

ไขผึ้ง หรือ ขี้ผึ้ง (Beeswax) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากรังของผึ้ง เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันอิสระสายยาวกับแอลกอฮอล์สายยาว ได้เป็น ไขผึ้ง ดังรูป 1.7 เป็นตัวอย่างสมการของไขที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ได้แก่ ไมริซิลปาล์มิเตต (Myricyl palmitate) ซึ่งพบในไขผึ้งเป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากไมริคอลแอลกอฮอล์ (Myricol alcohol) และกรดปาล์มิติก (Palmitic acid) เป็นต้น

กรดปาล์มิติก ไมริคอลแอลกอฮอล์ ไขผึ้งไมริซิลปาล์มิเตต น้ำ

**รูป 1.7** สมการการสร้างไขผึ้งไมริซิลปาล์มิเตต

ไขผึ้งส่วนใหญ่ได้มาจากการเลี้ยงผึ้งอุตสาหกรรมหรือผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) โดยรวบรวมจากรวงผึ้งเก่า (Old comb) รวงส่วนเกิน (Burr comb) และจากส่วนที่ได้มาจากการปาดรวงน้ำผึ้ง (Capping wax) ก่อนนำไปเข้าเครื่องสลัดน้ำผึ้ง ไขผึ้งที่ได้จากแหล่งที่มาต่างกันมีผลต่อคุณภาพของไขผึ้ง ดังนี้ [32]

**1.3.3.1 ไขผึ้งที่ได้จากการนำรวงผึ้งเก่ามาหลอม**

มักมีสีคล้ำ เพราะมีสิ่งเจือปนมาก เช่น ชันผึ้ง เกสรผึ้ง และคราบดักแด้ต้องนำไปฟอกสีก่อน ถ้าต้องการขายให้ได้ราคาสูงขึ้น ไขผึ้งที่ได้มาจากส่วนนี้ราคาถูกที่สุด เพราะมีสิ่งเจือปน ได้แก่สารพวกคาโรทีนอยด์ และไอโอดีน

**1.3.3.2 ไขผึ้งที่ได้จากรวงส่วนเกิน**

เมื่อทำการขูดทำความสะอาดคอนผึ้งที่ผึ้งกำลังสร้างรวงส่วนเกิน ผึ้งงานสร้างรวงส่วนเกินขึ้นมาตรงบริเวณที่มีช่องว่างในรัง ซึ่งกว้างเกินระยะช่องผึ้ง (Bee space) หรือ 3/8 นิ้ว ที่ผึ้งใช้เป็นทางเดินเพื่อการติดต่อกันระหว่างผึ้งงานด้วยกันเอง รวงส่วนเกินนี้มักเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ผึ้งรังนั้นมีประชากรมากขึ้นเพราะนางพญาไข่ดก และแหล่งอาหารในธรรมชาติอุดมสมบูรณ์

**1.3.3.3 ไขผึ้งที่ได้จากการปาด หรือเปิดฝารวงน้ำผึ้ง**

ก่อนที่จะนำคอนน้ำผึ้งไปเข้าเครื่องสลัดน้ำผึ้งไขผึ้งที่ได้จากการปาดรวงน้ำผึ้งเป็นไขผึ้งที่มีคุณภาพดีที่สุด ไขผึ้งชนิดนี้มักใช้ทำเครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง

**1.3.4 คุณสมบัติของไขผึ้ง**

**1.3.4.1 ลักษณะทางกายภาพ**

ไขผึ้งบริสุทธิ์จะไม่มีสีหรือเห็นเป็นสีใสๆ โปร่งแสง ไขผึ้งละลายได้ดีในน้ำมัน โดยเฉพาะน้ำมันสน แต่ไม่ละลายในน้ำ ถ้านำไขผึ้งที่แข็งไปต้มในน้ำ ไขผึ้งจะหลอมละลายลอยตัวอยู่ที่ผิวน้ำ [31]

**1.3.4.2 จุดหลอมเหลว**

ไขผึ้งมีจุดหลอมเหลวเฉลี่ยที่ 63-65 องศาเซลเซียส ถ้าได้รับความร้อนสูงกว่าจุดหลอมเหลว จะเกิดเปลวไฟหรือติดไฟ ลุกไหม้เหมือนแก๊ส จะเป็นอันตราย ดังนั้นการหลอมไขผึ้ง ควรใช้ความร้อนจากไอน้ำหรือนึ่งในน้ำร้อน [30]

**1.3.4.3 ค่าสะปอนนิฟิเคชัน**

ค่าสะปอนนิฟิเคชัน หมายถึง จำนวนมิลลิกรัมของ KOH ที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ไขมันหรือน้ำมันอย่างสมบูรณ์ จำนวน 1 กรัม ได้เป็นสบู่และกลีเซอรอล ซึ่งค่าสะปอนนิฟิเคชันใช้เป็นตัวชี้บ่งขนาดของโมเลกุล ไขผึ้งมีค่าสะปอนนิฟิเคชันเท่ากับ 80-105 [29]

#### 1.3.4.4 ค่าไอโอดีน

ค่าไอโอดีน คือจำนวนกรัมของไอโอดีนที่ทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน ณ คาร์บอนตำแหน่งที่ไม่อิ่มตัวของไขมันหรือน้ำมัน จำนวน 100 กรัม ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ว่าไขมันหรือน้ำมันนั้นมีองค์ประกอบที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเท่าใด ถ้ามีค่าไอโอดีนสูงแสดงว่าประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง การหาค่าไอโอดีนหาได้หาได้หลายวิธี เช่น วิธีวิจ (Wij method) ใช้รีเอเจนต์ที่เป็นสารละลายไอโอดีนโมโนคลอไรด์ในสารละลายผสมของกรดน้ำส้มและคาร์บอนเตตระคลอไรด์ วิธีฮานัส (Hanus method) ใช้ไอโอดีนโบรไมด์แทนไอโอดีนโมโนคลอไรด์ในวิธีของวิจ [29]

### 1.3.5 การนำไปใช้ประโยชน์

ไขผึ้งที่บริสุทธิ์จากธรรมชาติจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากไขผึ้งนั้นมีคุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไขเทียม ไขผึ้งนอกจากนำไปทำเทียนไขแล้วยังใช้ทำเครื่องสำอาง กระบวนการทำ ผ้าบาติก งานโลหะ ใช้เป็นสารกันน้ำ สารขัดเงา สารหล่อลื่น ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้ [31]

1. ใช้ทำเครื่องสำอาง ประมาณร้อยละ 35-40 เป็นส่วนผสมของครีมต่างๆ โลชั่น น้ำมันแต่งผม และลิปสติก

2. ใช้ในงานเภสัชกรรม ประมาณร้อยละ 25-30

3. ใช้ทำเทียนไข ประมาณร้อยละ 20 เทียนไขจากผึ้งนำมาใช้ในกิจกรรมทางศาสนา

4. ใช้ทำอื่นๆ ประมาณร้อยละ 10-20 เช่น อุตสาหกรรมน้ำผึ้ง โดยใช้ในการผลิตแผ่นรังเทียม เพื่อประหยัดเวลาในการสร้างรวงรังให้แก่ผึ้ง ทำให้เก็บน้ำผึ้งได้มากขึ้น

## 1.4 ลิปิด

ลิปิดเป็นสารชีวโมเลกุลที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน นอกจากนี้อาจประกอบด้วยธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส [33] ลิปิดเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ของแอลกอฮอล์กับกรดไขมัน (Fatty acid) มีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย แต่มีโครงสร้างโดยทั่วไปที่เหมือนกันคือ จะมีส่วนของโครงสร้างที่เป็นไฮโดรคาร์บอน (-CH) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว (Non-polar) มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) จึงไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ลิปิดบางชนิดอาจประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (Polar) มีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophillic) ทำให้ลิปิดเหล่านี้มีคุณสมบัติทั้งชอบน้ำ และไม่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุล เรียกคุณสมบัติแบบนี้ว่า แอมฟิไฟล์ (Amphiphiles) (เป็นภาษากรีกแปลว่า ชอบทั้งคู่) ลิปิดเหล่านี้จะ

ทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่ทำให้ลิปิดที่เกลียดน้ำสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ลิปิดที่มีคุณสมบัติเป็นแอมฟิไฟล์ ได้แก่ ฟอสโฟกลีเซอไรด์ (Phosphoglycerides) และสฟิงโกลิปิด (Sphingolipids)

**1.4.1 แบ่งตามลักษณะของการทำหน้าที่** [34]

1. ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน ได้แก่ กรดไขมัน (Fatty acid) ไข (Waxes) และ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerol)

2. ลิปิดที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเมมเบรน ได้แก่ ฟอสโฟลิปิด (Phospholipids) กลีเซอโรฟอสโฟลิปิด (Glycerophospholipids) สเตอรอยด์ (Steroids)

3. ลิปิดที่ทำหน้าที่อื่นๆ เช่น เป็นตัวให้สัญญาณ (Signal) เป็นโคแฟคเตอร์ (Cofactor) และสารสี (Pigments)

**1.4.2. แบ่งตามโครงสร้างทางเคมี** [34]

1. ลิปิดอย่างง่าย (Simple lipid) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ แบ่งย่อยได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ ไขมันและน้ำมัน (Fat and oil) กับไข (Waxes)

2. ลิปิดประกอบ (Compound lipid) เป็นสารประกอบที่เกิดจากเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารประกอบอื่นๆ รวมอยู่ด้วย ลิปิดกลุ่มนี้ได้แก่ ฟอสโฟลิปิด สฟิงโกลิปิด และไกลโคลิปิด

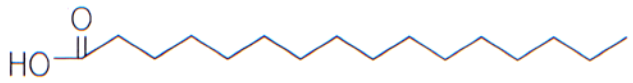
3. อนุพันธ์ของลิปิด (Derived lipid) เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวของลิปิดธรรมดา และลิปิดประกอบ ซึ่งยังคงคุณสมบัติความเป็นลิปิดอยู่ ได้แก่ กรดไขมัน กลีเซอรอล มอโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ รวมทั้งแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

4. ลิปิดเบ็ดเตล็ด (Miscellaneous lipid) เป็นลิปิดที่ไม่เข้าพวกในกลุ่มทั้ง 3 ได้แก่ สเตอรอยด์ และ เทอร์พีน

**1.4.3 กรดไขมัน (Fatty acid)**

กรดไขมัน (Fatty acid) เป็นกรดที่เกิดในธรรมชาติจากการไฮโดรลิซิสไตรกลีเซอไรด์ (เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน) กรดไขมันที่พบโดยทั่วไปจะมีจำนวนของคาร์บอนเป็นเลขคู่ ที่พบมาก คือ 16 หรือ 18 อะตอม และจะต่อกันเป็นสายยาวไม่ค่อยพบแตกกิ่งก้านสาขา และขดเป็นวงปิด กรดไขมัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ [40]

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) หมู่แอลคิลจะมีแต่พันธะเดี่ยว เช่น กรดไมริสติก กรดปาล์มิติก กรดสเตียริก ดังรูป 1.8 เป็นต้น



**รูป 1.8** โครงสร้างของกรดปาล์มิติก

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids) หมู่แอลคิลจะมีพันธะคู่อยู่ด้วย เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก ดังรูป 1.9 เป็นต้น

**รูป 1.9** โครงสร้างของกรดโอเลอิก

**สมบัติของกรดไขมัน** [35]

1. กรดไขมันส่วนมากมีจำนวน C อะตอมระหว่าง $C_{12}$-$C_{18}$ ชนิดที่มีจำนวน C อะตอมน้อยกว่า 12 ได้แก่ กรดบิวทาโนอิก $C_3H_7COOH$ ที่พบในเนย

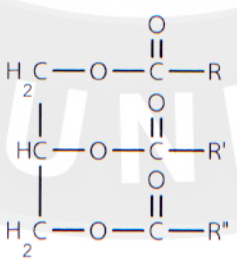
2. กรดไขมันไม่ละลายน้ำ

3. กรดไขมันจะมีจุดเดือด และจุดหลอมเหลวสูงขึ้นตามจำนวนคาร์บอนอะตอมที่เพิ่มขึ้น

4. กรดไขมันอิ่มตัวมีจุดเดือดสูงกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว ที่มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกัน

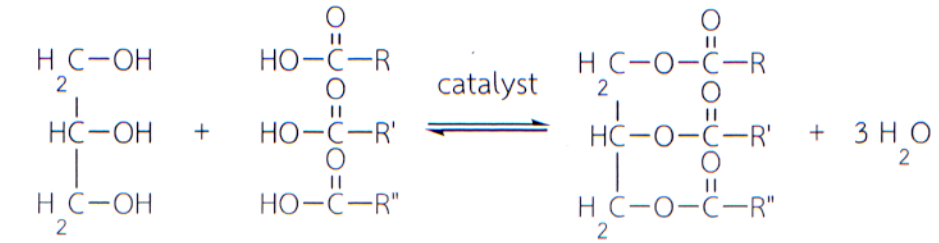
### 1.4.4 ไขมันและน้ำมัน

ไขมันและน้ำมัน (Fat and oil) คือ สารอินทรีย์ประเภทลิปิดชนิดหนึ่ง มีหมู่ฟังก์ชันเหมือนเอสเทอร์ จึงจัดเป็นสารประเภทเอสเทอร์ชนิดหนึ่งที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ พบทั้งในพืชและสัตว์ เป็นสารให้พลังงาน คือ ไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม ให้พลังงานประมาณ 9 แคลอรี ไขมันและน้ำมัน จะคงตัวอยู่ในรูปสารประกอบประเภทเอสเทอร์ชนิดหนึ่งที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เรียกว่าไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) [35] ดังรูป 1.10



**รูป 1.10** โครงสร้างทั่วไปของไขมันและน้ำมัน [35]

ไขมันและน้ำมัน เกิดจากแอลกอฮอล์ที่มี -OH 3 หมู่ ที่เรียกว่ากลีเซอรอลรวมกับ กรดอินทรีย์ที่เรียกว่ากรดไขมัน จะได้สารที่เรียกว่า ไตรซิล กลีเซอรอล (Triacyl glycerol) ดังรูป 1.11

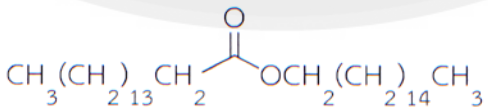



**รูป 1.11** การสังเคราะห์ไขมันและน้ำมัน [35]

ไขมันเป็นของแข็งที่มักพบในสัตว์ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว มากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น ไขวัว ไขควาย ส่วนน้ำมันเป็นของเหลวที่มักพบในพืชประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันอิ่มตัว เช่น น้ำมันมะกอก ซึ่งไขมันมีจุดเดือดสูงกว่าน้ำมัน ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายไม่มีน้ำ เช่น เบนซีน และไขมันและน้ำมันเสียจะเกิดกลิ่นเหม็นหืน ซึ่งเกิดจากพันธะคู่ในกรดไขมัน หรือน้ำมันที่ไม่อิ่มตัวจะถูกออกซิไดซ์ได้ด้วยออกซิเจนในอากาศ หรืออาจเกิดการไฮโดรไลซิสกับน้ำ โดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ได้กรดไขมันโมเลกุลเล็กที่ระเหยง่ายมีกลิ่นเหม็นหืน

### 1.4.5 ไข (Wax)

ไข (Wax) เป็นลิปิดที่พบทั้งพืช และสัตว์ เป็นของแข็งและไม่ละลายน้ำ พบเป็นสารเคลือบเส้นผม ขนนก และขนสัตว์ต่างๆ ทำให้มีลักษณะเป็นเงา และเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ไขยังขับจากหู ที่เรียกว่าขี้หู (Ear Wax) เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนของเยื่อหู นอกจากนี้ยังมีไขที่ขับออกจากต่อมไขมันใต้ผิวหนังเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ทำให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้นอยู่เสมอ ในพืชมักพบเป็นสารเคลือบผิวของใบไม้ และเปลือกไม้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ องค์ประกอบของไขเป็นของผสมของเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ที่มีโซ่ยาว ส่วนที่มาจากกรดไขมันจะมีจำนวนอะตอมคาร์บอนเป็นเลขคู่ ระหว่าง 14–36 อะตอม สำหรับส่วนที่มาจากแอลกอฮอล์มีจำนวนอะตอมคาร์บอน เป็นเลขคู่เช่นกัน ระหว่าง 16–30 อะตอม ตัวอย่างของไขที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ได้แก่ ไมริซิลปาล์มิเตต (Myricyl Palmitate) ซึ่งพบในไขผึ้ง (Beeswax) เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากไมริคอลแอลกอฮอล์ (Myricol Alcohol) และกรดปาล์มิติก (Palmitic Acid) เซทิลปาล์มิเตต (Cetyl Palmitate) ซึ่งพบในไขปลาวาฬ ซึ่งแสดงดังรูป 1.12 โดยเป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากเซทิลแอลกอฮอล์ (Cetyl Alcohol) กับกรดปาล์มิติกเป็นต้น



**รูป 1.12** โครงสร้างของเซทิลปาล์มิเตต

การแบ่งประเภทของไขนั้นหากแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีจะยุ่งยากมากเนื่องจากส่วนใหญ่แล้วเป็นสารผสมที่ซับซ้อน โดยปกติไข (Wax) ที่พบอยู่ตามธรรมชาติ จะมี 3 อย่างด้วยกัน คือ ไขจากสัตว์ ไขจากพืช และไขจากแร่ธาตุ ดังนั้นจึงมีการจัดแบ่งประเภทของไขตามแหล่งที่มา ออกเป็น 3 ประเภท และได้แสดงลักษณะทั่วไปของไขจากพืช จากสัตว์ และแร่ธาตุ ดังตาราง 1.3

**ตาราง 1.3** ลักษณะทั่วไปของไขจากพืช จากสัตว์ และแร่ธาตุ

| ชนิดไข | จุดหลอมเหลว (°C) | สี | แหล่งที่มา | ลักษณะ |
|---|---|---|---|---|
| **ก) ไขจากพืช** | | | | |
| ไขรำข้าว | 40-70 | น้ำตาล | รำข้าว | แข็ง เปาะ |
| ไขอ้อย | 76-82 | ขาวเทา | ลำต้นอ้อย | เหนียวกึ่งแข็ง |
| ไขคาร์นูบา | 82-85 | เหลือง | ปาล์มคาร์นูบา | แข็ง เปาะ |
| ไขแรฟเฟีย | 79-67 | น้ำตาล | ปาล์มซาโก | แข็ง |
| **ข) ไขจากสัตว์** | | | | |
| ไขผึ้ง | 60-67 | เหลือง | ผึ้ง | เหนียวปั้นได้ |
| ไขสเปอมาซิติ | 42-46 | ขาว | ปลาวาฬ | อ่อนนุ่ม |
| ไขไชนีสอินเซค | 80-83 | ขาว | แมลง | แข็งมาก |
| **ค) ไขแร่ธาตุ** | | | | |
| พาราฟิน | 65-70 | ขาว | ปิโตรเลียม | เป็นผลึก |
| มอนเทน | 60-76 | เหลือง | ถ่านหิน | แข็ง เปราะ |
| ซินเซอโร | 68-70 | เหลือง | ปิโตรเลียม | ไมโครคริสตัลไลน์ |

**1. ไขจากสัตว์**

ชนิดที่สำคัญได้แก่ไขผึ้ง (Beeswax) ไขผึ้งจะมีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลเป็นเส้นตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา และเป็นพันธะเดี่ยวทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีไขอื่นๆ เช่น ไขสเปอมาซิติ (Spermaceti Wax)

เป็นไขที่สกัดจากไขสมองของปลาวาฬ ไขไชนีสอินเซค (Chinese Insect Wax) พบในแมลงที่จีน ญี่ปุ่น นิยมนำมาผลิตเทียนไขและยา ส่วนไขที่สกัดได้จากขนแกะ คือลาโนลิน (Lanolin) เป็นต้น

**2. ไขจากพืช**

เป็นแหล่งสำคัญของไขซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากไขพืชให้ความมันวาวสูง เช่น ไขรำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการนำน้ำมันรำข้าว ไขอ้อยเป็นส่วนเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำตาลทราย ไขจากข้าวสาลี ไขฝ้าย ไขปาล์ม และข้าวโอ๊ต เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีไขพืชอีกหลายชนิดที่พบในพืชต่างประเทศ เช่น ไขคาร์นูบา (Carnauba) ซึ่งสกัดได้จากส่วนใบของต้นปาล์มคาร์นูบา ซึ่งเป็นไขที่มีจุดหลอมเหลวสูง องค์ประกอบหลักของไขคาร์นูบา คือไมริซิลซีโรเตท ไมรีสซีลแอลกอฮอล์ ซีริลแอลกอฮอล์ และกรดอะซีติก

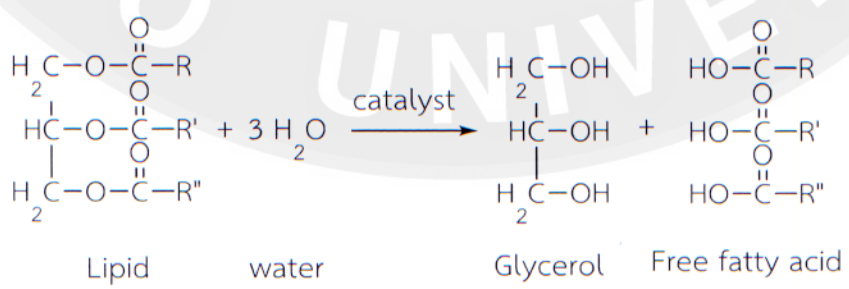
**3. ไขจากแร่ธาตุหรือสารไฮโดรคาร์บอน (Mineral or Hydrocarbon Wax)**

รวมตัวกับน้ำมันอันเกิดจากซากพืชซากสัตว์มาทับถมและถ่านหิน เช่น ไขพาราฟิน ซึ่งประกอบด้วยสารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นเส้นตรง สารไฮโดรคาร์บอนที่แตกกิ่งก้าน และที่เป็นวงแหวน มักจะใช้ทำน้ำมันหล่อลื่น ลิปสติก สารขัดเงา และสารยึดเกาะ นอกจากนั้นยังมีไขชนิดอื่นๆ เช่น มอนแทน (Montan) และซินเซอโร (Syncero) เป็นต้น

### 1.4.6 ปฏิกิริยาของลิปิด

#### 1.4.6.1 ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส

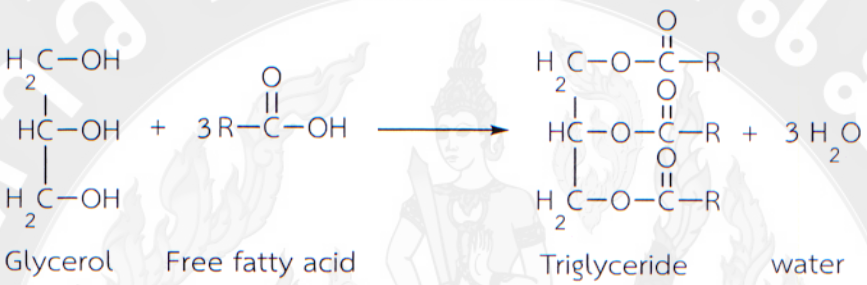
ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของไขมันและน้ำมันเกิดได้ทั้งในสภาวะกรดและเบส เมื่อทำการไฮโดรลิซิสไขมันหรือน้ำมันโดยใช้กรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน 3 โมเลกุล ในการย่อยอาหารพวกไขมันก็จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส เช่นเดียวกันโดยใช้เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สมการทั่วไปของการไฮโดรลิซิสไขมันหรือน้ำมันโดยใช้กรดหรือหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังรูป 1.13 [36]




**รูป 1.13** ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสไขมันโดยใช้กรดหรือหรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

**1.4.6.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน**

น้ำมันหรือไขมันเป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกเอสเทอร์ในกลุ่มไขมันธรรมดา (Simple lipid) จากการแบ่งโครงสร้างทางเคมีตามวิธีของ Bloor โดยเกิดจากปฏิกิริยาเกิดหมู่เอสเทอร์ (Esterification) ของสารจำพวกแอลกอฮอล์ โดยการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างแอลกอฮอล์กับกรดไขมันตรงตำแหน่งหมู่คาร์บอกซิล ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันและน้ำ เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้เมื่อมีน้ำมากและสามารถเร่งปฏิกิริยาให้ดำเนินไปข้างหน้าได้โดยการให้ความร้อนแก่ระบบ ได้แก่ กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดอินทรีย์ประเภทกรดไขมัน แสดงดังรูป 1.14

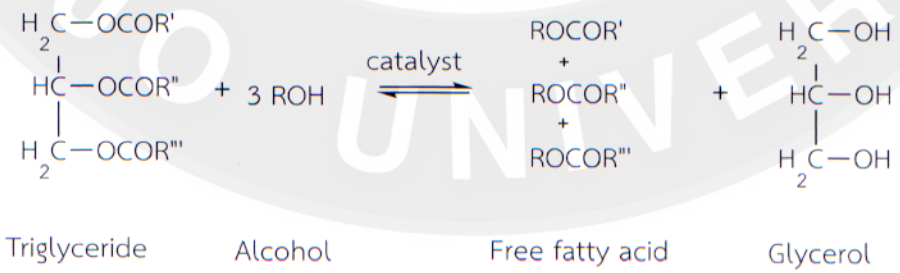



**รูป 1.14** ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของน้ำมันพืช

**1.4.6.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน**

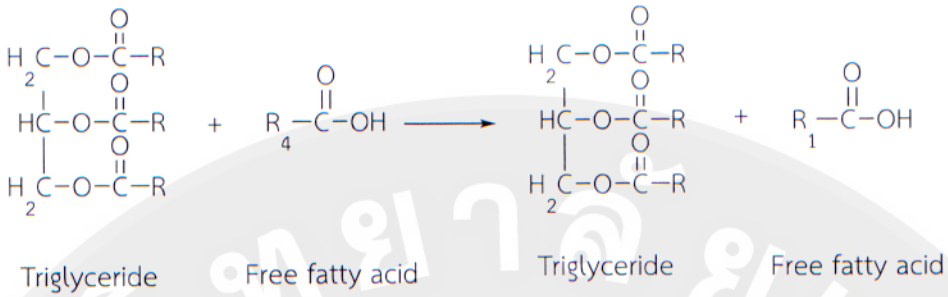
ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน หมายถึง กระบวนการของปฏิกิริยาเคมีที่มีการแทนที่หมู่แอลกอฮอล์ในเอสเทอร์ด้วยแอลกอฮอล์อีกชนิดหนึ่ง ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันยังแบ่งเป็นปฏิกิริยาย่อยๆ ได้ 3 ปฏิกิริยาดังนี้

**Alcoholysis** เป็นการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์ แสดงดังรูป 1.15



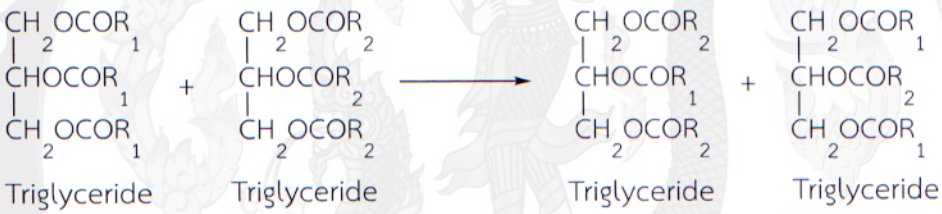

**รูป 1.15** ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ Alcoholysis

**Acidolysis** เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับกรดไขมันอิสระ แสดงดังรูป 1.16




**รูป 1.16** ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ Acidolysis

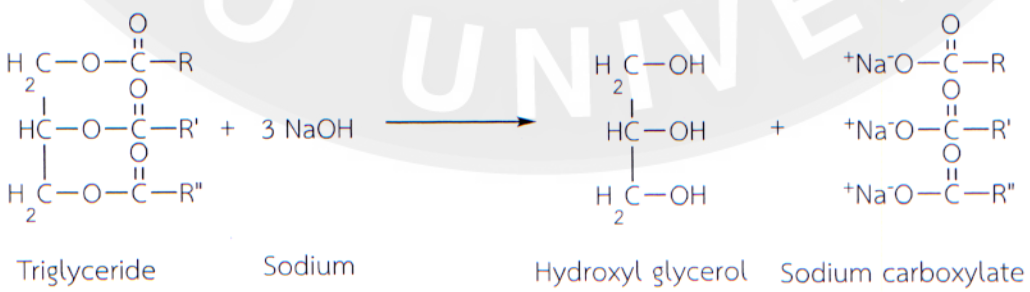
**Ester-ester interchange (Interesterification)** เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรกลีเซอไรด์กับไตรกลีเซอไรด [36] แสดงดังรูป 1.17




**รูป 1.17** ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันแบบ Ester-ester interchange

### 1.4.6.4 ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน

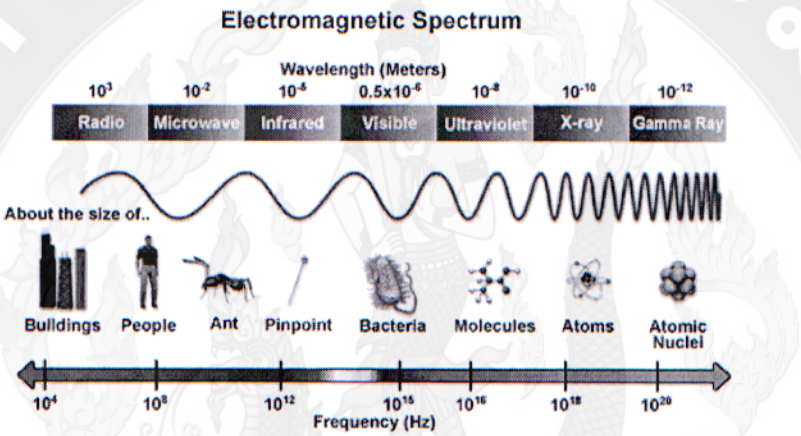
ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (Sponification) เป็นปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสไขมัน และน้ำมันด้วยเบส เป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากไขมันและน้ำมันทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ได้เกลือโซเดียมของกรดไขมันกับกลีเซอรรอล ($RCOO^- Na^+$) ซึ่งก็คือ สบู่ กับกลีเซอรอล ดังรูป 1.18 [37]




**รูป 1.18** ปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชัน (Sponification)

## 1.5 ไมโครเวฟ (Microwave)

ไมโครเวฟ (Microwave) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic spectrum) ที่มีความยาวคลื่นอยู่ระหว่างคลื่นวิทยุ (Radio wave) กับอินฟราเรด (Infrared) มีความถี่ ระหว่าง 300-30,000 MHz ดังรูป 1.19 [38] โดยไมโครเวฟเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า เช่นเดียวกับแสงสว่าง โดยอยู่ในช่วงของคลื่นวิทยุความถี่สูง (High frequency radio wave) เมื่อรังสีมีความถี่สูงขึ้น ความยาวคลื่นจะลดลง คลื่นที่มีความถี่สูงมาก ความยาวคลื่นจึงสั้นมาก ดังนั้น คลื่นชนิดนี้จึงได้ชื่อว่าไมโครเวฟ ซึ่งแปลว่าคลื่นสั้นมาก รังสีอินฟราเรด (Infrared) แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) และรังสีเอกซ์ (X-ray) เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเช่นเดียวกัน แต่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าไมโครเวฟ [39]

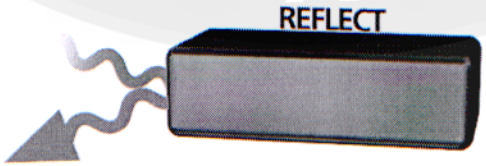



รูป 1.19 สเปกตรัมแม่เหล็กไฟฟ้า

### 1.5.1 ลักษณะคลื่นไมโครเวฟ

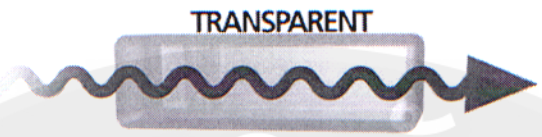
ลักษณะคลื่นไมโครเวฟมีลักษณะเด่น 3 ประการ

**การสะท้อนกลับ (Reflection)** คลื่นไมโครเวฟเมื่อไปกระทบกับภาชนะที่เป็นโลหะหรือมีส่วนผสมของโลหะ คลื่นไมโครเวฟไม่สามารถทะลุผ่านภาชนะดังกล่าวได้ จะสะท้อนกลับหมด ดังรูป 1.20 ดังนั้นวัตถุที่ใส่ในภาชนะที่เป็นโลหะก็จะไม่ได้รับความร้อน



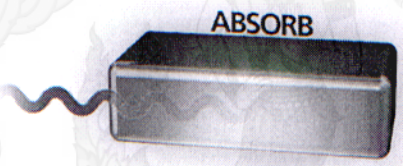

รูป 1.20 การสะท้อนกลับของคลื่นไมโครเวฟ

**การส่งผ่าน (Transmission)** คลื่นไมโครเวฟสามารถทะลุผ่านภาชนะที่ทำด้วยแก้ว กระดาษ ไม้ เซรามิกและพลาสติกได้ เพราะภาชนะดังกล่าวไม่มีส่วนผสมของโลหะ ดังที่แสดงรูป 1.21




**รูป 1.21** การส่งผ่านของคลื่นไมโครเวฟ

**การดูดซึม (Absorption)** ปกติวัตถุโดยทั่วๆ ไป จะประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำซึ่งจะดูดซึมคลื่นไมโครเวฟ ดังรูป 1.22 ทำให้วัตถุร้อนอย่างรวดเร็ว และอีกนัยหนึ่งเมื่อโมเลกุลของน้ำดูดซึมคลื่นไมโครเวฟแล้วจะสลายตัวในทันที ไม่สะสมในวัตถุ

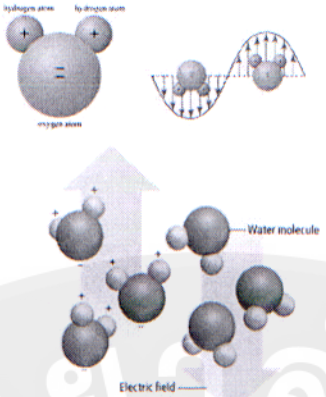



**รูป 1.22** การดูดซึมของคลื่นไมโครเวฟ

### 1.5.2 หลักการให้ความร้อน

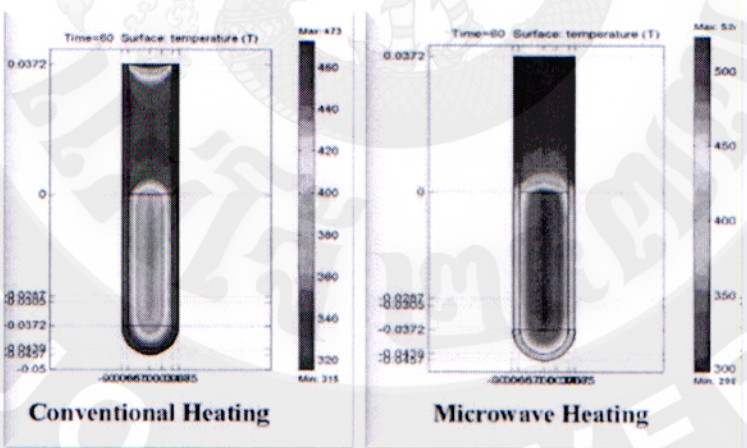
ในเตาไมโครเวฟมีอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ เรียกว่า แมกนีตรอน (Magnetron) ใช้สำหรับผลิตคลื่นไมโครเวฟ คลื่นไมโครเวฟที่ผลิตออกมานี้มีความถี่ 2,450 MHz ซึ่งจะปล่อยออกมาที่ช่องว่างภายในเตาที่มีผนังเป็นโลหะ คลื่นไมโครเวฟจะสะท้อนไปมาอยู่ภายในเตา และถูกดูดกลืนโดยอาหารหรือเครื่องดื่มที่เราใส่เข้าไป การดูดกลืนที่ไม่สม่ำเสมอจะทำให้บางตำแหน่งเกิดจุดร้อน (Hot spots) ขึ้น [39]

เตาไมโครเวฟทำให้วัตถุเกิดความร้อนโดยคลื่นไมโครเวฟ ที่มีความถี่สูง ทำให้โมเลกุลของน้ำเกิดการสั่นสะเทือน และชนโมเลกุลอื่นๆ ต่อไปจนเกิดเป็นพลังงานจลน์ และพลังงานจลน์จะกลายสภาพเป็นพลังงานความร้อน ดังรูป 1.25 จึงทำให้วัตถุร้อนอย่างรวดเร็วและเร็วกว่าการให้ความร้อนด้วยระบบอื่นๆ [38]




**รูป 1.23** โมเลกุลของน้ำที่เปลี่ยนทิศสลับไปมาอย่างรวดเร็ว ตามทิศทางของสนามไฟฟ้าทำให้เกิดความร้อน [38]

การให้พลังงานความร้อนโดยใช้คลื่นไมโครเวฟกับการให้พลังงานความร้อนแบบปกติ จะมีกลไกการให้ความร้อนที่ต่างกัน โดยการให้พลังงานความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ จะเกิดความร้อนจากภายในสู่ภายนอก ทำให้วัตถุเกิดความร้อนที่เร็วยิ่งขึ้น สำหรับการให้พลังงานความร้อนแบบปกติ จะเป็นการพาความร้อนจากภายนอกค่อยๆ เข้าสู่ภายในวัตถุ ดังรูป 1.24




(ก) (ข)

**รูป 1.24** กลไกการให้พลังงานความร้อน (ก) พลังงานความร้อนปกติ (ข) พลังงานความร้อนจากคลื่นไมโครเวฟ

## 1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Irmark และคณะ (2006) [6] ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณของโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขผึ้ง อ้อย และข้าวสาลี ซึ่งเป็นแหล่งที่พบโพลิโคซานอล โดยจะใช้เฮกเซนในการสกัด และไฮโดรไลซ์ด้วย 1 M NaOH ในเมทานอล นาน 30 นาที พบว่าน้ำมันจมูกข้าวสาลีมีโพลิโคซานอลรวมสูงสุด 628 mg/kg จากข้าวสาลี 164 mg/kg และไขเปลือกอ้อย 270 mg/kg ในขณะที่ไขผึ้งสีน้ำตาลสามารถสกัดโพลิโคซานอลได้ 20 และ 45 เท่าของน้ำมันจมูกข้าวสาลี และไขเปลือกอ้อยตามลำดับ

จิราภรณ์ และคณะ (2551) [22] สกัดโพลิโคซานอล เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของไขรำข้าวของไทย พบว่าประกอบด้วย น้ำมันร้อยละ 55.91 แวกซ์เอสเทอร์ ร้อยละ 40.67 ไขมันแอลกอฮอล์อิสระสายยาว ร้อยละ 2.56 และอื่นๆ ร้อยละ 1.86 โดยนำไขรำข้าวมาสกัดด้วยปฏิกิริยาสะปอนนิฟิเคชันโดยใช้ KOH ในเอทานอลในการสกัด และทำให้บริสุทธิ์ด้วยโทลูอีน และไอโซออกเทน และนำโพลิโคซานอลมาวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย GC และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย HPLC พบว่าโพลิโคซานอลประกอบด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความยาวอยู่ในช่วง 16-36 อะตอม โดยองค์ประกอบหลักที่ละลายในโทลูอีน ไอโซออกเทน และส่วนตกตะกอนจากไอโซออกเทนได้แก่ ไขมันแอลกอฮอล์ที่มีความยาว C26 (ร้อยละ 21.4) C24 (ร้อยละ 29.5) และ C30 (ร้อยละ 33.1) ที่ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 94 โดยไขรำข้าวของไทยสามารถสกัดโพลิโคซานอลได้ปริมาณสุทธิร้อยละ 26.56

ดุษฎี และคณะ (2550) [40] ได้ศึกษาการสกัดโพลิโคซานอลจากไขรำข้าว โดยการเร่งปฏิกิริยา สะปอนิฟิเคชันด้วย (16.0กรัม) 1.43 N KOH ใน 80 % เอทานอล รีฟลักซ์ในช่วงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายผสม ไอโซออกเทน น้ำ และเอทานอล พบว่าโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขรำข้าว ประกอบด้วย ไขมันแอลกอฮอล์ที่มีความยาวคาร์บอนตั้งแต่ 22-36 อะตอม และโพลิโคซานอลที่สกัดมีความบริสุทธิ์ 97.88 %

Sumit Nandi (2014) และคณะ [41] สกัด Triacontanol เข้มข้นจากไขรำข้าวโดยใช้การเร่งปฏิกิริยาด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 1300 วัตต์ ความต่างศักย์ 230 โวลต์ และความถี่ 50 Hz โดยมีอัตราส่วนของไขผึ้งต่อ6 % (w:v) โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 : 2 โดยทำการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน และนาน 35 นาที หลังจากการไฮโดรไลซ์แล้ว พบว่าสามารถสกัดโพลิโคซานอลได้ปริมาณ triacontanol 42.95 % มากที่สุด ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC

Dunford และคณะ (2010) [42] ศึกษาชนิดของตัวทำละลายและอุณหภูมิที่มีต่อผลผลิต และปริมาณองค์ประกอบของโพลิโคซานอล จากส่วนต่างๆ ของข้าวสาลี เช่น ฟาง รำ และจมูกข้าว โดนำมาสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน และเอทานอลที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 80-125 องศาเซลเซียส พบว่า

ฟางข้าวสาลีที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณโพลิโคซานอลสูงที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนต่างๆ ของ ข้าวสาลีที่นำมาศึกษา และสกัดได้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น องค์ประกอบโพลิโคซานอลจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย และส่วนของข้าวสาลีที่ใช้ โดยฟางข้าวสาลีมี Octacosanol สูงสุด

López-Mesas (2003) [43] ได้ปรับปรุงการสกัดไขที่ได้จากขนสัตว์ด้วยไมโครเวฟ แทนการสกัดแบบ Soxhlet system เพื่อให้ได้ปริมาณไขที่มากที่สุดในเวลาอันสั้น โดยนำตัวอย่างไขจากขนสัตว์ 1.25 กรัม ในตัวทำละลายอะซิโตนและเฮกเซน (1 : 1 (v/v)) 10 มิลลิลิตร ทำการสกัดโดยไมโครเวฟเป็นระยะเวลา 8 นาที ใช้พลังงาน magnetron ที่ปล่อยออกมาคือ 90% (675 W) ภายใต้เงื่อนไขเหล่านี้ไม่จำเป็นที่จะต้องใช้ตัวอย่างไขที่แห้ง และการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟสำหรับตัวอย่างไขจากขนสัตว์นี้มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับระบบวิธีการสกัดแบบ Soxhlet

Terigar และคณะ (2011) [44] ได้ศึกษาการสกัดน้ำมันจากถั่วเหลืองและรำข้าวโดยใช้ไมโครเวฟ เพื่อลดเวลาในการสกัด สำหรับการสกัดน้ำมันจากแป้งถั่วเหลืองและรำข้าวโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 3 : 1 ในการสกัดโดยใช้ไมโครเวฟจะถูกปรับให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการสกัดที่สูงสุด คือใช้อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัดนาน 21 นาที

Boukhchina และคณะ (2009) [45] ได้ศึกษาการสกัดโพลิโคซานอลจากข้าวโพด สามสายพันธุ์ คือ GH2547 ซึ่งพบว่ามีโพลิโคซานอลสูกว่า พันธุ์ท้องถิ่น และ Astro ทำการสกัดโดยนำข้าวโพดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นเติมแอลกอฮอล์ แล้วนำไปปั่นเหวียงเป็นเวลา 15 นาที และนำไประเหยแอลกอฮอล์ออกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แล้วเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ เพื่อช่วยการสกัด จากนั้นนำไประเหยในสภาวะ $N_2$ พบว่าองค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สำคัญที่มีอยู่ในข้าวโพด คือ Dotriacomtanol (C32-OH), Triacontanol (C34-OH), Tetracosanol (C24-OH) และเปลือกข้าวโพดมีโพลิโคซานอลอยู่ 72.7-110.9 mg/kg

Jackson และ Eller (2006) [18] ศึกษาการแยกสายอะลิฟาติกแอลกอฮอล์สายยาวจากไขผึ้งใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเมทาโนไลซิสในก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความดันสูง โดยทำการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งด้วยสารละลาย KOH (1 : 2 w/v ของไข และ 6 % KOH) แล้วนำเข้าไมโครเวฟ (1300 วัตต์ 230 โวลต์ 50 เฮิรตซ์) ต่อกับคอนเด็นเซอร์ที่ออกแบบมาเป็นพิเศษ ประมาณ 35 นาที จากนั้นรอให้เย็น แล้วล้างด้วยน้ำร้อนหลายๆ ครั้ง เพื่อกำจัด OH ที่มากเกินพอและสบู่ที่เกิดขึ้นระหว่างเกิดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกส่วนที่เป็นตะกอนของแอลกอฮอล์สายยาว (โพลิโคซานอล) แล้วนำไปอบแห้ง พบว่าแอลกอฮอล์สายยาวจากไขผึ้ง ที่มาจากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ซึ่งถูกเลี้ยงใน Peoria รัฐ Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบไปด้วย Tetracosanol (C24-OH) 9.0%, Hexacosanol (C26-OH) 13.9 %, Octacosanol (C28-OH) 18.3

%, Triacontanol (C30-OH) 36.9 %, Dotriacontanol (C32-OH) 20.8 % และ Tetratriacontanol (C34-OH) 1.0 %

สุภัทรา และ คณะ (2551) [46] ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขรำข้าวของไทย พบว่าโพลิโคซานอลในไขรำข้าวของไทยประกอบด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความยาวสายคาร์บอนอยู่ในช่วง 22-36 อะตอม โดยมี triacontanol, (C30-OH) มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 24.5 ขององค์ประกอบของแอลกอฮอล์ทั้งหมด

Vali และคณะ (2003) [47] พบว่าไขรำข้าวที่มีสิ่งเจือปนอยู่มีจุดหลอมเหลว 75-79 องศา-เซลเซียส โดยสิ่งเจือปนที่สำคัญในไขรำข้าวส่วนมากจะเป็นยางไม้ (resinous) และสามารถกำจัดออกได้โดยใช้ sodiumborohydride ใน isopropanol เนื่องจากยางมีส่วนผสมของ alipatic aldehydes, fatty alcohol, fatty acid ในขณะที่ไขรำข้าวที่มีความบริสุทธิ์ 99 % มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 80-83 องศาเซลเซียส โดยงานวิจัยนี้ทำการสกัดน้ำมันรำข้าวที่เจือปนออกจากไข ด้วยวิธี soxhlet โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย จากนั้นทำการกำจัดสิ่งเจือปนโดยการรีฟลักซ์ด้วยเฮกเซน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที จากนั้นรีฟลักซ์ด้วยไอโซโพรพานอล ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วจึงทำการไฮโดรไลซ์ไขรำข้าวด้วย 30% KOH ใน ไอโซโพรพานอล ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

# บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

## 2.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

### 2.1.1 สารเคมี

ตาราง 2.1 สารเคมี

| ชื่อสารเคมี | สูตรเคมี | บริษัทผู้ผลิต | ประเทศ |
|---|---|---|---|
| Acetic acid | $CH_3COOH$ | Lab Scan | Thailand |
| Acetonitrile | $CH_3CN$ | Thermo Fisher Scientific | U.S.A |
| Chloroform | $CHCl_3$ | Lab Scan | Thailand |
| Ethanol | $C_2H_5OH$ | องค์การสุรา กรมสรรพสามิต | Thailand |
| Ethyl acetate | $CH_3COOC_2H_5$ | Lab Scan | Thailand |
| Heptanes | $C_7H_{16}$ | Lab Scan | Thailand |
| Hexane | $CH_3(CH_2)_4CH_3$ | Lab Scan | Thailand |
| Iodine resublimed | - | QReC | New Zealand |
| Isooctane | $(CH_3)_3CCH_2CH(CH_3)$ | Lab Scan | Thailand |
| Methanol | $CH_3OH$ | Lab Scan | Thailand |
| Isopropanol | $(CH_3)_2CHOH$ | Lab Scan | Thailand |
| Potassium hydroxide | KOH | Lab Scan | Thailand |
| Silica gel | $SiO_2$ | Lab Scan | Thailand |
| Sodium hydroxide | NaOH | Lab Scan | Thailand |
| Sodium sulfate (Anhydrous) | $Na_2SO_4$ | Lab scan | Thailand |
| Toluene | $C_6H_5CH_3$ | Merck | Germany |
| ไขผึ้งสีขาว | - | เคมีภัณฑ์ (จำหน่าย) | Germany |
| ไขผึ้งสีเหลือง | - | ประดิษฐ์ฟาร์ม อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ | ประเทศไทย |
| น้ำมันรำข้าวคิง | - | น้ำมันบริโภคไทย จำกัด | ประเทศไทย |

ตาราง 2.2 สารมาตรฐาน

| ชื่อสารเคมี | สูตรเคมี | บริษัทผู้ผลิต | ประเทศ |
|---|---|---|---|
| 1-Docosanol | $C_{22}H_{46}O$ | SIGMA-ALDRICH | Germany |
| Dotriacontane | $C_{32}H_{66}$ | SIGMA-ALDRICH | Switzerland |
| 1-Eicosanol | $C_{20}H_{52}O$ | SIGMA-ALDRICH | India |
| 1-Hexacosanol | $C_{26}H_{54}O$ | SIGMA-ALDRICH | Switzerland |
| Hexadecane | $C_{16}H_{34}$ | Fluka | Switzerland |
| Lignoceryl alconol | $C_{24}H_{50}O$ | SIGMA-ALDRICH | U.S.A |
| 1-Octadecanol | $C_{18}H_{38}O$ | SIGMA-ALDRICH | Japan |
| 1-Octacosanol | $C_{28}H_{58}O$ | SIGMA-ALDRICH | U.S.A |
| Palmitic acid | $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ | Merck | Malaysia |
| Stearic acid | $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ | Fluka | Switzerland |
| Stearyl alcohol | $C_{18}H_{36}O_2$ | SIGMA-ALDRICH | Japan |
| 1-Triacontanol | $C_{30}H_{62}O$ | SIGMA-ALDRICH | U.S.A |

### 2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ตาราง 2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

| เครื่องมือ | บริษัทผู้ผลิตและรุ่น | ประเทศ |
|---|---|---|
| Analytical balance | Mettler Toledo รุ่น ML204 | Switzerland |
| Hot plate and stirrer | Fisher scientific | U.S.A. |
| Hot air oven | GALLENKAMP รุ่น A050714 | Germany |
| Gas chromatography | Agilent Technologies รุ่น 7890A | U.S.A |
| Microwave oven | Samsung รุ่น ME711K | Malaysia |
| Rotary Evaporator | Tokyo Rikakikai | Japan |

## 2.2 วิธีการทดลอง

### 2.2.1 การหาความชื้นของไขผึ้ง

ชั่งไขผึ้ง 0.30XX กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส กระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำมาหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยการคำนวณ ดังนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ (g)} - \text{น้ำหนักหลังอบ (g)}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ (g)}} \times 100$$

### 2.2.2 การหาจุดหลอมเหลวของไขผึ้ง

บรรจุไขผึ้งลงในหลอดแคปิลารีให้สูงประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร จากปลายหลอดแคปิลารี และผูกติดกับเทอร์โมมิเตอร์ โดยปลายกระเปาะหลอดแคปิลารีเสมอกับปลายกระเปาะของเทอร์โมมิเตอร์ เสียบเทอร์โมมิเตอร์เข้ากับจุกคอร์ก และยึดติดกับแคลมพ์ เทน้ำมันพาราฟินลงในบีกเกอร์ และจุ่มปลายเทอร์โมมิเตอร์ลงในบีกเกอร์ ให้ความร้อนอย่างช้าๆ สังเกต และบันทึกช่วงอุณหภูมิ เมื่อไขผึ้งในหลอดแคปิลลารีเริ่มหลอมเหลว จนกระทั่งหลอมเหลวหมด

### 2.2.3 การหาองค์ประกอบของไขผึ้งด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC)

นำไขผึ้งมาทดสอบองค์ประกอบกับสารมาตรฐานคือ ไฮโดรคาร์บอน น้ำมันรำข้าว อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว และกรดไขมันอิสระ ด้วย TLC

**การเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว**

ชั่งน้ำมันรำข้าว 0.50 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร เติมโทลูอีน 2 มิลลิลิตร และ 1% sodium methoxide ($NaOCH_3$) ในเมทานอล 2 มิลลิลิตร ปิดฝาเกลียวให้แน่น เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นคลายฝาเกลียวออก นำไปใส่ไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 1000 วัตต์ เป็นเวลา 10 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมกรดอะซิติก เพื่อหยุดปฏิกิริยา ล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ดูดส่วนบนเก็บไว้ เติม $Na_2SO_4$ (anhydrous) เพื่อดูดน้ำ

**วิธีการเตรียมแผ่น TLC**

ชั่งซิลิกาเจล 45 กรัม ละลายด้วยน้ำปริมาตร 130 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงบนแผ่นกระจก เกลี่ยให้เรียบ เนื่องจากการเคลือบซิลิกาเจลนั้น ต้องสม่ำเสมอ ไม่เกิดรอยแตกบนผิวหน้าที่ฉาบ เช็ดซิลิกาเจลที่เหลือบริเวณขอบของแผ่นกระจกออก ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าซิลิกาเจลแห้ง

หยดตัวอย่างไขผึ้งที่ละลายในเฮกเซน น้ำมันรำข้าว ไฮโดรคาร์บอน และอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว และกรดไขมัน ที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจุ่มแผ่น TLC ลงในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1) โดยปริมาตร ทิ้งไว้จน

สารละลายเคลื่อนที่ถึงขีดสิ้นสุดบนแผ่น TLC จากนั้นนำไปอังเกล็ดไอโอดีนที่อิ่มตัว จึงปรากฏแถบการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC

**2.2.4 การกำจัดไตรกลีเซอไรด์ที่เจือปนในไขผึ้ง**

โดยนำไขผึ้ง 40 กรัม เติมเฮกเซน 280 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองไขผึ้ง แล้วล้างด้วยเฮกเซนร้อน 140 มิลลิลิตร จำนวน 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไขผึ้งที่ได้ไปอบเพื่อกำจัดเฮกเซน แล้วนำมารีฟลักซ์ซ้ำด้วยไอโซโพรพานอล 140 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองไขผึ้ง นำไปอบเพื่อกำจัดไอโซโพรพานอล จากนั้นตรวจสอบไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดไตรกลีเซอร์ไรด์ด้วย TLC โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1) โดยปริมาตร ไขผึ้งปราศจากไตรกลีเซอไรด์ที่ได้ถูกนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

**2.2.5 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ ในการเตรียมสารละลายเบส KOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง**

**- เตรียมสารละลาย KOH ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 M ที่ละลายในเอทานอล**

ชั่ง KOH 1.40 กรัม ละลายใน 80 % เอทานอล นำไปกวนด้วย Magnetic Stirrer ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลาย KOH เข้มข้น 0.5M

ชั่ง KOH 2.80 กรัม ละลายใน 80 % เอทานอล นำไปกวนด้วย Magnetic Stirrer ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลาย KOH เข้มข้น 1.0 M

ชั่ง KOH 5.61 กรัม ละลายใน 80 % เอทานอล นำไปกวนด้วย Magnetic Stirrer ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ได้สารละลาย KOH เข้มข้น 2.0 M

- ทำการเตรียมสารละลาย KOH ที่ความเข้มข้นดังกล่าวอีก 4 ชุด โดยใช้ตัวทำละลาย โทลูอีน เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียม อีเทอร์ จากนั้นเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการเตรียมสารละลายเบส KOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อนำไปใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง

**2.2.6 การเตรียมเบสแก่ในการแยกโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง**

**2.2.6.1 การเตรียมสารละลาย 2.0 M Etanolic KOH**

ชั่ง KOH 11.22 กรัม ละลายใน 80 % เอทานอล นำไปกวนด้วย magnetic stirrer ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย KOH เข้มข้น 2.0 M

**2.2.6.2 การเตรียมสารละลายเบส 2.0 M Etanolic NaOH**

ชั่ง NaOH 8.00 กรัม ละลายใน 80 % เอทานอล นำไปกวนด้วย magnetic stirrer ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย NaOH เข้มข้น 2.0 M

**2.2.7 การแยกโพลิโคซานอลจากไขผึ้งด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันโดยการให้ความร้อนโดยตรง**

**2.2.7.1 การแยกโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย 2.0 M Etanolic KOH**

- ชั่งไขผึ้งสีขาว 20 กรัม นำมาเติม 2.0 M KOH ที่ละลายใน 80 % เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมารีฟลักซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กวนด้วย magnetic stirrer พร้อมกับให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ มาทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยมีเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น แต่เปลี่ยนมาใช้ไขผึ้งสีเหลือง

**2.2.7.2 การแยกโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย 2.0 M Etanolic NaOH**

- ชั่งไขผึ้งสีขาว 20 กรัม นำมาเติม 2.0 M NaOH ที่ละลายใน 80 % เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมารีฟลักซ์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กวนด้วย magnetic stirrer พร้อมกับให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ มาทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยมีเฟสเคลื่อนที่คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น แต่เปลี่ยนมาใช้ไขผึ้งสีเหลือง

**2.2.8 การศึกษาเวลา ความเข้มข้นของเบส และกำลังไฟฟ้าในการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งเพื่อสกัดโพลิโคซานอล โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน (Hydrolyzation) ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ**

**2.2.8.1 การไฮโดรไลซ์ไขผึ้งด้วยสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 M ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลาต่างๆ**

นำไขผึ้งที่ปราศจากไตรกลีเซอไรด์ มาให้ความร้อนจนไขผึ้งหลอมละลาย นำมาเติม KOH ที่ละลายใน 80% เอทานอล ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียม คือ 0.5, 1.0 และ 2.0 M แล้วนำมาทำการไฮโดรไลซ์ โดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เป็นเวลา 60, 90 และ 120 วินาที จากนั้นทำการทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC

**2.2.8.2 ความเข้มข้นของเบสที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที เพื่อสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง**

การสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งด้วยสารละลาย KOH ใน 80 % เอทานอล

ชั่งไขผึ้งสีเหลือง 0.300 กรัม นำมาเติม 0.5 M KOH ที่ละลายในตัวเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ ด้วยการให้พลังงานความร้อนจากไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ มาทดสอบความสมบรูณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย คลอโรฟอล์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1)

การสกัดโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย KOH ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 M เลือกความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถไฮโดรไลซ์ไขผึ้งได้สมบูรณ์มาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ทำการสกัดโพลิโคซานอลโดยใช้ไขผึ้งสีขาวเป็นวัตถุดิบเหมือนขั้นตอนข้างต้น

**2.2.8.3 การไฮโดรไลซ์ไขผึ้งเพื่อสกัดโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย KOH เข้มข้น 0.5 M ใน 80 % เอทานอล ด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที**

นำไขผึ้งสีเหลืองที่ผ่านการการกำจัดสิ่งเจือปน มาให้ความร้อนจนไขผึ้งหลอมละลาย นำมาเติม KOH ใน 80 % เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 M แล้วนำมาไฮโดรไลซ์โดยใช้พลังงานความร้อนจากไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที จากนั้นทำการทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC

ทำการไฮโดรไลซ์เพื่อสกัดโพลิโคซานอลโดยใช้ไขผึ้งสีขาวเป็นวัตถุดิบเหมือนขั้นตอนข้างต้น

**2.2.9 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์**

**2.2.9.1 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์**

นำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ 20 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมโดยปริมาตร ระหว่าง โทลูอีน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปรีฟลักซ์เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง โดยแบ่งเป็นสองช่วง โดยช่วงแรกให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส พร้อมกับการกวนตลอดเวลา 30 นาที จากนั้นช่วงที่ 2 หยุดการกวนและลดอุณหภูมิลงที่ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นและเก็บชั้นโทลูอีนมาทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง โทลูอีน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ จากนั้นแยกชั้นโทลูอีนออกมาและนำไประเหยโทลูอีนออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เติมตัวทำละลายผสม ระหว่าง ไอโซออกเทน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) รีฟลักซ์เช่นเดียวกับครั้งแรก จากนั้นตั้งทิ้งไว้ เมื่อสารละลายแยกเป็นสองชั้นแล้ว ให้เก็บเฉพาะชั้นไอโซออกเทนมาตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของแอลกอฮอล์สายยาว นำตะกอนไปอบให้แห้ง จากนั้นนำตะกอนมาตรวจสอบด้วย TLC

**2.2.9.1 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับการตกผลึก**

นำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ 15 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายอะซิโตน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยกวนตลอดเวลา จากนั้นนำไปแช่เย็นเพื่อให้สารตกตะกอน แล้วกรองตะกอนที่ได้ นำตะกอนที่ได้มาเพิ่มความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอล โดยการรีฟลักซ์ด้วยสารละลายเฮพเทน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายลงในกรวยแยกสาร เติมน้ำร้อน 150 มิลลิลิตร ทำการเขย่า เพื่อสกัดให้กรดไขมันอิสระละลายในน้ำร้อน แล้วตั้งทิ้งไว้กระทั่งสารละลายแยกเป็นสองชั้น จากนั้นนำชั้นเฮพเทน มาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติมน้ำร้อนครั้งละ 150 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายแยกเป็นสองชั้นแล้วนำเฉพาะชั้นเฮพเทนไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้แอลกอฮอล์ตกตะกอน นำส่วนตะกอนที่ได้ไปกรองแล้วนำไปอบแห้ง เพื่อให้สารละลายเฮพเทนระเหยออกไป ดัดแปลงจาก จิราภรณ์ และคณะ (2008) [22] และ Gamble และคณะ (2003) [17]

นำชั้นน้ำไปตรวจสอบกรดไขมันสายยาวและนำตะกอนที่ได้ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลด้วย TLC โดยใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบไปด้วย คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1) โดยปริมาตร และใช้เครื่อง HPLC เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอล แล้วจึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)

**2.2.10 การยืนยันความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**

นำตัวอย่างตะกอนโพลิโคซานอลที่ทำให้บริสุทธิ์ มาทำการยืนยันความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอล โดยนำตะกอนโพลิโคซานอลทำการละลายด้วยไอโซโพรพานอล จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 291 nm โดยสภาวะที่ใช้แสดงดังตาราง 2.4

**ตาราง 2.4** สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วย HPLC

| พารามิเตอร์ | สภาวะ |
|---|---|
| คอลัมน์ | : Column Hypersil ODS C-18 ขนาด 5 ไมโครเมตร 4.0×250 มิลลิเมตร |
| วัฏภาคเคลื่อนที่ | : Acetonitrile : Methanol (4 : 1) |
| ตัวตรวจวัด | : UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น 291 nm |
| ปริมาณสารที่ฉีดเข้าไป | : 20 ไมโครลิตร |
| อัตราการไหล | : 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที |

**2.2.11 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)**

นำตัวอย่างตะกอนโพลิโคซานอลที่ทำให้บริสุทธิ์ มาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบ โดยนำส่วนของตะกอนโพลิโคซานอลทำการละลายด้วยไอโซโพรพานอล จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย GC โดยสภาวะที่ใช้แสดงดังตาราง 2.5

**ตาราง 2.5** สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วย GC

| พารามิเตอร์ | สภาวะ |
|---|---|
| คอลัมน์ | : HP-5 (5 % Phenyl-95 % methypolysiloxane) ใช้ตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน |
| แก๊สตัวพา | : แก๊สไนโตรเจน |
| ความดันเกจ | : แก๊สไนโตรเจน 75 psi, แก๊สไฮโดรเจน 60 psi, แก๊สออกซิเจน 5 psi |
| อุณหภูมิ | : อินเจคเตอร์ (Injector port) 280 องศาเซลเซียส |
| | : เครื่องตรวจวัด (Detector) 280 องศาเซลเซียส |
| | : เตาอบ (Oven) แบบสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิเริ่มต้น 150 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 280 องศาเซลเซียส และคงที่ไว้ 10 นาที |
| ปริมาณสารที่ฉีดเข้าไป | : 1.0 ไมโครลิตร Split less |

**2.2.12 การคำนวณหาร้อยละผลผลิตของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (%yield)**

นำไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ โดยการรีฟลักซ์ด้วยเฮกเซน และตามด้วยไอโซโพรพานอล จากนั้นนำมาไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80 % เอทานอล โดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ และผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยการสกัดตัวทำละลายโทลูอีน : น้ำ : เอทานอล 3 ครั้ง และสกัดต่อด้วยไอโซออกเทน : น้ำ : เอทานอล เก็บชั้นไอโซออกเทน ไปตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของโพลิโคซานอล จากนั้นนำตะกอนมากรอง และนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาคำนวณหา %Yield ของโพลิโคซานอล โดยคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\%\text{Yield} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอนหลังการทดลอง (g)}}{\text{น้ำหนักไขผึ้งหลัง purified beeswax (g)}} \times 100$$

# บทที่ 3 ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการแยก และเพิ่มความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลจากไขผึ้งสีขาวที่ได้จากประเทศเยอรมัน และไขผึ้งสีเหลืองสีเหลืองที่ได้มาจากประดิษฐ์ฟาร์ม อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ โดยขั้นตอนแรกนำไขผึ้งมาหาความชื้น และทำการศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของไขผึ้ง ด้วยเทคนิค TLC จากนั้นทำการแยกโพลิโคซานอลด้วย 2.0 M KOH และ NaOH ในเอทานอล รวมทั้งศึกษาการทำให้โพลิโคซานอลที่แยกได้ให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จากนั้นจึงจะทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ โพลิโคซานอลด้วยเทคนิค GC ต่อไป

## 3.1 การหาความชื้นของไขผึ้ง

ไขผึ้งที่ทำการศึกษามีอยู่ 2 ชนิด คือ ไขที่มีสีขาว และไขที่มีสีเหลือง โดยไขที่มีสีขาวนั้นจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม มีขนาดเล็ก ส่วนไขผึ้งสีเหลืองนั้นจะมีลักษณะเป็นก้อนกลม มีขนาดใหญ่ ซึ่งลักษณะเหล่านี้ขึ้นอยู่กับแม่พิมพ์ในการหล่อขึ้นรูปไขผึ้งของแต่ละแหล่งที่มา อย่างไรก็ตามไขผึ้งที่มาจากแหล่งที่มาแตกต่างกันอาจมีคุณสมบัติ หรือปริมาณสิ่งเจือปนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการ หาความชื้นของไขผึ้งสีขาว และสีเหลือง ซึ่งค่าร้อยละความชื้นของไขผึ้งได้แสดงดังตาราง 3.1

**ตาราง 3.1** ร้อยละความชื้นของไขผึ้ง สีขาว และสีเหลือง

| ไขผึ้ง | น้ำหนักก่อนอบเฉลี่ย (g) | น้ำหนักหลังอบ (g) | | | | ความชื้น (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | |
| ไขผึ้งสีขาว | 0.3069 | 0.3068 | 0.3065 | 0.3061 | 0.3065 | 0.2606±0.0807 |
| ไขผึ้งสีเหลือง | 0.3017 | 0.2674 | 0.2670 | 0.2669 | 0.2671 | 0.4972±0.0857 |

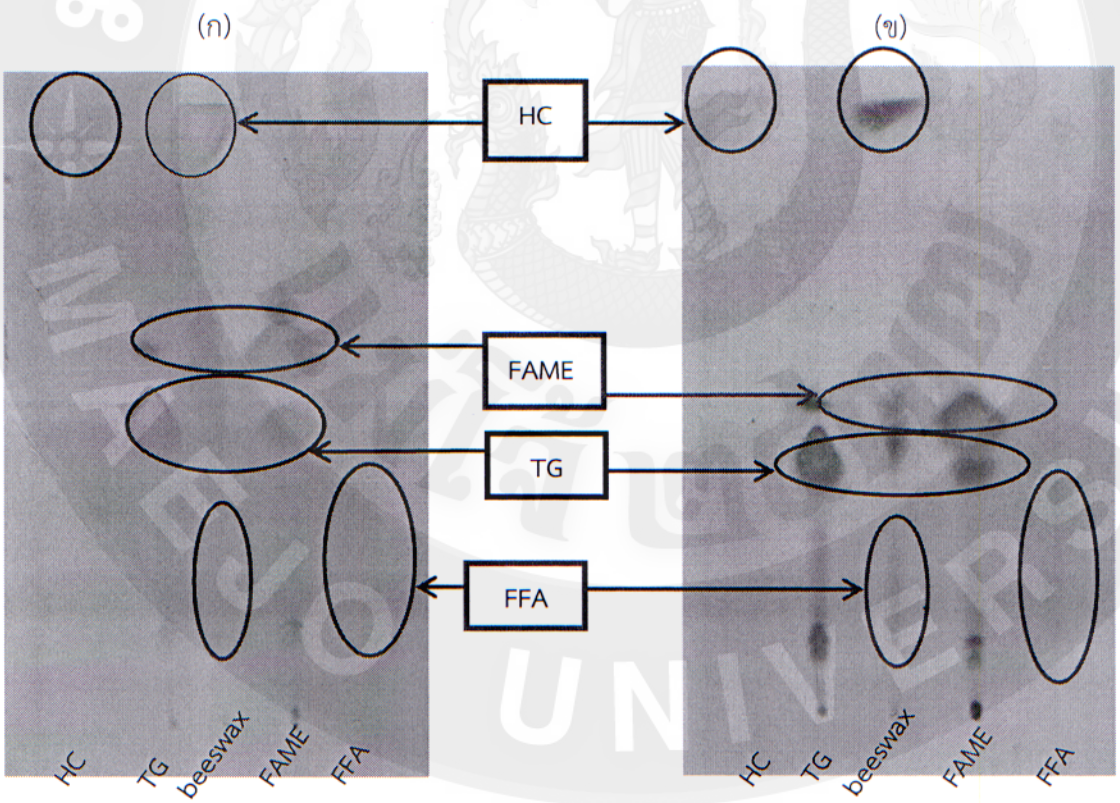
จากตาราง 3.1 พบว่า ไขผึ้งสีขาวมีความชื้นร้อยละ 0.2606±0.0807 และไขผึ้งสีเหลืองมีความชื้นร้อยละ 0.4972±0.0857 โดยค่าร้อยละความชื้นของไขผึ้งโดยทั่วไปจะอยู่ที่ 0.5% [35] ซึ่งค่าร้อยละความชื้นจะแสดงถึง คุณภาพของไขผึ้ง รวมถึงการเก็บรักษาไขผึ้ง พบว่าไขผึ้งมีความชื้นต่ำ นั่นคือไขผึ้งมีคุณภาพดี สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน

## 3.2 การศึกษาจุดหลอมเหลว

จุดหลอมเหลว คือ อุณหภูมิที่สารเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลว เมื่อได้รับพลังงานความร้อน จากการทดลอง พบว่า ไขผึ้งตัวอย่างมีช่วงหลอมเหลวอยู่ที่ 58-62 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าที่มีการรายงานไว้ว่าไขผึ้งมีจุดหลอมเหลวเฉลี่ยที่ 63-65 องศาเซลเซียส [30] ซึ่งต่างจากโพลิโคซานอลที่บริสุทธิ์ที่มีช่วงหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส [48] ซึ่งมี ไพรมารี อะลิฟาติก แอลกอฮอล์ (1° aliphatic alcohol) เป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จึงไม่มีสิ่งเจือปนอื่น ซึ่งช่วงหลอมเหลวของไขผึ้งที่ค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากมีส่วนประกอบของสิ่งเจือปนต่างๆ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ เป็นต้น

## 3.3 การหาประกอบของไขผึ้งด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC)

งานวิจัยนี้ได้มีการนำเทคนิค TLC มาใช้ในการตรวจสอบองค์ประกอบของไขผึ้งซึ่งคือ แวกซ์เอสเทอร์ โดยมีสารมาตรฐานไฮโดรคาร์บอน (HC) ไตรกลีเซอไรด์จากน้ำมันรำข้าว (TG) อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว (FAME) และสารมาตรฐานกรดสเตียริก (FFA) เป็นตัวเปรียบเทียบผลการศึกษาองค์ประกอบไขผึ้งสีขาวและสีเหลือง แสดงดังรูป 3.1




**รูป 3.1** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แสดงองค์ประกอบของไขผึ้ง (ก) ไขผึ้งสีขาว (ข) ไขผึ้งสีเหลือง

**หมายเหตุ**

HC คือ สารมาตรฐานไฮโดรคาร์บอน Hexadecane

TG คือ สารมารตฐานน้ำมันรำข้าว

Beeswax คือ ไขผึ้ง

FAME คือ สารมาตรฐานอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว

FFA คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก

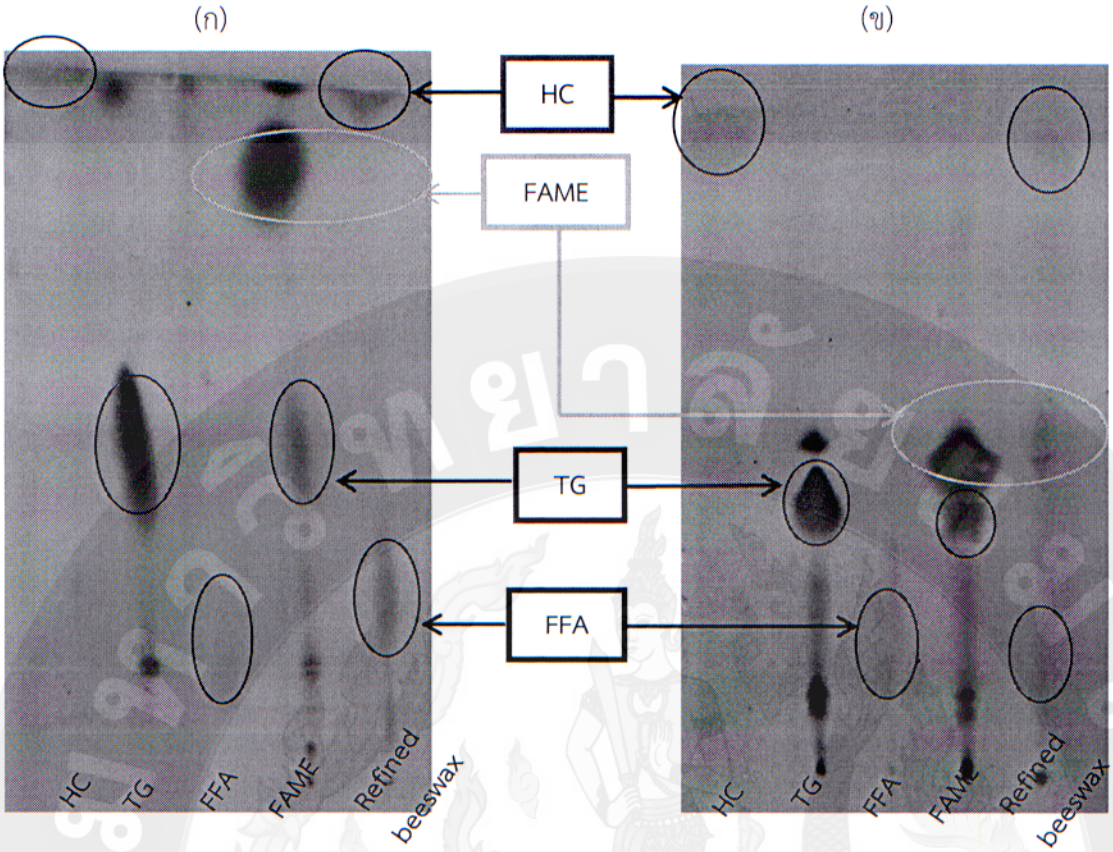
**เฟสเคลื่อนที่ คือ** เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1)

จากผลการศึกษาองค์ประกอบของไขผึ้งด้วย TLC พบว่าทั้งไขผึ้งสีขาว (ก) และสีเหลือง (ข) ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ไตรกลีเซอร์ไรด์ แวกซ์เอสเทอร์ กรดไขมันอิสระ ซึ่งยืนยันได้จากการเปรียบเทียบกับ สารมาตรฐานไฮโดรคาร์บอน ไตรกลีเซอร์ไรด์จากน้ำมันรำข้าว อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว และกรดไขมันอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gemble และคณะ ในปี 2003 [17] ที่ได้กล่าวถึงองค์ประกอบหลักของไขผึ้งว่าประกอบไปด้วย ไฮโดรคาร์บอน เอสเทอร์ และกรดไขมันอิสระ

ในการแยกโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง จึงมีความจำเป็นต้องทำให้วัตถุดิบไขผึ้งมีความบริสุทธิ์มากที่สุดก่อนที่จะนำไขผึ้งมาไฮโดรไลซ์ เพื่อให้ได้โพลิโคซานอลในการทดลองขั้นต่อไปจึงต้องมีการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งถือว่าเป็นสิ่งเจือปนออกจากไขผึ้งก่อนนำไปสกัดโพลิโคซานอล

## 3.4 การกำจัดไตรกลีเซอไรด์ที่เจือปนในไขผึ้ง

การกำจัดไตรกลีเซอไรด์ทำโดยดัดแปลงจากงานวิจัยของจิราภรณ์ และคณะ [22] ที่ได้ทำการสกัดโพลิโคซานอลจากไขรำข้าว โดยการนำไขผึ้งสีขาว และสีเหลือง มารีฟลักซ์ด้วยเฮกเซน จากนั้นทำการกรองไขตะกอน และล้างตะกอนด้วยเฮกเซนร้อน 2-3 ครั้ง จากนั้นรีฟลักซ์ซ้ำด้วยไอโซโพพานอล ผลการทดสอบ การกำจัดสิ่งเจือปนออกจากไขผึ้ง แสดงดังรูป 3.2




**รูป 3.2** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แสดงองค์ประกอบของ ไขผึ้งสีขาว (ก) และสีเหลือง (ข) ที่ทำการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ โดยการล้างด้วยเฮกเซน และไอโซโพรพานอล

**หมายเหตุ**

HC คือ สารมาตรฐานไฮโดรคาร์บอน hexadecane

TG คือ น้ำมันรำข้าว

FFA คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก

FAME คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว

Refined beeswax คือ ไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดไตรกลีเซอไรด์

**เฟสเคลื่อนที่คือ** เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1)

เมื่อนำไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข) ที่ผ่านการรีฟลักซ์ มาตรวจสอบองค์ประกอบ ผลการทดสอบแสดงดังรูป 3.2 โดยพบว่า ไตรกลีเซอไรด์ ในไขผึ้งถูกกำจัดออกไป เห็นได้จากในแถบของไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดไตรกลีเซอไรด์แล้ว ของ TLC ทั้งสองแผ่นไม่ปรากฏแถบของไตรกลีเซอไรด์ (TG) พบเพียงแถบของ กรดไขมันสายยาว (FFA) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (HC) ซึ่งยังคงมีเจือปนอยู่ และปรากฏแถบของสารประกอบเอสเทอร์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของไขผึ้งซึ่งสารประกอบในกลุ่มต่างๆ ที่กล่าวมา สามารถยืนยันได้ด้วยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานต่างๆ ที่ได้แสดงไว้ในรูป 3.2

ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการรีฟลักซ์ไขผึ้งด้วยเฮกเซน และตามด้วยการรีฟลักซ์ด้วยไอโซโพรพานอล สามารถกำจัด ไตรกลีเซอไรด์ออกจากไขผึ้งได้ ส่วนกรดไขมันสายยาว (FFA) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน (HC) จะถูกกำจัดในขั้นตอนอื่นๆ ต่อไป จากนั้นไขผึ้งที่กำจัดไตรกลีเซอไรด์แล้วถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสกัดแยกโพลิโคซานอลด้วยปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ต่อไป

## 3.5 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ ในการเตรียมสารละลายเบสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง

ไขผึ้งเป็นสารประกอบเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์สายยาวหรือโพลิโคซานอลมีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม การสกัดโพลิโคซานอลจากไขชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่คือการนำมาไฮโดรไลซ์หรือตัดพันธะเอสเทอร์ ด้วยเบสแก่ที่ละลายในตัวทำละลายต่างๆ เนื่องจากไขไม่ละลายน้ำ จึงต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น เมทานอล เอทานอล บิวทานอล ไอโซโพรพานอล เฮพเทน อะซีโทน โทลูอีน เบนซีน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น

ในขั้นตอนนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่มีต่อการละลายของ KOH และ NaOH ได้แก่ 80 % เอทานอล โทลูอีน เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยศึกษาการละลายที่ความเข้มข้น คือ 0.5, 1.0 และ 2.0 M ผลการทดลอง แสดงดังตาราง 3.2 นำข้อมูลที่ได้ไปพิจารณาในการเลือกชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นเบสที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดโพลิโคซานอล

จากผลการศึกษาความสามารถของตัวทำละลาย ซึ่งประกอบด้วย 80 % เอทานอล โทลูอีน เฮกเซน คลอโรฟอร์มและปิโตรเลียมอีเทอร์ ที่ใช้ในการเตรียมสารละลาย KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเบสทั้งสองชนิดสามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดได้ในอัตราที่แตกต่างกัน โดยพบว่า 80 % เอทานอล มีประสิทธิภาพในการทำละลายเบสได้ดีที่สุดในทุกความเข้มข้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ 80 % เอทานอล ในการเตรียมสารละลาย KOH และ NaOH ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสกัดโพลิโคซานอลขั้นตอนต่อไป

**ตาราง 3.2** ความสามารถในการละลายของ KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆใน ตัวทำละลายอินทรีย์

| ตัวทำละลาย/ความเข้มข้น | การละลายของ KOH | การละลายของ NaOH |
|---|---|---|
| - **80% เอทานอล** | | |
| 0.5 M | +++++ | +++++ |
| 1.0 M | +++++ | +++++ |
| 2.0 M | +++++ | +++++ |
| - **โทลูอีน** | | |
| 0.5 M | + | + |
| 1.0 M | + | + |
| 2.0 M | + | + |
| - **เฮกเซน** | | |
| 0.5 M | +++ | +++ |
| 1.0 M | ++ | ++ |
| 2.0 M | + | + |
| - **คลอโรฟอร์ม** | | |
| 0.5 M | + | + |
| 1.0 M | + | + |
| 2.0 M | + | + |
| - **ปิโตรเลียมอีเทอร์** | | |
| 0.5 M | ++ | ++ |
| 1.0 M | + | + |
| 2.0 M | + | + |

**หมายเหตุ**

+++++ คือ ละลายได้ดีมาก

++++ คือ ละลายได้ดี

+++ คือ ละลายได้ปานกลาง

++ คือ ละลายได้บ้าง

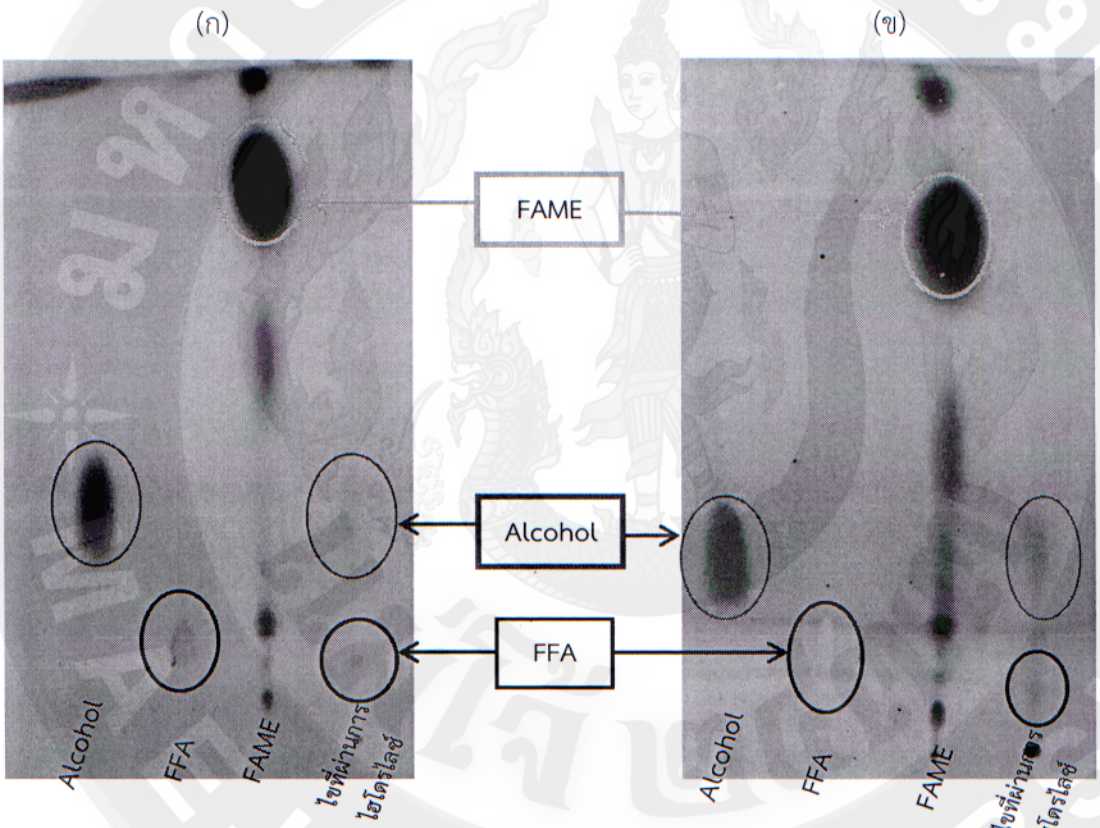
+ คือ ละลายได้ยาก (หรือใช้เวลาในการละลายนาน)

## 3.6 การสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน

นำไขผึ้งที่กำจัดไตรกลีเซอไรด์แล้วไปแยกโพลิโคซานอลด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน โดยใช้สารละลายเบส KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้น 2.0 M เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เนื่องจากต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ แอลกอฮอล์สายยาว (โพลิโคซานอล) และกรดไขมันอิสระ

### 3.5.1 การสกัดโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย 2.0 M Ehtanolic KOH

ทำการแยกโพลิโคซานอล จากไขผึ้งที่อยู่ในรูปของแวกซ์เอสเทอร์ โดยนำไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดไตร-กลีเซอไรด์ มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน โดยมี 2.0 M KOH ใน 80 % เอทานอลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นนำมาตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังรูป 3.3




**รูป 3.3** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแสดง ไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข) ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล

**หมายเหตุ**

Alcohol คือ สารมาตรฐานสเตียริลแอลกอฮอล์

FFA คือ สารมาตรฐานกรดปาล์มิติก

FAME คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว

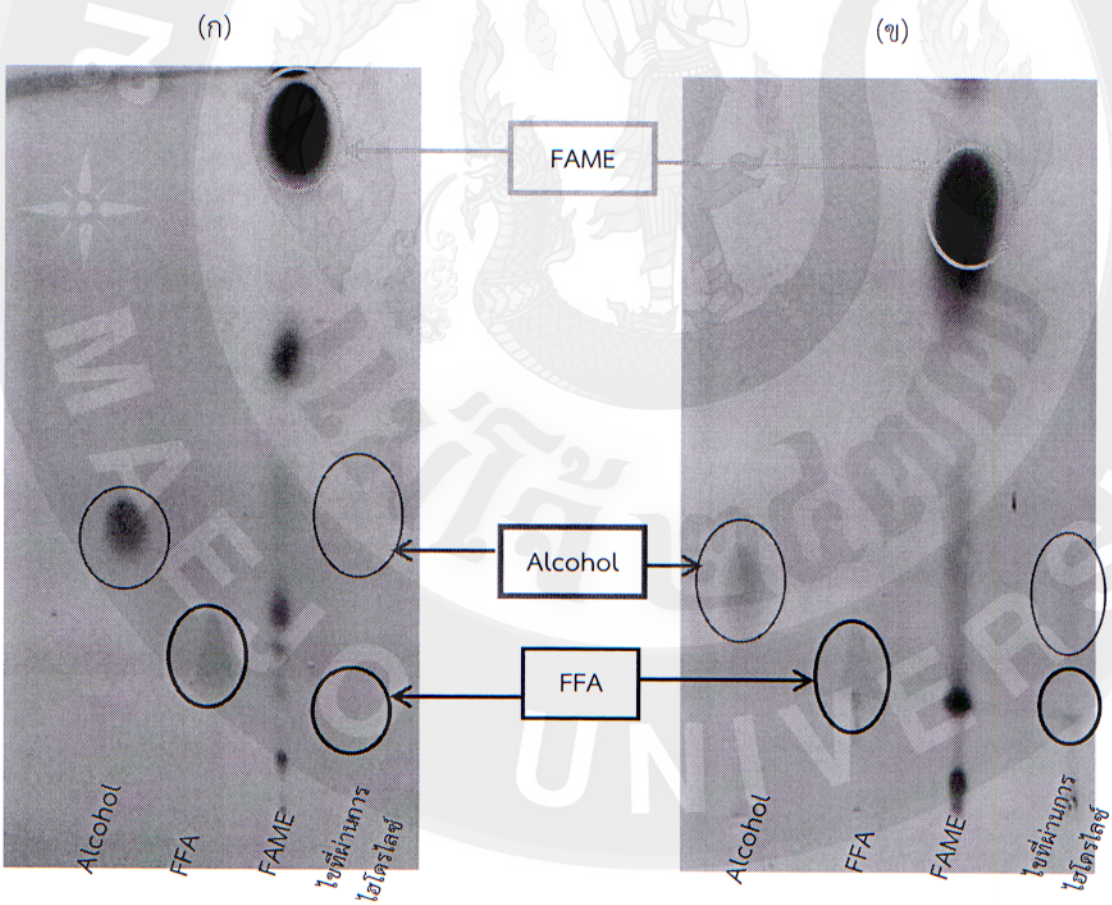
**ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์** คือ ไขที่ผ่านการตัดพันธะเอสเทอร์

**เฟสเคลื่อนที่คือ** เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : กรดอะซิติก (90 : 9 : 1)

จากรูป 3.3 ทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีของไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข) ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล พบว่ามีแถบของแอลกอฮอล์สายยาว และกรดไขมันอิสระสายยาว โดยยืนยันได้จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ และสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ แต่ไม่ปรากฏแถบของสารประกอบเอสเทอร์ เนื่องจากสารประกอบเอสเทอร์ของไขผึ้งถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเบส ได้เป็นแอลกอฮอล์สายยาว และกรดไขมันสายยาว นั่นแสดงว่า 2.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไขผึ้งได้อย่างสมบูรณ์ โดยสามารถเข้าไปตัดพันธะเอสเทอร์ของไข ได้เป็นแอลกอฮอล์สายยาว กับกรดไขมันอิสระ

### 3.5.2 การแยกโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย 2.0 M Ehtanolic NaOH

ทำการแยกโพลิโคซานอล จากไขผึ้งที่อยู่ในรูปของแวกซ์เอสเทอร์ โดยนำไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดไตรกลีเซอไรด์แล้ว มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน โดยมี 2.0 M NaOH ใน 80 % เอทานอลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์มาตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังรูป 3.4




**รูป 3.4** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีแสดง ไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข) ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M NaOH ใน 80 % เอทานอล

**หมายเหตุ**

Alcohol คือ สารมาตรฐานสเตียริลแอลกอฮอล์

FFA คือ สารมาตรฐานกรดปาล์มิติก

FAME คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว

**ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์** คือ ไขที่ผ่านการตัดพันธะเอสเทอร์

**เฟสเคลื่อนที่คือ** คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1)

จากรูป 3.4 ทินเลเยอร์โครมาโทรกราฟีของไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข) ที่ผ่านการไฮโดรไลด์ด้วย 2.0 M NaOH ใน 80% เอทานอล พบว่ามีแถบของแอลกอฮอล์สายยาว และกรดไขมันอิสระสายยาว โดยยืนยันได้จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ และสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระแต่ไม่ปรากฏแถบของสารประกอบเอสเทอร์ เนื่องจากสารประกอบเอสเทอร์ของไขผึ้งถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเบส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น แอลกอฮอล์สายยาว และกรดไขมันสายยาว นั่นคือ 2.0 M NaOH ใน 80 % เอทานอล สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไขผึ้งได้อย่างสมบูรณ์

จากการทดลองใช้สารละลาย KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้น 2.0 M ใน 80 % เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งสีขาว และไขผึ้งสีเหลือง จากการตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC พบว่าให้ผลไปทางเดียวกัน กล่าวคือ สารประกอบเอสเทอร์ ถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็นแอลกอฮอล์สายยาว และกรดไขมันอิสระ ได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากไม่พบสารประกอบเอสเทอร์ในไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ เนื่องจากความเข้มข้นที่มากพอของสารละลายเบสทั้งสอง ทำให้ KOH และ NaOH มีความแรงมากพอเข้าไปทำปฏิกิริยาในการตัดพันธะเอสเทอร์ของไข ร่วมกับการกวนอย่างต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส นานถึง 3 ชั่วโมง จึงเพียงพอในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ของไข ที่นับว่าเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่

จากการทดลองพบว่า ทั้งเบส KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้น 2.0 M ใน 80 % เอทานอล สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามสารละลายเบส KOH มีข้อได้เปรียบตรงที่เมื่อทำการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งแล้ว สารที่ได้มีลักษณะอ่อนนุ่มกว่า เมื่อเทียบกับไขผึ้งที่ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเบส NaOH ซึ่งทำให้สะดวกในการผสมกับสารละลายชนิดต่างๆ ในการทดลองขั้นต่อไป ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย KOH เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟในการทดลองขั้นต่อไป

## 3.7 การศึกษาเวลาความเข้มข้นของเบสและกำลังไฟฟ้าในการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งเพื่อสกัดโพลิโคซานอล โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน (Hydrolyzation) ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ

ไข เป็นสารประกอบเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกรดไขมันอิสระกับแอลกอฮอล์สายยาวหรือโพลิโคซานอล ที่มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม การสกัดโพลิโคซานอลจากไขชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่จะนำไขมาไฮโดรไลซ์หรือตัดพันธะเอสเทอร์ ด้วย NaOH หรือ KOH ที่ละลายในตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เมทานอล เอทานอล บิวทานอล ไอโซโพรพานอล เฮพเทน อะซิโตน โทลูอีน เบนซีน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น [22]

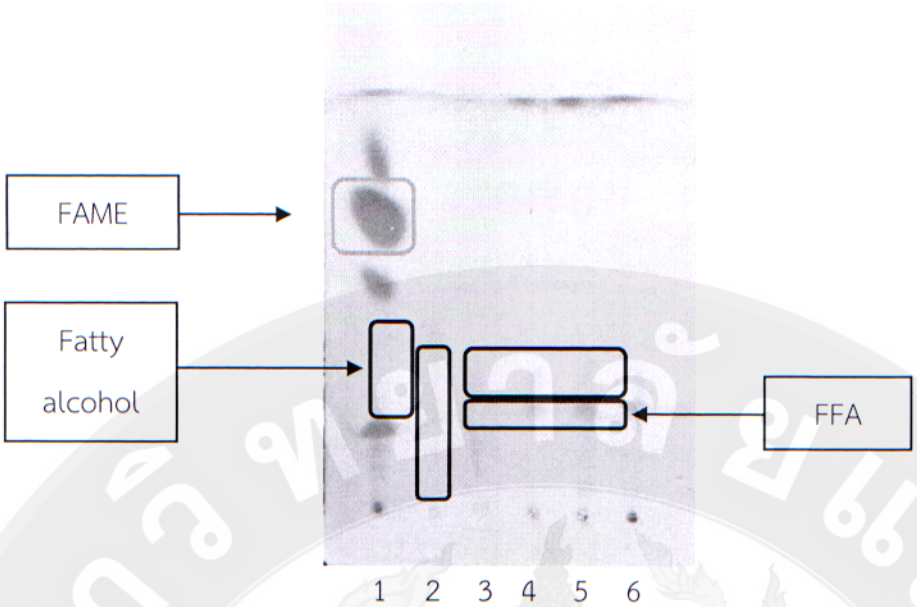
ในการทดลองเบื้องต้น ได้ทำการแปรค่าของกำลังไฟฟ้าตั้งแต่ 300, 400, 500, และ 600 วัตต์ ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันไขผึ้ง ด้วยสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล พบว่า ที่กำลังไฟฟ้า 600 วัตต์ สารละลายตัวอย่างเกิดการระเบิดภายในเวลาอันรวดเร็ว ส่วนที่กำลังไฟฟ้า 400 และ 500 วัตต์ สารละลายตัวอย่างเกิดการไหม้ในเวลาที่ศึกษาคือ 60 และ 30 วินาที ตามลำดับ อาจเนื่องมาจาก ตัวทำละลายเอทานอลที่ใช้ มีจุดเดือดที่ 78 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่าอุณหภูมิที่ทำการทดลอง อาจสูงกว่าจุดเดือดของเอทานอล จึงส่งผลให้สารละลายตัวอย่างไหม้และมีควันเกิดขึ้น ดังนั้นในการทดลอง จึงเลือกใช้กำลังไฟฟ้าที่ 300 วัตต์ ในการให้ความร้อน และทำการแปรค่าเวลาที่ 60, 90 และ 120 วินาที

### 3.7.1 ศึกษาการสกัดด้วยสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 M ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์

ในขั้นตอนนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการสกัดของสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 M ด้วยพลังงานไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที เพื่อใช้ในการสกัดโพลิโคซานอล

#### 3.7.1.1 ศึกษาการสกัดด้วยสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.5 M ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที

ทำการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งโดยการใช้สารละลาย 0.5 M KOH ใน 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ที่เวลาต่างๆ นำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย TLC แสดงผลการตรวจสอบแสดง ดังรูป 3.5




**รูป 3.5** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของการใช้ 0.5 M KOH ใน 80% เอทานอล ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไขผึ้งโดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ (FAME) ของน้ำมันรำข้าว

หมายเลข 2 คือ สเตียริลแอลกอฮอล์ (Fatty alcohol)

หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริค (FFA)

หมายเลข 4 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 60 วินาที

หมายเลข 5 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 90 วินาที

หมายเลข 6 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 120 วินาที

**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1)

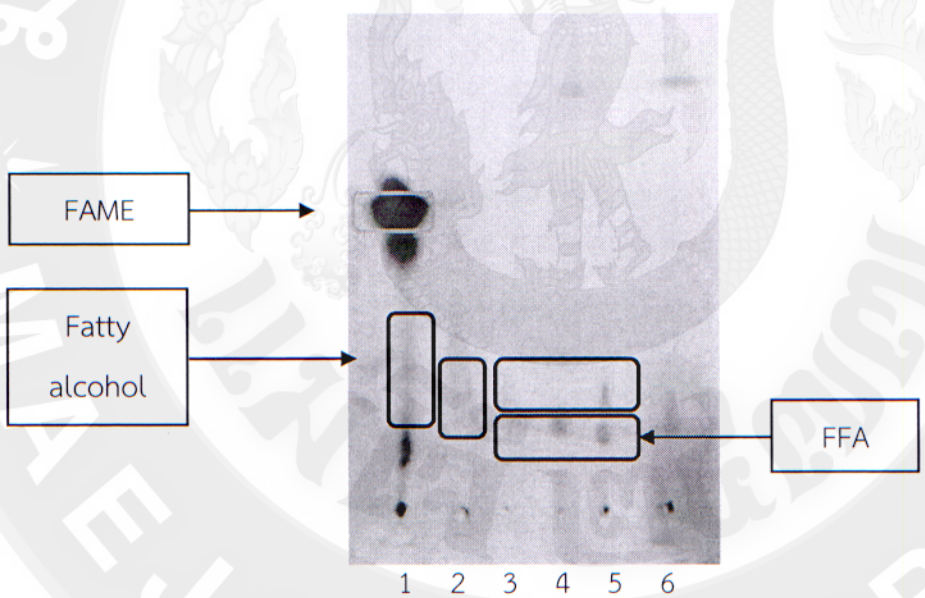
จากรูป 3.5 ผลการไฮโดรไลซ์ไขผึ้ง โดยใช้ 0.5 M KOH ใน 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เป็นเวลา 60 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 4 ที่เวลา 90 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 5 และ ที่เวลา 120 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 6 พบว่า โครงสร้างของแวกซ์เอสเทอร์ในไขผึ้ง ถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็น กรดไขมันอิสระสายยาวและแอลกอฮอล์สายยาว ซึ่งสามารถยืนยัน

ได้จากการเปรียบเทียบกับแถบของสารมาตรฐานบนแผ่น TLC ในหมายเลข 2 ซึ่งคือ สเตียริลแอลกอฮอล์ และหมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดเสตียริค

อย่างไรก็ตาม เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารละลาย KOH ความเข้มข้น 0.5 M ใน 80% เอทานอล สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ การทดลองต่อไปจึงได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบโดยใช้สารละลายเบส KOH ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

**3.7.1.2 ศึกษาการสกัดด้วยสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 1.0 M ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที**

ทำการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งโดยการใช้สารละลาย 1.0 M KOH ใน 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ที่เวลาต่างๆ นำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย TLC แสดงผลการตรวจสอบแสดง ดังรูป 3.6




**รูป 3.6** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของการใช้ 1.0 M KOH ใน 80% เอทานอล ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไขผึ้งโดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ (FAME) ของน้ำมันรำข้าว

หมายเลข 2 คือ สเตียริลแอลกอฮอล์ (fatty alcohol)

หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริค (FFA)

หมายเลข 4 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 1.0 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 60 วินาที

หมายเลข 5 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 1.0 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 90 วินาที

หมายเลข 6 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 1.0 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 120 วินาที

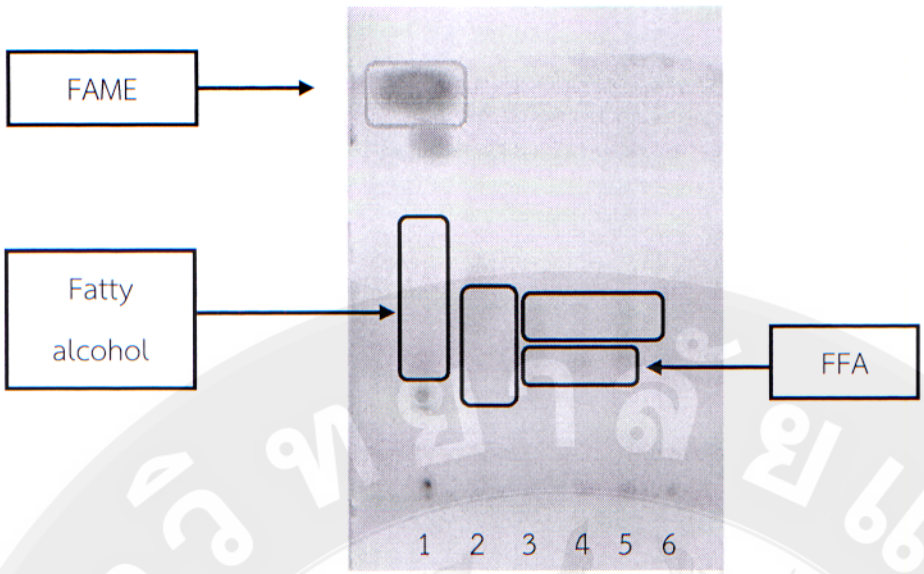
**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1)

จากรูป 3.6 แสดงผลการไฮโดรไลซ์ไขผึ้ง โดยใช้ 1.0 M KOH ใน 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เป็นเวาลา 60 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 4 เวลา 90 ที่วินาที แสดงด้วยหมายเลข 5 และที่เวลา 120 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 6 พบว่า โครงสร้างของแวกซ์เอสเทอร์ในไขผึ้ง ถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็น กรดไขมันอิสระสายยาว และแอลกอฮอล์สายยาว ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการเปรียบเทียบกับแถบของสารมาตรฐานบนแผ่น TLC ในหมายเลข 2 และหมายเลข 3 คือ สเตียริลแอลกอฮอล์ และสารมาตรฐานกรดเสตียริค ตามลำดับ

จากผลการศึกษา สารละลาย KOH ความเข้มข้น 1.0 M ใน 80% เอทานอล สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ การทดลองต่อไปจะทำการศึกษา การเปรียบเทียบโดยใช้สารละลายเบส KOH ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

**3.7.1.3 ศึกษาการสกัดด้วยสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 2.0 M ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที**

ทำการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งโดยการใช้สารละลาย 2.0 M KOH ใน 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ที่เวลาต่างๆ นำมาตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย TLC แสดงผลการตรวจสอบแสดง ดังรูป 3.7




**รูปที่ 3.7** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของการใช้ 2.0 M KOH ใน 80% เอทานอล ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไล - เซชันของไขผึ้งโดยใช้พลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ที่เวลา 60, 90 และ 120 วินาที

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ (FAME) ของน้ำมันรำข้าว

หมายเลข 2 คือ สเตียริลแอลกอฮอล์ (Fatty alcohol)

หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริค (FFA)

หมายเลข 4 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 60 วินาที

หมายเลข 5 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 90 วินาที

หมายเลข 6 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M KOH ใน 80% เอทานอล กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เวลา 120 วินาที

**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1)

จากรูป 3.7 ผลการไฮโดรไลซ์ไขผึ้ง โดยใช้ 2.0 M KOH ใน 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีพลังงานจากไมโครเวฟ ที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เป็นเวลา 60 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 4 เวลา 90 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 5 และ เวลา 120 วินาที แสดงด้วยหมายเลข 6 พบว่า โครงสร้างของแวกซ์เอสเทอร์ในไขผึ้ง ถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็น กรดไขมันอิสระสายยาวและแอลกอฮอล์สายยาว ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการเปรียบเทียบกับแถบของสารมาตรฐานบนแผ่น TLC ในหมายเลข 2 คือ สเตียริลแอลกอฮอล์ และหมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดเสตียริค

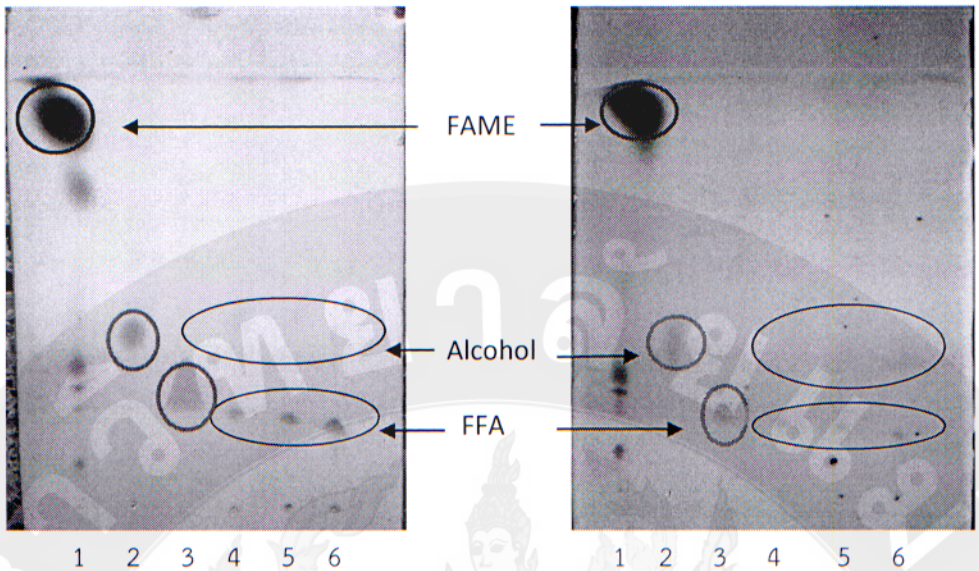
จากการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเบส KOHที่เตรียมใน 80 % เอทานอล ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันไขผึ้ง พบว่า สารละลาย KOH เข้มข้น 0.5 M สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ได้สมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์สายยาวและกรดไขมันสายยาว ในเวลาสั้น เพียง 60 วินาที โดยการใช้พลังงานจากไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับ งานวิจัยของ Jackson และ Eller [18] ทำการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งด้วยสารละลาย KOH (1 : 2 w/v ของไข และ 6% KOH) แล้วไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (1300 วัตต์ 230 โวลต์ 50 เฮิรตซ์) ประมาณ 35 นาที

ดังนั้น เห็นได้ว่า การใช้พลังงานจากไมโครเวฟในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน สามารถเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งยืนยันได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค TLC อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาขั้นต่อไปได้ทำการลดกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟที่ใช้ โดยได้แปรค่าความเข้มข้นของเบสที่ใช้ เพื่อเป็นแนวทางในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันโดยใช้ไมโครเวฟเป็นแหล่งให้พลังงานความร้อนต่อไป

### 3.7.2 การศึกษาหาความเข้มข้นของเบสที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที เพื่อสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง

เมื่อได้ไขผึ้งที่มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากไตรกลีเซอไรด์แล้ว และได้ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการเตรียมละลาย KOH คือ 80 % เอทานอล ขั้นตอนต่อไปคือการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเบสที่จะใช้ในการสกัดโพลิโคซานอลด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน โดยนำตัวอย่างไขผึ้งสีขาว และไขผึ้งสีเหลืองที่ปราศจากไตรกลีเซอไรด์ มา 0.300 กรัม จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไล เซชันกับสารละลายเบส KOH ที่ความเข้มข้น 0.5 M, 1.0 M, และ 2.0 M ที่ละลายใน 80 % เอทานอล ด้วยการใช้ไมโครเวฟเป็นแหล่งให้พลังงานความร้อนที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที คิดเป็นพลังงานไฟฟ้า 30000 จูล กระแสไฟฟ้า 0.45 แอมแปร์ จากนั้นนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว มาทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน ด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) ได้ผลดังรูป 3.8

(ก) (ข)




**รูป 3.8** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที ด้วยสารละลายเบส KOH ความเข้มข้น 0.5 M 1.0 M และ 1.0 M ใน 80 % เอทานอล (ก) ไขผึ้งสีขาว (ข) ไขผึ้งสีเหลือง

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว (FAME)

หมายเลข 2 คือ สารมารฐาน FATTY ALCOHOL (C18-OH)

หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก (FFA)

หมายเลข 4 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80 % เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที

หมายเลข 5 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 1.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที

หมายเลข 6 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 2.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที

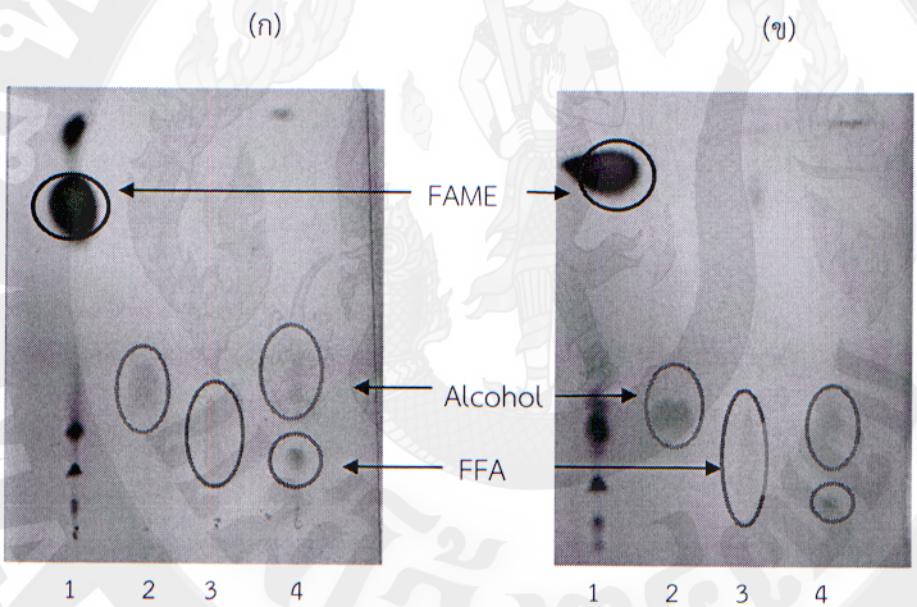
**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก อัตราส่วน 70 : 30 : 1

ไขผึ้งเป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน เบสจะไปตัดพันธะเอสเทอร์ของไขทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์สายยาว และกรดไขมันอิสระสายยาว จากผลการทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยเทคนิค TLC ดังรูป 3.8 พบว่าไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80 % เอทานอล (หมายเลขที่ 4) ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 1.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล (หมายเลขที่ 5) และไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลเซชันด้วย 2.0 M KOH ใน 80 % เอทานอล (หมายเลขที่ 6) สามารถเกิดการไฮโดรไลซ์ได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้ไมโครเวฟเป็นแหล่งให้พลังงานความร้อนที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที

โดยไม่พบอนุพันธ์เอสเทอร์จะเป็นองค์ประกอบหลักของไข แต่ตรวจพบกลุ่มของแอลกอฮอล์สายยาวและกรดไขมันอิสระ ยืนยันได้โดยเทียบกับสารอนุพันธ์เมทิล-เอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว (หมายเลข 1) สารมารฐาน Fatty alcohol (หมายเลข 2) และสารมารฐานกรดสเตียริก (หมายเลข 3) ดังนั้นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารละลายเบส KOH 0.5 M ใน 80 % เอทานอล จึงถูกใช้เป็นความเข้มข้นในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไขผึ้ง ด้วยพลังงานจากไมโครเวฟต่อไป

### 3.7.3 การไฮโดรไลซ์ไขผึ้งเพื่อสกัดโพลิโคซานอลด้วยสารละลาย KOH เข้มข้น 0.5 M ใน 80 % เอทานอล ด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที

ทำการสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง โดยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน ด้วยสารละลาย KOH ใน 80 % เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.5 M ผลการทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันของไขผึ้งสองชนิดด้วยเทคนิค TLC แสดงดังรูป 3.9




**รูป 3.9** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที ด้วยสารละลายเบส KOH ความเข้มข้น 0.5 M ใน 80 % เอทานอล (ก) ไขผึ้งสีขาว (ข) ไขผึ้งสีเหลือง

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว (FAME)

หมายเลข 2 คือ สารมาตรฐาน FATTY ALCOHOL (C18-OH)

หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก (FFA)

หมายเลข 4 คือ ไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80 % เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที

**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก อัตราส่วน 70 : 30 : 1

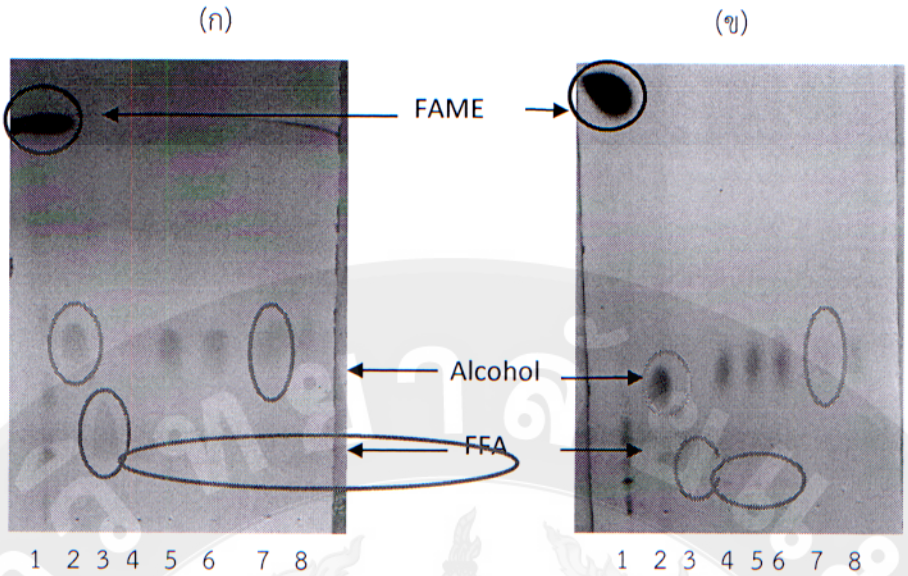
จากผลการทดสอบความสมบรูณ์ ดังรูป 3.9 พบว่าไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วย 0.5 M KOH ใน 80 % เอทานอล (หมายเลขที่ 4) โดยใช้พลังงานความร้อนจากไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 5 นาที สามารถเกิดการไฮโดรไลซ์ได้อย่างสมบูรณ์ โดยโครงสร้างของแวกซ์เอสเทอร์ในไขผึ้ง ถูกไฮโดรไลซ์ได้เป็น กรดไขมันอิสระสายยาวและแอลกอฮอล์สายยาว ซึ่งสามารถยืนยันได้กับแถบสารมาตรฐานบนแผ่น TLC หมายเลข 2 คือ สารมารฐาน FATTY ALCOHOL (C18-OH) และหมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก (FFA)

ในงานวิจัยที่ผ่านมา ส่วนใหญ่มักทำการสกัดโพลิโคซานอลโดยวิธีการรีฟลักซ์เป็นส่วนมาก ซึ่งวิธีการรีฟลักซ์เป็นเทคนิควิธีการที่ใช้เวลานาน อย่างน้อย 30 นาที ดังตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Irmak และคณะ [16] ที่ได้ทำการไฮโดรไลซ์ ฟางข้าวโพด จมูกข้าว และรำข้าว ด้วย 1 M NaOH ในเมทานอล โดยการรีฟลักซ์เป็นเวลา 30 นาที และงานวิจัยของ จิราภรณ์ และคณะ [22] นำไขรำข้าว มาไฮโดรไลซ์ด้วย KOH 30 กรัม ใน 90% เอทานอล ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการรีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

## 3.8 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์

### 3.8.1 การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์

การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ คือการกำจัดกรดไขมันอิสระสายยาวที่ปนอยู่กับโพลิโคซานอลได้จากขั้นตอนไฮโดรไลซ์ ซึ่งเบสจะไปตัดพันธะเอสเทอร์ของไขทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์สายยาวกับกรดไขมันอิสระสายยาว การกำจัดกรดไขมันอิสระทำโดยนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ มาสกัดด้วยตัวทำละลายผสมโดยปริมาตร ระหว่าง โทลูอีน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยการ รีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้เกิดการแยกตัวของกรดไขมันอิสระออกจากโพลิโคซานอล โดยโพลิโคซานอลซึ่งเป็นแอลกอฮอล์สายยาวละลายอยู่ในโทลูอีน ส่วนกรดไขมันอิสระละลายในน้ำ นำชั้นโทลูอีนมาทำการสกัดครั้งที่ 2 ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง โทลูอีน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ แยกชั้นโทลูอีนมาทำการสกัดซ้ำอีกนับว่าเป็นการสกัดด้วยโทลูอีนครั้งที่ 3 แยกชั้นโทลูอีนและนำไประเหย จากนั้นนำมาเติมตัวทำละลายผสม ระหว่าง ไอโซออกเทน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) นำไปรีฟลักซ์ 1ชั่วโมง เก็บเฉพาะชั้นไอโซออกเทนมาตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการตกตะกอนของแอลกอฮอล์สายยาวในชั้นไอโซออกเทน กรองเก็บตะกอน โพลิโคซานอลจากสารละลายไอโซออกเทน ซึ่งเป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก จิราภรณ์ และคณะ ในปี 2551 [22] และทดสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลด้วยเทคนิค TLC แสดงดังรูป 3.10




**รูป 3.10** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของการทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ (ก) ไขผึ้งสีขาว (ข) ไขผึ้งสีเหลือง

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของน้ำมันรำข้าว (FAME)

หมายเลข 2 คือ สารมารฐาน FATTY ALCOHOL (C18-OH)

หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก (FFA)

หมายเลข 4 คือ ชั้นโทลูอีน จากการสกัดด้วยโทลูอีนครั้งที่ 1

หมายเลข 5 คือ ชั้นโทลูอีน จากการสกัดด้วยโทลูอีนครั้งที่ 2

หมายเลข 6 คือ ชั้นโทลูอีน จากการสกัดด้วยโทลูอีนครั้งที่ 3

หมายเลข 7 คือ ชั้นตะกอน จากการสกัดด้วยไอโซออกเทน

หมายเลข 8 คือ ชั้นไอโซออกเทน จากการสกัดด้วยไอโซออกเทน

**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก อัตราส่วน 70 : 30 : 1

การทำให้โพลิโคซานอลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ไขผึ้งมีความบริสุทธิ์ คือการกำจัดกรดไขมันอิสระสายยาวซ้ำ ทำโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จากรูป 3.10 แสดงการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ โพลิโคซานอล เมื่อทำการสกัดด้วยโทลูอีน ครั้งที่ 1-3 นำชั้นโทลูอีนมาตรวจสอบ พบว่าไม่สามารถกำจัดกรดไขมันอิสระสายยาวได้ โดยยังปรากฏแถบขอบกรดไขมันอิสระสายยาวอยู่ โดยแสดงดังหมายเลข 4-6

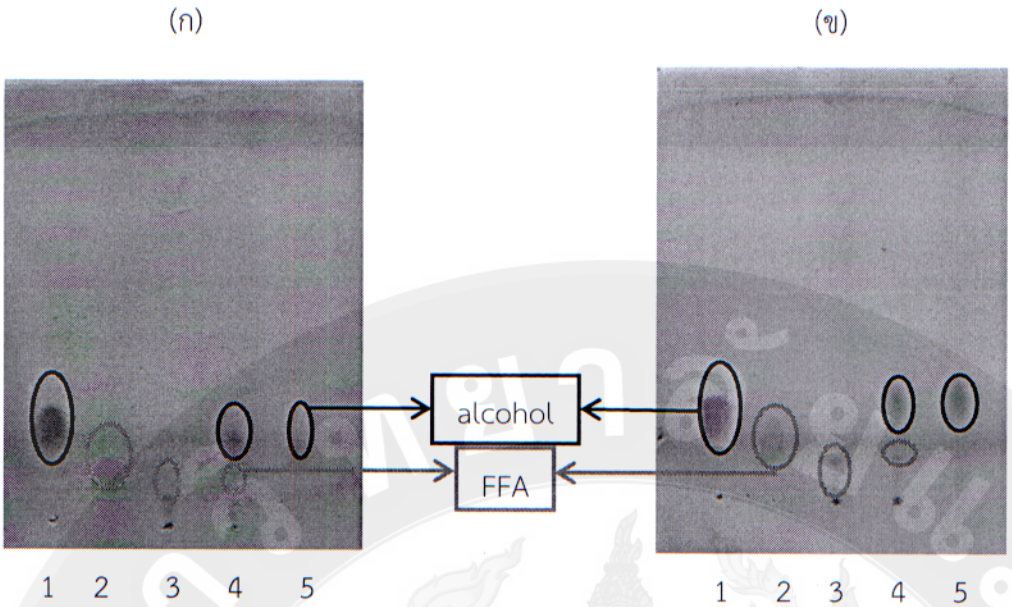
จากนั้นนำชั้นโทลูอีนที่คาดว่ามีแอลกอฮอล์สายยาวละลายอยู่ มาสกัดซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายไอโซออกเทน รอให้ตกตะกอน เก็บชั้นตะกอนที่ได้นี้ มาทดสอบหาแอลกอฮอล์สายยาว ดังแสดง หมายเลข 7 พบ

แอลกอฮอล์สาย และไม่พบกรดไขมันอิสระสายยาว และนำชั้นไอโซออกเทน มาทดสอบแสดงผลดังหมายเลข 8 ปรากฏแถบของแอลกอฮอล์สายยาวและกรดไขมันอิสระสายยาว ซึ่งสามารถยืนยันกับแถบสารมาตรฐานบนแผ่น TLC ในหมายเลข 2 คือ สารมารฐาน FATTY ALCOHOL (C18-OH) และ หมายเลข 3 คือ สารมาตรฐานกรดสเตียริก (FFA)

อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบที่ได้ แสดงให้เห็นว่า กลุ่มของแอลกอฮอล์สายยาวมีทั้งที่รวมตัวกันตกตะกอนลงมา (หมายเลข 7) และละลายปนอยู่ในชั้นของไอโซออกเทน (หมายเลข 8) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงทำการทดสอบควมบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลที่ตกตะกอนลงมาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

### 3.8.2 การเพิ่มความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับการตกผลึก

การทำโพลิโคซานอลให้บริสุทธิ์โดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ร่วมกับการตกผลึกนั้น เริ่มจากนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลกอฮอล์สายยาวและกรดไขมันอิสระมารีฟลักซ์ด้วยอะซิโตน 250 ml ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่เย็นเพื่อให้โพลิโคซานอลค่อยๆ ตกตะกอนลงมา นำตะกอนที่ได้มาเพิ่มความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอล โดยการรีฟลักซ์ด้วยเฮพเทน จากนั้นเทสารละลายลงในกรวยแยก เติมน้ำร้อน 150 ml ทำการเขย่า แล้วตั้งทิ้งไว้ เมื่อสารแยกเป็น 2 ชั้น แยกชั้นเฮพเทนไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งโพลิโคซานอลค่อยๆ ตกตะกอนลงมา กรองตะกอนแล้วนำไปอบแห้งเพื่อให้สารละลายเฮพเทนระเหยออกไป จากนั้นนำชั้นน้ำไปตรวจสอบกรดไขมันอิสระและนำตะกอนที่ปราศจากเฮพเทน ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลด้วย TLC ( ดังรูป 3.11) โดยเปรียบเทียบความบริสุทธิ์กับสารที่ผ่านการรีฟลักซ์ด้วยอะซิโตนเพียงขั้นเดียว




**รูป 3.11** ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีของโพลิโคซานอล ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์
(ก) โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง (ข) โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว

**หมายเหตุ**

หมายเลข 1 คือ สารมาตรฐานแอลกอฮอล์ (alcohol) (C18-OH)

หมายเลข 2 คือ สารมาตรฐานกรดปาล์มิติก (FFA)

หมายเลข 3 คือ ชั้นน้ำที่ได้จากการสกัด

หมายเลข 4 คือ ตะกอนโพลิโคซานอลที่ผ่านการรีฟลักซ์ด้วยอะซิโตน

หมายเลข 5 คือ ตะกอนโพลิโคซานอลที่ผ่านการรีฟลักซ์ด้วยเฮพเทนและล้างด้วยน้ำร้อน

**เฟสเคลื่อนที่** คือ คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน : กรดอะซิติก (70 : 30 : 0.1)

จากรูป 3.11 แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนการทำให้แอลกอฮอล์สายยาวหรือโพลิโคซานอลมีความบริสุทธิ์นั้นมีหลักการคือแยกกรดไขมันอิสระออกจากโพลิโคซานอล โดยในขั้นแรกทำการสกัดด้วยอะซิโตนและแช่เย็นเพื่อให้เกิดการตกตะกอนลงมา จากนั้นนำตะกอนไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอล โดยคาดว่ากรดไขมันอิสระจะละลายอยู่ในชั้นของสารละลายอะซิโตน เนื่องจากสายไฮโดรคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมันอิสระมีความยาวค่อนข้างมาก และมีเพียงโพลิโคซานอลเท่านั้นที่ตกตะกอนลงมา อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบดังหมายเลข 4 พบว่าในการสกัดด้วยอะซิโตนยังไม่สามารถแยกกรดไขมันอิสระออกจากโพลิโคซานอลได้ ดังปรากฏแถบของแอลกอฮอล์สายยาวและกรดไขมันอิสระ

จากนั้นจึงเพิ่มความบริสุทธิ์โดยการนำตะกอนไปรีฟลักซ์อีกครั้งด้วยเฮพเทนและตามด้วยการล้างด้วยน้ำร้อน เมื่อนำส่วนของชั้นน้ำ (หมายเลข 3) ไปตรวจสอบ พบแถบของกรดไขมันอิสระ และในส่วนของเฮพเทนถูกนำไปแช่เย็นเพื่อให้โพลิโคซานอลตกตะกอน และนำไปตรวจสอบ (หมายเลข 5) พบว่าปรากฏเพียง

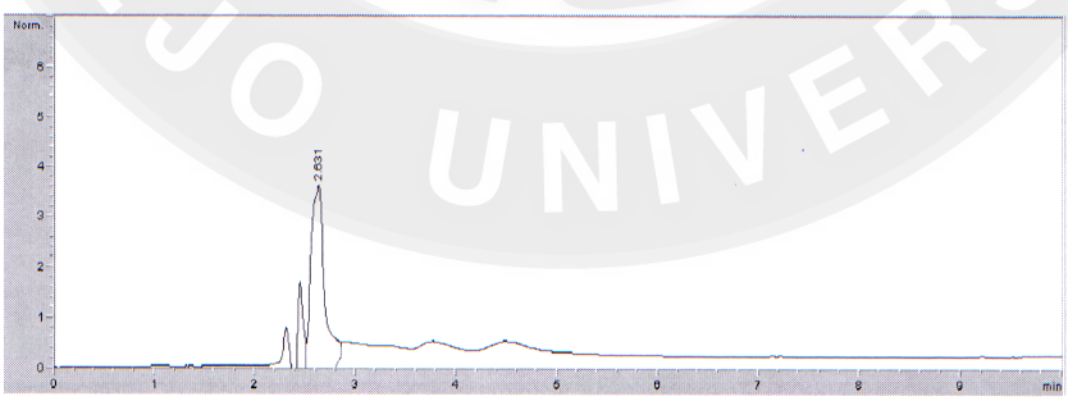
แถบของแอลกอฮอล์สายยาว ไม่ปรากฏแถบของกรดไขมันอิสระ นั่นคือการสกัดซ้ำด้วยเฮพเทนซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar) มากกว่าอะซิโตน สามารถแยกกรดไขมันออกจากโพลิโคซานอลได้ เนื่องจากกรดไขมันละลายในเฮพเทนได้มากขึ้น ประกอบกับในขั้นตอนการล้างด้วยน้ำร้อน กรดไขมันซึ่งอยู่ในรูปเกลือของกรดไขมัน สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น โดยใช้แรงทางเชิงกลคือการเขย่าร่วมด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gamble และคณะ ในปี 2003 [17] ที่ทำให้โพลิโคซานอลมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการใช้ตัวทำละลายต่างๆ คือ อะซิโตนซึ่งพบว่าสามารถทำให้โพลิโคซานอลมีความบริสุทธิ์ 50 % จากนั้นนำมาสกัดด้วยเฮพเทน ซึ่งพบว่าสามารถทำให้โพลิโคซานอลมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 65-75 % จากนั้นนำโพลิโคซานอลที่ได้นี้ไปวิเคราะห์เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

## 3.9 การยืนยันความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นำตะกอนของโพลิโคซานอลที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการยืนยันความบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคโครมาโท-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อดูว่ายังคงมีกรดไขมันอิสระปนอยู่หรือไม่ โดยนำตะกอนโพลิโคซานอลมาละลายด้วยไอโซโพรพานอลจากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ (C18 : O) โดยใช้ตัวตรวจวัด UV-Vis detector ที่ความยาวคลื่น 291 nm คอลัมน์ Hypersil ODS C-18 ขนาด 5 ไมโครเมตร 4.0×250 มิลลิเมตร ซึ่งมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น อาซีโตไนไตรล์ : เมทานอล (4 : 1)

### 3.9.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ

สารมาตรฐานกรดไขมันอิสระที่วิเคราะห์ด้วย HPLC คือสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระที่มีคาร์บอน 18 อะตอม (C18 : 0) โดยโครมาโทแกรมแสดงดังรูป 3.12



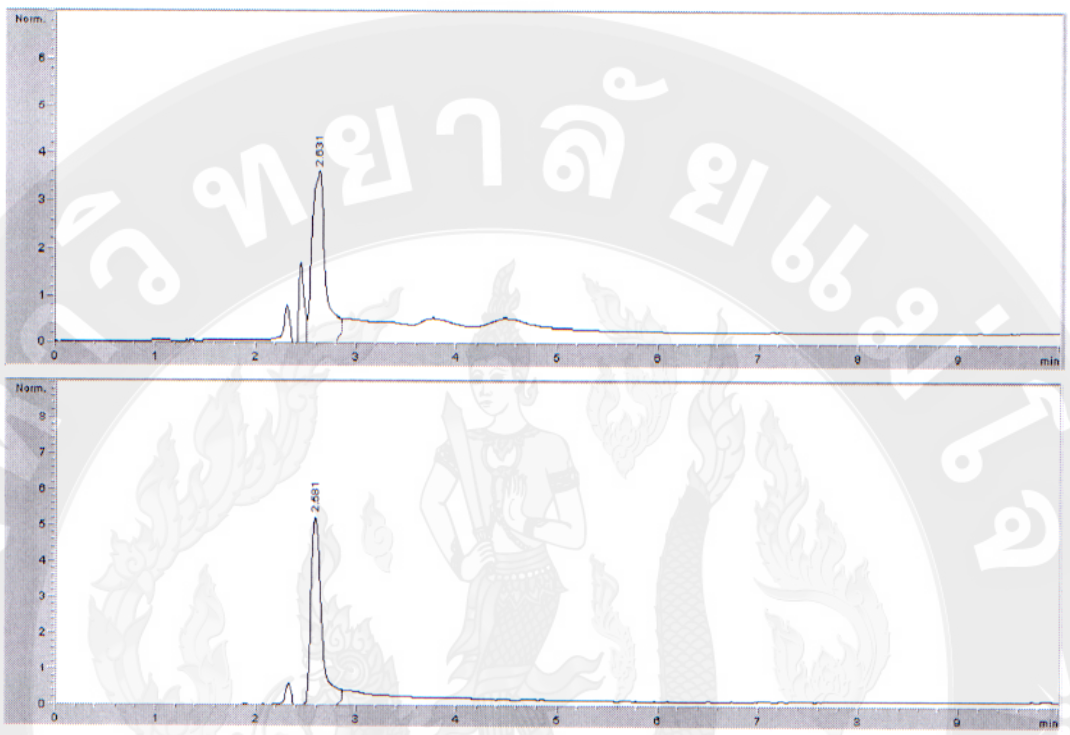

**รูป 3.12** โครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ (C18:0)

### 3.9.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลในไขผึ้งสีขาว

โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว และผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ผลการตรวจสอบ แสดงดังรูป 3.13

(ก)

(ข)




**รูป 3.13** โครมาโทแกรมของ (ก) สารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ (C18 : 0) (ข) กรดไขมันอิสระที่ปนอยู่ในโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว

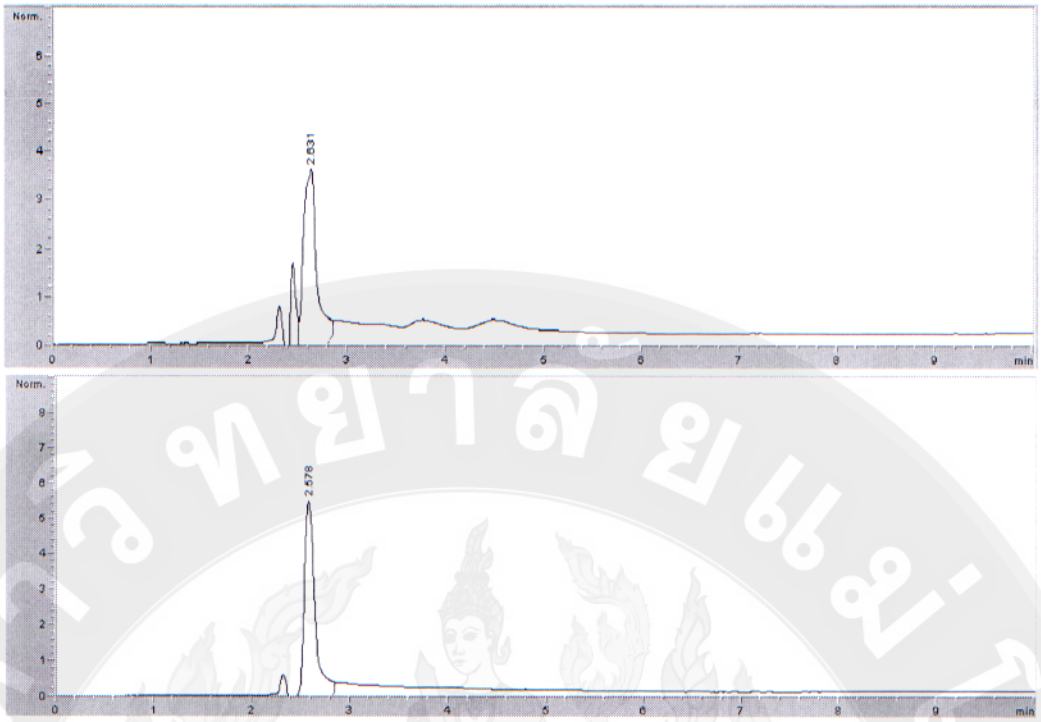
จากโครมาโทแกรมของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว เมื่อเปรียบเทียบค่าเวลาคงค้างกับโครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ทำให้พบว่ายังมีกรดไขมันอิสระปนอยู่ในโพลิโคซานอลทีสกัดได้

### 3.9.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลในไขผึ้งสีเหลือง

โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง และผ่านกระบวนการการทำให้บริสุทธิ์ นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ผลการตรวจสอบ แสดงดังรูป 3.14

(ก)

(ข)




**รูป 3.14** โครมาโทแกรมของ (ก) สารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ (C18 : 0) (ข) กรดไขมันอิสระที่ปนอยู่ในโพลิโคซานอลทีสกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง

จากโครมาโทแกรมของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบค่าเวลาคงค้างกับโครมาโทแกรมสารมาตรฐานกรดไขมันอิสระ ทำให้พบว่ายังมีกรดไขมันอิสระปนอยู่ในโพลิโคซานอลทีสกัดได้

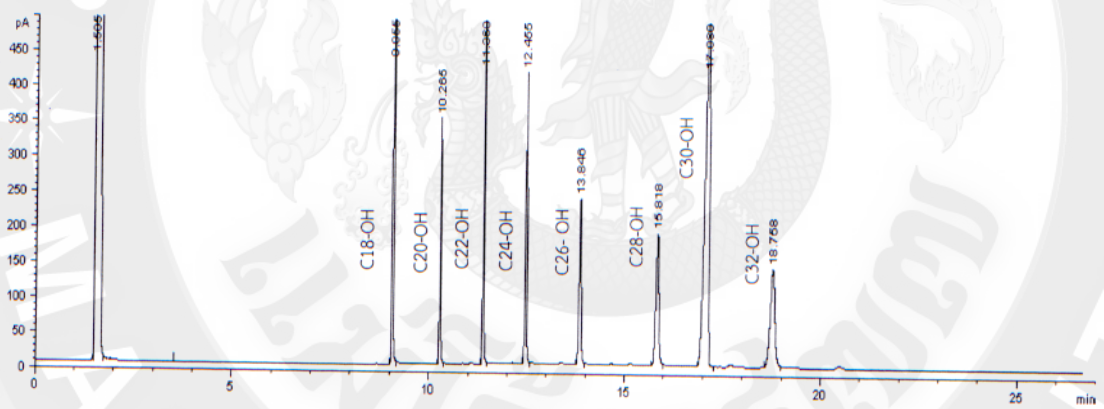
โดยจากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องที่ศึกษาความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าว จิราภรณ์ และคณะ ในปี 2008 [22] พบว่าเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลด้วย HPLC พบพีคของไขมันแอลกอฮอล์ ที่มีกรดไขมันอิสระปนเปื้อนเล็กน้อย โดยไขรำข้าวของไทยสามารถสกัดโพลิโคซานอลที่ความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 94 % ดุษฎี และคณะ ในปี 2550 [45] ได้ศึกษาการสกัดโพลิโคซานอลจากไขรำข้าว และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลด้วย HPLC พบว่าโพลิโคซานอลที่สกัดมีความบริสุทธิ์ 97.88 % ซึ่งอย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถระบุความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลที่ได้ ทั้งนี้เนื่องมากจากข้อจำกัดในส่วนของตัวตรวจวัด ที่ใช้ในการวิเคราะห์

## 3.10 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)

โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้ง ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำส่วนของตะกอนโพลิโคซานอลทำละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอล ด้วยเทคนิค GC และคำนวณสัดส่วนร้อยละองค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโพลิโคซานอลที่ความยาวคาร์บอนต่างๆ

### 3.10.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานแอลกอฮอล์สายยาว

สารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วย GC คือสารมาตรฐานผสมของแอลกอฮอล์สายยาวซึ่งประกอบด้วยOctadecanol (C18-OH), Eicosanol (C20-OH), Docosanol (C22-OH), Tetraco -sanol (C24-OH), Hexacosanol (C26-OH), Triacontanol (C30-OH), Dotriacotanol (C32-OH) วิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ HP-5 (5 % Phenyl-95 % methypolysiloxane) โปรแกรมอุณหภูมิในช่วง 150-280 องศาเซลเซียส โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ แสดงดังรูป 3.15 และค่าเวลาคงค้าง แสดงดังตาราง 3.3




**รูป 3.15** โครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ วิเคราะห์ด้วย (5 % Phenyl-95 % methypolysiloxane) ในช่วงอุณหภูมิ 150-280 องศาเซลเซียส

**ตาราง 3.3** ค่าเวลาคงค้าง ($T_R$) ของสารมาตรฐานแอลกอฮอล์

| Peak | Name | $T_R$(min) | Area (pA*s) |
|---|---|---|---|
| 1 | Toluene | 1.505 | 879904.9 |
| 2 | Octadecanol (C18-OH) | 9.055 | 1758.5 |
| 3 | Eicosanol (C20-OH) | 10.265 | 677.0 |
| 4 | Docosanol (C22-OH) | 11.369 | 1038.3 |
| 5 | Tetracosanol (C24-OH) | 12.455 | 1005.0 |
| 6 | Hexacosanol (C26-OH) | 13.845 | 818.0 |
| 7 | Octacosanol (C28-OH) | 15.818 | 976.2 |
| 8 | Triacontanol (C30-OH) | 17.089 | 4010.4 |
| 9 | Dotriacotanol (C32-OH) | 18.758 | 1123.7 |

จากโครมาโทแกรม รูป 3.15 และตารางที่ 3.4 แสดงค่า Retention time ($T_R$) ซึ่งคือระยะเวลาที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นจนถึงกึ่งกลางของพีค ดังนั้น ค่า $T_R$ ของสารมาตรฐานถูกนำมาใช้เพื่อทำนายชนิดของสารเนื่องจากสารชนิดต่างๆ ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง ประจุ ความจำเพาะ (Specificity) การดูดซับ (Adsorption) การละลาย (Solubility) ทำให้โมเลกุลของสารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ ในเวลาที่แตกต่างกัน แต่สารชนิดเดียวกันที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน สารออกมาจากคอลัมณ์ในเวลาที่ใกล้เคียงกัน [18] โดยค่า $T_R$ ของโทลูอีนมีค่า 1.505 นาที และสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ผสมที่ความยาวคาร์บอนต่างๆ (Mix Std.) ค่า $T_R$ แสดงดังนี้ คือ Octadecanol (C18-OH) มีค่า 9.055 นาที Eicosanol (C20-OH) มีค่า 10.265 นาที Docosanol (C22-OH) มีค่า 11.369 นาที Tetracosanol (C24-OH) มีค่า 12.455 Hexacosanol (C26-OH) มีค่า 13.845 นาที Octacosanol (C28-OH) มีค่า 15.818 นาที Triacontanol (C30-OH) มีค่า 17.089 นาที และ Dotriacotanol (C32-OH) มีค่า 18.758 นาที

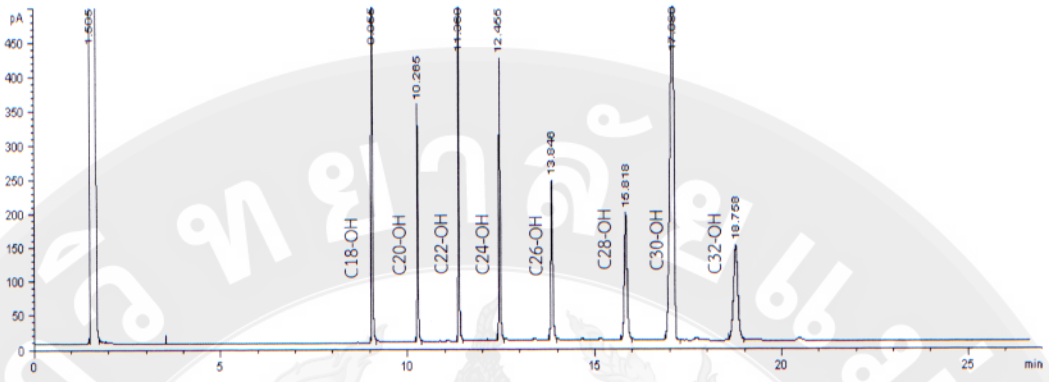
ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพ สามารถใช้ค่า $T_R$ ทำนายชนิดของสารได้โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เนื่องจากสารชนิดเดียวกัน ย่อมมีค่า $T_R$ เท่ากัน ดังนั้นการหาองค์ประกอบของโพลิโคซานอลด้วยเทคนิค GC ในสามารถพิสูจน์ได้ว่าสารนั้นประกอบด้วยสารชนิดใดด้วยการใช้ค่า $T_R$

### 3.10.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว

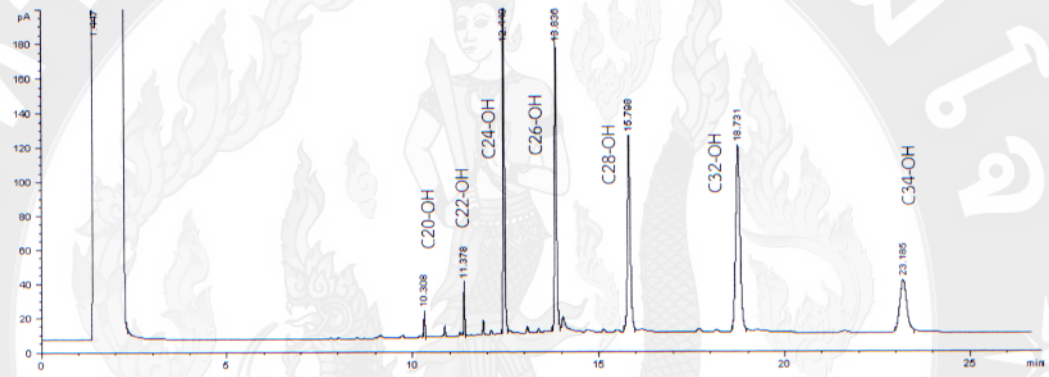
โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว โดยการเกิดปฏิกิริยาด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโพลิโคซานอล โดยการ

ใช้ค่า $T_R$ ในการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ รูป 3.16 แสดงโครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว และตาราง 3.4 แสดงค่า $T_R$ และร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของแอลกอฮอล์

(ก)




(ข)




**รูป 3.16** แสดงโครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ (ก) และโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาวโดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที (ข) ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HP-5 ในช่วงอุณหภูมิ 150-280 องศาเซลเซียส

จากโครมาโทแกรมของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว (ก) เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเวลาคงค้าง พบว่าโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขผึ้งสีขาวประกอบไปด้วย Eicosanol (C20-OH), Docosanol (C22-OH), Tetracosanol (C24-OH), Hexacosanol (C26-OH), Octacosanol (C28-OH), Dotriacontanol (C32-OH) และ Tetratricontanol (C34-OH)

**ตาราง 3.4** ค่าเวลาคงค้าง ($T_R$) และร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ ที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที

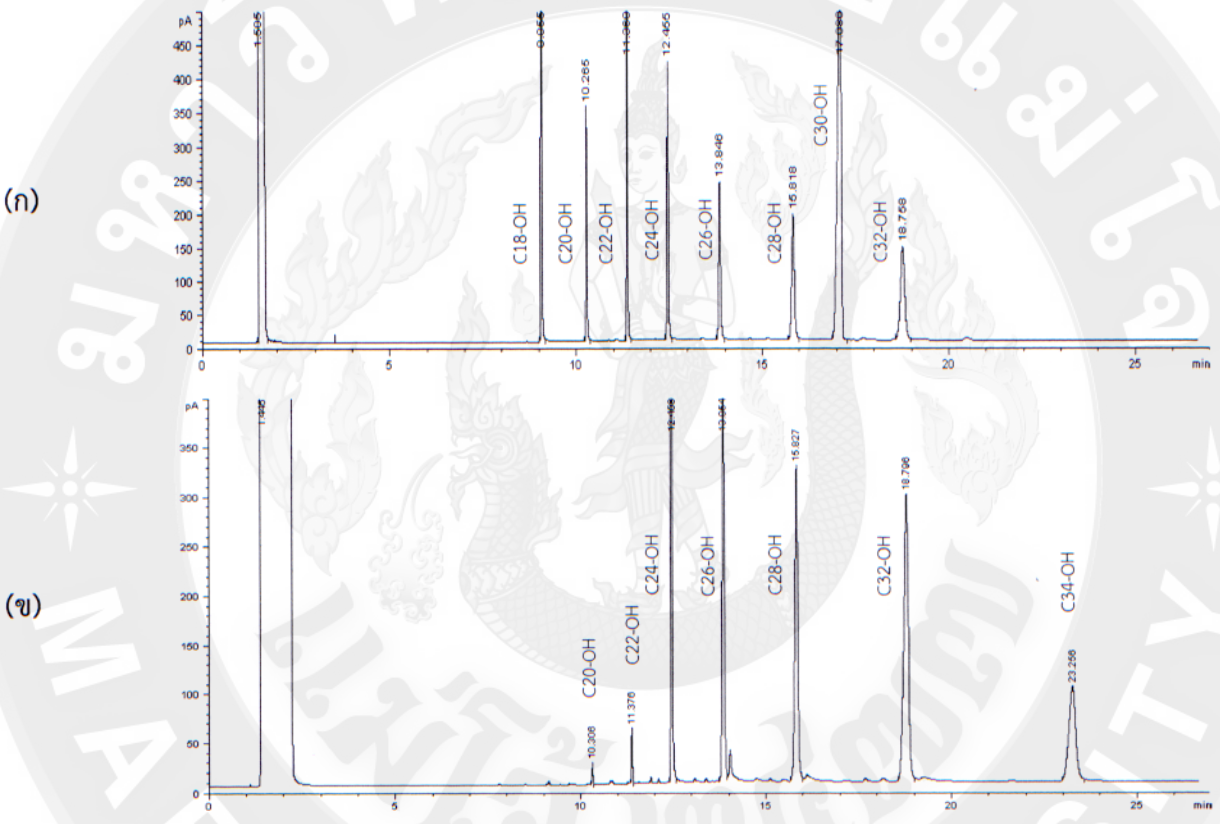
| Peak | Name | $T_R$ (min) | Area (pA*s) | Alcohol ratio (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Experimental | Reference [18] |
| 1 | Toluene | 1.4470 | 13333845 | - | - |
| 2 | Octadecanol (C18-OH) | - | - | - | - |
| 3 | Eicosanol (C20-OH) | 10.308 | 31.0 | 0.94 | |
| 4 | Docosanol (C22-OH) | 11.378 | 60.6 | 1.84 | - |
| 5 | Tetracosanol (C24-OH) | 12.448 | 650.5 | 19.76 | 9.0 |
| 6 | Hexacosanol (C26-OH) | 13.836 | 649.0 | 19.72 | 13.9 |
| 7 | Octacosanol (C28-OH) | 15.798 | 626.6 | 19.04 | 18.3 |
| 8 | Triacontanol (C30-OH) | - | - | - | 36.9 |
| 9 | Dotriacontanol (C32-OH) | 18.731 | 883.4 | 26.84 | 20.8 |
| 10 | Tetratricontanol (C34-OH) | 23.185 | 390.3 | 11.86 | 1.1 |
| Total | | | | 100 | 100 |

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที พบว่าประกอบด้วย Eicosanol (C20-OH) มี 0.94 % Docosanol (C22-OH) มี 1.84 %, Tetracosanol (C24-OH) มี 19.76 %, Hexacosanol (C26-OH) มี 19.72 %, Octacosanol (C28-OH) มี 19.04 %, Dotriacontanol (C32-OH) มี 26.84 % และ Tetratricontanol (C34-OH) มี 11.86 %

จากการวิเคราะห์ชนิดและร้อยละปริมาณสัดส่วนของแอลกอฮอล์ที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาวซึ่งแสดงดังตาราง 3.4 พบว่าแอลกอฮอล์ที่พบมีจำนวนคาร์บอน 20-34 อะตอม โดยพบ Dotriacontanol (C32-OH) ในปริมาณมากที่สุด 26.84 % ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Jackson และ Eller [18] ที่สกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งที่มาจากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ซึ่งถูกเลี้ยงใน Peoria รัฐ Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา พบแอลกอฮอล์ตั้งแต่จำนวนคาร์บอน 24-34 อะตอม และพบ Triacontanol (C30-OH) มากที่สุด 36.9 %

### 3.10.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขผึ้งสีเหลือง

โพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง โดยการเกิดปฏิกิริยาด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์นำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่ โดยการใช้ค่า $T_R$ ในการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ รูป 3.17 แสดงโครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์เปรียบเทียบกับโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง และตาราง 3.5 แสดงค่า $T_R$ และร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของแอลกอฮอล์




**รูป 3.17** โครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ (ก) และสารโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลืองโดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที (ข) ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ HP-5 ในช่วงอุณหภูมิ 150-280 องศาเซลเซียส

จากโครมาโทแกรมของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง (ก) เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเวลาคงค้างพบว่าโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขผึ้งสีขาวประกอบไปด้วย Eicosanol (C20-OH), Docosanol (C22-OH), Tetracosanol (C24-OH),

Hexacosanol (C26-OH), Octacosanol (C28-OH), Dotriacontanol (C32-OH) และ Tetratricontanol (C34-OH)

**ตาราง 3.5** ค่าเวลาคงค้าง ($T_R$) และร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของแอลกอฮอล์ ที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ 5 นาที

| Peak | Name | $T_R$ (min) | Area (pA*s) | Alcohol ratio (%) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Experimetal | Reference [18] |
| 1 | Toluene | 1.4450 | 13061104 | - | - |
| 2 | Octadecanol (C18-OH) | - | - | - | - |
| 3 | Eicosanol (C20-OH) | 10.306 | 43.2 | 0.47 | |
| 4 | Docosanol (C22-OH) | 11.376 | 109.6 | 1.19 | - |
| 5 | Tetracosanol (C24-OH) | 12.548 | 1851.9 | 20.06 | 9.0 |
| 6 | Hexacosanol (C26-OH) | 13.854 | 1734.3 | 18.78 | 13.9 |
| 7 | Octacosanol (C28-OH) | 15.827 | 1755.6 | 19.02 | 18.3 |
| 8 | Triacontanol (C30-OH) | | | | 36.9 |
| 9 | Dotriacontanol (C32-OH) | 18.796 | 2508.3 | 27.17 | 20.8 |
| 10 | Tetratricontanol (C34-OH) | 23.256 | 1229.7 | 13.31 | 1.1 |
| Total | | | | 100 | 100 |

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลือง โดยเร่งปฏิกิริยาด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที พบว่า Eicosanol (C20-OH) มี 0.47 % Docosanol, (C22-OH) มี 1.19 %, Tetracosanol (C24-OH) มี 20.06 %, Hexacosanol (C26-OH) มี 18.78 %, Octacosanol (C28-OH) มี 19.02 %, Dotriacontanol (C32-OH) มี 27.17 % และ Tetratricontanol (C34-OH) มี 13.31 %

จากการวิเคราะห์ชนิดและร้อยละปริมาณสัดส่วนของแอลกอฮอล์ที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลืองซึ่งแสดงดังตาราง 3.5 พบว่าแอลกอฮอล์ที่พบมีจำนวนคาร์บอน 20-34 อะตอม โดยพบ Dotriacontanol (C32-OH) ในปริมาณมากที่สุด 27.17 % ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Jackson และ Eller [18] ที่สกัดโพลิโคซา

นอลจากไขผึ้งที่มาจากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ซึ่งถูกเลี้ยงใน Peoria รัฐ Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา พบแอลกอฮอล์ตั้งแต่จำนวนคาร์บอน 24-34 อะตอม และพบ Triacontanol (C30-OH) มากที่สุด 36.9 %

จากการศึกษาองค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง พบว่าองค์ประกอบแอลกอฮอล์ในโพลิโคซานอลจากไขผึ้งในแต่ละแหล่งที่มา มีความแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ แหล่งเพาะปลูก รวมทั้งวิธีการสกัด รายงานการวิจัยของ Jackson และ Eller ในปี 2006 [18] กล่าวว่าองค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง ที่มาจากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ซึ่งถูกเลี้ยงใน Peoria รัฐ Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบไปด้วย Tetracosanol (C24), Hexacosanol (C26), Octacosanol (C28), Triacontanol (C30), Dotriacontanol (C32) และ Tetratriacontanol (C34) ส่วน Gamble และ คณะ ในปี 2002 [17] พบว่าองค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขผึ้ง ที่ผลิตในรัฐ Colorado ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบไปด้วย Eicosanol (C20), Tricosanol (C23), Tetracosanol (C24), Hexacosanol (C26), Heptacosanol (C27), Octacosanol (C28), Dotriacotanol (C32) และ Tetratriacontanol (C34) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขผึ้งแต่ละชนิดมีความแปรปรวนแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ แหล่งเพราะปลูก รวมทั้งวิธีการสกัดโพลิโคซานอล

ดังนั้นเห็นได้ว่าร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งขาวและสีเหลืองมีส่วนที่คล้ายคลึงกัน นั่นคือ นั่นคือมี Eicosanol ($C_{20}$-OH), Docosanol ($C_{22}$-OH), Tetracosanol ($C_{24}$-OH), Hexacosanol ($C_{26}$-OH), Octacosanol ($C_{28}$-OH) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกันกัน และยังพบ Dotriacotanol ($C_{32}$-OH) มากที่สุดเช่นเดียวกัน แสดงดังตาราง 3.6 อาจเนื่องมาจากวิธีที่ใช้ในการสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งสีเหลืองและสีขาวเป็นวิธีเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบแอลกอฮอล์สายยาวของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว และไขผึ้งสีเหลือง ก็ยังมีส่วนที่แตกต่างกันอยู่เพียงเล็กน้อย

จากรายงานการวิจัยของ Hargrove และคณะ ในปี 2004 [10] พบว่าการบริโภคโพลิโคซานอลที่มีความยาวของสายคาร์บอน 24-34 อะตอม ($C_{24}$-$C_{34}$) ในปริมาณ 5-20 มิลลิกรัม/วัน สามารถลดโคเลสเตอรอสที่ไม่ดี (Low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C) ได้ร้อยละ 21-29 ในขณะที่มีโคเรสเตอรอลที่ดี (High- density lipoprotein cholesterol; HDL-C) เพิ่มขึ้นร้อยละ 8-15 ดังนั้นโพลิโคซานอลที่สกัดได้จึงน่าจะเหมาะสมในการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้

**ตาราง 3.6** เปรียบเทียบร้อยละสัดส่วนองค์ประกอบแอลกอฮอล์สายยาวของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีเหลืองและสีขาว

| แอลกอฮอล์สายยาว | Alcohol ratio (%) | |
|---|---|---|
| | ไขผึ้งสีขาว | ไขผึ้งสีเหลือง |
| Eicosanol ($C_{20}$-OH) | 0.94 | 0.47 |
| Docosanol ($C_{22}$-OH) | 1.84 | 1.19 |
| Tetracosanol ($C_{24}$-OH) | 19.76 | 20.06 |
| Hexacosanol ($C_{26}$-OH) | 19.72 | 18.78 |
| Octacosanol ($C_{28}$-OH) | 19.04 | 19.02 |
| Dotriacontanol ($C_{32}$-OH) | 26.84 | 27.17 |
| Tetratricontanol ($C_{34}$-OH) | 11.86 | 13.31 |
| Total | 100 | 100 |

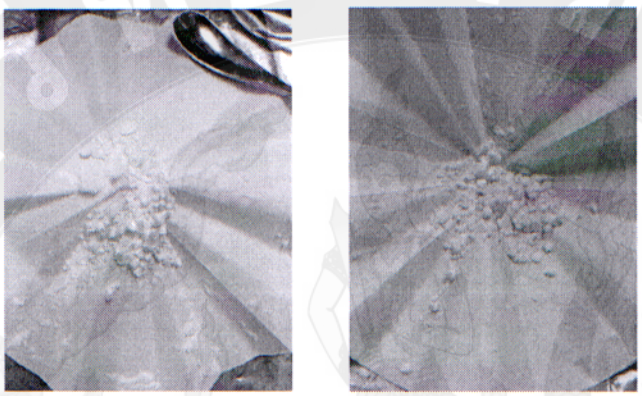
## 3.11 การคำนวณหาร้อยละผลผลิตของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (%yield)

จากการสกัดโพลิโคซานอลจากไขผึ้งโดยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยสารละลายเบส KOH ความเข้มข้น 0.5 M ใน 80 % เอทานอล ใช้พลังงานความร้อนจากไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที ได้แอลกอฮอล์สายยาว กับกรดไขมันอิสระสายยาวออกมา จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายผสมโทลูอีน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำมาสกัดด้วย ไอโซออกเทน : น้ำ : เอทานอล (60 : 30 : 10) ได้โพลิโคซานอลที่ละลายในส่วนที่ละลายในชั้นไอโซออกเทน และส่วนที่เป็นตะกอนนำมากรอง อบให้แห้ง เพื่อนำมาคำนวณ %yield ของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งทั้งสองชนิด แสดงดังตาราง 3.7 และเมื่อทำการศึกษาการทำให้โพลิโคซานอลที่บริสุทธิ์มากขึ้น โพลิโคซานอลที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว แสดงดังรูป 3.18

**ตาราง 3.7** ร้อยละผลผลิตของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (%yield)

| ชนิดของไขผึ้ง | น้ำหนักไขผึ้ง (g) | น้ำหนักตะกอนโพลิโคซานอล (g) | %yield ของ policosanol จาก purified beeswax |
|---|---|---|---|
| **ไขผึ้งสีขาว** | 4.0010 | 0.6787 | 16.960 |
| **ไขผึ้งสีเหลือง** | 4.0003 | 0.4352 | 10.870 |

อย่างไรก็ตามร้อยละผลผลิต (%yield) ที่ได้ เป็นเพียงน้ำหนักที่ได้จากในส่วนที่เป็นตะกอนเพียงเท่านั้น ซึ่งงานวิจัยของ Irmak และคณะ ในปี 2006 [6] และ สุภัทรา และคณะ ในปี 2551 [46] พบว่าแหล่งวัตถุดิบจากไขผึ้งมีปริมาณโพลิโคซานอลสูงกว่าแหล่งวัตถุดิบจากจมูกข้าวสาลีและชานอ้อยอยู่ในช่วง 12.56 ถึง 28.26 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจากการวิจัยพบว่า ถ้าหากสามารถลดการสูญเสียโพลิโคซานอลในระหว่างการศึกษาให้ได้มากที่สุด ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณร้อยละผลผลิตได้ ประกอบกับยังพบว่ามีกรดไขมันอิสระเจือปนอยู่ในโพลิโคซานอลที่สกัดได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ร้อยละผลผลิตไม่สูงเท่าที่ควร



(ก) (ข)

**รูป 3.18** ลักษณะของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งสีขาว (ก) และไขผึ้งสีเหลือง (ข)

# บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการแยกและการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขผึ้ง โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชัน โดยมีสารละลายเบสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเป็นการศึกษาถึงเทคนิคในการไฮโดรไลซ์ที่ใช้พลังงานจากไมโครเวฟเข้าร่วมในการเร่งปฏิกิริยา

จากการนำไขผึ้งทั้งสีขาว และสีเหลืองมาหาความชื้น พบว่าความชื้นของไขผึ้งสีขาวมีค่าร้อยละ 0.2606 และไขผึ้งสีเหลืองมีค่าร้อยละ 0.4972 และพบว่าไขผึ้งทั้งสองมีช่วงการหลอมเหลว 85-62 องศาเซลเซียส

นำไขผึ้งมาศึกษาองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในไขผึ้งด้วย TLC พบว่าไขผึ้งประกอบไปด้วย กรดไขมันอิสระ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน แวกซ์เอสเทอร์ และไตรกลีเซอไรด์ จากนั้นจึงทำการกำจัดไตรกลีเซอไรด์ออกจากไขผึ้ง โดยการรีฟลักซ์ด้วยสารละลายเฮกเซน ตามด้วยโพรพานอล จากนั้นจึงนำไขผึ้งเข้าสู่ขั้นตอนการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลาย KOH และ NaOH ที่ความเข้มข้น 2.0 M ที่เตรียมในตัวทำละลายคือ 80% เอทานอล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาร่วมกับการให้ความร้อนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสารละลายเบสทั้งสองสามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ โดยเข้าไปตัดพันธะเอสเทอร์ของไข ทำให้ได้แอลกอฮอล์สายยาว (โพลิโคซานอล) และกรดไขมันอิสระ

ในการศึกษาเวลา ความเข้มข้นของเบสและกำลังไฟฟ้าของไมโครเวฟที่ใช้ในการเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลเซ-ชันไขผึ้งที่ผ่านการกำจัดสิ่งเจือปนเพื่อสกัดโพลิโคซานอล พบว่าการใช้ไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 300 วัตต์ เป็นเวลา 60 วินาที สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันได้อย่างสมบูรณ์โดยมีสารละลาย KOH ใน 80% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.5 M เป็นตัวเร่งปฏิริยา และยังสามารถทำได้โดยใช้พลังงานไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ เวลานาน 5 นาที เพื่อเร่งปฏิกริยาให้เกิดอย่างสมบูรณ์ได้อีกด้วย

การทำให้โพลิโคซานอลบริสุทธิ์ คือการกำจัดกรดไขมันอิสระสายยาว ทำได้โดยนำไขผึ้งที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ มาสกัดด้วยทำละลายผสมและสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ได้โดยเทคนิคการใช้ด้วยทำละลายผสมร่วมกับการตกผลึกโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้โพลิโคซานอลตกตะกอน ซึ่งโพลิโคซานอลที่สกัดได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการยืนยันความบริสุทธิ์ของโพลิโคซานอลโดยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่าในโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งยังมีกรดไขมันอิสระอยู่ในปริมาณเล็กน้อย และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งทั้งสองชนิด ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ นาน 5 นาที ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) พบว่าประกอบด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความยาวตั้งแต่ 20-28 และ 32-34 อะตอม โดยแอลกอฮอล์แต่ละชนิดมีองค์ประกอบในร้อยละสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่อง เมื่อคำนวณหาร้อยละผลผลิตของโพลิโคซานอลที่สกัดได้จากไขผึ้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (%yield) โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชันด้วยพลังงานไมโครเวฟ โดยไขผึ้งสีขาวมีปริมาณร้อยละผลผลิต 16.96 และไขผึ้งสีเหลืองปริมาณร้อยละผลผลิต 10.87

# เอกสารอ้างอิง


1. ผึ้ง. [online]. http://plantpro.doae.go.th/beegroup/bee2.htm (accessed May 15, 2015).
2. Ilaria, B. and Maria, P. C., 2004, "Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1028, pp. 297-306.
3. Tulloch, A. P., 1980, "Beeswax-composition and analysis", Bee World, Vol. 61 (2), pp. 47-62.
4. Tulloch, A. P., 1971, "Structure of the ester and their component hydroxyl acids and diols", *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 6 (3), pp. 235-265.
5. Morgan, J., Townley, S., Kemble S. and Smith R., 2002, "Measurement of physical and mechanical properties of beeswax", *Materials Science and technology*, Vol. 18, pp. 463-467.
6. Irmak, S., Dunford, N. T. and Milligan, J., 2006, "Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts", *Food Chemistry*, Vol. 95, pp. 312-318.
7. Stuchlik, M. and Zak, S., 2002, "Vegetable lipids as components of functional food", *Biomedical Paper*, Vol. 146, pp. 3-10.
8. Jimenez, J. J, Bernal, J. L., Aumente, S., Toribio, L. and Bernal, L., 2003, "Ouality assurance of commercial Beeswax: II Gas chromatography electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acid", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1007, pp. 101-116.
9. Fukuda, N., Sho, H. and Chinin, I., 1984, "Effect of Okinawan sugar cane wax and fatty alcohols on serum and liver lipids in the rates", *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Vol.30, pp. 553-559.
10. Hargrove, J. L., Greenspan, P. and Haryle, D. K., 2004 "Nutritional significance metabolism of very long chain fatty alcohols and acid from dietary waxes", *Experimental Biology and Medicine*, Vol. 229, pp. 215-226.
11. Varady, K. A., Wang, Y. and Jones, P. J. H., 2003, "Role of policosanols in the prevention and treatment of cardiovascular disease", *Nutrition Reviews*, Vol. 61, pp. 376-383.

12. Menendez, R., Fernandez, S. I., Del Rio, A., Gonzalez, R. M., Fraga, V. and Amor, A. M., 1994, "Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances LDL processing in cultured human fibroblasts", *Biological Research*, Vol. 27, pp. 199-203.
13. Arruzazabala, M. L., Carbajal, D. R. M., Garcia, M. and Fraga, V., 1993, "Effects of policosanol on platelet aggregation in rats", *Thrombosis Research*, Vol. 69, pp. 321-327.
14. Carbajal, D., Arruzazabala, M. L., Valdes, S. and Mas, R., 1998, "Effect of policosanol on platelet aggregation and serum level of Arachidonic acid metabolites in healthy volunteers", *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, Vol. 58, pp. 61-64.
15. Rendon, A., Rodriguez, M. D., Lopez, M., Garcia, H., de la Cajigas, A. and Mas, R., 1992, "Policosanol: A Study of its Genotoxicity and teratogenicity in rodents", *Toxicology Letters*, Vol. 63, pp. 249.
16. Irmak, S. and Dunford, N. T., 2005, "Policosanol contents and compositions of wheat varieties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, pp. 5583-5586.
17. Gramble, W. R., Lui. Z., Bailey, D. T., Perez, P. P., Stull, D. P., Richheimer, S. L., Nichols, R. L. and Lenobel, R., 2003, **U.S. Patent** No. 20040019119 A1 "High Molecular weight primary aliphatic alcohols obtained from natural products and used thereof".
18. Jackson, M. A. and Eller, F. J., 2006, "Isolation of long chain aliphatic alcohols from beeswax using lipase-catalyzed methanolysis in supercritical carbon dioxide", *The journal of Supercritical Fluids*, Vol. 37, pp. 173-177
19. Cravotto, G., Binello, A., Merizzi, G. and Avogadro, M., 2004, "Improving solvent-Fee extraction of policosanol from rice bran by high density ultrasound treatment" *European Journal of Lipid Science and Technology*, Vol. 106, pp. 147-151.
20. Jimenez, J. J, Bernal, J. L., Aumente, S., Nozal M.J.D., Martin M. T. and Bernal, J. Jr., 2004, "Quality assurance of commercial Beeswax: I Gas chromatography - electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoester", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1024, pp. 147-154.

21. Miguel, M. and Fernando, M. N., 2013, "Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis", *Food Chemistry*, Vol. 136, pp. 961-968.

22. จิราภรณ์ พึ่งธรรม กรณ์กนก อายุสุข คณิศา กิตติรัตนไพบูลย์ นฤมล จียโชค และคณิต กฤษณังกูร. 2551, "การสกัด การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์องค์ประกอบของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าวของไทย" วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ, 31, 305-317.

23. Wikipedia. 1-Octacosanol. [online]. http://en.wikipedia.org/wiki/1-Octacosanol. (accessed May 15, 2015).

24. Wikipedia. 1-Hexacosanol. [online]. http://en.wikipedia.org/wiki/1-Hexacosanol. (accessed May 15, 2015).

25. Gansu New Legend Metals Trading Co., Ltd. High quality policosanol. [online]. http://thai.alibaba.com/product-gs/high-quality-policosanol-60228796108.html. (accessed May 15, 2015).

26. เมก้า ไลฟ์ไซแอ็นซ์ พีทีวาย จำกัด. ข้อมูลเพื่อการดูแลสุขภาพด้วยสารสกัดโพลีโคซานอล (Policosanol). [online]. http://megawecare.co.th/รายละเอียด/ข้อมูลการดูแลสุขภาพ/ข้อมูลเพื่อการดูแลสุขภาพด้วย-สารสกัดโพลีโคซานอล-Policosanol/27. (accessed May 15, 2015).

27. Castano G., Mas R., Fernandez J.C., Illnait J., Fernandez L., and Alvarez E., 2001, "Effects of Policosanol in older patients with type II Hypercholesterolemia and high coronary risk", *Gerotology*, Vol. 56A (3), pp. 186-192.

28. Berthold HK., Unverdorben S., Degenhardt R., Bulitta M., and Gouni-Berthold L., 2006, Effect of Policosanol on Lipid Levels Among Patients With Hypercholesterolemia or Combined Hyperlipidemia: A Randomized Controlled Trial", *American medical association*; Vol. 295(19), pp. 2262 -2269.

29. ผลิตภัณฑ์ล้ำค่าจากผึ้ง. [online]. http://www.aopdb03.doae.go.th/KM/bee%20product. (accessed May 15, 2015).

30. ไขผึ้งหรือขี้ผึ้ง. [online]. http://www.xn--72c2azblnq3c2a1h6dtb.com/ไขผึ้งหรือขี้ผึ้ง/. (accessed May 15, 2015).

31. ณัฐรดา วาเสนัง. เคล็ดไม่ลับของไขผึ้ง. [online]. https://www.gotoknow.org/posts/502528. (accessed May 15, 2015).

32. ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจจังหวัดเชียงใหม่.ผึ้งและแมลงเศรฐกิจ. [online]. [online]. http://www.aopdb04.doae.go.th/thebeeflies01. (accessed May 15, 2015).

33. ลิพิด. [online]. http://www.vcharkarn.com/lesson/1469. (accessed May 15, 2015).

34. โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์. บทที่ 4 ลิพิด (Lipid). [online].http://science.srru.ac.th/org/sci-learning/courseonline/4022503/chapter 4.htm. (accessed May 16, 2015).

35. วัชรา หงษ์เวียง และธีรพงษ์ แสงสิทธิ์. ลิพิด (Lipid). [online]. http://nakhamwit.ac.th/pingpong_web/biochem_web/Lipid.htm#. (accessed May 16, 2015).

36. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. Lipid / ลิพิด. [online]. http://www.food networksolution.com/wiki/word/0394/lip (accessed May 16, 2015).

37. Apissara Chaichuea. Lipid. [online]. http://biomolecule.myreadyweb.com/article/ topic-42852.html. (accessed May 16, 2015).

38. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. Microwave / ไมโครเวฟ. [online]. http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0401/microwave. (accessed May 16, 2015).

39. สมาคมนิวเคลียร์แห่งประเทศไทย. รังสีจากเตาไมโครเวฟ. [online]. http://www.nst.or.th/article/Article494/article49401.html. (accessed May 16, 2015).

40. ดุษฎี กิตติยวัฒน์. การทำให้บริสุทธิ์และการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของโพลิโคซานอลจากไขรำข้าว, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี, 2550.

41. Nandi S., Ganguly S., and Bhattachryya R., 2014, "Synthesis of Triacontanol Concentrate from Crude Rice Bran Wax by Microwave Treatment and Molecular Distillation", *Chemical Science Review and Letters*, Vol. 2(5), pp. 387-392.

42. Dunford N.T., 2010, "Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran", *Food Chemistry*, Vol. 119, pp. 1246–1249.

43. Lopez-Mesas M., 2003 "Microwave enhanced extraction of wool wax from solid wool scour wastes", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 494, pp. 255–260.

44. Terigar B.G., Terigar B.G., Balasubramanian S., Sabliov C.M., Lima M. and Boldor D., 2011, "Soybean and rice bran oil extraction in a continuous microwave system: From laboratory- to pilot-scale, *Food Engineering*, Vol. 104(2). pp. 208–217.
45. Boukhchina S., Harrabi S., Kallel H. and Mayer R.M, 2009, "Policosanol distribution and accumulation in developing corn kernels" *Food Chemistry*, Vol.115. pp. 918-923.
46. สุภัทรา ลิลิตชาญ, กรณ์กนก อายุสุข. ประโยชน์ด้านสุขภาพและกระบวนการผลิตโพลิโคซา-นอลจากไขรำข้าว, วารสารสาธรณสุขศาสตร์. 2551, 38(3), หน้า 457-464.
47. Valia, S. R., Jua, Y. H., Kaimalb, T. N. B. and Cherna, Y. T., 2005, "A Process for the Preparation of food-grade rice bran wax and the determination of its composition" Journal of the American Oil Chemists' Society, Vol. 82, pp. 57-64.
48. Policosanol. [Online]. Available at http://www.zhion.com/phytonutrients/Polycosanol.html. Accessed. 27 May 2015.

**บทความเผยแพร่**

1. Dennapa Yasamoot, Anakhaorn Srisaipet "Development of policosanol extraction from beeswax by microwave energy" Proceeding in The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016), 9-11 Feburary 2016, Bangkok, Thailand, pp.1078-1082.

2. Anakhaorn Srisaipet and Maypawee Aoopkham, 2015, "Extraction Purification and Composition Determination of Policosanols from Thai Beeswax", *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 9(8) pp. 42-47.

# Development of policosanol extraction from beeswax by microwave energy

Dennapa Yasamoot, Anakhaorn Srisaipet*
*Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University,*
*Chiang Mai 50290, Thailand*
*e-mail: anakhaorn@mju.ac.th

**Abstract:**

Policosanol is a group of long chain aliphatic alcohols of 20–36 carbon atoms which have beneficial uses in pharmaceutical and supplementary products. For this research, we had successfully used microwave instrument for activating hydrolysis of the wax ester in beeswax to policosanol in short time. The beeswax contained 0.2–0.5 % of moisture and melted at 58–62 °C. The crude beeswax was purified by refluxing with hexane and isopropanol for triglycerides elimination. The purified beeswax was completely hydrolyzed with 0.5 M KOH in 80% ethanol in 5 minutes at 100 watts microwave irradiation activation. The wax ester was hydrolyzed to long chain alcohols (policosanol) and long chain fatty acids, and thin layer chromatographic technique (TLC) was used to analyze the products. The hydrolysis technique via microwave energy was successfully used for policosanol extraction from beeswax.

## 1. Introduction

Policosanol is defined as a mixture of high molecular weight aliphatic primary alcohols with chain lengths ranging from 20 to 36 carbon atoms and contains mainly docosanol, tetracosanol, hexacosanol, octacosanol and triacontanol.[1] Policosanol is used for many conditions; it is principally used to reduce plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels, and increase high-density lipoprotein cholesterol.[2] Moreover, it has favorable effects on intermittent claudication, possibly due to its effects on platelet aggregation and endothelial function, and aiding in the prevention of cardiovascular disease.[3,4]

A common source of policosanol is several, such as rice bran wax, wheat germ, sugar cane, and beeswax.[5] The isolation of policosanol was divided into two main steps: extraction and purification. However, materials used in the extraction will affect the volume and the composition of policosanol

Beeswax mainly consists of esters of fatty acids and various long-chain alcohols. The extraction of policosanol or long chain alcohols from the wax was done by hydrolysis or saponification. Common bases used in catalysis include sodium hydroxide (NaOH) and potassium hydroxide (KOH), which can react in an organic solvent phase. The reported organic solvents used for extraction are n-a hexane, toluene, benzene, ethanol, methanol and acetone.[6] There is a variety of methods to purify policosanol. The most popular method is extracting with various solvents to separate policosanol out of free fatty acids. Gamble and et al.[7] reported on beeswax extraction by hydrolyzing with KOH in acetone at 50-60 °C for 3–7 hours following by cooling at 2 to -10℃ for 18 hours to purify the policosanol. Miguel et al. (2013)[8] had used KOH as catalyst in policosanol extraction at 100 °C for 2 hours. However, the longtime of policosanol extraction via hydrolysis is a drawback in the extraction.

The main objective of this study is to develop methods for policosanol extraction from beeswax by microwave radiation to complete hydrolysis of policosanol in the short time. The



© The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016)

completion of reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC).

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Materials and reagents

The white and yellow beeswaxes were obtained from Chamipan (Germany) and Honey Pradid Farm (Maewang, Chiang Mai), respectively. All solvents were analytical grade which purchased from Labscan (Thailand). Iodine resublimed was acquired from QReC (New Zealand). Stearic acid was supplied from Fluka (Switzerland). Steryl alcohol was purchased from Sigma Aldrich (Japan). Rice bran oil, used as a triglyceride standard, was food grade.

### 2.2 Humidity and melting point of beeswax

The humidity of the beeswax was determined by drying at 60 °C for 8 hours until the weight was constant. The melting point of beeswax was performed by transferring the beeswax into the capillary tube fixed with thermometer. The fixed capillary tube and thermometer was dropped into oil baths and the oil was heated. The range of beeswax melting temperature was recorded three times.

### 2.3 High purity beeswax preparation

The round bottom flask was equipped with a reflux condenser. Beeswax sample 20 g was mixed with 140 ml of hexane. In the first step, the temperature for refluxing beeswax was 65 °C for 30 minutes followed by washing with 70 ml of hot hexane twice. In the second step, the beeswax from the first step were repeated by refluxing with isopropanol at 70 °C for 30 minutes. The disappearance of impurities beeswax was checked for purity by TLC plate, and the bands were developed by iodine resublimed.

### 2.4 Optimization of potassium hydroxide concentration in organic solvent for catalysis

The potassium hydroxide solution was used to catalyze the reaction. It was prepared in various concentrations at 0.5, 1.0 and 2.0 M in many type of solvents such as 80% ethanol, toluene, hexane, chloroform and petroleum ether.

### 2.5 Extraction of policosanol from beeswax by microwave energy

The high purity beeswax was hydrolyzed with 0.5, 1.0 and 2.0 M KOH in 80% ethanol at 100 watts of microwave energy for 5 minutes as an activation source. The completion of reaction was tested by TLC.

## 3. Results & Discussion

### 3.1 Humidity and melting point of beeswax

Physical properties of white and yellow beeswax including humidity and melting point are shown in Table 1. White and yellow beeswaxes had 0.2606% and 0.4972% humidity, respectively. The low humidity content indicated good quality of beeswax resulting in a low level of rancid. The melting point was found in the range of 58-62 °C for both beeswaxes. The broad range of the melting point is because major components of beeswax are a mixture of long chain primary aliphatic alcohols, long chain fatty acids and other contaminations. Although the honeys are the cause of the color in yellow beeswax but it does not affect the melting point.

**Table 1.** Humidity and Melting point of beeswax.

| Sample | Humidity (%) | Melting point (°C) |
|---|---|---|
| White beeswax | 0.2606±0.0808 | 58-62 |
| Yellow beeswax | 0.4972±0.0857 | 58-62 |

### 3.2 High purity beeswax preparation

The removal of triglycerides and free fatty acids was done by refluxing with hexane twice followed by refluxing with isopropanol. Figure 1-3 showed the TLC plates of the high purity white and yellow beeswaxes. Triglycerides were not found



© The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016)

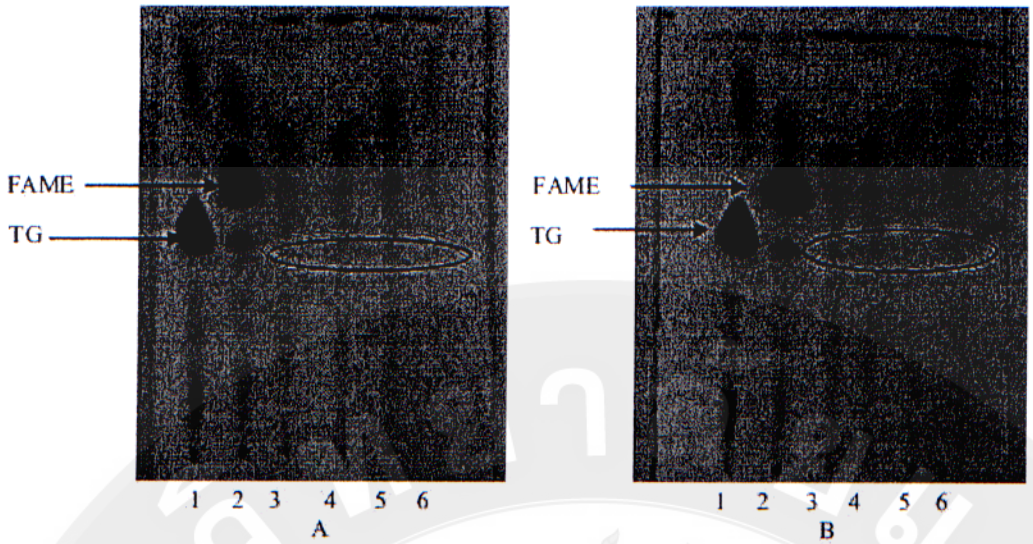



**Figure 1.** Thin layer chromatography of beeswax whose triglycerides were removed by refluxing with hexane. (A) white beeswax (B) yellow beeswax, (1 = rice bran oil (TG); 2 = standard fatty acid methyl ester (FAME); 3,5 = beeswax after refluxing with hexane in first and second time; 4,6 = hexane solution used to reflux the beeswax).

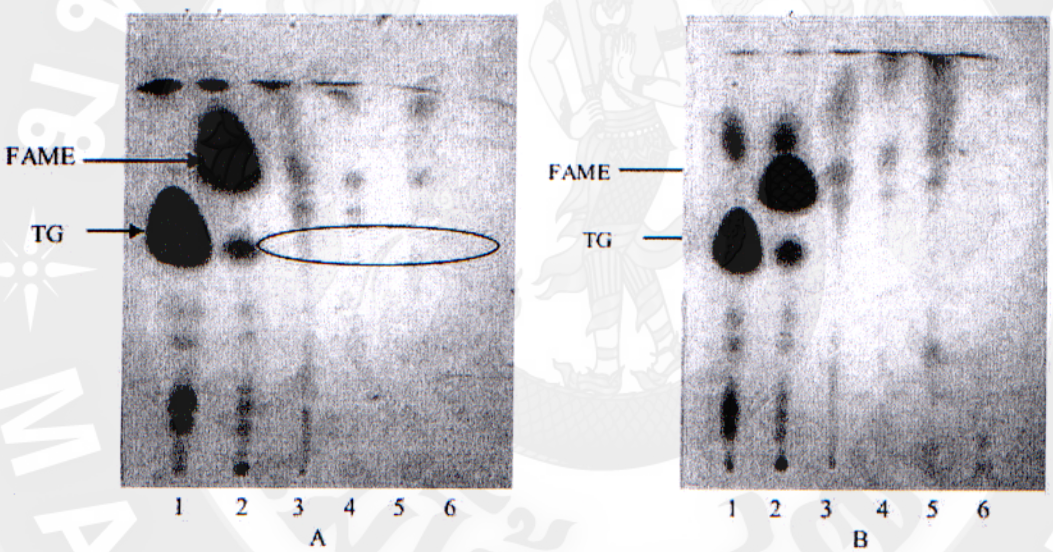



**Figure 2.** Thin layer chromatography of beeswax whose triglycerides were removed by refluxing with hexane when compared with isopropanol. (A) white beeswax (B) yellow beeswax, (1 = rice bran oil (TG); 2 = standard fatty acid methyl ester (FAME); 3 = beeswax refluxed with hexane in second time; 4 = hexane solution used to reflux the beeswax; 5 =beeswax refluxed with isopropanol in first time; 6, isopropanol solution used to reflux the beeswax).

in TLC plates, so it was assumed that elimination of triglyceride impurity was complete. However, the remains of free fatty acid in the purified beeswax were eliminated again together with long chain fatty acid which is by product from hydrolysis reaction. The beeswax ester with high purity was used as the material to extract policosanol.

### 3.3 Optimization of potassium hydroxide concentration in organic solvent for catalysis

The data in Table 2 were considered in selecting the types of solvent



© The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016)

and the

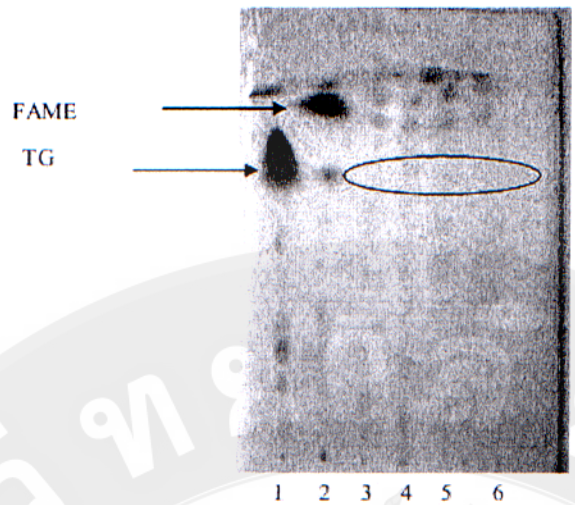



**Figure 3.** Thin layer chromatography of the yellow beeswax whose triglycerides were removed by refluxing with isopropanol. (1 = rice bran oil (TG); 2 = standard fatty acid methyl ester (FAME); 3,5 = beeswax refluxed with isopropanol in first time and second time; 4,6 = isopropanol solution used to reflux the beeswax).

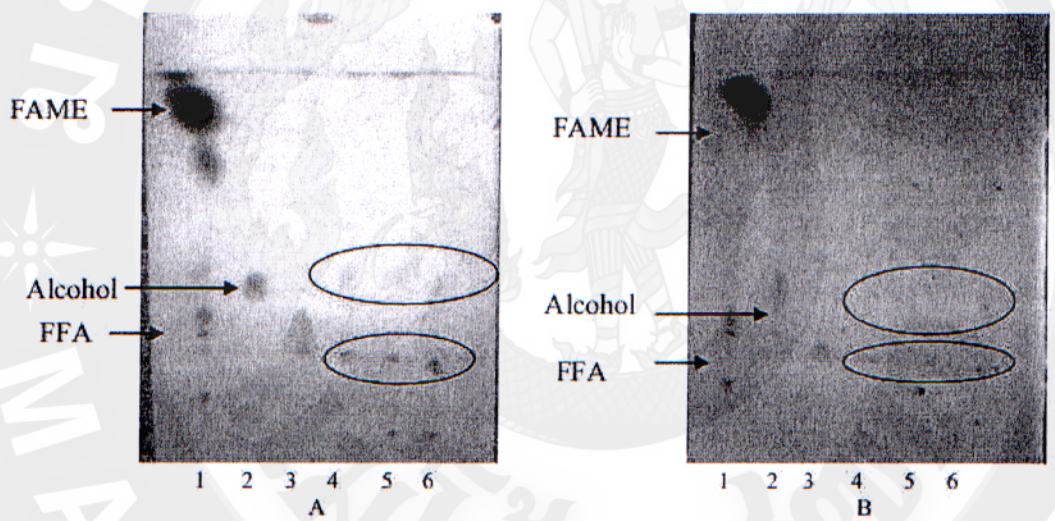



**Figure 4.** Thin layer chromatography of beeswax from hydrolyzation with 0.5 M 1.0 M and 1.0 M KOH solution in 80 % ethanol (A) white beeswax (B) yellow beeswax. (1 = fatty acid methyl ester (FAME); 2 = standard fatty alcohol; 3 = stearic acid (FFA); 4 = hydrolysis beeswax with 0.5 M KOH in 80 % ethanol; 5 = hydrolyze beeswax with 1.0 M KOH in 80 % ethanol; 6 = hydrolyzed beeswax with 2.0 M KOH in 80 % ethanol).

suitable concentration of base to catalyze the reaction for extraction of policosanol. The result showed that 80% ethanol was indeed the effective solvent for dissolving KOH at all concentrations. The KOH solution in 80% ethanol was prepared in 0.5, 1.0 and 2.0 M of concentration to be used as catalyst for beeswax hydrolysis of policosanol in the next step.

**3.4 Extraction of policosanol from beeswax by microwave energy**

The result of high purity beeswax hydrolysis was shown in Figure 4. The hydrolysis was done by catalyzing with 0.5, 1.0, and 2.0 M KOH concentrations



© The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016)

which were activated by 100 watts of microwave energy for 5 minutes. From TLC data in Figure 4, the wax ester band was not found because the wax was hydrolyzed to long chain aliphatic alcohol and long chain fatty acid. Moreover, the completion of hydrolysis was performed under 0.5 M KOH catalysis in rapid time of microwave energy.

**Table 2.** The dissolution of various KOH concentrations (0.5, 1.0 and 2.0 M) in many types of organic solvents.

| Organic solvents/ concentration | Dissolution |
|---|---|
| 80% Ethanol | |
| 0.5 M | ++++ |
| 1.0 M | ++++ |
| 2.0 M | ++++ |
| Toluene | |
| 0.5 M | + |
| 1.0 M | + |
| 2.0 M | + |
| Hexane | |
| 0.5 M | +++ |
| 1.0 M | ++ |
| 2.0 M | + |
| chloroform | |
| 0.5 M | + |
| 1.0 M | + |
| 2.0 M | + |
| Petroleum ether | |
| 0.5 M | ++ |
| 1.0 M | + |
| 2.0 M | + |

The symbol (+) show efficiency of KOH dissolution.

## 4. Conclusion

This work was successful in using of microwave energy activating the hydrolysis reaction for policosanol extraction from in shorter time consuming than refluxing technique.

## Acknowledgements

The authors wish to thank National Research Council of Thailand and Department of Chemistry, Faculty of Science, Maejo University for Finacial support.

## References

1. Irmak, S.; Dunford, N. T. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5583–5586.
2. Francini-Pesenti F.; Brocadello, F.; Beltramolli, D.; Nardi, M.; Caregaro, L. *Complement. Ther. Med.* **2008**, *16*, 61–65.
3. Joseph P.; Pharm, D. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2003**, *60*, 1–5.
4. Saoussem, H.; Sadok, B.; Paul, M. M.; Habib, K. *Food Chem.* **2009**, *115*, 918–923.
5. Knowlton, J.; Pearce, S. Oil, Fats and Waxes, in Handbook of Cosmetic science & Technology; Elsevier, **1993**; pp 21–34.
6. Virot, M.; Tomao, V.; Colnagui, G.; Visinoni, F.; Chemat, F. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1174*, 138–144.
7. Gamble, W. R.; Liu, Z.; Bailey, D. T.; Perez, P. P.; Stull, D. P.; Richheimer, S. L.; Nichols, R. L.; Lenoble, R. US Patent 6596776 B2, **2003**.
8. Miguel, M.; Fernando, M. N. *Food Chem.* **2013**, *136*, 961–968.



© The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016)

Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 9(8) Special 2015, Pages: 42-47

ISSN:1991-8178

Australian Journal of Basic and Applied Sciences

Journal home page: www.ajbasweb.com

# Extraction Purification and Composition Determination of Policosanols from Thai Beeswax

Anakhaorn Srisaipet and Maypawee Aoopkham

*Maejo University, Department of chemistry, Faculty of Science, 50290, Chiang Mai, Thailand*

ARTICLE INFO

***Article history:***
*Received 12 February 2015*
*Accepted 1 March 2015*
*Available online 28 March 2015*

***Keywords:***
*Extraction, Policosanol, Purification and Thailand Beeswax*

ABSTRACT

Policosanol is a mixture of long chain aliphatic alcohol of 20-36 carbon atoms. It has been use in pharmaceutical composition and dietary supplements. Beeswax is a rich sources of Policosanols. In this research, we focus on extracted and purified policosanols from Thai beeswax. The compositions of beeswax were checked by TLC and it contains wax ester, free fatty acids and triglycerides. The impurity such as triglycerides and free fatty acid were removed via refluxing with hexane. The get rid of triglycerides beeswax was saponified with 2.0 molar NaOH in 80% ethanolic on 3 hours. The saponified beeswax was great purified by the mixture of toluene : water : ethanol (70 : 20 : 10 v/v) in first step and use of isooctane : water : ethanol (70 : 20 : 10 v/v) in the second step. The isooctane extracted mostly contains policosanols without free fatty acids. The policosanols compositions were identified by gas chromatography and the range of carbon chain in fatty alcohol were $C_{18}$ to $C_{30}$. Thereby Tetracosanol ($C_{24}$) was predominant fatty alcohol in range 34.80 - 46.54 % proportion of total alcohols.

© 2015 AENSI Publisher All rights reserved.

**To Cite This Article:** Anakhaorn Srisaipet and Policosanols Content and Composition of Thailand Beeswax. *Aust. J. Basic & Appl. Sci., 9(8): 42-47, 2015*

## INTRODUCTION

Policosanols (PC) are a mixture of long chain aliphatic primary alcohol (20-36 carbon) that have been reported to have low-density lipoprotein and increasing high-density lipoprotein (Castano *et al*., 2001, Mas *et al*., 1999, Menendez *et al*., 1999 and Nurhan *et al*., 2010). Policosanols has also beneficial effects on smooth muscle cell proliferation, reducing plated aggregation and LDL peroxidation (Fraga *et al*., 1997, Kato *et al*., 1995 Gouni-Berthold and Berthold, 2002, Irmak and Dunford, 2005, Valdes *et al*., 1996). Currently, a number of dietary supplements containing policosanols are commercially available in the world market. The majority of these products are prepared from sugar cane and beeswax extracts (Irmak *et al*., 2006).

Beeswax is a rich source of policosanols. It is a complex mixture of long-chain alkanes, alkenes, monoester, diesters, hydroxymonoester and fatty acid as well as several minor components. Much of ester in beeswax are contain palmitic, oleic and tetracosanoic acid ester of alcohols ranging in length from 12 to 36 carbons, Monoester of $C_{24}$ to $C_{34}$ alcohols are about 40% of the composition of beeswax (Jackson, and, 2006). The compositions and content of substance in beeswax are various with origins (European bees *Apos mellifera*, African bees *Apis mellifera adansonii* and Asiatic bees *Apis dorsata*, *Apis florea* e *Apis indica)* (Ilaria and Maria, 2004). Beeswax from difference provinces of Spain are compost of various of long chain aliphatic alcohol from 16 to 34 carbon (Jimenez *et al*., 2004) whereas, beeswax from Portuguese shown in carbon 18 to 34 atoms (Miguel and Fernando, 2013). Thereby, the analyzation of beeswax from USA indicated aliphatic alcohol from C 20 to 30 and the main component of policosanols more than 40% is triacontanol (C30-OH) (Irmak *et al*., 2006).

The aim of this work was to establish the policosanols composition of beeswax from northern area of Thailand due to it is a main location of bee farms in the Country. The isolation and purification of alcohols was done after bees wax saponified follow by the characterization of long chain alcohol by GC-MS and GC-FID.

*Experimental:*

*Materials:*

Beeswax was obtained from Supa bee Farm in local area at Chiang Mai, Thailand. All solvents were analytical grade (Lab scan, Thailand). Sodium hydroxide, potassium hydroxide steric acid and steryl alcohol (C18-OH) were supplied by Sigma Aldrich,

**Corresponding Author:** Anakhaorn Srisaipet, Maejo University, Department of Chemistry, Faculty of Science, 50290, Chiangmai. Thailand.
Ph: +66 53875329, E-mail: anakhaorn@mju.ac.th

Thailand. Rice bran oil, used as a triglyceride standard was food grade.

*Moisture content and compositions of beeswax:*

The moisture content of the beeswax was determined by drying at 105°C until the weight constant.

The compositions of beeswax were done by spotting of beeswax, rice bran oil (as triglyceride; TG), standard steric acid (as free fatty acid; FFA) and steric acid methyl ester (as fatty acid methyl ester; FAME) on TLC plate. The developing solvent was a mixture of hexane, ethyl acetate and acetic acid (90: 10: 2, v/v/v) and developed bands by iodine resublimed.

*Samples preparation:*

Beeswax were prepared dissolving in hexane (10 g wax/10 ml) and it was repeated 3 times refluxing in water bath for 30 minutes with continuous stirring and following by washing with hot hexane. Then, the mixture was dried at 55°C for 24 hours to eliminate hexane. The get rid of impurity in wax was spotted on TLC plated and developing as previous experimental method.

*Extraction and purification of Plicosanols from beeswax:*

Five grams of high purity wax ester was hydrolyzed by refluxing with 100 ml of 0.5, 1.0 and 2.0 M of NaOH or KOH in 80% ethanol for 3 hours. The sample mixtures of hydrolyzed wax were check by TLC every 1 hour. The developing solvent was a mixture of chloroform, hexane and acetic acid (70: 30: 0.1, v/v/v) and developed bands by iodine resublimed.

The saponified wax ester was purified by refluxing with 200 ml of toluene, water and ethanol (70: 20: 10 v/v/v). The two steps of refluxing condition were heat at 80-90 °C with continuous stirring for 30 minutes in the first step following by decreasing temperature to 60-70 °C for 30 minutes without stirring in the second step. The toluene extracted was collected for repeating purification by washing and overnight soaking with isooctane, water and ethanol (70: 20: 10 v/v/v). The mud cake was discard and the mixture of solvents were separated from the cake. After the mud cake was dried at 60 °C resulting in policosanols. The policosanols purity was checked by TLC.

*Compositional analysis of Policosanols by GC-MS and GC-FID:*

Sample solutions were prepared by accurately weighting the proper amount the policosanols samples obtained as described under extraction of policosanols from beeswax and it were mixed with isooctane as solvent.

*GC-MS:*

A Hewlett-Packard 6890 series gas chromatograph (GC) system was directly coupled to a Hewlett-Packard 5973 mass spectrometer. A fused silica capillary HP-5 (5% phenyl-95% diethylpolysiloxane, 30 mx 0.25 mm, 0.25 μm film thickness) from Hewlett-Packard used for the analysis. The GC oven temperature was kept at 50 °C for 1 minute and programed at 5 °C/min to 320 °C and maintained at this temperature for 15 minutes. Initial flow rate of the carried gas (helium) was 1.0 ml/min. The inlet temperature was 300°C. The MS-temperatures were as follow: ion source: 230°C, quadrupole: 150°C. The ionization energy was 70 eV and a mass range of 50-600 U (2 scans/s). The sample were injected with 1:10 split ratio. Data analysis was carried out by using HP Chemstation software. The policosanols compositions of the samples were identified by direct comparison of their chromatographic retention times and mass spectra with those of authentic compounds. The peaks were also confirmed with NIST/EPA/NIH Mass spectra library.

*GC-FID:*

GC (Agilent Technologies 7890A series) separations were performed using a HP-5 capillary column. The oven temperature was programed as follow: the initial temperature was set at 150°C for 3 minutes, raise to 280 °C at 15°C/min and held at 280°C for 10 minutes. The carried gas was nitrogen with a flow rate 1 ml/min and the detector temperature was 280 °C. The Pressures of hydrogen and air were 60 and 5 KPa, respectively. The injection volume was 1.3 μl and the split ratio 1:30.

## RESULTS AND DISCUSSION

*Moisture content and compositions of beeswax:*

The moisture content of beeswax show in range 0.5266±0.03%. The compositions of beeswax material are show in Fig. 1. It is compost of wax ester, free fatty acid and triglyceride which is similar to previous report (Gemble and William, 2003). The get rid of impurity in wax such as triglycerides and free fatty acids is necessary step to prevent soap forming via hydrolyzation with strong base (saponification).

The elimination of triglycerides and free fatty acids were done by dissloving beeswax in hexane and repeated 3 times refluxing for 30 minutes with continuous stirring following by washing with hot hexane. TLC plate of the elimination show in Fig. 2. Triglycerides can be removed in the third refluxing time and washing with hexane. However, the remains of free fatty acid will be eliminated together with long chain fatty acid which is by product from saponification reaction or the policosanols

purification step. The high purity of wax ester will be used as material to extract policosanols.

*Extraction and purification of Policosanols from beeswax:*

The TLC had been present to hydrolyzation of the high purity wax ester by saponification reaction with 0.5, 1.0 and 2.0 M of NaOH in Fig. 3 and Fig. 4 for KOH in 80% ethanol for 3 hours. From the data, both of the strong base show high efficiency in catalyzation the saponification in only 1 hour at the lowest concentration. The wax ester did not appear on the TLC plate due to hydrolyzation the wax to long chain fatty acids and long chain aliphatic alcohols. The base NaOH 0.5 M were chosen for catalysis in saponification due to the reason to protection the possible emulsion formation from KOH catalysis. Moreover, a shorter reaction times have benefited to keep away from the formation of a brown precipitate thus highlighting a partial sample degradation (Ilaria and Maria, 2004).

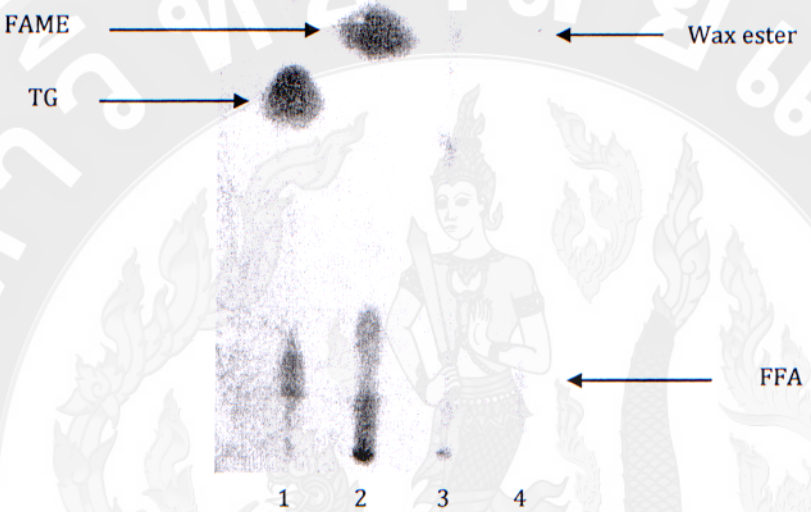



**Fig. 1:** Thin layer chromatography of beeswax sample materials. (1, rice bran oil (TG); 2, standard fatty acid methyl ester (FAME); 3, beeswax sample and 4, standard free fatty acid (FFA)).

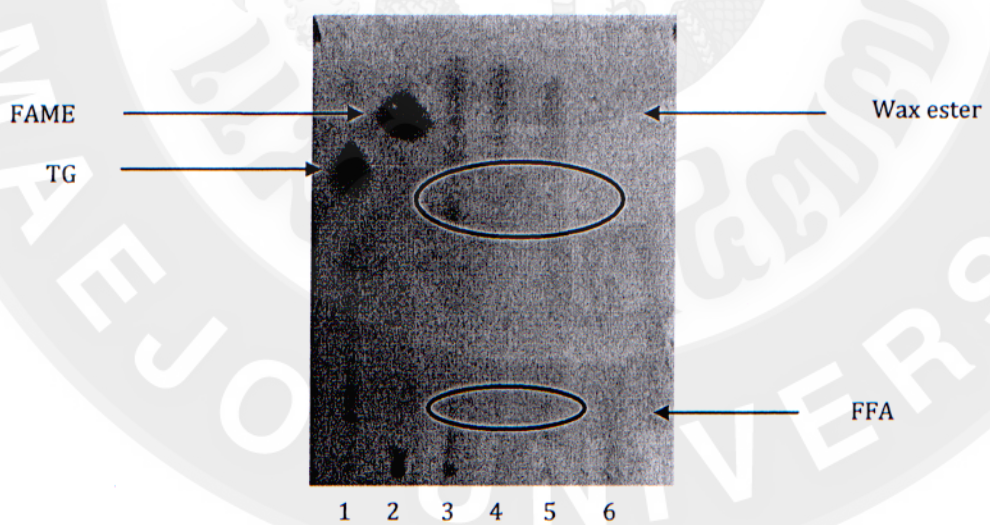
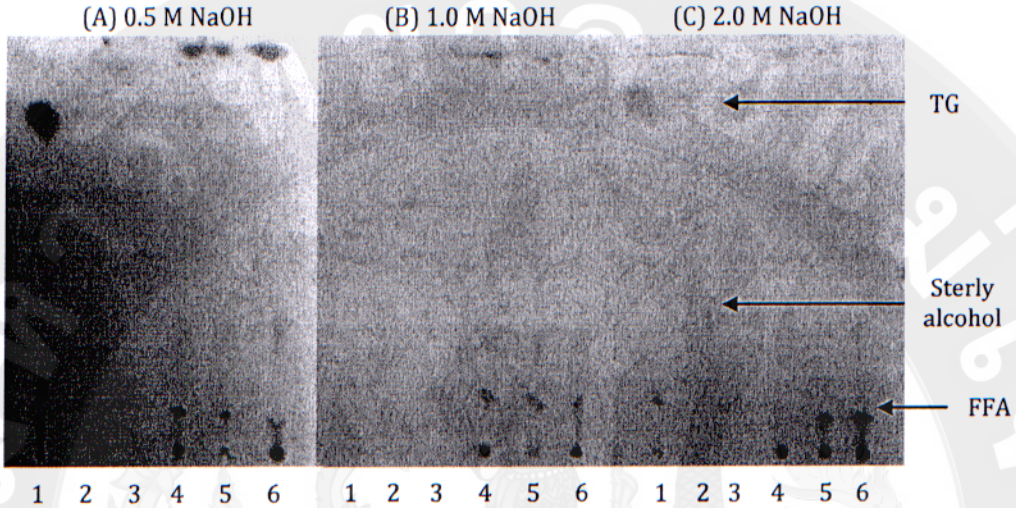



**Fig. 2:** Thin layer chromatography of the get rid of impurity from beeswax sample materials. (1, rice bran oil (TG); 2, standard fatty acid methyl ester (FAME); 3, first reflux beeswax; 4, second reflux beeswax; 5, third reflux beeswax and 6, standard free fatty acid (FFA))

The composition of long chain fatty acids and long chain aliphatic alcohols (Policosanols; PC) from saponified wax ester were purified by 2 step of temperature refluxing with the mixture of toluene, water and ethanol (70: 20: 10 v/v/v). The high temperature in first step at 80-90°C involves in non-policosanols elimination (Nurhan *et al.*, 2010). The policosanols dissolved in toluene whereas sodium

salt dissolved water in the fact that the emulsion forming of long chain hydrocarbon in fatty acid dissolving in non-polar toluene is a problem in purification. This problem can solved by ethanol addition into the solvent mixture, thereby clear of the layer separation. The policosanols extracted were repeated extraction via washing and soaking with isooctane water and ethanol (70: 20: 10 v/v/v). The non-polar isooctane which more than toluene had affect to increasing of policosanols purity due to decreasing the free fatty acid solution in this phase. The supernatant was collected to check by TLC which the indirectly way used to check policosanols purity (Fig. 5) and policosanols recovery got from this fraction by isooctane evaporation. The precipitate was dried at 60 °C resulting in white – yellow powder of policosanols for GC analyzation.




**Figu. 3:** Thin layer chromatography of saponified beeswax catalyzed by (A) 0.5, (B) 1.0 and (C) 2.0 M of NaOH in 80% ethanol. (1, rice bran oil; 2, steryl alcohol; 3, standard free fatty acid (FFA); 4, 1 hr. of hydrolyzation; 5, 2 hr. of hydrolyzation and 6, 3 hr. of hydrolyzation).

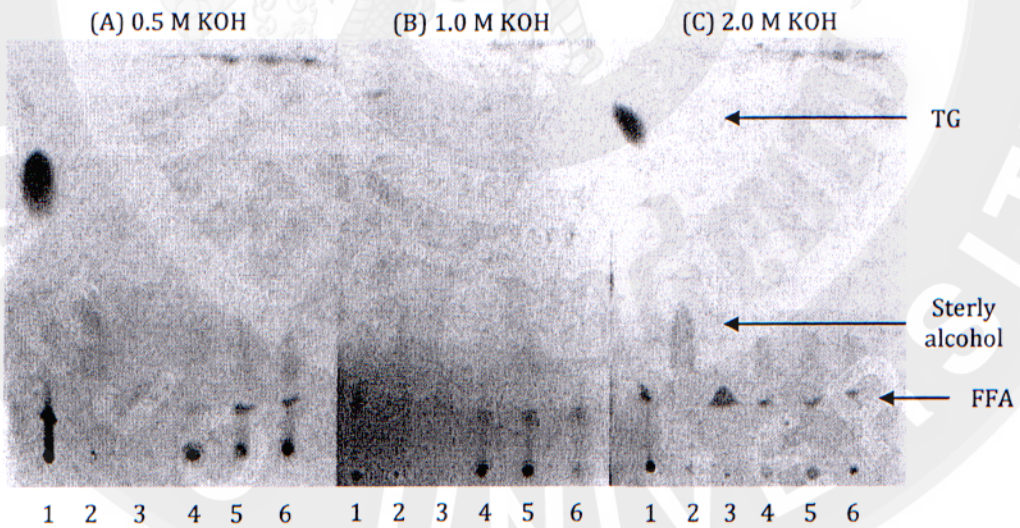



**Fig. 4:** Thin layer chromatography of saponified beeswax catalyzed by (A) 0.5, (B) 1.0 and (C) 2.0 M of KOH in 80% ethanol. (1, rice bran oil (TG); 2, steryl alcohol; 3, standard free fatty acid (FFA); 4, 1 hr. of hydrolyzation; 5, 2 hr. of hydrolyzation and 6, 3 hr. of hydrolyzation)

*Compositional analysis of Policosanols by GC-MS and GC-FID:*

Sample solutions were prepared by mixed the policosanols extracted with isooctane. GC-MS analysis of this mixture showed identifiable as five alcohols in Fig. 6 and the policosanols composition and content repeated analysis by GC-FID. A typical chromatogram of policosanols in beeswax sample is shown in Fig.7. Identification of the components and content are shown in table1. Beeswax from northern

area of Thailand is compost of various of long chain aliphatic alcohol from 18 to 30 carbon and the main component of policosanols more than 40% is Tetracosanol (C24-OH) (Irmak *et al.*, 2006). The various policosanols composition depend on the origins of beeswax such as America, European or African Jimenez *et al.*, 2004, Miguel and Fernando, 2013, Ilaria and Maria, 2004 and Irmak *et al.*, 2006).

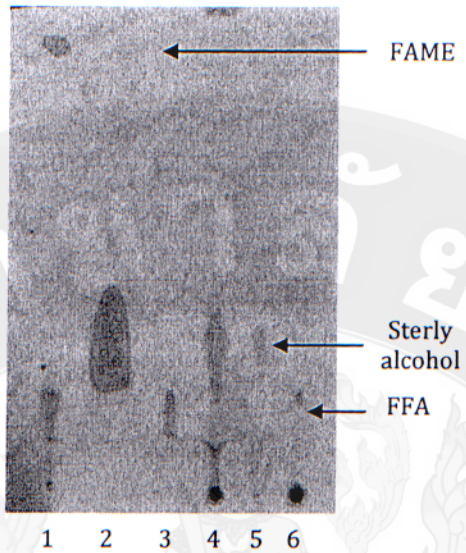



**Fig. 5:** Thin layer chromatography of the purify policosanols extracted (1, standard fatty acid methyl ester (FAME); 2, steryl alcohol; 3, standard free fatty acid (FFA); 4, saponified beeswax with 0.5 M NaOH 1 hr.; 5, isooctane fraction and 6, water and ethanol fraction)

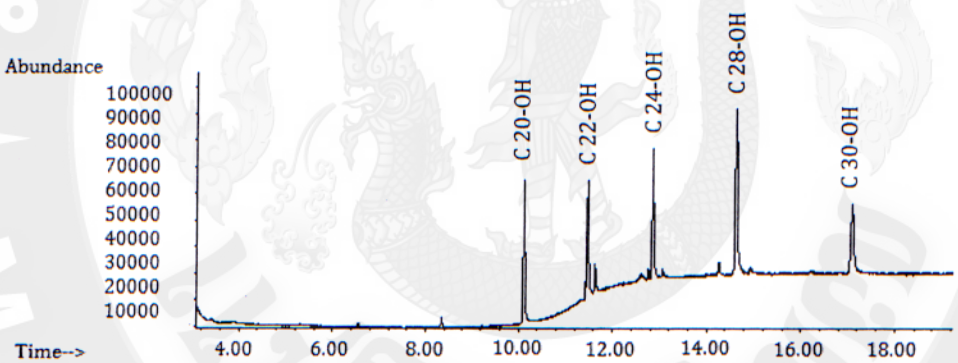



**Fig. 6:** Total ion chromatogram of fraction of policosanols product from beeswax.

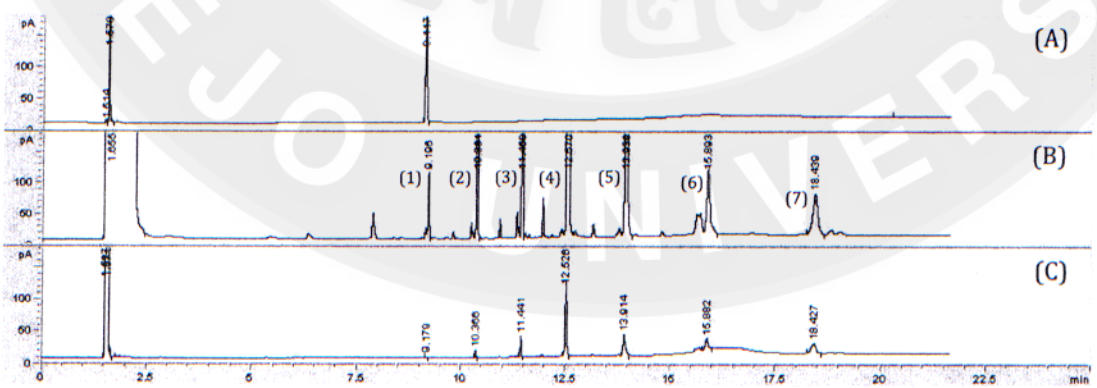



**Fig. 7:** Chromatograms of GC-FID of long chain aliphatic alcohol (A; steryl alcohol, B; supernatant fraction and C; precipitate fraction).

**Table 1:** Policosanols compositions of from beeswax.

| Peak No. | Long chain alcohol | Long chain alcohol (% portion) |
|---|---|---|
| 1 | Octadecanol (C18-OH) | 4.54 |
| 2 | Eicosanol (C20-OH) | 5.465 |
| 3 | Docosanol (C22-OH) | 10.54 |
| 4 | Tetracosanol (C24-OH) | 40.67 |
| 5 | hexacosanol (C26-OH) | 16.135 |
| 6 | octacosanol (C28-OH) | 9.515 |
| 7 | Triacontanol (C30-OH) | 13.135 |
| Total | | 100 |

*Conclusions:*

In this work, a successful extraction, purification and determination of the chemical profile of policosanols from Thai beeswax was performed. Tetracosanol (C24-OH) have highest quantities of the long chain alcohols compared to the composition of beeswax. The different chemical compositions of policosanols in beeswax were relation to natural beeswaxes and source-dependent. This study exhibit a preliminary data of policosanols from beeswax in Asia for developing to pharmaceutical industries.

## ACKNOWLEDHMENTS

The authors wish to thank National Research Council of Thailand for financial support, Department of Chemistry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand. Thanks Assoc. Prof. Kanit Krisnangkura and Assoc. Prof. Kornkanok aryusuk are gratefully suggestion.

## REFERENCES

Castano, G., R. Mas, J.C. Fernandez, J. Illnait, L. Fernandez and E. Alvarez, 2001. Effects of Policosanol in Older Patients with Type II Hypercholesterolemia and High Coronary Risk. The journal of Gerontology: A Biological Sciences and Medical Sciences, 56: 186-192.

Fraga, V., R. Menendez, A.M. Amor, R.M. Gonzalez, S. Jimenez and R. Mas, 1997. Effect of Policosanol on in Vitro and in Vivo Rat Liver Microsomal Lipid Peroxidation. Archives of Medical Research, 28: 355-360.

Gemble and R. William, 2003. High Molecular Weight Primary Aliphatic Alcohols Obtained from Natural Products and Uses Thereof, United States Patent.

Gouni-Berthold, I. and H.K. Berthold, 2002. Policosanol: Clinical Pharmaceuticology and Therapeutic Significance of a New Lipid- Lowering Agent. American Heart Journal, 143: 356-365.

Ilaria, B. and P.C. Maria, 2004. Characterisation of Beeswax in Works of Art by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Procedures. Journal of Chromatography A, 1028: 297-306.

Irmak, S. and N.T. Dunford, 2005. Policosanol Contents and Compositions of Wheat Varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 5583-5586.

Irmak, S., N.T. Dunford and J. Milligan, 2006. Policosanol Contents of Beeswax, Sugar Cane and Wheat Extracts. Food Chemistry, 95: 312-318.

Jackson, M.A. and F.J. Eller, 2006. Isolation of Long Chain Aliphatic Alcohols from Beeswax Using Lipase-Catalyzed Methanolysis in Supercritical Carbon Dioxide. The journal of Supercritical Fluids, 37: 173-177.

Jimenez, J.J., J.L. Bernal, S. Aumente, M.J.D. Nozal, M.T. Martin and J. Jr. Bernal, 2004. Quality Assurance of Commercial Beeswax: I Gas Chromatography - Electron Impact Ionization Mass Spectrometry of Hydrocarbons and Monoester. Journal of Chromatography A, 1024: 147-154.

Kato, S., K.I. Karino, S. Hasegawa, J. Nagasawa, A. Nagasaki, M. Eguchi, T. Ichinose, K. Tago and H. Okumori, 1995. Octacosanol Affects Lipid Metabolism in Rats Fed on a High-fat Diet. British Journal of Nutrition (London), 73: 433-441.

Mas, R., P. Rivas, J.E. Izquierdo, R. Hernandez, J. Fernandez, S.D. Orta, *et al.*, 1999. Pharmacoepidemiologic Study of Polycosanol. Current Therapeutic Research, 60: 458-467.

Menendez, R., V. Fraga, A.M. Amor, R.M. Gonzalez and R. Mas, 1999. Oral Administration of Policosanol Inhibits in Vitro Copper Ion-Induced Rat Lipoprotein Peroxidation. Physiology and Behavior, 67(1): 1-7.

Miguel, M. and M.N. Fernando, 2013. Authentication of Beeswax (*Apis mellifera*) by High-Temperature Gas Chromatography and Chemometric Analysis, Food Chemistry, 136: 961-968.

Nurhan, T.D., S. Irmak and R. Jonnala, 2010. Pressurised Solvent Extraction of Policosanol from Wheat Straw, Germ and Bran. Food Chemistry, 119: 1246-1246.

Valdes, S., M.L. Arruzazabala and E. Fernandez, 1996. Effect of Policosanol on Platelet Aggregation in Healthy Volunteers. International Journal of Clinical Pharmacology Research, 16: 67-72.