

การเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานระดับไมครอนจากเปลือกกุ้ง
เพื่อใช้ในงานทางโครมาโทกราฟี

PREPARATION OF CHITOSAN MICROSPHERES FROM SHRIMP SHELL
FOR USING IN CHROMATOGRAPHIC METHOD

ยิวพร อูป๊ะ
YUWAPORN UPPA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2443-9

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานระดับไมครอนจากเปลือกกุ้ง
เพื่อใช้ในงานทางโครมาโทกราฟี

PREPARATION OF CHITOSAN MICROSPHERES FROM SHRIMP SHELL
FOR USING IN CHROMATOGRAPHIC METHOD



ยิวพร อุปะ

YUWAPORN UPPA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2443-9

**PREPARATION OF CHITOSAN MICROSPHERES FROM SHRIMP
SHELL FOR USING IN CHROMATOGRAPHIC METHOD**

YUWAPORN UPPA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2006
ISBN 974-15-2443-9**

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานระดับไมครอนจากเปลือกกุ้งเพื่อใช้ในงานทางโครมาโทกราฟี
นักศึกษา	นางสาวยุวพร อุปปะ
รหัสประจำตัว	46063801
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เคมี (เคมีวิเคราะห์)
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.คณิตา ดังคณานุกรักษ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ และข้อจำกัดในการใช้เปลือกกุ้งมาเตรียมเป็นอนุภาคไคโตซานทรงกลม (chitosan microspheres) สำหรับนำไปประยุกต์ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ของคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC-column) ทำโดยสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้งได้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 785,980 จากนั้นเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน โดยอาศัยปฏิกิริยาการเชื่อมโยงพันธะ และเทคนิคการพ่นแห้ง สภาวะที่ใช้คือ สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เป็นสารเชื่อมโยง และความเร็วรอบในการพ่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที พบว่าอนุภาคของไคโตซานที่ได้มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ มีขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยเท่ากับ 4.08 ไมโครเมตร, พื้นที่ผิวเฉลี่ย 3.02 ตารางเมตรต่อกรัม, ขนาดรูพรุนสูงสุด 43.72 \AA และมีโครงสร้างแบบอสัณฐาน ในการบรรจุคอลัมน์ HPLC ใช้เทคนิคการบรรจุแบบเปียก ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีพบว่า จำนวนเพลททางทฤษฎีเท่ากับ 12,312 เพลทต่อเมตร และค่าความสูงของเพลททางทฤษฎีต่ำสุด 2.02×10^{-5} เมตร ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สารมาตรฐาน โทลูอิน และใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนโตรล/น้ำ (75:25) ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า สามารถประยุกต์ใช้อนุภาคทรงกลมของไคโตซานนี้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ HPLC ในระบบนอร์มัลเฟส (normal phase) ได้

Thesis Title	Preparation of chitosan microspheres from shrimp shell for using in chromatographic method
Student	Miss Yuwaporn Uppa
Student ID.	46063801
Degree	Master of Science
Program	Chemistry (Analytical Chemistry)
Thesis Advisor	Asst. Prof. Kanita Tangkananurak

ABSTRACT

This research is aimed to study the potential and limitation of using shrimp shell to produce the chitosan microspheres particles for used as a stationary phase for high performance liquid chromatography column (HPLC-column). By the process started with recovery of chitosan from shrimp shell to obtained chitosan molecular weight 785,980. Therefore chitosan microspheres were prepared by using glutaraldehyde crosslinking reaction and spray drying technique. Optimized condition for preparation of chitosan microspheres as stationary phase were found that using 250 mL of 0.5% (w/v) chitosan, 3 mL of 50% (v/v) glutaraldehyde and atomizer speed 35,000 rpm. The obtained chitosan microspheres had a good sphericity and a smooth, average particle size is 4.08 μm , average surface area of 3.02 m^2/g , major pore size of 43.72 \AA and amorphous form. For chitosan microspheres were packed into HPLC column by using slurry technique, and show a good reproducibility of chromatographic analysis, the numbers of theoretical plates 12,312 plates/m and the theoretical plate height minimum value (H) 2.02×10^{-5} m at 0.4 mL/min by using the standard toluene, the mobile phase of acetonitrile/ H_2O (75:25). The obtained findings confirm the applicability of normal phase HPLC on the chitosan microspheres as the stationary phase.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.คณิตา ตั้งคณาบุรุษย์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และโครงร่างวิทยานิพนธ์ ผศ. นงนุช ศิวะภิญโญยศ และ ดร.ชญชญา ธนชยานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และโครงร่างวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะ จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี เครื่องมือ สถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณดำรงศักดิ์ เจษฎาภัทรกุล ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ และคุณชาติไทย แก้วทอง ที่เป็นกำลังใจคอยให้คำปรึกษาแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือจนทำให้งานวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

ยุวพร อุปะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูปภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไคตินและไคโตซาน.....	4
2.1.1 ไคติน.....	4
2.1.2 ไคโตซาน.....	6
2.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคโตซาน.....	7
2.2.1 ค่าองค์ประกอบอะตอม.....	7
2.2.2 น้ำหนักโมเลกุล.....	7
2.2.3 การละลาย.....	8
2.2.4 ความหนืด.....	9
2.2.5 ไคโตซานเชื่อมโยง.....	9
2.2.6 อนุพันธ์ไคโตซาน.....	10
2.3 การเตรียมไคติน – ไคโตซาน.....	14
2.3.1 การเตรียมไคติน.....	14
2.3.2 การเตรียมไคโตซาน.....	15
2.4 การประยุกต์ใช้ไคโตซาน.....	17
2.4.1 ด้านอาหาร.....	17
2.4.2 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3 ด้านเครื่องสำอางค์.....	17
2.4.4 ด้านสิ่งแวดล้อม.....	18
2.4.5 ด้านอุตสาหกรรมกระดาษและสิ่งทอ.....	18
2.4.6 ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ.....	18
2.5 โครมาโทกราฟี.....	19
2.5.1 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี.....	19
2.5.1.1 สมการคงไว้.....	21
2.5.1.2 การคงไว้สัมพัทธ์.....	24
2.5.1.3 แพลเตอร์ที่มีผลต่อการคงไว้.....	25
2.5.1.4 ประสิทธิภาพของคอลัมน์.....	26
2.5.1.5 การคำนวณค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์.....	26
2.5.1.6 จำนวนเพลทที่มีประสิทธิภาพ.....	28
2.5.1.7 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ภาวะเหมาะสมที่สุด.....	38
2.5.1.8 ความสามารถในการแยก.....	39
2.6 โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง.....	42
2.6.1 โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ.....	43
2.6.2 โครมาโทกราฟีแบบกระจาย.....	43
2.6.3 โครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ.....	43
2.6.4 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน.....	44
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	45
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	46
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	46
3.1.1 สารเคมี.....	46
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	47
3.2 ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย.....	48
3.3 วิธีวิจัย.....	49
3.3.1 การเตรียมสารละลาย.....	49
3.3.2 การเตรียมโคโธซานจากเปลือกกุ้ง.....	50

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.3 การเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน.....	51
3.3.4 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน.....	51
3.3.5 การกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิล.....	52
3.3.6 การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน ที่เตรียมได้.....	53
3.3.7 การบรรจุอนุภาคทรงกลมของไคโตซานลงในคอลัมน์ด้วยเทคนิคบรรจุ แบบเปียก.....	53
3.3.8 การทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์.....	53
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	54
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	55
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน.....	55
4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่เหมาะสม.....	55
4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ที่เหมาะสม.....	58
4.1.3 ผลการศึกษาปริมาตรของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ที่เหมาะสม.....	61
4.1.4 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (atomizer speed) ที่เหมาะสม.....	64
4.2 การศึกษาคุณลักษณะอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน.....	67
4.2.1 น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน.....	67
4.2.2 หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมได้.....	68
4.2.3 โครงสร้างของอนุภาคทรงกลมไคโตซาน.....	70
4.2.4 การกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมไคโตซานที่เตรียมได้.....	71
4.2.5 พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของอนุภาคทรงกลมไคโตซานที่เตรียมได้.....	72
4.3 การศึกษาตัวแปรทางโครมาโทกราฟี.....	73
4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ทางทฤษฎี.....	73
4.3.1.1 กราฟแวนดีมเตอร์.....	73
4.3.2 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของคอลัมน์.....	76
4.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสาร.....	78

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพแยกสารแต่ละชนิดด้วยคอลัมน์ไอโตซาน.....	81
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	82
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	82
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	83
เอกสารอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	86
ภาคผนวก ก การคำนวณค่าทางโครมาโทกราฟี.....	87
ภาคผนวก ข โครมาโทแกรมการตรวจสอบประสิทธิภาพคอลัมน์.....	91
ภาคผนวก ค โครมาโทแกรมการทดสอบประสิทธิภาพแยกสารแต่ละชนิด ด้วยคอลัมน์ไอโตซาน.....	96
ประวัติผู้เขียน.....	104

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แหล่งและองค์ประกอบของไคตินในสิ่งมีชีวิต.....	5
2.2 การละลายของไคโตซานในสารละลายกรดอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	8
3.1 แสดงตัวแปรต่างๆ ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลม ของไคโตซาน.....	51
3.2 แสดงสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคทรงกลมของ ไคโตซาน.....	52
4.1 แสดง wave number ที่สำคัญของหมู่ฟังก์ชันในอนุภาคทรงกลมไคโตซาน.....	69
4.2 ข้อมูลของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอะเซทามิโนเฟน.....	76
4.3 แสดงเวลากลางไว้ของสารมาตรฐานต่างๆ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างๆ กัน.....	81
ก1 การคำนวณอัตราการไหลกับค่าทฤษฎีทางเพลาท.....	87

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส.....	4
2.2 โครงสร้างของไคติน.....	4
2.3 โครงสร้างของไคตินแบบต่างๆ.....	6
2.4 โครงสร้างของไคโตซาน.....	7
2.5 โครงสร้างของไคโตซานเชื่อมโยง.....	10
2.6 โครงสร้างของ hydroxypropyl chitosan (HPCS).....	11
2.7 การเตรียมอนุพันธ์ <i>O,O'</i> -dipalmitoyl chitosan (DPCT).....	12
2.8 อนุพันธ์ <i>O</i> -Carboxymethylchitosan (OCMCS).....	13
2.9 การเตรียมอนุพันธ์ Hydrophobic ของไคโตซาน.....	13
2.10 หลักการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี.....	20
2.11 แบบจำลองเฟลททางทฤษฎีโครมาโทกราฟี.....	26
2.12 การหาค่าจำนวนเฟลทด้วย $W_b = 4\sigma$	27
2.13 การคำนวณหาค่าทางเฟลททางทฤษฎี.....	28
2.14 การแพร่วนในคอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	30
2.15 แสดงค่าเทอม H กับ U ในเทอมของพจน์ A	32
2.16 แสดงค่าเทอม H กับ U ในเทอมของพจน์ B	33
2.17 การถ่ายโอนมวลในเฟสอยู่กับที่ (C_s).....	34
2.18 การถ่ายโอนมวลของเฟสเคลื่อนที่ (C_M).....	35
2.19 การถ่ายโอนมวลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนชั่วขณะหนึ่ง.....	35
2.20 แสดงค่า H กับ U ในเทอมของพจน์ C	36
2.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า H กับค่า U	37
2.22 กราฟระหว่างค่า H และ U ตามสมการแวนดีมเตอร์ กับค่าพจน์ A , B และ C	38
2.23 ผลของความกว้างของพีคและเวลาการคงไว้ที่มีต่อรีโซลูชัน.....	40
2.24 การคำนวณรีโซลูชันของพีคสองพีคโดยการวัดเวลาการคงไว้ และความกว้างของฐานพีค.....	41
2.25 รีโซลูชันของรูปพีคสามเหลี่ยมด้านเท่าและรูปเกาส์เซียนพีค.....	41
2.26 แสดงโครมาโทแกรมของพีคที่มีค่า $R = 1$, $R = 1.5$ และ $R = 2.0$	42

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วยรอบในการปั่นแห้ง 30,000 รอบต่อนาที.....	65
4.11 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วยรอบในการปั่นแห้ง 40,000 รอบต่อนาที.....	65
4.12 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโคโคซานที่เตรียมได้ ด้วยเทคนิค GPC.....	67
4.13 IR-spectrum ของอนุภาคทรงกลมโคโคซานที่เตรียมได้.....	68
4.14 สเปกตรัม XRD อนุภาคทรงกลมของโคโคซาน.....	70
4.15 แสดงการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมได้.....	71
4.16 แสดงรูปไอโซเทอมการแอดซอร์บ (adsorb) ก๊าซไนโตรเจนบนผิวอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมได้.....	72
4.17 กราฟแสดงค่าความสูงของเพลท (HETP) ของสารละลายมาตรฐาน โทลูอินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร, ในเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตนในไตรล์ต่อน้ำ (75:25).....	74
4.18 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน.....	77
4.19 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนไลด์ และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนในไตรล์ต่อน้ำ (75:25) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	78
4.20 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนไลด์ และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนในไตรล์ต่อน้ำ (90:10) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	79
4.21 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนไลด์ และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที.....	80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการส่งออกและแปรรูปสัตว์น้ำของประเทศไทยมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นับเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญแหล่งหนึ่งในมูลค่าประมาณ 300,000 ล้านบาทต่อปี ผลผลิตกุ้งที่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปีส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์ประมงโดยรวมมีการส่งออกสูงสุด โดยปี 2538 – 2541 ประเทศไทยส่งออกกุ้งเป็นอันดับหนึ่งของโลกในปริมาณมากถึง 200,000 – 220,000 ตัน/ปี แต่ในขณะเดียวกันปัญหาที่ตามมาก็คือ ทำให้ปริมาณกากของเสียชีวภาพเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมแช่แข็ง เช่น หัวกุ้ง เปลือกกุ้ง มีจำนวนมากตามไปด้วย เนื่องจากการส่งออกกุ้งแช่แข็งมักจะอยู่ในลักษณะเนื้อกุ้งเป็นตัวติดหาง ซึ่งเนื้อกุ้งทั้งตัวจะมีน้ำหนักประมาณร้อยละ 24 – 41 ส่วนที่เหลือจะเป็นส่วนของหัวกุ้งและเปลือกกุ้ง ซึ่งเดิมที่ผ่านมาโดยมากกากของเหลือทิ้งจะถูกนำไปจำหน่ายในราคาต่ำประมาณ 1 – 3 บาทต่อกิโลกรัม เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ที่สามารถใช้แทนโปรตีนบางส่วนได้ หรือใช้ทำปุ๋ย อย่างไรก็ตามยังคงมีกากของเหลือทิ้งที่ตกค้างอยู่ในปริมาณมากที่บริเวณโรงงานอันจะก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทั้งด้านน้ำเสีย อากาศเสียส่งกลิ่นเหม็น และเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรค ซึ่งทำให้โรงงานจะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการจัดการแก้ไขปัญหามลภาวะดังกล่าวที่เกิดขึ้น ทั้งนี้ถ้าหากได้นำกากของเหลือชีวภาพกลับมาใช้ และการใช้ประโยชน์กากของเสียชีวภาพ ในเชิงวิทยาศาสตร์เปลือกกุ้งสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารโคติน – โคอิตซาน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่มีการใช้ประโยชน์สูง นับว่าเป็นอีกทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหามลภาวะและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือทิ้งเหล่านี้อีกด้วย [1]

ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการเตรียมโคโตซานที่มีอนุภาคทรงกลมขนาดเล็กจากวัสดุทางธรรมชาติที่เหลือทิ้ง เช่น จากเปลือกกุ้ง โคอิตซานที่เตรียมได้มีสมบัติที่ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบผสมอาหาร เครื่องสำอางค์ ยา และทำเป็นปุ๋ย แต่ในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นการนำอนุภาคทรงกลมของโคโตซานที่เตรียมได้จากเปลือกกุ้ง ไปประยุกต์ใช้ในงานทางเคมีวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี คือใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ของคอลัมน์ HPLC ประกอบกับประเทศไทยมีการนำเข้าคอลัมน์ HPLC จากต่างประเทศที่มีค่าใช้จ่ายสูง จากสมบัติและกระบวนการเตรียมอนุภาคทรงกลมจากโคโตซานสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการเตรียมคอลัมน์ HPLC ซึ่งใช้โคโตซานเป็นเฟสอยู่กับที่ในการวิเคราะห์สาร โดยจะต้องศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการละลายของอนุภาคโคโตซาน เพื่อให้ใช้งานได้กับเฟสเคลื่อนที่สำหรับเทคนิค HPLC ได้มากขึ้น และการประยุกต์ใช้คอลัมน์ที่เตรียมได้แยกสาร เนื่องจากโคโตซานเป็นสารพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่

ฟังก์ชัน ซึ่งเป็นการช่วยลดการนำเข้าของคอลัมน์ HPLC ซึ่งมีราคาแพงให้กับประเทศได้ โดยผู้วิจัย จะต้องทำการศึกษาวิธีการเตรียม และสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กมากประมาณ 3-10 μm (ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำเป็นเฟสอยู่กับที่ในเทคนิค HPLC) มีโครงสร้างที่แข็งแรงและทนต่อแรงดันสูงๆ ประกอบกับต้องศึกษาคุณสมบัติการละลายของโคโคซาน เพื่อให้ใช้งานได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ของเทคนิค HPLC และการประยุกต์ใช้คอลัมน์ที่เตรียมได้เพื่อแยกสารและวิเคราะห์สารประกอบที่เหมาะสม โดยอาจจะต้องมีการปรับปรุงหมู่ฟังก์ชันเพื่อนำไปใช้แยกและวิเคราะห์สารได้กว้างขวางขึ้นต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- (1) ศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซานจากเปลือกกุ้ง เพื่อใช้ในงานทางเคมีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี
- (2) ศึกษาปัจจัยต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซาน
- (3) เพื่อเตรียมเป็นคอลัมน์ HPLC ที่มีประสิทธิภาพใช้งานได้ดี และราคาถูก
- (4) เพื่อเป็นแนวทางในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางโครมาโทกราฟี

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- (1) ศึกษาวิธีการเตรียมโคโคซานจากเปลือกกุ้ง
- (2) ศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคโคโคซานให้มีรูปร่างเป็นทรงกลม
- (3) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคโคโคซานให้มีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-10 μm และมีสมบัติทางกายภาพและเคมีที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานทางโครมาโทกราฟี
- (4) ศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคทรงกลมของโคโคซานทางโครมาโทกราฟีที่เตรียมขึ้น
- (5) ศึกษาวิธีการบรรจุคอลัมน์ HPLC
- (6) ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้ทางทฤษฎีโครมาโทกราฟีโดยใช้สารมาตรฐาน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- (1) สามารถเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC
- (2) สามารถผลิตคอลัมน์ที่มีราคาถูกและใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ และเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย
- (3) เป็นแนวทางในการพัฒนาต่อไปในระดับการผลิตเชิงอุตสาหกรรม
- (4) สามารถนำโคโคซานที่เตรียมขึ้นได้ไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น เช่น ในทางด้านการเกษตร, การแพทย์ และสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ
- (5) เพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้ง

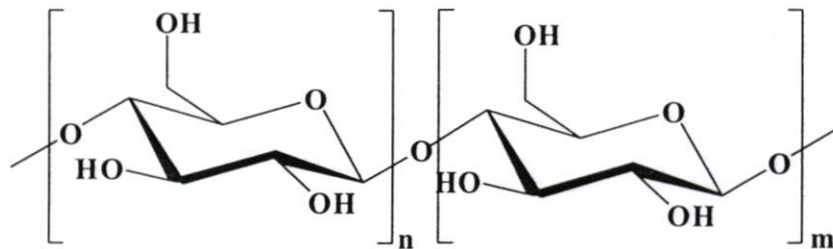
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

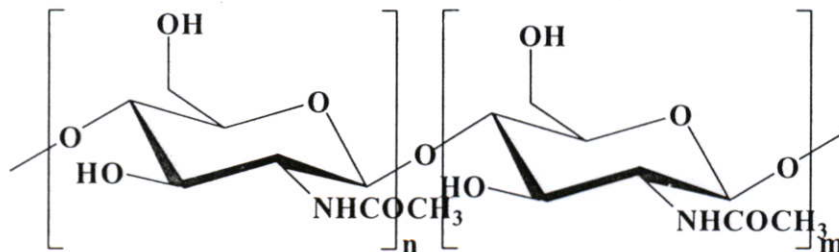
2.1 ไคตินและไคโตซาน

2.1.1 ไคติน (chitin)

มีชื่อทางเคมีว่า พอลิ[เบต้า-(1→4)-2-อะซิตามิโด-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคไพราโนส] ; poly[β-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] มีสูตรทั่วไป คือ $(C_8H_{13}NO_5)_n$ เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่พบในธรรมชาติมากเป็นอันดับที่สองรองจากเซลลูโลส (cellulose) โดยไคตินเป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส เพียงแต่หน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นไคตินนั้นต่างจากของเซลลูโลสที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็นหมู่อะซิตามิโด (NH-CO-CH₃) แทนที่จะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (OH) โดยเซลลูโลสจะประกอบด้วยหน่วยของ β-(1→4)-D-glucopyranose ส่วนไคตินนั้นประกอบด้วยหน่วยของ β-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose [2]



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเซลลูโลส



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไคติน

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ พบมากในสัตว์ที่มีเปลือก และ โครงสร้าง แข็งที่หุ้มร่างกายของสัตว์จำพวก กุ้ง ปู แคนหมึก แมลง ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเห็ด รา ยีสต์ และผนังเซลล์ของพืชบางชนิด ซึ่งมีหน้าที่ปกป้องและให้ความแข็งแรง ไคตินเป็นสาร โมเลกุล ยาวที่ไม่มีประจุ (non-electrolytic polymer) ซึ่งทำให้ไม่สามารถละลายในน้ำหรือสารละลายทั่วๆ ไป เช่น สารละลายอินทรีย์ได้ เป็นสารที่ไม่มีพิษ สามารถย่อยสลายได้เองทางชีวภาพ

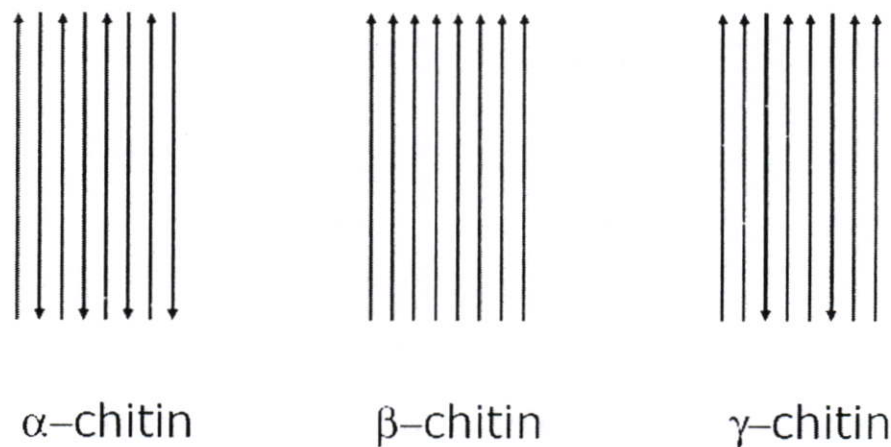
ตารางที่ 2.1 แหล่งและองค์ประกอบของไคตินในสิ่งมีชีวิต

ชนิด	ปริมาณไคติน		สารประกอบอื่นๆ	
	% ไคติน	Crystal type	สารอินทรีย์	สารอินทรีย์
Algae				
<i>Chlorophyceae</i> (cell wall)			-	cellulose
Arthropoda				
<i>Crustacea</i>	58.0 – 85.0	α	CaCO ₃	arthropodins 10–32%
<i>Diplopoda</i>	48.0 – 80.0	α	-	arthropodins 23–51%
<i>Insecta</i>	20.0 – 60.0	α	-	arthropodins 40–76%
<i>Arachnida Chilopoda</i>	20.0 – 60.0	α	-	arthropodins + resilin
Fungi				
<i>Ascomyceta</i> (cell wall)	Traces – 45		-	polysaccharides
<i>Basidiomyceta</i> (mycelia)				glucans or mannana
Mollusca				
<i>Polyplacophora</i>	12.0		CaCO ₃	proteins
<i>Gastropoda</i> (shell)	3.0 – 70.0		CaCO ₃	tanned proteins
<i>Cephalopoda</i>	3.5 – 26.0		CaCO ₃	
<i>Squid , Skeletalpen</i>	41.0	β β		

ไคตินในธรรมชาติที่พบจะมีโครงสร้างต่างกันออกไปโดยจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ สายของไคตินมีการจัดเรียงตัวได้หลายแบบซึ่งจะให้ความแข็งแรงที่ต่างกันไป เราสามารถจัดลักษณะโครงสร้างของไคตินในธรรมชาติออกได้ 3 ประเภท คือ [2]

- (1) อัลฟาไคติน (α -chitin) เป็นแบบที่เส้นใยจัดเรียงตัวกลับไปมา ซ้อนกัน เส้นใยเรียงตัวได้แน่น และมีความแข็งแรงสูงสุด
- (2) เบตาไคติน (β -chitin) เป็นแบบที่เส้นใยเรียงตัวในทิศทางเดียวกัน เส้นใยเรียงตัวได้ไม่แน่นมาก
- (3) แกมมาไคติน (γ -chitin) เป็นลักษณะผสมของ β และ γ เป็นแบบที่เส้นใยเรียงตัวไม่เป็นระเบียบไปในทิศทางเดียวกันบ้าง กลับทิศทางกันบ้าง

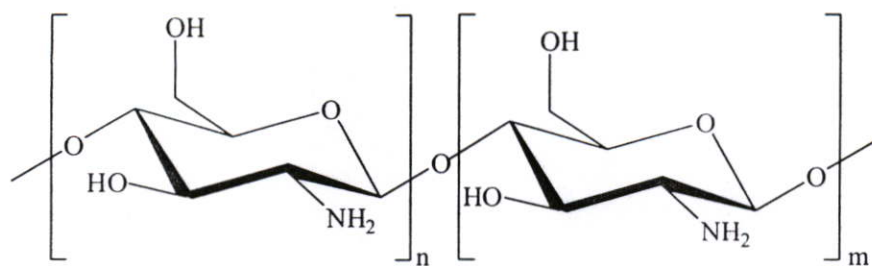
ประเภทโครงสร้างของไคตินส่วนใหญ่ที่เรานำมาใช้ได้แก่ แบบอัลฟาที่พบในเปลือกกุ้ง และปู ส่วนแบบเบตาจะพบในแกนในของปลาหมึก



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไคตินแบบต่างๆ

2.1.2 ไคโตซาน (Chitosan)

ไคโตซาน (chitosan) มีชื่อทางเคมีว่า พอลิ[เบต้า-(1→4)-2-อะมิโน-2-ดีออกซี-ดี-กลูโคไพราโนส] ; poly[β -(1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] มีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{11}NO_4)_n$ จัดเป็นอนุพันธ์ของไคตินซึ่งเกิดจากการกำจัดหมู่อะซิทิล (deacetylation) มีผลทำให้โครงสร้างทางเคมีของไคตินเปลี่ยนไป โดยในโมเลกุลของไคตินที่เป็น เอ็น-อะซิทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) จะถูกเปลี่ยนไปเป็น กลูโคซามีน (glucosamine) หรือหมู่อะซิตามิโด ($NH-CO-CH_3$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโนอิสระ (NH_2) ซึ่งจากการเกิดปฏิกิริยาทำให้บางที่ไคโตซานถูกเรียกว่า N-deacetylated chitin การกำจัดหมู่อะซิทิลในไคติน จะทำให้ไคโตซานมีส่วนของโมเลกุลที่แอคทีฟ และมีหมู่ที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาอยู่หลายหมู่ ได้แก่ หมู่อะมิโน ($-NH_2$) ตรงคาร์บอนตัวที่ 2 และหมู่แอลกอฮอล์ (CH_2OH) ตรงคาร์บอนตัวที่ 6 ในการที่ไคโตซานมีหมู่อะมิโนอิสระ (NH_2) จึงทำให้ไคโตซาน มีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นมากกว่าไคติน



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของไคโตซาน

2.2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคโตซาน [3]

2.2.1 ค่าองศาอะซิทธิเลชัน (Degree of Acetylation)

คุณลักษณะของไคโตซานถูกกำหนดไว้ด้วยค่าองศาอะซิทธิเลชัน (degree of acetylation ; DA) ซึ่งมีความสัมพันธ์เกี่ยวกับสัดส่วนจำนวนของหมู่ *N*-acetylamine หรือค่าองศาดีอะซิทธิเลชัน (degree of deacetylation ; DDA) ซึ่งมีความสัมพันธ์เกี่ยวกับสัดส่วนจำนวนของหมู่ *D*-glucosamine ในไคโตซาน ($DDA = 100 - DA$) โดยค่าองศาดีอะซิทธิเลชันของไคตินที่มีค่าสูงกว่า 70% ขึ้นไปจะถือว่าเป็นไคโตซาน

ในการเตรียมไคโตซานจากไคตินนั้นผลผลิตที่ได้จะอยู่ในรูปสายโซ่ที่มีหน่วยของไคติน และไคโตซานผสมกันอยู่สลับหน่วยปะปนกันไปเป็น โคพอลิเมอร์ ดังนั้นสารไคตินที่สกัดได้จากพวกเปลือกกุ้งหรือเปลือกปูก็จะมีหน่วยของไคโตซานปะปนอยู่จำนวนหนึ่ง ประมาณ 5% หรือในการนำไคตินมาผ่านกระบวนการเกิดปฏิกิริยาดีอะซิทธิเลชันซึ่งเป็นการเปลี่ยนหมู่อะเซทตาไมด์ให้เป็นให้เป็นหมู่อะมิโนเพื่อให้เกิดเป็นไคโตซาน ก็ไม่สามารถที่จะได้ไคโตซาน 100%

ค่าองศาอะซิทธิเลชัน (degree of acetylation) มีผลต่อสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ (molecular weight, viscosity, solubility, ฯลฯ) ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุด

2.2.2 น้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight)

ในการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ จะต้องหาในรูปค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจะมีผลต่อคุณสมบัติของไคโตซาน และมีความสำคัญอย่างมากต่อการนำไคโตซานไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่างๆ

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานมีหลายเทคนิค เช่น Size Exclusion Chromatography (SEC), Gel Permeation Chromatography (GPC) หรือ Gel Filtration Chromatography (GFC)

2.2.3 การละลาย (Solubility)

โคโคซานมีโครงสร้างที่แข็งแรงด้วยพันธะไฮโดรเจนอย่างหนาแน่นและเป็นระเบียบ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายไม่สามารถแทรกหรือแทรกเข้าไปเกิดพันธะกับสายโซ่โคโคซานได้น้อยมาก สมบัติในการละลายของโคโคซาน พบว่าสายโซ่ของโคโคซานไม่เกิดการละลายในสารละลายทั่วไป แต่จะละลายได้ดีในสารละลายกรดเจือจางหลายชนิดที่มีค่าพีเอชน้อยกว่า 6 ตัวทำละลายที่นิยมใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับโคโคซานคือ กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก เนื่องจากโคโคซานสามารถละลายได้ดีมากในสารละลายสองชนิดนี้ และสามารถละลายได้ในกรดชนิดอื่นๆ เช่น กรดแลกติก กรดซิตริก กรดทาตาร์ก กรดไฮโดรคลอริกเจือจาง แต่ไม่ละลายน้ำ กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) สารละลายด่างทั้งเจือจางและเข้มข้น แอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ

ตารางที่ 2.2 การละลายของโคโคซานในสารละลายกรดอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดของกรด	ความเข้มข้นของสารละลายกรด (w/w)				
	1%	5%	10%	50%	>50%
formic acid	+	+	+	+	+
acetic acid	+	+	+	+	
lactic acid	+	+	+		
citric acid	+	+	+		
tartaric acid	+	+	+		
malic acid	+	+	+		
oxalic acid	+	+	+		
hydrochloric acid	+				
adipic acid	+				
nitric acid	+				
malonic acid	+				
propionic acid	+				
pyruvic acid	+				
succinic acid	+				

หมายเหตุ + หมายถึงละลายได้

2.2.4 ความหนืด (Viscosity)

ความหนืดของไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การกำจัดหมู่อะซิทิล (degree of deacetylation) น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้นของความแรงไอออน (ionic strength) พีเอช และ อุณหภูมิ โดยความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ชนิดของกรดที่ใช้ และการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายพอลิเมอร์จะให้ผลความหนืดที่แตกต่างกัน เช่น ความหนืดของไคโตซานในกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายมีค่าพีเอชลดลง แต่ในขณะที่ความหนืดของไคโตซานในกรดไฮโดรคลอริกจะเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชของสารละลายเพิ่มขึ้น

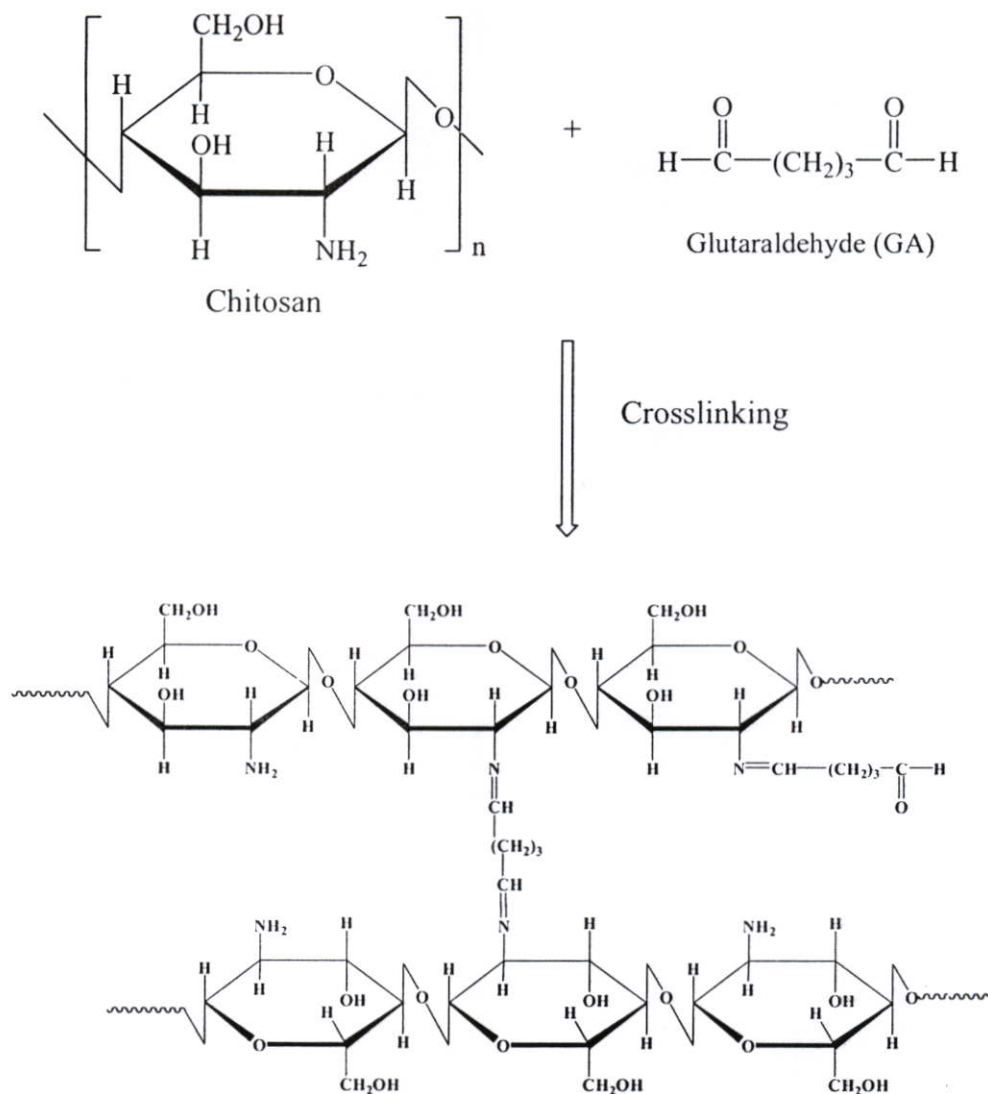
2.2.5 ไคโตซานเชื่อมโยง (Crosslinked Chitosan)

เพื่อหลีกเลี่ยงสมบัติการละลายของไคโตซานในสารละลายกรดบางชนิด กระบวนการเชื่อมโยงพันธะในสายโซ่พอลิเมอร์จึงถูกนำมาใช้กับไคโตซาน โดยกระบวนการเชื่อมโยงพันธะจะช่วยลดความจุของการดูดซับ (adsorption capacity) เนื่องจากการเกิดพันธะเคมีขึ้นที่บริเวณที่มีการดูดซับ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในการเชื่อมโยงพันธะไคโตซานหลังจากเกิดสารเชิงซ้อนกับโลหะไอออนในการเตรียมเจลไคโตซานที่สามารถดูดซับ จะไม่เกิดการละลายในสารละลาย

ในการเตรียมเชื่อมโยงพันธะของ poly(4-vinylpyridine) resin ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับโลหะไอออนที่ใช้เป็นแผ่นรองรับพบว่าไคโตซานเชื่อมโยงโลหะเชิงซ้อน (crosslinking metal-complex chitosan) ที่ได้จะมีความจุไม่สูง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับไคโตซาน แต่จะมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับโลหะไอออนที่ใช้เป็นแผ่นรองรับ

Glutaraldehyde crosslinking จะเกิดผ่าน Schiff's base reaction ที่บริเวณส่วนปลายที่เป็นอัลดีไฮด์ของสารเชื่อมโยงกับส่วนเอมีนของไคโตซาน เกิดเป็นหมู่อิมีน (imine function)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของไคโตซานเชื่อมโยง

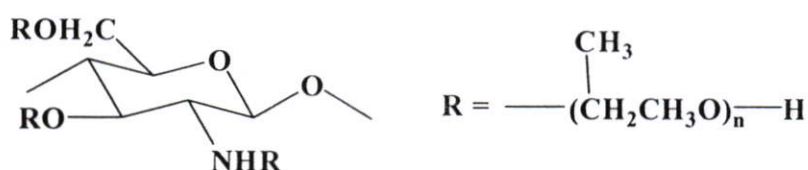
2.2.6 อนุพันธ์ไคโตซาน

จากโครงสร้างของไคติน - ไคโตซาน พบว่ามีอะตอมของไนโตรเจนอยู่ในรูปของหมู่อะเซทาไมด์และหมู่อะมิโน ดังนั้นหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญของไคติน - ไคโตซานมีอยู่ด้วยกัน 3 หมู่ คือ หมู่อะเซทาไมด์และหมู่อะมิโนที่ตำแหน่ง C-2 หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-3 (secondary alcohol) และตำแหน่ง C-6 (primary alcohol) เนื่องจากหมู่อะมิโนบนไคโตซานเป็นหมู่ที่มีความว่องไวสูงจึงได้รับความสนใจอย่างมากในการทำอนุพันธ์ ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับอนุพันธ์ของไคโตซานในรูปแบบต่างๆ อยู่เสมอ

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ทางชีวภาพที่มีมวลโมเลกุลสูง โครงสร้างมีหน่วยย่อยกลูโคซามีนบนสายที่ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่เป็นหมู่อะมิโน และหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถ

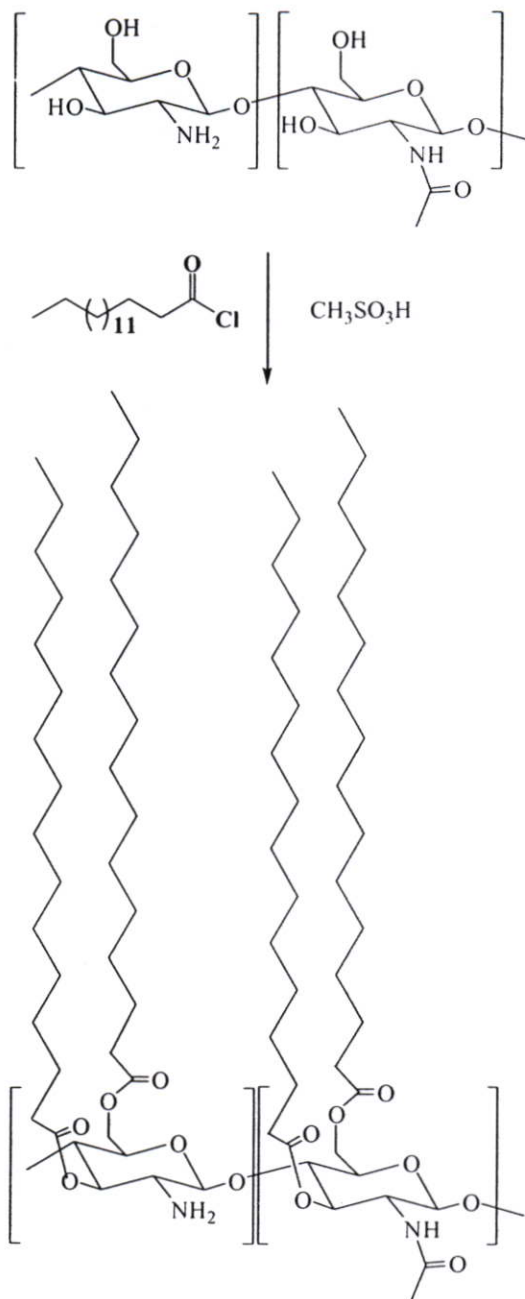
เกิดปฏิกิริยาได้หลายลักษณะ ทำให้สามารถทำการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานได้โดยการทำปฏิกิริยาที่หมู่ฟังก์ชันดังกล่าวบนสายไคโตซาน

Yanfei Peng และคณะ (2005) [4] ได้เตรียม hydroxypropyl chitosan (HPCS) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ โดยอนุพันธ์จะเตรียมที่ค่าองศาของการแทนที่และน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ซึ่งทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโตซานด้วย propylene epoxide ภายใต้สภาวะพื้นฐาน จากนั้นทำการหาคุณลักษณะของอนุพันธ์ที่ได้ด้วยเทคนิค IR spectroscopy, NMR spectroscopy และ elemental analysis โดยหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-6, C-3 และหมู่อะมิโนของไคโตซานเกิดการแทนที่ด้วยหมู่อัลคิล จากนั้นนำอนุพันธ์ที่ได้มาศึกษาผลที่เกิดกับแบคทีเรียพบว่าไม่มีผลในการต่อต้านแบคทีเรีย แต่จะมีผลต่อต้านกับเห็ดรา จากการศึกษาสรุปว่าอนุพันธ์ที่มีค่าองศาการแทนที่น้อยและมีน้ำหนักโมเลกุลมากจะมีผลกระทบต่อการทำงานของเห็ดรา



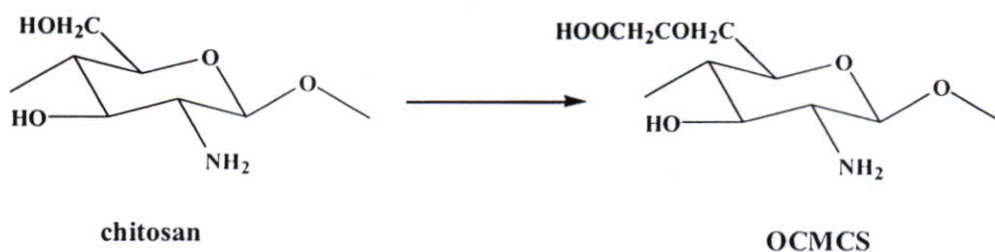
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ hydroxypropyl chitosan (HPCS)

Yuejin Tong และคณะ (2005) [5] ได้เตรียมอนุพันธ์ *O,O'*-dipalmitoyl chitosan (DPCT) โดยการเลือก protection หมู่อะมิโนไว้ด้วย MeSO₃H ทำให้ได้อนุพันธ์ไคโตซานที่ชอบน้ำ และสามารถละลายได้กับคอลเลสเตอรอล จากนั้นเข้าเชื่อมโยงไคโตซานที่หมู่อะมิโนที่ถูกกันไว้ก่อนหน้านี้ด้วยกลูทารัลดีไฮด์ แล้วทำการศึกษาพฤติกรรมการดูดซึมคอลเลสเตอรอล ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ DPCT มีประสิทธิภาพในการดูดซึมคอลเลสเตอรอลทั้งในตัวอย่างที่มีไขมันและไม่ไขมัน



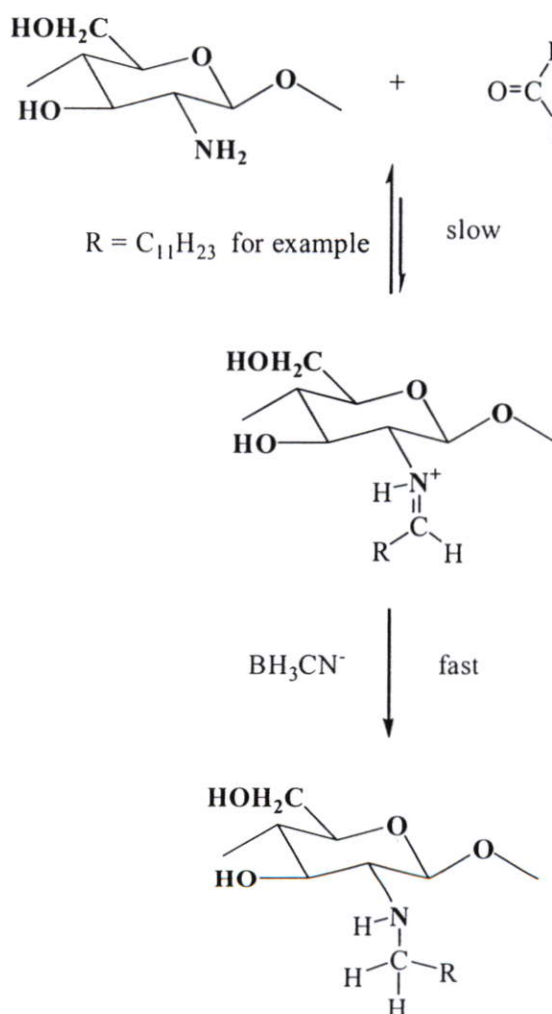
รูปที่ 2.7 การเตรียมอนุพันธ์ *O,O'*-dipalmitoyl chitosan (DPCT)

Aiping Zhu และคณะ (2005) [6] ได้ทำการเตรียม O-Carboxymethylchitosan (OCMCS) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานที่มีความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับค่าองศาของการเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเมทิลเลชัน OCMCS สังเคราะห์ขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของไคโตซาน กับ โมโนคลอโรอะซิติก เมื่อ OCMCS ละลายในน้ำจะได้สารละลายที่เป็นกลาง และ OCMCS มีพฤติกรรมเป็นพอลิอิเล็กโทรไลต์อ่อน (weak polyanionic polyelectrolyte) เนื่องจากอนุพันธ์นี้ไม่เกิดการแตกตัวในสารละลายที่เป็นกลาง



รูปที่ 2.8 อนุพันธ์ *O*-Carboxymethylchitosan (OCMCS)

J. Desbrieres และคณะ (1996) [7] ได้เตรียมอนุพันธ์ของไคโตซานโดยการแทนที่ด้วยสายโซ่อัลคิลบนโครงสร้างไคโตซานที่ตำแหน่ง C-6 ทำให้แสดงสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ โครงสร้างทางเคมีที่เกิดขึ้นพิสูจน์ได้ด้วยเทคนิค NMR spectroscopy และทำการศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อพฤติกรรม rheological เช่น ศึกษาธรรมชาติของพฤติกรรมของโซ่ไฮโดรโฟบิก ค่าองศาการแทนที่ ความเข้มข้น อุณหภูมิ และค่าไอออนิกในสารละลายพอลิเมอร์



รูปที่ 2.9 การเตรียมอนุพันธ์ Hydrophobic ของไคโตซาน

2.3 การเตรียมไคติน – ไคโตซาน [2]

2.3.1 การเตรียมไคติน

วัตถุดิบที่เป็นแหล่งสำคัญที่ใช้ในการผลิตไคติน ได้แก่ เปลือกกุ้ง และเปลือกปูที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง ในการผลิตไคตินจากสัตว์ทะเลประเภทกุ้ง และปู มีส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่

- ไคติน (20 – 30%)
- โปรตีน (30 – 40%)
- แคลเซียมคาร์บอเนต (30 – 50%)
- แมกนีเซียมและฟอสฟอรัส (1 – 2%)
- สารอื่นๆ ปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ สารรงควัตถุ เช่น คาโรทีนอยด์ (สีส้ม) และไขมัน

การเตรียมไคตินสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

- 1) ขั้นตอนการแยกโปรตีน (deproteinization)
- 2) ขั้นตอนการแยกแคลเซียมคาร์บอเนต (demineralization)
- 3) ขั้นตอนการแยกรงควัตถุ (decoloration)

1) การแยกโปรตีน

สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

(1) การสกัดแยกโปรตีนโดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ทำการต้มเปลือกกุ้งกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 – 10% ที่อุณหภูมิประมาณ 65 – 100 °C เป็นเวลาประมาณ ½ - 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายต่าง และอุณหภูมิที่ใช้ หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอชเป็นกลาง แล้วนำสารที่ได้ไปตากแห้ง

(2) การสกัดแยกโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน

แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ *Pseudomonas maltophilia* ซึ่งในการใช้เอนไซม์โปรติเอส เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ในการแยกสกัดโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง และในการสกัดแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการหลีกเลี่ยงสภาวะที่ใช้ด่างเข้มข้นมากในการสกัด แต่ในการสกัดโปรตีนด้วยวิธีนี้อาจจะไม่สามารถสกัดโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งได้ทั้งหมด และใช้เวลาานมากกว่า 1 วัน ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเอนไซม์ การสกัดแยกโปรตีนสามารถทำได้โดยใส่เปลือกกุ้งที่ต้องการแยกโปรตีนลงในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยระหว่างที่แบคทีเรียเจริญจะปล่อยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนออกมา ซึ่งก็คือเอนไซม์โปรติเอสที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน

สารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย ไคโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม และเปลือกกุ้งแห้ง 8 กรัม ปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C เพื่อฆ่าเชื้อเป็นเวลา 15 นาที และทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียลงไป และทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C เช้าตลอดเวลาเป็นเวลา 1 – 4 วัน จากนั้นทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง ตากให้แห้ง

2) การสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนต

การแยกแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

(1) การสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนตโดยใช้สารละลายกรด

ในการสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนตด้วยสารละลายกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดไนตริก กรดอะซิติก โดยทั่วไปส่วนใหญ่จะนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริก ซึ่งเปลี่ยนแคลเซียมคาร์บอเนตให้อยู่ในรูปแคลเซียมคลอไรด์ที่สามารถละลายน้ำได้

(2) การสกัดแยกแคลเซียมคาร์บอเนตโดยใช้สารละลาย EDTA

สารละลาย EDTA จะเกิดเป็นแคลเซียมที่ละลายน้ำได้ แต่ในการสกัดด้วยวิธีนี้ไม่สามารถที่จะกำจัดสารประกอบอินทรีย์ออกจากเปลือกกุ้งได้ทั้งหมด

3) การสกัดแยกรงควัตถุ

รงควัตถุส่วนใหญ่ที่มีในเปลือกกุ้งส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกคาโรทีนอยด์ เช่น แอสทาซีน แอสทาแซนทีน และเบต้าคาโรทีน ซึ่งสามารถสกัดออกได้โดยการล้างเอทานอล หรืออะซิโตน

2.3.2 การเตรียมไคโตซาน

ไคโตซานได้จากการทำปฏิกิริยาไคตินในสถานะที่เป็นด่างเข้มข้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาคีอะซีทีเลชัน ทำให้หมู่อะซีตามิไนด์ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) ของไคตินถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโน

การทำปฏิกิริยาคีอะซีทีเลชันแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

1) การทำปฏิกิริยาคีอะซีทีเลชันของไคตินกับด่างที่หลอมละลาย (Alkali fusion)

วิธีนี้เป็นการทำปฏิกิริยาคีอะซีทีเลชันในสถานะที่รุนแรง โดยการหลอมละลายกับด่างที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นการหลอมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 180°C ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน แม้ว่าวิธีนี้จะทำให้ไคโตซานได้ค่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดคีอะซีทีเลชันสูงถึง 95% แต่ผลจากภาวะที่รุนแรงในการเกิดปฏิกิริยาคีอะซีทีเลชันทำให้ได้ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ

2) การทำปฏิกิริยาคีโอะซิทีเลชันของไคตินในสารละลายต่าง

สารละลายต่างที่นิยมใช้ในการสกัดโคโคซานคือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่ก็มีการใช้สารละลายต่างชนิดอื่นด้วย เช่น โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ลิเทียมไฮดรอกไซด์ และ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยค่าเปอร์เซ็นต์ของการเกิดคีโอะซิทีเลชันที่ได้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายต่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา สภาพต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เช่น

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 150°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% โดยน้ำหนัก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40% โดยน้ำหนัก ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.4 การประยุกต์ใช้โคโคซาน [8,9]

2.4.1 ด้านอาหาร

เนื่องจากโคโคซานเป็นเส้นใยธรรมชาติที่ได้จากสัตว์ เป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีมีรสหวาน ไม่ละลายน้ำ ไม่ย่อยในกระเพาะอาหาร ไม่ให้พลังงาน อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการดักจับไขมันและคอเลสเตอรอล มีประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อโรกระบบทางเดินอาหารได้ จึงมีการนำโคโคซานมาประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ลดความอ้วน, ใช้เป็นสารเสริมเส้นใยธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้ง เช่น มั๊กกะโรนี ก๋วยเตี๋ยว บะหมี่สำเร็จรูป อีกทั้งยังใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียวให้กับผลิตภัณฑ์แปรรูปจากเนื้อสัตว์ เช่น ลูกชิ้น ไส้กรอก และยังใช้ถนอมอาหารปรุงแต่งอาหารคงรูปและสีเพื่อยืดอายุอาหาร โดยใช้เคลือบเป็นฟิล์มบางๆ เนื่องจากมีประจุบวกจึงมีคุณสมบัติต้านแบคทีเรียและรา

2.4.2 ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

โคโคซานเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านจากร่างกาย ไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ สามารถสลายตัวได้ทางชีวภาพ ป้องกันการติดเชื้อโรคบางชนิดได้ และยังสามารถเสริมการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดที่มีประโยชน์ต่อคน จึงได้มีการนำโคโคซานมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้รักษาโรคเหงือกและฟัน, ใช้เป็นพลาสติกปิดแผล, ใช้รักษาและเสริมสร้างสุขภาพของกระดูกอ่อน, ใช้เป็นเส้นเลือดเทียม, ใช้เป็นสารหล่อลื่นในเยื่อปาก, ใช้เป็นไหมเย็บแผล, ใช้เป็นตัวช่วยป้องกันการเกิดคราบจุลินทรีย์ที่ฟัน และใช้รักษาผิวเป็นผิวหนังเทียม เป็นต้น

สำหรับด้านเภสัชกรรมโคโคซานถูกนำมาประยุกต์ใช้ในระบบการขนส่งยาและควบคุมการปลดปล่อยยา โดยสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้จากการกระตุ้นภายนอก เช่น ค่า pH อุณหภูมิ เอนไซม์ และแสง เพื่อให้สามารถรักษาโรคได้โดยตรงและเฉพาะที่

2.4.3 ด้านเครื่องสำอางค์

เนื่องจากโคโคซานมีคุณสมบัติการอุ้มน้ำ และต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์จึงถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งให้ความชุ่มชื้น ทำให้มีความหอมติดทนนาน เนื้อของเครื่องสำอางค์ละเอียดเนียนปราศจากการแยกชั้น ดังนั้นจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารพื้นฐานของเครื่องสำอางค์หลายประเภท เช่น แป้งแต่งหน้า น้ำหอม ผงขัดเล็บ ครีม โลชั่นบำรุงผิว ผสมในแชมพูใช้บำรุงเส้นผม ยาสีฟัน และเจลล้างหน้า เป็นต้น

2.4.4 ด้านสิ่งแวดล้อม

โคโคซานมีความหลากหลายโดดเด่นในทางเคมีโดยเฉพาะประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีประจุลบ และสามารถดูดซับไอออนของโลหะหนักได้ ทำให้มีการนำโคโคซานมาประยุกต์ใช้ในระบบบำบัดน้ำเสีย ใช้จับกับอะตอมของโลหะหนัก เช่น พรอท แคลเมียม ตะกั่ว ด้วยพันธะเชิงซ้อน ใช้ในการตกตะกอนสารประเภทโปรตีน สีย้อมผ้า กรดอะมิโน และใช้เป็นตัวกรองแทนกระดาษกรอง อีกทั้งยังมีการนำโคโคซานไปจับกับสารกัมมันตรังสี พลูโตเนียม และยูเรเนียมด้วย

2.4.5 ด้านอุตสาหกรรมกระดาษและสิ่งทอ

ในอุตสาหกรรมกระดาษมีการนำโคโคซานไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษเพื่อเสริมสร้างคุณสมบัติทางกายภาพของกระดาษ เช่น ทำให้กระดาษเหนียวแน่นขึ้น แข็งแรงขึ้น ทนทานต่อการฉีกขาด หรือใช้ในการผลิตกระดาษที่ใช้ในการซับหมึก นอกจากนี้ยังใช้เป็นฟิล์มเคลือบกระดาษเพื่อยืดอายุการใช้งานในการเก็บเอกสารสำคัญ

นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำเอาโคโคซานมาผสมในเส้นใยเพื่อพัฒนาเสื้อผ้า และสิ่งทอที่สามารถป้องกันและต้านทานเชื้อโรคได้ ใช้ในการผลิตผ้าที่สามารถต้านทานเชื้อรา แบคทีเรีย หรือใช้เคลือบเส้นใยผ้าเพื่อลดกลิ่นต่างๆ ได้ เช่น กลิ่นเหงื่อ กลิ่นอับชื้น อีกทั้งใช้ในการผลิตผ้าที่ย้อมสีติดทนนาน

2.4.6 ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

โคโคซานสามารถนำมาขึ้นรูปได้หลายรูปแบบ ทำให้โคโคซานถูกนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นเยื่อบางเพื่อใช้ในการกรองแยกด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น โคอะไลซิส อัลตราฟิลเตรชัน นาโนฟิลเตรชัน และรีเวอร์ออสโมซิส ฯลฯ ใช้เป็นสารห่อหุ้มเอนไซม์ และเซลล์ด้วยเทคนิคอิมโมบิไลเซชัน (Immobilization) ใช้ทำขั้วไฟฟ้าทางชีวภาพ เพื่อวิเคราะห์และตรวจสอบสารต่างๆ ใช้ขึ้นรูปจุลินทรีย์เป็นเม็ด สำหรับกำจัดน้ำเสีย ใช้เป็นตัวแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีหรือใช้เป็นสารช่วยทำปฏิกิริยาในการเคลือบผิวแผ่นพอลิเอสเตอร์ด้วยโลหะในการผลิตวัสดุป้องกันคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า

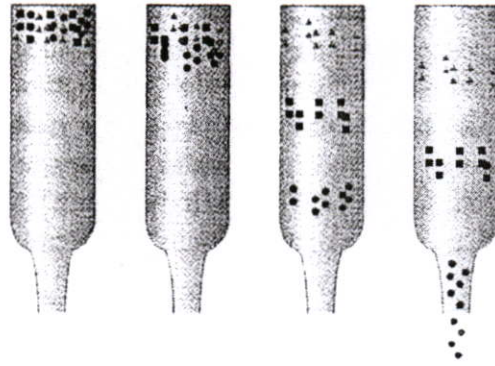
2.5 โครมาโทกราฟี (Chromatography) [10,11]

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร (Separation) ตัวอย่างซึ่งมีส่วนประกอบหลายๆ ชนิด โดยอาศัยอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (ขึ้นอยู่กับความสามารถในการกระจายตัวของสารแต่ละชนิด) ระหว่างเฟส 2 เฟส โดยเฟสหนึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ และอีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไหลผ่านไปบนเฟสอยู่กับที่ สารที่ต้องการแยกจะมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และมีความสามารถในการดูดซับบนตัวดูดซับได้ต่างกัน โดยสารที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับได้น้อย สารนั้นจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ส่วนสารที่มีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดี สารนั้นจะเคลื่อนที่ได้ช้า จึงทำให้อัตราการเคลื่อนที่ (อัตราการกระจายตัว) ของสารแต่ละตัวแตกต่างกัน

2.5.1 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

ทฤษฎีโครมาโทกราฟีอธิบายถึงพื้นฐานของสมการที่จะนำไปสู่การอธิบายถึงสมดุลการแจกแจงของสารตัวอย่างที่กระจายอยู่ระหว่างเฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่, เวลาการคงไว้ (Retention time), ปริมาตรการคงไว้ (Retention volume), การคงไว้สัมพัทธ์ (Relative retention), แฟกเตอร์ความจุ (Capacity factor), แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (Intermolecular force) ที่มีผลต่อการคงไว้

กระบวนการแยกสารตามทฤษฎีโครมาโทกราฟี ชั้นแรก โมเลกุลของสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะถูกผ่านไปในคอลัมน์ และจะเกิดการแบ่งละลาย (partition) ระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ เมื่อผ่านตัวชะ (eluent) ซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ลงไปคอลัมน์อีก จะทำหน้าที่ชะสารตัวอย่างออกจากจุดเริ่มต้นให้เคลื่อนที่ไปด้วยอัตราเร็วต่างๆ กัน โดยจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลาย หรือสัมพรรคภาพ (affinity) ของสารที่มีต่อตัวชะ สารที่ละลายได้ดีในตัวชะ สารที่ละลายได้ดีในตัวชะก็จะเคลื่อนที่ไปพร้อมกับตัวชะเร็ว ส่วนสารที่มีสัมพรรคภาพต่อเฟสอยู่กับที่ก็จะถูกยึดไว้ให้ติดกับที่ หรือเคลื่อนที่ช้าทำให้สามารถแยกสารตัวอย่างออกจากกันได้



รูปที่ 2.10 หลักการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

การแยกสารตัวอย่างที่เกิดขึ้นภายในคอลัมน์ โดยคอลัมน์บรรจุเฟสอยู่กับที่ที่เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ เกาะยึดติดอยู่ที่ผิวของ โซลิดซัพพอร์ต กระบวนการแยกสารขั้นแรกจะทำการผ่านเฟสเคลื่อนที่ตรงส่วนบนของคอลัมน์โดยให้เฟสอยู่กับที่แทนด้วย S และเฟสเคลื่อนที่แทนด้วย M เมื่อนำสารตัวอย่างซึ่งประกอบด้วยสาร X และ Y ที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ใส่ลงในคอลัมน์ ทั้งสาร X และ Y จะเกิดการกระจายตัวระหว่างเฟสทั้งสองเฟส ซึ่งการกระจายตัวขึ้นจะอยู่กับความสามารถในการละลายของสาร X และ Y ในเฟสสองเฟส การกระจายของสาร X และ Y จะเกิดอย่างรวดเร็วระหว่างสองเฟสจนเกิดสมดุลพลวัต (dynamic equilibrium) จะได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสแต่ละเฟส เป็นไปตามกฎของการแจกแจงดังนี้

$$X_M = X_S$$

$$K_X = \frac{[X_S]}{[X_M]} \quad \dots\dots\dots(2.1)$$

เมื่อ

X_M แทนการกระจายของสาร X ที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

X_S แทนการกระจายของสาร X ที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

K_X แทนค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution coefficient)

ในทำนองเดียวกันสามารถเขียนค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงของสาร Y ได้ดังนี้

$$Y_M = Y_S$$

$$K_Y = \frac{[Y_S]}{[Y_M]} \quad \dots\dots\dots(2.2)$$

เมื่อ

Y_M แทนการกระจายของสาร Y ที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

Y_S แทนการกระจายของสาร Y ที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

K_Y แทนค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution coefficient)

โดยทั่วไป K_X จะไม่เท่ากับค่า K_Y ในที่นี้จะสมมติว่า $K_Y > K_X$ จะได้สัดส่วนของโมเลกุล Y จะติดอยู่กับเฟสอยู่กับที่มากกว่าโมเลกุล X ทำให้เราสามารถแยกสาร X ออกจากสาร Y ได้ ถ้า K_X และ K_Y มีค่าใกล้เคียงกัน การแยกสาร X และ Y ก็จะไม่ได้ออกผล

ถ้าให้ U เป็นอัตราส่วนของโมเลกุลของสารละลายตัวอย่าง (U_X หรือ U_Y) เมื่อผ่านคอลัมน์ จะได้ว่า

$$U_X = U_M R_X \quad \dots\dots\dots(2.3)$$

เมื่อ

U_M แทนอัตราเร็วเฉลี่ยของเฟสเคลื่อนที่

R_X แทนสัดส่วนโมลของโมเลกุลของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่

$$R_X = \frac{(n_X)_M}{(n_X)_M + (n_X)_S} \quad \dots\dots\dots(2.4)$$

เมื่อ

$(n_X)_M$ แทนจำนวนโมลของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่

$(n_X)_S$ แทนจำนวนโมลของสาร X ในเฟสอยู่กับที่

2.5.1.1 สมการคงไว้ (The retention equations)

สารละลายตัวอย่างเมื่อถูกฉีดเข้าไปในอินเจกเตอร์ สารละลายดังกล่าวจะไหลผ่านเข้าไปในคอลัมน์แล้วผ่านยังเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) ปริมาณของสารละลายตัวอย่างที่ถูกตรวจวัดจะถูกบันทึกโดยเครื่องบันทึกผล (recorder) หรือเครื่องประมวลผล (integrator) จะแสดงผลเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ในลักษณะพิกซึ่งสามารถนำไปประเมินผลคุณภาพและปริมาณได้

ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาการคงไว้ (retention time) กับค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจงโดยอาศัยสมการที่ 2.4 จะได้ว่า

$$R_X = \frac{1}{1 + \frac{(n_X)_S}{(n_X)_M}} \quad \dots\dots\dots(2.5)$$

จะได้

$$R_X = \frac{1}{1 + k'} \quad \dots\dots\dots(2.6)$$

อัตราส่วน $\frac{(n_X)_S}{(n_X)_M}$ จะเรียกว่า แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor) เราจะเห็นความแตกต่างระหว่างค่า k' (เป็นอัตราส่วนของปริมาณ, a ratio of amounts) กับค่า K (เป็นอัตราส่วนของความเข้มข้น, a ratio of concentrations)

เมื่อแทนสมการที่ 2.6 ลงไปในสมการที่ 2.3 จะได้

$$U_X = U_M \frac{(1)}{1 + k'} \quad \dots\dots\dots(2.7)$$

ให้ความยาวของคอลัมน์แทนด้วย L เราสามารถหาได้ว่าจะต้องใช้เวลานานเท่าใดเพื่อจะให้สาร X ผ่านออกจากคอลัมน์

$$\text{เวลา} = \text{ระยะทาง/อัตราเร็ว}$$

จะได้

$$\frac{L}{U_X} = \frac{(1+k')L}{U_M} \quad \dots\dots\dots(2.8)$$

หรือ

$$t_R = t_M(1+k') \quad \dots\dots\dots(2.9)$$

เมื่อ t_M เป็นเวลาการคงไว้ของโมเลกุลของสาร X ก็คือ เวลาที่ต้องการใช้ในการนำโมเลกุลของสาร X เคลื่อนผ่านไปตามความยาวของคอลัมน์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งโมเลกุลของสาร X เคลื่อนที่ออกจากปลายอีกด้านหนึ่งของคอลัมน์ และ t_M เป็นเวลาที่ต้องใช้ในการให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านออกจากปลายอีกด้านหนึ่งของคอลัมน์

ถ้าความเข้มข้นแทนด้วยหน่วยโมลต่อปริมาตร จะได้ว่า $(n_X)_S = [X]_S V_S$ และ $(n_X)_M = [X]_M V_M$ โดยที่ V_S และ V_M เป็นปริมาตรของเฟสอยู่กับที่ และปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ตามลำดับ

เนื่องจาก $k' = \frac{(n_X)_S}{(n_X)_M} = \frac{[X]_S V_S}{[X]_M V_M}$
จะได้

$$k' = \frac{K_X V_S}{V_M} \quad \dots\dots\dots(2.10)$$

อัตราส่วนของ V_S ต่อ V_M เรียกว่าอัตราส่วนของเฟส (phase ratio) ได้จากนำสมการที่ 2.10 แทนลงในสมการที่ 2.9 จะได้

$$t_R = t_M \left(1 + \frac{K V_S}{V_M}\right) \quad \dots\dots\dots(2.11)$$

เมื่อทราบเวลาการคงไว้ (t_R) ของโมเลกุล X ย่อมสามารถที่จะคำนวณหาปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการพาโมเลกุลของสาร X ผ่านออกจากเฟสอยู่กับที่ได้ทั้งหมด เรียกปริมาตรดังกล่าวว่า ปริมาตรการคงไว้ (retention volume, V_R) หาได้จาก

$$V_R = t_R F \quad \dots\dots\dots(2.12)$$

เมื่อ F เป็นอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (the volume flow rate of the mobile phase) ในทำนองเดียวกัน V_M เป็นปริมาตรทั้งหมด (total volume) ของเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์

$$V_M = t_M F \quad \dots\dots\dots(2.13)$$

บางครั้งที่เราเรียกว่า V_M เป็นปริมาตรตาย (dead volume) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการมีช่องว่างในคอลัมน์ที่ไม่ถูกครอบครองด้วยเฟสอยู่กับที่ แต่จะถูกครอบครองด้วยเฟสเคลื่อนที่ เมื่อแทน V_S และ V_M ลงในสมการที่ 2.11 จะได้

$$V_R = V_M \left(1 + \frac{K_X V_S}{V_M}\right) \quad \dots\dots\dots(2.14)$$

$$V_R = V_M + K_X V_S \quad \dots\dots\dots(2.15)$$

สมการที่ 2.9 และสมการที่ 2.11 จัดเป็นสมการพื้นฐานของการคงไว้ (the fundamental retention equation) ที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับโครมาโทกราฟีทุกชนิด

เมื่อแทน $t_M = L/U_M$ ลงในสมการที่ 2.9 และสมการที่ 2.11 จะได้

$$t_R = \frac{L(1+k')}{U_M} = \frac{L(1+K \frac{V_S}{V_M})}{U_M} \quad \dots\dots\dots(2.16)$$

จากสมการที่ 2.16 จะเห็นได้ว่า t_R นั้นหาได้จากค่า t_M และ k' โดยที่ t_M นั้นจะมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

(1) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความยาวของคอลัมน์ ดังนั้นถ้าเพิ่มความยาวของคอลัมน์เป็นสองเท่าจากเดิม จะทำให้ t_R เพิ่มขึ้นจากเดิมสองเท่าด้วย

(2) เป็นสัดส่วนกลับกับอัตราการไหล F ดังนั้นถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะทำให้ t_R ลดลงครึ่งหนึ่งอันเนื่องมาจาก $t_R \propto 1/U_M$

(3) ผลของการลดลงของความดัน (pressure drop) ระหว่างความดันด้านเข้าคอลัมน์ (column inlet) และความดันด้านออกของคอลัมน์ (column outlet) จะมีผลทางอ้อมต่อ t_M สำหรับค่า k' นั้นจะมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

(1) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง, K

(2) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเฟสที่อยู่กับที่ในคอลัมน์, V_S

(3) เป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของเฟสที่เคลื่อนที่ในคอลัมน์, V_M

(4) เป็นฟังก์ชันอณูหภูมิของคอลัมน์

2.5.1.2 การคงไว้สัมพัทธ์ (Relative retention)

โดยทั่วไปของเทคนิคโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพนั้น เราอาศัยการเปรียบเทียบเวลาการคงไว้ หรือปริมาตรการคงไว้ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานในสภาวะการทดลองเดียวกัน ค่าที่ใช้เปรียบเทียบดังกล่าวจะเรียกว่า การคงไว้สัมพัทธ์ (α)

$$\begin{aligned} \alpha &= \frac{t'_R}{t'_{R_{std}}} = \frac{V'_R}{V'_{R_{std}}} \\ &= \frac{(t_R - t_M)F}{(t_{R_{std}} - t_M)F} \\ &= \frac{(V_R - V_M)F}{(V_{R_{std}} - V_M)F} \end{aligned}$$

$$\alpha = \frac{K_D}{K_{D_{std}}} \dots\dots\dots(2.17)$$

เมื่อ

- t'_R เป็นเวลาการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารตัวอย่าง
- $t'_{R_{std}}$ เป็นเวลาการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารมาตรฐาน
- V'_R เป็นปริมาตรการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารตัวอย่าง
- $V'_{R_{std}}$ เป็นปริมาตรการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารมาตรฐาน
- K_D เป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการแจกแจงของสารตัวอย่าง
- $K_{D_{std}}$ เป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการแจกแจงของสารมาตรฐาน

การใช้ค่าการคงไว้สัมพัทธ์ในการเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เนื่องจากในการวัดเวลาการคงไว้และปริมาตรการคงไว้เพื่อใช้ในการพิสูจน์หรือจำแนกชนิดของส่วนประกอบต่างๆ ที่ถูกแยกออกมาด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีนั้นมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากเวลาการคงไว้และปริมาตรการคงไว้ไม่ใช่ลักษณะพิเศษจำเพาะของส่วนประกอบ แต่เป็นค่าที่ได้จากการทดลองของคอลัมน์หนึ่งๆ เท่านั้น ดังนั้นไม่เหมาะที่จะใช้ค่าการคงไว้ใน การวิเคราะห์ทางคุณภาพหรือใช้จำแนกสารต่างๆ แต่จะนำค่าการคงไว้สัมพัทธ์หรือเรียกว่า แฟกเตอร์ของการแยก (separation factor) มาใช้แทน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสำหรับการวิเคราะห์ทางเชิงคุณภาพ

2.5.1.3 แฟกเตอร์ที่มีผลต่อการคงไว้ (Factors affecting retention)

เมื่อ โมเลกุลของสารตัวอย่างอยู่ในคอลัมน์จะเกิดสมดุลของการกระจายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ จะเห็นได้ว่าการคงไว้จะถูกควบคุมจากผลของการกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง, ส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่, ธรรมชาติของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิ สำหรับความดันนั้นตามทฤษฎีจะมีผลต่อการกระจาย (distribution) ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี สำหรับในเทคนิคของเหลว-ของเหลวโครมาโทกราฟีความดันจะไม่มีผลต่อการกระจาย แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการคงไว้ของสาร เพื่อให้เข้าใจถึงแฟกเตอร์ที่มีผลต่อการคงไว้ จะต้องเข้าใจถึงแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (intermolecular force) ซึ่งเป็นแรงทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) ที่เป็นไปตามกฎของคูลอมบ์ (coulomb law) ได้แก่

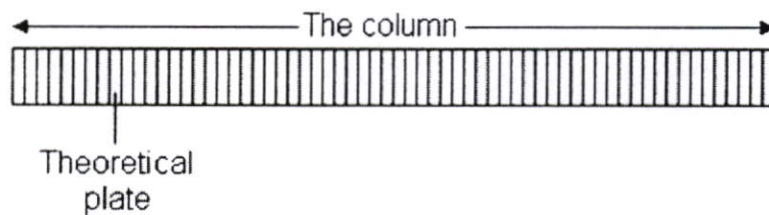
- (1) แรงคูลอมบ์ระหว่างไอออน (coulombic force between ions)
- (2) แรงไดโพล-ไดโพล (dipole-dipole interaction)
- (3) แรงไดโพล-ไดโพลเหนี่ยวนำ (dipole-induced dipole interaction)
- (4) แรงระหว่างอะตอมที่เป็นกลางกับโมเลกุล (dispersion forces)

(5) แรงไอออน-ไดโพลเหนี่ยวนำ (ion-induced dipole interaction)

(6) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding interaction)

2.5.1.4 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Column efficiency)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะขึ้นอยู่กับจำนวนเพลทที่อยู่ในคอลัมน์ จำนวนเพลทนั้นให้นึกถึงการกลั่นแบบลำดับส่วน (fractional distillation) เมื่อของเหลวได้รับความร้อนจะกลายเป็นไอ และอัตราการควบแน่นเกิดขึ้นซ้ำๆ กันหลายๆ ครั้งในหอกลั่น (fractionating column) การแยกสารออกจากกันภายในคอลัมน์ประกอบด้วยชั้น (layer) บางๆ แคบๆ เรียกว่าเพลททางทฤษฎี (theoretical plates) และสมมติให้แต่ละเพลทเกิดสมดุลของโมเลกุลของสารละลาย ตัวอย่างในเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารละลายตัวอย่างในเฟสเคลื่อนที่ให้ถือว่าเคลื่อนที่ไปเป็นขั้นๆ ต่อเนื่องกันไปจากเพลทหนึ่งไปยังอีกเพลทหนึ่ง เมื่อสมดุลที่เกิดขึ้นระหว่างเพลทมากขึ้นการแยกสารภายในคอลัมน์จะเกิดขึ้นได้มาก นั่นคือจะมีจำนวนเพลททางทฤษฎีเพิ่มขึ้น

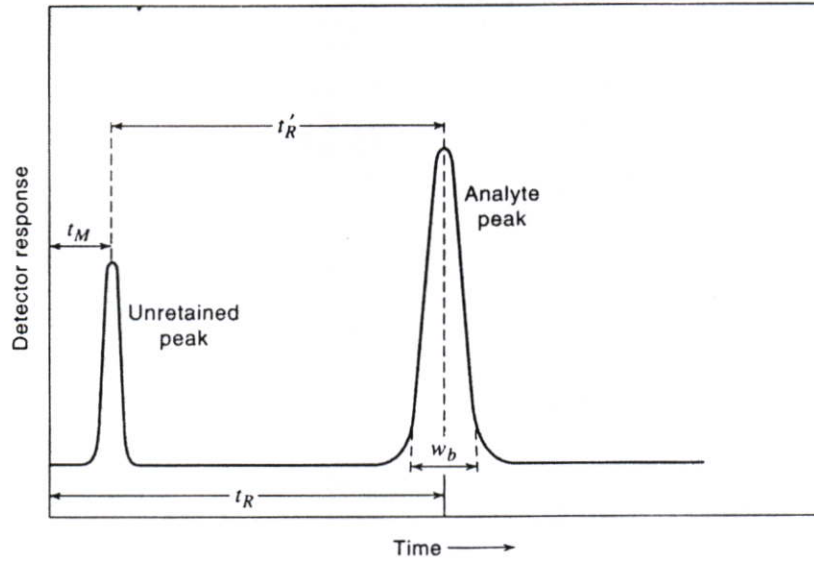


รูปที่ 2.11 แบบจำลองเพลททางทฤษฎีโครมาโทกราฟี

2.5.1.5 การคำนวณค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์

โครมาโทกราฟีเชิงเส้นลักษณะพีคบนโครมาโทแกรมที่ได้จะเป็นพีคการกระจายแบบเกาส์เซียน (Gaussian peak) ซึ่งจะมีความกว้างของฐานพีค (base peak width; W_b) ซึ่งสัมพันธ์กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; σ) จะได้ว่า

$$W_b = 4\sigma \quad \dots\dots\dots(2.18)$$



รูปที่ 2.12 การหาค่าจำนวนเพลทด้วย $W_b = 4\sigma$

ประสิทธิภาพของคอลัมน์แทนด้วยจำนวนเพลททางทฤษฎี (the numbers theoretical plates or plate number, N) หรือความสูงของเพลททางทฤษฎี (the height equivalent to a theoretical plate, HETP or H) การคำนวณประสิทธิภาพของคอลัมน์นั้นสามารถคำนวณได้หลายรูปดังสมการ

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma_t}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 = 16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \dots\dots\dots(2.19)$$

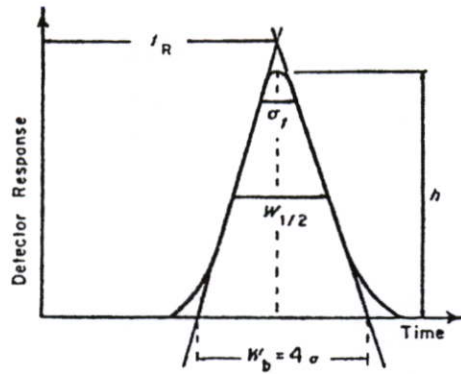
เมื่อ

σ_t^2 พิกัดความแปรปรวน (peak variance) ในหน่วยของเวลาที่มีความกว้างเป็น 0.882 ของความสูงทั้งหมด (0.882h)

$W_{1/2}$ ความกว้างของพีค (peak width) ในหน่วยของเวลาที่มีความกว้างเป็นครึ่งหนึ่งของความสูงทั้งหมด

W_b ความกว้างของพีคตรงฐานพีคในหน่วยเวลา

t_R เป็นเวลาการคงไว้ที่ยังไม่ได้ปรับค่า (Uncorrected retention time)



รูปที่ 2.13 การคำนวณหาค่าทางพลททางทฤษฎี

ความกว้างของพีคตรงฐานพีคนั้นหาได้จากการลากเส้นสัมผัสไปตัดเส้นฐาน จะสามารถวัดความกว้างของพีคได้ N เป็นค่าที่ไม่มีหน่วย (dimensionless) t_R และความกว้างของพีคจะอยู่ในหน่วยเดียวกัน เช่น หน่วยของเวลา หรือหน่วยของระยะทางบนโครมาโทแกรม

จำนวนเพลททางทฤษฎีในคอลัมน์จะขึ้นกับความยาวของคอลัมน์ เนื่องจากเมื่อเพิ่มความยาวของคอลัมน์เป็นสองเท่า จะทำให้จำนวนเพลททางทฤษฎีเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และทำให้ระยะระหว่างพีคเพิ่มขึ้นสองเท่าด้วย ทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ดีประมาณสองเท่า แต่จะทำให้พีคที่ได้มีความกว้าง (broaden peak) ถ้า L เป็นความยาวของคอลัมน์การเพิ่มจำนวนเพลททางทฤษฎีต่อความยาวของคอลัมน์พิจารณาได้จากความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) ดังสมการต่อไปนี้

$$N = \frac{L}{H} \dots\dots\dots(2.20)$$

ถ้า H มีค่าต่ำสุดที่ความยาวของคอลัมน์ที่กำหนดไว้ จะได้ค่าจำนวนเพลททางทฤษฎีมีค่ามากที่สุด และทำให้คอลัมน์มีประสิทธิภาพสูงสุด อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของคอลัมน์จะมีเทอมของ H มากกว่าเทอมของ N เนื่องจากเทอมของ H ไม่ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์

2.5.1.6 จำนวนเพลทที่มีประสิทธิภาพ

จากสมการที่ 2.19 เราต้องคำนึงถึงค่า t_R ในรูปของเวลาจากการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วมิฉะนั้นจะทำให้ค่า N ที่คำนวณได้มีค่ามากเกินไป ดังนั้นสมการที่ 2.19 สามารถเขียนใหม่ได้เป็น

$$N_{eff} = 5.54 \left[\frac{(t_R - t_M)}{W_{1/2}} \right]^2 \quad \dots\dots\dots(2.21)$$

และจากสมการที่ 2.20 จะได้

$$N_{eff} = \frac{L}{H_{eff}} \quad \dots\dots\dots(2.22)$$

N_{eff} เป็นจำนวนเพลทที่มีประสิทธิภาพที่ได้ใช้ค่าเวลาการคงไว้ที่ปรับค่าแล้ว จะมีความสัมพันธ์กับจำนวนเพลท (N) ดังนี้

$$N_{eff} = \left(\frac{k'}{1} + k' \right)^2 N \quad \dots\dots\dots(2.23)$$

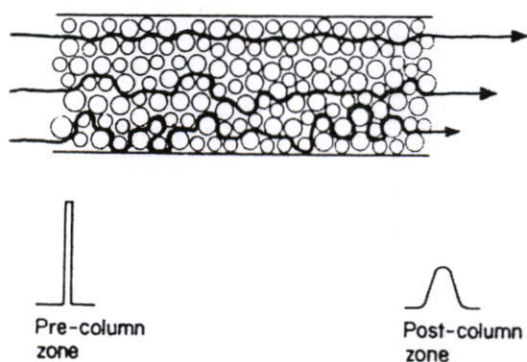
เมื่อเวลาการคงไว้เพิ่มขึ้น จะทำให้ N_{eff} มีค่าใกล้เคียงกับค่า N ดังนั้นถ้าใช้พีคที่ออกมาในตอนแรกๆของโครมาโทแกรมจะนิยมใช้ N_{eff} เป็นตัวชี้บอกประสิทธิภาพของคอลัมน์

ค่า H จะนำมาใช้ในการบอกประสิทธิภาพของคอลัมน์ เพื่อให้ได้พีคที่มีความคมชัดหรือแคบ ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะลดลงเมื่อความกว้างของพีคมากขึ้นซึ่งจะมีผลต่อการแยกสารผสมได้ จากสมการที่ 2.20 จะเห็นได้ว่า ถ้าความสูงของเพลทมีค่าน้อย จำนวนเพลทจะมีค่ามาก ประสิทธิภาพในการแยกของคอลัมน์ก็จะดีขึ้น หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่าคอลัมน์ที่ดีต้องมีค่า N มาก เมื่อแยกสารแล้วจะได้พีคที่มีฐานแคบ แต่ถ้า t_R มีค่ามาก ค่า H จะต้องมีค่าน้อยที่สุดและความยาวของคอลัมน์ควรจะสั้นที่สุด ตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อค่า H การเกิดความกว้างของพีคหรือแบนด์ และเวลาการคงไว้ มีด้วยกันอยู่ 3 แฟกเตอร์ คือ

(1) การแพร่วน (Eddy Diffusion or Multiple Path Effect)

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลสารตัวอย่างที่ต้องการแยกจะผ่านไปตามความยาวของคอลัมน์ ตั้งแต่ปลายด้านเข้าจนถึงปลายด้านออกจากคอลัมน์ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลเป็นแบบระยะทางสุ่ม (random path) โมเลกุลอาจจะเคลื่อนที่เข้าไปในบริเวณเฟสอยู่กับที่ หรือบริเวณช่องว่างปริภูมิ อันเนื่องมาจากขนาด และรูปร่างของเพลทที่อยู่ภายในคอลัมน์มีความแตกต่างกัน หรือกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่าขนาดและความสม่ำเสมอของอนุภาคที่ใช้บรรจุคอลัมน์มีความแตกต่างกัน ทำให้ระยะทางในการเคลื่อนที่ของแต่ละโมเลกุลไม่เท่ากัน จากทฤษฎีการแพร่วนจะสมมติว่าโมเลกุลเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกัน แต่ในทางปฏิบัติการเคลื่อนที่ หรือการแพร่ของโมเลกุลจะเกิดหลายทิศทางโดยไปแทรกกับการเคลื่อนที่ของโมเลกุลอื่นเรียกว่า เกิดการก่อกวน

(coupling) จึงทำให้เกิดความแตกต่างของระยะทางในการเคลื่อนที่ของแต่ละโมเลกุลไม่เท่ากัน เกิดเป็นปรากฏการณ์ในการเกิดการแพร่วน โมเลกุลที่เข้าสู่คอลัมน์ในตอนเริ่มต้นพร้อมๆ กัน แต่จะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เวลาที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.14 การแพร่วนในคอลัมน์โครมาโทกราฟี

(2) การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์ (Longitudinal Molecular Diffusion)

ผลของการกระจายของโมเลกุลของสารในเฟสเคลื่อนที่เป็นแนวโน้มในการแพร่จากบริเวณความเข้มข้นสูงไปสู่บริเวณความเข้มข้นต่ำ โชนหรือแบนด์ของโมเลกุลที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์จะเกิดการแพร่ขึ้น และถ้าโชนของโมเลกุลเคลื่อนที่ในคอลัมน์นานการแพร่จะเกิดขึ้นมากเวลาที่ใช้ในการชะจะนานจึงทำให้มีการกระจายของแบนด์ได้กว้างขึ้น

(3) การถ่ายโอนมวล (mass transfer)

การถ่ายโอนมวลจะสัมพันธ์ถึงอัตราการถูกยึดติด (sorption) หรือถูกปล่อยออก (desorption) ของโมเลกุลของสารที่อยู่ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ ซึ่งอาจจะมีอัตราที่เกิดช้ากว่าโมเลกุลของสารที่เคลื่อนที่ในเฟสเคลื่อนที่เมื่อเปรียบเทียบกับกัน ทำให้โมเลกุลของสารที่จะแยกไม่สามารถเกิดภาวะสมดุลระหว่างเฟสทั้งสองได้ ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนั้นอธิบายได้ด้วย 2 ขบวนการ คือ

(3.1) อัตราการถูกยึดติดและการถูกปล่อยออก (sorption-desorption kinetics) เกิดจากการที่โมเลกุลของสารถูกยึดติดหรือถูกปล่อยออกจากผิวของเฟสอยู่กับที่ชั่วขณะใดขณะหนึ่งโดยที่โมเลกุลของสารจะหลุดออก ผิวของเฟสอยู่กับที่ที่จะต้องมีการกระตุ้นพอเพียงที่จะชนะแรงยึดเหนี่ยวกับผิวของเฟสอยู่กับที่

(3.2) อัตราการควบคุมการแพร่ (diffusion controlled kinetics) จะเกิดการแพร่ระหว่างของเหลวที่เป็นเฟสอยู่กับที่เองซึ่งง่ายต่อการวิเคราะห์ แต่ถ้าเกิดการแพร่ระหว่างเฟสเคลื่อนที่เองจะมีความซับซ้อนมากต่อการวิเคราะห์

ด้วยสาเหตุทั้ง 3 ประการที่กล่าวมานี้จะส่งผลกระทบต่อค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในเชิงคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า สมการแวนดีมเตอร์ (van deemter equation) ดังนี้

$$H = \left(\frac{1}{A} + \frac{1}{C_M U}\right)^{-1} + \frac{B}{U} + C_S U + C_{SM} U \quad \dots\dots\dots(2.24)$$

จะเห็นว่าผลรวมของค่า H จะเป็นฟังก์ชันกับความเร็วเฉลี่ยเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่, U และแต่ละเทอมจะแสดงถึงการเกิดการกระจายความกว้างของแบนด์ อันเนื่องมาจากการแพร่และ/หรือการถ่ายโอนมวลโดยที่

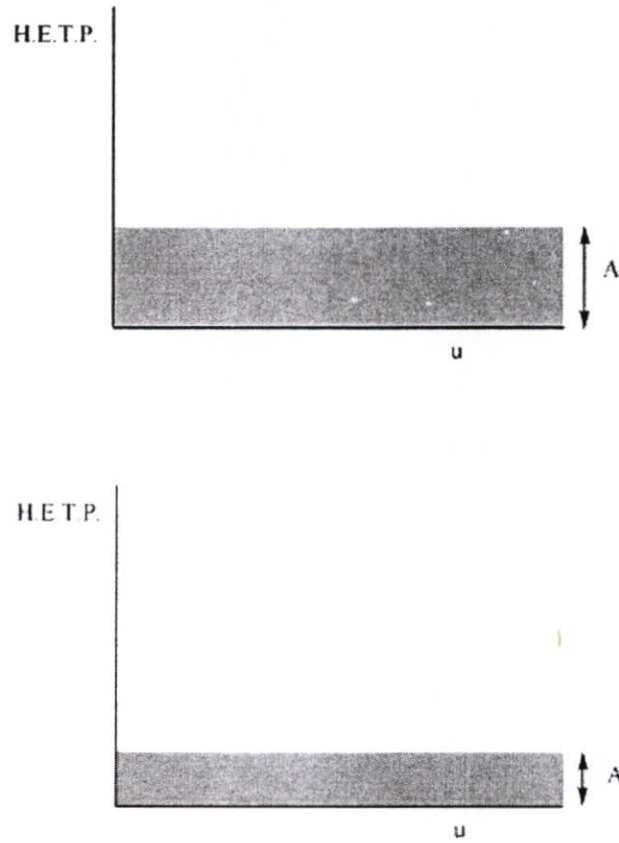
(1) พจน์ A เป็นค่าฟังก์ชันของขนาดและความสม่ำเสมอของอนุภาคเล็กๆ ของของแข็งที่ใช้ในการบรรจุคอลัมน์ (packing particles or packing material) โดยที่พจน์ A จะมีความสัมพันธ์กับเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่ใช้ในการบรรจุคอลัมน์ (d_p) ดังนี้

$$A = 2d_p \lambda \quad \dots\dots\dots(2.25)$$

เมื่อ

λ เป็นแฟกเตอร์ของการบรรจุ (packing factor)

เราอาจจะแสดงค่า H กับ U ในเทอมของพจน์ A ได้ดังนี้

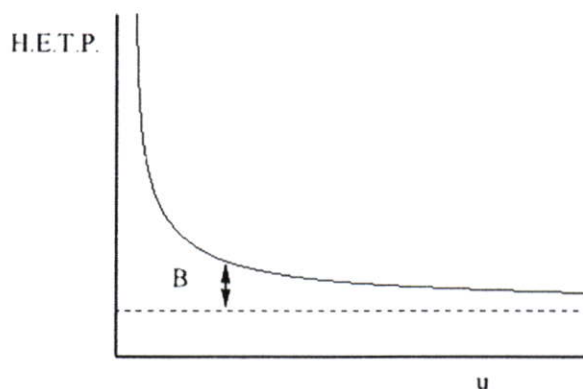
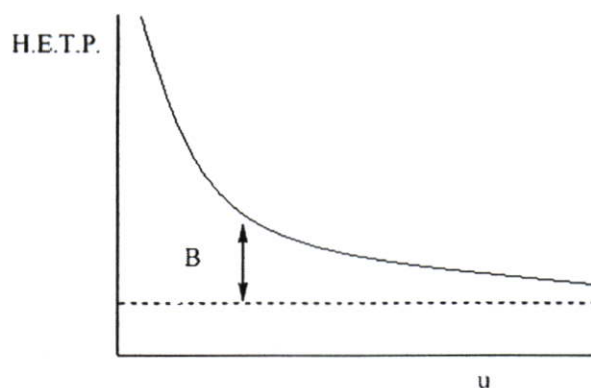


รูปที่ 2.15 แสดงค่าเทอม H กับ U ในเทอมของพจน์ A

(2) พจน์ B มีความสัมพันธ์กับการแพร่ของโมเลกุลตามความยาวของคอลัมน์ หรือมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกในเฟสเคลื่อนที่ D_M ดังนี้

$$B = 2\gamma D_M \dots\dots\dots(2.26)$$

เมื่อ γ เป็นค่าคงที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไปของเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว ($D_M \cong 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$) จะมีค่าน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแก๊ส ($D_M \cong 10^{-1} \text{ cm}^2/\text{sec}$) ดังนั้นผลของการแพร่ของโมเลกุลตามความยาวของคอลัมน์จะไม่มีผลต่อเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟี

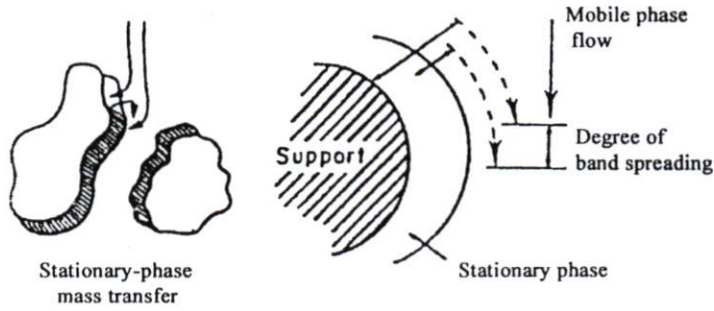


รูปที่ 2.16 แสดงค่าเทอม H กับ U ในเทอมของพจน์ B

พจน์ B จะเป็นส่วนกลับกับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ เมื่ออัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ต่ำจะทำให้ใช้เวลาในการชะออกจากคอลัมน์นาน โมเลกุลจะมีเวลานานในการแพร่ จึงทำให้ได้แถบที่มีความกว้าง

(3) พจน์ C จะมีความสัมพันธ์ของการเกิดสมดุลของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ ในระบบของเทคนิคโครมาโทกราฟีนั้นมักจะเกิดองศาของการไม่สมดุลขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเฟสเคลื่อนที่มีความเร็วสูง จะทำให้โมเลกุลของสารที่อยู่ในภาวะสมดุลเคลื่อนผ่านออกจากคอลัมน์ได้น้อย และถ้าบรรจุอนุภาคในคอลัมน์ที่มีความแน่นมากๆ (เฟสอยู่กับที่) โมเลกุลของสารจะถูกยึดหรือจับไว้นานเกินไป ดูเหมือนว่าโมเลกุลถูกจับอยู่หลายๆ ชั้นบนเฟสอยู่กับที่และมีบางส่วนของโมเลกุลเท่านั้นที่หลุดออกมา แต่ถ้าของเหลวเป็นเฟสอยู่กับที่ถูกจับไว้ หรือถูกปล่อยออกมาจะขึ้นอยู่กับอัตราการแพร่ การถ่ายโอนมวลในเฟสอยู่กับที่ แสดงดังรูปที่ 2.17

C_s Term: Stationary Phase Mass Transfer



รูปที่ 2.17 การถ่ายโอนมวลในเฟสอยู่กับที่ (C_s)

ดังนั้น C_s ที่มีผลต่อค่า H ดังนี้

(i) ถ้าของแข็งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ (เกิดการดูดซับ)

$$H_s = \frac{2t_d k'}{(1 + k')^2} \dots\dots\dots(2.27)$$

(ii) ถ้าของเหลวเป็นเฟสที่อยู่กับที่ (เกิดการพาร์ติชัน)

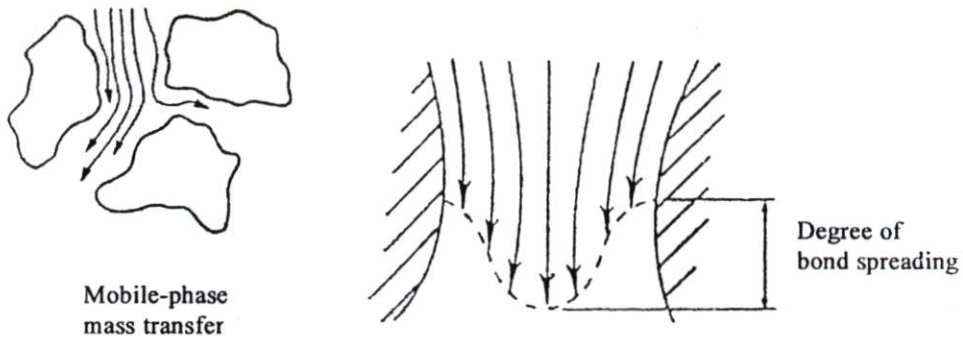
$$H_s = \frac{d_f^2 k'}{(1 + k')^2 D_s} \dots\dots\dots(2.28)$$

เมื่อ

- t_d เป็นเวลาที่โมเลกุลของสารหลุดออกจากเฟสที่เคลื่อนที่
- D_s เป็นอัตราการแพร่ของของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่
- d_f เป็นความหนาของฟิล์มของเหลวที่เคลื่อนบนอนุภาคของแข็งที่เป็นตัวดูดซับ
- k' เป็นแฟกเตอร์ความจุ

พิจารณาพจน์ C ที่เกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนมวลในเฟสเคลื่อนที่ ดังนี้

(ก) โมเลกุลของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากัน เราจะพบว่าตรงกลางของคอลัมน์จะมีการเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ส่วนขอบของคอลัมน์อื่นเนื่องมาจากแรงเสียดทาน ดังแสดงในรูปที่ 2.18



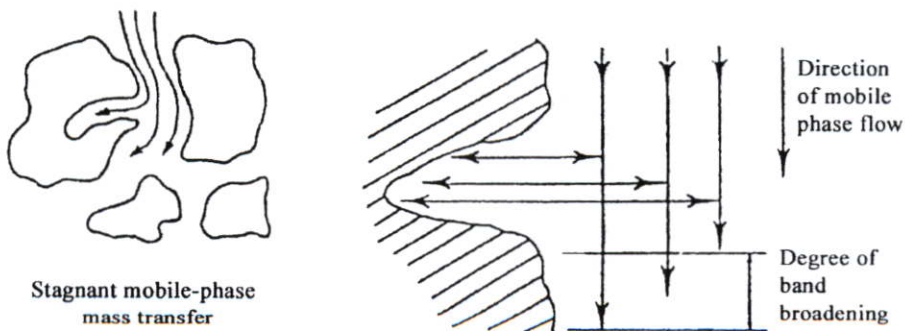
รูปที่ 2.18 การถ่ายโอนมวลของเฟสเคลื่อนที่ (C_M)

ลักษณะการเคลื่อนที่ดังกล่าวเกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการแพร่วน (eddy diffusion) ดังความสัมพันธ์

$$C_M = \frac{\Omega d_p^2}{D_M} \dots\dots\dots(2.29)$$

เมื่อ

- Ω เป็นฟังก์ชันเกี่ยวกับลักษณะของการบรรจุเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์
- d_p เป็นเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคที่ใช้ในการบรรจุคอลัมน์
- D_M เป็นค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกในเฟสเคลื่อนที่



รูปที่ 2.19 การถ่ายโอนมวลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนชั่วขณะหนึ่ง (stagnant mobile phase mass transfer ; C_{SM})

(ข) ในบางกรณีของแข็งที่เป็นเฟสอยู่กับที่มีรูพรุน (pores) ซึ่งเป็นช่องว่างที่เฟสเคลื่อนที่จะแทรกเข้าไปได้ ทำให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์หยุดไปชั่วขณะหนึ่ง และบางโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกจะถูกแทรกเข้าไปในรูพรุนได้ เกิดการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ช้า จึงทำให้ได้แถบหรือพีคที่มีความกว้าง ดังแสดงในรูปที่ 2.19

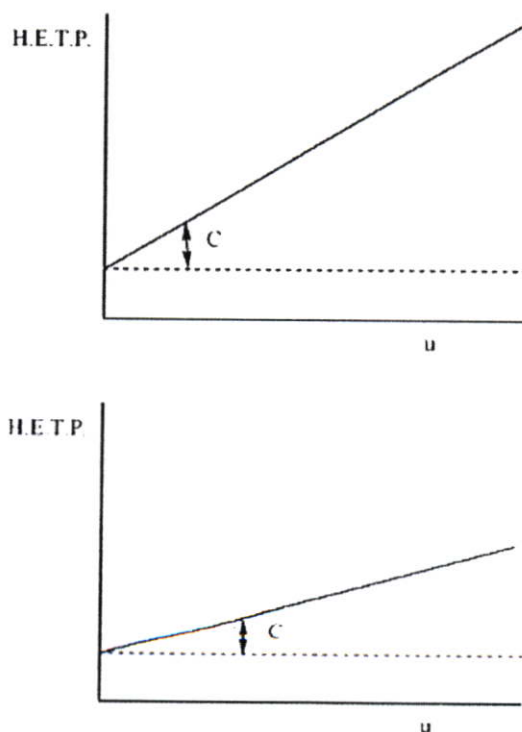
ดังนั้นค่า C_{SM} จึงมีความสัมพันธ์กับขนาด รูปร่าง และรูพรุนของอนุภาคที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ ดังนี้

$$C_{SM} = \frac{(1 - \phi + k')^2 d_p^2}{30(1 - \phi)(1 + k')^2 \gamma D_M} \dots\dots\dots(2.30)$$

เมื่อ

ϕ เป็นสัดส่วนทั้งหมดที่เฟสเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในรูพรุน

กล่าวได้ว่าพจน์ C ควรจะมีค่าน้อย โดยให้เฟสเคลื่อนที่มีความหนืดต่ำ หรือมีอัตราการไหลช้าจะทำให้แยกสารในคอลัมน์ถูกแยกออกมาได้ดีขึ้น พีคหรือแถบจะแคบ เราอาจจะแสดงค่า H กับ U ในเทอมของพจน์ C ดังรูปที่ 2.20



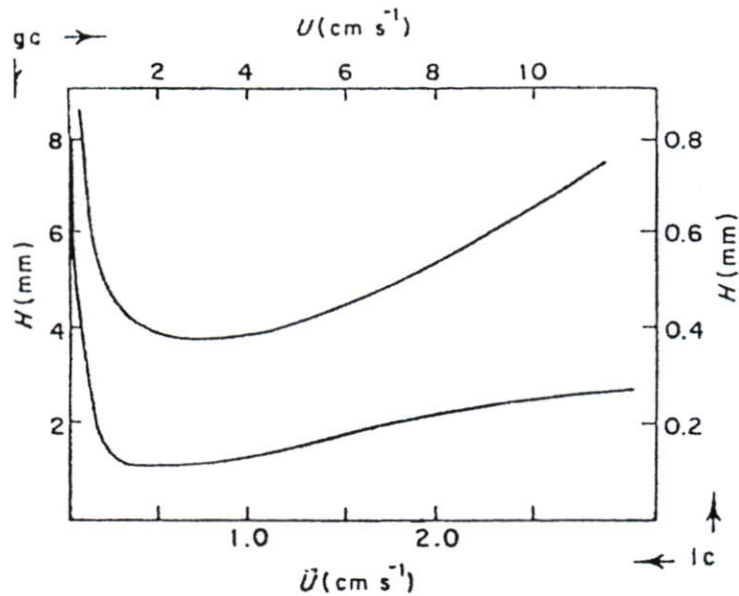
รูปที่ 2.20 แสดงค่า H กับ U ในเทอมของพจน์ C

จากสมการที่ 2.24 ทำให้สามารถทำนายเกี่ยวกับผลของพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ให้ผลต่อการทำงานภายในคอลัมน์ โดยทั่วไปการที่จะทำให้ H มีค่าต่ำสุด (N มีค่ามากที่สุดที่คิดได้จะแคบ) ทำได้โดยใช้แผ่นฟิล์มบางๆ เคลือบบนโซลิดซัพพอร์ต อนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ควรจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อย และเฟสเคลื่อนที่ควรมีความหนืดต่ำ ถึงแม้ว่าอุณหภูมิไม่ได้ปรากฏอยู่ในสมการที่ 2.24 แต่อุณหภูมิก็มีผลต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการแพร่, ความหนืด และการเกิด sorption/desorption kinetics ดังนั้นถ้าเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์และจะได้ค่า H ลดลง สมการที่ 2.24 เขียนย่อได้เป็น

$$H = A + \frac{B}{U} + CU \quad \dots\dots\dots(2.31)$$

เมื่อ

- A คือ Eddy diffusion
- B คือ Longitudinal molecular diffusion
- C คือ Mass transfer

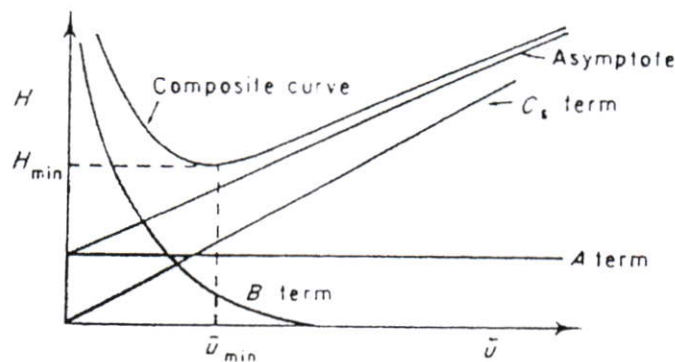


รูปที่ 2.21 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า H กับค่า U

ในกรณีของลิกวิดโครมาโทกราฟีแสดงการเพิ่มของ H เมื่อเพิ่มความเร็วขึ้น จะมีแนวโน้มในการเพิ่มขึ้นช้ากว่าของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งหมายความว่าอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ไม่ค่อยมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์ในเทคนิคลิกวิดโครมาโทกราฟีมากนัก ในทางปฏิบัติจึงใช้อัตราเร็วต่ำซึ่งจะทำให้ใช้เวลานาน ค่าที่นิยมใช้กันจะเป็น 2 เท่าของความเร็วเฉลี่ย

2.5.1.7 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ภาวะเหมาะสมที่สุด (optimization of column efficiency)

จากค่าของพจน์ A , B และ C ในสมการของแวนดีมเตอร์สามารถเขียนกราฟได้ดังรูป 2.23 ซึ่งแสดงถึงเส้นเคิร์ฟองค์ประกอบ (composite curve) จะแทนผลรวมของพจน์ A , B และ C จากรูปจะเห็นว่าพจน์ A นั้นไม่ขึ้นอยู่กับค่า U สำหรับพจน์ B จะมีความสำคัญเมื่ออัตราการไหลต่ำ ในขณะที่พจน์ C จะมีความสำคัญมากเมื่ออัตราการไหลสูง



รูปที่ 2.22 กราฟระหว่างค่า H และ U ตามสมการแวนดีมเตอร์ กับค่าพจน์ A , B และ C

เราสามารถหาค่าของพจน์ A , B และ C จากกราฟในรูปที่ 2.23 ได้โดยการลากเส้นตรงให้ใกล้กับเส้นโค้ง (เส้นโค้งองค์ประกอบ) ให้มากที่สุด เรียกเส้นตรงที่ลากขึ้นนั้นว่าเส้นตรงแอสซิมโทท (asymptote) หลักการลากเส้นตรงแอสซิมโททมีดังนี้ เมื่อทราบ U ในแต่ละจุดก็นำมาคำนวณหาระยะ d ของแต่ละจุด $\left(d = \frac{1}{U}\right)$ เมื่อ d เป็นระยะห่างระหว่างเส้นเคิร์ฟองค์ประกอบกับเส้นตรงแอสซิมโทท จากนั้นก็ลากเส้นตรงไปตัดแกน H ที่ $U = 0$ จะได้ค่าของพจน์ A , B เป็นค่าผลคูณระหว่างค่า d กับค่า U ตรงจุดใดจุดหนึ่งจะมีค่าเท่ากันตลอด สำหรับค่าของพจน์ C หาได้จากค่าความชันของเส้นตรงแอสซิมโทท

การควบคุมประสิทธิภาพของคอลัมน์เพื่อให้เกิดสถานะที่เหมาะสมที่สุด (มีค่า H ต่ำๆ จะทำให้มีค่า N มาก พิกที่ไค้จะแคบ) ทำได้ดังนี้

(1) ลดขนาดของเฟสอยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์ (d_p มีค่าน้อยๆ) ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี d_p ของขนาดอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ควรใช้อยู่ในช่วง 100 – 200 μm สำหรับในเทคนิค HPLC นั้น d_p จะอยู่ในช่วง 3 – 10 μm

(2) เลือกอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จากเคิร์ฟของแวนดีมเมอร์คือ U_{\min} เพื่อจะได้ H_{\min} เนื่องจากถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะทำให้พจน์ C (การถ่ายโอนมวล) มีค่ามาก แต่ถ้าลดอัตราการไหลจะทำให้พจน์ B มีค่ามาก ค่า U_{\min} ที่เลือกใช้นั้นจะทำให้เวลาการคงไว้นานมาก ดังนั้นในทางปฏิบัติจะใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เป็น 2 เท่าของ U_{\min} เพื่อช่วยลดเวลาการคงไว้ให้สั้นลง เราสามารถคำนวณ U_{\min} จากสมการที่ 2.31 ได้ดังนี้

$$H = A + \frac{B}{U} + CU$$

$$\frac{dH}{dU} = 0 = -\frac{B}{U^2} + C$$

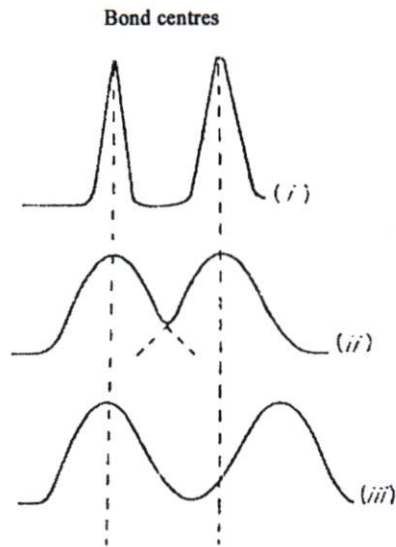
$$U_{\min} = \left(\frac{B}{C}\right)^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(2.32)$$

$$H_{\min} = A + 2(BC)^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(2.33)$$

(3) เลือกของเหลวที่เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่จะแยกแล้วเคลือบบนโซลิดซับพอร์ตให้บางที่สุด (d_f ลดลง) และใช้ปริมาณให้น้อยที่สุด (k' ลดลง) จะทำให้พจน์ C มีค่าน้อยลงได้จึงสรุปได้ว่า คอลัมน์ที่ดีนั้นค่า N ต้องมีค่าสูงมากๆ (H มีค่าต่ำสุด) ซึ่งหมายความว่า ในการแยกสารนั้นพิกที่ไค้จะมีฐานพิกแคบที่สุดเมื่อมีเวลาการคงไว้นานที่สุด

2.5.1.8 ความสามารถในการแยก (Resolution, R)

เมื่อใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพแล้วพิกที่ไค้ของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกเกิดการแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จะเรียกว่ามีองศาของการแยก (degree of separation)

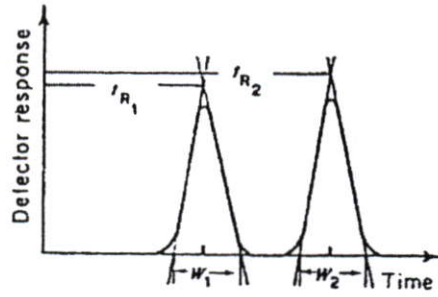


รูปที่ 2.23 ผลของความกว้างของพีคและเวลาการคงไว้ที่มีต่อรีโซลูชัน

เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 2.23 (i) จะเป็นพีคแบบอุดมคติ (ideal peaks) ที่มีความคมชัดมาก และพีคจะแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ที่สุด (ii) พีคสองพีคแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์เกิดการคาบเกี่ยวกัน (the peaks overlap) เพื่อที่จะให้แยกพีคสองพีคใน (ii) ให้ออกจากกัน มีความกว้างของพีคเท่าเดิมเหมือนกันใน (ii) นั่นคือ จะต้องเพิ่มเวลาการคงไว้ ดังแสดงในรูปที่ 2.23 เป็นการทำให้ต้องเพิ่มเวลาในการวิเคราะห์นั่นเอง

จากการที่เราจะทราบ ความกว้างของพีคเป็นฟังก์ชันกับประสิทธิภาพของคอลัมน์โดยการวัดจากจำนวนเพลททางทฤษฎี ดังนั้นเพื่อให้เกิดการแยกพีคสองพีคให้แยกออกจากกันทำได้โดยการเลือกเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ที่เหมาะสม และเลือกคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพ เมื่อรวมเอาสองแฟกเตอร์เข้าด้วยกัน จะได้ค่าการแยกระหว่างพีคสองพีค ดังสมการ

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{(W_1 + W_2)} \quad \dots\dots\dots(2.34)$$



รูปที่ 2.24 การคำนวณรีโซลูชันของพีคสองพีค โดยการวัดเวลาการคงไว้และความกว้างของฐานพีค

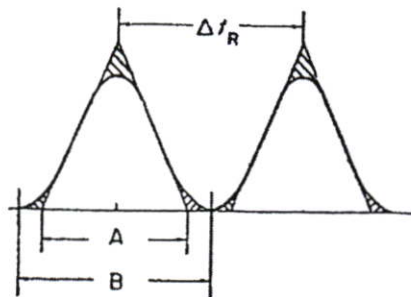
ถ้าความกว้างของฐานพีค W_1 และ W_2 เท่ากัน สมการที่ 2.34 เขียนได้ดังนี้

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W} = \frac{\Delta t_R}{W} \dots\dots\dots(2.35)$$

เมื่อพิจารณาพีคสองพีคที่แยกออกจากกัน โดยสมมติว่าแต่ละพีคเป็นรูปสามเหลี่ยมด้านเท่า สามารถหาค่า R ได้

$$R = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)} \dots\dots\dots(2.36)$$

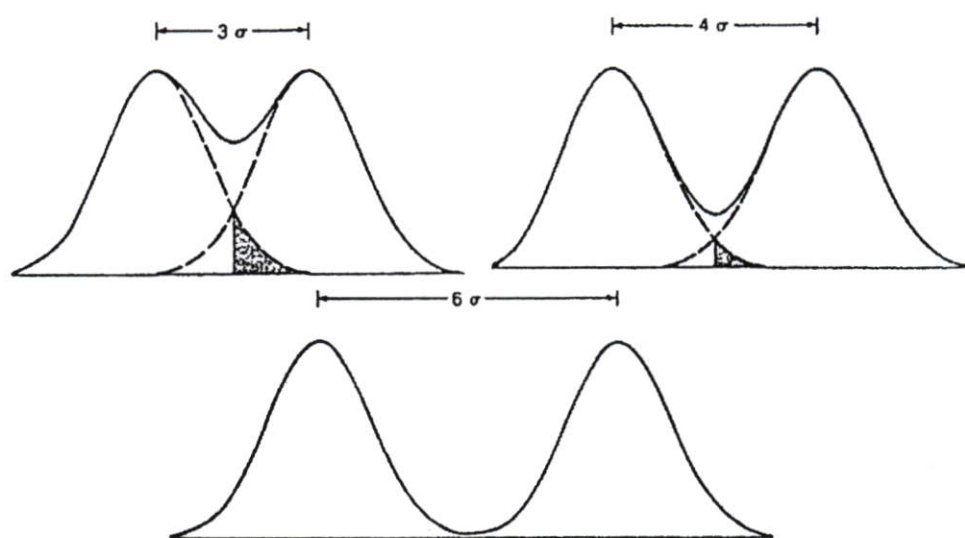
$$\Delta t_R = \frac{(W_1 + W_2)}{2} \dots\dots\dots(2.37)$$



รูปที่ 2.25 รีโซลูชันของรูปพีคสามเหลี่ยมด้านเท่าและรูปเกาส์เซียนพีค

ถ้าพีคสองพีคที่แยกออกจากกันเป็นรูปเกาส์เซียนพีค (gaussian peak) จากค่า $R = 1$ เมื่อพีคเป็นพีคสามเหลี่ยมด้านเท่า แต่ในกรณีเกาส์เซียนพีคซึ่งมีความกว้างของฐานพีค (B) มากกว่าความกว้างของฐานพีค (A) ในพีคสามเหลี่ยมด้านเท่า แต่ Δt_R เท่ากัน ดังนั้น R จะต้องมามีค่ามากกว่าหนึ่ง

ในทางปฏิบัติถ้า $R = 1$ แสดงว่าพีคสองพีคนั้นแยกออกจากกันได้ถึง 94% และอีก 6% จะได้พีคที่คาบเกี่ยวกัน แต่ถ้าได้ $R > 1.5$ แสดงว่าพีคสองพีคถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ เรียกว่า baseline resolution คือพีคสองพีคแยกกัน และเส้นฐานเดียวกัน และเส้นฐานแยกออกจากกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.26



รูปที่ 2.26 แสดงโครมาโทแกรมของพีคที่มีค่า $R = 1$, $R = 1.5$ และ $R = 2.0$

2.6 โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

(High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบธรรมดา (classical liquid chromatography) ที่ใช้คอลัมน์ขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1 – 10 ซม. และมีความยาวของคอลัมน์ 10 – 100 ซม. ภายในคอลัมน์บรรจุเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาดอนุภาคค่อนข้างใหญ่ที่ใช้เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) เช่น อะลูมินา (alumina) หรือซิลิกาเจล (silica gel) ใช้แยกสารผสมโดยการชะเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผสมที่ถูกดูดซับได้น้อยบนเฟสอยู่กับที่ให้ผ่านออกจากคอลัมน์ตามแรงโน้มถ่วงของโลก ซึ่งเกิดขึ้นช้ามาก ได้รีโซลูชันต่ำ สิ้นเปลืองเวลา การทำปริมาณวิเคราะห์ให้ผลที่ไม่ถูกต้อง กรณีสารผสมที่ประกอบด้วยส่วนประกอบที่ซับซ้อนจะแยกไม่ได้ผล จึงได้มีการพัฒนาระบบโครมาโทกราฟี

ของเหลวแบบธรรมดาให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารได้เร็วขึ้น โดยการ ใช้ลูกสูบ (pump) คุณภาพสูงอัดเฟสเคลื่อนที่ด้วยความดันสูง เพื่อช่วยให้ของเหลวไหลเร็วขึ้น และใช้ขนาดของเฟสอยู่กับที่ให้มีขนาดอนุภาคเล็กลง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของเฟสอยู่กับที่ที่เกิดแรงกระทำต่อสารผสมที่ต้องการแยกให้มากขึ้น

ประเภทของโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูงจำแนกได้โดยอาศัยกลไกการหน่วงเหนี่ยวดังต่อไปนี้

2.6.1 โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption Chromatography)

เทคนิคนี้ใช้หลักการในการแยกสาร โดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ที่ต่างกันระหว่างสารกับตำแหน่งซึ่งแอกทีฟ บนผิวตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ แรงที่เกิดขึ้นในระหว่างการดูดซับอาจเป็นแรงไดโพล-ไดโพล แรงเหนี่ยวนำไดโพล และพันธะไฮโดรเจนอย่างใดอย่างหนึ่ง ตัวดูดซับที่ใช้โดยทั่วไปจะเป็นของแข็งที่มีรูพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก เช่น ซิลิกาเจล, อะลูมินา หรือถ่าน (charcoal) ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่ผิวหน้ามีสภาพขรุขระ การแยกสารตัวอย่างจะถูกแยกโดยอาศัยสภาพขรุขระ ซึ่งสารตัวอย่างที่มีสภาพขรุขระสูงกว่าจะถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ได้นานกว่า

2.6.2 โครมาโทกราฟีแบบกระจาย (Partition Chromatography)

หลักการแยกสาร โดยเทคนิคนี้อาศัยหลักการที่โมเลกุลของสารประกอบจะกระจายตัวระหว่างเฟสทั้งสองที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เฟสอยู่กับที่ จะกระจายเป็นฟิล์มบางๆ บนผิวของ inert support ซึ่งอาจใช้อนุภาคที่มีรูพรุนหรือไม่รูพรุนก็ได้ เฟสทั้งสองจะต้องเลือกจากของเหลวที่มีสภาพขรุขระแตกต่างกันมากๆ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีขรุขระ จะต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่ไม่มีขรุขระ สารตัวอย่างที่มีขรุขระจะถูกยึด (retain) อยู่กับเฟสอยู่กับที่อย่างแน่น เทคนิคนี้คือ normal phase chromatography (normal phase chromatography) แต่ถ้าเฟสอยู่กับที่มีสภาพขรุขระ เฟสเคลื่อนที่ที่จะต้องไม่มีขรุขระ สารประกอบที่มีขรุขระจะชอบเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารตัวอย่างนั้นจะถูกแยกออกมาอย่างรวดเร็ว เทคนิคนี้เรียกว่า reverse phase chromatography (reverse phase chromatography)

2.6.3 โครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ (Size Exclusion Chromatography)

เทคนิคนี้อาศัยหลักการแยกขนาดของโมเลกุลสารตัวอย่างที่จะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของเฟสอยู่กับที่ที่มีลักษณะเป็นโครงร่าง 3 มิติ เฟสอยู่กับที่ จะเป็นสารที่มีรูพรุนสูงมาก ซึ่งรูเล็กๆ เหล่านี้ โมเลกุลที่มีขนาดเล็กของสารตัวอย่างสามารถแทรกสอดเข้าไปได้ ส่วนโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะไม่สามารถเข้าไปในรูได้ลึก จะเคลื่อนที่ออกไปตามคอลัมน์ ในเวลาเดียวกัน โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะถูกชะออกมาเป็นอันดับแรกจากคอลัมน์ และโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่สุดจะออกมาช้าที่สุด ทำให้สารตัวอย่างถูกชะออกมาในเวลาต่างกัน เทคนิคนี้แบ่งออกได้เป็น

- Gel Permeation Chromatography (GPC) เมื่อใช้ตัวทำละลายอินทรีย์
- Gel Filtration Chromatography (GFC) เมื่อใช้สารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย

2.6.4 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-Exchange Chromatography)

หลักการแยกสาร โดยเทคนิคนี้อาศัยการแยกสารที่ขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่บนผิวของเฟสอยู่กับที่ (ion exchanger) ประกอบด้วยของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งปกติแล้วจะเป็นพวกเรซินที่มีกลุ่มไอออนิกต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี เฟสเคลื่อนที่ปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย counter ion ที่มีประจุตรงกันข้ามกับกลุ่มที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุอยู่กลุ่มไอออนิกที่อยู่บนผิวของอนุภาค เช่น SO_3^{2-} , COO^- , NH_3^+ หรือ NR_3^+

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- (1) P. He, S.S. Davis, L. Illum [12] ได้เตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานแบบที่เติมสารเชื่อมโยง และไม่เติมสารเชื่อมโยง โดยใช้วิธีการพ่นแห้ง (spray drying method) อนุภาคทรงกลมที่เตรียมได้มีรูปทรงกลม ผิวเรียบแต่มีส่วนของผิวที่ถูกทำลาย ขนาดอนุภาคที่เตรียมได้อยู่ในช่วง 2 – 10 μm จากการทดลองสารเชื่อมโยงจะมีผลต่อขนาดของอนุภาค โดยเมื่อลดปริมาณสารเชื่อมโยงจะทำให้ได้อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้นำอนุภาคของไคโตซานที่เตรียมได้ไปประยุกต์ใช้เป็นตัวปลดปล่อยยา
- (2) Y.C. Huang a, M.K. Yeh b, C.H. Chiang [13] ได้เตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานด้วยวิธีพ่นแห้ง โดยใช้ type-A gelatin และ ethylene oxide-propylene oxide block copolymer เป็นตัว modifiers ศึกษาคุณลักษณะรูปร่างพื้นผิวของอนุภาคไคโตซานที่เตรียมได้โดยใช้ scanning electron microscopy (SEM) และ microelectrophoresis ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ gelatin ที่ใช้มีผลต่อรูปร่าง, ขนาด และลักษณะพื้นผิวของอนุภาคไคโตซาน จากนั้นได้ทำการศึกษาการเตรียมอนุภาคไคโตซานที่เติมขาลงไปเพื่อนำไปใช้เป็นตัวปลดปล่อยยาในปอด
- (3) B.F. Oliveira, M.H.A. Santana [14] ได้เตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานด้วยวิธีการพ่นแห้ง ตามด้วยการเติมสารเชื่อมโยง งานวิจัยนี้ได้เตรียมอนุภาคไคโตซานขึ้นเพื่อใช้ในงานทางเภสัชกรรม อนุภาคไคโตซานที่เตรียมได้นั้นมีขนาดเล็กและมีรูปทรงกลม สารเชื่อมโยงที่ใช้ในงานนี้คือ *D,L*-glyceraldehyde ปัจจัยที่มีผลต่อการเชื่อมโยงของสาร คือระยะเวลาที่เกิดการเชื่อมโยง และความเข้มข้นของสารเชื่อมโยงที่ใช้ในการเตรียม ในการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ *D,L*-glyceraldehyde และเมื่อลดระยะเวลาในการเกิดการเชื่อมโยงจะทำให้เกิดการบวมตัวของอนุภาค

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodiumhydroxide), A.R. grade บริษัท Lab scan
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid), A.R. grade บริษัท Lab scan
3. กลูทาร์ลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) 50% in water , A.R. grade บริษัท Fluka
4. กรดอะซิติก (Acetic acid), A.R. grade บริษัท Lab scan
5. ไพริดีน (Pyridine), A.R. grade บริษัท Lab scan
6. เมทานอล (Methanol), A.R. grade บริษัท Lab scan
7. เมทานอล (Methanol), HPLC grade บริษัท Lab scan
8. อะซิโตรไนไทรล์ (Acetronitrile), HPLC grade บริษัท Lab scan
9. โทลูอีน (Toluene), A.R. grade บริษัท Lab scan
10. ไบฟีนิล (Biphenyl), A.R. grade บริษัท Sigma-Aldrich
11. ไนโตรเบนซีน (Nitrobenzene), A.R. grade บริษัท BDH Chemicals
12. อะเซทานิลได์ (Acetanilide), A.R. grade บริษัท Sigma-Aldrich
13. ฟีนอล (Phenol), A.R. grade บริษัท Lab scan
14. เบนซาไมด์ (Benzamide), A.R. grade บริษัท Sigma-Aldrich
15. อะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen), A.R. grade บริษัท Sigma-Aldrich

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ (Fourier transforms infrared spectrometer) : FTIR spectrum GX, Perkin Element
2. เครื่องพ่นแห้ง (Spray dryer) : L-8, Ohkawara Kakohki Co., Ltd.
3. เครื่องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคป (Scanning Electrone Microscope; SEM) : 1455VP/EDAX, LEO
4. เครื่องวัดการกระจายตัวของอนุภาค (Particle size analyzer) : Masterzizer X, MaL Y≡RN
5. เครื่องวัดพื้นที่ผิวและขนาดรู (Surface area analyzer) : Autosorb-1, Quana chrome
6. เครื่องวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล Gel Permeation Chromatography (GPC) : Waters 150CV, Water Division of MILLIPORE
6. เครื่องเขย่าตะแกรงร่อน (Sieve shaker) : Refsch type vibro
7. เครื่องบรรจุคอลัมน์ HPLC (HPLC packing pump) : Model CP Lab Alliance
8. เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มเมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography) : Waters 510 HPLC pump / Waters 486 Tunable absorbance detector, MILLIPORE.
9. เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตมิเตอร์ (X-ray Diffractometer; XRD) : 08 Advance, Bruker AG
10. คอลัมน์เปล่า HPLC (HPLC empty column) i.d. 4.6 x 250 mm : 316 stainless steel tubing

3.2 ขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมโคโคซานจากเปลือกกุ้ง

- ศึกษากระบวนการเตรียมโคโคซานจากเปลือกกุ้ง
- เตรียมโคโคซานจากเปลือกกุ้ง
- วิเคราะห์คุณภาพของโคโคซานที่เตรียมได้

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซาน

- เตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซาน
- ศึกษาหาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อขนาด และรูปร่างของอนุภาคทรงกลมของโคโคซาน
- วิเคราะห์คุณสมบัติอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่ได้จากการเตรียมในสภาวะต่างๆ กัน

ขั้นตอนที่ 3 การบรรจุคอลลัมน์

- ศึกษากระบวนการบรรจุอนุภาคทรงกลมของโคโคซานลงในคอลลัมน์ด้วยเทคนิคบรรจุแบบเปียก (slurry techniques)

- บรรจุอนุภาคทรงกลมของโคโคซานลงในคอลลัมน์ HPLC

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพคอลลัมน์

- ศึกษาประสิทธิภาพคอลลัมน์ที่ผลิตได้ โดยการวิเคราะห์หาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง เช่น จำนวนเพลท (N), ความสูงของเพลททางทฤษฎี (H), สร้างกราฟแวนเดอวาล์ว, หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) และความสามารถในการแยกของสาร เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 5 การรายงานผลการทดลองและสรุปผลการทดลอง

3.3 วิธีวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารละลาย

3.3.1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8% (w/v)

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 80 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

3.3.1.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8% (v/v)

ปีเปตกรดไฮโดรคลอริกให้ได้ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (w/v)

ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 250 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

3.3.1.4 สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2% (v/v)

ปีเปตกรดอะซิติกให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

3.3.1.5 สารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0% (w/v)

ชั่งสารโคโคซาน 0.5 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2% (v/v) ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร

สารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0% (w/v) ให้ชั่งสารโคโคซาน 1.25, 2.5 และ 5.0 กรัม ตามลำดับ ละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2% (v/v) ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร

3.3.1.6 สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 5, 10 และ 25% (v/v)

ปีเปตสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 10 และ 25% (v/v) ให้ปีเปตสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 20 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

3.3.2 การเตรียมโคโคซานจากเปลือกกุ้ง

ขั้นตอนที่ 1 การทำความสะอาดเปลือกกุ้ง

นำเปลือกกุ้งมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำไปนึ่งใช้เวลาประมาณ 10 นาที ผึ่งให้แห้ง นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 การแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง

นำเปลือกกุ้งที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาแยกโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 8% (w/v) โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนัก นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วล้างเปลือกกุ้งด้วยน้ำจืด น้ำล้างมี pH เป็นกลาง

ขั้นตอนที่ 3 การแยกแร่ธาตุออกจากเปลือกกุ้ง

การแยกแร่ธาตุ ทำได้โดยแช่เปลือกกุ้งที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8% (v/v) โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ล้างเปลือกกุ้งด้วยน้ำจืด น้ำล้างมี pH เป็นกลาง ทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้เป็นสารโคโคซานออกมา

ขั้นตอนที่ 4 การกำจัดหมู่อะซิทิลออกจากสารโคโคซาน

นำโคโคซานที่เตรียมได้มากำจัดหมู่อะซิทิลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (w/v) โดยใช้อัตราส่วนเปลือกกุ้งต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วล้างด้วยน้ำจืด น้ำล้างมี pH เป็นกลาง ทำให้แห้งแล้วทำซ้ำในขั้นตอนการกำจัดหมู่อะซิทิลอีกครั้ง จะได้สารโคโคซานประมาณ 30% จากน้ำหนักเปลือกกุ้งแห้งเริ่มต้น

3.3.3 การเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน

นำไคโตซานที่เตรียมได้มาละลายในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 2% (v/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำมากรองเอาส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นเติมสารเชื่อมโยง (crosslinking agent) ในที่นี้ใช้สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ แล้วนำไปขึ้นรูปด้วยวิธีการพ่นแห้งโดยใช้เครื่องพ่นแห้ง (spray dryer) สภาวะเครื่องพ่นแห้งที่ใช้เป็นดังนี้

- Atomizer speed (ขึ้นอยู่กับสภาวะนั้นๆ ที่ใช้ศึกษา)
- Inlet temperature control 130°C
- Exhaust air temperature 80°C
- Pump rate 20 ml/min

3.3.4 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน

ตัวแปรที่ทำการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงตัวแปรต่างๆ ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน

ตัวแปร	ค่าแปรเปลี่ยนที่ศึกษา
1. ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซาน	0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0% (w/v)
2. ความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์	5, 10, 25 และ 50% (v/v)
3. ปริมาตรของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ เข้มข้น 25% (v/v)	1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร
4. ความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (atomizer speed)	(25000, 30000, 35000 และ 40000 rpm)

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคทรงกลมของ ไคโตซาน

ตัวแปรที่ศึกษา	ความเข้มข้นของไคโตซาน (%(w/v))	ปริมาตรสารเชื่อมโยง (ml)	ความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (rpm)
1. ความเข้มข้นของไคโตซาน (%(w/v))		<i>Glutaraldehyde (25%(v/v))</i>	
	0.2	3	35000
	0.5	3	35000
	1.0	3	35000
2. ความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์	0.5	<i>Glutaraldehyde (5%(v/v))</i> 3	35000
	0.5	<i>Glutaraldehyde (10%(v/v))</i> 3	35000
	0.5	<i>Glutaraldehyde (25%(v/v))</i> 3	35000
	0.5	<i>Glutaraldehyde (50%(v/v))</i> 3	35000
3. ปริมาตรของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v)	0.5	1	35000
	0.5	2	35000
	0.5	3	35000
	0.5	4	35000
4. ความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (atomizer speed)		<i>Glutaraldehyde (25%(v/v))</i>	
	0.5	3	25000
	0.5	3	30000
	0.5	3	35000
	0.5	3	40000

3.3.5 การกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิล

- (1) นำอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมได้มาทวนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (w/v) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างจนเป็นกลางด้วยน้ำกลั่น นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
- (2) ชั่งอนุภาคที่ได้มาประมาณ 10 กรัม เติมโพรีตินประมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปทวนเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นทำการรีฟลักซ์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เทลงในเมทานอลที่มีปริมาตร 300 มิลลิลิตร กรองเอาส่วนของอนุภาคนำไปทำการชอกเล็ดด้วย

เมทานอลเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำอนุภาคที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.6 การศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมได้

- (1) วิเคราะห์ลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคทรงกลมของไคโตซานด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM)
- (2) วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC)
- (3) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคทรงกลมของไคโตซานด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)
- (4) วิเคราะห์การจัดเรียงตัวด้วยเทคนิค X-ray Diffraction (XRD)
- (5) วิเคราะห์การกระจายของอนุภาคด้วยเทคนิค Particle Size Analysis
- (6) วิเคราะห์พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนด้วยเครื่อง Autosorb

3.3.7 การบรรจุอนุภาคทรงกลมของไคโตซานลงในคอลลัมน์ด้วยเทคนิคบรรจุแบบเปียก

(slurry techniques)

- (1) ชั่งอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่ได้จากข้อ 3.3.5 มาประมาณ 5 กรัม เติมนอนอลประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการกระจายตัวโดยการ โชนิกเทเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- (2) จัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์โดยต่อปั๊มความดันสูงเข้ากับท่อที่ใส่ของเหลวหนืด (slurry) นำสารละลายของเหลวหนืดที่เตรียมได้เติมลงในท่อที่ใส่ของเหลวหนืดแล้วต่อคอลลัมน์เปล่าเข้ากับท่อใส่ของเหลวหนืดเริ่มเปิดระบบทำการบรรจุคอลลัมน์โดยใช้เมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ในระบบ ทำการบรรจุคอลลัมน์นานประมาณ 1 ชั่วโมง
- (3) นำคอลลัมน์ที่ได้ต่อเข้ากับปั๊มใช้เมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่เปิดระบบทำที่อัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3.3.8 การทดสอบประสิทธิภาพคอลลัมน์

- (1) ทดสอบประสิทธิภาพคอลลัมน์ที่เตรียมได้ โดยใช้สารละลายมาตรฐาน โทลูอิน (Toluene) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ อะซิโทรไนโตรล/น้ำ (75:25) ที่อัตราการไหลต่างๆ

- (2) ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง(linearity) ของคอลัมน์ โดยใช้สารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน ความเข้มข้น 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ อะซิโตรไนโตรลีน้ำ (75:25) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- (3) ทดสอบประสิทธิภาพการแยกโดยใช้สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างอะเซทานิไลด์ (Acetanilide) เข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และอะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) เข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ อะซิโตรไนโตรลีน้ำ (75:25) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- (4) ทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสารละลายมาตรฐานต่างๆ ด้วยคอลัมน์โคโคซาน ดังต่อไปนี้ สารละลายมาตรฐานโทลูอินเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารละลายมาตรฐานไบฟีนิลเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารละลายมาตรฐานไนโตรเบนซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารละลายมาตรฐานฟินอลเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, สารละลายมาตรฐานเบนซาไมด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ อะซิโตรไนโตรลีน้ำ (75:25), อะซิโตรไนโตรลีน้ำ (90:10) และ 100% เมทานอล ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

3.4 สถานที่ทำการวิจัย

- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ภาควิชาวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปอาหาร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน

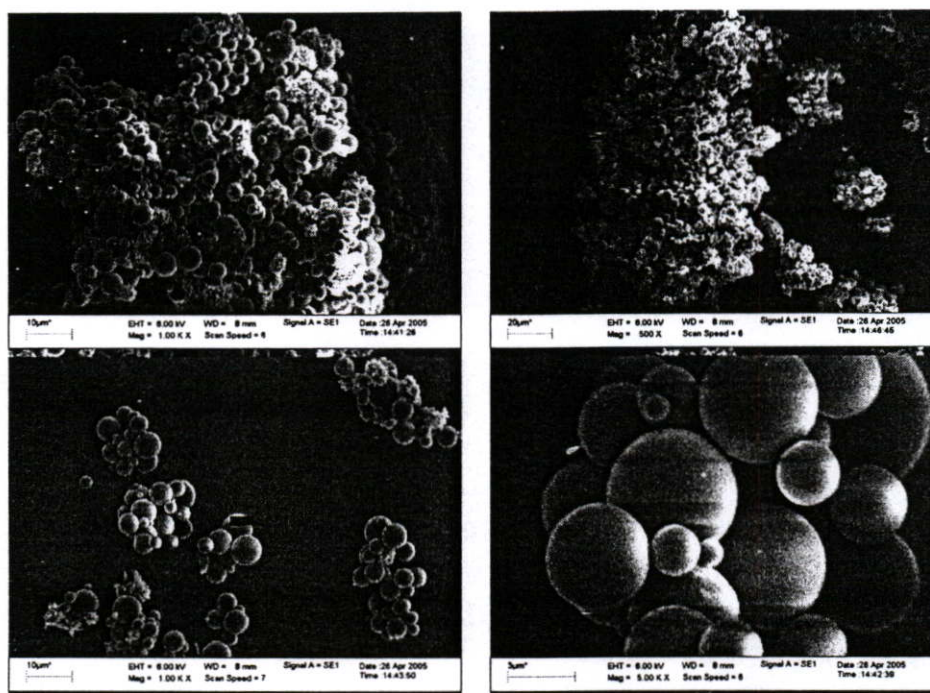
อนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC ความมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ มีรูปร่างลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3 – 10 μm ทนต่อความดันสูงในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ทำการศึกษา คือ 0.2, 0.5, 1.0 และ 2.0% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และตัวแปรอื่นๆ ถูกควบคุมให้คงที่ คือ สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) เท่ากับ 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้งเท่ากับ 35,000 รอบต่อนาที

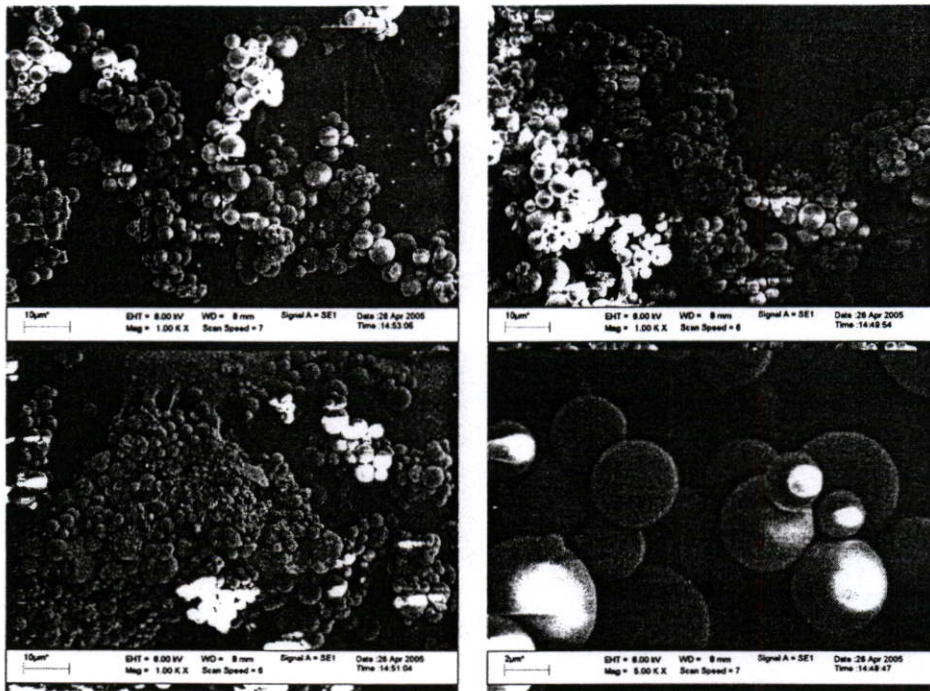
จากการศึกษาพบว่า สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% (w/v) เมื่อเติมสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ลงไปสักครู่สารละลายเกิดเป็นวุ้นแข็งไม่สามารถนำไปเข้าสู่กระบวนการขึ้นรูปปั่นแห้งได้ ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0% (w/v) จึงไม่เหมาะสม

ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.2 % (w/v) พบว่าอนุภาคโคโคซานที่ได้มีรูปร่างลักษณะทรงกลม พื้นผิวเรียบ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.2% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วยรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5 % (w/v) พบว่าอนุภาคโคโคซานที่ได้มีรูปร่างลักษณะทรงกลม พื้นผิวเรียบ ดังแสดงในรูปที่ 4.2



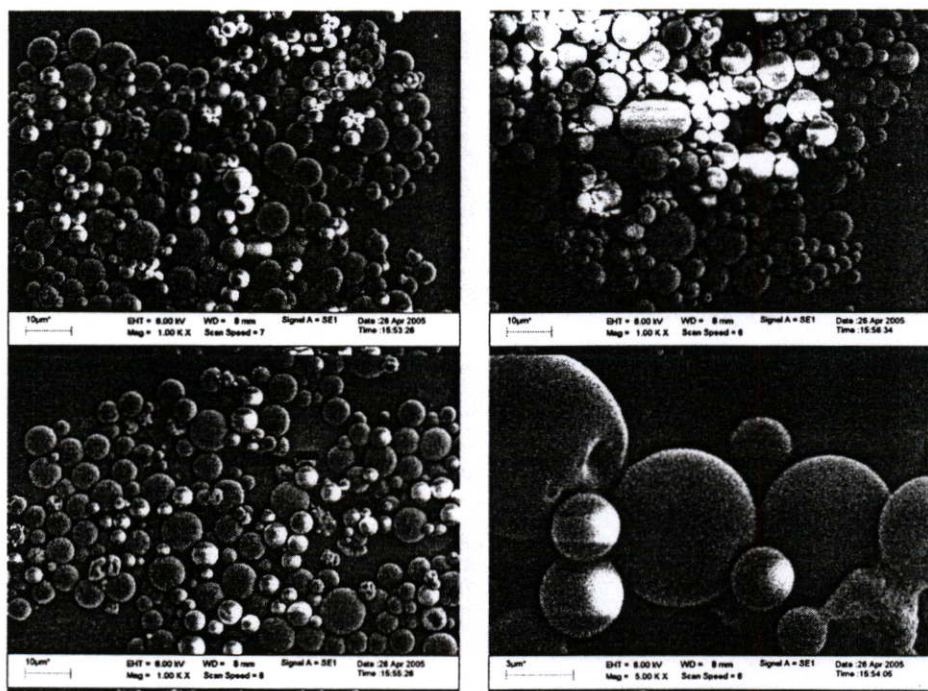
รูปที่ 4.2 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

โดยเฉลี่ยอนุภาคโคโคซานที่มีสารละลายโคโคซานที่ความเข้มข้น 0.2% (w/v) จะมีขนาดเล็กกว่าอนุภาคของโคโคซานที่ได้จากสารละลายโคโคซานที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) เล็กน้อย

4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ที่เหมาะสม

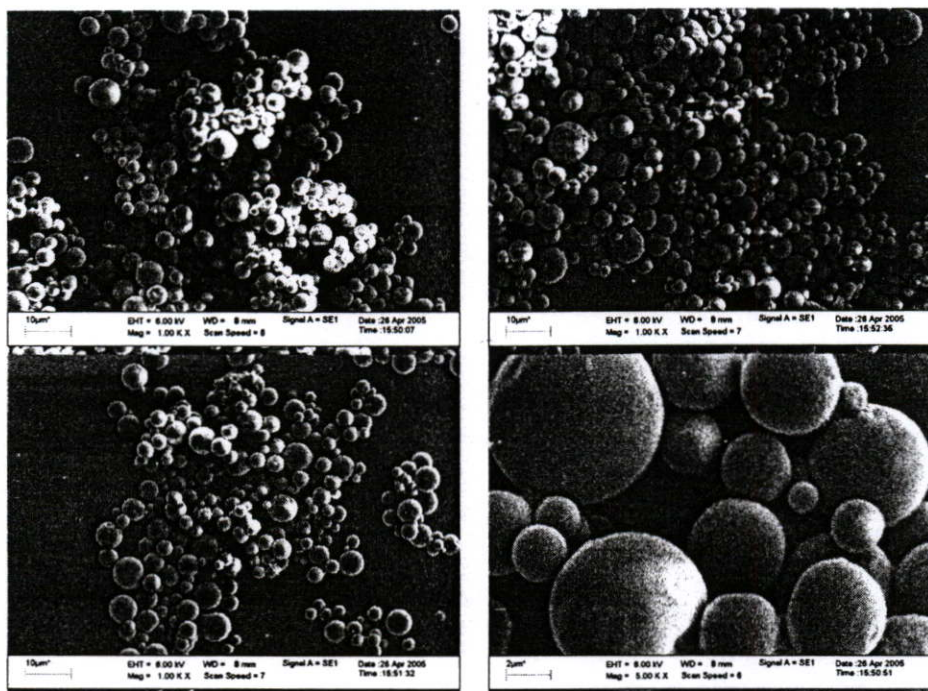
ความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ที่ทำการศึกษา คือ 5, 10, 25 และ 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และตัวแปรอื่นๆ ถูกควบคุมให้คงที่ คือ สารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) เท่ากับ 250 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้งเท่ากับ 35,000 รอบต่อนาที

จากการศึกษาพบว่า ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากการใช้สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 5% (v/v) มีรูปร่างกลม และพื้นผิวบางส่วนขรุขระเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.3



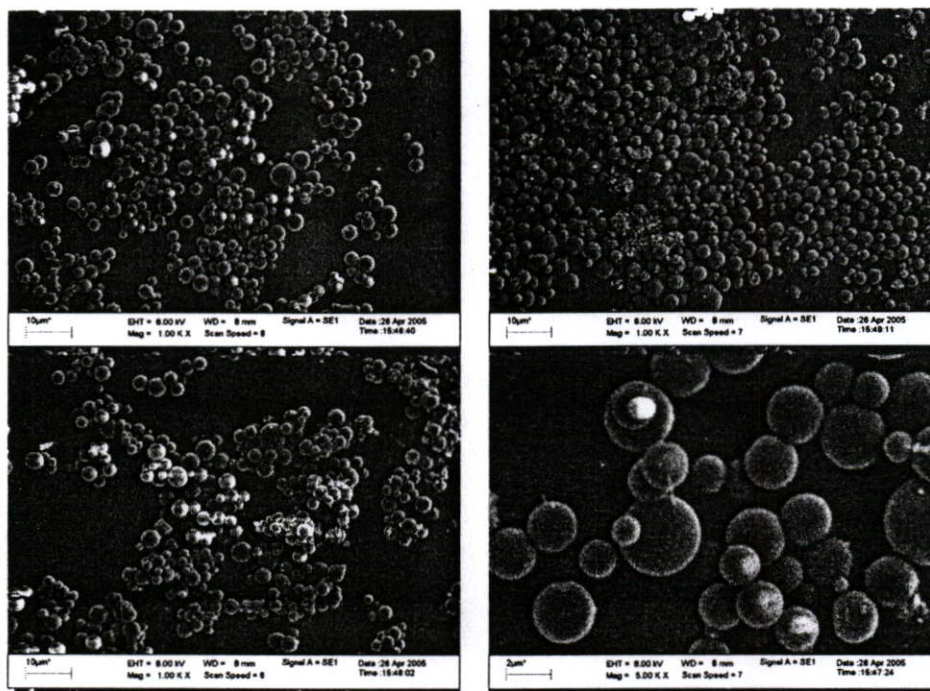
รูปที่ 4.3 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 5% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากการใช้สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 10% (v/v) มีรูปทรงกลม และพื้นผิวบางส่วนขรุขระเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากการใช้สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) มีรูปร่างกลม และพื้นผิวเรียบ ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วยอบในการพ่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

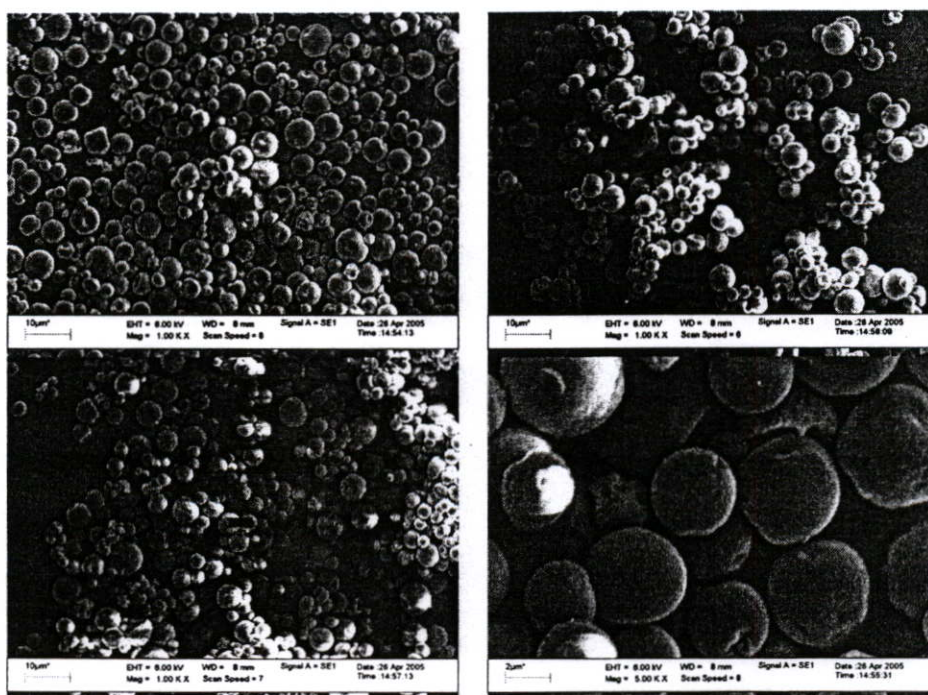
เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เพิ่มขึ้น จะทำให้ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคโคโคซานที่ได้ลดลง เช่นเดียวกันเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย กลูทาร์ลดีไฮด์ลดลง ทำให้พื้นผิวของอนุภาคโคโคซานขรุขระเพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลองสภาวะที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ 5 และ 10% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ไม่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC เนื่องจากอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่ได้มีพื้นผิวที่ขรุขระ

4.1.3 ผลการศึกษาปริมาณของสารละลายกุกูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ที่เหมาะสม

ปริมาณของสารละลายกุกูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ที่ทำการศึกษา คือ 1, 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร และตัวแปรอื่นๆ ถูกควบคุมให้คงที่ คือ สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) เท่ากับ 250 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้งเท่ากับ 35,000 rpm

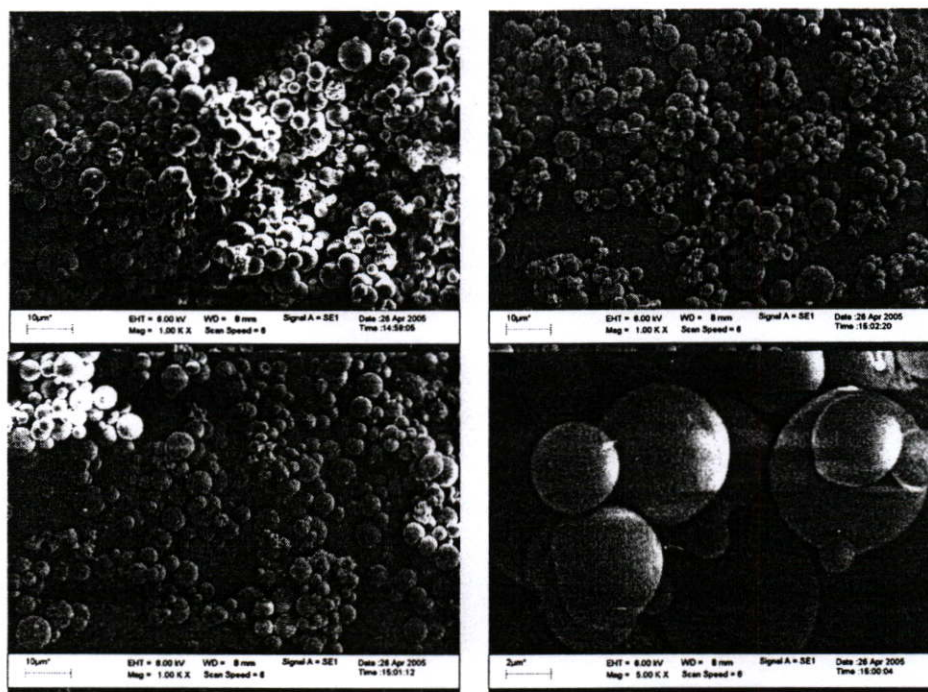
จากการศึกษาพบว่า ลักษณะอนุภาคไคโตซานที่ได้จากการใช้สารละลายกุกูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีรูปร่างกลม และพื้นผิวบางส่วนขรุขระ ดังแสดงในรูปที่

4.6



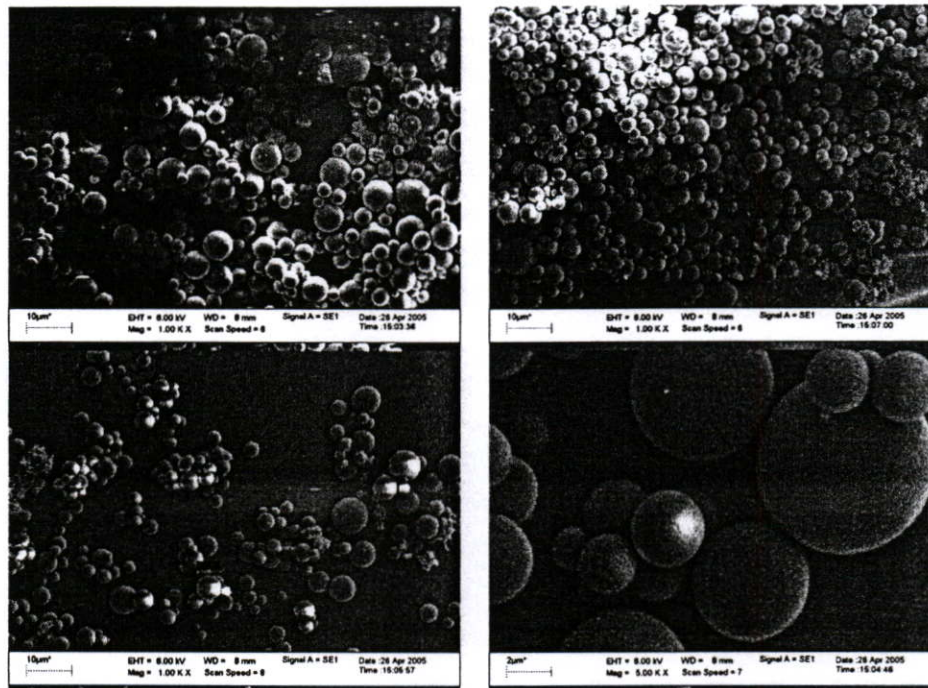
รูปที่ 4.6 อนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมจากสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกุกูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากการใช้สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มีรูปร่างกลม และพื้นผิวบางส่วนขรุขระเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และความเร็วยอบในการพ่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

ลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากการใช้สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และลักษณะอนุภาคโคโคซานที่ได้จากการใช้สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8 อนุภาคของโคโคซานที่ได้มีรูปทรงกลม พื้นผิวเรียบ



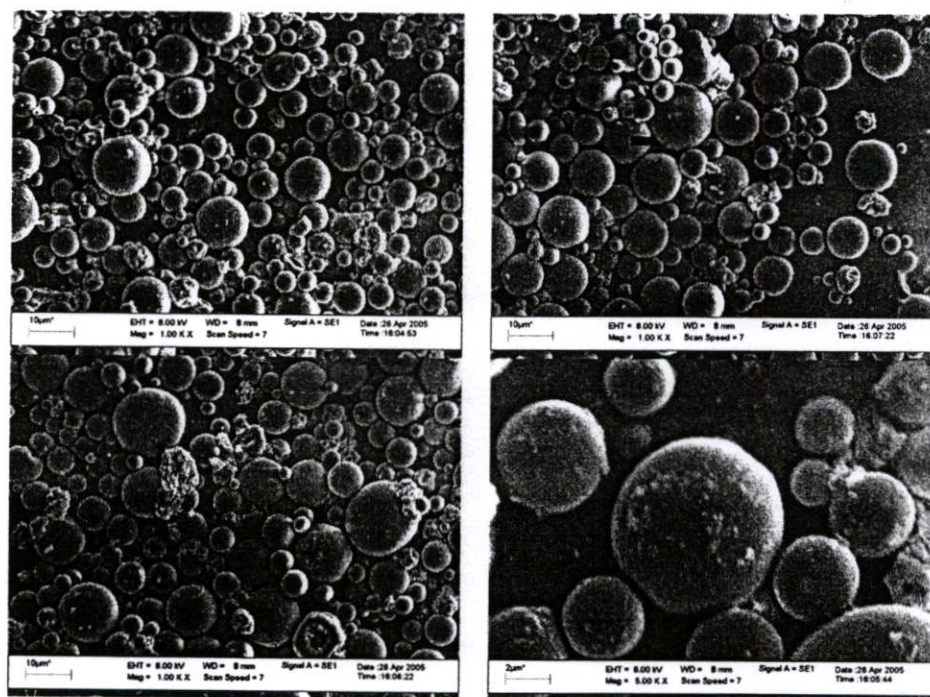
รูปที่ 4.8 อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมจากสารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที

เมื่อปริมาตรสารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เพิ่มขึ้น อนุภาคของโคโคซานที่ได้มีขนาดเฉลี่ยเล็กลง และพื้นผิวมีลักษณะเรียบมากขึ้น จากผลการทดลองสภาวะที่ใช้ปริมาตรของสารละลายกลูทาร์ดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) คือ 1 และ 2 มิลลิลิตร ไม่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC เนื่องจากอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่ได้มีพื้นผิวที่ขรุขระ

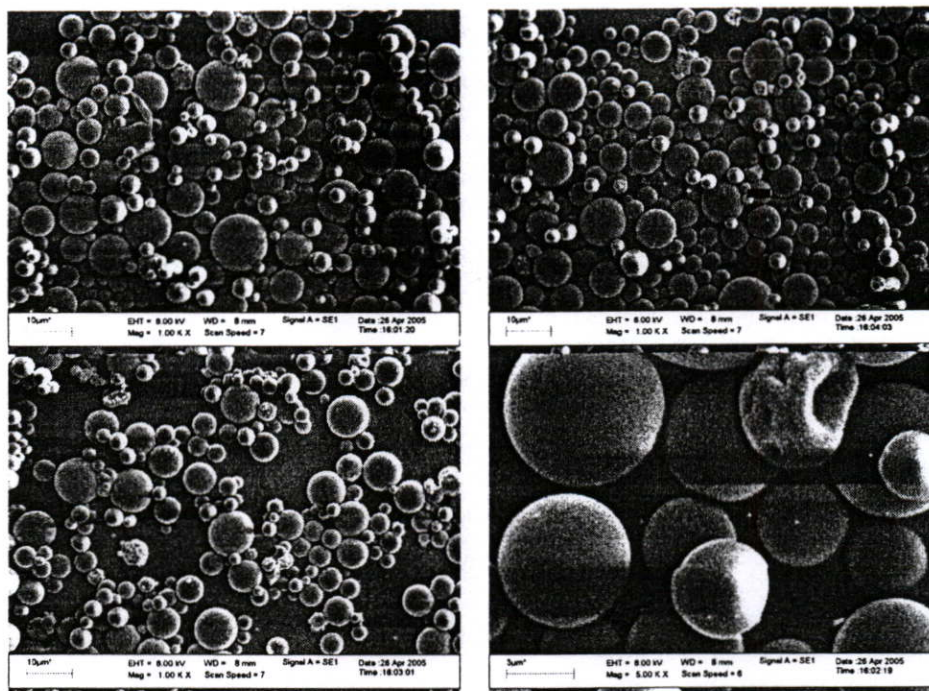
4.1.4 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (atomizer speed) ที่เหมาะสม

ความเร็วรอบในการพ่นแห้งที่ทำการศึกษา คือ 25000, 30000, 35000 และ 40000 รอบต่อนาที และตัวแปรอื่นๆ ถูกควบคุมให้คงที่ คือ สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) เท่ากับ 250 มิลลิลิตร และสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

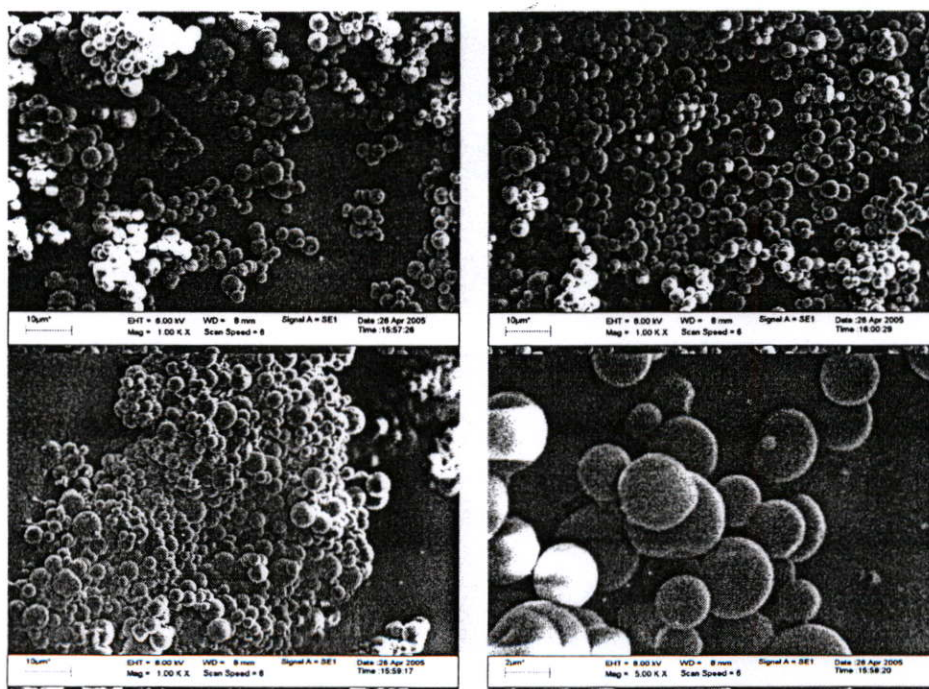
จากการศึกษาพบว่า ลักษณะอนุภาคไคโตซานที่ได้จากการพ่นแห้งด้วยความเร็วรอบ 25000, 30000, 35000 และ 40000 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 4.9, 4.2, 4.10 และ 4.11 ตามลำดับ เมื่อความเร็วรอบในการพ่นแห้งเพิ่มมากขึ้น อนุภาคของไคโตซานที่ได้จะมีขนาดเล็กลง



รูปที่ 4.9 อนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมจากสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการพ่นแห้ง 25,000 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.10 อนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมจากสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทารัลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 30,000 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.11 อนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมจากสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทารัลดีไฮด์เข้มข้น 25% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 40,000 รอบต่อนาที

ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานพบว่า

- (1) เมื่อความเข้มข้นของสารละลายไคโตซานเพิ่มขึ้น ทำให้ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคไคโตซานใหญ่ขึ้น
- (2) เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ลดลง ทำให้ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคไคโตซานใหญ่ขึ้น และทำให้พื้นผิวของอนุภาคไคโตซานถูกทำลายมากขึ้น
- (3) เมื่อปริมาตรสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เพิ่มขึ้น ทำให้ขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคของไคโตซานเล็กลง และมีพื้นผิวลักษณะเรียบมากขึ้น
- (4) เมื่อความเร็วรอบในการพ่นแห้งเพิ่มมากขึ้น ทำให้อนุภาคของไคโตซานมีขนาดเล็ก

จากผลการทดลอง สภาวะในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานดังรูปที่ 4.1, 4.2, 4.5, 4.8, 4.9, 4.10 และ 4.11 ที่ได้พบว่า ขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันมากนัก และเมื่อดูจากคุณสมบัติของอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC คือ มีรูปร่างลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3 – 10 μm ทนต่อความดันสูงในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง คุณสมบัติดังกล่าวสามารถพบในสภาวะการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่มีสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการพ่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ทนต่อแรงดันสูง เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารเชื่อมโยงเข้มข้น 50% (v/v) ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่าสภาวะอื่นๆ

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน เพื่อประยุกต์ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ HPLC คือ

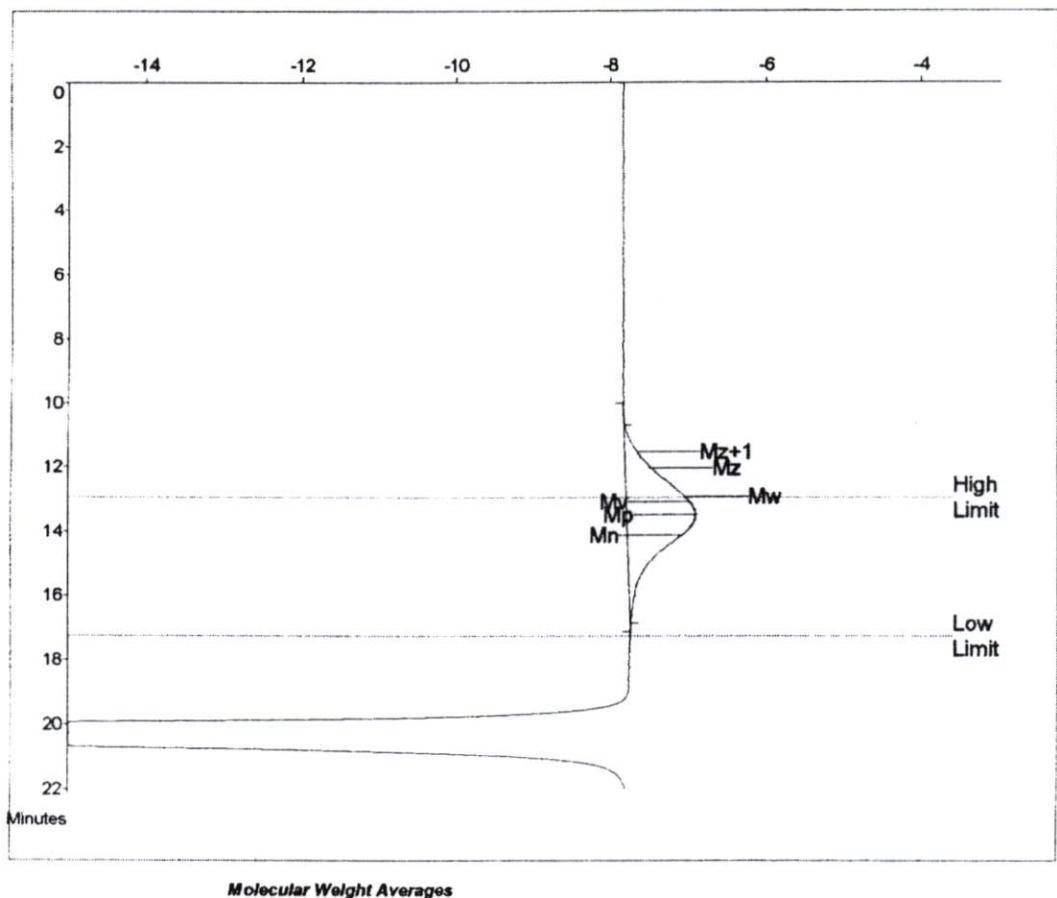
- (1) สารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v)
- (2) สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อสารละลายไคโตซาน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- (3) ความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (atomizer speed) 35,000 รอบต่อนาที

4.2 การศึกษาคุณลักษณะอนุภาคทรงกลมของไคโตซาน

นำอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมได้จากสถานะที่มีสารละลายไคโตซานเข้มข้น 0.5% (w/v) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, สารละลายกลูทารัลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และความเร็วรอบในการปั่นแห้ง 35,000 รอบต่อนาที ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC มาทำการศึกษาคุณลักษณะดังต่อไปนี้

4.2.1 น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน

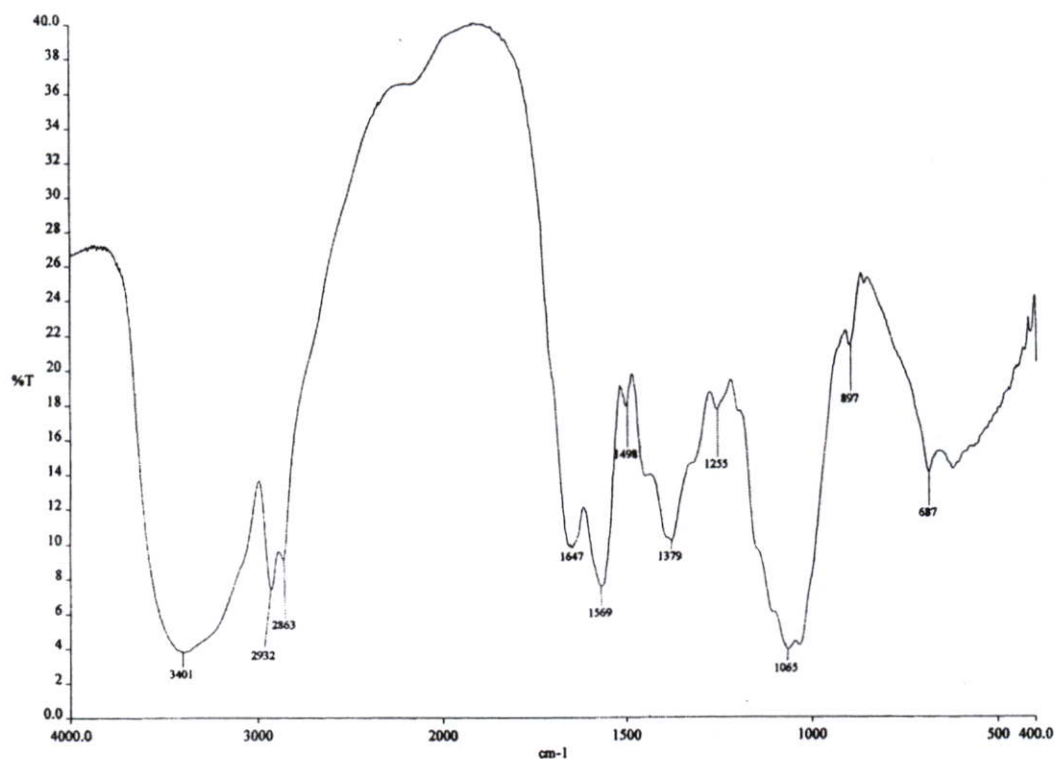
น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่เตรียมได้ ศึกษาโดยอาศัยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC) ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.12 พบว่า ไคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 785,980



รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่เตรียมได้
ด้วยเทคนิค GPC

4.2.2 หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคทรงกลมของโคโตซานที่เตรียมได้

หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคโคโตซานที่เตรียมได้ ศึกษาโดยใช้เทคนิคฟูเรียร์-ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี KBr disc ได้สเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 IR-spectrum ของอนุภาคทรงกลมโคโตซานที่เตรียมได้

จาก IR-spectrum รูปที่ 4.13 ปรากฏตำแหน่งสเปกตรัมที่สำคัญซึ่งเป็นผลเนื่องจากการสั่นและการงอของพันธะ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

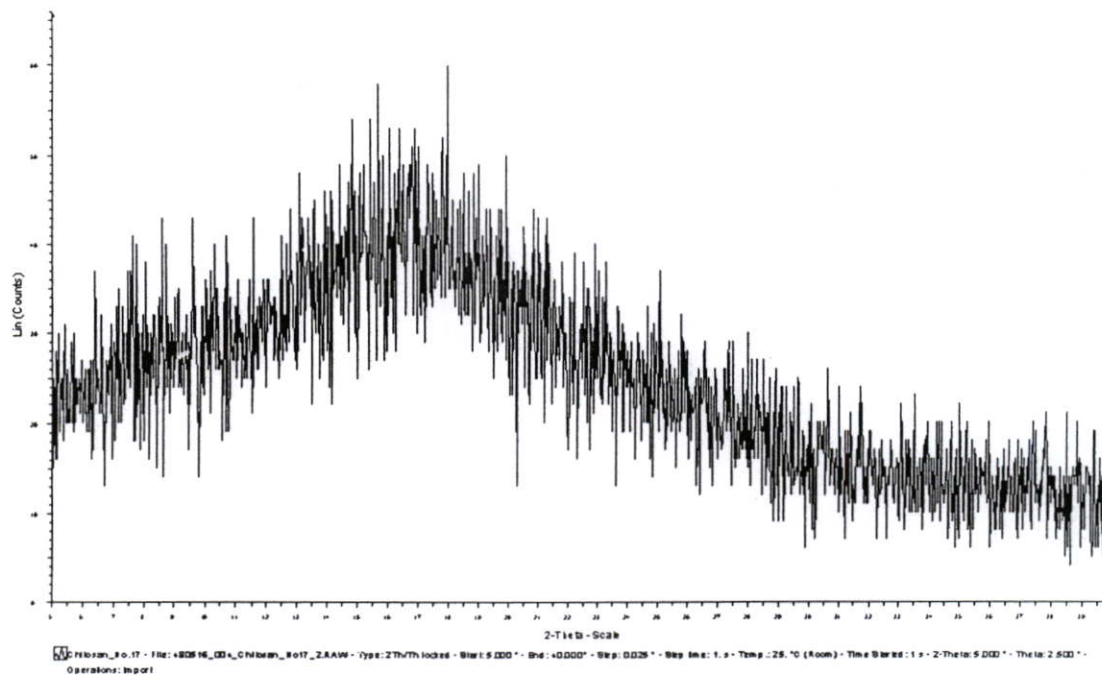
ตารางที่ 4.1 แสดง wave number ที่สำคัญของหมู่ฟังก์ชันในอนุภาคทรงกลมโคโตซาน

หมู่ฟังก์ชัน	wave number (cm ⁻¹)
V _s NH (-NH ₂)	~ 3400
V OH	~ 3340
V _{as} CH (-CH ₂ -)	~ 2926
V _s CH (-CH ₂ -)	~ 2863
V C=O (-NHCOCH ₃)	~ 1647
δ NH (R-NH ₂)	~ 1569

หมายเหตุ V - stretching, V_s - symmetric stretching,
V_{as} - asymmetric stretching, δ - bending

4.2.3 โครงสร้างของอนุภาคทรงกลมโคโตซาน

โครงสร้างของอนุภาคทรงกลมโคโตซาน ศึกษาโดยใช้เทคนิค X-ray diffraction (XRD) ได้ผลสเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.14

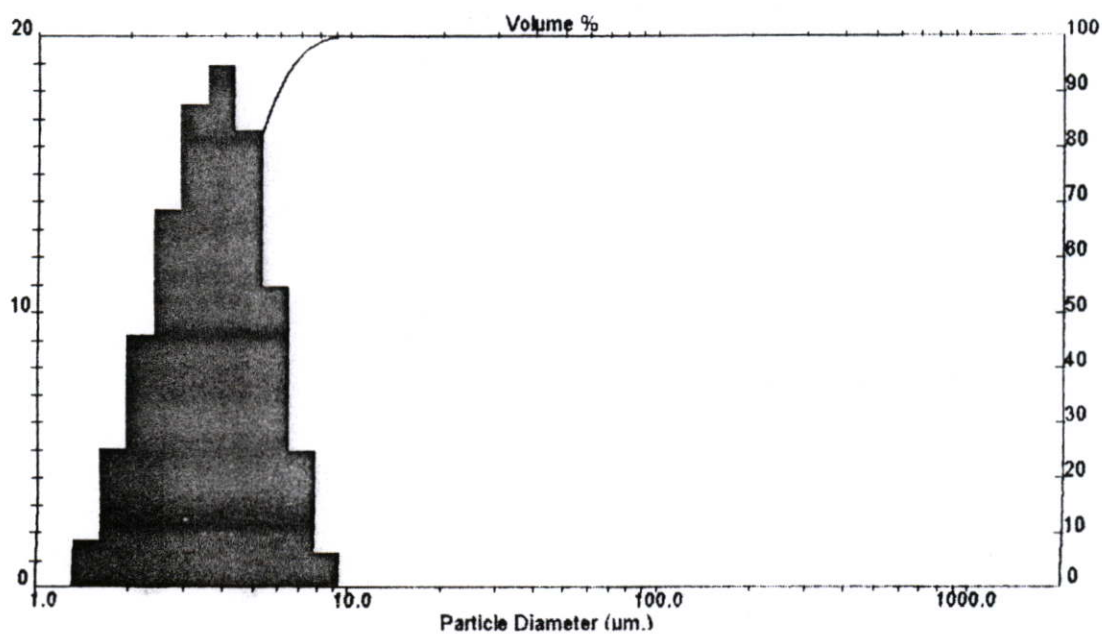


รูปที่ 4.14 สเปกตรัม XRD อนุภาคทรงกลมของโคโตซาน

จากรูปที่ 4.14 พบว่า สเปกตรัมอนุภาคทรงกลมของโคโตซานจาก X-ray diffraction pattern ที่ได้มีลักษณะที่ไม่เป็นพีคแหลม ทำให้สรุปได้ว่า อนุภาคทรงกลมของโคโตซานที่เตรียมได้เป็นอนุภาคทรงกลมของโคโตซานแบบอสัณฐาน (amorphous)

4.2.4 การกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมโคโคซานที่เตรียมได้

การกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมโคโคซาน ศึกษาโดยใช้เทคนิค light scattering analysis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.15

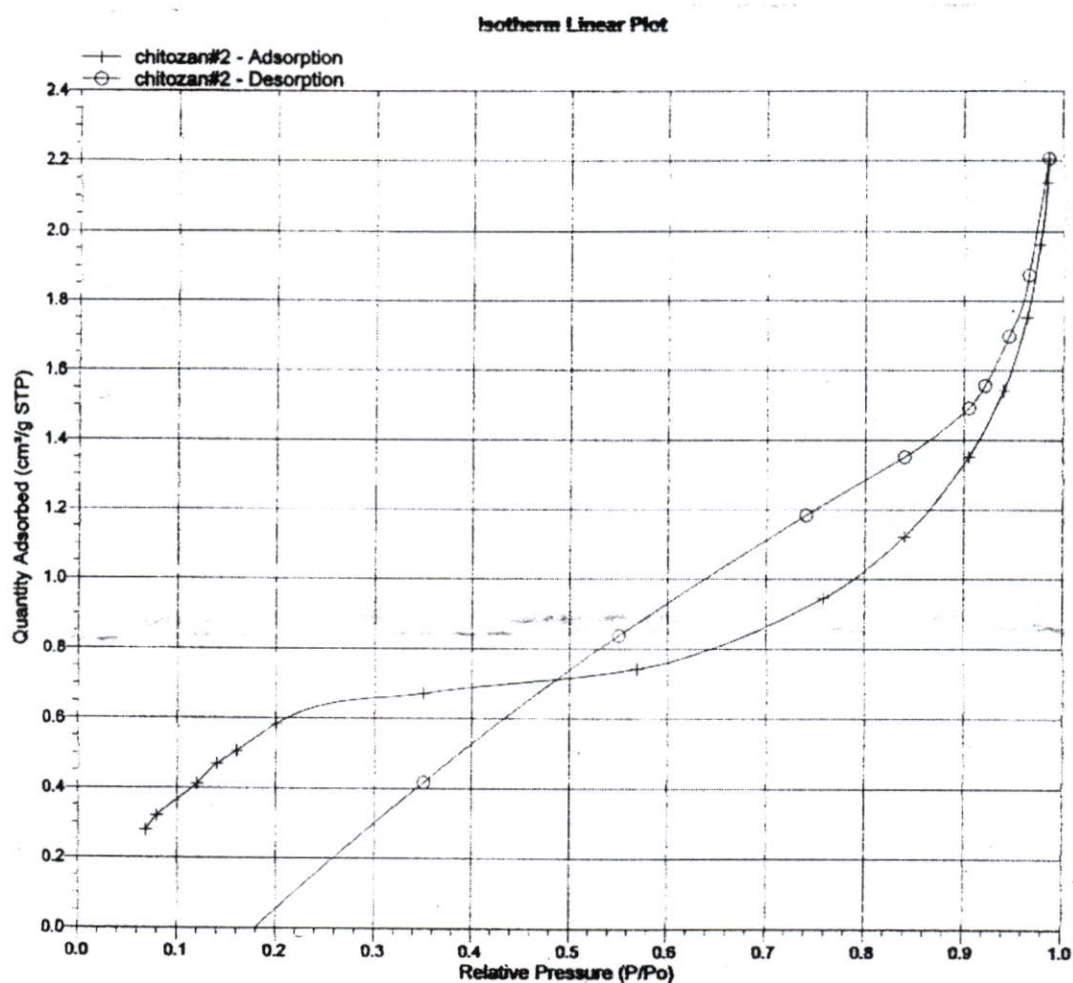


รูปที่ 4.15 แสดงการกระจายตัวของอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมได้

จากรูปที่ 4.15 พบว่า อนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมได้โดยส่วนมากมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4.08 ไมโครเมตร

4.2.5 พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของอนุภาคทรงกลมไคโตซานที่เตรียมได้

พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของอนุภาคทรงกลมไคโตซาน โดยใช้เทคนิค Braunaver-Emmett-Teller (BET method) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 แสดงรูปไอโซเทอมการแอดซอร์บ (adsorb) ก๊าซไนโตรเจนบน
ผิวอนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมได้

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค BET พบว่า อนุภาคทรงกลมของไคโตซานที่เตรียมได้มีพื้นที่
ผิวประมาณ 3.02 ตารางเมตรต่อกรัม และมีขนาดรูพรุน 43.72 Å

4.3 การศึกษาตัวแปรทางโครมาโทกราฟี

4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ทางทฤษฎี

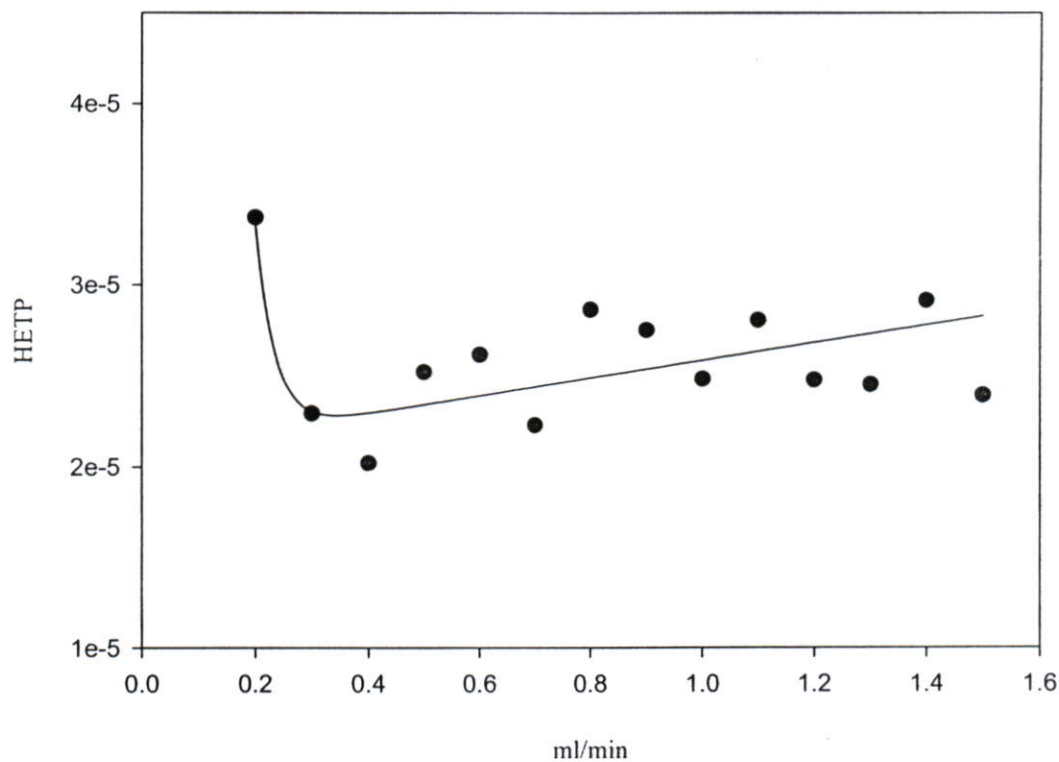
การทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ทางทฤษฎีโครมาโทกราฟี สามารถทำได้โดยการสร้างกราฟแวนดีมเตอร์ (Van deemter graph) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน ในงานวิจัยนี้ใช้สารมาตรฐานโทลูอิน (Toluene) เพื่อหาค่าจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of theoretical plate; N) และค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (height equivalent to a theoretical plate; HETP)

4.3.1.1 กราฟแวนดีมเตอร์

กราฟแวนดีมเตอร์สร้างได้จากการพลอตกราฟระหว่างค่า HETP กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ในที่นี้ใช้สารมาตรฐาน คือ สารละลายมาตรฐานโทลูอินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร และใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนไตรล์ค่อน้ำ (75:25) ค่า HETP แต่ละค่าได้จากการคำนวณค่าจำนวนเพลทจากค่าเวลาการคงไว้ที่อัตราไหลต่างๆ กัน จากนั้นนำมาคำนวณค่า HETP โดยใช้สูตรความสัมพันธ์ที่ว่า $H = \frac{L}{N}$ ดังแสดงใน

ภาคผนวก ก

Van deemter



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงค่าความสูงของเพลท (HETP) ของสารละลายมาตรฐาน โทลูอินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร, ในเฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไนโตรเจน (75:25)

กราฟแวนเดอเมเตอร์ได้จากการพลอตระหว่างค่า HETP (ซึ่งได้จากการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ก) กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่า จำนวนเพลททางทฤษฎี (N) เท่ากับ 12,312 เพลทต่อเมตร และค่าความสูงของเพลททางทฤษฎีต่ำที่สุด (H_{min}) เท่ากับ 2.02184×10^{-5} m ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.4 ml/min

สมการแวนดิมเตอร์ของกราฟ คือ

$$H = (2.1 \times 10^{-5}) + \frac{(5.5 \times 10^{-8})}{X} + (4.8 \times 10^{-6})X$$

โดยที่ พจน์ A เท่ากับ 2.1×10^{-5}

พจน์ B เท่ากับ 5.5×10^{-8}

พจน์ C เท่ากับ 4.8×10^{-6}

หมายเหตุ การคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก ก

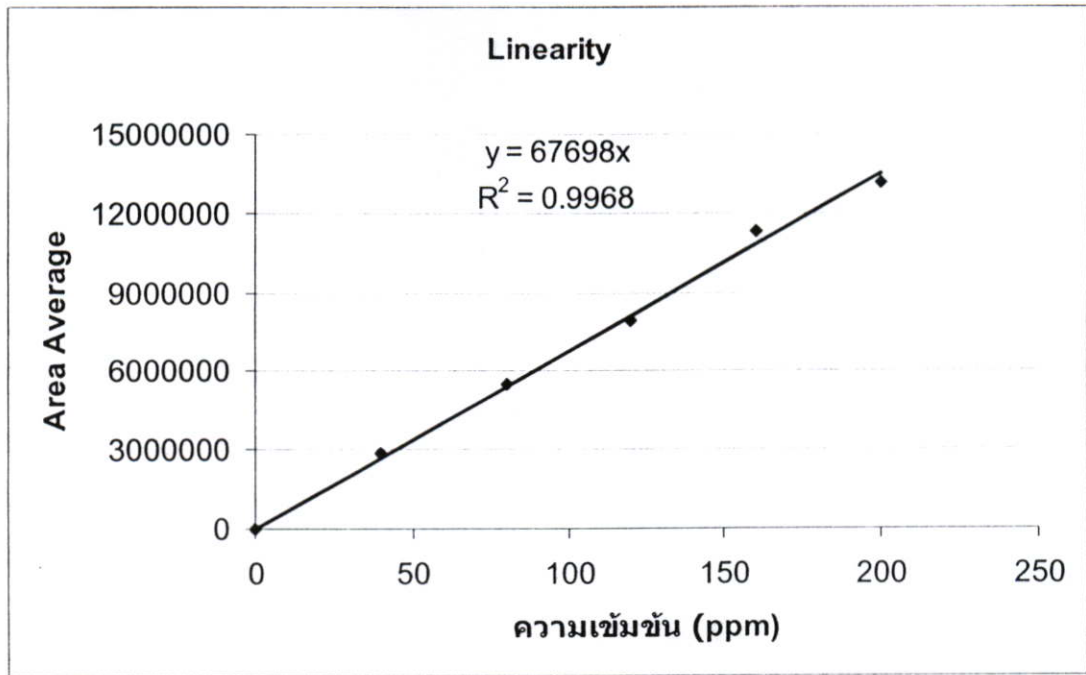
จากกราฟแวนดิมเตอร์และสมการแวนดิมเตอร์ที่ได้ พบว่า พจน์ A ซึ่งเป็นแฟกเตอร์ของการแพร่วนที่ได้มีค่าค่อนข้างมาก สืบเนื่องมาจากความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาคที่ใช้ในการบรรจุคอลัมน์มีความแตกต่างกันซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 2-9 μm มีผลทำให้ระยะทางในการเคลื่อนที่ของสารแต่ละโมเลกุลเกิดขึ้นหลายทิศทาง เกิดระยะทางในการเคลื่อนที่เพื่อออกจากคอลัมน์ของสารไม่เท่ากัน พิคหรือแบนด์ที่จึงกว้าง ซึ่งเมื่อค่าพจน์ A ที่ได้จากสมการแวนดิมเตอร์มีค่ามาก จึงส่งผลต่อค่า H ให้มากขึ้นด้วย พจน์ B ซึ่งเป็นแฟกเตอร์ของการแพร่ตามความยาวคอลัมน์ ซึ่งถ้าไซนของโมเลกุลเคลื่อนที่ในคอลัมน์นานการแพร่จะเกิดขึ้นมาก เวลาที่ใช้ในการชะจะนานขึ้น ทำให้การกระจายของแบนด์กว้างขึ้น จึงส่งผลให้ค่า H เพิ่มมากขึ้นด้วย แต่เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของโมเลกุลในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลวจะมีค่าน้อยกว่าในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแก๊ส แฟกเตอร์การแพร่ตามความยาวคอลัมน์จึงไม่มีผลต่อเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลว และจากพจน์ C ซึ่งเป็นแฟกเตอร์ที่เกี่ยวกับการถ่ายโอนมวลของโมเลกุลของสารที่อยู่ระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ จากสมการค่าที่ได้มีค่าค่อนข้างมากซึ่งอาจเกิดจากการถ่ายโอนมวลของโมเลกุลสารตัวอย่างระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ มีอัตราที่เกิดช้ากว่าโมเลกุลของสารที่เคลื่อนที่ในเฟสเคลื่อนที่ จึงทำให้โมเลกุลของสารที่อยู่ในภาวะสมดุลเคลื่อนที่ผ่านออกจากคอลัมน์ได้น้อย ส่งผลให้ค่า H เพิ่มมากขึ้นด้วย

4.3.2 การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของคอลัมน์

การทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของคอลัมน์โคโตซานที่เตรียมได้ ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานที่พลอตระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่พีค ในที่นี้ใช้สารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน (acetaminophen) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร, สภาพวะของเครื่อง HPLC : เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไน ไทรล์/น้ำ (75:25) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที, UV-detector ที่ 254 นาโนเมตร ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.2 และเมื่อนำมาพลอตกราฟได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 4.18 ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ (relative coefficient ; R^2) เท่ากับ 0.9968

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่พีค	พื้นที่พีคเฉลี่ย	เวลาการคงไว้ (min)
0	0	0	0
40	2756246	2836018.333	5.511
	2853487		5.514
	2898322		5.521
80	5526730	5493175	5.511
	5510695		5.485
	5442100		5.455
120	7950737	7951382.333	5.463
	8003661		5.429
	7899749		5.410
160	11485614	11316827.33	5.301
	11544443		5.287
	10920425		5.368
200	13118556	13198257.67	5.392
	13195841		5.404
	13280376		5.406

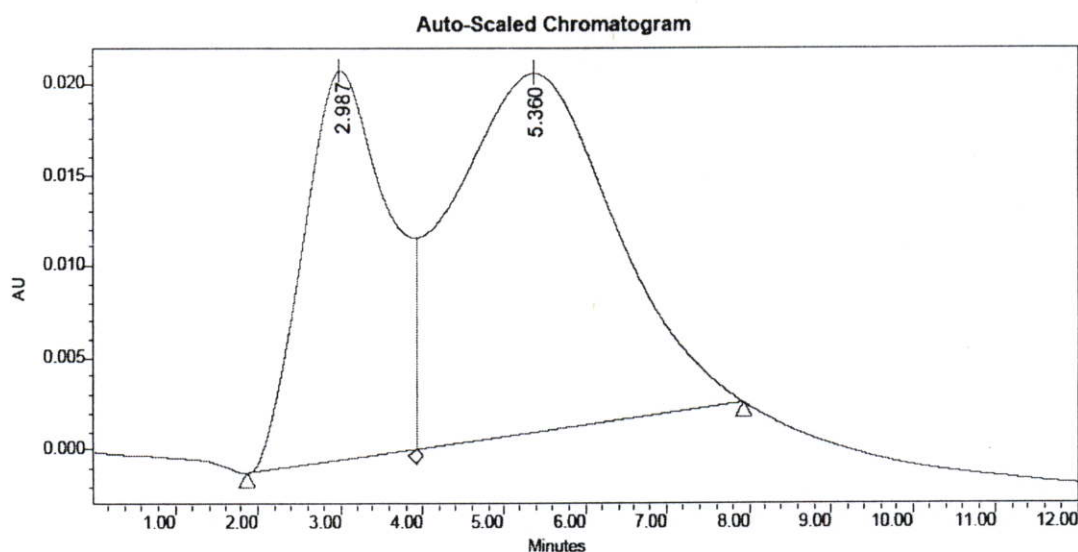


รูปที่ 4.18 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน

4.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสาร

การทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์ (Acetanilide) และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) เข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ฉีด 10 ไมโครลิตร ด้วยคอลัมน์โคโตซานที่เตรียมได้ สภาวะของเครื่อง HPLC : เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนโตรล/น้ำ (75:25), อะซิโทรไนโตรล/น้ำ (90:10) และ 100% เมทานอล ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที, UV-detector ที่ 254 นาโนเมตร

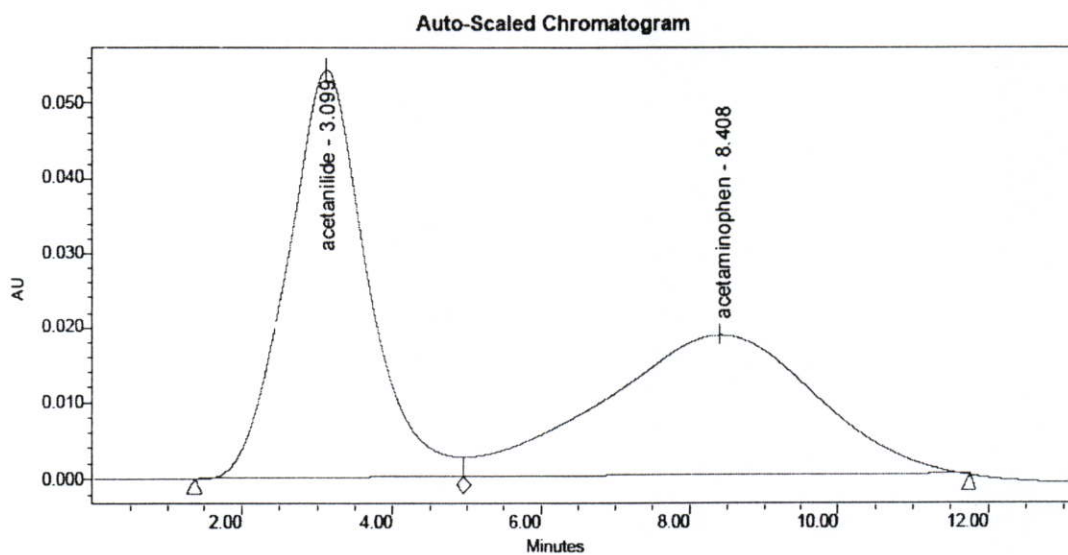
จากการทดลอง พบว่า เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนโตรล/น้ำ (75:25) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยคอลัมน์โคโตซานที่เตรียมได้ ค่าความสามารถในการแยก (Resolution) ของสารเท่ากับ 0.787879 แสดงว่า สารทั้งสองชนิดแยกออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์มีส่วนของพีคที่ซ้อนกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์

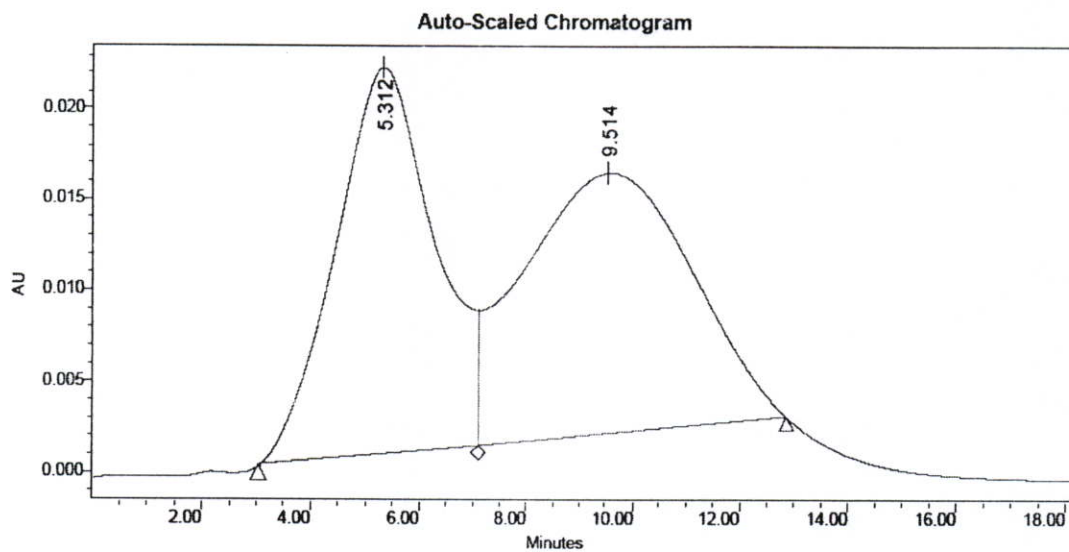
และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนโตรล/น้ำ (75:25) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรโนไทรล์/น้ำ (90:10) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยคอลัมน์โคโคซานที่เตรียมได้ ความสามารถในการแยกของสารได้ค่าการแยก เท่ากับ 1.061224 แสดงว่า สารทั้งสองชนิดแยกออกจากกันได้ถึง 94% และอีก 6% จะเป็นพีคส่วนที่คาบเกี่ยวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์ และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรโนไทรล์/น้ำ (90:10) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยคอลัมน์โคโคซานที่เตรียมได้ พบว่า ความสามารถในการแยกของสารได้ค่าการแยก เท่ากับ 0.873239 แสดงว่า สารทั้งสองชนิดแยกออกจากกันได้ไม่สมบูรณ์ เป็นพีคที่คาบเกี่ยวกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.21



รูปที่ 4.21 โครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่างสารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์ และสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

4.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพการแยกสารแต่ละชนิดด้วยคอลัมน์ไอโคซาน

การทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสารละลายมาตรฐานต่างๆ ด้วยคอลัมน์ไอโคซานที่เตรียมได้ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างๆ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ UV-detector ที่ 254 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.3 แสดงเวลากงไว้ของสารมาตรฐานต่างๆ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างๆ กัน

สารละลายมาตรฐาน	ACN/H ₂ O (75:25)	ACN/H ₂ O (90:10)	100% MeOH
Toluene	2.164	1.995	2.718
Biphenyl	2.157	2.002	3.605
Nitrobenzene	2.221	2.059	3.836
Acetanilide	2.832	3.112	3.768
Phenol	3.119	3.184	4.620
Benzamide	3.741	4.990	4.837
Acetaminophen	5.089	8.480	6.729

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการวิจัยสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคทรงกลมของโคโคซาน เพื่อประยุกต์ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ HPLC คือ

- (1) สารละลายโคโคซานเข้มข้น 0.5% (w/v)
- (2) สารละลายกลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อสารละลายโคโคซาน ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- (3) ความเร็วรอบในการพ่นแห้ง (atomizer speed) 35,000 รอบต่อนาที

โคโคซานที่เตรียมได้จากเปลือกกุ้ง เมื่อนำมาเตรียมเป็นอนุภาคทรงกลมของโคโคซานโดยอาศัยปฏิกิริยาเชื่อมโยงพันธะด้วยสารกลูทาร์ลดีไฮด์ แล้วนำมาพ่นแห้ง และกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลด้วยไพรีดีน ทำให้ได้อนุภาคที่เหมาะสมในการเตรียมเป็นเฟสอยู่กับที่ของคอลัมน์ HPLC โดยมีลักษณะเป็นอนุภาคทรงกลมสม่ำเสมอ พื้นผิวเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.08 ไมโครเมตร พื้นที่ผิวเฉลี่ย 3.02 ตารางเมตรต่อกรัม, ขนาดรูพรุนสูงสุด 43.72 Å และมีโครงสร้างแบบอสัณฐาน

จากผลการวิจัย เมื่อนำอนุภาคทรงกลมของโคโคซานที่เตรียมได้นั้นมาใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC พบว่าจำนวนเพลทสูงสุดมีค่าเท่ากับ 12,312 เพลทต่อเมตร และค่าความสูงของเพลททางทฤษฎีต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 2.02×10^{-5} เมตร ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้สารมาตรฐานโทลูอิน และใช้เฟสเคลื่อนที่คือ อะซิโทรโนไทรล์/น้ำ (75:25) โดยจากโครมาโทแกรมการแยกสารต่างๆ พบว่าพีคของสารที่ได้มีการกระจายตัวของแถบที่กว้างทำให้เกิดการแยกของสารต่างๆ ได้ไม่ดี ซึ่งเป็นผลมาจากขนาดและความสม่ำเสมอของอนุภาคที่ใช้บรรจุคอลัมน์ที่แตกต่างกันจึงทำให้เกิดอิทธิพลของการแพร่วนของสารมีผลให้ระยะทางในการเคลื่อนที่ของสารแต่ละ โมเลกุลไม่เท่ากัน และผลจากการถ่ายโอนมวลของโมเลกุลของสารที่แยกระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ซึ่งมีรูพรุนเป็นช่องว่างทำให้โมเลกุลของสารที่ต้องการแยกบางส่วนแทรกเข้าไปในรูพรุนได้จึงทำให้เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ช้า ถ้าบรรจุอนุภาคในคอลัมน์ที่มีความหนาแน่นมากๆ โมเลกุลของสารจะถูกยึดหรือจับไว้นานเกินไป ดูเหมือนว่าโมเลกุลถูกจับอยู่หลายๆ ชั้นบนเฟสอยู่กับที่ และมีบางส่วนของโมเลกุลเท่านั้นที่หลุดออกมาจากเฟสอยู่กับที่ จึงทำให้แถบหรือพีคที่ได้มีความกว้าง และสาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้ค่าการแยกของสารที่ได้จากคอลัมน์โคโคซานนี้ออกมาไม่ดีนักอาจสืบเนื่องมาจากจำนวนของหมู่ฟังก์ชันที่ใช้

เป็นหมู่เกิดอันตรกิริยากับสารที่ต้องการแยกมีจำนวนน้อย ประกอบกับพื้นที่ผิวของอนุภาคทรงกลมของโคโคซานมีค่าน้อย จึงส่งผลให้คอลัมน์ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร แต่จากผลการวิจัยพอสรุปได้ว่า แนวโน้มของการใช้อนุภาคทรงกลมโคโคซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้งใช้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ HPLC ระบบนอร์มัลเฟส (normal phase) มีแนวโน้มที่เป็นไปได้สูง

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัย จึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป คือ ขนาดและความสม่ำเสมอของอนุภาคของสารที่จะนำมาใช้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ HPLC ควรให้มีความสม่ำเสมอเท่ากัน โดยควรมีการกระจายตัวของอนุภาคอยู่ในช่วงแคบๆ และทำการปรับปรุงหมู่ฟังก์ชันเพื่อนำไปใช้แยกและวิเคราะห์สารได้กว้างขวางขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- [1] ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธ์ “ยุทธศาสตร์ไคติน-ไคโตซาน เพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย” *Journal of Technology Thonburi* 1 (2004) 18–26
- [2] จิราภรณ์ ชาวลิขิตสุขุมมาวาตี “ไคติน-ไคโตซาน สารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ” *LAB.TODAY*, ตุลาคม 2544
- [3] ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ “ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน” สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ, 2548
- [4] Y. Peng, B. Han, W. Liu and X. Xu “**Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan**” *Carbohydrate Research* xxx (2005) xxx–xxx
- [5] Y. Tong, S. Wang, J. Xu, B. Chua and C. He “**Synthesis of *O,O'*-dipalmitoyl chitosan and its amphiphilic properties and capability of cholesterol absorption**” *Carbohydrate Polymers* 60 (2005) 229–233
- [6] A. Zhu, M.B. Chan-Park, S. Dai and L. Li “**The aggregation behavior of *O*-carboxymethylchitosan in dilute aqueous solution**” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43 (2005) 143–149
- [7] J. Desbrières, C. Martinez and M. Rinaudo “**Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour**” *International Journal of Biological Macromolecules* 19 (1996) 21-28
- [8] สุวดี จันทร์กระจ่าง “การวิจัยและประยุกต์ใช้ไคติน/ไคโตซานในประเทศไทย” *พลาสติก*, 2544
- [9] ป๊วย อุ่นใจ “ไคติน-ไคโตซาน สารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ” *UPDATE*, กุมภาพันธ์ 2544
- [10] คณิตา ตังคณานุรักษ์ “**Chemical Separation Techniques**” โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, พฤษภาคม 2542
- [11] แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม “**Principle and Techniques of Instrumental Analysis**” ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ, 2534
- [12] P. He, S.S. Davis and L. Illum “**Chitosan microspheres prepared by spray drying**” *International Journal of Pharmaceutics* 187 (1999) 53–65
- [13] Y.C. Huang, M.K. Yeh and C.H. Chiang “**Formulation factors in preparing BTM–chitosan microspheres by spray drying method**” *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002) 239–242

- [14] B.F. Oliveira and M.H.A. Santana “**Spray-dried chitosan microspheres cross-linked with d,l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: reraration and characterization**” Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS 2004) São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol. B, pp. 1166–1173

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณค่าทางโครมาโทกราฟี

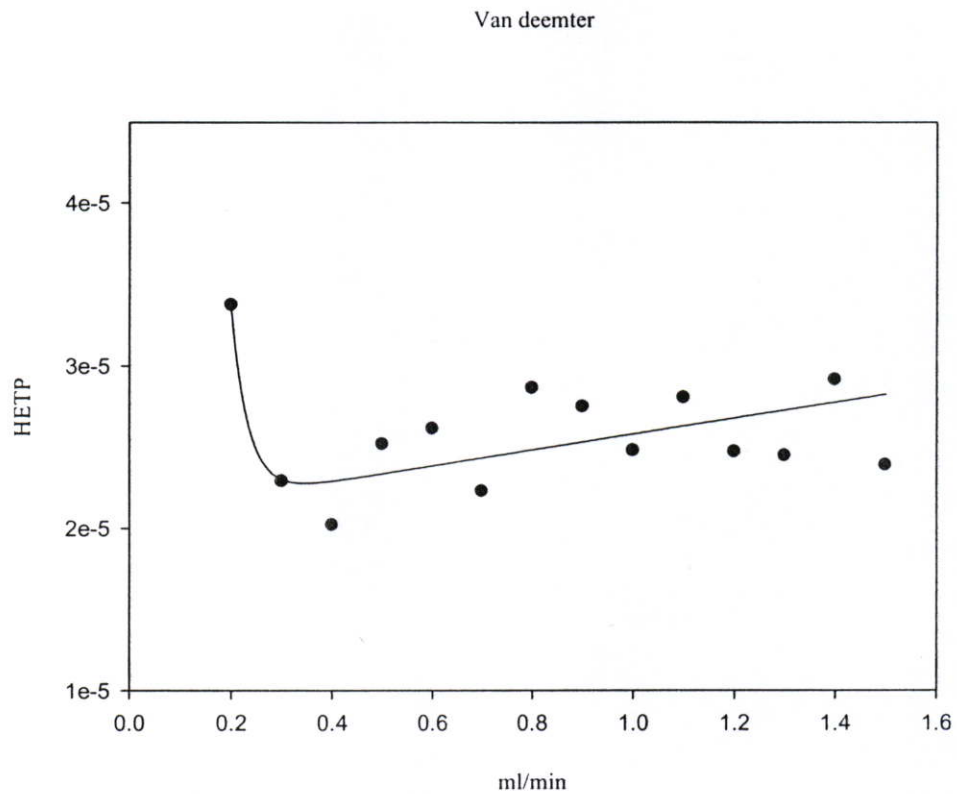
ตาราง ก1 การคำนวณอัตราการไหลกับค่าทฤษฎีทางเพลท

Flow rate (ml/min)	Rrtention time (min)	V (cm)	W _(0.5) (ml/min)	N (plate/m)	HETP
0.2	10.738	6.95	1.90	7412.627424	0.000033726233
0.3	7.105	7.10	1.60	10909.03906	0.0000229167756
0.4	5.267	6.60	1.40	12312.36750	0.0000203047873
0.5	4.217	6.35	1.50	9928.295556	0.0000251805558
0.6	3.517	6.65	1.60	9570.025391	0.0000261232327
0.7	3.056	8.55	1.90	11218.500000	0.0000222846192
0.8	2.683	6.95	1.75	8737.823673	0.0000286112434
0.9	2.396	7.70	1.90	9098.797784	0.0000274761574
1.0	2.164	6.40	1.50	10085.26222	0.0000247886465
1.1	1.964	5.15	1.30	8694.35799	0.0000287542795
1.2	1.806	7.05	1.65	10113.93388	0.000024718374
1.3	1.704	7.30	1.70	10215.45329	0.0000244727271
1.4	1.590	6.30	1.63	8275.908013	0.0000302081656
1.5	1.502	5.65	1.30	10464.535500	0.0000238902147

$$N = 5.54 \left(\frac{V}{W_{0.5}} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (L = \text{ความยาวคอลัมน์ m})$$

การคำนวณค่าเทอม A, B และ C จากกราฟแวนดีมเตอร์ (Van deemter graph)



สมการ $y = y_0 + ae^{-bx} + cx$

Coefficient

a 0.00406773

b 29.3991

c 0.0000048

y^0 0.0000210

หาค่า x และ y จากสมการได้ดังนี้

จาก $y = y_0 + ae^{-bx} + cx$ (1)

$y' = -bae^{-bx} + c$ (2)

กำหนดให้ $y' = 0$

จะได้ $-bae^{-bx} + c = 0$

$bae^{-bx} = c$ (3)

แทนค่าลงในสมการที่ (3)

$$\begin{aligned} \text{จะได้} \quad & (29.3991)(0.00406773)e^{-(29.3991)x} = 0.0000048 \\ & (0.11958760)e^{-(29.3991)x} = 0.0000048 \\ & e^{-(29.3991)x} = 0.00004014 \\ & \ln e^{-(29.3991)x} = \ln 0.00004014 \\ & -29.3991x = -10.1266 \\ & x = 0.3445 \end{aligned}$$

แทนค่า x ในสมการที่ (1)

$$\begin{aligned} y &= 0.000021 + (0.00406773)e^{-(29.3991)(0.3445)} + (0.0000048)(0.3445) \\ y &= 2.2816 \times 10^{-5} \end{aligned}$$

จากสมการ $y = y_0 + ae^{-bx} + cx$ เมื่อเปรียบเทียบกับสมการ Van deemter คือ $H = A + \frac{B}{x} + Cx$

$$y = y_0 + \frac{a}{e^{bx}} + cx \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$H = A + \frac{B}{x} + Cx \quad \dots\dots\dots(5)$$

ให้สมการที่ (4) เท่ากับ (5) จะได้

$$y = y_0 + \frac{a}{e^{bx}} + cx$$

$$\frac{a}{e^{bx}} = \frac{B}{x}$$

$$B = \frac{ax}{e^{bx}}$$

แทนค่าจะได้

$$B = \frac{(0.00406773)(0.3445)}{e^{(29.3991)(0.3445)}}$$

$$B = 5.5 \times 10^{-8}$$

จะได้ว่า

$$H = 2.2816 \times 10^{-5}$$

$$A = 2.1 \times 10^{-5}$$

$$B = 5.5 \times 10^{-8}$$

$$C = 4.8 \times 10^{-6}$$

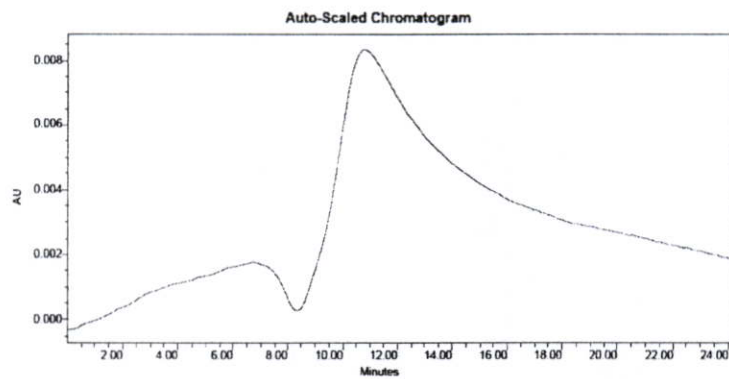
ดังนั้นสมการแวนติเมอร์คือ

$$H = (2.1 \times 10^{-5}) + \frac{(5.5 \times 10^{-8})}{x} + (4.8 \times 10^{-6})x$$

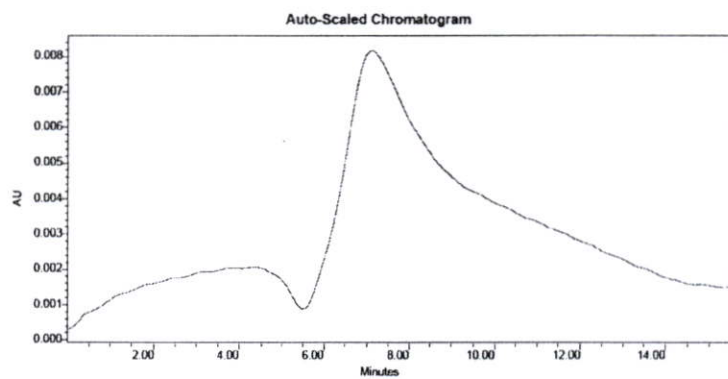
ภาคผนวก ข

โครมาโทแกรมการตรวจสอบประสิทธิภาพคอลัมน์

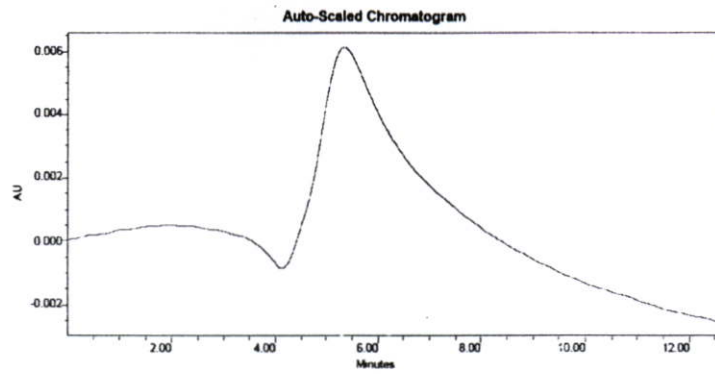
โครมาโทแกรมการตรวจสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐานโทลูอินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่คือ อะซิโทรไนโตรส/น้ำ (75:25) ที่ค่าอัตราเร็วต่างๆ กัน โดยใช้ดีเทคเตอร์ คือ UV-detector ที่ 254 nm



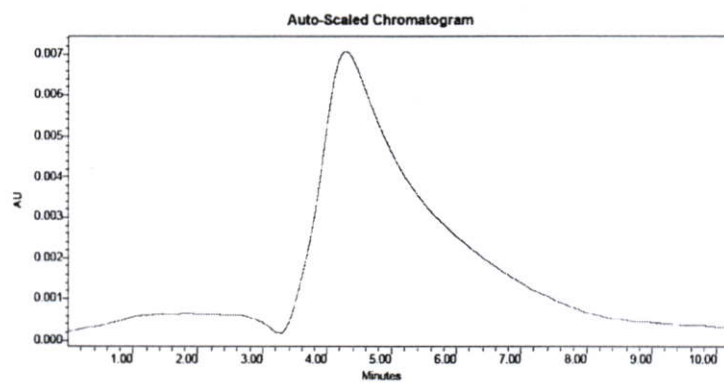
รูปที่ ข1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 0.2 มิลลิเมตรต่อนาที



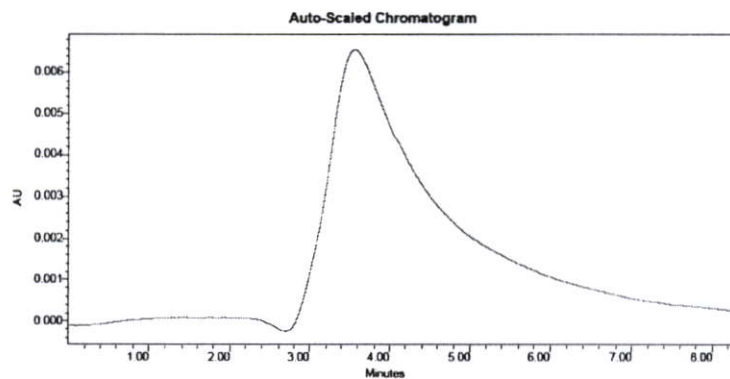
รูปที่ ข2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 0.3 มิลลิเมตรต่อนาที



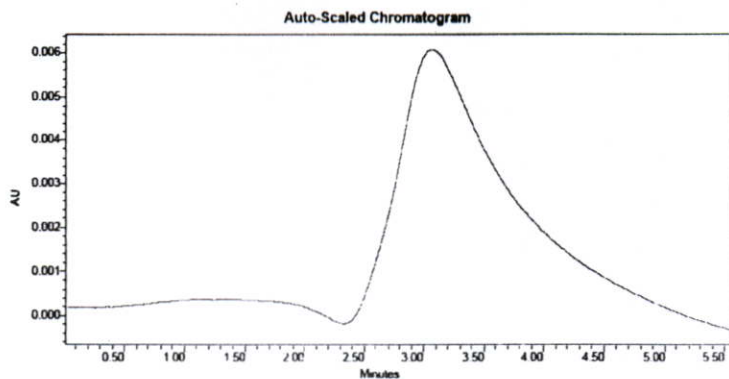
รูปที่ ข3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที



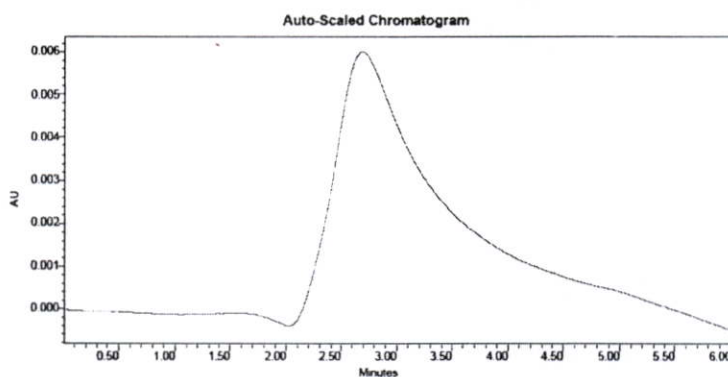
รูปที่ ข4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที



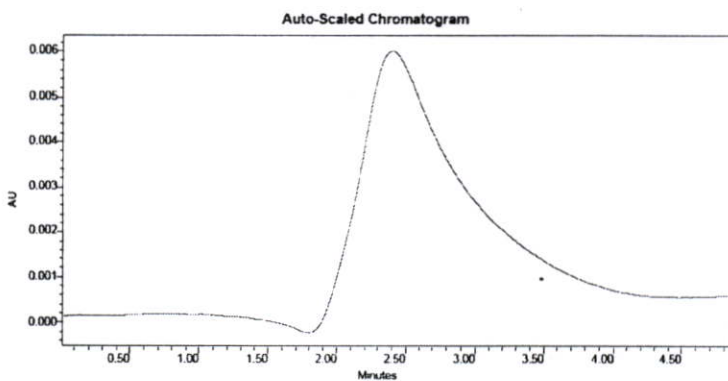
รูปที่ ข5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที



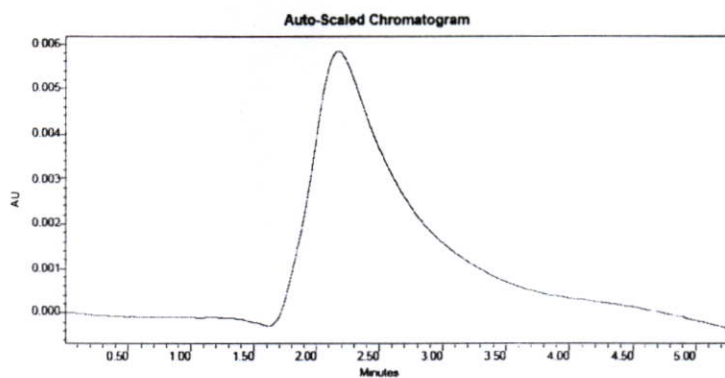
รูปที่ ข6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน โทลูอิน อัตราไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที



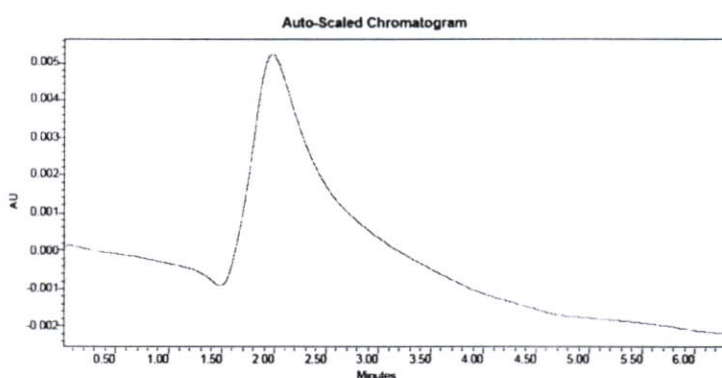
รูปที่ ข7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน โทลูอิน อัตราไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที



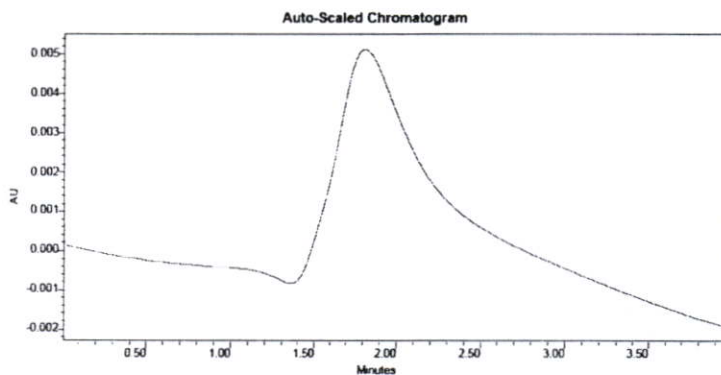
รูปที่ ข8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน โทลูอิน อัตราไหล 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที



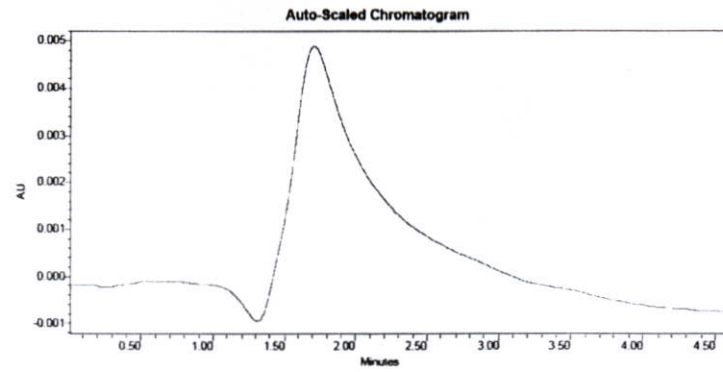
รูปที่ ข9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



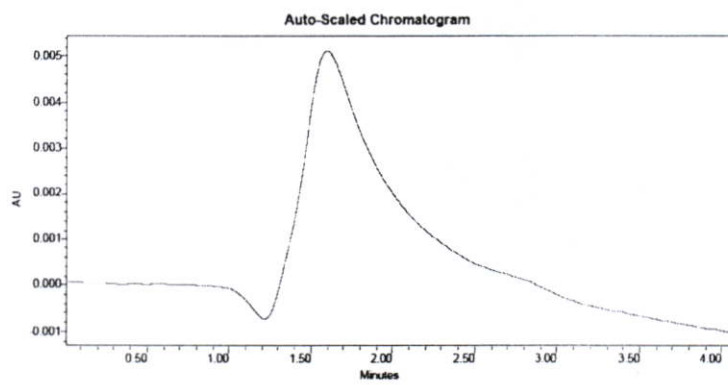
รูปที่ ข10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 1.1 มิลลิลิตรต่อนาที



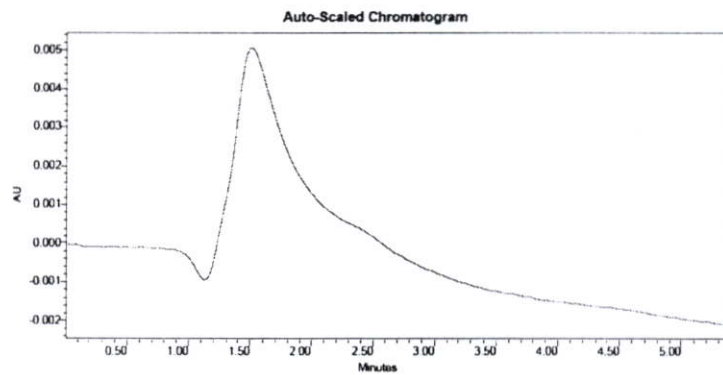
รูปที่ ข11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ ข12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 1.3 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ ข13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที

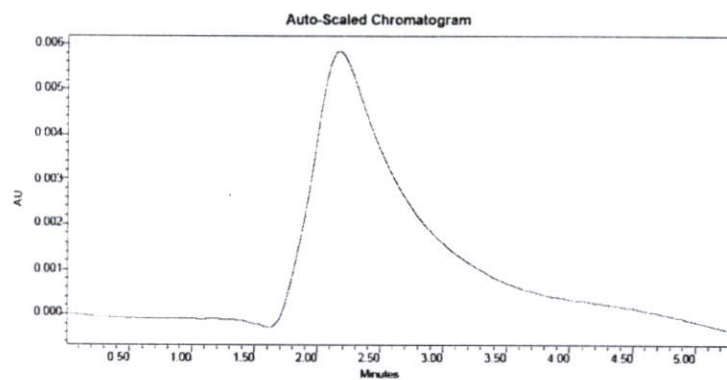


รูปที่ ข14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอิน อัตราไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที

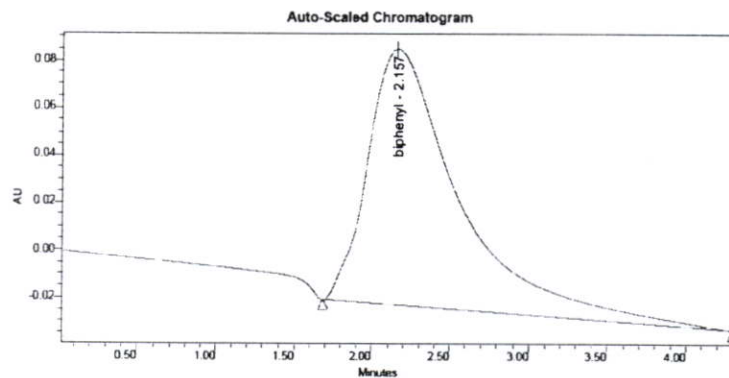
ภาคผนวก ค

โครมาโทแกรมการทดสอบประสิทธิภาพแยกสารแต่ละชนิด ด้วยคอลัมน์ไอโคโตซาน

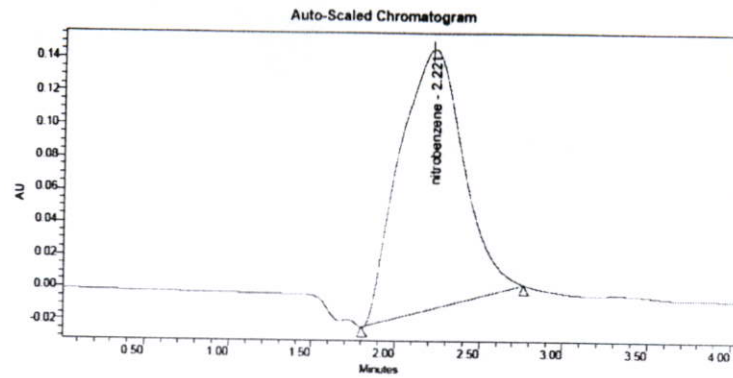
โครมาโทแกรมการทดสอบประสิทธิภาพการแยกของสารละลายมาตรฐานต่างๆ ด้วยคอลัมน์ไอโคโตซานที่เตรียมได้ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างๆ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ดีเทคเตอร์ คือ UV-detector ที่ 254 นาโนเมตร



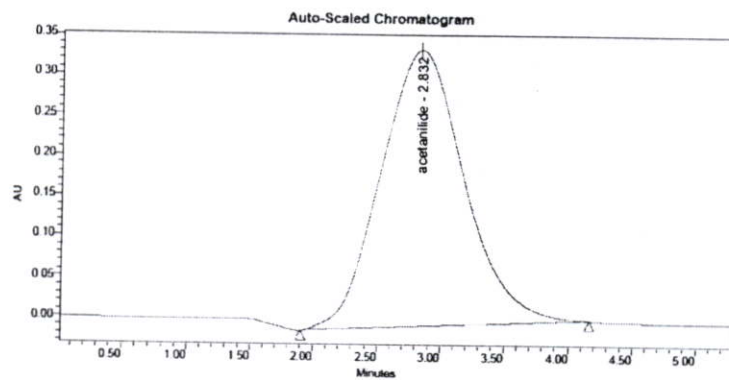
รูปที่ ค1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอินเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตน ไทรอล์ฟ/น้ำ (75:25)



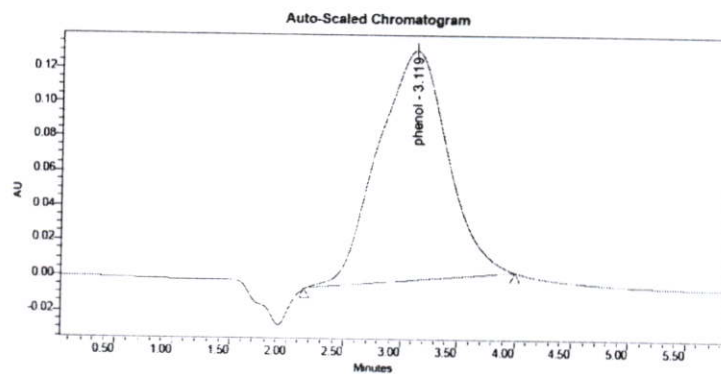
รูปที่ ค2 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไบฟีนิลเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตน ไทรอล์ฟ/น้ำ (75:25)



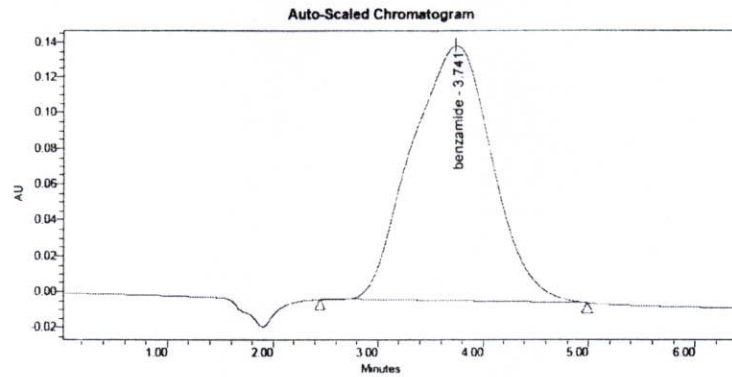
รูปที่ ค3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไนโตรเบนซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (75:25)



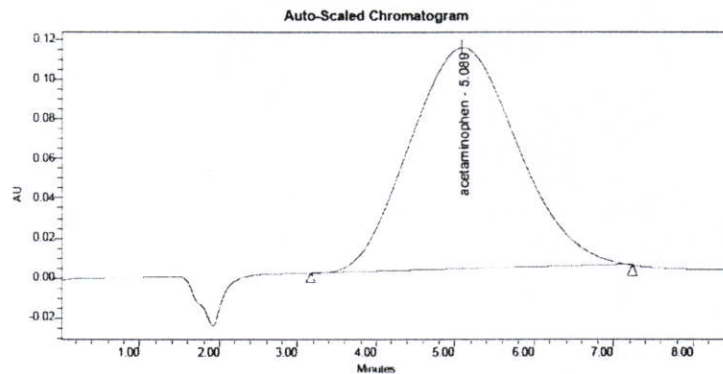
รูปที่ ค4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (75:25)



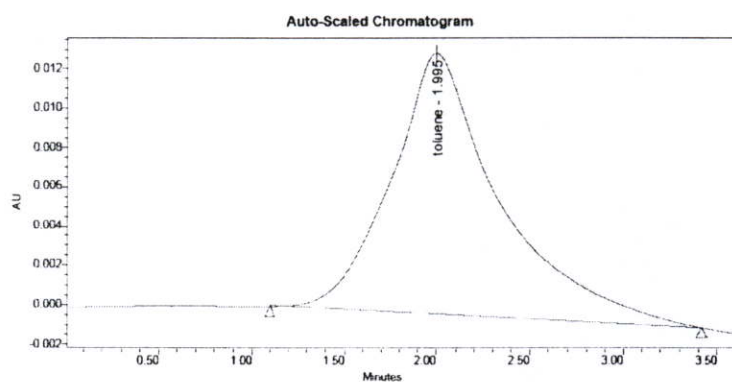
รูปที่ ค5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานฟีนอลเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (75:25)



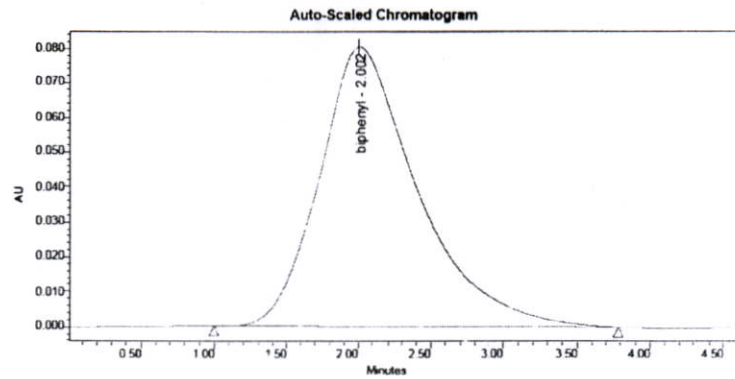
รูปที่ ค6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบนซาไมด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (75:25)



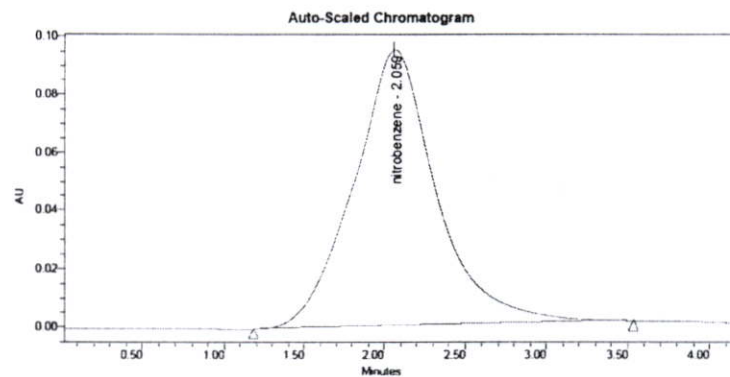
รูปที่ ค7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (75:25)



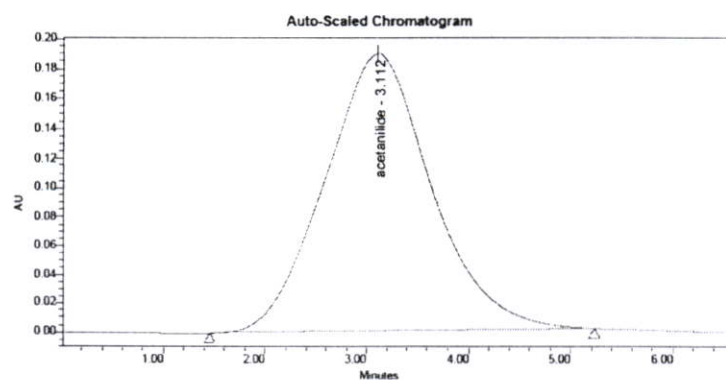
รูปที่ ค8 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอินเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (90:10)



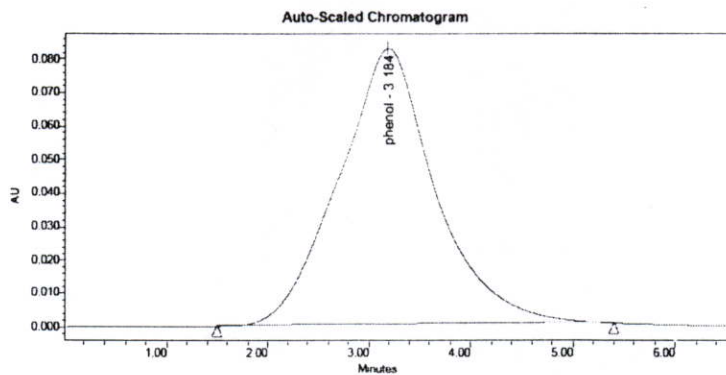
รูปที่ ค9 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไบฟีนิลเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (90:10)



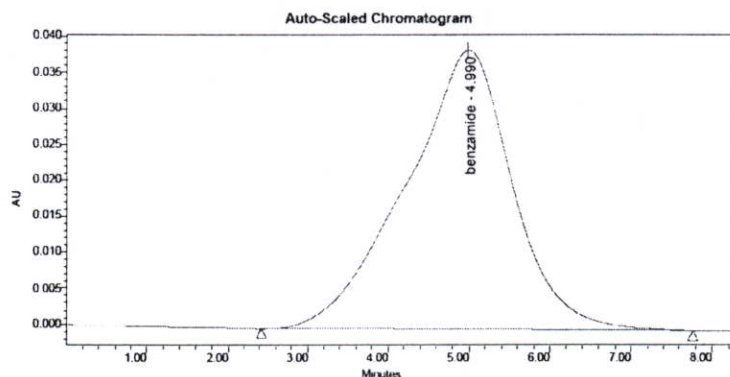
รูปที่ ค10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไนโตรเบนซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (90:10)



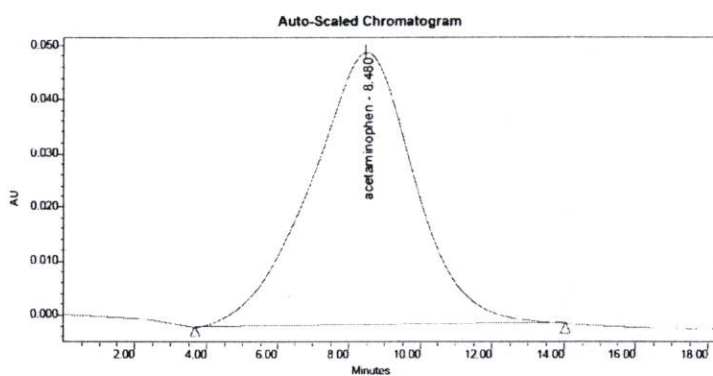
รูปที่ ค11 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะเซทานิลไอดีเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตนไนโตรล์/น้ำ (90:10)



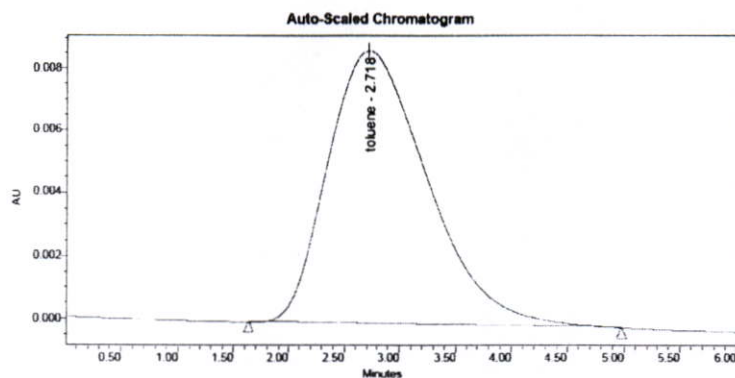
รูปที่ ค12 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานฟีนอลเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนไตรล์/น้ำ (90:10)



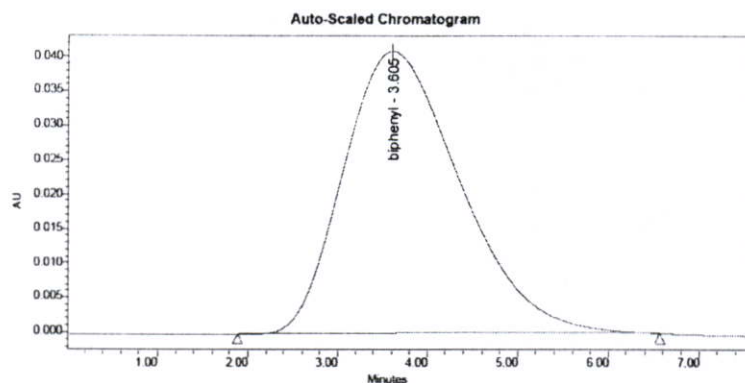
รูปที่ ค13 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบนซาไมด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนไตรล์/น้ำ (90:10)



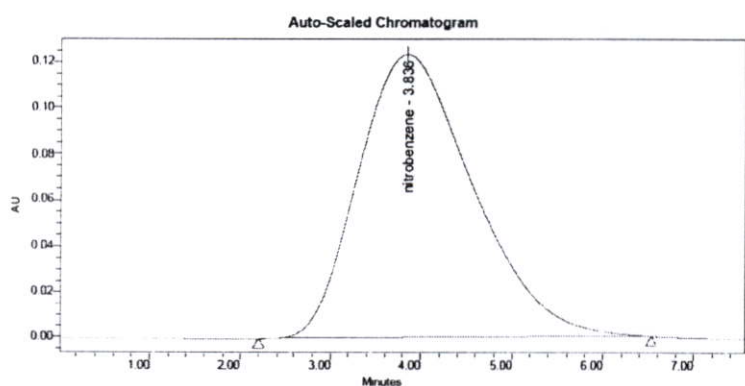
รูปที่ ค14 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโทรไนไตรล์/น้ำ (90:10)



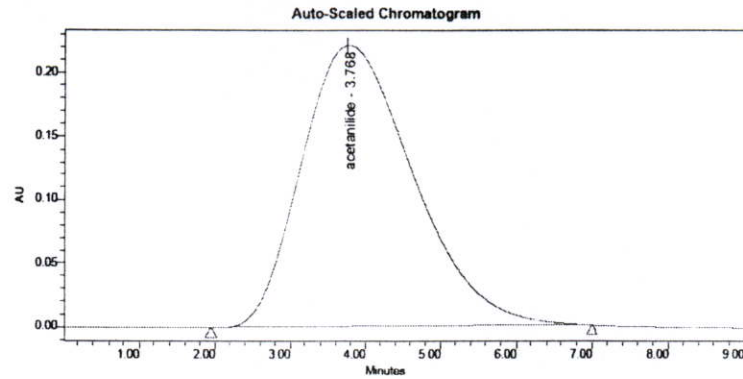
รูปที่ ค15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานโทลูอินเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล



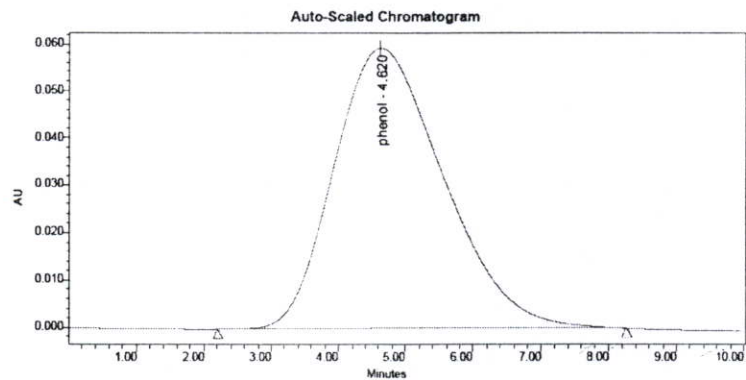
รูปที่ ค16 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไบฟีนิลเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล



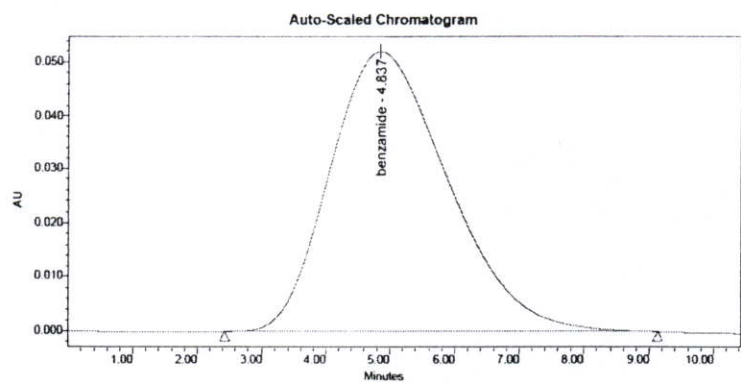
รูปที่ ค17 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานไนโตรเบนซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล



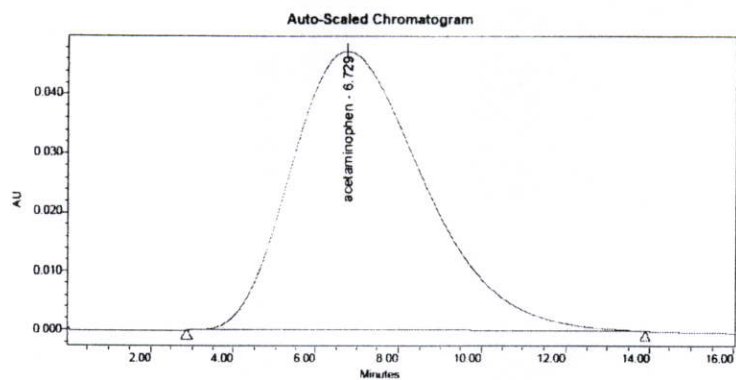
รูปที่ ค18 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะเซทานิไลด์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล



รูปที่ ค19 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานฟีนอลเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล



รูปที่ ค20 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเบนซามิได์เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล



รูปที่ ค21 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 100% เมทานอล

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอุพร อุปะ
วัน เดือน ปีเกิด	15 มกราคม 2523
ที่อยู่	133/1 ถนนประสานเมือง ตำบลสระคู อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด 45130
ประวัติการศึกษา	2545 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม