

การทำนายค่าเวลาคงค้างของสารในโครมาโตกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส

ภัทรภรณ์ แก้วกุล¹ และ คณิต กฤษณังกูร²

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

รับเมื่อ 23 กุมภาพันธ์ 2550 ตอรับเมื่อ 8 ตุลาคม 2550

บทคัดย่อ

การแยกสารในโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส อาศัยหลักการแยกสารด้วยการแบ่งละลายของสารตัวอย่างระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคนิ่งเช่นเดียวกันกับในแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแก๊ส-ของเหลว ซึ่งแตกต่างกันที่วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ในโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟสเป็นตัวทำละลายหรือของเหลวส่วนแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแก๊ส-ของเหลวเป็นแก๊สเฉื่อย ดังนั้น เมื่อนำสมการทำนายการเคลื่อนที่ของสารในแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแก๊ส-ของเหลวที่เสนอโดย Krisnangkura และคณะ ($\ln k = a+bz+c/T+dz/T$) มาทำนายค่าเวลาคงค้าง (ปริมาตรคงค้าง) ของสารนอร์มัลแอลเคน (C_6-C_{12}) ที่ชะออกจากคอลัมน์ Nucleosil ODS ที่อุณหภูมิระหว่าง 20-40 °ซ มีค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.01 นาที หรือคิดเป็นร้อยละ 0.19 สำหรับสารนอร์มัลอัลคิล-เบนซีน (C_6-C_{12}) ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายระหว่างเมทานอลกับน้ำอัตราส่วน 4:1 และ 9:1 ชะออกจากคอลัมน์ Hypersil C₁₈ ระหว่างอุณหภูมิ 29.2 - 51 °ซ พบว่า ค่าตัวประกอบคงค้างคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.24 หรือคิดเป็นร้อยละ 2.03 และ 0.13 หรือคิดเป็นร้อยละ 2.85 ตามลำดับ

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสามารถเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ได้หลายชนิดกว่าแก๊สโครมาโตกราฟี เพื่อที่จะแยกสารผสมออกจากกันให้ได้ดีที่สุด แต่องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อการทำนายค่าเวลาคงค้างของสาร โดยทำให้ค่าคงที่ทั้งสี่ของคอลัมน์เปลี่ยนแปลง

คำสำคัญ : โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรีเวอร์สเฟส / ค่าเวลาคงค้างของสาร

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

² รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Forecasting of Solute Retention Time in Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Phattaraporn Kaewkool¹ and Kanit Krisnangkura²

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakam, Bangkhuntien, Bangkok 10150

Received 23 February 2007 ; accepted 8 October 2007

Abstract

Solutes are separated in a reversed phase HPLC (RP-HPLC) according to their partitions between stationary and mobile phases. The separation principle is very similar to that of gas liquid chromatography (GLC). The difference is the mobile phases, where solvent (s) or liquid is used as the mobile phase in HPLC while an inert gas is used as the mobile phase in GLC. Therefore, it is speculated that the equation proposed by Krisnangkura et al ($\ln k = a + bz + c/T + dz/T$) for predicting retention in GLC should be able to predict the solutes retention times (or volumes) in RP-HPLC at different temperatures and flow rates. For *n*-alkanes ($C_6 - C_{12}$) eluted from Nucleosil ODS column between 20 -40 °C, the highest difference between the experimental and predicted values was 0.01 min. or 0.19%. For *n*-alkyl benzenes eluted by methanol-water (4:1 and 9:1 w/w) from Hypersil C_{18} column between 30 – 51 °C, the highest differences in *k* values were 0.242 or -2.03% and 0.131 or 2.85 %, respectively.

HPLC is more versatile than GLC in term of the selectivity of the mobile phases and they can be tailored for the best separation of a mixture, but it is considered as a draw back in term of the prediction of the solute retention time because the 4 column constants are changed as the mobile phase (or mobile phase composition) is changed.

Keywords : Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography / Retention Time

¹ Graduate student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

² Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของสารในแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) สามารถทำได้หลายวิธีด้วย เช่น การเปรียบเทียบจากค่าเวลาคงค้าง (retention time; t_R) และ ปริมาตรคงค้าง (retention volume; V_R) [1] หรือการใช้ ค่าคงค้างสัมพัทธ์ (relative retention; α) เทียบกับสาร อ้างอิงวิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่จะมีข้อจำกัดหลายประการ และการใช้ค่าดัชนีคงค้าง (retention index; I) [2] จะใช้ เพียงสารหม่อนุกรมฟังก์ชันนอร์มัลแอลเคนเป็นสารอ้างอิง วิธีนี้เป็นที่ยอมรับว่ามีความแม่นยำสูง แต่ก็ยังไม่สะดวก ต่อการนำไปใช้งาน เนื่องจากต้องจัดสารอ้างอิงร่วมกับ สารตัวอย่างทุกครั้งทีวิเคราะห์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1997

Krisnangkura และคณะ [3] ได้เสนอสมการทำนายการ เคลื่อนที่ของสารในแก๊สโครมาโตกราฟีแบบแก๊สของเหลว (gas liquid chromatography; GLC) โดยไม่ใช้สารอ้างอิง วิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการทำนายค่าเวลาคงค้างของสาร และวิเคราะห์เอกลักษณ์สารได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

สมการทำนายการเคลื่อนที่ของสารนี้ได้จากการโยง ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลาคงค้าง (retention time; t_R) และจำนวนคาร์บอน (carbon number; z) กับคุณสมบัติ ทางอุณหพลศาสตร์ของการถ่ายเทสารระหว่างวัฏภาค เคลื่อนที่ (mobile phase) และวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) มาใช้ทำนายการเคลื่อนที่ของสารใน GLC ดัง สมการที่ (1)

$$\ln \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = a + bz + \frac{c}{T} + \frac{dz}{T} \quad (1)$$

$$\text{โดย } a = \frac{\Delta S_0}{R} - \ln \beta, \quad b = \frac{\delta S}{R}, \quad c = \square \frac{\Delta H_0}{R} \quad \text{และ} \quad d = - \frac{\delta H}{R}$$

เมื่อ ΔH_0 และ ΔS_0 คือ ค่าเอนทัลปีและค่าเอนโทรปี มาตรฐานของการถ่ายเทสารสมมุติในหม่อนุกรมที่มี จำนวนคาร์บอนเป็นศูนย์ (หรือหมู่ฟังก์ชันของสารตัวอย่าง)

δH และ δS คือค่าเอนทัลปีและค่าเอนโทรปีที่ เปลี่ยนไปต่อหนึ่งอะตอมคาร์บอน

β คือ อัตราส่วนปริมาตรวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อวัฏภาค นิ่ง

R คือ ค่าคงที่ของแก๊ส (1.987 แคลอรี/โมล เคลวิน)

T คือ อุณหภูมิเคลวิน (เคลวิน; K)

t_M คือ ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้าง (hold-up time)

เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบ รีเวอร์สเฟส (reversed phase high performance liquid chromatography; RP-HPLC) ถูกนำมาใช้ กันอย่างแพร่หลายในงานแยกวิเคราะห์เอกลักษณ์ (qualitative analysis) และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ของสารต่างๆ ทั้งทางด้าน เภสัชกรรม ชีวเคมี เคมี การแพทย์ เกษตร อาหารและอื่นๆ

ซึ่ง RP-HPLC มีความเหมาะสมสำหรับแยกสารที่ไม่ เสถียรต่อความร้อน หรือระเหยกลายเป็นไอยาก [4]

การแยกสารใน RP-HPLC อาศัยหลักการแยกสาร ด้วยการแบ่งละลาย (partition) ของสารระหว่างวัฏภาค เคลื่อนที่กับวัฏภาคนิ่งเช่นเดียวกันกับใน GLC แต่จะแตกต่างที่วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้นั้นเป็นของเหลว ซึ่งในทาง อุณหพลศาสตร์เมื่อพิจารณาถึงสมดุลยภาพของโครมา โตกราฟี จะพิจารณาที่สภาวะสมดุลยภาพของสารทั้งหมด ในโซนหนึ่งๆ ของระบบเท่านั้น ดังนั้นถ้านำสมการที่ (1) มาใช้ทำนายค่าเวลาคงค้างของสารใน RP-HPLC ด้วยเหตุผลที่ว่าสมการที่ (1) อาศัยหลักการทาง อุณหพลศาสตร์ ของการละลายของสารระหว่างวัฏภาค เคลื่อนที่กับวัฏภาคนิ่งมาใช้ทำนายการเคลื่อนที่ของสาร นำจะเป็นไปได้ ดังจะเห็นได้จากการเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของสารใน RP-HPLC กับ พารามิเตอร์ต่างๆ ทางอุณหพลศาสตร์ ในปี ค.ศ. 1980 Vigh และ Varga [5] ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการแยกของสาร ใน RP-HPLC ด้วยคอลัมน์ Micropak CH-10 และ

Nucleosil C18 มี n-alkanols, n-alkanal dinitrophenyl hydrazones และ n-alkanone dinitrophenyl hydrazones เป็นสารตัวอย่าง และใช้เมทานอลเป็น วัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า $\log k$ กับ $1/T$ ค่า $\log k$ กับ z ค่า $-\Delta H^0$ กับ z และค่า $\log k$ กับ $-\Delta H^0$ มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง นั่นคือ ค่าตัวประกอบคงค้าง (k) เป็นฟังก์ชันทั้งอุณหภูมิและจำนวนคาร์บอน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงตั้งสมมุติฐานว่าสมการทำนาย การเคลื่อนที่ของสารที่เสนอโดย Krisnangkura และคณะ [3] สามารถนำมาใช้ในการทำนายค่าเวลาคงค้างของสารใน RP-HPLC ได้ถูกต้องแม่นยำเช่นเดียวกับ GLC

2. ทฤษฎีการเคลื่อนที่ของสารใน GLC

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลในโครมาโตกราฟีนั้นสามารถ วิเคราะห์ในเทอมของอุณหพลศาสตร์ (thermodynamics) [6] ดังสมการที่ (2) คือ

$$\ln k = - \frac{\Delta G^0}{RT} - \ln \beta \quad (2)$$

โดยที่ k คือตัวประกอบคงค้าง (retention factor) ของ สารมีค่าเท่ากับ

$$\Delta G^0 = \Delta H_0 - T\Delta S_0 + z\delta H - zT\delta S \quad (6)$$

$$\text{หรือ} \quad \Delta G^0 = (\Delta H_0 + z\delta H) - (T\Delta S_0 + zT\delta S) \quad (7)$$

แทนค่าสมการที่ (7) ลงในสมการที่ (2) จะได้

$$\ln k = - \frac{(\Delta H_0 + z\delta H) - T(\Delta S_0 + z\delta S)}{RT} - \ln \beta \quad (8)$$

หรือ

$$\ln k = - \frac{\Delta H_0}{RT} - \frac{z\delta H}{RT} + \frac{\Delta S_0}{R} + \frac{z\delta S}{R} - \ln \beta \quad (9)$$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

และ t_R เป็นค่าเวลาคงค้างของสาร (retention time) t_M เป็นค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้าง (hold-up time) R เป็น ค่าคงที่ของแก๊ส T เป็นอุณหภูมิเคลวิน (เคลวิน; K) และ β เป็นอัตราส่วนของ วัฏภาคเคลื่อนที่ต่อวัฏภาคนิ่ง ΔG^0 เป็นค่าพลังงานอิสระมาตรฐานของการละลาย (free energy of solution) ของสารในอนุกรมฟังก์ชันเดียวกัน กับสารใดๆซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับผลต่างของค่า ΔH^0 (ค่าเอนทัลปีมาตรฐานของการละลาย; standard enthalpy of solution) และค่า ΔS^0 (ค่าเอนโทรปีมาตรฐานของ การละลาย; standard entropy of solution) คือ

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4)$$

สำหรับสารนอร์มัลแอลเคนความสัมพันธ์ของค่าพลังงาน อิสระมาตรฐานของการละลายสามารถเขียนได้เป็น

$$\Delta G^0 = \Delta G_0 + z\delta G \quad (5)$$

โดยที่ ΔG^0 เป็นค่าพลังงานอิสระที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ค่า δG เป็นค่าพลังงานอิสระที่ เปลี่ยนไปต่อหนึ่งหมู่เมทิลีน (methylene group) และ z เป็นจำนวนคาร์บอนอะตอมในโมเลกุล เมื่อแทนค่าสมการ ที่ (4) ลงในสมการที่ (5) จะได้

$$\text{หรือ} \quad \ln \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = a + bz + \frac{c}{T} + \frac{dz}{T} \quad (1)$$

$$\text{โดย} \quad a = \frac{\Delta S_0}{R} - \ln \beta, \quad b = \frac{\delta S}{R}, \quad c = -\frac{\Delta H_0}{R} \quad \text{และ} \quad d = -\frac{\delta H}{R}$$

สมการที่ (1) หรือ (9) เป็นสมการที่โยงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาคงค้างหรือตัวประกอบคงค้างกับพารามิเตอร์ทางอุณหพลศาสตร์ ซึ่งถูกนำมาใช้ทำนายการเคลื่อนที่ของสารและใช้วิเคราะห์เอกลักษณ์สารใน GLC ได้แม่นยำ

หากการอนโลมให้นำทฤษฎีทาง GLC มาใช้กับ RP-HPLC ได้ สมการที่ (1) หรือ (9) น่าจะใช้ทำนายการเคลื่อนที่ของสารใน RP-HPLC ได้แม่นยำเช่นกัน

3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารนอร์มัลแอลเคน (*n*-alkane; C₆-C₁₂) และสารนอร์มัลอัลคิลเบนซีน (*n*-alkyl benzenes; C₆-C₁₂) เป็นสารมาตรฐานจากบริษัทซิกมาเคมิคัล (สหรัฐอเมริกา) คอลัมน์แบบรีเวอร์สเฟส ได้แก่ คอลัมน์ Nucleosil ODS (250 x 4 ม.) จากบริษัท Macherey-Nagel (เยอรมัน) และคอลัมน์ Hypersil C₁₈ (500 x 41 ม.) จากบริษัท Shandon, Runcorn, Great Britain

3.2 โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ประกอบด้วย six port injector Model 7125 ของบริษัท Rheodyne Incorporated (Cotati, CA) บั๊ม Model 510 ของบริษัท Waters Associate (สหรัฐอเมริกา) เครื่องตรวจวัดแบบมาตรวัดดัชนีหักเห (Refractive index detector) รุ่น LCD 200 ของบริษัท PerkinElmer LAS (เยอรมัน) ต่อพ่วงกับเครื่องประมวลผล CR6A ของบริษัท Shimadzu (ญี่ปุ่น) การแยกวิเคราะห์สารทำโดยฉีดสารตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรเข้าคอลัมน์แบบรีเวอร์สเฟส อัตราการไหลของเมทานอล 1 ม./นาที่ (ตัวชะ, วัฏภาคเคลื่อนที่)

อุณหภูมิคอลัมน์ 20-40 °ซ สำหรับสารมาตรฐานนอร์มัลแอลเคน (C₆-C₁₂) และ 29.2 - 51 °ซ สำหรับสารนอร์มัลแอลคิลเบนซีน

3.3 การหาค่าคงที่ a, b, c และ d ของคอลัมน์

ค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์หาตามวิธีของ Krisnangkura และ คณะ(1997) [3] โดยการฉีดสารมาตรฐานนอร์มัลแอลเคน (C₆-C₁₂) ที่อุณหภูมิคงที่ 20-40 °ซ ห่างกันช่วงละ 5 °ซ

เมื่อกำหนดให้จำนวนคาร์บอน (z) คงที่ สมการที่ (1) จะลดรูปลงเหลือ

$$\ln k = a' + \frac{b'}{T} \quad (10)$$

$$\text{โดยที่} \quad a' = a + bz \quad (11)$$

$$b' = c + dz \quad (12)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง a' กับ z จะได้จุดตัดแกน y เท่ากับ a และ ความชันเท่ากับ b และเมื่อเขียนกราฟระหว่าง b' กับ z จะได้จุดตัดแกน y เท่ากับ c และ ความชันเท่ากับ d

เมื่อพิจารณาให้อุณหภูมิคงที่ สมการที่ (1) จะลดรูปลงเหลือ

$$\ln k = a'' + b''z \quad (13)$$

$$\text{โดยที่} \quad a'' = a + \frac{c}{T} \quad (14)$$

$$b'' = b + \frac{d}{T} \quad (15)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง a'' กับ $1/T$ จะได้จุดตัดแกน y เท่ากับ a และความชันเท่ากับ c และเมื่อเขียนกราฟระหว่าง b'' กับ $1/T$ จะได้จุดตัดแกน y เท่ากับ b และ ความชันเท่ากับ d

อย่างไรก็ตามค่าคงที่ทั้งสี่สามารถคำนวณค่าได้ง่าย โดยแทนค่าเวลาคงค้าง อุณหภูมิ และจำนวนคาร์บอนที่ได้ใส่ลงใน Microsoft Excel (version 8.0) ดังแสดงไว้ในผลการทดลองตารางที่ 1

4. ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ค่าคงที่ของคอลัมน์

ค่าคงที่ทั้งสี่ (a , b , c และ d) ของคอลัมน์นี้ได้จากการนำค่าเวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน 6 -12 อะตอม แยกบนคอลัมน์ Nucleosil ODS ตรวจสอบด้วยค่าดัชนีหักเหสาร ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ตั้งแต่ 20-40 °ซ ใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่อัตราการไหล 1 มล./นาที มาเขียนกราฟลอการิทึมธรรมชาติของตัวประกอบคงค้างของสารที่จำนวนคาร์บอนต่างๆ กับจำนวนคาร์บอนและส่วนกลับอุณหภูมิคอลัมน์ดังตารางที่ 1 ซึ่งค่าคงที่ทั้งสี่ (a , b , c และ d) ของคอลัมน์ที่ได้จากทั้งสองวิธีจะให้ค่าเท่ากัน

ตารางที่ 1 ค่าลอการิทึมธรรมชาติของตัวประกอบคงค้าง ($\ln k$) ของสารนอร์มัลแอลเคน (C_6-C_{12}) ที่แยกบนคอลัมน์ Nucleosil ODS (250 x 4 มม.) ใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่อัตราการไหล 1 มล./นาที ที่อุณหภูมิ 20-40 °ซ

| z | Natural logarithm of retention factor ($\ln k$) | | | | | intercept (a') | slope (b') | R ² |
|--------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------------------|---------------------|----------------|
| | 20 °C | 25 °C | 30 °C | 35 °C | 40 °C | | | |
| | 3.413* | 3.356* | 3.300* | 3.247* | 3.195* | | | |
| 6 | -0.636 | -0.657 | -0.678 | -0.692 | -0.707 | -1.755 | 327.48 | 0.9972 |
| 7 | -0.448 | -0.475 | -0.504 | -0.525 | -0.546 | -1.994 | 452.65 | 0.9985 |
| 8 | -0.258 | -0.293 | -0.327 | -0.355 | -0.382 | -2.208 | 570.89 | 0.9990 |
| 9 | -0.069 | -0.110 | -0.151 | -0.187 | -0.220 | -2.436 | 693.24 | 0.9995 |
| 10 | 0.121 | 0.072 | 0.024 | -0.017 | -0.056 | -2.664 | 815.51 | 0.9994 |
| 11 | 0.311 | 0.255 | 0.200 | 0.152 | 0.107 | -2.891 | 937.35 | 0.9996 |
| 12 | 0.499 | 0.436 | 0.375 | 0.319 | 0.268 | -3.119 | 1059.27 | 0.9997 |
| Intercept (a'') | -1.772 | -1.750 | -1.732 | -1.706 | -1.684 | -0.401 a | -402.10 c | 0.9979 |
| slope (b'') | 0.189 | 1.182 | 0.176 | 0.169 | 0.163 | -0.226 b | 121.76 d | 0.9999 |
| R ² | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | 1.0000 | |

* $1/7 \times 10^{-3}$ (K⁻¹)

แทนค่า a , b , c และ d ลงในสมการที่ (1) จะได้

$$\ln k = -0.401 - 0.226z - \frac{402.10}{T} + \frac{121.76z}{T} \quad (16)$$

เมื่อนำสมการที่ (16) นี้ไปทำนายค่าเวลาคงค้างสารที่ชะออกจากคอลัมน์ Nucleosil ODS ที่อุณหภูมิต่างๆ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 ผลการทำนายค่าเวลาคงค้างให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.01 นาที หรือคิดเป็นร้อยละ 0.19 นั่นคือ RP-HPLC สามารถใช้ทฤษฎีการทำนายการเคลื่อนที่ของสารของ GLC ที่เสนอโดย Krisnangkura และคณะ [3] ได้ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่นำมาใช้ต้องมีความถูกต้อง

4.2 ผลของวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อค่าคงที่ของคอลัมน์

ค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์จะเป็นค่าเฉพาะตัวของสารในหมู่อนุกรมฟังก์ชันหนึ่งๆ กับวัฏภาคหนึ่งๆ เท่านั้น ซึ่งใน GLC จากการศึกษาปัจจัยต่างๆ พบว่าความยาวคอลัมน์ไม่มีผลต่อค่าคงที่ทั้งสี่ของคอลัมน์ [7] แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางนั้นจะมีผลต่อค่า a เท่านั้น หากทราบค่า β ก็สามารถปรับแก้ค่า a ให้ถูกต้อง

$$\ln k = -2.477 - 0.312z + \frac{545.07}{T} + \frac{214.72z}{T} \quad (17)$$

$$\ln k = -2.491 - 0.216z + \frac{379.98}{T} + \frac{151.06z}{T} \quad (18)$$

การที่อัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่เปลี่ยนไปมีผลให้ค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์เปลี่ยนไปนั้น เกิดจากการถ่ายเทมวลระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่กับวัฏภาคนิ่ง นั่นคือ สารเกิดการแบ่งละลายระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีน้ำในระบบมาก (4:1) ได้น้อยกว่าในวัฏภาคนิ่ง ซึ่งทำให้สารเกิดการคงค้างอยู่ในคอลัมน์นาน และสารถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีน้ำในระบบน้อยกว่า (9:1)

และเมื่อนำสมการที่ (17) และ (18) ไปทำนายค่าตัวประกอบคงค้างสารที่ชะออกจากคอลัมน์ Hypersil C₁₈ ที่

ได้ [8] วัฏภาคเคลื่อนที่ใน GLC มักไม่เปลี่ยน ส่วนอัตราการไหลก็ไม่มีผลต่อค่าตัวประกอบคงค้าง ดังนั้น ค่าคงที่ทั้งสี่ใน GLC จึงไม่เปลี่ยน แต่สำหรับ RP-HPLC วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวและมีการเปลี่ยนชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่บ่อยๆ เพื่อให้การแยกสารได้ดี ซึ่งวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีความสำคัญต่อการคงค้างของสารตัวอย่างอย่างมากๆ น่าจะส่งผลให้ค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์นั้นเปลี่ยนแปลงตามชนิดวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังเช่นค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์ Hypersil C₁₈ (500 x 41 มม.) ในการแยกสารนอร์มัลแอลคิลเบนซีน ที่สภาวะอุณหภูมิคงที่ตั้งแต่ 29.2 - 51 °ซ โดยมีเมทานอลกับน้ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราส่วน 4:1 จะมีค่าคงที่ทั้งสี่ดังสมการที่ (17) เมื่อเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลกับน้ำที่อัตราส่วน 9:1 ค่าคงที่ทั้งสี่จะเปลี่ยนไปดังสมการที่ (18)

อุณหภูมิต่างๆ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ผลการทำนายให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุดคิดเป็น 0.24 หรือร้อยละ 2.03 และ 0.13 หรือร้อยละ 2.85 ตามลำดับ ซึ่งถือว่าสมการมีความแม่นยำเช่นกัน นอกจากนี้ยังแสดงว่าค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่นำมาใช้ในการหาค่าตัวประกอบคงค้างมีความถูกต้อง และจากการทดลองพบว่าค่าตัวประกอบคงค้างของสารนอร์มัลแอลคิลเบนซีนจะมีค่าเพิ่มขึ้นตามความยาวคาร์บอน และมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น [9]

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่าเวลาคงตัวที่ได้จากการคำนวณกับค่าเวลาคงตัวที่ได้จากทดลองของสารออร์มีลแอลเคน (C_6-C_{12}) ที่แยกกันคอลัมน์ Nucleosil ODS (250 x 4 มม.) ใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 20 - 40 °ซ

| z | Temperature | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|-----------------------|------------|
| | 20 °ซ ($t_M^a = 2.117$) | | | 25 °ซ ($t_M^a = 2.094$) | | | 30 °ซ ($t_M^a = 2.070$) | | | 35 °ซ ($t_M^a = 2.044$) | | | 40 °ซ ($t_M^a = 2.018$) | | |
| | $t_{R(\text{exp})}^b$ | $t_{R(\text{cal})}^c$ | % Δ | $t_{R(\text{exp})}^b$ | $t_{R(\text{cal})}^c$ | % Δ | $t_{R(\text{exp})}^b$ | $t_{R(\text{cal})}^c$ | % Δ | $t_{R(\text{exp})}^b$ | $t_{R(\text{cal})}^c$ | % Δ | $t_{R(\text{exp})}^b$ | $t_{R(\text{cal})}^c$ | % Δ |
| 6 | 3.238 | 3.235 | -0.08 | 3.180 | 3.180 | -0.01 | 3.121 | 3.124 | 0.09 | 3.067 | 3.067 | -0.02 | 3.013 | 3.010 | -0.08 |
| 7 | 3.470 | 3.468 | -0.04 | 3.396 | 3.397 | 0.02 | 3.321 | 3.326 | 0.15 | 3.253 | 3.255 | 0.05 | 3.187 | 3.186 | -0.04 |
| 8 | 3.753 | 3.750 | -0.08 | 3.656 | 3.657 | 0.03 | 3.562 | 3.567 | 0.14 | 3.477 | 3.478 | 0.02 | 3.395 | 3.392 | -0.09 |
| 9 | 4.093 | 4.090 | -0.07 | 3.969 | 3.970 | 0.02 | 3.850 | 3.854 | 0.11 | 3.740 | 3.742 | 0.04 | 3.638 | 3.635 | -0.09 |
| 10 | 4.507 | 4.501 | -0.13 | 4.345 | 4.345 | -0.01 | 4.190 | 4.197 | 0.16 | 4.053 | 4.054 | 0.03 | 3.926 | 3.920 | -0.14 |
| 11 | 5.005 | 4.998 | -0.14 | 4.795 | 4.795 | -0.01 | 4.599 | 4.605 | 0.12 | 4.423 | 4.424 | 0.03 | 4.263 | 4.256 | -0.16 |
| 12 | 5.603 | 5.598 | -0.09 | 5.331 | 5.334 | 0.06 | 5.081 | 5.091 | 0.19 | 4.857 | 4.862 | 0.11 | 4.657 | 4.652 | -0.11 |

$$\% \Delta = [(t_{R(\text{cal})} - t_{R(\text{exp})}) / t_{R(\text{exp})}] \times 100$$

^a t_M = calculated according to Guardino *et al.* [10]

^b $t_{R(\text{exp})}$ = data from Möckel [11]

^c $t_{R(\text{cal})}$ = $k t_M + t_M$

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่าตัวประกอบคงค้างที่ได้จากการคำนวณกับค่าตัวประกอบคงค้างที่ได้จากทดลองของสารอินทรีย์อัลคิลเบนซีน (C₆-C₁₂) ที่แยกบนคอลัมน์ Hypersil C₁₈ (500 x 41 มม.) ใช้เมททานอลกับน้ำ 4:1 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 30 - 51 °ซ

| z | Temperature | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------------------------|---------------------------------|------|---------------------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|---------------------------------|-------|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| | 30 °ซ | | | 35.8 °ซ | | | 40.2 °ซ | | | 46.7 °ซ | | | 51 °ซ | | |
| | k ^a _(exp) | k ^b _(cal) | %Δ | k ^a _(exp) | k ^b _(cal) | %Δ | k ^a _(exp) | k ^b _(cal) | %Δ | k ^a _(exp) | k ^b _(cal) | %Δ | k ^a _(exp) | k ^b _(cal) | %Δ |
| 6 | 5.43 | 5.46 | 0.54 | 4.88 | 4.87 | -0.14 | 4.54 | 4.48 | -1.24 | 3.94 | 3.98 | 1.04 | 3.66 | 3.69 | 0.81 |
| 7 | 8.06 | 8.11 | 0.64 | 7.20 | 7.15 | -0.76 | 6.56 | 6.51 | -0.76 | 5.73 | 5.70 | -0.52 | 5.18 | 5.24 | 1.09 |
| 8 | 11.93 | 12.05 | 1.03 | 10.52 | 10.48 | -0.41 | 9.42 | 9.45 | 0.35 | 8.27 | 8.16 | -1.30 | 7.45 | 7.43 | -0.25 |
| 9 | 17.82 | 17.91 | 0.50 | 15.39 | 15.36 | -0.18 | 13.84 | 13.73 | -0.83 | 11.93 | 11.69 | -2.03 | 10.41 | 10.55 | 1.31 |
| 10 | 26.39 | 26.61 | 0.83 | 22.62 | 22.52 | -0.43 | 20.04 | 19.93 | -0.55 | 16.63 | 16.74 | 0.64 | 14.87 | 14.97 | 0.66 |
| 11 | 39.26 | 39.54 | 0.71 | 33.30 | 33.03 | -0.83 | 29.09 | 28.94 | -0.52 | 24.09 | 23.97 | -0.52 | 21.10 | 21.24 | 0.68 |
| 12 | 58.16 | 58.75 | 1.01 | 48.86 | 48.42 | -0.89 | 42.36 | 42.02 | -0.81 | 34.23 | 34.32 | 0.25 | 29.86 | 30.15 | 0.97 |

$$\% \Delta = [(k_{(cal)} - k_{(exp)}) / k_{(exp)}] \times 100$$

^ak_(exp) = data from Grushka et al. [9]

$${}^b k_{(cal)} = \exp \left(-2.477 - 0.312z + \frac{545.07}{T} + \frac{214.72z}{T} \right)$$

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าตัวประกอบคงตัวที่ได้จากการคำนวณกับค่าตัวประกอบคงตัวที่ได้จากทดลองของสารออร์มัลลิลเคิลเบนซีน (C_6-C_{12}) ที่แยกบนคอลัมน์ Hypersil C_{18} (500×41 มม.) ใช้เมทานอลกับน้ำ 9:1 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 29.2 - 50 °ซ

| z | Temperature | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|------------|
| | 29.2 °ซ | | | 35.8 °ซ | | | 40.8 °ซ | | | 46 °ซ | | | 50 °ซ | | |
| | $k_{(exp)}^a$ | $k_{(cal)}^b$ | % Δ | $k_{(exp)}^a$ | $k_{(cal)}^b$ | % Δ | $k_{(exp)}^a$ | $k_{(cal)}^b$ | % Δ | $k_{(exp)}^a$ | $k_{(cal)}^b$ | % Δ | $k_{(exp)}^a$ | $k_{(cal)}^b$ | % Δ |
| 6 | 1.60 | 1.63 | 1.80 | 1.49 | 1.49 | -0.23 | 1.39 | 1.39 | 0.06 | 1.29 | 1.30 | 0.82 | 1.22 | 1.24 | 1.40 |
| 7 | 2.16 | 2.17 | 0.47 | 1.96 | 1.96 | -0.52 | 1.84 | 1.82 | -1.14 | 1.70 | 1.69 | -0.72 | 1.59 | 1.60 | 0.36 |
| 8 | 2.88 | 2.89 | 0.40 | 2.61 | 2.58 | -1.03 | 2.44 | 2.38 | -2.50 | 2.19 | 2.19 | -0.00 | 2.04 | 2.06 | 0.90 |
| 9 | 3.82 | 3.85 | 0.86 | 3.45 | 3.41 | -1.30 | 3.14 | 3.11 | -0.90 | 2.85 | 2.84 | -0.29 | 2.64 | 2.66 | 0.58 |
| 10 | 5.09 | 5.13 | 0.86 | 4.62 | 4.49 | -2.85 | 4.08 | 4.07 | -0.25 | 3.69 | 3.69 | -0.07 | 3.41 | 3.43 | 0.45 |
| 11 | 6.75 | 6.84 | 1.34 | 5.96 | 5.92 | -0.73 | 5.34 | 5.32 | -0.33 | 4.74 | 4.78 | 0.95 | 4.43 | 4.42 | -0.26 |
| 12 | 9.01 | 9.11 | 1.15 | 7.80 | 7.80 | -0.01 | 7.04 | 6.96 | -1.12 | 6.15 | 6.21 | 0.96 | 5.64 | 5.70 | 1.06 |

$$\% \Delta = [(k_{(cal)} - k_{(exp)}) / k_{(exp)}] \times 100$$

^a $k_{(exp)}$ = data from Grushka et al. [9]

$$^b k_{(cal)} = \exp \left(-2.491 - 0.216z + \frac{379.98}{T} + \frac{152.06z}{T} \right)$$

4.3 ความสำคัญของค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างต่อผลการทำนาย

ดังที่กล่าวมาข้างต้นว่าความแม่นยำของสมการทำนายการเคลื่อนที่ของสารที่เสนอโดย Krisnangkura และคณะ [3] จะขึ้นอยู่กับค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างด้วยนั้น เนื่องจากค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างมีความสำคัญในการนำไปใช้คำนวณค่าตัวประกอบคงค้าง (k) ค่าประสิทธิภาพการแยก (separation factor; α) และค่าอำนาจการแยก (resolution; R_s) [12] ถ้าค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างผิดพลาดจะทำให้การคำนวณเวลาคงค้างสารผิดพลาด นั่นคือ ผลการคำนวณค่าคงที่ทั้งสี่ (a , b , c และ d) ของคอลัมน์เกิดความผิดพลาด ส่งผลให้การทำนายค่าเวลาคงค้างของสารเกิดความคลาดเคลื่อนและการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารไม่แม่นยำ

การหาค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างใน RP-HPLC มีหลายวิธี เช่น การใช้เวลาคงค้างของเกลือสารอินทรีย์และอนินทรีย์ (inorganic and organic salts) [13] หรือ สารโมเลกุลขนาดเล็กๆ (unrestrained neutral marker) [14] เป็นเวลาของสารไม่คงค้าง วิธีนี้มีข้อจำกัดในการนำมาใช้งานคือจะต้องแน่ใจว่าสารที่นำมานั้นไม่คงค้างในคอลัมน์ ต่อมาได้มีการนำสมการทางคณิตศาสตร์มาใช้ ซึ่งวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารในหมู่อนุกรมฟังก์ชัน (linearization of solutes for homologous series) กับจำนวนคาร์บอน [5, 15, 16] ความสัมพันธ์เชิงเส้นนี้เป็นไปตามสมการของ Martin [17] ดังสมการที่ (19)

$$\log(t_R - t_M) = A + Bz \quad (19)$$

Peterson และ Hirsch [18] ได้แก้สมการ (19) นี้โดยใช้สารหมู่อนุกรมฟังก์ชันของสารนอร์มัลแอลเคน 3 ตัวสุดท้ายที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น z , $z+1$ และ $z+2$ ดังสมการที่ (20)

$$t_M = \frac{t_{R(z+1)}^2 - t_{R(z)} t_{R(z+2)}}{t_{R(z)} + t_{R(z+2)} - 2t_{R(z+1)}} \quad (20)$$

Berendsen [15] หาค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างจากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลาคงค้างของ sub sequent homologues ($t_{(z)}$ กับ $t_{(z+1)}$) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับนิยามของค่าสัมประสิทธิ์การแยก ดังสมการที่ (21) วิธีนี้นิยมใช้กันมากในการหาค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้าง ใน HPLC

$$t_{R(z+1)} = \alpha t_{R(z)} + (1-\alpha)t_M \quad (21)$$

ส่วน Guardino และคณะ [10] คำนวณหาค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างโดยใช้คอมพิวเตอร์คำนวณซ้ำ (iterative method) โดยการสมมติค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างเพื่อเขียนกราฟเส้นตรงระหว่างค่าลอการิทึมธรรมชาติของตัวประกอบคงค้างของสารมาตรฐานนอร์มัลแอลเคนกับจำนวนคาร์บอนดังสมการที่ (22) โดยค่อยๆ แปรค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างจนกระทั่งได้ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่ทำให้สมการที่ (22) มีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด วิธีนี้ใช้กันมากใน GLC แต่ยังไม่มีการนำมาใช้ใน HPLC การศึกษานี้ได้นำวิธีของ Guardino และคณะ [10] มาใช้ในการคำนวณหาค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้าง ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่คำนวณจากทั้งสามสมการจะให้ค่าแตกต่างกัน ผลแสดงดังตารางที่ 5

$$\ln \frac{(t_R - t_M)}{t_M} = az + b \quad (22)$$

ตารางที่ 5 แสดงค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่ได้จากการคำนวณทางคณิตศาสตร์ โดยใช้ข้อมูลของ Möckel [11]

| Methods | Temperature (°C) | | | | |
|---------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| t_M (Peterson) Eq.20 | 2.027 | 1.990 | 1.898 | 1.914 | 1.934 |
| t_M (Berendsen) Eq.21 | 2.109 | 2.084 | 2.062 | 2.036 | 2.010 |
| t_M (Guradino <i>et al.</i>) Eq.22 | 2.117 | 2.094 | 2.070 | 2.044 | 2.018 |

ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่คำนวณได้ด้วยวิธีของ Guardino และคณะ [10] เมื่อนำมาคำนวณหาค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์ Nucleosil ODS ผลแสดงดังตารางที่ 1 และสมการที่ (16) และจากข้อมูลของ Möckel [11] นี้ หากใช้เวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่หาได้ตาม

วิธีของ Peterson และ Hirsch [18] และ Berendsen [15] มาคำนวณหาค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์ Nucleosil ODS พบว่าค่าคงที่ทั้งสี่นี้เปลี่ยนแปลงไปดังสมการที่ (23) และ (24) ตามลำดับ

$$\ln k = 0.233 - 0.250z - \frac{526.35}{T} + \frac{125.73z}{T} \tag{23}$$

$$\ln k = 0.388 - 0.226z - \frac{401.10}{T} + \frac{121.54z}{T} \tag{24}$$

เมื่อนำสมการที่ (23) และ (24) ไปทำนายค่าเวลาคงค้างสารที่ชะออกจากคอลัมน์ Nucleosil ODS และจำนวนคาร์บอนที่อุณหภูมิต่างๆ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 7 และ 8 ซึ่งผลการทำนายค่าเวลาคงค้างที่ใช้ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่คำนวณด้วยวิธีของ Peterson และ Hirsch [18] ให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.09 นาที หรือคิดเป็นร้อยละ 2.94 และการทำนายจำนวนคาร์บอนให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.47 อะตอม ถือว่าผลการทำนายให้ค่าที่คลาดเคลื่อนสูง ส่วนผลการทำนายค่าเวลาคงค้างที่ใช้ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่คำนวณด้วยวิธีของ Berendsen [15] ให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.01 นาที หรือคิดเป็นร้อยละ 0.19 และการทำนายจำนวนคาร์บอนให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.03 อะตอม ถือว่าสมการมีความแม่นยำ แต่เมื่อเทียบผลการทำนายกับสมการที่ (16) ที่ใช้ค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่คำนวณด้วยวิธีของ Guardino และคณะ [10] ผลการทำนายค่าเวลาคงค้างของสารไม่แตกต่างกัน แต่ผลการทำนายจำนวนคาร์บอน

ของสมการที่ (16) ให้ค่าคลาดเคลื่อนสูงสุด 0.02 อะตอม ดังนั้นค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้างที่นำมาใช้จึงมีความสำคัญต่อผลการทำนายอย่างมาก

5. สรุปผลการทดลอง

สมการทำนายการเคลื่อนที่ของสารของ GLC ที่เสนอโดย Krisnangkura และคณะ [3] สามารถนำมาใช้ในการทำนายค่าเวลาคงค้างของสารใน RP-HPLC ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้ แต่ค่าคงที่ทั้งสี่ของคอลัมน์จะมีความจำเพาะต่อหมู่อนุกรมฟังก์ชันของสารและคอลัมน์ (วิภูภาคนี้) RP-HPLC ใช้วิภูภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว ฉะนั้นองค์ประกอบของวิภูภาคเคลื่อนที่จะมีผลต่อค่าคงที่ทั้งสี่ (a, b, c และ d) ของคอลัมน์ จึงเป็นข้อจำกัดเมื่อนำสมการมาใช้งานจำเป็นต้องใช้วิภูภาคเคลื่อนที่ตัวเดิม นั่นคือ หากประสงค์จะนำมาใช้ในการทำนายเวลาคงค้างสารใน HPLC แบบเกรเดียน (gradient systems) จะมีปัญหาอย่างมาก

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่าเวลาคงตัวที่ได้จากการคำนวณกับค่าเวลาคงตัวที่ได้จากทดลองของสารอินทรีย์แอลเคน (C_6-C_{12}) ที่แยกบนคอลัมน์ Nucleosil ODS (250 x 4 มม.) ใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 20 - 40 °ซ

| z | Temperature | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------------------------------|----------------|------------|------------------------------|----------------|------------|------------------------------|----------------|------------|------------------------------|----------------|------------|------------------------------|----------------|------------|
| | 20 °ซ ($t_M^a = 2.027$) | | | 25 °ซ ($t_M^a = 1.990$) | | | 30 °ซ ($t_M^a = 1.898$) | | | 35 °ซ ($t_M^a = 1.914$) | | | 40 °ซ ($t_M^a = 1.934$) | | |
| | $t_{R(exp)}^b$ | $t_{R(cal)}^c$ | % Δ | $t_{R(exp)}^b$ | $t_{R(cal)}^c$ | % Δ | $t_{R(exp)}^b$ | $t_{R(cal)}^c$ | % Δ | $t_{R(exp)}^b$ | $t_{R(cal)}^c$ | % Δ | $t_{R(exp)}^b$ | $t_{R(cal)}^c$ | % Δ |
| 6 | 3.238 | 3.267 | 0.88 | 3.180 | 3.191 | 0.35 | 3.121 | 3.029 | -2.94 | 3.067 | 3.041 | -0.85 | 3.013 | 3.059 | 1.54 |
| 7 | 3.470 | 3.509 | 1.13 | 3.396 | 3.416 | 0.59 | 3.321 | 3.232 | -2.69 | 3.253 | 3.234 | -0.60 | 3.187 | 3.243 | 1.76 |
| 8 | 3.753 | 3.799 | 1.23 | 3.656 | 3.683 | 0.73 | 3.562 | 3.470 | -2.58 | 3.477 | 3.459 | -0.52 | 3.395 | 3.457 | 1.82 |
| 9 | 4.093 | 4.146 | 1.29 | 3.969 | 3.999 | 0.76 | 3.850 | 3.751 | -2.57 | 3.740 | 3.723 | -0.45 | 3.638 | 3.706 | 1.86 |
| 10 | 4.507 | 4.560 | 1.18 | 4.345 | 4.375 | 0.69 | 4.190 | 4.083 | -2.57 | 4.053 | 4.032 | -0.51 | 3.926 | 3.995 | 1.75 |
| 11 | 5.005 | 5.056 | 1.01 | 4.795 | 4.821 | 0.55 | 4.599 | 4.473 | -2.74 | 4.423 | 4.394 | -0.65 | 4.263 | 4.331 | 1.60 |
| 12 | 5.603 | 5.648 | 0.81 | 5.331 | 5.351 | 0.37 | 5.081 | 4.934 | -2.90 | 4.857 | 4.818 | -0.80 | 4.657 | 4.723 | 1.41 |

$$\% \Delta = [(t_{R(cal)} - t_{R(exp)}) / t_{R(exp)}] \times 100$$

^a t_M = calculated according to Peterson and Hirsch [18]

^b $t_{R(exp)}$ = data from Möckel [11]

^c $t_{R(cal)}$ = $k t_M + t_M$

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่าเวลาคงตัวที่ได้จากการคำนวณกับค่าเวลาคงตัวที่ได้จากทดลองของสารนิวคลีโอไซด์ (C₆-C₁₂) ที่แยกบนคอลัมน์ Nucleosil ODS (250 x 4 มม.) ใช้เมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 20 - 40 °ซ

| z | Temperature | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|----------------------------------|-------|--|----------------------------------|-------|--|----------------------------------|------|--|----------------------------------|-------|--|----------------------------------|-------|
| | 20 °ซ (t _M ^a = 2.109) | | | 25 °ซ (t _M ^a = 2.084) | | | 30 °ซ (t _M ^a = 2.062) | | | 35 °ซ (t _M ^a = 2.036) | | | 40 °ซ (t _M ^a = 2.010) | | |
| | t _{R(exp)} ^b | t _{R(cal)} ^c | %Δ | t _{R(exp)} ^b | t _{R(cal)} ^c | %Δ | t _{R(exp)} ^b | t _{R(cal)} ^c | %Δ | t _{R(exp)} ^b | t _{R(cal)} ^c | %Δ | t _{R(exp)} ^b | t _{R(cal)} ^c | %Δ |
| 6 | 3.238 | 3.236 | -0.55 | 3.180 | 3.177 | -0.09 | 3.121 | 3.124 | 0.10 | 3.067 | 3.066 | -0.02 | 3.013 | 3.010 | -0.10 |
| 7 | 3.470 | 3.470 | 0.00 | 3.396 | 3.395 | -0.04 | 3.321 | 3.327 | 0.17 | 3.253 | 3.255 | 0.07 | 3.187 | 3.186 | -0.04 |
| 8 | 3.753 | 3.752 | -0.03 | 3.656 | 3.655 | -0.2 | 3.562 | 3.568 | 0.17 | 3.477 | 3.478 | 0.04 | 3.395 | 3.392 | -0.08 |
| 9 | 4.093 | 4.092 | -0.02 | 3.969 | 3.968 | -0.04 | 3.850 | 3.856 | 0.14 | 3.740 | 3.742 | 0.07 | 3.638 | 3.635 | -0.08 |
| 10 | 4.507 | 4.503 | -0.08 | 4.345 | 4.342 | -0.06 | 4.190 | 4.198 | 0.19 | 4.053 | 4.055 | 0.05 | 3.926 | 3.921 | -0.14 |
| 11 | 5.005 | 5.000 | -0.11 | 4.795 | 4.791 | -0.08 | 4.599 | 4.605 | 0.14 | 4.423 | 4.425 | 0.03 | 4.263 | 4.256 | -0.16 |
| 12 | 5.603 | 5.599 | -0.08 | 5.331 | 5.330 | -0.02 | 5.081 | 5.091 | 0.19 | 4.857 | 4.862 | 0.10 | 4.657 | 4.651 | -0.13 |

$$\% \Delta = [(t_{R(cal)} - t_{R(exp)}) / t_{R(exp)}] \times 100$$

^at_M = calculated according to Berendsen [15]

^bt_{R(exp)} = data from Möckel [11]

^ct_{R(cal)} = k t_M + t_M

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนคาร์บอนจากการคำนวณกับจำนวนของสารอนุกรมแอลเคน (C₆-C₁₂) ที่แยกบนคอลัมน์ Nucleosil ODS (250 x 4 มม.) ใช้เมทานอล เป็นตัวภาคเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 20 - 40 °ซ

| z | Temperature | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 20 °ซ | | | 25 °ซ | | | 30 °ซ | | | 35 °ซ | | | 40 °ซ | | |
| | t _m (B) ^a | t _m (G) ^b | t _m (P) ^c | t _m (B) ^a | t _m (G) ^b | t _m (P) ^c | t _m (B) ^a | t _m (G) ^b | t _m (P) ^c | t _m (B) ^a | t _m (G) ^b | t _m (P) ^c | t _m (B) ^a | t _m (G) ^b | t _m (P) ^c |
| 6 | 0.01 | 0.01 | -0.13 | 0.01 | 0.00 | -0.05 | -0.02 | -0.02 | 0.47 | 0.00 | 0.14 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | -0.28 |
| 7 | 0.00 | 0.01 | -0.15 | 0.01 | 0.00 | -0.08 | -0.03 | -0.02 | 0.39 | -0.01 | 0.09 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | -0.29 |
| 8 | 0.00 | 0.01 | -0.15 | 0.00 | 0.00 | -0.09 | -0.02 | -0.02 | 0.35 | -0.01 | 0.07 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | -0.27 |
| 9 | 0.00 | 0.01 | -0.14 | 0.00 | 0.00 | -0.09 | -0.02 | -0.01 | 0.32 | -0.01 | 0.06 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | -0.26 |
| 10 | 0.01 | 0.01 | -0.12 | 0.01 | 0.00 | -0.07 | -0.02 | -0.01 | 0.29 | -0.01 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | -0.22 |
| 11 | 0.01 | 0.01 | -0.09 | 0.01 | 0.00 | -0.05 | -0.01 | -0.01 | 0.29 | 0.00 | 0.07 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | -0.19 |
| 12 | 0.01 | 0.01 | -0.07 | 0.00 | -0.01 | -0.03 | -0.02 | -0.02 | 0.29 | -0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | -0.16 |

$$\Delta = Z_{(cal)} - Z_{(exp)}$$

$$Z_{(cal)} = (\ln k - a - c/T) / (b + d/T)$$

^a t_m(B) = calculated according to Berendsen [15]

^b t_m(G) = calculated according to Guardino *et.al.* [10]

^c t_m(P) = calculated according to Peterson and Hirsch [18]

6. เอกสารอ้างอิง

- James, A. T. and Martin, A. J. P., 1952, "Gas Liquid Partition Chromatography: The Separation and Microestimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid", *Biochemical Journal*, Vol. 50, pp. 679-690.
- Kovats, E., 1958, "Gas Chromatographic Characterization of Organic Compounds. Part 1. Retention Indexes of Aliphatic Halides, Alcohols, Aldehydes and Ketones", *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 41, pp. 1915-1932.
- Krisnangkura, K., Tancharoon, A., Konkao, C. and Jeyashoke, N., 1997, "An Alternative Method for the Calculation of Equivalent Chain Length or Carbon Number of Fatty acid Methyl Esters in Gas Chromatography", *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 35, pp. 329-332.
- พัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2547, *โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง: หลักการและการประยุกต์ใช้*, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Vigh, G. and Varga-Puchony, Z., 1980, "Influence of Temperature on the Retention Behaviour of Members of Homologous Series in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 196, pp. 1-9.
- Guillaume, Y. and Guinchard, C., 1994, "Effect of ester Molecular Structure and Column Temperature on the Retention of Eight Esters in Gas Chromatography", *Chromatographia*, Vol. 39, pp. 438-442.
- Nilratnisakorn, S., Jeyashoke, N. and Krisnangkura, K., 1999, "Effect of Column Length on Forecasted Retention Times and Carbon Numbers in an Isothermal and Temperature-Programmed Gas Chromatography", *Science Asia*, Vol. 251, pp. 173-177.
- Aryasuk, K. and Krisnangkura, K., 2003, "Prediction of Gas Chromatographic Retention Times of Capillary Columns of Different inside Diameters", *Journal of Separation Science*, Vol. 26, pp. 1688-1692.
- Grushka, E., Colin, H. and Guiochon, G., 1982, "Retention Behavior of n-alkylbenzenes as a Function of Temperature and Mobile Phase Composition in Reversed-Phase Chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 248, pp. 325-339.
- Guardino, X., Albaiges, J., Firpo, G., Rodriguez-Vinals, R. and Gassiot, M., 1976, "Accuracy in the Determination of the Kovats Retention Index: Mathematical Dead Time", *Journal of Chromatography A*, Vol. 118, pp. 13-22.
- Möckel, H. J., 1994, "Influence of Temperature on Dead Volume of ODS Columns and on n-alkane Retention in High Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 675, pp. 13-28.
- Neidhart, B., Kringe, K. P. and Brockmann, W., 1981, "Determination of Zero Retention Times by Temperature Dependent Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography", *Journal of Liquid Chromatography*, Vol. 4, pp. 1875-1886.
- Vit, I., Popl, M. and Fahrnich, J., 1983, "Dead Volume Determination in Reversed-Phase Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, Vol. 281, pp. 293-298.
- Bidlingmeyer, B. A., Warren, F. V., Weston, A. and Nugent, C., 1991, "Some Practical Consideration when Determining the Void Volume in High Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography Science*, Vol. 29, pp. 275-279.
- Berendsen, G., E., Schoenmakers, P. J., De Galan, L., Vigh, G., Varga-Puchony, Z. and Inczedy, J., 1980, "On the determination of the hold up time

in reversed phase liquid chromatography", *Journal of Liquid Chromatography*, Vol. 3, pp. 1669.

16. Haken, J. K., Wainwright, M. S. and Smith, R. J., 1977, "A Problem of Accuracy of Mathematical Dead-Time Estimation", *Journal of Chromatography A*, Vol. 133, pp. 1-6.

17. Martin, A. J. P., 1949, "Some Theoretical Aspects of Partition Chromatography", *Biochemical Society Symposia*, Vol. 3, pp. 4-20.

18. Peterson, M. L. and Hirsch, J., 1959, "A Calculation for Locating the Carrier Gas front of a Gas-Liquid Chromatogram", *Journal of Liquid Research*, Vol. 1, pp. 132-134.