บทที่ 3

ปฏิบัติการทดลองโดยวิธี โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Laboratory Practice in HPLC

บทที่ 3

ปฏิบัติการทดลองโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Laboratory Practice in HPLC

เครื่อง HPLC ที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ CM 437 มีอยู่ 3 เครื่อง คือ

1) HP 1100 isocratic pump โดยใช้เครื่องบันทึกและประมวลผลเป็น Integrator HP 3396 series III

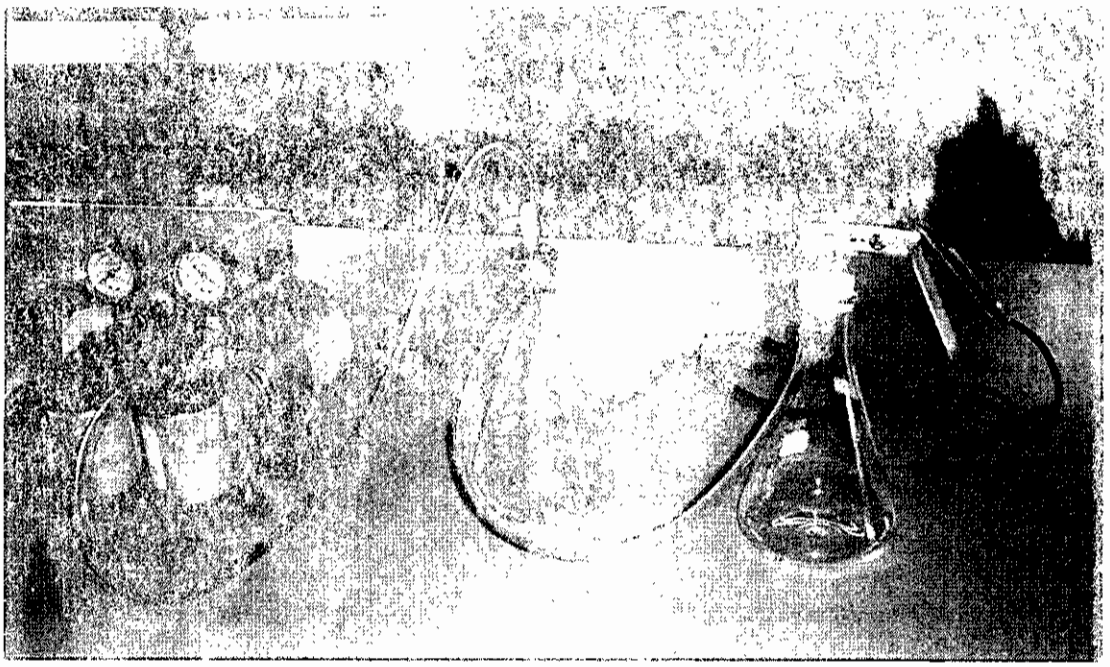
2) HP 1100 binary pump สั่งงานและประมวลผลด้วยคอมพิวเตอร์ โดยใช้ soft ware Chemstation

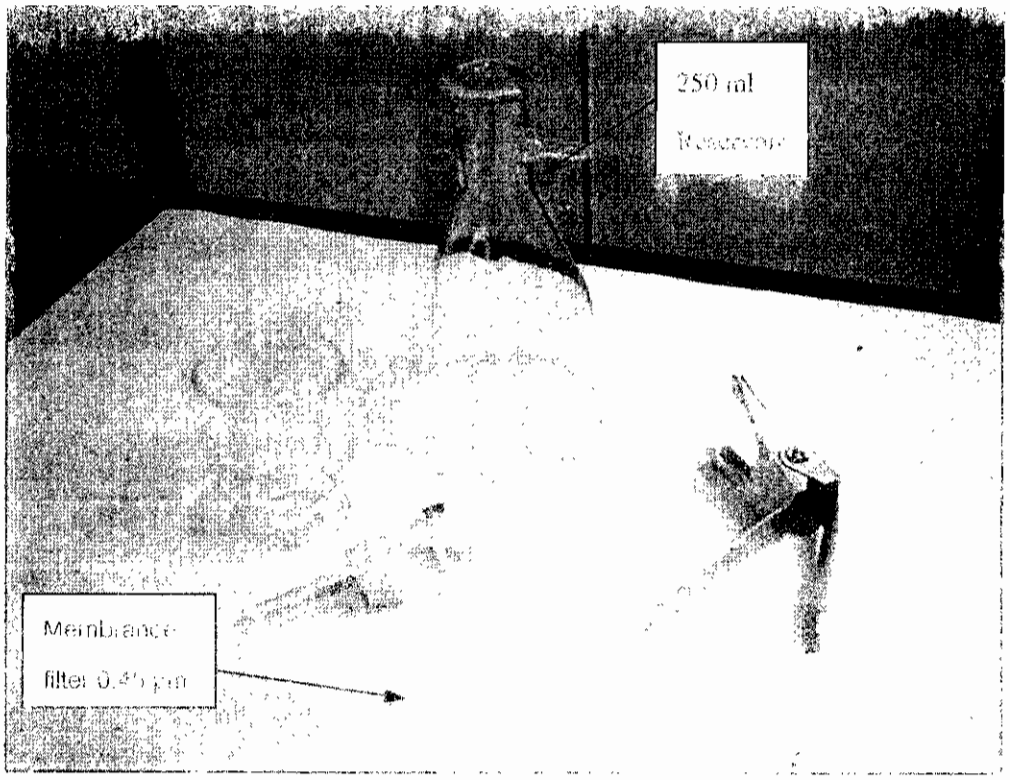
3) Jusco 875 UV (Detector) & 880 Pu (Pump) โดยใช้เครื่องบันทึกและประมวลผลเป็น Integrator Chromatocoder 12

(1.) ขั้นตอนในการทำปฏิบัติการทดลอง มีดังต่อไปนี้

1.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

เตรียมสารละลายของเฟสเคลื่อนที่ให้มีความเข้มข้นและปริมาณตามที่ต้องการ ซึ่งขึ้นอยู่กับเรื่องที่จะทำการทดลอง ต้องกรองเฟสเคลื่อนที่ด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 μm ก่อนนำไปใช้ run chromatogram ด้วยชุดกรองตัวทำละลาย ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรนต้องเลือกให้เหมาะสมกับชนิดของตัวทำละลายด้วย ดังแสดงในตารางที่ 3.1




250 ml
Membrane
filter 0.45 µm

ตารางที่ 3.1 ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน ที่เหมาะสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิด

ชนิดของแผ่นกรองเมมเบรน	ตัวทำละลายที่เหมาะสม
Cellulose	ใช้ได้กับสารละลายเอเควียส
Nitrocellulose	ใช้ได้กับสารละลายเอเควียส
Nylon 66 ®	ใช้ได้ทั้งสารละลายเอเควียสและนอนเอเควียส แต่ไม่เหมาะสมกับกรด หรือเบสแก่

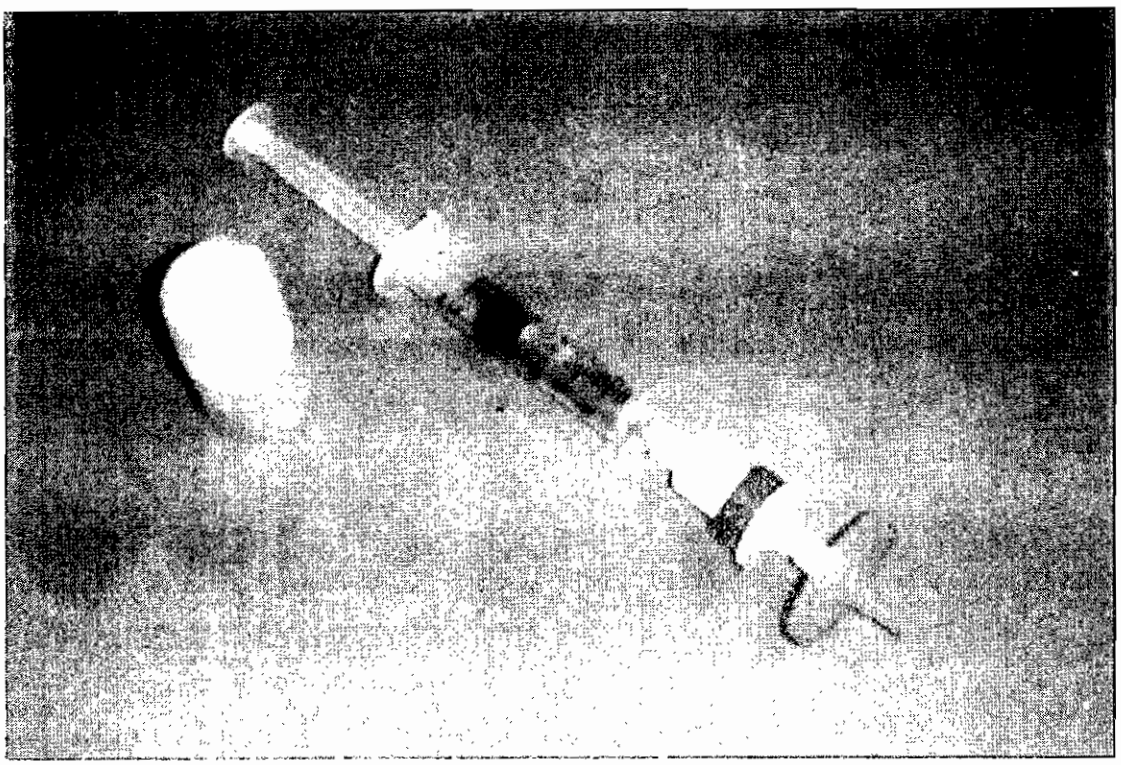
นำตัวทำละลายที่กรองแล้วไป degas โดยการสั่นด้วย ultrasonic bath เป็นเวลา 15-30 นาที ก่อนนำไปใช้งาน

1.2 การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC

ตัวอย่างที่จะนำไปฉีดเข้าเครื่องต้องสะอาดเพียงพอ คือปราศจากมลทินที่สามารถติดแน่นอยู่ในคอลัมน์ที่ทำการวิเคราะห์ และต้องไม่มีตะกอนหรือฝุ่นผง ดังนั้นตัวอย่างต้องผ่านขั้นตอนในการเตรียมที่เหมาะสม เพื่อขจัดมลทินออกไป เช่นการใช้วิธีของ

- Liquid - Liquid Extraction
- Solid – Phase Extraction
- Supercritical Fluid Extraction

เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างนั้นๆ แล้ว ก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ควรกรองตัวอย่างด้วย syringe membrance filter ขนาด 0.20 μm ก่อน ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ชุดกรองตัวอย่าง และขวดบรรจุ

หมายเหตุ เฟสเคลื่อนที่และตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างควรเป็นเกรด HPLC เพื่อผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ยาวนาน

1.3 การเลือกคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ (Column selection และ Mobile phase selection)

เมื่อต้องการ run chromatogram ของสารตัวอย่าง ต้องศึกษาคุณสมบัติของสารตัวอย่าง เพื่อเลือกคอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่ให้ถูกต้อง ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการทำปฏิบัติการทดลอง การเลือกขึ้นอยู่กับเทคนิคและคุณสมบัติของตัวอย่างว่าเป็นประเภทใด ให้ศึกษารายละเอียดได้ในบทที่ 2 ข้อ 4.3-4.5

ปัจจุบันคอลัมน์ที่นิยมนำมาใช้ ในการวิเคราะห์ตัวอย่างประเภทต่างๆ คือ bond – phase column ที่มีหมู่ฟังก์ชันนอลได้หลายชนิด มีทั้งที่เป็น polar เช่น cyano หรือ amino (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ normal phase) และ non polar เช่น octadecyl (ทำให้เกิดการวิเคราะห์แบบ reverse phase) โดยคอลัมน์ที่นิยมใช้มากกว่าคือ reverse phase column ชนิด C_8 หรือ C_{18} ซึ่งสามารถแยกได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ในกรณีของตัวอย่างที่มีขั้วจะใช้หลักการของ ion – pair เมื่อต้องการให้เกิดการแยกสามารถใช้วิธีปรับเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ หรือความเข้มข้นของ pairing ion ในกรณีของสารตัวอย่างไม่มีขั้ว สามารถทำให้เกิดการแยกได้โดยปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

1.4 การ Run chromatogram

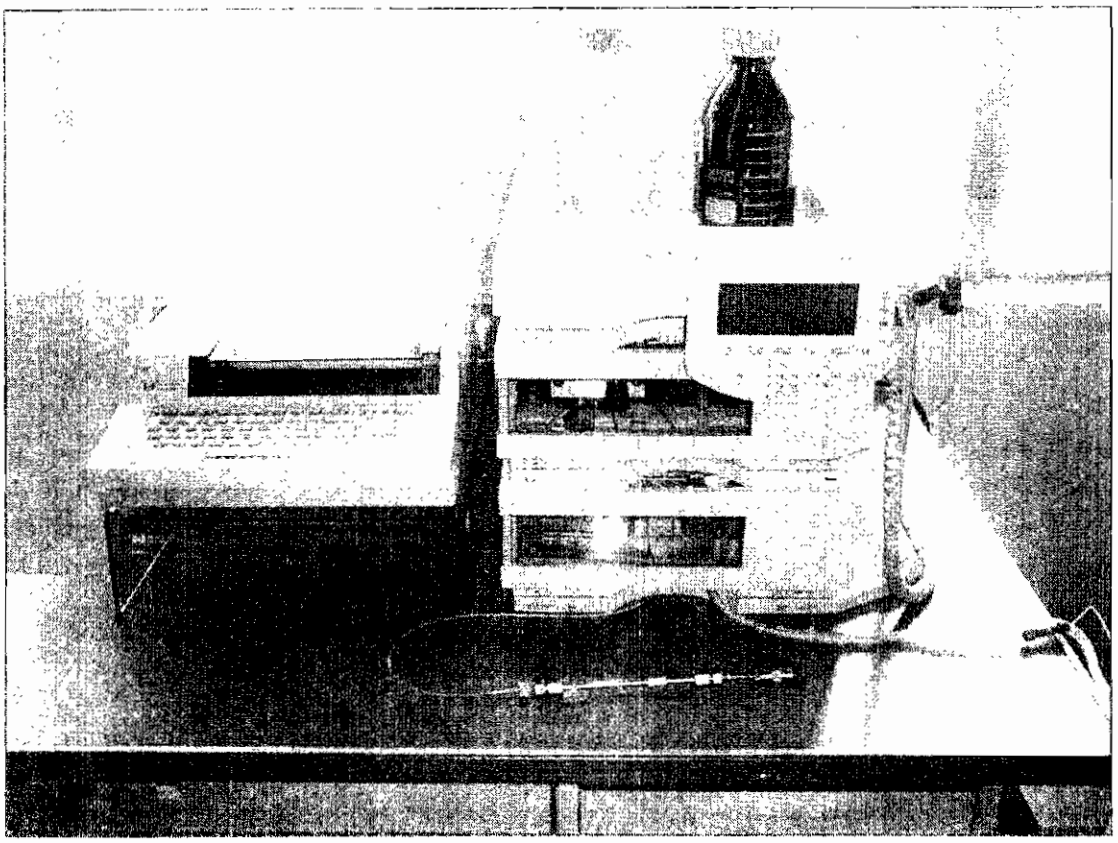
ทำการศึกษาวิธีการใช้เครื่อง HPLC อย่างละเอียดก่อนลงมือ run chromatogram ในหัวข้อที่ (2)

เมื่อ run chromatogram เสร็จแล้ว ข้อมูลต้องถูกบันทึกไว้ใน floder ที่จำเพาะของการเก็บข้อมูลและเป็นของแต่ละผู้วิเคราะห์ ไม่ควรปะปนกัน เพื่อความสะดวกในการเรียกข้อมูลมาทำการประเมินและแปรผล

ควรมีการวางแผนงานให้ทำการทดลองเสร็จทันเวลา เพราะเงื่อนไขที่ใช้ในการ run ควรเป็นเงื่อนไขเดียวกัน คือทำในวันเวลาเดียวกัน เพื่อความถูกต้องของผลที่ได้

2. วิธีการใช้เครื่อง HPLC

2.1 วิธีการใช้เครื่อง HP 1100 isocratic pump และ Integrator HP 3396 series III

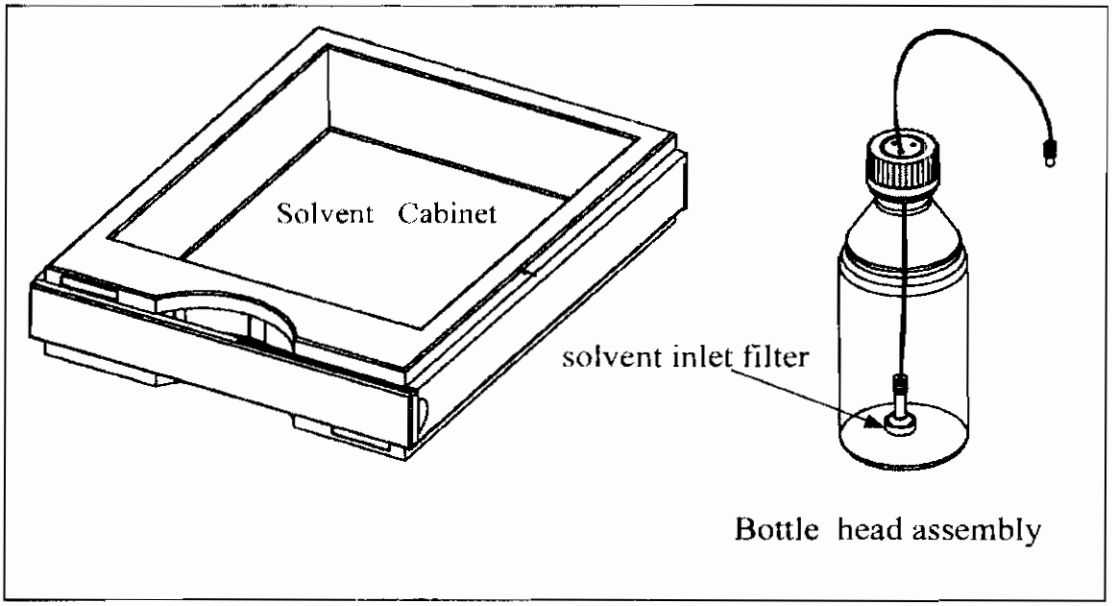


รูปที่ 3.3 แสดงเครื่อง HPLC : HP 1100 isocratic pump และ Integrator ในห้องปฏิบัติการ CM 437

ให้ดำเนินการใช้เครื่องตามขั้นตอนต่อไปนี้

◆ ต่อคอลัมน์ที่เลือกไว้ได้เหมาะสมแล้ว เข้ากับเครื่องมือ HPLC

◆ นำเฟสเคลื่อนที่วางบน Solvent Cabinet แล้วต่อสายท่อนำตัวทำละลายเข้าปั๊ม ซึ่งประกอบด้วย Bottle head assembly และ solvent inlet filter ควรล้าง solvent inlet filter ด้วยตัวทำละลายที่จะใช้ก่อนจุ่มเข้าไปในขวดตัวทำละลาย โดยรูปที่ 3.4 แสดงลักษณะของ Solvent Cabinet และ Bottle head assembly



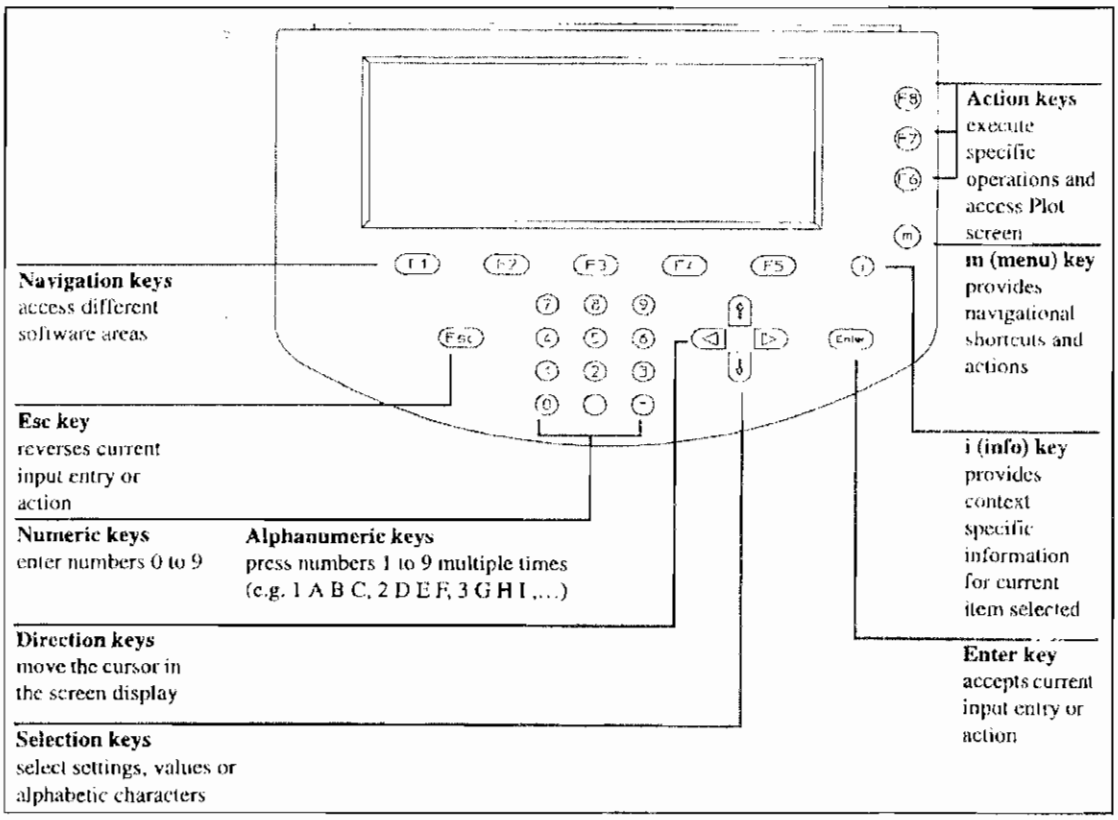
รูปที่ 3.4 Solvent Cabinet และ Bottle head assembly

◆ เสียบปลั๊ก เปิด power supply เครื่อง stabilizer เมื่อมีเสียงร้องให้ reset

◆ เปิด power switch ของปั๊ม detector และ integrator (เปิดจากด้านล่างขึ้นบน)

◆ ที่ control module (รูปที่ 3.5) ให้รอจนกว่าจะขึ้นหน้า Analysis

◆ ตั้งค่า bottle fillings ก่อน (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1.1)



รูปที่ 3.5 Control module

◆ หมุนปุ่ม purge ทวนเข็มนาฬิกา 3-4 รอบ

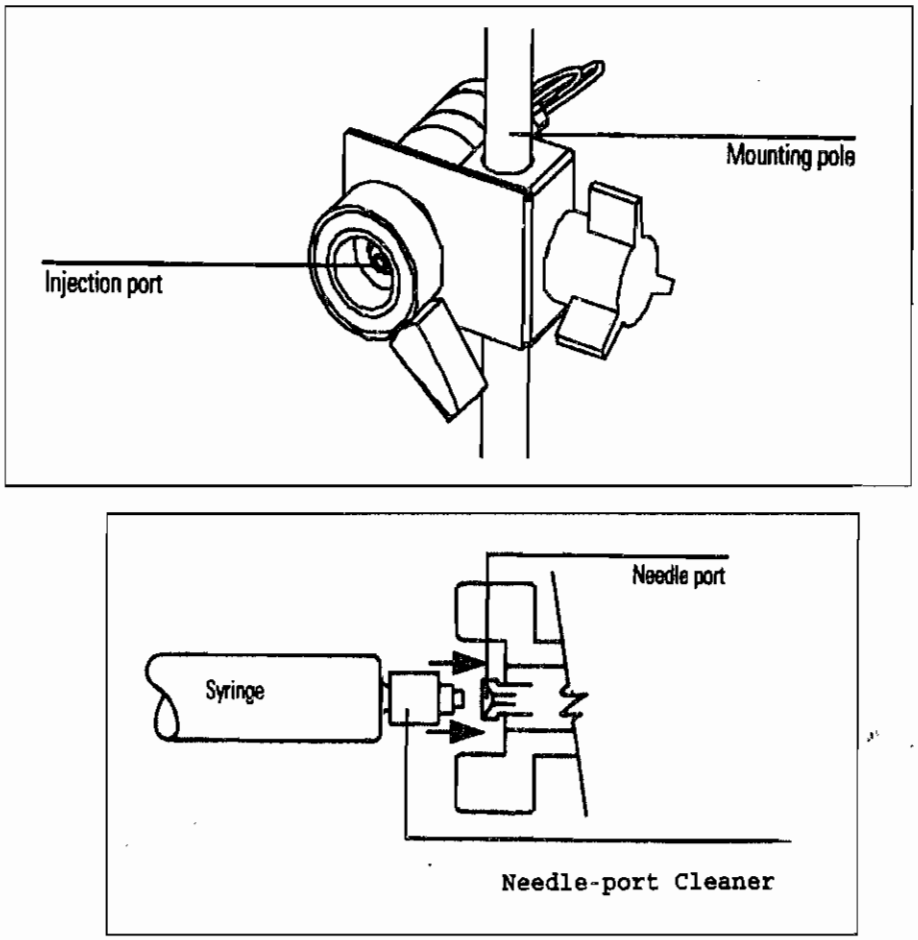
◆ ทำการ purge ด้วยตัวทำละลายเพื่อไล่ฟองอากาศที่ค้างอยู่ในปั๊มและตามสายท่อส่งตัวทำละลาย เพื่อป้องกันฟองอากาศเข้าสู่คอลัมน์ (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1.2)

◆ ปิด purge valve หมุนตามเข็มนาฬิกาจนสนิท

◆ ตั้งค่าต่างๆ เพื่อทำการ run chromatogram ที่ control module
(ดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1.3 และ 2.1.4)

◆ ดู base line ให้นิ่งก่อนฉีดสารตัวอย่าง โดยกดปุ่ม F6 ( )

◆ ก่อนฉีดสารตัวอย่างควรล้าง loop ที่ inject port ด้วยตัวทำละลายที่ใช้เตรียมตัวอย่างในตำแหน่ง load โดยใช้ syringe พลาสติกขนาด 2.5 ml (ดังรูปที่ 3.6) ต่อกับ needle port cleaner แล้วล้างประมาณ 2-3 ครั้ง หรือมากกว่า ขึ้นอยู่กับว่างานที่ทำอยู่ก่อนหน้ามีความสกปรกมากน้อยแค่ไหน



รูปที่ 3.6 แสดงวิธีล้าง loop

◆ ใช้ syringe ขนาด 100 µl ดูดสารละลายตัวอย่างโดยไม่ให้มีฟองอากาศใน syringe และให้มีขนาดของสารละลายตัวอย่างมากกว่าปริมาตรของ loop ฉีดตัวอย่างเข้า inject port ในตำแหน่ง load โดยทำการ rinse loop ด้วยตัวอย่าง 2-3 ครั้ง เมื่อฉีดตัวอย่างลงใน inject port ในตำแหน่ง load แล้วให้ค้าง syringe ไว้ที่ inject port ด้วย

◆ ตั้งค่าต่างๆ ที่เครื่อง integrator ให้ถูกต้องตามที่ต้องการ

(ดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1.5)

◆ set zero (Balance) ให้ base line อยู่ที่ 0 (ดูรายละเอียดหัวข้อ 2.1.4 [5])

◆ หมุน injection valve ไปที่ตำแหน่ง inject เพื่อทำการ run เครื่อง integrator จะเริ่มบันทึกโครมาโทแกรมและประมวลผล

◆ รอให้การ run chromatogram ผ่านไปเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 นาที จึงหมุน inject valve กลับไปที่ load และทำการล้าง loop เพื่อทำการฉีดสารตัวอย่างตัวต่อไป (ถ้าสารตัวอย่างที่ต้องการฉีดต่อคือชนิดเดิม ไม่ต้องทำการล้าง loop ให้ rinse ด้วยตัวอย่างที่ต้องการฉีด 1-2 ครั้ง)

◆ ทำการฉีดสารตัวอย่างตัวต่อไป ในตำแหน่ง load รอไว้ได้ เมื่อการ run chroma - togram ครั้งแรกเสร็จให้หมุน inject valve ไปที่ตำแหน่ง inject การ run chromatogram ก็จะเริ่มขึ้นอีก

◆ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิบัติการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ HPLC ให้ล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับใช้เก็บรักษาคอลัมน์เป็นเวลา 0.5 ชม. เช่นเมื่อใช้คอลัมน์ ODS ควรเก็บไว้ใน 95 % methanol เป็นต้น โดยให้ดูเอกสารประกอบที่แนบมากับคอลัมน์เมื่อซื้อมาใช้

◆ ข้อสำคัญอีกประการหนึ่งคือ ถ้าระบบของเฟสเคลื่อนที่มีบัฟเฟอร์เป็นองค์ประกอบเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานต้องทำการล้างปั๊มด้วยน้ำเป็นเวลา 0.5-1 ชม. เพื่อล้างเกลือของบัฟเฟอร์ที่มีโอกาสตกค้างในระบบออกให้หมด แล้วจึงล้างต่อด้วยเมทานอล

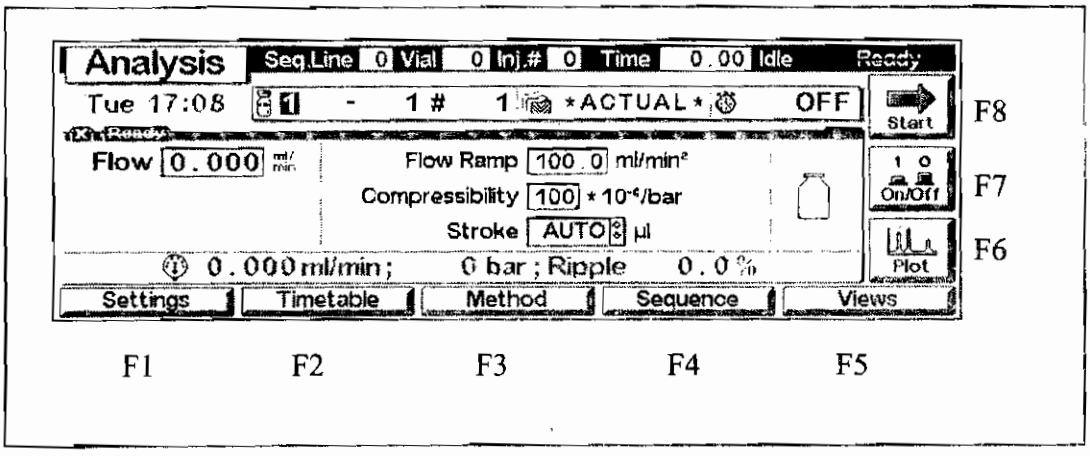
◆ เมื่อเสร็จสิ้นทุกขั้นตอนให้ทำการปิดเครื่อง (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1.7)

2.1.1 การตั้งค่า bottle fillings

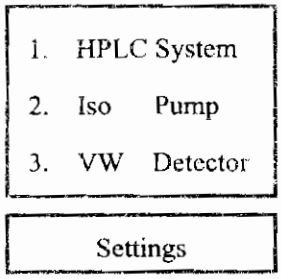
❋❋❋ การตั้งค่า bottle filling เป็นการใส่ปริมาตรของตัวชะที่อยู่ในขวดบรรจุตัวชะ ให้เครื่องได้รับรู้ก่อนทำการทดลอง และทำการตั้งค่าปริมาตรของตัวชะที่น้อยที่สุดที่ปั๊มสามารถทำงานได้ เช่นถ้าได้ตั้งค่าปริมาตรของตัวชะที่น้อยที่สุดไว้ที่ 0.1 ลิตร จะหมายความว่าหากปริมาตรในขวดบรรจุตัวชะ เหลือน้อยกว่า 0.1 ลิตร ปั๊มจะหยุดทำงานทันที เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องตั้งค่า bottle filling นี้ทุกครั้งก่อนทำการ run chromatogram เสมอ **ห้ามลืมเด็ดขาด**

ขั้นตอนการตั้งค่า bottle fillings

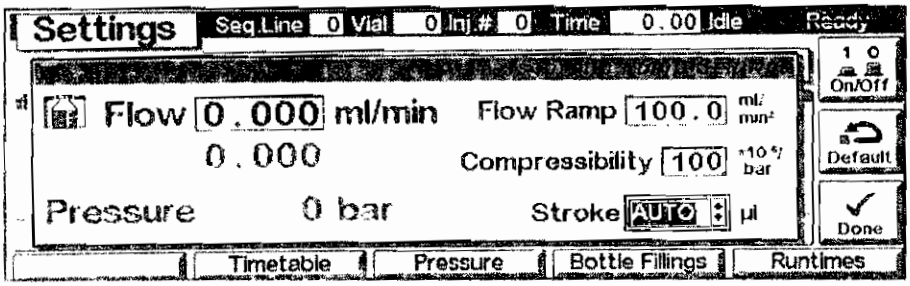
1. ที่ control module กด ESC ให้หน้าจอกลับมาอยู่ที่หน้า **Analysis**



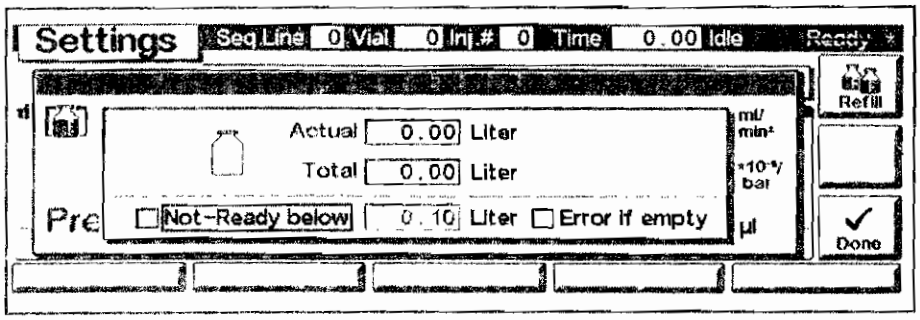
2. กดปุ่ม F1 [Settings] จะปรากฏรายการที่ต้องตั้งค่าต่างๆ ดังนี้



3. กดตัวเลข 2 (Iso Pump) หรือเลื่อนแถบดำมาที่ Iso Pump แล้วกด enter จะปรากฏหน้าจอ Setting ดังนี้



4. กด F4 [Bottle Fillings] จะปรากฏหน้าจอดังนี้



5. ให้สังเกตว่าแถบดำปรากฏอยู่ที่ตำแหน่งใดก่อน แล้วค่อยกดตัวเลข การเลื่อนแถบดำให้ใช้ลูกศรแสดงทิศทาง (◀▶) ที่แป้น control module จากนั้นให้ป้อนตัวเลขของค่าต่อไปนี้

❋ **Actual** คือ ปริมาตรของตัวชะที่เหลืออยู่ในขวด

❋ **Total** คือ ปริมาตรของขวดที่ใส่ตัวชะ

❋ ตั้งค่า **Not – Ready below** ไว้ที่ 0.1 ลิตร (เป็นการตั้งค่าเพื่อให้ปั๊มหยุดทำงานเมื่อตัวชะเหลือ 0.1 ลิตร) และทำการ click ให้เป็นสีดำในช่อง ■

❋ กด F6 [✓ Done]

❋ ❋ ❋ **ตัวอย่าง** ถ้าขวดบรรจุมีขนาด 1 ลิตรและมีปริมาณตัวชะเหลืออยู่ 0.5 ลิตร แสดงว่าต้องใส่ดำแหน่ง Actual เป็น 0.5 Liter และใส่ดำแหน่ง Total เป็น 1 Liter จากนั้นกด F6 (✓ Done)

2.1.2 การ Purge ด้วยตัวทำละลาย

❋ ❋ ❋ การ Purge คือไล่ฟองอากาศที่อยู่ใน line เพื่อป้องกันฟองอากาศเข้าสู่คอลัมน์โดย Purge valve จะต่อกับสายน้ำทิ้ง (waste tubing) ที่ลงสู่ขวด waste solvent

ขั้นตอนการ Purge

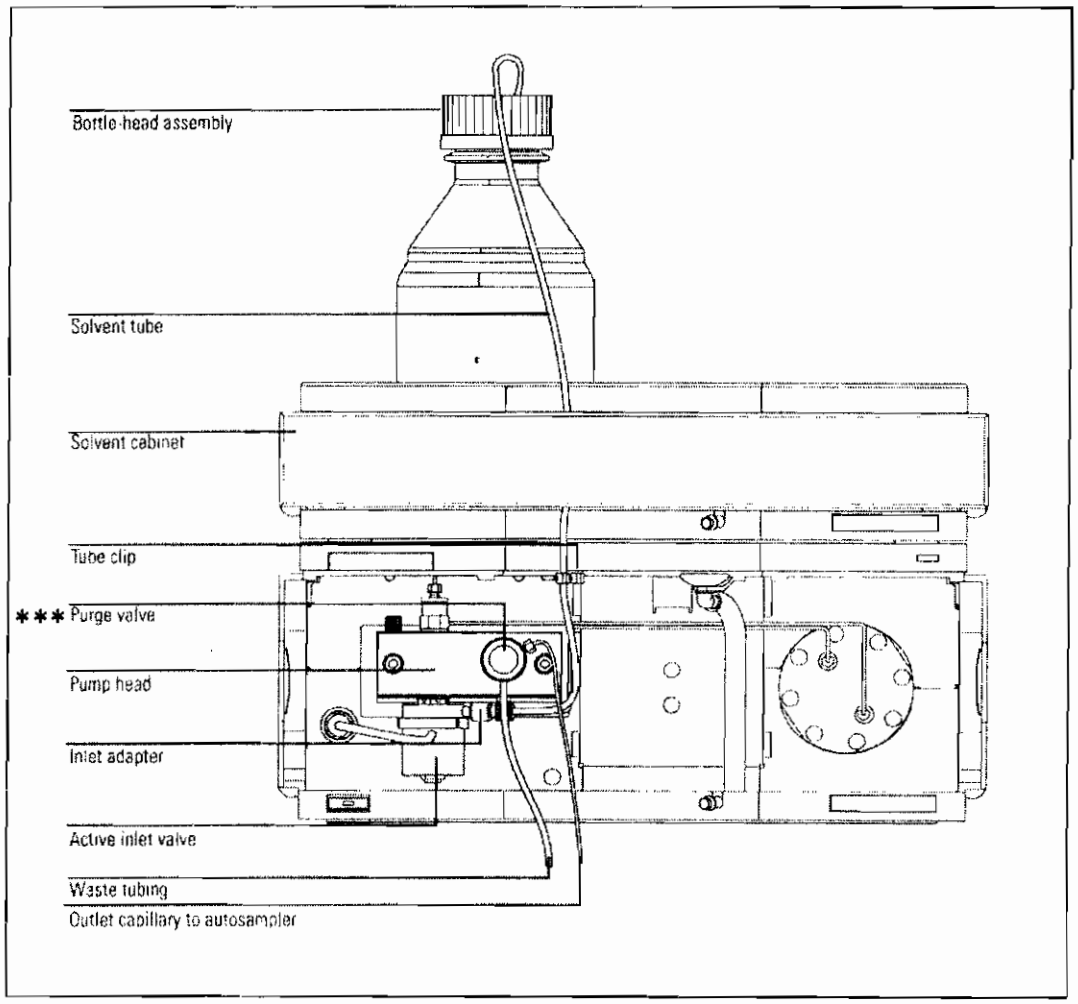
1. ตรวจดูว่า waste tubing ที่ออกจาก Purge valve ลงสู่ขวด waste solvent แล้ว

2. หมุนปุ่ม Purge valve ทวนเข็มนาฬิกาให้คลายตัว (ไม่ต้องหมุนจนสุด) โดยตำแหน่ง Purge valve แสดงดัง**รูปที่ 3.4** ในทางปฏิบัติควรหมุนปุ่ม purge valve ให้คลายออกในทิศทางทวนเข็มนาฬิกา ก่อนทำกิจกรรมอย่างอื่นทั้งหมด เพื่อป้องกันการหลงลืมที่สั่งให้เครื่อง run โดยที่ยังไม่ได้ไล่ฟองอากาศเพราะจะทำให้เกิดช่องว่างในคอลัมน์ได้

3. ตั้งค่า flow rate ที่จะทำการ Purge (ดูการตั้งค่า flow rate ในหัวข้อ 2.1.3)

(ในการ Purge ใช้ flow rate ให้เร็วก็ได้เพื่อประหยัดเวลาในการล้าง line ให้สะอาด แต่ควรปรับ flow rate ลงมาให้เท่ากับที่ต้องการ run ก่อนปิด Purge valve ข้างเคียงเด็ดขาด)

4. เปิดการทำงานของปั๊ม (pump on) (ดูหัวข้อ 2.1.4 [1])



รูปที่ 3.7 *** คือตำแหน่ง purge valve

5. ให้ทำการ Purge โดยระยะเวลาในการ Purge นั้นสังเกตได้จาก ท่อส่งตัวทำละลายก่อนเข้าปั๊มต้องไม่มีฟองอากาศ

6. ลด flow rate ให้เท่ากับต้องการใช้งานจริง

7. ทำการปิดปั๊ม (ดูหัวข้อ 2.1.4 [1])

8. ปิด purge valve หมุนตามเข็มนาฬิกาจนสนิท

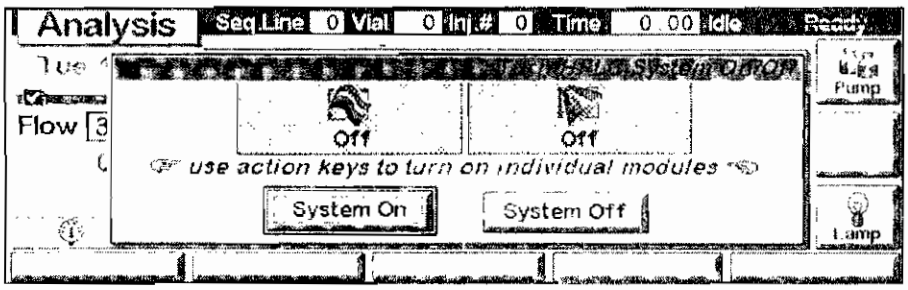
2.1.3 ตั้งค่า flow rate

1. ที่หน้าจอ Analysis กด F1 (Setting) และกด 2 (Iso Pump)
2. เลื่อนแถบดำโดยใช้ลูกศรเลื่อนไปทางตำแหน่งซ้ายหรือขวาจนแถบดำอยู่ที่ตำแหน่ง FLOW [ ] ml/min
3. กดตัวเลขที่ต้องการตั้งค่าของ Flow rate
4. กด enter หรือ เลื่อนแถบ cursor ไปทางซ้ายหรือขวาก็ได้
5. กด F6 [Done] เพื่อเป็นการสั่งให้ทำงาน

2.1.4 การทำงานในระบบต่างๆ ที่ control module

1 การเปิด - ปิด pump

1. ที่หน้าจอ **Analysis** ถ้าอยู่ที่หน้า System ให้กด F5 (View) จากนั้นกด 1 [Analysis]
2. กด F7 [On/Off] จะปรากฏหน้าจอดังนี้

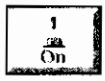


❁❁❁ สังเกตว่า ถ้ายังไม่เปิดการทำงานของ system ตรงปุ่ม system on จะมีลักษณะนูนขึ้นมา และรูปขวด กับ VWD จะขึ้น off ถ้าต้องการเปิดทั้งปั๊มและ VWD พร้อมกันให้กด enter การกด system on ครั้งแรก pump จะขึ้น stand by ต้องกด system on อีกครั้งหนึ่ง ปั๊มจึงจะทำงาน ❁❁❁

..... ถ้าต้องการเปิดเฉพาะปั๊มให้ทำต่อข้อ 3 .....

3. กดปุ่ม F8 [ ] จะปรากฏหน้าจอดังนี้

❁❁❁ สังเกตว่า ปุ่ม Pump On จะมีลักษณะนูนขึ้นมา ถ้ายังไม่เปิดทำงาน และเมื่อสั่งทำงานแล้ว Pump Off จะนูนขึ้นมาแทน ❁❁❁

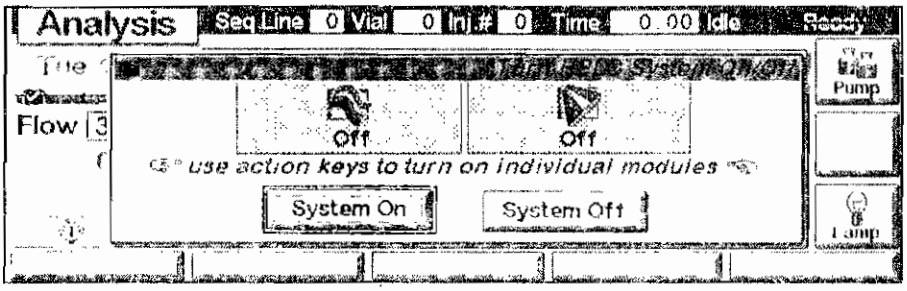
4. กดปุ่ม F8 [] หรือกดปุ่ม enter เพื่อสั่งให้ pump ทำงาน

❁❁❁ สังเกตว่า ถ้ากด F8 แล้วมีเสียงปั๊มทำงาน แล้วหยุดทำงาน เพราะเข้าสู่ระบบ stand by (ให้สังเกตจากเสียงของ pump) จะต้องสั่งทำงานครั้งที่ 2 อีก เพื่อให้ Pump On ❁❁❁

2 การเปิด UV – VIS Lamp

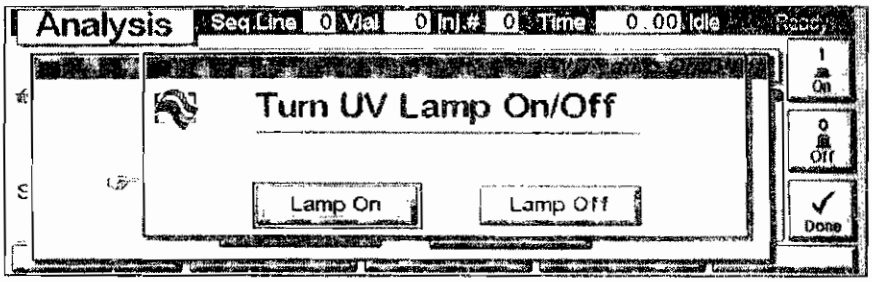
1. ไปที่หน้าจอ **Analysis** ถ้าไม่อยู่ที่หน้าจอ Analysis ให้กด ESC

2. กด F7 [1 On/Off] จะปรากฏหน้าจอดังนี้



ถ้าต้องการเปิดทั้งปั๊ม และ VWD พร้อมกันให้กด enter ถ้าต้องการเปิดเฉพาะ VWD ให้ทำต่อข้อ 3

3. กดปุ่ม F6 [Lamp] จะปรากฏหน้าจอดังนี้



4. กดปุ่ม F8 [1 On] หรือกดปุ่ม enter เพื่อสั่งให้ lamp ทำงาน

❁❁❁ **สังเกตว่า ปุ่ม Lamp On จะมีลักษณะนูนขึ้นมา ถ้ายังไม่ได้สั่งให้ Lamp ทำงาน และเมื่อสั่งให้ทำงานแล้ว Lamp Off จะนูนขึ้นมาแทน** ❁❁❁

5. สุดท้ายสั่งให้ระบบทำงานคือ system on โดยกด enter (ให้สังเกตว่าก่อนกดปุ่ม system on จะนูนขึ้น เมื่อกด enter แล้วที่ system off จะนูนขึ้นแทน)

❁❁❁ **ให้สังเกตว่าได้ทำการเปิดการทำงานของ Pump และ Lamp แล้ว ดังนี้** ❁❁❁

ข้อที่ 1 : เมื่อสั่งให้ Pump ทำงานแล้ว หน้าจอจะกลับมาอยู่หน้า Turn HPLC System On /Off และให้สังเกตช่องทางด้านซ้ายบนที่เป็น Off จะเปลี่ยนมาเป็น Stand by และจะเปลี่ยนมาเป็น On ในที่สุด

ข้อที่ 2 : เมื่อสั่งให้ Lamp ทำงานแล้ว หน้าจอจะกลับมาอยู่หน้า Turn HPLC System On /Off เช่นเดียวกับการเปิด Pump และให้สังเกตช่องทางด้านขวาบนที่เป็น Off จะเปลี่ยนมาเป็น Ignition และจะเปลี่ยนมาเป็น On ในที่สุด

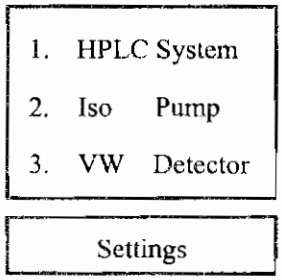
ข้อที่ 3 : ให้สังเกตในหน้า Analysis จะมีเครื่องหมาย ☑ Ready แทนเครื่องหมาย ☒ Ready ทั้งส่วนของปั๊ม และ VWD

3 **<u>การตั้งค่าความยาวคลื่น</u>** **(wave length ,λ)**

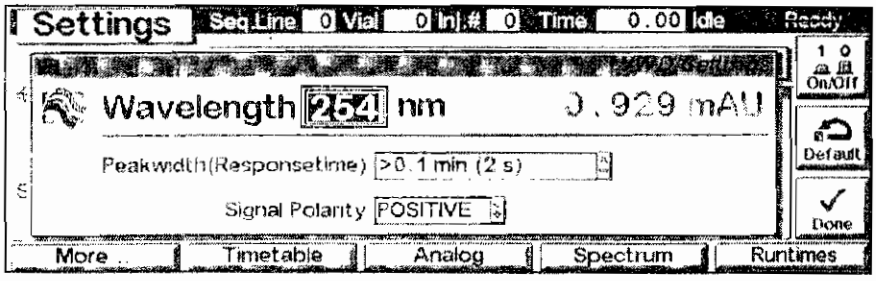
สามารถทำได้ 2 วิธี

<u>วิธีที่ 1</u>

1. ไปที่หน้าจอ Analysis
2. กดปุ่ม F1 [Settings] จะปรากฏที่ปุ่ม setting ดังนี้



3. กดตัวเลข 3 [VW Detector] หรือ กดลูกศรลงจนแถบดำมาอยู่ที่ VW Detector แล้วจึงกด enter จะปรากฏหน้าจอดังนี้



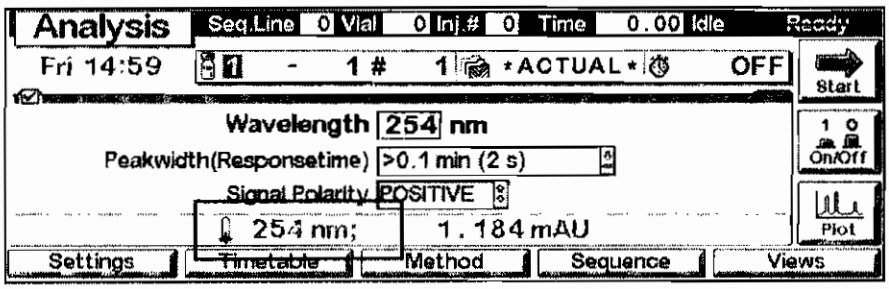
4. สังเกตว่าแถบดำจะอยู่ที่ Wave length [ ] nm ให้ใส่ตัวเลขที่ต้องการตั้งความยาวคลื่นเข้าไป แล้วกดปุ่มคำสั่ง F6 [Done] หากมีการเลื่อนของแถบดำไม่ตรงช่องของ Wave length ให้ใช้ลูกศรเลื่อนจนมาอยู่ที่ช่องของ Wave length ก่อนแล้วค่อยป้อนตัวเลขเข้าไป

วิธีที่ 2

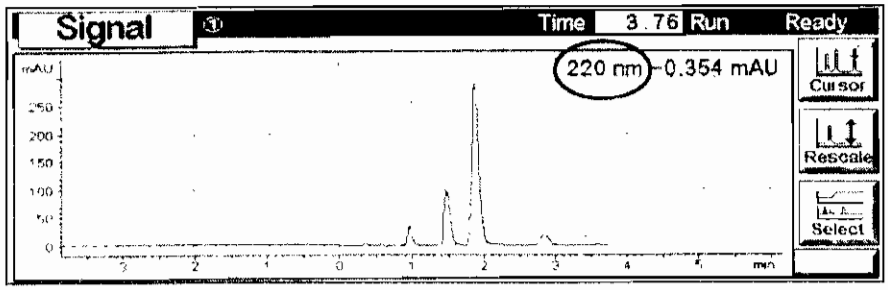
1. ไปที่หน้าจอ Analysis
2. ใช้ลูกศรตำแหน่งซ้าย, ขวา เลื่อนแถบดำไปอยู่ที่ Wave length [ ] nm
3. กดตัวเลขตามที่ต้องการตั้งความยาวคลื่นป้อนไปบนแถบดำดังกล่าว
4. กด enter หรือ เลื่อนแถบดำโดยใช้ลูกศรตำแหน่งซ้าย หรือขวา

❁❁❁ **สังเกตว่าได้ทำการตั้งความยาวคลื่นไว้แล้ว ดังนี้** ❁❁❁

ข้อที่ 1 : ที่หน้าจอ Analysis จะมีเครื่องหมายหลอด light source และจะปรากฏมีตัวเลขที่ได้ตั้งความยาวคลื่นกำกับอยู่



ข้อที่ 2 : เมื่อกด F6 [Plot] จากหน้าจอ Analysis จะปรากฏหน้าจอ Signal ให้สังเกตด้านบนมุมขวาของกรอบ Chromatogram บน control module จะปรากฏตัวเลขของความยาวคลื่นที่ได้ตั้งไว้และจะเป็นความยาวคลื่นที่ใช้ run สารด้วย



4 **<u>การตั้งค่าเวลาในการ run</u> (Stoptime)**

สามารถทำได้ 2 วิธี

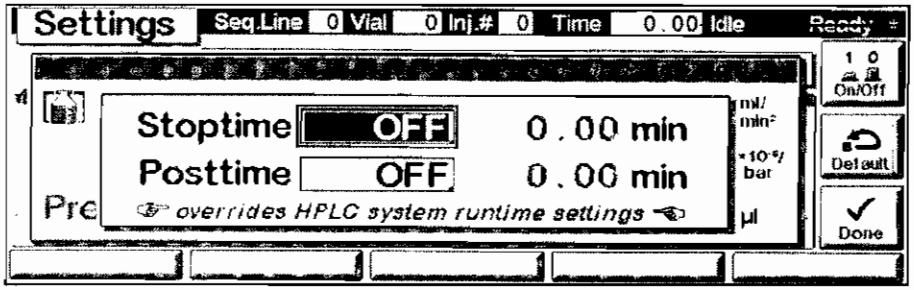
<u>วิธีที่ 1</u>

1. ไปที่หน้าจอ Analysis (หากอยู่ที่หน้าอื่นให้กด ESC)

2. กดปุ่ม F1 [Settings] จะปรากฏหน้าจอที่ปุ่ม setting ดังนี้

1. HPLC System
2. Iso Pump
3. VW Detector
Settings

3. กด 1 [HPLC System] หรือ กด enter (กด enter ได้หากแถบดำอยู่ที่ 1 HPLC System แต่ถ้าแถบดำไม่อยู่ที่ตำแหน่งของ 1 HPLC System ให้ใช้ลูกศร [▲▼] เลื่อนจนแถบดำอยู่ที่ข้อ 1 แล้วค่อยกดปุ่ม enter) จากนั้นจะปรากฏหน้าจอ setting ดังรูป



4. สังเกตว่า แถบดำอยู่ที่ช่อง Stoptime อยู่แล้วให้กดตัวเลขที่ต้องการตั้ง Stoptime ได้เลย หากแถบดำไม่อยู่ที่ช่อง Stoptime ก็ให้เลื่อนโดยใช้ลูกศร แล้วค่อยกดตัวเลข

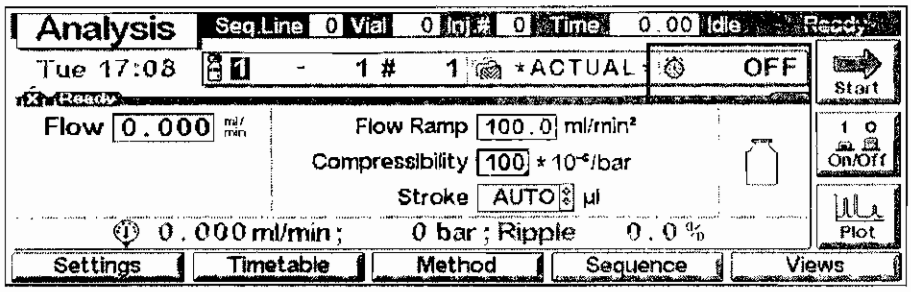
5. กดปุ่ม F6 [✓ Done] เพื่อสั่งให้ทำงาน

(สังเกตว่าจะกลับมาอยู่ที่หน้า Analysis)

วิธีที่ 2

1. ไปที่หน้าจอ Analysis (หากอยู่ที่หน้าอื่นให้กด ESC)

2. ให้เลื่อนลูกศรบน control module (ซ้าย, ขวา) จนแถบดำปรากฏอยู่ช่องที่มีนาฬิกา



3. กดตัวเลขที่ต้องการตั้ง stoptime
4. กด enter หรือเลื่อนลูกศรไปซ้าย ขวา

❁❁❁ ข้อสังเกตว่าได้ทำการตั้ง Stoptime แล้ว คือจากช่องที่มีนาฬิกาจะปรากฏตัวเลขที่ได้ตั้ง run time ไว้ ❁❁❁

หมายเหตุ ควรตั้งเวลาของ stoptime ใน integratorไว้เท่ากับ stoptime ที่ control module การทำงานของ integrator จะได้หยุดทำงานพร้อมกับที่ control module

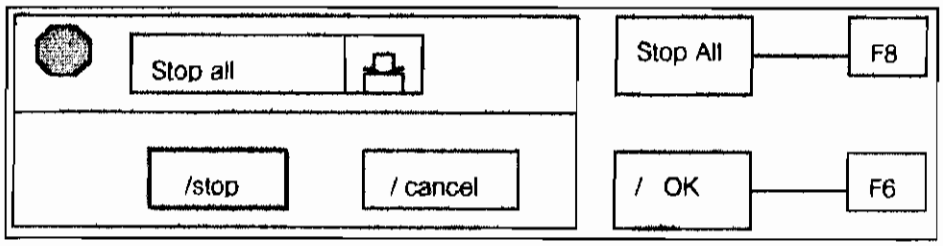
---

ตัวอย่าง ถ้าตั้ง stoptime ใน control module และ Integrate ไว้ 5 นาที integrator ก็จะหยุดการทำงาน 5 นาที แต่ถ้ามีการตั้ง stoptime ของ integrator ไว้ที่ 2 นาที integrator จะหยุดการทำงานที่ 2 นาที แม้ว่าได้ตั้ง stoptime ใน control module ไว้ 5 นาทีก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามใน 3 นาทีที่เหลือ ก็สามารถดู chromatogram ของสารได้จากหน้าจอ signal ใน control module เพียงแต่ไม่มีผลบันทึกลงกระดาษเท่านั้นเอง

กรณีลืมตั้ง stoptime ก่อน inject

ขั้นตอนต่อไปนี้จะทำเมื่อคิดว่าสารที่ inject ออกจาก column หมดแล้ว แต่ไม่ได้กำหนด stoptime

1. ทำให้อยู่ที่หน้า Analysis
2. กด F8 [stop] จะปรากฏหน้าจอ

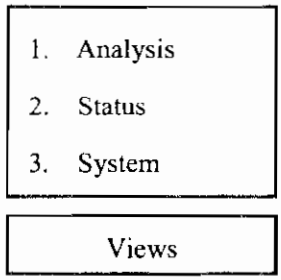


3. กด F6 [OK]

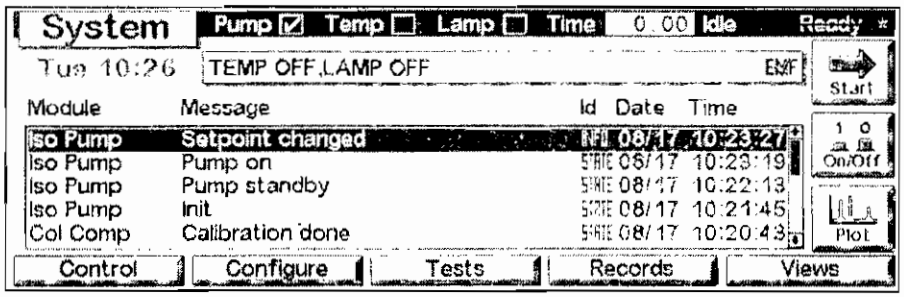
❁❁❁ ถ้าไม่ได้กดปุ่ม stop หลังจาก run เสร็จแล้ว (กรณีไม่ได้ตั้ง stoptime ไว้) เมื่อทำการ inject ครั้งต่อไป เวลาบน baseline จะไม่เริ่ม start ที่นาทีที่ศูนย์ แต่จะทำการ run ต่อเนื่อง ❁❁❁

5 การ set zero ที่ baseline

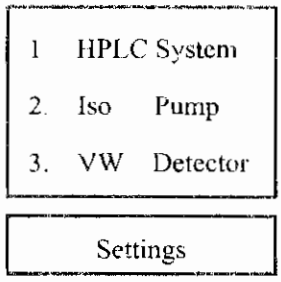
1. กดปุ่ม F5 [Views] ในหน้า Analysis จะปรากฏ



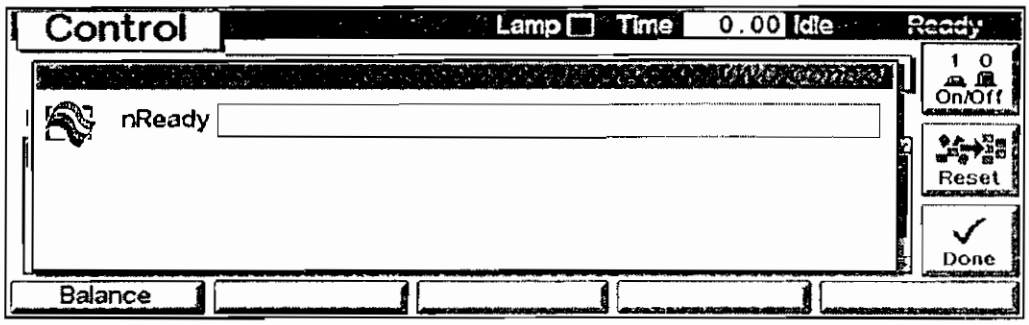
2. กดเลข 3 [system] จะปรากฏหน้าจอ system ดังรูป



3. กด F1 [Control] จะปรากฏ



4. กดเลข 3 [VW detector] จะปรากฏหน้าจอ control ดังรูป



5. กด F1 [Balance]

6. กด F6 [Done]

❁❁❁ การสังเกตว่าได้ตั้ง set baseline ที่ศูนย์แล้วคือ ให้ดูจากหน้าจอ signal โดยกด F6 (plot) จากหน้าจอ Analysis ❁❁❁

6 การตั้ง Program การ run

*** การตั้ง program ในการ run สามารถทำการตั้งได้ที่ pump เพื่อทำการปรับเปลี่ยน flow rate หรือ ทำการตั้งที่ detector เพื่อทำการปรับเปลี่ยนความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ แต่ไม่สามารถที่จะทำการปรับเปลี่ยน % ของ eluent ได้ เนื่องจากระบบของปั๊มเป็น isocratic pump ***

6.1 วิธีการปรับเปลี่ยนความยาวคลื่น

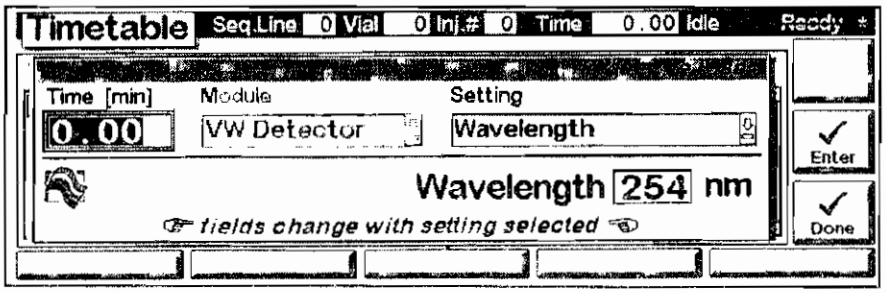
1. ทำให้อยู่ที่หน้า Analysis

(ถ้าอยู่ที่หน้า System ให้กด F5 [View] จากนั้นกดเลข 1 [Analysis])

2. กด F1 (Setting) เลือก VWD Detector กด enter จะเข้าสู่หน้า Setting

3. กดปุ่ม F2 [Timetable] จะปรากฏหน้าจอ Time table

4. กดปุ่ม F7 [Insert] จะปรากฏหน้าจอ Time table insert ดังรูป



5. การสร้าง Program การ Run

ช่วงที่ 1 นาทีที่ศูนย์ จะตั้งความยาวคลื่นที่หน้าจอ Analysis และที่ time table ให้ตรงกัน เสร็จแล้วกด F6 [Done]

ช่วงที่ 2 เลือก Insert ตั้ง Time ของช่วงที่ 2 โดยกดเปลี่ยนตัวเลข และตั้ง wave length ของช่วงที่ 2 แล้วกด F6 [Done] หน้าจอจะกลับมาอยู่ที่หน้า Time table เป็นการรับคำสั่ง และให้สังเกตว่าในตารางจะเป็นตัวเลขที่ตั้งโปรแกรม ไว้

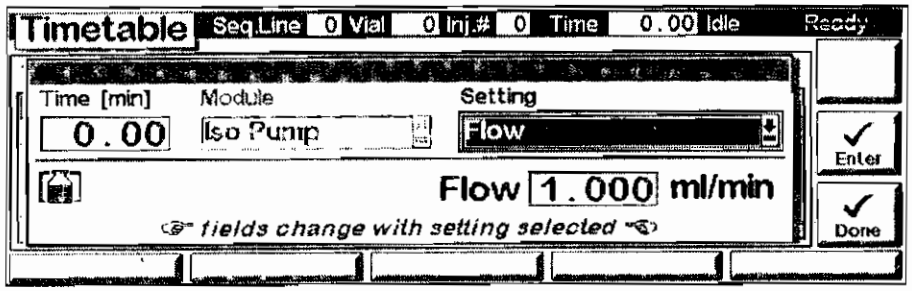
6.2 วิธีการตั้ง flow rate

1. ทำให้อยู่ที่หน้า Analysis

2. กด F1 (Setting) เลือก Iso Pump กด enter จะเข้าสู่หน้า Setting

3. กดปุ่ม F2 [Timetable] จะปรากฏหน้าจอ Time table

4. กดปุ่ม F7 [Insert] จะปรากฏหน้าจอ Time table insert ดังรูป



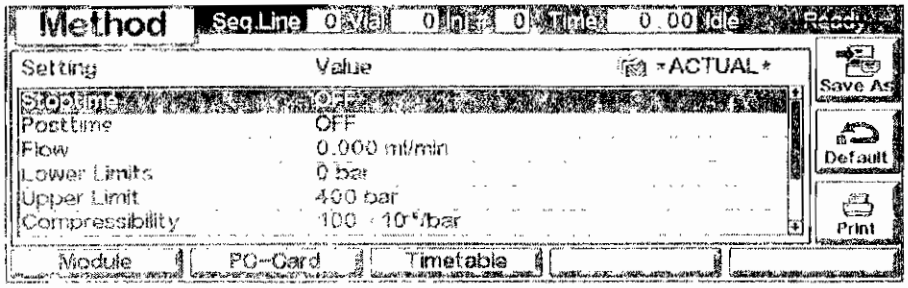
5. ทำการสร้าง Program การ Run

ช่วงที่ 1 นาทีที่ศูนย์ จะต้องตั้ง flow rate ที่หน้าจอ Analysis และที่ time table ให้ตรงกัน เสร็จแล้วกด F6 [✓ Done]

ช่วงที่ 2 เลือก Insert ตั้ง Time ของช่วงที่2 โดยกดเปลี่ยนตัวเลข และตั้ง flow rate ของช่วงที่2 แล้วกด F6 [✓ Done] หน้าจอจะกลับมาอยู่ที่หน้า Time table เป็นการรับคำสั่งและให้สังเกตว่าในตารางจะเป็นตัวเลขที่ตั้งโปรแกรมไว้

7 การตั้งชื่อ Method

1. ทำให้อยู่ที่หน้า Analysis กด F3 [Method] จะปรากฏหน้าจอ Method



2. กด F8 [Save As]

3. การตั้งให้ตั้งเฉพาะ Name ไม่ต้องตั้ง Protected และ User Id. (ป้องกันการลืม Password)

---- ---- เลือกตัวอักษรและเครื่องหมายจากลูกศรขึ้น-ลง ----------

4. กด F6 [Done]

8 การลบ Method

1. ให้อยู่ที่หน้า Analysis กด F3 [Method]

2. กด F1 (Module) จะปรากฏหน้าจอ Method ที่ได้สร้างไว้

3. เลือก Method ที่ต้องการลบโดยกดลูกศรขึ้น-ลง

4. กด F6 (Delete) จะขึ้น 1. Selected Method

2. All Method

ถ้าต้องการลบเพียง 1 Method ให้เลือก Selected Method ถ้าต้องการลบทั้งหมดเลือก All Method โดยกดลูกศรขึ้น-ลง หรือกดเลข 2

5. กด enter จะขึ้นหน้าจอถามย้ำว่าต้องการลบใช่หรือไม่ให้เลือกตอบ Yes หรือ No โดยกดลูกศรเลือก แล้วตามด้วย enter

9 การเรียก Method ที่มีอยู่มาใช้งาน

1. เข้าสู่หน้าจอ Analysis หรือ Samples
2. กด F3 [Method] จะได้หน้าจอที่แสดงพารามิเตอร์ต่างๆ ของ method ปัจจุบันที่กำลังใช้งานอยู่ (current method)
3. กด F1 [Module]
4. เลือก method จากรายการที่แสดงเป็นรายชื่อของ Method วันที่ และรายละเอียด (description) ที่ผู้ใช้บันทึกไว้สั้นๆ โดยใช้ลูกศรเลือกรายการ [⇕] ให้แถบเข้มอยู่ที่ method ที่ต้องการ
5. กด Enter Key

เมื่อ method ที่ต้องการใช้งานได้ถูก load ขึ้นมา พารามิเตอร์ต่างๆ จะถูกเปลี่ยนเป็นของ method ที่เลือกนี้ และเรียก method นี้ว่า current method เมื่อ run ตัวอย่างเงื่อนไขที่ใช้จะเป็นไปตาม method ที่เลือก

2.1.5 วิธีใช้เครื่อง integrator

1. เปิดปุ่ม power ด้านหลังเครื่อง

2. ต้องการดูค่าที่ตั้งในเครื่องให้กดปุ่ม List 2 ครั้ง

3. ตั้งค่า Attenโดยกดปุ่ม ATT 2 ^ ที่เครื่องแล้วกดตัวเลขที่ต้องการตั้งค่า จากนั้นกด enter (ตัวเลขมากขึ้นจะเป็นการลดขนาดสัญญาณ ถ้าเลขเพิ่ม 1 หน่วย จะลดขนาดสัญญาณ 50 %)

4. ตั้งค่า Chart Speed โดยกดปุ่ม CHT SP ที่เครื่องแล้วกดตัวเลขที่ต้องการ จากนั้นกด enter

5. ตั้งวันที่ กดอักษร DA วรรคหนึ่งครั้ง กดเดือนเป็นตัวเลข 2 หลัก แล้วคั่นด้วย Colon กดวันเป็นตัวเลข 2 หลัก แล้วคั่นด้วย Colon กดปีเป็น ค.ศ. 4 หลัก กด enter (ตัวอย่าง DA 01 / 10 / 2001)

6. ตั้งเวลา กดตัวเลขอักษร TI วรรคหนึ่งครั้งกด ชั่วโมง : นาที :วินาที ตามด้วย กด enter (**ตัวอย่าง :** TI 12 : 12 : 12)

7. ตั้ง Zero กรณีมี negative peak กดปุ่ม zero แล้วตามด้วยตัวเลข ตามด้วย enter

8. การตั้ง stoptime กด TIME กดตัวเลขที่ต้องการตั้งค่า กด STOP

9. การ REANALIZE กด A และ กด N ตามด้วย enter

10. การสร้าง Tickmark กด TIME กดศูนย์ กด integration กด 8 ตามด้วย enter ถ้าต้องการลบ Tickmark ให้กด delete กด Time และกดศูนย์

11. ถ้าต้องการให้โครมาโทแกรมที่ run เสร็จ save ใน memory ของเครื่อง ให้กด SHIFT ค้างไว้และกด OPT2 จากนั้นให้พิมพ์ A และกด enter แล้วเลือก raw data กด enter และกด enter อีกครั้งเพื่อตอบ Yes

12. การเข้า Drive A ให้กด B ตามด้วยกด A , enter, กด E: พิมพ์ AUTONAME.BAS enter (เพื่อออกจาก M) จะขึ้น exest basic

13. ต้องการ SHOW DIR A ให้กด DIR วรรค 1 ครั้ง พิมพ์ A:enter

14. ต้องการดูข้อมูลใน File กด AN วรรค 1 ครั้ง พิมพ์ A: พิมพ์ชื่อ File

15. ต้องการ Save method กด SHIFT ค้างไว้ ตามด้วย STOER กด SHIFT ค้าง ตามด้วย METHOD พิมพ์ A: กดชื่อ File ที่ต้องการตั้งแล้วกด enter

16. ต้องการ LOAD METHOD ขึ้นมาใช้งาน ให้กด SHIFT กด LOAD กด METHOD พิมพ์ A: กดชื่อ File แล้ว enter

-------- การขอดูค่าที่ตั้งแต่ละค่ากด List กดปุ่มที่ต้องการจะดูค่า เช่นต้องการดูการตั้ง run time ให้กด List แล้วกด Time กด enter ถ้าต้องการ reset เครื่องใหม่ให้กด CTRL + Shift + Break ค้างไว้แล้วกด Delete ----------

17. ถ้าไม่มี sensor line ต่อระหว่าง injection valve กับ integrator เมื่อเริ่ม inject ตัวอย่างโดยหมุน injection valve มาที่ตำแหน่ง inject ให้กด start ที่เครื่อง integrator ด้วยพร้อมๆ กัน integrator จึงจะเริ่มบันทึก chromatogram ที่ได้

แต่ถ้ามี sensor line ต่อเชื่อมกัน เวลาหมุน injection valve ไปที่ตำแหน่ง inject ที่ integrator จะทำงานทันทีโดยไม่ต้องกดปุ่ม start

18. ถ้ากระดาษหมด ต้องการใส่ม้วนใหม่ ให้กด enter หลายๆ ครั้ง จนปลายกระดาษม้วนเก่าหลุดออกมา นำกระดาษม้วนใหม่ใส่แทนที่แล้วดึงปลายกระดาษขึ้นมา ให้รูที่เจาะข้างกระดาษใส่เข้าไปในปุ่มเฟืองของเครื่องทั้งสองข้างในแนวเดียวกัน กด Ctrl + Esc กระดาษจะเลื่อนขึ้น แล้วกด Break

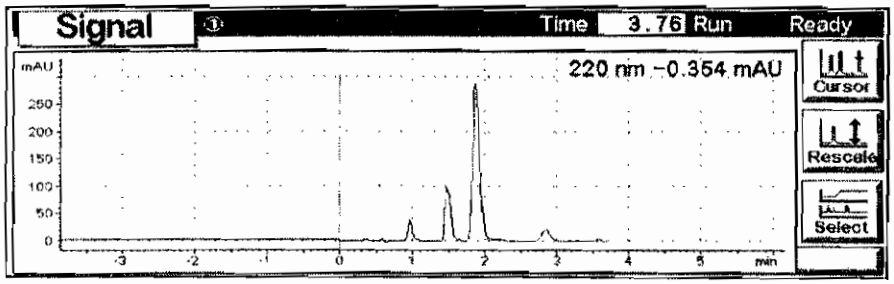
*** ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการสรุปการใช้ integrator ที่จำเป็นใช้บ่อยๆ มีรายละเอียดของ function key ที่ทำงานแบบอื่นๆ อีก แสดงไว้ใน Quick Reference Card ดังรูปที่ 3.8

2.1.6 การ run สารตัวอย่าง

1. ทำการฉีดสารตัวอย่างเข้า Injection port ในตำแหน่ง load
2. เมื่อ base line นิ่งดีแล้ว ให้ทำการ set zero baseline (ดังข้อ 2.1.4 5)
3. ทำการ run สาร โดยหมุน Injection valve ไปที่ตำแหน่ง inject ขณะที่ยังค้าง syringe ไว้ รอเวลาสักครู่หนึ่งเพื่อให้ตัวชะพาตัวอย่างออกจาก loop หมดจึงหมุน Injection valve มาที่ตำแหน่ง load พร้อมดึง syringe ออก
4. ที่ control module สามารถที่จะดู chromatogram ของสารได้โดยให้อยู่ที่หน้า Analysis

5. กด F6

6. จะปรากฏหน้าจอ Signal ที่มี chromatogram ของสาร

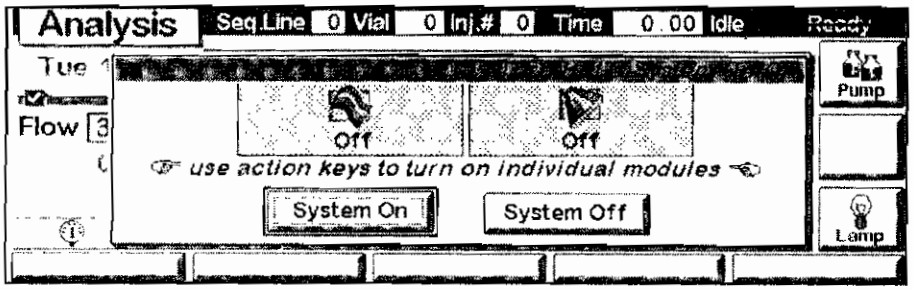


2.1.7 การปิดเครื่อง HPLC

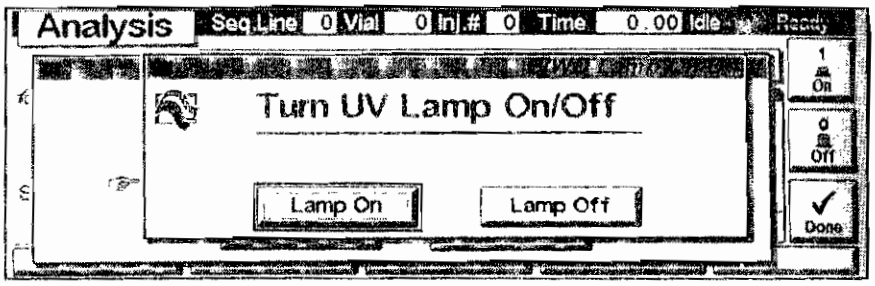
<u>เริ่มปิดหน้า control module</u>

1. ทำให้อยู่ที่หน้า Analysis

2. กด F7 [ ] หน้าจอจะปรากฏดังนี้



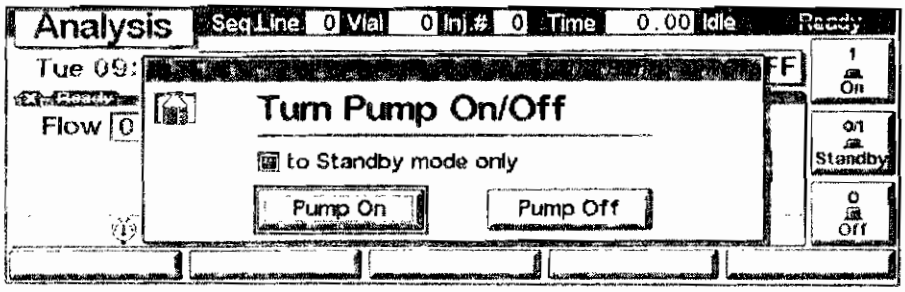
3. กด F6 [Lamp] หน้าจอจะปรากฏดังนี้ (ควรปิด Lamp ก่อน)



4. ใช้ลูกศร ◀▶ เลื่อนให้แถบนูนมาอยู่ที่ Lamp off แล้วกด enter
หรือ กด F7 [0 Off] กด enter จะปรากฏหน้าจอในข้อ 2

---------- ในข้อ 4 นี้จะเป็นการปิด Lamp เพราะฉะนั้นให้สังเกตว่าได้ปิดแล้ว จากรูปใน block ด้านขวาของหน้าจอในข้อ 2 ว่าเปลี่ยนจาก On เป็น Off แล้ว จากนั้นจึงมาทำการปิดปั๊ม ในข้อถัดไป ----------

5. เมื่อปิด Lamp แล้ว กด ESC กด F7 ทำให้หน้าจอกลับมาอยู่ดังหน้าจอในข้อ 2 จากนั้นให้กดปุ่ม F8 [Pump] จะปรากฏหน้าจอดังนี้



6. ใช้ลูกศร ◀▶ เลื่อนให้แถบนูนมาอยู่ที่ Pump off แล้วกด enter

หรือ กด F6 กด enter จะปรากฏหน้าจอในข้อ 2

---------- ให้สังเกตว่าได้ทำการปิดปั๊มแล้ว จากรูปใน block ด้านซ้ายของหน้าจอในข้อ 2 ว่าเปลี่ยนจาก On เป็น Off แล้ว ----------

7. จากนั้นจึงมาทำการปิด system โดยการเลื่อนแถบให้มาอยู่ที่ System off ให้กด enter

(ให้สังเกตว่าปุ่ม System off จะนูนอยู่ก่อนการกด enter เมื่อกด enter แล้วปุ่ม System On จะนูนขึ้นมาแทน)

ข้อสังเกต เมื่อกดปุ่ม System off แล้วจากข้อ 7 หน้าจอจะกลับมาอยู่ที่หน้าจอ Analysis จะเห็นว่าที่หน้าจอจะแบ่งเป็น 2 block ใหญ่ๆ ด้านขวาจะเป็นส่วนของการทำงานของ detector ด้านซ้ายจะเป็นส่วนของการทำงานของปั๊ม เมื่อได้ทำการปิดระบบแล้ว ให้สังเกตแถบด้านบนของทั้ง 2 ส่วนจะมีเครื่องหมาย ☒ Ready แทนเครื่องหมาย ☑ Ready

8. เมื่อระบบการทำงานของเครื่องปิดเรียบร้อยแล้วให้ปิดสวิทช์ที่เครื่องปั๊ม และดีเทคเตอร์ และควรคลายปุ่ม purge ไว้ โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกา 3-4 รอบ เพื่อป้องกันการลืมในคราวหน้ามา run งาน แล้ว ฟองอากาศจะได้ไม่เข้าคอลัมน์

HP 3395/3396 Quick Reference Card

Chart Control

[START] Starts run

[SHIFT] [SEQ] [ENTER] Starts a sequence of runs

[ ] Starts plot without integration

[ ] Stops run or plot

[ ] [1] [ENTER] Sets chart speed to 1 cm/min

[ ] Positions plot 10% away from

[ ] Sets attenuation to 8

[ ] Top of form for 66 line pg (USA)

[ ] Top of form for 70 line pg

[ ] Advance paper 1/3 line

[ ] Large font

[ ] Small font

[ ] Records before

[ ] Records after

[ ] Prints data

Data Storage

A: = Optional floppy disk drive (HP 3396 only)
E: = Optional EPROM
H: = Optional Host memory
M: = Main memory

DIR [space] M: [ENTER] Lists files on M: disk

A: [ENTER] Changes default disk from M: disk to A: disk (Default disk is M: unless otherwise specified)

FORMAT [space] M:, VOL1, 200 [ENTER] Initializes internal disk in drive M: names it VOL1 and divides it into 200 files

COPY [space] A:Q00332D7.BNC, M:DATA391 [ENTER]
Copies data file A:Q00332D7.BNC to M:DATA391

RENAME [space] M:DATA391.BNC, M:Q00332D7 [ENTER]
Renames data file M:DATA391.BNC to M:Q00332D7

PURGE [space] METHOD1 [ENTER] Deletes file named METHOD1

[SHIFT] [ ] 2 [ENTER] Specify whether to store data; determine either bunched or raw signal data; and where to store

Timetable

[ ] [TIME] [ENTER] Lists all current timetable entries

[ ] [5] [CHT SP] 7 [ENTER] Sets chart speed to 7 cm/sec at 0.5 min into the run

[ ] [ ] [ME] [ENTER] Deletes entire timetable

[ ] [ ] [ME] 2 [ENTER] Deletes all entries for 1 min

[ ] [1] [INTG] 8 [ENTER] Turns on Start/Stop marks 1 min into run

[TIME] 2 [INTG] −8 [ENTER] Turns off Start/Stop marks 2 min into run

[SHIFT] = Press SHIFT key and hold down while pressing next key
[CTRL] = Press CTRL key and hold down while pressing next key
[space] = Press the spacebar and release it

Status/Calendar

LIST (LIST) Lists current run parameters

REA (ENTER) Checks system readiness

SY (LIMIT) Lists current system configuration

(INIT) [SHIFT] (OPT.) 2 (ENTER)
Lists current status for Option 2

TIME 8:35:30 (ENTER)
Sets the clock to 8:35:30 AM

DATE 6/1/80 (ENTER)
Sets the calendar to June 1, 1980

Reports

[SHIFT] (AREA%) Prints uncalibrated percent report for data in default file

[SHIFT] (REPORT) Prints calibrated report

NOTEPAD (ENTER)
Adds notes to printed report

ID [sp] LAB1 (ENTER)
Adds identifier to report header

ID " " (ENTER)
Deletes identifier from report header

[SHIFT] (OPT.) 4 (ENTER) Specifies local report suppression, report title, amount label, inclusion of uncalibrated peaks, and report format

[SHIFT] (OPT.) 5 (ENTER) Specifies postrun report storage, external printing, and listing of additional information after a report

Methods

[SHIFT] (PREP) [SHIFT] (METH) Prepares a method step by step

[SHIFT] (EDIT) [SHIFT] (METH) Edits an existing method

(LIST) [SHIFT] (METH) METH625 (ENTER) Lists M:METH625 from default disk

[SHIFT] (STORE) [SHIFT] (METH) M:METH625 (ENTER) Stores current method parameters under M:METH625 on disk M:

[SHIFT] (LOAD) [SHIFT] (METH) M:METH625 (ENTER) Loads M:METH625 into integrator from M: disk

(DEL) [SHIFT] (METH) M:METH625 (ENTER) Deletes M:METH625 from M: disk

[SHIFT] (OPT.) 5 (ENTER) Specifies form feeds before and after reports, perforation skips in plots and reports, and large or small font

[SHIFT] (OPT.) 6 (ENTER) Sends commands to specified remote device

(LIST) [SHIFT] (OPT.) (ENTER) Lists all option dialogs

Sequences

Syntax same as for methods' using [SHIFT] (SEQ) key I see above

[SHIFT] (OPT.) 7 (ENTER) Specifies use of sample table in external mode

External Events (HP 19405A) (HP 9836 only)

(EXT.) 1 (ENTER) Turns on external event 1

(EXT.) -1 (ENTER) Turns off external event 1

(TIME) 1 (EXT.) 5 (ENTER) Turns external event 5 on at 1 min into the run

(DEL) (TIME) 1 (EXT.) (ENTER) Deletes external events programmed for 1 min into run

(DEL) (TIME) (EXT.) Deletes entire external events timetable

(LIST) (TIME) (EXT.) Lists external event timetable

(TIME) 1 (EXT.) (ENTER) Sets equilibration time to 1 min and activates auto reset function

[SHIFT] = Press SHIFT key and hold down while pressing next key
(CTRL) = Press CTRL key and hold down while pressing next key
[space] = Press the spacebar and release it

Calibration/Calculations

[SHIFT] PREP [SHIFT] CALIB ENTER Prepares calibration step-by-step

[SHIFT] EDIT [SHIFT] CALIB ENTER Edits existing calibration

LIST [SHIFT] CALIB C A L 6 2 5 ENTER Lists calibration file CAL625 from default disk

[SHIFT] STORE [SHIFT] CALIB M : C A L 6 2 5 ENTER Stores current calibration parameters to CAL625 on disk M

[SHIFT] LOAD [SHIFT] CALIB M : C A L 6 2 5 ENTER Loads CAL625.CAL into integrator from M: disk

DEL [SHIFT] CALIB C A L 6 2 5 ENTER Deletes CAL625.CAL

[SHIFT] OPT 3 ENTER Specifies response factor for uncalibrated peaks, calibration fit, retention time updating, peak number, internal standard amount, sample amount, and multiplication factor

[SHIFT] OPT 4 ENTER Specifies area or height for calculations

[SHIFT] OPT 7 ENTER Specifies values for internal standard amount, sample amount, and multiplication factor without sample table

Integration/Reintegration

PK WD . 01 ENTER Sets peak width to .01 min

THRSH 5 ENTER Sets threshold to 5

THRSH ENTER Measures noise and sets threshold

THRSH – ENTER Aborts noise measurement

AREA 8 0 0 ENTER Sets area rejection limit to 800

TIME . 0 1 INTGL 0 ENTER Sets baseline at .01 min
1 Sets baseline at next valley
2 Sets baseline at all valleys
3 Processes next peak as solvent peak
4 Turns off automatic solvent detection
5 Draws horizontal line
6 Measures and updates threshold
7 Turns off retention time labeling
8 Turns on Start/Stop marks
9 Turns off integration
10 Increments threshold
11 Inverts negative peaks
12 Clamps negative peaks
13 Shows functions 11 and 12
14 Starts peak sum window

A N ENTER Reintegrates data in default file

A N , I ENTER Reintegrates data in default file using original PK WD profile

Recalibration

[SHIFT] CALIB 2 ENTER Manually initiates averaging for response data for level 2 of current calibration

A N [space] D A T A 1 ENTER Reintegrates data in DATA1 file

A N [space] D A T A 1 , I ENTER Reintegrates data in DATA1 file using original PK WD profile

[SHIFT] CALIB – 2 ENTER Replaces old data with new data for level 2 of current calibration

[SHIFT] OPT 1 ENTER Specifies integration plot type

[SHIFT] = Press SHIFT key and hold down while pressing next key
[CTRL] = Press CTRL key and hold down while pressing next key
[space] = Press the spacebar and release it

Applications Programs

At asterisk prompt (*) press appropriate key to start program.

1 File Manager

Manage your disk files with wildcards using the COPY, DELETE, DIRECTORY, FORMAT, LIST, and RENAME commands.

2 Batch Reprocess

Reprocesses existing data files using new method or sequence parameters. Calibration files can be reprocessed to update their calibration information.

- **Updates calibration information of the current method.**
- **Updates calibration information of a specified calib file.**

3 Plot Calibration Curve

Plots the response curves of calibrated peaks from a method or multi-level calibration file.

- **Plots with defaults or enter plotting parameters.**
- **Plots selected peaks or the entire file.**

5 Bar Coded Methods (HP 3396 Dual Channel only)

Automates runs without a sequence. The method, inj volume, cal level, and the number of injections is coded on each bar coded vial.

- **Prepare bar code labels ahead of time.**

6 Sequence Chaining

Chains a set of sequences together.

- **Each sequence can be assigned an optional Autoscheduler file for scheduling postrun programs.**

8 Plot Baseline

Replots the original chromatogram with its baseline.

- **Set OP() 2 to store signal data and processed peak files.**
- **Store bunched data when possible.**
- **E:BASELINE.BAS can be scheduled as a postrun program.**

9 Autoscheduler

Schedules postrun programs and provides access to the AUTONAME and AUTO_2CH (dual channel) programs.

- **Press 0 to start an autoscheduled run or sequence.**

Autoname

E:AUTONAME.BAS is an application program that automatically renames the signal data, processed peak, and report files after each run.

- **Enter the file name prefix in the Autoscheduler dialog.**
  Prefix = TEST and Run# = 002, then TEST002.BNC
  Prefix = TEST*, Vial# = 20, and Inj# = 02, then TEST2002.BNC
  If no prefix, sample names are read from the active sample table
- **Schedule E:AUTONAME.BAS as a postrun program.**
- **Press 0 to start an autoscheduled run or sequence.**

HP 5890 Dual Channel (HP 3396 only)

E:AUTO_2CH.BAS is the Dual Channel application program.

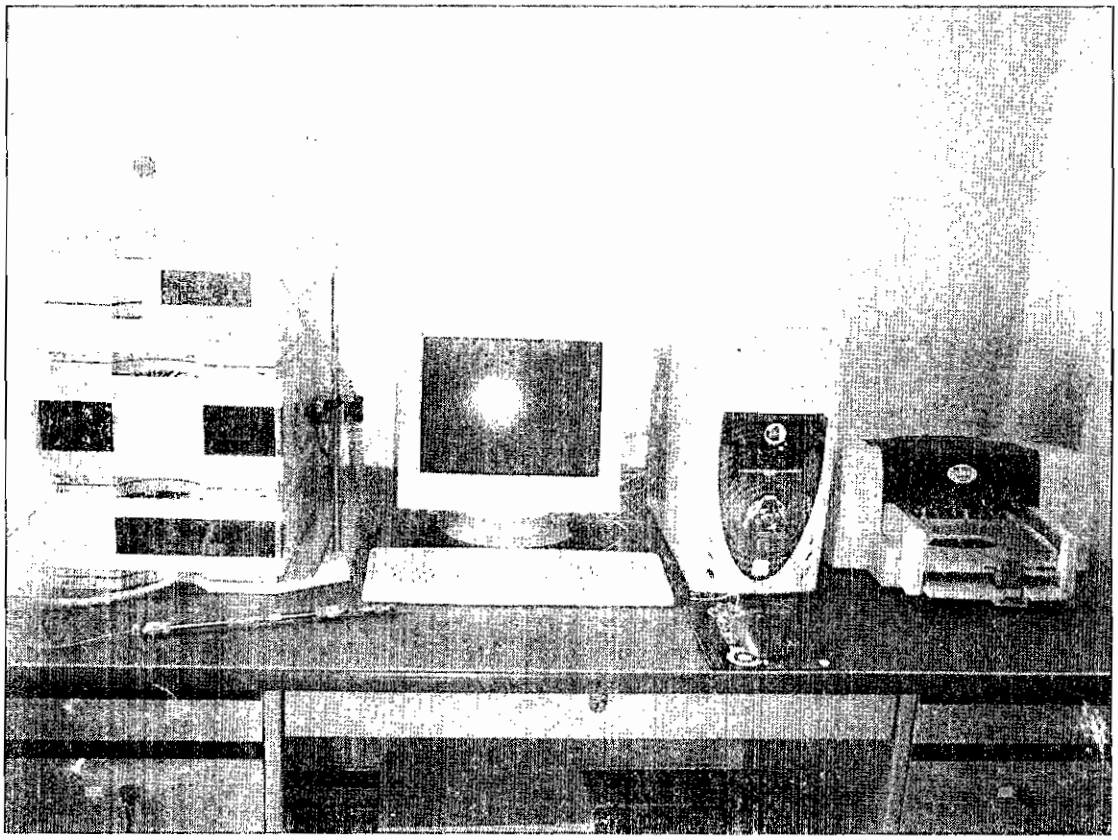
- **The Dual Channel program must be the first postrun program on the buffered channel.**
- **Press 0 to start an autoscheduled run or sequence.**

0 Auto Start

Start key for autoscheduled run or sequence.

HEWLETT PACKARD Copyright © 1992 Hewlett-Packard Company

Printed in USA 5/92
Part No. 03395-90265



รูปที่ 3.9 HPLC 1100 Binary pump , Computer & Printer ในห้องปฏิบัติการ CM 437

2.2.1 วิธีการเปิดเครื่อง HPLC Binary Pump

1. บรรจุเฟสเคลื่อนที่ลงในขวดบรรจุ แล้ววางลงบน Solvent carbinet (ดังรูปที่ 3.4) ใส่ Solvent inlet filter ที่ต่อเข้ากับท่อส่งตัวทำละลาย ปกติ line A จะใช้สำหรับตัวทำละลายน้ำ หรือ buffer และ line B สำหรับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น methanol หรือ acetonitile

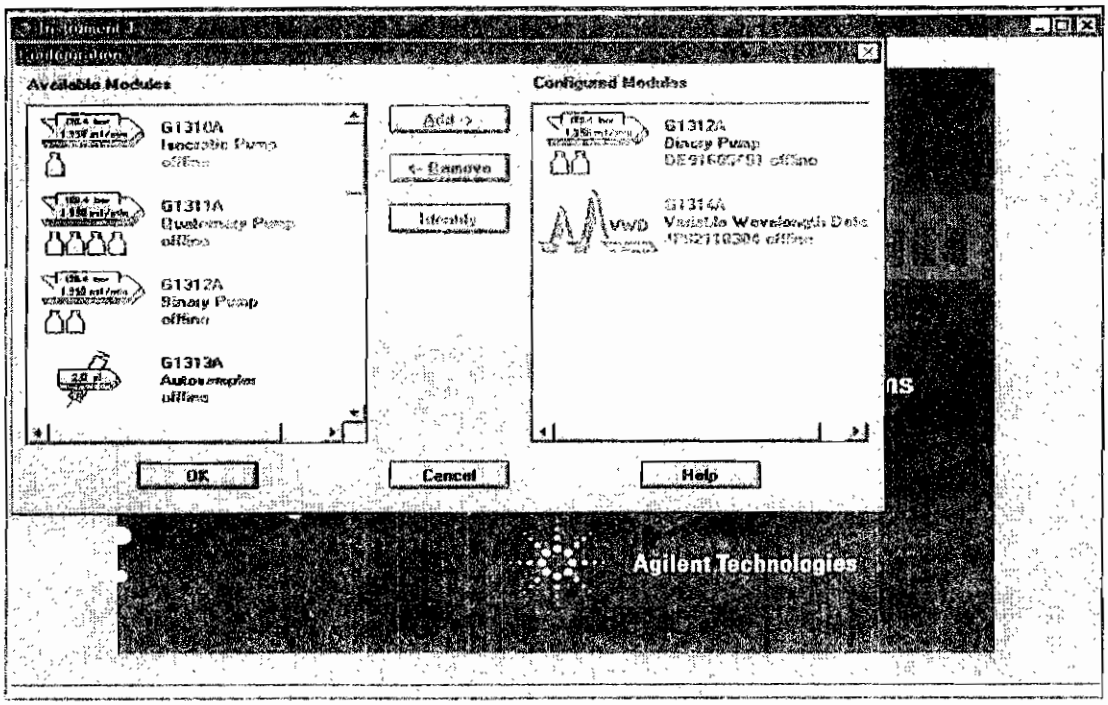
2. หมุนปุ่ม purge valve ทวนเข็มนาฬิกา 3-4 รอบ

3. เสียบปลั๊กเปิดสวิทช์ที่ Stabilizer เปิดสวิทช์ตัวเครื่อง HPLC (ได้แก่ degrasser, binary pump และ UV detector โดยเปิดจากด้านล่างขึ้นด้านบน) และ Computer

4. หน้าจอเครื่อง computer ขึ้น NT workstation ให้กด Ctrl + Alt + Del

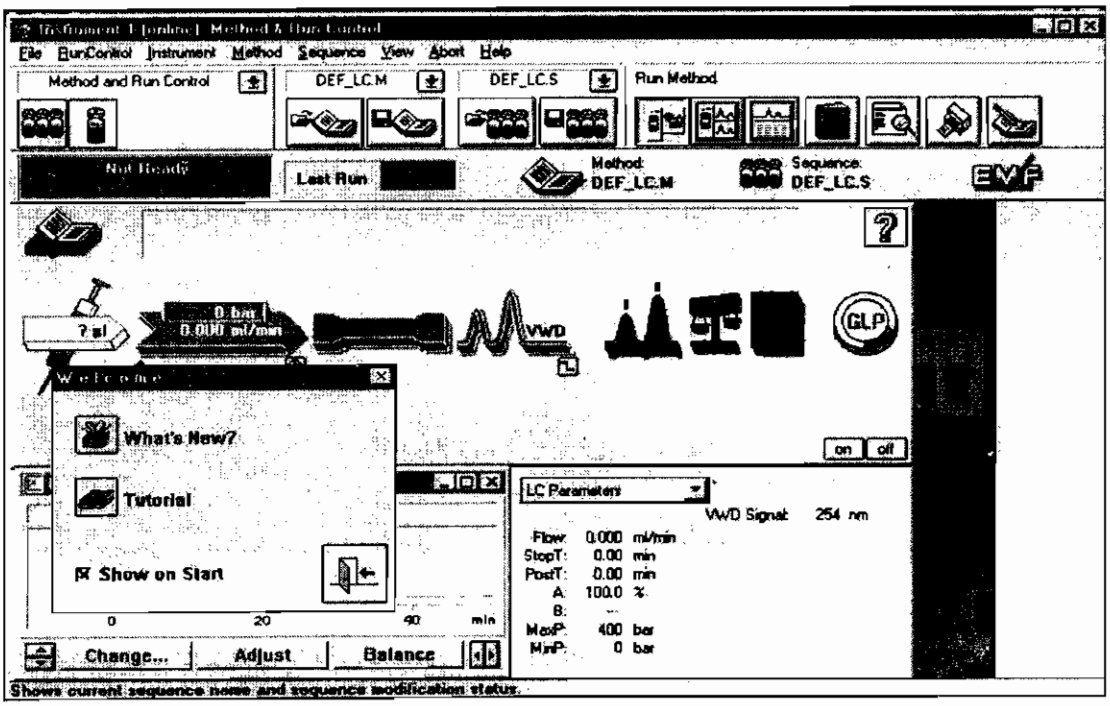
5. หน้าจอเครื่อง computer ขึ้น login.....passsword... ให้กด OK

6. ❖ หน้าจอจะปรากฏหน้าต่าง *Configuration* เลือกอุปกรณ์ที่ต้องการ config คือ Binary Pump และ VWD กด Add มาใส่ที่ช่อง Configured Modules จากนั้นให้กด OK



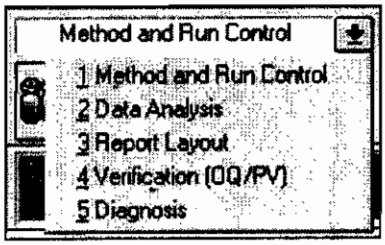
❖ Double click ที่ icon Instrument 1 online หรือ Start → Programs → HP chemstation → Instrument 1 online (ถ้าต้องการทำงานเฉพาะการวิเคราะห์ข้อมูลในเครื่องให้ Double click ที่ Instrument 1 offline)

◆ จะปรากฏหน้าจอดังรูป

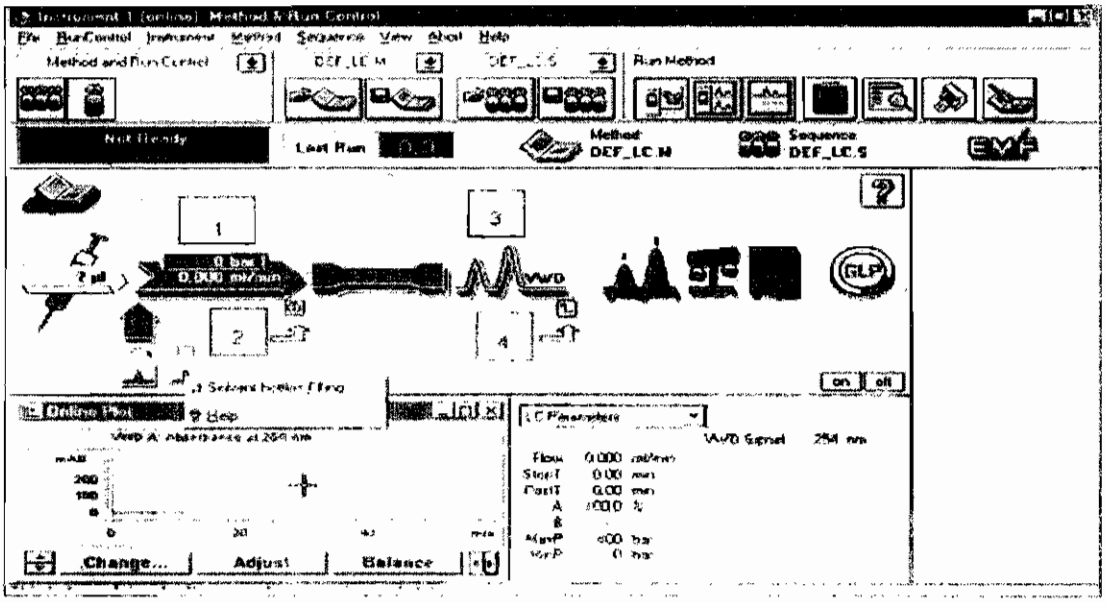


7. Click ที่รูปหนังสือเปิด จะได้หน้าของหน้าต่าง ***Instrument 1 online***

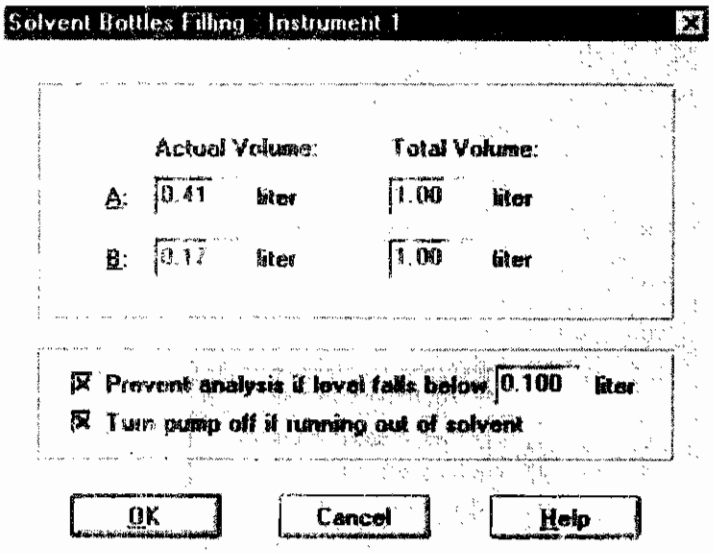
8. ถ้าหน้าต่างไม่ใช่หน้าต่างของ Method and Run Control ที่ drop down list ช่องแรก ของบรรทัดที่ 3 ของหน้าต่าง



ให้เลือก **Method and Run Control**



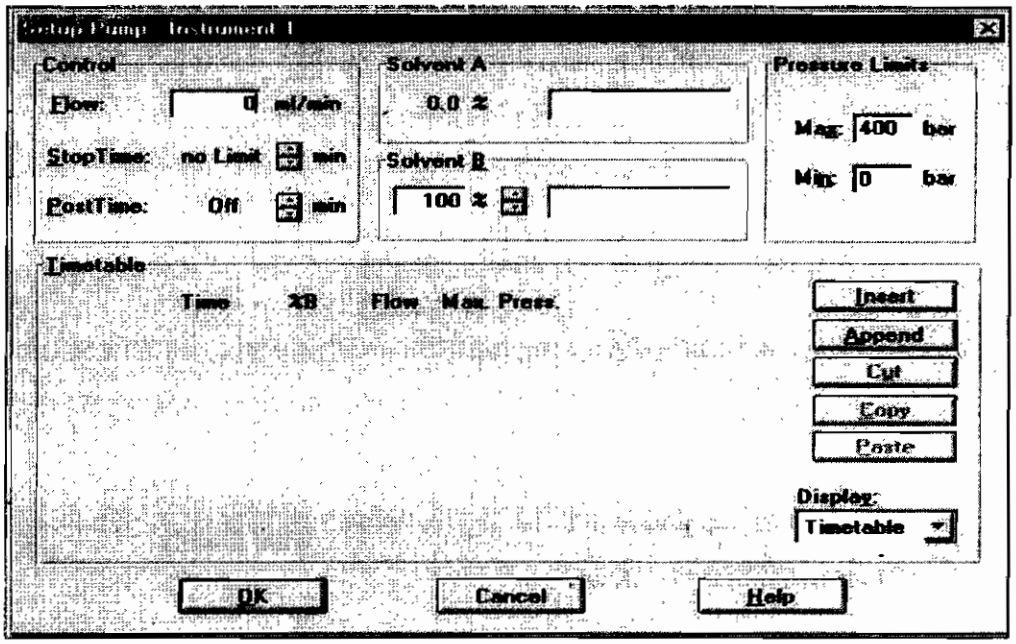
9. ◆ ที่รูปภาพ [illegible] ให้ [illegible] Solvents [illegible]



◆ [illegible]

- เติมปริมาตรขวดตัวทำละลาย ในช่อง Total Volume
- กด OK

10. ที่เมนู **Instrument** เลือก **Setup pump** หรือ click ที่รูปหมายเลข 1 จะปรากฏหน้าจอ



[1.] ทำการ purge line A ก่อน โดยพิมพ์ช่อง line B เป็น 0 % กด OK line A จะขึ้น 100 %

[2.] ปรับ Flow rate เป็น 2-5 ml/min

[3.] กด OK

[4.] เปิด pump โดย click ที่ปุ่มหมายเลข 2

[5.] ทำการ purge จนแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศตาม line A

[6.] เข้า Setup pump พิมพ์ B เป็น 100% กด OK A จะเปลี่ยนเป็น 0 % โดยอัตโนมัติ

[7.] ทำการ purge line B ประมาณ 7 – 10 นาที จนแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศตาม line B

[8.] เข้า Setup pump ปรับ % B และ A ให้ได้ตามต้องการ กด OK แล้วเปิด pump อีกครั้งโดยกดปุ่ม ทำการ purge อีกประมาณ 5-10 นาที ให้สังเกตจากฟองอากาศว่าหมดแล้ว

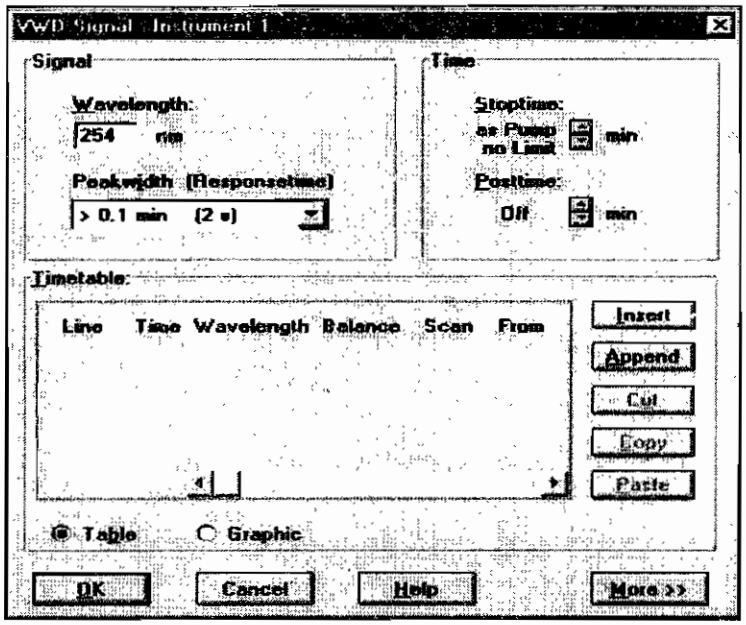
[9.] เข้า Setup pump ปรับ flow rate เป็น 0 กด OK

11. หมุน purge valve ปิดตามเข็มนาฬิกาพอตึงมือ แต่อย่าหมุนจนแน่นแล้วหมุนไม่ออกในคราวต่อไป

12. เสร็จแล้วเข้า **Setup pump** โดย click ที่รูปหมายเลข 1 ปรับ Flow rate ตามเงื่อนไขที่ต้องการ กด OK

13. ที่เมนู **Instrument** เลือก **Setup VWD signal** หรือ

click ที่รูปหมายเลข 3 จะปรากฏหน้าจอ

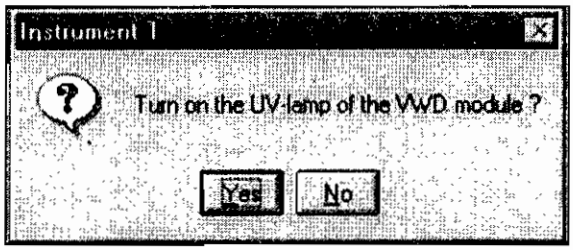


❑ ทำการตั้งความยาวคลื่นที่ต้องการ

❑ ส่วนค่าอื่นๆ ไม่ต้องเปลี่ยนแปลง

❑ กด OK

15. ทำการเปิด lamp โดย click ที่ปุ่มหมายเลข 4 จะปรากฏหน้าจอดังรูป ให้กด Yes

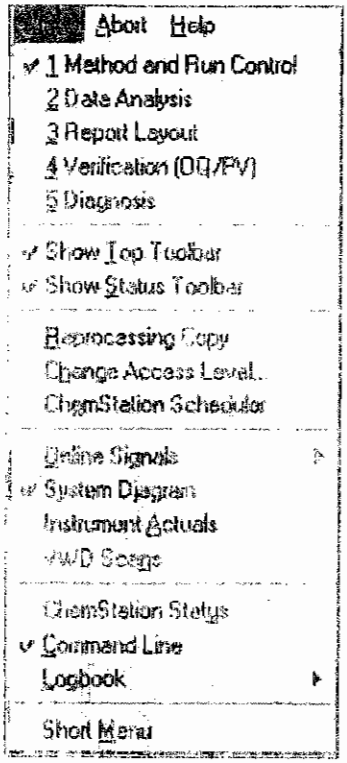


16. รอจน base line นิ่ง ประมาณ 30 นาทีถึง 2 ชม. ระหว่างรอให้ล้าง loop ของ Injector (วิธีการล้าง ดังรูปที่ 3.6) ด้วยเมทานาล 1 ครั้ง ตามด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง แล้วตามด้วย Methanol อีก 1 ครั้ง

2.2.2 การสร้างวิธีสำหรับ run chromatogram (Creating Method)

1. ❍ ไปที่เมนู View เลือก **Method and Run Control** และ **Full menu**

(Show Top Toolbar & Show Status Toolbar)



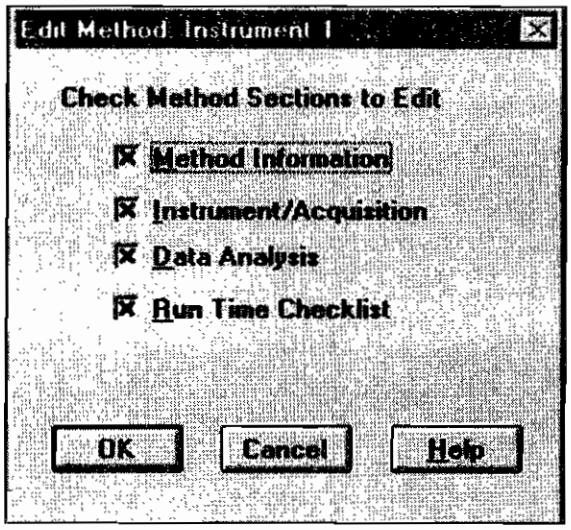
❍ หรือไปที่ drop down list ช่องแรกของบรรทัดที่ 3 ของหน้าต่าง

เลือก Method and Run Control

2. ❍ ไปที่เมนู **Method** เลือก **New Method** จะมีการถามว่าต้องการ save ของเก่าหรือไม่ควรกด NO

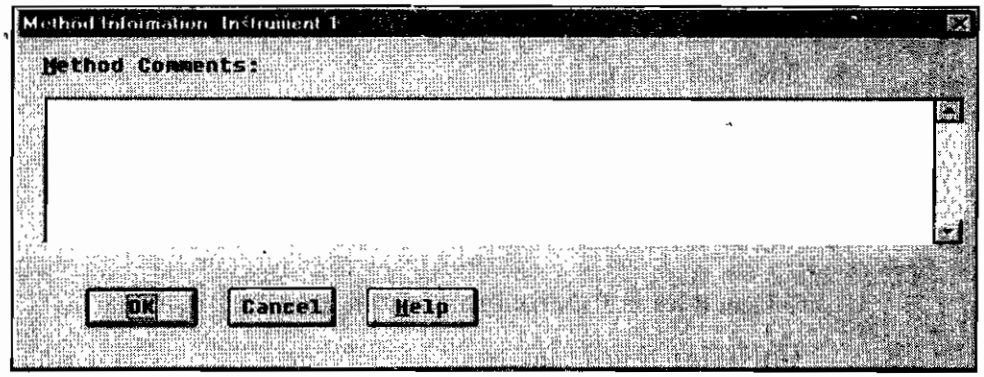
❍ ไปที่เมนู **Method** เลือก **Edit entire Method**

❍ จะปรากฏหน้าจอ Edit Method



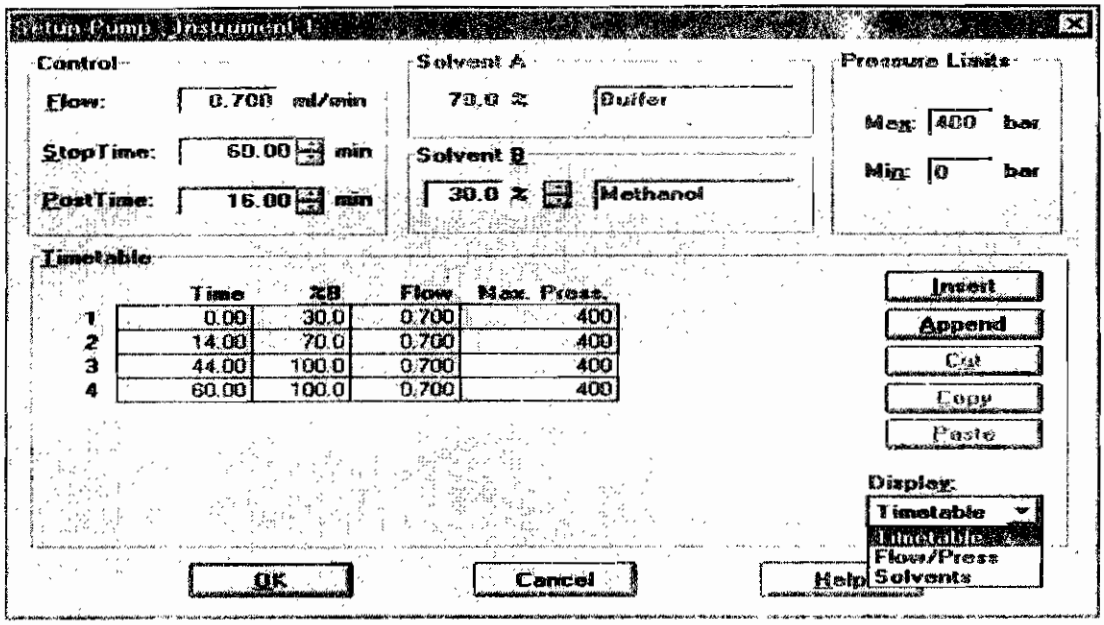
❍ click ให้เป็น ☒ ในทุกช่อง กด OK

❍ จะปรากฏหน้าจอ Method Information



❍ ให้พิมพ์ comments ที่ต้องการ กด OK

❍ จะปรากฏหน้าจอ Setup pump



❍ แล้วทำการตั้งค่าตัวแปรที่ต้องการให้เหมาะสมกับงานที่วิเคราะห์ ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารตัวอย่างและคอลัมน์ที่ใช้

ตัวแปรที่ต้องตั้งค่ามีดังนี้

- Flow : อัตราการไหลของ Solvent
- Stop Time : เวลาที่ Run
- Post Time : เวลาที่ใช้ล้าง Column ให้สะอาด หลัง run เสร็จ ก่อนที่จะฉีดสารตัวต่อไป
- Solvent A คือ น้ำ หรือ buffer

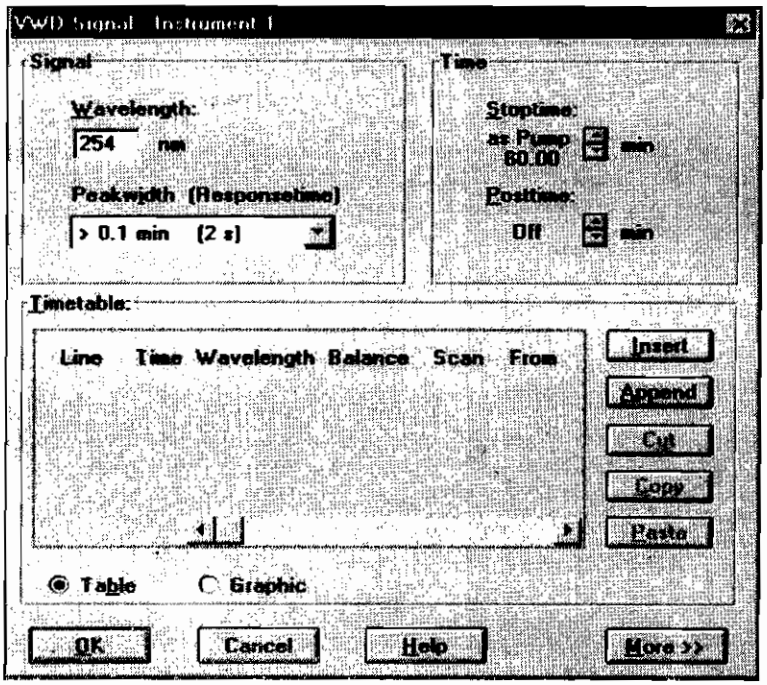
  Solvent B คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น methanol หรือ acetonitile

  ให้ปรับอัตราส่วนที่ Solvent B
- Pressure Limits : Max (ความดันสูงสุด) ตั้งไว้ที่ 400

  : Min (ความดันต่ำสุด) ตั้งไว้ที่ 000

- Timetable : Insert (แทรกแถว) ใช้สำหรับการ run แบบ gradient elution
  : Append (เพิ่มแถว)
  : Display: (Timetable , Flow/Press , Solvents)
- กรอกข้อมูลเสร็จแล้ว กด OK

❍ จะปรากฏหน้าจอ **VWD signal**

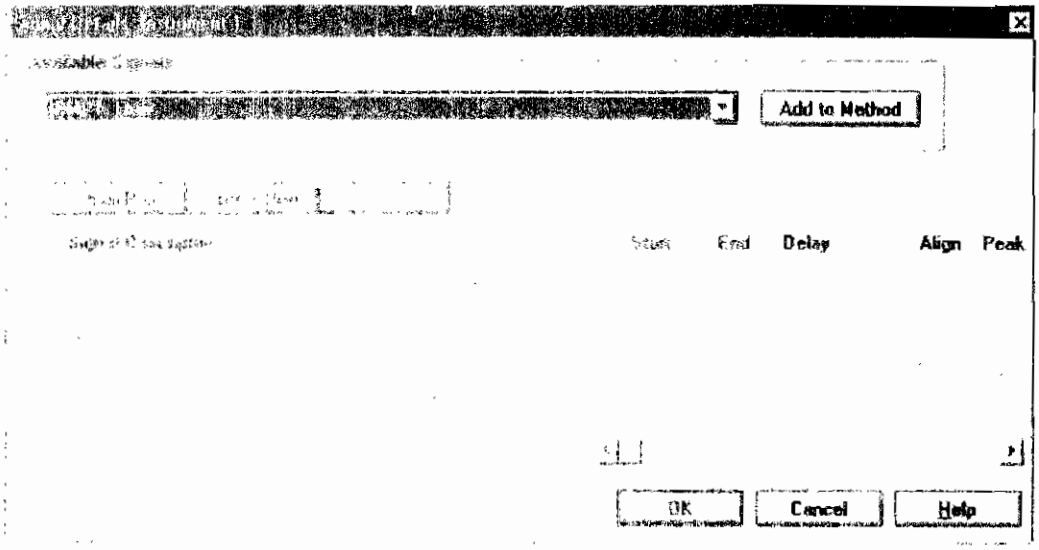


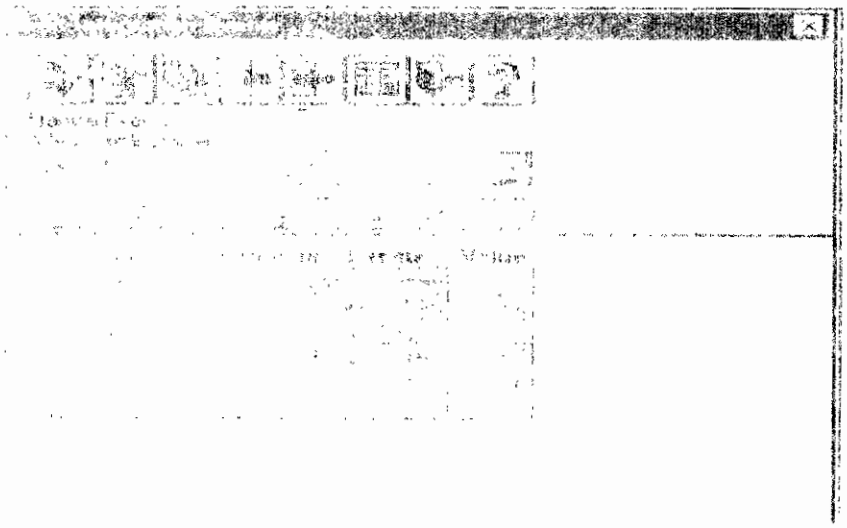
ตัวแปรที่ต้องตั้งค่ามีดังนี้

※ ใส่ค่าความยาวคลื่นที่ต้องการวิเคราะห์

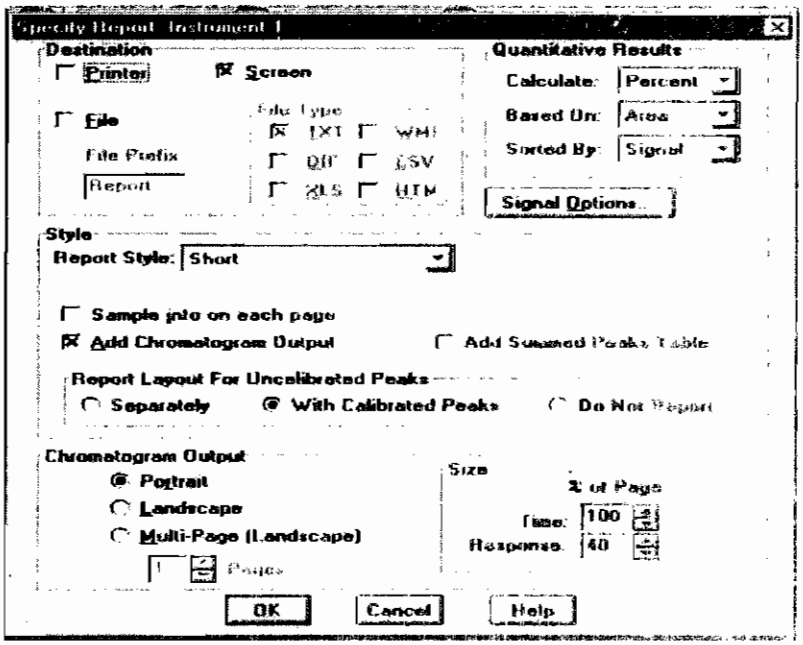
※ ใส่ค่า Stop time และ post time

※ กด OK

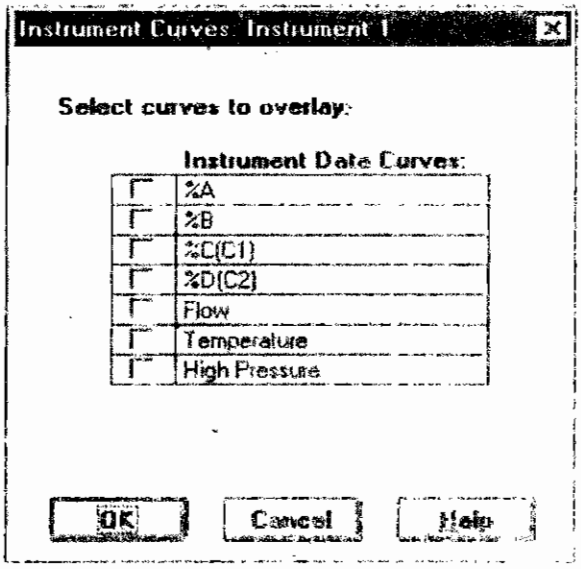

Add to Method
End
Delay
Align
Peak
OK
Cancel
Help



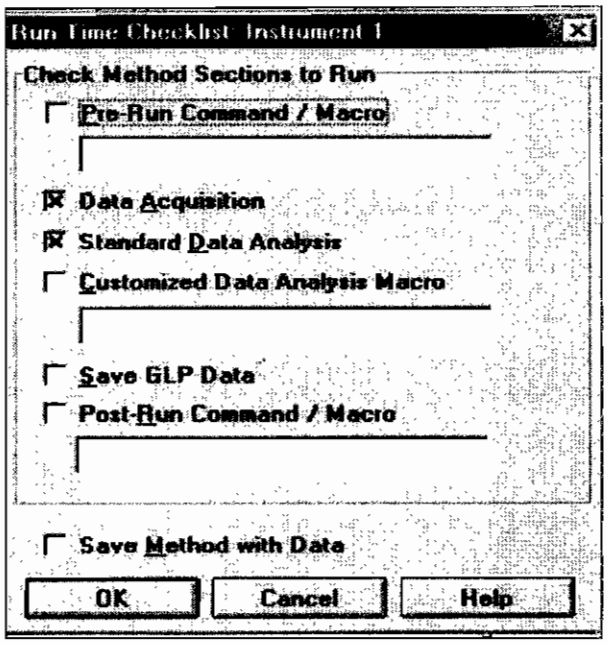
( ) จะปรากฏหน้าจอ Specify Report ดังนี้ OK



( ) จะปรากฏหน้าจอ Instrument Curves ดังนี้ OK



❍ จะปรากฏหน้าจอ **Run Time Checklist** กด OK



❍ จะปรากฏหน้าจอ **Method & Run Control** ตามเดิม

หมายเหตุ : การ Setup Injector จะเป็นการใส่ปริมาตรสารตัวอย่างที่ต้องการฉีด เมื่อใช้เครื่อง Auto Injector **ถ้าฉีดแบบ manual ไม่ต้อง Setup**

3. ไปที่เมนู **Method** เลือก **method save as** ใส่ชื่อ method แล้วกด save

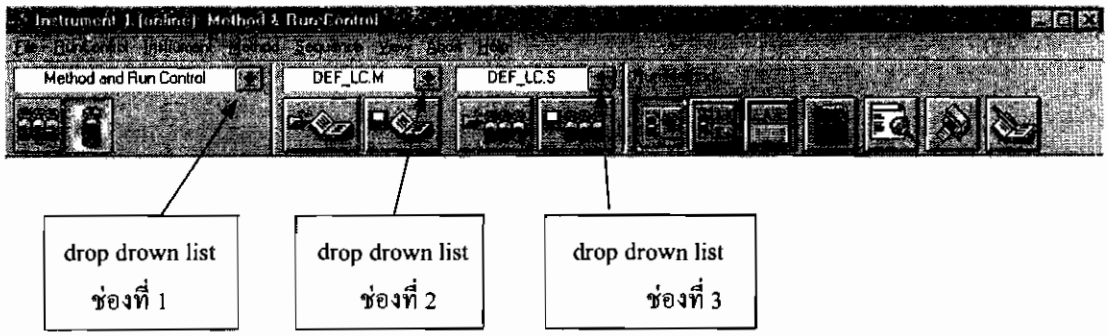
4. กรณีที่ต้องการนำ method ที่สร้างไว้แล้วมาแก้ไข parameter บางค่าเพื่อการใช้งานใหม่ ให้ไปที่เมนู method เลือก Load method เลือก method ที่ต้องการแก้ไข กด OK

5. ทำการแก้ไข parameter ตามต้องการ ทำเช่นเดียวกับการ set up ค่าต่างๆ แล้วกด OK

6. ไปที่เมนู **Method** เลือก method save แล้วกด save

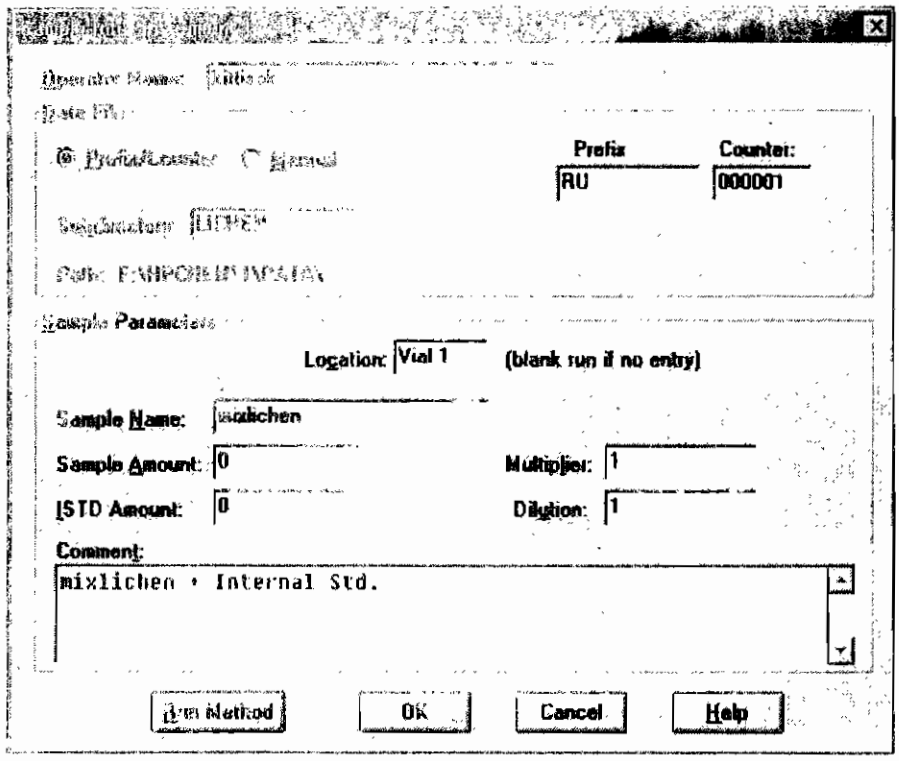
2.2.3 การ run chromatogram แบบ manual

---------- ให้หน้าต่างอยู่ที่หน้า Instrument 1 (online) Method and Run Control และสังเกตที่บรรทัดที่ 3 ของหน้าต่าง ตรงช่องที่มี drop drown list ช่องที่ 2 ต้องเป็นชื่อ method ที่ต้องการใช้งาน ถ้าไม่ใช่ต้องไปที่เมนู **Method** เลือก **Load Method** และทำการเลือก method ที่ถูกต้องขึ้นมาใหม่ ----------



ขั้นตอนการ run chromatogram

1. click ที่เมนู **Run Control** เลือก **Sample Info....** จะปรากฏหน้า Sample Info



2. ที่ Operator Name : ให้ใส่ชื่อผู้ที่ทำการวิเคราะห์ (Operator Name)

(ข) ที่ Data File

- ที่ Prefix/Counter : ตรงที่ช่อง Prefix ให้ใส่ RU และที่ Counter ให้พิมพ์ 000001
- ที่ Subdirectory : ให้ใส่ชื่อ Subdirectory เช่น
- ที่ File : ให้ใส่ชื่อ Data File

(ค) ที่ Sample Parameters

- ที่ Sample Name : ให้ใส่ชื่อ Sample
- ที่เหลือๆ ไม่ต้องแก้ไขครับ

(ง) ที่ Comment : ให้พิมพ์ว่า mixlichen + Internal Std.

3. กด OK

4. จะมีหน้าต่างขึ้นมาให้ใส่ชื่อ Data File ที่ต้องการจะเก็บ ให้

5. ฉีดสารเข้าไปใน loop ของ Injection valve ในตำแหน่ง load โดยต้องล้าง loop ด้วยตัวอย่าง 2 ครั้ง แล้วฉีดสารให้เต็ม loop ยังไม่ดึง syringe ออก

   (*** สังเกตอย่าให้มีฟองอากาศใน syringe ***)

6. click ที่ Balance เพื่อให้ base line เท่ากับศูนย์ โดยการดู base line ให้ใช้แกน x ~ 2 และแกน y ~ 10

   ▲▼ : หมายความว่ากดลูกศรเพื่อปรับขยายสเกล

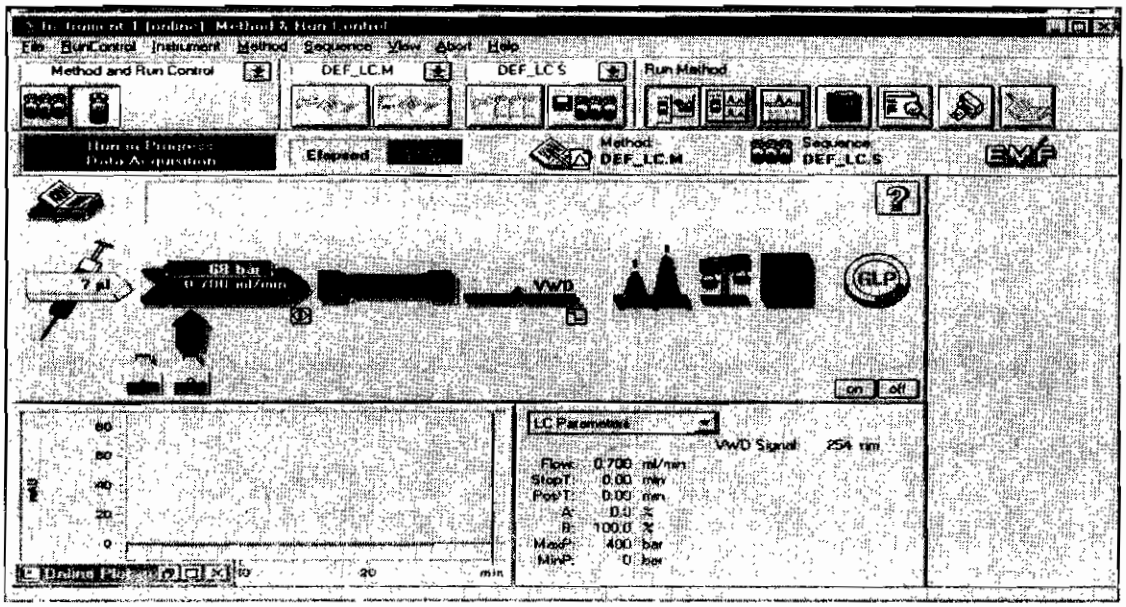
   change : หมายความว่าจะใช้ในการตั้งค่า scale ของแกน x และแกน y

   adjust : หมายความว่าหน้าจอจะไปยังจุดสุดท้ายของเส้นกราฟ

   balance : หมายความว่าปรับ baseline ให้เท่ากับ 0

7. เมื่อ base line นิ่งแล้วให้หมุน Injector ลง ไปที่ตำแหน่ง inject รอเวลาสักครู่ ให้เฟสเคลื่อนที่พาสารออกจาก loop หมด แล้วหมุนกลับมาที่ตำแหน่ง load พร้อมดึง syringe ออก สังเกตที่ status bar ขึ้นสีน้ำเงิน

ดังรูป



8. รอจน Run เสร็จ สังเกต status bar ขึ้นสีน้ำเงิน

9. ระหว่างนี้ล้าง loop ของ Injection valve ด้วย Methanol 1 ครั้ง ตามด้วยน้ำ DI 2 ครั้ง แล้วตามด้วย Methanol อีก 1 ครั้ง แต่ถ้ามีการ run ด้วยสารชนิดเดิมแต่เปลี่ยนความเข้มข้นให้ใช้สารที่จะฉีดใหม่ rinse loop 2 ครั้ง ในตำแหน่ง load แล้วฉีดรอไว้ให้เต็ม loop

10. ทำซ้ำตั้งแต่ข้อ1 (หากมีการ Run เพิ่มเติม)

11. ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ให้ run chromatogram ของสารมาตรฐานให้ครบทุกความเข้มข้นก่อน แล้วไปที่ Instrument offline เพื่อสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) ตามข้อ 5 ในหัวข้อ 2.2.4 แล้ว save method file เมื่อทำการ run ตัวอย่างด้วย method ที่สร้างกราฟมาตรฐานแล้ว ข้อมูลความเข้มข้นจะถูกรายงานทันทีเมื่อ run ตัวอย่างเสร็จ (ดูรายละเอียดข้อ 6 ในหัวข้อ 2.2.4)

เมื่อ Run เสร็จทั้งหมด

ล้าง Column ด้วยน้ำ DI อย่างน้อย 30 นาที (ถ้าใช้ Solvent เป็นเกลือ) แล้วล้าง Column ด้วย 100% Methanol ประมาณ 20 นาที ตามด้วย 95% methanol (Methanol 95% + H_2O 5%) ประมาณ 15 นาที เพื่อเก็บรักษาคอลัมน์

*** **ข้อควรระวังอย่างมาก** ***

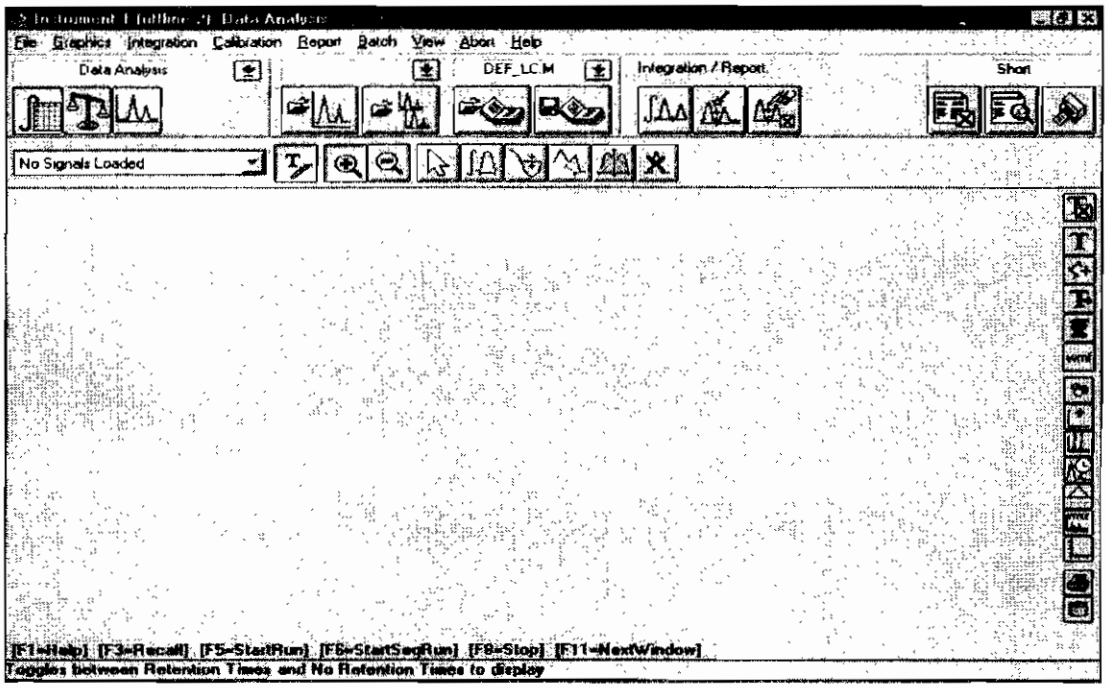
ถ้ามีการ run ด้วย buffer ต้องล้างเกลือออกจากระบบปั๊มให้หมด มิฉะนั้นเกลืออาจตกค้างและแห้งอยู่ในปั๊ม ทำให้ปั๊มไม่ทำงาน และ seal ต่างๆ อาจเสียไว

*** **หมายเหตุ** ***

ถ้ามีการ run แบบ sequence เมื่อตั้งค่าที่ Sample info เสร็จแล้วให้ไปที่เมนู sequence เลือก sequence parameter ใส่ชื่อ operator , Subdirectory ให้เหมือนกับ Sample info เลือก Auto กด OK ไปที่ sequence เลือกเมนูย่อย New sequence ⟶ Sequence Table ใส่ข้อมูลต่างๆ ลงใน sequence Table แล้ว save sequence as เมื่อต้องการ run ให้ load method sequence ขึ้นมาใช้ในการ run

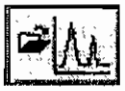
2.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

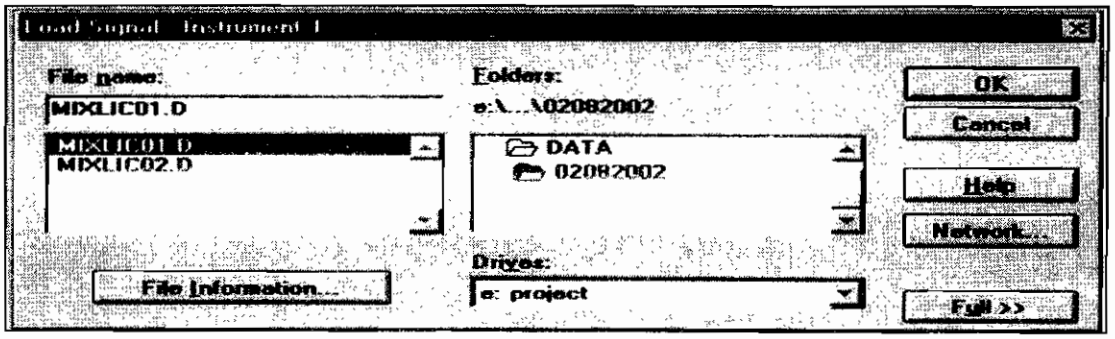
- ที่หน้าต่าง Desktop ให้ click ที่ Icon Instrument 1 offline
- จะปรากฏหน้าต่าง **Data Analysis**



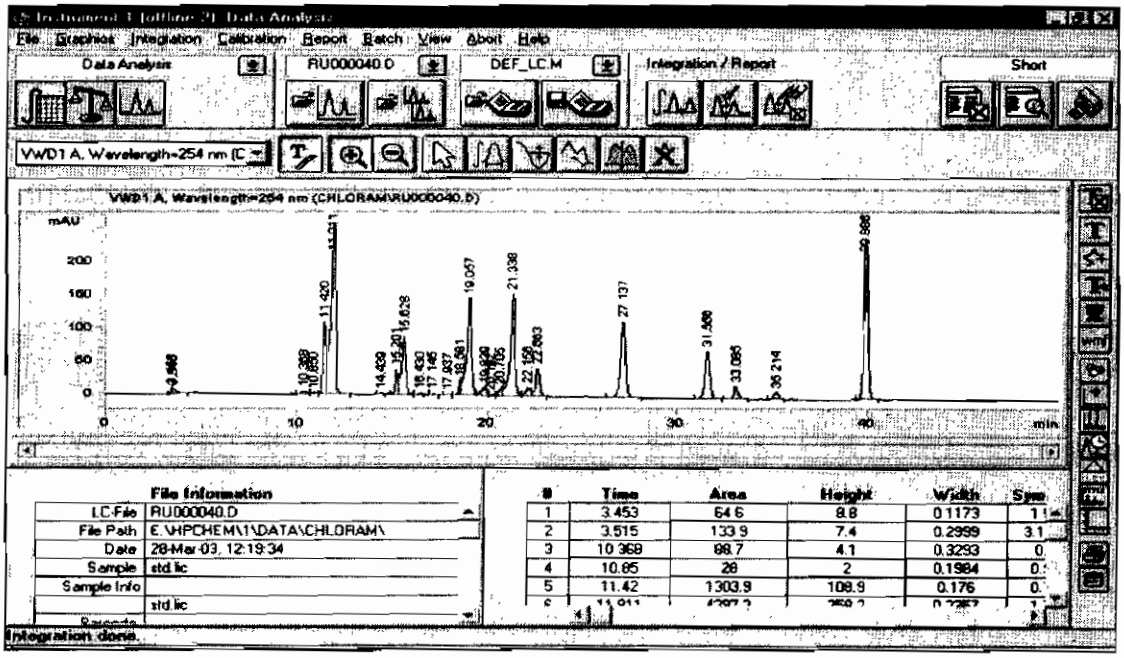
- ที่ drop drown list ช่องที่ 1 บรรทัดที่ 3 หากไม่ใช่ Data Analysis ให้ click เลือก Data Analysis

1. การเปิดดูข้อมูล

1.1 ที่เมนู **File** เลือก **Load Signal** หรือ click ที่รูป  จะปรากฏหน้าจอ Load Signal

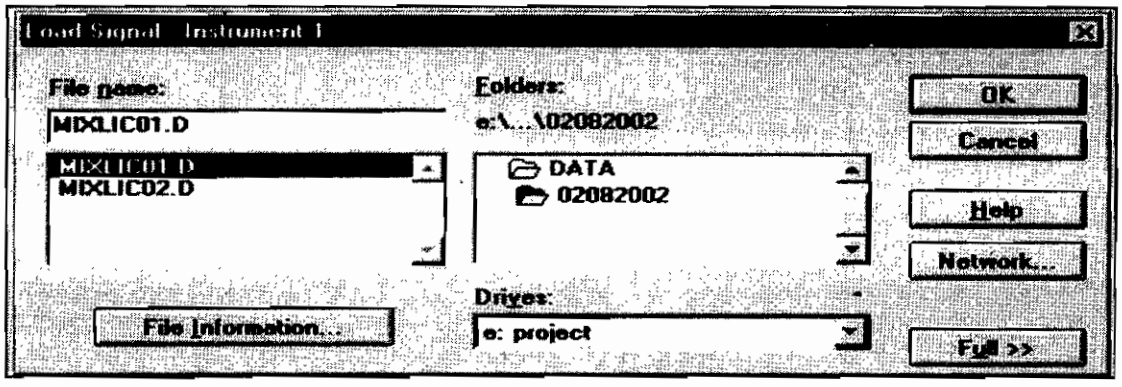


- เลือก DATA จาก folder ที่เก็บข้อมูลแล้วเลือก File Name ที่ต้องการ กด OK (สำหรับข้อมูลชุดเดียว)
- จะปรากฏหน้าจอดังรูป



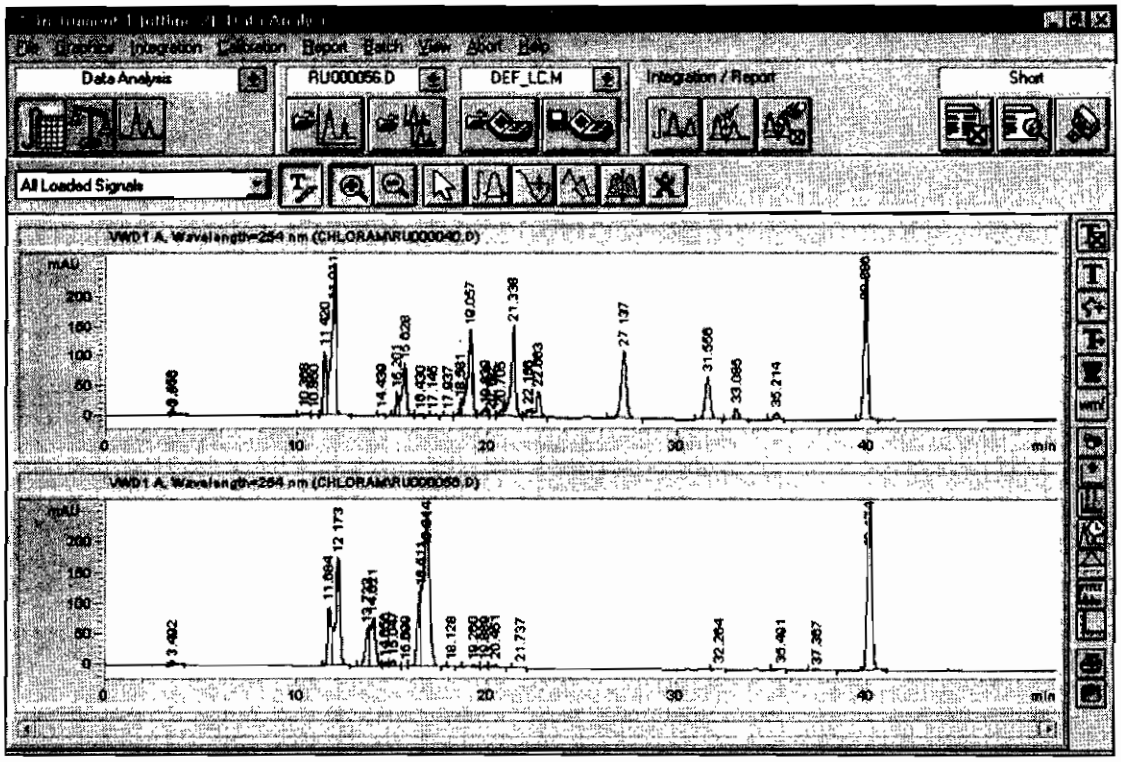
1.2 ถ้าต้องการเรียกข้อมูลมากกว่า 1 ข้อมูล (ต้องทำข้อ 1.1 ก่อน)

และให้ click ที่รูป อีกครั้ง จะปรากฏหน้าจอ Load Signal



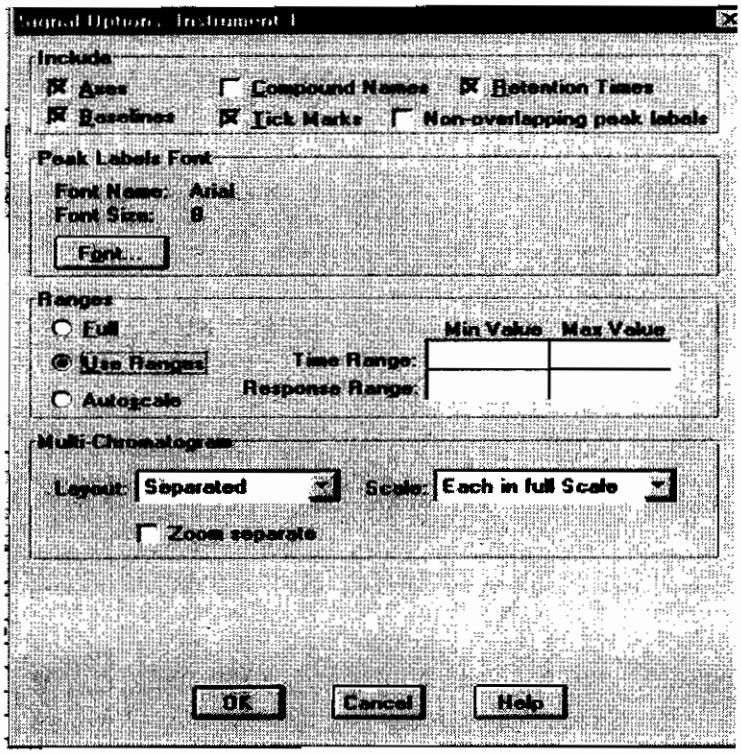
☺ เลือก DATA จาก folder ที่เก็บข้อมูลแล้วเลือก File Name ที่ต้องการ กด OK (หน้าจอจะแสดงข้อมูลซ้อนกัน 2 ภาพ)

☺ จะปรากฏหน้าจอดังรูป



2. การแก้ไข Scale

1.1 ไปที่เมนู **Graphics** เลือก **Signal Options** จะปรากฏหน้าจอ Signal Options



1.2 ตั้งค่าตัวแปรตรงช่อง Ranges (Full , Use Ranges , Autoscale) กด OK

- Use Ranges : กำหนด scale เอง
- Full : เครื่องคอมฯ กำหนด scale เต็มตามค่าที่ตั้ง
- Auto scale : เครื่องจะตั้งค่า scale อัตโนมัติ (กำหนดตามพีกสูงสุด)

3. Integration

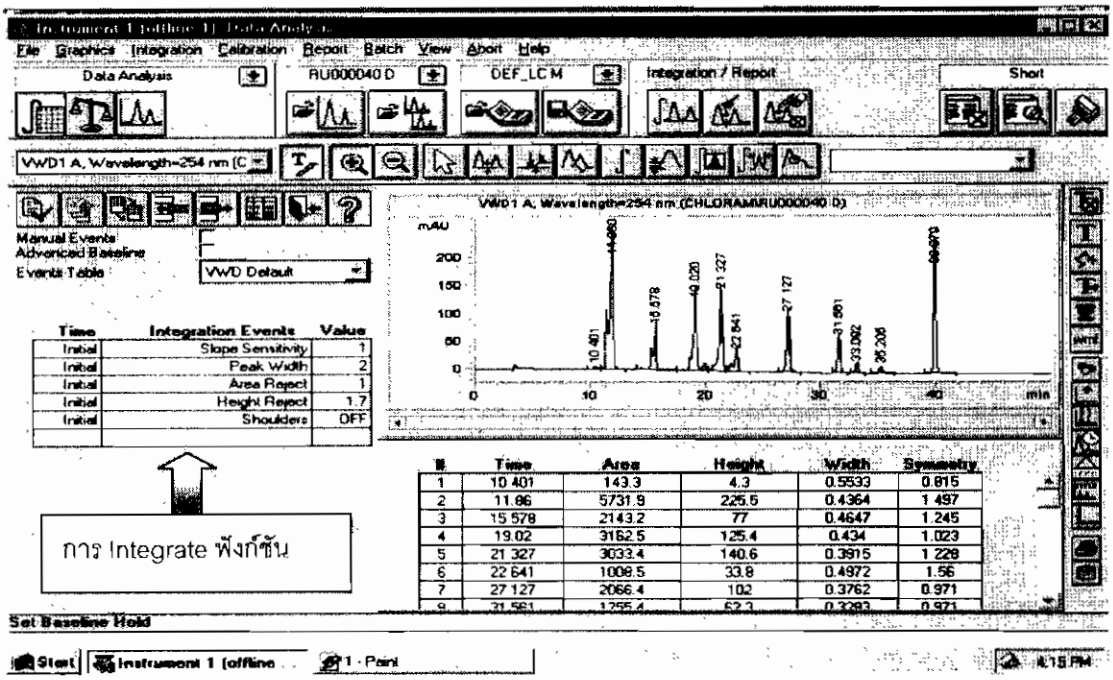
เมื่อ run chromatogram เสร็จ 1 ครั้ง และผลที่ได้ดี แสดงว่าเงื่อนไขต่างๆ ถูกต้องให้ทำ integration เพื่อกำหนดพีกจากสัญญาณที่ได้และคำนวณขนาดของพีกที่สัมพันธ์กับปริมาณของตัวอย่าง แล้ว save method หลังจากนั้นเมื่อนำ method นี้ไป run chromatogram ผลที่ได้จะถูก integrate ให้เสร็จตามค่าที่ได้ทำการ Integrate ไว้แล้วใน method

การทำ Integrate มีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์ทางปริมาณผลการวิเคราะห์อาจผิดพลาดได้ถ้าตั้งค่าในการ Integrate ไว้ไม่ถูกต้อง

3.1 **<u>การตั้งค่า Integration ตามต้องการ</u>** ให้ทำในหน้าต่าง off line

✱ ไปที่ file เลือก load data file เลือก file ที่ต้องการ

✱ ไปที่เมนู Integration เลือก Integration Events



✱ ตั้งค่าตัวแปรตามต้องการ เช่น

: Slope Sensitivity .....ความชัน

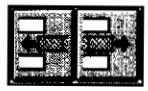
: Peak Width ..... ความกว้างของ peak ที่ความสูงครึ่งหนึ่ง

: Area Reject .....พื้นที่ peak ที่ไม่ต้องการให้ Integrate

: Height Reject ..... ความสูงของ peak ที่ไม่ต้องการให้ Integrate

พีกที่ให้ค่าต่างๆ น้อยกว่าค่าที่ตั้งไว้จะไม่ถูกนำมาคำนวณเป็นสัญญาณของพีก ตามปกติใน soft ware จะมีค่าต่างๆ ตั้งไว้เป็น defualt ที่สามารถใช้กับสัญญาณพีกปกติ การ integrate ด้วยค่าที่ต่างออกไปขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้วิเคราะห์ในการพิจารณาสัญญาณของพีก

*** เมื่อทำการ Integrate ฟังก์ชันต่างๆ แล้วต้องไปที่เมนู Integration เลือก Integration หรือ click ที่รูป ***

◈ <u>การเพิ่ม/ลดฟังก์ชันต่างๆ ในการ Integrate ให้ click ที่รูป</u> 

◈ <u>การออกจากการ Integrate ให้ click ที่รูป</u> แล้วกด Yes

◈ <u>เมื่อต้องการดูผลของการ Integrate</u> ไปที่เมนู **Report** เลือก **Print Report** จะได้ข้อมูลของ chromatogram ที่ Integrate แล้ว หรือใช้ short cut ieon รูป Print Report

<u>การ Integrate แบบ Auto</u>

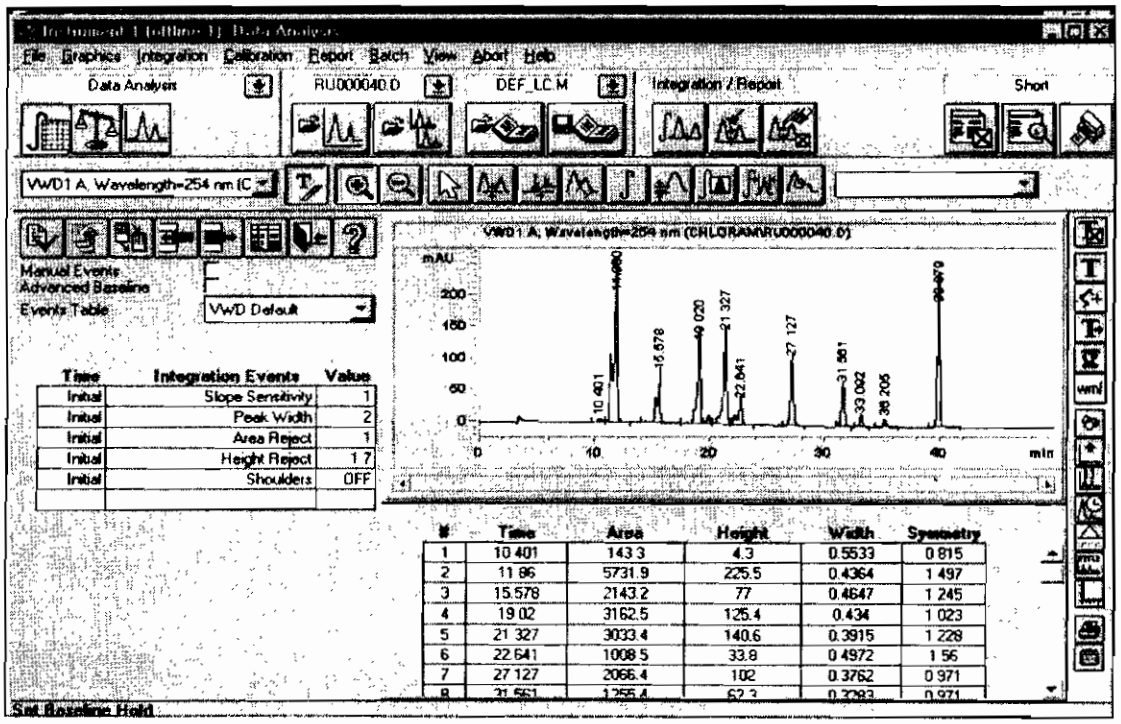
ถ้าต้องการให้เครื่องทำการ integrate ให้โดยไม่ต้องตั้งค่าต่างๆ เองซึ่งยุ่งยากกว่า ให้ใช้ Auto Integration แล้วพิมพ์รายงานได้เลย สามารถทำได้ดังนี้

✱ ไปที่เมนู **Integration** เลือก **Auto Integration**

✱ เมื่อต้องการดูผลของการ Integrate ไปที่เมนู Report เลือก Print Report จะได้ข้อมูลของ chromatogram ที่ integrate แบบ Auto แล้ว หรือใช้ short cut icon รูป Print Report

3.3 การตัดพีกบางพีกที่ไม่ต้องการ Integrate

ในการ integrate จะสนใจเฉพาะพีกที่ต้องการวิเคราะห์ แต่เมื่อ run chromatogram ของตัวอย่างเสร็จแล้วจะพบว่ามีพีกต่างๆ เกิดขึ้นมาด้วยมากมายโดยเฉพาะถ้าตัวอย่างไม่บริสุทธิ์มากๆ รวมทั้งพีกของตัวทำละลายที่ไม่ต้องการทำ Integration



ตัวอย่างโครมาโทแกรมที่จะตัดพีกที่ไม่ต้องการวิเคราะห์

เมื่อเลือกตัวแปรต่อไปนี้ให้เหมาะสมตามต้องการแล้ว

Slop Sensitivity

Peak Width

Arca Reject

Height Reject

ให้เพิ่มฟังชั่นต่างๆ ของการ integrate โดย click ที่รูป (append line) จะได้ line ในการ integrate เพิ่ม

Time	Integration Events	Value
Initial	Slope Sensitivity	2
Initial	Peak Width	0.5
Initial	Area Reject	0.9033
Initial	Height Reject	0.0319
Initial	Shoulders	OFF
18.438	Integration	OFF
30.000	Integration	ON

แถวที่เพิ่ม

✱ ที่ช่อง time (column ที่ 1) ให้พิมพ์เวลา (RT) ที่ต้องการ OFF ในแถวที่เพิ่ม append line

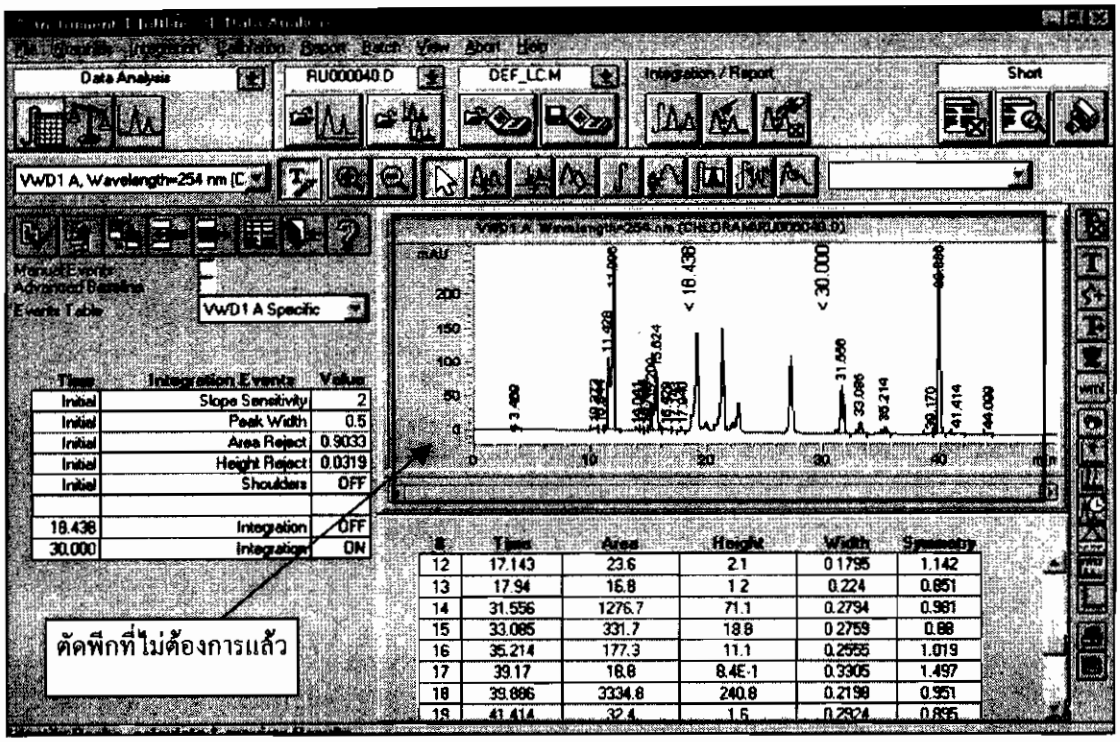
✱ ที่ช่อง Integration Event (column ที่ 2) เลื่อน cursor ให้มาอยู่ที่แถวที่เพิ่ม ให้คลิกที่ drop down list เลือก Integration

✱ ที่ช่อง Value (column ที่ 3) เลื่อน cursor ให้มาอยู่ที่แถวที่เพิ่ม ให้คลิกที่ drop down list เลือก OFF แสดงว่าเวลา (RT) ที่ต่อจากนี้จะไม่มีการ integrate

✱ ให้เพิ่มแถวอีก 1 แถว เลือกเวลาที่ต้องการ on ในคอลัมน์ที่ 1 ตามด้วยเลือก Integration ในคอลัมน์ที่ 2 และเลือก on ในคอลัมน์ที่ 3

✱ ไปที่เมนู Integration เลือก Integrate หรือ click ที่รูป

จะได้ช่วงเวลาที่ตั้งครั้งแรกเป็น OFF จนถึงเวลาที่เป็น ON คือช่วงเวลาที่ไม่มีการ integrate พีกที่อยู่ในบริเวณนั้นเลย ดังรูป



*** นักศึกษาสามารถเลือกเวลา (RT) ที่ต้องการไม่ให้มีการ integrate พีกได้หลายๆ ช่วง ในโครมาโทแกรมเดียวกัน โดย appened line และเลือกเวลา พร้อมทำตามขั้นตอนที่กล่าวมาซ้ำอีก

3.4 การทำ Manual Integration

บางครั้งโครมาโทแกรมที่ได้เมื่อทำการ integrate แบบ Auto Integration หรือการตั้งค่าจาก Integration Event ให้ผลที่ไม่ถูกต้อง เนื่องจากลักษณะพีกที่ได้ไม่เป็นไปตามรูปแบบที่ถูกต้อง เช่น พีกไม่สมมาตร หรือโครมาโทแกรมมี noise สูง หรือเส้นฐาน (base line) ไม่เรียบ (ผู้วิเคราะห์ที่ชำนาญจะดูออก) จึงควรทำการ integrate แบบ manual ดังนี้

✵ เปิด file ของโครมาโทแกรมที่ต้องการ โดยไปที่เมนู **View** เลือก **Data Analysis** ไปที่เมนู **File** เลือก **Load Signal** เลือก Folder และ Data file พร้อม file ที่ต้องการ แล้วกด OK

✵ จากนั้นทำการอินทิเกรตด้วยมือ ดังนี้

3.4.1 <u>การลากสัญญาณเส้นฐาน</u> (Draw Baseline)

- กด icon *Draw Baseline* และทำตามขั้นตอนดังนี้
- วางตำแหน่ง cursor ที่จุดแรกของฐานพีกที่ต้องการอินทิเกรต กดเมาส์ปุ่มซ้ายมือค้างไว้
- ลากเมาส์ไปที่ตำแหน่งที่สอง ซึ่งจะปรากฏเป็นเส้นแถบสีเทา แสดงแนวที่ลากเส้นฐานสัญญาณที่เลือก จากนั้นปล่อยปุ่มเมาส์ซ้ายมือนี้ จะปรากฏตัวเลขแสดงพื้นที่พีกสำหรับพีกที่เลือกนี้ขึ้นมาโดยฐานของพีกจะมีสีแดง
- ทำเช่นนี้จนได้พื้นที่พีกทั้งหมดทุกพีก
- จากนั้น จึงทำการ Double click เพื่อให้ได้ภาพโครมาโทแกรมที่อินทิเกรตแล้วทุกพีก Check โดย click ที่
- ไปที่เมนู Report เลือก Print Report ได้ข้อมูลของโครมาโทแกรมที่อินทิเกรตด้วยมือ

3.4.2 <u>การลบพีก</u> (Deleat Peak)

ในกรณีที่เราได้ทำการอินทิเกรตพื้นที่พีกไว้แล้ว แต่ต้องการจะลบทิ้งสามารถทำได้โดย

- กด icon *Delete Peak*
- วางตำแหน่ง cursor ที่ต้องการลบทิ้งนั้น กดเมาส์ปุ่มซ้ายมือ

- จากภาพที่หน้าจอ จะพบว่าพื้นที่พีกที่เคยปรากฏจะหายไป หรือถ้าเคยให้แสดงค่ารีเทนชันไทม์จะหายไปด้วย

- เมื่อเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้ click ที่

*** จากขั้นตอนที่กล่าวมาสามารถลบได้ทั้งทีละพีก และครั้งละหลายพีก โดยถ้าต้องการจะลบพีกติดกันในช่วงหนึ่ง ทำได้โดยการลากเมาส์เป็นพื้นที่สี่เหลี่ยมครอบคลุมเวลาในช่วงของพีกที่ต้องการลบเหล่านั้นไว้ คือช่วงกว้างของกรอบเหลี่ยม ส่วนความสูงของกรอบสี่เหลี่ยมนั้นไม่สำคัญ เท่าใดก็ได้ ***

3.4.3 การแบ่งพีก (Split Peak)

การอินทิเกรตพีก บางครั้งอาจต้องการทำการแบ่งส่วนของพีกถ้าพีกแยกกันได้ไม่สมบูรณ์ สามารถทำได้โดย

- กด icon *Split Peak* และทำตามขั้นตอนดังนี้
- วาง cursor เลือกตำแหน่งเวลาของพีกที่ต้องการแบ่ง (ถ้ามีสัญญาณเส้นฐานอยู่แล้ว แต่ถ้าไม่มีต้องลากสัญญาณเส้นฐานก่อน)
- กดเมาส์ปุ่มซ้ายมือ
- ค่าของพื้นที่พีกแต่ละส่วนจะปรากฏขึ้นมา ไปที่ Report เลือก Print Report

ในหัวข้อของ Manual Integration ยังมีโปรแกรมการอินทิเกรตพีก ลักษณะต่างๆ ให้เลือกใช้ให้เหมาะสมกับรูปร่างของพีกที่ได้ อีกหลายแบบ ทั้งลักษณะพีกหัวกลับ (Negative Peak) พีกที่อยู่ที่ไหล่ของพีกอื่น (Target Skim) ซึ่งควรเลือกใช้ให้เหมาะสม

*** ให้นักศึกษาลองทดลองใช้รูปแบบของการอินทิเกรตต่างๆ อีก ***

4. Name Peak และเขียนคำอธิบายในโครมาโทแกรม (Annotation)

1. click ที่รูป

2. ปรากฏแทบเครื่องมือ (Annotation dialog box)

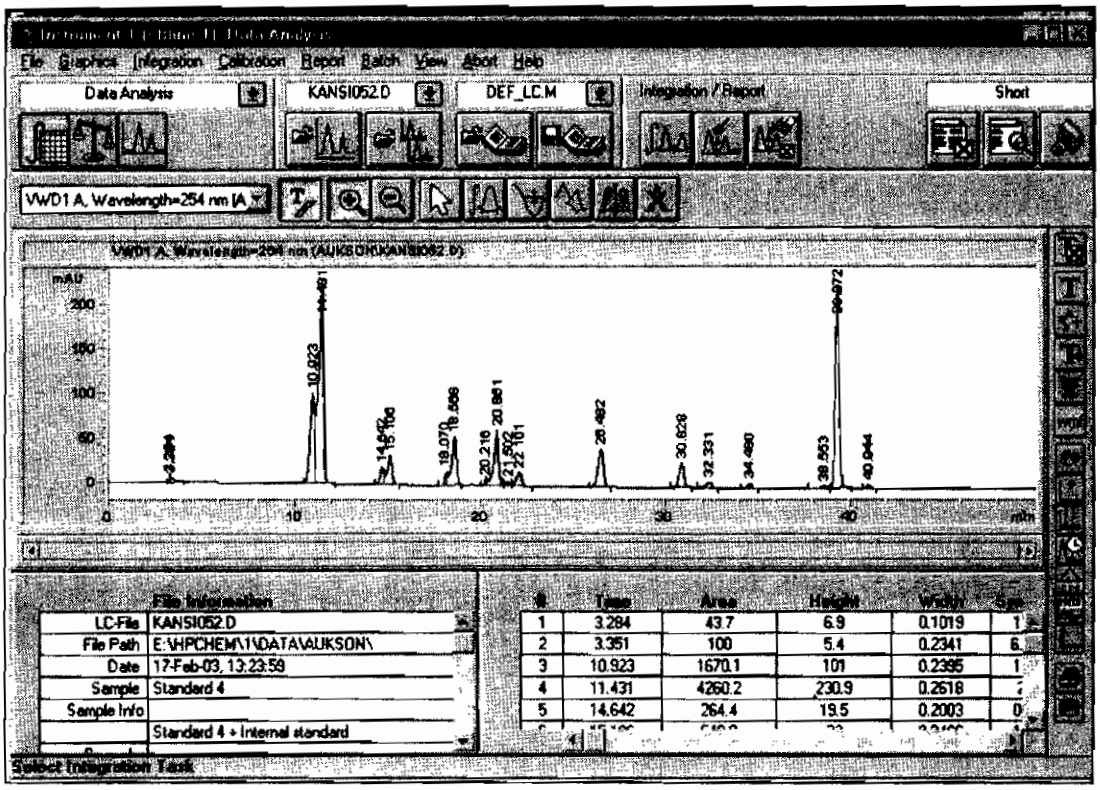
พิมพ์ชื่อพีก หรือข้อความต่างๆ ลงในโครมาโทแกรม ให้นักศึกษาลองใช้ icon ต่างๆ ที่มีอยู่ว่า แต่ละชนิดทำหน้าที่อะไร

5. การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (Calibration Curve)

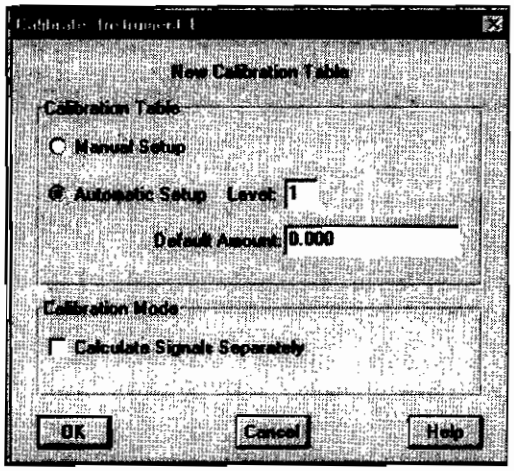
ก่อนที่จะทำการสร้างกราฟมาตรฐาน ต้องทำการ run สารมาตรฐานทุกความเข้มข้นก่อน โดยทำการ run จากความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูงสุดตามลำดับ จากนั้นเลือกวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานตามที่ต้องการ

5.1 การสร้างกราฟเปรียบเทียบมาตรฐานแบบจุดเดียว (Single level calibration)

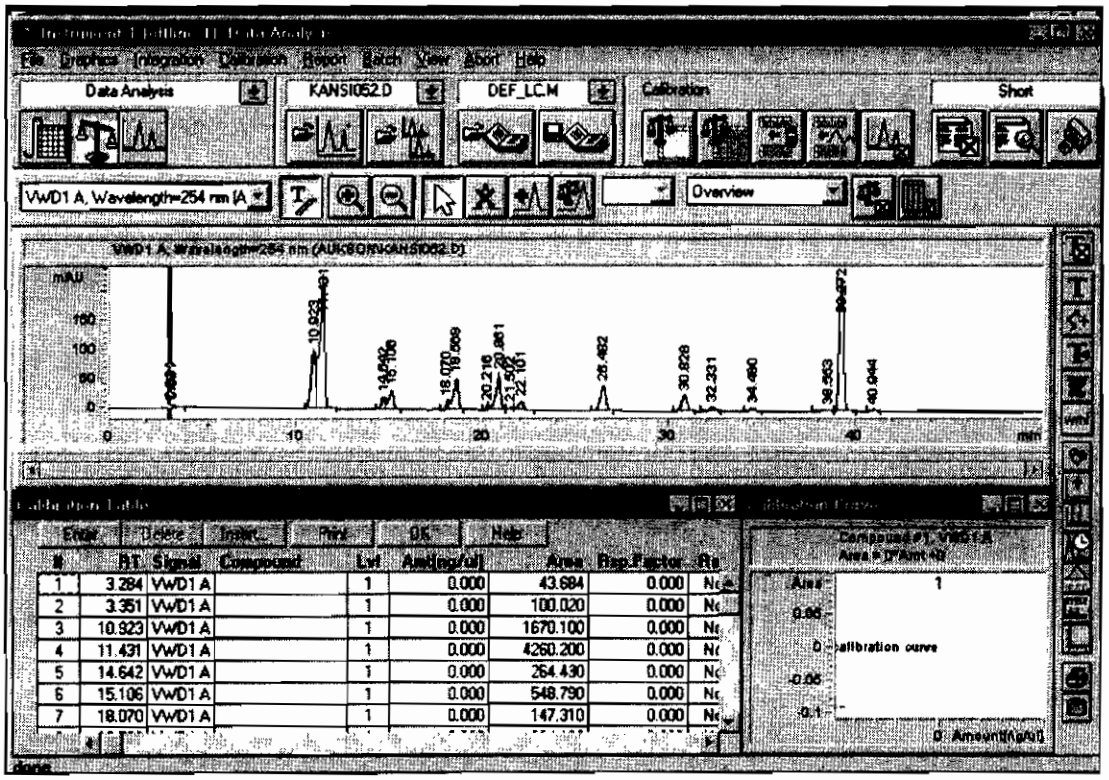
- ที่หน้าต่าง Instrument 1 (offline)
- ไปที่เมนู View หรือที่ drop down list บรรทัดที่ 3 ช่องแรก เลือก data analysis
- ไปเมนู ที่ file เลือก Load Method เลือก method ที่ต้องการ กด open (เป็น method ที่ใช้ในการ run สารมาตรฐานและทำการ integrate แล้ว)
- ไปเมนู ที่ file เลือก load signal เลือก signal ที่ต้องการ กด OK จะปรากฏหน้าจอดังรูป



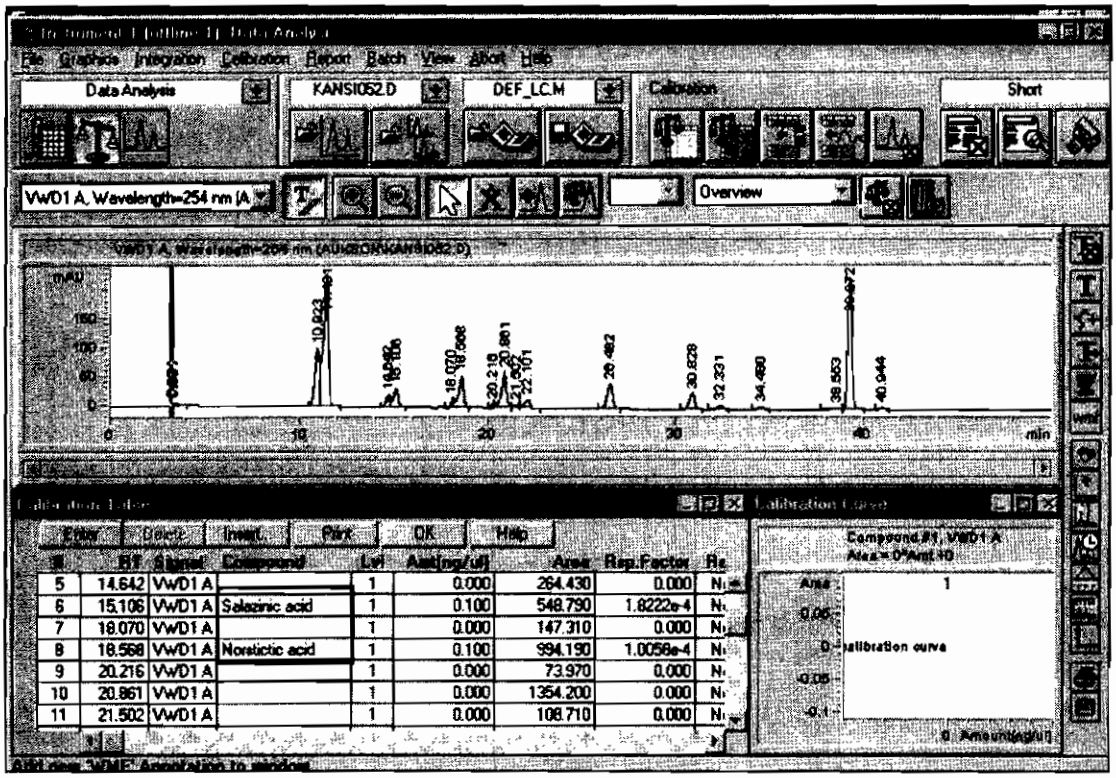
❖ ไปที่เมนู calibration เลือก new calibration table จะปรากฏหน้าต่างดังรูป



❖ กด OK หน้าต่างจะปรากฏตารางการเทียบมาตรฐาน โดยทุกพีกที่มีการอินทิเกรตจะปรากฏขึ้นมาดังรูป



❖ ใส่ชื่อของสารประกอบนั้น และปริมาณสารให้ตรงกับตำแหน่งของค่ารีเทนชันไทม์ของแต่ละสาร



#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ng/ul]	Area	Resp.Factor	Rs
5	14.642	VWD1 A		1	0.000	264.430	0.000	N
6	15.106	VWD1 A	Selazinic acid	1	0.100	548.790	1.8222e-4	N
7	18.070	VWD1 A		1	0.000	147.310	0.000	N
8	18.568	VWD1 A	Norsticticacid	1	0.100	994.190	1.0058e-4	N
9	20.216	VWD1 A		1	0.000	73.970	0.000	N
10	20.861	VWD1 A		1	0.000	1354.200	0.000	N
11	21.502	VWD1 A		1	0.000	108.710	0.000	N

❖ ถ้าต้องการลบพีกใดออก ไม่ต้องการสร้างกราฟมาตรฐานของสารนั้น ทำได้โดยเลื่อนเมาส์มาที่หน้าบรรทัดที่ต้องการลบออก จากนั้นกดเมาส์จะปรากฏแถบสีดำทั้งบรรทัด แล้วกด delete

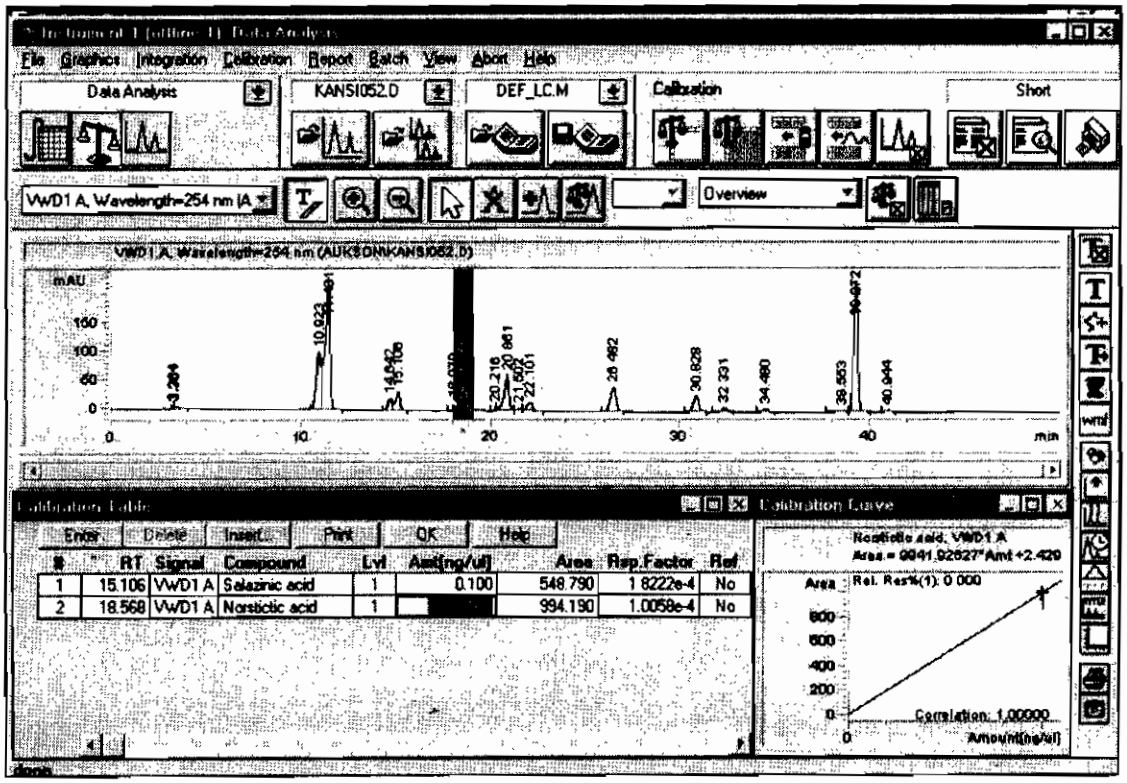
❖ ให้เลือกพีกอ้างอิง (Reference peak) พีกอ้างอิงนี้จะเป็นพีกที่ใช้ในการปรับค่าเป็นผลมาจากเทคนิคการฉีดสาร อัตราการไหลเปลี่ยน หรืออุณหภูมิเปลี่ยน ดังนั้นถ้ากำหนดพีกอ้างอิงจะเป็นการวัดค่าเวลาของพีกที่ปรากฏเทียบกับพีกอ้างอิงนี้

- การเลือกพีกอ้างอิงทำโดย ไปที่บรรทัดพีกที่จะใช้อ้างอิงในตารางเทียบมาตรฐานที่ช่อง Ref กดเมาส์ เลือก yes

- เมื่อได้ตารางเปรียบเทียบมาตรฐานเป็นที่พอใจแล้ว กด OK

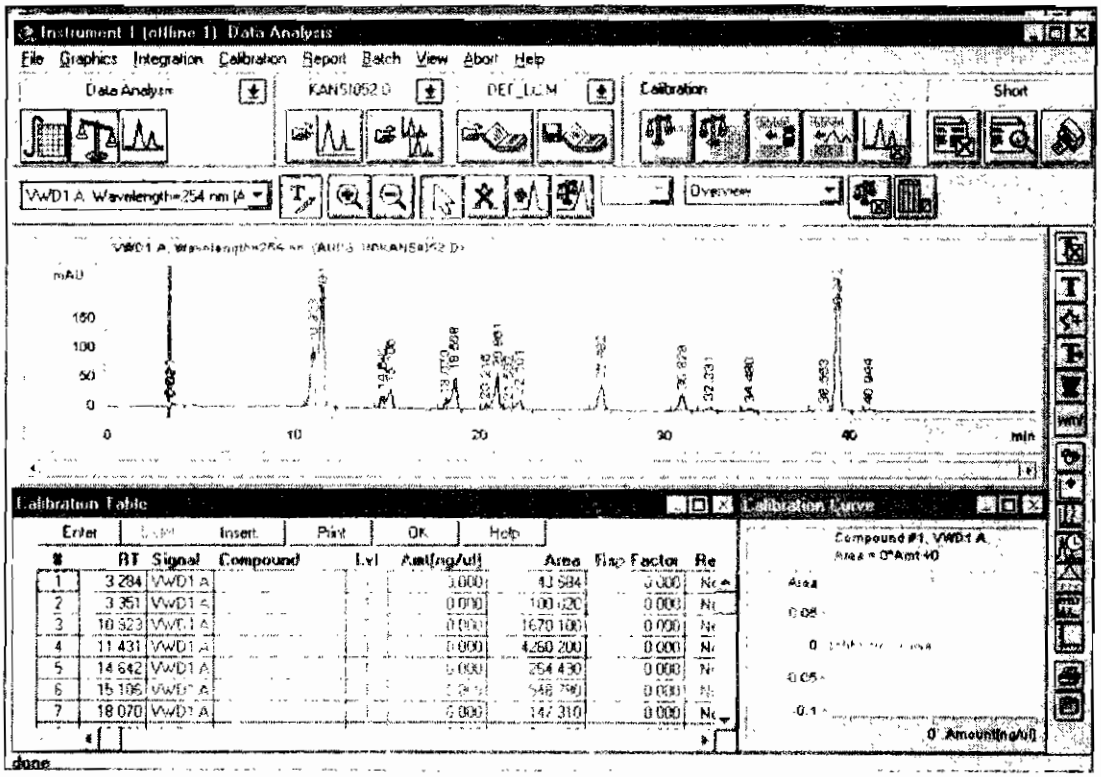
- เก็บบันทึกข้อมูลวิธีการเทียบมาตรฐานไว้ โดยไปที่ file เลือก save method as ตั้งชื่อวิธีการตามที่ต้องการและ save method

- เส้นตรงที่ได้จะถูกลากจากจุด 0 ไปยังจุดมาตรฐานเพียงจุดเดียว ดังรูป

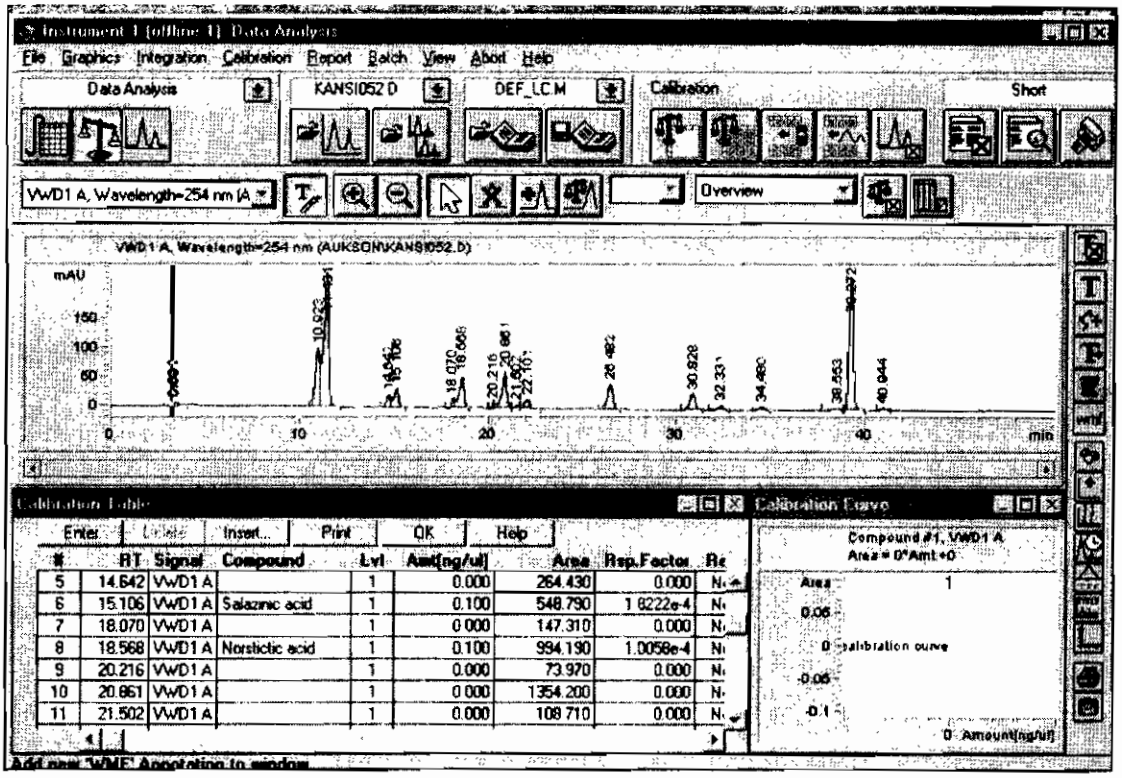


5.2 การสร้างกราฟปริมาณเทียบกับการตอบสนองของสาร (Amount Calibration)

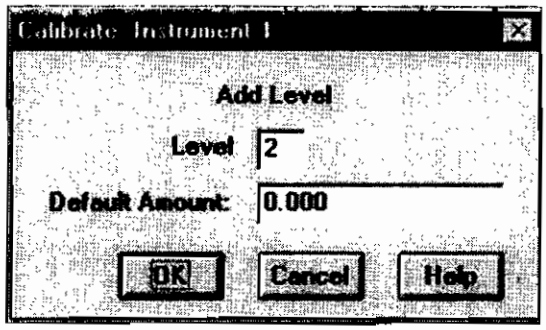
- ที่หน้าต่าง Instrument 1 (offline)
- ไปที่เมนู View เลือก Data Analysis
- ไปที่เมนู Integration เลือก Integrate (ที่ต้องการจะ open (เป็น method ที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง) เพื่อ integrate ก่อน)
- ไปที่เมนู Calibration เลือก New Calibration Table
- ไปที่เมนู calibration เลือก Recalculate Table
- กด OK แล้วโปรแกรมจะคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยดูจากพื้นที่ที่มีการอินทิเกรตจะปรากฏขึ้นบนตารางดังรูป



- ใส่ชื่อของสารประกอบนั้น และปริมาณสารให้ตรงกับตำแหน่งของค่ารีเทนชันไทม์ของแต่ละสาร
- ตัดพีกที่ไม่ต้องการออก โดยเลื่อนเมาส์ไปที่หน้าบรรทัดที่ไม่ต้องการ และกดเมาส์จะได้แถบสีดำทั้งบรรทัดกด delete

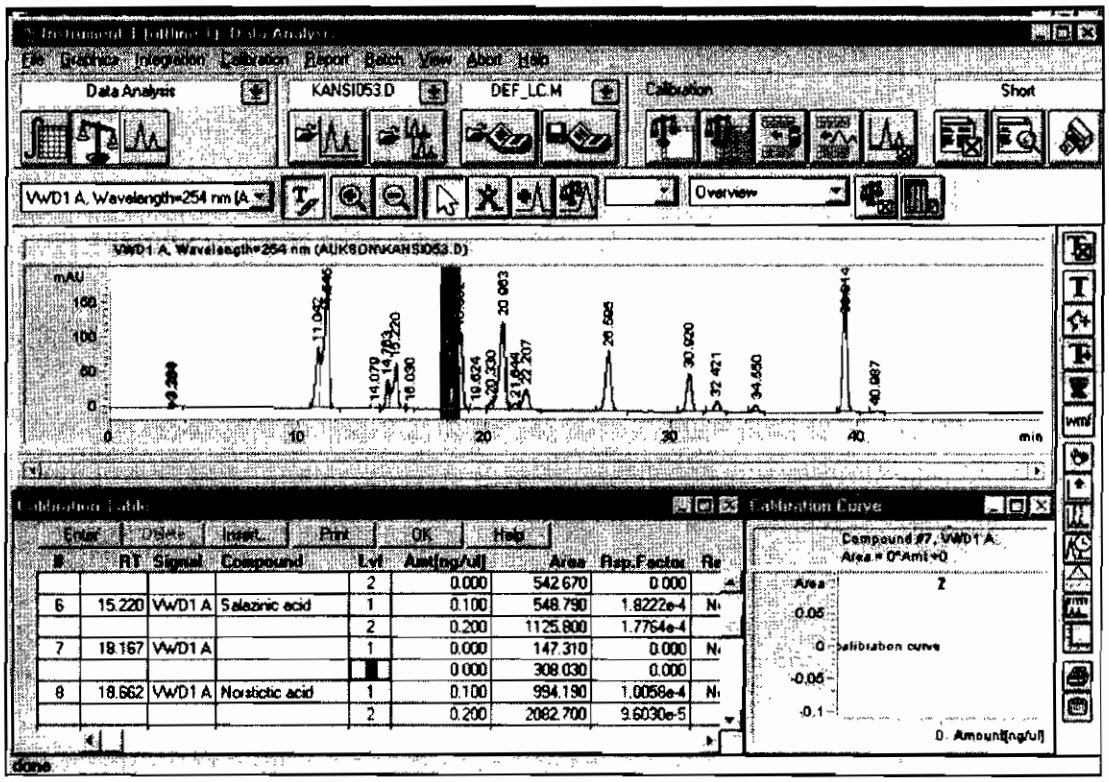


- ไปที่เมนู file เลือก load signal ของสารมาตรฐานตัวที่ 2
- ไปที่เมนู calibration เลือก add level จะปรากฏหน้าต่างดังรูป

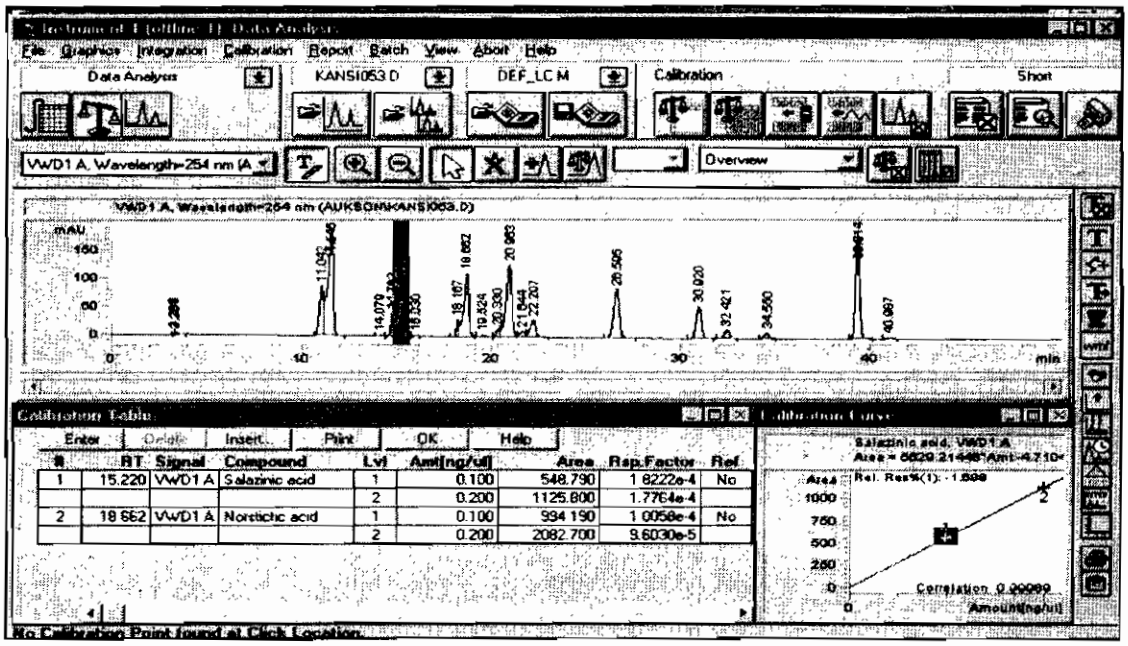


❖ เลือกช่อง level number ใส่เลข 2 เพื่อกำหนดให้ข้อมูลจากแฟ้มที่เปิดนี้เป็นจุดที่ 2 ในกราฟ

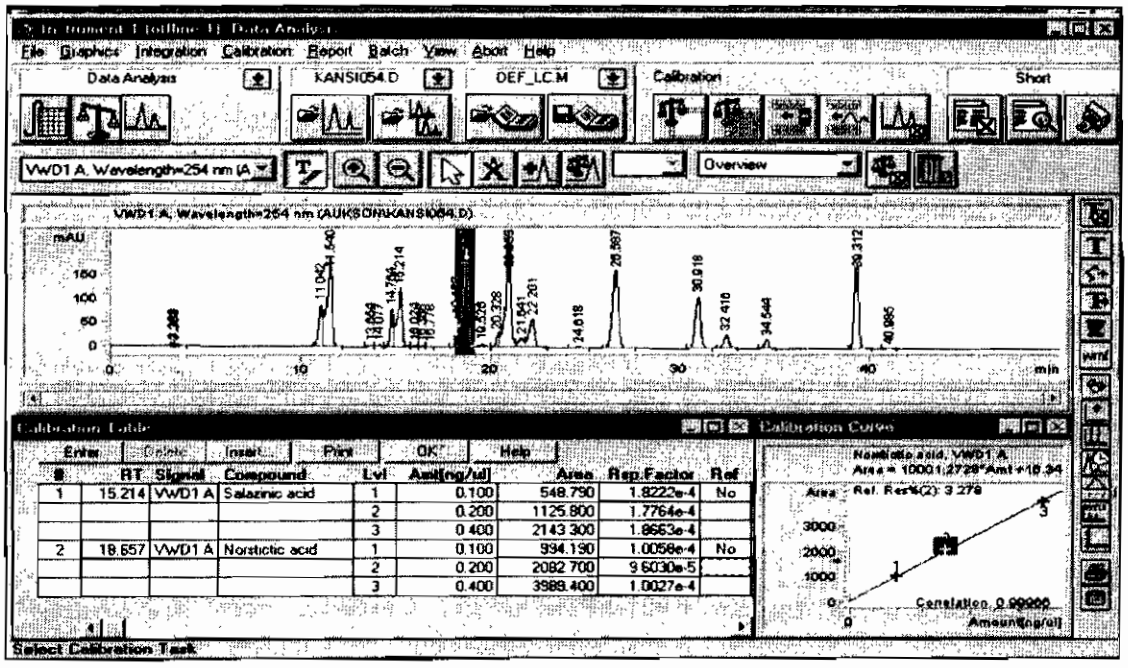
❖ จากนั้น กด OK จะเห็นว่าตารางเทียบมาตรฐานจะปรากฏขึ้นเพิ่มช่องของแต่ละสารประกอบขึ้นอีกหนึ่งช่อง ใส่ความเข้มข้นให้ครบทุกพีก



❖ กด OK จะปรากฏ calibration curve ดังรูป

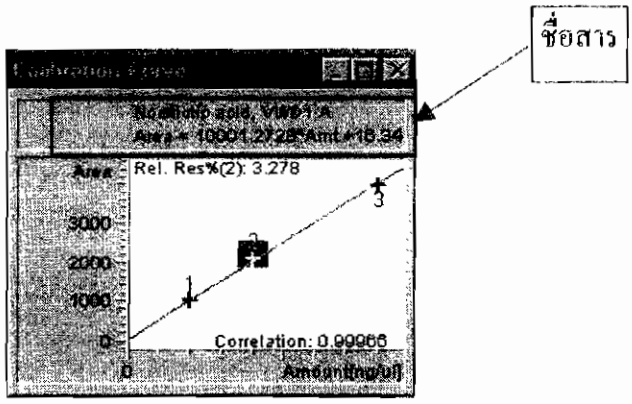


❖ ถ้าต้องการจะเพิ่มจุดขึ้นอีก จะทำเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น คือ เรียกแฟ้มข้อมูลที่จะนำมาเพิ่มในกราฟเทียบมาตรฐานขึ้นมา และ Add level ใส่ Level number ไม่ให้ซ้ำกับที่มีอยู่แล้ว และเมื่อข้อมูลเข้าเพิ่มในตารางมาตรฐานแล้ว ให้ใส่ความเข้มข้นแต่ละพีก แล้ว กด OK



❖ เก็บบันทึกข้อมูลวิธีการ และกราฟเทียบมาตรฐานแบบหลายจุดนี้ไว้ โดยไปที่ file เลือก save method as และ save method ตั้งชื่อวิธีตามที่ต้องการ

หมายเหตุ ในการดู calibration curve ของสารแต่ละชนิด ทำได้โดยนำเมาส์ไป click ที่ชื่อ ของสารที่ต้องการ ที่ calibration table จากนั้นจะปรากฏ calibration curve ของสารที่ต้องการ และสามารถตรวจสอบ calibration curve ที่กำลังแสดงอยู่นั้นว่าเป็นของสารใด โดยสังเกตที่ด้านบนของ calibration curve จะมีชื่อของสารแสดงอยู่



---

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างและการรายงานผล

ขณะนี้หน้าต่างอยู่ใน method ที่สร้างกราฟมาตรฐานที่ต้องการอยู่แล้ว ถ้าไม่ใช่ต้อง load method ที่ต้องการใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างขึ้นมาใหม่

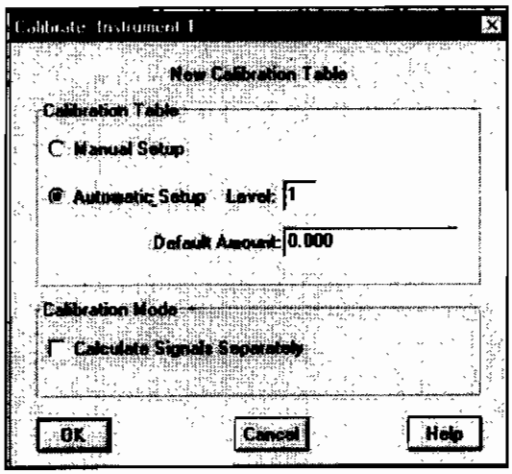
6.1 การหาปริมาณแบบ External Standard

- ที่หน้าต่าง data analysis
- ไปเมนู ที่ file เลือก load signal
- การอินทิเกรตแฟ้มข้อมูลจะเกิดขึ้นตามตัวแปรที่กำหนดใน method ที่ได้สร้างไว้
- จากนั้นไปที่ Report เลือก Specific report
- เลือก ESTD จากช่องเลือก calculate ใน quantitative results ต้องการให้ภาพรายงานปรากฏที่ใด เช่น หน้าจอ หรือที่เครื่องพิมพ์ เลือกได้จากหน้าจอนี้เช่นกัน หรือใช้ short cut menu โดยกดที่รูป

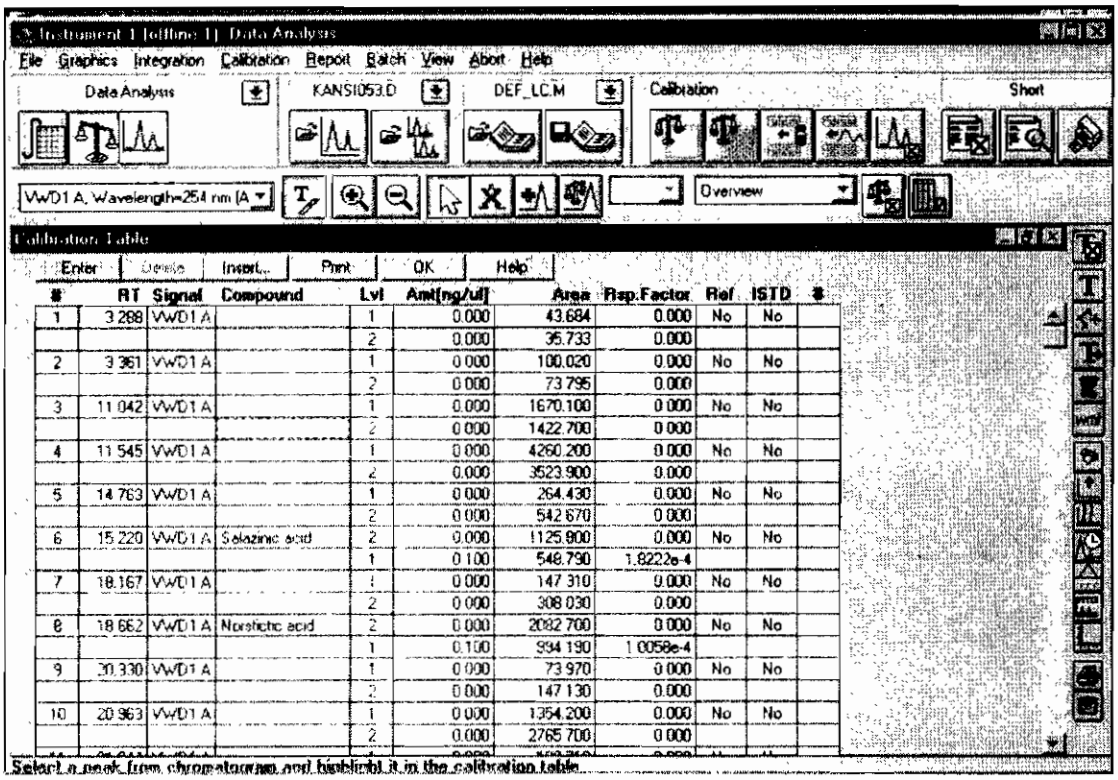
6.2 การหาปริมาณแบบ Internal Standard

ต้องเติมสารที่เลือกเป็น internal standard ลงไปทั้งในสารละลายมาตรฐานที่ต้องการสร้างกราฟเทียบมาตรฐานและสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ โดยทราบปริมาณที่แน่นอน และเท่ากันทุกขวดเมื่อทำการวิเคราะห์เสร็จ ให้ทำการสร้างกราฟเทียบมาตรฐานแบบ Internal Standard Calibration ดังนี้

- ที่หน้าต่าง data analysis
- ไปที่เมนู file เลือก analysis
- ไปที่ calibration เลือก new calibration table จะปรากฏหน้าต่างดังรูป



- กด OK
- เมื่อตารางการเทียบมาตรฐานปรากฏขึ้นมา ให้ทำการใส่ชื่อสารประกอบพร้อมทั้งความเข้มข้น ดังรูป



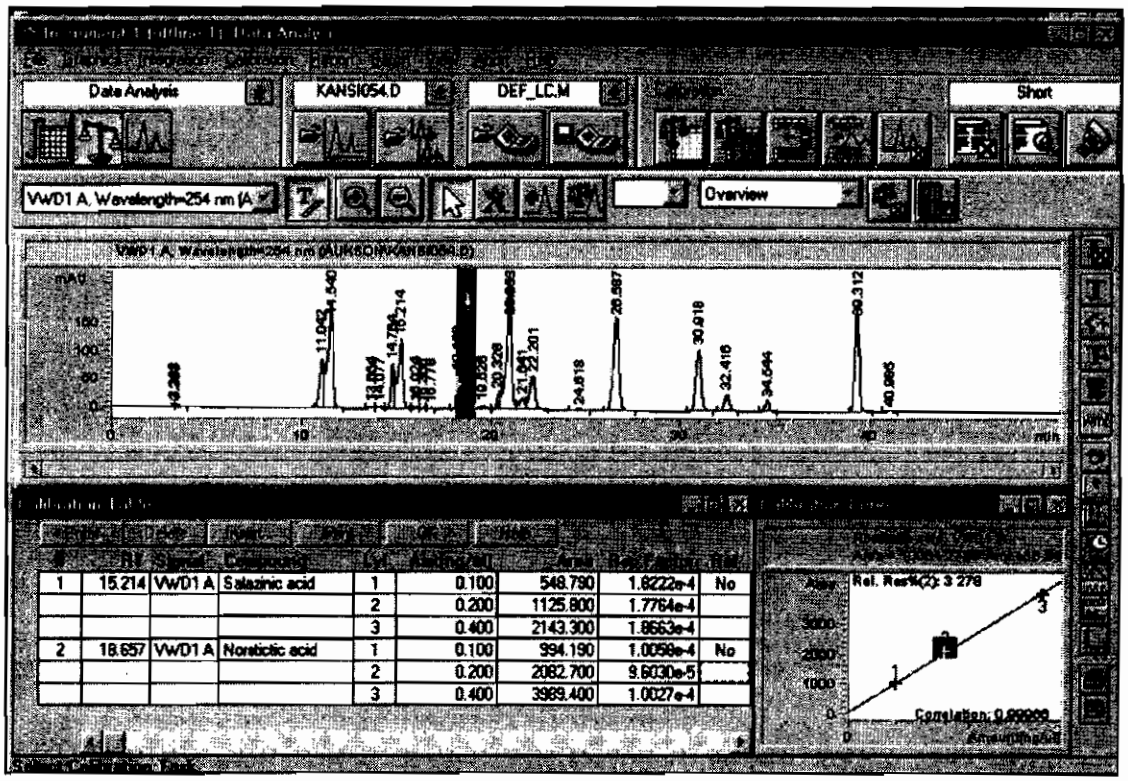
#	RT	Signal	Compound	Lvl	Amt[ng/ul]	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD
1	3.288	VWD1 A		1	0.000	43.684	0.000	No	No
				2	0.000	36.733	0.000		
2	3.361	VWD1 A		1	0.000	100.020	0.000	No	No
				2	0.000	73.795	0.000		
3	11.042	VWD1 A		1	0.000	1670.100	0.000	No	No
				2	0.000	1422.700	0.000		
4	11.545	VWD1 A		1	0.000	4260.200	0.000	No	No
				2	0.000	3523.900	0.000		
5	14.763	VWD1 A		1	0.000	264.430	0.000	No	No
				2	0.000	542.670	0.000		
6	15.220	VWD1 A	Salazinic acid	2	0.000	1125.900	0.000	No	No
				1	0.100	548.790	1.8222e-4		
7	18.167	VWD1 A		1	0.000	147.310	0.000	No	No
				2	0.000	308.030	0.000		
8	18.662	VWD1 A	Norstictic acid	2	0.000	2082.700	0.000	No	No
				1	0.100	994.190	1.0058e-4		
9	20.330	VWD1 A		1	0.000	73.970	0.000	No	No
				2	0.000	147.130	0.000		
10	20.963	VWD1 A		1	0.000	1354.200	0.000	No	No
				2	0.000	2765.700	0.000		

- ที่ตารางการเทียบมาตรฐานของสารที่เป็น internal standard ในช่อง ref ให้เปลี่ยนเป็น yes โดยกดเมาส์ที่ช่องนั้นแล้วเลือก yes และไปที่ช่อง ISTD ให้เปลี่ยนจาก no เป็น yes โดยทำแบบเดียวกัน

- จากนั้นไปที่เมนู file เลือก load signal เลือกแฟ้มข้อมูลที่ต้องการนำมาสร้างจุดเทียบมาตรฐานจุดที่สองเพิ่มเติม

- แฟ้มข้อมูลจะเปิดขึ้นและผลการอินทิเกรตพีกทั้งหมดจะปรากฏขึ้นมา จากนั้นไปที่ calibration เลือก Add Level หน้าจอจะปรากฏ เมนูของ Add Level ใส่ตัวเลข 2 ที่ช่อง level number จากนั้นกด OK ตารางเทียบมาตรฐานจะเพิ่มช่องเติมในแต่ละพีก เติมค่าความเข้มข้นของสารประกอบ

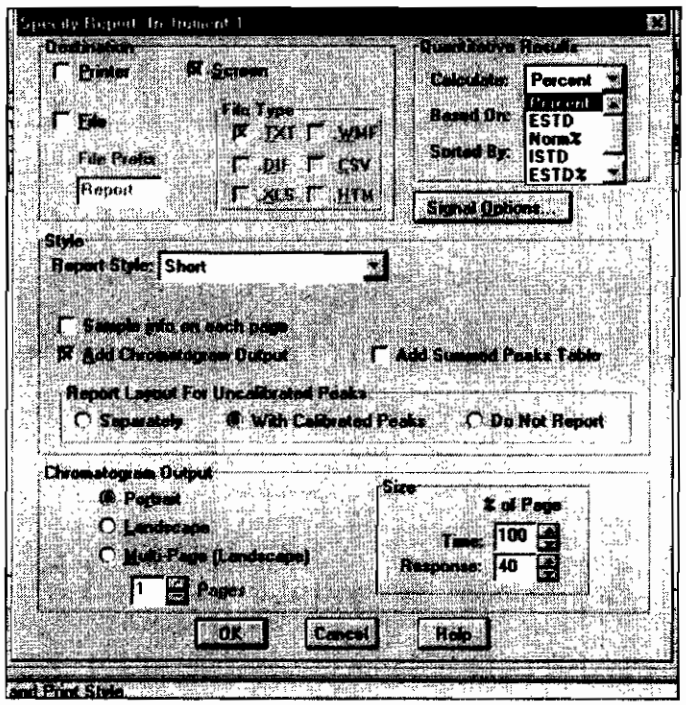
- ไปที่เมนู ที่ file เลือก load signal ตัวต่อไปขึ้นมาทำเช่นเดียวกัน โดย Add Level ที่ level number 3 จากนั้นเติมค่าความเข้มข้นของสารประกอบ



- ถ้าต้องการเพิ่มจุดในตารางการเทียบมาตรฐานทำได้โดยการเรียกแฟ้มข้อมูลที่ได้ทำไว้ในระดับความเข้มข้นอื่นขึ้นมาเพิ่มอีกและทำเช่นเดียวกัน จนได้กราฟเทียบมาตรฐานที่พอใจ แล้วกด OK ที่ตารางการเทียบมาตรฐาน จากนั้นเก็บบันทึกข้อมูลวิธีการการเทียบมาตรฐานแบบนี้ไว้ โดยไปที่ file เลือก save method as และตั้งชื่อวิธีการตามที่ต้องการ กด save

- เมื่อต้องการทราบปริมาณสารตัวอย่างใด ที่ต้องการเทียบกราฟเทียบมาตรฐานแบบ Internal Standard Calibration ให้เรียกแฟ้มข้อมูลที่ต้องการขึ้นมา

- ไปที่ Report เลือก Specify report เมื่อหน้าจอปรากฏขึ้นมาแล้ว ให้เลือกตัวเลือกที่ quantitative results ในช่อง calculate เป็น ISTD จากนั้น กด OK

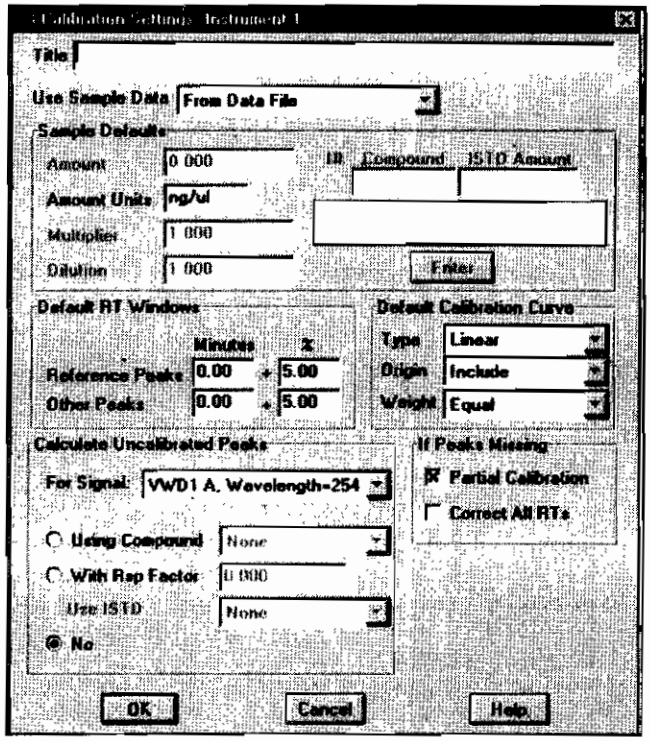


- จากเมนู report เลือก print report ซึ่งสามารถเลือกให้รายงานผลที่ออกมาแสดงภาพบนหน้าจอ หรือพิมพ์ผ่านเครื่องพิมพ์ หรือทั้งสองแบบได้ อีกทั้งยังเลือกให้แสดงภาพโครมาโทแกรมออกมาในรายงานได้ด้วย

7. การตั้งตัวแปรกราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน (Calibration setting)

ในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน เราสามารถกำหนดค่าตัวแปรการสร้างกราฟ หรือแฟ้มข้อมูลเกี่ยวกับสารตัวอย่าง เพื่อให้โปรแกรมคำนวณค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ต้องการทราบออกมาเลยได้

จาก Data Analysis ไปที่ Calibration เลือก Calibration Settings ภาพหน้าจอจะปรากฏดังนี้



ทำการเลือกกำหนดตัวแปรของสารตัวอย่างในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน เช่น เปลี่ยนหน่วยความเข้มข้นแฟกเตอร์ความเข้มข้น หรือการเจือจางสารละลาย ช่วงอ้างอิงของการเบี่ยงเบนของค่ารีเทนชันไทม์ และสามารถกำหนดการลากเส้นกราฟเทียบมาตรฐานให้เป็นเส้นตรงหรือโค้ง หรืออื่นๆ และจะให้เส้นกราฟลากผ่านจุดศูนย์หรือไม่ก็ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปภาพนี้

จะมีผลต่อการวิเคราะห์ ที่สามารถปรับให้มีความถูกต้องเหมาะสมยิ่งขึ้นได้ และสามารถเลือกการตั้งค่าอื่นๆ ได้อีก ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้วิเคราะห์

8. การปิดเครื่อง HPLC

- ให้หน้าจออยู่ที่ Method and Run Control
- ทำการ OFF ที่ Instrument แต่ละส่วนจากหน้าจอ

  โดย click ที่ เมื่อต้องการ off pump

  click ที่ เมื่อต้องการ off detector
- ออกจาก Chemstation โดยเลือกเมนู file กด Exit
- ไปที่ Start เลือก Shutdown
- ปิด Printer, Computer, Degasser, Binary Pump, Detector, Stabilizer

9. การบำรุงรักษาเครื่องมือ

สภาพห้องที่ตั้งของเครื่อง HPLC ต้องสะอาด ปราศจากฝุ่นละออง และมีอุณหภูมิเหมาะสม (~25°C) ต้องหมั่นเช็ดทำความสะอาดหากมีสารละลายหรือสารเคมีเปื้อน

การบำรุงรักษา	ความถี่
1. ล้างคอลัมน์ด้วย 10% น้ำ + 90% Acetonitile หรือ Methanol เป็นเวลา 15 นาที และ 100% Acetonitile หรือ Methanol เป็นเวลา 10 นาที โดยมี flow rate 2 ml/min เมื่อใช้คอลัมน์ C_{18}	ทุกครั้งก่อน Run ตัวอย่าง เมื่อปิดเครื่องเป็นเวลานาน หรือมีผู้มาใช้งานก่อนหน้าโดยไม่ทราบว่าตัวอย่าง สะอาดหรือไม่
2. ตรวจสอบข้อต่อต่างๆ ว่ามีรอยรั่วของเฟสเคลื่อนที่หรือไม่	ทุกครั้งที่ใช้งาน โดยที่เครื่องจะมี sensor ตรวจสอบถ้ามีตัวทำละลายรั่วมาถูกจะทำให้เกิดเสียงร้องเตือน
3. Equilibrate column ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้วิเคราะห์เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ด้วย flow rate 1.5 ml/min	ทุกครั้งที่ใช้งาน
4. ตรวจสอบปริมาณเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ใน Solution Bottle ว่ามีเพียงพอหรือไม่สำหรับการ Run	ทุกครั้งที่ใช้งาน โดยถ้าเฟสเคลื่อนที่ไม่เพียงพอจะ พบว่างานต่อไปจะเทียบกับงานที่ทำไว้แล้วได้ไม่ถูกต้อง
5. ตรวจสอบว่ามีฟองอากาศอยู่ใน line ของเฟสเคลื่อนที่ หรือไม่	ทุกครั้งที่ใช้งาน
6. ตรวจสอบ waste bottle ต้องสะอาดและสามารถรองรับ waste จากการ Run ได้	ทุกครั้งที่ใช้งาน ควรเท waste ของเก่าออกก่อนเสมอ

(ต่อ)

การบำรุงรักษา	ความถี่
7. ถ้า Run งานด้วย buffer ที่มีเกลือต่างๆ ผสมอยู่ หลังจากเสร็จงานแล้ว ต้องล้างระบบด้วย DI water นานๆ (30-60 นาที) จนแน่ใจว่าไม่มีเกลือติดอยู่ในปั๊ม และตาม line ต่างๆ	ทุกครั้งที่ใช้งาน
8. ไม่ควรนำ diskette ที่บรรจุข้อมูลจากภายนอกมาใช้กับคอมพิวเตอร์ที่ทำงานของเครื่อง	ทุกครั้งที่ใช้งาน

2.3 วิธีการใช้เครื่อง HPLC Jusco 875 UV & 880 Pu และ Integrator Chromatocoder 12

รูปที่ 3.10 HPLC Jusco 875 UV & 880 Pu และ Integrator Chromatocoder 12 ในห้องปฏิบัติการ CM 437

ให้ดำเนินการใช้เครื่องตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. นำตัวทำละลายที่ไล่ฟองแก๊ส และบรรจุในขวดตัวทำละลายมาต่อเข้ากับสายส่งตัวทำละลายของเครื่อง

2. เปิดเครื่อง HPLC และเครื่อง Integrator (ดูรายละเอียดหัวข้อ 2.3.1)

3. ตั้ง parameter ของเครื่อง HPLC และเครื่อง Integrator

4. หมุนปุ่มบิดสีดำ (purge valve) ในส่วนของ pump เพื่อทำการ purge ทวนเข็มนาฬิกา ประมาณ 5 รอบ ให้มีเฟสเคลื่อนที่หยดออกทิ้งทางท่อข้างๆ นำบีกเกอร์มารองรับ waste (เป็นการไล่ฟองอากาศที่ค้างอยู่ตามสายยางและ pump)

5. กดปุ่ม pump จนไฟแดงติดที่ปุ่ม (เปิด pump ทำงาน)

6. ไล่ฟองอากาศออกจากท่อจนหมด

7. กดปุ่ม pump จนไฟแดงดับที่ปุ่ม (ปิด pump) หมุนลูกบิด purge valve ตามเข็มนาฬิกาประมาณ 5 รอบ จนปิดสนิท

8. กดปุ่ม pump จนไฟแดงติดที่ปุ่ม (เปิด pump ทำงาน) เพื่อให้มีเฟสเคลื่อนที่เข้าเครื่อง HPLC ทั้งระบบ

9. Equilibrate เครื่อง HPLC (column) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ผ่าน เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง จน baseline นิ่ง (ดูค่า ABS ไม่แกว่งมาก) ถ้าเป็นเฟสเคลื่อนที่ใหม่และถ้าเป็นเฟสเคลื่อนที่เดิมใช้เวลาประมาณ 30 นาที

10. ถอดฝาครอบสีแดง และเข็มออกจาก Injector

11. ฉีดสารโดยใช้ Syring (ห้ามให้ฟองอากาศเข้าไป) ฉีดเข้าไปใน Injector ในตำแหน่ง Load และปล่อย Syring ไว้

12. หมุน Injector จากตำแหน่ง Load ไปยัง Inject พร้อมๆ กับการกดปุ่ม Inject ที่เครื่อง Integrator

13. เครื่อง Integrator จะทำการ run Chromatogram

14. เมื่อผ่านไปประมาณ 2 นาที ให้หมุน Injector จากตำแหน่ง Inject ไปยัง Load จากนั้นดึง Syring ออก

15. เมื่อสิ้นสุดการ run Chromatogram กดปุ่ม STOP ที่ Integrator

16. เครื่อง Integrator จะทำการ Integrate และทำการคำนวณผล

17. ทำการ run Chromatogram จนเสร็จครบทุกตัว โดยทำซ้ำข้อ 11-16

18. ปิดเครื่อง
    - กดปุ่ม pump จนไฟแดงดับที่ปุ่ม (ปิด pump)
    - ปิดเครื่อง Integrator กดจาก I ไปยัง O ที่ข้างหน้าเครื่อง Integrator
    - ปิด pump กด POWER OFF
    - ปิด Detector กด POWER OFF
    - นำหัวเข็มไปเสียบไว้กับ Injector พร้อมครอบฝาแดง
    - กดสวิทช์ที่แผงไฟฟ้าสีแดงดับ

2.3.1 การเปิดเครื่อง HPLC Jusco

1. เสียบปลั๊กและกดสวิทช์ที่แผงไฟฟ้าจนไฟสีแดงติด
2. กด POWER ON ที่ปั๊ม เครื่องจะทำการเช็คระบบปั๊ม
3. กด POWER ON ที่ Detector เครื่องจะทำการเช็คระบบ Detector

2.3.2 การตั้งค่า Parameter ส่วนของ Pump

1. หน้าจอจะแสดง ดังนี้

FLOW : ? ml/min

PRESS : 0 kg/cm^3

2. ตั้งค่า Flow rate

★ กดปุ่ม EDIT ตัวเลขที่ FLOW จะกระพริบ

★ เลือก Value โดยกดปุ่ม ↑ เพื่อเพิ่มค่า ↓ เพื่อลดค่า Flow rate

★ กดปุ่ม enter เพื่อตอบรับการตั้งค่า

3. ตั้งค่า Pressure

★ กดปุ่ม Parameter หน้าจอแสดง

P. MAX : kg/cm^2 (ความดันสูงสุด) ควรตั้งไม่เกิน 450 kg/cm^2

P. MIN : kg/cm^2 (ความดันต่ำสุด)

★ กดปุ่ม EDIT ตัวเลขที่ P.MAX จะกระพริบ

★ เลือก Value โดยกดปุ่ม ↑ เพื่อเพิ่มค่า ↓ เพื่อลดค่า P. MAX

★ กดปุ่ม EDIT ตัวเลขที่ P. MIN จะกระพริบ

★ เลือก Value โดยกดปุ่ม ↑ เพื่อเพิ่มค่า ↓ เพื่อลดค่า P. MIN

★ กดปุ่ม enter เพื่อตอบรับการตั้งค่า Pressure

*** ***หมายเหตุ*** : หากความดันของเครื่องขณะใช้งาน ต่ำกว่า P. MIN หรือสูงกว่า P. MAX เครื่องจะหยุดทำงาน เพราะอาจเกิดการอุดตันภายในเครื่อง HPLC ***

2.3.3 การตั้งค่า Parameter ส่วนของ Detector

1. **หน้าจอจะแสดง ดังนี้**

   ABS : ?

   RANGE : ?

   *** หาก ABS (Absorpbance unit) ไม่แสดงตัวเลข 0.000 ให้กดปุ่ม Auto Zero จะปรากฏเป็น 0.000 ***

2. **การตั้งค่า Range ของ Absorbance**

   ★ กดปุ่ม EDIT ตัวเลขที่ RANGE จะกระพริบ

   ★ เลือก Value โดยกดปุ่ม ↑ เพื่อเพิ่มค่า ↓ เพื่อลดค่า RANGE

   ★ กดปุ่ม enter เพื่อตอบรับการตั้งค่า RANGE

3. **การตั้งค่า Wavelength และ Response**

   ★ กดปุ่ม Parameter หน้าจอแสดง

   λ : ? nm

   Response : STD

   ★ กดปุ่ม EDIT ตัวเลขที่ λ จะกระพริบ

   ★ เลือก Value โดยกดปุ่ม ↑ เพื่อเพิ่มค่า ↓ เพื่อลดค่า Wavelength

   ★ กดปุ่ม Parameter ข้อความที่ Response จะกระพริบ

   ★ เลือก Value โดยกดปุ่ม ↑ เพื่อเพิ่มค่า ↓ เพื่อลดค่า Fast Standard Slow

   ★ กดปุ่ม enter เพื่อตอบรับการตั้งค่า

4. การตั้งค่า LAMP

★ กดปุ่ม Parameter หน้าจอแสดง

Lamp

D2 ON เมื่อต้องการวัดในช่วง UV

★ กดปุ่ม enter หน้าจอจะกลับมาที่ หญ

ABS :
RANGE : → ค่าที่ได้ตั้งไว้ตอนต้น

2.3.4 การตั้งค่า Parameter ส่วนของ Integrator

1. กดปุ่มจาก 0 เป็น I เพื่อเปิดเครื่อง Integrator

2. เครื่องจะพิมพ์ Date Set

★ YEAR : พิมพ์ปี ค.ศ. กด enter

★ MONTH : พิมพ์เดือน (ตัวเลข) กด enter

★ DAY : พิมพ์วันที่ กด enter

★ HOUR : พิมพ์ (เวลา) ชั่วโมง กด enter

★ MINUTE : พิมพ์ (เวลา) นาที กด enter

3. **เครื่องจะพิมพ์**

NEW CARTRIDGE LOAD KEY PUSH 1 :YES 0 :NO

พิมพ์ 1 กด enter

4. **เครื่องจะพิมพ์**

CHROMATOCORDER – 12

FILE NO : 0

LOAD FILE NO : 0

STORE FILE NO : 0

5. **การตั้งค่า Parameter**

5.1 <u>การตั้งค่า MINIMUM HEIGHT</u>

★ กด KEY ***MH*** เครื่องจะพิมพ์ MINIMUM HEIGHT

พิมพ์ตัวเลขความสูงต่ำสุดที่จะให้เครื่องอ่าน เช่น 20

★ กด ENTER

5.2 <u>การตั้งค่า MINIMUM WIDTH</u>

★ กด KEY ***MW*** เครื่องจะพิมพ์ MINIMUM WIDTH

★ พิมพ์ตัวเลขความกว้างต่ำสุดที่จะให้เครื่องอ่าน เช่น 5,000

★ กด ENTER

5.3 <u>การตั้งค่า MINIMUM AREA</u>

★ กด KEY ***MA*** เครื่องจะพิมพ์ MINIMUM AREA

★ พิมพ์ตัวเลขพื้นที่ต่ำสุดที่จะให้เครื่องอ่าน เช่น 20

★ กด ENTER

5.4 การตั้งค่า ATTENUATION

★ กด KEY ***ATTN*** เครื่องจะพิมพ์ ATTENUATION

★ พิมพ์ตัวเลขที่ต้องการให้เครื่องขยายสัญญาณ

ค่า ATTN : 1 ขยายสัญญาณสูงสุด (ขยายขนาดของ PEAK)

2

4

8

16

32 → เป็นสัญญาณปกติของเครื่อง PEAK จะไม่เกิดการเพิ่มหรือลดสัญญาณ

64

128 สัญญาณต่ำลง (ย่อขนาด PEAK)

....

5.5 การตั้งค่า SPEED

★ กด KEY ***SPEED*** เครื่องจะพิมพ์ SPEED

★ พิมพ์ตัวเลขที่ต้องการให้กระดาษเคลื่อนที่ (cm/min)

★ กด ENTER

5.6 การตั้งค่า END TIME

★ กด KEY ***END TIME*** เครื่องจะพิมพ์ END TIME

★ พิมพ์ตัวเลขของระยะเวลาที่ต้องการให้ INTEGRATOR หยุดการ RUN CHROMATOGRM (min)

★ กด ENTER

5.7 <u>การ REINTEGRAL</u>

★ กด KEY ***EXCUTE*** เครื่องจะทำการ REINTEGRAL CHROMATOGRM ล่าสุด

*** **<u>หมายเหตุ</u>** ใช้เมื่อการ INTEGRAL ครั้งแรกมีปัญหาแล้วอาจมีการตั้ง PARAMETER ใหม่ เมื่อกด EXCUTE เครื่องจะทำการ INTEGRAL CHROMATOGRM เดิมด้วย PARAMETER ใหม่ ***

(3) ปฏิบัติการทดลองทางคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative analysis)

การทดลองที่ 3.1

การแยกสารผสมและการคำนวณพารามิเตอร์ของคอลัมน์

(Separation of test mixture and calculation of column parameters)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการใช้เครื่องมือ HPLC
2. เพื่อเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารตัวอย่างผสม
3. คำนวณพารามิเตอร์ของคอลัมน์จากผลการวิเคราะห์ที่ได้

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 binary pump DAD computer and software chemstation
2. คอลัมน์ 5 µm Hypersil ODS , 4 mm x 250 mm พร้อม guard column
3. ชุดกรองตัวทำละลายพร้อม membrance filter ขนาด 0.45 µm ชนิด Nylon
4. ตัวทำละลาย
   - ตัวทำละลาย A น้ำปราศจากไอออน
   - ตัวทำละลาย B เมธานอล ชนิด HPLC grade
5. สารตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้คือ
   - Resorcinol M.W. 110.11
   - Naphthalene M.W. 128.19
   - Anthracene M.W. 178.24

วิธีการทดลอง

1. เตรียม stock ของสารละลายตัวอย่างผสมของ
   - Resocinal เข้มข้น 1000 ppm
   - Naphthalene เข้มข้น 1000 ppm
   - Anthracene เข้มข้น 80 ppm

2. เจือจางสารผสมจาก stock 100 เท่า จะได้
   - Resocinal เข้มข้น 10 ppm
   - Naphthalene เข้มข้น 10 ppm
   - Anthracene เข้มข้น 0.8 ppm

3. กรองตัวทำละลาย น้ำ และเมทานอล ผ่านเมมเบรน 0.45 μm จำนวน 1 ลิตร แล้วนำไปไล่แก๊สโดยการ sonicate เป็นเวลา 15-30 นาที จากนั้นบรรจุใส่ขวดตัวทำละลาย สำหรับน้ำใส่ขวดสีชา แล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่อง HPLC

4. อ่านวิธีการใช้เครื่องในหัวข้อ 2 .1 ให้เข้าใจ
5. เสียบปลั๊ก เปิดสวิทซ์ที่เครื่อง Stabilizer และเครื่อง HPLC
6. ตั้งค่าต่างๆ ของเครื่อง HPLC ดังนี้

6.1 Setup HPLC pump

P max	300	atm
P min	10	atm
Flow rate	1	ml/min
Solvent A :	H_2O	20%
Solvent B :	MeOH	80%

6.2 Setup HPLC UV detector

Range	1	AUFS (Absorbance units full scale)
Lamp	on	
Wave length (λ)	254	nm

7. หมุนปุ่ม purge ทวนเข็มนาฬิกา 3-4 รอบ แล้วกด pump on ทำการไล่ฟองอากาศและล้างสายยาวเป็นเวลา 5 นาที ขณะ purge เพื่อความรวดเร็วสามารถเพิ่ม flow rate เป็น 2.5 ml/min จากนั้นให้ลด flow rate เป็น 1.0 ml/min รอให้ flow rate คงที่ แล้วปิด purge valve

8. ทำการ equilibrate คอลัมน์เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่าโดยสังเกตจาก base line ต้องนิ่งและไม่มีสัญญาณรบกวน (noise)

9. ล้าง loop ด้วยเฟสเคลื่อนที่ 2-3 ครั้ง ในตำแหน่ง load

10. ฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ micro syringe ขนาด 100 µl ในตำแหน่ง load โดยปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดต้องมากกว่าขนาดของ loop ที่ใช้ สามารถดูขนาดของ loop ได้ที่ injection valve ก่อนฉีด ตัวอย่างที่ฉีดต้องไม่มีฟองอากาศ สังเกตที่ syringe ก่อนฉีดด้วย

11. ทำการ optimize การแยกโดยการปรับเปลี่ยน flow rate และเฟสเคลื่อนที่ ดังนี้

a) ปรับ flow rate เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2 ml/min

***ให้นักศึกษาดูผลของการแยกสารตัวอย่างผสม แล้วเลือก flow rate ที่เหมาะสม

b) เปลี่ยนอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างน้ำ(A) และเมทานอล(B) ดังนี้

(1)	A:B	=	20:80
(2)	A:B	=	30:70
(3)	A:B	=	40:60
(4)	A:B	=	50:50

*** ให้นักศึกษาสังเกตผลของการแยกเมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่แต่ละอัตราส่วน แล้วเลือกอัตราส่วนผสมที่เหมาะสม ***

12. ทำการเปลี่ยนความยาวคลื่น(Wave length) เพื่อให้ความไวในการตรวจวัดดีขึ้น (improve sensitivity) โดยใช้เงื่อนไขที่เหมาะสมในข้อ 11

ทำการเปลี่ยนความยาวคลื่น 3 ค่า คือ 220, 254 และ 278 nm

***ให้นักศึกษา สรุปเงื่อนไขต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารตัวอย่างผสมนี้

13. ตั้งค่าต่างๆ ให้ตรงตามเงื่อนไขที่เหมาะสมตามที่สรุปได้ แล้วทดลองฉีดสารตัวอย่างผสมอีกครั้ง

14. จากโครมาโทแกรมที่ได้จากข้อ 13 ให้คำนวณหาค่า N (efficiency) ของคอลัมน์จากพีกสุดท้าย (anthracence) จากสูตร

$$N_{eff} = 5.54 \left[\frac{t_R'}{w_{\frac{1}{2}}} \right]^2$$

$$= 5.54 \left[\frac{t_R - t_0}{w_{\frac{1}{2}}} \right]^2$$

เมื่อ t_R' คือรีเทนชันไทม์ที่แก้ไขแล้วของ anthracence

t_o หรือ t_m คือ dead volume หรือ เวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้เดินทาง 1 ความยาวคอลัมน์ ซึ่งหาได้จากพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ ในการทดลองนี้สมมุติให้ resorcinol ซึ่งเป็นพีกแรกเป็นสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ รีเทนชันไทม์คือ t_o

$w_{\frac{1}{2}}$ คือความกว้างของพีกที่มีความสูงเป็นครึ่งหนึ่ง

N_{eff} คือจำนวนเพลตตามทฤษฎีที่บอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยถ้า N_{eff} มีค่าสูงหมายความว่ามีประสิทธิภาพดี และค่า N จะมีค่ามากเมื่อพีกที่ได้แคบ

จากการทดลองได้ผลดังนี้

t_R (anthracence) = _____

t_O (resorcinal) = _____

$w_{\frac{1}{2}}$ (anthracence) = _____

N_{eff} (anthracence) = _____

15. ให้คำนวณหาค่าปัจจัยความจุ (capacity factor, k') ของพีก anthracence จากสูตร

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_0}$$

ค่าปัจจัยความจุเป็นค่าที่แสดงถึงเวลาที่ตัวอย่างใช้อยู่ในเฟสอยู่กับที่ หรือถูกหน่วงในคอลัมน์

16. ให้คำนวณหาความจำเพาะเจาะจง (selectivity, α) ของคอลัมน์ สำหรับ anthracence กับ naphthalene เมื่อสมมุติให้พีกของ resocinal เป็น t_o

$$\alpha = \frac{t_{R\ anthracene} - t_0}{t_{R\ naphthalene} - t_0}$$

ค่า α เป็นค่าที่ใช้เปรียบเทียบพีกสองพีก ว่ามีการแยกอย่างไร ค่า α ที่มากหมายถึงมีการแยกที่มากด้วย

<u>หมายเหตุ</u> ถ้ามีเวลาเพียงพอให้นักศึกษาทดลองปรับระบบการแยกเป็นแบบ gradient elution โดยนำผลที่ได้จากข้อ 11 มาพิจารณาว่าควรตั้งระบบของการทำ gradient อย่างไร ให้นักศึกษา discuss ผลการทดลองกับอาจารย์ผู้ควบคุมปฏิบัติการ

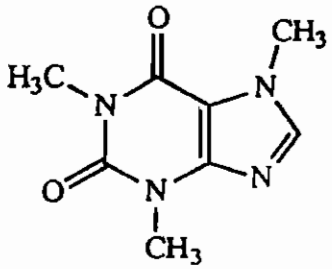
การทดลองที่ 3.2

การแยกและการแสดงเอกลักษณ์ ของสารประกอบในยา APC

(Separation and identification of the compound of APC drug)

APC เป็นยาคลายกล้ามเนื้อและแก้ปวด ที่ประกอบด้วย caffeine, paracetamol และ phenacetin ซึ่งสารประกอบแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีดังนี้

Caffeine



Caffeine : 1,3,7-trimethyl Xanthine

MW : 242 g/mol

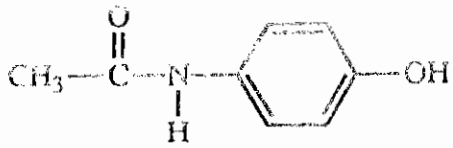
Mp : 238 °C

UV : λ max (nm) (log ε) 227(4.3), 235 (4.3), 274 (4.3)

1 กรัมละลายได้ใน : น้ำ 46 ml , alcohol 66 ml , acetone 50 ml , chloroform 5.5 ml , ether 530 ml , benzene 100 ml

Use : central nervous system stimulant

Paracetamol



Paracetamon : Acetaminophen

MW : 179.22 g/mol

Mp : 169 - 170.5 °C

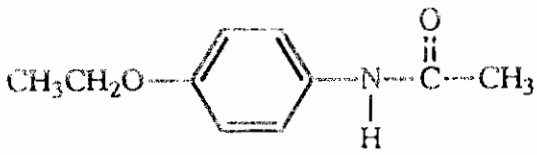
การละลายได้ใน : ละลายใน alcohol แต่ในน้ำละลายได้เพียงเล็กน้อย

UV : λ max (nm) (log ε) 250 (4.2)

Use : analgesic, antipyretic

MLD i.v. in rabbits : 3.7 g/kg

Phenacetin



Phenacetin : N-(4-ethokyphenyl) acetamide

MW : 179.21 g/mol

Mp : 134 – 135 °C

UV : λ max (nm) (log ε) 2444(3.11)

1 กรัมละลายได้ใน : น้ำ 1300 ml ที่ 25 °C, alcohol 20 ml , chloroform 20 ml , ether 90 ml

Use : analgesic, antipyretic

LC50 orally in rats : 1.75 g/kg

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงและหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบในยาเม็ด APC โดยเทคนิค isocratic elution
2. เพื่อพิสูจน์โครมาโทแกรมของสารผสมในยา APC ว่าแต่ละพีกคือสารประกอบใด
3. ศึกษาผลของการควบคุมคุณภาพยา APC ของบริษทผู้ผลิต

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 isocratic pump และ integrator HP3396 series III หรือ เครื่อง JUSCO 875 UV & 880 Pu และ Integrator Chromatocoder 12
2. คอลัมน์ C_{18} พร้อม guard column
3. ชุดกรองตัวทำละลายพร้อม membrance filter ขนาด 0.45 µm ชนิด Nylon
4. ตัวทำละลาย
   - ตัวทำละลาย A ตัวทำละลายผสมของ น้ำ : เมทานอล (60:40)
   - ตัวทำละลาย B ตัวทำละลายผสมของ บัฟเฟอร์ : เมทานอล (80:20)
   - ตัวทำละลาย C ตัวทำละลายผสมของ บัฟเฟอร์ : เมทานอล (70:30)

   (บัฟเฟอร์ คือ 1% acetic acid เข้มข้น 1 M)
5. ตัวอย่างยา APC
6. สารมาตรฐาน caffeine, paracetamol และ phenacetin
7. 0.45 µm syringe membrance filter

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของ caffeine, paracetamol และ phenacetin เข้มข้น 10 ppm จาก Stock 1,000 ppm

2. นำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมาชนิดละ 5 ml ผสมกันใน vial ได้สาระลายมาตรฐานผสมไว้สำหรับศึกษาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการแยก

3. ทำการกรองเฟสเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรน 0.45 μm แล้วนำไปไล่แก๊สโดยการ sonicate เป็นเวลา 15-30 นาที ก่อนนำไปใช้ จากนั้นบรรจุใส่ขวดตัวทำละลาย แล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่อง HPLC โดยก่อนต่อเข้าเครื่อง HPLC ต้อง rinse สายและท่อ ด้วยเฟสเคลื่อนที่จำนวนเล็กน้อยก่อน

4. ติดตั้งคอลัมน์ reverse phase C_{18} ในระบบ

5. อ่านคู่มือการใช้เครื่องในหัวข้อ 2 .1 หรือ 2.3 ให้เข้าใจ

6. เสียบปลั๊ก เปิดเครื่อง HPLC และ Integrator

7. ตั้งเงื่อนไขที่ใช้ในการ run chromatogram ดังนี

P max	300	atm
P min	10	atm
Flow rate	1	ml/min
λ	254	nm
Injection volumn	20	μl

8. ทำการ purge ระบบเพื่อไล่ฟองอากาศ 5-10 นาที และทำการ equilibrate คอลัมน์เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่าโดยสังเกตจาก base line ต้องนิ่งและไม่มีสัญญาณรบกวน (noise)

9. ใช้เฟสเคลื่อนที่ทั้ง 3 ชนิด ทดลอง run chromatgram ของ สารละลายมาตรฐานผสม เพื่อดูว่าเฟสเคลื่อนที่ชนิดใดให้การแยกดีที่สุด และหาความยาวคลื่นที่ให้ความไวสูงสุดสำหรับสารประกอบทั้ง 3 ชนิดในยา APC

10. เมื่อทำการแยกพีกของสารประกอบทั้งสามชนิด ได้สมบูรณ์และได้เงื่อนไขที่เหมาะสม ให้ใช้เงื่อนไขที่เหมาะสมนี้ run chromatgram สารมาตรฐานของ caffeine, paracetamol และ phenacetin แต่ละชนิด เพื่อแสดงว่าพีกแต่ละพีกในสารผสมคือ สารประกอบใด

11. สุ่มเก็บตัวอย่างยา APC แต่ละล็อตของการผลิต โดยเลือกมา 1 บริษัทเพื่อศึกษาการควบคุมคุณภาพของผู้ผลิต สุ่มเก็บตัวอย่างมาทั้งหมด 14 ตัวอย่าง และเตรียมตัวอย่างโดย ละลายยา APC 1 เม็ดในเมทานอลให้มีปริมาณ 10 ml และนำไปกรองผ่าน 0.45 μm syringe membrance filter จากนั้นนำสารละลายมา 1 ml เจือจางให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำปราศจากไอออน

12. ทำการ run chromatgram ของตัวอย่างทั้งหมด 14 ตัวอย่าง

13. นำข้อมูลพื้นที่พีกของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้มาแสดงเป็นกราฟ และหาค่าเฉลี่ยของพื้นที่พีก ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ เพื่อศึกษาหาว่าตัวอย่างแต่ละล็อตของการผลิตได้มีการควบคุมคุณภาพหรือไม่ โดยพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่วิเคราะห์ได้

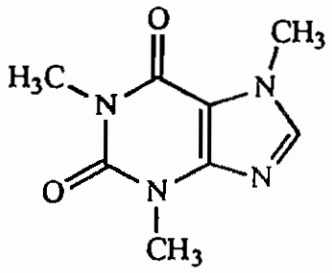
4. ปฏิบัติการทดลองทางปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative analysis)

การทดลองที่ 3.3

การหาปริมาณคาเฟอิน ด้วยเทคนิค HPLC ในระบบ isocratic elution

(Determination of Caffeine by using isocratic elution HPLC)

คาเฟอิน เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบประสาททำให้มีความรู้สึกกระปรี้กระเปร่า มักพบในเครื่องดื่มเช่นกาแฟ, น้ำชา, น้ำอัดลม เป็นต้น ซึ่งมีชื่อทางเคมีหลายชื่อ ได้แก่ 3,7-Dihydro-1,3,7-trimethyl-1-H-Purine-2,6-dione , 1,3,7-trimethylxanthine , 1,3,7-trimethyl-2,6-dioxopurine , caffeine , guaronine , methyltheobromine มีสูตรทางเคมีคือ $C_8H_{10}N_4O_2$ และมีสูตรโครงสร้างดังนี้



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเทคนิคในการวิเคราะห์ทางปริมาณโดยวิธี HPLC โดยใช้ software chemstation เปรียบเทียบกับการใช้ Integrator ในระบบ isocratic elution
2. หาปริมาณคาเฟอินในกาแฟเปรียบเทียบกับในใบชา

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 binary pump และ computer + software chemstation
2. เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 isocratic pump และ integrator HP3396 series III
3. คอลัมน์ C_{18} พร้อม guard eolumn
4. ชุดกรองตัวทำละลายพร้อมแผ่นกรองเมมเบรน ขนาด 0.45 μm ชนิด Nylon

5. ตัวทำละลาย
   - ตัวทำละลาย A บัฟเฟอร์ 1 % acetic acid เข้มข้น 1 M
   - ตัวทำละลาย B เมทานอล ชนิด HPLC grade
6. Solid Phase Extraction Cartridge ชนิด ODS
7. สารมาตรฐานคาเฟอิน
8. ขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ขนาด 1000 ml
9. 0.20 μm syringe membrance filter สำหรับกรองตัวอย่าง
10. ปิเปตขนาด 1, 5, 10 ml
11. ไมโครปิเปตขนาด 100 – 1000 μl
12. ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เตรียมเฟสเคลื่อนที่ บัฟเฟอร์ : เมทานอล อัตราส่วน 80:20 แล้วกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 μm ชนิด Nylon แล้วนำไปไล่แก๊สโดยการ sonicate เป็นเวลา 15-30 นาที

2. เตรียมตัวอย่างที่มีคาเฟอินเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กาแฟผงสำเร็จรูป และชา
   - ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักละเอียดประมาณ 0.5 กรัม
   - นำมาละลายน้ำอุ่นที่ 70-80° C เป็นเวลา 10-20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นกรองผ่านกระดาษกรอง แล้วปรับปริมาณเป็น 50 ml
   - นำ SPE ODS Cartridge มาทำ condition ก่อนผ่านตัวอย่างโดย ผ่านน้ำ DI 2 ml และตามด้วยเมทานอล 5 ml และใช้ syringe เป่าเมทานอลให้แห้ง
   - ดูดตัวอย่างมา 2 ml ผ่านไปบน SPE ODS Cartridge ที่ condition แล้ว ขั้นตอนนี้คาเฟอินและสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วจะถูกจับไว้ที่ ODS Cartridge จากนั้นใช้เมทานอล 2.5 ml ไล่คาเฟอินออกจาก ODS Cartridge โดยทิ้ง 0.5 ml แรกไปแล้วเก็บส่วนที่เหลือ 2.0 ml จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ผ่าน 0.25 μm syringe membrance filter แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC
   - ให้ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เป็นตัวอย่างละ 3 ครั้ง

หมายเหตุ

SPE ODS Cartridge 1 อันใช้ได้เพียงครั้งเดียว ถ้าต้องการนำกลับมาใช้ใหม่ (ซึ่งไม่ค่อยดีนักในงานวิเคราะห์ที่ต้องการความถูกต้องสูงๆ) ให้ทำได้โดยใช้ acetonotile และ ethyl acetate ไล่สารประกอบอินทรีย์ที่ติดค้างใน ODS Cartridge ออกให้หมด แล้ว rinse ตามด้วยเมทานอล, น้ำ, เมทานอล แล้วจึงกลับมาใช้กับตัวอย่าง

3. เตรียมสารละลาย stock คาเฟอิน

ชั่งคาเฟอินที่บริสุทธิ์หนัก 0.0100 กรัม นำมาละลายในน้ำปราศจากไอออน แล้วทำให้มีปริมาณ 100 ml จะได้ stock คาเฟอินเข้มข้น 100 ppm

4. เตรียมสารละลายมาตรฐานหลายๆ ระดับความเข้มข้นเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยปิเปต 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8 ml ของ stock 100 ppm คาเฟอิน ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml แล้วเจือจางให้พอดีขีดด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สาลละลายมาตรฐานคาเฟอินที่มีความเข้มข้น 1, 2 , 3, 4, 6 และ 8 ppm ตามลำดับ

5. อ่านคู่มือการใช้เครื่องในหัวข้อ 2 .1 และ 2.2 ให้เข้าใจ

6. ที่เครื่อง HPLC HP 1100 binary pump และ computer ปฏิบัติดังนี้

6.1 เปลี่ยนฝาขวดเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นฝาของเครื่อง HPLC โดยทำการ rinse สายท่อด้วยเฟสเคลื่อนที่จำนวนเล็กน้อย โดย line A ใส่ 1 % ของ 1 M acetic acid และ line B ใส่เมทานอล

6.2 เปิด power ของเครื่อง stabilizer (ดันขึ้น) จากนั้นเปิด power switch ของปั๊ม ดีเทคเตอร์ degrasser และคอมพิวเตอร์ และเข้า Instrument 1 online

6.3 ตั้งค่า Solvent Bottle filling

Check Bottle B ⟶ Solvent Bottle Filling ⟶ Actual Vol. ⟶ Total Vol.

A	0.95 L	1.00 L
B	0.75 L	1.00 L

☒ Prevent analysis if level fall below 0.100 L

☒ Turn pump off

6.4 ทำการ purge เพื่อไล่ฟองอากาศไม่ให้เข้าคอลัมน์ โดยหมุน purge valve ทวนเข็มนาฬิกาให้คลายตัว ทำการตั้งค่าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2 ml/min แล้วเปิดปั๊ม (ในการ purge ให้ตัวทำละลายไหลเร็วได้) ให้ทำการ purge line ทั้ง 2 line เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที

Click ที่ Pump ⟶ Setup Pump ⟶ Control : Flow 1.00 ml/min

Stop time 20 min

Post time 1.00 min

Solvent A : Buffer [Auto] Pressure Limit 400 bar Max.

Solvent B : Methanol [30%] Pressure Limit 0 bar Min.

Click Pump on

6.5 ทำการปิดปั๊มและปิดปุ่ม purge valve (หมุนตามเข็มนาฬิกาจนสุดแต่ไม่ต้องแน่นมากเกินไป)

6.6 ตั้งค่าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 ml/min ทำการเปิดปั๊มอีกครั้ง ให้สังเกตดูระดับของ pressure ให้คงที่ตลอดเวลา ถ้าไม่คงที่แสดงว่ามีฟองอากาศอยู่ในระบบ ให้ทำการปิดปั๊มและทำการ purge อีกครั้ง

6.7 ทำการตั้งค่าส่วนผสมของ A:B เป็น 80:20

6.8 ทำการตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 280 nm เพื่อใช้ในการตรวจวัดของดีเทคเตอร์

6.9 สังเกตจน base line นิ่ง

6.9.1 ก่อนที่จะ run สารตัวอย่างต้องทำการล้าง sample loop ก่อนโดยทำการล้างด้วย เมทานอล แล้วตามด้วยน้ำปราศจากไอออน 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย เมทานอล อีกครั้ง (ควรทำการล้าง sample loop ในกรณีที่วาล์วอยู่ในตำแหน่ง load)

6.9.2 ทำการ rinse syringe ที่จะใช้ในการฉีดสารตัวอย่างด้วยเมทานอล แล้วจึงล้างด้วยสารตัวอย่างที่จะใช้ในการ run

6.9.3 ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ sample loop ให้มีปริมาณมากกว่าขนาดของ loop

6.9.4 ก่อนที่จะทำการ inject ให้ตรวจสอบว่าได้ตั้งค่า parameter ต่างๆ ที่ใช้ใน method ถูกต้อง เช่น wave length, flow rate, % eluent, bottle filling, run time,

6.9.5 กดปุ่ม Balance ก่อน inject

6.9.6 หมุน inject valve จากตำแหน่ง load มาที่ตำแหน่ง inject ให้เฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์

6.10 ทำ calibration curve โดยฉีดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ทั้งหมด 5 ระดับ

6.11 ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่ได้เตรียมไว้แล้วทั้งกาแฟ และชา

*** การใช้งาน soft ware ทำ data analysis ในการหาปริมาณ ให้ดูรายละเอียดในข้อ (2.2.4) ***

7. ที่เครื่อง HP 1100 isocratic pump และ Integrator HP 3396 serie III

7.1 เปลี่ยนฝาขวดเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นฝาของเครื่อง HPLC โดยทำการ rinse สายท่อด้วยเฟสเคลื่อนที่จำนวนเล็กน้อย โดยเตรียมเฟสเคลื่อนที่เป็น 1 % 1 M acetic acid :เมทานอล ในอัตราส่วน 80:20

7.2 เปิด power ของเครื่อง stabilizer (ดันขึ้น) จากนั้นเปิด power switch ของปั๊ม ดีเทคเตอร์ และ อินทิเกรเตอร์

7.3 ทำการ purge เพื่อไล่ฟองอากาศไม่ให้เข้าคอลัมน์ โดยหมุน purge valve ทวนเข็มนาฬิกา 3-4 รอบให้คลายตัว

7.4 ที่ control module ตั้ง bottle filling, flow rate, wavelength โดยดูรายละเอียดในหัวข้อ 2.1

7.5 ทำการเปิดปั๊ม (กด pump on) และ purge เป็นเวลา 3-5 นาที (ในการ purge สามารถตั้งค่า flow rate ให้มากกว่าตอนที่ทำการ run ตัวอย่าง เพื่อความรวดเร็วได้)

7.6 ทำการปิดปั๊ม และหมุนปุ่ม purge ปิดให้สนิทตั้งค่า flow rate ใหม่ให้ถูกต้องตามที่ต้องการใช้งาน แล้วเปิดปั๊มอีกครั้ง

7.7 ที่ control module สั่งไปที่หน้า signal plot ดูจน base line นิ่ง

7.8 ที่อินทิเกรเตอร์ทำการตั้งค่าต่างๆ ตามรายละเอียดในหัวข้อ 2.1.5

7.9 เมื่อ base line นิ่งแล้ว ให้ดำเนินการแบบเดียวกับข้อ 6.9 แต่ในขณะที่หมุนปุ่ม injection valve ไปที่ตำแหน่ง inject ให้กดปุ่มstart ที่เครื่อง Integrator พร้อมกันด้วย

7.10 ฉีดสารมาตรฐานเพื่อทำกราฟมาตรฐานทั้งหมด 5 ระดับความเข้มข้น

7.11 ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วทั้งกาแฟ และชา

8. ให้คำนวณหา % คาเฟอินในตัวอย่างกาแฟ และชา
9. ให้เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากเครื่อง HPLC ทั้ง 2 เครื่องในหัวข้อ
   - ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน
   - ความเที่ยงของผลที่วิเคราะห์ได้
   - ความยากง่ายในการวิเคราะห์

<u>คำถาม</u>

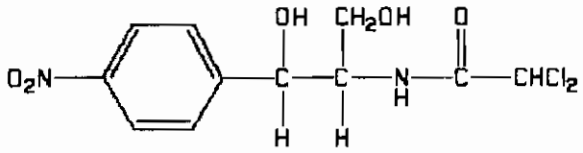
1. ทำไมจึงเลือกใช้คอลัมน์ Reverse Phase ODS ในการหาปริมาณคาเฟอิน
2. SPE คืออะไร
3. ทำไมจึงต้อง sonicate เฟสเคลื่อนที่ก่อนนำไปใช้งาน

การทดลองที่ 3.4

การหาปริมาณคลอแรมฟีนิคอลในยาหยอดตาโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(Determination of chloramphenical in eye drop drug by HPLC)

คลอแรมฟีนิคอล เป็นสารปฏิชีวนะที่ได้จาก *Streptomyces venezuelae* ซึ่งมีผลใช้ในการรักษาอย่างกว้างขวางกับการติดเชื้อจากแบคทีเรีย (bacteria) รวมถึงการติดเชื้อจากเชื้อประเภทที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการหายใจ มีการนำไปใช้งานทั้งในรูปของ แคปซูล ครีม ยาน้ำและยาฉีด มีชื่อทางเคมีคือ 2,2-Dichloro-N-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-2-(4-nitrophenyl)ethyl]acetamide มีสูตรทางเคมีคือ $C_{11}H_{12}N_2O_5$ และมีสูตรโครงสร้างดังนี้



สารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอล ถูกจัดให้เป็นสารที่มีส่วนก่อมะเร็งในมนุษย์ในบางสภาพการที่มีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้นสารคลอแรมฟีนิคอลนี้จะถูกพิจารณาใช้เป็นอันดับสุดท้ายเมื่อยาปฏิชีวนะตัวอื่นใช้ไม่ได้ผล อย่างไรก็ตามยังพบว่ามีการนำสารคลอแรมฟีนิคอลมาใช้ในทางเกษตรกรรม ทำให้มีคลอแรมตกค้างในอาหาร

ตามกฎของ USA FDA ไม่อนุญาติให้มีสารตกค้างประเภท สารปฏิชีวนะคลอแรมฟีนิคอลในกุ้ง ดังนั้นกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ของไทยจึงห้ามมีการนำเข้า และใช้สาร β – Agronist, Chloramphenical, Furazolodone, Avoparcin และ Nitrofurazone ในอาหารสัตว์ ตั้งแต่วันที่ 14/6/99 และในวันที่ 22 ม.ค. 2002 คณะรัฐมนตรีอนุมัติการควบคุมการนำเข้าของสารคลอแรมฟีนิคอล ยิ่งกว่านั้นทางกรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และหน่วยงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ตรวจตราอย่างใกล้ชิดเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ การเลี้ยงกุ้ง ขบวนการผลิต และการส่งออก รวมทั้งวิธีการวิเคราะห์ปริมาณตกค้างของคลอแรมฟีนิคอล ให้ได้มาตรฐาน

แต่อย่างไรก็ตามคลอแรมฟีนิคอลยังมีประโยชน์ทางการแพทย์ โดยนิยมใช้รักษาอาการอักเสบของตาเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย คลอแรมฟีนิคอลในยาหยอดตา ใช้สำหรับรักษาการติดเชื้อจากแบคทีเรียของตาได้เป็นอย่างดี แต่ไม่รวมถึงการติดเชื้อจากไวรัสและเชื้อรา อาจใช้ยาหยอดตาเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับยากิน การใช้ยาหยอดตาคลอแรมฟีนิคอล ไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรงแต่การใช้ยาในระยะยาวอาจมีผลทำลายไขกระดูก การใช้ยาจึงควรอยู่ในความดูแลของแพทย์

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. เพื่อศึกษาเงื่อนไขที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณคลอแรมฟีนิคอล โดยวิธี HPLC
2. เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณคลอแรมฟีนิคอลในยาหยอดตาจากตัวอย่างยี่ห้อต่างๆ

<u>สารเคมีและเครื่องมือ</u>

1. เครื่อง HPLC รุ่น HP 1100 binary pump และ computer and software chemstation
2. คอลัมน์ 5 μm Hypersil ODS , 4 mm x 250 mm พร้อม guard column
3. Sample loop ขนาด 20 μl
4. ชุดกรองตัวทำละลายพร้อม membrance filter ขนาด 0.45 μm ชนิด Nylon
5. ตัวทำละลาย
   - ตัวทำละลาย A น้ำปราศจากไอออน (DI water)
   - ตัวทำละลาย B เมทานอล
6. ตัวอย่างยาหยอดตา
7. สารมาตรฐานคลอแรมฟีนิคอล
8. ขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ขนาด 1000 ml
9. 0.25 μm syringe membrance filter สำหรับกรองตัวอย่าง
10. ปิเปตขนาด 1, 5, 10 ml
11. ไมโครปิเปตขนาด 100 – 1000 μl
12. ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml
13. Syringe ขนาด 3 ml
14. บีกเกอร์ ขนาด 5, 25, 50, 100 ml
15. ชุดกรองแบบ suction

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเฟสเคลื่อนที่

   1.) กรองเมทานอล ผ่านเมมเบรน 0.45 μm จำนวน 1 ลิตร จากนั้นบรรจุใส่ขวดตัวทำละลาย และนำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่องHPLC

   2.) นำน้ำปราศจากไอออน ใส่ขวดสีชาแล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปต่อเข้ากับเครื่อง HPLC

2. การเตรียม Standard Solution หลายๆ ระดับจาก Stock Solution ที่มีความเข้มข้น 100 ppm

ตาราง แสดงความเข้มข้นของ Standard Solution และปริมาตรของ Stock Solution ที่ใช้เตรียม

Standard level	Standard concentration (ppm)	Stock Solution volume (μl) in 10 ml solution
1	1	100
2	2	200
3	3	300
4	4	400
5	5	500

3. การเตรียมตัวอย่างจากขวดยาหยอดตา (~ 0.5% CAP)

ตาราง แสดงการเตรียมตัวอย่างโดยทำ dilution 3 steps

Step	Solution	Pipette(μl)	Final Volume (ml)	Appx. Conc.(ppm)
1	ในขวดยา	2,000	10	1,000
2	จาก (1)	250	10	25
3	จาก (2)	1000	10	2.5

4. ติดตั้งเฟสเคลื่อนที่ เปิดเครื่อง HPLC และคอมพิวเตอร์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3

5. ตั้งค่า Solvent Bottle filling และทำการ purge ระบบ เช่นเดียวกับข้อ 6.3 และ 6.4 ของการทดลองที่ 3.3

6. นำสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 3 ppm มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้ run chromatogram โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ และ flow rate

<u>ตาราง</u> แสดงสภาวะเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง

คอลัมน์	5 µm Hypersil ODS , 4 mm x 250 mm
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
อัตราการไหล	1.0 ml/min
การตรวจวัด	UV – detector (280 nm)
เฟสเคลื่อนที่	MeOH : H_2O (30 : 70)

- Eluent ratio : ปรับอัตราส่วน MeOH : H_2O จาก
  30:70 ⟶ 40:60 ⟶ 50:50 ⟶ 60:40 ⟶ 70:30
  เปรียบเทียบค่า Peak Symmetry, Peak Area , Peak Height
  และ Retention time และพิจารณาเลือกอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

- Flow rate : ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่จาก Eluent ratio ที่ได้ จากนั้นทำการปรับ Flow rate โดยเปลี่ยน flow เป็น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ml/min
  ทำการเลือก Flow rate ที่เหมาะสม

7. ทำ Calibration Curve แบบ ESTD (ดูรายละเอียดข้อ (2.2.4))

Run chromatogram สารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้ด้วยเงื่อนไขอัตราส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ และ flow rate ที่วิเคราะห์ได้

8. วิเคราะห์สารตัวอย่าง ที่เตรียมจากข้อ 3 บันทึกผลการทดลอง
(ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างยาหลายๆ ยี่ห้อ โดยสุ่มเก็บยี่ห้อละ 3 ตัวอย่าง)
9. สรุปผล และรายงานผลการทดลอง