

2.1 ตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารหวานเทียม

ตัวอย่างอาหารที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารหวานเทียมนี้ได้เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

ลำดับที่	ชนิดของอาหาร	วันที่เก็บ	สถานที่	ผู้ผลิต
1	น้ำกระเทียมคอง	18 ธ.ค. 25	ตลาดคนลำไย	ไม่ทราบชื่อ
2	กระเทียมคอง	18 ธ.ค. 25	ตลาดคนลำไย	ไม่ทราบชื่อ
3	น้ำมะนาว	18 ธ.ค. 25	ตลาดควโรรส	ไม่ทราบชื่อ
4	น้ำขวย	22 ธ.ค. 25	ตลาดควโรรส	ไม่ทราบชื่อ
5	น้ำลูกท้อ	22 ธ.ค. 25	ตลาดควโรรส	ไม่ทราบชื่อ
6	ลูกท้อ	22 ธ.ค. 25	ตลาดควโรรส	ไม่ทราบชื่อ
7	น้ำกระท้อน	28 ธ.ค. 25	ตลาดสุเทพ	ไม่ทราบชื่อ
8	น้ำเงาะกวย	28 ธ.ค. 25	หอพักหญิง 6 มช.	กุนลดา เชียงใหม่
9	น้ำมะพร้าว	8 ม.ค. 26	ตลาดควโรรส	ไม่ทราบชื่อ
10	น้ำรากบัว	10 ม.ค. 26	ตลาดควโรรส	ไม่ทราบชื่อ
11	น้ำมะขาม	12 ม.ค. 26	ตลาดสุเทพ	ไม่ทราบชื่อ
12	มะม่วงเค็ม	12 ม.ค. 26	ร้านคาหนา มช.	ไม่ทราบชื่อ
13	คึกคาก	14 ม.ค. 26	หอพักหญิง 6 มช.	บริษัทคึกคากจำกัด
14	มิรินคา	14 ม.ค. 26	หอพักหญิง 6 มช.	บริษัทเสริมสุข
15	ทิม	14 ม.ค. 26	หอพักหญิง 6 มช.	บริษัทเสริมสุข
16	ทอฟฟิตราโก	20 ม.ค. 26	ตลาดควโรรส	บริษัทป๋อ เองวัฒนา
17	ทอฟฟิตรานกแก้ว	20 ม.ค. 26	ตลาดควโรรส	บริษัทเม่งเส็ง

2.2 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยวิธีทีแอลซี (34)

(TLC : Thin-Layer Chromatography)

2.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. แผ่นกระจก (glass plate) 20 x 20 ซม
2. แท็งก์แยกสาร (developing tank) 22 x 22 x 10 ซม
3. ขวดสำหรับสเปรย์ (spray bottle)
4. เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light source) 254 nm Original HANAU Fluotest
5. สเปรดเดอร์สำหรับแผ่นกระจกทีแอลซี (spreader for thin layer plates)
6. เครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศ (vacuum rotary evaporator) Buchi type R.
7. เข็มฉีดยา (syringe) 10 μ l Hamilton

2.2.2 สารเคมี

1. ซิลิกาเจลเอช 60 (silica gel H 60)
ผลิตโดย E. Merck
2. โซเดียมไซคลาเมต (sodium cyclamate) AR. grade
ผลิตโดย Fluka
3. แซคคาไรน (saccharin) AR. grade
ผลิตโดย Fluka
4. แซคคาไรนโซเดียม (saccharin sodium) Lab. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.

5. คัลซีน (dulcin) AR. grade
ผลิตโดย Sigma
6. ไบรอมีน (bromine) Lab. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
7. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (carbon tetrachloride) Lab. grade
ผลิตโดย May & Baker
8. ฟลูออเรสซีน (fluorescein)
ผลิตโดย E. Merck
9. เอ็น-1-แนฟทิลเอทิลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์
(N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride)
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
10. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 %
ผลิตโดยบริษัทอยุธยา
11. สารละลายแอมโมเนีย (ammonia solution) 28 %
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
12. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) 98 %
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.

14. ปีโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) มีจุดเดือดอยู่ในช่วง
60–80°C
ผลิตโดย May & Baker
15. เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) AR. grade
ผลิตโดย E. Merck
16. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) Lab. grade
ผลิตโดย May & Baker
-
17. นอร์มอล บิวทิลแอลกอฮอล์ (n-butyl alcohol)
ผลิตโดย May & Baker
18. ไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ (dimethyl formamide)
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.

2.2.3 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายสำหรับแยก (developing solvent) เตรียมโดยใช้
ส่วนผสมของนอร์มอลบิวทิลแอลกอฮอล์-เอทิลแอลกอฮอล์-แอมโมเนียไฮดรอกไซด์-น้ำ ใน
อัตราส่วน 40:4:1:9 โดยปริมาตร

2. สารละลายสำหรับพ่นโครมาโตแกรม (chromogenic agent)

มี 3 ชนิดคือ

ก) สารละลายโบรมีนในคาร์บอนเตตราคลอไรด์ 5 % โดยปริมาตร

ข) สารละลายฟลูออเรสซิน 0.25 % โดยปริมาตรในสารละลายผสม
ของไดเมทิลฟอร์มมาไมด์ และเอทิลแอลกอฮอล์ 1:1

ค) สารละลาย 2 % ของเอ็น-1-แนพทิลเอทริลีนไคอะมินไดไฮโดรคลอไรด์ในเอทิลอัลกอฮอล์

3. สารละลายผสมมาตรฐานของไซคลาเมท, แซคคารินและคัลซินเตรียมโดยละลายไซเคียมไซคลาเมท 50 มิลลิกรัม ไซเคียมแซคคาริน 10 มิลลิกรัม และคัลซิน 10 มิลลิกรัม ในเอทิลอัลกอฮอล์เจือจาง (1:1) 10 ซม³

2.2.4 การเตรียมแผ่นกระจกที่แอลซี และแท่งแคบ

เคลือบกระจกโดยใช้ซิลิกาเจลเอช 30 กรัม ผสมน้ำกลั่น 75-80 ซม³ เขย่าประมาณ 1 นาที แล้วนำไปเคลือบบนแผ่นกระจกโดยใช้สเปกโตรโม่ให้ความหนา 0.25 มม. ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมง จึงนำไปใช้

สำหรับแท่งที่บรรจุสารละลายสำหรับแยกโคคัวกัวยกระคายกรองให้รอบแล้วเทสารละลายสำหรับแยกลงไปประมาณ 100 ซม³ ปิดฝาแท่งให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ภายในแท่งเกิดการอิมพัคควัยไอของสารละลายสำหรับแยก

2.2.5 การเตรียมสารตัวอย่างและการสกัดแยกสารหวานเทียม

นำสารตัวอย่างมา 100 ซม³ ใส่ในกรวยแยกขนาด 250 ซม³ เติมกรดซัลฟูริก 50 % ลงไป 10 ซม³ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 50 ซม³ 2 ครั้ง (เขย่าเบา ๆ แต่ให้ทั่วถึง) ทิ้งชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์เสีย นำชั้นน้ำที่เหลือมาเติมไซเคียมไฮดรอกไซด์ 50 % ลงไป 5 ซม³ แล้วทำให้อิมพัคควัยไซเคียมคลอไรด์⁽³⁵⁾ จากนั้นจึงสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทครั้งละ 50 ซม³ 2 ครั้ง กรองสารละลายเอทิลอะซีเตทที่สกัดได้ผ่านสำลีที่คั่วให้ชุ่มด้วยเอทิลอะซีเตท แล้วจึงนำไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องกลั่นภายใต้สุญญากาศให้เหลือสารละลายประมาณ 2 ซม³ ทำสารละลายให้เจือจางด้วยสารละลายผสมของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์-น้ำ-เอทิลอัลกอฮอล์ (1:1:2) จนปริมาตรครบ 5 ซม³ เขย่าให้เข้ากัน

สำหรับสารละลายตัวอย่างที่เป็นแก๊สที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ด้วย ได้ไลต์แก๊สออกให้หมดเสียก่อนโดยการเขย่าแล้วเทลงอีกภาชนะหนึ่งแล้วเขย่าอีก เทกลับ
ไปกลับมาหลาย ๆ ครั้งจนก๊าซหมด จึงเริ่มสกัดตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว

2.2.6 การตรวจสอบโดยวิธีที่แอลซี

หยดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.5 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (μl) โดยใช้เข็มฉีดยาหยดลงบนแผ่นกระดาษที่ฉาบไว้เรียบร้อยแล้ว ให้จุดที่หยดห่างจากขอบล่างของกระดาษประมาณ 2.5 ซม. จากนั้นหยดสารละลายผสมมาตรฐานของแซคคาริน, ไซคลาเมท และคัลซิน โดยให้ตำแหน่งที่หยดแต่ละจุดห่างกันประมาณ 2 ซม. การหยดนั้นหยดครั้งละ $1 \mu\text{l}$ แล้วเป่าควมลมอุณหภูมิต่ำเสียก่อน จึงค่อยหยดปริมาณต่อไปจนครบ $5 \mu\text{l}$

นำแผ่นกระดาษที่หยดแล้วไปจุ่มในถังที่บรรจุสารละลายสำหรับแยกและอิมมูบิลิตี้แล้ว ปล่อยให้สารละลายสำหรับแยกซึมขึ้นมาบนแผ่นกระดาษเป็นระยะทาง 10 ซม. จึงนำแผ่นกระดาษออกจากถัง ทำให้แห้งในตู้เย็น แล้วนำส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตชนิดคลื่นสั้น จุดที่หยดแซคคารินจะเรืองแสงปรากฏให้เห็น จากนั้นนำไปอบในถังที่บรรจุควย 5 % โบรมีนในคาร์บอนเตตราคลอไรด์ แล้วจึงพ่นควยน้ำยาฟลูออเรสเซนต์ จะเห็นตำแหน่งของไซคลาเมทเป็นสีชมพู ค่อยพ่นควยสารละลายเอ็น-1-แนพทิล เอทริลีน ไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ คัลซินจะปรากฏเป็นสีม่วงปนเหลือง สำหรับค่าอาร์เอฟ (R_f) ของสารหวานเทียมทั้ง 3 ชนิด แสดงในตารางที่ 3.1

2.3 การหาปริมาณสารหวานเทียมโดยวิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส-ของเหลว (Gas-Liquid Chromatography)

เมื่อได้ตรวจสอบชนิดของสารหวานเทียมโดยวิธีที่แอลซีแล้ว ก็นำสารตัวอย่างมาหาปริมาณสารหวานเทียมที่ตรวจพบโดยวิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส-ของเหลว

2.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ (gas chromatograph) ผลิตโดย บริษัท Perkin Elmer Model F 17 มีระบบตรวจวัดเป็นแบบเฟลมไอออนไนซ์เซ็นติฟิเคเตอร์ (flame ionization detector, FID)

2. เครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder) ผลิตโดย Perkin Elmer Model 56

3. เครื่องวัดอัตราการไหลของก๊าซแบบใช้ฟองสบู่ (soap bubble flow meter)

4. คอลัมน์ (column) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 0.12 มม. ยาว 2 เมตร

5. ของเหลวที่เป็นเฟสคงที่ (stationary liquid phase) เป็น 10 % DC 200 เคลือบอยู่บน Chromosorb WHP ขนาด 80-100 mesh

6. ก๊าซพา (carrier gas) ใช้ไนโตรเจน

7. อากาศ (air)

8. เครื่องกำเนิดไฮโดรเจน (hydrogen generator)

ผลิตโดย Varian Model 9225

9. เข็มฉีดยา (microsyringes) ขนาด 10 μ l

ผลิตโดยบริษัท Hamilton

2.3.2 สารเคมี

1. อะซีโตน (acetone) Lab. grade

ผลิตโดย May & Baker

2. ไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether) AR. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
3. เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) AR. grade
ผลิตโดย E. Merck
4. ไดเมทิลซัลเฟต (dimethyl sulfate) Lab. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
5. โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate) AR. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
6. โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous)
Lab. grade
ผลิตโดย May & Baker
7. แซคคาริน (saccharin) AR. grade
ผลิตโดย Fluka
8. แซคคารินโซเดียม (saccharin sodium)
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
9. คัลซิน (dulcin) AR. grade
ผลิตโดย Sigma
10. โซเดียมไซคลาเมต (sodium cyclamate) AR. grade
ผลิตโดย Fluka
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) Lab. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.

12. กรดเกลือ (hydrochloric acid) Lab. grade
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
13. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide)
Lab. grade
ผลิตโดย E. Merck
14. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) จุดเดือดอยู่ในช่วง
35-60°C
ผลิตโดย E. Merck
15. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid) 98 %
ผลิตโดย BDH Chemicals Ltd.
16. โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite) AR. grade
ผลิตโดย E. Merck
17. เมทิลพาล์มมีเตท (methyl palmitate) AR. grade
ผลิตโดย Sigma

2.3.3 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานแซคคารินความเข้มข้น 2 มก./ cm^3 เตรียม
โดยชั่งแซคคาริน 200 มก. ละลายในอะซีโตนจนปริมาตรครบ 100 cm^3
2. สารละลายมาตรฐานของเมทิลพาล์มมีเตทความเข้มข้น 2 มก./ cm^3
เตรียมโดยชั่งเมทิลพาล์มมีเตท 200 มก. ละลายในอะซีโตนจนปริมาตรครบ 100 cm^3
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล (N) เตรียมโดยชั่ง
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำจนปริมาตรครบ 250 cm^3

4. สารละลายกรดเกลือ 10 % เตรียมโดยกुकสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 12 M ปริมาตร 22.7 ซม³ ทำให้เจือจางด้วยน้ำจนปริมาตรครบ 100 ซม³

5. สารละลายกรดซัลฟูริก 10 นอร์มอล เตรียมโดยกุกสารละลายกรดซัลฟูริก (98 %) 26.62 ซม³ ทำให้เจือจางด้วยน้ำจนปริมาตรครบ 100 ซม³

6. สารละลายโซเดียมไซคลาเมต 0.2 % w/v เตรียมโดยซังโซเดียมไซคลาเมต 0.2 กรัม ละลายในน้ำจนปริมาตรครบ 100 ซม³

7. สารละลายโซเดียมไนไตรท์ 0.5 นอร์มอล เตรียมโดยซังโซเดียมไนไตรท์ 3.45 กรัม ละลายในน้ำจนปริมาตรครบ 100 ซม³

2.3.4 การปรับสภาพคอลัมน์ (36)

ก่อนที่จะนำคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นใหม่ไปใช้งานให้นำไปปรับสภาพคอลัมน์ด้วยการอบที่อุณหภูมิ 210°C ภายในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟ โดยให้ก๊าซพาไหลผ่านด้วยอัตราเร็วประมาณ 20 ซม³ ต่อ นาที เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง จึงนำไปใช้สำหรับงานวิเคราะห์ได้

2.3.5 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของอากาศและไฮโดรเจนที่ทำให้เกิดเปลวไฟที่ใช้ในการวิเคราะห์

การทำงานของเฟลมไอออนไนซ์ เซ็นซีทีเทคเตอร์จะมีความไว (sensitivity) และความคงที่ (stability) ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับ การเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างอากาศและไฮโดรเจน ถ้าไฮโดรเจนมากหรือน้อยเกินไป สัญญาณที่ได้จากเฟลมไอออนไนซ์ เซ็นซีทีเทคเตอร์ก็จะน้อยด้วย สำหรับอากาศนั้นถ้ามากเกินไป จะทำให้สัญญาณจากเฟลมไอออนไนซ์ เซ็นซีทีเทคเตอร์น้อย ถ้ามากเกินไปจะไม่มีผลต่อ

สัญญาณ แต่จะทำให้เกิดสัญญาณรบกวนมากขึ้น ถ้าเลือกอัตราส่วนระหว่างอากาศกับไฮโดรเจนที่เหมาะสม เฟลมไอออนไนซ์เซชันคือเทคเตอร์จะให้สัญญาณมากที่สุด ฉะนั้นจึงต้องทดลองหาอัตราส่วนของอากาศและไฮโดรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งทำได้โดยฉีกระบายมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ โดยเริ่มกำหนดให้ความดันภายใน (inlet pressure) ของอากาศคงที่ แล้วเปลี่ยนแปลงความดันภายในของไฮโดรเจน วัดความสูงของพีค (peak) โดยที่ฉีกระบายมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากัน จากนั้นกำหนดความดันภายในของไฮโดรเจนตรงที่ความสูงของพีคมากที่สุดให้คงที่แล้วเปลี่ยนแปลงความดันภายในของอากาศ ตรงตำแหน่งที่ความสูงของพีคมากที่สุดจะเป็นจุดที่อัตราส่วนปริมาณของอากาศและไฮโดรเจนเหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ผลของการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของอากาศ และไฮโดรเจนนี้แสดงอยู่ในตารางที่ 3.3 และ 3.4

2.3.6 การหาประสิทธิภาพของคอลัมน์

ทฤษฎีที่อธิบายถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ในโครมาโตกราฟีก๊าซได้แก่ "plate theory" และ "rate theory"

"plate theory" (37) ถือว่าคอลัมน์ประกอบด้วยแผ่นหลาย ๆ แผ่นซ้อนกัน แต่ละแผ่นเรียกว่า แผ่นทางทฤษฎี (theoretical plate) ขณะที่ก๊าซพาเอาสารตัวอย่างเข้าไปจะเกิดการกระจายตัวอย่างสมดุลย์ (equilibrium distribution) ระหว่างก๊าซพาและเฟสของเหลวที่คงที่ (stationary liquid phase) และการกระจายตัวอย่างสมดุลย์นี้จะเกิดผ่านไปยังแผ่นอื่น ๆ ต่อไป เป็นผลทำให้เกิดพีคที่กว้าง ประสิทธิภาพของคอลัมน์คู่ได้อย่างคร่าว ๆ จากจำนวนแผ่นทางทฤษฎี (number of theoretical plates, N) หรือความสูงที่เทียบเท่าขนาดของแผ่นทางทฤษฎี (height equivalent to a theoretical plate, HETP) ในกรณี

ที่ความยาวของคอลัมน์ไม่เท่ากัน ซึ่งจำนวนแผ่นทางทฤษฎีนี้จะเกี่ยวข้องกับความกว้างของพีค ซึ่งสามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$N = 16 \left(\frac{X}{Y} \right)^2 \dots\dots\dots(2.1)$$

และ $HETP = \frac{L}{N} \dots\dots\dots(2.2)$

เมื่อ $X =$ ระยะทางจากจุดเริ่มฉีดสาร (injection point) ถึงจุดยอดของพีค

$Y =$ ความกว้างของฐานพีค

$L =$ ความยาวของคอลัมน์

การหาจำนวนแผ่นทางทฤษฎี ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.8

คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพคือนั้นจะต้องมีจำนวนแผ่นทางทฤษฎีมาก หรือ ความสูงที่เทียบเท่าขนาดของแผ่นทางทฤษฎี (HETP) จะต่องน้อยที่สุด แต่ "plate theory" มีข้อเสียคือ ไม่ได้บอกรายละเอียดเพื่อที่จะปรับปรุงคอลัมน์ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น van Deemter (38) จึงได้เสนอทฤษฎีใหม่ที่อาศัยพื้นฐานของ "plate theory" มาอธิบายถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ เรียกทฤษฎีนี้ว่า "rate theory" ซึ่งอธิบายในเทอมของสมการแวนดีมเตอร์ (39) (van Deemter equation) ดังนี้

$$HETP = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_{gas}}{U} + \frac{8k' d_p^2 U}{\sqrt{(1+k')^2} D_{liq}} \dots\dots\dots(2.3)$$

หรือเขียนสมการแวนดีมเตอร์แบบลดรูป (40) (simplified van Deemter equation) จะได้

$$HETP = A + \frac{B}{U} + C U \dots\dots\dots(2.4)$$

A = eddy diffusion term

เป็นเทอมที่ขึ้นกับขนาดของอนุภาคของสารแขั่งรองรับ

B = longitudinal diffusion term

เป็นเทอมที่ขึ้นกับความสามารถของสารที่จะแพร่อยู่ในก๊าซพา

C = mass transfer term

เป็นเทอมที่ขึ้นกับความหนาของเฟสของเหลวคงที่ที่เคลื่อนอยู่บนสารแขั่งรองรับ

จากสมการ 2.3 และ 2.4 จะได้

$$A = 4 \lambda d_p$$

เมื่อ λ = ค่าคงที่เกี่ยวกับความสม่ำเสมอในการบรรจุคอลัมน์

d_p = ขนาดเฉลี่ยของสารแขั่งรองรับ

เทอม A จะเกี่ยวข้องกับสารแขั่งรองรับ ค่า d_p ควรจะมีขนาดเล็ก เพื่อให้ค่า A มีค่าน้อย ฉะนั้นขนาดของสารแขั่งรองรับควรมีขนาดเล็กและขนาดสม่ำเสมอ เมื่อเวลายาวจะเกิดช่องว่างระหว่างสารแขั่งรองรับให้น้อยที่สุด

$$B = 2 \gamma D_{gas}$$

เมื่อ γ = ค่าคงที่ซึ่งเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของก๊าซพาในคอลัมน์

D_{gas} = diffusion coefficient ของส่วนที่เป็นก๊าซ

เทอม B ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับก๊าซพา ค่า D_{gas} ควรจะน้อยที่สุด เพื่อค่า B จะได้มีค่าน้อยที่สุดด้วย ซึ่งควรเลือกใช้ก๊าซพาที่มีความหนาแน่นสูง

$$C = \frac{8k' d_f^2}{\eta^2 (1+k')^2 D_{liq}}$$

k' = capacity factor คือปริมาณสารตัวอย่างที่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปในเฟสที่เป็นของเหลวเทียบกับเฟสที่เป็นก๊าซ

d_f = ความหนาของเฟสที่เป็นของเหลวบนสารแข็งรองรับ

D_{liq} = diffusion coefficient ของส่วนที่เป็นของเหลว

เทอม C เกี่ยวข้องกับเฟสที่เป็นของเหลว เทอม C จะน้อยที่สุด

เมื่อ k' มีค่ามากที่สุด, d_f มีค่าน้อยที่สุด และ D_{liq} มีค่ามากที่สุด

k' จะมีความมากที่สุด เมื่อเลือกเฟสที่เป็นของเหลวให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างเพื่อให้สารตัวอย่างนั้นเคลื่อนที่เข้าไปในเฟสที่เป็นของเหลวมากที่สุด

d_f จะมีความน้อยที่สุด เมื่อใช้เฟสที่เป็นของเหลวเคลือบบนสารแข็งรองรับให้บางที่สุด

D_{liq} มีความมากที่สุดเมื่อ เฟสที่เป็นของเหลวมีความหนืดน้อยที่สุด

จาก "rate theory" นี้สามารถบอกได้ว่าแพคเตอร์ใดบ้างที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ และควรทำอย่างไรเพื่อให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีขึ้น

เมื่อพล็อตกราฟระหว่างความสูงที่เทียบเท่าขนาดของเส้นทางทฤษฎีกับอัตราการไหลของก๊าซพาจะได้อกราฟดังรูปที่ 3.9 อัตราการไหลของก๊าซพาที่เหมาะสมเพื่อจะให้คอลัมน์มีประสิทธิภาพดีที่สุดอยู่ตรงตำแหน่งที่ความสูงที่เทียบเท่าขนาดของเส้นทางทฤษฎีมีค่าน้อยที่สุด

จากสมการ 2.4 สามารถหา HETP และ U ที่น้อยที่สุด (H_{min} และ U_{min}) ของคอลัมน์ใด ๆ ได้ดังนี้

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

$$\frac{B}{U^2} = C$$

$$U_{\min} = \left(\frac{B}{C}\right)^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(2.5)$$

แทนค่า U_{\min} ในสมการ 2.4 จะได้

$$H_{\min} = A + 2(BC)^{\frac{1}{2}} \dots\dots\dots(2.6)$$

ในงานวิจัยนี้ได้หาจำนวนแผ่นทางทฤษฎีและอัตราการไหลของก๊าซที่เหมาะสมโดยฉีดเมทิลแซคคารินเข้มข้น $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาตร $1 \mu\text{l}$ ที่อัตราการไหลของก๊าซต่าง ๆ กัน โดยเริ่มที่ประมาณ $28 \text{ cm}^3/\text{นาที}$ ใช้แอทเทนนิวเอเตอร์ (attenuator) 32 อัตราเร็วของกระดาษบันทึกสัญญาณ $6 \text{ cm.}/\text{นาที}$ อุณหภูมิของคอลัมน์ 220°C อุณหภูมิของอินเจกเตอร์ (injector) และดีเทคเตอร์ (detector) 250°C ผลการทดลองหาอัตราการไหลของก๊าซที่เหมาะสมนี้แสดงในตารางที่ 3.5

จากรูปที่ 3.8 พบว่าอัตราการไหลของก๊าซที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ประมาณ $64 \text{ cm}^3/\text{นาที}$ A มีค่า 0.03 มม. ค่า B และ C สามารถหาได้จากสมการ 2.5 และ 2.6 ซึ่ง $B = 18.4 \text{ มม. cm}^3/\text{นาที}$ $C = 3.97 \times 10^{-3} \text{ มม. นาที/cm}^3$.

2.3.7 การหาเส้นยี่ริ (linearity) ของเครื่องตรวจจับ (detector)

เป็นการศึกษาช่วงที่สัญญาณเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร ซึ่งจะมีประโยชน์ในการเลือกใช้ความเข้มข้นของสารในการทำกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

การหาดีเอ็นเอ (linearity) ของเครื่องตรวจจับที่เป็นแบบเฟลม ไอออนไนซ์ เซชันนี้ทำโดยการฉีดสารละลายมาตรฐานเมทิลแซคคารินปริมาณต่าง ๆ กันที่อุณหภูมิคอลัมน์ 220°C อุณหภูมิอินเจกเตอร์และเครื่องตรวจจับ 250°C อัตราการไหลของก๊าซพา $64 \text{ cm}^3/\text{นาที่}$ ความดันของอากาศ 25 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ความดันของไฮโดรเจน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อัตราเร็วของกระดาษบันทึกสัญญาณ $1 \text{ cm.}/\text{นาที่}$ หากความสูงของพีค (peak) เมื่อปริมาณของสารมีค่าต่าง ๆ กันแล้วพลอตกราฟระหว่างปริมาณของสารกับความสูงของพีค จากกราฟหาช่วงที่เป็นเส้นตรง และหาช่วงที่ความสัมพันธ์แบบเส้นตรงสิ้นสุด (linearity cut off) ได้ ผลการหาดีเอ็นเอแสดงอยู่ในตารางที่ 3.10 ส่วนกราฟแสดงดีเอ็นเอ (linearity curve) แสดงอยู่ในรูปที่ 3.12

2.3.8 การเตรียมเอ็น-เมทิลแซคคาริน⁽⁴¹⁾ (N-methyl saccharin)

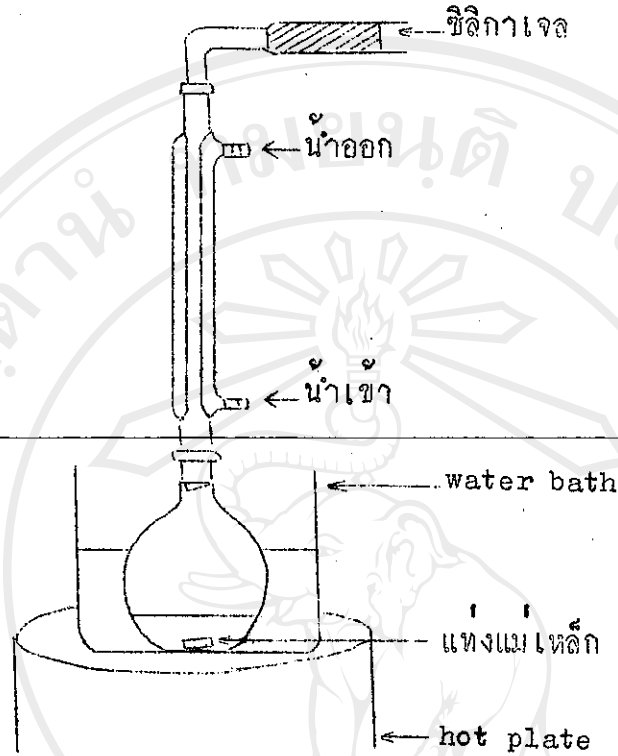
ใช้แซคคาริน 2 กรัม ละลายในอะซีโตน 50 cm^3 เดิมแอมไฮครัส โปแตสเซียมคาร์บอเนต 2 กรัม และไดเมทิลซัลเฟต 15 cm^3 นำไปรีฟลักซ์ (reflux) และคนตลอดเวลาโดยใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) เป็นเวลาประมาณ 90 นาที แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องกรองเอาโปแตสเซียมคาร์บอเนตออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ความดันจนแห้ง กากที่เหลือนำไปละลายในไดเอทิลอีเทอร์จนละลายหมด แล้วล้างด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 2% ปริมาตร 70 cm^3 นำชั้นของไดเอทิลอีเทอร์มาคูดน้ำออกโดยโซลันไฮครัสโซเดียมซัลเฟต กรองเอาโซเดียมซัลเฟตออก สารละลายที่ได้นำไประเหยให้แห้งภายใต้ความดันจนได้เอ็น-เมทิลแซคคารินเป็นตะกอนสีขาว นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยเอาไปตกผลึกโดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลายได้ผลึกของเอ็น-เมทิลแซคคารินเป็นรูปเข็ม มีจุด

หลอมเหลว (melting point) $130-132^{\circ}\text{C}$ นำผลึกที่ได้ไปพิสูจน์โครงสร้างโดยใช้ไออาร์สเปกโตรโฟโตเมทรี (IR spectrophotometry) และเอ็นเอ็มอาร์ (NMR) สำหรับอินฟราเรดสเปกตรัม (infrared spectra) และเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (NMR spectra) ของแซคคาริน และเอ็น-เมทิลแซคคาริน แสดงในรูปที่ 3.2, 3.3, 3.4 และ 3.5 ตามลำดับ

อนึ่ง ในการศึกษาวิจัยนี้ได้กำจัดน้ำออกจากอะซีโตนโดยนำมากลั่นใหม่ ขณะกลั่นเติมแอนไฮดรัสโปแตสเซียมคาร์บอเนตด้วย ส่วนโปแตสเซียมคาร์บอเนตก่อนใช้ได้เอาไปแอกทีเวท (activate) โดยเอามาทำให้เป็นผงละเอียดแล้วเอาไปอบที่อุณหภูมิ 125°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ที่ปราศจากอากาศ (vacuum desiccator)

2.3.9 การเตรียมกราฟมาตรฐาน⁽⁴²⁾ (calibration curve) ของแซคคาริน

ใช้แซคคารินปริมาณต่าง ๆ กันในช่วง 2-10 มก. มาทำเมทิลเลชัน โดยละลายในอะซีโตน 20 cm^3 เติมแอนไฮดรัสโปแตสเซียมคาร์บอเนตประมาณ 0.1 กรัม แล้วเติมโคเมทิลซัลเฟต 1.5 cm^3 เอาไปรีฟลักซ์ (reflux) ใน water bath เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองเอาโปแตสเซียมคาร์บอเนตออก จากนั้นนำไประเหยให้แห้งโดยกลั่นภายใต้ความดัน เติมน้ำละลายเมทิลพอลมีเทท 3.5 cm^3 ลงไปในภาชนะที่เหลือ แล้วทำสารละลายให้เจือจางด้วยอะซีโตนจนปริมาตรครบ 10 cm^3



รูปที่ 2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทำเมทิลเลชัน

2.3.10 การสกัดแซคคารินออกจากสารตัวอย่าง

ดูดสารละลายตัวอย่างมาประมาณ 50 cm^3 มาใส่ในกรวยแยกทำให้เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ 25 cm^3 2 ครั้ง ล้างชั้นไดเอทิลอีเทอร์ด้วยน้ำ 20 cm^3 2 ครั้ง ทิ้งชั้นไดเอทิลอีเทอร์เอาชั้นน้ำมารวมกันทำให้เป็นกรดด้วยกรดเกลือ 10 % จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์จนกระทั่งสารละลายอิ่มตัว จึงสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 3 ครั้ง ๆ ละ 50 cm^3 คูกน้ำออกจากชั้นเอทิลอะซีเตทโดยใช้แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟตเป็นตัวคูกน้ำ กรอง

เอาโซเดียมซัลเฟตออก สารละลายที่ได้นำไประเหยให้แห้งโดยกลั่นภายใต้ความดัน
 กากที่เหลือจะเป็นแซคคารินที่สกัดได้ แล้วเอาไปทำเมทิลเลชัน (methylation)
 ตามวิธีที่ได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อ 2.3.8

การคำนวณหาปริมาณแซคคารินในสารตัวอย่าง

กำหนดให้ V_1 = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้สกัดมีหน่วยเป็น cm^3

a = ความเข้มข้นของแซคคารินที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐานมีหน่วยเป็น
 มก./cm^3

V_2 = ปริมาตรสุดท้ายก่อนฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟีมีหน่วยเป็น cm^3

ความเข้มข้นของแซคคารินที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน = a มก./cm^3

\therefore ปริมาตรสุดท้ายก่อนฉีดคือ V_2 มีปริมาณแซคคาริน = $V_2 a$ มก.

นั่นคือ ปริมาตรของสารตัวอย่าง V_1 cm^3 มีปริมาณแซคคาริน = $V_2 a$ มก.

\therefore เปอร์เซ็นต์ของแซคคารินในสารตัวอย่าง = $\frac{100 V_2 a}{V_1}$

ตัวอย่างการหาปริมาณแซคคารินในน้ำกระเทียมคอง

ความเข้มข้นของแซคคารินที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน = 0.65 มก./cm^3

\therefore ปริมาตรสุดท้ายก่อนฉีด 10 cm^3 มีแซคคาริน = 0.65×10 มก.

นั่นคือ ปริมาตรสารตัวอย่าง 5 cm^3 มีแซคคาริน = 0.65×10 มก.

\therefore ปริมาณของแซคคารินในสารตัวอย่าง = $\frac{0.65 \times 10 \times 100}{5}$

= 130 %

เอาชั้นของปิโตร เลียมอีเทอร์ไปฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟ โดยมีเงื่อนไขของการทดลองดังนี้

- อุณหภูมิของคอลัมน์ 80°C
- อุณหภูมิอินเจกเตอร์ (injector) 150°C
- อุณหภูมิเครื่องตรวจจับ (detector) 150°C
- อัตราการไหลของก๊าซพา $64 \text{ cm}^3/\text{นาที}$
- ความดันอากาศ 25 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- ความดันไฮโดรเจน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- แอทเทนนูเอเตอร์ (attenuator) 32

โครมาโตแกรมของไซโคลเฮกซีนแสดงอยู่ในรูปที่ 3.25

2.3.13 การหาความแม่นยำ (precision) ของการวิเคราะห์

นำสารตัวอย่างมาหาปริมาณแซคคารินโดยวิธีที่ใดก็ตามมาแล้วในหัวข้อที่ 2.3.10 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย (mean), ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation) ตามวิธีดังต่อไปนี้

(1) mean (\bar{X}) หาจากสูตร

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$$

X = ข้อมูลแต่ละค่า

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

(2) standard deviation (SD)

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

(3) relative standard deviation (RSD)

$$RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

สำหรับค่าความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทำโดยวัดปริมาณแคดคาร์บินในสารตัวอย่างชนิดเดียวกันโดยวัดซ้ำกัน 10 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ตามวิธีดังกล่าวแล้วข้างตน

2.5.14 การหาความถูกต้อง (accuracy)

การหาความถูกต้องหาออกในรูปร้อยละของการกลับคืน (percent recovery) ทำโดยเพิ่มสารละลายมาตรฐานของสารที่ทำกรวิเคราะห์ในปริมาณที่ทราบแน่นอนลงในสารตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารที่เติมลงไป

ในงานวิจัยนี้เติมสารละลายมาตรฐานแคดคาร์บินลงในสารตัวอย่าง แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแคดคาร์บินที่เติมลงไปตามวิธีดังต่อไปนี้

(1) หาปริมาณแคดคาร์บินในสารตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานแคดคาร์บินโดยวิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ

(2) ทำการเติมสารมาตรฐาน (standard addition) โดยการเติมสารละลายมาตรฐานแคดคาร์บินปริมาณต่าง ๆ กันลงในสารตัวอย่าง แล้วหาปริมาณแคดคาร์บินทั้งหมดโดยวิธีเดียวกัน

(3) นำปริมาณแซคคารินที่หาได้ใน (2) หักออกด้วยปริมาณแซคคารินที่หาได้ใน (1) จะได้ปริมาณแซคคารินที่หาได้

(4) นำปริมาณแซคคารินที่หาได้จาก (3) หารด้วยปริมาณแซคคารินที่เติมลงไป แล้วคูณผลที่ได้ด้วย 100 ก็จะเป็นร้อยละของการกลับคืน (percent recovery) ของเทคนิคนี้

$$\text{percent recovery} = \frac{\text{amount found}}{\text{amount taken}} \times 100$$

amount found = ปริมาณแซคคารินของสารละลายมาตรฐานที่หาได้

amount taken = ปริมาณแซคคารินของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

ตัวอย่างการหาร้อยละของการกลับคืน (percent recovery) ของแซคคารินโดยใช้น้ำลูทอเป็นสารตัวอย่าง

ปริมาณแซคคารินที่ตรวจพบในสารตัวอย่าง = 2.6 มก.

ปริมาณแซคคารินที่เติมลงไป = 0.76 มก.

ปริมาณแซคคารินทั้งหมดที่ตรวจพบ = 3.3 มก.

∴ ปริมาณแซคคารินที่หาได้ = 3.3 - 2.6 = 0.7 มก.

ร้อยละของการกลับคืน = $\frac{0.7 \times 100}{0.76}$

= 92.11

2.3.15 การหาพื้นที่ใต้พีค

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้นำพื้นที่ใต้พีคโดยใช้วิธีตัดกระดาษซึ่งแล้วเปลี่ยนน้ำหนักของกระดาษมาเป็นพื้นที่ ซึ่งในที่นี้ได้ตัดโครมาโตแกรมที่ได้ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการตัดกระดาษให้หนอยลงโดยการเพิ่มความเร็วของกระดาษบันทึกสัญญาณให้มากกว่าปกติ พบว่าความเร็วของกระดาษบันทึกสัญญาณที่เหมาะสมเป็น 2 ซม./คอรนาที และพื้นที่ของกระดาษบันทึกสัญญาณ 100 มม²หนัก 0.0062 กรัม (โดยเฉลี่ย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved