

การเตรียมคอลัมน์ SILICA-ODS จากแกลบข้าวโดยวิธีไมเซลล์  
สำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

PREPARATION OF SILICA-ODS COLUMN FROM RICE HUSK  
BY MICELLARS METHOD FOR HIGH PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY

อมรรตม์ จินรักษ์

AMORNRUTSAMEE JINNARAK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเตรียมคอลัมน์ SILICA-ODS จากแกลบข้าวโดยวิธีไมเซลล์  
สำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

PREPARATION OF SILICA-ODS COLUMN FROM RICE HUSK  
BY MICELLARS METHOD FOR HIGH PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY



อมรรักษ์มี จินรักษ์

AMORNRUTSAMEE JINNARAK

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 74838  
วัน,เดือน,ปี..... 11 ต.ค. 2550

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

**PREPARATION OF SILICA-ODS COLUMN FROM RICE HUSK  
BY MICELLARS METHOD FOR HIGH PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**AMORNRUTSAMEE JINNARAK**

**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  
2007**

**COPYRIGHT 2007**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

<b>หัวข้อวิทยานิพนธ์</b>	การเตรียมคอลัมน์ SILICA-ODS จากแคลบข้าวโดยวิธีไมเซลล์ สำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
<b>ชื่อนักศึกษา</b>	นางสาวอมรรักษ์มี จิณรัชย์
<b>รหัสประจำตัว</b>	46063809
<b>ปริญญา</b>	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
<b>สาขาวิชา</b>	เคมี (เคมีวิเคราะห์)
<b>พ.ศ.</b>	2550
<b>อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์</b>	ผศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์

### บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการเตรียม Silica-ODS เพื่อใช้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับ คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แบบเฟสย้อนกลับ (reverse phase HPLC column) ซิลิกาที่ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะให้เฟสอยู่กับที่ เตรียมได้จากการตกตะกอนสารละลายเมทาซิลิเกต (ซึ่งเตรียมได้จากแคลบข้าว) โดยอาศัยระบบไมเซลล์ สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ที่ใช้คือ ไทร-ทอนเอ็กซ์ - 100 (Triton X-100) ซิลิกาที่เตรียมได้มีรูปร่างลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดอนุภาค 3-10 ไมโครเมตร มีพื้นที่ผิวจำเพาะ 1270.79 m<sup>2</sup>/g และมีขนาดรูพรุน 18 Å ทำการศึกษาหาปริมาณหมู่ ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณสูงสุดที่เป็นไปได้ของสารออก- ทะเดซิลไทรคลอโรไซเลน (octadecyl trichlorosilane, ODS) และ ไทรมethylคลอโรไซเลน (trimethylchlorosilane, TMCS) ในการสร้างพันธะและปิดปลายที่ว่องไวที่เหลือ (end-capping) ตามลำดับ พบว่าปริมาณสูงสุดที่เป็นไปได้ของ ODS ที่ใช้สร้างพันธะเท่ากับ 5.51 x 10<sup>-3</sup> กรัม ต่อ ซิลิกา 1 กรัม และ TMCS เท่ากับ 4.18 x 10<sup>-3</sup> กรัม ต่อซิลิกา 1 กรัม ศึกษาหมู่ฟังก์ชันบนผิว ซิลิกาที่สร้างพันธะแล้ว ด้วยเทคนิค FT-IR และ % carbon loading ด้วยเทคนิค TGA บรรจุ Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไวแล้ว ลงในคอลัมน์ HPLC ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. โดยใช้เทคนิคการบรรจุแบบเปียก และทดสอบคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีของ คอลัมน์ที่เตรียมได้ ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) เท่ากับ 0.00470 cm และ 0.00640 cm ตามลำดับ โดยใช้สารละลายมาตรฐาน ไบฟีนิล 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่ใช้คือสารละลาย ผสมเมทานอล-น้ำ (80:20) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีด 1 ไมโครลิตร ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำการทดสอบสารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลิน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ด้วยสภาวะ HPLC เช่นเดิม สารทุกตัวถูกแยกภายในเวลา 10 และ 15 นาที ตามลำดับ สำหรับค่าความสามารถในการแยกของสารแต่ละคู่ที่อยู่ใกล้กันมีค่ามากกว่า 1.5 ค่าแฟกเตอร์ความจุ

อยู่ในช่วง 1-10 ค่าความจำเพาะเจาะจงมากกว่า 1 และความสมมาตรของพีค น้อยกว่า 1.2 คอลัมน์ ทั้งสองขนาดถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ หาปริมาณพาราเซตามอล ในยาทางการค้า พลอตกราฟแคลิเบรชันของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล 5 ความเข้มข้น ได้กราฟที่เป็น เส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) มากกว่า 0.9995 ค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) เท่ากับ 98.04 และ 98.76 ตามลำดับ % RSD มีค่าน้อยกว่า 2 ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับคอลัมน์ทางการค้า

<b>Thesis</b>	PREPARATION OF SILICA-ODS COLUMN FROM RICE HUSK BY MICELLARS METHOD FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
<b>Student</b>	Miss Amornrassamee Jinnarak
<b>Student ID.</b>	46063809
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Chemistry (Analytical Chemistry)
<b>Year</b>	2007
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. Prof. Kanita Tangkananuruk

### ABSTRACT

An objective of the research is to prepare the Silica-ODS to be use as a stationary phase in reverse-phase HPLC columns. The spherical silica solid supported stationary phase was prepared by precipitation of sodium metasilicate solution (prepared from rice husk) in micellars system with nonionic-surfactant (triton X-100). The prepared silica particles were spherical with 3-10  $\mu\text{m}$  in diameter, specific surface area 1270.79  $\text{m}^2/\text{g}$  and 18  $\text{\AA}$  pore size. The silinol groups on silica surface particles were determined by calculating the possible maximum loading of octadecyl-trichlorosilane (ODS) and trimethylchlorosilane (TMCS) to bond phase and end-cap respectively. The possible maximum ratio of ODS was  $5.51 \times 10^{-3}$  g/g silica and TMCS was  $4.18 \times 10^{-3}$  g/g silica. The silica bonded-phase functional group was studied by FT-IR technique and carbon loading percentage was studied by TGA technique. The end-capped silica-ODS was packed in 150 x 4.6 mm.i.d. and 250 x 4.6 mm.i.d. column by wet packing method and tested the efficiency of chromatographic columns. The theoretical plate height of both columns was 0.00470 cm and 0.00640 cm respectively by using 0.06 mg/L standard biphenyl solutions, mixture of methanol - water (80:20) as mobile phase, at flow rate 1.0 mL/min, 1  $\mu\text{L}$  injection volume and UV detector at 254 nm. A mix standard uracil, benzene, naphthalene and biphenyl 0.02, 3.00, 0.50 and 0.06 mL/min respectively were tested. All compounds were separated within 10 to 15 min. Resolutions of each pair compound were above 1.5, capacity factor were between range of 1-10, selectivity was above 1 and peak symmetry were less than 1.2. The two columns were applied for determination of paracetamal in commercial medicine. The calibration graphs plotted with five concentrations of standard paracetamal was linear with a regression coefficient ( $R^2$ ) > 0.9995.

The recovery percentages of two column were 98.04 and 98.76 respectively and precision of the results (RSD %) were less than 2 .

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดี ด้วยความช่วยเหลือ และคำแนะนำ จากบุคคลหลายฝ่าย ทางผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. คณิตา ตั้งคนานุรักษ์ ที่กรุณาแนะนำให้คำปรึกษา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ตะวัน สุขน้อย ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ และ ดร.ชญชญา ธนชยานนท์ ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติที่สนับสนุนเงินทุน สำหรับงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณดำรงศักดิ์ เจษฎาภัทรกุล ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ ตลอดเทคนิคในการดำเนินงานวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตศึกษาและบัณฑิตวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือ ในเรื่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอบคุณน้องสาว ครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

อนึ่งยังมีบุคคลอีกหลายท่าน นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว ผู้จัดทำงานวิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อมรรักษ์มี จินรัักษ์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ชีวลิแก.....	4
2.2 สารลดแรงตึงผิวและการเกิดไมเซลล์.....	11
2.2.1 ชนิดของสารลดแรงตึงผิว.....	11
2.2.2 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว.....	12
2.3 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี.....	14
2.3.1 สมการการคงไว้.....	15
2.3.2 การคงไว้สัมพัทธ์.....	18
2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการคงไว้ .....	19
2.3.4 พารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในโครมาโทกราฟี.....	20
2.3.5 ประสิทธิภาพคอลัมน์ .....	22
2.3.6 การควบคุมการแยกในเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟี.....	31
2.3.7 กลไกการแยก.....	34
2.4 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	37
2.4.1 การจำแนกชนิดของโครมาโทกราฟีตามกลไกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์.....	37

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 ระบบการบรรจุ.....	50
2.5.1 HPLC column.....	52
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	53
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	59
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	59
3.1.1 สารเคมี.....	59
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	60
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	61
3.3 วิธีการวิจัย.....	62
3.3.1 การเตรียมสารละลาย.....	62
3.3.2 วิธีการเตรียมอนุภาคซิลิกาจากสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต.....	63
3.3.3 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้.....	64
3.3.4 ศึกษาหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลโดยการสร้างพันธะกับ TMCS.....	65
3.3.5 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Silica-ODS.....	66
3.3.6 การบรรจุลงคอลัมน์ HPLC.....	67
3.3.7 ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับคอลัมน์ทางการค้า.....	68
3.3.8 การประยุกต์ใช้งาน.....	68
3.3.9 ทดสอบการเก็บรักษาคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ในสารละลายเมทานอล.....	69
3.3.10 การบรรจุคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ครั้งที่ 2 .....	70
3.4 สถานที่ทำการวิจัย.....	70
บทที่ 4 ผลงานวิจัย.....	71
4.1 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้จากการควบคุมอนุภาคโดยระบบไมเซลล์.....	71
4.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของซิลิกาเมื่อสร้างพันธะกับ TMCS และ ODS.....	81

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 การศึกษาคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟี.....	89
4.4 วิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของพาราเซตามอลในยาลด ไข้บรรเทาปวด (ทีพีพี).....	101
4.5 ทดสอบระบบการบรรจุคอลัมน์.....	110
บทที่ 5 การวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	111
บรรณานุกรม.....	114
ภาคผนวก.....	119
ภาคผนวก ก. การคำนวณปริมาณไทรมะทิลคลอโรไซเลน.....	120
ภาคผนวก ข. การคำนวณหาปริมาณหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา ที่สร้างพันธะกับ TMCS.....	123
ภาคผนวก ค. การคำนวณปริมาณออกทะเลคซิลไทรมะทิลคลอโรไซเลน.....	125
ภาคผนวก ง. การคำนวณหาปริมาณหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา ที่สร้างพันธะกับ ODS.....	127
ภาคผนวก จ. การคำนวณหาปริมาณหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา เมื่อปิดปลายว่องไวด้วย TMCS.....	129
ภาคผนวก ฉ. การคำนวณค่า จำนวนเพลทตามทฤษฎี ค่าความสูงของเพลท ทางทฤษฎี และตัวแปรในสมการแวนดีมเตอร์ของคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5 $\mu\text{m}$ (150 x 4.6 mm i.d.) บรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 1.....	131
ภาคผนวก ช. การคำนวณค่า จำนวนเพลทตามทฤษฎี ค่าความสูงของเพลท ทางทฤษฎี และตัวแปรในสมการแวนดีมเตอร์ของคอลัมน์ ที่เตรียมได้ จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.) บรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 1.....	135
ภาคผนวก ซ. การคำนวณค่า จำนวนเพลทตามทฤษฎี ค่าความสูงของเพลท ทางทฤษฎี และตัวแปรในสมการแวนดีมเตอร์ ของคอลัมน์ที่เตรียมได้ จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.) .....	139
ภาคผนวก ฌ. การคำนวณค่าความสามารถในการแยก (Resolution, $R_s$ ).....	143
ภาคผนวก ญ. การคำนวณแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, $k'$ ).....	146
ภาคผนวก ฎ. การคำนวณความจำเพาะเจาะจง (Capacity factor, $\alpha$ ).....	148

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ก. การคำนวณความสมมาตรของพีค (peak asymmetry, $A_s$ ) .....	150
ภาคผนวก ข. การคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery).....	152
ภาคผนวก ค. การคำนวณค่าความเที่ยง (Precision).....	154
ภาคผนวก ด. การคำนวณค่า ความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) ของคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.) บรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 2.....	157
ประวัติผู้เขียน.....	159

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงคุณลักษณะอนุภาคซิลิกาสำหรับคอลัมน์ HPLC.....	6
2.2 แสดงปริมาณธาตุที่ปนเปื้อนในซิลิกาของ Zorbax Rx-SIL โดยใช้เทคนิค ICP-ASE/MS.....	9
2.3 ซิลิกาที่ใช้เป็นตัวยึดเกาะในคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารประกอบพวกเบส.....	9
2.4 แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนค่า $k'$ กับ $R_s$ .....	32
2.5 สรุปการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง NP – BPC และ RP – BPC.....	46
2.6 การถูกหน่วงเหนี่ยวของ Acetophenone โดยคอลัมน์ $C_{18}$ ชนิดต่างๆ.....	46
2.7 ตัวอย่างสารที่นำมาทำการแยกโดยเทคนิค Affinity chromatography.....	47
2.8 แสดงหมู่ฟังก์ชันนอลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยน ไอออนของ Ion – exchange chromatography.....	50
4.1 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของซิลิกา (HPLC grade).....	78
4.2 เปอร์เซ็นต์ของซิลิกาหลังทำการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C.....	79
4.3 ปริมาณธาตุที่ปนเปื้อนในซิลิกาหลังทำการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C และซิลิกาทางการค้า Zorbax Rx-SIL.....	80
4.4 แสดงสมการแวนดีมเตอร์ และพจน์ต่างๆ ของคอลัมน์ทางการค้าและคอลัมน์ที่เตรียมขึ้น จากงานวิจัยสองคอลัมน์.....	92
4.5 แสดงค่าเฉลี่ยความสามารถในการแยก (Resolution, $R_s$ ) ของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด.....	99
4.6 แสดงค่าเฉลี่ยแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, $k'$ ) ของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด.....	100
4.7 แสดงค่าเฉลี่ยความจำเพาะเจาะจง (selectivity, $\alpha$ ) ค่าความสมมาตรของพีค (peak asymmetry, $A_s$ ) ของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด.....	101
4.8 ข้อมูลสำหรับการสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของพาราเซตามอล (0-1250 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร) คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d.....	102

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9 แสดงข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลใน ตัวอย่างยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีพีพี) และ ค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery).....	104
4.10 แสดงข้อมูลการทดสอบความเที่ยง (Precision) ของคอลัมน์ 3 ชนิด.....	105

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 รูปแบบต่างๆ ของการเชื่อมต่อของ $\text{SiO}_4$ tetrahedral ในโครงสร้างพื้นฐานของซิลิกา.....	4
2.2 รูปแบบการเชื่อมต่อของ $\text{SiO}_4$ tetrahedral (a) crystalline silica (b) amorphous silica.....	5
2.3 แสดงลักษณะของอนุภาคซิลิกาโดยใช้เทคนิค Transmission electron micrographs.....	7
2.4 พื้นผิวของซิลิกาที่ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะสำหรับเทคนิค HPLC.....	8
2.5 โลหะปนเปื้อนบนพื้นผิวซิลิกา หมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา ..... 8	8
2.6 เปรียบเทียบการแยกของคอลัมน์ที่มีซิลิกา type A และ type B.....	10
2.7 โครงสร้างทางโมเลกุลอย่างง่ายของสารลดแรงตึงผิว .....	11
2.8 แสดงการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว .....	12
2.9 การจัดเรียงตัวของไมเซลล์ในรูปแบบต่างๆ .....	13
2.10 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว.....	13
2.11 การแยกสารผสม 3 ชนิด A,B และ C เมื่อ $K_A < K_B < K_C$ .....	15
2.12 แสดงโครมาโทแกรมในการคำนวณหาค่าปัจจัยความจุ (capacity factor, $k'$ ).....	20
2.13 แสดงโครมาโทแกรมของสาร A และ B.....	21
2.14 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมซึ่งมีการกระจายแบบ Gaussian curve (Gaussian distribution).....	22
2.15 ผลของการเกิด Eddy diffraction ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างเดินทางไม่เท่ากัน.....	25
2.16 ผลของการเกิด Longitudinal diffusion ทำให้แบนด์ที่ได้มีฐานกว้าง.....	25
2.17 Mobile phase mass transfer.....	26
2.18 Stagnant Mobile phase mass transfer.....	27
2.19 Stationary phase mass transfer.....	27
2.20 Van Deemter plot ระหว่าง H กับ u .....	29
2.21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง linear velocity (u) ของเฟสเคลื่อนที่ กับค่า H จะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคเล็กๆ เมื่อเพิ่ม u ไม่มีผลให้ H เพิ่ม .....	31
2.22 แสดงผลของ capacity factor ( $k'$ ) ที่มีต่อ resolution ( $R_s$ ) และ elution time ( $t_r$ ).....	32
2.23 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า $k'$ , $\alpha$ และ N ที่มีต่อ resolution ( $R_s$ ).....	33
2.24 การดูดซับ (Adsorption).....	35
2.25 การแบ่งส่วน (Partition).....	35

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
2.26 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange).....	36
2.27 การแยกตามขนาดโมเลกุล (Molecules exclusion).....	36
2.28 การสัมพรรคภาพ (Affinity).....	37
2.29 แสดงชนิดอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ใน LC.....	38
2.30 โครงสร้างของซิลิกาเจล.....	38
2.31 modified silica.....	40
2.32 แสดง bonded phase แบบ monomeric phase.....	42
2.33 แสดง bonded phase แบบ polymeric phase.....	42
2.34 แสดงโครงสร้างของ ODS บนพื้นผิวซิลิกา .....	45
2.35 แสดง surface coverage.....	45
2.36 แสดงการแยกแบบ SCE.....	48
2.37 แสดงส่วนประกอบของคอลัมน์.....	52
4.1 ศึกษาลักษณะรูปร่างของอนุภาคซิลิกาหลังจากการสังเคราะห์โดยใช้เทคนิค SEM.....	71
4.2 ภาพแสดงอนุภาคซิลิกาที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 20 ไมครอน และผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C.....	72
4.3 การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้.....	74
4.4 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของอนุภาคซิลิกา.....	75
4.5 สเปกตรัม XRD ของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้.....	76
4.6 ไอโซเทอมที่ได้จากการแอดซอร์บ (adsorb) และดีซอร์บ (desorb) แก๊สไนโตรเจนบนผิวซิลิกาที่สังเคราะห์ได้.....	77
4.7 BJH desorption DV (log d) polt .....	77
4.8 สเปกตรัมของ ก. cell ATR ข. ซิลิกา ค. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% TMCS ครั้งที่ 1 ง. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% TMCS ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค FT-IR วิธี ATR.....	81
4.9 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของ ก. ซิลิกา ข. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% TMCS ครั้งที่ 1 ค. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% TMCS ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค TGA...	82
4.10 สเปกตรัมของ ก. cell ATR ข. ซิลิกา ค. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 1 ง. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค FT-IR วิธี ATR.....	83

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของ ก. ซิลิกา ข. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 1 ค. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค TGA.....	84
4.12 สเปกตรัมของ ก. ซิลิกา ข. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 2 ปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS ครั้งที่ 1 ค. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 2 ปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค FT-IR วิธี ATR.....	85
4.13 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงเฟสของ ก. ซิลิกา ข. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 2 ปิดปลายที่ว่องไวด้วย TMCS ครั้งที่ 1 ค. ซิลิกาสร้างพันธะกับ 100% ODS ครั้งที่ 2 ปิดปลายที่ว่องไวด้วย TMCS ครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค TGA.....	85
4.14 แสดงการสร้างพันธะของ ODS กับ ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา .....	86
4.15 แสดงการสร้างพันธะของ ไซลานอลในรูพรุนของซิลิกา .....	87
4.16 แสดงลักษณะของ (ก) ซิลิกา (ข) Silica-TMCS (ครั้งที่ 2) Silica- ODS (ครั้งที่ 2) (ง) Silica-ODS สร้างพันธะซ้ำ 2 ครั้ง ทำการ ปิดปลายที่ว่องไวด้วย TMCS 2 ครั้ง ด้วยเทคนิค SEM.....	87
4.17 กราฟแวนติเมตรรี่ที่ได้จาก คอลัมน์ทางการค้า HiQSilC18W 5 $\mu$ m (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.) (ข)....	90
4.18 กราฟแวนติเมตรรี่ที่ได้จาก คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.) .....	91
4.19 โครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานยูราซิล ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของทั้ง 3 คอลัมน์ .....	94
4.20 โครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานเบนซีน ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของทั้ง 3 คอลัมน์.....	95
4.21 โครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานแนพทาลิน ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของทั้ง 3 คอลัมน์.....	96
4.22 โครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐาน ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของทั้ง 3 คอลัมน์.....	97
4.23 โครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานผสมของคอลัมน์ทางการค้า HiQ Sil C18W 5 $\mu$ m (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค).....	98

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ความเข้มข้น 0-1250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) และ 250 x 4.6 mm i.d. (ค).....	103
4.25 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของคอลัมน์ HiQSil C18 W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค).....	106
4.26 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสารพาราเซตามอลในยาลดไข้ บรรเทาปวด (ทีพีพี) ของคอลัมน์ HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค).....	107
4.27 โครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสารพาราเซตามอลในยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีพีพี) ที่เติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล(spiked sample) ของคอลัมน์ HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียม ได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค).....	108
4.28 โครมาโทแกรมคอลัมน์ทางการค้าที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.) เก็บรักษาไว้ในระบบเมทานอล นาน 1 เดือน ฉีดสารครั้งที่ 1 (ก) ฉีดสารครั้งที่ 2 (ข) ฉีดสารครั้งที่ 3 (ค) .....	110

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญของวิทยานิพนธ์

ปัจจุบันการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ( High Performance - Liquid Chromatography, HPLC) เป็นเทคนิควิเคราะห์ที่มีบทบาทสำคัญมากในงานวิเคราะห์ประจำวัน ของห้องปฏิบัติการทั้งตามหน่วยงานราชการและเอกชน โรงงานอุตสาหกรรม และในงานวิจัยหลายสาขา เช่น ทางด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม อาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น ส่วนประกอบที่จัดว่าเป็นหัวใจของเครื่อง HPLC คือ คอลัมน์ โดยเฉพาะสารที่บรรจุภายในคอลัมน์ (packing materials) ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งคุณลักษณะของแพคเกจจิ้งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการแยกสารของเทคนิค HPLC อย่างมาก คอลัมน์ที่นิยมใช้งานมากที่สุด คือ คอลัมน์ Silica-ODS หรือ C-18 [1,2] โดยส่วนใหญ่วัสดุที่ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะให้กับเฟสอยู่กับที่ คือ ซิลิกา [3]

ซึ่งในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะนำซิลิกาที่ผลิตได้จากแกลบข้าว โดยวิธีตกตะกอนด้วยระบบไมเซลล์ มาสร้างพันธะกับสารออกทะเลซิลไตรคลอโรไซเลน (octadecyltrichlorosilane, ODS) เพื่อใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในการแยกสารด้วยระบบรีเวอร์สเฟส (reverse phase) ของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ในงานวิจัยที่ผ่านมา [4, 5] ได้มีการเตรียมซิลิกาที่มีอนุภาคเป็นทรงกลม สำหรับใช้ในเทคนิค HPLC โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารผสมโซเดียมซิลิเกต ซึ่งเตรียมได้จากซิลิกา ( $\text{SiO}_2$ ) และโซเดียมเปอร์ออกไซด์ ( $\text{Na}_2\text{O}_2$ ) กับสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (ไตรทอนเอ็กซ์-100, Triton X-100) ปรับพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 1.85 - 6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาอยู่ในช่วง 25-45 °C อนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้มีขนาด 2-12 ไมโครเมตร พื้นที่ผิว 746-1340  $\text{m}^2/\text{g}$  และมีขนาดรูพรุน 17-18 Å

ต่อมาได้มีงานวิจัย [6] เตรียมอนุภาคซิลิกาโดยอาศัยระบบไมเซลล์ในการควบคุมขนาดอนุภาค ระบบไมเซลล์เกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวนอนไอออนิก คือ ไทรทอนเอ็กซ์-100 กับสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 5% (w/v) ซึ่งเตรียมได้จากแกลบข้าว และปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 4.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้มีขนาดอยู่ในช่วง 3-10 ไมโครเมตร มีพื้นที่ผิวเท่ากับ 1542  $\text{m}^2/\text{g}$  ขนาดรูพรุนสูงสุดเท่ากับ 25 Å และนำซิลิกาไปใช้แยกสารในระบบนอร์มัลเฟสของเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

สำหรับงานวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการเตรียมซิลิกาด้วยสถานะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น ตามรายละเอียดการวิจัย [6] แล้วศึกษาคุณลักษณะของซิลิกาที่เตรียมได้

จากนั้นผู้วิจัยจะทำการศึกษาหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลโดยประมาณ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างพันธะกับ สารออกทะเลซิลไตรคลอโรไฮโดรเจน (octadecyltrichlorosilane, ODS) และ ปิดปลายที่ว่องไว (end-capping) ด้วยไตรเมทิลคลอโรไฮโดรเจน (trimethylchlorosilane, TMCS) บนผิวซิลิกา ให้มีความสมบูรณ์มากที่สุด ดังนั้นพารามิเตอร์ที่ต้องทำการศึกษาลงจากเตรียมอนุภาค ซิลิกาได้แล้วมีดังนี้

- ปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลโดยประมาณที่จะเกิดการสร้างพันธะได้ บนผิวอนุภาคซิลิกา
- ปริมาณของ ODS สูงสุดที่เป็นไปได้ที่ใช้ในการสร้างพันธะ เพราะ ODS เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ทำให้ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลได้ทุกหมู่ ถ้าใส่ในปริมาณที่มากเกินไปพอจะเกิดก่อนขะที่ส่งผลเสียต่อการแยกได้สูง แต่ถ้าใส่ในปริมาณที่น้อยเกินไป ทำให้มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ว่องไวเหลืออยู่มาก ซึ่งอาจเกิดแรงดึงดูดกับสารที่มีขั้วที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ส่งผลให้โครมาโทแกรมมีลักษณะเป็นฟีกที่มีหาง (tailing)

- ปริมาณไตรเมทิลคลอโรไฮโดรเจน (trimethyl chlorosilane, TMCS) เป็นสารอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า ODS ใช้ในการปิดปลายที่ว่องไว คือ บดบังหมู่ไฮดรอกซิลที่ไม่ถูกสร้างพันธะด้วย ODS ช่วยลดความว่องไวของหมู่ไฮดรอกซิลเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการแยกให้กับคอลัมน์ Silica-ODS ดังนั้นในการปิดปลายที่ว่องไว ต้องรู้ปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลโดยประมาณ ซึ่งอาศัยเทคนิค FT-IR spectroscopy, TGA และ SEM

จากนั้นผู้วิจัยจะทำการบรรจุ Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว แล้วลงในคอลัมน์ HPLC ขนาด 150 x 4.6 mm. id และ 250 x 4.6 mm. id เพื่อทำการศึกษาสมบัติทางโครมาโทกราฟีของคอลัมน์ และทดสอบประสิทธิภาพในการแยกของคอลัมน์จากพารามิเตอร์ต่อไปนี้ เช่น จำนวนเพลทตามทฤษฎี (The number of theoretical plate, N) ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (The height of theoretical plate, H) และค่าความสามารถในการแยก (Resolution, R) ทดสอบแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor,  $k'$ ) ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity,  $\alpha$ ) และทดสอบความสมมาตรของฟีก (peak asymmetry,  $A_s$ ) ตลอดจนการประยุกต์ใช้งานจริง เปรียบเทียบกับคอลัมน์ Silica-ODS ของทางการค้า

## 1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

- 1.1.1 เพื่อเตรียม Silica- ODS ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเป็นเฟสอยู่กับที่ให้กับคอลัมน์ HPLC โดยใช้ซิลิกาที่เตรียมได้จากแคลบข้าวโดยอาศัยระบบไมเซลล์
- 1.1.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ Silica-ODS ที่เตรียมได้เปรียบเทียบกับคอลัมน์ที่ผลิตในทางการค้า
- 1.1.3 เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตคอลัมน์ HPLC ระบบรีเวอร์สเฟส (Reverse phase) ในเชิงการค้า โดยใช้วัสดุดิบเป็นแคลบข้าว

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 เตรียมซิลิกาความบริสุทธิ์สูงจากแคลบข้าวโดยอาศัยระบบไมเซลล์
- 1.3.2 ศึกษาหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลโดยประมาณที่เกิดการสร้างพันธะได้
- 1.3.3 ศึกษาหาปริมาณสูงสุดของ ODS ที่ใช้สร้างพันธะได้ (Silica-ODS)
- 1.3.4 ศึกษาหาปริมาณ TMCS สูงสุดที่ใช้ในการปิดปลายที่ว่องไว
- 1.3.5 ศึกษาคุณลักษณะของ silica-bonded phase ที่สังเคราะห์ขึ้นมาได้
- 1.3.6 ศึกษากระบวนการบรรจุคอลัมน์แบบบรรจุเปียก (slurry packing technique)
- 1.3.7 ศึกษาสมบัติทางโครมาโทกราฟีของคอลัมน์ที่เตรียมได้และเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการแยกกับคอลัมน์ทางการค้า
- 1.3.8 ศึกษาการประยุกต์นำมาใช้งานจริง

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้ปริมาณสูงสุดของ ODS ที่เป็นไปได้ในการเตรียม Silica-ODS สำหรับคอลัมน์ HPLC ระบบรีเวอร์สเฟส
- 1.4.2 ได้ปริมาณสูงสุดของ TMCS ที่เป็นไปได้ในการปิดปลายที่ว่องไว สำหรับคอลัมน์ HPLC ระบบรีเวอร์สเฟส
- 1.4.3 เป็นแนวทางในการผลิตคอลัมน์ HPLC ระบบรีเวอร์สเฟส โดยของแข็งยึดเกาะให้เฟสอยู่กับที่ (ซิลิกา) เตรียมได้จากแคลบข้าว ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากแคลบข้าวโดยอาศัยระบบไมเซลล์

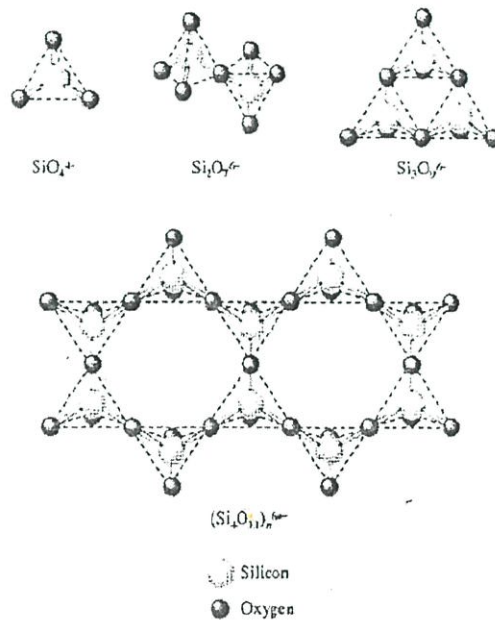
## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

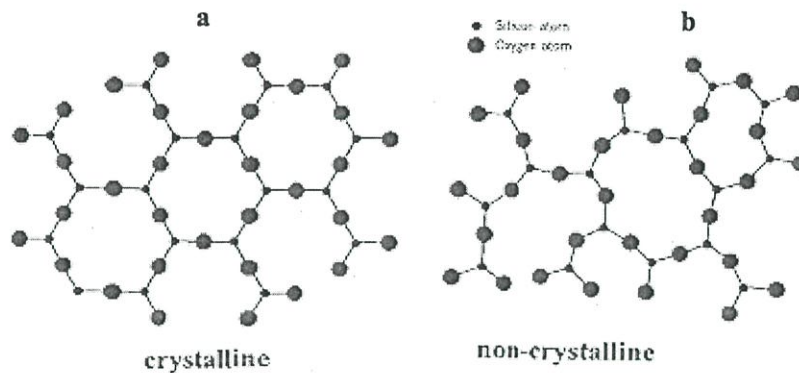
## ทฤษฎี

### 2.1 ซิลิกา (Silica, SiO<sub>2</sub>)

ซิลิกาหรือ ซิลิคอนไดออกไซด์ (SiO<sub>2</sub>) เป็นสารประกอบที่เกิดจากการรวมตัวของธาตุซิลิคอน และออกซิเจน ซึ่งธาตุทั้งสองนี้มีปริมาณมากที่สุดในโลก ซิลิกาเป็นองค์ประกอบของเปลือกโลกประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ หน่วยย่อยพื้นฐานทางโครงสร้างของซิลิกา ส่วนใหญ่เป็นการจัดเรียงตัวแบบทรงเหลี่ยมสี่หน้าเตตระฮีดรอล (tetrahedral) ของออกซิเจน 4 อะตอม ล้อมรอบด้วยซิลิคอนซึ่งเป็นอะตอมกลาง โดยทางโครงสร้างซิลิกาจะมีลักษณะโครงร่างตาข่าย 3 มิติแบบไม่รู้จบ (infinite three dimension network) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และรูปแบบการจัดเรียงตัวของโครงสร้างแบบผลึก (crystalline) และแบบอสัณฐาน (amorphous) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 มีหลายสภาวะการณืที่ซิลิกาแบบอสัณฐานมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยามากกว่าซิลิกาแบบที่เป็นผลึก พื้นที่ผิวของ ซิลิกาแบบอสัณฐานจะมีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากพื้นที่ผิวของซิลิกาแบบ อสัณฐานมี หมู่ไฮดรอกซิลซิลานอล (hydroxy silanol group) ซึ่งครึ่งหนึ่งของหมู่ไฮดรอกซิลซิลานอลจะยังคงอยู่แม้ว่าให้ความร้อนถึง 400 °C [7]



รูปที่ 2.1 รูปแบบต่างๆ ของการเชื่อมต่อของ SiO<sub>4</sub> tetrahedral ใน โครงสร้างพื้นฐานของซิลิกา [7]



**รูปที่ 2.2** รูปแบบการเชื่อมต่อของ  $\text{SiO}_4$  tetrahedral (a) crystalline silica (b) amorphous silica [8]

ในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาวัสดุสำหรับบรรจุในคอลัมน์รีเวอร์สเฟสโครมาโทกราฟีไปสู่อนุภาคที่มีขนาดระดับไมโครเมตร เพื่อความเสถียรในการสร้างพันธะ เริ่มมีการพัฒนาซิลิกาที่ผลิตได้ให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น มีการควบคุมขนาดอนุภาคและขนาดรูพรุนเพื่อยกระดับเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ตั้งแต่ปี 1970 ซิลิกาเจลได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายที่จะนำมาใช้เป็นตัวยึดเกาะสำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ซึ่งโดยหลักแล้วซิลิกาเจลสามารถแบ่งได้ 2 ชนิด ดังนี้ ซิลิกาเจลที่อยู่ในรูปแบบ A (type A) และ B (type B)

- ซิลิกาเจลรูปแบบ A หรือ โซลเจล (solgel) เกิดจากการรวมตัวของซิลิกาโซล ซึ่งมีพื้นที่ผิวน้อยกว่า  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  มีความเป็นรูพรุนต่ำ และมีขนาดของรูพรุนสม่ำเสมอ ผนังของซิลิกาชนิดนี้มีความหนาและแข็ง

ซิลิกาโซล (silica sols) และซิลิกาคอลลอยคอลล (colloidal silica) ซิลิกาโซลจะหมายถึงอนุภาคคอลลอยคอลลของซิลิกาอสัณฐาน จะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในสารละลาย ซิลิกาโซล จะมีสภาพเป็นเจล หรือไม่ตกตะกอนแม้ถูกทิ้งไว้เป็นเวลาหลายปี โซลมีซิลิกาอยู่มากกว่า 50 % ขึ้นไป และอนุภาคจะมีขนาดถึง 300 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 70 นาโนเมตร จะเกิดการตกตะกอนอย่างช้าๆ สถานภาพของโซลจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย พี่เอชจะต้องมากกว่า 11 จึงจะคงสภาพประจุกับขนาดอนุภาคซิลิกา ซึ่งเป็นการป้องกันการจับตัว ประจุที่ผิวจะถูกทำให้เป็นกลางโดยเกลือที่ละลายอยู่ ซึ่งจะเสถียรที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ ในช่วงพีเอชต่ำ โซลจะอยู่ในสภาพกึ่งเสถียร (metastable) การเกิดเจลและการจับตัวจะเกิดขึ้นได้ง่ายแม้มีไอออนของฟลูออไรด์ (fluoride ion) เพียงเล็กน้อยในช่วงที่พีเอชต่ำนี้ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น แอลกอฮอล์ จะต้านการเกิดเจล แต่อย่างไรก็ตามการเกิดเจลจะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูง ยิ่งถ้ามีปริมาณซิลิกาในโซลสูง การเกิดเจลก็ยิ่งเกิดขึ้นง่ายขึ้น ส่วนลักษณะผิวของอนุภาคซิลิกาก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการควบคุมเสถียรภาพของโซล [7]

- ซิลิกาเจลรูปแบบ B (type B) หรือเรียกว่าซีโรเจล (xerogel) และ ซิลเจล (silgel) หรือ โคลเสตซิงฟุ่มซิลิกา (coalescing fumed silica) มีพื้นที่ผิวมากกว่า  $200 \text{ m}^2/\text{g}$  มีความเป็นรูพรุนสูง และมีขนาดของรูพรุนไม่สม่ำเสมอ ผันของซิลิกาชนิดนี้บางและไม่แข็ง [9]

การเตรียมอนุภาคซิลิกาที่มีรูพรุน สามารถเตรียมได้โดยมีขนาดความแคบของ รูพรุนที่เล็กขนาด 8, 30 และ 100 นาโนเมตร และมีขนาดของอนุภาค 10, 5 และ 3 ไมโครเมตร ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์กับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก - ใหญ่ได้แตกต่างกันตามความเหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซิลิกามีข้อดี คือ มีการได้เปรียบทางเชิงกลสูง ซึ่งส่งผลให้มีประสิทธิภาพที่ดีในการบรรจุลงคอลัมน์เพราะทนต่อสภาวะภายใต้ความดันสูง ๆ เป็นระยะเวลานานได้และที่สำคัญเมื่อนำซิลิกามาเป็นของแข็งยึดเกาะจะทำให้คอลัมน์ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงมากกว่าวัสดุชนิดอื่นๆ นอกจากนี้อนุภาคยังมีความแข็ง เมื่อบรรจุลงคอลัมน์ทำให้ความดันย้อนกลับ (backpressure) มีค่าต่ำ และคอลัมน์ที่ได้มีอายุการใช้งานที่ยาวนาน [10,11]

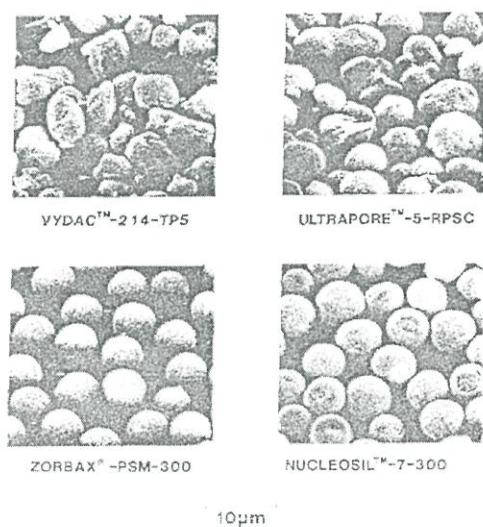
**ตารางที่ 2.1** แสดงคุณลักษณะอนุภาคซิลิกาสำหรับคอลัมน์ HPLC [10]

ลักษณะ (Feature)	การใช้งาน (utility)
ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร	ใช้แยกสารได้เกือบทุกชนิด (most separation)
ขนาดอนุภาค 3 ไมโครเมตร	ใช้แยกสารที่แยกเร็ว (Fast separation)
ขนาดอนุภาค 1-5 ไมโครเมตร	ใช้แยกสารที่แยกได้เร็วมาก โดยเฉพาะสารที่พวกแมคโครโมเลกุล (very fast separations (especially macromolecules))
ขนาดความแคบของรูพรุน (narrow pore) 70-120 Å 150-400 $\text{m}^2/\text{g}$	แยกสารจำพวกโมเลกุลเล็ก (small molecule separations)
ขนาดความกว้างของรู (wide pore) 150-1000 Å, 10-150 $\text{m}^2/\text{g}$	แยกสารจำพวก แมคโครโมเลกุล

อย่างไรก็ตามในเทคนิคโครมาโทกราฟี ซิลิกาเจลที่ใช้งานมีทั้งลักษณะอนุภาคที่เป็นทรงกลม (spherical particles) และอนุภาคที่มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน (irregular particles) เมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์ที่ใช้สารบรรจุที่มีรูปร่างไม่แน่นอน พบว่าระหว่างการใช้งานความดันย้อนกลับ

จะมีค่าสูงกว่าคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคที่เป็นทรงกลมส่วนใหญ่อนุภาคที่มีรูปร่างไม่แน่นอนจะนำไปใช้งานทางการเตรียมตัวอย่างเพราะมีราคาถูก

คุณสมบัติของซิลิกาที่ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะนี้ ที่พื้นผิวซิลิกาสามารถนำไปตัดแปลง โดยการสร้างพันธะกับหมู่ฟังก์ชันอื่นๆ ของสารอินทรีย์บางกลุ่มได้ นอกจากนี้ยังทำงานได้ในสถานะที่มีน้ำและใช้กับสารอินทรีย์เกือบทุกชนิด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมิติรูปร่าง (เช่น การบวม) เพราะซิลิกามีความเสถียรสูงนั่นเอง จึงสามารถทำให้เลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ได้หลายชนิด และปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (gradient elution) ได้ด้วย แต่ซิลิกาก็ยังมีข้อจำกัด ในการนำมาใช้เป็นของแข็งยึดเกาะในคอลัมน์ HPLC เพราะซิลิกาจะละลายที่ค่าพีเอชสูง เช่น พวกซิลเจล (silgel) หรือ ซีโรเจล (xerogel) ที่ได้จากการตกตะกอนของสารละลายซิลิเกต จะใช้งานไม่ได้ที่ พีเอชสูงกว่า 8 ส่วนคอลัมน์ที่ซิลิกาเกิดจากการรวมตัวกันของซิลิกาโซล (เรียกว่า โซลเจล (solgel)) จะถูกใช้งานที่พีเอช ต่ำกว่า 9 ที่พีเอชสูงกว่า 9 ซิลิกาสามารถละลายได้รวดเร็วในเฟสเคลื่อนที่บางตัวทำให้ซิลิกาที่บรรจุในคอลัมน์ยุบลง (collapse) ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลงเป็นอย่างมาก และซิลิกาบางชนิดที่พื้นผิวมีความเป็นกรด จะเกิดปัญหาเมื่อแยกสารประกอบจำพวกเบส แต่ในปัจจุบันได้มีการเตรียมซิลิกาที่มีความเป็นกรดน้อย เพื่อลดปัญหาดังกล่าวลง มีขั้นตอนในการสังเคราะห์ซิลิกาให้ได้อนุภาคทรงกลมได้หลายวิธีแตกต่างกันไป ดังแสดงในรูปที่ 2.3 เปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวขนาด และการกระจายตัวของอนุภาค ซิลิกาทางการค้า ซึ่งวัสดุเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันในการนำไปใช้งาน เพราะมีพื้นที่ผิว ความบริสุทธิ์ และขนาดการกระจายตัวแตกต่างกันนั่นเอง

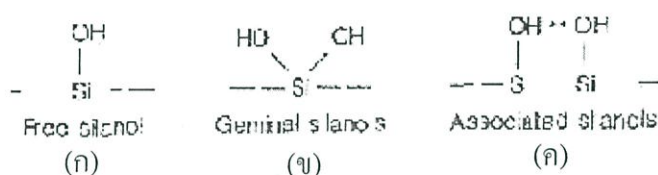


**รูปที่ 2.3** แสดงลักษณะของอนุภาคซิลิกาโดยใช้เทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)

[10]

ลักษณะธรรมชาติทางเคมีของพื้นผิวซิลิกาที่ไม่มีการตัดแปลง มีรายงานจากแต่ละกระบวนการที่ผลิตขึ้นดังต่อไปนี้ ที่พื้นผิวซิลิกาประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) หมู่ไฮดรอกซิล แสดงความมีขั้วและมีคุณสมบัติเป็นกรดเล็กน้อย มีบทบาทสำคัญในกลไกการแยกสาร บนพื้นผิวซิลิกา

จะไม่มีหมู่ไซลันอลเหลืออยู่บนพื้นผิว เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 1000 °C ส่วนภายในโครงสร้างที่มีพันธะซิลอกเซน (siloxane linkage; Si-o-Si) ไม่มีอิทธิพลต่อการแยกของสารสำหรับซิลิกาที่สภาวะเหมาะสมในการทำงานจะต้องมีไซลันอลเพียงพออยู่บนพื้นผิว ซึ่งบนพื้นผิวซิลิกามีหมู่ไซลันอลสูงสุดถึง 8  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  หมู่ไซลันอลบนผิวซิลิกาแบ่งได้เป็น 3 ชนิด ซึ่งสามารถชี้แจงความแตกต่างของไซลันอลแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค magic angle - spinning (MAS)  $^{29}\text{Si}$  NMR และ diffuse reflectance infrared spectroscopy กับ Fourier transform (DRIFT) ได้ดังนี้ คือ ไซลันอลอิสระ (free silanol) ไซลันอล เจมินอล (geminal silanol) และอยู่ในรูป complex (associated silanol) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 หมู่ไซลันอลอิสระมีคุณสมบัติเป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีโลหะ เช่น เหล็ก แมกนีเซียมหรืออลูมิเนียม ปนอยู่ในเนื้อแก้ว โลหะเหล่านี้จะดึง อิเล็กตรอน จากหมู่ไซลันอล ทำให้แสดงคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารที่แยกเป็นเบส เช่น เอมีน เกิดเป็นปรากฏการณ์ฟีดที่มีหางเรียกว่า tailing ซิลิกาที่มีโลหะปนเปื้อนบนพื้นผิว และถูกกระตุ้นด้วยโลหะ แสดงในรูปที่ 2.5 [10]



**รูปที่ 2.4** ไซลันอลในรูปต่าง ๆ พื้นผิวของซิลิกาที่ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะสำหรับเทคนิค HPLC ไซลันอลอิสระ ( free silanol ) (ก) ไซลันอล เจมินอล ( geminal silanol ) (ข) associated silanol (ค) [10]



**รูปที่ 2.5** โลหะปนเปื้อนบนพื้นผิวซิลิกา (ก) หมู่ไซลันอลถูกกระตุ้นด้วยโลหะ (ข) [10]

อย่างไรก็ตามซิลิกาที่จะนำมาใช้งานใน HPLC ต้องมีความบริสุทธิ์สูง โดยเฉพาะจะนำมาแยกสารพวกเบสและสารที่มีขั้วสูง ความบริสุทธิ์ของซิลิกาทางการค้าบางชนิดได้แสดงในตารางที่

**ตารางที่ 2.2** แสดงปริมาณธาตุที่ปนเปื้อนในซิลิกาของ Zorbax Rx-SIL โดยใช้เทคนิค ICP-ASE/MS [10]

ธาตุ (Element)	ปริมาณที่ปนเปื้อน (Content <sup>α</sup> ) (ppm)
Na	10
Ca	2
K	<3
Al	1.5
Fe	3
Mg	4
Zn	1

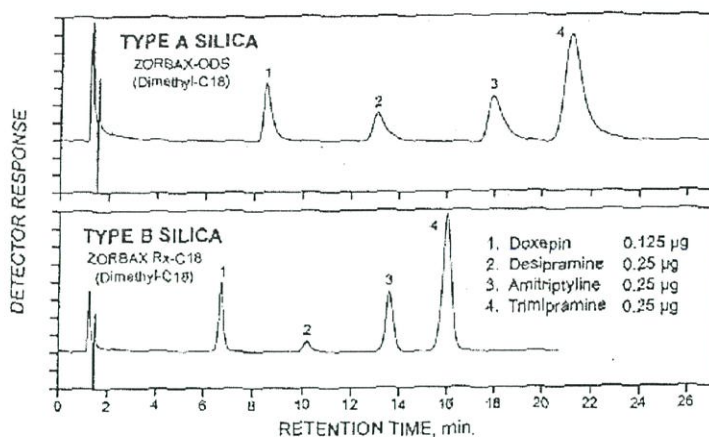
หมายเหตุ α ผลรวมทั้งหมดน้อยกว่า 35 ppm ธาตุที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ppm ไม่สามารถตรวจพบว่าได้ และซิลิกาใช้ในการตรวจสอบมีความบริสุทธิ์ 99.995 %

ซิลิกาที่มีความเป็นกรดมากกว่าเรียกว่า acidic หรือ ซิลิกาแบบ A (type A) นำไปแยกสารประกอบจำพวก neutral และ nonionizable ส่วนซิลิกาที่มีความเป็นกรดน้อยเรียกว่า basic หรือ ซิลิกาแบบ B (type B) แยกสารประกอบพวก ionic และ ionizable ตัวอย่างซิลิกาทางการค้าที่ใช้แยกสารประกอบพวกเบส

**ตารางที่ 2.3** ซิลิกาที่ใช้เป็นตัวยึดเกาะในคอลัมน์ใช้ในการแยกสารประกอบพวกเบส [10]

Altima	RSIL
Betasil	Supelcosil ABZ+
Delta Bond	Super sphere RP
Encapharm RP	Symmetry
Hy persil-BDS	Synchropak RP-SCD
Inergsil	Techspere-BDS
Kromasil	Vybac
Lichrospher Select B	YMC-Basic
Nucleusil AB	Zorbax Rx, SB, XDB

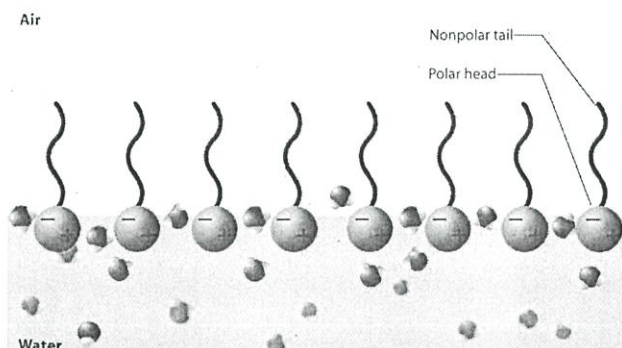
ในรูปที่ 2.6 เปรียบเทียบซิลิกา type A และ type B ของคอลัมน์ C-18 สำหรับแยกสารประกอบพวกเบสในตัวอย่างยา ซึ่งคอลัมน์ที่ใช้ซิลิกา type B เป็นของแข็งยึดเกาะ พิกที่ได้สมมาตร ใช้เวลาในการแยกเร็วกว่า และพิกที่ได้ไม่มีลักษณะมีหาง เมื่อเปรียบเทียบกับซิลิกา type A



**รูปที่ 2.6** เปรียบเทียบการแยกของคอลัมน์ที่มีซิลิกา type A และ type B เป็นของแข็งยึดเกาะ ของคอลัมน์ขนาด 15 mm x 0.46 mm i.d. เฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไนโตรล์ - โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Acetonitrile : sodium phosphate buffer) (30:70) 0.025 โมลาร์ พีเอช 2.5 + ไตรเอทิลเอมีน (triethylamine) และ ไตรฟลูโอโรอะซิติก เอซิด (trifluoroacetic acid) อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และปริมาตรในการฉีด 1 ไมโครลิตร [10]

## 2.2 สารลดแรงตึงผิวและการเกิดไมเซลล์ [12]

สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เป็นสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัวโดยจะเป็นโครงสร้างแบบแอมฟิพาติก (amphipatic structure) โดยที่ ในหนึ่งโมเลกุลจะประกอบด้วยสองส่วน ดังแสดงในรูปที่ 2.7 ส่วนแรกจะประกอบด้วยหมู่ที่มีแรงดึงดูดน้อยกับตัวทำละลายหรือหมู่ที่ไม่ชอบตัวทำละลาย (lyophobic group) ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำจะเรียกหมู่เหล่านี้ว่าเป็นหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นหมู่ของไฮโดรคาร์บอนสายยาว ซึ่งอาจจะเป็นแบบเชิงเส้น หรือแบบแขนง และส่วนที่สองจะประกอบด้วย หมู่ที่มีแรงดึงดูดมากกับตัวทำละลายหรือหมู่ที่ชอบตัวทำละลาย (lyophilic group) ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ จะเรียกหมู่เหล่านี้ว่าเป็นหมู่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ซึ่งส่วนใหญ่จะประกอบด้วยไอออน หรือหมู่ที่มีสภาพขั้วสูง (high pola group) โดยโครงสร้างทางเคมีของส่วนที่ไม่ชอบตัวทำละลาย และส่วนที่ชอบตัวทำละลายในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวนั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวทำละลาย และสถานะที่ใช้ เช่น ในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง จะพบว่าส่วนที่ไม่ชอบตัวทำละลายจะเป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีความยาวเหมาะสม ส่วนหมู่ที่ชอบตัวทำละลายจะเป็นหมู่ไอออนหรือหมู่ที่มีสภาพขั้วสูง ซึ่งหมู่ที่มีสภาพขั้วสูงเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นส่วนที่ไม่ชอบตัวทำละลาย เมื่ออยู่ในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน



**รูปที่ 2.7** โครงสร้างทางโมเลกุลอย่างง่ายของสารลดแรงตึงผิว [13]

### 2.2.1 ชนิดของสารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิวสามารถแบ่งชนิดโดยพิจารณาจากความแตกต่างของส่วนที่ชอบน้ำใน โมเลกุลออกได้เป็น 4 ชนิด คือ

(ก) สารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนลบ (anionic surfactants) สารลดแรงตึงผิว ชนิดนี้เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวเป็นไอออนบวก (cation) และไอออนลบ (anion) โดยสภาพการเกิดแรงตึงผิวจะเป็นผลเนื่องมาจากไอออนลบ เช่น  $\text{RCOO}^- \text{Na}^+$  (สบู่),  $\text{RC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}^+$  (อัลคิลเบนซินซัลโฟเนต)

(ข) สารลดแรงตึงผิวชนิดไอออนบวก (cationic surfactants) สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวเป็นไอออนบวกและไอออนลบ โดยสภาพการเกิดแรงตึงผิวจะเป็นผลเนื่องมาจากไอออนบวก เช่น  $\text{RNH}_3^+\text{Cl}$  (เกลือของสารประกอบเอมีน),  $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$  (ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์)

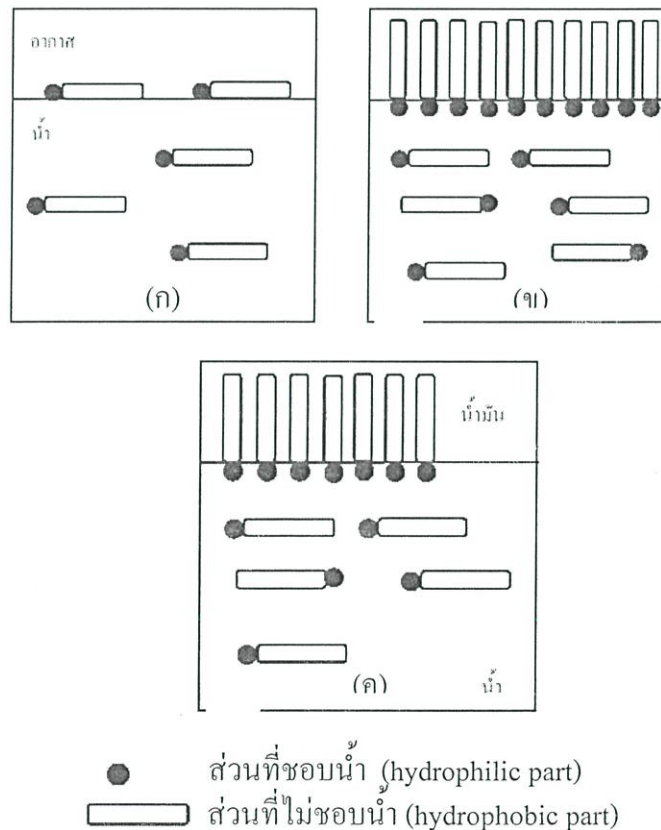
(ค) สารลดแรงตึงผิวชนิดนอนไอออนิก (nonionic surfactants) สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ เมื่อละลายน้ำจะไม่แตกตัวเป็นไอออน ความสามารถในการละลายน้ำของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ขึ้นอยู่กับส่วนที่มีขั้วของโมเลกุล ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ ได้แก่  $\text{RCOOCH}_2$ ,  $\text{CHOHCH}_2\text{OH}$  (โมโนกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสายยาว),  $\text{RC}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_x\text{OH}$  (โพลีออกซีเอทรีลีนเทต อัลคิลฟีนอล)

(ง) สารลดแรงตึงผิวชนิดที่เป็นได้ทั้งไอออนบวกและไอออนลบ (swifter ionic surfactant or amphoteric surfactants) สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้มีทั้งส่วนที่เป็นประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เช่น  $\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  (กรดอะมิโนสายยาว),  $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$  (ซัลโฟเบตอีน) การที่สารลดแรงตึงผิวชนิดนี้ จะแสดงสมบัติเป็นไอออนบวกหรือ

ไอออนลบนั้น ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ และสถานะของตัวกลาง (medium) เช่น ค่าความเป็นเบสของสารละลาย

### 2.2.2 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว [14]

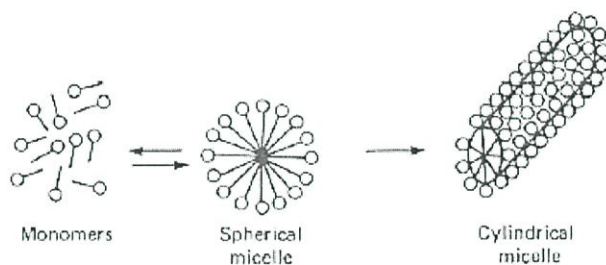
ณ จุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่ำ โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเรียงตัวบนพื้นผิวน้ำ (รูปที่ 2.8 ก) โดยหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาน้ำและส่วนที่ไม่มีขั้วทอดขนานกับผิวน้ำ เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (รูปที่ 2.8 ข) โมเลกุลจะเรียงตั้งตรง โดยหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาอากาศทำให้เปลี่ยนจากระหว่างพื้นผิวน้ำ - อากาศ เป็นระหว่างพื้นผิวไฮโดรคาร์บอน - อากาศ ทำให้แรงตึงผิวของน้ำลดลงเนื่องจากแรงตึงผิวของไฮโดรคาร์บอนจะต่ำกว่าแรงตึงผิวของน้ำ ส่วนพื้นผิวของน้ำและน้ำมัน โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะเรียงตัว โดยหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาน้ำมัน (รูปที่ 2.8 ค)



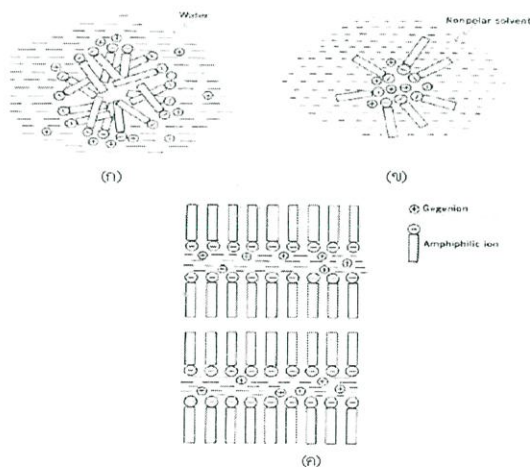
**รูปที่ 2.8** แสดงการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว ที่พื้นผิวของน้ำเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวต่ำ (ก) ที่พื้นผิวของน้ำเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูงขึ้น (ข) ที่พื้นผิวของน้ำและน้ำมัน (ค) [14]

เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวถึงความเข้มข้นหนึ่ง โมเลกุลภายในเนื้อของเหลวจะรวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) โดยสารละลายที่ประกอบด้วยไมเซลล์

เรียกว่า สารละลายไมเซลล์ (micellar solution) ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่ต่ำสุดที่เริ่มเกิดไมเซลล์ เรียกว่า ความเข้มข้นไมเซลล์วิกฤต (critical micelle concentration, CMC) และจำนวนของสารลดแรงตึงผิวที่รวมตัวกันในแต่ละไมเซลล์เรียกว่า aggregation number โดยทั่วไปไมเซลล์จะประกอบด้วยปริมาณของสารลดแรงตึงผิว 50-100 โมเลกุลต่อหนึ่งไมเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวใกล้เคียงความเข้มข้นไมเซลล์วิกฤตนี้ไมเซลล์จะมีรูปร่างเป็นทรงกลม (spherical micelle) (รูปที่ 2.9, 2.10 ก และ ข ) ถ้าความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีโอกาสที่ไมเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical micelle) (รูปที่ 2.9 ) หรือแผ่นแบน (lamellar micelle) (รูปที่ 2.10 ค) ถ้าของเหลวเป็นน้ำโมเลกุลจะเรียงตัวโดยหันส่วนที่มีขั้วออกหาน้ำและส่วนไม่มีขั้วเข้าภายในเซลล์ (รูปที่ 2.10 ก) แต่ถ้าของเหลวเป็นของเหลวที่ไม่ชอบน้ำ เช่น น้ำมัน โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่มีขั้วเข้าภายในไมเซลล์และส่วนไม่มีขั้วออกหาน้ำมัน (รูปที่ 2.10 ข)



รูปที่ 2.9 การจัดเรียงตัวของไมเซลล์ในรูปแบบต่างๆ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว [14]



รูปที่ 2.10 การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวและรูปร่างของ micelle spherical micelle ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ (ก) spherical micelle ในตัวทำละลายที่ไม่ชอบน้ำ (ข) lamellar micelle เมื่อความเข้มข้นของลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ (ionic surfactant) สูงขึ้น (ค) [14]

### 2.3 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี [15]

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสาร เมื่อโมเลกุลของตัวถูกละลายในสารตัวอย่างผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะถูกพาออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ขณะที่ตัวถูกละลายในสารตัวอย่างผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะถูกพาออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่จะเกิดการกระจายตัว (distribute) ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ไปพร้อม ๆ กัน อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่ต่อความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ เป็นค่าคงที่ที่เรียกว่า อัตราส่วนของการกระจาย (distribution ratio, K)

$$A_M \leftrightarrow A_S$$

$$K_A = \frac{[A]_S}{[A]_M} \quad (2.1)$$

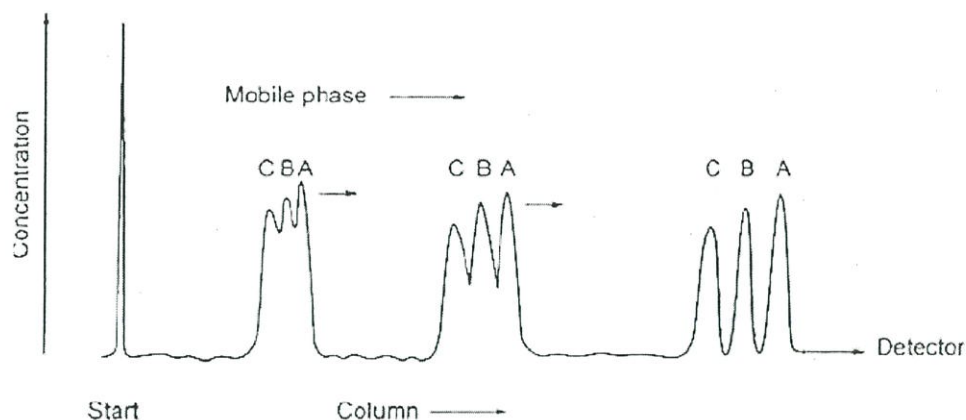
เมื่อ

$A_M$  แทนการกระจายของสาร A ที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

$A_S$  แทนการกระจายของสาร A ที่อยู่ในเฟสที่อยู่กับที่

$K_A$  แทนค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง (Distribution coefficient)

ถ้ามีตัวถูกละลายหลายชนิดที่มีค่า K ต่างกัน จะมีผลทำให้เกิดการแยกขึ้น ตัวถูกละลายที่มีค่า K มาก หมายถึง มีความเข้มข้นในเฟสอยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ จึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าตัวถูกละลายที่มีค่า K น้อยกว่า ตัวอย่าง เช่น เมื่อใส่สารผสมของสารสามชนิด คือ A, B และ C ลงในคอลัมน์โครมาโทกราฟี กระบวนการแยกเริ่มเกิดขึ้นเนื่องจากการกระจายของสาร A, B และ C ระหว่างเฟสทั้งสองไม่เท่ากัน การแยกจะเริ่มเกิดขึ้นได้อย่างชัดเจนเมื่อเวลาที่ใช้ในการเดินทางของสารในคอลัมน์มากขึ้น ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งแสดงได้ว่า  $K_A > K_B > K_C$



**รูปที่ 2.11** การแยกสารผสม 3 ชนิด A, B และ C เมื่อ  $K_A > K_B > K_C$  [16]

ถ้าให้  $U$  เป็นอัตราเร็วเฉลี่ยของโมเลกุลของสารตัวอย่าง  $U_x$  เมื่อผ่านคอลัมน์ จะเขียนได้ว่า

$$U_x = U_M R_x \quad 2.2$$

เมื่อ  $U_M$  แทนอัตราเร็วเฉลี่ยของเฟสที่เคลื่อนที่  
 $R_x$  เป็นสัดส่วน โมลของโมเลกุลของสาร  $X$  ในเฟสที่เคลื่อนที่

$$R_x = \frac{(n_x)_M}{(n_x)_M + (n_x)_S} \quad 2.3$$

เมื่อ  $(n_x)_M$  แทนจำนวนโมลของสาร  $X$  ในเฟสเคลื่อนที่  
 $(n_x)_S$  แทนจำนวนโมลของสาร  $X$  ในเฟสอยู่กับที่

### 2.3.1 สมการการคงไว้ (The Retention Equations)

โดยทั่วไปเราจะไม่สามารถเห็นแบนด์หรือแถบ (bands) ต่างๆ ของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่ถูกแยกเมื่อผ่านคอลัมน์ จึงต้องมีตัววัดสัญญาณ (detector) เพื่อวัดปริมาณของสารตัวอย่างที่แยกออกจากคอลัมน์ แล้วเครื่องวัดสัญญาณจะส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกโครมาโทแกรม จะได้โครมาโทแกรมในลักษณะเป็นพีคซึ่งสามารถจะนำไปประเมินผลทางคุณภาพและปริมาณต่อไป

เราจะมาทำความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาของการคงไว้ (retention time) กับค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง โดยอาศัยสมการ 2.2

$$R_x = \frac{1}{1 + \frac{(n_x)_S}{(n_x)_M}}$$

จะได้

$$R_X = \frac{1}{1 + k'} \quad 2.4$$

อัตราส่วน  $(n_X)_S / (n_X)_M$  เรียกว่าแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor) จะเห็นความแตกต่างระหว่างค่า  $k'$  เป็นอัตราส่วนของปริมาณ (a ratio of amounts) กับค่า  $K$  เป็นอัตราส่วนของความเข้มข้น (ratio of concentrations)

เมื่อแทนสมการ (2.4) ลงในสมการ (2.2)

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

ถ้าให้ความยาวของคอลัมน์เป็น  $L$  สามารถหาเวลาที่สาร  $X$  ผ่านออกจากคอลัมน์ หรือเวลาการคงไว้ (retention time;  $t_R$ ) ของสาร  $X$  ว่าจะต้องใช้เวลานานเท่าใดเพื่อจะให้สาร  $X$  ผ่านออกจากคอลัมน์

เวลา = ระยะทาง / อัตราเร็ว

จะได้

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

หรือ

$$t_R = t_M(1 + k') \quad 2.5$$

เมื่อ  $t_R$  เป็นเวลาการคงไว้ (retention time) ของโมเลกุลของสาร  $X$  คือเวลาที่ต้องการใช้ในการนำโมเลกุลของสาร  $X$  เคลื่อนผ่านไปตามความยาวของคอลัมน์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งโมเลกุลของสาร  $X$  เคลื่อนที่ออกจากปลายอีกด้านหนึ่งของคอลัมน์

$t_M$  เป็นเวลาที่ต้องการใช้ในการให้เฟสที่เคลื่อนที่ผ่านอีกปลายด้านหนึ่งของคอลัมน์

ถ้าความเข้มข้นแทนด้วยหน่วย โมลต่อหน่วยปริมาตร จำนวนโมลของสาร  $X$  ในเฟสอยู่กับที่  $(n_X)_S = [X]_S V_S$  และจำนวนโมลของสาร  $X$  ในเฟสเคลื่อนที่  $(n_X)_M = [X]_M V_M$  โดยที่  $V_S$  และ  $V_M$  เป็นปริมาตรของเฟสที่อยู่กับที่และปริมาตรของเฟสที่เคลื่อนที่ตามลำดับ

เนื่องจากว่า

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

หรือ

$$k' = \frac{K_X V_S}{V_M} \quad 2.6$$

เรียกอัตราส่วน  $V_S/V_M$  ว่าอัตราส่วนของเฟส (phase ratio) นำสมการ 2.6 แทนลงในสมการ 2.5 จะได้

$$t_R = t_M \left( 1 + \frac{K V_S}{V_M} \right) \quad 2.7$$

เมื่อทราบเวลาการคงไว้ ( $t_R$ ) ของโมเลกุล X ย่อมสามารถคำนวณหาปริมาณของเฟสเคลื่อนที่เพื่อใช้ในการพาโมเลกุลของสาร X ผ่านออกจากเฟสที่อยู่กับที่ได้หมดเรียกปริมาตรดังกล่าวว่า ปริมาตรของการคงไว้ (retention volume,  $V_R$ ) หาได้จาก

$$V_R = t_R F$$

เมื่อ  $F$  เป็นอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ (the volume flow rate of the mobile phase) ในทำนองเดียวกัน  $V_M$  เป็นปริมาตรทั้งหมด (total volume) ของเฟสที่เคลื่อนที่อยู่ในคอลัมน์

$$V_M = t_M F$$

บางครั้งที่เราเรียก  $V_M$  ว่าเป็นปริมาตรตาย (dead volume) เกิดขึ้นเนื่องมาจากการมีช่องว่างในคอลัมน์ที่ไม่ถูกรอบครองด้วยเฟสเคลื่อนที่ แทน  $V_S$  และ  $V_M$  ลงในสมการที่ 2.7 จะได้

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

$$V_R = V_M + K_X V_S \quad 2.8$$

สมการ 2.5 และ 2.7 จัดเป็นสมการพื้นฐานของการคงไว้ (the fundamental retention equations) ที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับโครมาโทกราฟีทุกชนิด

ถ้าแทน  $t_M = L/U_M$  ลงในสมการ 2.5 และ 2.7 จะได้

$$t_R = \frac{L(1+k')}{U_M} = \frac{L\left(1+K\frac{V_S}{V_M}\right)}{U_M} \quad 2.9$$

จากสมการ 2.9 จะเห็นว่า  $t_R$  นั้นหาได้จากค่า  $t_M$  และ  $k'$  โดยที่  $t_R$  นั้นจะมีคุณสมบัติดังนี้

1. เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความยาวคอลัมน์ ดังนั้นถ้าเพิ่มความยาวของคอลัมน์เป็นสองเท่าจากเดิม จะทำให้  $t_R$  เพิ่มขึ้นจากเดิมสองเท่าด้วย
2. เป็นสัดส่วนกลับอัตราการไหล  $F$  ดังนั้นถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ จะทำให้  $t_R$  ลดลงครึ่งหนึ่ง อันเนื่องมาจาก  $t_R \propto 1/U_M$
3. ผลของการความดันตก (pressure drop) ระหว่างความดันด้านเข้าคอลัมน์ (column inlet,  $P$ ) และความดันด้านออกของคอลัมน์ (column outlet,  $P_0$ ) จะมีผลทางอ้อมต่อ  $t_M$

สำหรับ  $k'$  นั้นจะมีคุณสมบัติดังนี้

- เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าสัมประสิทธิ์การแจกแจง,  $K$
- เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของเฟสที่อยู่กับที่ในคอลัมน์,  $V_S$
- เป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของเฟสที่เคลื่อนที่ในคอลัมน์,  $V_M$
- เป็นฟังก์ชันกับอุณหภูมิของคอลัมน์

### 2.3.2 ค่าการคงไว้สัมพัทธ์ (Relative retention)

โดยทั่วไปของเทคนิคโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเชิงคุณภาพนั้น เราจะอาศัยการเปรียบเทียบเวลาการคงไว้หรือปริมาตรการคงไว้ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานในสภาวะการทดลองเดียวกัน ค่าที่ใช้เปรียบเทียบดังกล่าวจะเรียกว่า การคงไว้สัมพัทธ์ ( $\alpha$ )

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

$$\alpha' = \frac{K_D}{K_{D_{Std}}} \quad 2.10$$

$t'_R$	เป็นเวลาการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารตัวอย่าง
$t'_{R_{Std}}$	เป็นเวลาการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารมาตรฐาน
$V_R$	เป็นปริมาตรการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารตัวอย่าง
$V_{R_{Std}}$	เป็นปริมาตรการคงไว้ที่ปรับค่าแล้วของสารมาตรฐาน
$K_D$	เป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการแจกแจงของสารตัวอย่าง
$K_{D_{Std}}$	เป็นค่าสัมประสิทธิ์ของการแจกแจงของสารมาตรฐาน

การใช้ค่าการคงไว้สัมพัทธ์ในการเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานก็เพราะว่า ในการวัดเวลาการคงไว้และปริมาตรการคงไว้เพื่อที่จะใช้ในการพิสูจน์หรือจำแนก (identify) ชนิดของส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ถูกแยกออกมาโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีนั้นจะมีความยาวคลาดเคลื่อนได้ ก็เนื่องจากว่าเวลาการคงไว้และปริมาตรของการคงไว้ไม่ใช่ลักษณะพิเศษจำเพาะของส่วนประกอบ แต่เป็นค่าที่ได้จากการทดลองคอลัมน์หนึ่งๆ เท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สะดวกที่จะใช้ค่าการคงไว้ในกรณีวิเคราะห์ทางคุณภาพหรือใช้จำแนกสารต่างๆ แต่จะนำค่าการคงไว้สัมพัทธ์มาใช้แทน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสำหรับการวิเคราะห์ทางเชิงคุณภาพ

### 2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการคงไว้ (Factors affecting retention)

เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างอยู่ในคอลัมน์จะเกิดสมดุลของการกระจายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ จึงเห็นว่าการคงไว้จะถูกควบคุมอันเนื่องมาจากผลของการกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง ส่วนประกอบของเฟสที่เคลื่อนที่ ธรรมชาติของเฟสที่อยู่กับที่ และอุณหภูมิสำหรับความดันนั้นตามทฤษฎีแล้วจะมีผลต่อการกระจาย (distribution) ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี สำหรับเทคนิคของเหลว-ของเหลวโครมาโทกราฟีความดันจะไม่มีผลต่อการกระจาย แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการคงไว้ของสาร

เพื่อให้เข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลต่อการคงไว้ จะต้องเข้าใจถึงแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล (intermolecular force) ซึ่งเป็นแรงทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic force) ที่เป็นไปตามกฎของคูลอมบ์ (coulomb law) ได้แก่

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

5. แรงไอออน-ไดโพลเหนี่ยวนำ (ion-induced dipole interaction)
6. พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding interactions)

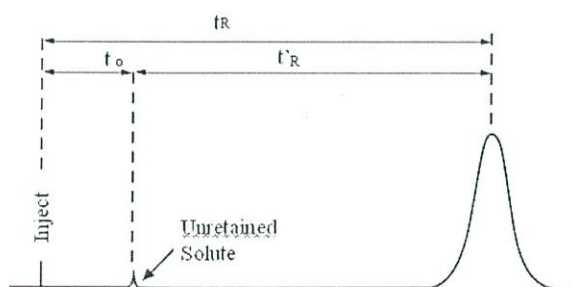
แรงในข้อ 2, 3 และ 4 ก็คือแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals forces) นั่นเอง

### 2.3.4 พารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในโครมาโทกราฟี

#### 2.3.4.1 แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, $k'$ ) [16]

แฟกเตอร์ความจุ หมายถึง เวลาที่ตัวถูกละลายใช้อยู่ในเฟสอยู่กับที่ หรือ ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ ให้นิยามได้เป็นค่าเวลาการคงไว้ที่ถูกปรับ (adjusted retention time) ( $t_R - t_0$ )หารด้วย  $t_0$  ดังแสดงในรูปที่ 2.12

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad 2.11$$



**รูปที่ 2.12** แสดงโครมาโทแกรมในการคำนวณหาค่าปัจจัยความจุ (capacity factor,  $k'$ ) [16]

ตัวอย่างเช่น ถ้า  $k' = 1$  หมายถึงว่า มีตัวถูกละลายใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่ 50 % และใช้เวลาอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ 50 % ถ้า  $k' = 2$  หมายถึงว่า มีตัวถูกละลายใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่ 66.6 % และใช้เวลาอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ 33.3 % เป็นต้น

การใช้เวลาของตัวถูกละลายอยู่ในเฟสแต่ละเฟสขึ้นอยู่กับ อัตราส่วนการกระจาย ( $K_d$ ) ดังนั้นค่าปัจจัยความจุยังมีความหมายได้อีก คือ

$$k' = K_d \times \frac{V_S}{V_M} \quad 2.12$$

คอลัมน์ที่มีค่า  $k'$  สูง แสดงว่าถูกยึดเหนี่ยวในคอลัมน์ได้ดี การปรับปรุงค่า  $k'$  ของตัวถูกละลายจะช่วยให้การแยกดีขึ้น ตามปกติ  $k'$  ของตัวถูกละลายในการทำโครมาโทกราฟีจะอยู่ในช่วง 1-10

### 2.3.4.2 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity, $\alpha$ )

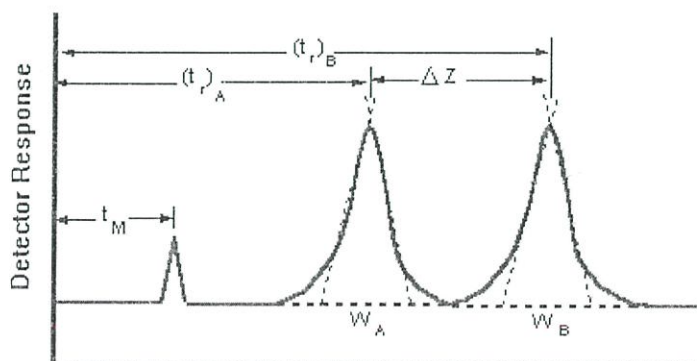
ค่าจำเพาะเจาะจงเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของเฟสอยู่กับที่ในการดูดซับ หรือละลายตัวอย่าง 2 ชนิด ถูกลดดูดซับได้เท่ากัน ก็จะไม่มีความแตกต่างในการแยกเกิดขึ้น ดังนั้นค่าความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นการบอกความแตกต่างของค่ารีเทนชันของพีค 2 พีค ซึ่งทำให้บอกได้ว่าระบบโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพอย่างไรในการแยกตัวอย่างทั้งสองออกจากกัน สมการที่ใช้แสดงค่าความจำเพาะเจาะจง คือ

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} = \frac{V_{R_2} - V_0}{V_{R_1} - V_0} = \frac{k'_2}{k'_1} \quad 2.13$$

### 2.3.4.3 ความสามารถในการแยก (Resolution) [15]

เป้าหมายหรือจุดประสงค์ของการแยกสารโดยกระบวนการทางโครมาโทกราฟี คือสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ เพื่อที่จะหาปริมาณสารแต่ละชนิดและตรวจความบริสุทธิ์ของสาร สิ่งที่ต้องบอกให้ทราบว่าการแยกของสารผสมนั้นดีหรือไม่ คือ ค่าความสามารถในการแยก (Resolution;  $R_S$ ) ซึ่งเป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาสารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ และความกว้างของพีคทั้งสอง คำนวณได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีคทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีคทั้งสอง ดังสมการที่ 2.14 และ โครมาโทแกรมการแยกของสาร A และ B ดังแสดงในรูปที่ 2.13

$$R_S = \frac{2\Delta t_R}{W_A + W_B} \quad 2.14$$

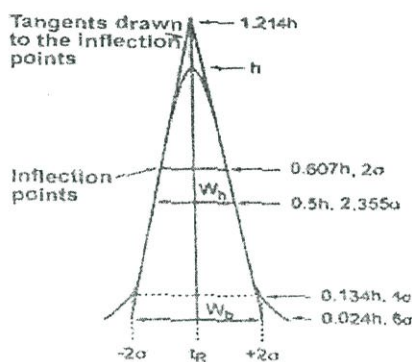


รูปที่ 2.13 แสดง โครมาโทแกรมของสาร A และ B [17]

ตามปกติค่าการแยก ( $R_s$ ) มีค่าเท่ากับ 1.0 ก็เพียงพอสำหรับการแยกทั่ว ๆ ไป ถ้าสารตัวอย่างไม่เข้มข้นมากนัก แต่ถ้าสารตัวอย่างเข้มข้นมาก ค่า  $R_s$  ควรมีค่ามากกว่านี้จึงจะทำให้การวิเคราะห์ทางปริมาณได้ถูกต้อง ถ้าการแยกเท่ากับ 1.5 หมายความว่า พีคแยกออกจากกันได้เท่ากับ 99.7 โดยใช้วิธีแบ่งพื้นที่พีคจากจุดแยกแล้วลากเส้นตั้งฉากกับเส้นฐาน ถ้า  $R_s$  ที่มีค่าเท่ากับ 1.0 มีความหมายว่าพีคทั้งสองแยกออกจากกันได้ 98 % ขณะที่อีก 2 % คือพื้นที่ส่วนที่รวมกับอีกพีคหนึ่ง แต่ก็สามารถนำไปใช้งานทางด้านวิเคราะห์ได้

### 2.3.5 ประสิทธิภาพคอลัมน์ (column efficiency) [16]

จำนวนเพลทตามทฤษฎี (theoretical plate,  $N$ ) เป็นเทอมที่สามารถใช้บอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ ตามปกติพีคที่ปรากฏในโครมาโทแกรมมีลักษณะของการกระจายแบบ Gaussian curve ดังรูปที่ 2.14 ซึ่ง  $\sigma$  คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Gaussian curve ที่อธิบายการกระจายของโมเลกุลของตัวอย่างในพีค



รูปที่ 2.14 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมซึ่งมีการกระจายแบบ Gaussian curve (Gaussian distribution) [16]

ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างมีการกระจายมากพีคที่ได้จะกว้าง คือ คอลัมน์มีประสิทธิภาพน้อยดังนั้น

$$\sigma^2 \propto \frac{1}{N} \quad 2.15$$

$$\sigma \propto \frac{1}{\sqrt{N}} \quad \text{หรือ} \quad \sqrt{N} \propto \frac{1}{\sigma} \quad 2.16$$

นอกจากนี้ความกว้างขวางของพีคขึ้นอยู่กับเวลาที่โมเลกุลของตัวอย่างใช้เดินทาง นั่นคือ

$$\sigma \alpha t_R \times \frac{1}{\sqrt{N}} \quad \text{หรือ} \quad \sqrt{N} \alpha \frac{t_R}{\sigma} \quad 2.17$$

ในทางปฏิบัติพบว่าค่า proportional factor = 1

$$\therefore N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad 2.18$$

จากรูปที่ 2.14 ความกว้างของฐานพีคจะวัดได้จากการลากเส้นสัมผัสขอบของพีคให้เกิดเป็นสามเหลี่ยม ซึ่งแสดงได้ว่า ความกว้างของฐานพีคมีค่าเท่ากับ  $4\sigma$  ( $\sigma = W_b/4$ )

$$\therefore N = \left( \frac{t_R}{W_b / 4} \right)^2 \quad 2.19$$

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad 2.20$$

ในกรณีที่มีความกว้างของฐานพีค ( $W_b$ ) วัดได้ยาก สามารถวัดความกว้างของพีคที่มีความสูงเป็นครึ่งหนึ่ง ( $0.5h$ ) ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ  $2.35\sigma$

$$N = \left( \frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}} / 2.35} \right)^2 \quad 2.21$$

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad 2.22$$

จากสมการที่ 2.21 และ 2.22 แสดงให้เห็นว่า  $N$  เป็นทอมประสิทธิภาพของคอลัมน์นี้หาได้จากการปฏิบัติ อย่างไรก็ตามทอมประสิทธิภาพของคอลัมน์นี้ยังสามารถแสดงได้ในทอม effective column efficiency ( $N_{eff}$ ) ดังนี้

$$N_{eff} = \left( \frac{t'_R}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t'_R}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad 2.23$$

$$(t'_R = t_R - t_0)$$

จำนวนเพลทตามทฤษฎี (N) ในคอลัมน์แปรผันโดยตรงกับความยาวคอลัมน์ ถ้ามีจำนวนเพลท N ที่เกิดสมดุลในคอลัมน์ที่ยาว L จะได้ความสูงของเพลทตามทฤษฎี (The height of theoretical plate, H) ดังนี้

$$H = \frac{L}{N} \quad 2.24$$

$$N = \frac{1}{\sigma^2}$$

$$H = \sigma^2 L \quad 2.25$$

ในปี ค.ศ. 1952 Matrin และ Synge เป็นคนแรกที่อธิบายประสิทธิภาพคอลัมน์ในเทอมของ H โดยทฤษฎีที่ใช้อธิบาย เรียกว่า ทฤษฎีเพลท (Plate theory) ในทฤษฎีนี้ใช้สมมติฐานที่ว่าในคอลัมน์ประกอบด้วยเพลทหลายๆ เพลทซ้อนกันอยู่ในแต่ละเพลทจะมีสมดุลของตัวถูกละลายเกิดขึ้นระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ และเกิดการเคลื่อนที่จากเพลทที่ 1 ไปยังเพลทที่ 2 และเพลทที่ 2 ไปยังเพลทที่ 3 ต่อไปเรื่อยๆ คล้ายกับการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ (counter current extraction) และการกลั่นลำดับส่วน แต่แตกต่างกันคือ ในการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์นั้นการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือถึงสมดุลก่อนเคลื่อนย้ายไปยังเพลทต่อไป ส่วนในวิธีการของโครมาโทกราฟีนั้น ในแต่ละเพลทจะมีการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองได้ไม่สมบูรณ์เพราะมีการผ่านเฟสเคลื่อนที่ตลอดเวลา มีผลทำให้เกิด band broadening ถ้าตัวถูกละลายสามารถเกิดสมดุลขึ้นได้อย่างรวดเร็วแบบค้ำที่ได้ก็จะแคบ โดยหลักการของการสกัด ประสิทธิภาพของการแยกจะดีเมื่อทำการสกัดหลายครั้ง ในโครมาโทกราฟีก็เช่นเดียวกัน ถ้ามีจำนวนเพลทตามทฤษฎีบรรจุในคอลัมน์ได้มาก ประสิทธิภาพของคอลัมน์ก็จะดี การบรรจุเพลทตามทฤษฎี ในคอลัมน์ได้มากแสดงว่าความสูงของเพลทต้องมีค่าน้อย ( $H=L/N$ ) ดังนั้นจึงสามารถอธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ได้ในเทอมของความสูงของเพลทตามทฤษฎี (H) โดย H ยังมีค่าน้อยประสิทธิภาพของคอลัมน์ยิ่งมาก ซึ่ง H จะมีค่าน้อยได้เมื่อ

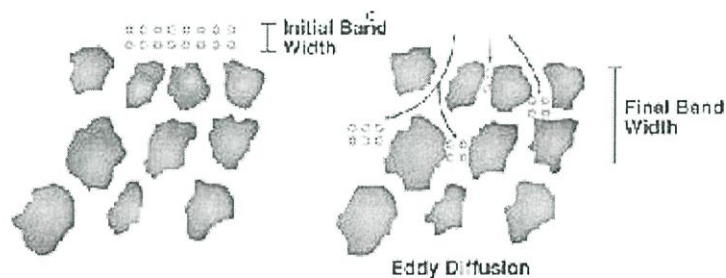
- ขนาดของอนุภาคเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ
- เฟสเคลื่อนที่ที่มีความหนืดต่ำ
- อัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ
- อุณหภูมิในการแยกสูง

ในปี ค.ศ. 1956 Van deemter และคณะ ได้เสนอทฤษฎีอัตรา (Rate theory) ที่สามารถอธิบายการเกิดแบนด์กว้างในกระบวนการระเหย โดยมีสาเหตุที่สำคัญ 3 ประการ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการระเหย ที่ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างมีความประพฤติไม่เหมือนกัน คือ กลไกการเกิดการแพร่กระจาย ซึ่งมี 3 กลไก คือ

- Eddy diffusion
- Longitudinal diffusion
- Mass transfer effect

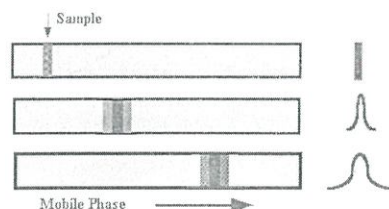
2.3.5.1 Eddy diffusion หรือ multiple path effect เป็นผลที่เกิดขึ้นเนื่องจาก โมเลกุลของตัวอย่างเดินทางผ่านอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ ที่ได้ระยะทางที่แตกต่างกัน เนื่องจากขนาดของอนุภาคไม่เท่ากัน

เมื่อเดินทางผ่าน โมเลกุลแต่ละตัวใช้เวลาที่แตกต่างกันดังรูปที่ 2.15 จึงมีผลทำให้พีคของโครมาโทแกรมเกิดเป็นแบนด์กว้าง การแก้การกระจายแบบ Eddy ทำได้โดยใช้ขนาดของเฟสอยู่กับที่ให้สม่ำเสมอและบรรจุให้แน่น



**รูปที่ 2.15** ผลของการเกิด Eddy diffraction ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างเดินทางไม่เท่ากัน [16]

2.3.5.2 Longitudinal diffusion เป็นการกระจายของตัวถูกละลายจากความเข้มข้นสูงสู่ความเข้มข้นต่ำ เมื่อใส่สารตัวอย่างลงส่วนบนของคอลัมน์แล้วมีเฟสเคลื่อนที่พาตัวถูกละลายเคลื่อนที่ ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่นั้นจะพบว่าการแพร่กระจายจากความเข้มข้นสูง สู่ความเข้มข้นต่ำด้วย ทำให้เกิดแถบของตัวถูกละลายในคอลัมน์กว้าง มีผลทำให้ได้แบนด์ที่มีฐานกว้าง (band broadening) ดังแสดงในรูปที่ 2.16



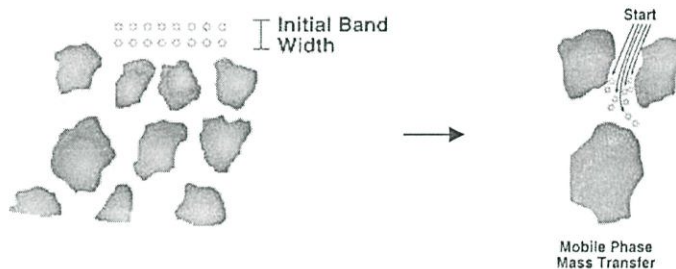
**รูปที่ 2.16** ผลของการเกิด Longitudinal diffusion ทำให้แบนด์ที่ได้มีฐานกว้าง [18]

การแพร่กระจายขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในคอลัมน์ ถ้ามีเวลานานจะเกิดการแพร่กระจายได้มากตัวถูกละลายจะอยู่ในคอลัมน์นานเมื่อเฟสเคลื่อนที่ไหลช้าๆนั่นเองสรุปได้ว่า Longitudinal diffusion จะมีค่ามากเมื่อเฟสเคลื่อนที่ไหลช้า

2.3.5.3 Mass transfer effect เมื่อผลที่เกิดจากการเดินทางของโมเลกุลตัวอย่างผ่านเฟสอยู่กับที่โดยการพาของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งในกระบวนการนี้จะเกิดสมดุลการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองขึ้น มีผลทำให้เกิดการแยกในโครมาโทกราฟี การกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ในแต่ละเพลททางทฤษฎียังไม่ถึงสมดุลก็ต้องถูกถ่ายเทไปยังเพลทต่อไป ผลที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า non equilibrium mass transfer effect ซึ่งมีผลทำให้เกิดแบนด์กว้าง (band broadening) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระจายของตัวถูกละลายที่ไม่ถึงสมดุลจะทำให้มีช่วงของตัวถูกละลายในคอลัมน์ระหว่างเฟสทั้งสองกว้างกว่าเมื่อการกระจายถึงสมดุล

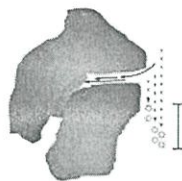
นอกจากนี้บางโมเลกุลของตัวถูกละลายยังถูกยับยั้งให้เคลื่อนที่ได้ช้าด้วยเฟสอยู่กับที่ ทำให้ตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ไม่พร้อมกัน เรียกผลนี้ว่า resistance to mass transfer effect ซึ่งเกิดขึ้นได้ 3 แบบ คือ

- Mobile phase mass transfer เกิดเนื่องจากอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านรอบๆ อนุภาคของเฟสอยู่กับที่ได้แตกต่างกัน ของเหลวที่อยู่ใกล้อนุภาคของเฟสอยู่กับที่จะไหลได้ช้ากว่าที่อยู่ไกลกว่า ดังนั้นการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายจึงต่างกัน ดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 Mobile phase mass transfer [16]

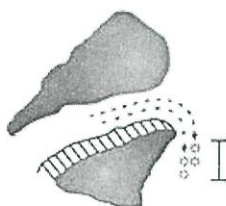
- Stagnant mobile phase mass transfer ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นอนุภาคที่มีรูพรุนเฟสเคลื่อนที่เมื่อเข้าไปอยู่ในรูพรุนจะไม่เคลื่อนที่ โมเลกุลของตัวถูกละลายจะเคลื่อนที่เข้าสู่รูพรุนด้วยการแพร่ โมเลกุลที่แพร่เข้าไปในรูพรุนได้ลึกก็จะออกจากคอลัมน์ได้ช้า ทำให้โมเลกุลของตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดแบนด์กว้างขึ้นในโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 2.18



Stagnant Mobile Phase  
Mass Transfer

รูปที่ 2.18 Stagnant Mobile phase mass transfer [16]

- Stationary phase mass transfer เมื่อโมเลกุลของตัวถูกละลายแพร่เข้าไปในรูพรุนแล้วซึม (penetrate) เข้าไปในเฟสอยู่กับที่ ถ้าเข้าไปลึกก็จะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ ซึ่งการเคลื่อนที่ของโมเลกุลแต่ละตัวจึงใช้เวลาไม่เท่ากันมีผลทำให้เกิดเป็นแบนด์กว้างขึ้นในโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 2.19



Stationary Phase  
Mass Transfer

รูปที่ 2.19 Stationary phase mass transfer [16]

จากผลของการเกิด mass transfer effect ทั้ง non equilibrium mass effect และ resistance mass transfer effect แสดงให้เห็นว่าทั้งสอง effect จะมีค่าน้อยเมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ได้ช้าซึ่งตรงข้ามกับ Longitudinal diffusion

Van Deemter ได้อธิบายไว้เป็นสมการทางคณิตศาสตร์ คือ

$$H = A + B/u + Cu \quad 2.26$$

#### เทอม A

แทนผลเนื่องจาก Eddy diffusion ซึ่งเกิดจากการแพร่ของโมเลกุลของสารตัวอย่างไปตามเฟสอยู่กับที่ ถ้าขนาดของเฟสอยู่กับที่ไม่สม่ำเสมอ การเดินทางของโมเลกุลของตัวอย่างจะใช้เวลาไม่เท่ากัน จึงทำให้เกิดแบนด์ที่กว้าง ผลนี้ไม่ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

$$A = 2\lambda d \quad 2.27$$

$d$  = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเฟสเคลื่อนที่ (diameter of the stationary phase particle)

$\lambda$  = ค่าคงที่ที่ขึ้นอยู่กับความเหมือนกันของเฟสอยู่กับที่ และความเป็นระเบียบในการบรรจุ  
(Uniformity and column geometry)

### เทอม B

แทนผลอันเนื่องมาจาก longitudinal diffusion ปกติการแพร่กระจายจะเกิดขึ้นได้ทุกทิศทาง สำหรับการแพร่กระจายแบบ longitudinal diffusion เป็นการแพร่กระจายจากความเข้มข้นสูงไปสู่ความเข้มข้นต่ำตามความยาวของคอลัมน์ในทิศทางที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่

$$B = 2\gamma D_M \quad 2.28$$

$\gamma$  คือ diffusion factor ขึ้นอยู่กับการบรรจุเฟสอยู่กับที่ ถ้าเป็น packed column จะมีค่าประมาณ 0.7 ส่วน capillary column ใน GC จะมีค่าประมาณ 1.0

$D_M$  คือ การแพร่กระจายของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

ตามสมการ Van Deemter เทอม B จะมีค่ามากเมื่อการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าต่ำ ( $u$  น้อย ทำให้เทอม B/ $u$  มีค่ามาก) และเทอม B ใน GC มีค่ามากกว่าใน LC เพราะเกิดมีอัตราการฟุ้งกระจายได้มากกว่าของเหลว อย่างน้อย  $10^4$  เท่า

### เทอม C

แทนผลเนื่องจาก mass transfer effect ซึ่งเกิดขึ้นได้ในลักษณะ non equilibrium mass transfer และ resistance to mass transfer การเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายจากเฟสหนึ่งไปยังอีกเฟสหนึ่งในคอลัมน์เกิดจากการพาของเฟสเคลื่อนที่ และในขณะเดียวกันก็เกิดการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ โมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวจะใช้เวลาในการอยู่ในเฟสไม่เท่ากัน ถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีมาก จะมีผลทำให้เทอม C มีค่ามาก ซึ่งโมเลกุลของตัวถูกละลายจะถูกพาออกจากคอลัมน์ก่อน โดยที่การแพร่กระจายยังไม่ถึงสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง มีผลให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ต่ำ ถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ โมเลกุลของตัวถูกละลายก็จะใช้เวลาเพียงพอในการเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง มีผลทำให้เทอม C มีค่าน้อย ประสิทธิภาพของคอลัมน์จึงมีค่าสูง จะเห็นได้ว่าจากเทอม C ขึ้นอยู่กับเฟสทั้งสอง ซึ่งแต่ละเฟสมีความสัมพันธ์กับค่าความหนาของฟิล์มและการแพร่กระจายดังนี้

$C_S$  คือ เทอมที่เกี่ยวข้องกับเฟสอยู่กับที่ ขึ้นอยู่กับความหนาของฟิล์มเฟสอยู่กับที่ และ diffusion coefficient ของตัวถูกละลายอยู่กับที่

$$C_S = d_f^2 / D_S \quad 2.29$$

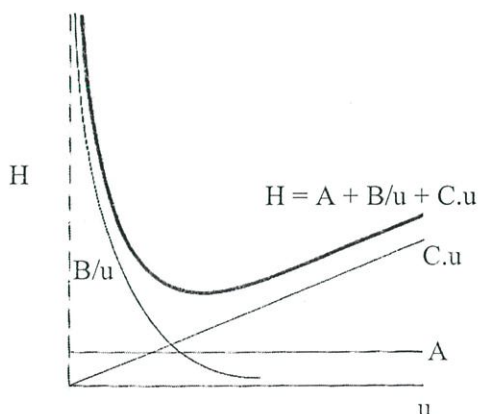
$d_f$  = ความหนาของฟิล์มเฟสอยู่กับที่

$D_S$  = diffusion coefficient ของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่

$C_M$  คือเทอมที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของโมเลกุลของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ ขึ้นอยู่กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเฟสอยู่กับที่ ( $d_p$ ) และ diffusion coefficient ของตัวถูกละลายกับเฟสเคลื่อนที่ ( $D_M$ )

$$C_M = d_p^2 / D_M \quad 2.30$$

จากสมการของ Van Deemter แสดงให้เห็นได้ว่า ถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ( $u$ ) มีค่าน้อยมีผลให้เทอม B มีค่ามาก เนื่องจาก H มีค่ามาก ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้น  $u$  ควรมีค่ามาก เพื่อให้เทอม B มีค่าน้อย แต่ในทางกลับกัน ถ้าเทอม  $u$  มีค่ามากจะมีผลทำให้เทอม C มีค่ามาก ซึ่งมีผลทำให้เทอม H มีค่ามาก ประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้น  $u$  ควรมีค่าน้อยเพื่อให้เทอม C มีค่าน้อย ซึ่งเป็นผลที่ขัดแย้งกับเทอม B จะเห็นได้ว่า  $u$  ที่น้อยเกินไป ประสิทธิภาพของคอลัมน์ไม่ดีเช่นกัน ดังนั้น  $u$  ที่เหมาะสมจึงมีเพียงค่าเดียวซึ่งหาได้จากการพลอตกราฟระหว่าง H กับ  $u$  ดังรูปที่ 2.20



**รูปที่ 2.20** Van Deemter plot ระหว่าง H กับ  $u$  [16]

A term คือ eddy diffusion

B term คือ longitudinal diffusion

C term คือ mass transfer effect ประกอบด้วย  $C_S$  term และ  $C_M$  term

อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ( $u_{opt}$ ) จะมีผลทำให้  $H$  มีค่าต่ำสุด ( $H_{min}$ ) คือ

$$dH/du = 0 \text{ จากสมการที่ 2.26} \quad H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

$$\frac{dH}{du} = \frac{-B}{u^2_{opt}} + c = 0 \quad 2.31$$

นั่นคือ 
$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad 2.32$$

แทนค่า  $u_{opt}$  ลงในสมการ (2.30)

$$H_{min} = A + \frac{B}{\sqrt{\frac{B}{C}}} + C\sqrt{\frac{B}{C}} \quad 2.33$$

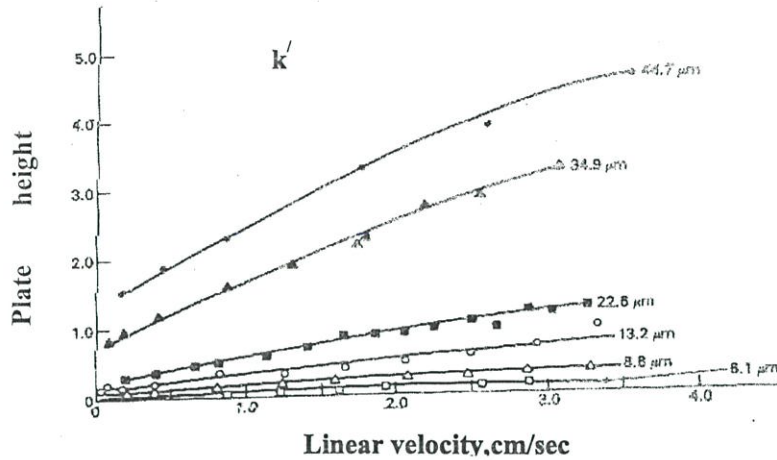
$$= A + 2\sqrt{BC} \quad 2.34$$

ดังที่กล่าวแล้วว่าใน LC เทอม  $B$  จะมีความสำคัญน้อยกว่าใน GC ดังนั้น LC จะได้

$$H \cong A + Cu \quad 2.35$$

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง  $u$  และ  $H$  พบว่าในการเพิ่ม  $u$  สำหรับอนุภาคขนาดเล็กๆ ของเฟสอยู่กับที่ไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง ดังรูปที่ 2.21

การใช้อนุภาคเล็กมีผลทำให้ประสิทธิภาพดี คือ  $H$  มีค่าน้อย ซึ่งใช้ในระบบของ HPLC แต่การใช้อนุภาคเล็กๆ จะมีผลทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้ามาก เพื่อให้เฟสเคลื่อนที่เกิดการไหลในคอลัมน์และมีการแยกเกิดขึ้นจึงต้องใช้แรงดันเข้าบังคับการไหล ดังนั้นการทำ HPLC จึงต้องมีปั๊มสำหรับอัดแรงดันของเฟสเคลื่อนที่เป็นส่วนประกอบของเครื่องมือตัวเอง



**รูปที่ 2.21** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง linear velocity ( $u$ ) ของเฟสเคลื่อนที่ กับค่า  $H$  จะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคเล็กๆ เมื่อเพิ่ม  $u$  ไม่มีผลให้  $H$  เพิ่มขึ้น [16]

### 2.3.6 การควบคุมการแยกในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Controlling Resolution in Liquid Chromatography) [18]

ความสามารถในการแยก (Resolution,  $R_s$ ) มีความสัมพันธ์กับแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor,  $k'$ ) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity,  $\alpha$ ) และประสิทธิภาพคอลัมน์ (column efficiency,  $N$ ) ดังสมการ

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{1 + k'} \right) \quad 2.36$$

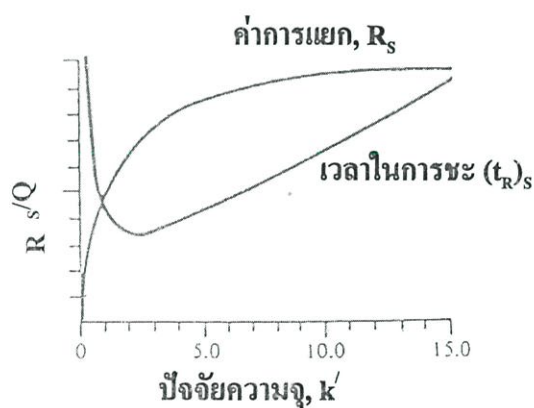
จากสมการใช้เป็นแนวทางในการเลือกสถานะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด ได้สามวิธี คือการปรับค่า  $k'$ ,  $\alpha$  และ  $N$  ในการทำงานพิจารณาว่า ควรปรับพารามิเตอร์ตัวใดก่อน-หลัง เพื่อให้การแยกดีขึ้น สิ่งที่ยากและสะดวกคือ ควรปรับค่า  $k'$  และ  $\alpha$  ก่อน ถ้าการแยกยังไม่ดีจึงปรับค่า  $N$  ซึ่งไม่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายสูง

จากสมการเทอมที่ 1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์เกี่ยวข้องกับผลกระทบทางจลศาสตร์ (kinetic effect) ที่มีผลต่อความกว้างของพีคคือ  $\sqrt{N}$  เทอมที่ 2 ค่าความจำเพาะเจาะจงและเทอมที่ 3 ค่าความจุเกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกส์ของสารที่ทำการแยก ขึ้นกับค่าการกระจายตัวของสาร (distribution coefficient) และปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ พารามิเตอร์ในเทอมที่ 2 คือค่าความจำเพาะเจาะจง เกี่ยวข้องเฉพาะกับคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิดเท่านั้น ส่วนพารามิเตอร์ในเทอมที่ 3 คือค่าความจุ เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทั้งของสารและคอลัมน์

2.3.6.1 การปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor,  $k'$ ) การเพิ่มค่า  $k'$  เป็นการเพิ่มค่าความสามารถในการแยก ในขณะที่เดียวกันเวลาในการชะ (elution time) ก็เพิ่ม ดังนั้นในการปรับค่า  $k'$  จะต้องคำนึงถึงผลของการแยก เวลา และลักษณะของพีคที่ได้ค่า  $k'$  ที่เหมาะสมก็ควรอยู่ในช่วง  $1 \leq k' \leq 10$  เพราะถ้าค่า  $k' > 10$  ผลของการแยกหรือค่าความสามารถในการแยกเพิ่มไม่มากนักแต่จะใช้เวลานาน พีคที่ได้จะกว้างเตี้ย ตรวจสอบได้จากตารางที่ 2.4 พบว่าค่าการแยกจะมีการเปลี่ยนแปลงมากในช่วง  $1 \leq k' \leq 5$  และหลังจากค่า  $k' > 5$  การแยกจะเปลี่ยนไม่มากนัก แต่เวลาในการชะเปลี่ยนมาก ดังแสดงในรูปที่ 2.22 วิธีที่ง่ายที่สุดในการปรับค่า  $k'$  คือการปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนค่า  $k'$  กับ  $R_s$  [18]

$k'$	$k'/(1+k')$ (ค่าการแยกที่เหมาะสม)
0	0
1	0.5
2	0.67
5	0.83
10	0.91
$\infty$	1.00



รูปที่ 2.22 แสดงผลของปัจจัยความจุ ที่มีต่อการแยกและเวลาในการชะ elution time ( $t_R$ )

[18]

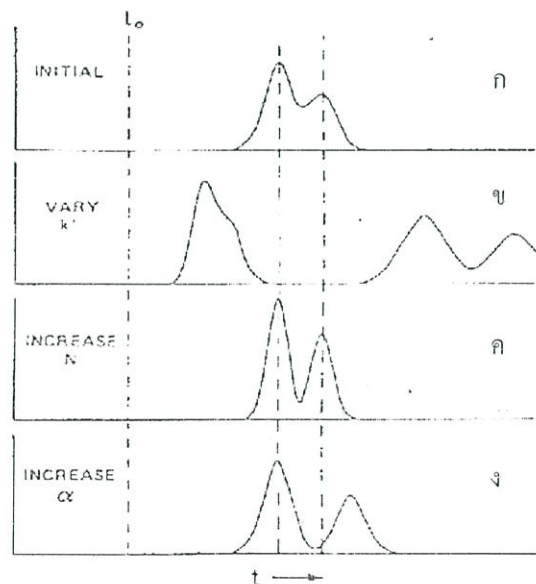
### 2.3.6.2 การปรับค่าความจำเพาะเจาะจง (selectivity factor, $\alpha$ )

การเพิ่มค่าความจำเพาะเจาะจง (selectivity factor,  $\alpha$ ) เป็นการเพิ่มความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่เร็วเท่าไรแล้วถ้าค่า  $\alpha = 1$  แสดงว่าพีคสองพีคที่อยู่ใกล้กัน ไม่แยกออกจากกัน ในกรณีนี้การปรับหรือควบคุมค่า  $k'$  หรือ  $N$  ไม่เพียงพอที่จะทำให้การแยกดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจำเป็นต้องเพิ่มค่า  $\alpha$  โดยให้ค่า  $k'$  อยู่ในช่วงที่มีเหมาะสม (1-10) วิธีการปรับค่า  $\alpha$  ทำได้หลายวิธีได้แก่

- เปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ คือ เปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายหรือเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย เปลี่ยนพีเอชของเฟสเคลื่อนที่
- เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์
- เปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสอยู่กับที่หรือคอลัมน์โดยเปลี่ยนชนิดของอนุภาค

### 2.3.6.3 การปรับค่าประสิทธิภาพคอลัมน์ (column efficiency, $N$ )

การปรับค่าประสิทธิภาพคอลัมน์ (column efficiency,  $N$ ) เพื่อให้การแยกหรือค่าการแยกดีเอ็นเอเป็นทางเลือกสุดท้ายเพราะเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวก การเพิ่มค่า  $N$  ทำโดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ ทำให้พีคแคบลง โดยทั่วไป มักจะลดค่า  $H$  ทำโดยเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ลดขนาดของอนุภาคของสารบรรจุในคอลัมน์ ลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ (เพื่อเพิ่มอัตราการกระจายตัว ของสารในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีคแคบลง) และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ ตัวอย่างแสดงผลของการปรับค่า  $k'$ ,  $\alpha$  และ  $N$  ที่มีต่อการแยกดังแสดงในรูปที่ 2.23



รูปที่ 2.23 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า  $k'$ ,  $\alpha$  และ  $N$  ที่มีต่อ (resolution,  $R_s$ ) [18]

จากรูปที่สามารถอธิบายผลของการปรับ  $k'$ ,  $\alpha$  และ  $N$  ที่มีต่อ  $R_s$  ได้ดังนี้ เช่น การแยกสารสองชนิด ด้วยคอลัมน์รีเวอร์สเฟส (reversed-phase) ใช้ส่วนผสมของน้ำและ เมทานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่เริ่มด้วยใช้เมทานอลกับน้ำ ในอัตราส่วน 50:50 สารทั้งสองจะแยกดังในรูป (ก) ค่า  $k'$  ที่ได้จะอยู่ในช่วง  $0.5 \leq k' \leq 2$  ซึ่งอยู่ในช่วงไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการปรับค่า  $k'$  ก่อนเพราะสะดวกถ้าต้องการลดค่า  $k'$  จะต้องเพิ่มความแรงของเฟสเคลื่อนที่ คือเพิ่มสัดส่วนของ เมทานอล-น้ำเป็น 70:30 ผลการแยกไม่ดี พิกทับกันดังในรูป (ข) ด้านซ้าย เพราะฉะนั้นต้องเพิ่มค่า  $k'$  เพื่อให้การแยกดีขึ้น โดยลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่เป็น 35:65 การแยกดีขึ้น แต่ความสูงของพีคลดลงมาและใช้เวลานาน ดังในรูป (ข) ด้านขวารูป (ค) เป็นการปรับค่า  $N$  โดยการเพิ่มจำนวนเพลท เช่น ความยาวของคอลัมน์จาก 15 เป็น 25 เซนติเมตร ผลการแยกพิกแคบลง ความสูงเพิ่มขึ้น เวลาไม่เปลี่ยนไปจากเริ่มแรก (โดยทั่วไปการเพิ่มค่า  $N$  หรือเพิ่มความยาวของคอลัมน์ เวลาจะเปลี่ยน แต่ในกรณีเข้าใจว่าอัตราส่วนของน้ำหนักของสารตัวอย่างต่ออนุภาคของคอลัมน์ไม่เปลี่ยนแปลง) รูปที่ 2.23 (ง) เป็นการปรับค่า  $\alpha$  โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่จาก เมทานอล เป็น อะซิโทไนไตรด์ เช่น ใช้ อะซิโทไนไตรด์ 40 % ในน้ำ ผลการแยกดีขึ้นเวลาในการคงไว้ (retention time;  $t_R$ ) และความสูงของพีคเปลี่ยนไม่มากนัก

การแยกเทคนิคโครมาโทกราฟีตามชนิดของเฟสเคลื่อนที่และเฟสนิ่งได้ สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทหลักดังนี้

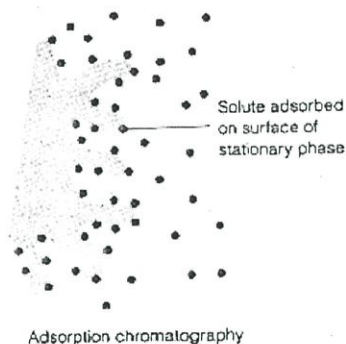
### 2.3.7 กลไกการแยก [16]

การกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองขึ้นอยู่กับอันตรกิริยา(interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่าง ตัวถูกละลายกับเฟสอยู่กับที่ซึ่งทำให้เกิดการแยกขึ้น กลไกการแยก (Separation Mechanism) สามารถแบ่งตามชนิดของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้น ได้ดังนี้

- การดูดซับ (Adsorption)
- การแบ่งส่วน (Partition)
- การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange)
- การแยกตามขนาดโมเลกุล (Size exclusion)
- การเกิดสัมพรรคภาพ (Affinity)

#### 2.3.7.1 การดูดซับ (Adsorption)

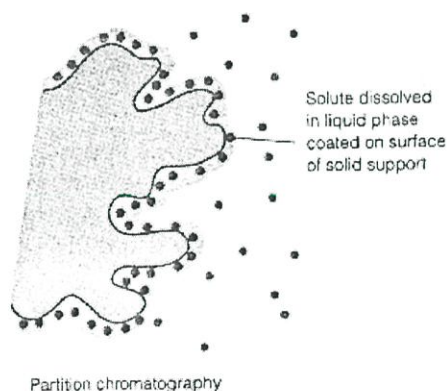
ตัวดูดซับทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ โมเลกุลของตัวอย่างจะถูกดูดซับที่ผิวของเฟสอยู่ดังรูปที่ 2.24 และในขณะที่เดียวกันเฟสเคลื่อนที่ก็จะแข่งขันในการดึง โมเลกุลของตัวอย่างมาละลายในเฟสเคลื่อนที่ ตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะถูกดูดซับได้แตกต่างกันจึงทำให้เกิดการแยกขึ้นและถ้าตัวดูดซับมีพื้นที่ผิวมากก็มีความสามารถดูดซับได้ดี



รูปที่ 2.24 การดูดซับ (Adsorption) [19]

### 2.3.7.2 การแบ่งส่วน (partition)

เป็นการแบ่งส่วนจำนวนโมเลกุลของตัวอย่างระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ที่เป็นของเหลวเช่นเดียวกันกับเฟสเคลื่อนที่ แต่มีคุณสมบัติที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน (immiscible) ของเหลวในเฟสอยู่กับที่จะมีลักษณะเป็นฟิล์มบางๆ ฉาบบนของแข็งช่วยยึดเกาะ (solid support) ซึ่งเป็นอนุภาคของแข็งที่มีรูพรุนหรือไม่มีก็ได้ ดังรูปที่ 2.25 ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวที่มีขั้ว (polar) เฟสเคลื่อนที่ที่ต้องเลือกไม่มีขั้ว จะมีผลทำให้ตัวถูกละลายที่มีขั้วถูกยึดไว้ในเฟสอยู่กับที่ได้แน่นและนาน ทำให้ตัวถูกละลายมีค่า  $t_R$  นานกว่าตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้ว (non polar) เฟสเคลื่อนที่ที่ต้องเลือกตัวทำละลายที่มีขั้ว ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดไว้ในเฟสอยู่กับที่ได้แน่นและนาน ทำให้มีค่า  $t_R$  นานกว่าตัวถูกละลายที่มีขั้ว เรียกเทคนิคนี้ว่า Reverse phase chromatography

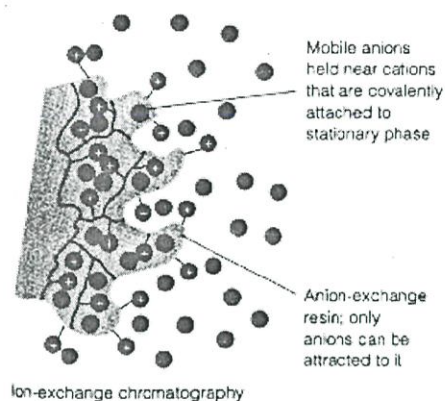


รูปที่ 2.25 การแบ่งส่วน (Partition) [19]

### 2.3.7.3 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange)

เฟสอยู่กับที่เป็นอนุภาคที่มีประจุที่ผิว สามารถดึงดูดไอออนที่มีประจุตรงข้ามไว้ได้เรียกไอออนนี้ว่าเคาเตอร์ไอออน (counter ion) ซึ่งสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนอื่นที่

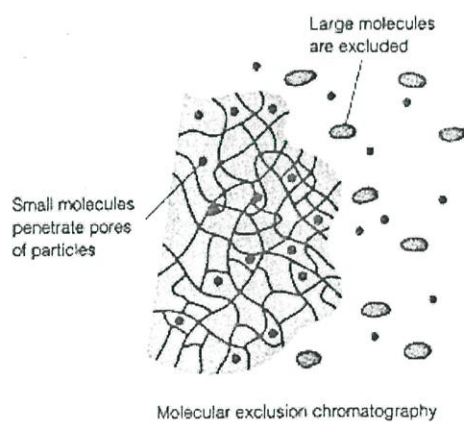
มีความสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุได้สูงกว่า ดังรูปที่ 2.26 เฟสอยู่กับที่เป็นพวกพอลิเมอร์เรซินที่มีรูพรุนและมีหมู่ไอออน (ion group) ต่อด้วยการสร้างพันธะด้วยสารเคมี chemical bond ที่ aromatic nucleus ของพอลิเมอร์



รูปที่ 2.26 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange) [19]

#### 2.3.7.4 การแยกตามขนาดโมเลกุล (Molecule exclusion)

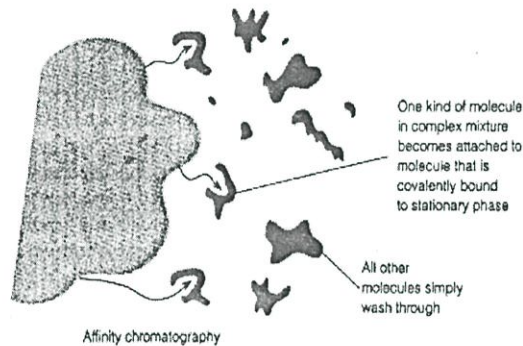
เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเนื่องจากตัวถูกละลายมีขนาดโมเลกุลต่างๆ กันถูกแยกตามขนาดโมเลกุลด้วยรูพรุนของเฟสอยู่กับที่ที่มีลักษณะเป็นเจล โมเลกุลขนาดเล็กสามารถลอดผ่านรูพรุนของเจลได้ จะออกจากคอลัมน์หลังโมเลกุลที่ไม่ผ่านเข้ารูพรุน เทคนิคนี้จึงทำให้เกิดการแยกตัวถูกละลายตามขนาดของโมเลกุลดังรูปที่ 2.27 โมเลกุลขนาดใหญ่จะมีค่า  $t_R$  น้อยกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก



รูปที่ 2.27 การแยกตามขนาดโมเลกุล (Molecules exclusion) [19]

### 2.3.7.5 สัมพรรคภาพ (Affinity)

เป็นกลไกของการจับแล้วปล่อย (Lock and Key) ดังรูปที่ 2.28 หลักการของการทำ affinity chromatography คือการทำให้เอนไซม์ (enzyme) หรือแอนติเจน (antigen) เกิดสร้างพันธะกับอนุภาคที่ใช้เป็นตัวยึดเกาะ (support particle) แล้วผ่านสารตัวอย่างที่เป็นแอนติบอดี (antibody) ลงในคอลัมน์จะเกิดกระบวนการจับ (lock) จากนั้นทำการปรับเปลี่ยนพีเอชหรือ ionic strength ของเฟสเคลื่อนที่เพื่อทำให้แอนติเจนยังคงมี chemically bonded phase อยู่กับอนุภาคที่ใช้เป็นตัวยึดเกาะและสามารถใช้งานต่อได้อีก



รูปที่ 2.28 การสัมพรรคภาพ (Affinity) [19]

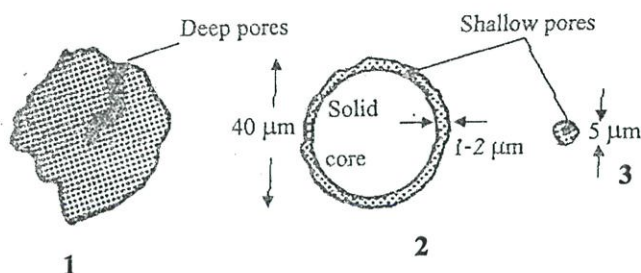
## 2.4 โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) [19]

HPLC คือ วิธีการแยกสารและตรวจวัดโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ จึงใช้ขนาดอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ขนาดเล็กมากๆ เมื่อเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็ก การไหลของเฟสเคลื่อนที่จึงต้องใช้แรงดันเข้าช่วย เพื่อทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย และทำให้การแยกเกิดได้เร็วขึ้น การแยกในระบบ HPLC จึงมีความหมายเป็น High performance liquid chromatography, High pressure liquid chromatography หรือ High speed liquid chromatography

ปกติอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลว (LC) แบ่งเป็น 3 ขนาด คือ

1. Large porous particle หรือ Macro porous particle มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย ( $d_p$ ) เท่ากับ 50-250  $\mu\text{m}$  ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวทั่วไป
2. Pellicular particle มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย ( $d_p$ ) เท่ากับ 30-50  $\mu\text{m}$  ใช้ได้ในระบบ HPLC ปกติจะใช้งานของ preparative scale

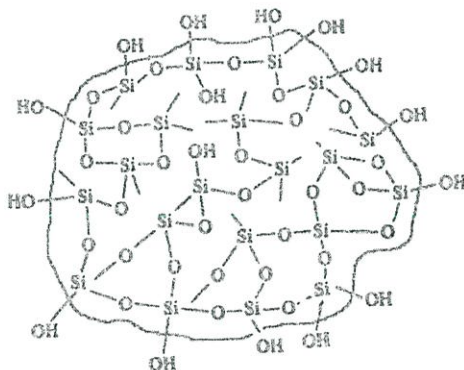
3. Micro porous particle มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย ( $d_p$ ) เท่ากับ 5-10  $\mu\text{m}$  ใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC



รูปที่ 2.29 แสดงชนิดอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ใน LC [16]

#### 2.4.1 การจำแนกชนิดของโครมาโทกราฟีตามกลไกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์

2.4.1.1 โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography) ทำให้เกิด โครมาโทกราฟีที่เรียกว่า liquid solid chromatography (LSC) เฟสที่อยู่กับที่จะมีสภาพขั้วสูง สามารถดูดซับเหล่านี้ ได้แก่ ซิลิกา และ อะลูมินา ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล ที่มีสภาพขั้วสูงที่ผิวหน้า ซิลิกาจะได้รับความนิยมนมากกว่า เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาถูก มีหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) ที่ว่องไวบนผิวหน้า ดังแสดงในรูปที่ 2.30 ระบบ LSC จัดเป็น normal phase chromatography เพราะมีเฟสอยู่กับที่มีสภาพขั้วสูง เหมาะสำหรับการแยกพวก alkaloid, steroid, vitamins, triglycerides, sex hormone และ peptides เป็นต้น



รูปที่ 2.30 โครงสร้างของซิลิกาเจล [16]

ในกระบวนการแยกสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ จะเกิดการแข่งกันกัน ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับตัวถูกละลาย ในการดูดซับที่เฟสอยู่กับที่ ตัวถูกละลายจะถูกระงับออกจากคอลัมน์ได้ เนื่องจากโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่เข้าแย่งดูดซับแทน ซึ่งจะเข้าแย่งที่ได้จะต้องมีแรงของตัวทำละลาย (solvent strength) สูงกว่า เพื่อให้การแยกเกิดขึ้นได้ต้องใช้เฟสเคลื่อนที่จากความแรงต่ำๆ

ไปหาสูง คือ จากไม่มีขั้วไปถึงมีขั้ว ทำให้ระบบของ LSC สามารถทำนายค่าของการคงไว้ (retention time,  $t_R$ ) ของตัวถูกละลายได้ตามลำดับของสภาพขั้วดังนี้

aliphatic hydrocarbon < olefin < aromatic hydrocarbon < organohalide < organosulfide < ether < nitrocompound < aldehyde, ketone, ester < alcohols, amines < sulfones < sulfoxides < amides < carboxylic acid

ข้อควรคำนึงถึงสำหรับ LSC

1. พื้นที่ผิวของซิลิกาเป็นกรดอ่อน สารที่เป็นเบสอาจเกาะติดแน่น ทำให้พีคที่ได้มีหาง (tailing peak) เกิดขึ้น ดังนั้นไม่ควรใช้กับสารที่เป็นเบส สารที่มีฤทธิ์เป็นกรดใช้ได้ดี แต่ต้องไม่เป็นกรดมากเกินไปสำหรับอนุภาคนาใช้กับสารที่เบสได้ดีกว่า
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ควรบริสุทธิ์มากๆ เพราะสิ่งเจือปนที่มีขั้วจะทำลายซิลิกาโดยเข้าคู่อกับที่ active site ได้อย่างถาวร
3. การใช้ตัวทำละลายหลายๆ ตัวผสมกันจะทำให้ค่าความจำเพาะเจาะจงดีกว่าใช้เพียงตัวเดียว
4. พีคมีลักษณะเป็นที่มีหาง (Tailing peak) เกิดกับตัวอย่างที่มีขั้วมาก หรือมี ionized group สามารถแก้ไขได้โดยการเติม anti tailing agent เช่น ตัวอย่างเป็นกรดให้เติม 1 % อะซิติกแอซิด (acetic acid) หรือฟอสฟอริกแอซิด (phosphoric acid) ถ้าเป็นเบสให้เติมเทอเทียรี เอมีน (tertiary amine) เช่น ไตรเอทิลเอมีน (triethylamine) หรือแอมโมเนีย (ammonia) แต่โดยทั่วไปจะแก้ปัญหาโดยใช้ reverse phase chromatography

2.4.1.2 โครมาโทกราฟีแบบกระจาย (Partition chromatography) ทำให้เกิด โครมาโทกราฟีที่เรียกว่า liquid – liquid chromatography (LLC) การใช้ของเหลวเป็นเฟสอยู่กับที่ทำได้โดยเคลือบของเหลวบนของแข็งยึดเกาะ (solid support) โดยที่ของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ ต้องไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ดีกว่าคือเกิดกระบวนการกระจาย (partition) ได้หลายครั้งตามจำนวนเพลทตามทฤษฎี ในทางปฏิบัติการผ่านเฟสเคลื่อนที่ลงไปบนคอลัมน์นานๆ อาจละลายเฟสอยู่กับที่ได้บ้าง คอลัมน์อาจมีประสิทธิภาพลดลง การแก้ไขหรือหลีกเลี่ยงการเกิด solvent stripping ทำได้โดยใช้ตัวชะที่อิมมิดด้วยเฟสอยู่กับที่ วิธีการของ partition ไม่ค่อยเหมาะสมกับการทำ Gradient elution

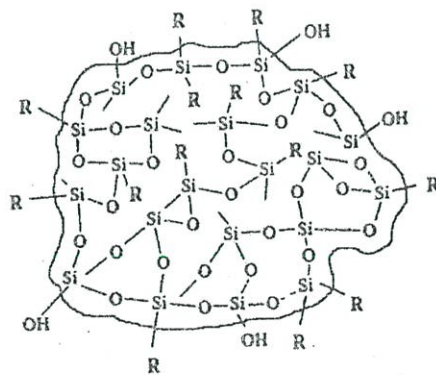
เนื่องด้วยข้อจำกัดของการทำ liquid-liquid partition chromatography มีมากทำให้การวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิดนี้ใน HPLC จึงมีน้อย ด้วยเหตุผลที่คอลัมน์สามารถเกิด solvent stripping ได้จึงมีการพัฒนาคอลัมน์ที่ใช้เฟสอยู่กับที่ที่เป็นของเหลว โดยการทำให้ของเหลวเกิดสร้างพันธะกับของแข็งยึดเกาะ (solid support) จึงเกิดเทคนิคในการทำโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า bond phase chromatography

2.4.1.3 Bond phase chromatography (BPC) เหตุผลที่ต้องพัฒนาการทำ partition chromatography มาเป็น bond phase chromatography นอกจากการแก้ปัญหา solvent stripping แล้วยังทำให้

1. สามารถแยกสารที่มีขั้ว (polar), ไม่มีขั้ว (nonpolar), ไอออนิก (ionic) และ ionizable molecule ที่ผสมกันอยู่ได้เพียงคอลัมน์เดียว
2. เลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ได้มากชนิดขึ้น
3. สามารถใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นพวก น้ำ - บัฟเฟอร์ และ เมทานอล - อะซิโตน ไทรล์ ที่มี ราคาถูกกว่าสารหลายชนิดอื่น
4. สามารถทำ gradient elution ได้ผลดี
5. ไม่มีข้อจำกัดของแรงดันขาเข้าของเฟสเคลื่อนที่

เฟสอยู่กับที่ชนิดการสร้างพันธะเกิดขึ้นได้โดยนำซิลิกาามาดัดแปลง (modified) โดยทำปฏิกิริยากับตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเฟสอยู่กับที่ โดยให้เกิดพันธะที่หมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) ดังรูปที่ 2.31 ซิลิกาเจล ที่นำมาใช้เป็นฐานต้องมีคุณสมบัติ

- เป็นอนุภาคขนาดเล็ก (3, 5, 10  $\mu\text{m}$ )
- มีพื้นที่ผิวมาก
- ควบคุมขนาดรูพรุน (เกือบทั้งหมดใช้ชนิด microporous silica)
- แข็ง และทนต่อแรงต่างๆ ทางกล (mechanic)



รูปที่ 2.31 ซิลิกาที่ถูกดัดแปลง (modified silica) [16]

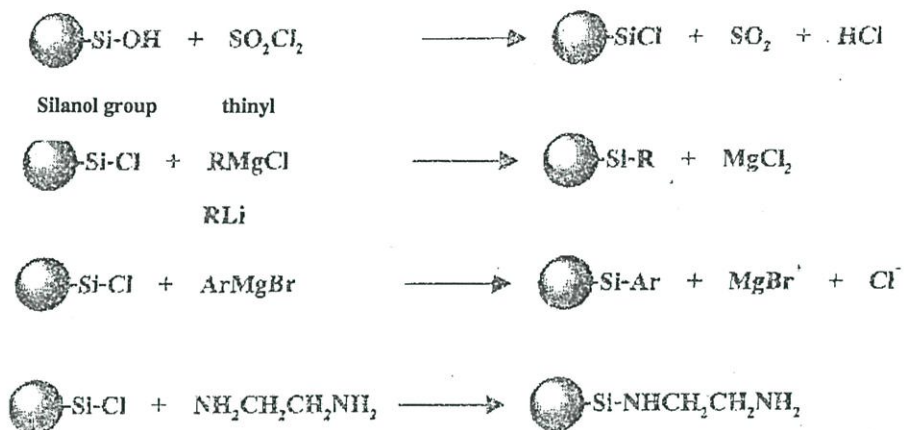
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการ modified silica เป็น bond phase stationary phase มี 3 แบบ คือ

- 1) หมู่ไฮดรอกซิลทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์

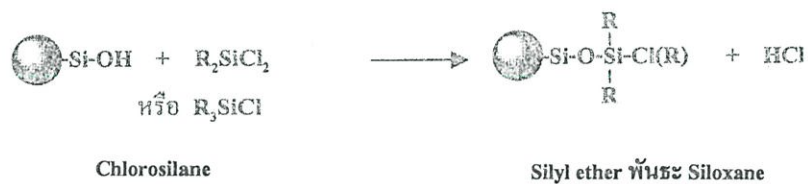
การสร้างพันธะแบบนี้เป็นชนิดแรกที่เกิดขึ้น ไม่ค่อยดีนักเพราะอีเทอร์สร้างพันธะ (ether bond; Si-O-R) ที่เกิดขึ้นสามารถถูก hydrolyse ได้ง่ายในสภาวะที่เป็นกรด (aqueous acidic condition)



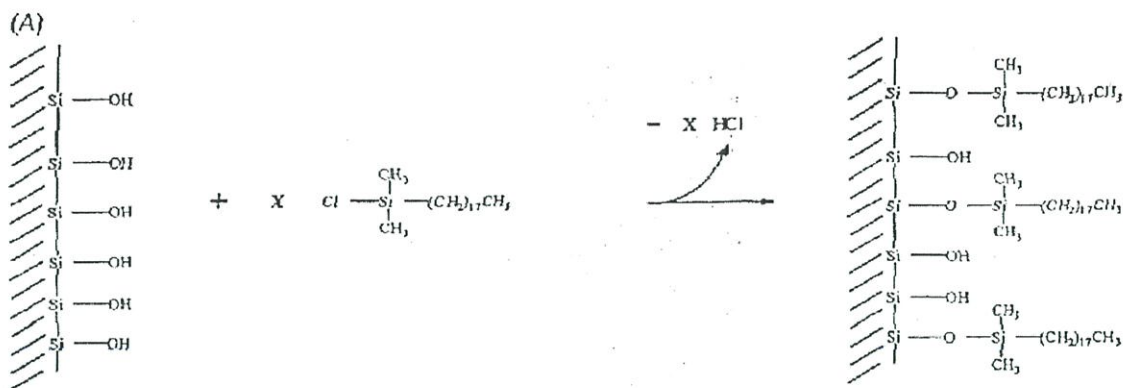
2) คลอรีเนชัน (Chlorination) เป็นวิธีที่สะดวก ใช้หมู่ไฮดรอกซิลทำปฏิกิริยากับ  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  ได้  $\text{SiCl}$  ที่ทำปฏิกิริยากับ Grignard reagent หรือ organolithium เกิดเป็น  $\text{Si-C}$  bond ที่คงทนต่อการแตกตัว



3) ไฮลิดชัน (Silylation) วิธีที่นิยมใช้มากในปัจจุบันโดยใช้สารพวกออร์กาโนคลอโรซิลเลน (organochlorosilane) หรือ ออร์กาโนอัลคอกซีซิลเลน (organoalkoxy silane) ทำให้เกิดพันธะเคมีแบบซิลอกเซน (siloxane) ที่เสถียร ( $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C}$ ) พีเอชที่เหมาะสมคือ  $> 2 - < 7.5$  ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เรียกว่าซิลานาชัน (Silanization) ปฏิกิริยาที่สภาวะไม่มีน้ำ (anhydrous conditions) จะได้โมโนเมอร์ริก เฟส (monomeric phase) ถ้าเกิดโพลีเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ภายใต้สภาวะที่ควบคุมความชื้น จะได้โพลีเมอร์ริก เฟส (polymeric phase)



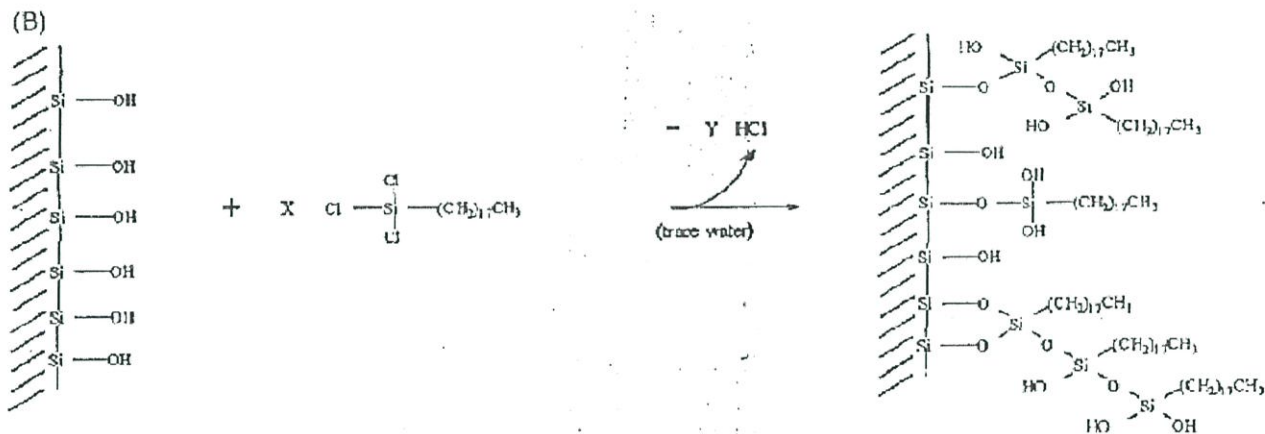
3.1) ตัวอย่างของการสร้างพันธะ แบบโมโนเมอร์ริก เฟส วิธีเตรียมให้ใช้ซิลิกา กับ ไดเมทิล คลอโรซิลเลน (dimethyl chlorosilane) ดังแสดงในรูปที่ 2.32



รูปที่ 2.32 แสดงการสร้างพันธะแบบ โมโนเมอร์ริก [20]

3.2) ตัวอย่างของการสร้างพันธะแบบโพลิเมอร์ริกเฟส จะใช้

ได หรือ ไตร คลอโรซิลเลน (di - หรือ tri- chlorosilane) การเกิดพันธะเกิดได้ทั้งทางด้านตั้งตรงแนวตั้งฉาก (vertical) และตามแนวขวาง (horizontal) ดังแสดงในรูปที่ 2.33



รูปที่ 2.33 แสดงการสร้างพันธะแบบ โพลิเมอร์ริกเฟส [20]

โพลิเมอร์ริกเฟส จะมีความจุของสารตัวอย่างสูง ใช้กับ gradient elution ได้ดี การสร้างพันธะสามารถมีคุณสมบัติต่างๆ กัน หรือเป็นชนิดต่างๆ ได้ โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันนอล R\* ในไซลิเลชัน รีเอเจนต์ (Silylating agent ; R\*SiCl<sub>3</sub>) ทำให้เกิดการแบ่งสร้างพันธะเป็น 2 ชนิดคือ

- Normal phase BPC
- Reverse phase BPC

### นอร์มัลเฟส (Normal phase) BPC

กลุ่ม R\* จะเป็นสารที่สภาพขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ หลักการเลือกเฟสที่เคลื่อนที่คล้ายกับ LSC การเปลี่ยน R\* ให้มีหมู่ฟังก์ชันนอลต่างๆ กัน จะทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงแตกต่างกัน หมู่ฟังก์ชันนอล (functional group) R\* ได้แก่

diol	$-(CH_2)_3-O-CH_2-\overset{OH}{\underset{ }{C}}H-CH_2-OH$
cyano	$-(CH_2)_3C \equiv N$
amino	$-(CH_2)_n-NH_2$ n= 3 หรือ 4
dimethyl amino	$-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$
diamine	$-(CH_2)_3-NH(CH_2)_2NH_2$

การทำนอร์มัล การสร้างพันธะ (NP - BPC) มีลักษณะคล้ายคลึงกับ LSC แต่มีข้อดีกว่าคือ

- 1) ไม่จำเป็นต้องควบคุมปริมาณน้ำในตัวทำละลายเพราะน้ำไม่สามารถ deactivated ที่ active sites บนคอลัมน์ได้ เนื่องจากเป็นคอลัมน์ที่ปิดปลายว่องไวที่เหลือ (Capped column) คือไม่มี Si - OH เหลืออยู่ หรือเหลืออยู่ในปริมาณที่น้อย เพราะเกิดการสร้างพันธะไปแล้ว
- 2) เกิดสมมูลได้เร็วกว่า LSC ทำให้สามารถทำ gradient elution ได้ง่าย ใช้เวลาในการทดลองน้อย
- 3) ใช้กับตัวทำละลายได้หลายชนิด ดังนั้นถ้าคอลัมน์สกปรกก็ทำความสะอาดได้โดยล้างกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว เช่น เอทิลอะซิเตต (ethylacetate) หรือเมทานอล เป็นต้น
- 4) มีความจำเพาะเจาะจงต่างไปจาก LSC

#### ข้อควรคำนึง

- 1) ถ้าสารที่วิเคราะห์มีแนวโน้มที่จะแตกตัวเป็นไอออน เมื่อใช้ NP - BPC เช่นอะมิโน (amino;  $-NH_2$ ) ควรแก้ไขโดยการเติมกรดอะซิติกลงในเฟสเคลื่อนที่
- 2) เมื่อใช้วัสดุที่จะบรรจุลงคอลัมน์ ที่มีหมู่ฟังก์ชันนอลเป็น  $-NH_2$  และ  $-CN$  อาจเกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างได้ ทำให้คอลัมน์เกิดการเปลี่ยนแปลงไป จึงควรระวัง

## Reverse phase BPC

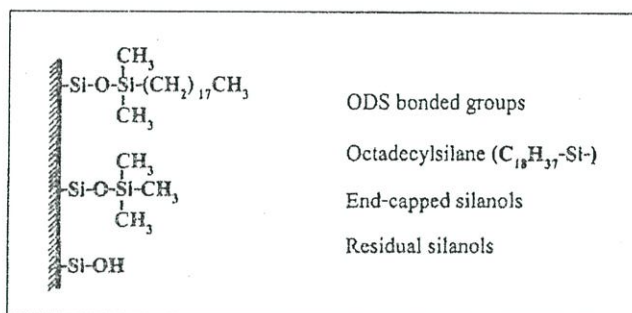
กลุ่ม R\* จะเป็นสารที่มีสภาพขั้วน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ การเลือกเฟสเคลื่อนที่ เลือกลงจากมีขั้ว (polar) ----> ไม่มีขั้ว (nonpolar) เทคนิคที่เหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลายหรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ดีเนื่องจากมีสารประกอบอินทรีย์จำนวนมากที่มีพฤติกรรมเช่นนี้ จึงนิยมใช้ RP – BPC มากใน HPLC

หมู่ฟังก์ชันนอล R\* ใน RP – BPC ได้แก่  $-C_{18}H_{37}$ ,  $-C_8H_{17}$ ,  $-C_6H_{13}$ ,  $-C_2H_5$  เป็นต้น

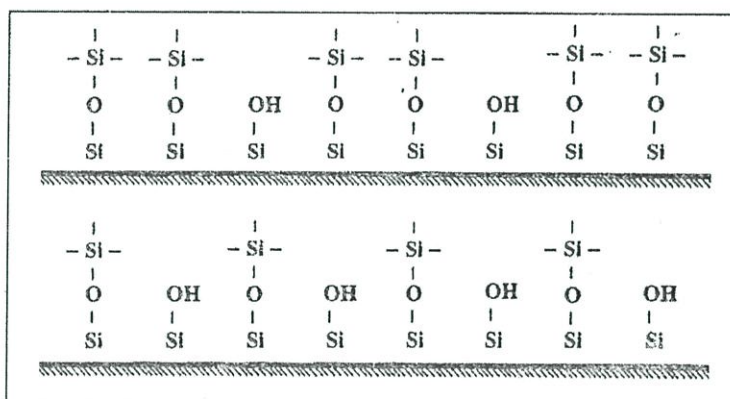
ความนิยม RP – BPC มีมากเพราะ

- 1) สามารถนำมาแยกได้ทั้งนอนไอออนิก (nonionic) และสารประกอบไอออนิก ionic compound
- 2) ใช้เพื่อควบคุมเฟสเคลื่อนที่ได้
- 3) เฟสเคลื่อนที่ใช้น้ำ เมทานอล ซึ่งหาง่าย ราคาไม่แพง มีความบริสุทธิ์สูง
- 4) สามารถทำนายลำดับการชะของสารตัวอย่างได้ดี เพราะเป็นไปตามคุณสมบัติของการไม่ชอบน้ำ
- 5) สมดุลที่เกิดในคอลัมน์รวดเร็ว เหมาะกับการทำ gradient elution

สิ่งสำคัญที่เกิดขึ้นในการสังเคราะห์ BPC โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับชนิด RP – BPC คือ เปอร์เซ็นต์ของการไซลานไนเซชัน silanization (หรือ coverage) ซึ่งหมายถึงจำนวนหมู่ไซลานอลที่ทำปฏิกิริยากับ silylating agent ในทางปฏิบัติ จะได้ % coverage ประมาณ 45% ถ้าเปอร์เซ็นต์สูงมีผลให้ค่าความจุ และค่าความจำเพาะเจาะจงสูงตามไปด้วย การมีหมู่ไซลานอลเหลืออยู่มากๆ จะมีผลทำให้เกิดลักษณะฟีกที่มีหาง แบบเดียวกับการทำ LSC แต่ถ้าหมู่ไซลานอลที่เหลือถูกไฮโดรไลซิส และทำปฏิกิริยากับไตรเมทิลคลอโรไซเลน (trimethylchlorosilane) จะเกิด trimethyl silyl ether ที่เรียกว่า end – capped คอลัมน์ชนิดเดียวกันแต่มี % coverage หรือ carbon load ต่างกัน จะมีผลของการหน่วงเหนี่ยวตัวอย่างไม่เหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.5 และรูปที่ 2.34 และ 2.35



รูปที่ 2.34 แสดงโครงสร้างของ ODS บนพื้นผิวซิลิกา [16]



รูปที่ 2.35 แสดง surface coverage [16]

ความสามารถในการหน่วงเหนี่ยว และการแยกของคอลัมน์การสร้างพันธะ ขึ้นอยู่กับ

1. หมู่ฟังก์ชันนอลที่เลือกสร้างพันธะ
2. ชนิดของซิลิกาที่ใช้ทำเป็นฐาน และการทำ pre - treatment
3. ปริมาณสารที่เกิดพันธะ (carbon load) ปริมาณคาร์บอนที่ใส่ลงในเฟสอยู่กับที่ วัดเป็นร้อยละ โดยน้ำหนักของซิลิกา ปริมาณคาร์บอนที่ใส่เข้าไปยังมีปริมาณมาก ยิ่งเพิ่มการหน่วงเหนี่ยว
4. ปริมาณการเกิดพันธะ end capped ที่เรียกว่า พันธะทุติยภูมิ

**ตารางที่ 2.5** สรุปการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง NP – BPC และ RP – BPC [16]

	Normal phase	Reverse phase
Compound	Polar substituents	Non – polar substituents
Stationary phase polarity	High (alkyl – amines, alkyl - nitriles)	Low (alkyl – silanes)
Solvent polarity	Low to medium	Medium to high
Solvent strength	Non polar ---> polar	Polar -----> Non polar
Sample elution order	Least polar first	Most polar first
Effect of increasing	Reduces elution time	Increase elution time
Solvent polarity		
Cautions :	Ketone & aldehydes not good for alkylamine	Use between pH 2 – 8

**ตารางที่ 2.6** การถูกหน่วงเหนี่ยวของอะซิโตฟีโนน (Acetophenone) โดยคอลัมน์ C-18 ชนิด  
ต่างๆ [16]

Column	Percentage carbon load	K'
Dupont Zorbax ODS	20	15.7
Merck Lichrosorb RP – 18	22	10.3
Beckman Ultrasphere ODS	12	11.3
Whatman Partisil ODS – 3	10	12.0
Water Resolve C <sub>18</sub>	10	12.4
Water $\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	10	7.9
Water Nova – Pak C <sub>18</sub>	7	5.5

2.4.1.4 Affinity chromatography คอลัมน์ที่ทำให้เกิดเทคนิคของการวิเคราะห์ที่เรียกว่า affinity chromatography เป็นคอลัมน์ที่ใช้ลิแกนด์สัมพรรคภาพ (affinity ligand) ซึ่งเป็นสารทางชีวภาพ ได้แก่ immobilized enzyme หรือแอนติเจนเกิดพันธะของแข็งยึดเกาะ (solid support)

สารตัวอย่างที่เป็นโมเลกุลของสารทางชีวภาพ เช่น enzyme inhibitor หรือแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับ ลิแกนด์สัมพรรคภาพ จะถูกจับไว้ในคอลัมน์ ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ในสารตัวอย่าง จะถูกระงอกจากคอลัมน์โดยไม่ถูกหน่วงเหนี่ยว โมเลกุลของตัวอย่างจะถูกระงอกจากคอลัมน์ได้โดยการปรับเปลี่ยนพีเอช และ ionic strength ของเฟสเคลื่อนที่ที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ และเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้

วิธีการของ affinity chromatography มีความจำเพาะเจาะจงสูง การแยกที่ดีโดยเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างที่สมมาตรของของแข็งยัดเกาะ หรือตัวรองรับ ซึ่งของแข็งยัดเกาะ ได้แก่ agarose, cellulose, dextrin, silica และ polyacrylamide

ความสำเร็จของการใช้เทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับทางเลือกปฏิกิริยาเคมีที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อระหว่างลิแกนด์สัมพรรคภาพกับตัวยัดเกาะ ประโยชน์ที่ได้รับจากวิธีการนี้ นอกจากจะแยกสารทางชีวภาพแล้วยังเป็นวิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วย นอกจากนี้ยังใช้เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์จากสารที่สกัดได้

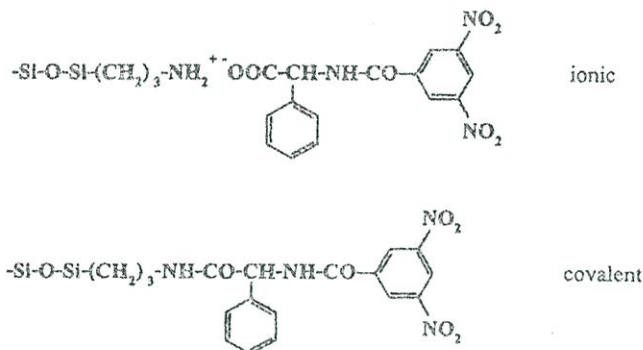
**ตารางที่ 2.7** ตัวอย่างสารที่นำมาทำการแยกโดยเทคนิค Affinity chromatography [16]

Immobilised ligand	โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์
Di และ trivalent metal ions	โปรตีนที่มี His, Trp และ Cys residues
Carbohydrates	Lectins
Reactive dyes	nucleotide – binding proteins
Nucleic acids	Exo – และ endonucleases, polymerases
Amino acids	Proteases
Nucleotides, cofactors, substrates และ inhibitor	Enzymes
Protein A, Protein G	immunoglobulins
Hormones, drugs	Receptor antigens
Antibodies, antigens	Antigens, antibodies

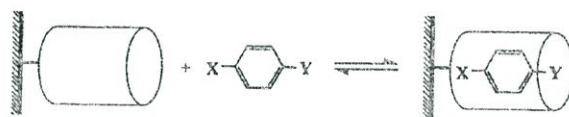
2.4.1.5 Chiral chromatography เป็นเทคนิคการทำโครมาโทกราฟีที่สามารถแยกสารประกอบประเภทอีแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) หรือเป็นสารที่มี optically active โดยอาศัยหลัก stereoselectivity ใช้มากในการทำยาให้บริสุทธิ์ เนื่องจากว่ามีเพียงหนึ่งเดียวในอีแนนทิโอเมอร์ เท่านั้นที่แสดงผลทางด้านเภสัชวิทยา ส่วนอีกองค์ประกอบหนึ่งไม่มีผลหรืออาจมีผลข้างเคียง

Chiral stationary phase (CSPs) จะมีราคาแพงกว่าเฟสเคลื่อนที่ของคอลัมน์ HPLC ทั่วๆ ไป 3 – 5 เท่า ตัวอย่าง CSPs ได้แก่

(a) “Pirkle” CSPs พัฒนาขึ้นโดย W.H. Pirkle University of illinois คือสารที่เป็นอนุพันธ์ของ phenyl – glycine หรือ leucine ที่นำมาสร้างพันธะกับซิลิกา 5  $\mu\text{m}$  มีทั้งที่อยู่ในรูป ionic และ covalent ดังนี้



(b) Cyclodextrin bonded phases Cyclodextrins คือ cyclic chiral carbohydrates ที่ประกอบด้วย 6 – 12 หน่วยของ glucose โดย bonded กับ 5  $\mu\text{m}$  Silica



2.4.1.6 Size exclusion chromatography (SCE) เป็นวิธีการของโครมาโทกราฟีโดยใช้เฟสอยู่กับที่เป็นเจลที่มีรูพรุนขนาดต่างๆ โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเจลจะผ่านออกจากคอลัมน์พร้อมๆ กับเฟสเคลื่อนที่ ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กที่ลอดผ่านเข้าไปในรูพรุนของเจลจะออกจากคอลัมน์ที่หลัง ทำให้เกิดการแยกได้ การแยกจึงขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจลว่าจะยอมให้โมเลกุลขนาดใดรอดผ่านเข้าไปในเจลได้ ซึ่งเรียกว่า exclusion limit



รูปที่ 2.36 แสดงการแยกแบบ SCE [16]

โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า exclusion limit จะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเจล และออกจากคอลัมน์ที่หลัง ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าก็จะออกจากคอลัมน์ก่อน

เจลที่ใช้มี 3 ชนิด คือ

- Soft gel คือ เจลที่สามารถบวม (swell) ให้มีขนาดใหญ่ได้หลายเท่าตัว เมื่ออยู่ในตัวทำละลาย ตัวอย่างเช่น polydextran หรือ agarose ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Sephadex มีหลายชนิด ถ้าเป็นพวก polyacrylamide จะมีชื่อทางการค้าว่า Bio – gel P.
- Semi rigid gel เป็นเจลที่ค่อนข้างแข็ง บวมโดยมีขนาดใหญ่กว่าเดิมเพียง 1.1 – 1.8 เท่า เช่น polyvinyl acetate หรือ polystyrene มีชื่อทางการค้าว่า Bio – Beads
- Rigid gel จะมีขนาดรูคงที่ ไม่บวมเมื่อถูกตัวทำละลาย เช่นแก้วที่มีรูพรุน หรือเม็ดซิลิกาที่มีรูพรุน

ประโยชน์ของ SEC

1. ใช้แยกสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่นพวกสารพอลิเมอร์ สารประกอบชีวภาพ
2. ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง
3. ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ เช่น ความแข็ง ความทนแรงดึง และความเสถียร เพราะพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีหลายขนาดปนกัน โดยมีการกระจายขนาดของโมเลกุลอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น โครมาโทแกรมที่ได้สำหรับพอลิเมอร์สังเคราะห์ จึงมีลักษณะเป็นฟีก ซึ่งจากโครมาโทแกรมที่ได้นี้จะมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางกายภาพ

2.4.1.7 Ion – exchange chromatography เป็นวิธีการของโครมาโทกราฟีที่เฟสอยู่กับที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนของสารตัวอย่าง ถ้าสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เป็นแคทไอออนเฟสอยู่กับที่ควรเป็น cation exchanger ถ้าสารตัวอย่างเป็นแอนไอออนเฟสอยู่กับที่ควรเป็น anion exchanger หมูฟังก์ชันนอล ที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออน แบ่งได้เป็น 2 ระดับ ขึ้นอยู่กับองศาของการแตกตัวของกรดและเบส ที่เป็นหมูฟังก์ชันนอล

**ตารางที่ 2.8** แสดงหมู่ฟังก์ชันนอลที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนไอออนของ Ion – exchange - chromatography [9]

	Cation exchanger	Anion exchanger
strong	Sulphonic acid - SO <sub>3</sub> H	Quaternary amine - NR <sub>3</sub>
weak	Carboxylic acid - COOH Phenolic - OH	Tertiary amine –HNR <sub>2</sub> และ Secondary amine –H <sub>2</sub> NR (R แทนด้วยกลุ่มของสารอินทรีย์)

## 2.5 ระบบการบรรจุ (Packing system) [7]

ในการบรรจุคอลัมน์ (column packing) โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ

### 1) วิธีการบรรจุแบบแห้ง (Dry-packing methods)

วิธีนี้เหมาะสำหรับการบรรจุอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ (> 20 μm) วิธีการบรรจุนี้ไม่ยุ่งยากนัก ทำได้โดยนำคอลัมน์ด้าน inlet มาต่อกับปั๊มสำหรับสูบลuft ออก ส่วนด้าน outlet ต่อกับช่องสำหรับใส่อนุภาคของแข็ง ขั้นตอนการบรรจุจะนำอนุภาคมาใส่ลงในช่องสำหรับใส่อนุภาคที่จะทำการบรรจุส่วนปลายด้าน inlet ประกอบ screen เพื่อกันไม่ให้อนุภาคหลุดออกมาได้ จากนั้นเปิดวาล์วเพื่อสูบลuft ออกจากคอลัมน์จะทำให้อากาศอีกด้านไหลเข้าแทนที่ ซึ่งการไหลเข้าของอากาศนี้จะผลักดันให้อนุภาคเคลื่อนเข้าไปในคอลัมน์ รอจนกว่าอนุภาคจะไม่ไหลเข้าไปในคอลัมน์อีก จากนั้นนำ stopcock ติดตั้งกับด้าน outlet ของคอลัมน์ (ก่อนการบรรจุจะต้องนำคอลัมน์มาซีดให้ตรง และทำความสะอาดด้วย ไคลโอโรมีเทน, อะซิโตน และน้ำ ตามลำดับ จากนั้นจึงล้างด้วยผงซักฟอกร้อน, น้ำกลั่น และ เมทานอล ทำให้แห้งด้วย N<sub>2</sub> หรืออากาศ)

### 2) วิธีการบรรจุแบบเปียก (Wet-packing methods or Slurry-packing methods)

วิธีนี้เหมาะสำหรับการบรรจุอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (< 20 μm) ในการบรรจุ ด้วยเทคนิคนี้จะนำอนุภาคที่จะใช้บรรจุคอลัมน์มากระจายตัว (suspension) และ อัลตราโซนิคในของเหลวที่มีความหนืดอยู่ในช่วง 1-5 cP ซิลิกาเจลมีความหนาแน่น 2.2 กรัม/ลบ. ซม. จากนั้นนำไปบรรจุในช่องสำหรับบรรจุอนุภาคของแข็ง ซึ่งวิธีการบรรจุแบบนี้มีอยู่ด้วยกัน 2 แบบ คือการบรรจุแบบ up-fill และแบบ down-fill

ในวิธีการบรรจุแบบ down-fill จะเป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุด ซึ่งการบรรจุแบบนี้จะสามารถใช้ในการบรรจุอนุภาคขนาดเล็กได้ทุกชนิด วิธีการคือเมื่อผสม ของเหลวชั้นหนืด (slurry) เรียบร้อยแล้ว ของเหลวชั้นหนืดจะถูกสูบลดด้วยปั๊มที่มีความดันคงที่ อัตราการไหลของ ของเหลวชั้นหนืด จะขึ้นอยู่กับความดันที่ใช้ เมื่ออนุภาคถูกอัดแน่นเรียงตัวอยู่ในคอลัมน์ อัตราการไหลของ ของเหลวจะลดลง ในการบรรจุนี้เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดีที่สุดจะต้องใช้ความเร็วของ ของเหลวชั้นหนืด ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ และอนุภาคที่จะบรรจุด้วยวิธีนี้จะต้องมีความแข็งแรง ด้วย เพราะถ้าแรงดันที่ใช้ในการบรรจุด้วยวิธีนี้สูงมากอนุภาคที่ถูกบรรจุอาจแตกกลายเป็นเม็ดเล็กๆ ไปอยู่บริเวณด้านปลายของคอลัมน์ซึ่งจะทำให้อนุภาคมีโครงสร้างไม่แน่นอน การเตรียม ของเหลวชั้นหนืด ทำโดยการนำอนุภาคที่จะใช้ในการบรรจุมากระจายตัวในของเหลว (เช่น เมทานอล) (1-30% w/w) โดยทั่วไปนิยมใช้กันที่ 5-15% ก่อนที่จะทำการบรรจุจะต้องนำอนุภาคมาทำการไล่แก๊ส ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ของเหลวที่จะใช้ในการทำหน้าที่อัด ของเหลวชั้นหนืด เข้าสู่คอลัมน์จะต้องไม่เป็นชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการเตรียม ของเหลวชั้นหนืด โดยทั่วไปจะใช้ของเหลวที่มีความหนาแน่นต่ำในการบรรจุเพื่อหลีกเลี่ยงการผสมกันของของเหลวที่ใช้เป็นตัวอัดฉีดและ ของเหลวชั้นหนืด ในระหว่างการปั๊ม

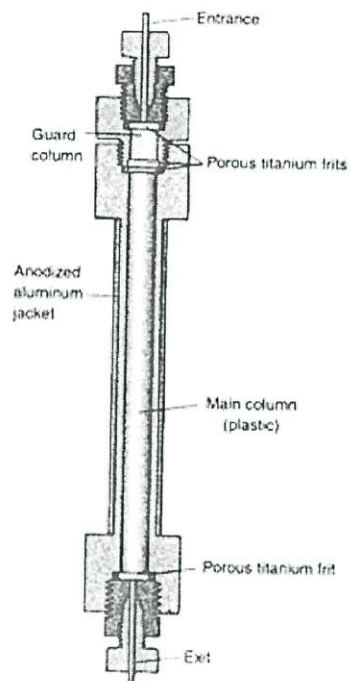
ก่อนที่จะทำการบรรจุคอลัมน์ควรนำคอลัมน์เปล่ามาทำความสะอาดผิวภายใน คอลัมน์ด้วย ไคคลอโรมีเทน, อะซิโตน และ น้ำ ตามลำดับ จากนั้นนำมาขัดด้วยผงซักฟอกร้อน และ ใช้เชือก ไนลอน (หลีกเลี่ยงการทำให้ผนังด้านในของคอลัมน์เป็นรอย) ทำความสะอาดผนังคอลัมน์ ภายใน จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น และ เมทานอล และทำให้แห้งด้วย  $N_2$  หรืออากาศ เพื่อให้มั่นใจว่า ผนังภายในของคอลัมน์เรียบ สะอาดและไม่มีอนุภาคใดๆ อยู่ ส่วนปลายทางออกของคอลัมน์ถูก fitted ด้วย porous fit หรือ screen ซึ่งจะถูก retained ไว้โดย outlet compression fitting ใช้ non-low-volume outlet compression fitting เพื่อให้อัตราการไหลของของเหลวสูงสุดในระหว่างการบรรจุ ด้าน inlet ของคอลัมน์เปล่าจะถูกต่อกับ connector tubing สั้นๆ (3-5 cm) ซึ่ง connector นี้จะต่อเข้าไปใน ของเหลวชั้นหนืด reservoir เพื่อใช้เป็นทางผ่านให้ ของเหลวชั้นหนืด ไหลเข้าสู่คอลัมน์เปล่า จากนั้นนำ stopcock ติดตั้งกับด้านปลายของคอลัมน์เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีฟองอากาศอยู่ด้านท้ายของ คอลัมน์ในขณะที่ทำการบรรจุ จากนั้นเปิด high-pressure shut off valve ซึ่งจะอัดแรงดันประมาณ 5-12,000 psi จาก air-driven pump ในระหว่างการบรรจุนี้ไม่ควรมีการปั๊มเป็นช่วงๆ แต่ควรปั๊ม ต่อเนื่องกันถ้าเป็นไปได้ การปั๊มจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งตัวทำละลายถูกชะ ออกจากคอลัมน์แล้ว ประมาณ 50-100 มิลลิลิตร การบรรจุ จะสมบูรณ์เมื่อเวลาผ่านไปโดยใช้เวลาเป็นนาที่ หรือหลาย นาที่ จากนั้นปิด high-pressure shut off valve และปล่อยให้แรงดันที่เหลืออยู่ในคอลัมน์หลักดัน ของเหลวจนไม่ไหลออกมาอีก

ในวิธีการบรรจุแบบ up-fill มีผู้ใช้ไม่มากนัก และประสิทธิภาพของการบรรจุก็ ใกล้เคียงกับแบบ down-fill แต่วิธีนี้สามารถที่จะบรรจุคอลัมน์ที่มีความยาวมากกว่า 25 cm ด้วย

อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า  $5\ \mu\text{m}$  (วิธีนี้สามารถใช้บรรจุอนุภาคขนาด  $3\ \mu\text{m}$  ลงในคอลัมน์ยาว 1 เมตร ได้ plate count ประมาณ 120,000) [10]

### 2.5.1 HPLC column

โดยทั่วไปจะมีความยาวตั้งแต่ 10-25 cm และมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.1- 4.6 mm สำหรับคอลัมน์ (Silica-ODS; C-18) ส่วนประกอบที่สำคัญของคอลัมน์ดังแสดงในรูปที่ 2.37



รูปที่ 2.37 แสดงส่วนประกอบของคอลัมน์ [7]

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ศิริลักษณ์ เกิดศิริ [6] ได้มีการพัฒนาขั้นตอนและวิธีการในการเตรียมซิลิกาที่ได้จาก แกลบข้าว โดยอาศัยระบบ ไมเซลล์ที่เกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดนอนไอออนิก คือ ไทรทอนเอ็กซ์ 100 (Triton X 100) กับสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกตจากแกลบข้าว อนุภาคของ ซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีลักษณะเป็นทรงกลมผิวเรียบ มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99 % โครงสร้างเป็น แบบ อสังฐาน เส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วงประมาณ 3-10  $\mu\text{m}$  โดยมีอนุภาคเฉลี่ย 5.27  $\mu\text{m}$  พื้นที่ผิว เฉลี่ย 1542  $\text{m}^2/\text{g}$  และมีขนาดรูพรุนสูงสุด 25  $\text{\AA}$  ความหนาแน่นที่แท้จริง 1.0052  $\text{g}/\text{cm}^3$  นำมาบรรจุ ลงในคอลัมน์ที่ใช้เทคนิคการบรรจุแบบเปียก ผลการทดลองทางโครมาโทกราฟีของระบบบนอร์มัล เฟสนี้ พบว่าให้ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎีต่ำสุด 0.00479 cm ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.3 ml/min สำหรับคอลัมน์ขนาด 4.6 (i.d) x 150 mm ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี ต่ำสุด 0.001637 cm ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.6 ml/min สำหรับคอลัมน์ขนาด 4.6(i.d) x 250 mm (ทดสอบกับสารมาตรฐานไนโตร เบนซีน 6 ppm, ปริมาตร 1.0  $\mu\text{l}$  และใช้เฟส เคลื่อนที่เป็นเฮกเซน : อะซิโตนไนโตรล (98:2))

2. D. Jedsadapattarakul [7] ได้ทำการเตรียมซิลิกาที่มีความบริสุทธิ์สูงจากแกลบข้าว เพื่อ ใช้เป็นของแข็งยึดเกาะ(solid support)ให้เฟสอยู่กับที่(stationary phase) ที่บรรจุในคอลัมน์ที่จะใช้ใน GC และ HPLC โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 % (w/v) สกัดซิลิกาจากขี้เถ้าแกลบของ เปลือกข้าว จะได้สารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) ปรับพีเอชเท่ากับ 10 ด้วยสารละลาย กรดไฮโดรคลอริก 15 % (v/v) เกิดเจลของซิลิกาขึ้น นำเจลที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องเครื่องพ่นแห้ง (spay dry) ผงซิลิกาที่ได้สามารถนำมาทำเฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี โดยอาศัยปฏิกิริยาไซเลไนเซชัน (silanization) กับสารประกอบพวกออร์กาโนคลอโรไฮเลน เช่น trimethylchlorosilane (TMCS) และ hexamethyldisilazane (HMDS) ส่วนคอลัมน์ HPLC จะอาศัย ปฏิกิริยาไซเลไนเซชันกับ octadecyltrichlorosilane (ODS) ซึ่งจะได้เฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ ทั้ง สองเทคนิคที่มีราคาถูก นำคอลัมน์ GC และ HPLC มาทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

3. M. Mesa และคณะ [21] ได้เตรียม SBA15-type mesoporous silica ที่มีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางของอนุภาคมากกว่า 3 ไมโครเมตร และมีขนาดของรูพรุน 5-10 nm ใช้สำหรับเป็นเฟสอยู่กับ ที่สำหรับเทคนิค HPLC โดยมี tetraethoxysilane (TEOS) เป็นแหล่งซิลิกา triblock copolymer Pluronic P123 ( $\text{EO}_{20}\text{PO}_{70}\text{EO}_{20}$ ) เป็นสารลดแรงตึงผิว ( $\text{S}^0$ ) และ cetyltrimethylammonium bromide (CTMABr) เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ( $\text{S}^+$ ) กลไกในการสังเคราะห์จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ รวมตัวกันเองระหว่างสปีชีส์ของสารลดแรงตึงผิวและซิลิกา ในตัวกลางที่เป็นกรด ภายใต้สภาวะที่ เงียบ (quiescent) ที่ซึ่ง  $\text{S}^0\text{H}_3\text{O}^+\text{X}^-$  และ  $\text{S}^+\text{X}^-$  เกิดปฏิกิริยากัน โดยจะใช้สองขั้นตอน ให้ความร้อน

ในขั้นตอนที่ 1 และให้ความร้อนในขั้นตอนที่ 2 สภาวะในการเจือจาง อุณหภูมิ สภาวะที่เป็นกรด ของปฏิกิริยาผสม ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามีอิทธิพลต่อคุณลักษณะของรู โครงสร้าง และขนาด ของอนุภาค อนุภาคที่เป็นทรงกลมจะได้ในขั้นตอนการให้ความร้อนในขั้นที่ 1 ภายใต้อุณหภูมิของ ปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับซิลิกา การเจือจางมาก อุณหภูมิที่สูง และสภาวะ การเป็นกรดต่ำ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดของไมเซลส์ ก็จะเป็นการปรับปรุงแก้ไขขนาดของ รู

4. J. Esquena และคณะ [22] ได้ทำการเตรียมอนุภาคซิลิกาแบบ monodisperse ซึ่งมี คุณสมบัติเหมาะสมเป็นตัวดูดซับในโครมาโทกราฟี อนุภาคซิลิกาได้มาจากระบบอิมัลชันแบบน้ำ ต่อน้ำมัน (water/Oil emulsion) สังกะเรสในปฏิกิริยา tetraethyl orthosilicate โดยมี  $\text{NH}_3$  หรือ  $\text{HCl}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา อิมัลชันเตรียมได้จากวิธีการอิมัลซิฟิเคชัน (emulsification) อนุภาคซิลิกา monodisperse ได้จากการใช้กระบวนการอิมัลซิฟิเคชันที่เหมาะสมและการควบคุมความเสถียรของ อิมัลชันในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา อนุภาคซิลิกาที่ได้มีขนาดเฉลี่ยระหว่าง 2 -1000  $\mu\text{m}$  เตรียมโดย ใช้  $\text{HCl}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขณะที่  $\text{NH}_3$  จะสร้างอนุภาคที่ขนาดเฉลี่ย 0.5-10  $\mu\text{m}$  ควบคุมขนาด ของอนุภาคโดยอัตราส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวสองชนิดที่ต่างกัน ศึกษาคุณลักษณะของ อนุภาคซิลิกาด้วยเทคนิค electron microscopy, nitrogen sorption, FTIR, small angle X-ray scattering และ thin layer chromatography จากผลการทดลองแสดงว่าอนุภาค monodisperse spherical มีพื้นผิวที่เฉพาะสูง เหมาะสำหรับงานโครมาโทกราฟี และสามารถเตรียมในระบบ อิมัลชันโดยใช้  $\text{HCl}$  เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

5. R. Lindberg และคณะ [23] ได้เตรียมอนุภาคซิลิกาจากโซล-เจล หรือเทคนิคอิมัลชัน- เจล โดยทำการตกตะกอนสารละลายที่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งได้ทำการศึกษาเฟสของสารละลายขึ้นใน ระบบของเทอร์อะทิลออลโทซิลิเกต-เอทานอล-สารละลายแอมโมเนียม อนุภาคที่ได้มีขนาด 70- 840 nm ซึ่งขนาดและการกระจายตัวแบบ monodisperse ถูกควบคุมโดยองค์ประกอบของระบบ มี ความเป็นไปได้ที่จะเพิ่มขนาดอนุภาคถึง 10 ไมโครเมตร แต่ต้องเป็นการกระจายตัวแบบ polydisperse ในกระบวนการอิมัลชัน-เจล จะให้ผลที่ดีเมื่อปริมาณของน้ำ น้อยกว่า 15 wt% และ ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวน้อยกว่า 0.5 wt% และพิจารณาเวลาในการทำปฏิกิริยานานมากกว่า กระบวนการโซล-เจล แบบเดิม

6. T.H. Liou และคณะ [24] ได้เตรียมผงซิลิกาที่ละเอียดมากและมีขนาดสม่ำเสมอ โดยการเผาเคลือบด้วยความร้อนที่ไม่คงที่ใน oxidizing atmosphere คุณลักษณะของสารตั้งต้นและ ผลิตภัณฑ์รวมทั้ง โครงสร้าง, ขนาดอนุภาค, พื้นผิว, ปริมาตรรูพรุนและการกระจายของรูพรุน ตรวจสอบโดยใช้เทคนิค TEM, SEM, XRD, FTIR, ICP-MS และ EA ศึกษาการเผาให้ความร้อน ด้วยอัตรา 5 K/นาทีก จะได้พื้นที่ผิวของผง ซิลิกา  $235 \text{ m}^2/\text{g}$  ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนเฉลี่ย 5.4 nm ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 60 nm ซิลิกาที่ได้จากการเผาที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ ทุกสภาวะมี

ลักษณะเป็นอสัณฐาน ศึกษากลไกของปฏิกิริยาการสลายด้วยความร้อนทั้งสองขั้นตอน ด้วยเทคนิค Thermogravimetric Analysis (TGA) พบว่าพลังงานกระตุ้นมีค่า  $166 \pm 10$  kJ/mol วิธีการเตรียมซิลิกาที่มีพื้นที่ผิวสูงละเอียดขนาดนาโนเมตร โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสะดวก

7. J.H. Park และคณะ [25] ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคซิลิกาแบบเป็นโพรงที่มีขนาดเล็กระดับไมโครเมตร โดยปฏิกิริยาไฮล-เจล ในอิมัลชันของน้ำในน้ำมัน (W/O) การควบคุมความเป็นรูพรุนของโครงสร้างในอนุภาคของซิลิกาใช้วิธีควบคุมความหนืดของหยดละอองน้ำในอิมัลชันของน้ำในน้ำมัน (W/O) ด้วย polyethylene glycol (PEG) หรือ polyvinylpyrrolidone (PVP) การทำให้โครงสร้างของ อิมัลชันเสถียร โดยการเติม hydroxypropyl cellulose (HPC) ลงไปในชั้นน้ำมัน เพราะถ้าไม่มี HPC รูปร่างของอนุภาคจะไม่สม่ำเสมอและยากที่จะอยู่ในรูปอนุภาค เมื่อความเข้มข้นของ hydroxypropyl cellulose (HPC) เพิ่มขึ้นจาก 0.8 – 1.4 % โดยน้ำหนัก ขนาดของอนุภาคจะลดลงจาก 10 ไมโครเมตร เป็น 1 ไมโครเมตร แต่ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 1.4 % โดยน้ำหนัก สารละลายจะมีความหนืดสูงใช้งานยาก บทบาทของ PEG หรือ PVP ในชั้นของน้ำจะมีความสำคัญมากไม่เพียงแต่เพื่อให้โครงสร้างของอิมัลชัน W/O มีความเสถียรเท่านั้นแต่ยังช่วยทำให้เกิดรูพรุนที่น่าสนใจคืออนุภาคซิลิกาที่มีความเป็นรูพรุนจะเกิดขึ้นเมื่ออัตราส่วน โมลาร์ ของน้ำต่อ TEOS (Rw) เป็น 4 และความเข้มข้นของ PEG และ PVP ในชั้นน้ำเท่ากับ 6 และ 1.4% เท่านั้น ดังนั้น PEG จะถูกแทนที่ด้วย PVP อนุภาคซิลิกาที่เป็นรูพรุนจะอยู่ระหว่าง 3 - 7 ไมโครเมตร

8. J. David Sunseri และคณะ [26] ได้ทำการศึกษาการให้ความร้อนกับซิลิการะหว่างอุณหภูมิ 150 ถึง 800 °C ก่อนนำไปสร้างพันธะกับ dimethyloctadecyl chlorosilane ซึ่งเป็นการลดจำนวนหมู่ไฮลานอลที่แอคทีฟในเฟสอยู่กับที่ของเทคนิค HPLC ลง นอกจากนี้เป็นการศึกษาเวลาในการให้ความร้อนจาก 12 ถึง 48 ชั่วโมง เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับ dehydroxykation สำหรับการเพิ่มอุณหภูมิก่อนนำไปสร้างพันธะนั้น สามารถทำให้จำนวนของหมู่ไฮลานอลที่จะทำปฏิกิริยา ลดลงจาก 8 ถึง 0  $\mu\text{mol} / \text{m}^2$  ที่อุณหภูมิ 1,000 °C และตรวจสอบการให้ความร้อนก่อนการสร้างพันธะของซิลิกาด้วยเทคนิค diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) และ Solid state cross polarization magic angle spinning (CP-MAS)  $^{29}\text{Si}$  NMR และหลังจากสร้างพันธะ จะตรวจสอบความแอคทีฟของไฮลานอลที่เหลือและความเสถียรต่อพีเอช จากนั้นทำการทดสอบระบบรีเวอร์ส-เฟส ลิกวิด โครมาโทกราฟี (RPLC) ความแอคทีฟของไฮลานอลที่เหลือมีผลเป็นอย่างมาก เมื่อ ซิลิกาถูกให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 800 °C และวิเคราะห์สารที่เป็นเบส จะเกิดลักษณะเป็นพีคที่มีหาง (tailing) น้อย ส่วนในเฟสเคลื่อนที่มีความเป็นเบสแก่ (พีเอช 11.5) พบว่าซิลิกาที่ถูกให้ความร้อนที่อุณหภูมิดังกล่าวนี้จะให้ผลที่ดี เพราะมีความคงตัวของโครงสร้างพันธะสูง เพราะโดยทั่วไป ที่พีเอชที่มีความเป็นเบสสูงจะเกิดการแตกหักของพันธะระหว่าง C-18 กับซิลิกาเกิดขึ้น

9. S. Ek. และคณะ [27] ได้ทำการศึกษา การใช้เทคนิค Thermogravimetry (TG) วิเคราะห์ หมู่ไฮดรอกซิลที่บรรจุอยู่ในซิลิกาทั้ง 9 ชนิด ที่แตกต่างกัน ในการใช้เครื่อง TG นั้นได้ให้ความร้อนกับสารตัวอย่างซิลิกา (15-30 mg) โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$  จากอุณหภูมิห้องไปจนกระทั่งถึงอุณหภูมิ  $1,250\text{ }^{\circ}\text{C}$  ในสถานะแก๊สอาร์กอน เกิดปรากฏการณ์ของน้ำหนักที่สูญเสียไปเกิดขึ้น 2 ขั้นตอนขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydration) และขั้นตอนที่สองการดึงหมู่ไฮดรอกซิล (dehydroxylation) โดยการนำ differential กราฟของ TG (DTG) อุณหภูมิที่ซึ่งเกิดการสูญเสียของซิลิกาอยู่ในช่วง  $100\text{ ถึง }130\text{ }^{\circ}\text{C}$  จำนวนหมู่ไฮดรอกซิล จากน้ำหนักที่สูญเสียไปในขั้นตอนที่สอง โดยถือว่าที่อุณหภูมิ  $1,250\text{ }^{\circ}\text{C}$  ซิลิกาอยู่ในรูปของ siloxane (Si-O-Si) เท่านั้นเพราะไฮดรอกซิลจะยังคงเหลืออยู่ที่อุณหภูมิการให้ความร้อนต่ำกว่า  $1,250\text{ }^{\circ}\text{C}$  ดังนั้นจึงทำการศึกษาจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในช่วงอุณหภูมิ  $550\text{ และ }1,000\text{ }^{\circ}\text{C}$  และเมื่อเปรียบเทียบ การวิเคราะห์จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่อุณหภูมิการให้ความร้อนที่  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  โดยเทคนิค TG และ  $^1\text{H MAS NMR}$  พบว่า ผลการทดลองที่ได้โดยใช้เทคนิค TG เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ  $1,000\text{ }^{\circ}\text{C}$  ผลการทดลองของทั้งสองวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ซึ่งเกิดจากผลทางด้านไดนามิกส์ และผลของความเกาะกันนั้นวิธีการตรวจวัดโดยใช้เทคนิค TG นั้น ประยุกต์ใช้ได้แบบธรรมดาไม่ยุ่งยากซับซ้อน เพราะเทคนิคดังกล่าว ยังมีข้อจำกัดสำหรับวิเคราะห์หมู่ไฮดรอกซิลที่อุณหภูมิสูงกว่า  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$

10. Neil D. Danielson และคณะ [28] ได้เตรียมซิลิกาที่มีอนุภาคเป็นทรงกลมระดับไมโครเมตร มีขนาดของรูพรุน  $200\text{ อังสตรอม}$  สำหรับการแยกสารชีวโมเลกุลซึ่งสามารถแยกสารดังกล่าวได้อย่างรวดเร็ว อนุภาค ซิลิกา 1-2 ไมโครเมตร ที่ถูกเตรียมขึ้นนี้มีช่วงการกระจายตัวที่แคบ และของแข็งยึดเกาะในคอลัมน์รีเวอร์สเฟสสำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟี เตรียมจากซิลิกาที่มีขนาด 2 ไมโครเมตร จะให้ค่า HETP มากกว่า  $130,000\text{ เพลท/เมตร}$  โดยมีค่าความสามารถในการซึมผ่านดี และได้พีคที่สมมาตร สามารถแยกสารผสมโปรตีนและเปปไทด์ได้หลายชนิดโดยใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาที และให้ค่า recovery ของสารที่แยกดี

11. Kevin D. Wyndham และคณะ [29] ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและประเมินประสิทธิภาพของคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง 3 ชนิด ซึ่งเตรียมโดยใช้ ethyl-bridged hybrid organic/inorganic อนุภาคที่มีความกลมสูง มีพื้นที่ผิวเฉพาะ  $140, 187, \text{ and } 270\text{ m}^2/\text{g}$  และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางรูพรุนเฉลี่ย  $185, 148, \text{ และ } 108\text{ \AA}$  ตามลำดับ โดยใช้ SEM และ nitrogen sorption analysis โดยมีการดัดแปลงโดยใช้กระบวนการทางเคมี 2 ขั้นตอนคือใช้ octadecyltrichlorosilane และ trimethylchlorosilane จากรายงานผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของปริมาณ octadecyl บนพื้นผิวซิลิกา มีความเข้มข้นเท่ากับ  $3.17\text{-}3.35\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$  ซึ่งเปรียบเทียบกับอนุภาคซิลิกาที่สร้างพันธะอย่างสม่ำเสมอ  $3.44\text{ }\mu\text{mol}/\text{m}^2$  พื้นที่ผิว  $344\text{ m}^2/\text{g}$  วัสดุผสมนี้แสดงให้เห็นว่ามีความแข็งแรงทางกลพอเพียงต่อการใช้งานภายใต้สภาวะความดันสูงของคอลัมน์สำหรับ

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงทั่วไปได้ เปรียบเทียบคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟีของ คอลัมน์ C-18 bonded hybrid phase กับ C-18 bonded silica โดยใช้แยกสารที่เป็นกลาง และเป็นเบส ภายใต้สภาวะเฟสเคลื่อนที่เฟสเดียวกันพบว่ามีความจำเพาะเจาะจง (selectivity) คล้ายกันและมี ค่าสัมประสิทธิ์ peak tailing สำหรับสารที่เป็นเบสดีขึ้นค่า retentivity ของคอลัมน์จะเพิ่มขึ้นเมื่อ พื้นผิวของอนุภาคเพิ่มขึ้น จากการศึกษาการเสื่อมสภาพในสภาวะพีเอชต่างๆ กัน พบว่าวัสดุไฮบริด มีความคงทนต่อสภาวะทางเคมีมากกว่าวัสดุไฮบริดที่สร้างพันธะ และไม่ได้สร้างพันธะ โดย เปรียบเทียบกับ C-18 bonded silica โดยตรวจสอบจากการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์เมื่อใช้นาน 140 ชั่วโมง โดยให้ใช้งานที่พีเอช 10 ในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น triethylamine ที่อุณหภูมิ 50 °C.

12. Y. Sudo และคณะ [30] ได้พัฒนาวิธีการแบบใหม่ในการ end-capping สำหรับ octadecylsilylated silica gels (ODS) โดยปฏิกิริยา silylation ที่อุณหภูมิ 250 °C ซึ่งมีการดูดซับ pyridine น้อยกว่า end-capped ด้วยปฏิกิริยา silylation ในเฟสของเหลว และจากข้อมูลสเปกตรัม อินฟราเรดแสดงให้เห็นว่ามีปริมาณหมู่ silanols เหลือน้อยกว่า ปริมาณการสร้างพันธะของ ODS ที่ เตรียมจาก monochlorosilane ลดลงเมื่อ end-capped ที่อุณหภูมิสูงกว่า 300 °C อธิบายได้ว่าการ ลดลงเนื่องจากการแทนที่หมู่ silanol บนซิลิกาเจลโดยสารที่เป็นตัว end-capped หรืออีกแง่หนึ่ง ปริมาณ carbon content ของ ODS ที่เตรียมจาก trichlorosilane ไม่ลดลง เนื่องจากเมื่อปฏิกิริยา end-capping เกิดที่อุณหภูมิ 350 °C นั้นหมายความว่าปฏิกิริยา end-capping เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงกว่า จากการวิเคราะห์ที่เป็นเบสด้วย HPLC โดยใช้ ODS end-capped ที่อุณหภูมิ 350 °C พบว่าได้พีค ที่มีรูปร่างดีกว่าถึงแม้ว่าจะไม่มีการเติมสารลดการเกิด tailing ลงไปในเฟสเคลื่อนที่ก็ตาม

13. Joseph J. Pesek และคณะ [31] ได้ทำการศึกษาผลของการ endcapped บน octadecyl bonded phase โดยวิธี silanization / hydrosilation สารที่ใช้เป็นตัว endcapped ประกอบด้วย trimethylchlorosilane (TMCS) และ hexamethyldisilazane (HMDS) อัตราส่วน 1:1 โดยโมล วิธีการ endcapped นี้ทำได้สองวิธี คือการทำปฏิกิริยากันของ silica hydride intermediat กับ TMCS-HMDS หลังจาก หรือหลังจากปฏิกิริยา hydrosilation (บน C-18) สาร TMCS-HMDS ใช้ในการกำจัดหมู่ ไฮดรอกซิลบน silica hydride ให้ลดน้อยลงไป จากนั้นศึกษาคุณลักษณะกระบวนการ end-capping โดยวิธี Diffuse reflectance infrared Fourier transform 29 (DRIFT) และ Si cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy (CP-MAS-NMR) และ <sup>13</sup>C-CP-MAS-NMR ศึกษาคุณลักษณะทางโครมาโทกราฟีของ octadecyl bonded phases โดยการทดสอบ ค่าความจุ (capacity factors) ของสารกลุ่ม hydrophobic และกลุ่ม basic ตลอดจนปัจจัยที่มีผลต่อการ แยก separation factors ในสารต่างๆ สุดท้ายเป็นการทดสอบความเสถียรระยะยาวของสารทั้งสอง กลุ่มในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างสูง

14. O. Mitsuyoshi [32] ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งให้ความร้อนโดยการทำให้ calcine ซิลิกา ซึ่งใช้เทคนิค HPLC ในการตรวจสอบหลังจากการให้ความร้อนกับซิลิกาที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะทำการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพและทางเคมี ข้อมูลที่ได้สำหรับธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของหมู่ไฮดรอกซิล ( $\alpha_{OH(s)}$ ) โดยวิเคราะห์ปริมาณธาตุที่อยู่ในรูปของธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนมีค่าเท่ากับ 2.3 % และ 2.9 % ตามลำดับ calcine ที่อุณหภูมิ 180 °C ส่วนการ calcine ที่อุณหภูมิ 950 °C ตรวจวิเคราะห์ธาตุคาร์บอนมีค่าเท่ากับ 1.6 % และไฮโดรเจน 1.6 % (ซิลิกาที่ทำการศึกษามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุน 11.6 nm พื้นที่ผิว 298 m<sup>2</sup>/g ขนาดรูพรุน 1.22 ml/g และขนาดอนุภาค 5  $\mu$ m ) ใช้เทคนิค HPLC ตรวจสอบหาค่าความจุ (capacity factor) ของสาร dioctylphthalate, dibutylphthalate และ dimethylphthalate ค่าความจุจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิในการ calcine จาก 180 ถึง 950 °C โดยใช้เมทานอล-เฮกเซนเป็นตัวชะ

## บทที่ 3

### การดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) A.R. grade บริษัท CARLO ERBA
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) A.R. grade บริษัท CARLO ERBA
3. ไตรทอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100) A.R. grade บริษัท Fluka
4. ออกทาดิลคลอโรซิลเลน (Octadecyltrichlorosilane) A.R. grade  
บริษัท Fluka
5. ไตรเมทิลคลอโรซิลเลน (Trimethylchlorosilane) A.R. grade บริษัท Fluka
6. โทลูอีน (Toluene) A.R. grade บริษัท BDH
7. ไพริดีน (Pyridine) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
8. อะซิโทไนล์ (Acetonitrile) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
9. อะซิโทไนล์ (Acetonitrile) HPLC grade บริษัท LAB SCAN
10. เมทานอล (Methanol) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
11. เมทานอล (Methanol) HPLC grade บริษัท LAB SCAN
12. น้ำมันพาราฟิน (Parafin liquid for oil bath) A.R. grade บริษัท Fisher  
Chemicals
13. คลอโรฟอร์ม (Chloroform) A.R. grade บริษัท BDH
14. ยูราซิล (Uracil) A.R. grade บริษัท SIGMA
15. ไบฟีนีล (Biphenyl) A.R. grade บริษัท Aldrich
16. เบนซีน (Benzene) A.R. grade บริษัท LAB SCAN
17. แนฟทาลีน (Naphthalene) A.R. grade บริษัท Merck
18. พาราเซตามอล (Paracetamol) A.R. grade บริษัท Aldrich
19. สารละลายมาตรฐานผสม ยูราซิล เบนซีน แนฟทาลีน และ ไบฟีนีล  
HPLC grade บริษัท Restek
20. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) A.R. grade บริษัท Fisher Scientific

21. อะซิโตน (Acetone) A.R.grade บริษัท LAB SCAN
21. น้ำกลั่น (Distillation water) และน้ำปราศจากไอออน (Deionization water, DI)

### 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM): 1455VP/EDAX®, LEO
2. เครื่องเทอร์โมกราวิเมตริกอนาไลซ์เซอร์ (Thermogravimetric Analyzer; TGA): Pyris 1 TGA, Perkin Elmer
3. เครื่องวัดพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุน (Surface area Analyzer): Autosorb-1, Quana Chrome
4. เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคโทมิเตอร์ (X-ray Diffractometer; XRD): 08 Advance, Bruker AG
5. เครื่องเอกซเรย์ฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรมิเตอร์ (X-ray Fluorescence Spectrometer; XRF): SRS 3400, Bruker AG
6. เครื่องวัดการกระจายตัวของอนุภาค (Particle size Analyzer): Mastersizer X, MaLYeRN
7. เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (Fourier transforms infrared spectrometer; FT-IR): FTIR spectrum GX, Perkin Element
8. เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มแมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC): water 510 HPLC pump /waters 486 Tunable absorbance detector, MILLIPORE
9. ปุ่มสำหรับบรรจุคอลัมน์ HPLC (HPLC packing column): Model CP Lab Alliance
10. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter): Model type 215 Denver Instrument
11. เครื่องร่อนคัดขนาดอนุภาค (Sieve shaker): Refsch type vibro
12. ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 635 mesh: ASTM E11, Endecotts Ltd.
13. เครื่องอินดักทีฟคัปเปิลพลาสมาแมสสเปกโทรมิเตอร์ (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer; ICP-MS): ELAN 6000 ICP-MS
14. เตาเผาความร้อนสูง (High temperature furnace): CSF 1200, Carbolite Furnaces
15. มอเตอร์ปั่นกวนและใบพัด (Motor stirrer and propeller): SL 2400, StedFast™ Stirrer

16. แท่นให้ความร้อนและปั่นกวน (Hotplate & stirrer): Framo® Geratetechnik, Model type: M21/1
17. คอลัมน์เปล่า HPLC (HPLC empty column) ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. (316 stainless steel tubing )

### 3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

#### ขั้นตอนที่1 ทำการผลิตซิลิกาจากแคลบข้าว

- ศึกษาวิธีการเตรียมสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกตจากแคลบข้าว
- ศึกษาวิธีการเตรียมอนุภาคซิลิกา ที่มีรูปร่างเป็นทรงกลม พื้นที่ผิว ขนาดรูพรุน และเส้นผ่านศูนย์กลางเหมาะสมในการนำไปใช้ในเป็นเฟสอยู่กับที่ของคอลัมน์ HPLC โดยอาศัยวิธีตกตะกอนด้วยระบบไมเซลล์
- ตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ-เคมี เช่น
  - วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของซิลิกาที่ผลิตขึ้นได้
  - วิเคราะห์การจัดเรียงตัวของอะตอมภายในซิลิกาที่เตรียมขึ้นได้
  - วิเคราะห์พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของอนุภาคซิลิกา
  - วิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกา
  - วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของอนุภาคซิลิกา

#### ขั้นตอนที่2 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Silica-bonded phase

- ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Silica-ODS ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปริมาณ ODS สูงสุด ที่สร้างพันธะกับไฮโดรเจนได
- ศึกษาวิธีการปิดปลายที่ว่างไว้ (end-capping) ซิลิกาด้วย TMCS และปริมาณ TMCS สูงสุดในการปิดปลายที่ว่างไว้
- ศึกษาการตรวจสอบคุณลักษณะ (characterization) ของ Silica-ODS
- ศึกษาหาปริมาณ carbon loading และ surface coverage ของ Silica-ODS

#### ขั้นตอนที่3 ทำการบรรจุ Silica-ODS ลงในคอลัมน์

- ศึกษาการบรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก (slurry packing)

#### ขั้นตอนที่4 ศึกษาคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟี

โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสม ยูราซิล เบนซีน แนนพทาลิน และ ไบฟีนิล (HPLC grade) บริษัท Restek พร้อมทั้งเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับคอลัมน์ทางการค้า เช่น

- จำนวนเพลทตามทฤษฎี (Theoretical plate, N)
- ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี ( HETP, H)

- ค่าความสามารถในการแยก (Resolution, R)
- ทดสอบแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor;  $k'$ )
- ความจำเพาะเจาะจง (selectivity;  $\alpha$ )
- ความสมมาตรของพีค (peak asymmetry;  $A_s$ )

วิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของพาราเซตามอลในยาลดไข้บรรเทาปวด(ทีพีพี) โดยใช้คอลัมน์ที่ทำขึ้นเองเปรียบเทียบกับคอลัมน์ทางการค้า

- ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)
- ทดสอบหาความเที่ยง (precision)
- ทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

ขั้นตอนที่ 5 สรุปผลการทดลองและรายงานผลการทดลอง

### 3.3 วิธีการวิจัย

จากข้อมูล [6] พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคซิลิกาที่มีรูปร่างทรงกลมสม่ำเสมอ และสามารถนำมาใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ HPLC อาศัยระบบไมเซลล์ในการควบคุมขนาดอนุภาค โดยระบบไมเซลล์เกิดจากการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดนอนไอออนิก ในที่นี้ใช้สารไตรทอนเอ็กซ์-100 (Triton -X 100) ปริมาณ 3.235 กรัม กับสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 5 % (w/v) สารละลายกรดไฮดรอกลอร์ริก 2 โมลาร์ และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.2 ด้วยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 3.3.1 การเตรียมสารละลาย

##### 3.3.1.1 สารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 10 % (w/v)

นำแก้วกลมไปเผาที่อุณหภูมิ 700 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรกร่อน ขนาด 35 เมช (mesh) และล้างแก้วที่ร่อนได้ด้วยสารละลายกรด ไฮดรอกลอร์ริก 0.1 โมลาร์ โดยการแช่และคนด้วยเครื่องกวนและแท่งแม่เหล็กช่วยกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ ล้างด้วยน้ำกลั่นจนน้ำล้างที่ได้เป็นกลาง นำแก้วกลมไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ซึ่งแก้วกลมแล้วจัดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน นำไปต้มกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% (w/v) ที่อุณหภูมิ 80-85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ให้คำนวณจากความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 % (w/v) [7]



$$\text{NaOH}(\text{required}) = \left[ \frac{X \times \left( \frac{y\%}{100} \right)}{MW_{\text{SiO}_2}} \right] \times 2 (MW_{\text{NaOH}})$$

กำหนดให้	X	คือ น้ำหนักของแก้วเคลบ (กรัม)
	Y	คือ เปอร์เซ็นต์ของซิลิกาที่มีอยู่ในแก้วเคลบ (%)
	M.W. <sub>SiO<sub>2</sub></sub>	คือ น้ำหนักโมเลกุลของซิลิกอนไดออกไซด์
	M.W. <sub>NaOH</sub>	คือ น้ำหนักของโมเลกุลโซเดียมไฮดรอกไซด์

ปล่อยสารละลายสีน้ำตาลอ่อนที่ได้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องและทำการกรองสารละลายด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ จะได้สารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 10% (w/v)

### 3.3.1.2 สารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 5% (w/v)

เปิดสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต 10% 500 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และเขย่าให้เข้ากัน

### 3.3.1.3 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์

เปิดสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 167.20 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

### 3.3.1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

ชั่งสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

## 3.3.2 วิธีการเตรียมอนุภาคซิลิกาจากสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกต

3.3.2.1 ชั่งไทรทอนเอ็กซ์ -100 3.235 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ 50 มิลลิลิตร แล้วทำการปั่นกวนด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้น เติมสารละลายโซเดียมเมทาซิลิเกตความเข้มข้น 5 % (w/v) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงไป ทำการปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 4.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ไซต์ 1 โมลาร์ จากนั้นเทสารละลายที่ได้ทั้งหมดใส่ในขวดสังเคราะห์แล้วปิดฝาให้สนิท นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

กรองสารละลาย แล้วล้างตะกอนที่สังเคราะห์ได้ด้วยน้ำกลั่น จนกระทั่งฟิเอชเป็นกลาง และล้างด้วยอะซิโตน นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการคัดขนาดอนุภาคซิลิกา โดยการร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 20 ไมครอน และเครื่องเขย่าตะแกรงร่อน [6] นำผงซิลิกาที่ได้ทำการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 1.5 องศาต่อนาที (heating rate 1.5 °C/min) [33]

3.3.2.2 นำซิลิกาที่ได้มาล้างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (เพื่อขจัดไอออนของโลหะ) โดยการแช่และคนด้วยแท่งกวนแม่เหล็กและเครื่องกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์และล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีฟิเอชเป็นกลาง นำซิลิกาที่ได้ไปอบในตู้อบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 140 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อจะนำไปตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้และใช้สร้างพันธะกับ ODS ต่อไป

### 3.3.3 วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้

- วิเคราะห์รูปร่างลักษณะเม็ดซิลิกาด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscopy (SEM)
- วิเคราะห์การกระจายตัวของอนุภาคด้วยเทคนิค Light scattering analysis (Mastersizer X)
- วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค Transforms infrared spectrometry (FT-IR)
- วิเคราะห์การจัดเรียงตัวด้วยเทคนิค X-ray Diffraction (XRD)
- วิเคราะห์หาปริมาณพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุนด้วยเครื่อง Autosorb
- วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค X-ray Fluorescent (XRF)
- วิเคราะห์หาปริมาณธาตุที่ปนเปื้อนในซิลิกาด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)

### 3.3.4 ศึกษาหาปริมาณหมู่ไซลานอลโดยการสร้างพันธะกับ TMCS

จากข้อมูล [29] การเกิดปฏิกิริยาไซลาโนเซชันของ ODS บนไซลานอล พื้นผิวของซิลิกา สามารถเกิดได้สูงสุดเพียงครึ่งหนึ่งหรือ 50 % ของปริมาณไซลานอลที่มีบนพื้นผิวทั้งหมด เนื่องจากผลของความเกะกะ (steric effect) ระหว่างหมู่ ODS ด้วยกัน เพื่อให้ ODS เข้าสร้างพันธะกับซิลิกาได้สมบูรณ์ที่สุด ดังนั้นต้องทำการศึกษาเพื่อทราบหมู่ไซลานอลบนผิวของซิลิกาโดยประมาณก่อน

การศึกษาทำได้โดยนำสาร TMCS ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก ( ปริมาณเท่ากับจำนวน โมลของหมู่ไซลานอลที่คำนวณได้จากพื้นที่ผิวของซิลิกา) ทำปฏิกิริยากับซิลิกา จากนั้นตรวจสอบแนวโน้มหมู่ไซลานอลที่ลดลงด้วยเทคนิค FT-IR และคำนวณหมู่ไซลานอลโดยประมาณ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างพันธะกับซิลิกา

#### 3.3.4.1 การสังเคราะห์ Silica - TMCS (ครั้งที่ 1)

ซึ่งซิลิกาที่อบแล้วมา 2 กรัม เติมน้ำในขวดก้นกลม 3 คอ เติมโทลูอินที่ปราศจากน้ำ 35 มิลลิลิตร ปั่นกวน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมไพริดีนลงไป  $1.94 \times 10^{-2}$  โมล ทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่อย ๆ เติม TMCS  $1.94 \times 10^{-2}$  โมล (2.114 กรัม) (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ก.) ที่ละลายในโทลูอินที่ปราศจากน้ำ 5 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณ TMCS ที่คิดเป็น 100 % ของหมู่ไซลานอลที่ผิวซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ลงไปในช่วงปฏิกิริยาคนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลานาน 60 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มากรองและล้างด้วยโทลูอินที่ปราศจากน้ำ ไคคลอโรมีเทน เมทานอล และอะซิโตน ปริมาตรของสารแต่ละชนิดที่ใช้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 110 °C ในตู้อบสุญญากาศเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง [28]

#### 3.3.4.2 ตรวจสอบหมู่ไซลานอลของ Silica-TMCS ที่สังเคราะห์ได้

นำ Silica-TMCS ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 3.3.4.1 มาศึกษาคุณลักษณะด้วยเทคนิค FT-IR วิธีการสะท้อน (Attenuated Total Reflection; ATR) เพื่อดูแนวโน้มการลดลงของหมู่ไซลานอลเมื่อสร้างพันธะกับ TMCS ครั้งที่ 1

#### 3.3.4.3 การสร้างพันธะด้วย TMCS ซ้ำ

นำ Silica-TMCS จากข้อ 3.3.4.1 มาสร้างพันธะซ้ำ ด้วย TMCS  $19.42 \times 10^{-3}$  โมล วิธีการเหมือนกับข้อ 3.3.4.1 และตรวจสอบหมู่ไซลานอล ด้วยเทคนิค FT-IR วิธีการสะท้อน เมื่อการลดลงของหมู่ไซลานอลเริ่มคงที่ จึงวิเคราะห์ % Carbon loading ด้วยเทคนิค TGA

### 3.3.5 ศึกษาวิธีการสังเคราะห์ Silica-ODS

จากการทดลองที่ได้จากข้อ 3.3.4.2 สามารถประมาณการหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาโดยการสร้างพันธะกับ TMCS ได้ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเท่ากับ  $3.35 \times 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร เมื่อระบุปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลได้แล้ว จึงคำนวณปริมาณ ODS ในการสร้างพันธะ Silica-ODS ได้ ปริมาณ 100 % ODS ที่ต้องใช้ในการสร้างพันธะ เท่ากับ  $1.42 \times 10^{-5}$  โมล ต่อซิลิกา 1 กรัม (การคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค.)

#### 3.3.5.1 การสังเคราะห์ Silica - ODS

ซึ่งซิลิกาที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.3.2.2 มา 2 กรัม เติลงในขวดก้นกลม 3 คอขนาด 100 มิลลิลิตร เติมโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ 35 มิลลิลิตร ปั่นกวน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมไพริดีนที่มีจำนวนโมล เท่ากับโมลของ ODS ทำการปั่นกวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ เติม ODS  $2.84 \times 10^{-5}$  โมล ( $11.020 \times 10^{-3}$  กรัม) ที่ละลายในโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ 5 มิลลิลิตร ลงไปในขวดปฏิกิริยาและคนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก รีฟลักซ์ที่อุณหภูมิ  $110^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน

#### 3.3.5.2 ขั้นตอนการล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.3.5.1

นำสารที่ได้ไปกรองและล้างด้วยโทลูอีนที่ปราศจากน้ำ แล้วนำไปปั่นกวนในสารละลายผสมอะซิโตนไทรคลอไรด์-น้ำ (ที่มีอัตราส่วน 60:40) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในขั้นตอนสุดท้ายล้างผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย อะซิโตนไทรคลอไรด์ - เมทานอล (ปริมาตรของสารแต่ละชนิดที่ใช้ล้าง 500 มิลลิลิตร) ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ  $140^{\circ}\text{C}$  ในตู้อบสุญญากาศเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง [30]

#### 3.3.5.3 ทำการสร้างพันธะ Silica-ODS ซ้ำ

นำ Silica-ODS ที่ได้จากข้อ 3.3.3.5 มาสร้างพันธะซ้ำตามขั้นตอน 3.3.5.1 และ 3.3.5.2 จากนั้นศึกษาคุณลักษณะด้วยเทคนิค FT-IR วิธีการสะท้อน และวิเคราะห์ % carbon loading ด้วยเทคนิค TGA

หมายเหตุ จากการสร้างพันธะ Silica-ODS ซ้ำ 2 ครั้ง พบว่า % carbon loading ใกล้เคียงกัน คือ 15.61 และ 15.73 % ตามลำดับแสดงว่า การสร้างพันธะ 2 ครั้ง เป็นการสร้างพันธะด้วย ODS ที่สมบูรณ์แล้ว

คำนวณหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลที่ถูกสร้างพันธะและที่ยังไม่ถูกสร้างพันธะด้วย ODS ซึ่งปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลที่ถูกสร้างพันธะด้วย ODS เท่ากับ  $2.28 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ง.) แต่ผลจากการทดลองในข้อ 3.3.4.2 ระบุไว้

ว่ามีซิลานอลบนพื้นผิวซิลิกาที่สร้างพันธะกับ 100 % TMCS อยู่ประมาณ  $3.35 \times 10^8$  โมลต่อตารางเมตร เพราะฉะนั้นจึงมีซิลานอลที่ยังไม่ถูกสร้างพันธะอยู่  $3.02 \times 10^8$  โมลต่อตารางเมตร ดังนั้นจึงต้องใช้ TMCS ปริมาณ  $2.21 \times 10^{-4}$  โมล ( $4.18 \times 10^{-3}$  กรัม) ต่อซิลิกา 1 กรัม (วิธีการคำนวณเหมือนกับ ภาคผนวก ก.) ในการปิดปลายที่ว่องไว หมู่ซิลานอลที่เหลือ (ทำการปิดปลายที่ว่องไว ซ้ำ 2 ครั้ง) ตามวิธีในขั้นตอนที่ 3.3.4.1

ศึกษาคุณลักษณะของ Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS โดยใช้เทคนิค FT-IR, TGA และ SEM

3.3.5.4 วิเคราะห์ความหนาแน่น Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว ด้วยวิธีการแทนที่น้ำ โดยใช้ขวดพิคโนมิเตอร์

### 3.3.6 การบรรจุลงคอลัมน์ HPLC (HPLC packing column)

หลังจากที่ทำการสร้างพันธะซิลิกาด้วย ODS และ ปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS เรียบร้อยแล้วนั้น ขั้นตอนต่อไปเป็นการบรรจุสารที่สังเคราะห์ได้ลงในคอลัมน์ HPLC โดยใช้เทคนิคการบรรจุเปียก (wet packing) โดยชั่งซิลิกาที่สร้างพันธะแล้ว มาประมาณ 3.50 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ปริมาณ 35 มิลลิลิตร ได้ของเหลวขุ่นหนืด (slurry) เข้มข้น 10 % w/v จากนั้นนำของเหลวขุ่นหนืดที่ได้ไปทำการกระจายตัวโดยการ โซนิเคต (sonicated) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ในการที่จะบรรจุสารลงคอลัมน์โดยตรวจเช็คระบบให้เรียบร้อย ต่อปั๊มความดันสูงกับอุปกรณ์สำหรับเก็บของเหลวขุ่นหนืด (reservoir) นำของเหลวขุ่นหนืดที่เตรียมได้เทลงใส่ในถังเก็บของเหลวขุ่นหนืด และจึงต่อกับคอลัมน์ HPLC (150 x 4.6 mm i.d.) ที่วางเปล่าและผ่านขั้นตอนการทำความสะอาดแล้วจากนั้น ทำการบรรจุลงคอลัมน์โดยใช้ปั๊มความดันสูงประมาณ 6000 psi และใช้เมทานอล (methanol HPLC grade) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำการบรรจุคอลัมน์นานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นจะถอดคอลัมน์ออกจากระบบ และทำการปิดปลายคอลัมน์ด้วย ฟริต (frit)

ทำการ equilibrate คอลัมน์ โดยการนำคอลัมน์ที่บรรจุเรียบร้อยแล้วมาต่อเข้ากับปั๊มใหม่อีกครั้ง ผ่านอะซิโทไนไทรล์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล และผ่านคอลัมน์เช่นเดียวกัน [7]

วิธีการบรรจุสารลงคอลัมน์ HPLC (250 x 4.6 mm i.d.) ทำได้เช่นเดียวกันกับวิธีการข้างต้น โดยใช้ปริมาณของซิลิกาที่สร้างพันธะแล้วประมาณ 5.70 กรัม และเติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ปริมาณ 57 มิลลิลิตร [7]

### 3.3.7 ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับคอลัมน์ทางการค้า

พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา คือ จำนวนเพลทตามทฤษฎี (The number of theoretical plate, N) ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (height equivalent to a theoretical plate; HETP หรือ H) และค่าความสามารถในการแยก (resolution, R) แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor; k') ความจำเพาะเจาะจง (selectivity;  $\alpha$ ) และความสมมาตรของพีค (peak asymmetry;  $A_s$ ) [10, 30, 36, 44]

3.3.7.1 จำนวนเพลทตามทฤษฎี (N) ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) วัดสารละลายมาตรฐานไบฟีนิลความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายผสมเมทานอล - น้ำ อัตราส่วน 80:20 อัตราไหลต่าง ๆ ของทั้ง 3 คอลัมน์ เป็นดังต่อไปนี้ คอลัมน์ของทางการค้า HiQSil C18 W5  $\mu\text{m}$  ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.9, 0.95, 1.0, 1.05, 1.1, 1.3, 1.5, 2.0, และ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ที่เตรียมได้ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ปรับเปลี่ยนอัตราไหลของเฟสเคลื่อนที่ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3, 1.5 และ 1.8 มิลลิลิตรต่อนาที และขนาด 250 x 4.6 mm i.d. คือ 0.2, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.70, 0.90, 1.00, 1.10. และ 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที และ ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.3.7.2 ความสามารถในการแยก (Resolution) แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor; k') ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) และความสมมาตรของพีค (peak asymmetry;  $A_s$ ) โดยใช้สารละลายผสมระหว่าง ยูราซิล (Uracil) เบนซีน (Benzene) แนพทาลีน (Naphthalene) และไบฟีนิล (Biphenyl) ความเข้มข้น 0.02 , 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายผสมเมทานอล - น้ำ อัตราส่วน 80:20 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และ ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

### 3.3.8 การประยุกต์ใช้งาน [52]

การประยุกต์ใช้งาน ในที่นี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของพาราเซตามอลในยาลดไข้บรรเทาปวด (ทิฟฟี) ตามวิธี AOAC โดยใช้คอลัมน์ที่ผู้วิจัยเตรียมขึ้นทั้งสองขนาด (150 x 4.6 mm i.d.) และ (250 x 4.6 mm i.d.) กับคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) ทำการทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ร้อยละการกลับคืน (%Recovery) และทดสอบความเที่ยง (Precision) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

### 3.3.8.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล 3119.4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานพาราเซตามอล 0.31194 กรัม ละลายด้วยน้ำที่ปราศจาก ไอออนจำนวนเล็กน้อยในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้ของแข็งละลายหมด ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล 3119.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานมา 2, 4, 6, 8, และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 250, 500, 750, 1000 และ 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

### 3.3.8.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีเฟฟ)

ชั่งยา 1 เม็ดแล้วบดน้ำหนักไว้ บดตัวอย่างยาให้ละเอียด ชั่งมา 0.03533 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ปราศจากไอออนลงไปเล็กน้อย เขย่าให้ ตัวอย่างละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน ให้ถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าให้ สารละลายผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จะมีตะกอนที่ก้นขวด กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองที่มี ขนาดรู 0.45 ไมครอน ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน แล้วนำไปวิเคราะห์ สำหรับตัวอย่างยาที่มีการเติม สารละลายมาตรฐานลงไป (spiked sample) มีขั้นตอนดังข้อ 3.3.8.2 แต่ต้องเติมสารละลายมาตรฐาน พาราเซตามอล 3119.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5 มิลลิลิตร ลงไปในขั้นตอนการเตรียม จากนั้นนำ สารละลายที่เตรียมได้ทั้งหมด มาตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC จากข้อ 3.3.8.1 และ 3.3.8.2

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการตรวจวัดกับทั้ง 3 คอลัมน์

เฟสเคลื่อนที่สารละลายผสม เมทานอล : น้ำ 100:0

อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร

ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

### 3.3.9 ทดสอบการเก็บรักษาคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ในสารละลายเมทานอล

หลังจากตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ทางโครมาโทกราฟีแล้ว ล้างคอลัมน์ด้วยเฟส เคลื่อนที่ที่กำลังทำการวิเคราะห์ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ เก็บ รักษาคอลัมน์ไว้ในระบบเมทานอล โดยผ่านเฟสเคลื่อนที่คือสารละลายเมทานอล ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บคอลัมน์ไว้นาน 1 เดือน จากนั้นนำมาทดสอบหาค่าเวลา การคงไว้ ( $t_R$ ) ของสารละลายมาตรฐานผสม ระหว่าง ยูราซิล (Uracil) เบนซีน (Benzene) แนพทา ลีน (Naphthalene) และ ไบฟีนีล (Biphenyl) ความเข้มข้น 0.02 , 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายผสมเมทา-นอล-น้ำ อัตราส่วน 80:20 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และ ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

### 3.3.10 การบรรจุคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ครั้งที่ 2

บรรจุคอลัมน์ ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ครั้งที่ 2 มีขั้นตอนดังข้อ 3.3.6 แล้วคำนวณค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (The height equivalent to a theoretical plate, H) เปรียบเทียบกับการบรรจุครั้งแรกของคอลัมน์ขนาดเดียวกัน

จากนั้นสังเกตความแตกต่างของปริมาณสารที่ใช้ในการบรรจุ ครั้งที่ 1 และ 2 ทำโดย หลังจากการวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ แล้ว นำสารออกจากคอลัมน์ อบอุ่นให้แห้ง แล้วชั่งน้ำหนักบันทึกข้อมูล จะได้น้ำหนักจริงของสารที่ใช้ในการบรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 1 และ 2

## 3.4 สถานที่ทำการวิจัย

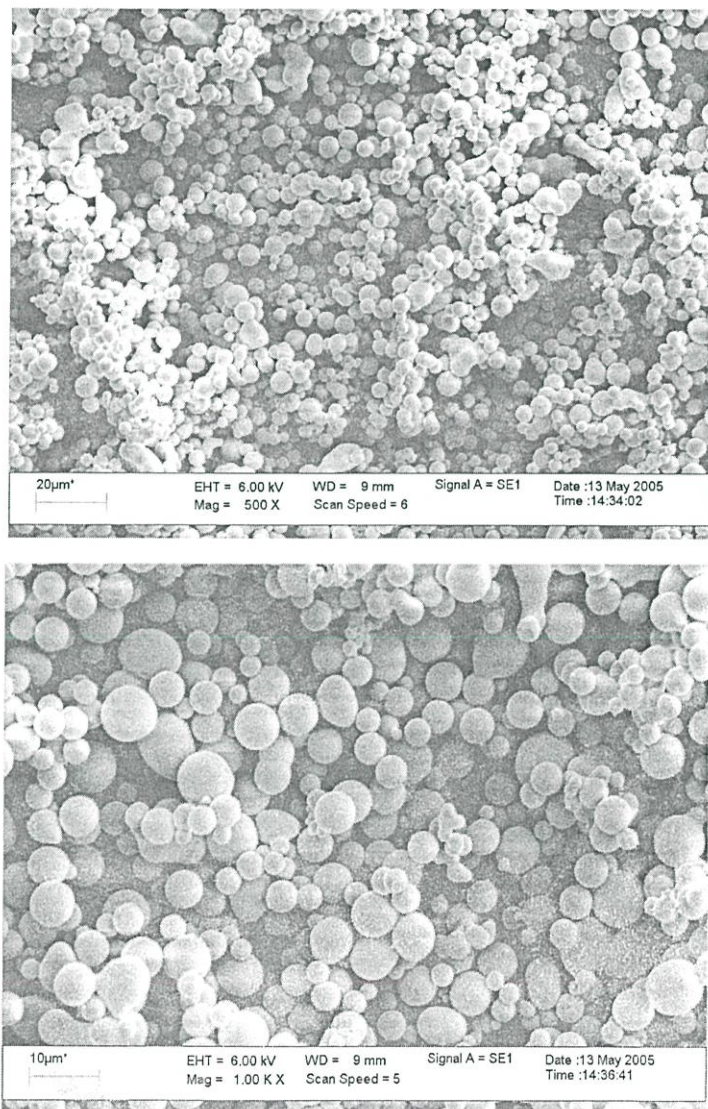
1. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
3. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 การตรวจสอบคุณลักษณะของอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้จากการควบคุมอนุภาค โดยระบบไมเซลล์

4.1.1 ศึกษาคุณลักษณะรูปร่างของอนุภาคซิลิกาหลังจากการสังเคราะห์ โดยใช้  
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) ดังแสดงใน  
รูปที่ 4.1

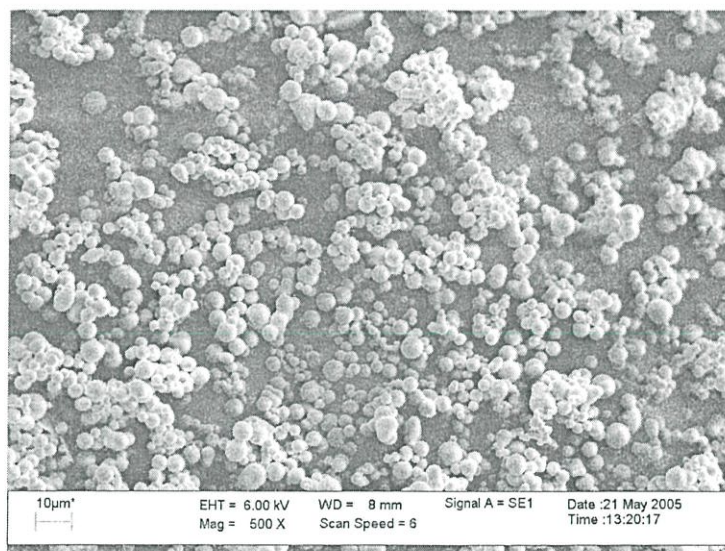


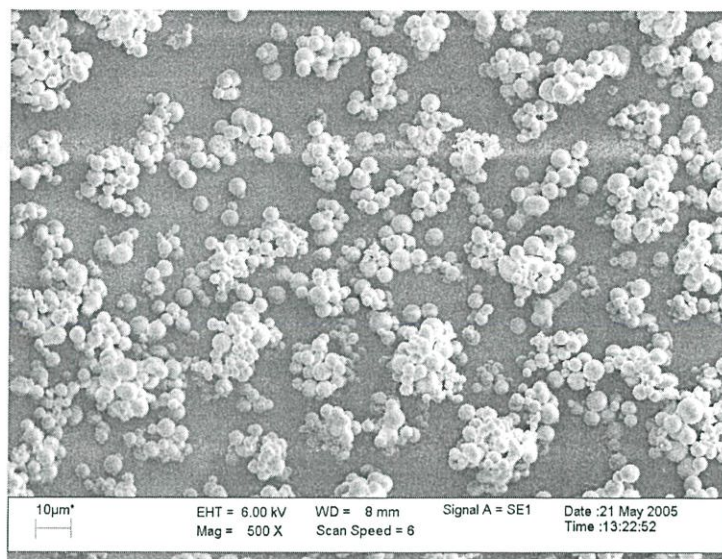
รูปที่ 4.1 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้

จากรูปที่ 4.1 พบว่าอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้จากการควบคุมโดยระบบไมเซลล์นั้นมีลักษณะเป็นทรงกลม พื้นผิวเรียบ มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 3-10 ไมโครเมตร จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นที่รองรับของแข็งยึดเกาะให้เฟสอยู่กับที่สำหรับคอลัมน์ HPLC เพราะปัจจุบันนิยมนำซิลิกาที่เป็นทรงกลมขนาดอนุภาค 3, 5 และ 10 ไมโครเมตร ใช้เป็นที่รองรับของแข็งยึดเกาะให้เฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์มากกว่าซิลิกาที่มีรูปร่างไม่แน่นอน [10,20,26,36] เมื่อเปรียบเทียบซิลิกาที่มีลักษณะเป็นทรงกลมและที่มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนที่มีขนาดอนุภาคเท่ากัน พบว่าในช่วงระยะแรกของการใช้งานจะให้ประสิทธิภาพที่ดีเหมือนกัน แต่เมื่อใช้งานในระยะเวลาที่ยาวนานและมีการใช้งานบ่อยครั้ง พบว่าคอลัมน์ที่ใช้ซิลิกาที่มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนเป็นที่รองรับของแข็งยึดเกาะให้เฟสอยู่กับที่จะมีความดันย้อนกลับ (backpressure) สูงมากกว่าที่ใช้ซิลิกาที่มีลักษณะเป็นทรงกลม เนื่องจากซิลิกาที่มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนเกิดการแตกหักทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง ความดันย้อนกลับ (back pressure) จึงเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลงนั่นเอง [38]

#### 4.1.2 ลักษณะรูปร่างของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้

นำซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มาผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 20 ไมโครเมตร (635 เมช) ผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C มาตรฐานวัดด้วยเทคนิค SEM ดังแสดงในรูปที่ 4.2

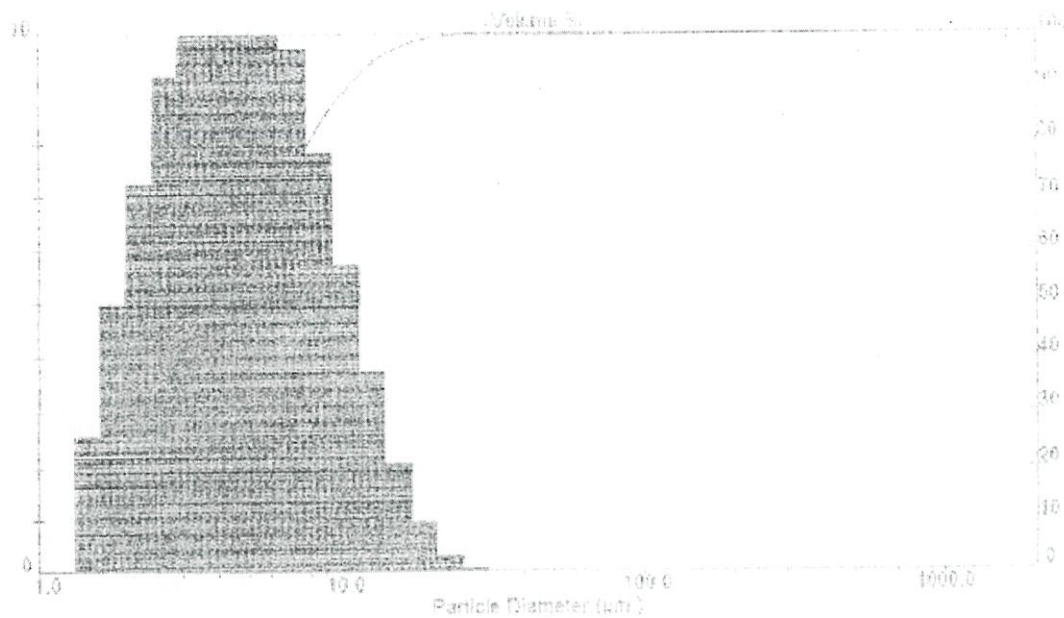




**รูปที่ 4.2** ภาพแสดงอนุภาคซิลิกาที่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรงคัดขนาด 20 ไมโครเมตร และผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C

จากการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 1.5 องศาต่อนาที (heating rate 1.5 °C/min) [33] ปริมาณที่ได้หลังจากการเผาจะลดลงเหลือครึ่งหนึ่งของปริมาณก่อนเผา เนื่องจากการสังเคราะห์ซิลิกาโดยใช้ระบบไมเซลล์ในการควบคุมขนาดอนุภาคซิลิกาที่ได้เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารละลายโซเดียมซิลิเกต และกรดไฮโดรคลอริก และสารไทรทอนเอ็กซ์-100 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดนอนไอออนิกที่เกิดเป็นไมเซลล์และมีโครงสร้างเป็นสารกลุ่มไฮโดรคาร์บอน เมื่อทำการเผาที่อุณหภูมิดังกล่าวจึงเกิดการเผาไหม้ของสารลดแรงตึงผิวกลายเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการเผาซิลิกาก่อนนำไปสร้างพันธะกับ ODS นั้น นอกจากจะเป็นการกำจัดสารลดแรงตึงผิวแล้วยังเป็นการลดหมู่ไฮดรอกซิลได้อีกด้วย [9,26, 33]

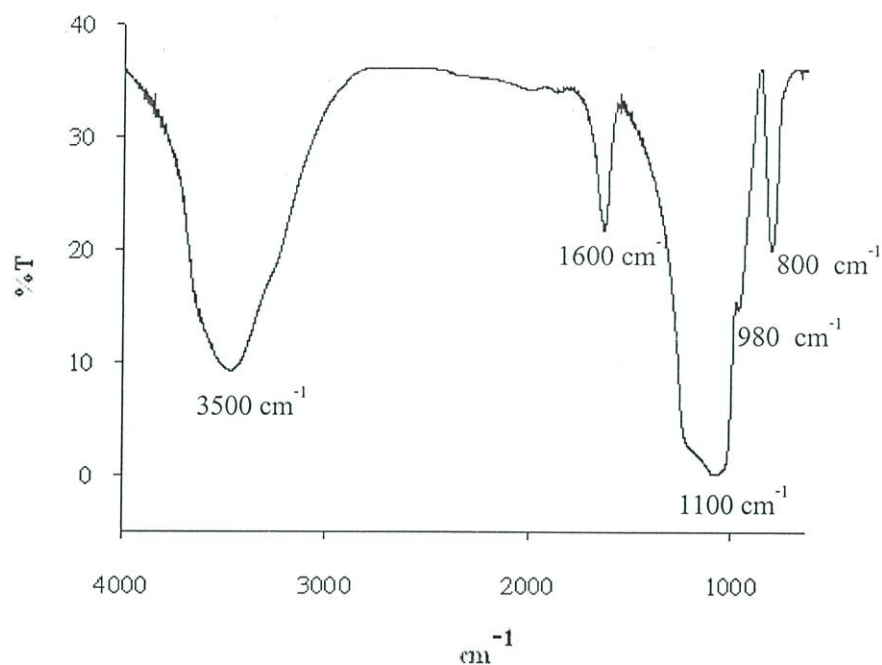
4.1.3 ศึกษาการกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้ โดยใช้เครื่องวัดการกระจาย  
ตัวของอนุภาค (Light Scattering analyzer) ดังแสดงในรูปที่ 4.3



**รูปที่ 4.3** การกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้

จากรูปที่ 4.3 ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาค่าการกระจายตัวของอนุภาคซิลิกาหลังจากผ่านการ  
ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 20 ไมโครเมตร (635 เมช) และผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C โดยใช้  
เครื่องวัดการกระจายตัวของอนุภาค พบว่ามีขนาดอนุภาคส่วนใหญ่ 3-10 ไมโครเมตร อนุภาค  
ซิลิกาส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 4.55 ไมโครเมตร สำหรับอนุภาคซิลิกาของทาง  
การค้าที่นิยมนำมาใช้งานในเทคนิค HPLC มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 3, 5 และ 10 ไมโครเมตร [10]

#### 4.1.4 ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของผิวซิลิกาที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคฟูเรียร์-ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform Infrared Spectroscopy; FT-IR)

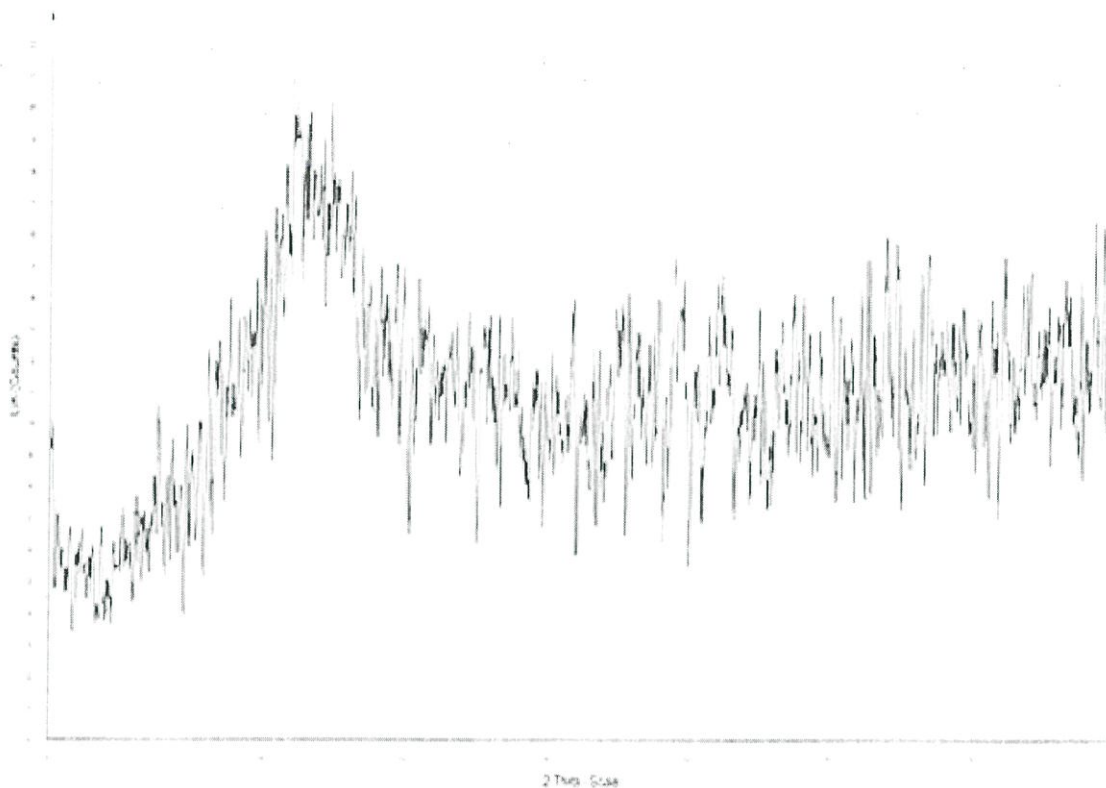


รูปที่ 4.4 แสดงสเปกตรัม FT-IR ของอนุภาคซิลิกา

ในการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันบนผิวซิลิกา ทำโดยใช้เทคนิคฟูเรียร์-ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี โดยวิธีเตรียมเป็น KBr disc กับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ได้สเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งมีตำแหน่งของแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญดังนี้ [37, 38, 39, 40]

- ที่เลขคลื่น 3500 cm<sup>-1</sup> เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น 1600 cm<sup>-1</sup> เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น 1100 cm<sup>-1</sup> เกิดจากการสั่นของ Si-O-Si
- ที่เลขคลื่น 980 cm<sup>-1</sup> เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH
- ที่เลขคลื่น 800 cm<sup>-1</sup> เกิดจากการสั่นของ Si-O

#### 4.1.5 โครงสร้างของซิลิกาตรวจสอบโดยใช้เครื่องเอกซเรย์ ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ (X-ray diffractometer; XRD)

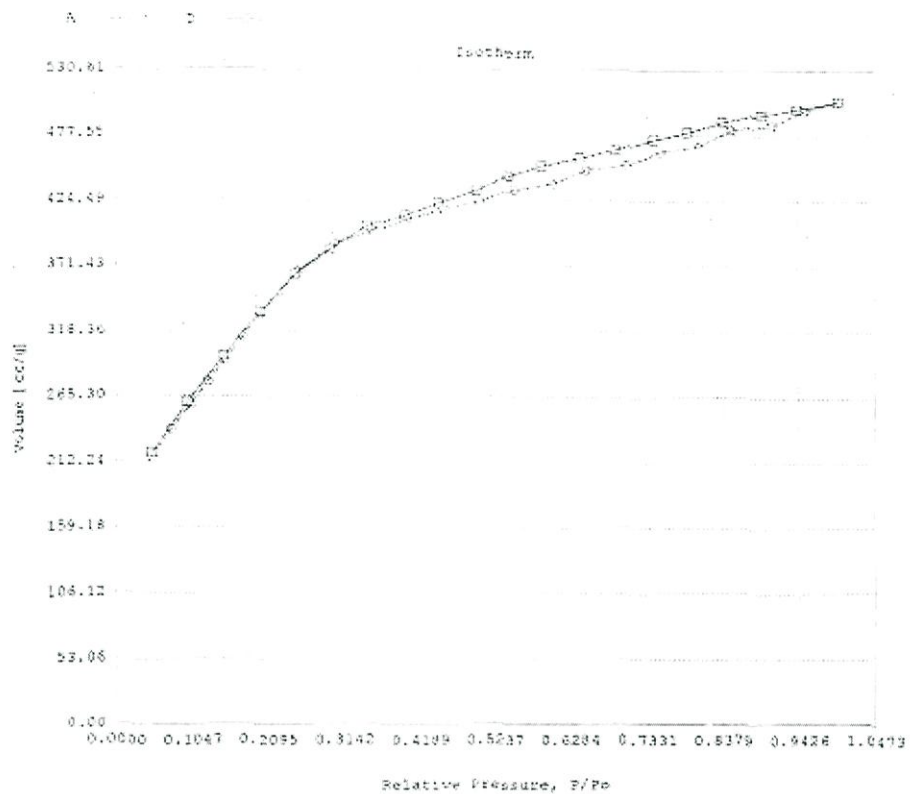


**รูปที่ 4.5** สเปกตรัม XRD ของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้

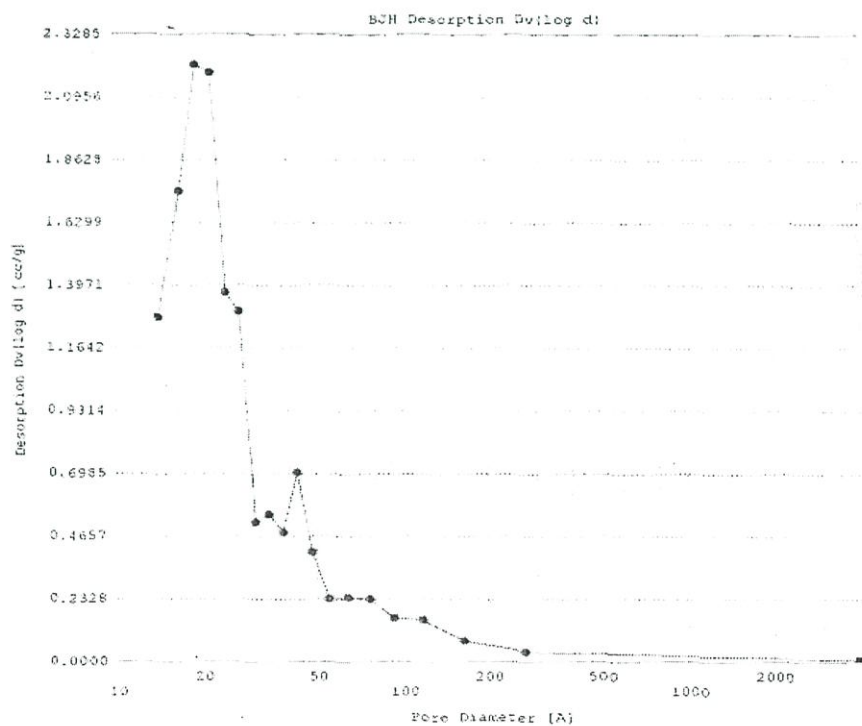
จากสเปกตรัม XRD รูปที่ 4.5 พบว่าสเปกตรัม XRD มีลักษณะเป็นพีคที่กว้าง (broad peak) แสดงว่าซิลิกาที่ได้มีลักษณะโครงสร้างเป็นซิลิกาอสัณฐาน (amorphous silica) หลังจากผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 20 ไมโครเมตร (635 เมช) และผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C [33,35]

#### 4.1.6 พื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนที่สังเคราะห์ได้ ตรวจสอบโดยใช้วิธี Brauaver Emmett-Teller (BET method)

ผลการตรวจสอบโดยวิธี Brauaver Emmett Teller (BET method) ได้ไอโซเทอมดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้หลังผ่านการร่อนด้วยตะแกรงขนาด 20 ไมโครเมตร (635 เมช) และผ่านการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C มีพื้นที่ผิวประมาณ 1270.79 m<sup>2</sup>/g และจากกราฟรูปที่ 4.7 มีขนาดรูพรุนประมาณ 18 Å ซึ่งมีวัชย์ที่ผ่านมา ได้นำซิลิกาที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้มาใช้เป็นเฟสอยู่กับที่สำหรับเทคนิค HPLC [3,4,6] ระบบนอร์มัลเฟส [10]



รูปที่ 4.6 ไอโซเทอมที่ได้จากการแอดซอร์บ (adsorb) และดีซอร์บ (desorb) แก๊สไนโตรเจน บนผิวซิลิกาที่สังเคราะห์ได้



รูปที่ 4.7 BJH desorption DV (log d) plot

เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ผิวและขนาดของรูพรุน พบว่าซิลิกาทางการค้ามีพื้นที่ผิวน้อยกว่าและมีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าซิลิกาที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ ทั้งนี้เนื่องมาจากกระบวนการเตรียมอนุภาคซิลิกา และผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน คุณลักษณะซิลิกาในทางการค้าแสดงในตารางที่ 4.1 [36]

**ตารางที่ 4.1** แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของซิลิกา (HPLC grade) [36]

ซิลิกา	พื้นที่ผิว $m^2/g$	ขนาดรูพรุน $\text{\AA}$
LiChrosorb <sup>®</sup> 100	300	100
LiChrospher <sup>®</sup> 100	420	100
ProntoSIL 60	450	60
ProntoSIL 120	300	120
ProntoSIL 200	150	300
Nucleosil <sup>®</sup> 100	350	100
Partisil <sup>®</sup>	350	80.5
Hypersil <sup>®</sup> 100	300	100
Hypersil <sup>®</sup> 300	90	300
Symmetry <sup>®</sup>	335	100
Kromasil <sup>®</sup>	340	100
$\mu$ Bondapak <sup>™</sup>	330	100
YMCPPro <sup>™</sup>	330	125
Platinum <sup>™</sup>	210	100
Resolve <sup>™</sup>	200	90
Water Spherisorb <sup>®</sup>	200	80
Inertsil <sup>®</sup>	320	150
Delta-Pak <sup>™</sup> 100	300	100

#### 4.1.7 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุภาคซิลิกาที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องเอกซเรย์ฟลูออเรสเซนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (X-ray Fluorescence Spectrometer; XRF)

ผลการตรวจสอบได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง คือ มี SiO<sub>2</sub> ถึง 99.97 % และมีสารอื่นปะปนมาเพียง 0.10 %

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ของซิลิกาหลังทำการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C

SiO <sub>2</sub> (%)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	Etc. (%)
99.97	-	-	0.10

#### 4.1.8 วิเคราะห์หาปริมาณธาตุที่ปนเปื้อนในซิลิกาด้วยอินดักทีฟคัปเปิลพลาสมา แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer; ICP-MS)

ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบกับ ซิลิกาทางการค้า ชื่อ Zorbax Rx-SIL ความบริสุทธิ์ถึง 99.995 % แต่มีปริมาณธาตุบางอย่างที่เจือปน มีความเข้มข้นสูงกว่าในอนุภาคซิลิกาที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ โลหะที่ปนเปื้อน เช่น เหล็ก อลูมิเนียม นิกเกิล และ สังกะสี ส่งผลต่อการวิเคราะห์ได้ คือ โลหะบางชนิดอาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ ทำให้พีคที่ได้ไม่สมมาตร มีลักษณะเป็นพีคที่มีหาง (tailing) และถ้าเป็นอลูมิเนียมไปกระตุ้นหมู่ไซลานอลบนพื้นผิวซิลิกา จะทำให้มีสภาพความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ดังนั้นซิลิกาที่จะนำมาใช้สำหรับเทคนิค HPLC จึงต้องมีความบริสุทธิ์สูง โดยเฉพาะจะนำไปใช้ในงานวิเคราะห์สารจำพวกเบสและสารที่มีขั้วสูง [10]

**ตารางที่ 4.3** ปริมาณธาตุปนเปื้อนในซิลิกาที่ควบคุมอนุภาคโดยระบบไมเซลล์หลังทำการเผาที่อุณหภูมิ 600 °C และซิลิกาทางการค้า Zorbax Rx-SIL [10]

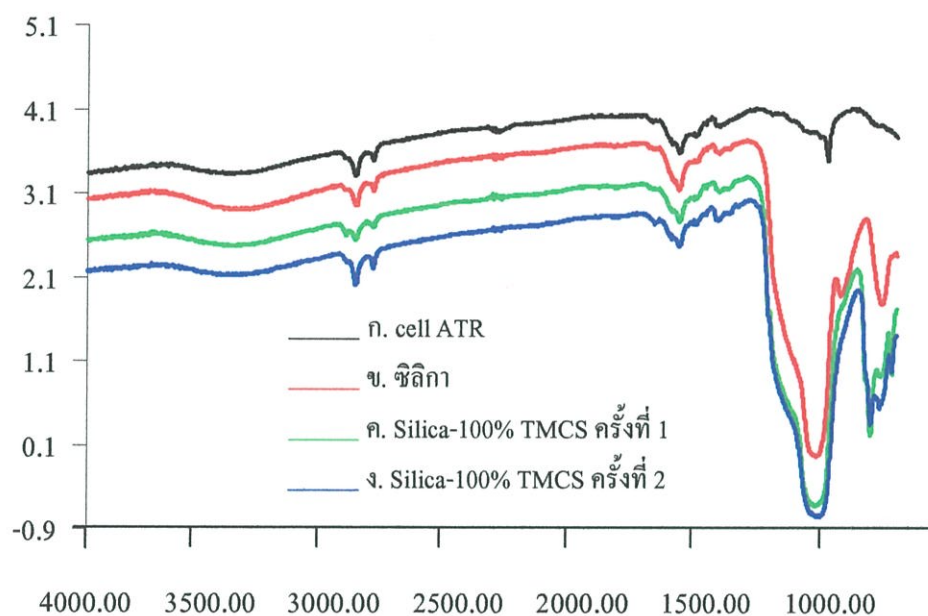
ธาตุ	ซิลิกาที่เตรียมได้ (mg/kg)	ซิลิกาทางการค้าชื่อ Zorbax RxSIL (mg/kg)
Na	0.27	10
Mg	0.08	4
Al	0.36	1.5
Ca	0.16	2
Cr	< 0.001	-
Mn	< 0.0002	-
Fe	< 0.03	3
Co	0.001	-
Ni	0.01	-
Cu	< 0.02	-
Zn	0.09	1
Sr	0.00	-
Mo	< 0.0004	-
Cd	0.002	-
Sn	0.08	-
Ba	0.07	-
Pb	< 0.007	< 3

หมายเหตุ การวิเคราะห์ปริมาณธาตุที่ปนเปื้อนในซิลิกาของ Zorbax Rx-SIL โดยใช้เทคนิค ICP-ASE/MS [5] ธาตุที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 1 ppm ไม่สามารถตรวจพบได้

## 4.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของซิลิกาเมื่อสร้างพันธะกับ TMCS และ ODS

### 4.2.1 ศึกษาหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนผิวซิลิกาที่ถูกสร้างพันธะกับ TMCS (silica-TMCS)

4.2.1.1 ศึกษาหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) บนพื้นผิวซิลิกาที่สร้างพันธะกับ TMCS ครั้งที่ 1 และ สร้างพันธะครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิคฟูเรียร์-ทรานสฟอร์ม อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี อาศัยหลักการสะท้อน (Attenuated Total Reflection, ATR) ได้สเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.8 เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของเซลล์ ATR และ ซิลิกา ซึ่งใส่สารที่จะทำการตรวจวัดและเก็บให้เต็มเซลล์ ATR ทุกครั้งที่ทำการตรวจวัด



รูปที่ 4.8 สเปกตรัม FT-IR ของ เซลล์ ATR (ก) ซิลิกา (ข) Silica-TMCS สร้างพันธะครั้งที่ 1 (ค) Silica-TMCS สร้างพันธะ ซ้ำครั้งที่ 2 (ง)

จากสเปกตรัมรูปที่ 4.8 ก ข และ ค จะเห็นว่ามีตำแหน่งเลขคลื่นที่เหมือนกัน ดังนี้

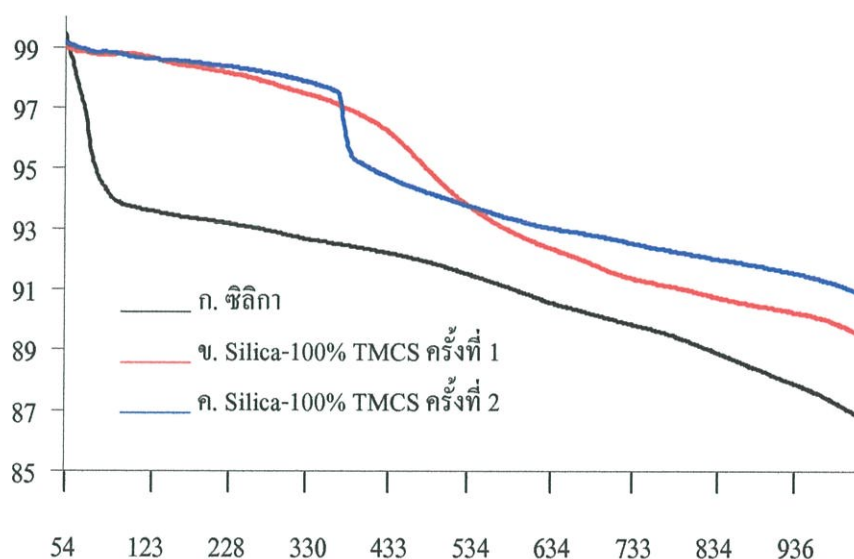
- ที่เลขคลื่น  $3500\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น  $1600\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น  $1100\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นของ Si-O-Si
- ที่เลขคลื่น  $980\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH
- ที่เลขคลื่น  $800\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นของ Si-O [37, 38, 39, 40]

แต่รูปที่ 4.8 ข และ ค จะมีพีคที่เพิ่มขึ้นมา คือ ที่เลขคลื่น  $2992\text{ -}2846\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่ -  $\text{CH}_3$  ของ TMCS และที่เลขคลื่น  $980\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบงอของ

พันธะ Si-OH ของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาโดยตรง ซึ่งจะมีความเข้มลดลงเนื่องจากถูกสร้างพันธะกับ TMCS [37] แต่จะไม่พิจารณาการลดลงหรือหายไปของหมู่ไฮดรอกซิลที่เลขคลื่น 3500 และ  $1600\text{ cm}^{-1}$  เพราะถ้าตัวอย่างมีความชื้น ก็จะส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดลงของลักษณะพีคที่ตำแหน่งนี้ได้เช่นกัน

#### 4.2.1.2 ผลการตรวจสอบการสังเคราะห์ซิลิกาด้วยเทคนิค TGA

นำ Silica-TMCS มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงเฟสและ % carbon loading ด้วยเทคนิค TGA ได้ เฮอร์ฟ TG ดังแสดงในรูปที่ 4.9

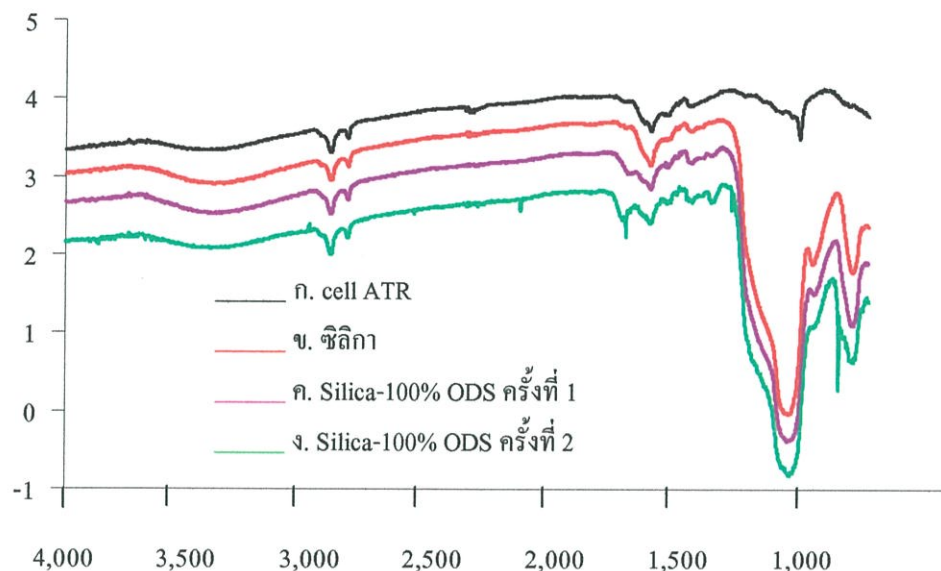


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงเฮอร์ฟ TG ของ ซิลิกา (ก) Silica-TMCS สร้างพันธะครั้งที่ 1 (ข) Silica-TMCS สร้างพันธะ ซ้ำครั้งที่ 2 (ค)

ผลจากเทคนิค TGA ทำให้ได้ข้อมูลร้อยละ โดยน้ำหนักที่สูญหาย (% Weight loss) ในช่วงอุณหภูมิ 248-1000 °C ของ Silica-TMCS สร้างพันธะครั้งที่ 1 และ 2 จากข้อมูลนี้ ทำให้สามารถคำนวณหา % carbon loading ได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.72 และ 5.76 % ตามลำดับ และสามารถคำนวณหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาที่สร้างพันธะกับ TMCS โดยประมาณได้ ดังแสดงในภาคผนวก ข. เท่ากับ  $3.35 \times 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร

## 4.2.2 ผลการตรวจสอบคุณลักษณะของ Silica-ODS

4.2.1.1 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของซิลิกาที่ถูกสร้างพันธะด้วย ODS ครั้งที่ 1 และสร้างพันธะซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค FT-IR วิธี ATR ซึ่งในการทดสอบได้สารตัวอย่างและกรรไกรให้เต็มเซลล์ ATR ทุกครั้งที่ทำการตรวจวัด ได้สเปกตรัมดังแสดงในรูปที่ 4.10



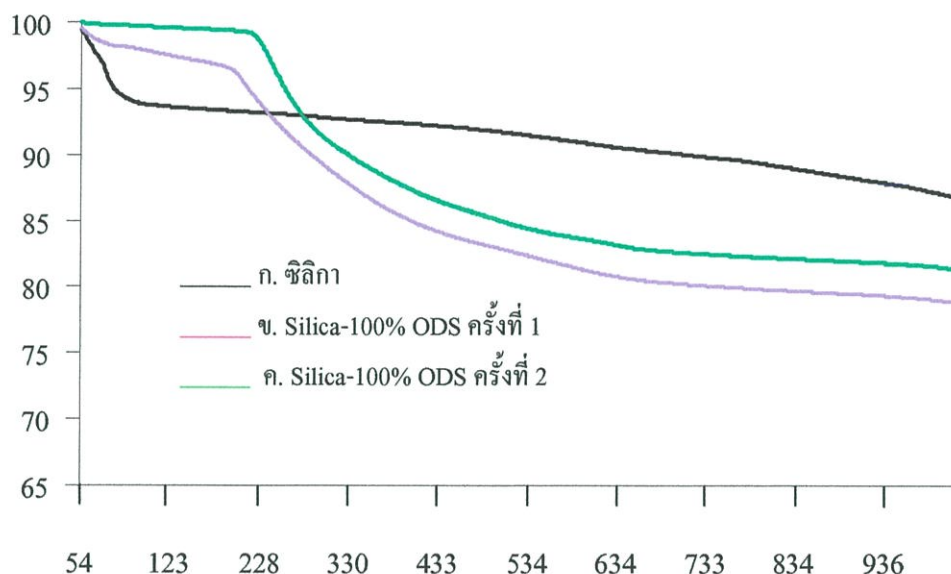
รูปที่ 4.10 สเปกตรัม FT-IR ของ เซลล์ ATR (ก) ซิลิกา (ข) Silica-ODS สร้างพันธะ ครั้งที่ 1 (ค) Silica-ODS สร้างพันธะ ครั้งที่ 2 (ง)

จากรูปที่ 4.10 สเปกตรัม ก ข และ ค มีสเปกตรัมตำแหน่งเลขคลื่นที่เหมือนกัน ดังนี้

- ที่เลขคลื่น  $3500\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบยืดของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น  $1600\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ O-H
- ที่เลขคลื่น  $1100\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นของ Si-O-Si
- ที่เลขคลื่น  $980\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH
- ที่เลขคลื่น  $800\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นของ Si-O [37, 38, 39, 40]

แต่สเปกตรัม ข และ ค มีพีคเพิ่มขึ้นมา คือ ที่เลขคลื่น  $2992\text{ -}2846\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจากการสั่นแบบยืดของหมู่ -CH<sub>3</sub> และ ที่เลขคลื่น  $1350\text{ -}1460\text{ cm}^{-1}$  เป็นผลของการสั่นแบบงอของหมู่ -CH<sub>2</sub> และ -CH<sub>3</sub> [34] ของ ODS และที่เลขคลื่น  $980\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการสั่นแบบงอของพันธะ Si-OH ของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา มีความเข้มลดลงเมื่อเทียบกับสเปกตรัมของซิลิกา แต่ความเข้มไม่ลดลงมากเท่ากับสร้างพันธะด้วย TMCS [4, 46]

#### 4.2.1.2 ผลการตรวจสอบการสังเคราะห์ Silica-ODS ด้วยเทคนิค TGA

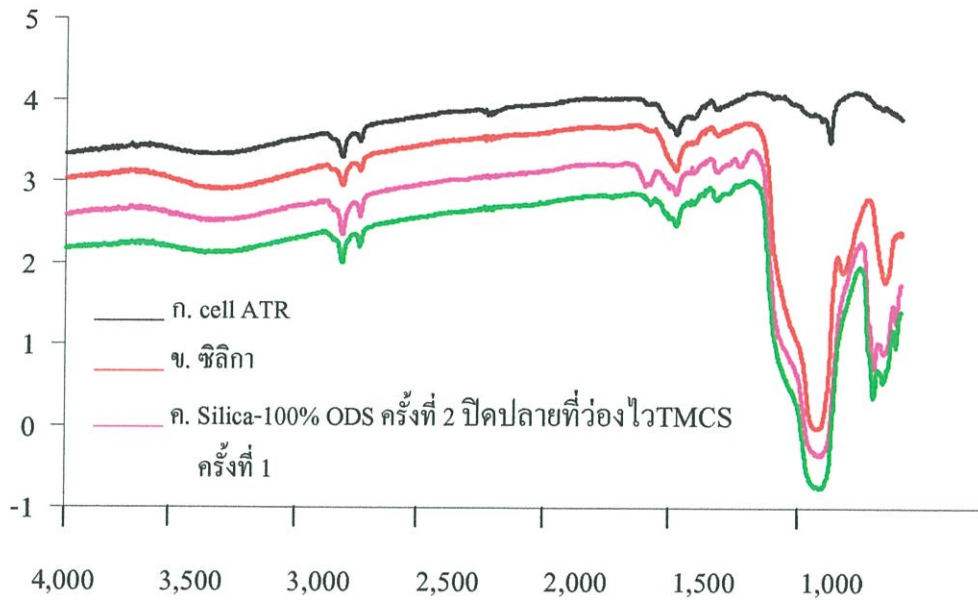


รูปที่ 4.11 กราฟแสดงเคอร์ฟ TG ของ ซิลิกา (ก) Silica-ODS ครั้งที่ 1 (ข) Silica-ODS สร้างพันธะ ซ้ำครั้งที่ 2 (ค)

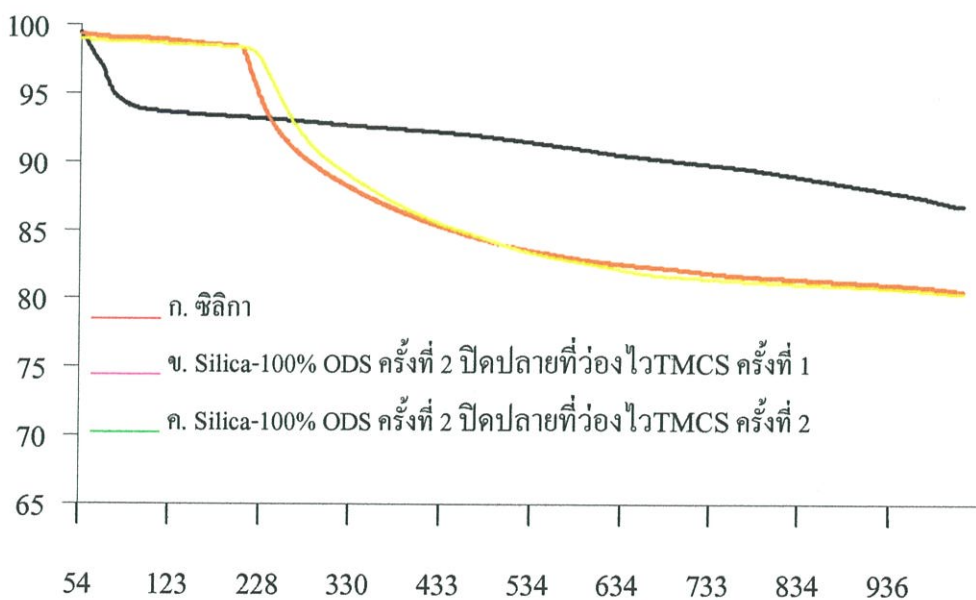
เมื่อตรวจสอบซิลิกาที่ได้จากการสร้างพันธะด้วย ODS ครั้งที่ 1 และ สร้างพันธะซ้ำครั้งที่ 2 ด้วยเทคนิค TGA ได้เคอร์ฟ TG ดังแสดงในรูปที่ 4.11 ทำให้ได้ข้อมูลร้อยละโดยน้ำหนักที่สูญหาย (% Weight loss) ในช่วงอุณหภูมิ 248-1000 °C พบว่า % carbon loading ครั้งที่ 1 และ 2 เท่ากับ 15.61 และ 15.73 % ตามลำดับ จากข้อมูลนี้ คำนวณหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิว Silica-ODS โดยประมาณได้เท่ากับ  $3.28 \times 10^9$  ไมโครโมลต่อตารางเมตร (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ง.)

#### 4.2.3 ตรวจสอบคุณลักษณะของ Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว (end capping) ด้วย TMCS

เมื่อทำการสร้างพันธะซิลิกาด้วย ODS ซ้ำ 2 ครั้ง และปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS ครั้งที่ 1 และนำมาตรวจสอบคุณลักษณะด้วยเทคนิค FT-IR วิธี ATR ซึ่งในการทดสอบได้สารตัวอย่างและเตรียมให้เต็มเซลล์ ATR ทุกครั้งที่ทำการตรวจวัด ดังแสดงในรูปที่ 4.12 (ค) และตรวจวัดด้วยเทคนิค TGA ได้เคอร์ฟ TG ดังแสดงในรูปที่ 4.13 (ข) จากนั้นนำไปปิดปลายที่ว่องไว ซ้ำด้วย TMCS ครั้งที่ 2 และตรวจสอบคุณลักษณะด้วยเทคนิค FT-IR วิธี ATR ดังแสดงในรูปที่ 4.12 (ง) และ ตรวจวัดด้วยเทคนิค TGA ได้เคอร์ฟ TG ดังแสดงในรูปที่ 4.13 (ค)



รูปที่ 4.12 สเปกตรัม FT-IR ของ เซลล์ ATR (ก) ซิลิกา (ข) Silica-ODS สร้างพันธะซ้ำ 2 ครั้ง และ ปิดปลายที่ว่องไว ครั้งที่ 1 (ค) Silica-ODS สร้างพันธะซ้ำ 2 ครั้ง และ ปิดปลายที่ว่องไว ครั้งที่ 2 (ง)



รูปที่ 4.13 กราฟแสดงเคอร์ฟ TG ของ ซิลิกา (ก) Silica-ODS สร้างพันธะซ้ำ 2 ครั้ง และปิดปลายที่ว่องไว ครั้งที่ 1 (ข) Silica-ODS สร้างพันธะซ้ำ 2 ครั้ง และปิดปลายที่ว่องไว ครั้งที่ 2 (ค)

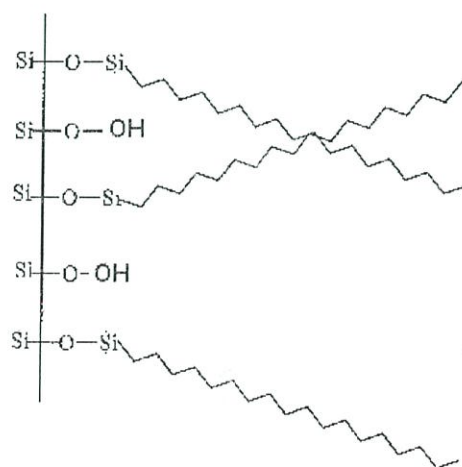
เมื่อนำ TMCS สร้างพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา จากข้อมูลเทอร์โมกราฟ TG รูปที่ 4.9 ค. จำนวน % carbon loading เท่ากับ 5.76 % และมีพื้นที่ผิวที่ถูกครอบคลุม (surface coverage) ด้วย TMCS เท่ากับ  $3.35 \times 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร วิธีคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข.

ส่วนปริมาณ ODS ที่สร้างพันธะกับไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา ค่า % carbon loading เท่ากับ 15.73 % มีพื้นที่ผิวที่ถูกครอบคลุมด้วย ODS เท่ากับ  $3.28 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร วิธีคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ง.

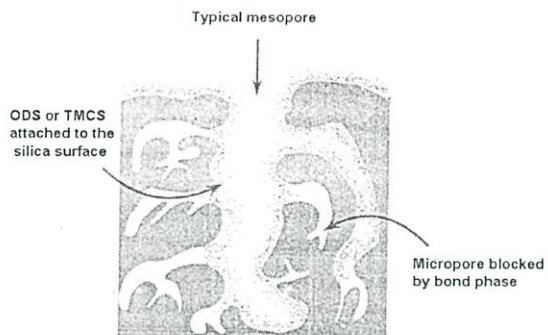
จะเห็นได้ว่า พื้นที่ผิวที่ไม่ถูกครอบคลุมด้วย ODS เท่ากับ  $3.02 \times 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร ซึ่งต้องทำการปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS ให้หมด แต่จากการทดลอง และคำนวณพื้นที่ผิวที่ถูกครอบคลุมด้วย TMCS เท่ากับ  $2.60 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร วิธีคำนวณดังแสดงในภาคผนวก จ. จึงแสดงว่ามีหมู่ไฮดรอกซิลที่เหลือและไม่ถูกครอบคลุมถึง  $2.76 \times 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร

สาเหตุเนื่องมาจาก เพราะโมเลกุลของ ODS เป็นโมเลกุลที่ใหญ่มีความเกะกะ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 จึงขัดขวางการเข้าสร้างพันธะของ TMCS กับหมู่ไฮดรอกซิลที่เหลืออยู่ ทำให้เกิดพันธะได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควรจะเป็น [9,35] ดังนั้น TMCS จึงปิดปลายที่ว่องไวกับไฮดรอกซิลได้น้อย อีกทั้งธรรมชาติของซิลิกาที่สังเคราะห์ได้มีขนาดรูพรุนค่อนข้างเล็ก เมื่อเทียบกับซิลิกาที่ใช้สำหรับเทคนิค HPLC ทั่วไป การเข้าไปสร้างพันธะในรูพรุนของซิลิกาจึงเป็นไปได้น้อยทำให้พื้นที่ผิวที่ถูกครอบคลุมมีน้อย

ส่วนในรูปที่ 4.15 เป็นการแสดงลักษณะรูพรุนของซิลิกาของทางการค้าที่มีขนาดรูพรุนที่ใหญ่อยู่ในช่วง 50-150 Å [36] ทำให้สารที่นำไปสร้างพันธะ อาทิ เช่น ODS และสารที่นำไปปิดปลายที่ว่องไว เช่น TMCS สามารถเกิดการสร้างพันธะในรูพรุนได้ [11] ซึ่งซิลิกาที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยนี้มีขนาดรูพรุนค่อนข้างเล็ก (18 Å) ดังนั้นสารที่จะนำมาสร้างพันธะหรือปิดปลายว่องไวจึงไม่สามารถเกิดพันธะกับไฮดรอกซิลในรูพรุนได้ จึงทำให้มีหมู่ไฮดรอกซิลที่ไม่ถูกสร้างพันธะเหลือเป็นจำนวนมากนั่นเอง

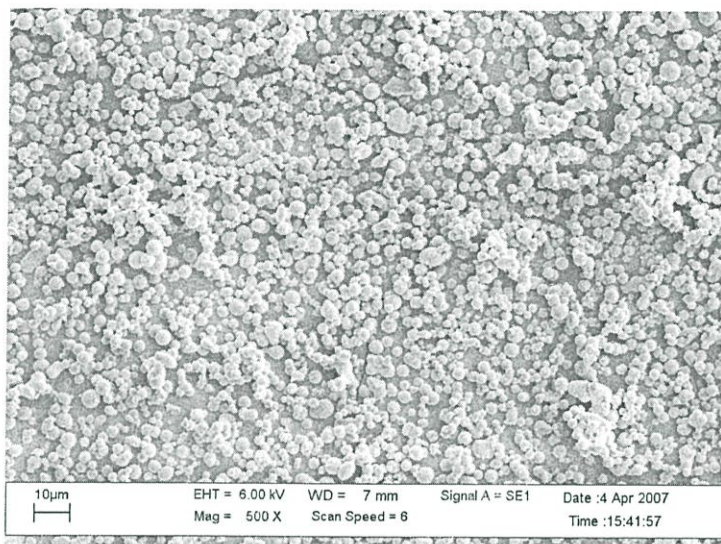


รูปที่ 4.14 แสดงการสร้างพันธะของ ODS กับไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา [10]

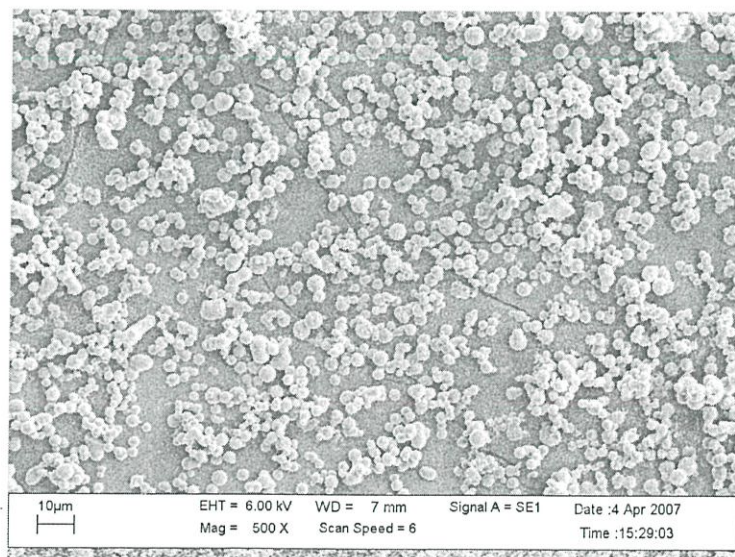


รูปที่ 4.15 แสดงการสร้างพันธะของไซลันอลในรูพรุนของซิลิกา [11]

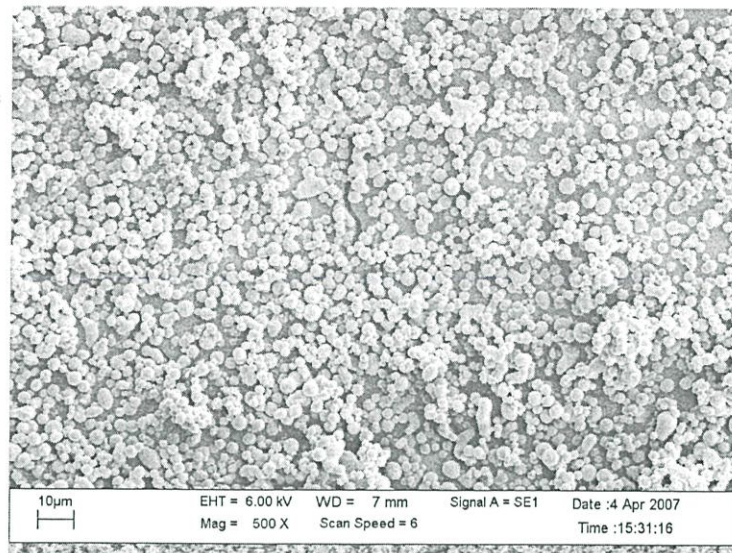
#### 4.2.4 วิเคราะห์คุณสมบัติของซิลิกาและซิลิกาที่สร้างพันธะกับ ODS และ ปิดปลายที่ว่างไว้ ด้วยเทคนิค Scanning Electron Microscope (SEM)



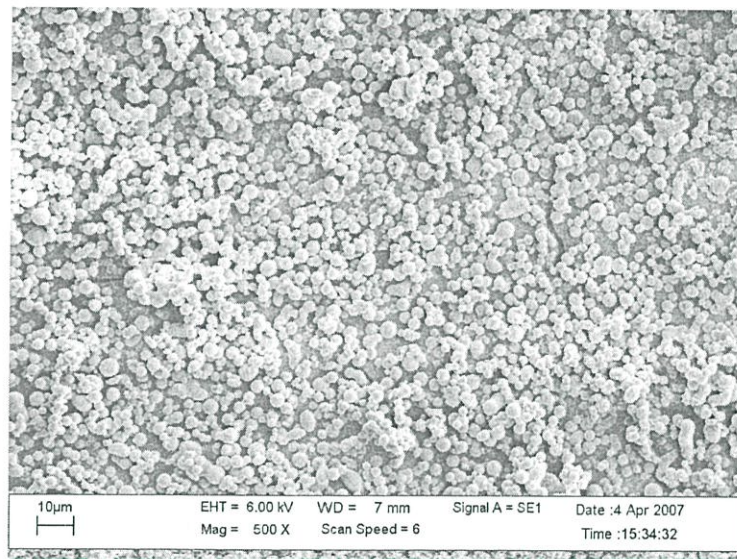
(ก)



(ข)



(ก)



(ง)

**รูปที่ 4.16** แสดงลักษณะของ (ก) ซิลิกา (ข) Silica-TMCS (ครั้งที่ 2) Silica - ODS (ครั้งที่ 2) (ง) Silica-ODS สร้างพันธะซ้ำ 2 ครั้ง ทำการ ปิดปลายที่ว่องไวด้วย TMCS 2 ครั้ง ด้วยเทคนิค SEM

จากรูปที่ 4.16 แสดงให้เห็นว่า Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว แล้วเมื่อใช้เทคนิค SEM ในการถ่ายภาพ แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดขยะขึ้นในขั้นตอนการสร้างพันธะกับ ODS และปิดปลายที่ว่องไว จึงนำไปบรรจุลงสู่คอลัมน์ได้ในอันดับต่อไป

#### 4.2.5 วิเคราะห์ความหนาแน่น Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไวด้วยวิธีการแทนที่น้ำ

ค่าความหนาแน่นของ Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว ด้วยปริมาณที่สูงที่สุดที่เป็นไปได้ ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแทนที่น้ำ โดยใช้ขวดฟิคโนมิเตอร์ เท่ากับ 1.3209 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากข้อมูลดังกล่าวนี้จะนำไปใช้ในการคำนวณ และ ชั่ง Silica-ODS ที่ปิดปลายที่ว่องไว แล้ว เพื่อบรรจุลงคอลัมน์ HPLC ทั้งสองขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. ต่อไป

### 4.3 การศึกษาคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟี

คอลัมน์ทางการค้าที่ใช้งานในเทคนิค HPLC นอกจากจะต้องชี้แจงคุณลักษณะของคอลัมน์ อาทิ เช่น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ความยาว ชนิด และขนาดของแพคเกจแล้ว ยังต้องระบุรายละเอียดที่เกี่ยวกับพารามิเตอร์ต่างๆ ทางด้านโครมาโทกราฟีเพื่อเป็นการบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ อาทิ เช่น จำนวนเพลทตามทฤษฎี (The number of theoretical plate, N) ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) ค่าความสามารถในการแยก (Resolution, R) แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor,  $k'$ ) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity,  $\alpha$ ) และความสมมาตรของพีค (peak asymmetry,  $A_s$ ) [5, 28, 29, 38]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้ เปรียบเทียบกับคอลัมน์ทางการค้าของบริษัท KYA TECH Corporation

Column Number: 00W00421

Batch: #060207

ขนาดคอลัมน์ 150 x 4.6 mm i.d.

อนุภาคซิลิกา มีขนาด 5 ไมโครเมตร

มีพื้นที่ผิว 336  $\text{m}^2/\text{g}$

ขนาดรูพรุน 126 Å

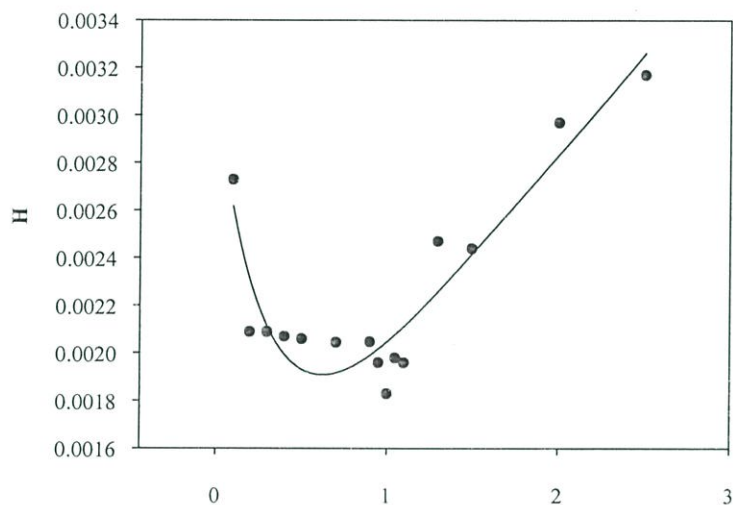
มี % Carbon loading 18.5 % และคอลัมน์นี้ถูก end-capping ด้วย TMCS

#### 4.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ Silica-ODS ที่ผู้วิจัยเตรียมได้ กับคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5 $\mu\text{m}$ (150 x 4.6 mm i.d.)

4.3.1.1 กราฟแวนติเมตรของคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d.

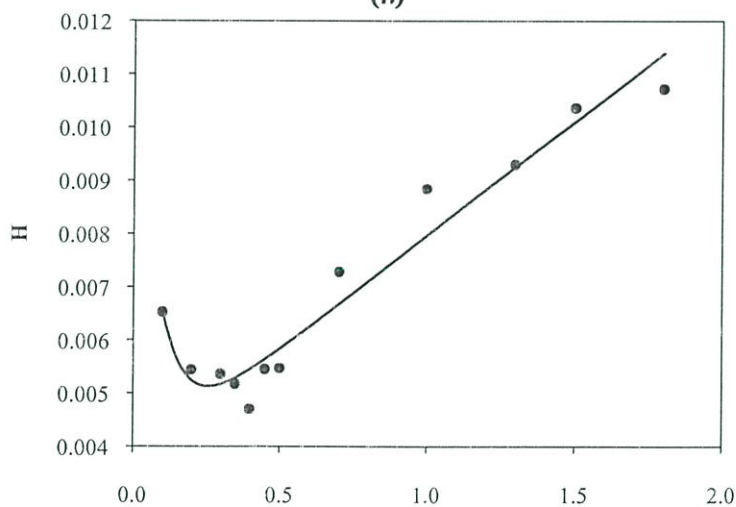
กราฟแวนติเมตรได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐานไบฟีนีล 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ เมทานอล-น้ำ (80:20) ปรับเปลี่ยนอัตราการใช้เฟสเคลื่อนที่ของคอลัมน์ที่เตรียมได้ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3, 1.5 และ 1.8

มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนคอลัมน์ของทางการค้า HiQSil C18 W5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) ปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 0.9, 0.95, 1.0, 1.05, 1.1, 1.3, 1.5, 2.0, และ 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร คำนวณค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) ของทั้งสองคอลัมน์ (ดังแสดงในภาคผนวก ฉ. และ ช. ตามลำดับ) นำข้อมูลที่ได้จากการคำนวณมาพลอตกราฟระหว่างค่า H กับอัตราการไหล ได้กราฟแวนดิมเตอร์ดังแสดงในรูปที่ 4.17



อัตราการไหล (flow rate) มิลลิลิตรต่อนาที

(ก)



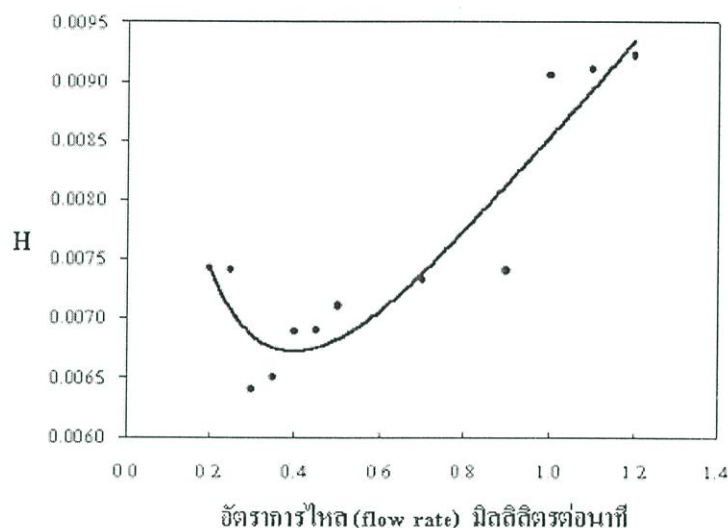
อัตราการไหล (flow rate) มิลลิลิตรต่อนาที

(ข)

รูปที่ 4.17 กราฟแวนดิมเตอร์ที่ได้จาก คอลัมน์ทางการค้า HiQSilC18W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.) (ข)

#### 4.3.1.2 กราฟแวนดิมเตอร์ของคอลัมน์ขนาด 250 x 4.6 mm i.d.

กราฟแวนดิมเตอร์ได้จากการตรวจวัดสารละลายมาตรฐาน โปฟีนีล 0.06 มิลลิกรัมต่อหน้าที่ ใช้สภาวะการทดลองเหมือนกับการทดสอบคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ปรับเปลี่ยนอัตราการไหลดังต่อไปนี้ 0.2, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.70, 0.90, 1.00, 1.10. และ 1.20 มิลลิกรัมต่อหน้าที่ คำนวณค่าเพลททางทฤษฎี (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ซ.) ดังแสดงในรูปที่ 4.18



**รูปที่ 4.18** กราฟแวนดิมเตอร์ที่ได้จาก คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)

คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพการแยกดี ต้องมีจำนวนเพลททางทฤษฎี (N) เกิดขึ้นในคอลัมน์ได้มาก นั่นคือ ความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) ต้องมีค่าน้อย โดยเฉพาะความสูงของเพลททางทฤษฎีที่มีค่าต่ำสุด ( $H_{\min}$ ) ต้องมีค่าน้อย พิกที่ได้จะมีลักษณะเป็นพิกที่มีฐานแคบ [15,19,47,49]

จากข้อมูลพบว่า ค่า  $H_{\min}$  และอัตราการไหลที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อน ที่ได้จากคอลัมน์ ทางการค้า HiQSil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. เท่ากับ 0.00183, 0.00470 และ 0.00640 cm ที่อัตราการไหลที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อน เท่ากับ 1.00, 0.40 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อหน้าที่ ตามลำดับ

จะเห็นว่าค่า  $H_{\min}$  ของคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยทั้งสองคอลัมน์มีความแตกต่างจากคอลัมน์ทางการค้าไม่มากนัก เมื่อทดลองที่สภาวะเดียวกัน

## 4.3.1.3 พจน์ A, B และ C [15,19,47,49]

พจน์ A, B และ C ของคอลัมน์ทั้งสาม คำนวณ ได้ดังวิธีที่แสดงในภาคผนวกที่ ฉ, ช และ ซ ตามอันดับ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** แสดงสมการแวนดีมเตอร์ และพจน์ต่างๆ ของคอลัมน์ทางการค้าและคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นจากงานวิจัยสองคอลัมน์

คอลัมน์	สมการแวนดีมเตอร์	พจน์ A	พจน์ B	พจน์ C
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	$H = 0.0011 + \frac{1.71 \times 10^{-4}}{x} + 0.0009 x$	0.0011	$1.71 \times 10^{-4}$	0.0009
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	$H = 0.0037 + \frac{8.16 \times 10^{-5}}{x} + 0.0043 x$	0.0037	$0.82 \times 10^{-4}$	0.0043
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	$H = 0.0043 + \frac{4.11 \times 10^{-4}}{x} + 0.0042 x$	0.0043	$4.11 \times 10^{-4}$	0.0042

นำข้อมูลจากตารางที่ 4.4 มาพิจารณาพจน์ต่างๆ ที่เป็นสาเหตุให้เกิดความกว้างของพีคหรือแบนด์ (band broadening processes)

**พจน์ A** การแพร่วน (Eddy diffusion or multiple path effect) [15,16,18, 36,49,50,51]

พจน์ A ของคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. เท่ากับ 0.0011, 0.0037 และ 0.0043 cm ตามอันดับ ซึ่งพจน์ A ของคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยทั้งสองคอลัมน์รวมทั้งคอลัมน์ทางการค้า มีค่าสูงกว่า พจน์ A มาตรฐาน (0.0005 cm เมื่อขนาดอนุภาคซิลิกา 5 ไมโครเมตร) แสดงว่าคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด มีขนาดอนุภาคค่อนข้างกระจาย

เนื่องจาก พจน์ A แทนผลมาจากการแพร่วน ซึ่งเกิดจากการแพร่ของสารตัวอย่างไปตามเฟสอยู่กับที่ ถ้าขนาดของเฟสอยู่กับที่ไม่สม่ำเสมอ และ ทำการบรรจุคอลัมน์ไม่แน่น การเดินทางของโมเลกุลของตัวอย่างจะได้ระยะทางที่ไม่เท่ากัน จึงทำให้เกิดแบนด์กว้าง การลดการกระจายของแถบโมเลกุลของสารที่มีสาเหตุ จากพจน์ A ทำโดยใช้คอลัมน์ที่มีแพคเกจขนาดอนุภาคเล็กสม่ำเสมอ และบรรจุคอลัมน์ให้แน่น

**พจน์ B** การแพร่ตามความยาวของคอลัมน์ (Longitudinal Molecular diffusion) [15,16,18,36,49,50,51]

พจน์ B ของคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. เท่ากับ  $1.71 \times 10^{-4}$ ,  $0.82 \times 10^{-4}$  และ  $4.11 \times 10^{-4}$  ตารางเซนติเมตรต่อวินาที ตามลำดับ พจน์ B ที่ได้จากทั้ง 3 คอลัมน์ มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน ( $0.16 \times 10^{-4}$  ตารางเซนติเมตรต่อวินาที) เนื่องจากตัวของสารที่ต้องการวิเคราะห์กระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ได้ดี ซึ่งจะส่งผลให้พีคที่ได้มีฐานกว้าง แต่สามารถลดปัจจัยของพจน์ B ได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เลือกใช้อนุภาคขนาดเล็กและขนาดสม่ำเสมอ และบรรจุคอลัมน์ให้แน่น

**พจน์ C** การถ่ายโอนมวล (Mass transfer) [15,16,18,36,49,50,51]

การถ่ายโอนมวล ของคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. เท่ากับ 0.009, 0.0043 และ 0.0042 วินาที ตามลำดับ ซึ่งพจน์ C ของคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยทั้งสองคอลัมน์ มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐาน (0.0025 วินาที) แสดงว่าคอลัมน์ทั้งสองขนาดมีการถ่ายโอนมวลสารได้ดี ทำให้พีคมีฐานกว้าง สาเหตุมาจาก

Mobile phase mass transfer คือ การไหลของเฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านไปรอบๆ อนุภาคของเฟสอยู่กับที่ในอัตราเร็วที่ต่างกัน ของเหลวที่อยู่แนบกับอนุภาค จะเคลื่อนที่ได้ช้า ขณะที่ตรงกลางของกระแสการไหลจะเคลื่อนที่ได้เร็ว จึงเกิดการกระจายตัวของแถบโมเลกุลของสาร

Stagnant mobile phase mass transfer เกิดจากเฟสเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในรูพรุนของเฟสอยู่กับที่ ซึ่งซิลิกาที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีขนาดรูพรุนอยู่ในระดับ meso porous ซึ่งขนาดของรูพรุนอยู่ในช่วง 20 - 150 Å ถ้าขนาดของรูพรุนเล็กกว่า 50 Å จะทำให้สารแพร่เข้าไปในรูพรุน และ เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลที่อยู่นอกรูพรุน ทำให้เกิดการกระจายตัวของแถบโมเลกุลของสาร ทำให้เกิดพีคกว้างได้เช่นกัน [36]

Stationary phase mass transfer นอกจากโมเลกุลของสารจะแพร่เข้าไปในรูพรุนของเฟสอยู่กับที่แล้ว โมเลกุลเหล่านี้ยังสามารถที่จะแทรกซึมเข้าไปจับกับเฟสอยู่กับที่ด้วยอันตรกิริยา (interaction) แบบใดแบบหนึ่ง ถ้าซึมเข้าไปลึกก็จะเคลื่อนที่ออกได้ช้าตรงข้ามกับโมเลกุลของสารที่ไม่ซึมเข้าไปไม่ลึกก็จะเคลื่อนที่ออกได้เร็ว จึงเกิดการกระจายตัวของแถบโมเลกุลเกิดขึ้น

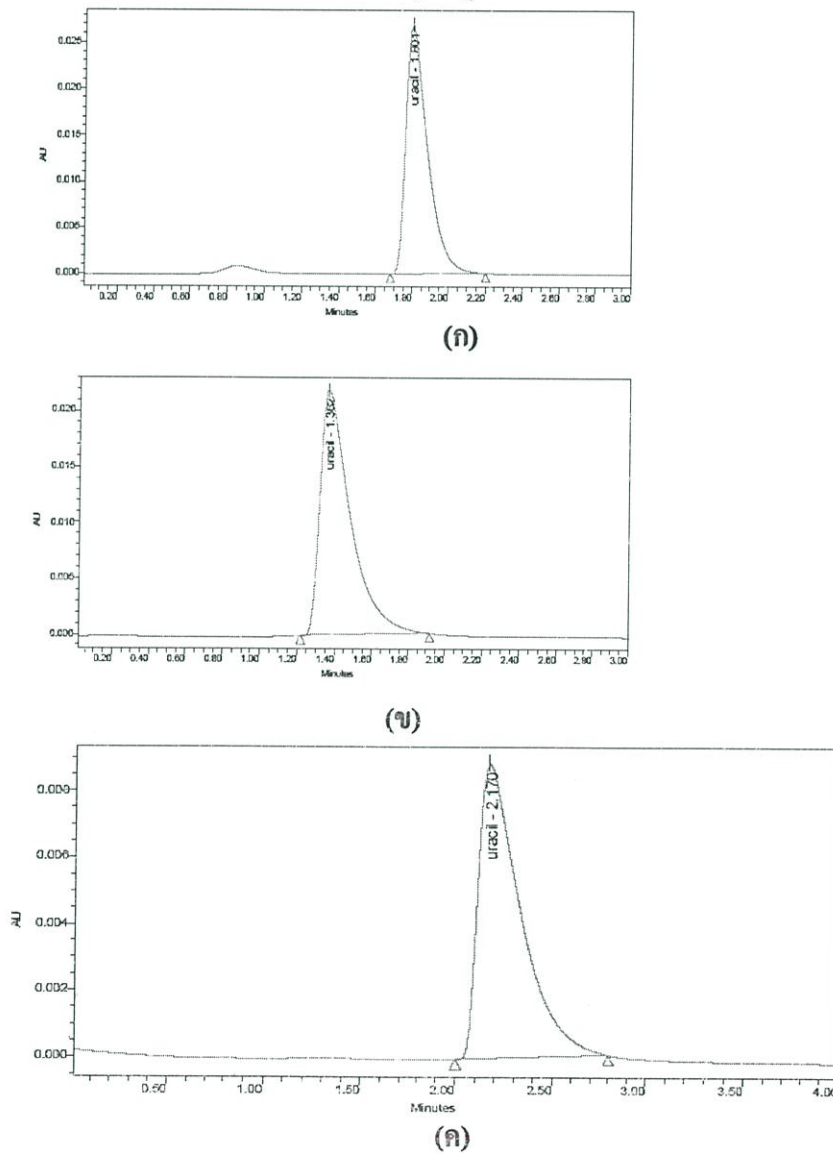
การลดการกระจายของแถบโมเลกุลของสารที่มีสาเหตุ จากพจน์ C ทำโดยลดขนาดอนุภาคที่บรรจุให้เล็กลงเพื่อลดช่องว่างในคอลัมน์ เลือกเฟสเคลื่อนที่ที่มีการ

กระจายตัวสูง มีอัตราการไหลช้า เพื่อลดการกระจายตัวที่ไม่สมดุล เพิ่มความเร็วของการเคลื่อนที่ออกจากเฟสอยู่กับที่ เช่น การสร้างพันธะที่เหมาะสมไม่หนาแน่นจนเกินไป

### 4.3.2 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารแต่ละชนิด

สภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบใช้เฟสเคลื่อนที่ เมทานอล-น้ำ (80 : 20) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตรต่ออนาที ปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

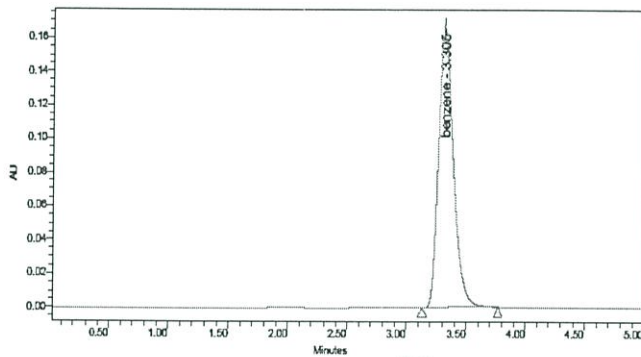
#### 4.3.2.1 สารละลายมาตรฐานยูราซิล ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



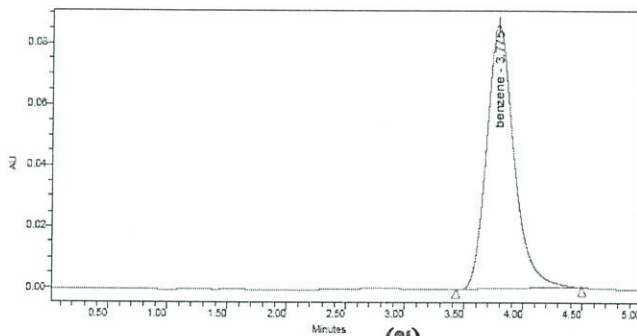
**รูปที่ 4.19** โครมาโทแกรมของ คอลัมน์ทางการค้า HiQSiC18W 5 $\mu$ m (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ข) และขนาด (250 x 4.6 mm i.d.) (ค)

จากโครมาโทแกรมของยูราซิล ลักษณะของพีคที่ได้ มีลักษณะที่เป็นหาง (tailing) เพราะไซทานอลบนพื้นผิวและในรูพรุนของซิลิกาถูกปิดปลายด้วย TMCS ได้น้อย จึงเหลือหมู่ไซทานอลเป็นจำนวนมาก เมื่อทดสอบกับสารที่มีขั้ว จึงเกิดอันตรกิริยาระหว่างสารที่ทำการทดสอบกับหมู่ไซทานอล พีคที่ได้จึงมีลักษณะที่มีหาง ดังแสดงในรูปที่ 4.19 ข และ ค ดังนั้นต้องทำปิดปลายหมู่ไซทานอลบนพื้นผิวและในรูพรุนของซิลิกาให้ได้มากที่สุด หรือ ขยายรูพรุนให้มีขนาดเพิ่มขึ้น เพื่อให้ TMCS สามารถเข้าไปปิดปลายที่ร่องไว (หมู่ไซทานอล) ในรูพรุนของซิลิกาได้ [36]

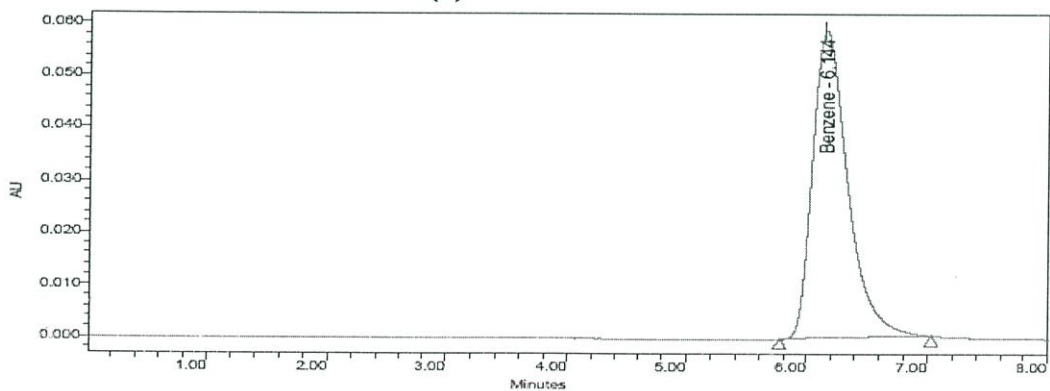
#### 4.3.2.2 สารละลายมาตรฐานเบนซีน ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



(ก)



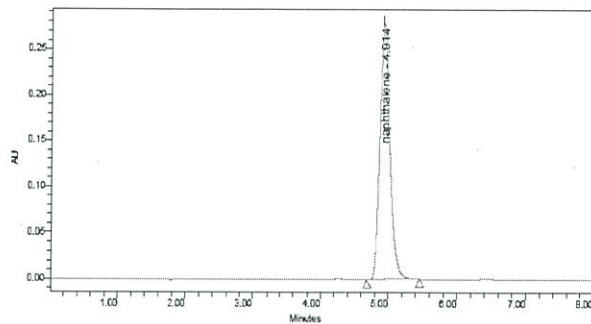
(ข)



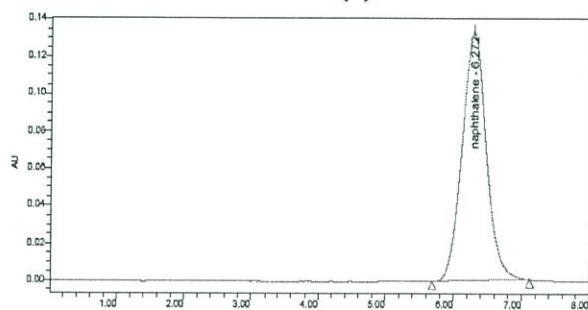
(ค)

**รูปที่ 4.20** โครมาโทแกรมของ คอลัมน์ทางการค้า HiQSiC18W 5 $\mu$ m (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ข) และขนาด (250 x 4.6 mm i.d.) (ค)

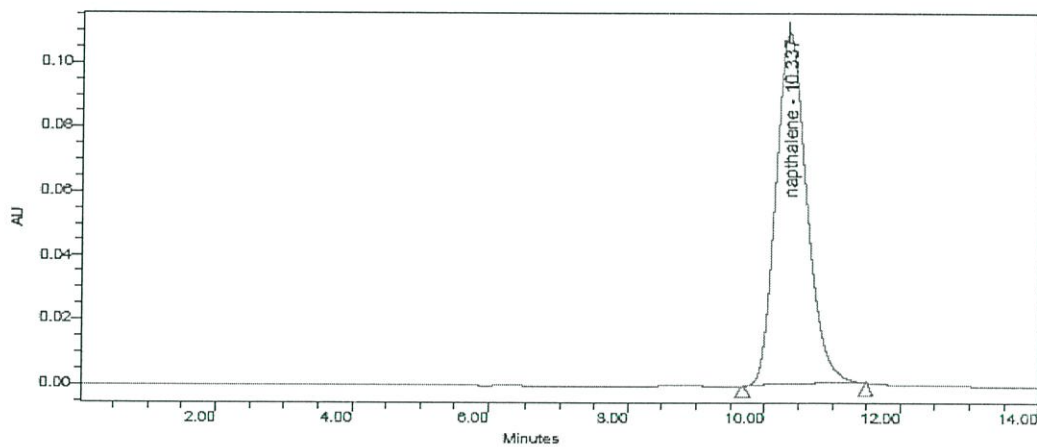
### 4.3.2.3 สารละลายมาตรฐานเนฟทาไลน์ ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



(ก)



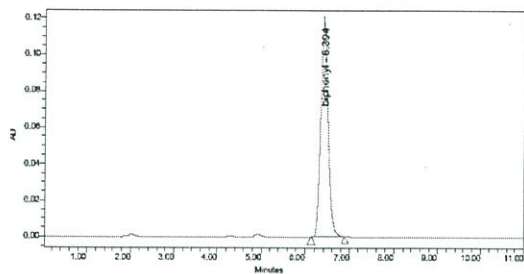
(ข)



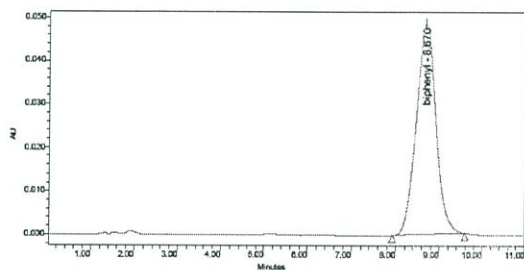
(ค)

**รูปที่ 4.21** โครมาโทแกรมของ คอลัมน์ทางการค้า HiQSilC18W 5 $\mu$ m (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ข) และขนาด (250 x 4.6 mm i.d.) (ค)

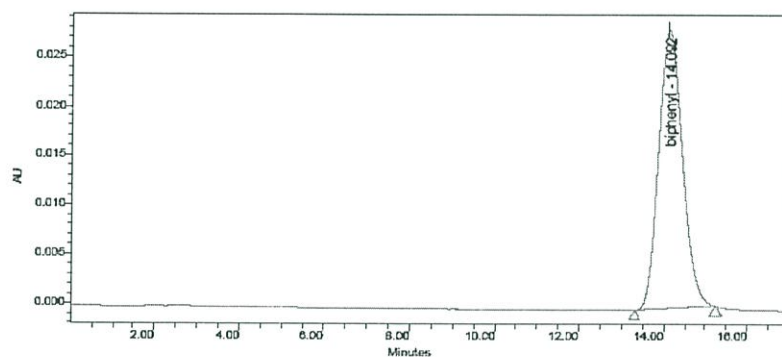
#### 4.3.2.4 สารละลายมาตรฐานไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



(ก)



(ข)

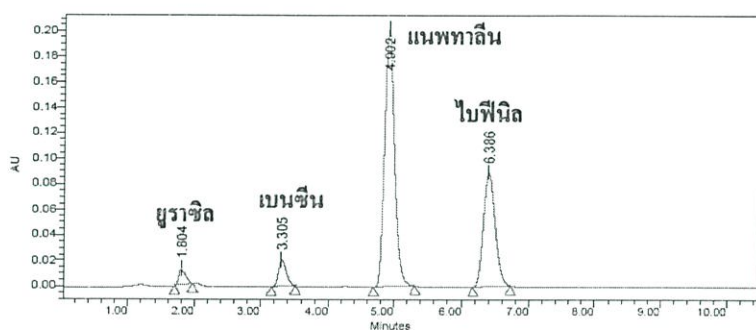


(ค)

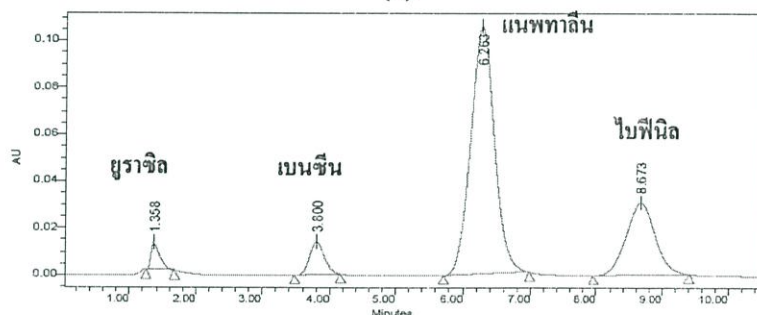
**รูปที่ 4.22** โครมาโทแกรมของ คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18W 5 $\mu$ m (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ข) และขนาด (250 x 4.6 mm i.d.) (ค)

### 4.3.3 การทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ทางโครมาโทกราฟี

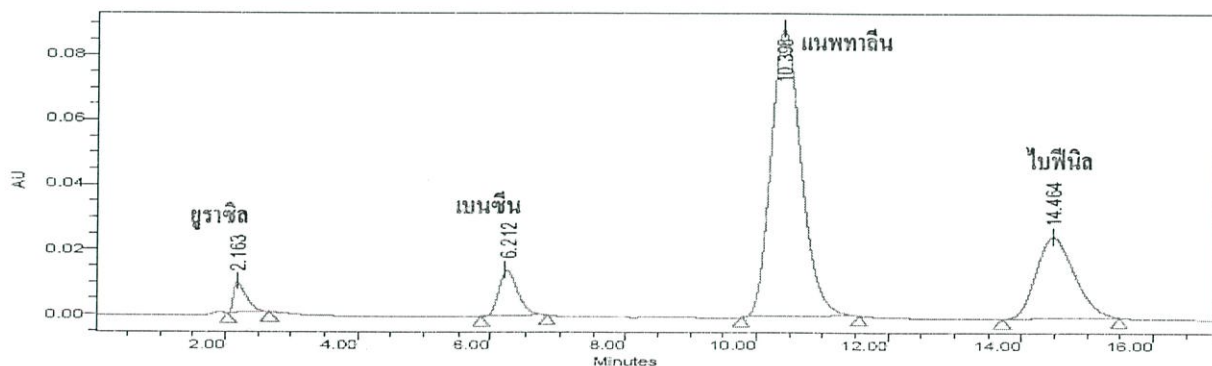
ทดสอบความสามารถในการแยก (Resolution,  $R_s$ ) แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor,  $k'$ ) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity,  $\alpha$ ) และความสมมาตรของพีค (peak asymmetry,  $A_s$ ) โดยใช้สารละลายมาตรฐานผสม 4 ชนิด คือ สารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้เฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีด 1 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยทดสอบกับคอลัมน์ 3 ชนิด คือ คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18W 5  $\mu\text{m}$  ขนาด (150 x 4.6 mm i.d.) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4.23



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 4.23 คอลัมน์ทางการค้า HiQ Sil C18W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค)

#### 4.3.3.1 ความสามารถในการแยก (Resolution, $R_s$ )

ค่าความสามารถในการแยก (Resolution,  $R_s$ ) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสาร 2 ชนิด ที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด จากโครมาโทแกรมรูปที่ 4.23 สามารถคำนวณค่าความสามารถในการแยกของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด ได้ดังแสดงในภาคผนวกที่ ณ. ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** แสดงค่าเฉลี่ยความสามารถในการแยก (Resolution,  $R_s$ ) ของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด

คอลัมน์	ค่าเฉลี่ยความสามารถในการแยก ( $R_s$ )		
	ยูราซิล - เบนซีน	เบนซีน - แนพทาลิน	แนพทาลิน - ไบฟีนิล
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	3.36	2.29	1.70
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	3.37	1.82	1.30
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	5.40	3.35	2.54

จากข้อมูล [15,16,48,49,50] ถ้าค่า  $R_s$  ของสารผสม เท่ากับ 1 แสดงว่าพีคสองพีคนั้นแยกออกจากกันได้ถึง 98 % และอีก 2% จะได้พีคที่คาบเกี่ยวกัน จัดเป็นการแยกที่ยอมรับได้และ สามารถนำมาใช้ในงานด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ แต่ถ้า  $R_s$  มีค่า  $\geq 1.5$  แสดงว่าพีคสองพีคถูกแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าค่า  $R_s$  ของคอลัมน์ทางการค้า และคอลัมน์ที่เตรียมจากงานวิจัยนี้ ขนาด 250 x 4.6 mm i.d. มีค่ามากกว่า 1.5 ซึ่งแสดงว่า คอลัมน์สามารถแยกสารผสมได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ค่า  $R_s$  ของสารชนิดอื่นมีค่ามากกว่า 1.5 ยกเว้นการแยกของพีคสองพีคระหว่างแนพทาลินกับไบฟีนิล ที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.3 ซึ่งน้อยกว่า 1.5 แต่ค่าที่ได้ก็มากกว่า 1 ซึ่งสำหรับทางเทคนิคโครมาโทกราฟียอมรับค่าดังกล่าวได้และสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ [49,50]

จากข้อมูลในตารางที่ 4.5 แสดงว่าคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยนี้ทั้ง 2 ขนาดมีความสามารถในการแยกได้ดี

#### 4.3.3.2 แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, $k'$ ) [15,16,48]

เป็นค่าที่แสดงให้ทราบว่าสารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยก ปัจจัยที่มีผลต่อค่า  $k'$  คือองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ และเฟสอยู่กับที่ คอลัมน์ที่มีค่า  $k'$  สูง แสดงว่าสารถูกยึดเหนี่ยวในคอลัมน์ได้ดี ตามปกติ  $k'$  ของตัวถูกละลายอยู่ในช่วง 1-10 [15,16,48] ผลการทดสอบคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด สามารถคำนวณค่า  $k'$  ได้ (วิธีคำนวณดัง

แสดงในภาคผนวก ญ.) และจากข้อมูลพบว่าค่า  $k'$  ของทั้ง 3 คอลัมน์ ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วง 1-10 ซึ่งแสดงว่าสาร ได้ถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ได้ดี ด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ค่า  $k'$  ของทั้ง 3 คอลัมน์ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 แต่ยกเว้น  $k'$  ของพีคสองพีค ระหว่างยูราซิลกับเบนซีน ของคอลัมน์ทางการค้า HiQsil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) มีค่าเท่ากับ 0.84 ซึ่งน้อยกว่า 1 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า ค่า  $k'$  ของคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยทั้ง 2 ขนาด มีค่าแฟกเตอร์ความจุดีกว่าคอลัมน์มาตรฐาน

**ตารางที่ 4.6** แสดงค่าเฉลี่ยแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor,  $k'$ ) ของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด

คอลัมน์	ค่าเฉลี่ยแฟกเตอร์ความจุ (Capacity factor, $k'$ )		
	เบนซีน-ยูราซิล	แนพทาลีน-เบนซีน	ไบฟีนิล-แนพทาลีน
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.)	0.84	1.73	2.56
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	1.79	3.60	5.38
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	1.88	3.81	5.69

#### 4.3.3.3 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity, $\alpha$ )

ความจำเพาะเจาะจง (selectivity,  $\alpha$ ) เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของเฟสอยู่กับที่ในการดูดซับหรือละลายตัวอย่างสองชนิด ถ้าตัวอย่างสองชนิดถูกดูดซับได้เท่ากันก็จะไม่มีความแตกต่างกันในการแยกเกิดขึ้น ดังนั้นค่า  $\alpha$  จึงเป็นการบอกความแตกต่างของค่าการคงไว้ (retention) ของพีคสองพีค ซึ่งทำให้บอกได้ว่าระบบโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพอย่างไรในการแยกตัวอย่างทั้งสองออกจากกัน ในการแยกค่า  $\alpha$  จะต้องมามีค่ามากกว่า 1 ถึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ถ้าค่า  $\alpha$  น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 แสดงว่าพีคทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีคทั้งสองมีเวลาการคงไว้ (retention time,  $t_R$ ) เท่ากัน [10,15,16]

ค่า  $\alpha$  ที่ได้จากทั้ง 3 คอลัมน์วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวกที่ ฎ. และได้ค่า  $\alpha$  ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าค่า  $\alpha$  ที่ได้มีค่ามากกว่า 1 นั่นก็แสดงว่าสารผสมสามารถแยกออกจากกันได้ดี แต่คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย ค่า  $\alpha$  ที่ได้มีค่าสูงกว่าคอลัมน์ทางการค้า จึงแสดงว่า ในการทดสอบสารกลุ่มนี้กับคอลัมน์ที่เตรียมได้มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าคอลัมน์ทางการค้า

**ตารางที่ 4.7** แสดงค่าเฉลี่ยความจำเพาะเจาะจง (selectivity,  $\alpha$ ) ค่าความสมมาตรของพีค (peak asymmetry,  $A_s$ ) ของคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด

คอลัมน์	ค่าเฉลี่ยความจำเพาะเจาะจง (selectivity, $\alpha$ )		ค่าความสมมาตรของพีค (peak symmetry, $A_s$ )		
	แนพทาลีน-เบนซีน	ไบฟีนิล-แนพทาลีน	เบนซีน	แนพทาลีน	ไบฟีนิล
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	2.06	1.48	1.00	1.17	1.13
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	2.01	1.49	1.00	1.00	1.04
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	2.03	1.49	1.13	1.08	1.17

#### 4.3.3.4 ความสมมาตรของพีค (peak asymmetry, $A_s$ )

ค่าความสมมาตรของพีค (peak asymmetry,  $A_s$ ) เป็นการวัดเกี่ยวกับการบิดเบี้ยวของพีค หรือใช้บอกว่าเป็นพีคสมมาตรหรือไม่สมมาตร ถ้า  $A_s < 1.2$  แสดงว่าพีคที่ได้จะเป็นพีคที่สมมาตร  $A_s \geq 1.2$  แสดงว่าพีคที่ได้เป็นพีคที่ไม่สมมาตรมีลักษณะเป็นหาง [5, 8, 9] ค่า  $A_s$  ของคอลัมน์ 3 ชนิด (วิธีคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ก.) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากข้อมูลพบว่าค่า  $A_s$  ของสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดที่ทดสอบกับคอลัมน์ 3 ชนิด ทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 1.2 แสดงคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิดสามารถแยกสารได้พีคที่มีความสมมาตร

## 4.4 วิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของพาราเซตามอลในยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีฟฟี)

[52]

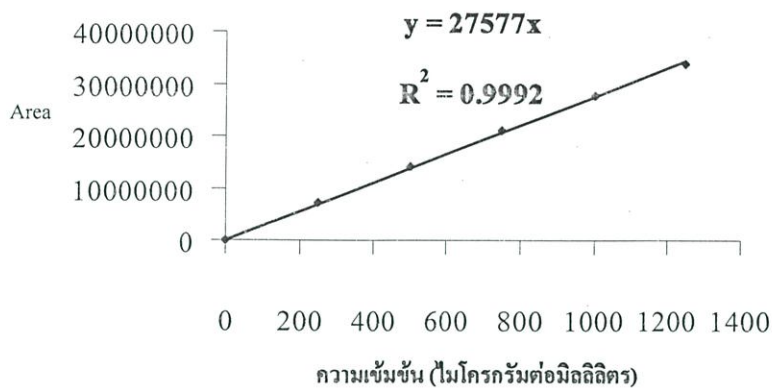
### 4.4.1 ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ค่าผลการทดสอบ ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบในตัวอย่าง ผลของความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ดี จะได้กราฟเส้นตรง ที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Regression coefficient,  $R^2$ ) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 0.999 – 0.995 แสดงว่ากราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นมีความเป็นเส้นตรง ในงานวิจัยนี้ทำการทดสอบกับคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ดังนี้ 0, 250, 500, 750, 1000 และ 1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ที่อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที, เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล-น้ำ (100:0) ตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร [52] พบว่าค่าสัมประสิทธิ์

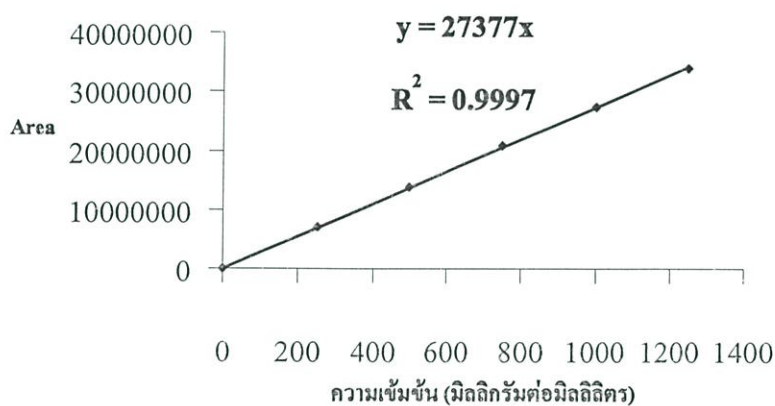
สหสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานที่ได้จาก คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. เท่ากับ 0.9992 , 0.9997 และ 0.9997 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ข้อมูลที่ได้แสดงในตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.24 กราฟสมการเส้นตรงของความสัมพันธ์เชิงเส้นของทั้ง 3 คอลัมน์ คือ  $y = 27577x$ ,  $y = 27377x$  และ  $y = 28163x$  ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.8** ข้อมูลสำหรับการพลอตกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของพาราเซตามอล (0-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d.)

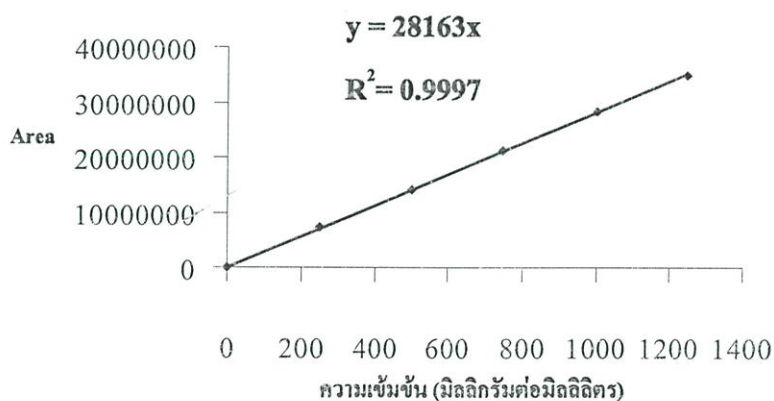
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.)			2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงาน วิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)			3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงาน วิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)		
	เวลาการคงไว้	พื้นที่พีค	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค	เวลาการคงไว้	พื้นที่พีค	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค	เวลาการคงไว้	พื้นที่พีค	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	2.69	7261561	726602	1.95	7161840	7100279	3.07	7332072	7399458
	2.69	7266042		1.95	7275848		3.07	7480829	
	2.69	7272205		1.95	6863149		3.07	7385474	
500	2.69	13524692	1460787	1.95	13893828	13785166	3.06	13986615	14228007
	2.69	14166744		1.94	13867947		3.07	14595463	
	2.69	14490925		1.95	13593724		3.07	14101943	
750	2.67	21452567	21139082	1.949	20857906	20799374	3.071	20663871	21168618
	2.67	21089997		1.949	20640777		3.071	21374940	
	2.67	20874684		1.949	20899440		3.069	21467043	
1000	2.68	26398091	27639523	1.95	27275378	27468939	3.07	28163588	28359653
	2.69	28700701		1.95	27394581		3.07	27915089	
	2.69	27819778		1.95	27736860		3.07	29600284	
1250	2.68	33570983	33964081	1.95	31796581	33899048	3.07	34416776	34889441
	2.68	34750279		1.95	33050221		3.08	35571415	
	2.68	33570983		1.95	36850342		3.07	34680134	



(ก)



(ข)



(ค)

**รูปที่ 4.24** กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ความเข้มข้น 0-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากคอลัมน์ทางการค้า HiQsil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค)

#### 4.4.2 ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)

การทดสอบตัวอย่างที่เติมสารที่รู้ค่าสารที่เราสนใจจะตรวจวิเคราะห์ (analyte) ในปริมาณที่รู้ค่าแน่นอนลงในตัวอย่าง (spiked sample) แล้วหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบความถูกต้องหรือความแม่นยำ (accuracy) ในการวิเคราะห์ ซึ่งในที่นี้จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล ใน ตัวอย่าง 2 ชนิด คือ ยาลดไข้บรรเทาปวด (ทิฟฟี) และ ยาลดไข้บรรเทาปวด (ทิฟฟี) ที่เติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล (spiked sample)

ทำการทดสอบกับคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด คือ คอลัมน์ทางการค้า HiQSiL C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และคอลัมน์ที่เตรียมได้ 2 ชนิด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. ใช้สภาวะเหมือนกันกับทดสอบความสัมพัทธ์เชิงเส้น ทำซ้ำ 3 ครั้ง ร้อยละการคืนกลับที่ได้เท่ากับ 95.78, 98.04 และ 98.76% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 (วิธีคำนวณดังแสดงในภาคผนวก จ.) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (98-105%)

**ตารางที่ 4.9** แสดงข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในตัวอย่างยาลดไข้บรรเทาปวด (ทิฟฟี) และ ค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)

คอลัมน์	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค ตัวอย่างยา (ทิฟฟี)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค ตัวอย่างยา (ทิฟฟี) + สารละลาย มาตรฐานพาราเซตามอล	ร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSiL C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	17556327	20981242	95.78
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	16559967	20390918	98.04
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	17573.730	21429711	98.76

#### 4.4.3 ทดสอบความเที่ยง (Precision)

ความเที่ยง (Precision) เป็นค่าที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของผลการทดสอบที่ทำการทดสอบซ้ำหลายครั้ง โดยทั่วไปประเมินได้ด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, % RSD) ทดสอบโดย ฉีดสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซ้ำ 7 ครั้ง ใช้สภาวะการทดลองเหมือนกับทดสอบความสัมพัทธ์เชิงเส้น กับคอลัมน์ทั้ง 3 ชนิด คือ คอลัมน์ทางการค้า HiQSiL C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และคอลัมน์ที่เตรียมได้ 2 ชนิด คือ 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d พบว่า % RSD ที่ได้เท่ากับ 1.05, 1.31 และ 1.51 ตามลำดับ (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ข.) ข้อมูลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.10 จากนั้นประเมินความเที่ยงโดยใช้ Horwitz equation ค่า

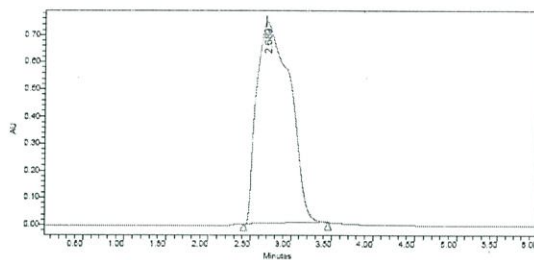
Horrat ที่ได้เท่ากับ 1.18, 1.47 และ 1.70 ตามลำดับ (วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ท.) ค่าที่ได้มีน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงว่าคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยมีความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ดี

**ตารางที่ 4.10** แสดงข้อมูลการทดสอบความเที่ยง (Precision) ของคอลัมน์ 3 ชนิด

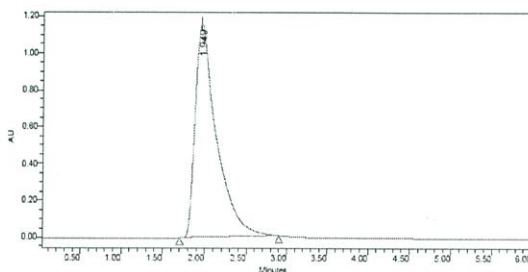
คอลัมน์	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ที่ค		
	ละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 750 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซ้ำ 7 ครั้ง	% RSD	Horrat
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	21232829	1.05	1.18
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	20877033	1.31	1.47
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	21261277	1.51	1.70

#### 4.4.4 โครมาโทแกรมการที่ใช้ในคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) และ ความเที่ยง (Precision)

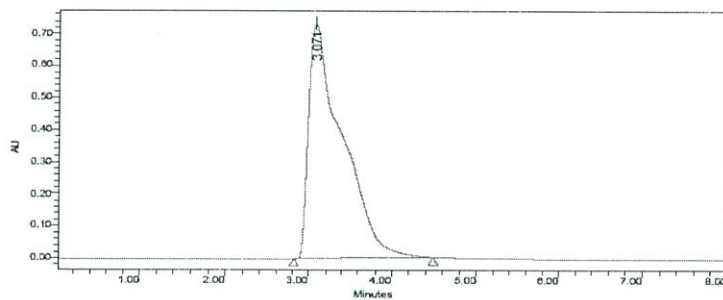
4.4.4.1 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



(ก)



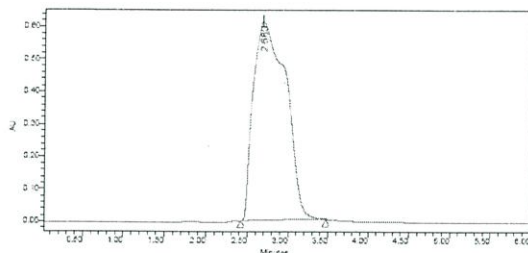
(ข)



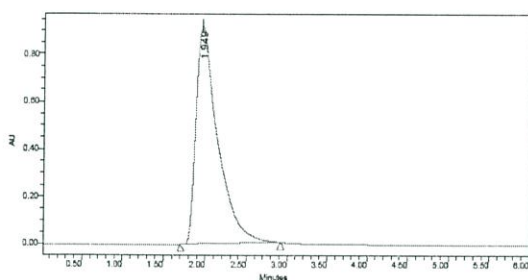
(ค)

**รูปที่ 4.25** โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ของคอลัมน์ HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียม ได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค)

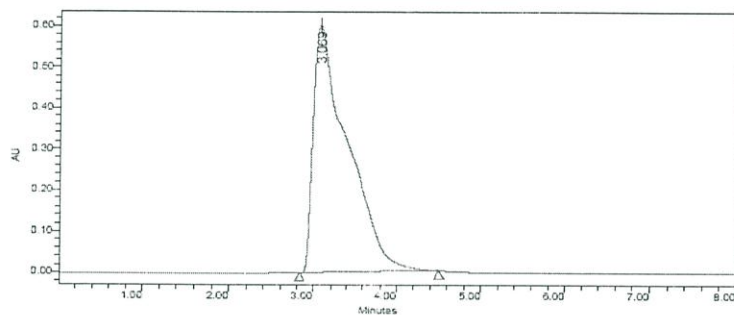
4.4.4.2 ลักษณะโครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสารละลายพาราเซตามอลในยา  
ลดไข้บรรเทาปวด (ทีพีพี)



(ก)



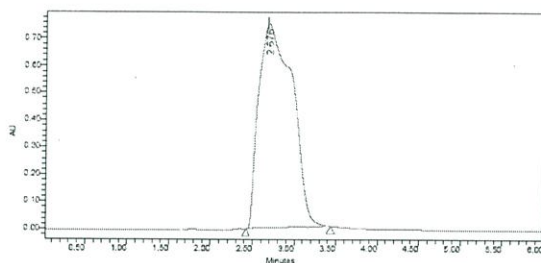
(ข)



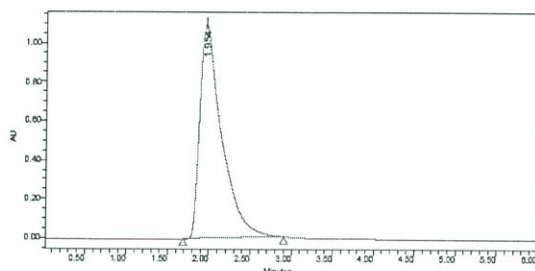
(ค)

**รูปที่ 4.26** โครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสารพาราเซตามอลในยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีพีพี) ของคอลัมน์ HiQSil C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค)

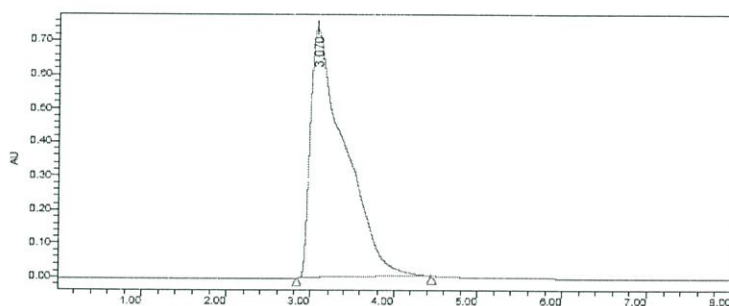
4.4.4.3 ลักษณะโครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสารละลายพาราเซตามอล  
ในยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีฟพี) ที่เติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล (spiked sample)



(ก)



(ข)



(ค)

**รูปที่ 4.27** โครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสารพาราเซตามอลในยาลดไข้บรรเทาปวด (ทีฟพี) ที่เติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล (spiked sample) ของคอลัมน์ HiQSi1 C18W ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. (ก) คอลัมน์ที่เตรียม ได้จากงานวิจัย 2 ขนาด คือ 150 x 4.6 mm i.d. (ข) 250 x 4.6 mm i.d. (ค)

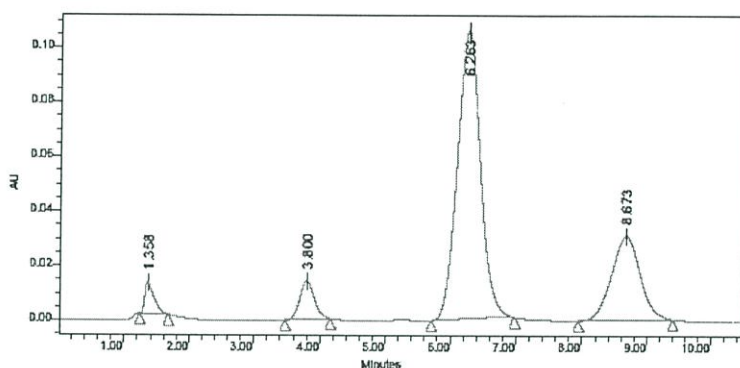
**4.4.5 ทดสอบการเก็บรักษาคอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d.**

หลังจากการเก็บรักษาคอลัมน์ไว้ในระบบเมทานอลเป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งเป็นระบบพื้นฐานทั่วไปของการเก็บรักษาคอลัมน์ Silica-ODS หรือ C-18 แล้วนำมาตรวจสอบกับสารละลายมาตรฐานผสม 4 ชนิด คือสารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลิน และ ไบฟีนิล ความ

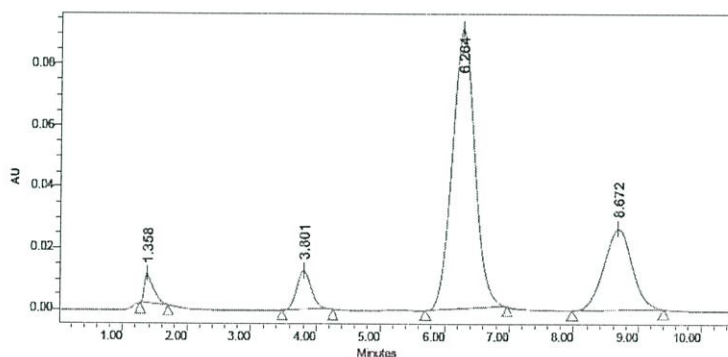
เข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้เฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร ต่อนาที ปริมาตรในการฉีด 1 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กับ คอลัมน์ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ได้ค่าเฉลี่ยเวลาการคงไว้ ( $t_r$ ) ของสารละลายมาตรฐาน 4 ชนิด เท่ากับ 1.36, 3.80, 6.26 และ 8.67 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.28 ซึ่งค่าเฉลี่ย ( $t_r$ ) เดิมของ สารละลายมาตรฐานผสมก่อนที่จะเก็บไว้ในระบบสารละลายเมทานอล เท่ากับ 1.36, 3.80, 6.26 และ 8.67 ตามลำดับ

จากข้อมูลจะเห็นว่า การวิเคราะห์ทั้งสองครั้ง คือ ก่อนที่จะเก็บคอลัมน์ไว้ในระบบเมทานอล และเก็บไว้ในระบบเมทานอลนาน 1 เดือน เมื่อนำคอลัมน์มาวิเคราะห์กับสารละลายมาตรฐานผสม 4 ชนิด พบว่าค่าเวลาการคงไว้ ( $t_r$ ) ของสารทั้ง 4 ชนิดไม่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อไม่มีการใช้งาน คอลัมน์จึงสามารถเก็บรักษาคอลัมน์ไว้ในระบบเมทานอลได้ เช่นเดียวกับคอลัมน์ C-18 ทางการค้า ทั่วไป

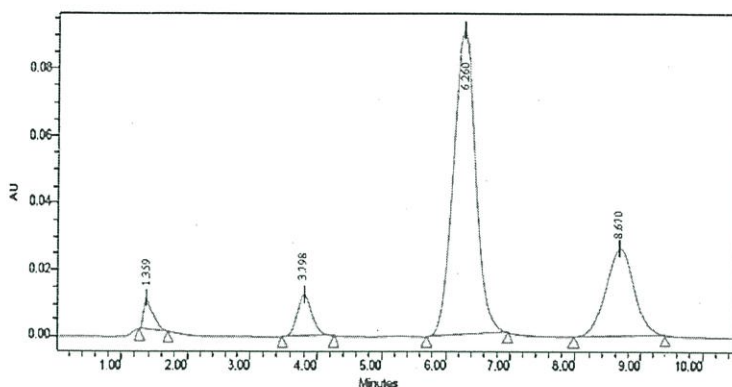
#### 4.4.6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม ทดสอบกับคอลัมน์ที่เก็บรักษาไว้ในระบบเมทานอลนาน 1 เดือน



(ก)



(ข)



(ก)

**รูปที่ 4.28** โครมาโทแกรมคอลัมน์ทางการค้าที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)

เก็บรักษาไว้ในระบบเมทานอลนาน 1 เดือน ฉีดสารครั้งที่ 1 (ก)

ฉีดสารครั้งที่ 2 (ข) ฉีดสารครั้งที่ 3 (ค)

#### 4.5 ทดสอบระบบการบรรจุคอลัมน์

บรรจุคอลัมน์ ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. สองครั้ง เมื่อทดสอบหาค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) โดยใช้สถานะในการทดสอบเหมือนกับการบรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 1 ค่า H ของการบรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 1 และ 2 เท่ากับ 0.00470 และ 0.00498 cm ตามลำดับ วิธีการคำนวณดังแสดงในภาคผนวก ค. อัตราการไหลที่เหมาะสมที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.40 และ 0.35 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้พบว่าค่า H ที่ได้จากการบรรจุคอลัมน์ทั้งสองครั้งมีความใกล้เคียงกัน

น้ำหนักของสารที่ใช้ในการบรรจุ ครั้งที่ 1 และ 2 หลังจากนำสารออกจากคอลัมน์ ปล่อยให้แห้ง ชั่งน้ำหนักได้เท่ากับ 2.5542 และ 2.4996 กรัม ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักของสารที่ใช้ในการบรรจุครั้งที่ 1 และ 2 แตกต่างกัน 0.0546 กรัม

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้เตรียมซิลิกาที่มีอนุภาคทรงกลม จากเกลบข้าวโดยควบคุมขนาดอนุภาคด้วยระบบไมเซลล์ และศึกษาปริมาณสูงสุดที่เป็นไปได้ของสารออกทะเลคซิลไตรคลอโรไซเลน (octadecyltrichlorosilane, ODS) ที่ใช้ในการสร้างพันธะและปริมาณสูงสุดที่เป็นไปได้ของไตรเมทิลคลอโรไซเลน (trimethylchlorosilane, TMCS) ที่ใช้ในการปิดปลายหมู่ว่องไวที่เหลือ (end capping) จากการทดลองทำการสร้างพันธะด้วย ODS ซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าปริมาณสูงสุดที่เป็นไปได้ของ ODS เท่ากับ  $5.51 \times 10^{-3}$  กรัม ต่อ ซิลิกา 1 กรัม และ TMCS เท่ากับ  $4.18 \times 10^{-3}$  กรัม ต่อซิลิกา 1 กรัม

จากนั้นบรรจุ Silica-ODS ที่ ปิดปลายที่ว่องไว ด้วย TMCS ลงในคอลัมน์ HPLC ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d. ทดสอบคุณสมบัติทางโครมาโทกราฟี พบว่า

คอลัมน์ทางการค้า HiQsil C18W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐานไบฟีนิล 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือสารละลายผสม เมทานอล - น้ำ (80:20) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีด 1 ไมโครลิตร ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) เท่ากับ 0.00183 cm ที่อัตราการไหลที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเมื่อนำมาวิเคราะห์และแยกสารละลายผสมที่ประกอบด้วยสารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้สภาวะทดสอบเหมือนกับการหาค่า H พบว่า เวลาของการคงไว้ ( $t_R$ ) ของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 1.80, 3.31, 4.91 และ 6.40 นาที ตามลำดับ ค่าความสามารถในการแยก ( $R_S$ ) ระหว่าง ยูราซิล - เบนซีน เท่ากับ 3.34 เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 2.28 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 1.70 ค่าแฟกเตอร์ความจุ ( $k'$ ) ระหว่าง ยูราซิล - เบนซีน เท่ากับ 1.02 เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 1.72 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 2.49 ค่าความจำเพาะเจาะจง ( $\alpha$ ) เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 1.69 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 1.48 และค่าความสมมาตรของพีค ( $A_S$ ) ของ เบนซีน เท่ากับ 1.00 แนพทาลีน เท่ากับ 1.17 ไบฟีนิล เท่ากับ 1.14

จากนั้นนำไปประยุกต์ใช้งานวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลในยาทางการค้า โดยทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) กับสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น ต่างๆ ดังนี้ 0, 250, 500, 750, 1000 และ 1250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรที่ฉีด 5 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ที่อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที, เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล-น้ำ (100:0) ตรวจวัดที่ 254 นาโนเมตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เท่ากับ 0.9992 ใช้สภาวะการทดสอบเหมือนกับการหาค่า

$R^2$  ทำการทดสอบ โดยเติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample) ได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) เท่ากับ 95.78 % และจากการตรวจวัดซ้ำสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลความเข้มข้น 750 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 7 ครั้ง ค่า % RSD เท่ากับ 1.05

คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. ทำการบรรจุคอลัมน์ซ้ำ 2 ครั้ง ได้ค่า H เท่ากับ 0.00470 และ 0.00498 cm ตามลำดับ ที่อัตราการไหลที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อน 0.4 และ 0.35 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และนำมาวิเคราะห์และแยกสารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ( $t_R$ ) ของสารแต่ละชนิด เท่ากับ 1.36, 3.80, 6.26 และ 8.67 นาที ตามลำดับ ค่า  $R_s$  ระหว่าง ยูราซิล - เบนซีน เท่ากับ 3.37 เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 4.01 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 1.30 ค่า  $k'$  ระหว่าง ยูราซิล - เบนซีน เท่ากับ 2.44 เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 3.61 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 5.39 ค่าเบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 1.48 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 1.49 และ ค่า  $A_s$  ของเบนซีน 1.00 เท่ากับ แนพทาลีน เท่ากับ 1.00 และไบฟีนิล เท่ากับ 1.04

จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลด้วยสถานะ HPLC เช่นเดียวกับทางการค้า พบว่าได้ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9997 ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) เท่ากับ 98.04 % และ % RSD เท่ากับ 1.31 นอกจากนี้ยังทดสอบการเก็บรักษาคอลัมน์ไว้ในระบบเมทานอล วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล เวลาของการคงไว้ (retention time,  $t_R$ ) ที่ได้ไม่แตกต่างกัน

คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย ขนาด 250 x 4.6 mm i.d. ได้ค่า H เท่ากับ 0.00640 และ 0.30 มิลลิลิตรต่อนาที นำมาวิเคราะห์และแยกสารละลายมาตรฐานผสมยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ( $t_R$ ) ของสารแต่ละชนิด เท่ากับ 2.61, 6.21, 6.26, 10.40 และ 14.46 นาที ตามลำดับ  $R_s$  ระหว่าง ยูราซิล - เบนซีน เท่ากับ 5.40 เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 3.22 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 2.43 ค่า  $k'$  ระหว่าง ยูราซิล - เบนซีน เท่ากับ 1.87 เบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 3.80 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 5.69 ค่า  $\alpha$  ระหว่างเบนซีน - แนพทาลีน เท่ากับ 2.03 และ แนพทาลีน - ไบฟีนิล เท่ากับ 1.49 และ ค่า  $A_s$  เบนซีน 1.13 เท่ากับ แนพทาลีน เท่ากับ 1.08 ไบฟีนิล เท่ากับ 1.17

จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลด้วยสถานะ HPLC เช่นเดียวกับทางการค้า พบว่าได้ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9997 ร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) เท่ากับ 98.76 % และ % RSD เท่ากับ 1.70

สรุปได้ว่าจากการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ของคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย ทั้งสองขนาด ค่าของพารามิเตอร์ทุกค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ดี ดังนั้นจึงสามารถนำคอลัมน์ไปประยุกต์ใช้งานกับการวิเคราะห์ตัวอย่างได้จริง

จากผลการวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยต่อไป คือ ต้องปรับปรุงขนาดของรูปทรงซิลิกาให้มีขนาดเพิ่มขึ้น เพื่อลดปัญหาของการถ่ายโอนมวลสารในรูปของอนุภาค และปรับปรุงขนาดอนุภาคซิลิกาให้มีความสม่ำเสมอเท่ากัน เพื่อลดการกระจายตัวของขนาดอนุภาค และจากการทดสอบคอสม์ที่เตรียมขึ้นได้ในงานวิจัยนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์ตัวอย่างได้จริง ดังนั้น ควรทดลองนำไปประยุกต์กับงานวิเคราะห์ตัวอย่างอื่น ๆ เพิ่มขึ้น และทำการทดสอบความใช้ได้ (validation)

## บรรณานุกรม

- [1] J. Nawrocki, **“The silanol group and its role in liquid chromatography,”** J. Chromatogr. A, vol. 779, pp. 29-71, 1997.
- [2] R.E. Majors, **“The cleaning and regeneration of reversed-phase HPLC columns,”** LC.GC Europe, vol. 16, pp. 404-409, 2003.
- [3] R.J.M. Vervoort, et al., J. Chromatogr. A, vol. 779, pp. 29-71, 1997. **“The silanol group and its role in liquid chromatography,”** J. Chromatogr. A, vol. 897, pp. 1-22, 2000.
- [4] L. Sierra and J.-L. Guth, **“Synthesis of mesoporous silica with tunable pore size from sodium silicate solutions and a polyethylene oxide surfactant,”** Micro. And Meso. Mater., vol. 27, pp. 243-253, 1999.
- [5] L. Sierra, B. Lopez and J.-L. Guth, **“Preparation of mesoporous silica particles with controlled morphology from sodium silicate solutions and a non-ionic surfactant at pH values between 2 and 6,”** Micro. And Meso. Mater., vol. 39, pp. 519-527, 2000.
- [6] ศิริลักษณ์ เกิดศิริ **“การเตรียมอนุภาคที่ใช้ในทางโครมาโทกราฟีจากเถ้าแกลบโดยใช้กรดตะกอนในระบบไมเซลล์,”** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2548
- [7] D. Jedsadapattarakul., **“Production of high purity silica from rice husk as a solid support for HPLC and GC,”** Thesis for degree of master of science in chemistry, King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang, 2004.
- [8] M. Prassas, **Silica Glass from Aerogels.** [Online]. Available : <http://www.solgel.com/articles/apri/01/aerog1.htm>.
- [9] D.J. Sunseri, **“Synthetic strategies to improve silica-based stationary phases for reversed-phase liquid chromatography,”** Thesis for degree of doctor of philosophy in chemistry, Florida state university, 2003.
- [10] L.R. Snyder, J.J. Kirkland and J.L. Glajch, **Practical HPLC Method Development.** 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1997.
- [11] J.J. Pesek and M.T. Matyska, **Solid Phase Extraction.** New York: Simson (Ed.) Inc., 2000.

- [12] ทศนิธร ชื่นประทุม **“สมดุลเคมีในสารละลายไมเซลล์”** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2548
- [13] T. Hargreaves, **Surfactant**. [Online]. Available : [http://www.Rutgers.edu/~huskey/10/\\_ec.html](http://www.Rutgers.edu/~huskey/10/_ec.html).
- [14] U Rangsattong, **Solubility Enhance**. [Online]. [pharm.kku.ac.th/thaiv/depart/techno/basicpharm/downloads/Lesson3.pdf](http://pharm.kku.ac.th/thaiv/depart/techno/basicpharm/downloads/Lesson3.pdf)
- [15] คณิตา ตั้งคณานุรักษ์ **“เทคนิคการแยกสารเคมี”** โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2540
- [16] ชุติมา ศรีวิบูลย์ **“การวิเคราะห์โดยเครื่องมือโครมาโทกราฟี”** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2546
- [17] Adelaide University, **Chromatographic Resolution**. [Online]. Available : <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/.../resolution1.htm>.
- [18] พวงแก้ว ถิ่นทินพร **“ความรู้พื้นฐานทางลึควิดโครมาโทกราฟี”** โครงการตำรา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540
- [19] K.Yip, **Types of Chromatography**. [Online]. Available : [http://www.Rpi.edu/.../CHROMA/be\\_types.htm](http://www.Rpi.edu/.../CHROMA/be_types.htm).
- [20] E. Katz, R. Eksteen, P. Schoenmakers and N.Miller., **Chromatographic Science Series: Handbook of HPLC vol.78**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998.
- [21] M. Mesa, B.Lopez, A.Ramirez and J.L. Guth, **“Preparation of micron sized spherical particles of mesoporous silica rom atriblock copolymer surfactant usable as astationary phase for liquid chromatography,”** J. of Solid state sciences, vol. 5, pp. 1303-1308, 2003.
- [22] J. Esquena, R. Pons, N. Azemar, J. Caelles and C. Solans, **“Preparation of monodisperse silica particles in emulsion edia,”** Colloids Surfaces, vol. 123-124, pp. 575-586, 1997.
- [23] R. Lindberg, J. Sjoblom and G. Sundholm, **“Preparation of silica particles utilizing the sol-gel and the emulsion-gel process,”** Colloids Surfaces, vol. 99, pp. 79-88, 1995.
- [24] T.-H. Liou, **“Preparation and characterization of nano-structured silica from rice husk,”** J. Mater. Sci., vol. A364, pp. 313-323, 2004.
- [25] J. Hyung Park, C. Oh and S. Seung, **“Preparation hollow silica microsphere in W/O emulsion with polymers,”** J. Colloid Interface Sci., vol. 266, pp. 107-114, 2003.

- [26] J. David Sunseri, William T. Cooper and John G. Dorsey, **“Reducing residual silanol interactions in reversed-phase liquid chromatography, Thermal treatment of silica before derivatization,”** J. Chromatogr. A, vol. 1011, pp. 23-29, 2003.
- [27] S. Ek, A. Root, M. Peussa and L. Niinisto, **“Determination of the hydroxyl group content in silica by thermogravimetry and a comparison with <sup>1</sup>H MAS NMR results,”** Thermochemica Acta, vol. 379, pp. 201-212, 2001.
- [28] Neil D. Danielson and J.J. Kirkland, **“Synthesis and characterization of 2- $\mu$ m Wide-Pore Silica Microspheres as Column Packings for the Reversed-Phase Liquid Chromatography of Peptides and Proteins,”** Anal. Chem., Vol. 59, pp. 2501-2506, 1987.
- [29] Kevin D. Wyndham, John E. Ogara and Thomas H. Walter, **Characterization and Evaluation of C<sub>18</sub> HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/inorganic Particles,”** Anal. Chem., Vol. 75, pp. 6781-6788, 2003.
- [30] Y. Sudo, **“End-capping of octadecylsilylated silica gels by high-temperature silylation,”** J. Chromatogr. A, vol. 737, pp. 139-147, 1996.
- [31] Joseph J. Pesek, Maria T. Matyska and Raymond J. Yu, **“Synthesis and characterization of endcapped C<sub>18</sub> stationary phase using a silica hydride intermediate,”** J. Chromatogr. A, vol. 974, pp. 195-203, 2002.
- [32] O. Mitsuyoshi, **“Effect of silanol groups on heat-treated silicas by calcinations and retention behaviour in high-performance liquid chromatography,”** J Chromatogr., vol. 556, pp. 407-414, 1991.
- [33] L. Sierra and J.-L. Guth, **“Synthesis of mesoporous silica with tunable pore size from sodium silicate solutions and a polyethylene oxide surfactant,”** Micro. And Meso. Mater., vol. 27, pp. 243-253, 1999.
- [34] L. Sierra, B. Lopez and J.-L. Guth, **“Preparation of mesoporous silica particles with controlled morphology from sodium silicate solutions and a non -ionic surfactant at pH values between 2 and 6,”** Micro. And Meso. Mater., vol. 29, pp. 519-527, April 2000.
- [35] K. Jones, **“Optimization procedure for the silanisation of silicas for reversed-phase High Performance Liquid Chromatography,”** J. Chromatogr., vol. 392, pp.1-10, 1987.

- [36] R.A. Mayers, **ENCYCLOPEDIA OF ANALYTICAL CHEMISTRY: Applications Theory and Instrumentation**. UK: Jonh Wiley & Sons, Ltd., 2000.
- [37] J. Nawrocki, **"The silanol group and its role in liquid chromatography,"** J. Chromatogr. A, vol. 779, pp. 29-71, 1997.
- [38] M.A. Ramos, M.H. Gil, E. Schacht, G. Matthys, W. Mondelaers and M.M. Figueiredo, **"The silanol group and its role in liquid chromatography,"** Powder Techno. vol. 99, pp. 79-85, 1998.
- [39] A.M. Faria, D.R. Magalhaes, K.E. Collins and C.H. Collins, **"Characterization of zirconized silica support for HPLC,"** Anal. Chim Acta, vol. 550, pp. 137-143, August 2005.
- [40] K.M.S.Khalil, L.A.Elkabee and B.Murphy, **"Formation and characterization of different ceria/silica composite materials via dispersion of ceria gel or soluble ceria precursors in silica sols,"** Colloid Interface Sci., vol. 287, pp. 534-541, April 2005.
- [41] U. Kalapathy, A. Proetor and J. Shultz **"An improved method for production of silica from rice hull ash,"** Bioresource Techno. vol. 85, pp. 285-289, 2002.
- [42] R.E. Majors, **"The silanol group and its role in liquid chromatography,"** J. Chromatog. Sci, vol. 12, pp. 767-778, 1974.
- [43] A. Sandi, M. Nagy and L. Szepesy, **"Characterization of reversed-phase columns using the linear free energy relationship: III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition,"** J. Chromatogr. A, vol. 839, pp. 215-234, 2000.
- [44] C.R. Silva, S. Bachmann, R. Robelo, et al., **"Preparation of a new C<sub>18</sub> stationary phase containing embedded urea group for use in high-performance liquid chromatography,"** J. Chromatogr. A, vol. 948, pp. 85-95, 2002.
- [45] M.C. McMaster., **HPLC A Practical User's Guide**. New York: VCH Publishers, Inc., 1994.
- [46] K.B. Sentell, K.W. Barnes and J.G. Dorsey **"Ultrasound driven synthesis of reversed-phase stationary phases for liquid chromatography using 4-Dimethyl aminopyridne as acid -acceptor,"** J. Chromatogr., vol. 455, pp. 95-104, 1988.
- [47] A. Braithwaite, F.J. Smith, **Chromatographic Method**. 5<sup>nd</sup> ed. London: Champman & Hall, 1996

- [48] W.J. Lough and I.W. Wainer, **High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice**. London: Chapman & Hall, 1996.
- [49] E. Pungor, **A Practical Guide to Instrumental Analysis**. Florida: CRC Press Inc. 1995.
- [50] P.A. Sewell and B. Clarke, **Chromatographic Separations : Analytical Chemistry by Open Learning**. Singapore: John Wiley & Sons (SEA)Pte Ltd., 1991.
- [51] F.W. Fifield and D. Kealey, **Principle and Practice of Analytical Chemistry**. 4<sup>nd</sup> ed. London: Chapman & Hall, 1995.
- [52] AOAC Peer verified method program. **“Manual on policies and procedures”**, AOAC International Arlington, VA, USA. 1993.

**ภาคผนวก**

**ภาคผนวก ก.**

**การคำนวณปริมาณไตรเมทิลคลอโรไซเลน (Trimethylchlorosilane, TMCS)**

**ในการสร้างพันธะกับไซทานอลบนพื้นผิวซิลิกา**

จากงานวิจัย [35] ซิลิกาที่ผ่านการให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 120-400 °C จะมีหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา 4.6 หมู่ต่อตารางนาโนเมตร ทั้งนี้จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวอาจจะมีมากกว่าหรือน้อย 4.6 หมู่ ขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวและขนาดรูพรุนของซิลิกาชนิดนั้น

ดังนั้นจึงกำหนดหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาเท่ากับ 4.6 หมู่ต่อตารางนาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณ TMCS ที่ใช้ในการสร้างพันธะกับไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา ซึ่งซิลิกาที่ได้จากแกลบข้าวควบคุมอนุภาคด้วยระบบไมเซลล์มีพื้นที่ผิว 1270.79 m<sup>2</sup>/g

### คำนวณปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา

พื้นที่ผิว 1 ตารางนาโนเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เท่ากับ 4.6 หมู่

ถ้าพื้นที่ผิว 1270.79 x 10<sup>18</sup> ตารางนาโนเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เท่ากับ  $\frac{1270.79 \times 10^{18} \times 4.6}{1}$  หมู่

∴ พื้นที่ผิว 1270.79 x 10<sup>18</sup> ตารางนาโนเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เท่ากับ 5845.634 x 10<sup>18</sup> หมู่

### คำนวณจำนวนโมลของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา

จำนวน โมลของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ  $\frac{(-OH \text{ บนพื้นผิวซิลิกา}) \text{ หมู่}}{6.02 \times 10^{23}}$

จำนวน โมลของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ  $\frac{5845.634 \times 10^{18} \text{ หมู่}}{6.02 \times 10^{23}}$

∴ จำนวน โมลของหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา (-OH) เท่ากับ 971.04 x 10<sup>-5</sup> โมล

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง TMCS กับหมู่ไฮดรอกซิลบนซิลิกา 1 กรัม คือ 1:1 ดังนั้นปริมาณของ TMCS สามารถคำนวณได้ดังนี้

ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ  $\frac{(\text{จำนวน โมลของหมู่-OH บนพื้นผิวซิลิกา} \times F.W._{TMCS})}{1}$

ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ  $\frac{(971.04 \times 10^{-5} \text{ โมล} \times 108.64 \text{ กรัมต่อโมล})}{1}$

ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ  $(971.04 \times 10^{-5} \text{ โมล} \times 108.64)$

∴ ปริมาณ TMCS (กรัม) เท่ากับ 1.057 กรัม หรือ  $9.70 \times 10^{-3}$  โมล

ดังนั้นปริมาณ TMCS (100%) ที่ใช้ในการสร้างพันธะกับซิลิกามีเท่ากับ  $9.70 \times 10^{-3}$  โมล ต่อซิลิกา 1 กรัม

**ภาคผนวก ข.**

**การคำนวณหาปริมาณหมู่ไซทานอดบนพื้นผิวซิลิกาที่สร้างพันธะกับ TMCS**

จากข้อมูลการใช้เทคนิค TGA พบว่า % carbon loading ที่ได้ของการทำปฏิกิริยา Silica-TMCS (ครั้งที่ 1) และ ทำปฏิกิริยาซ้ำ (ครั้งที่ 2) เท่ากับ 5.72 และ 5.76 % ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาที่เกิดปฏิกิริยากับ TMCS ได้ โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้ [26, 35, 46]

$$\alpha = \frac{\% C x 10^6}{12 . 011 n_c S \left[ 100 - \left( \frac{\% C}{12 . 011 x n_c} \right) (M - 35 . 5) \right]}$$

โดยที่  $\alpha$  จำนวนพันธะที่ครอบคลุม (bonding coverage) (ไมโครโมลต่อตารางเมตร)

% C % carbon loading เท่ากับ 5.76 %

$n_c$  จำนวนของคาร์บอนอะตอมต่อ 1 โมลของไฮดรอกซิล เท่ากับ 3 อะตอม

S พื้นที่ผิว  $m^2/g$  เท่ากับ  $1270.79 m^2/g$

35.5 น้ำหนักของคลอรีน

แทนค่าลงในสูตร จะได้

$$\alpha = \frac{5.76 x 10^6}{12 . 01 x 3 x 1270 . 79 \left[ 100 - \left( \frac{5.76}{12 . 01 x 3} \right) (73 . 12 - 35 . 5) \right]}$$

ดังนั้นจำนวนพันธะที่ครอบคลุม (bonding coverage,  $\alpha$ ) เท่ากับ  $3.35 x 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร จึงแสดงว่าจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่ทำปฏิกิริยากับ TMCS เท่ากับ  $3.35 x 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร

หมายเหตุ ในการคำนวณเลือกใช้ค่า %C ของการสร้างพันธะซ้ำครั้งที่ 2 คือ 5.76 % เพราะให้ค่า %C มากกว่าครั้งแรก

**ภาคผนวก ค.**

**การคำนวณปริมาณออกทะเลคซิลไทรคลอโรไซเลน  
(Octadecyltrichlorosilane, ODS) ในการสร้างพันธะกับซิลานอลบนพื้นผิวซิลิกา**

จากการนำซิลิกาไปสร้างพันธะกับ TMCS ทำให้สามารถประมาณการหาจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาที่ถูกสร้างพันธะด้วย TMCS ได้ ซึ่งจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่คำนวณได้ ในภาคผนวก ข. เท่ากับ  $3.35 \times 10^{-8}$  โมลต่อตารางเมตร พื้นผิวซิลิกา  $1270.79 \text{ m}^2/\text{g}$

$$\begin{aligned} \text{พื้นที่ผิว 1 ตารางเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เท่ากับ} & \quad 3.35 \times 10^{-8} \quad \text{โมล} \\ \text{ถ้าพื้นที่ผิว 1270.79 ตารางเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เท่ากับ} & \quad \frac{1270.79 \text{ ตารางเมตร} \times 3.35 \times 10^{-8} \text{ โมล}}{1} \\ \therefore \text{พื้นที่ผิว 1270.79 ตารางเมตร มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เท่ากับ} & \quad 4.26 \times 10^{-5} \quad \text{โมล} \end{aligned}$$

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง ODS กับหมู่ไฮดรอกซิลบนซิลิกา 1 กรัม คือ 1:3 ดังนั้นปริมาณของ ODS สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณ ODS (กรัม) เท่ากับ} \quad \frac{\text{จำนวนโมลของหมู่-OH บนผิวซิลิกา} \times \text{F.W.}_{\text{ODS}}}{3}$$

$$\text{ปริมาณ ODS (กรัม) เท่ากับ} \quad \frac{(4.26 \times 10^{-5} \text{ โมล} \times 387.94 \text{ กรัมต่อโมล})}{3}$$

$$\text{ปริมาณ ODS (กรัม) เท่ากับ } 5.51 \times 10^{-3} \text{ กรัม หรือ } 1.42 \times 10^{-5} \text{ โมล ต่อซิลิกา 1 กรัม}$$

ดังนั้น ปริมาณ ODS (100%) ที่ใช้ในการสร้างพันธะกับซิลิกามีเท่ากับ  $1.42 \times 10^{-5}$  โมล ต่อซิลิกา 1 กรัม

### **ภาคผนวก ง.**

**การคำนวณหาปริมาณหมู่ไซทานอลบนพื้นผิวซิลิกาที่สร้างพันธะกับ ODS**

จากข้อมูลการใช้เทคนิค TGA พบว่า % carbon loading ที่ได้ของการทำปฏิกิริยา Silica-100 % ODS (ครั้งที่ 1) และ ทำปฏิกิริยาซ้ำ (ครั้งที่ 2) เท่ากับ 15.61 และ 15.73 % ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกาที่เกิดปฏิกิริยากับ ODS ได้ โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้ [26,35,46]

$$\alpha = \frac{\% C \times 10^6}{12.011 n_c S \left[ 100 - \left( \frac{\% C}{12.011 x n_c} \right) (M - 3(35.5)) \right]}$$

โดยที่  $\alpha$  จำนวนพันธะที่ครอบคลุม (bonding coverage) (ไมโครโมลต่อตารางเมตร)  
 $\% C$  % carbon loading เท่ากับ 15.73 %  
 $n_c$  จำนวนของคาร์บอนอะตอมต่อ 1 โมลของไฮดรอกซิล เท่ากับ 18 อะตอม  
 $S$  พื้นที่ผิว  $m^2/g$  เท่ากับ  $1270.79 m^2/g$   
 $35.5$  น้ำหนักของคลอรีน

แทนค่าลงในสูตร จะได้

$$\alpha = \frac{15.73 \times 10^6}{12.01 \times 18 \times 1270.79 \left[ 100 - \left( \frac{15.73}{12.01 \times 18} \right) (281.44 - 3(35.50)) \right]}$$

ดังนั้นจำนวนพันธะที่ครอบคลุม (bonding coverage,  $\alpha$ ) เท่ากับ  $3.28 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร

จึงแสดงว่าจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่ทำปฏิกิริยากับ ODS เท่ากับ  $3.28 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร

**ภาคผนวก จ.**

**การกำหนดหาปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลบนพื้นผิวซิลิกา  
เมื่อปิดปลายว่องไวด้วย TMCS**

เมื่อนำซิลิกามาสร้างพันธะกับ ODS และ ปิดปลายหมู่ว่องไวด้วย TMCS พบว่าค่า % carbon loading ได้เท่ากับ 16.18 % ดังนั้น แต่ในการสร้างพันธะระหว่าง ODS กับไซลันอลบนพื้นผิวซิลิกาได้เพิ่มที่ % carbon loading เท่ากับ 15.73 % มี นั้น จึงคำนวณหา % carbon loading ของ TMCS ได้ เท่ากับ

$$\% \text{ carbon loading ของ TMCS} = \% \text{ carbon loading ของ (ODS+TMCS)} - (\text{ODS})$$

$$\% \text{ carbon loading ของ TMCS} = 16.18 - 15.73 \%$$

$$\% \text{ carbon loading ของ TMCS} = 0.45 \%$$

คำนวณหาปริมาณหมู่ไซลันอลบนพื้นผิวซิลิกาที่เกิดปฏิกิริยากับ TMCS ได้ โดยใช้สูตรในการคำนวณดังนี้ [26, 35, 46]

$$\alpha = \frac{\% C \times 10^6}{12.011 n_c S \left[ 100 - \left( \frac{\% C}{12.011 n_c} \right) (M - 35.5) \right]}$$

โดยที่  $\alpha$  จำนวนพันธะที่ครอบคลุม (bonding coverage) (ไมโคร โมลต่อตารางเมตร)

% C % carbon loading เท่ากับ 0.45 %

$n_c$  จำนวนของคาร์บอนอะตอมต่อ 1 โมลของไซเลน เท่ากับ 3 อะตอม

S พื้นที่ผิว  $m^2/g$  เท่ากับ  $1270.79 m^2/g$

35.6 น้ำหนักของคลอรีน

แทนค่าลงในสูตร จะได้

$$\alpha = \frac{0.45 \times 10^6}{12.01 \times 3 \times 1270.79 \left[ 100 - \left( \frac{0.45}{12.01 \times 3} \right) (73.12 - 35.5) \right]}$$

ดังนั้นจำนวนพันธะที่ครอบคลุม (bonding coverage,  $\alpha$ ) เท่ากับ  $2.60 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร จึงแสดงว่าจำนวนหมู่ไซลันอลที่ทำปฏิกิริยากับ TMCS เท่ากับ  $2.60 \times 10^{-9}$  โมลต่อตารางเมตร

### ภาคผนวก ฉ.

การคำนวณค่า จำนวนเพลทตามทฤษฎี (The number of theoretical plate, N) ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (HETP, H) และตัวแปรในสมการเวนดิมเตอร์ ของคอลัมน์ทางการค้า HiQsil C18 W 5  $\mu\text{m}$  (150 x 4.6 mm i.d.) บรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 1

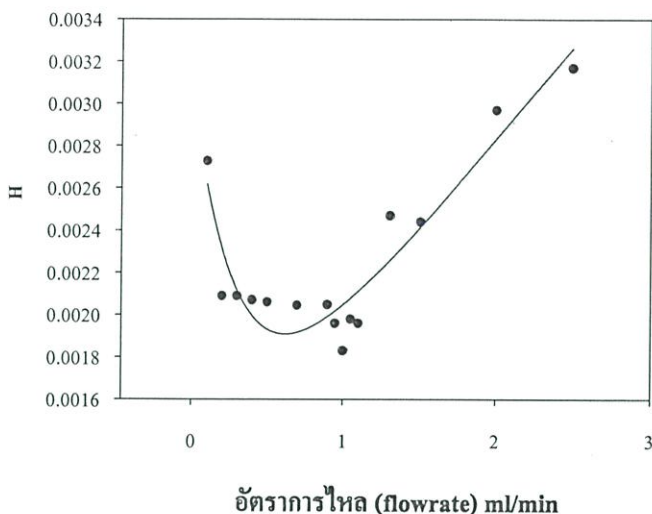
**ตาราง จ.1** การคำนวณอัตราการไหลกับค่าทฤษฎีทางเพลท ของคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W  
5  $\mu$ m 150 x 4.6 mm i.d.

อัตราไหล มิลลิลิตรต่อนาที	ความดัน (Pressure) Psi	เวลาการคงไว้ (retention time, $t_R$ ) (นาที)	V (cm)	W <sub>(0.5)</sub> (cm)	N*	H* (cm)
0.10	211.00	61.64	14.10	0.45	5438.47	0.00276
0.20	318.00	30.81	14.40	0.40	7179.84	0.00209
0.30	423.00	20.56	14.40	0.40	7179.84	0.00209
0.40	531.00	15.50	14.45	0.40	7229.79	0.00207
0.50	642.00	12.49	14.50	0.40	7279.97	0.00206
0.70	851.00	8.92	14.55	0.40	7330.20	0.00205
0.90	1057.00	6.97	14.70	0.40	7482.12	0.00205
0.95	1109.00	6.62	14.85	0.40	7635.59	0.00196
1.00	1165.00	6.30	15.35	0.40	8158.43	0.00183
1.05	1214.00	6.01	14.80	0.40	7584.26	0.00198
1.10	1272.00	5.75	14.85	0.40	7635.59	0.00196
1.30	1469.00	4.89	14.90	0.45	6073.55	0.00247
1.50	1671.00	4.26	15.00	0.45	6154.94	0.00244
2.00	2167.00	3.22	15.10	0.50	5052.70	0.00297
2.50	2625.00	2.61	15.35	0.53	4646.66	0.00323

$$N^* \text{ มีสูตรดังนี้ } 5.54 \left( \frac{V}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2$$

$$H_{\min} = \text{Length of column} / N, L/N$$

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



รูปที่ จ.1 กราฟแวนเดอมเตอร์ที่ได้จากคอลัมน์ทางการค้า HiQSilC18W 5µm (150 x 4.6 mm i.d.)

สมการ คือ  $y = y_0 + ae^{-bx} + cx$

coefficient

$a = 0.0020$

$b = 3.2462$

$c = 0.0009$

$y_0 = 0.0011$

แก้สมการหาค่า x และ y ดังนี้

จาก  $y = y_0 + ae^{-bx} + cx \dots\dots\dots (1)$

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

กำหนดให้  $y' = 0$

จะได้  $-bae^{-bx} + c = 0$

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

แทนค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้ลงไปในสมการที่ 3

$(3.2162)(0.0020)e^{-(3.2162)X} = 0.0009$

$(0.00643)e^{-(3.2162)X} = 0.0009$

$e^{-(3.2162)X} = 0.13997$

$\ln e^{-(3.216)X} = \ln 0.13997$

$$-3.2162x = \ln 0.13997$$

$$x = 0.611$$

แทนค่า  $x$  ลงในสมการที่ 1

$$y = 0.0011 + 0.0020e^{-3.2162(0.611)} + 0.0009(0.611)$$

$$y = 1.93 \times 10^{-3}$$

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

$$y = y_0 + ae^{-bx} + cx \dots\dots\dots(5)$$

$$H = A + \frac{B}{x} + Cx \dots\dots\dots(6)$$

ให้สมการที่ 5 เท่ากับสมการ 6 เพราะฉะนั้น

$$y_0 + \frac{a}{e^{bx}} + cx = A + \frac{B}{x} + Cx$$

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

แทนค่าจากสัมประสิทธิ์ที่กำหนดให้มา และค่า  $x$  จากการคำนวณเบื้องต้น จะได้

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

$$B = \frac{0.0020 \times 0.611}{e^{(3.2162)(0.611)}}$$

$$B = 1.71 \times 10^{-4}$$

จึงสรุปได้ว่า

$$\begin{array}{l} H = 1.93 \times 10^{-3} \\ A = 0.0011 \\ B = 1.71 \times 10^{-4} \\ C = 0.0009 \end{array}$$

$$H = 0.0011 + \frac{1.71 \times 10^{-4}}{x} + 0.0009x$$

### ภาคผนวก ข.

การคำนวณค่า จำนวนเพลทตามทฤษฎี (The number of theoretical plate, N)  
ค่าความสูงของเพลททางทฤษฎี (HETP, H) และตัวแปรในสมการแวนดีมเตอร์  
ของ Silica-ODS ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)

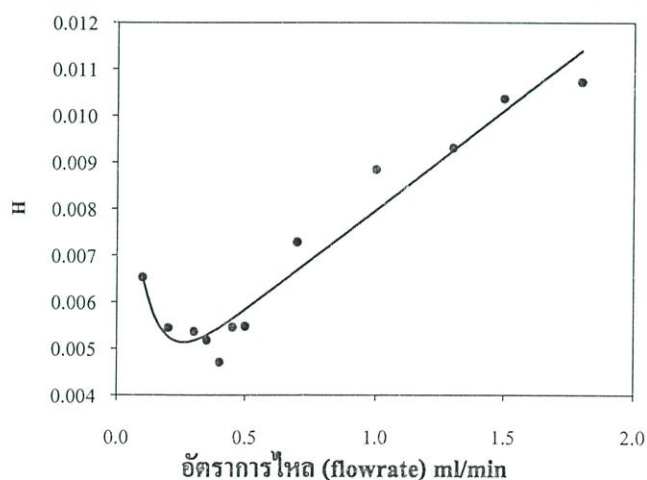
**ตาราง จ. 1** การคำนวณอัตราการไหลกับค่าทฤษฎีทางพลท ของคอลัมน์ 150 x 4.6 mm i.d.

อัตราไหล มิลลิลิตรต่อนาที	ความดัน (Pressure) Psi	เวลาการคงไว้ (retention time, $t_R$ ) (นาที)	V (cm)	$W_{(0.5)}$ (cm)	N*	H* (cm)
0.10	339.00	82.12	13.75	0.73	1965.94	0.00763
0.20	429.00	41.16	14.50	0.65	2756.93	0.00544
0.30	593.00	27.79	14.10	0.63	2774.91	0.00540
0.35	670.00	23.37	15.10	0.66	2900.01	0.00517
0.40	783.00	20.53	14.40	0.60	3191.04	0.00470
0.45	910.00	16.29	13.15	0.59	2752.29	0.00545
0.50	1108.00	13.49	13.35	0.60	2742.65	0.00547
0.70	1224.00	11.75	13.50	0.70	2061.00	0.00728
1.00	1779.00	8.67	14.00	0.80	1696.66	0.00884
1.30	2255.00	6.71	14.50	0.85	1612.27	0.00930
1.50	2574.00	5.83	14.55	0.90	1448.24	0.01036
1.80	3049.00	4.90	14.70	0.93	1384.45	0.01083

$$N^* \text{ มีสูตรดังนี้ } 5.54 \left( \frac{V}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2$$

$$H_{\min} = \text{Length of column} / N, L/N$$

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



**รูปที่ จ 1.** กราฟแวนดีมเตอร์ที่ได้จากคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)

สมการ คือ  $y = y_0 + ae^{-bx} + cx$

coefficient

$$a = 0.0144$$

$$b = 14.3099$$

$$c = 0.0043$$

$$y_0 = 0.0037$$

แก้สมการหาค่า  $x$  และ  $y$  ดังนี้

$$\text{จาก } y = y_0 + ae^{-bx} + cx \dots\dots\dots(1)$$

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

กำหนดให้  $y' = 0$

$$\text{จะได้ } -bae^{-bx} + c = 0$$

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

แทนค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้ลงไปในสมการที่ 3

$$(14.3099)(0.0144)e^{-(14.3099)x} = 0.0043$$

$$(0.206)e^{-(14.3099)x} = 0.0043$$

$$e^{-(14.3099)x} = 0.021$$

$$\ln e^{-(14.3099)x} = \ln 0.021$$

$$-14.3099x = \ln 0.021$$

$$\boxed{x = 0.270}$$

แทนค่า  $x$  ลงในสมการที่ 1

$$y = 0.0037 + 0.0144 e^{-14.3099(0.270)} + 0.0043(0.270)$$

$$\boxed{y = 5.16 \times 10^{-3}}$$

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

$$y = y_0 + ae^{-bx} + cx \dots\dots\dots(5)$$

$$H = A + \frac{B}{x} + Cx \dots\dots\dots(6)$$

ให้สมการที่ 5 เท่ากับสมการ 6 เพราะฉะนั้น

$$y_0 + \frac{a}{e^{bx}} + cx = A + \frac{B}{x} + Cx$$

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

แทนค่าจากสัมประสิทธิ์ที่กำหนดให้มา และค่า  $x$  จากการคำนวณเบื้องต้น จะได้

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

$$B = \frac{0.0144 x 0.270}{e^{(14.3099)(0.270)}}$$

$$B = 0.82 x 10^{-4}$$

จึงสรุปได้ว่า

$$\begin{array}{l} H = 5.16 x 10^{-3} \\ A = 0.0037 \\ B = 0.82 x 10^{-4} \\ C = 0.0043 \end{array}$$

$$H = 0.0037 + \frac{0.82 x 10^{-4}}{x} + 0.0043 x$$

### ภาคผนวก ซ.

การคำนวณค่า จำนวนเพลตตามทฤษฎี (The number of theoretical plate, N)  
ค่าความสูงของเพลตทางทฤษฎี (HETP, H) และตัวแปรในสมการแวนดีมเตอร์  
ของคอลัมน์ Silica-ODS ที่เตรียมได้จากงานวิจัย 250 x 4.6 mm i.d.

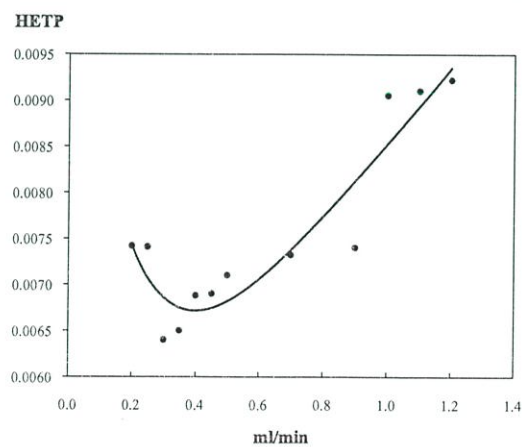
**ตาราง ข. 1** การคำนวณอัตราการไหลกับค่าทฤษฎีทางเพลท ของคอลัมน์ 250 x 4.6 mm i.d.

อัตราไหล มิลลิลิตรต่อนาที	ความดัน (Pressure) Psi	เวลาการคงไว้ (retention time, $t_R$ ) (นาที)	V (cm)	$W_{(0.5)}$ (cm)	$N^*$	$H^*$ (cm)
0.20	688.00	69.58	14.75	0.60	3348.05	0.00746
0.25	826.00	56.49	15.30	0.61	3485.24	0.00717
0.30	954.00	46.55	14.90	0.56	3921.99	0.00640
0.35	1047.00	39.47	14.80	0.56	3869.52	0.00650
0.40	1138.00	35.05	14.85	0.58	3631.67	0.00688
0.45	1309.00	31.23	14.90	0.59	3533.21	0.00708
0.50	1472.00	28.22	14.90	0.59	3533.28	0.00710
0.70	1892.00	19.94	14.93	0.59	3545.24	0.00705
0.90	1393.00	15.61	14.85	0.59	3509.61	0.00712
1.00	2637.00	14.09	13.40	0.60	2763.23	0.00905
1.10	2879.00	12.81	13.35	0.60	2742.64	0.00901
1.20	3098.00	11.73	13.10	0.60	2640.89	0.00922

$$N^* \text{ มีสูตรดังนี้ } 5.54 \left( \frac{V}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2$$

$$H_{\min} = \text{Length of column} / N ; L/N$$

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



อัตราการไหล (flowrate) ml/min

**รูปที่ ข 1.** กราฟแวนดีมเตอร์ที่ได้จากคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)

สมการ คือ  $y = y_0 + ae^{-bx} + cx$

coefficient

$a = 0.0072$

$b = 5.6989$

$c = 0.0042$

$y_0 = 0.0043$

แก้สมการหาค่า  $x$  และ  $y$  ดังนี้

จาก  $y = y_0 + ae^{-bx} + cx \dots\dots\dots(1)$

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

กำหนดให้  $y' = 0$

จะได้  $-bae^{-bx} + c = 0$

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

แทนค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้ลงไปในสมการที่ 3

$(5.6989)(0.0072)e^{-(5.6989)x} = 0.0042$

$(0.0410)e^{-(5.6989)x} = 0.0042$

$e^{-(5.6989)x} = 0.102$

$\ln e^{-(5.6989)x} = \ln 0.102$

$-5.6989x = \ln 0.102$

$x = 0.401$

แทนค่า  $x$  ลงในสมการที่ 1

$y = 0.0043 + 0.0072e^{-5.6989(0.401)} + 0.0042(0.401)$

$y = 6.72 \times 10^{-3}$

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

$y = y_0 + ae^{-bx} + cx \dots\dots\dots(5)$

$H = A + \frac{B}{x} + Cx \dots\dots\dots(6)$

ให้สมการที่ 5 เท่ากับสมการ 6 เพราะฉะนั้น

$y_0 + \frac{a}{e^{bx}} + cx = A + \frac{B}{x} + Cx$

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

แทนค่าจากสัมประสิทธิ์ที่กำหนดให้มา และค่า  $x$  จากการคำนวณเบื้องต้น จะได้

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

$$B = \frac{0.0072 \times 0.102}{e^{(5.6989)(0.102)}}$$

$$B = 4.11 \times 10^{-4}$$

จึงสรุปได้ว่า

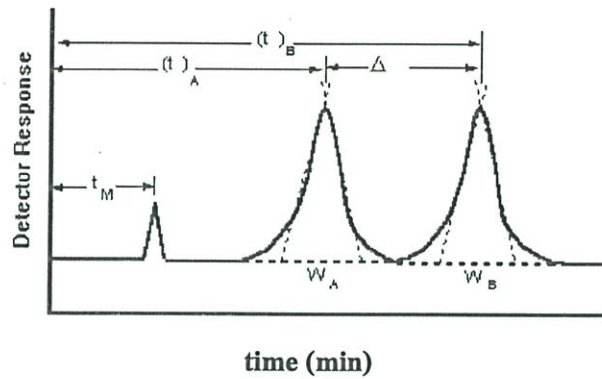
$$\begin{array}{l} H = 6.72 \times 10^{-3} \\ A = 0.0043 \\ B = 4.11 \times 10^{-4} \\ C = 0.0042 \end{array}$$

$$H = 0.0043 + \frac{4.11 \times 10^{-4}}{x} + 0.0042 x$$

**ภาคผนวก ฉ.**

**การคำนวณค่าความสามารถในการแยก (Resolution,  $R_s$ )**

ความสามารถในการแยกสารนี้ จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ และ ความกว้างของพีคทั้งสอง คำนวณได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีคทั้งสองหาร ด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีคทั้งสอง โดยใช้สูตร  $R_S = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{(W_B + W_A)}$  ดังแสดงในรูปที่ ซ.1 และ ค่าที่ ใช้ในการคำนวณดังแสดงในตารางที่ ซ.1



รูปที่ ซ.1 แสดงโครมาโทแกรมในการคำนวณค่าความสามารถในการแยก

เมื่อ

- $R_S$  คือ ค่าความสามารถในการแยก
- $t_{R1}$  คือ เวลาของการคงไว้ของพีคที่ 1 (นาที)
- $t_{R2}$  คือ เวลาของการคงไว้ของพีคที่ 2 (นาที)
- $w_1$  คือ ความกว้างของพีคที่ 1 (มิลลิเมตร)
- $w_2$  คือ ความกว้างของพีคที่ 2 (มิลลิเมตร)

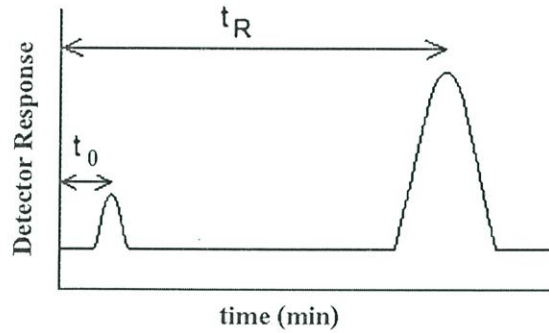
**ตารางที่ ข.1** แสดงค่าการคำนวณความสามารถในการแยกสารละลายมาตรฐานผสม ยูราซิล  
เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัม  
ต่อมิลลิลิตรของคอลัมน์ 3 ชนิด คือ คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5 $\mu$ m  
ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d.  
และ 250 x 4.6 mm i.d

คอลัมน์	ยูราซิล - เบนซีน					เบนซีน - แนพทาลีน					แนพทาลีน - ไบฟีนิล				
	ค่าเฉลี่ย					ค่าเฉลี่ย					ค่าเฉลี่ย				
	$t_{RA}$	$t_{RA}$	$W_A$	$W_B$	$R_S$	$t_{RA}$	$t_{RA}$	$W_A$	$W_B$	$R_S$	$t_{RA}$	$t_{RA}$	$W_A$	$W_B$	$R_S$
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.)	1.80	3.31	0.40	0.50	<b>3.36</b>	3.31	4.91	0.50	0.90	<b>2.29</b>	4.91	6.40	0.85	0.90	<b>1.70</b>
2. คอลัมน์ที่เตรียม ได้จากงาน วิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	1.36	3.80	0.55	0.90	<b>3.37</b>	3.80	6.26	0.90	1.80	<b>1.82</b>	6.26	8.67	1.80	1.90	<b>1.30</b>
3. คอลัมน์ที่เตรียม ได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	2.16	6.21	0.60	0.90	<b>5.40</b>	6.21	10.40	0.90	1.60	<b>3.35</b>	10.40	14.46	1.60	1.60	<b>2.54</b>

**ภาคผนวก ญ.**

**การคำนวณแฟคเตอร์ความจุ (capacity factor, k')**

แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor;  $k'$ ) เป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยก คำนวณได้จากเวลาที่ตัวถูกละลายใช้อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ หรือถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ให้นิยามได้เป็นค่า (corrected retention time,  $(t_R - t_0)$ )หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ( $t_0$ ) ในที่นี้คือ สารละลายมาตรฐาน ยูราซิลคำนวณโดยใช้สูตร  $k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$  ดังแสดงในรูปที่ ๑. ๑ และค่าที่ใช้ในการคำนวณดังแสดงในตารางที่ ๑. ๑



รูปที่ ๑. ๑ แสดงโครมาโทแกรมในการคำนวณค่าความจุ

ตารางที่ ๑. ๑ แสดงค่าการคำนวณแฟกเตอร์ความจุของสารละลายมาตรฐานผสม ยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02, 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรของคอลัมน์ 3 ชนิด คือ คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5 $\mu$ m ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d.

คอลัมน์	ยูราซิล - เบนซีน			เบนซีน - แนพทาลีน			แนพทาลีน - ไบฟีนิล		
	ค่าเฉลี่ย			ค่าเฉลี่ย			ค่าเฉลี่ย		
	$t_0$	$t_R$	$k'$	$t_0$	$t_R$	$k'$	$t_0$	$t_R$	$k'$
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	1.80	3.31	<b>0.84</b>	1.80	4.91	<b>1.73</b>	1.80	6.40	<b>2.56</b>
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	1.36	3.80	<b>1.79</b>	1.36	6.26	<b>3.60</b>	1.36	8.67	<b>5.38</b>
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	2.16	6.21	<b>1.88</b>	2.16	10.40	<b>3.81</b>	2.16	14.46	<b>5.69</b>

## ภาคผนวก ฎ.

การคำนวณความจำเพาะเจาะจง (Capacity factor,  $\alpha$ )

สมการที่ใช้แสดงค่าความจำเพาะเจาะจง คือ  $\alpha = \frac{k'_A}{k'_B}$

เมื่อ

$k'_A$  คือ ค่าแฟกเตอร์ความจุของสาร A

$k'_B$  คือ ค่าแฟกเตอร์ความจุของสาร B

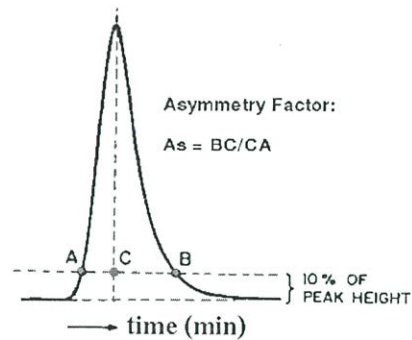
**ตารางที่ ๑.1** แสดงค่าการคำนวณความจำเพาะเจาะจง (selectivity,  $\alpha$ )

คอลัมน์	เบนซีน – แนฟทาลีน			แนฟทาลีน - ไบฟีนิล		
	ค่าเฉลี่ย			ค่าเฉลี่ย		
	$k'_{\text{เบนซีน}}$	$k'_{\text{แนฟทาลีน}}$	$\alpha$	$k'_{\text{แนฟทาลีน}}$	$k'_{\text{ไบฟีนิล}}$	$\alpha$
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	0.84	1.73	<b>2.06</b>	1.73	2.56	<b>1.48</b>
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	1.79	3.60	<b>2.01</b>	3.60	5.38	<b>1.49</b>
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	1.88	3.81	<b>2.03</b>	3.81	5.69	<b>1.49</b>

## ภาคผนวก ฎ.

การคำนวณความสมมาตรของพีค (peak asymmetry,  $A_s$ )

ความสมมาตรของพีค (peak asymmetry,  $A_s$ ) คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้ คือ  $\frac{BC}{CA}$   
 ดังแสดงในรูปที่ ฎ.1



รูปที่ ฎ.1 แสดงลักษณะของพีคในการคำนวณค่าความสมมาตรของพีค

ตารางที่ ฎ.1 แสดงค่าการคำนวณความสมมาตรของพีค ของสารละลายมาตรฐานผสม ยูราซิล เบนซีน แนพทาลีน และ ไบฟีนิล ความเข้มข้น 0.02 3.00, 0.50 และ 0.06 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรของคอลัมน์ 3 ชนิด คือ คอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18 W 5 $\mu$ m ขนาด 150 x 4.6 mm i.d. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัยขนาด 150 x 4.6 mm i.d. และ 250 x 4.6 mm i.d.

คอลัมน์	เบนซีน			แนพทาลีน			ไบฟีนิล		
	BC	CA	$A_s$	BC	CA	$A_s$	BC	CA	$A_s$
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	0.20	0.20	<b>1.00</b>	0.35	0.30	<b>1.17</b>	0.45	0.40	<b>1.10</b>
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	0.40	0.40	<b>1.00</b>	0.80	0.80	<b>1.00</b>	0.93	0.89	<b>1.04</b>
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	0.45	0.40	<b>1.13</b>	0.65	0.60	<b>1.08</b>	0.70	0.60	<b>1.17</b>

หมายเหตุ สำหรับสารละลายมาตรฐาน ยูราซิล ไม่คิดค่า  $A_s$  เพราะเป็นสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยว (unretain) ในคอลัมน์

**ภาคผนวก ง.****การคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery)**

การคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) คำนวณจากสูตร

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{(C_1 - C_2) \times 100}{C_3}$$

เมื่อ

$C_1$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน (spiked sample)

$C_2$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่าง (unspiked sample)

$C_3$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติม

**ตารางที่ ๑.1** แสดงปริมาณพาราเซตามอลในตัวอย่างยาลดไข้บรรเทาปวด (ทิฟฟี) และ (ทิฟฟี) ที่เติมสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอล (spiked sample)

คอลัมน์	$C_1$ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	$C_2$ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	$C_3$ (ไมโครกรัมต่อกรัม)	% Recovery
1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	1483658	901047	608307	95.78
2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	1452457	856051	608307	98.04
3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)	1483847	883103	608307	98.76

**ภาคผนวก ๗.****การคำนวณค่าความเที่ยง (Precision)**

การคำนวณค่าความเที่ยง (Precision) คำนวณจากสูตร

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

เมื่อ

$\bar{X}$  คือ ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

$SD$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ

$\%RSD$  คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ที่ได้จากการทดลอง (Experimental RSD)

โดยที่ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดสอบ  $SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$

$x_i$  คือ ค่าของข้อมูลแต่ละค่า

$\bar{x}$  คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งหมด

$n$  คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

การประเมินความเที่ยง โดยใช้ Horwitz equation

$$RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \dots\dots\dots (2)$$

$\%RSD_r$  คือ ค่า RSD จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียวกัน (Repeatability) จัดเป็น Predicted RSD

$C$  คือ ค่าความเข้มข้น

นำค่า RSD ที่คำนวณได้จากสมการที่ 1 มาเทียบกับค่า RSD ที่คำนวณได้ จากสมการที่ 2 จะได้ Horwitz' Ratio หรือ Horrat ดังสมการต่อไปนี้

$$Horwitz' s - ratio / Horrat = \frac{Experimental - RSD}{Predicted - RSD} \dots\dots\dots 3$$

ตัวอย่างการคำนวณ Horrat จากข้อมูลของคอลัมน์ทางการค้า HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.) ในตารางที่

$$Horwitz' s - ratio / Horrat = \frac{1.05}{0.89} = 1.18$$

**ตารางที่ ๑.๑** แสดงข้อมูลการทดสอบความเที่ยง (Precision) ของคอลัมน์ 3 ชนิด

ลำดับ	ค่าพื้นที่พีค ( $x_i$ )		
	1. คอลัมน์ทางการค้า (HiQSil C18W (150 x 4.6 mm i.d.))	2. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (150 x 4.6 mm i.d.)	3. คอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย (250 x 4.6 mm i.d.)
1	21452567	20857906	20663871
2	21089997	20640777	21374940
3	20874684	20899440	21467043
4	21067520	21460346	21232015
5	21400775	20907830	21700040
6	21441140	20643817	21231783
7	21303122	20929115	21159245
ผลรวม ( $\Sigma$ )	148629805	146339231	148828937
ค่าเฉลี่ย $\bar{x}$	21232829	20877033	21261277
<i>SD</i>	223912	273640	320625
% <i>RSD</i>	1.05	1.31	1.51
Horrat	1.18	1.47	1.70

**ภาคผนวก ค.**

**การคำนวณค่า ความสูงของเพลททางทฤษฎี (H) ของคอลัมน์ที่เตรียมได้จากงานวิจัย  
(150 x 4.6 mm i.d.) บรรจุคอลัมน์ครั้งที่ 2**

**ตาราง ท. 1** การคำนวณอัตราการไหลกับค่าทฤษฎีทางเพลท ของคอลัมน์ 150 x 4.6 mm i.d.

บรรจุคอลัมน์ครั้งที่

อัตราไหล มิลลิลิตรต่อนาที	ความดัน (Pressure) Psi	เวลาการคงไว้ (retention time, $t_R$ ) (นาที)	V (cm)	$W_{(0.5)}$ (cm)	N*	H* (cm)
0.10	339.00	82.05	13.75	0.73	1965.94	0.00763
0.20	429.00	40.98	14.50	0.65	2756.93	0.00544
0.30	593.00	27.59	14.10	0.63	2774.91	0.00541
0.35	670.00	23.18	15.15	0.65	3009.90	0.00498
0.40	783.00	20.33	14.65	0.63	2995.23	0.00500
0.45	910.00	16.08	13.25	0.60	2701.30	0.00555
0.50	1108.00	13.28	13.25	0.63	2450.32	0.00612
0.70	1224.00	11.56	13.45	0.73	1880.18	0.00798
1.00	1779.00	8.46	14.15	0.85	1535.54	0.00977
1.30	2255.00	6.40	14.55	0.90	1448.24	0.01036
1.50	2574.00	5.52	14.55	0.93	1356.45	0.01105
1.80	3049.00	4.78	14.45	0.93	1337.66	0.01121

$$N^* \text{ มีสูตรดังนี้ } 5.54 \left( \frac{V}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2$$

$$H_{\min} = \text{Length of column} / N, L/N$$

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวอมรรักษ์ จิณรัชย์ เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ.2520 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ราชภัฏเพชรบุรีวิทยาลัย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ในปี 2543

- เมษายน พ.ศ 2543 – มกราคม พ.ศ 2544 ได้เข้าทำงานที่บริษัทเพอร์กิน เอลเมอร์ จำกัด ในตำแหน่งเจ้าหน้าที่ติดต่อประสานงานการจัดส่งเครื่องมือทางด้านวิทยาศาสตร์ของโครงการเงินกู้ธนาคารโลก (World Bank) ให้กับมหาวิทยาลัยในประเทศไทย

- กุมภาพันธ์ พ.ศ 2544 – พฤษภาคม พ.ศ 2545 ได้เข้าทำงานที่การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) ในตำแหน่งเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ (ลูกจ้างชั่วคราว)

- มิถุนายน พ.ศ 2545 – พฤษภาคม พ.ศ 2546 ได้เข้าทำงานที่บริษัทอุตสาหกรรมหลอมโลหะไทย จำกัด ในตำแหน่งนักเคมี

เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี (เคมีวิเคราะห์) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2546 โดยในปี พ.ศ. 2547 และ 2548 ได้ทำงานเป็นผู้ช่วยอาจารย์สอนในรายวิชาปฏิบัติการเคมีทั่วไป ปฏิบัติการเคมีเบื้องต้น และปฏิบัติการชีวเคมี ให้กับนักศึกษาปริญญาตรี วิศวกรรมศาสตร์และวิทยาศาสตร์ชั้นปีที่ 1 และ 2 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง