สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตแผ่น TLC โดยใช้ซิลิกาเจลจากแกลบข้าว สำหรับวิเคราะห์คาเฟอีนในเครื่องดื่ม

นางสาวกมลวรรณ พนาดร
นางสาวศศนันท์ กิตติภักดี
นางสาวต้องใจ แถมพยัคฆ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 62032
วัน,เดือน,ปี 25 ก.ค. 2549

b 11608270
ส.....

ปัญหาพิเศษ/โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production TLC plate by using silica gel from rice husk to determine caffeine in beverage

Ms. KAMONWAN PANADORN

Ms. SASANUN KITTIPAKDEE

Ms. TONGJAI THAMPAYAK

A Sepecial Project Submitted in Partial fulfilment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Acadamic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตแผ่น TLC โดยใช้ซิลิกาเจลจากแกลบข้าวสำหรับวิเคราะห์คาเฟอีนในเครื่องดื่ม

นักศึกษา นางสาวกมลวรรณ พนาดร

นางสาวศศนันท์ กิตติภักดี

นางสาวต้องใจ แถมพยัคฆ์

ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้ปัญหาพิเศษ/โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.นงนุช ศิวภิญโญยศ	
กรรมการ ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ	
กรรมการ ผศ. คณิตา ตังคณานุรักษ์	

.....

(ผศ.ดร.ประยงค์ ดวงดี)

หัวหน้าภาควิชาเคมี

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตแผ่น TLC โดยใช้ซิลิกาเจลจากแกลบข้าวสำหรับวิเคราะห์คาเฟอีนในเครื่องดื่ม

นักศึกษา นางสาวกมลวรรณ พนาดร
นางสาวศศนันท์ กิตติภักดี
นางสาวต้องใจ แถมพยัคฆ์

ภาควิชา เคมี

สาขาวิชา เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

ปีการศึกษา 2547

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. คณิตา ตังคณานุรักษ์

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของโครงงานนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและความเป็นไปได้ในการใช้ซิลิกาเจลที่เตรียมมาจากแกลบข้าวเป็นตัวดูดซับในเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยซิลิกาเจลที่นำมาทดสอบต้องผ่านขั้นตอนการสกัดจากแกลบข้าว 4 ขั้นตอน ได้แก่ การเผา , การรีฟลักซ์ ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ , การตกตะกอนและการทำให้แห้ง , การบดและร่อนให้อยู่ในลักษณะที่เป็นผง หลังจากนั้น นำซิลิกาเจลที่เตรียมได้ไปเคลือบลงบนแผ่น TLC (20 cm. x 20cm.) และนำไปใช้สำหรับการวิเคราะห์ สารมาตรฐานคาเฟอีนและตัวอย่าง ชา กาแฟ จำนวน 6 ตัวอย่าง ระบบของตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เอทิลอะซิเตต , กรดฟอร์มิก, กรดอะซิติก, น้ำ(100:11:11:26) และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค UV – vis spectrophotometry. ประสิทธิภาพของการแยกด้วยแผ่น TLC หาได้จากการเปรียบเทียบด้วยซิลิกาเจลสำเร็จรูป (ซิลิกาเจล จี) ที่เคลือบลงบนแผ่น TLC ผลที่ได้จะแสดงในรูปของค่า R_f จากซิลิกาเจลทั้ง 2 ชนิดที่เคลือบลงบนแผ่น TLC (ซิลิกาเจลจากแกลบ และซิลิกาเจล จี) พบว่าค่า R_f ของสารมาตรฐานคาเฟอีน มีค่าเท่ากับ 0.78 และ0.89 ของตัวอย่างชามีค่าเท่ากับ 0.78 และ 0.90 ตัวอย่างกาแฟมีค่าเท่ากับ 0.74 และ 0.84 ตามลำดับ ดังนั้น ซิลิกาเจลที่ใช้ในโครงงานนี้จึงมีประสิทธิภาพเหมาะสมในการใช้เป็นตัวดูดซับในการแยกด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production of TLC plate by using Silica gel from rice husk to determination Caffeine in Beverage
Name	Miss Kamonwan Panadorn
	Miss Sasanun Kittipakdee
	Miss Tongjai Thampayak
Department	Science
Program	Industrial Chemistry - Analytical Instrumention
Academic Year	2547
Special Project Advisor	Asst. Prof. Kanita Tangkananuruk

ABSTRACT

The aim of this project was to study the possibilities and efficiency in using silica gel which prepared from rich husk as adsorbent for TLC separations.The silica gel was extracted from rice husk by four steps , burning , reflux with sodium hydroxide , precipitation and dried , ground and sieve to powder form. Then the obtained silica products was coated on TLC – plates (20 cm. x 20 cm.) and were used to separate for analysis of standard caffeine and six sample of coffee and tea. Solvent system : ethyl acetate , formic acid , acetic acid , water (100:11:11:26) and UV – detection were used. Efficiency of TLC separation can be compared with processed silica gel G – precoated TLC – plate. The result of R_f from two types of silica gel precoated TLC – plate (silica gel from rice husk and processed silica gel G) indicated that R_f of standard caffeine were 0.78 and 0.89 , tea sample were 0.78 and 0.90 , coffee sample were 0.74 and 0.84 respectively . Therefore , the silica gel from this project can be considered as a efficient adsorbent for TLC separation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ. คณิตา ตังคณานุรักษ์ ที่คอยให้คำแนะนำต่างๆ ที่มีประโยชน์มากมาย ขอบคุณค่ะ

ขอบคุณกรรมการคุมสอบ ผศ. นงนุช และ ดร. วิบูลย์ ที่เสียสละเวลามาเป็นกรรมการคุมสอบให้พวกเราค่ะ

ขอขอบคุณ รศ. อรุณี สำหรับคำแนะนำ และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ขอบคุณค่ะ

ขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์ตึกวิทยาศาสตร์ทุกคน อาทิ เช่น คุณสุรินทร์ คุณกัญญา คุณสุภัทร สำหรับคำแนะนำต่างๆ มากมาย ขอบคุณค่ะ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ คุณสุพจน์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับอุปกรณ์ต่างๆ และคอยเป็นกำลังใจให้ค่ะ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน ที่คอยให้กำลังใจตลอดมา ช่วยทำ lab และบางครั้งก็อยู่เป็นเพื่อนเวลาที่พวกเราทำงานจนถึงดึก บางครั้งก็คอยซื้อของกินเข้ามาให้กิน และไปส่งที่หอด้วยเวลาที่ทำงานจนถึงดึก ขอบคุณค่ะ

ขอขอบคุณผู้ที่ทีส่วนเกี่ยวข้องในงานครั้งนี้ ที่ทำให้โปรเจคของพวกเราสำเร็จไปได้ด้วยดีที่ไม่ได้กล่าวถึงในที่นี้ทุกๆท่านด้วยค่ะ

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ของพวกเราที่คอยเป็นกำลังใจ และกำลังทรัพย์ ให้พวกเราด้วยดีตลอดมา และตลอดไป ขอบคุณค่ะ

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมโปรเจคด้วยค่ะ ที่ช่วยกันทำงานหนักจนผ่านไปได้ด้วยดี

และท้ายที่สุดขอขอบคุณที่มีโครงงานชิ้นนี้เกิดขึ้น ทำให้พวกเราได้มีโอกาสมาทำงานร่วมกัน ทำให้เรารู้จักการช่วยเหลือ การอดทนและเสียสละมากขึ้น ขอบคุณค่ะ

นางสาวกมลวรรณ พนาดร

นางสาวศศนันท์ กิตติภักดี

นางสาวต้องใจ แถมพยัคฆ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	4
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	5
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 ทฤษฎี	7
2.1 โครมาโทกราฟี	7
2.2 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี	9
2.3 ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงาน	33
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	33
3.2 การเตรียมซิลิกาเจลจากแกลบข้าว	35
3.3 การเตรียมแผ่น TLC	37
3.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยเทคนิค TLC	38
3.5 การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	39
3.6 การทดสอบความแม่นยำ	40
3.7 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี	40
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	41
4.1 ผลจากการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography	41
4.2 ผลจากการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค UV–visiblespectrophotometry	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	46
5.1 สรุป	46
5.2 ข้อเสนอแนะ	46
เอกสารอ้างอิง	47
ภาคผนวก	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงปริมาณของคาเฟอีนที่อยู่ในเครื่องดื่มทั่วๆไป 3
ตารางที่ 1.2 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน 5
ตารางที่ 2.1 คู่ของตัวดูดซับและตัวทำละลายที่เหมาะสม 11
ตารางที่ 2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปเรียงตามโพลาริตีจากน้อยไปมาก 22
ตารางที่ 2.3 ข้อเปรียบเทียบของเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยวและลำแสงคู่ 31
ตารางที่ 4.1 แสดงค่า retardation factor (R_f) ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง 41
ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบค่า retardation factor (R_f) ที่ได้จากซิลิกาเจล ที่ผลิตจากแกลบข้าวและซิลิการเจล จี 42
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่เตรียมได้จากการใช้ซิลิกาเจลแต่ละชนิด 43
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ได้จากซิลิกาเจลแต่ละชนิด 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่1.1 แสดงสูตรโครงสร้างของคาเฟอีน 2
รูปที่ 2.1 แสดงการแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี 8
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะโครงสร้างของซิลิกาเจล ซึ่งแสดงให้เห็นพันธะต่างๆ
และ Silanol groups 16
รูปที่ 2.3 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย 17
รูปที่ 2.4 ถังสำหรับการทำดีเวลลอป 21
รูปที่ 2.5 องค์ประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ 26
รูปที่ 2.6 Absortion filter 27
รูปที่ 2.7 Interference filter 28
รูปที่ 2.8 แสดงการทำงานของปริซึมและเกรตติง 28
รูปที่ 2.9 เกรตติงชนิดต่างๆ 28
รูปที่ 2.10 แสดงกราฟมาตรฐานทั่วไปที่ใช้หาปริมาณสาร 32
รูปที่ 4.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน
ที่เตรียมได้จากซิลิกาเจลที่ผลิตจากแกลบข้าว 43
รูปที่ 4.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน
ที่เตรียมได้จากซิลิกาเจล จี 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม โดยเฉพาะการทำนาข้าว ซึ่งข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจ ที่ประเทศไทยมีการส่งออกมากเป็นอันดับหนึ่ง และเป็นอาหารหลักของประชากรในประเทศไทย ในแต่ละปีมีการผลิตข้าวประมาณ 17 – 19 ล้านตันต่อปี ดังนั้นในแต่ละปีจึงมีวัสดุเหลือทิ้งจากการ สีข้าวในปริมาณมาก ซึ่งในที่นี้วัสดุเหลือทิ้งที่จะนำมาใช้คือแกลบข้าว

เนื่องจากแกลบข้าวมีองค์ประกอบที่เป็นซิลิกาอยู่ถึง 15.1% และเมื่อนำมาเผาที่อุณหภูมิ 400 – 500 ^{o}C จะได้ขี้เถ้าแกลบซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น ซิลิคอนไดออกไซด์อยู่ถึง 90%

โครงงานวิจัยนี้จึงคิดผลิตซิลิกาเจล ที่มีขนาดในระดับไมครอน เพื่อใช้เป็นตัวดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ให้กับเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography ,TLC) เพื่อใช้ในการแยกคาเฟอีน ซึ่งเป็นสารที่พบอยู่ใน ชา กาแฟ และเครื่องดื่มบางประเภท นอกจากนี้ยังพบในยาบางชนิด เช่น ยากระตุ้นความคิด (NoDoz) ยาแก้แพ้ (Dristan) ยาลดน้ำหนัก (Dexatrin , Dietac) ยาควบคุม (Darvon , Fiorina) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสขมเล็กน้อย

คาเฟอีนเป็นอัลคาลอยด์ (alkaloids: Alkaline - like) ตัวหนึ่งซึ่งจัดว่าเป็นสารประกอบเฮทเทอโรไซคลิกที่พบในธรรมชาติจำพวก Xanthine ถูกนำมาใช้ในปริมาณมากกว่า 260 ล้านปอนด์ทุกปีผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยคาเฟอีน ได้แก่ กาแฟ ชา น้ำอัดลม โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำดื่มโคลา นอกจากนี้ยังพบในยาบางชนิด เช่น ยากระตุ้นความคิด (NoDoz) ยาแก้แพ้ (Dristan) ยาลดน้ำหนัก (Dexatrin , Dietac) ยาควบคุม (Darvon , Fiorina) ปริมาณคาเฟอีนที่พบในเครื่องดื่ม อาหาร ยา แสดงดังตารางที่ 1.1

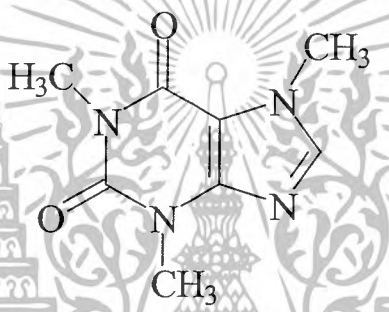
คาเฟอีนถูกสกัดได้เป็นครั้งแรกในห้องปฏิบัติการในปี ค.ศ. 1821 โดยนักเคมีชาวฝรั่งเศสชื่อ Pierre Jean Robiquet คาเฟอีนมีสมบัติเป็นตัวกระตุ้น ชาวจีนโบราณเป็นผู้ใช้คาเฟอีนในรูปของชา ชาวอาหรับโบราณก็ใช้คาเฟอีนในรูปของกาแฟ แม้แต่มนุษย์ในยุคหินก็ถูกเชื่อว่าใช้คาเฟอีนในเครื่องดื่มในสมัยนั้นด้วย นอกจากนี้ยังเพิ่มความว่องไว เพิ่มการนึกคิด ไม่ง่วงนอน ช่วยทำให้การทำงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับบางคนทำให้ตื่นตัวตลอดเวลา แต่คาเฟอีนก็มีข้อเสียเช่นกัน เช่น ทำให้การเต้นของหัวใจเร็วขึ้น ความดันโลหิตสูงขึ้น ทำให้แผลหายช้า ระคาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคือง เกิดความเครียด ทำลายระบบประสาท ตาลาย เวียนศีรษะ หน้ามืด เป็นต้น อย่างไรก็ตาม คาเฟอีนก็มีคุณสมบัติช่วยให้ระบบการขับถ่ายปัสสาวะได้ดี

ในปัจจุบันนี้คาเฟอีนยังไม่ถูกพิจารณาว่าเป็นสารเสพติด และไม่มีหลักฐานว่าเป็นตัวทำให้เกิดโรคมะเร็ง และโรคที่เกี่ยวกับหัวใจ อย่างไรก็ตามคาเฟอีนอาจมีผลต่อการเกิดทารก ดังนั้น ผู้หญิงที่ตั้งครรภ์จึงควรหลีกเลี่ยงต่อการดื่มหรือรับประทานอาหารที่มีคาเฟอีนผสมอยู่

คาเฟอีนเป็นสารจากธรรมชาติ มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีรสขม มีชื่อทางเคมีว่า 1,3,7-trimethylxanthine มีโครงสร้างดังรูป



รูปที่1.1 แสดงสูตรโครงสร้างของคาเฟอีน

คาเฟอีนสามารถถูก protonated ที่ตำแหน่งที่ 9 ปริมาณของคาเฟอีนที่พบอยู่ในชาจะอยู่ในระหว่าง 2-5% ส่วนในกาแฟจะพบคาเฟอีนในปริมาณ 5% เนื่องจากผลกระทบต่อระบบประสาทจากคาเฟอีน ทำให้ผู้บริโภคนิยมจะดื่มกาแฟที่ปราศจากคาเฟอีน คาเฟอีนสามารถถูกขจัดออกจากกาแฟด้วยการสกัดเมล็ดกาแฟด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วแยกตัวทำละลายอินทรีย์ออก จากนั้นก็มีการกำจัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหลือด้วยไอน้ำ เมล็ดกาแฟที่ได้ถูกทำให้แห้งและเผาเพื่อให้กลิ่นกาแฟเกิดขึ้น การขจัดคาเฟอีน จะลดปริมาณคาเฟอีนให้อยู่ในช่วงระหว่าง 0.03-1.0%

ปัญหาอื่นที่เกิดขึ้นกับการดื่มชาปริมาณมากจะทำให้เกิดการขาดวิตามินบี 1 (thiamine) ทั้งนี้เนื่องจาก tannins ในชาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ thiamine คาเฟอีนจะลดเอนไซม์ transketolase ซึ่งขึ้นกับปริมาณของ thiamine การลดของ transketolase จึงทำให้ thiamine ลดลง เมื่อ tannins ถูกสกัดในน้ำร้อน บางลักษณะจะถูกไฮโดรไลส์เป็น galic acid เมื่อเติมโซเดียมคาร์บอเนต จะทำให้กรดละลายน้ำได้ดีขึ้น ถึงแม้คาเฟอีนจะละลายในน้ำ แต่คาเฟอีนก็สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลาย เช่น methylene chloride ดังนั้นคาเฟอีนสามารถถูกสกัดออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสารละลายของชา ในชั้นของ methylene chloride จะได้คาเฟอีนที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ หลังจากระเหยตัวทำละลายจะได้คาเฟอีน

เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คาเฟอีน ได้ สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ คือ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography,TLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย โดยทั่วไปแล้วเทคนิคนี้จะใช้ตัวดูดซับเป็น Silica gel G แต่ในที่นี้เราจะใช้ Silica gel ที่ผลิตได้จากแกลบข้าว ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และจากการศึกษาพบว่า แกลบจะมีปริมาณของซิลิกาเป็นองค์ประกอบสูงกว่าที่ได้จากพืชชนิดอื่น จึงมีศักยภาพเหมาะสมในการผลิตซิลิกา เป็นการพัฒนาวิธี และหาก Silica gel ที่ได้จากแกลบข้าวนี้ใช้ได้ผลเทียบเท่ากับ Silica gel แบบเก่า ก็จะช่วยลดต้นทุนในการสั่งซื้อ Silica gel ที่มีราคาแพงได้อีกด้วย

ตารางที่ 1.1 แสดงปริมาณของคาเฟอีนที่อยู่ในเครื่องดื่มทั่วๆไป

Soft drink

Brand	Milligrame caffeine per 12-0% serving	Brand	Milligrame caffeine per 12-0% serving
Mountain Dew	54	Pepsi Light	36
Mellow Yellow	53	RC Cola	36
TAB	47	Diet Rite	36
Coca-Cola	46	Canada Dry Jamaica Cola	30
Diet Coke	46	Canada Dry Diet Cola	0
Shasta Cola	44	7-UP	0
Sunkist Orange	42	Diet 7-UP	0
Mr.PIBB	41	Sprite	0
Mr.Pepper	40	Sunkist Diet Orange	0
Sugar-Free Dr.Pepper	40	Pepsi Free	0
Big Red	38	Patio Orange	0
Pepsi-Cola	38	Fanta Orange	0
Aspen	36	Fresca	0
Diet Pepsi	36	Hires Root Beer	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coffee,tea and foods

Item	Milligram caffeine	Item	Milligrams Caffeine
Coffee (5-oz. cup)		Cocoa beverage (5-oz.cup)	7-20
Brewed, drip method	110-180	Chocalate milk (8 oz.)	4-7
Brewed,percolator	60-170	Milk chocolate (1 oz.)	6-15
Instant	40-120	Dark chocolate, semisweet (1oz.)	20-35
Decaffeinated,brewed	2-5	Baker's chocolate (1 oz.)	26
Decaffeinated,instant	1-5	Chocolate-flavored	4
Tea (5-oZ. cup)			
Brewed. Major U.S.brands	20-90		
Brewed, imported brand	25-110		
Instant	25-50		
Iced (12-oz. glass)	67-76		

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเพิ่มคุณค่า โดยนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านเคมีวิเคราะห์
2. เพื่อศึกษาการผลิตซิลิกาเจลจากแกลบข้าว
3. เพื่อศึกษาการเตรียมแผ่น TLC จากซิลิกาเจลที่ผลิตได้
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการแยกคาเฟอีน ด้วยแผ่น TLC ที่เตรียมได้โดยเปรียบเทียบกับแผ่น TLC ที่เตรียมได้จาก ซิลิกาเจล จี
5. เพื่อที่จะลดการสั่งซื้อแผ่น TLC จากบริษัทต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เตรียมซิลิกาเจลจากแกลบข้าว
2. เตรียมแผ่น TLC จากซิลิกาเจลที่ผลิตได้จากแกลบข้าว
3. นำแผ่น TLC ที่เตรียมได้มาวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อแยกคาเฟอีน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคาเฟอีน
4. วิเคราะห์หาปริมาณ คาเฟอีน ที่แยกได้จากเทคนิค TLC ด้วยเทคนิค UV – Visible Spectrophotometry
5. ทดสอบความถูกต้องของวิธีโดยทำเปรียบเทียบกับแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย ซิลิกาเจล จี โดยค่าที่ทำการตรวจสอบมี ดังนี้

    5.1 ความแม่นยำ(Precission)

    5.2 ความถูกต้อง(Accuracy)

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน

ตารางที่ 1.2 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน

ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินการ	ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง											
	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.
- ศึกษาและค้นคว้าข้อมูล	←	—	—	—	—	→						
- ตั้งวัตถุประสงค์และขอบเขต		←	→									
- จัดทำเค้าโครงงานวิจัย			←	—	—	→						
- เสนอเค้าโครงงานวิจัย						↔						
- เตรียมอุปกรณ์และสารเคมี							↔					
- ดำเนินการทดลองตามขอบเขตที่กำหนด								←	—	→		
- รวบรวมและวิเคราะห์								←	—	—	—	→
- สรุปผลและวิจารณ์								←	—	—	—	→
- ค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติม										←	→	
- จัดทำรูปเล่มรายงาน											↔	→
- เตรียมเสนอโครงงานพิเศษ											↔	→
- เสนอโครงงานพิเศษ												↔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แผ่น TLC ที่ประยุกต์มาจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

2. ทราบถึงวิธีการปฏิบัติใช้เทคนิค TLC ในการแยกสาร

3. เป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิต TLC เพื่อใช้วิเคราะห์สารอื่นๆ ได้ต่อไปอย่างสะดวกและรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 โครมาโทกราฟี(Chromatography)

โครมาโตกราฟี คือ การแยกสารโดยอาศัยหลักการที่ว่า สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการละลายและดูดซับได้ไม่เท่ากัน และเหมาะอย่างยิ่งในการใช้กับสารที่มีปริมาณน้อยๆ วิธีโครมาโทกราฟีถูกค้นพบโดยนักชีววิทยาชาวรัสเซีย ชื่อ Michael Tgwett ในปี ค.ศ. 1906 เหตุที่เรียกการวิเคราะห์นี้ว่าโครมาโทกราฟี เพราะผู้ค้นพบได้พบว่าการแยกที่ทำให้เกิดการโซนหรือเป็นตอนๆ นั้นให้โซนที่มีสี จึงตั้งชื่อการวิเคราะห์ว่า โครมาโทกราฟี(Chromatography) ซึ่งมาจากภาษากรีกที่แปลว่า สีและการเขียน ดังนั้นคำว่า โครมาโทกราฟีจึงถูกใช้มาตลอดจนถึงปัจจุบัน ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการของ โครมาโทกราฟี เพื่อให้การวิเคราะห์ทำได้ดีขึ้นจนกระทั่งได้เทคนิคและวิธีการวิเคราะห์หลายชนิดทำให้เกิดการจัดแบ่งชนิดและวิธีการของโครมาโทกราฟีขึ้น การแบ่งสามารถแบ่งได้ตามชนิดของเฟสที่เคลื่อนที่ (Mobile phase) จากนั้นสามารถแบ่งย่อยๆได้อีกตามลักษณะของวิธีการทำโครมาโทกราฟี คือแบ่งเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟี และแพลนโครมาโทกราฟี และยังแบ่งต่อไปได้อีกตามชนิดของเฟสที่อยู่กับที่ (Stationary phase)

การแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ ของเหลว และ ก๊าซ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งได้เป็น 2 แขนง คือ

1. **ก๊าซโครมาโทกราฟี** (Gas Chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ประกอบด้วยเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ 2 วิธี คือวิธีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสที่อยู่กับที่เรียกว่า ก๊าซ-ลิควิด โครมาโทกราฟี (gas-liquid chromatography,GLC) และวิธีที่ใช้ของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ เรียกว่า ก๊าซ -โซลิด โครมาโทกราฟี (gas-solid chromatography,GSC)

2. ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) เป็นโครมาโทกราฟีที่ใช้ของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่ สามารถแบ่งได้อีกหลายวิธีขึ้นอยู่กับเทคนิคของการทำโครมาโทกราฟี คือ

2.1 การทำโครมาโทกราฟีแบบแผ่น (plane chromatography) ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นเฟสที่เป็นของเหลวจะเรียกว่า ลิควิด-ลิควิด โครมาโทกราฟี (liquid-liquid chromatography ,LLC) ตัวอย่างเช่น เปเปอร์โครมาโทกราฟี (PC) และถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งจะเรียกว่า ลิควิดโซลิด

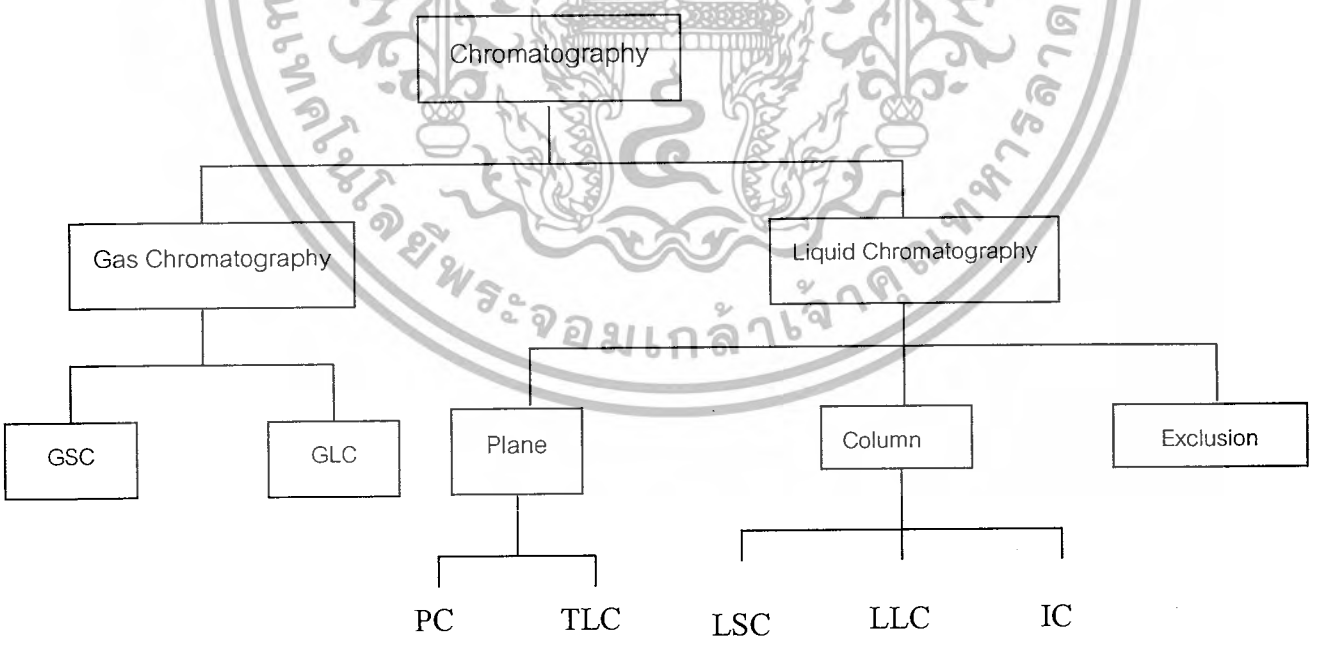
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครมาโทกราฟี (liquid-solid chromatography,LSC) ตัวอย่างเช่น ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatography,TLC)

2.2 การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) การทำโครมาโทกราฟีแบบนี้เป็นที่รู้จักกันดีและใช้กันมากทั่วๆไป สามารถใช้ได้กันเฟสที่อยู่กับที่ที่เป็นของเหลวซึ่งเรียกว่า LLC ก็ได้ หรือที่เป็นของแข็งซึ่งเรียกว่า LSC ก็ได้เช่นกัน การทำลิควิดโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์นี้ ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้ความดันเข้าช่วย เพื่อทำให้การแยกดีขึ้น ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ขึ้น เช่น ไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (high performance liquid chromatography)

2.3 ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ เช่น เรซิน จะทำให้เกิดเทคนิคการวิเคราะห์ที่เรียกว่า ไอออนโครมาโทกราฟี (ion chromatography)

2.4 ถ้าเฟสที่อยู่กับที่คือสารที่ไม่สามารถเกิดการดูดซับหรือแบ่งส่วนหรือแลกเปลี่ยนไอออน แต่เป็นสารที่สามารถกีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารตัวอย่าง เนื่องจากมีรูพรุนให้สารตัวอย่าง ผ่านเข้าไปได้จะเรียกว่า เทคนิคการวิเคราะห์นี้ เรียกว่า เอ็กซ์คลูชันโครมาโทกราฟี (exclusion chromatography) การจัดแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี ตามที่กล่าวมาสามารถรวบรวมแสดงเป็นแผนภูมิได้ดังนี้



รูปที่ 2.1 แสดงการแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณากลไก (mechanism) ที่เกิดขึ้นในการทำโครมาโทกราฟี พบว่าประกอบด้วย 2 กระบวนการคือ

1. กระบวนการดูดซับ (adsorption) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็ง (LSC) การดูดซับจะเกิดขึ้นกับพื้นที่ผิวของของแข็งด้วย

2. กระบวนการแบ่งส่วน (partition) กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลว (LLC)

ดังนั้นการแบ่งประเภทของโครมาโทกราฟีสามารถจัดแบ่งได้อีก คือแบ่งเป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน (partition chromatography)

2.2 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี(Thin layer Chromatography,TLC)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer Chromatography,TLC) เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ โดยการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว เคลื่อนที่พาสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยังเฟสที่อยู่กับที่แล้วเกิดการแยกเกิดขึ้น

TLC มีลักษณะคล้ายกับโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (PC) ซึ่งเป็นโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน โดยอาศัยสมบัติที่สารต่างชนิดกันละลายในตัวทำละลายสองชนิดซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ไม่เท่ากันแต่แทนที่จะใช้กระดาษกรอง กลับมาใช้แผ่นกระจก อะลูมิเนียมหรือแผ่นพลาสติก เป็นแบบ open bed ซึ่งมีขนาดไม่เหมือนกับของ PC โดยเคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุนและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-40 ไมโครเมตร stationary phase ที่นิยมใช้กันมากคือ siliga gel , alumina , cellulose , polyamide , ion – exchange resins การที่จะทำให้ stationary phase ยึดติดกับแผ่นและมี mechanical strength ดี จะต้องเติมตัวยึด (binder) เช่น เติม $CaSO_4$ เข้าไป 5-10% โดยน้ำหนัก การเลือกของแข็งที่เป็นตัวดูดซับ และตัวอีลูทที่เข้าคู่กันได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม จะทำให้สามารถแยกสารได้อย่างดี ตัวอย่างของการเลือกใช้คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารต่างๆ ได้แสดงไว้ดังในตาราง

การทำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี เริ่มด้วยการนำสารละลายที่ต้องการแยกจำนวนเล็กน้อยไป spot บนตัวดูดซับปลายแผ่นสไลด์ด้านหนึ่ง โดยใช้หลอดแคปิลารี หรือไมโครปิเปต แล้วนำแผ่นสไลด์นี้ไปใส่ในภาชนะที่มีตัวทำละลาย ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร เมื่อปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมผ่านขึ้นมาข้างบนตามแนวดิ่งผ่านจุดที่มีสาร สารต่างๆที่ spot ไว้จะเคลื่อนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามตัวทำละลายขึ้นมาในอัตราเร็วที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตัวทำละลาย และตัวดูดซับที่ใช้

ตัวทำละลายที่ใช้ในทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี จะคล้ายคลึงหรืออาศัยหลักการเลือกระบบตัวทำละลายเช่นเดียวกันกับที่ใช้ในวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี อาจใช้ตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสม แต่ส่วนมากมักจะใช้ตัวทำละลายผสม และใช้ตัวทำละลายเพียงระบบเดียว

การตรวจหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสีบนแผ่น TLC ทำได้หลายวิธี วิธีที่ง่ายและสะดวกก็คือ การนำแผ่น TLC ที่ทำการแยกสารแล้วมาปล่อยให้แห้ง จากนั้นจึงนำไปใส่ในภาชนะปิดที่มีเกล็ดไอโอดีน สารอินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างอ่อนที่ผันกลับได้กับไอโอดีน และให้จุดสีน้ำตาลภายในเวลา 5-10 วินาที หรืออาจนานถึง 10-15 นาที ขึ้นอยู่กับความว่องไวในการดูดซับไอโอดีนของสารแต่ละชนิด

อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่ไม่มีสีได้ก็คือ การใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปที่มีการผสมฟลูออเรสเซนต์อินดิเคเตอร์ อยู่กับซิลิกาเจลที่ฉาบไว้บางๆ โดยเมื่อนำแผ่น TLC ที่ทำการแยกแล้วมาส่องกับยูวี ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะเห็นจุดสารที่มีสมบัติเป็นตัวเควนช์ (quencher) หรือตัวเพิ่มฟลูออเรสเซนต์ (fluoresent) สารอินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้เนื่องจากมีโครโมฟอร์ เช่น พันธะคู่ จะใช้การตรวจสอบแบบนี้ได้ แผ่น TLC สำเร็จรูปดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี (reaction progress) รวมทั้งตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารในกระบวนการแยกได้อย่างรวดเร็ว

เนื่องจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีทำได้รวดเร็วและง่าย จึงใช้กันมากในการตรวจความบริสุทธิ์ของสาร ใช้แยกสารจำนวนน้อยออกจากกัน และใช้สำหรับระบุชนิดของสารเปรียบเทียบมาตรฐาน โดยอาศัยหลักการ ถ้าใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมือนกัน ที่อุณหภูมิและสภาวะเดียวกัน สารหนึ่งๆ จะมีค่า “retardation factor ” หรือค่า R_f ที่คงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คู่ของตัวดูดซับและตัวทำละลายที่เหมาะสม

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	ตัวทำละลายและตัวดูดซับ
1. Chloroplast Pigment	a. Isooctane-acetone-ether (3:1:1)-silica gel and polyamide b. Petroleum ether-benzene-$CHCl_3$-acetone-isopropanol (50:35:20:5:0.17) - cellulose c. Petroleum ether -n-propanol (99.2:0.8) followed by 20% $CHC1_3$ in petroleum ether (2 dimensional) - Sucrose d. Petroleum ether - acetone (4:5) – alumina e. Petroleum ether-n-propanol (199:l)-starch f. Petroleum ether-acetone (7:3)-magnesia-celite (1:1 w/w) and hydroxyapatite g. Petroleum ether-acetone (8:2)-calcium carbonate h. Methanol Satd. with paraffin-silica gel G-$Ca(OH)_2$ (1:4) impreg with paraffin
2. 2, 4-Dinitrophenyl-hydrazone of Aldehydes and ketones	a. Hexane-ethyl acetate (4:1 or 83:2)-silica gel b. Benzene or $CHC1_3$ or ether or benzene-hexane (I:l)-alumina c. Petroleum ether-benzene mixtures containing small amounts of pyridine-$ZnCO_3$
3. Alkaroids	a. Benzene-ethanol (9:1) or $CHCl_3$-acetone-diethylamine (5:4:l)-Silicagel. b. $CHC1_3$ or ethanol or cyclohexane-$CHC!_3$ (3:7) plus 0.05% diethylamine-alumina c. Benzene -heptane -$CHCl_3$-diethylamine (6:5:1:0.02) cellulose impreg with formamide
4. Amines	a. Ethanol (95%)-NH_3 (25%) (4:l)-silica gel. b. Acetone-heptane (I:l)-alumina c. Acetone-H_2O (99:l)-kieselguhr G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	ตัวทำละลายและตัวดูดซับ
5. Sugars	a. Benzene-acetic acid-methanol (l:l:3)-silica gel buffer, with boric acid b. n-propanol-conc. NH_3-H_2O (6:2:l)-silica gel G c. Butanol-pyridine-H_2O (6:4:3) or ethyl acetate pyridine -H_2O (2:1:2)-cellulose d. Ethyl acetate-isopropanol-H_2O (65:24:12 or 5:2:05) - kieselguhr G buffered with 0.02 N Sodium acetate e. Ethyl acetate-benzene (3:7) (for sugar acetates) starch - bound silicic acid
6. Carboxylic Acids	a. Benzene-methanol-acetic acid (4:8:8)-silica gel. b. Methanol or ethanol or ether-polyamide c. Isopropyl ether-formic acid-H_2O (90:7:3)-kieselguhr G-polyethylene glucol (M-1000) (2:1)
7. Sulfonamide	a. $CHCl_3$-ethanol-heptane (l:l:l)-silica gel G.
8. Food Dyes.	a. Methyl ethyl ketone-acetic acid-methanol (40:5j5)-silica gelG . b,Butanol-ethanol-H_2O (9:1:1, 8:2:1, 7:3:3, 6:4:4 or 5:5:5)-alumina c. Aq sodium citrate (2.5%)-NH_3 (25°7o) (4:l)-cellulose
9. Essential oils	a. Hexane-starch-bound silicic acid b. Benzene-CHCl, (l:l)-silica gel G
10. Flavonoids and Coumarins.	a. Ethyl acetate-Skellysolve B-starch-bound silicic acid b. Methanol-H_2O (8:2 or 6:4)-polyamide c. Toluene-ethyl formate-formic acid (5:4:l)-silica gel G + Sodium acetate d. Petroleum ether-ethyl acetate (2:l)-silica gel G
11. Metal Ions	a. Dilute HCl-Starch-bound alumina-Celite b. Acetone-cone. HC1-2, 5-hexanedione (100:l:0.5)-silica gelG c. 1M aq. NaNOj-Dowex 1 + cellulose d. Methanol-alumina

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่2.1(ต่อ)

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	ตัวทำละลายและตัวดูดซับ
12. Insecticides	a. Cyclohexane-hexane (1:1) or CCl_4-ethyl acetate (8:2) - silica get G b. Hexane-alumina c.Heptane saturated with acetic acid-starch-bound silicic acid d. Chloroform-silica gel G 4- oxalic acid
13. Lipids	a. Petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (90:10:1 or (70:20:4)-silica gel G b. Petroleum ether-diethyl ether (95:5)-alumina c. $CHCl_3$-methanol-H_2O (80:25:3)-silicic acid
14. Fatty acids	a. Petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (70:30:1082) - silica gel G b. Acetic acid-CH_3CN (I:I)-kieselguhr impreg. with undecane c. Benzene-diethyJ ether (75:25 or I:I)-starch-bound silicic acid d. CH_3CN-acetic acid-H_2O (70:10:25)-silica gel G impreg. with silicone oil.
15. Glycerides	a. $CHCl_3$-acetic acid (99.5:0.5)-silica gel G impreg. With $AgN0_3$ b. CHCVbenzene (7:3)-silica gel G c. $CHCl_3$-methanol-H_2O (5:15:I)-silica gel G impreg. with undecane d. Petroleum ether-diethyl ether (9:1 to 4:6)-plaster-bounti silicic acid e. Methyi isobutyl ketone-hydroxyapatite f. Acetone-CHjCN (8:2 or 7:4)-kieselguhr G impreg. With petroleum
16. Glycolipids	a. Propanol-12% NH_3 (4:I)-silica gel G
17. Phospholipids	a.$CHCl_3$-methanol-H_2O (60:35:8 or 65:25:4)-silica gel G

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	ตัวทำละลายและตัวดูดซับ
18. Nucleotides	a. 0.15 M NaCl or 0.01-0.06 N HCl-Ecteola cellulose b. Sat aq. $(NH_4)_2SO_4$-1 M Sodium acetate-2-propanol (80:18:2)-cellulose c. 0.02-0.04 N aq. HC1-DEAE cellulose d. Gradient elution : start with 1 N formic acid and add 10 N formic acid which is 2 M in ammonium formate-DEAE Sephadex A-25 e. 1.0-1.6 M LiC! -cellulose PEI
19. Phenols	a. Xylene, $CHC1_3$ or xylene-$CHCl_3$ (1:1,3:1,1:3) -Starch-bound silicic acid or silicic acid-kieselguhr (1:1) b. Benzene-alumina plus acetic acid c.Benzene-1, 4-dioxane-acetic acid (90:25:4)-Silica gel G d. Diethyl ether-alumina e. Hexane-ethyl acetate (4:1 or 3:2)-silica gel plus oxalic acid f. Hexane or cyclohexane or Benzene polycaprolactam g. Ethanol-H_2O (8:3) containing "4% boric acid, and 2% sodium acetate-silica gel G plus boric acid h. CCl_4-acetic acid (9:1) or cyclohexane-acetic acid (93:7)-polyamide 6
20. Amino acids	a. Butanol-acetic acid-H_2O (3 or 4:1:1) or phenol-H_2O (75:25) or propanol-34% NH_3 (67:33)-silica gel G b. Butanol-acetic acid-H_2O (4:l:l)-cellulose c. Butanol-acetic acid-H_2O (3:1:1) or pyridine- H_2O (1:1or 80:54)-alumina d. Ethanol-NH_3 (conc>H_2O (7:I:2)-silica gel G buffered with equal portions of 0.2 M KH_2PO_4 and 0.2 M Na_2HPO_4 e. n-Butanol-acetone-NH_3-H_2O (10:10:5:2) followed by isopropanol-formic acid-H_2O (20:1:5) (2 dimensional)-cellulose
21. Polypeptides and Proteins	a. $CHCl_3$-methanol or acetone (9:I)-silica gelG b. Potassium phosphate buffers, pH 6.5 polyamides-bound hydroxyapatite c. H_2O or 0.05 M NH_3-Sephadex G-25 d. Phosphate buffers-DEAE Sephadex A-25

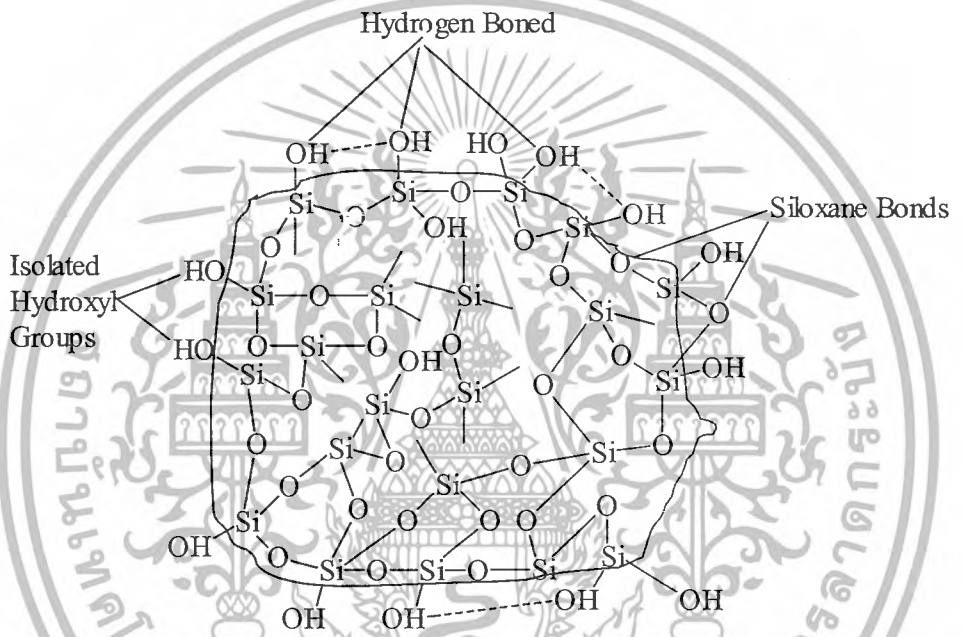
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	ตัวทำละลายและตัวดูดซับ
22. Steriods and Sterols	a. Benzene or benzene-ethyl acetate (9:1 or 2:l)-Silica gel G b. $CHCl_3$-ethanol (96:4)-alumina c. Ethyl acetate-cyclohexane mixtures-starch-bound silicic acid d. Benzene-isopropanol-silica gel plus NaOH e. Methanol-H_2O(95:5)-Celite impreg with paraffin oil f. Cyclohexane-heptane (l:l)-silica gel G-kieselguhr G (1:1) g.Cyclohexane-ethyl acetate (99,5:0.5)-kieseiguhr G h. Acetic acid-H_2O (95:8 or 90:10)-kieselguhr G imprge. with undecane
23. Terpenoid	a. Hexanc or hexane-ethyl acetate (85:15)-starch-bound -silicic acid b. Benzene or benzene-petroleum ether or-ethanol mixtures-alumina c Isopropyl ether or isopropyl ether-acetone (5:2 or 19:1) -silica gel G
24. Vitamins	a. Methanol, $CC1_4$, Xylene, $CHC1_3$ or Petroleum ether-alumina, b. Methanol, propanol, or $CHCl_3$-silica gel G c. Acetone-paraffin (H_2O sat) (9:l)-silica gel G impreg.with paraffin
25. Barbiturates	a. $CHCl_3$-n-butanol-25% NH_3 (70:40:5)-silica gel
26. Digitalis compounds	a. $CHCl_3$-pyridine (6 : l)-silica gel
27. Polycyclic Hydrocarbons	a. CCl_4-alumina
28. Purines	a. Acetone-$CHCl_3$-n-butanol-25% NH_3 (3:3:4:l)-silica gel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อแสดงให้เห็นถึงลักษณะของตัวดูดซับที่ใช้ในการแยกสารประกอบ จะต้องพิจารณาจากลักษณะที่ผิวของตัวดูดซับ เช่น ซิลิกาเจลจะมีลักษณะโครงสร้างดังรูปที่ 2 โดยที่หมู่ Silanol มีสมบัติเป็นกรดเล็กน้อย และมีบทบาทที่สำคัญมากในการแยกสาร สำหรับ Siloxane bonds (Si-O-Si-) มีอิทธิพลต่อการแยกสารน้อยหรือแทบไม่มีเลย หมู่ Silanol (-Si-OH) เป็นกลุ่มที่มีระดับความเป็นกรดแตกต่างกันไป ส่วนที่เป็นกรดมากจะอยู่ใกล้กับอะตอมของซิลิกอนซึ่งจะเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของมัน



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะโครงสร้างของซิลิกาเจล ซึ่งแสดงให้เห็นพันธะต่างๆ และ Silanol groups

สารตัวอย่างหรือตัวถูกละลายสามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสองได้ตามกฎของการกระจาย คือ $K_d = \frac{C_S}{C_M}$

เมื่อหยดสารตัวอย่างลงบนแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC ถ้าสารตัวอย่างนั้นประกอบด้วยสารหลายชนิด แต่ละชนิดมีค่า K_d ต่างกัน หลังจากที่ทำให้เฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปตามเพลน พบว่า หยดของสารตัวอย่างนั้นสามารถเคลื่อนที่ไปตามเพลนได้ด้วยแรงขับ (driving force) ของเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากเกิด capillary action ในขณะเดียวกัน เฟสอยู่กับที่อาจทำหน้าที่หน่วง (retarding action) สารตัวอย่างแต่ละชนิดจะถูกขับและถูกหน่วงได้ไม่เท่ากัน ทำให้ถูกแยกออกจากกันเป็นโซนได้ ซึ่งเป็นหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ระยะทางที่สารตัวอย่างหรือตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ถูกละลายเคลื่อนที่ได้ เรียกว่า ค่ารีเทนชัน องศาของรีเทนชัน (degree of retention) ในการทำเพลนโครมาโทกราฟี สามารถแสดงได้ในเทอมของ retardation factor (R_f)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

การวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายให้วัดที่จุดกึ่งกลางของหยดสารตัวอย่างจากจุดเริ่มต้นถึงจุดเคลื่อนที่มาถึง สำหรับระยะทางของตัวทำละลายจะเริ่มจากจุดเริ่มต้น เมื่อตัวทำละลายเริ่มพาตัวถูกละลายให้เคลื่อนที่จนถึงจุดที่ตัวทำละลายหยุดเคลื่อนที่ ซึ่งเรียกว่า solvent front แสดงดังรูปที่ 2.3

รูปที่ 2.3 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย

จากรูปแสดงว่า $R_f = \frac{X}{Y}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
62032

ค่า R_f ไม่มีหน่วย และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1 เป็นค่าที่บอกการเคลื่อนที่ของสาร สารใดมีค่า R_f สูงแสดงว่าสารนั้นเคลื่อนที่ได้ไกล เนื่องจากค่า R_f มีได้ไม่แน่นอนจึงต้องหาจากผลการทดลองเท่านั้นสามารถนำไปวิเคราะห์ชนิดของสารได้ โดยการนำค่าที่ได้ไปเปิดเทียบกับตาราง

R_f เป็นค่าคงที่สำหรับสารชนิดหนึ่งๆ ที่อุณหภูมิหนึ่งๆและตัวทำละลายชนิดหนึ่งๆ ดังนั้น การคำนวณหาค่า R_f จะทำให้สามารถชี้บอกได้ว่าสารตัวนั้นคืออะไรทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ (Qualitative) แต่เนื่องจากตัวถูกละลายมีมากมายหลายชนิดและบางชนิดอาจมีค่า R_f ใกล้ๆหรือเท่ากัน จึงไม่สามารถใช้ค่า R_f ที่ได้จากการทดลองเพียงครั้งเดียว บอกได้ว่าสารตัวอย่างนั้นคืออะไร การทดลองควรทำหลายครั้งโดยเปลี่ยนตัวทำละลายและทำเทียบกับสารมาตรฐาน ถ้าได้ค่า R_f ของสารตัวอย่างและสารมาตรฐานเท่ากันทุกครั้งก็ยืนยันได้ว่าสารตัวอย่างคือสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน หรืออาจใช้วิธีผสมสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานเข้าด้วยกันแล้วทำการทดลองโดยเปลี่ยนตัวทำละลายสัก 2-3 ชนิด ถ้าได้โซนเพียงโซนเดียวทุกครั้ง ก็ยืนยันได้ว่าสารตัวอย่างคือสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานเซนกัน จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์จะกระทำได้เมื่อมีสารมาตรฐานมาเปรียบเทียบ การหาค่า R_f จากสารตัวอย่างเพียงอย่างเดียวไม่มามารถบอกได้ว่าสารตัวอย่างนั้นคืออะไร

วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer Chromatography,TLC) ใช้ประโยชน์ได้ดีกว่าวิธีเปเปอร์โครมาโทกราฟี (Paper Chromatography, PC)เพราะสามารถวิเคราะห์สิ่งที่ PC ทำไม่ได้และมีข้อดีกว่า PC หลายประการดังนี้คือ

1. เวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยกว่า
2. เลือกใช้ stationary phase ได้มากมายหลายชนิด
3. ใช้ในการวิเคราะห์สารพวก lipids ได้ดีกว่า
4. มีการแยก (resolution) ที่ดีกว่า
5. สามารถใช้ได้กับตัวทำละลายที่มีการกัดกร่อนอย่างแรง เช่น กรดซัลฟูริกเข้มข้น
6. เมื่อทำการอีลูท แยกสารตัวอย่างได้แล้ว สามารถขูดเอาจุดหรือแบนด์ที่แยกได้ออกไปทำการวิเคราะห์ต่อไปอีกได้

วิธีการของ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ได้ถูกพัฒนามาเรื่อยๆเพื่อทำให้สามารถใช้ได้กับสารที่มีปริมาณน้อยลง แยกได้ดีขึ้น และใช้เวลาน้อยลง ซึ่งทำให้เกิดเทคนิคใหม่ของการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงเรียกว่า High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า HPTLC มีขั้นตอนในการวิเคราะห์แบบเดียวกับ TLC ทุกประการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกันที่เทคนิคของ HPTLC นั้นต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วยทำการวิเคราะห์ เพราะต้องมีความแม่นยำในการทำมาก HPTLC แตกต่างจาก TLC ที่ขนาดของตัวดูดซับที่ฉาบบน plate คือมีขนาดเล็กกว่า ตามปกติ TLC มีขนาดประมาณ 12 ไมโครเมตร ขนาดของ HPTLC ประมาณ 7 ไมโครเมตร เท่านั้น การฉาบต้องทำให้บางกว่า เรียบสม่ำเสมอ และแน่นกว่า HPTLC มีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า TLC มาก สามารถแยกของผสมหลายชนิดออกจากกันได้โดยใช้ระยะทางเพียง 5 เซนติเมตร เท่านั้น ในขณะที่ TLC ใช้ประมาณ 15-20 เซนติเมตร นั่นคือ เวลาที่ใช้จะน้อยกว่าประมาณ 1/3 เท่า ขนาดของสารตัวอย่างที่ใช้ใน HPTLC ประมาณ $10^{-9} – 10^{-12}$ ในสารละลายที่น้อยกว่า 1 ไมโครลิตรเท่านั้น

วิธีการทำ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

1. การเตรียมเพลตสำหรับการแยก (Prepration of Separating Layer)

แผ่นแก้วที่นำมาใช้สำหรับให้ของแข็งดูดซับยึดเป็นแผ่นบางๆ (thin layer) ได้นั้นตามปกติมีขนาด 20×20 เซนติเมตร หรือ 10 ×20 เซนติเมตร ส่วน HPTLC ใช้ขนาด 5×5 เซนติเมตร สำหรับของแข็งตัวดูดซับมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์

สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวดูดซับ ได้แก่ ผงเซลลูโลส (cellulose powder) แป้ง (starch) เซฟาเดกซ์ (sephadex or superfine) โพลีเอไมด์ (polyamides) และ ไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน (ion exchange resin)

สารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวดูดซับได้แก่ ซิลิกาเจล (siliga gel) ผงแก้ว (glass powder) และ diatomaceous earth เป็นต้น ขนาดของอนุภาคที่ใช้มากคือ 20-40 ไมโครเมตรสาร เหล่านี้อาจทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับโดยตรง หรืออาจใช้สารอื่นฉาบลงบนสารนี้อีกทีหนึ่งก่อนแล้วค่อยนำไปใช้

เมื่อเลือกใช้ของแข็งดูดซับได้แล้ว ให้เตรียมเป็นสารละลายหนืด (slurry) คล้ายโคลน โดยค่อยๆเทของแข็งที่มีตัวยึดเหนี่ยวผสมอยู่ เช่น ซิลิกาเจล–จี หรือ อะลูมินา-จี (จี หมายถึง ตัวยึดเหนี่ยว ยิปซัม ซึ่งเป็นตัวที่นิยมใช้กันมาก) ลงในตัวทำละลายพร้อมคนไปด้วย ตัวทำละลายที่ใช้อาจเป็นน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ก็ได้ ตามความเหมาะสม สำหรับตัวยึดเหนี่ยว (binder) นอกจาก ยิปซัมแล้วอาจเป็นสารชนิดอื่นได้อีก สำหรับตัวยึดเหนี่ยวที่นิยมใช้อีกตัวหนึ่งคือ แป้ง (starch) เมื่อเตรียมสารสำหรับฉาบได้แล้ว สามารถทำการฉาบลงบนแผ่นแก้วได้ 3 วิธี คือ

1.ใช้แผ่นแก้วจุ่มลงในสารละลายหนืดแล้วนำมาทำให้แห้ง แผ่นแก้วที่ฉาบได้แล้วต้องมีลักษณะเรียบและสม่ำเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้เครื่องลาก นำสารละลายหนืดที่เตรียมได้ใส่ลงในรางแล้วลากไปตามแผ่นแก้วโดยใช้มือลาก ความหนาของสารที่ฉาบสามารถปรับได้ที่เครื่องลาก

3. ใช้เครื่องลากอัตโนมัติ การทำเพลตโดยใช้เครื่องลากจะได้เพลตที่มีความหนาสม่ำเสมอใช้ในงานวิเคราะห์ได้ดีกว่าการเตรียมด้วยมือ

ในทางการค้าได้มีบริษัทผู้ผลิต ผลิตเพลตสำเร็จรูปขาย ซึ่งทำให้ผู้วิเคราะห์สะดวกขึ้น สามารถซื้อมาใช้ได้เลย ไม่ต้องเสียเวลาในการเตรียม และเพลตสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นมาขายนั้นมีคุณภาพดีกว่าที่เราเตรียมเอง ส่วนใหญ่ใช้กับงานวิเคราะห์ที่เรียกว่า HPTLC

ก่อนนำเพลตที่เตรียมได้ไปใช้งาน ต้องตรวจสอบดูว่าในเพลตไม่มีมลทินปนอยู่ โดยนำไปส่องกับแสง อัลตราไวโอเลต ถ้าปรากฏว่ามีจุดของสารปรากฏขึ้น แสดงว่ามีมลทินปนอยู่ ต้องใช้วิธีล้างเพลตก่อน เรียกว่า prewashing โดยการนำเพลตไปจุ่มในตัวทำละลายที่ใช้ ดีเวลลอป เพื่อให้สารมลทินถูก อีลูทออกไปให้หมด จากนั้นนำเพลตมาทำให้แห้ง แล้วจึงค่อยนำไปใช้งาน

TLC สมัยใหม่จะเคลือบด้วย reversed bonded phase ซึ่งได้มีการพิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์ค่อนข้างมาก โดยทั่วไปแผ่น TLC พวกนี้จะเกิดสมดุลเร็ว จึงอาจไม่ต้องทำให้สมดุลก่อนใช้เหมือน ซิลิกาเจล จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาข้อมูลเฟสเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะนำไปใช้ใน reverse-phase HPLC ได้

2. **การใส่ตัวอย่างลงในเพลต** (Sample application)

การใส่ตัวอย่างลงในเพลตสามารถทำได้ 2 ลักษณะคือ

2.1 ทำเป็นจุด (spot wise) โดยการใช้คาปิลลารีหยดสารตัวอย่างลงไป ต้องพยายามทำให้เป็นจุดที่เล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือ หรือใช้เครื่องอัตโนมัติ ถ้าใช้เครื่องอัตโนมัติ สามารถกำหนดปริมาตรของสารตัวอย่างที่หยดลงไปได้แน่นอนกว่าการใช้มือ และลักษณะของจุดที่ได้มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอกว่า

2.2 ทำเป็นแบนด์ (bandwise) เนื่องจากมือคนไม่สามารถลากขนาดของสารตัวอย่างที่ใส่ลงในเพลตให้เป็นแบนด์ได้สม่ำเสมอ วิธีนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วย ซึ่งจะทำให้แบนด์ที่ได้สม่ำเสมอและมีขนาดที่แน่นอน

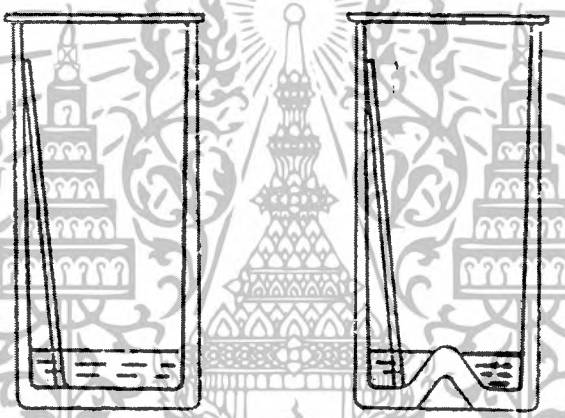
เนื่องจากการวิเคราะห์วิธี TLC เหมือนกับวิธี PC คือ ไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ทางคุณภาพหรือทางปริมาณ ต้องทำควบคู่กับสารมาตรฐาน ดังนั้น การใส่ตัวอย่างลงในเพลต ต้องทำสลับกันกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารมาตรฐาน ให้จุดทุกจุดอยู่บนเพลตเดียวกัน เพื่อจะได้มีสภาวะของการทดลองแบบเดียวกันทุกประการ จึงจะเปรียบเทียบกันได้

3. ทำการดีเวลลอป

สามารถทำการดีเวลลอปทั้งแบบจากล่างขึ้นบน และแบบจากบนลงล่าง หรือทำโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดแบบ 2 มิติ ตัว chamber ที่ใช้สำหรับทำการดีเวลลอป มีลักษณะเป็นถังแก้วที่มีฝาปิด เพื่อให้มองเห็นการเคลื่อนที่การสารตัวอย่างได้ ก้นถังมีได้ 2 แบบคือ แบบเรียบและแบบแบ่งเป็น 2 หลุม



ก. ข.

รูปที่ 2.4 ถังสำหรับการทำดีเวลลอป

ก. ถังแบบก้นเรียบ

ข. ถังแบบแบ่งเป็น 2 หลุม

ถังแก้วแบบก้นเรียบ ใช้สำหรับทำการดีเวลลอปสารที่ใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว ลักษณะถังแบบนี้จะแคบ ส่วนถังแบบมีก้น 2 หลุม ใช้สำหรับใส่ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ ตัวทำละลายชนิดที่หนึ่งใช้สำหรับทำการดีเวลลอป ส่วนอีกชนิดหนึ่งใส่ไว้เพื่อทำให้บรรยากาศภายในอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายชนิดที่ 2 ซึ่งจะทำให้การดีเวลลอปได้ผลดีขึ้น

การเลือกใช้ตัวทำละลายสำหรับการดีเวลลอป ในกรณีที่สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ เป็นสารที่ไม่ทราบว่าเป็นสารอะไร หรือไม่มีการรายงานมาก่อนว่า ควรใช้ตัวทำละลายชนิดใด จะต้องมีการทดสอบ โดยการทดลองเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม การทดลองเลือกใช้ตัวทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายมีกฎเกณฑ์ว่า ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำสุดก่อน แล้วค่อยเพิ่มไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้ตัวทำละลายที่สามารถแยกออกได้อย่างเหมาะสม

ตารางที่ 2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอปเรียงตามโพลาริตีจากน้อยไปมาก

ตัวทำละลาย	ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก
n-Hexane	1.9
Isooctane	1.9
Cyclohexane	2.0
Carbontetrachloride	2.2
Dioxane	2.2
Benzene	2.3
Xylene	2.3
Toluene	2.4
Carbondisulfide	2.6
di-iso-propylether	3.9
Diethylether	4.3
Chloroform	4.8
n-Butylacetate	5.0
Phenyl chloride	5.7
Ethyl acetate	6.0
Acetic acid	6.3
tetrahydrofuran	7.6
Dichloro methane	9.1
Piridine	13.2
Iso-propane	13.8
n-butanol	17.9
Acetone	21.5
n-propanol	22.5
Ethanol	25.0
Methanol	33.6
Acetronitrile	38.8
Water	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 2.2 แสดงค่าโพลาริตีของตัวทำละลายชนิดต่างๆเรียงจากน้อยไปหามาก ตามค่าคงที่ไดอิเล็กตริก สำหรับตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการดีเวลลอปได้นั้น ต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม ดังนี้คือ

- ต้องมีความหนืดต่ำ เพื่อทำให้เคลื่อนที่ได้เร็ว
- ถ้าจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม ควรทำเป็นตัวทำละลายผสมที่น้อยชนิด เพราะถ้าทำการผสมหลายชนิดจะมีโอกาสผิดพลาดได้ง่ายในการเตรียมส่วนผสม
- ถ้าเป็นสารผสมต้องสามารถผสมได้เป็นเนื้อเดียวกันจึงจะนำมาใช้ได้
- ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งหมายความว่า ไม่มีตัวทำละลายตัวอื่นที่มีโพลาริตี ตรงข้ามกับตัวทำละลายที่ใช้ปนอยู่ด้วย
- ควรเป็นตัวทำละลายที่เตรียมได้ใหม่ๆ

4. **การตรวจหา** (detection)

เนื่องจากสารที่เคลือบบนแผ่น TLC เป็นพวกซิลิกา และอะลูมินา ซึ่งเฉื่อยมากกว่ากระดาษ ดังนั้นสารละลายที่ไวต่อปฏิกิริยามากสามารถนำมาใช้ในการบอกตำแหน่งของสารที่แยกออกจากกันได้ กรดซัลฟูริกเข้มข้นสามารถนำมาใช้พ่นให้เป็นฝอยลงบนแผ่น ซิลิกาได้ และทำให้สารอินทรีย์เกิดเป็นสีดำ ซึ่งมองเห็นได้ชัดหลังจากให้ความร้อนกับแผ่น นอกจากนี้ ยังสามารถใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดสี เช่น ไอโอดีน ได้อีกด้วย หรืออาจใช้วิธีส่องแผ่น TLC ด้วยแสงยูวี สารที่ให้ฟลูออเรสเซนต์จะมองเห็นได้ หรือบางครั้งอาจผสมสารฟลูออเรสเซนต์เข้าไปกับสารเคลือบแผ่น TLC และเมื่อส่องด้วยสารยูวีจะเห็นสารเป็นจุดสีดำบนพื้นของฟลูออเรสเซนต์ อย่างนี้เรียกว่าเกิด quenching effect

การที่จะทำค่า R_f ให้ได้เท่ากันทุกครั้งใน TLC นั้นยากกว่าใน PC เพราะว่า TLC มีตัวแปรจากการทดลองมาก ค่า R_f จะขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ธรรมชาติของตัวดูดซับ ได้แก่ ธรรมชาติทางเคมี ขนาดของอนุภาค พื้นที่ผิว และ ตัวยึด เป็นต้น

2. ธรรมชาติของเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของมัน ความถูกต้องของการผสม ปริมาณความชื้นและการระเหย เป็นต้น

3. Activity ของตัวดูดซับ ความหนา และความสม่ำเสมอของมัน

4. อุณหภูมิของเครื่องมือ

5. ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้

6. สมดุลความดันไอ ระหว่างแผ่น TLC กับบรรยากาศในถังที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ลักษณะการวิเคราะห์หาปริมาณด้วย TLC และ PC

ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารด้วยเทคนิค TLC หรือ PC นั้น ถ้าจะให้ได้ผลที่มีความแม่นและเที่ยง จะต้องให้ความระมัดระวังเป็นอย่างมากและต้องทำให้ chromatographic condition มีมาตรฐาน การ spot สารตัวอย่างและสารมาตรฐานลงบนกระดาษหรือแผ่น TLC จะต้องมีขนาดและความเข้มข้นเท่าๆกัน การเตรียมตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่รวมถึงภาชนะจะต้องอยู่ในสมดุล และอื่นๆทั้งหมดนี้ควรจะต้องอยู่ในลักษณะที่เหมือนกัน การใช้สารละลายเพื่อบอกตำแหน่งของจุดที่แยกได้จะต้องเหมือนกัน การใช้สารละลายเพื่อบอกตำแหน่งของจุดที่แยกได้สามารถวัดได้โดยตรงจากแผ่นกระดาษ หรือแผ่น TLC หรือสามารถแยกเอาสารออกมาวัดด้วยวิธีการอย่างอื่น เทคนิคที่ใช้ในการวัดมีดังต่อไปนี้

1. ใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ของจุดด้วยตา สารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว นำไปวิเคราะห์บนแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน พื้นที่สัมพัทธ์ของทั้งสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะถูกประเมินออกมาด้วยตาเปล่า ซึ่งจะให้ความถูกต้อง 5-10%

2. การวัดสมบัติทางกายภาพของจุดสี โดยวัดค่าความเข้มของการสะท้อนแสง หรือฟลูออเรสเซนต์ หรือการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง scanning photodensitometer แล้วบันทึกด้วย recorder ซึ่งจะให้ความถูกต้อง 3-5%

3. การวัดกัมมันตรังสี สำหรับสารกัมมันตรังสีสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวัดกัมมันตรังสี หรือใช้เครื่องวัดอัตโนมัติ

4. การวัดพื้นที่ของจุด พื้นที่ของจุดนั้นจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของสาร พื้นที่ของจุดสามารถหาได้โดยใช้กระดาษกราฟที่ใสแล้วนับจำนวนสี่เหลี่ยมที่ครอบคลุมพื้นที่ของจุดนั้น สำหรับสารมาตรฐานก็ทำเช่นเดียวกัน และสามารถทำ calibration curve ได้โดยเขียนกราฟระหว่างพื้นที่กับปริมาณสารต่างๆกัน

5. ใช้วิธีการเอาสารออกจากแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC ถ้าเป็น TLC อาจใช้วิธีแยกเอา absorbent นั้นออกมาจากแผ่น TLC โดยนำมาสกัดหรือชะล้างสารออกมาจาก absorbent ถ้าเป็น PC สามารถทำการสกัดหรือชะสารออกจากกระดาษได้เลย แล้วนำไปวัดด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น เทคนิค UV Visible Spectroscopy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)

หลักการทำงานของเครื่อง

คลื่นวิสิเบิลและอัลตราไวโอเลตเป็นส่วนหนึ่งของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งช่วงความยาวคลื่นของอัลตราไวโอเลตประมาณ 10-200 นาโนเมตร และช่วงความยาวคลื่นวิสิเบิลประมาณ 400-800 นาโนเมตรประกอบด้วยคลื่นแสงสีต่างๆ เมื่อรวมแล้วจะเห็นเป็นแสงสีขาว (white light) การดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงคลื่นวิสิเบิลและอัลตราไวโอเลตของสารเคมีได้แก่ สารอินทรีย์ (Organic) สารประกอบเชิงซ้อน (Complex compound) และสารประกอบอนินทรีย์(Inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี เทคนิคการวิเคราะห์นี้จึงเรียกว่า "เทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์"

เมื่อลำแสง (Radiation) ส่องผ่านเข้าไปในวัตถุใสที่บรรจุสารที่สามารถดูดกลืนแสงได้ แสงส่วนหนึ่งจะถูกดูดกลืน บางส่วนจะเกิดการสะท้อน บางส่วนเกิดการกระเจิง จึงเหลือแสงส่วนหนึ่งที่ผ่านทะลุออกไปแล้วผ่านเข้าไปในปริซึมหรือเกรตติงเพื่อแยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่น (monochromatic radiation) และแยกส่วนความยาวคลื่นที่ต้องการไปใช้วัดสารตัวอย่าง

แสงที่ถูกดูดกลืน จะสัมพันธ์กับความเข้มของแสงที่เหลือ

$$A = \log \frac{I_o}{I}$$

A = ความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืน

I_o = ความเข้มของแสงที่ตกกระทบ

I = ความเข้มของแสงที่เหลือ

จากกฎของเบียร์ () จะได้ความสัมพันธ์ดังนี้

$$A = abc$$

A = ค่าของการดูดกลืนแสง

a = ค่าของการดูดกลืนแสง

b = ความกว้างของเซลล์

c = ความเข้มข้นของสารละลาย

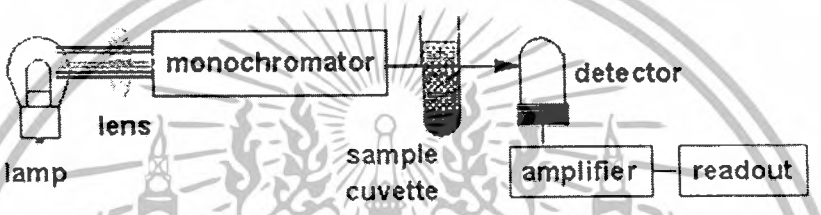
จะเห็นว่าค่าของการดูดกลืนแสงของสารละลาย จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้น

ส่วนประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ทุกแบบ จะมีส่วนประกอบพื้นฐานที่เหมือนกันดังนี้คือ

1. แหล่งกำเนิดแสง (Light Source)
2. โมโนโครมาเตอร์ (Monochromator)
3. ช่องใส่เซลล์ (Cell compartment)
4. ภาชนะสำหรับใส่สาร (Sample Cell)
5. ดีเทคเตอร์และแอมพลิไฟเออร์ (Detector and Amplifier)



รูปที่ 2.5 องค์ประกอบของเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

แหล่งกำเนิดแสง (Light Source)

แหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ในงานทางสเปกโตรโฟโตเมตรีนั้น ควรจะต้องมีลักษณะดังนี้

1. จะต้องให้ลำแสง(beam of radiation)ที่มีกำลังพอที่จะวัดได้ด้วยมาตรแสง(photometer)
2. จะต้องให้การแผ่รังสี(radiation)ออกมาตลอดเวลาในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการ
3. จะต้องให้การแผ่รังสีคงที่ตลอดเวลา มิฉะนั้นแล้วผลของการวิเคราะห์จะไม่แม่นยำหรือไม่มีความเที่ยง

สำหรับเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์นั้น ต้นกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตเป็นหลอดไฮโดรเจน(Hydrogen lamp) หรือหลอดดิวเทอเรียม (deuterium lamp) ให้สงอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 185-375 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากการคายพลังงานของไฮโดรเจน หรือดิวเทอเรียมอะตอมที่อยู่ในสถานะกระตุ้น ช่องที่จะให้แสงออกจากหลอดจะต้องทำด้วยควอร์ตซ์หรือ fused silica แต่ถ้าใช้วัสดุอื่น เช่น แก้ว จะดูดกลืนแสงในช่วงนี้ได้ ทั้งหลอดไฮโดรเจนและหลอดดิวเทอเรียมจะบรรจุด้วยแก๊สนั้นไว้ที่ความกดดันต่ำ (5 มม. ปรอท) และใช้ระบบไฟฟ้าชนิด D.C. ขนาด 40 โวลต์เท่านั้น ทั้งหลอดดิวเทอเรียมและหลอดไฮโดรเจนมีอายุใช้งานจำกัด แต่หลอดดิวเทอเรียมซึ่งมีราคาแพงกว่าจะมีอายุการใช้งานมากกว่า และให้ความเข้มแสงมากกว่าด้วย

หลอดทังสเตน (tungsten filament lamp) ซึ่งมีลักษณะคล้ายๆหลอดไฟธรรมดาโดยใช้ไส้หลอดเป็นโลหะทังสเตน เมื่อใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเข้าไป ลวดทังสเตนจะถูกเผาให้ร้อนและเปร่งแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมาอยู่ในช่วง 320-2500นาโนเมตร ถ้าใช้อุณหภูมิสูงขึ้น ลักษณะของสเปกตรัมจะเคลื่อนที่ไปทางความยาวคลื่นสั้นมากขึ้น แต่อายุของหลอดก็สั้นเข้าเช่นกัน จึงได้มีการปรับปรุงให้หลอดมีอายุยาวขึ้นโดยใส่แก๊สไอโอดีน หรือแก๊สโบรมีนที่ความดันต่ำเข้าไปในหลอดที่ทำด้วย fused silica เรียกว่า หลอดควอร์ตซ์-แฮโลเจน (Quartz-halogen lamp) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันในปัจจุบันนี้

โมโนโครมาเตอร์ (Monochromator)

ส่วนประกอบนี้ถือว่าเป็นหัวใจของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพราะเป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสงซึ่งเป็นพอลิโครเมติกให้เป็นแสงโมโนโครมาติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ โมโนโครมาเตอร์ประกอบด้วย

1. ช่องที่ปล่อยให้แสงเข้า(entrance slit) เพื่อให้แสงที่เข้ามาแรงพอที่จะผ่านออกไปยังสารตัวอย่าง โดยคิดต่อพื้นที่ที่แสงผ่าน ดังนั้นความกว้างของสลิทจึงมีส่วนสำคัญ

2. กระจกและเลนส์(mirror และ lens) เพื่อใช้ทำให้แสงเกิดการสะท้อนไปมาในเครื่อง บางครั้งทำให้แสงเดการรวมกัน ทั้งนี้ เพื่อช่วยลดขนาดของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ให้เล็กลง และบางครั้งทำให้แสงกลายเป็นลำแสงขนาน

3. ส่วนที่ทำให้แสงกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆกัน เพื่อให้เหมาะแก้การเลือกใช้ หรืออาจเป็นส่วนที่ตัดแสงบางช่วงออกไปให้เหลือเฉพาะช่วงคลื่นแสงที่ต้องการ อุปกรณ์ส่วนนี้อาจประกอบด้วย

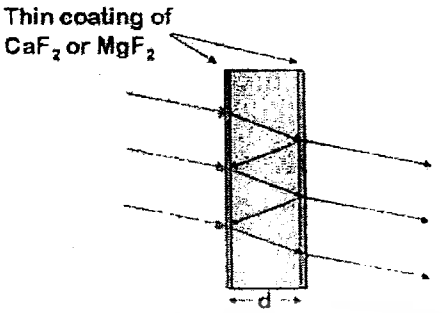
3.1 ฟิลเตอร์(filters)

- Absortion filter ทำด้วยกระจกสีต่างๆ เช่น ฟิลเตอร์สีเขียว จะปล่อยแสงสีเขียว(500-560นาโนเมตร) ใช้ในช่วงวิสิเบิล

รูปที่ 2.6 Absortion filter

- Interference filter เป็นฟิลเตอร์ที่ฉาบด้วยสารที่มีค่าดรรชนีหักเหต่ำและพวกไดอิเล็กตริก(MgF_2, CaF_2) และฉาบด้วยเงินบางๆ แล้วประกบด้วยกระจกเป็นแบบแซนวิชอีกครั้งหนึ่ง

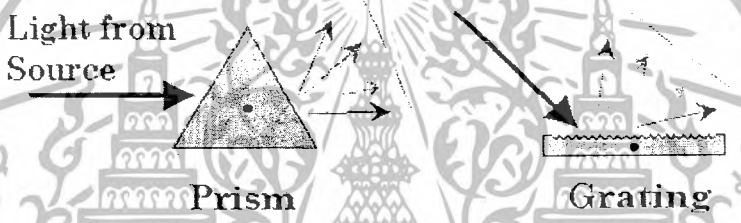
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.7 Interference filter

3.2 ปริซึม

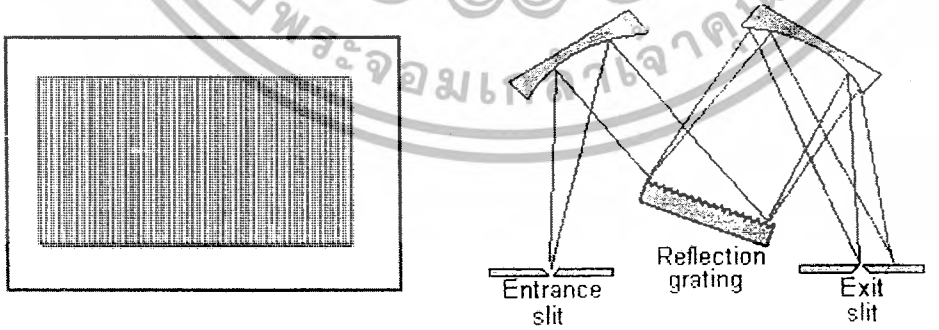
โดยทั่วไปนิยมใช้การหมุนปริซึมให้แสงที่ต้องการผ่านช่องทางแสงออกเลย แทนการเลื่อนช่องแสงออก



รูปที่ 2.8 แสดงการทำงานของปริซึมและเกรตติง

3.3 เกรตติง

- Transmission grating ทำด้วยวัสดุโปร่งใส นำมาขีดเป็นร่องขนานกัน
- Reflection grating ผิวหน้าของวัสดุจะต้องเรียบและสะท้อนแสงได้



Transmission grating Reflection grating

รูปที่ 2.9 เกรตติงชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sample container

ในส่วนนี้จะทำจากวัสดุที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของงานที่ใช้

สำหรับ UV เซลล์ทำจากควอตซ์ หรือซิลิกา

สำหรับ Visible เซลล์ทำจากแก้วหรือ พลาสติก

ดีเทคเตอร์(Detector)

เครื่องวัดแสงนั้นมีด้วยกันหลายแบบ แต่ละแบบอาจแตกต่างกันที่ความกว้างของช่วงคลื่นแสงที่สามารถตรวจสอบได้ ความเร็วของการตอบสนอง สภาพไวของการรับแสง เพื่อต้องการเปลี่ยนพลังงานแสง ให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า เครื่องวัดแสงที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน มีดังนี้คือ

1. โฟโตโวลตาอิกเซลล์ หรือแบริเออร์-เลเยอร์เซลล์ (photovoltaic or barrier-layer cells) เป็นเซลล์ที่ใช้ตรวจและวัดแสงที่อยู่ในช่วงวิสิเบิล และให้สภาพไวสูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แต่จะลดลงประมาณ 10% ที่ความยาวคลื่น 350 และ 750 นาโนเมตร ลักษณะเซลล์ประกอบด้วยแผ่นทองแดงหรือเหล็กเป็นขั้วบวก ฉาบด้วยวัสดุกึ่งตัวนำบางๆ แล้วฉาบผิวด้านนอกเป็นฟิล์มบางๆ โปร่งแสง ทำหน้าที่เป็นตัวจับอิเล็กตรอน

โฟโตเซลล์อีกอย่างหนึ่งเป็น ซิลิกอนโฟโตเซลล์ เหมาะที่จะใช้วัดแสงในช่วงวิสิเบิล และช่วงใกล้อินฟราเรด แต่ให้สภาพไวต่ำในช่วงยูวี เมื่อแสงตกลงบนผิวของสารกึ่งตัวนำ จะทำให้พันธะแตกออกเกิดอิเล็กตรอนขึ้น วิ่งไปยังแผ่นโลหะ ส่วนหลุม (hole) ที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนที่ไปสู่แผ่นเหล็ก แล้วอิเล็กตรอนก็จะวิ่งไปสู่วงจรภายนอกและรวมกับหลุมที่เกิดขึ้น ปริมาณกระแสไฟฟ้าจะเกิดขึ้นมากน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของแสงที่ตกกระทบกับสารกึ่งตัวนำ แบริเออร์- เลเยอร์เซลล์นี้ราคาถูก และเหมาะที่จะใช้เป็นเครื่องวัดแสงที่เคลื่อนย้ายได้ ข้อเสียคือ เป็นเครื่องที่ใช้ได้ดีกับแสงที่มีกำลังมากๆ และถ้าใช้ไปนานกระแสที่เกิดขึ้นจะน้อยลง ทำให้สภาพไวลดลงด้วย

2. หลอดรับแสง (phototube) เป็นหลอดที่ทำด้วยแก้วหรือซิลิกา ภายในหลอดเป็นสุญญากาศ หรือเกือบเป็นสุญญากาศ มีแคโทด (cathode) ซึ่งฉาบด้วยสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนเมื่อถูกแสง เมื่อแสงตกกระทบกับสารที่ฉาบผิวแคโทดจะเกิดอิเล็กตรอนขึ้น แล้ววิ่งไปที่ขั้วแอโนดที่ต่อกับศักย์ไฟฟ้าที่คงที่(ประมาณ 90 โวลต์) ซึ่งอยู่ในช่วงของ saturated current กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้น โดยไม่ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้า แม้ศักย์ไฟฟ้าจะเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อยก็จะไม่มีผลต่อกระแสที่เกิดขึ้น ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับการวัดรังสีบีตาด้วยหลอดวีเอ็ม กระแสที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้มีค่าน้อยจึงจำเป็นต้องต่อเข้ากับเครื่องขยายอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้ได้กระแสพอที่จะวัดด้วยมาตรต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube = PMT) หลอด PMT เป็นหลอดที่มีลักษณะคล้ายกับหลอดรับแสง แต่ PMT มีสภาพไวดีกว่าและสามารถใช้ได้ในช่วงความยาวคลื่น 190-900 นาโนเมตร ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการทำมาตรวัดแสงในเครื่องยูวีวิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ภายในหลอดประกอบด้วยแคโทดที่ฉาบผิวด้วยสารเช่นเดียวกับหลอดรับแสง จำนวน 9 ชุด ซึ่งเรียกว่า ไดโนด (dynodes) แต่ละไดโนดจะมีค่าศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้น 90 โวลต์ เรื่อยไปจบครบ 9 ไดโนด ให้ได้ศักย์ไฟฟ้าแตกต่างกันระหว่างขั้วแคโทดและแอโนดเป็น 900 โวลต์ หลอด PMT จึงเหมาะแก่การวัดแสงที่มีกำลังต่ำ แต่ถ้าวัดแสงที่มีกำลังสูงๆ หลอดจะเสื่อมเร็ว เพราะส่วนที่ไวต่อแสงเสีย

4. เครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector) หัววัดแสงชนิดนี้ประกอบด้วย reverse-biased on junction ทำให้เกิด depirtion layer ซึ่งไปลดการนำไฟฟ้าของ junction จนเกือบเป็นศูนย์ ถ้าให้แสงตกลงบน depletion layer หลุม (hole) และอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้น จะก่อให้กระแสไฟฟ้าเป็นปฏิภาคกับกำลังแสงที่ได้รับ มีอยู่ 2 ชนิดคือ หัววัดวิดิคอน และหัววัดซิลิกอนไดโอดอาร์เรย์

แบบต่าง ๆของเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องที่ใช้ลำแสงเดี่ยว เป็นเครื่องที่ใช้ลำแสงเดียวจากต้นกำเนิดแสง ผ่านโมโนโครมาเตอร์แล้วให้ผ่านสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง แล้วจึงไปยังมาตรวัดแสงนั้น ในการวัดค่าแอบซอร์แบนซ์ ให้ปรับเครื่องอ่านได้ 0 และ 100% T ด้วยแบล้งค์ แล้วจึงจะวัดสารละลายตัวอย่างได้ และจะต้องทำอย่างนี้ทุกครั้งเมื่อปลี่ยนคลื่นแสง

เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงคู่ (double beam) เป็นเครื่องที่ใช้ลำแสง 2 ลำแสง ลำแสงหนึ่งผ่านสารละลายตัวอย่าง อีกลำแสงหนึ่งผ่านสารละลายแบล้งค์ แบ่งเป็น 3 ชนิด

1. ชนิด double beam และ double detectors แสงที่ผ่านโมโนโครมาเตอร์แล้วจะถูกแยกออกเป็น 2 ลำแสง ด้วยกระจกรูปตัว v เรียกว่า beam splitter ลำแสงหนึ่งผ่านเซลล์ที่ใส่สารละลายตัวอย่าง อีกลำแสงผ่านแบลงค์ หลังจากผ่านสารละลายแล้วจะไปยังเครื่องวัดแสงที่แยกกัน ค่าที่วัดได้จะส่งเข้าเครื่องอิเล็กทรอนิกเพื่อหาอัตราส่วน

2.ชนิด double beam และ single detector แสงที่ผ่านออกมาโมโนโครมาเตอร์จะแบ่งออก เป็น 2 ลำแสงด้วย rotating mirror หรือ chopper แล้วผ่านสารละลายตัวอย่างและแบล้งค์สลับกันไป ที่เหลือรวมกันด้วย grid mirror ซึ่งเป็นช่องแสงผ่านและสะท้อนต่อไปยังมาตรวัดแสง มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแบบ double-beam, single detector และ single monochromator และเป็นแบบ double-beam, double detector และ double-monochromator ซึ่งจะให้ resolution ที่ดีกว่าแบบแรก

3.ชนิด dynode feedback เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ชนิด double-beam นำมาผสมกับ dynode feedback จะทำให้เครื่องมีประสิทธิภาพดีขึ้น การทำงานของ dynode feedback จะเร็วมาก จึงสามารถทำให้การวัดได้ถูกต้องแม่นยำ แม้มีการเปลี่ยนแปลงบางสิ่งบางอย่างเกิดขึ้นในขณะวัดก็ตาม ฉะนั้นเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องมี voltage หรือ current stabilizer

ตารางที่ 2.3 ข้อเปรียบเทียบของเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ชนิดลำแสงเดี่ยวและลำแสงคู่

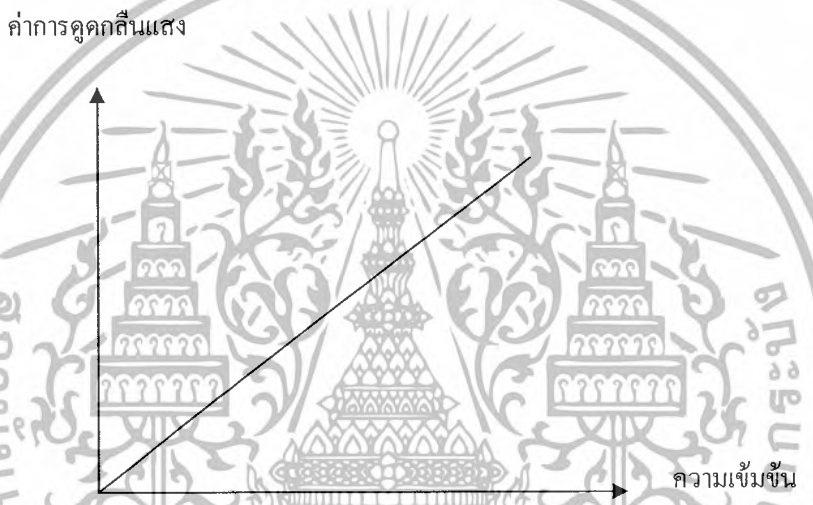
	ชนิดลำแสงเดียว	ชนิดลำแสงคู่	
		single detector	double detectors
การสร้าง	ทำได้ง่าย	ทำได้มากกว่า	ทำได้ยาก
ราคา	ถูก	แพง	แพง
การใช้งาน	จะต้องปรับเครื่องทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนความยาวคลื่นของแสง	ไม่จำเป็นต้องปรับใหม่	ไม่จำเป็นต้องปรับใหม่
การวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง	เสียเวลามาก เพราะต้องวัดทีละครั้ง ยกเว้นเมื่อใช้ไดโอดอาร์เรย์ ซึ่งทำได้ง่ายและเร็วมาก	ทำได้ง่าย สะดวก และเร็ว	ทำได้ง่าย สะดวก และเร็ว
ความเสถียร	ไม่ดี	ดีมาก	ดีมาก
การใช้งานวิเคราะห์	ดีสำหรับ quantitative	ดีทั้ง quanlitative และ quantitative	ดีทั้ง quanlitative และ quantitative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์หาปริมาณของสารด้วยการใช้เทคนิคทางยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรสโกปี

วิธีวิเคราะห์ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมีดังนี้

1. **ในกรณีที**สารตัวอย่างมีสารที่จะวิเคราะห์เพียงสารเดียว อาจใช้วิธีทำกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} โดยเทียบกับ blank นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.10 แสดงกราฟมาตรฐานทั่วไปที่ใช้หาปริมาณสาร

ค่าการดูดกลืนแสงควรอยู่ในช่วงที่พอเหมาะเพื่อให้ได้ผลถูกต้อง นั่นคือ ควรอยู่ในช่วง 0.1-1.0 ถ้าสารละลายเจือจางเกินไป วัดค่าการดูดกลืนได้น้อย ก็อาจแก้ไขด้วยการใช้เซลล์ให้กว้างขึ้น แต่ถ้าสารละลายเข้มข้นเกินไป ก็ใช้วิธีทำให้เจือจางลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. แผ่นแก้วขนาด 20X20 ซม.
2. แผ่น TLC สำเร็จรูป
3. Chamber
4. บีกเกอร์ขนาด 50 มล.
5. หลอดทดลอง
6. เครื่อง Centrifuge
7. Water bath
8. Hot plate
9. แท่งแก้วคน
10. เครื่อง spreading device coat stationary phase
11. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
12. เครื่อง UV-Visible ชนิดลำแสงคู่
13. Glass stopered flask
14. barrel สำหรับเก็บ Slurry
15. ครกบดสาร
16. ไมโครปิเปตขนาด 10 มล.
17. กระบอกน้ำกลั่น
18. Quartz cell
19. กรวยแก้ว
20. กรวยแยก
21. กระดาษกรอง
22. ขวดวัดปริมาตร
23. ขวดรูปชมพู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 สารเคมี

1. ซิลิกาเจล จากแกลบข้าว
2. ซิลิกาเจล จี(Silica gel G)
3. ยิปซั่ม ($CaSO_4.H_2O$)
4. สารมาตรฐานคาเฟอีน
5. สารละลายเอทานอล 95% (95% Ethanol)
6. น้ำดีไอออไนซ์
7. สารตัวอย่าง ชา กาแฟ
8. สารละลายเอทิลอะซิเตรต
9. สารละลายกรดฟอร์มิก
10. สารละลายกรดอะซิติก
11. โซเดียมคาร์บอเนต
12. สารละลายไดคลอโรมีเทน
13. แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต
14. น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเตรียมซิลิกาเจลจากแกลบข้าว

1. นำแกลบข้าวมาล้างด้วยน้ำประปาและใช้ตะแกรงกรอง นำไปตากแดดประมาณ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำแกลบไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 6 ชั่วโมง นำแกลบที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก (Thermo Gravimetric Analysis ,TGA) โดยกำหนดค่า พารามิเตอร์ดังนี้

Gas Type : N_2

Temperature Scan range : 50-800 °C

Heating Rate : 10°C /min

Sample Weight : ≈30 mg

2. ทำการกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเผาแกลบ กำหนดปริมาณแกลบที่จะเผาจำนวน 50 กรัม เนื่องจากข้อจำกัดด้านกายภาพ (ขนาดเตาเผา และขนาดชามเผา) โดยทำการเปลี่ยนเปลงระยะเวลาที่ใช้ในการเผา นำเถ้าแกลบที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณซิลิกาด้วยเทคนิค เอกซ์เรย์ฟลูออเรสเซนต์ (X-ray Fluorescent, XRF)

3. นำเถ้าแกลบที่เตรียมได้มาบดละเอียด และร่อนผ่าน sieve ขนาด 35 mesh (500 μm) นำเถ้าแกลบที่ได้มาล้างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M (เพื่อขจัดไอออนของโลหะ) โดยการแช่และคนตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก จากนั้นนำไปกรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์และล้างด้วยน้ำกลั่นจนมี pH เป็นกลาง นำเถ้าแกลบไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ชั่วโมง

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการละลายซิลิกาเจลเท่ากับ 10% (w/v)

$$\text{NaOH ที่ต้องใช้} = \left[\frac{X \times \left(\frac{Y\%}{100}\right)}{M.W._{SiO_2}}\right] \times 2\,(M.W._{NaOH})$$

โดยที่ X = น้ำหนัก (กรัม) ของเถ้าแกลบ

Y = เปอร์เซ็นต์ซิลิกาที่มีในเถ้าแกลบ

3.1 ชั่งเถ้าแกลบใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร จดบันทึกน้ำหนักเถ้าแกลบที่แน่นอน

3.2 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ตามที่คำนวณได้ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปแล้วทำให้ได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10%w/v

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ ลงในบีกเกอร์ของเถ้าแกลบ ใส่แท่งแม่เหล็กกวน ปิดบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา เสียบเทอร์โมมิเตอร์ตรงบริเวณที่เทสารของบีกเกอร์ นำไปให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนพร้อมทั้งกวนสารละลายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้เป็นการรีฟลักซ์

3.4 กรองสารละลายด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ (เพื่อแยกส่วนตะกอนที่ไม่ละลายออก) เก็บสารละลายที่ได้ไปทำขั้นตอนต่อไป

4. เตรียมซิลิกาเจลจากสารละลายโซเดียมซิลิเกต

4.1 นำสารละลายโซเดียมซิลิเกต ที่ได้จากการกรอง มาปรับ pH ให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 15% (w/v) เพื่อให้เกิดเจล จากนั้นทำการปรับ pH ให้ลดลงจนถึง pH = 1 (เพื่อให้เจลเกิดการกระจายตัว) ในระหว่างที่ทำการปรับ pH ให้คนสารละลายตลอดเวลาด้วย mechanical stirrer โดยใช้ใบพัดรูปตัว U จากนั้นเก็บสารละลายทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 นำสารละลายโซเดียมซิลิเกตที่ผ่านการปรับ pH ให้เท่ากับ 1 แล้วนำมาทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 15%(v/v) เพื่อให้เกิดเจล ในระหว่างการปรับ pH ให้ปรับอัตราการหมุนของ mechanical stirrer ที่ความเร็วสูง เพื่อให้ได้อนุภาคขนาดเล็ก จากนั้นนำเจลที่ได้ไปเข้าเครื่องพ่นแห้งเพื่อทำเป็นผง โดยมี condition ที่ใช้ในการทดลอง ดังนี้

Mechanical Stirrer Speed : 2.5-3

Gel Forming Temperature : Room temperature

Atomizer (spray dryer) : 50 Hz

Atomizer Speed set : 4

Cyclone P.G. : 50 mm H_2O

Pump Speed : 45

4.3 นำซิลิกาเจลที่ได้มาล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น และกวนสารละลายด้วย magnetic bar นาน 10 นาที กรองสารละลายด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และล้างด้วยน้ำกลั่น จน pH เป็นกลาง นำผงซิลิกาเจลที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.4 คัดขนาดอนุภาคด้วยการร่อนด้วยเครื่อง sieve shaker โดยใช้ sieve ขนาด Aperture 400 mesh (38 μm)

5. วิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของซิลิกาเจลที่สังเคราะห์ได้

5.1วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคเอกซ์เรย์ฟลูออเรสเซนต์(x-ray Fluorescent,XRF)

5.2 วิเคราะห์การจัดเรียงตัวด้วยเทคนิค เอกซ์เรย์ดิฟแฟรคชัน (x-ray Diffraction, XRD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 วิเคราะห์พื้นที่ผิวและรูพรนด้วยเครื่อง Autosorb-1

5.4 วิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคด้วยเครื่อง Mastersizer

5.5 วิเคราะห์ลักษณะเม็ดซิลิกาด้วยเทคนิคสแกนนิงอิเลกตรอนไมโครสโคป (Scanning Electron Microscope, SEM)

5.6 วิเคราะห์โครงสร้างก่อนทำการสังเคราะห์ bonded-phaseด้วยเทคนิค Si Solid StateNMR

5.7 วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคฟูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี(FT-IR)

3.3 การเตรียมแผ่น TLC

3.3.1 นำแผ่นแก้วขนาด 20×20 ซม. มาเช็ดทำความสะอาดด้วยอัลกอฮอล์

3.3.2 ชั่งซิลิกาเจล 26.4 กรัมผสมกับยิปซัม 3.6 กรัม (ยิปซัม 13%) ผสมกับน้ำกลั่น 60 มล. ลงในขวดรูปกรวยชมพู่พร้อมฝาปิด ขนาด 250 มล. เขย่าให้เข้ากัน จะได้ซิลิกาเจลที่อยู่ในรูปของของเหลวเหนียวข้น(slurry)

3.3.3 ทำการเคลือบซิลิกาเจลที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 ลงบนแผ่นแก้วโดยใช้เครื่องเคลือบเฟสอยู่กับที่(spreading device coat stationary phase) ให้มีความหนาประมาณ 0.30 มม. การเคลือบควรกระจายของเหลวซิลิกาเจลที่เหนียวข้นอย่างรวดเร็ว โดยใช้ความเร็วที่สม่ำเสมอ เพื่อให้มีความหนาเท่าๆกันตลอดทั้งแผ่น

3.3.4 หลังจากทำการเคลือบเสร็จเรียบร้อยแล้ว ทิ้งให้แห้งประมาณ 45 นาที หลังจากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 110°C นาน 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography

3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน คาเฟอีน ให้ได้ความเข้มข้นต่อไปนี้ 100 ,200, 400, 800 และ 1600 มก./ล.ตามลำดับ โดยใช้ ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวทำละลาย

3.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างชา

ชั่งตัวอย่างชา 5 กรัม(สำหรับชากระป๋องใช้ 100 มิลลิลิตรและไม่ต้องเติมน้ำกลั่น) ต้มในน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร นำไปกรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำ ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 15 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตรลงในขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตรนำไปให้ความร้อน ประมาณ 5 นาที ปล่อยให้ของผสมเย็นลง เติมไดคลอโรมีเทน 30 มิลลิลิตรลงไป แกว่งขวดรูปกรวยประมาณ 3-5 นาที หลังจากนั้นเทของผสมลงในกรวยแยกผ่านกรวยแก้ว แยกชั้นไดคลอโรมีเทนเก็บไว้ เติมไดคลอโรมีเทน 30 มิลลิลิตร เขย่ากรวยแยกเบาๆ (ห้ามเขย่าแรง เนื่องจากจะเกิดอิมัลชัน) แยกชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้รวมกับไดคลอโรมีเทนที่ได้ในตอนแรก เทลงในกรวยแยกผ่านกรวยแก้ว เติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร เขย่า แยกชั้นอินทรีย์ลงในขวดรูปกรวย เติมโซเดียมซัลเฟตที่แห้ง กรองโซเดียมซัลเฟตที่ดูดน้ำด้วยกระดาษกรองพับจีบลงในขวดรูปกรวยที่แห้ง เก็บสารที่ได้ไว้สำหรับวิเคราะห์ด้วยแผ่น TLC

ตัวอย่างกาแฟ

ชั่งกาแฟสำเร็จรูป 15 กรัม(สำหรับกาแฟกระป๋องใช้ 100 มิลลิลิตรและไม่ต้องเติมน้ำกลั่น) และโซเดียมคาร์บอเนต 15 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตรลงในขวดรูปกรวย ขนาด 250 มิลลิลิตรนำไปให้ความร้อน ประมาณ 5 นาที ปล่อยให้ของผสมเย็นลง เติมไดคลอโรมีเทน 30 มิลลิลิตรลงไป แกว่งขวดรูปกรวยประมาณ 3-5 นาที หลังจากนั้นเทของผสมลงในกรวยแยกผ่านกรวยแก้ว แยกชั้นไดคลอโรมีเทนเก็บไว้ เติมไดคลอโรมีเทน 30 มิลลิลิตร เขย่ากรวยแยกเบาๆ (ห้ามเขย่าแรง เนื่องจากจะเกิดอิมัลชัน) แยกชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้รวมกับไดคลอโรมีเทนที่ได้ในตอนแรก เทลงในกรวยแยกผ่านกรวยแก้ว เติมสารละลายอิ่มตัวโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร เขย่า แยกชั้นอินทรีย์ลงในขวดรูปกรวย เติมโซเดียมซัลเฟตที่แห้ง กรองโซเดียมซัลเฟตที่ดูดน้ำด้วยกระดาษกรองพับจีบลงในขวดรูปกรวยที่แห้ง เก็บสารที่ได้ไว้สำหรับวิเคราะห์ด้วยแผ่น TLC

สำหรับสารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้แก่

ตัวอย่าง A คือ ชาเขียวญี่ปุ่น ชาลีวัง

ตัวอย่าง B คือ ใบชาเบอร์ 1 ตรา สามม้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่าง C คือ ชาเขียวญี่ปุ่นกลิ่นมะลิตราระมิงค์

ตัวอย่าง D คือ ชาจีนอบดอกมะลิตราระมิงค์

ตัวอย่าง E คือ กาแฟสำเร็จรูปตราเนสกาแฟ

ตัวอย่าง F คือ กาแฟดำปรุงสำเร็จพร้อมดื่มตราเบอร์ดี้

3.4.3 การแยกสารด้วยแผ่น TLC

1. ทำให้ภายในแชมเบอร์อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายซึ่งในที่นี้จะใช้ สารละลายเอทิลอะซิเตต-กรดฟอร์มิก-กรดอะซิติก-น้ำ(100:11:11:26) โดยนำกระดาษกรองขนาด 40 x 15 ซม.มาโค้งเป็นรูปตัว U แล้วจุ่มลงไปยังแชมเบอร์ โดยที่ระดับของตัวทำละลายสูงประมาณ 1-2 ซม. ปิดฝาแชมเบอร์แล้วทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

2. นำแผ่นกระดาษกรองขึ้นมาจากแชมเบอร์กำหนดเส้นเริ่มต้น (starting line) ที่ใช้ spot สารโดยให้ห่างจากขอบด้านล่างของแผ่น TLC ประมาณ 2.5 ซม. และกำหนดเส้นระดับบนของตัวทำละลาย (solvent front) ให้ห่างจากขอบบนของแผ่น TLC ประมาณ 2.5 ซม.

3. หยด (spot) สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ลงบนเส้นเริ่มต้น โดยหยดสารละลายมาตรฐานสลับกับสารละลายตัวอย่าง

4. ทิ้งให้หยดของสารละลายแห้ง แล้วนำแผ่น TLC ไปจุ่มลงในตัวทำละลายที่อยู่ภายในแชมเบอร์ ปิดฝาปล่อยทิ้งไว้ให้เกิดการแยก จนระดับของตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปถึงเส้นระดับบนของตัวทำละลายที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกมาทิ้งไว้ให้แห้ง

5. นำแผ่น TLC ที่แห้งแล้วไปใส่ในภาชนะปิดที่มีเกล็ดไอโอดีน เพื่อดูตำแหน่งของสารที่เกิดการแยก แล้ววงด้วยดินสอ

6. นำแผ่น TLC มาหาค่า R_f ของสารแต่ละชนิดที่แยกออกมา โดยใช้จุดกึ่งกลางของแต่ละตำแหน่งที่วงไว้ เป็นระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้ แล้วนำค่า R_f ของสารแต่ละชนิดที่แยกได้จากสารตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับค่า R_f ของสารมาตรฐาน ทำให้ทราบว่าสารที่แยกได้ตำแหน่งใดเป็นสารคาเฟอีน

3.5 การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค UV – visible spectrophotometry

3.5.1 การเตรียมสารละลายแบลงค์

1. นำแผ่น TLC ที่เคลือบเรียบร้อยแล้วจากข้อที่ 2 จุ่มลงในแชมเบอร์ที่มีสารละลายเอทิลอะซิเตต-กรดฟอร์มิก-กรดอะซิติก-น้ำ (100:11:11:26) อยู่สูงประมาณ 1-2 ซม. ปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปประมาณ 15 ซม.จากนั้นนำขึ้นมาปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. จากนั้นนำแผ่น TLC มาขูดเอาซิลิกาเจล ขนาดประมาณ 2 ตร.ซม. แล้วนำไปสกัดด้วยสารละลาย ไดคลอโรมีเทน แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบที่สูงประมาณ 5 นาที รินเอาสารละลายส่วนที่ใสจากหลอดทดลอง (ระวังอย่าให้มีตะกอนติดขึ้นมาด้วย) ใส่ลงไปขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มล. เก็บสารละลายที่ได้ไว้สำหรับเป็นแบลงค์เพื่อเปรียบเทียบกับสารตัวอย่าง

3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.นำสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 400 มก./ล. ไปสแกนค่าการดูดกลืนแสง ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 - 1100 นาโนเมตร เพื่อหาค่า λ_{max} ($\approx$ 250 นาโนเมตร)

2.นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ λ_{max} ที่หาได้จากข้อ 1. แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

3.5.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. นำแผ่น TLC ที่แยกสารเรียบร้อยแล้ว มาขูดซิลิกาเจลในตำแหน่งที่เป็นสารคาเฟอีนแยกออกมาใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วสกัดด้วยสารละลาย ไดคลอโรมีเทน เขย่าแล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงนานประมาณ 5 นาที

2. รินเอาสารละลายส่วนที่ใสจากหลอดทดลอง (ระวังอย่าให้มีตะกอนติดขึ้นมาด้วย) ใส่ลงไปในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มล.

3 .นำสารละลายที่กรองได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของคาเฟอีน

3.6 การทดสอบความแม่นยำ

ทำซ้ำโดยการหยดสารตัวอย่าง ภายในแผ่น TLC เดียวกันจำนวน 7 หยดแล้วทำการทดลองต่อเหมือนข้อ3.4.3แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี

3.7 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ทำการทดลองเหมือนข้อที่ 3.3 ถึง 3.5 โดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลจี แต่สำหรับซิลิกาเจลจี นั้นให้ชั่งมา 30 กรัม แล้วผสมน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องผสมยิบซัม ($CaSO_4.H_2O$)เนื่องจากว่าทางบริษัทผู้ผลิตได้ผสมเรียบร้อยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำสารตัวอย่างแต่ละชนิดไปทำการแยกด้วยแผ่น TLC เปรียบเทียบกับ
จากนั้นนำสารตัวอย่างที่เหลือไป spot ยังแผ่น TLC จำนวน 7 จุดเพื่อเป็น
ของแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 7 ค่า แล้วนำไปหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบ
เปรียบเทียบค่า R_f ของสารตัวอย่างที่แยกด้วย ซิลิกาเจลจากแกลบข้าว กับ
ตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบค่า retardation factor (R_f) ที่
จากแกลบข้าวและซิลิการเจล จี

สารตัวอย่าง	ค่า R_f ± SD
	ซิลิกาเจลจากแกลบข้าว
A	0.86 ± 0.01
B	0.80 ± 0.01
C	0.83± 0.04
D	0.81± 0.04
E	0.77± 0.02
F	0.85± 0.01

4.2 ผลจากการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้เทคนิค UV – visible sp

การวิเคราะห์เชิงปริมาณทำได้โดยการขูดเอาซิลิกาบริเวณที่ทำ
TLC แล้วนำไปสกัดด้วยสารละลายไดคลอโรมีเทนโดยนำไปเข้าเครื่องเ
คาเฟอีนออกมา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปเปรียบเทียบ
ความเข้มข้นของสารตัวอย่างออกมา

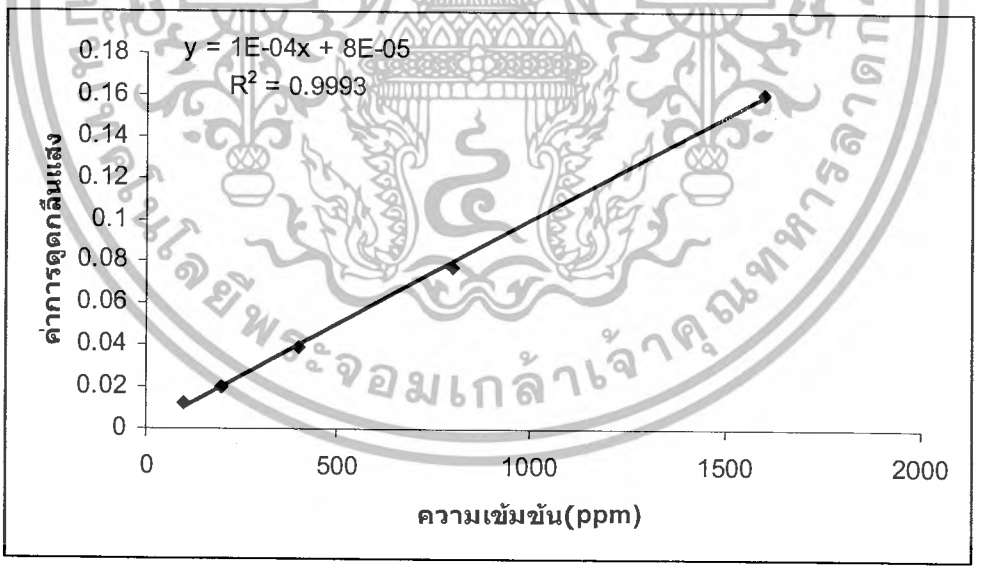
กราฟมาตรฐานได้จากการเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเฟอี
100,200,400,800 และ 1600 มก./ล จากนั้นนำไปแยกด้วยแผ่น TLC
คลอโรมีเทน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้น นำ
ความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงจะได้กราฟมาตรฐานขึ้นมาแสดงดัง
แกลบข้าว และรูป 4.2 ใช้ซิลิกาเจล จี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่เตรียมได้จากการใช้ซิลิกาเจลแต่ละชนิด

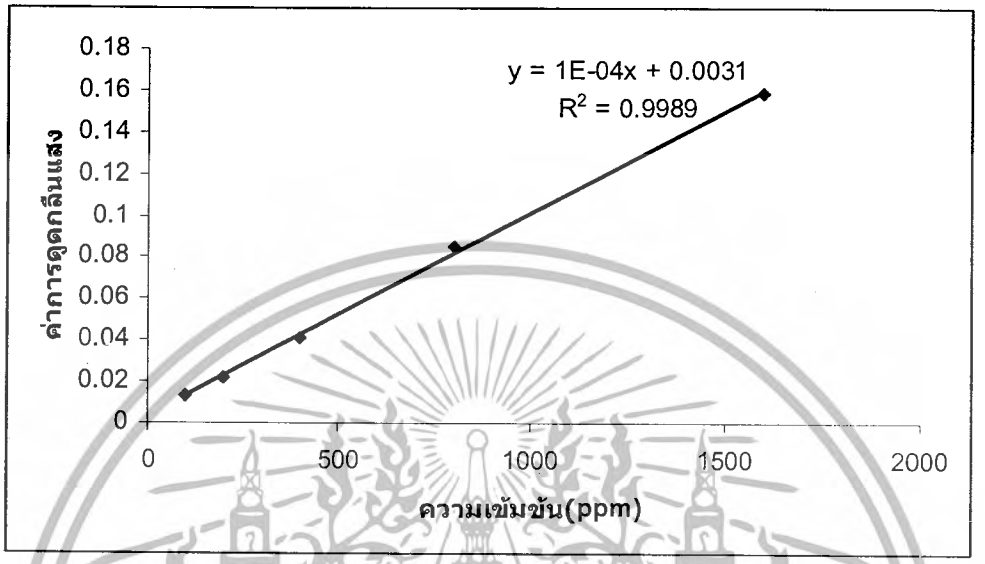
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีน(ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง	
	ซิลิกาเจลจากแกลบข้าว	ซิลิการเจล จี
100	0.012	0.013
200	0.020	0.022
400	0.039	0.041
800	0.078	0.085
1600	0.161	0.159

รูปที่ 4.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่เตรียมได้จากซิลิกาเจลที่ผลิตจากแกลบข้าว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาเฟอีนที่เตรียมได้จากซิลิกาเจล จี



ตารางที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ได้จากซิลิกาเจลแต่ละชนิด

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น(ppm)± SD	
	ซิลิกาเจลจากแกลบข้าว	ซิลิการเจล จี
A	143.49 ± 19.02	119.00 ± 32.66
B	339.20 ± 17.32	307.57 ± 14.64
C	212.06 ± 32.00	177.57 ± 21.39
D	352.06 ± 19.76	322.33 ± 8.16
E	1452.06 ± 275.42	1219.00 ± 8.94
F	765.87± 27.33	736.14 ± 13.80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในตารางที่ 4.4 แสดงค่าความเข้มข้นของคาเฟอีนที่อยู่ในตัวอย่าง ชา และกาแฟ ที่เปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน พบว่าจะอยู่ในช่วง 110-1500 ppm

เมื่อนำความเข้มข้นที่พบในตัวอย่างแต่ละชนิดมาคำนวณเป็นปริมาณที่มีอยู่ในตัวอย่าง ค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.5

สารตัวอย่าง	ปริมาณ	
	ซิลิกาเจลจากแกลบข้าว	ซิลิการเจล จี
ชาเขียวญี่ปุ่น ชาลีวัง	14.35 mg/100 ml	11.90 mg/100ml
ใบชาเบอร์ 1 ตราสามม้า	33.92 mg/5 g	30.76 mg/5 g
ชาเขียวญี่ปุ่นกลิ่นมะลิตราระมิงค์	21.21 mg/5 g	17.76 mg/5 g
ชาจีนอบดอกมะลิตราระมิงค์	35.21 mg/5 g	32.23 mg/5 g
กาแฟสำเร็จรูปตราเนสก้าแฟ	145.21 mg/30 g	121.90 mg/30 g
กาแฟดำปรุงสำเร็จพร้อมดื่มตราเบอร์ดี้	76.59 mg/100 ml	73.61 mg/100 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของซิลิกาเจลที่เตรียมมาจากแกลบข้าว กับซิลิกาเจลมาตรฐาน (ซิลิกาเจล จี) โดยใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ในการวิเคราะห์คาเฟอีน ในเครื่องดื่มจำพวกชาและกาแฟ จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าผลที่ได้จากซิลิกาเจลที่เตรียมขึ้นนั้น มีค่าใกล้เคียงกับซิลิกาเจล จี โดยดูได้จากค่า R_f ของสารตัวอย่าง ซึ่งเปรียบเทียบมาจากสารมาตรฐานแล้ว และนำผลจากแต่ละซิลิกาเจลมาเปรียบเทียบกัน เมื่อนำสารตัวอย่างแต่ละชนิดไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณ ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตรี ค่าความเข้มข้นที่ได้ ก็มีค่าใกล้เคียงกันทั้งที่ได้จากซิลิกาเจลจากแกลบข้าว และซิลิกาเจล จี

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ซิลิกาเจลจากแกลบข้าวนั้น มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับซิลิกาเจล จี และสามารถใช้แทนกันได้ จัดเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเพิ่มคุณค่า โดยนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านเคมีวิเคราะห์ และยังช่วยลดต้นทุนในการสั่งซื้อซิลิกาเจลได้อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิเคราะห์ ด้วยแผ่น TLC ซิลิกาเจล จี จะใช้เวลาในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายประมาณ 1 ชั่วโมง แต่ซิลิการเจล จากแกลบข้าว ใช้เวลาในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายถึง 7 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่า ซิลิกาเจลจากแกลบข้าวนั้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเกินไป เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากขนาดอนุภาคของซิลิกาเจลจากแกลบข้าวนั้น มีขนาดที่เล็กมาก (20 ไมครอน) จึงเกิดการดูดซับได้ดี ทำให้เคลื่อนที่ได้ช้า ดังนั้น เราจึงใช้ขนาดอนุภาคของซิลิกาเจลที่มีขนาดประมาณ 30-40 ไมครอน ก็จะทำให้ช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์

2. สำหรับตัวทำละลายนั้นควรทำการปรับเปลี่ยนหลายอัตราส่วนเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. ผศ.คณิตา ดังคณานุรักษ์, การควบคุมคุณภาพและการประกันคุณภาพ การตรวจวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ,ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

2. ผศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์, เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์,ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

3. ผศ.ดร. สุวรรณ ไชยสิทธิ์, เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี,ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

4. แม้น อมรสิทธิ์, Principles and Techniques of Instrumental Analysis, ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์ ชวนพิมพ์.

5. สุรินทร์ เหล่าพระจันทร์, การใช้และการบำรุงรักษาเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ , ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

6. รศ.ธวัชชัย ศรีวิบูลย์, เคมีวิเคราะห์ 2 , ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ,มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

7. ผศ. ดร. ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์, ปฏิบัติการเคมีอินทรีย์ 2, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

8. Ekle Hahn-Deinstrop, Applied Thin-Layer Chromatography, Wiley-VCH Verlag Gmbh

9. Pavia, D.L.;Lampman, G.M.;Kriz, G.S.;and Engle,R.G.; Introduction to Organic Laboratory Techniques . A Microscale Approach , Saunders College Publishing, U.S.A. ,1992

10. Eator, D.C.; Laboratory Investigation in Organic Chemistry , McGraw – Hill Inc.,U.S.A. ,1989

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ผลการทดลอง

1. ใช้ซิลิกาเจลที่ได้จากแกลบข้าว

สาร	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
สารมาตรฐานครั้งที่ 1	15	12.15	0.81
สาร A	15	12	0.8
สารมาตรฐานครั้งที่ 2	15	11.7	0.78
สาร B	15	10.95	0.73
สารมาตรฐานครั้งที่ 3	15	11.55	0.77
สาร C	15	11.4	0.76
สารมาตรฐานครั้งที่ 4	15	11.1	0.74
สาร D	15	12.45	0.83
สารมาตรฐานครั้งที่ 5	15	12	0.8
สาร E	15	10.8	0.72
สารมาตรฐานครั้งที่ 6	15	11.4	0.76
สาร F	15	11.4	0.76

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร A

ครั้ง	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
1	15	13.05	0.87
2	15	12.90	0.86
3	15	12.90	0.86
4	15	12.75	0.85
5	15	13.05	0.86
6	15	12.75	0.85
7	15	13.05	0.87
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.86
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทำซ้ำสำหรับสาร B

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
1	15	13.05	0.87*
2	15	11.70	0.78
3	15	11.70	0.78
4	15	12.15	0.81
5	15	12.15	0.81
6	15	12.15	0.81
7	15	12.00	0.80
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.80
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.01

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร C

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
1	15	13.05	0.87
2	15	13.05	0.84
3	15	12.00	0.80
4	15	11.85	0.79
5	15	11.85	0.79
6	15	13.05	0.82
7	15	13.20	0.88
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.83
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร D

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ (ซม.)	ค่า R_f
1	15	13.05	0.87
2	15	12.30	0.82
3	15	11.85	0.79
4	15	11.85	0.79
5	15	11.55	0.77
6	15	11.55	0.77
7	15	12.60	0.84
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.81
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.04

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร E

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ (ซม.)	ค่า R_f
1	15	11.85	0.79
2	15	11.85	0.79
3	15	11.85	0.75
4	15	11.70	0.78
5	15	10.95	0.73
6	15	11.55	0.77
7	15	11.55	0.77
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.77
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร F

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า Rf
1	15	12.90	0.86
2	15	12.60	0.84
3	15	13.35	0.89*
4	15	12.90	0.86
5	15	12.75	0.85
6	15	12.75	0.85
7	15	12.90	0.86
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.85
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.01

- ผลการทดลองจากเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

- ความยาวคลื่น(λ_{max}) = 250
- ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานคาเฟอีน

ความเข้มข้น(ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย
100	0.012	0.012	0.012	0.012
200	0.021	0.020	0.020	0.020
400	0.039	0.040	0.039	0.039
800	0.077	0.077	0.080	0.078
1600	0.160	0.163	0.160	0.161

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร A

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.015	0.017	0.016	0.016	159.2
2	0.010	0.011	0.013	0.011	109.2
3	0.014	0.015	0.015	0.015	149.2
4	0.015	0.014	0.014	0.014	139.2
5	0.014	0.014	0.014	0.014	139.2
6	0.018	0.017	0.017	0.017	169.2
7	0.017	0.012	0.012	0.014	139.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	143.49
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	19.02

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร B

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.031	0.039	0.036	0.035	349.2
2	0.031	0.033	0.031	0.032	319.2
3	0.032	0.031	0.035	0.033	329.2
4	0.032	0.036	0.034	0.034	339.2
5	0.037	0.035	0.035	0.036	359.2
6	0.032	0.038	0.037	0.036	359.2
7	0.031	0.036	0.030	0.032	319.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	339.2
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	17.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร C

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	(ppm)
1	0.022	0.022	0.021	0.022	219.2
2	0.027	0.027	0.027	0.027	269.2
3	0.021	0.021	0.021	0.021	209.2
4	0.019	0.015	0.017	0.017	169.2
5	0.021	0.020	0.020	0.020	199.2
6	0.021	0.018	0.019	0.019	189.2
7	0.024	0.022	0.022	0.023	229.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	212.06
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	32.00

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร D

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	(ppm)
1	0.032	0.032	0.032	0.032	319.2
2	0.036	0.037	0.037	0.037	369.2
3	0.035	0.033	0.034	0.034	339.2
4	0.038	0.037	0.036	0.037	369.2
5	0.037	0.035	0.035	0.036	359.2
6	0.039	0.033	0.038	0.037	369.2
7	0.035	0.034	0.034	0.034	339.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	352.06
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	19.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร E

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.163	0.161	0.161	0.162	1619.2
2	0.139	0.140	0.141	0.140	1399.2
3	0.188	0.191	0.189	0.189	1889.2
4	0.100	0.104	0.101	0.102	1019.2
5	0.138	0.159	0.160	0.152	1519.2
6	0.146	0.147	0.147	0.147	1469.2
7	0.131	0.119	0.125	0.125	1249.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	1452.06
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	275.42

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร F

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.076	0.075	0.075	0.075	749.2
2	0.074	0.075	0.075	0.075	749.2
3	0.081	0.080	0.082	0.081	809.2
4	0.076	0.077	0.074	0.076	759.2
5	0.060	0.062	0.061	0.061	609.2*
6	0.074	0.074	0.073	0.074	739.2
7	0.079	0.078	0.081	0.079	789.2
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	765.87
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	27.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.ใช้ซิลิกาเจล จี

สาร	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
สารมาตรฐานครั้งที่ 1	15	13.30	0.89
สาร A	15	13.25	0.88
สารมาตรฐานครั้งที่ 2	15	13.50	0.90
สาร B	15	13.25	0.88
สารมาตรฐานครั้งที่ 3	15	13.45	0.90
สาร C	15	13.60	0.91
สารมาตรฐานครั้งที่ 4	15	13.70	0.91
สาร D	15	13.95	0.93
สารมาตรฐานครั้งที่ 5	15	13.90	0.93
สาร E	15	12.15	0.81
สารมาตรฐานครั้งที่ 6	15	12.25	0.82
สาร F	15	12.85	0.86

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร A

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
1	15	12.90	0.86
2	15	12.90	0.86
3	15	13.05	0.87
4	15	13.35	0.89*
5	15	13.05	0.87
6	15	12.90	0.86
7	15	13.00	0.87
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.87
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร B

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
1	15	12.60	0.84
2	15	12.30	0.82
3	15	12.30	0.82
4	15	12.15	0.81
5	15	11.70	0.78
6	15	12.30	0.82
7	15	12.45	0.83
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.82
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.02

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร C

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า R_f
1	15	12.75	0.85
2	15	12.45	0.83
3	15	12.15	0.81
4	15	12.00	0.80
5	15	12.45	0.83
6	15	12.45	0.83
7	15	12.30	0.82
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.82
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.02

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร D

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า Rf
1	15	12.90	0.86
2	15	13.05	0.87
3	15	12.90	0.86
4	15	13.20	0.88
5	15	13.05	0.87
6	15	13.05	0.87
7	15	12.75	0.85
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.87
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร E

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า Rf
1	15	11.85	0.79
2	15	10.95	0.73
3	15	10.95	0.73
4	15	11.40	0.76
5	15	11.40	0.76
6	15	11.55	0.77
7	15	11.55	0.77
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.76
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.02

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร F

ครั้งที่	ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่(ซม.)	ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่(ซม.)	ค่า Rf
1	15	13.20	0.88
2	15	13.05	0.87
3	15	11.85	0.79
4	15	12.30	0.82
5	15	11.55	0.77
6	15	12.30	0.82
7	15	12.60	0.84
ค่าเฉลี่ย	-	-	0.83
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ผลการทดลองจากเครื่อง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

- ความยาวคลื่น(λ_{max}) = 250
- ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานคาเฟอีน

ความเข้มข้น(ppm)	ค่าการดูดกลืนแสง			ค่าเฉลี่ย
100	0.012	0.013	0.013	0.013
200	0.023	0.022	0.021	0.022
400	0.041	0.043	0.038	0.041
800	0.086	0.085	0.085	0.085
1600	0.160	0.159	0.159	0.159

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร A

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.014	0.014	0.012	0.013	99
2	0.015	0.016	0.015	0.015	119
3	0.016	0.017	0.017	0.017	139
4	0.013	0.011	0.015	0.013	99
5	0.011	0.012	0.011	0.011	79
6	0.015	0.014	0.015	0.015	119
7	0.020	0.022	0.022	0.021	179
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	119
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	32.66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร B

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.031	0.032	0.03 2	0.032	289
2	0.032	0.033	0.033	0.033	299
3	0.036	0.036	0.036	0.036	329
4	0.036	0.035	0.035	0.035	319
5	0.033	0.033	0.032	0.033	299
6	0.031	0.035	0.033	0.033	299
7	0.036	0.034	0.034	0.035	319
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	307.57
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	14.64

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร C

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น (ppm)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
1	0.020	0.021	0.020	0.020	169
2	0.024	0.023	0.023	0.023	199
3	0.018	0.018	0.017	0.018	149
4	0.021	0.022	0.022	0.022	189
5	0.023	0.023	0.023	0.023	199
6	0.019	0.018	0.017	0.018	149
7	0.022	0.021	0.022	0.022	189
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	177.57
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	21.93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร D

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	(ppm)
1	0.036	0.035	0.035	0.035	319
2	0.034	0.035	0.035	0.035	319
3	0.035	0.036	0.036	0.036	329
4	0.036	0.037	0.034	0.036	329
5	0.030	0.032	0.031	0.031	279*
6	0.034	0.034	0.033	0.034	309
7	0.039	0.038	0.031	0.036	329
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	322.33
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	8.16

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร E

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	(ppm)
1	0.126	0.125	0.125	0.125	1219
2	0.122	0.125	0.125	0.124	1209
3	0.125	0.123	0.126	0.125	1219
4	0.126	0.127	0.124	0.126	1229
5	0.120	0.122	0.121	0.121	1179*
6	0.124	0.124	0.123	0.124	1209
7	0.129	0.128	0.121	0.126	1229
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	1219.29
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	8.94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการทำซ้ำสำหรับสาร F

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง				ความเข้มข้น
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	(ppm)
1	0.078	0.079	0.079	0.079	759
2	0.074	0.075	0.075	0.075	719
3	0.075	0.076	0.076	0.076	729
4	0.076	0.077	0.074	0.076	729
5	0.078	0.077	0.077	0.077	739
6	0.078	0.078	0.077	0.078	749
7	0.079	0.078	0.071	0.076	729
ค่าเฉลี่ย	-	-	-	-	736.14
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	-	-	-	-	13.80

หมายเหตุ * คือ ค่าที่ถูกตัดออกโดยใช้ Q-test ที่ความเชื่อมั่น 95%

การคำนวณทางสถิติดังนี้

- ค่าเฉลี่ย (Mean) $\overline{X} = \frac{\sum X_i}{N}$

- ความแม่นยำ(Precission)

นำผลการทดลองที่ได้ มาหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV)

$$SD = \frac{\sum (X_i - \overline{X})^2}{N-1}$$

$$\% CV = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การตัดข้อมูลที่สงสัยออก โดยใช้ Q-test

  ค่าที่ถูกตัดออก (Q) = (ค่าที่ติดกับค่าที่สงสัย – ค่าที่สงสัย)/(ค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุด)

  หากค่า Q มีค่าเท่ากันหรือมากกว่าค่าที่เทียบจากตารางควรตัดทิ้งไป

ตารางแสดงค่า Q_{crit}(Critical Value for rejection qoutient)

จำนวนค่าที่วัด	Q_{crit} (Reject if $Q_{cal} > Q_{crit}$)		
	90% confidence	95% confidence	99% confidence
3	0.941	0.970	0.994
4	0.765	0.829	0.926
5	0.642	0.710	0.821
6	0.560	0.625	0.740
7	0.507	0.568	0.680
8	0.468	0.526	0.634
9	0.437	0.493	0.598
10	0.412	0.466	0.568

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้