

บทที่ 7

ปฏิบัติการทดลองโดยวิธี
แก๊สโครมาโทกราฟี

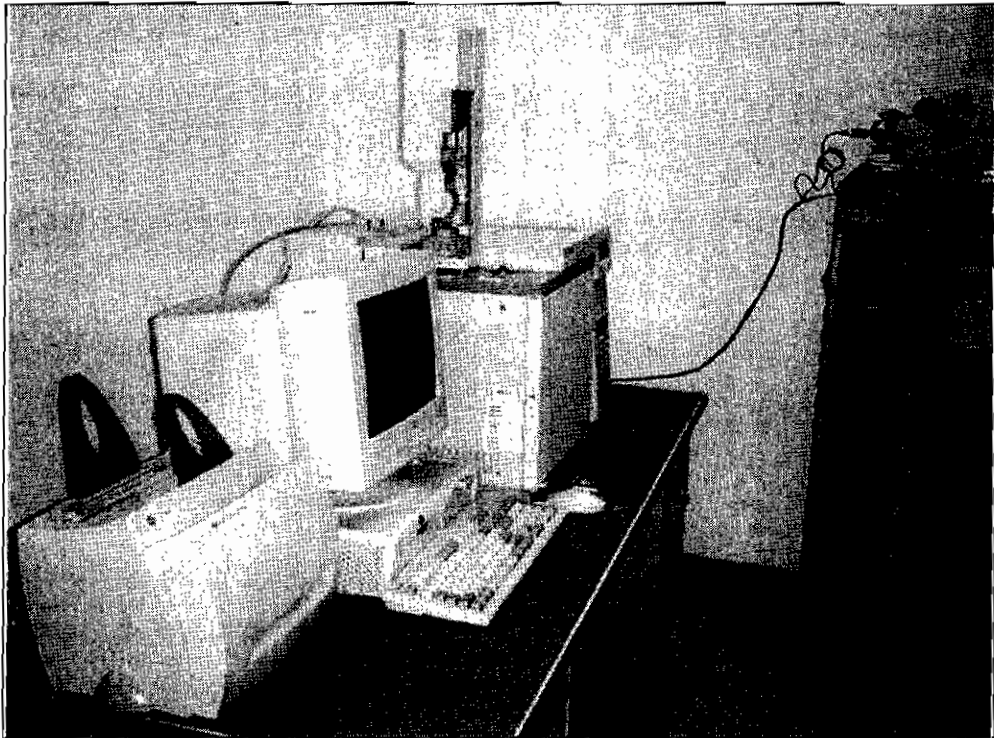
Laboratory Practice in
GC

บทที่ 7

ปฏิบัติการทดลองโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

Laboratory Practice in GC

เครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทดลอง CM 437 คือ GC HP 6890 ก่อนที่นักศึกษาจะลงมือปฏิบัติการทดลอง นักศึกษาต้องทำความเข้าใจและเรียนรู้วิธีการใช้เครื่องมือก่อนดังนี้



รูปที่ 7.1 ชุดเครื่องมือแก๊สโครมาโทกราฟีในห้องปฏิบัติการ CM 437

เครื่องมือ GC ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ระบบแก๊ส

แก๊สที่ต่อเข้ากับเครื่อง GC มีทั้งหมด 5 ดัง คือ

1.1 แก๊สไฮโดรเจน แก๊สจะทำไว้ด้วยสีแดง และมีชื่อบอกไว้ชัดเจน แก๊สไฮโดรเจนจะต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ FID ทำหน้าที่เป็นเชื้อเพลิง ข้อควรระวังอย่างยิ่งคือวาล์วปรับความดัน (regulator) ที่ใช้ประจำกับแก๊สชนิดนี้ ไม่ควรนำไปใช้กับแก๊สชนิดอื่น หรือนำวาล์วปรับความดันของแก๊สชนิดอื่นมาใช้กับแก๊สชนิดนี้ เพราะไฮโดรเจนเป็นแก๊สที่ไวไฟ โดยเฉพาะเมื่อรวมกับออกซิเจน อาจมีการติดไฟและระเบิดได้

1.2 อากาศ แก๊สที่เป็นอากาศที่บริสุทธิ์ (air zero) ส่วนใหญ่ทำไว้ด้วยสีเขียว และมีชื่อบอกชัดเจน มีหน้าที่ช่วยทำให้เชื้อเพลิงไฮโดรเจนติดไฟ ต่อเข้ากับเครื่องดีเทคเตอร์เช่นกัน

1.3 แก๊สไนโตรเจน แก๊สไนโตรเจนที่บริสุทธิ์ (OFN) จะทำไว้เป็นสีเทา และมีชื่อบอกอย่างชัดเจน ไนโตรเจนจะทำหน้าที่เป็น make up gas ช่วยให้ความดันของแก๊สตัวพาที่พาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์มีค่าสูงขึ้น เหมาะสมกับการทำงานของดีเทคเตอร์ ดังนั้นแก๊สไนโตรเจนต้องมีความบริสุทธิ์และปราศจากความชื้น ที่ท่อส่งแก๊สจึงต้องต่อไว้ด้วย moisture trap และ hydrocarbon trap

1.4 แก๊สฮีเลียม แก๊สบรรจุทาดด้วยสีน้ำตาล แก๊สฮีเลียมทำหน้าที่เป็นแก๊สตัวพาควรมีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากความชื้นและออกซิเจน แก๊สนี้ต้องผ่านเข้าคอลัมน์ตลอดเวลา คอลัมน์บางชนิดไม่ชอบความชื้น บางชนิดอาจเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน ดังนั้นแก๊สฮีเลียมเมื่อออกจากถังจะถูกส่งผ่านตามท่อไปยัง moisture trap และ oxygen trap ตามลำดับ ที่ oxygen trap ซึ่งติดอยู่ด้านหลังของเครื่อง GC จะต้องมีตัวชี้บอกเวลาหมดอายุการใช้งาน ถ้าไม่มีตัวชี้บอก (indicator) ติดไว้ สามารถจะประมาณอายุการใช้งานได้ คือใช้กับแก๊สตัวพาประมาณ 3 ถึง หรือสังเกตจากความผิดปกติของโครมาโทแกรม

1.5 การบอมนไดออกไซด์ ถึงบรรจุด่วนใหญ่จะทาด้วยสิค้ำ แก๊สนี้จะใช้งานเมื่อต้องการให้ oven เย็นลงอย่างรวดเร็ว เมื่อต้องการ cool down ระบบ หรือต้องการเปลี่ยน method ใหม่ ที่เปลี่ยน จากอุณหภูมิสูงมาเป็นต่ำ เพื่อเป็นการประหยัดเวลา หรือเมื่อต้องการ run สารตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง เรียกว่า Cryogenic

สิ่งที่ควรรทราบในตอนเริ่มต้นเปิดแก๊สคือ คิตเตคเตอร์ที่มีใช้สำหรับเครื่อง GC HP 6890 ในห้องปฏิบัติการ CM 437 มี 2 ชนิดได้แก่ FID และ μ ECD

เมื่อต้องการใช้งาน FID ให้เปิดถึงแก๊สไฮโดรเจน อากาศ ไนโตรเจน และฮีเลียมทั้ง 4 ชนิด
เมื่อต้องการใช้งาน μ ECD ให้เปิดถึงแก๊สไนโตรเจน และฮีเลียมเพียง 2 ชนิดเท่านั้น

2. ที่ตัวเครื่อง GC

ถ้าระบบของเครื่องไม่มีคอมพิวเตอร์ การสั่งงานต่างๆ สามารถทำได้ทีคีย์บอร์ดของเครื่อง แต่ถ้าเครื่องต่อกับคอมพิวเตอร์ที่มี soft ware HP chemstation ให้สั่งงานและประมวลผลทางคอมพิวเตอร์

ที่ตัวเครื่อง GC มีสิ่งที่ต้องทราบและต้องเรียนรู้ดังนี้คือ

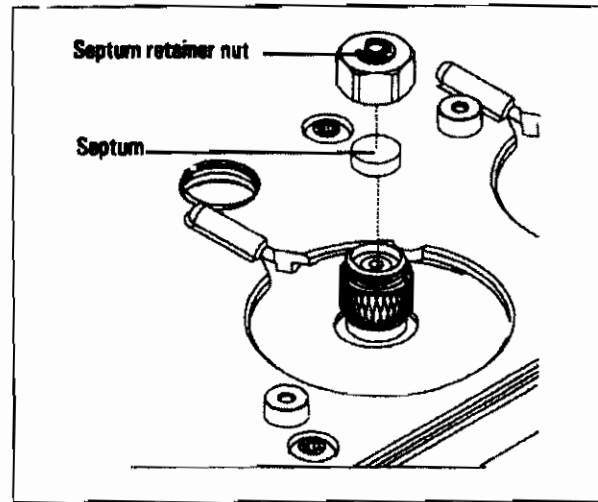
2.1 ระบบฉีดตัวอย่าง (Injection system)

ระบบของ injection system ที่มีใช้ยู่คือ split/splitless การฉีดสารตัวอย่างทำได้ทั้งแบบ manual และใช้ Auto injector ปัญหาที่พบเป็นประจำในการใช้งาน ณ.จุดนี้คือ septum leak โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าใช้วิธีการฉีดแบบ manual ซึ่งเครื่องจะเตือน เพราะเกิดการ leak ของแก๊สทำให้ความดันของเครื่องลดต่ำกว่าปกติ ต้องทำการเปลี่ยน septum

การเปลี่ยน septum

ใช้ประแจ (septum nut wrench) สำหรับหมุน nut ที่ส่วนฉีดตัวอย่าง ทำการหมุน septum retainer nut ที่ปิดด้านบนออก ดังแสดงในรูปที่ 7.2 ใช้คีมคีบ (forsep) ปลายแหลม หรือที่

เขี่ย septum ดึง septum ออก พยายามอย่าให้ที่ใส่ septum เป็นรอยขีดข่วน เพราะจะทำให้เกิดการ leak ได้ถ้าเป็นรอยลึก



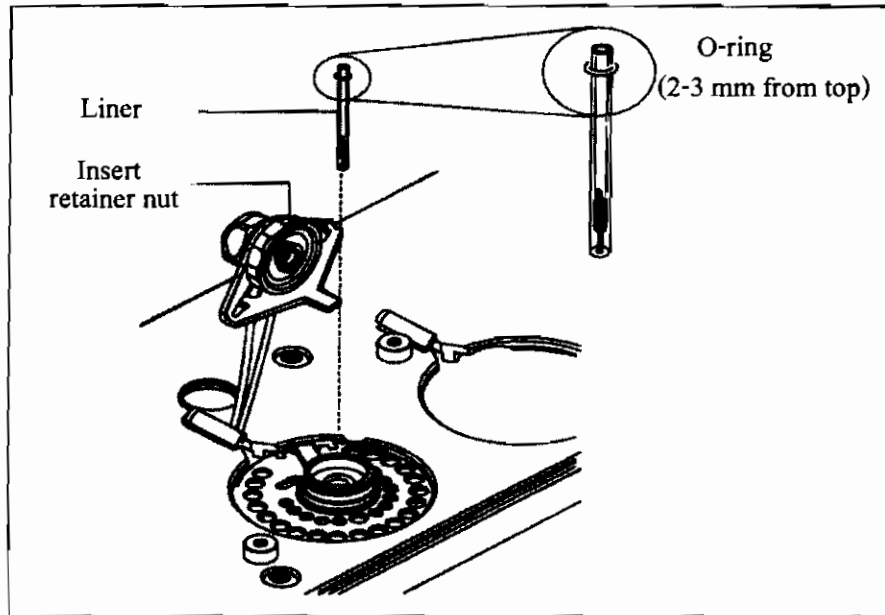
รูปที่ 7.2 แสดงวิธีการเปลี่ยน septum

การเปลี่ยน liner

ในระบบของการฉีดสารแบบ split/splitless จะมีส่วนประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่เป็นหลอดแก้วกลางอยู่ภายใน injection port ที่เรียกว่า liner ซึ่งมีอยู่หลายแบบขึ้นอยู่กับการใช้งาน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 6.23 ภายในหลอด liner จะบรรจุด้วยใยแก้ว (glass wool) บางๆ ซึ่งจะเป็นตัวกรองเศษผงอีกชั้นหนึ่ง เพื่อไม่ให้ตกเข้าไปในคอลัมน์ ทำให้คอลัมน์อุดตันได้ เศษผงนี้อาจเกิดจากเศษของ septum ที่ฉีกขาดเมื่อทำการฉีดสาร หรือจากมลทินในสารตัวอย่าง ถ้า liner สกปรกอาจได้โครมาโทแกรมที่ไม่ต้องการรบกวนการวิเคราะห์ได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์ ถ้ามีสิ่งผิดปกติเกิดขึ้น ควรเช็กที่ความสะอาดของ liner ด้วย ถ้าสกปรกให้นำมาทำความสะอาดหรือเปลี่ยนใหม่ การทำความสะอาด liner ให้ใช้สวดเล็กๆ เขี่ย glass wool ที่อยู่ข้างในออก แล้วนำไปแช่ด้วยอะซิโตน จนกว่าสิ่งสกปรกที่ติดอยู่จะออกไปหมด ถ้าไม่หมด สามารถใช้ Ultrasonic bath สั่น หลังจากนั้นล้างด้วยเมทานอล และน้ำกลั่น แล้วนำไปอบให้แห้ง ก่อนนำไปใช้งานใหม่

วิธีการเปลี่ยน liner ให้ใช้ septum nut wrench หมุนคลายเกลียว split/splitless insert nut แล้วใช้มือหมุนต่อจนหลุด จากนั้นค่อยๆ ดึงขึ้น ระวังอย่าให้กระทบกับหลอด liner อาจทำให้

แตกได้ คึงแห้ง liner ออกแล้วค่อยๆ ถอดยางวงกลม (rubber seal O-ring) ที่หุ้ม liner ออก ถ้ายางวงกลมมีลักษณะเปื่อยยุ่ย และเสียรูปทรงให้เปลี่ยนใหม่ด้วย ดังแสดงในรูป



รูปที่ 7.3 แสดงการเปลี่ยน liner

2.2 Oven

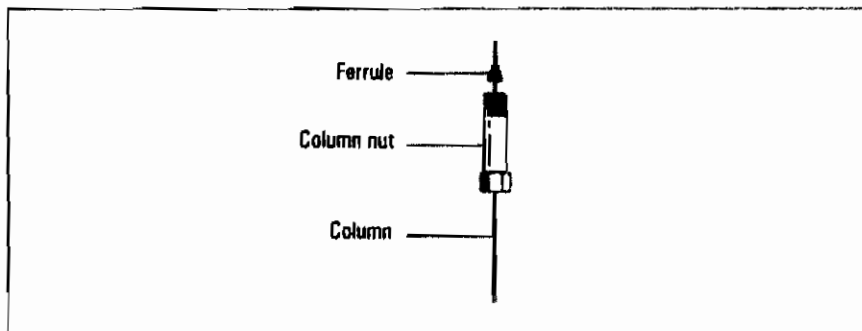
ในส่วนของ Oven ซึ่งเป็นที่บรรจุคอลัมน์ มีจุดต่อคอลัมน์ 2 ชนิดคือ แบบ packed column อยู่ด้านหน้า (front) และแบบ capillary column ซึ่งอยู่ด้านหลัง (back) ส่วนใหญ่คอลัมน์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ทั่วไปคือ คอลัมน์คาปิลลารี ในที่นี้จึงขอกล่าวเฉพาะการติดตั้งคอลัมน์ชนิดคาปิลลารีเท่านั้น โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.2.1 การเตรียมคาปิลลารีคอลัมน์

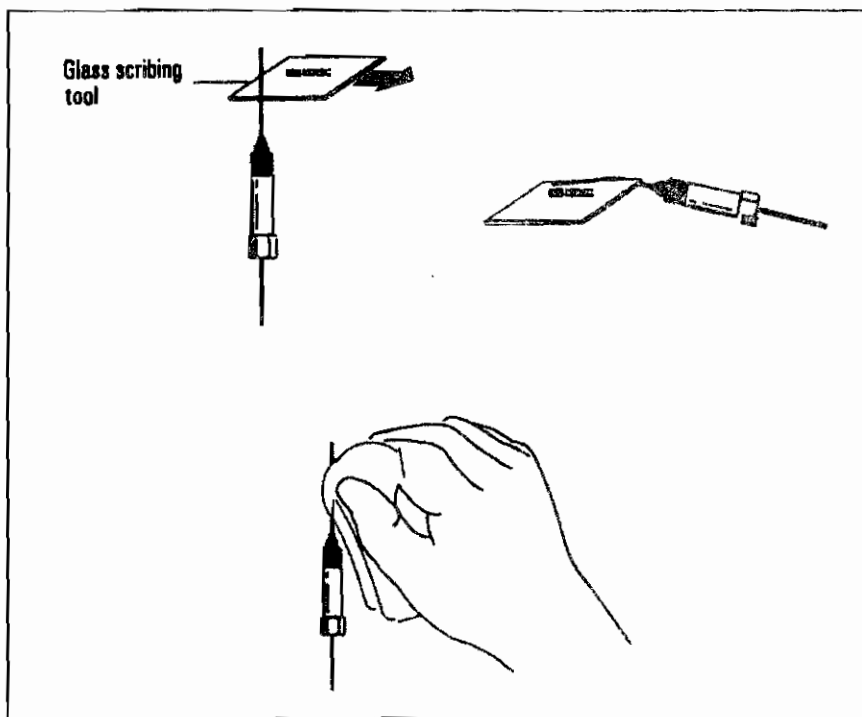
ต้องแน่ใจว่า คอลัมน์ที่นำมาใช้จะไม่อุดตันที่ปลายหรือสกปรกมาก โดยสังเกตจากที่ปลายต้องไม่มีรอยดำและไหม้ ถ้ามีให้ตัดปลายของคอลัมน์ทิ้งไปได้

๗ คำเตือน เวลาตัดปลายคอลัมน์ ควรระวังเศษของคอลัมน์กระเด็นเข้าตา ดังนั้น ควรสวมใส่แว่นตาด้วยขณะทำงาน

1). ใส่ nut และ ferrule ลงในคอลัมน์ ดังรูป



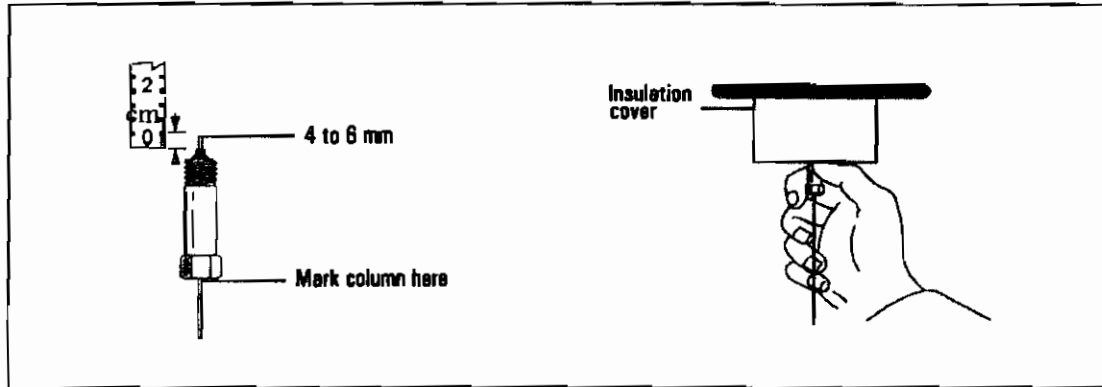
2). ตัดปลายคอลัมน์ด้วย glass scribing tool แล้วหัก ดังรูป



ปลายคอลัมน์ที่ถูกตัดต้องมียอบที่เรียบ
ไม่หักเป็นแบบปากฉลาม

เช็ดปลายคอลัมน์ด้วย isopropanol
เพื่อขจัดรอยนิ้วมือ และฝุ่นผงที่ติดอยู่

3). ดึงคอลัมน์ให้มีปลายโผล่เหนือ ferrule 4 – 6 mm แล้วทำเครื่องหมายที่ปลายของ nut ไว้ โดยป้ายด้วยน้ำยาลบหมึกพิมพ์ติด (liquid paper) เพื่อให้ได้ระยะที่แน่นอน เมื่อใส่ใน inlet base แล้วหมุน nut ให้แน่นด้วยมือ โดยให้ปลาย nut อยู่พอดีกับรอยที่ทำเครื่องหมายไว้ด้วยน้ำยาลบหมึก แล้วใช้ประแจขันอีก 1/4 - 1/2 รอบ เพื่อให้แน่นพอดี

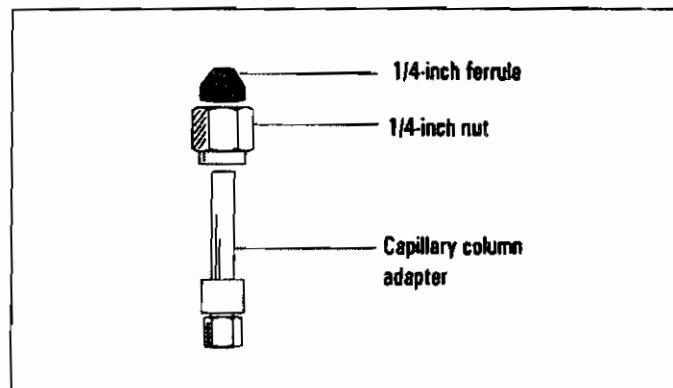


4). การใส่คอลัมน์เข้าดีเทคเตอร์

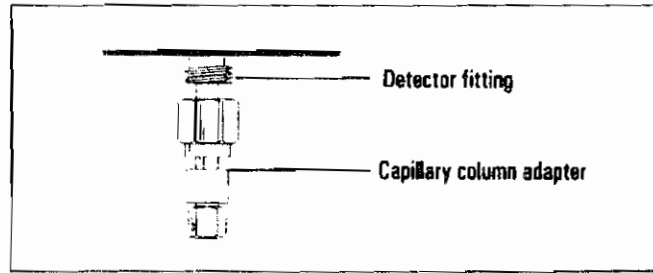
ดีเทคเตอร์สำหรับเครื่องที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ CM 437 มี 2 ชนิดคือ FID อยู่ด้านหน้า (front) และ μ ECD อยู่ด้านหลัง (back) มีวิธีการใส่ดังนี้

4.1 การใส่คอลัมน์ในดีเทคเตอร์ FID

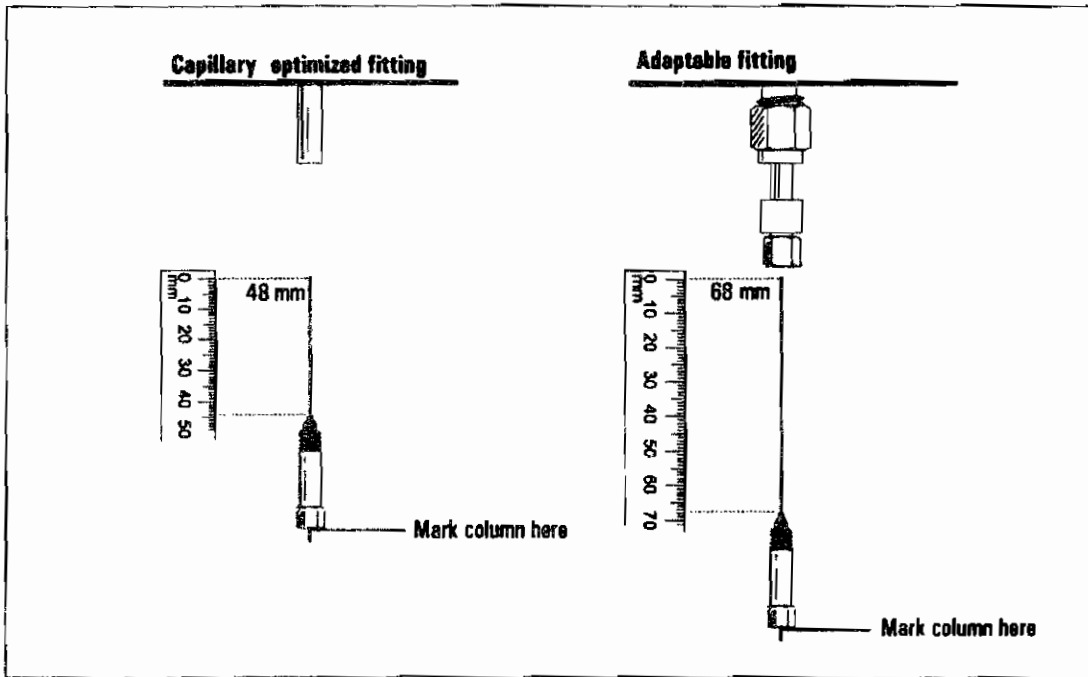
1). ใส่ brass nut และ graphitize vespel ferrule ลงบน adapter



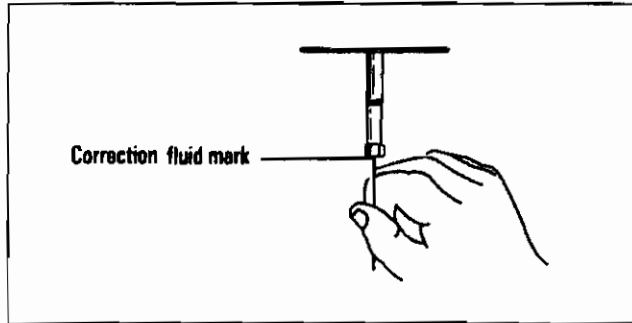
แล้วสอดเข้าตรงๆ ในฐานของดีเทคเตอร์ ใช้มือหมุน nut ให้แน่น แล้วใช้ประแจหมุนอีก 1/4 รอบ



2). คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในน้อยกว่า 100 μm มี 2 ชนิดคือ Capillary optimized fitting ให้ใช้ระยะของคอลัมน์อยู่เหนือ ferrule 48 mm และ Adaptable fitting ให้ใช้ระยะของคอลัมน์อยู่เหนือ ferrule 68 mm พร้อมใช้น้ำยาลบหมึกพิมพ์ขีดทำเครื่องหมายไว้



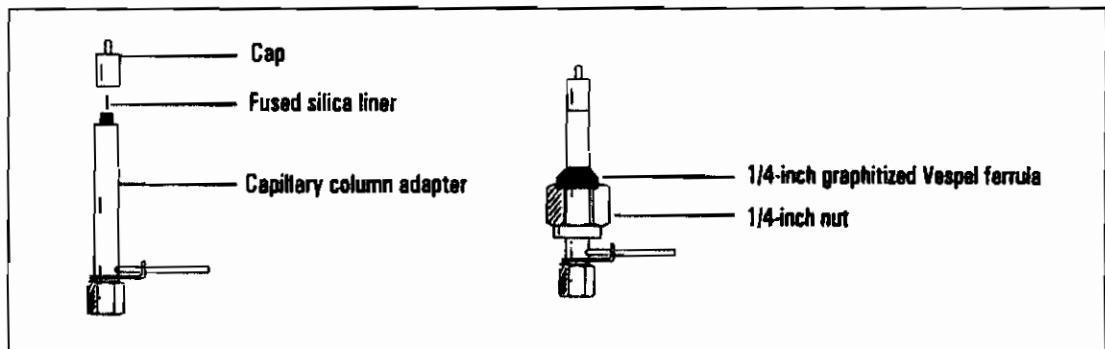
3). ใส่คอลัมน์เข้าไปในดีเทคเตอร์ ค่อยๆ เลื่อนให้คอลัมน์เข้าไปยังฐานของดีเทคเตอร์ ให้เลื่อนจนที่ทำเครื่องหมายอยู่ปลาย nut แล้วใช้มือหมุนให้แน่น ตามด้วยใช้ประแจขนาด 9/16 นิ้ว หมุนอีก 1/4 - 1/2 รอบ



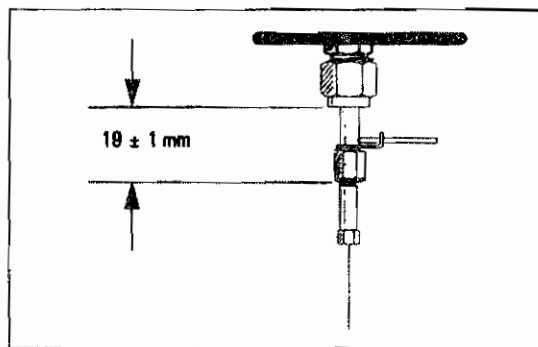
อีกวิธีหนึ่ง ถ้าไม่ได้ทำเครื่องหมายไว้ จะไม่ทราบว่าต้องหมุน nut ให้แน่นที่ใด ให้ใช้วิธีใส่คอลัมน์เข้าไปช้าๆ เลื่อนเข้าไปจนสุด (มีความรู้สึกเหมือนชนอะไร) อย่าออกแรงบังคับ ให้ใช้มือหมุน nut ให้พอยึดคอลัมน์ได้ จากนั้นออกแรงดึงคอลัมน์ลงมาประมาณ 1 มม. แล้วจึงใช้ประแจขันให้แน่นอีก 1/2 รอบ อย่าแน่นเกินไป

4.2 การใส่คอลัมน์ในดีเทคเตอร์ μ ECD

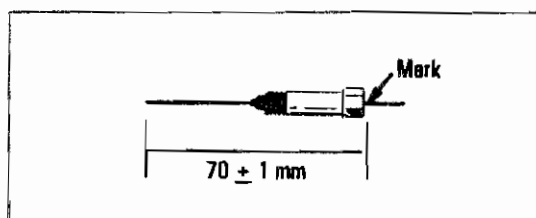
1). นำ adapter cap ออก แล้วตรวจสอบ fused silica liner ว่ามีการแตกหักหรือไม่ ถ้าแตกให้เปลี่ยนใหม่ แล้วหมุน cap กลับเข้าที่เดิม



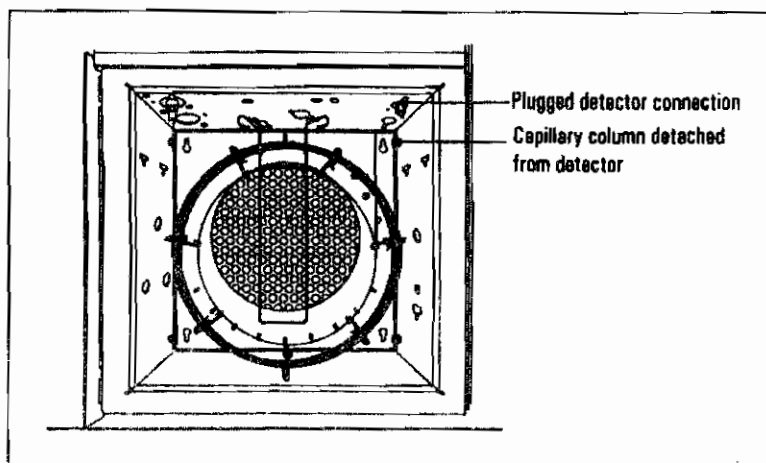
ใส่ nut ขนาด 1/4 นิ้ว และ graphitized vespel ferrule เข้าที่ adapter แล้วค่อยๆ ใส adapter เข้าที่ดีเทคเตอร์แล้วขันให้แน่น ถ้าใส่ได้ถูกต้อง ระยะระหว่างฐานของ adapter กับ 1/4 นิ้วของ nut จะห่างกัน 19 ± 1 mm



2). เตรียมคอลัมน์ใส่ nut แล้วตามด้วย ferrule ให้คอลัมน์อยู่เหนือ ferrule 70 ± 1 mm แล้วทำเครื่องหมายไว้ด้วยน้ำยาลบหมึกพิมพ์สีดำ



3). ใส่คอลัมน์ที่มี nut และ ferrule เข้า adapter ขันให้แน่นด้วยมือ แล้วตามด้วยใช้ประแจขนาด 9/16 นิ้วขันอีก 1/4 รอบ

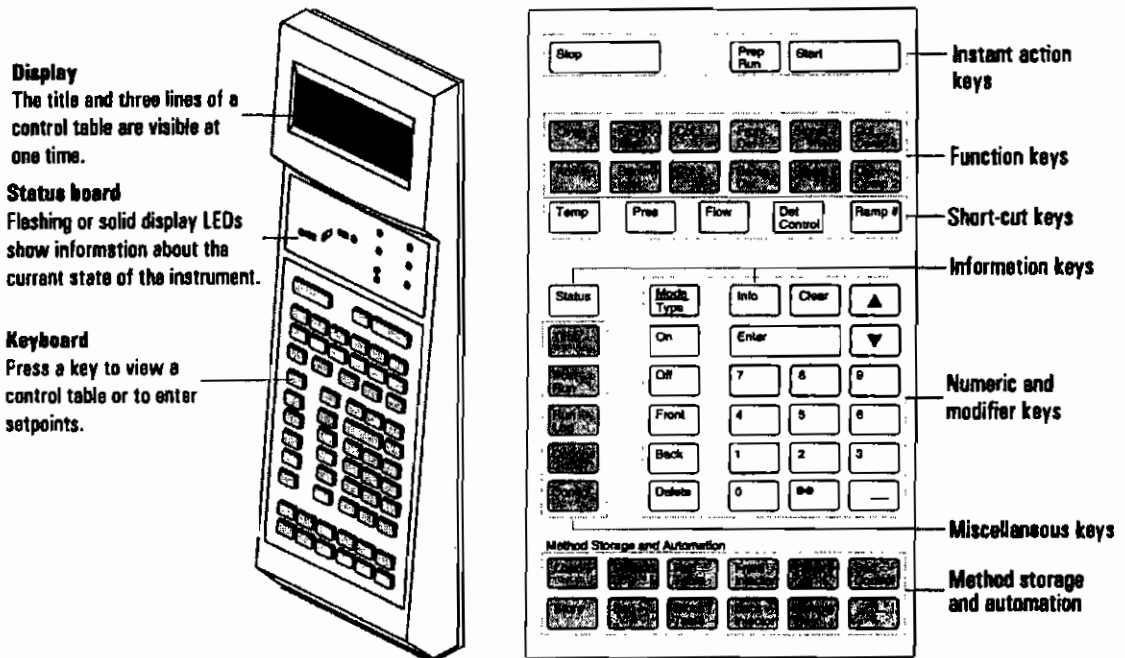
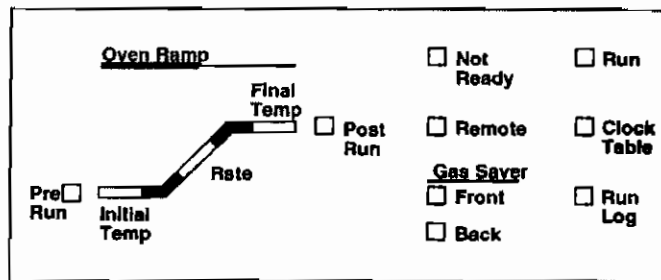


คอลัมน์เมื่อติดตั้งเรียบร้อยแล้วอยู่ใน Oven ต้องเขวมน้ำพอดี ไม่บิดเหมือนถูกบังคับ

2.3 คีย์บอร์ด และการแสดงผล (Key-board และ display)

ที่ตัวเครื่องจะมีคีย์บอร์ด สำหรับสั่งงานได้โดยไม่ต้องผ่านเครื่องคอมพิวเตอร์ และแสดงผลที่จอเป็น LED (display LEDs) ซึ่งแสดงได้ 3 บรรทัด บรรทัดแรกคือ ชื่อของเรื่อง (title) ที่ต้องการดูผล บรรทัดต่อไปแสดงรายการของเรื่องนั้นๆ ถ้ามีข้อมูลมากกว่า 3 บรรทัด ให้ใช้ scroll key ชนิด ▲ ▼ เคลื่อนหาคำแหน่งที่ต้องการแสดง

The status board



รูปที่ 7.4 Keyboard and display and status board

ที่ status board จะแสดงผลเป็น LEDs โดยที่ข้อความที่แสดงจะมีจุดไฟสว่างเป็นรูปสี่เหลี่ยม □
ไว้ที่ข้อความนั้น และเมื่อไฟที่จุด □ ดิบขึ้นจะแสดงความหมายดังตารางที่ 7.1

ตารางที่ 7.1 The display LEDs

LED	Description
Pre Run	Lit when the GC is in the <i>Pre Run</i> state (after [Prep Run] is pressed).
Oven Ramp LEDs	Show the progress of the oven temperature program. The Rate LED blinks if the oven is unable to follow the program.
Post Run	Lit when the instrument is executing a post run.
Not Ready	Lit when the GC is not yet ready to make a run. Blinks when the instrument has one or more fault conditions. Press the [Status] key to see which parameters are not ready or what faults have occurred.
Run	Lit when the instrument is executing a chromatographic run.
Remote	Indicates that communication with a remote device has been established.
Clock Table	Indicates that the clock table has entries.
Gas Saver	Indicates that the front or back gas saver is on.
Run Log	Indicates that the run log has entries. This information can be used for Good Laboratory Practice (GLP) standard.

การทำงานโดยใช้คีย์บอร์ด

การป้อนข้อมูลเกี่ยวกับคอลัมน์ให้เครื่องรับรู้

ข้อมูลของคอลัมน์หาได้จากรายละเอียดที่บันทึกมากับกล่องบรรจุคอลัมน์เมื่อสั่งซื้อมาใช้ แต่เมื่อใช้งานไปนานๆ ความยาวของคอลัมน์อาจลดลงเนื่องจากการตัดทิ้งบ้างเมื่อคอลัมน์สกปรกถ้ามีการตัดบ่อยครั้ง ต้องทำการคำนวณความยาวคอลัมน์ใหม่ได้จากสูตร

$$\text{ความยาว} = \pi dk$$

d = เส้นผ่าศูนย์กลางของวงที่ขดคอลัมน์ในหน่วยเมตร ทั่วไปมีขนาด 0.2 เมตร

k = จำนวนรอบของคอลัมน์ที่ขดไว้

☼ ทำการติดตั้งคอลัมน์เข้าที่ inlet และ detector พร้อมทั้งแขวนให้เรียบร้อย ซึ่งมีตะขอที่เกี่ยวแขวนไว้ให้ ไม่ควรตั้งไว้กับพื้นของ oven หรือลอยไว้โดยไม่แขวน ทำการติดตั้งให้ดี พยายามอย่าให้คอลัมน์ตึงเกินไป หรือมีการบิดงอจนเกิดความเครียด และอย่าให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของคอลัมน์แตะผนังเตาอบ

☼ เปิดเครื่อง GC HP 6890 แล้วใช้คีย์บอร์ดบนตัวเครื่องทำการป้อนข้อมูลที่คีย์บอร์ด กด และ จะปรากฏตารางของข้อมูลบนจอแสดง (display) กดเครื่องหมาย ▲ ▼ เลื่อนขึ้นลงเพื่อดูข้อมูลแต่ละค่า แล้วทำการแก้ไขช่องตัวเลขต่างๆ ให้ถูกต้องกับชนิดของคอลัมน์ที่นำมาใช้ เมื่อเสร็จแล้วต้องการให้เครื่องรับคำสั่ง กด ค่าตัวเลขต่างๆ ที่ต้องเติม คือ

Length (m).....(ได้จากการคำนวณหรือตาม specification ของคอลัมน์ที่กำหนดมา)

Diameter.....(ตาม specification ของคอลัมน์ที่กำหนดมา)

Film thickness... (ตาม specification ของคอลัมน์ที่กำหนดมา)

Inlet..... (เลือก split/splitless)

Detector.....(เลือก FID หรือ ECD ตามที่ต่อคอลัมน์ไว้)

Vacuum Correction off

Press Correct off

ทำการตรวจสอบให้แน่ใจว่า คอลัมน์ที่ทำการติดตั้ง และที่เครื่อง GC มีข้อมูลถูกต้องตรงกัน

การตรวจสอบค่าตัวแปรของคอยล์

☸ กด จะแสดงผลดังนี้

Dim L	320 μ
Pressure	9.0
Flow	2
Avg velocity	3.3
Mode	Constant Flow

ถ้าจำเป็นต้องเปลี่ยนแปลงให้แก้ไขตัวแปรตามต้องการแล้วกด

การตั้งค่าอัตราการไหลของระบบ split/splitless

☸ กด หรือ ขึ้นอยู่กับว่าติดตั้งคอยล์ไว้ที่ใด จากนั้นป้อนข้อมูลตามที่กำหนด โดยสังเกตข้อมูลที่ป้อนได้ที่จอแสดง (display)

Mode	=	Split*
Temp	=	250
Pressure	=	9.0
Split Ratio	=	50
Split Flow	=	103 approx*
Total Flow	=	108 approx*
Gas saver	=	On

ถ้าค่าใดขึ้น * จะเป็นการแสดงข้อมูลเท่านั้น ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงหรือตั้งค่าได้

การตั้งค่าและตรวจดูค่าตัวแปรของดีเทคเตอร์

* กด (FID) หรือ (ECD) ขึ้นอยู่กับการติดตั้งถอยกลับว่าติดตั้งไว้ที่ใด

ที่จอแสดงจะมีข้อมูลเก่าอยู่ ถ้าต้องการเปลี่ยนแปลง ให้ป้อนข้อมูลตามต้องการ แล้วกด

กรณีเป็น FID

Temp	:	250
Hydrogen	:	40
Air flow	:	450
Mode	:	Constant Make up
Mk up (N ₂)	:	45
Flame	:	On
Out put	:	15 – 20 approx

การตั้งค่าตัวแปร Signal 1

* กด signal 1

ที่จอแสดงจะมีข้อมูลเก่าอยู่ ถ้าต้องการเปลี่ยนแปลง ให้ป้อนข้อมูลตามต้องการ แล้วกด

Type	:	Back
Value	:	15 – 20 approx
Zero	:	Off
Range	:	0
Attn	:	0

การตั้งค่าตัวแปรอุณหภูมิของเตาอบ

☞ กด

ที่จอแสดงจะมีข้อมูลเก่าอยู่ ถ้าต้องการเปลี่ยนแปลง ให้ป้อนข้อมูลตามต้องการ แล้วกด

Temp	:	180
Init. time	:	10
Rate (off)	:	0

ให้นักศึกษาฝึกหัดการใช้คีย์บอร์ด โดยคีย์ค่าต่างๆ แล้วดูที่จอแสดงผล ขนทราบหน้าที่ของแต่ละคีย์ให้อ่านคู่มือการใช้ Volume 1 General Information ของ Operating Manual เมื่อทำการทดลองแล้วยังไม่เข้าใจ

3. การสั่งงานด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์

คอมพิวเตอร์ที่ต่อเข้ากับเครื่อง GC HP 6890 ควรเป็น Pentium IV 2.4 GHz Harddisk ความจุไม่ต่ำกว่า 80 GB Ram 256 MB ใช้โปรแกรม Window NT การติดตั้งระบบคอมพิวเตอร์กับเครื่อง GC ควรเป็นหน้าที่ของบริษัทผู้จำหน่ายพร้อมติดตั้งซอฟต์แวร์ HP chemstation สำหรับการทำงานทั้งระบบ

โปรแกรม HP chemstation ถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ

☛ On line ใช้เมื่อต้องการ run งานจริง

☛ Offline มีโปรแกรมการทำงานคล้าย Online แต่ไม่สามารถ run งานได้เพราะคำสั่งจะไม่เชื่อมต่อกับเครื่อง GC ดังนั้นเมื่อต้องการศึกษาการใช้งานต่าง ๆ ของ HP chemstation หรือนำข้อมูลที่ได้จากการ run chromatogram มาศึกษาและประเมินผล ให้ใช้ในหน้าต่างของ Offline ซึ่งจะช่วยให้ทำงานได้ไปพร้อมๆ กับการ run chromatogram

การเริ่มต้นใช้งาน HP Chemstation

ถ้าต้องการใช้ HP Chemstation ในการ run chromatogram ของสารตัวอย่าง ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. วิธีเปิดเครื่อง GC

① เปิด supplies gas

He, N₂, H₂, Air (เมื่อใช้ดีเทกเตอร์ FID)

He, N₂ (เมื่อใช้ดีเทกเตอร์ μ ECD)

① ความดัน gas ที่ใช้ H₂, N₂ ~ 50-60 psi

Air > 60 psi

He > 50 psi

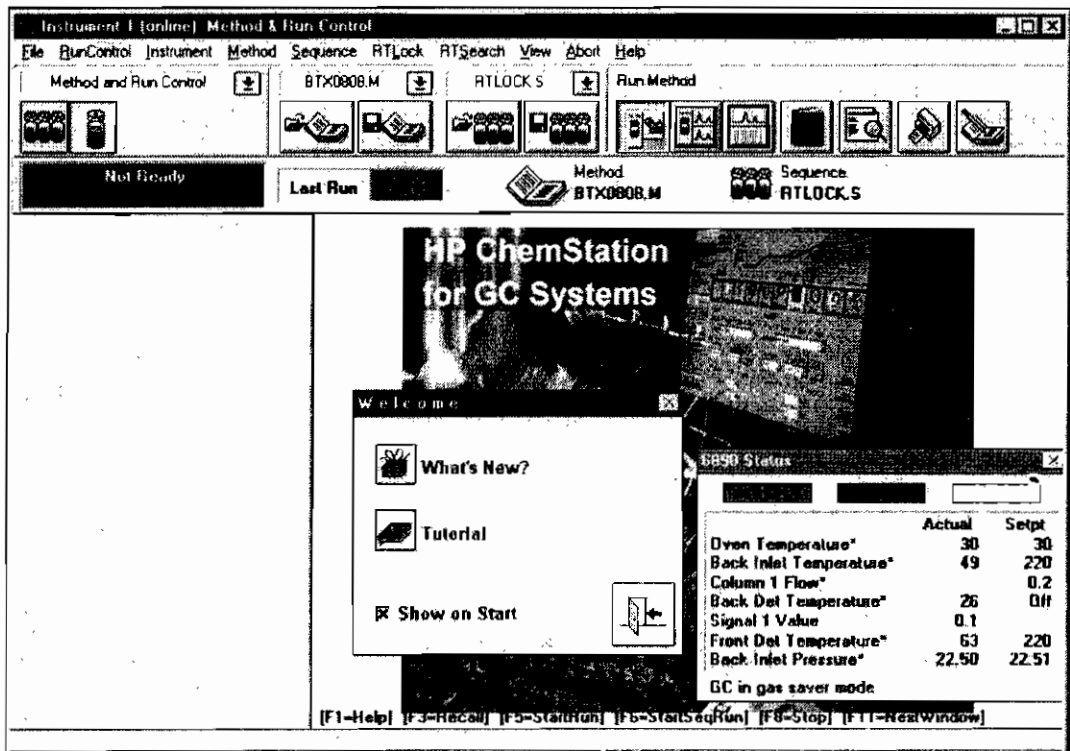
** ทำการทดลองแล้วไม่พอ เพิ่มขึ้นอีกได้

① เสียบปลั๊ก เปิดสวิทช์ stabilizer, ตัวเครื่อง GC, Computer และ Printer

① จอปรากฏหน้าต่าง NT workstation ให้กด Ctrl + Alt + Del

① ปรากฏหน้าต่าง login password ให้กด O.K.

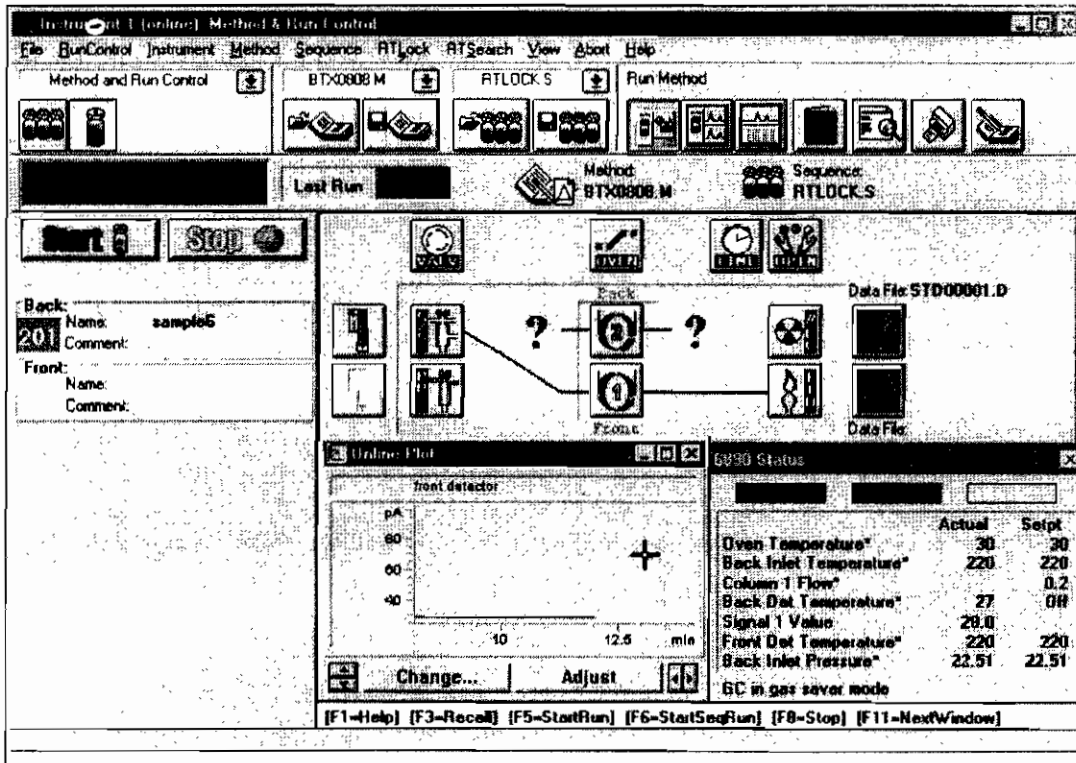
① Double click ที่ shortcut Instrument I Online (หรือไปที่ Start เลือก program เลือก HP chemstation เลือก Instrument I Online) จะได้นหน้าต่าง




หมายเหตุ : ถ้าต้องการเฉพาะวิเคราะห์ข้อมูล ไม่ต้องเปิดเครื่อง GC และ gas ให้

double click ที่ shortcut Instrument 1 Offline



① click ที่รูปเปิดสมุด จะได้หน้าต่าง Instrument 1 (online)








2. วิธีสร้าง Method

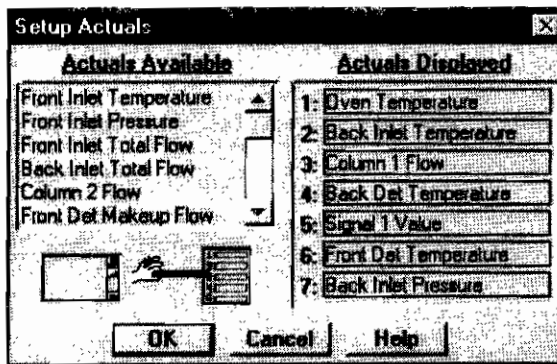
📖 ที่หน้าต่าง Instrument 1 (online) เลือก method and run control โฉงให้ stop down list  (หรือไปที่ view เลือก method and run control) และ Full screen

📖 Diagram ต่างๆ ของหน้าต่าง Instrument 1 Online สามารถตั้งค่าพารามิเตอร์ได้เช่น ไปให้ไปที่ view แล้ว ✓ หน้า menu นั้นๆ คือ

-  Show Top Footer (ใส่ เลขที่ดัชนีกับ Main menu)
-  Show Status Footer (ส่วนนี้ เลขที่ menu Ready)

-  Online Signal , Signal window 1 (จอภาพสัญญาณ Online plot)
-  Sampling diagram (ส่วนที่บอก Vial และชื่อสารที่กรอกใน Sample Info...)
-  Instrument diagram (ส่วนที่แสดง icon ของ parameter ต่างๆ)
-  Command Line (แถบขารด้านล่าง)
-  Instrument Actual (หน้า 6890 status) ซึ่งหน้าต่างนี้สามารถกำหนดข้อ

มูลที่ต้องการให้แสดงโดยไปที่เมนู Instrument เลือก Setup Actual แล้วคลิกข้อมูลที่ต้องการให้แสดงทางซ้าย ลากมาไว้ทางขวา





	Actual	Setpt
Oven Temperature*	53	53
Back Inlet Temperature*	220	220
Column 1 Flow*		0.2
Back Det Temperature*	30	Off
Signal 1 Value	28.1	
Front Det Temperature*	220	220
Back Inlet Pressure*	22.51	22.51

เมื่อเปิดเครื่องแล้ว อาจพบว่าคิเทคเตอร์ให้สัญญาณที่มีค่าสูง อาจเนื่องมาจากมีมลทินติดค้างอยู่ในระบบ ดังนั้นควรไล่มลทินต่างๆ ที่มีหลงเหลืออยู่ออกไปให้หมด โดยให้ความร้อนที่ oven และคิเทคเตอร์ให้สูงสุด แต่ไม่เกินค่าที่กำหนดไว้ใน specification ของอุปกรณ์นั้นๆ ขั้นตอนนี้เรียกว่า การทำ condition เครื่อง GC ให้นานจนพอนเห็นว่าไม่มีสัญญาณรบกวน คือ base line เรียบสม่ำเสมอจึงดำเนินการทดลองต่อไป

การทำ Condition เพื่อให้ระบบได้เงื่อนไขที่พร้อมใช้งานต่อไป

ที่หน้าต่าง Instrument 1 Online ให้

เลือก icon inlet  ตั้งค่าอุณหภูมิ 250 ที่ Heater °C กด 

เลือก icon oven  ตั้งค่าอุณหภูมิ 300 ที่ set point °C กด 

(ต้องไม่เกินอุณหภูมิสูงสุดของคอลัมน์ที่กำหนดไว้)


เลือก icon detector  หรือ  ตั้งค่าอุณหภูมิ 300 ที่ Heater °C
 กด **Apply** กด **OK**

FID ไม่เกิน 400 °C

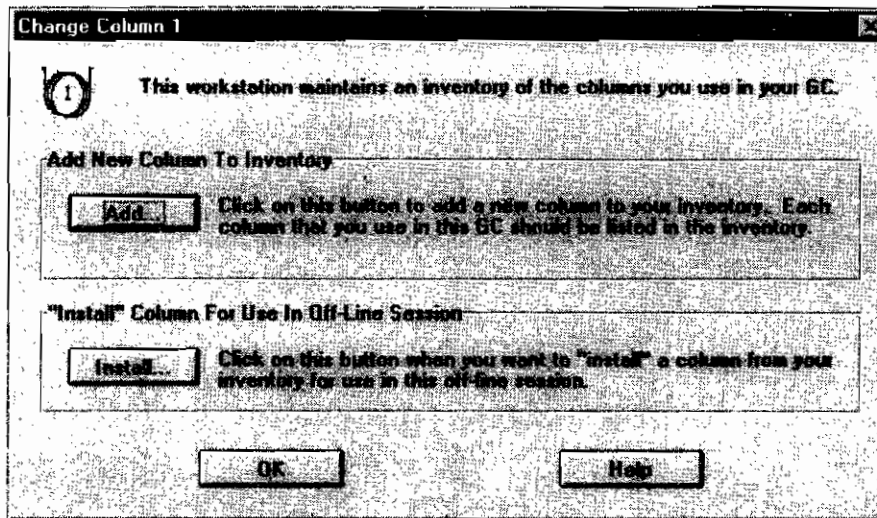
MUECD ไม่เกิน 375 °C

ให้ดูสัญญาณที่หน้าต่าง online plot จนเห็นว่า base line เรียบสม่ำเสมอและมีสัญญาณต่ำสุด

หมายเหตุ: check parameter ของ Method ทุกครั้งที่ Load มาใหม่ที่หน้าต่าง 6890 status เพื่อป้องกันการทำงานผิดพลาดเมื่อสั่ง run

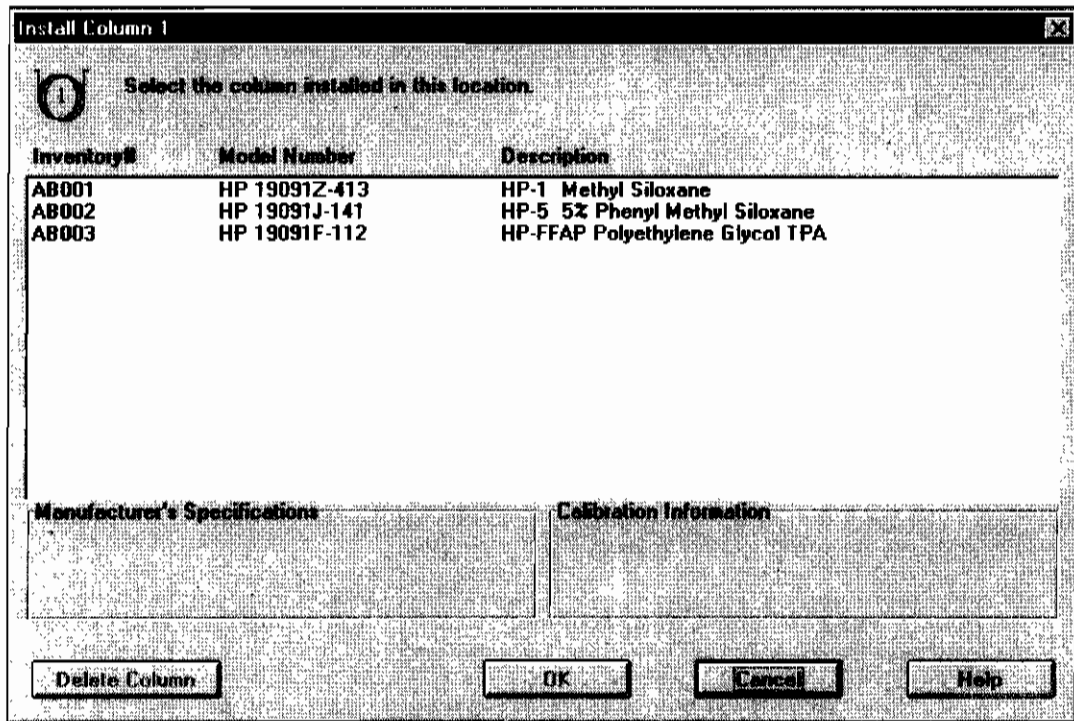
คลิกที่ปุ่มการเปลี่ยน Column ใหม่ ให้ไปที่หน้าต่าง Instrument/Edit/Column โดยคลิก icon รูป column  (หรือไปที่ Instrument เลือก Edit parameter คลิก

รูป column ) แล้วเลือก **Change...** จะได้หน้าต่าง

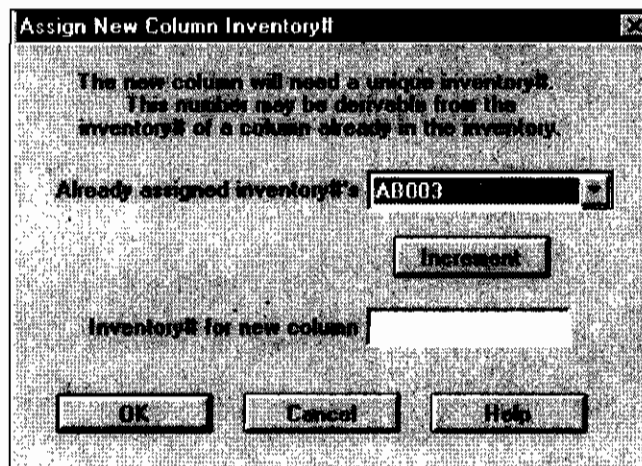


ให้คลิกที่ **Install...**

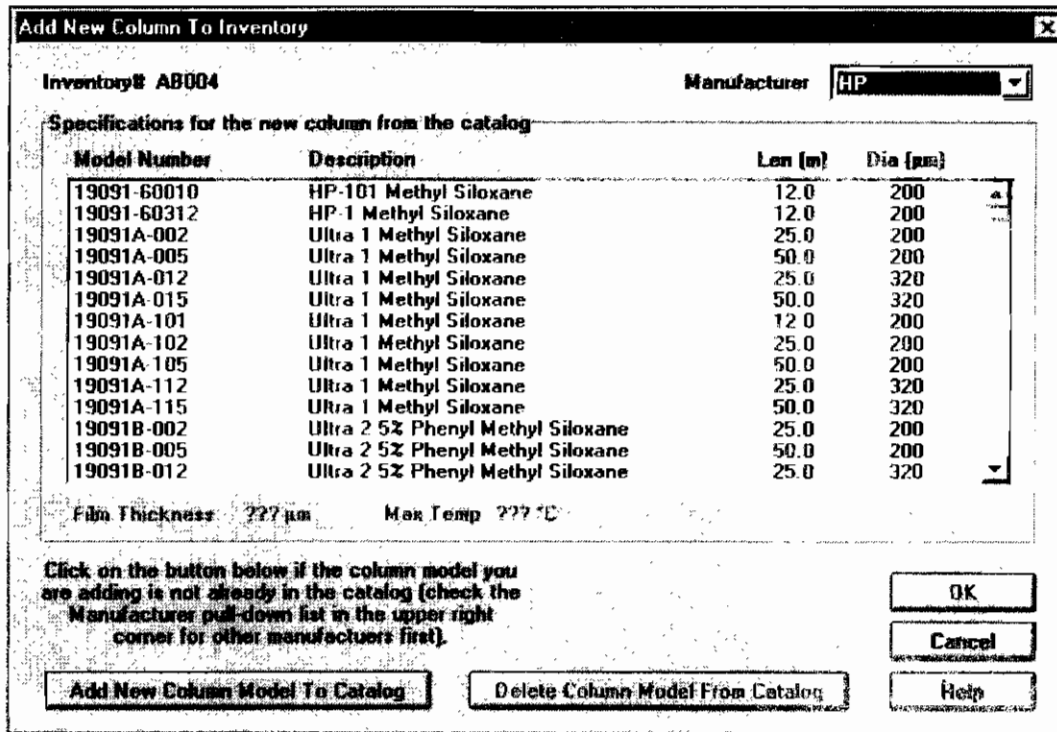
ถ้า Column ที่จะเปลี่ยนมีอยู่ในรายการแล้ว ให้เลือกขึ้นมา แล้วกด **OK**



ถ้าไม่มี กด **Cancel** แล้วตามด้วย **Add** (ที่หน้าต่าง Change Column 1) จะได้หน้าต่าง



เพิ่มหมายเลข column ต่อจากที่มีอยู่แล้ว โดยกด **Increment** เครื่องจะทำการตั้ง
ชื่อคอลัมน์ใหม่ต่อจากคอลัมน์ที่มีอยู่เดิม และกด **OK** จะปรากฏหน้าต่าง



เลือกชนิดของ column จากแคตตาล็อกของเครื่อง กด **OK** และ Install as column :

หมายเหตุ : ไม่ควรเปลี่ยน Column สลับไปมาบ่อยๆ เพราะจะทำให้ความยาว Column
สั้นลง เพราะทุกครั้งที่เราเปลี่ยนต้องมีการตัดคอลัมน์ออกเล็กน้อย ถ้าส่วน
ปลายคอลัมน์ หรือ ไม้ว้าย คั้นนั้นจึงควรมีการวางแผนการใช้งาน

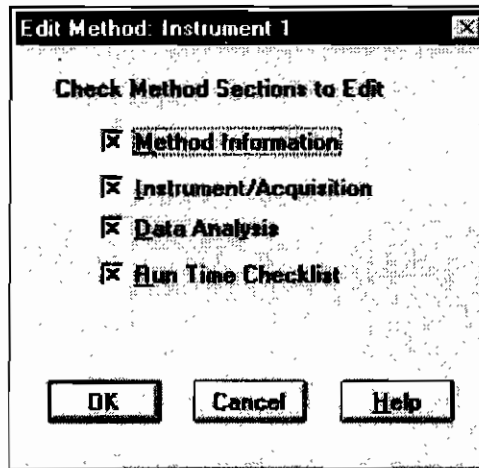
เนื่องจากคอลัมน์ที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการ C-4 437 มีอยู่ 2 ชนิดคือ HP 1, HP 5
และ HP FFAP เพื่อให้สะดวกในการติดตั้ง ค่าของคอลัมน์เข้าอยู่ในเครื่อง เกเนอเรชั่น จึงได้สร้าง
method ไว้ดังต่อไปนี้ วิธี ให้เลือกไม้ตรงกับชนิดของคอลัมน์ ดังนี้คือ

Column HP 1 เลือก Method name hp 1

Column HP 5 เลือก Method name hp 5

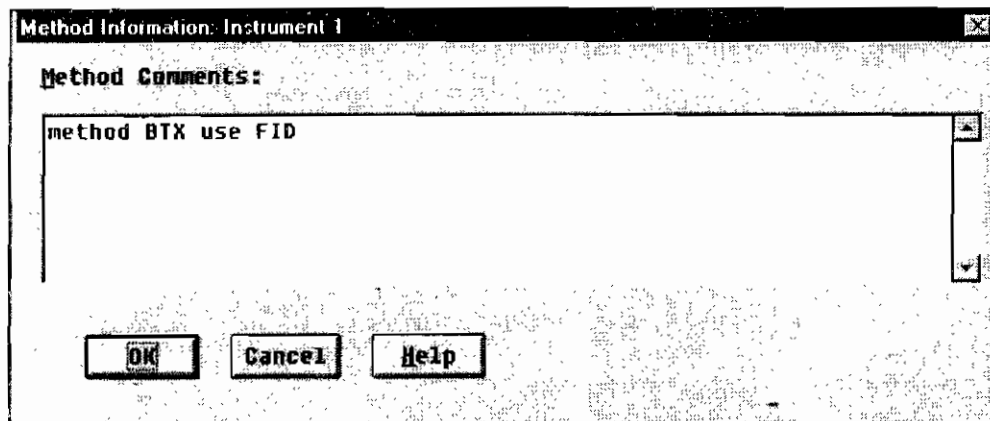
Column HP FFAP เลือก Method name hp

เมื่อต้องการสร้าง method สำหรับทำงานให้ไปที่เมนู method เลือก Load method เลือกชื่อ method โดยเลือก ▼ ให้เลือก mainhp 1 หรือ mainhp 5 หรือ mainffap ให้ตรงกับคอลัมน์ที่นำมาใช้งาน กด **OK** (ถ้าต้องการติดตั้งค่าของคอลัมน์ใหม่เอง ให้ไปที่ method เลือก new method แล้วดำเนินการแก้ค่าต่างๆ และเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ตามต้องการ) ไปที่เมนู Method เลือก Edit entire Method คลิก ทุกหัวข้อ กด **OK**



(ต่อไปเครื่องจะแสดงหน้าต่างเรียงกันที่ทะหน้าออกมาให้ตั้งค่าตัวแปร)

หน้า Method information...ใส่ Method Comments (ถ้ามี) กด **OK**





หน้า Select Injection Source เลือกชนิด Injection กด

OK



หน้า Instrument / Edit / Oven.....ตั้งค่าตัวแปรตามต้องการ โดยคลิกที่แต่ละ

icon ดังนี้



Injector...สำหรับ Auto injector ใส่ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด จำนวนครั้ง

ที่ใช้ solvent ถ้างเข้ม

☰ Valve ไม่ต้องปรับ

☰ Inlet... เลือกชนิด Inlet โดยใช้ drop down list ☑

front หมายถึง pack column

back หมายถึง capillary column

Gas เลือก He

Mode มีอยู่ 4 mode คือ

🎵 **split** ใช้เมื่อสารที่นำมาวิเคราะห์มีความเข้มข้นมาก เมื่อเลือก mode นี้ต้องใส่ split ratio เช่น 50:1 , 100:1 , 200:1 เป็นต้น ค่านี้จะสัมพันธ์กับ split flow และ Total flow หากเลือก split ratio สูงเกินไป เมื่อ run เกิด error ขึ้นว่า pressure not enough

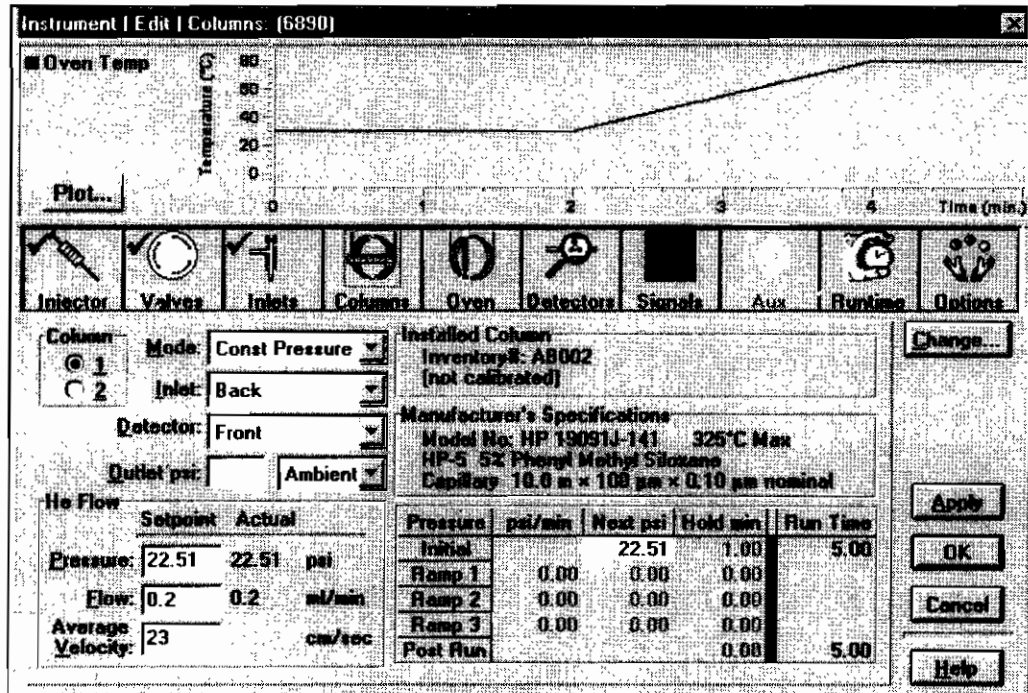
🎵 **splitless** ใช้เมื่อสารที่นำมาวิเคราะห์มีความเข้มข้นต่ำๆ และที่ purge time ควรมีการตั้งค่าน้อย 0.75 min เพราะเมื่อครบเวลานี้จะมีการ split ที่ หากไม่ตั้งค่านี้อาจทำหน้าที่ย่อย split




🎵 **pulsed split** และ **pulsed splitless** ใน mode นี้สามารถ set pressure ของ inlet ให้แตกต่างจาก column pressure ได้ ทำให้ peak sharp ขึ้น ปกติ pressure ที่ inlet จะมากกว่าที่คอลัมน์ 5 psi ขึ้นไป

Gas saver ตั้งค่า 20 ml/min เวลา 2 นาที อาจปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสม (อย่าลืมทำ! เพราะเมื่อเวลาผ่านไป 2 นาที จะมีการ save gas ให้ มิฉะนั้นจะเปลือง Gas มาก)


🔧 **Column** ตรวจสอบชนิดของ Column ว่าที่ต่อไว้กับ Inlet และ detector ในเครื่อง GC นั้นตรงกับ Software หรือไม่ตรงกัน ค่าต่างๆ ที่อยู่ใน default ของ program จะทำงานผิดพลาดได้ ถ้าไม่ตรงให้เปลี่ยนชนิดของคอลัมน์โดย กด **Change** กด **Install** แล้วเลือกคอลัมน์ที่ต้องการ ถ้าในตอนเริ่มต้น Load method มาตรงกับชนิดของคอลัมน์แล้ว ไม่ต้องเลือกชนิดของคอลัมน์ใหม่

🔧 **Column** เลือก column 1 และ เลือก mode ของ carrier flow เลือก constant pressure บางการทดลองที่มีการเลือก constant flow ต้องระวัง pressure อาจมีการ drop ต้องมีการปรับ pressure ที่ถึงแก๊สด้วย สังเกตด้านขวาจะบอกรายละเอียดของ column ว่า เป็นชนิดใด และอุณหภูมิสูงสุดสำหรับ Column ชนิดนี้



-  Inlet เลือก Back
-  Detector เลือก front (เมื่อใช้ FID)
Back (เมื่อใช้ µECD)
-  Outlet psi เลือก Ambient

***Ambient (คือในสภาวะความดันบรรยากาศ ใช้กับ detector FID หรือ µECD)
 Vacuum (คือ ความดันต่ำ มีการดูดอากาศออก)
 Positive (คือ ความดันสูง มีการอัดอากาศเข้าไป)
 ซึ่งแบบ Vacuum และ Positive เหมาะสำหรับ detector แบบอื่นๆ

 He flow ตั้งค่าที่ flow ของ carrier 0.2 ml/min (ไม่ควรเกิน 2.0 ml/min แต่สามารถปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้ค่าที่ optimum ในแต่ละการทดลอง) ส่วนตัวอื่นๆ จะแปรเปลี่ยนให้เอง

หมายเหตุ : ถ้าระหว่างรอ run เครื่องไม่ยอมขึ้น ready อยู่ที่ not ready เป็นเวลานานเกินไป หรือ system error ของ peak shift ให้ลอง คลิกที่ icon รูป column ดูที่ Actual ว่า flow เท่ากับ setpoint หรือไม่ ถ้าไม่เท่าให้ เช็คว่า Supplied gas อัดพอหรือไม่ หรือมีการ leak ที่ส่วนใด เช่น septum leak เนื่องมาจากการใช้งานนาน โดยเฉพาะเมื่อ ใช้ระบบฉีดแบบ manual จะทำให้ septum leak เร็วขึ้น ซึ่งจะเกิด error ว่า back inlet pressure shutdown มักจะเกิดขึ้นที่ cool down ที่อุณหภูมิต่ำ หากมีการ leak ให้ ไปที่หน้าคั้ง Inlets คลิก ที่ pressure ออก กด Apply แล้วคลิก เข้าไปใหม่ Apply สังเกต pressure จะเพิ่มขึ้น หลังจากปิดเครื่อง จึงนำตารางเปลี่ยน septum ใหม่

๘. Oven... ตั้งค่าอุณหภูมิของ oven ที่จะใช้งาน

ค่าตัวเลข เป็นได้จนกว่าจะได้ option จากนั้นกด

(Cryogenic คือการใช้ gas CO₂ หรือ N₂ มาลงเข้าไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว)

Oven

On Setpoint °C: 30 Actual °C:


Oven Ramp	°C/min	Heat °C	Hold min	Stop Time
Initial		30	2.00	2.00
Ramp 1	1.00	40	0.00	5.00
Ramp 2	0.00	5	0.00	
Ramp 3	0.20	4	0.00	
Ramp 4	0.20	0	0.00	
Ramp 5	0.00	0	0.00	
Ramp 6	0.00	0	0.00	
Post Run		0	0.00	5.00

Oven Configuration

Maximum °C: 325
Equilibration rate: 2.00

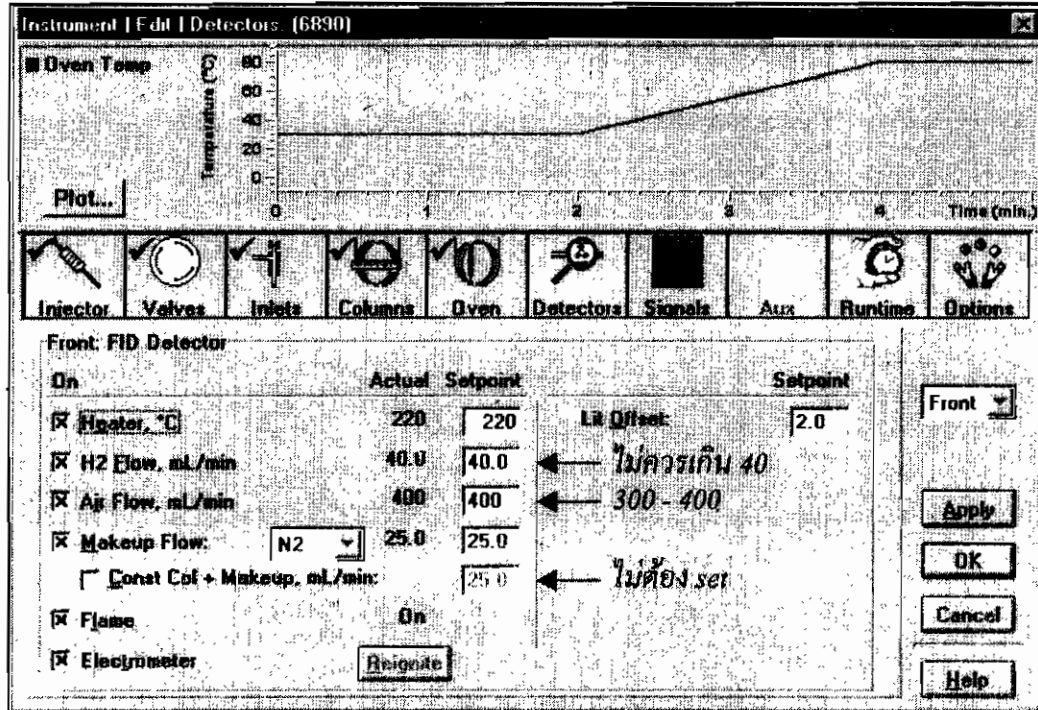
Oven Configuration


Cryo On
 Quick Cooling On
10 °C Ambient
 Tissue Detection On
120 min
 Fault Detection On


 **Detector...**เลือกชนิด detector และตั้งค่าตัวแปรต่างๆ


Front เมื่อ detector เป็น FID

back เมื่อ detector เป็น μ ECD



 เมื่อเริ่มจุด detector ให้เอา ที่ flame ออก ซึ่ง ที่ Air และ H_2 ก็จะหายไปด้วย กด **Apply**

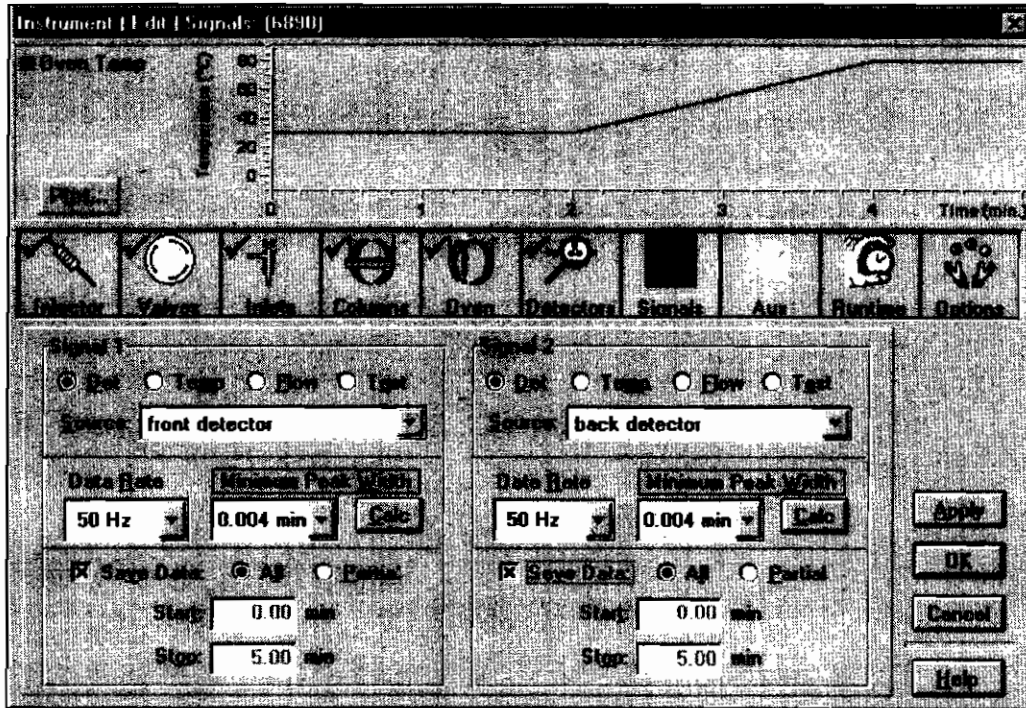
 รอ...เมื่ออุณหภูมิที่ Actual สูงแล้วคลิก ที่ flame **Apply**
 รอสักพัก Detector จะติดก็จะมีเสียงดังขึ้นที่เครื่อง GC และที่ flame จะเป็น On เมื่อใช้ปลายประแจ
 ไปอังที่ปากทางออกของ detector จะเห็นไอน้ำเกิดขึ้น


 **Signal...**เลือกการรับสัญญาณ เช่น

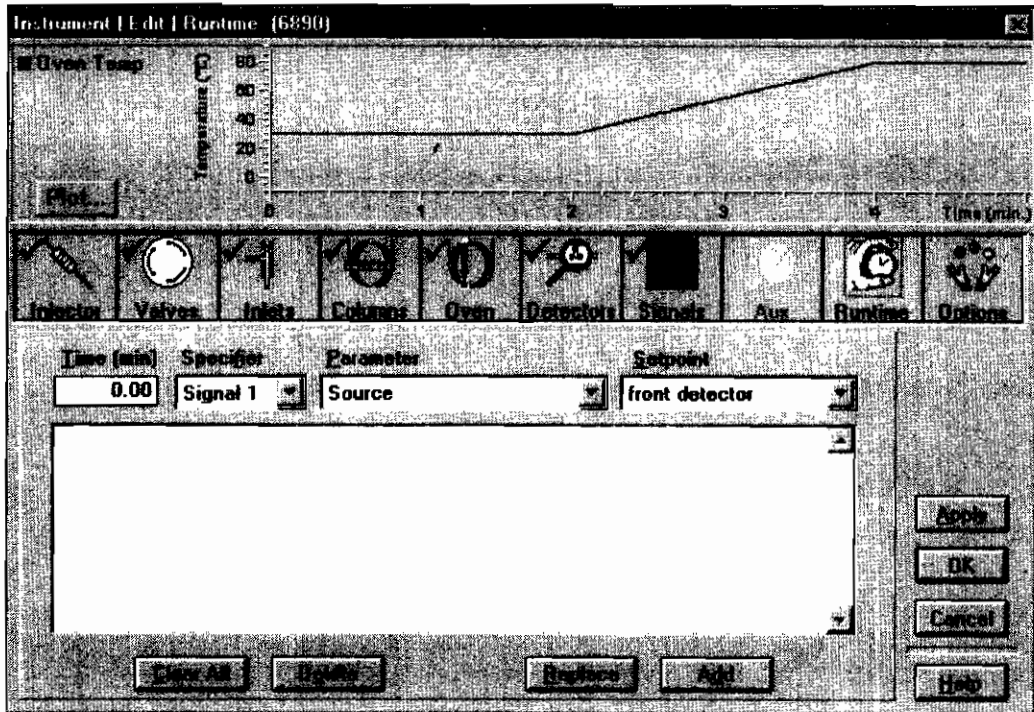
Signal 1...front detector (FID)

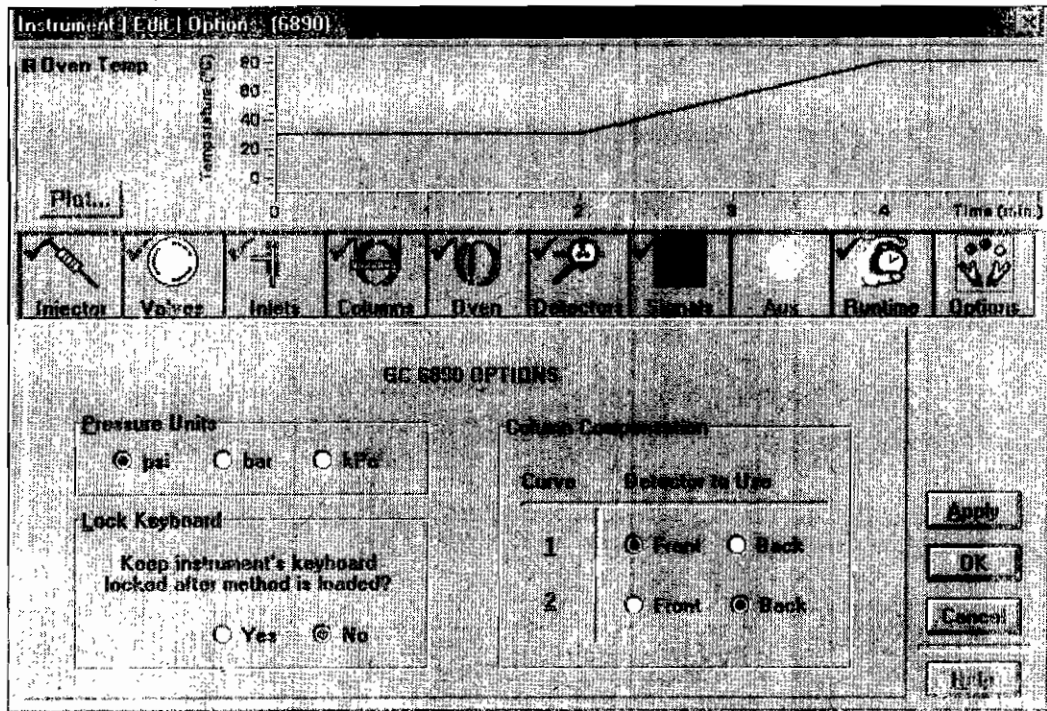
Signal 2...back detector (μ ECD)

ถ้าใช้ FID กำหนดให้เลือกใช้เฉพาะ signal 1 เท่านั้น (signal 2 ไม่ต้องทำอะไร) และควรเลือกที่ 50 Hz จะให้สัญญาณชัดเจนกว่า 20 Hz

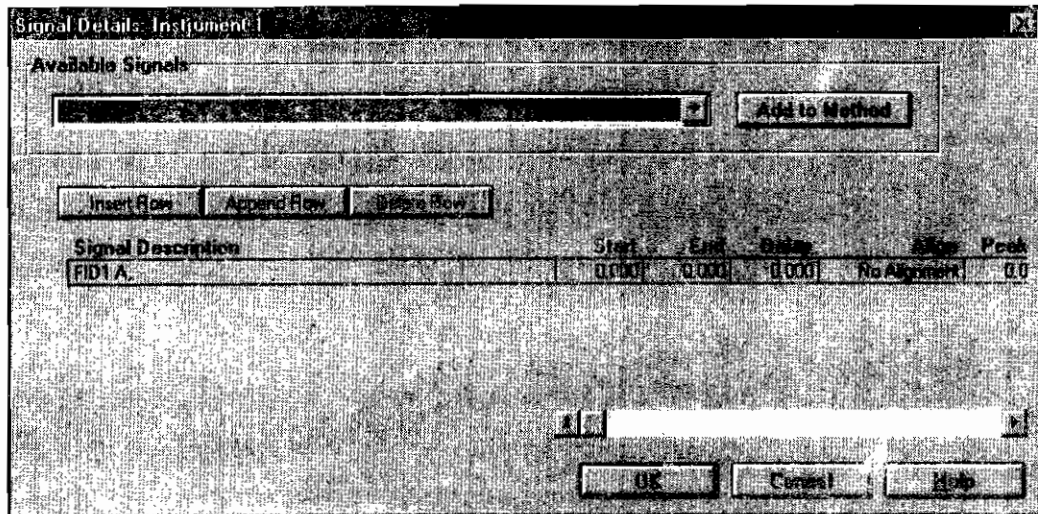



 Runtime และ Options ไม่ต้องตั้งค่าใดๆ

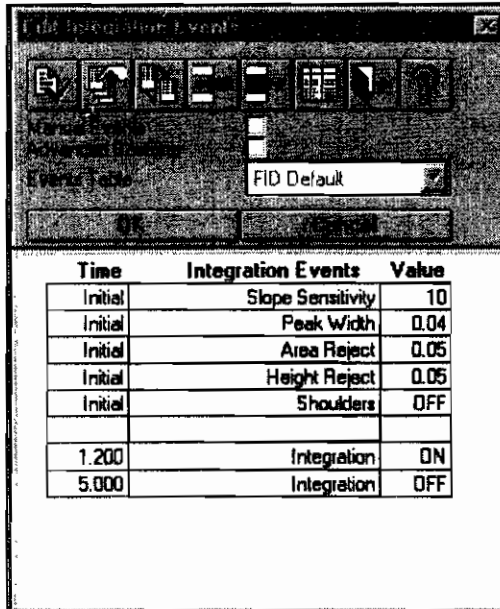




กด **Apply** และ กด **OK** จะได้นี้ต่าง Signal detail..... กด **OK**
 (ไม่ต้องตั้งค่าตัวแปร)




☰ หน้า **Edit Integration Events** ตั้งค่าตัวแปรสำหรับการ Integrate peak ในโครมาโทแกรม เช่น Slope Sensitivity , Area Reject ... (ปกติจะตั้งหลังจากที่ได้ฉีดสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างเสร็จแล้ว) กด 



☰ หน้า **Specify Report** เลือกตัวแปรเกี่ยวกับการพิมพ์ เช่น พิมพ์ออก printer กด 

☰ หน้า **Calibration Setting** กด 

☰ หน้า **Calibration Table** และ **Calibration Curve** กด 

☰ หน้า **Run Time Checklist** กด 

☰ Save method ที่สร้างขึ้น โดยไปที่เมนู Method เลือก Save Method As..... ใส่ชื่อ Method ที่ต้องการใช้ เช่น การตั้งเป็น วัน , เดือน , ปี




หมายเหตุ : การ save method มี 2 แบบคือ

1) save method (ทับชื่อเดิม)

2) save method as (ใส่ชื่อใหม่)

!! ขั้นตอนนี้ควรใช้ save as เพียงอย่างเดียว !!

3. การเรียก Method ที่มีอยู่แล้วมาใช้งาน

- ☆ ที่หน้า Method and Run Control
- ☆ ไปที่เมนู Method เลือก Load Method เลือกชื่อ Method ที่ต้องการ กด  แล้วดำเนินการนิตสารตัวอย่างต่อไป
- ☆ หากต้องการแก้ไข parameter ในการทดลอง ให้ไปที่เมนู Instrument เลือก Edit Parameter คลิกที่ icon ต่างๆ เพื่อแก้ไขค่า parameter จากนั้น  และ 
- ☆ ไปที่เมนู File เลือก Save เมื่อต้องการ Save ทับ Method เดิม หรือ Save As...เมื่อต้องการตั้งชื่อ ใหม่

4. การนิตสารตัวอย่าง

การนิตสารตัวอย่างมี 2 แบบ คือ Run Method และ Run Sequence ซึ่ง

Run Method มี 2 แบบ คือ

การ run โดยใช้มือฉีด และ

การ run โดยใช้เครื่อง Auto Injector


จะเลือกแบบใดอาจเลือกตั้งแต่ตอนที่สร้าง method ที่หน้า Select Injection Source หรือเข้าไปเลือกทีหลังโดยไปที่เมนู Instrument เลือก Select Injection Source เลือกแบบการนิตสารตัวอย่างที่ต้องการ และเลือก select injection location เป็น back

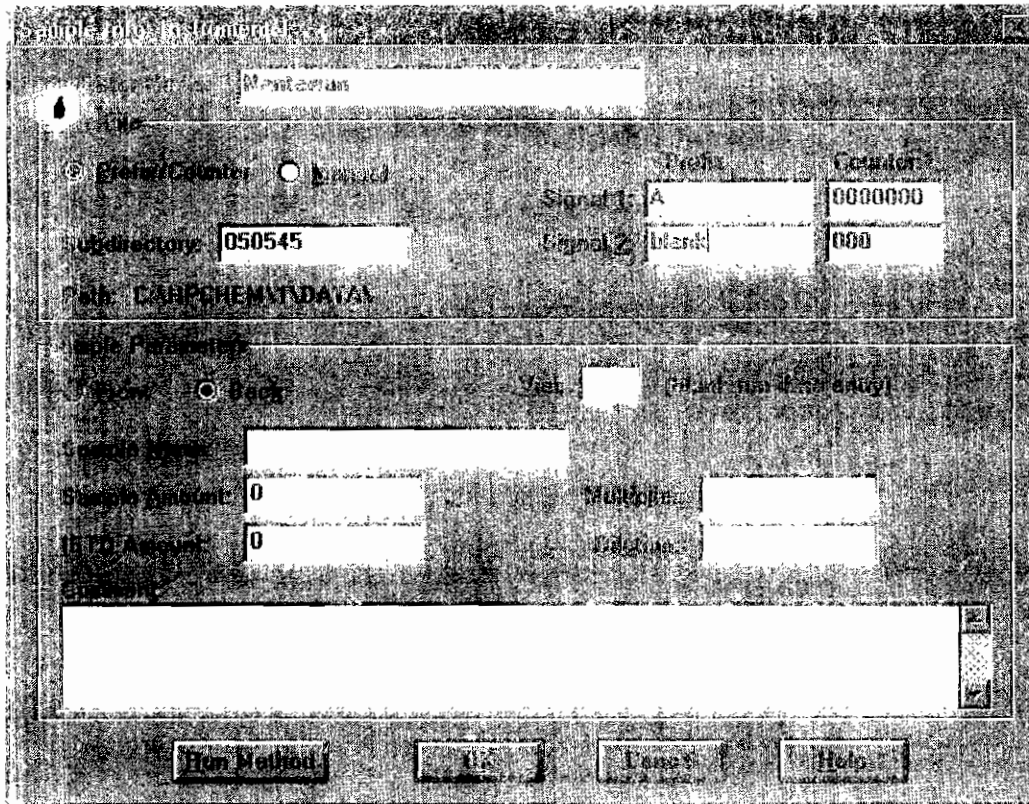
การ run โดยใช้มือฉีด





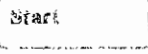
(Injection Source ต้องเลือกแบบ manual)

⊕ ไปที่เมนู Run Control เลือก Sample Info...



⊕ ใส่ชื่อ Operator Name , Subdirectory , ชนิด data file

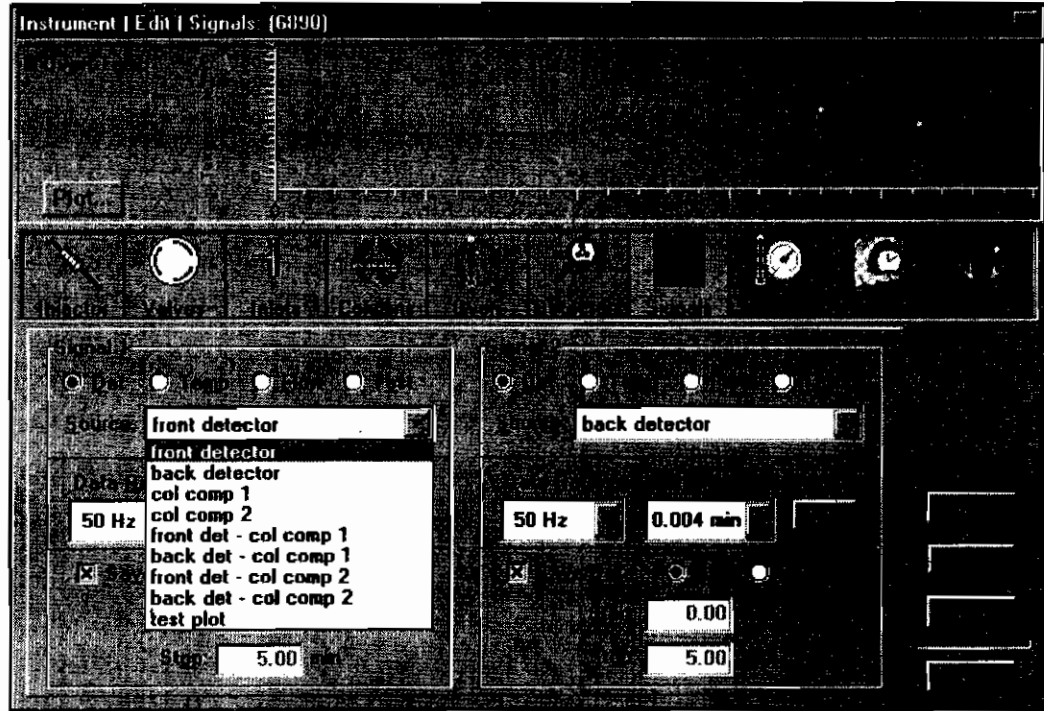
๑. ถ้าฟังก์ชัน unblank ไม่ work ที่ช่อง Signal ถ้าใช้ front detector (FD) ให้ใส่ช่อง signal 1 ให้ใช้ back detector (quCD) ให้ใส่ช่อง Signal 2 กด 




๑. รอจนหน้าต่าง Instrument: 1 Online Mode ready
 ๑. กด  ที่เครื่อง GC รอจน ready
 ๑. กด  โดยไม่ต้องกดค้างตัวอย่าง
 หรือ กด  ที่เครื่อง GC เลื่อนลูกศร  ลงมาที่ Start comp
 กด  โดยไม่ต้องกดค้างเลย


ควรมีการ comp column หรือ run Temperature program โดยไม่ต้องค้างตัวอย่างไว้ condition เดียวกันที่จะเริ่ม run สามารถลดเวลาการรอกวนของ solvent และพื้นที่ก่อนมี blank ทำให้ baseline ของ โครมาโทแกรมที่ต้องการไม่สูงที่จุดแรกของ peak การทำ Temperature program เรียกว่าการทำ column compensation เครื่องจะ memory sample sample ให้



เมื่อ run เสร็จ ระหว่างที่เครื่อง cool down คลิก icon รูป  เปลี่ยนจาก front detector เป็น front detector-col comp 1 กด 





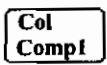





⊕ เมื่อทำการ run blank เสร็จ ให้ไปที่หน้าต่าง Sample info...
แก้ไขชื่อ data file จาก blank เป็น level 1 และใส่ชื่อ Sample Name

⊕ รอจนเครื่อง cool down และ ready จึงกด  ที่เครื่อง
GC รอจน ready อีกครั้ง



⊕ กดสารเข้าทาง Inlet พร้อมกดปุ่ม  ที่เครื่อง GC
ให้ทำพร้อมๆ กัน

หมายเหตุ : ถ้าไม่ต้องการ compensate ค่า blank เมื่อเครื่อง ready ให้กด 
ที่เครื่อง GC รอจนเครื่อง ready อีกครั้ง จึงกดสารพร้อมกด 
ที่เครื่อง GC

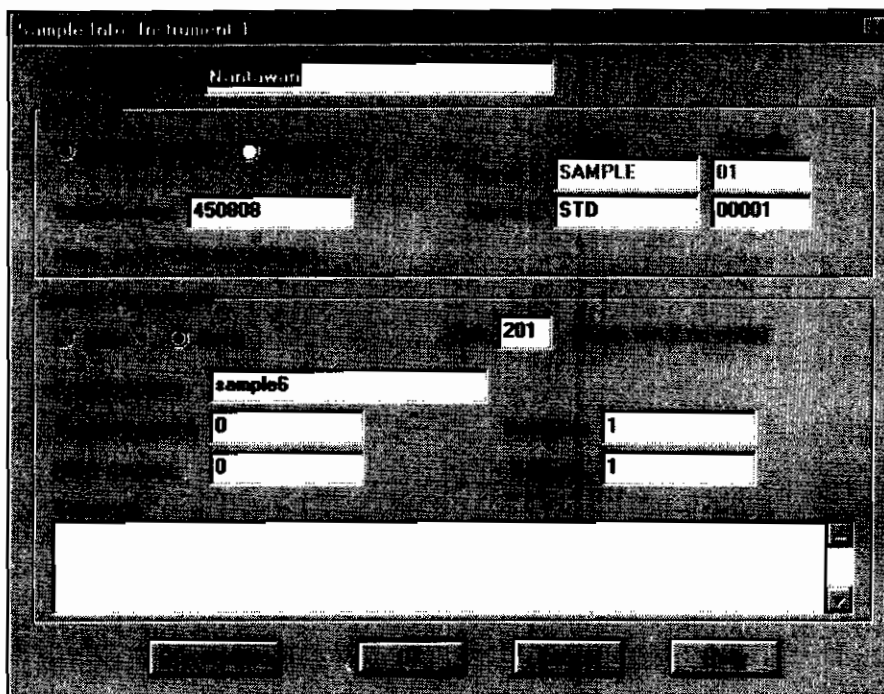
☆ การ run โดยใช้ Auto Injector

- vial ขวดเดียว 
- ⊕ ไปที่เมนู Run Control เลือก Run Method หรือกดที่ icon รูป
 - ⊕ ไปที่เมนู Run Control เลือก Sample Info...
 - ⊕ ใส่ชื่อ Operator name , Subdirectory ชนิด data file
 - ⊕ ที่ datafile เลือก Prefix/counter
 - ⊕ ถ้าทำ Column compensation ที่ data file ให้ใส่ blank ที่ช่อง
- Signal กด 
- ⊕ รอจนหน้าต่าง Instrument ! Online แสดง Ready
 - ⊕ กด  ที่เครื่อง GC เลื่อนลูกศร  ลงมาที่ Start comp
- run กด  โดยไม่ติดสารละลาย
- เมื่อ run เสร็จ ระหว่างที่เครื่อง cool down คลิก icon รูป 
- เปลี่ยนจาก front detector เป็น front detector-col comp 1 กด 
- ⊕ ไปที่ data File แก่จาก blank เป็น Level I และ vial no. ใส่
- 201 กด 

*** (no. เริ่มที่ 201 ระวังการใส่ vial no. ใส่ผิดไม่ได้ ถ้าต้องการฉีดขวดที่ 3 ให้ใส่ vial no. 203)

- ⊕ เมื่อ Ready ไปที่เมนู Run Control เลือก Run method หรือคลิกที่ icon รูปขวดเดียว  แล้วคลิก icon 

*** ในการ run สารละลายมาตรฐาน ถ้าเลือก Data File แบบ Manual จะต้องแก้ไขชื่อ Prefix และ Counter ใน Sample Info... ทุกครั้ง เพราะจะได้มีทุก Signal มิฉะนั้นจะถูก run ทับจะดึง Signal ไปทำ Calibration Curve ไม่ได้ ***



☞ Run Sequence เป็นการ run สารที่มากกว่า 1 vial ขึ้นไป โดยใช้ Auto Injector

⊕ ไปที่เมนู Sequence เลือก Sequence Parameters ใส่ชื่อ Operator name , ชนิด data file , Subdirectory ใส่ให้ตรงกับ Subdirectory ที่ได้ run ในวันนี้ กด **OK**

⊕ ไปที่เมนู Sequence เลือก Sequence table ใส่ Vial ที่จะฉีด , Sample name , Method ที่จะใช้ run และจำนวน Injection ต่อ vial กด **OK**

Vial	Concentration	Method	Injection Count	Analysis Type
202	L2 4%	010544	1 Calibration	2 Average
203	L3 6%	010544	1 Calibration	3 Average
204	L4 8%	010544	1 Calibration	4 Average
205	mixalc	010544	1 Sample	

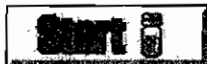
⊕ ไปที่เมนู Run Control เลือก Sample Info แก้ parameter ต่างๆ ให้ตรงกับ Sequence Parameters ถ้าไม่ตรงเวลาเรียกข้อมูลมาอาจสับสน กด **OK**

⊕ ไปที่เมนู File เลือก Save as เลือก sequence โดยใช้ชื่อเดียวกับ Method

⊕ ตรวจสอบว่าการเรียง sequence ถูกต้องก่อนกดโดยดูที่หน้าจอของ run control จะมีรูปของ Sequence




⊕ ไปที่เมนู Run Control เลือก Run Sequence หรือ คลิกที่ icon รูปหลายขวด แล้วคลิก icon **Start**



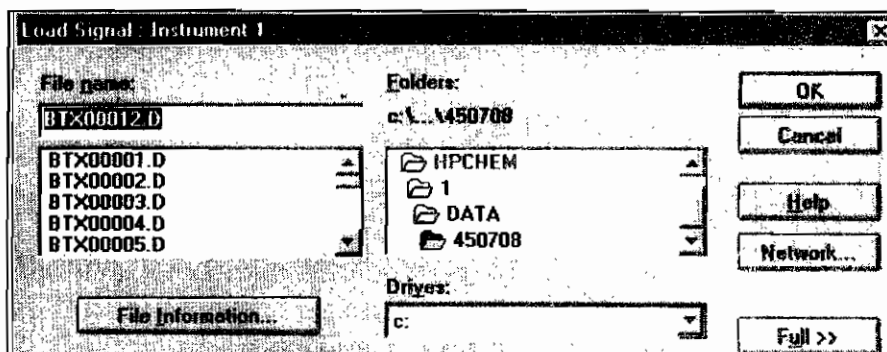
5. Data Analysis


☆ การเรียก data ที่เก็บขุ่ออกมาใช้งาน นิยมทำในหน้า Instrument 1 Offline เพราะถ้าขณะทำการ run ที่ Instrument 1 Online แล้วเลือกทำ Data Analysis เมื่อ Load Method อื่นมาอ่านข้อมูล จะทำให้การ run สารในหน้า Method and run control เป็นการ run ด้วย method อื่น หรือถ้าเรียก method เดียวกันมาใช้ในการอ่านข้อมูล อาจทำให้เครื่อง Hange ได้

☆ ให้ minimize  หน้าต่าง Instrument 1 Online ลงแล้ว double click ที่ Instrument 1 Offline


☆ ไปที่เมนู view เลือก Data Analysis

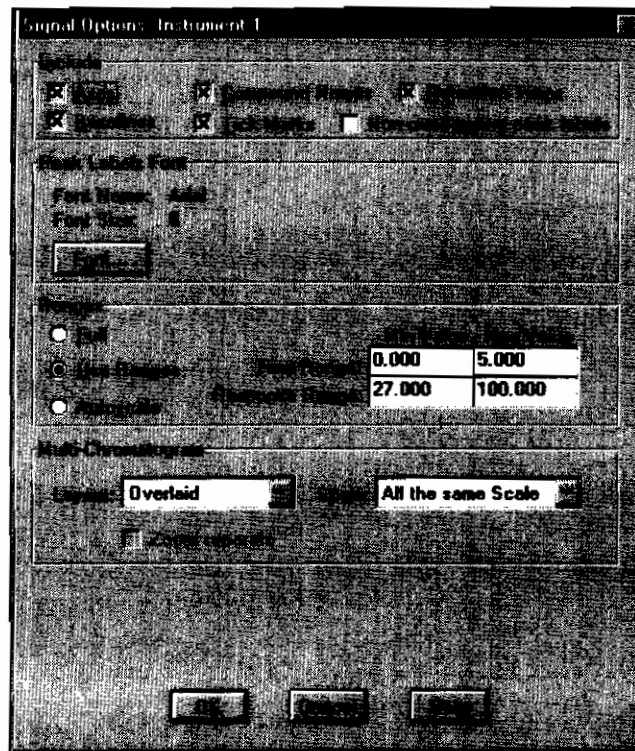
☆ ไปที่เมนู File เลือก Load signal



- ☆ เลือก data จาก folders ที่เก็บข้อมูล
- ☆ double click ที่ File name ที่ต้องการ หรือเลือก File name แล้วกด 

6. การแก้ไข Scale

- ☆ ที่หน้า Data Analysis
- ☆ ไปที่เมนู Graphics เลือก Signal option
- ☆ ตั้งค่าตัวแปรตรงช่อง Ranges (Full , Use Ranges , Autoscale)
- ☆ กด 



หมายเหตุ : ที่ Layout ถ้าเลือก Separated จะทำให้เวลา Overlay peak แล้ว Chromatogram จะไม่ซ้อนทับกัน จะต้องกลับมาเลือกให้เป็น Overlaid เมื่อต้องการดูการซ้อนทับกันของพีค และที่ Ranges ถ้าเลือกเป็น Autoscale

เครื่องจะทำการปรับความเหมาะสมของแกนให้อัตโนมัติ นิยมเลือก Autoscale ก่อน หลังจากนั้นจึงเลือกตามที่ต้องการ เมื่อพิจารณาแล้วที่ได้ จาก Autoscale

7. Integration

เมื่อ run chromatogram เสร็จ ด้วยเงื่อนไขที่ถูกต้อง (โครมาโทแกรมที่ได้ต้องครบทุกพีค และชัดเจน) ให้ทำการ Integrate เพื่อกำหนดพีคจากสัญญาณที่ได้และคำนวณขนาดพีคที่สัมพันธ์ กับปริมาณของตัวอย่างโดยไป Load signal ที่ได้ใน "Offline" แล้วดำเนินการดังต่อไปนี้

✿ ที่หน้า Data Analysis ไปที่เมนู Integration เลือก Integration Events ตั้งค่า ตัวแปรตามต้องการ เช่น


Slope Sensitivity.....ความชัน

Peak Width.....ความกว้างของ peak ที่ความสูงครึ่งหนึ่ง


Area Reject.....พื้นที่ peak ที่ให้เริ่ม Integrate


Height reject.....ความสูงของ peak ที่ให้เริ่ม Integrate

พีคที่ให้ค่าต่างๆ น้อยกว่าค่าที่ตั้งไว้จะไม่ถูกนำมาคำนวณ เป็นสัญญาณของพีค ปกติใน soft ware จะมีค่าต่างๆ ตั้งไว้ให้เป็น default ที่สามารถใช้ได้กับสัญญาณพีคปกติ การ integrate ด้วยค่าที่ต่างออกไปขึ้นอยู่กับความชำนาญของผู้วิเคราะห์ในการพิจารณาสัญญาณของพีค

✿ กรณีที่ไม่ต้องการ peak solvent สามารถตัดออกได้โดยคลิกที่ icon รูป Append line  2 บรรทัด แต่ละบรรทัดจะมี 3 คอลัมน์ โดยบรรทัดแรกให้เป็นเวลาที่เริ่มไม่ให้เกิดการ Integrate และบรรทัดที่สองเป็นเวลาที่เริ่ม Integrate ใหม่อีกครั้ง

คอลัมน์ 1 คือ time ให้พิมพ์เวลาที่ตัด peak ที่

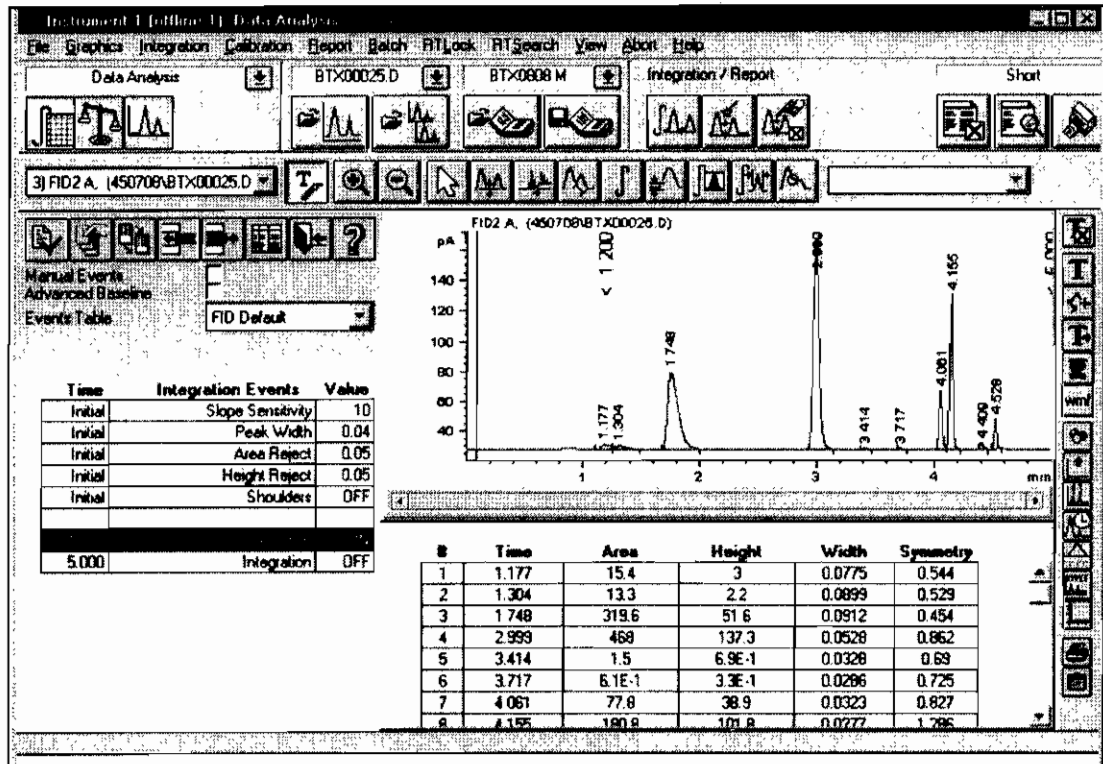
คอลัมน์ 2 คือ เลือก Integration โดยใช้ drop down list 

คอลัมน์ 3 คือ เลือก Off หรือ On โดยใช้ drop down list 

ซึ่งถ้ามีช่วงที่ต้องการตัดทิ้งอีก ก็เลือก Append line และทำแบบเดียวกัน

* ถ้าตั้งค่าสำหรับ Integration ได้เหมาะสมแล้ว ให้ Save as... โดยอาจตั้งเป็นชื่อ Method ที่คล้ายกัน แต่บอกความหมายว่าได้ integrate แล้ว

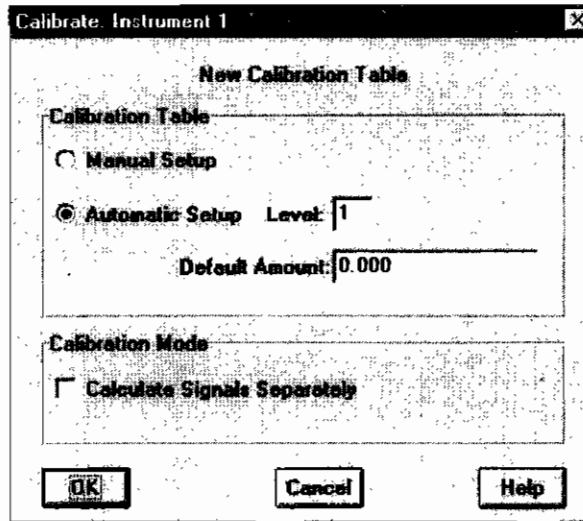
* ถ้ามีการกลับมาแก้ค่าที่ Integration Event เมื่อปิดสมุด (Exit)  จะถูกถามว่า Save Change Event Table กด  กด



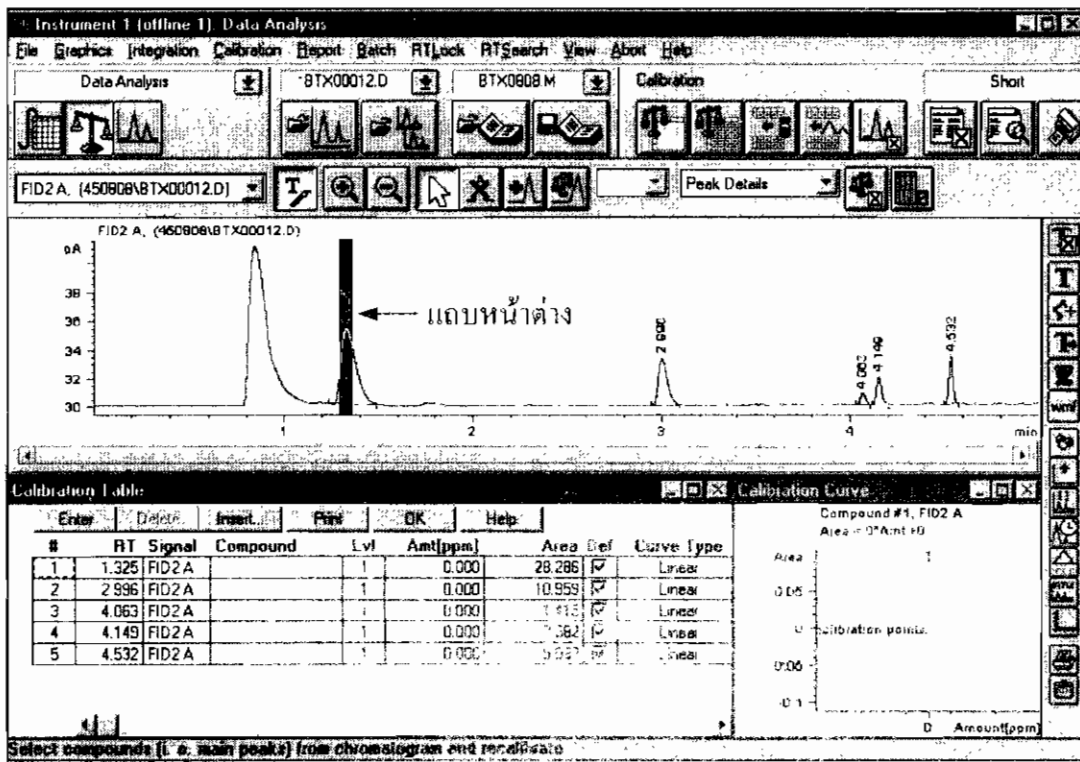
8. การทำ Single Calibration Curve แบบ ESTD

- ☒ ที่หน้าต่าง Data Analysis
- ☒ ไปที่เมนู File เลือก Load Method ที่มีการ Integrate และตัด peak solvent ออกแล้ว
- ☒ ไปที่เมนู File เลือก Load Signal เลือก file ของ Standard ที่ใช้เทียบมาตรฐาน

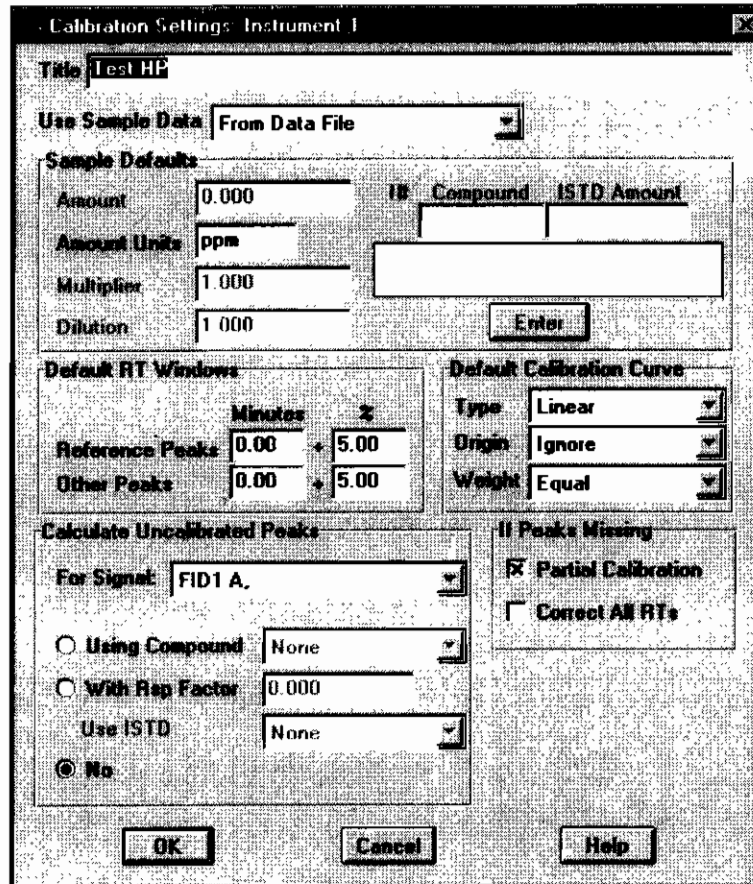
☒ ไปที่เมนู Calibration เลือก New Calibration Table จะปรากฏหน้าต่าง Calibrate กำหนด Automatic Setup Level 1 กด **OK**



☒ ใส่ข้อมูลในช่อง Compound และความเข้มข้นในช่อง Amt โดยให้ตรงกับ RT ที่ต้องการจนครบทุก peak กด **OK**



☒ หากแถบหน้าต่างที่แสดงขอบเขตของพีค Overlap กับ peak ข้างเคียง เมื่อกรอกข้อมูลจะมีหน้าจอฟ้องว่าเกิดการ Overlap ให้ลดขนาดของแถบหน้าต่าง โดยไปที่เมนู Calibration เลือก Calibration Setting



☒ ที่ Default RT Window ตรง% แก้ไขจาก 5% เป็น 2% หรือ 1% ตามความเหมาะสมจนแถบหน้าต่างไม่ Overlap กับ peak ข้างเคียง

☒ กด **OK** กลับมาที่หน้า Signal แถบหน้าต่างจะเล็กลง

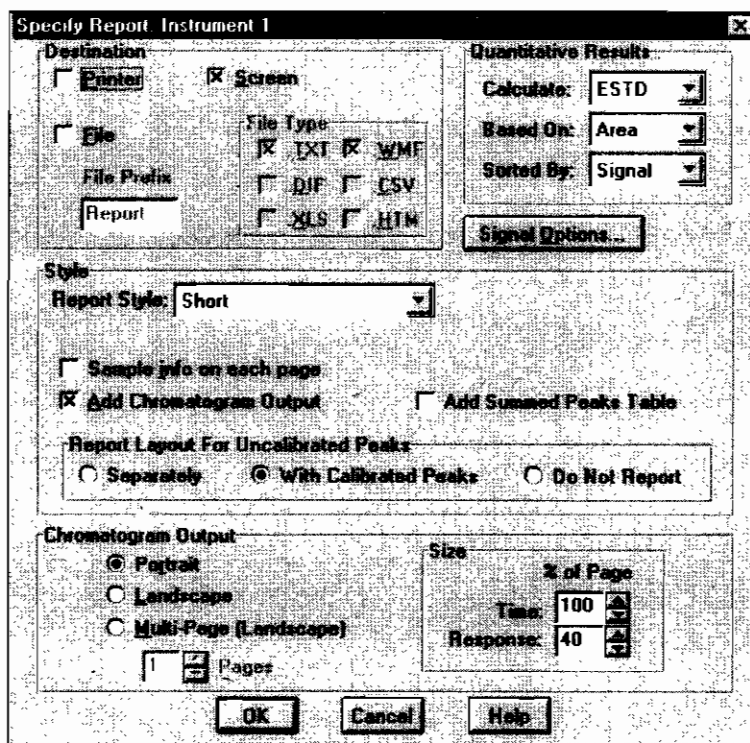
☒ ถ้ามีหน้าจอขึ้น Delete Line with Zero Amounts ให้ตอบ **Yes**

☒ ไปที่เมนู Calibration เลือก Calibration Setting ใส่หน่วยของความเข้มข้น เช่น ppm ตรง Amount Units กด **OK**


☒ ไปที่เมนู Report เลือก Specify Report ที่ช่อง Calculate เลือก ESTD กด

OK

CM 437



☒ ถ้าต้องการเปลี่ยนขนาด Scale ให้คลิกที่ **Signal Options...** (ซึ่งหน้าต่างนี้อาจเข้าได้โดยไปที่ Graphics เลือก Signal Options เช่นเดียวกับข้อ 6 การแก้ไข scale) ปรับขนาด Scale ตามต้องการ

☒ ไปที่เมนู File เลือก Save เลือก Method กด save หรือไปกดที่  จะเป็นการ save ทับชื่อเดิม (ให้จำไว้ว่า method นี้เป็น method ที่ได้ทำ Calibration Curve แล้ว)

☒ หากต้องการ Print ให้ไปที่เมนู File เลือก print เลือก Calibration + Curve

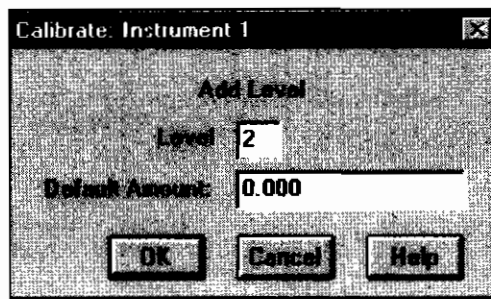
9. การทำ Multicalibration Curve แบบ ESTD

☒ ไปที่เมนู File เลือก Load method ที่มีการ integrate และตัด peak solvent ออกแล้ว

☒ ไปที่เมนู File เลือก Load Signal เลือก standard ที่ทราบความเข้มข้นตัวที่ 1

☒ ไปที่ Calibration เลือก New Calibration Table

- ⊗ Automatic Setup Level 1 กด
- ⊗ ใส่ชื่อสารในช่อง Compound และความเข้มข้นในช่อง Amt ให้ตรงกับ RT ที่ต้องการจนครบทุก standard peak กด ถ้า standard peak ใดใช้เป็น Ref หรือ Internal standard ให้เลือก yes ตรง peak นั้นๆ
- ⊗ ถ้าจอขึ้น Delete Line with Zero Amounts ให้ตอบ
- ⊗ ไปที่เมนู File เลือก Load Signal เลือก standard ตัวที่ 2 (มีความเข้มข้นสูงกว่าตัวที่ 1)
- ⊗ ไปที่เมนู Calibration เลือก Add Level พิมพ์ 2 กด



- ⊗ ใส่ความเข้มข้นให้ตรงกับ Compound และ Level กด
- ⊗ ไปที่เมนู File เลือก Load Signal เลือก standard ตัวที่ 3
- ⊗ ไปที่ Calibration เลือก Add Level พิมพ์ 3 กด
- ⊗ ใส่ความเข้มข้นให้ตรงกับ Compound และ Level กด
- ⊗ ทำซ้ำจนครบทุก standard
- ⊗ ไปที่เมนู Calibration เลือก Calibration Setting
- ⊗ ใส่หน่วยของความเข้มข้น เช่น ppm ตรง Amount Units กด
- ⊗ ไปที่เมนู Report เลือก Specify Report ตรงช่อง Calculate เลือก ESTD กด
- ⊗ ไปที่เมนู File เลือก Save เลือก Method
- ⊗ ไปที่เมนู File เลือก Print เลือก Calib Table + Curve


10. เมื่อต้องการวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่าง


ให้ Load method ที่ทำการ integrate และสร้าง calibration curve แล้วขึ้นมา run chromatogram ของสารตัวอย่าง แล้วรายงานผลได้ดังนี้

- ☑ ไปที่หน้า Data analysis เลือก file สารตัวอย่าง
- ☑ ไปที่เมนู Report เลือก print report จะได้ report ที่รายงานปริมาณสารตัวอย่าง

11. การ Overlaid Chromatogram

★ ไปที่เมนู view เลือก full menu (ถ้าคำสั่งอยู่ที่ short menu จะทำงานขั้นตอนนี้ไม่ได้)

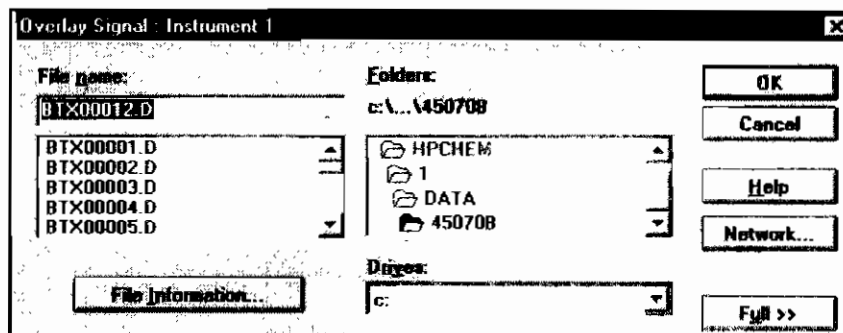
★ ไปที่เมนู File เลือก Load Signal หรือคลิก icon  เลือก data ที่ต้องการ กด

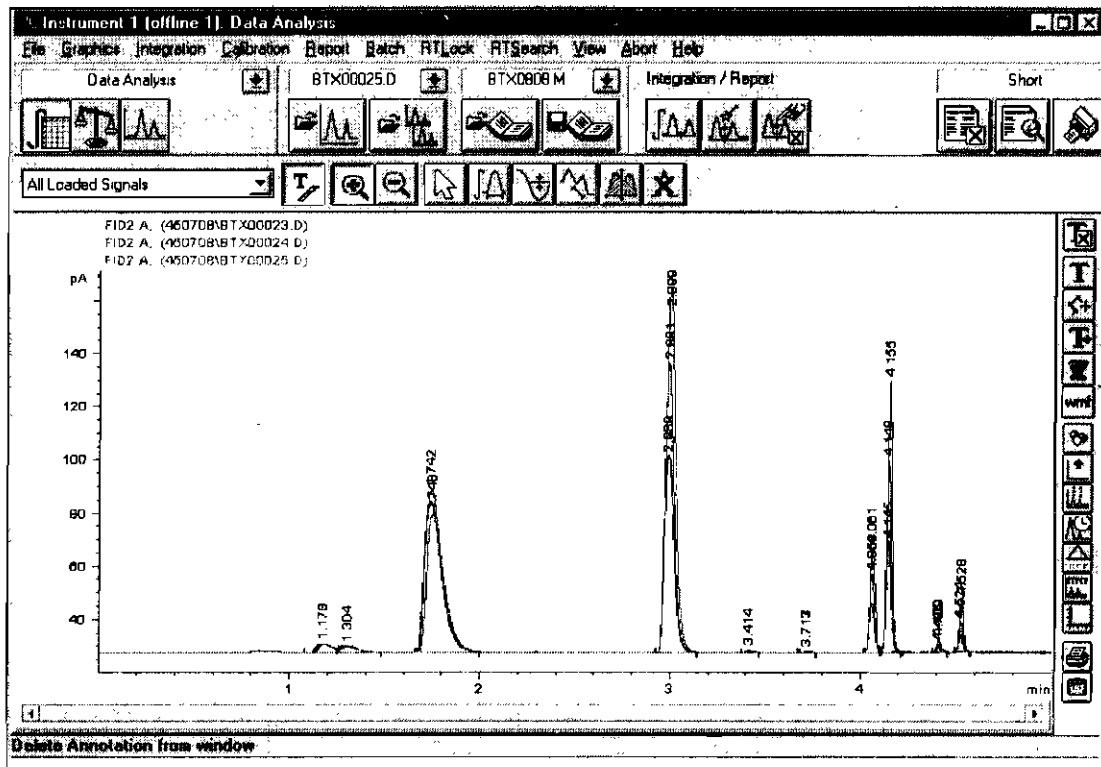
★ ไปที่เมนู File เลือก Overlay Signal หรือคลิก icon  เลือก data ที่ต้องการ กด

★ การ overlay มี 2 แบบ คือ separate และ overlaid เลือกแบบโดยไปที่เมนู Graphic เลือก Signal Options..

★ ดูตรงส่วน Layout เลือกที่ต้องการ กด

★ การ Overlay ทำได้ครั้งละหลาย data file





12. การปิดเครื่อง GC

✎ ต้องสร้าง method สำหรับ cool down ระบบและเครื่อง ให้อุณหภูมิที่ Inlet และ Detector ลดลงเหลือ 40°C จึงจะปิดเครื่องได้ method ที่สร้างไว้จะใช้ได้กับคอลัมน์ชนิดหนึ่ง ๆ เวลาเลือก method ต้องเลือกให้ถูกต้อง



✎ ไปที่เมนู File เลือก Load method เลือก method ให้ถูกต้อง เช่น สำหรับเครื่อง GC ที่ใช้อยู่นี้ ให้เลือก method ตามชนิดของคอลัมน์ ดังนี้

- | | |
|----------------|---------------------------|
| Column HP 1 | เลือก method cool HP 1 |
| Column HP 5 | เลือก method cool HP 5 |
| Column HP FFAP | เลือก method cool HP ffap |

หรือใช้วิธีปรับอุณหภูมิของ inlet, oven และ detector ให้เหลือ 40°C ที่หน้าต่าง Instrument 1 online หน้า Method & Run Control

คลิกที่ icon inlet  แล้วปรับอุณหภูมิที่ set point ของ Heater °C เป็น 40 กด

คลิกที่ icon Oven  แล้วปรับอุณหภูมิที่ set point ของ Heater °C เป็น 40 กด

คลิกที่ icon detector  หรือ  แล้วปรับอุณหภูมิที่ set point ของ Heater °C เป็น 40 กด กด จะกลับสู่หน้า Method & Run Control

รอนที่เครื่องคอมฯ ขึ้น ready และ อ่านอุณหภูมิของคอลัมน์และดีเทคเตอร์ ได้ 40 °C โดยดูที่หน้าต่าง Status ให้ปิดหน้าต่าง Instrument I Online โดยกด เมื่อมีการออกจากหน้าต่างนี้ เครื่องจะถามว่า method ได้มีการเปลี่ยนแปลง ต้องการ save หรือไม่ ต้องตอบว่า ถ้าตอบว่า จะพบว่า method ที่กำลังใช้งานจะถูกเปลี่ยนมาเป็นเงื่อนไขของการ cool down ซึ่งจะเรียกกลับมาใช้งานใหม่ไม่ได้

-  shut down เครื่องคอมฯ ปิดเครื่องคอมฯ เครื่องพิมพ์ และเครื่อง GC
-  ปิดแก๊สทุกถัง

หมายเหตุ

1) ในการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ ในหน้าต่าง Instrument/Edit/ สำหรับการเปลี่ยนแปลงแต่ละ icon เมื่อเปลี่ยนเสร็จแล้วต้องกด เมื่อเปลี่ยนครบหมดทุกเงื่อนไข ให้กด การ run งานจะถูกกระทำด้วยเงื่อนไขที่แก่นี้โดย method เก่าที่มีอยู่จะยังไม่ถูกเปลี่ยนแปลง เมื่อต้องการจบการทำงาน เครื่องจะถามว่าต้องการ save สิ่งที่เปลี่ยนแปลงหรือไม่ ถ้าต้องการเปลี่ยนแปลงโดยการ save ทับให้กด ถ้าไม่ต้องการเปลี่ยนแปลง method เก่าเพียงแต่ต้องการให้เครื่องทำงานด้วยเงื่อนไขที่เปลี่ยนแปลงนี้ชั่วคราว กด (ควรจำไว้ว่าในการเปลี่ยนแปลงเงื่อนไขต่างๆ ขณะ run ถ้าไม่มั่นใจว่าจะใช้เงื่อนไขที่เปลี่ยนแปลงนี้ เมื่อออกจากหน้าต่างนี้ต้องกด เสมอ เพื่อให้เงื่อนไขเก่าที่ใช้งานอยู่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลง)

2) กรณีที่ Icon ของ Inlet ขึ้นแถบสีแดง แสดงว่าโปรแกรมไม่สามารถตั้งงานได้เพราะค่าที่ตั้งที่ front inlet ไม่ถูกต้อง ให้ไปที่หน้า inlet เลือก front inlet พิมพ์ค่า flow ใหม่เป็น 1.2 กด apply แถบสีแดงจะหายไป ทำงานต่อได้ ถ้าแก้ไขแล้วยังทำไม่ได้ต้องแก้ config ที่เครื่อง GC

ทำได้โดยปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ และเครื่อง GC ก่อน แล้วเปิดเฉพาะเครื่อง GC แก่ค่า parameter ต่างๆ โดยใช้ Key broad ที่เครื่อง GC ดังนี้

1. กด
2. กด หรือ เลือกตามที่ต้องการแก้
3. กดลูกศรขึ้นลงเลือก parameter ต่างๆ ที่ต้องแก้ แล้วแก้ไขถูกต้อง กด

3) เมื่อมีการเปลี่ยนคอลัมน์ชนิดใหม่ต้องทำการสร้าง method ใหม่ไม่ควร load จาก method เก่า โดยไปที่เมนู View เลือก Method & Run control ไปที่เมนู Method เลือก New

4) กรณีที่เครื่องเกิด Power Off (สีแดง) ที่ Injector จะขึ้นแค่ manual ให้เลือก back Injector ปิดเครื่อง computer กด ที่เครื่อง GC ตรวจสอบสิ่งที่ไม่ยอมทำงานแล้วแก้ไข ทำให้ถูกต้อง เปิดเครื่อง computer ใหม่ (กรณีเกิดปัญหาอื่นๆ ก็ทำการแก้ไขด้วยวิธีการเดียวกัน)

5) กรณีไฟตก หรือ ไฟดับ

ให้รีบปิดเครื่องคอมพิวเตอร์และ GC ปิด gas

เมื่อไฟฟ้ามามีที่เครื่อง Automatic Voltage Stabilizer จะมีเสียงร้องเตือน ให้กด reset

รอประมาณ 5 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าไฟฟ้ามั่นคงจึงเปิด gas และเครื่อง GC ใหม่ได้

เปิดเครื่อง computer ใหม่

6) กรณีที่ Online plot มองไม่เห็นเส้นฐานและโครมาโทแกรม ให้ click ของ Online plot ขึ้นมา ให้เติมหน้าต่างและ click , click ช่อง Available Signals, click ให้ หรือ ขึ้นอยู่ว่ากำลังใช้งานชนิดไหนอยู่ในช่อง selected signal กด

7) ถ้า Output มีมาก มองลำบาก ให้ click , click หรือ ขึ้นอยู่ว่ากำลังใช้งานชนิดไหน, click auto y-adjust กด

8) กรณีที่ไม่ได้ run ด้วย auto Injector เป็นเวลานาน เมื่อสั่ง run syringe จะไม่ทำงาน ซึ่งเครื่องจะเตือนว่า


“The sample unit has reported an error : Back-plunger Error. Operation may not be retried , press Abort to clear message.”

ให้นำ syringe ไปทำความสะอาดด้วย acetone (ห้ามแช่ลงไปที่งั้น ให้ใช้วิธีการดึง plunger) และผึ่งให้แห้ง

9) ขณะที่เครื่องเปิดอยู่ ถ้ามีเสียงเตือนเบาๆ ที่เครื่อง GC ให้สำรวจถัง gas ว่าเปิดอยู่ และมี gas เชื่อมต่อเรียบร้อยแล้ว

10) กรณีที่ไฟที่ Injector ติดทั้ง 4 ดวง มีสาเหตุมาจาก broad ในเครื่อง Injector อ่านค่ากระแสมากกว่าปกติ ซึ่งมาจากการจ่าย Voltage มาก เครื่องจะไม่ทำงาน ให้ปิดเครื่อง GC สักครู่ แล้วเปิดเครื่องใหม่ ก็ทำงานได้ดั่งปกติ

11) ขณะที่ทำการ run สาร บางครั้งมีสัญญาณขึ้นมา sharp มาก สาเหตุอาจมาจาก 2 กรณี คือ มี hydrocarbon แคมซึบม หรือ มาจากความไม่บริสุทธิ์ของ gas คือ H₂, Air Zero และ He

12) ในขณะที่ cool down เมื่ออุณหภูมิลดค่าแล้ว ถ้ามีการ leak ที่ septum เครื่องจะรายงานว่า “back inlet pressure shutdown” ให้ click ที่ icon รูป inlet  จะพบว่า ค่า pressure และ total flow เป็น 0 ให้เอา ออก กด **Apply** แล้ว เข้าไปใหม่ และกด **Apply** อีกครั้งสังเกตว่า ค่า pressure และ total flow จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น ต้องคอยดู เพราะอาจ shutdown ได้อีก เมื่อปิดเครื่องได้แล้ว จึงทำการเปลี่ยน septum ใหม่

13) ที่ถัง gas การปรับ Regulator ควรปรับให้อยู่ในช่วง 40-60 psi ไม่ควรเกิน 80 psi

ชนิดของ Column ที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการ CM 437

1. **HP-FFAP** (Crosslinked FFAP) number 19091F-112
film thickness : 0.52 μm length 25 m
Phase ratio : 150 Column ID 0.32 mm
Serial number 60038227 Made in USA
2. **HP-1 (DB-1)** (Crosslinked Methyl siloxane) number 19091z-413
film thickness : 0.25 μm length 30 m
Phase ratio : 320 Column ID 0.32 mm
Serial number 59394227 Made in USA
3. **HP-5 (DB-5)** (Crosslinked 5% PH ME siloxane)
number 19091j-141
film thickness : 0.10 μm length 10 m
Phase ratio : 250 Column ID 0.10 mm
Serial number 59381721 Made in USA

ปฏิบัติการทดลองทางคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative analysis)

การทดลองที่ 7.1 การเทียบมาตรฐานคอลัมน์ (Column Calibration)

เนื่องจากคอลัมน์ที่ใช้งานไปนาน ๆ โดยมีการเปลี่ยนหลอดเข้าออก ใส่ตัวใหม่สลับไปมา อยู่บ่อยๆ จะมีผลทำให้คอลัมน์สั้นลง เพราะต้องมีการตัดในการใส่ใหม่ ทำให้ค่า RT (retention time) ที่ได้จากการวิเคราะห์เปลี่ยนไป ดังนั้นจึงควรทำการทดลอง เพื่อหาค่าความยาวที่แท้จริงของคอลัมน์

วัตถุประสงค์

เพื่อหาค่าความยาวที่แน่นอนของคอลัมน์ โดยใช้คาร์เท็นซินโทรม์ของสารประกอบที่ไม่มีการหน่วงเหนี่ยว

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง GC HP 6890
2. column HP 1 (DB 1)
3. gas-tight syringe ขนาด 10 μ l
4. pentane

วิธีการทดลอง

1. บรรจุ pentane 1 ml ลงใน vial ขนาด 20 ml พร้อม clamp ฝาให้สนิท
2. อุ้มน vial ใน water bath ให้ pentane กลายเป็นไอ
3. เปิดแก๊ส air, H_2 , N_2 , และ He
4. เปิดเครื่อง GC และคอมพิวเตอร์

5. ทำการ condition เครื่องจนได้ base line เรียบสม่ำเสมอ ไม่มีสัญญาณรบกวน
6. Load method ที่ต้องการใช้ run chromatogram
(อ่านวิธีการใช้เครื่องมือให้เข้าใจมาก่อน)
7. ใช้ gas-tight syringe ขนาด 10 μ l ดูคิโอของ pentane 5 μ l แล้วฉีดเข้าเครื่อง GC
8. เมื่อ run chromatogram เสร็จ ให้บันทึกค่ารีเทนชันไทม์ของ pentane
9. ไปที่เมนู instrument เลือก edit parameter เลือก icon column เลือก change และเลือก calibrate ตามด้วย Calc Length ใส่ค่า RT ที่บันทึกไว้ของ pentane
10. อ่านค่าความยาวที่แท้จริงของคอลัมน์ที่ทำการติดตั้ง

หมายเหตุ : นอกจากใช้วิธีฉีด pentane แบบแก๊สแล้ว สามารถฉีดแบบของเหลวได้ โดยใช้เครื่อง Auto injector ให้บรรจุ pentane ลงใน vial 2 ml พร้อม climp ฝาให้สนิท ให้ฉีดเพียง 1 μ l ใช้ mode split มีค่า split ratio เท่ากับ 100:1

การทดลองที่ 7.2 การปรับเงื่อนไขต่างๆ ให้เหมาะสมสำหรับการแยกสารผสม ในแก๊สโครมาโทกราฟี

(Optimization of GC conditions for Separation mixture samples)

วัตถุประสงค์

เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกฝนวิธีการปรับเปลี่ยนเงื่อนไขต่างๆ ให้เหมาะสมสำหรับการแยก
ใน GC ได้แก่



- ๑- Inlet Temperature
- ๒- Oven Temperature Programming
- ๓- Split ratio

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง GC HP 6890
2. Auto injector HP G2613A
3. Detector FID
4. Column HP 5
5. สารตัวอย่าง pentane , hexane , benzene , toluene และ xylene
6. methanol

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารผสมของ pentane , hexane , benzene , toluene และ xylene ให้ได้
ความเข้มข้นอย่างละ 2 ppm ในตัวทำละลาย methanol
2. ใส่สารละลายตัวอย่างผสมลงใน vial ขนาด 2 ml ที่ใช้สำหรับเครื่อง auto injector
3. นำเมทานอลใส่ลงในขวดล้าง A และ B แล้วใส่ในเครื่อง auto injector
4. อ่านวิธีใช้เครื่องให้เข้าใจ หรือมอร์เช่ methol สำหรับ run chromatogram
5. ศึกษาคัด parameter

- * เลือก  ตั้ง heater ไว้ที่ 150 °C และ split ratio 100 : 1
 - * เลือก  ตั้งอุณหภูมิ initial 100 °C และตั้งค่าที่ Ramp 1 → Ramp 6 เป็น 0 (run chromatogram ในระบบ isothermal) กด O.K.
6. ทำการ run chromatogram ด้วยเงื่อนไขที่ตั้งไว้โดยฉีดสารตัวอย่างครั้งละ 1 µl ซึ่งตั้งค่านีไว้ตั้งแต่การสร้าง method
 7. เปลี่ยนเงื่อนไขของ inlet โดยปรับ heater เป็น 200 , 250 และ 300 เลือกเงื่อนไขของ heater ที่ทำให้ได้โครมาโทแกรมที่ดีที่สุด
 8. ตั้งค่า Heater ไว้ตามอุณหภูมิที่เลือก แล้วปรับเปลี่ยนขนาดของ split ratio ตามลำดับดังนี้ 20 : 1 , 50 : 1 , 100 : 1 , 150 : 1 และ 200 : 1 พิจารณาโครมาโทแกรมเพื่อเลือก split ratio ที่เหมาะสมที่สุด
 9. ตั้งค่า split ratio ตามที่เลือกไว้ แล้วทดลองปรับเปลี่ยนค่า Oven temperature program แบบต่าง ๆ จนได้การแยกและความไวที่ดีที่สุด
 10. Cool down เครื่อง GC หลังจาก Oven และ detector มีอุณหภูมิลดลงเท่ากับ 40 °C ให้ปิดโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ GC และเก็บตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. จากการทดลองปรับเปลี่ยนอุณหภูมิของ inlet ให้สร้างกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง พื้นที่พีกกับอุณหภูมิของ inlet และระหว่าง การแยกกับอุณหภูมิ เพื่อแสดงให้เห็นว่าควรเลือกเงื่อนไขใด
2. จากผลการทดลองให้สร้างกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง พื้นที่พีกกับ split ratio และระหว่าง การแยกกับ split ratio เพื่อพิจารณาว่า split ratio ใดที่เหมาะสมที่สุด
3. จากการทดลองปรับเงื่อนไขของ oven temperature program ให้แสดงเป็นแผนภูมิชนิดกราฟแท่งของพื้นที่พีกกับการแยก เพื่อพิจารณาว่า temperature program ชุดใดเหมาะสมที่สุด

4. กำหนดหาพารามิเตอร์ต่างๆ ทางโครมาโทกราฟีจากโครมาโทแกรมชุดที่เหมาะสมที่สุด ดังนี้
 - 4.1 กำหนดเพลาตามทฤษฎีของสารตัวอย่างแต่ละชนิด
 - 4.2 ปัจจัยความจุของสารตัวอย่างแต่ละชนิด
 - 4.3 ค่าความจำเพาะเจาะจง (α) ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด
 - 4.4 ค่าการแยก (R_s) ของสารตัวอย่างแต่ละชนิดที่มี RT ติดกัน
5. ทำรายงาน สรุปผล และวิจารณ์ ส่งภายใน 1 สัปดาห์ที่ทำการทดลองเสร็จ

คำถาม

1. การเลือกวิธีการฉีดสารตัวอย่างแบบ split หรือ splitless มีหลักการอย่างไร
2. จงอธิบายวิธีการหาค่า split ratio
3. Oven temperature program มีประโยชน์อย่างไรในการทำ GC
4. หน้าที่ของ Makeup gas (N_2) คืออะไร

การทดลองที่ 7.3 การพิสูจน์ชนิดของสารตัวอย่างโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

(Identification of Unknown samples by Gas Chromatography)

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้หลักการของแก๊สโครมาโทกราฟีในการพิสูจน์ว่าสารตัวอย่างที่สนใจคืออะไร

หลักการวิเคราะห์

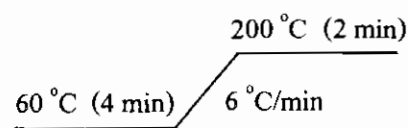
สารตัวอย่างที่สนใจวิเคราะห์นั้น ต้องทราบมาก่อนว่าเป็นสารประกอบประเภทใด เพียงแต่สงสัยว่าจะเป็นตัวใดในกลุ่มของสารประเภทนั้น เช่น ทราบว่าเป็นสารกลุ่ม แอลกอฮอล์ แต่อยากทราบว่า เป็น เมทานอล หรือ เอทานอล หรือ บิวทานอล เท่านั้น ถ้าไม่ทราบข้อมูลอะไรมาก่อนบ้างเลย การใช้วิธีแก๊สโครมาโทกราฟีเพียงอย่างเดียวจะไม่เพียงพอในการสรุปว่าสารที่สนใจนั้นคืออะไร

สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง GC HP 6890
2. Column HP-FFAP
3. Auto injector HP G2613A
4. Detector FID
5. สารมาตรฐาน เมทานอล เอทานอล โพรพานอล บิวทานอล และเอมิลแอลกอฮอล์
6. unknown
7. ตัวทำละลายโทลูอีน

วิธีการทดลอง

1. นำสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วน 1 : 1 ทุกชนิดแล้วเจือจาง 100 เท่าด้วยโทลูอิน นำไปบรรจุใน vial ขนาด 2 ml ที่ใช้สำหรับ auto injector แล้วนำไปเรียงไว้ใน tray ของเครื่อง auto injector เป็นชุดที่ 1
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแอลกอฮอล์แต่ละชนิด เข้มข้น 5 ppm โดยใช้โทลูอินเป็นตัวทำละลาย
3. บรรจุสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดลงใน vial ขนาด 2 ml ที่ใช้สำหรับเครื่อง auto injector แล้วนำไปเรียงไว้ใน tray ตามลำดับ ต่อจากสารผสม
4. นำ unknown ที่อาจารย์ผู้ควบคุมจ่ายให้ไปเจือจาง 100 เท่า โดยใช้โทลูอินเป็นตัวทำละลาย บรรจุใน vial ขนาด 2 ml ที่ใช้สำหรับเครื่อง auto injector แล้วนำไปเรียงไว้ใน tray เป็นตัวสุดท้าย
5. เปิดแก๊ส air, H₂, N₂, และ He
6. เสียบปลั๊ก เปิดเครื่อง stabilizer คอมพิวเตอร์ และ GC ตามลำดับ
(อ่านวิธีการใช้เครื่องมือให้เข้าใจก่อนลงมือทำ)
7. เงื่อนไขของโครมาโทกราฟี ที่ใช้มีดังนี้

Column	: HP-FFAP (Cross-linked PEG-TPA), 30 m x 0.25 mm x 0.33 μ m
Carrier gas	: He
Makeup gas	: N ₂
Injection volume	: 1 μ l , split 100 : 1
Oven temperature program	: 60 °C hold 4 min ramp 6 °C/min to 200 °C hold 2 min
	
Detector	: FID

8. ทำการ Condition คอลัมน์ที่อุณหภูมิของ oven 300 °C จน base line นิ่ง ไม่มีสัญญาณรบกวน
9. สร้าง method สำหรับ run chromatogram
10. ทดลอง run chromatogram ของสารผสมในขวดที่ 1 ตามเงื่อนไขที่ตั้งว่าสามารถแยกสารผสมได้ครบทุกตัวอย่างสมบูรณ์ คือ มีจำนวนพีกเท่ากับจำนวนตัวอย่าง ถ้าการแยกยังไม่ดี ให้ทดลองปรับ oven temperature program หรือ split ratio จนได้การแยกที่ดีที่สุด
11. เปลี่ยนเงื่อนไขของ inlet โดยปรับ heater เป็น 200 , 250 และ 300 เลือกเงื่อนไขของ heater ที่ทำให้ได้โครมาโทแกรมที่ดีที่สุด
12. run chromatogram แบบ sequence จนครบหมดทุกขวดใน tray ด้วยเงื่อนไขที่ดีที่สุดที่เลือกแล้ว
13. จากค่า RT ของสารมาตรฐานแต่ละตัวที่ run chromatogram มาแล้วทำให้ทราบว่า พีกใดในสารผสมคือสารอะไร
14. Label ชื่อพีกแต่ละพีกว่าคืออะไร จากเครื่องมือในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (แถบเมนูที่อยู่ด้านขวามือ) ให้นักศึกษาทดลองฝึกหัดใช้เมนูต่างๆ ว่าสามารถทำงานอะไรได้บ้าง
15. ทดลองนำโครมาโทแกรมของสารผสมมา Overlay กับโครมาโทแกรมของ unknown จะทำให้ทราบว่า unknown ตรงกับพีกใด สามารถสรุปได้ว่า unknown คืออะไร
16. ทำการทดลองซ้ำใหม่โดยใช้ระบบการ run chromatogram แบบ isothermal ที่อุณหภูมิของ oven 100°C , 150°C และ 200°C ให้กำหนดว่าพีกใดคือสารอะไร
17. เลือกอุณหภูมิที่มีการแยกและโครมาโทแกรมที่ดีที่สุดมา run chromatogram สารตัวอย่าง unknown ที่อาจารย์แจกให้
18. Cool down เครื่อง GC จนได้ Oven และ detector มีอุณหภูมิลดลงเท่ากับ 40 °C
19. ปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ เครื่อง GC และแก๊ส ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ให้ใช้ข้อมูลจากการ run chromatogram ในระบบ isothermal

1. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง จุดเดือดของสารกับค่ารีเทนชันไทม์ (RT) ให้นักศึกษาค้นข้อมูล ค่าจุดเดือดของสารมาตรฐานแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลอง พร้อมบันทึกค่า RT ที่ได้จากโครมาโทแกรม (ค่า RT นี้รู้ได้ทั้งจากโครมาโทแกรมสารเดี่ยว หรือโครมาโทแกรมของสารผสมที่ทราบว่าพิกใดคือสารใดแล้ว)
พลอตกราฟเปรียบเทียบระหว่าง จุดเดือดกับค่ารีเทนชันไทม์ อธิบายผลที่เกิดขึ้น
2. พลอตกราฟระหว่างค่า \log retention time กับจำนวนคาร์บอนในสารมาตรฐาน จะได้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรง เมื่อนำค่า \log retention time ของ unknown มาอ่านจำนวนคาร์บอนจากกราฟ จะได้คำตอบว่า unknown เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนกี่ตัว และคือสารอะไร

คำถาม

1. ทำไมค่า \log RT จึงมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับจำนวนคาร์บอน
2. ท่านคิดว่าในการทดลองนี้ นอกจากใช้คอลัมน์ HP-FFAP แล้ว สามารถใช้คอลัมน์ชนิดอื่นได้หรือไม่ ยกตัวอย่างคอลัมน์ชนิดอื่นที่สามารถนำมาใช้ในการทดลองนี้ได้อีก (นักศึกษาต้องค้นคว้าเพิ่มเติม)
3. การเลือกตัวทำละลายสำหรับเตรียมสารตัวอย่างแต่ละชนิดเพื่อนำไปฉีด GC มีวิธีการอย่างไร จงอธิบาย

ปฏิบัติการทดลองทางปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative analysis)

การทดลองที่ 7.4 การหาปริมาณยากำจัดศัตรูพืชโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

(Determination of Pesticide by GC)

อาชีพหลักของประชากรส่วนใหญ่ในประเทศไทยคือ เกษตรกรรม ซึ่งเกษตรกรทุกคนย่อมคาดหวังที่ให้ผลผลิตทางการเกษตรมีปริมาณมาก และคุณภาพสูง จึงได้มีการใช้ปุ๋ยและยาปราบศัตรูพืชกันมาก โดยลืมนึกถึงผลเสียที่ตามมาคือ การตกค้างของสารพิษต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร มีผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดที่ส่งออกจำหน่ายสู่ต่างประเทศ ไม่ผ่านการตรวจสอบ เนื่องจากมีสารพิษตกค้างเกินกว่าที่มาตรฐานกำหนดไว้ จึงทำให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกร ดังนั้นการควบคุมการผลิตและควบคุมคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรไม่ให้มีปริมาณสารพิษตกค้างมากเกินไป จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เทคนิคการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบสารพิษตกค้างจำพวกยากำจัดศัตรูพืชในผลผลิตทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของผลผลิตได้

สารเคมีที่ใช้เป็นยากำจัดศัตรูพืช แบ่งตามชนิดของศัตรูพืชได้ดังนี้ คือ

1. สารป้องกันกำจัดแมลง (Insecticide)
2. สารป้องกันกำจัดวัชพืช (Herbicide)
3. สารป้องกันกำจัดโรคพืช (Fungicide)
4. สารป้องกันกำจัดไร (Acaricide)
5. สารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย (Nematicide)
6. สารป้องกันกำจัดหนู (Rodenticide)

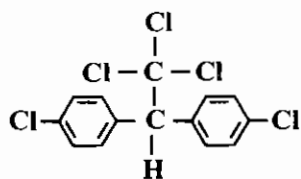
กลุ่มสารป้องกันกำจัดแมลง หรือกลุ่มยาฆ่าแมลง เป็นกลุ่มสารเคมีที่ใช้กันมากที่สุด ไม่เพียงแต่ใช้ในทางเกษตรเท่านั้น ยังรวมไปถึงการใช้ในกิจการอื่นๆ แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine Insecticide)

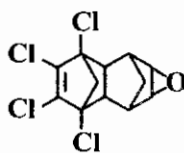
เป็นสารพิษกลุ่มที่ใช้กันมานานตั้งแต่สงครามโลกครั้งที่ 2 สารพิษตกค้างกลุ่มนี้ละลายได้ดีในไขมัน และมีพิษตกค้างนานไม่เหมาะสมกับการฉีดพ่นป้องกันกำจัดศัตรูพืช อาหารทั้งหลาย ในปัจจุบันได้ยกเลิกการใช้ทางการเกษตรไปแล้วหลายชนิด เช่น DDT dieldrin แต่ยังคงใช้ในด้านอื่นๆ เช่น DDT ใช้ป้องกันกำจัดขุง เพื่อป้องกันโรคมalaria dieldrin ใช้ในการกำจัดปลวก เป็นต้น

พิษวิทยาของสารกลุ่มนี้คือ จะดูดซับได้ดีทางลำไส้และผิวหนัง เมื่อได้รับในปริมาณมากพอจะเกิดผลกระทบต่อการทำงานทางระบบประสาท โดยเฉพาะสมองส่วนที่ควบคุมระบบหายใจ

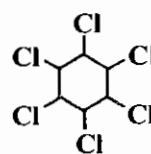
ตัวอย่างสารพิษในกลุ่มนี้คือ DDT , dieldrin , beta-BHC , lindane , chlordane และ endosulfan เป็นต้น



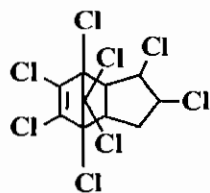
DDT



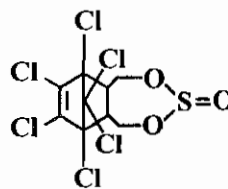
dieldrin



lindane



Chlordane



endosulfan

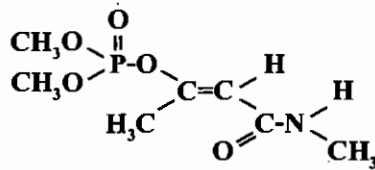
2. กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate Insecticide)

สารพิษกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีพิษตกค้างไม่นาน มีทั้งที่เป็นพิษร้ายแรงและพิษปานกลาง ซึ่งเกษตรกรผู้ใช้สารพิษควรทราบถึงความเป็นพิษของสารพิษชนิดที่ใช้ เพื่อจะได้ระมัดระวังตัวเองในระหว่างการใช้ และควรใช้ในอัตราตามคำแนะนำเพื่อป้องกันปัญหาสารพิษตกค้างที่จะตามมาในผลผลิต และในสิ่งแวดล้อม

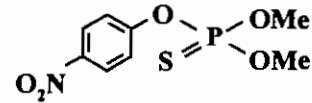
พิษวิทยาของสารกลุ่มนี้คือ จะเป็นพิษต่อแมลงและสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม ปริมาณสารพิษที่เข้าไปในร่างกายจะทำปฏิกิริยากับ enzyme acetyl cholinesterase ที่ปลายประสาท ทำให้ปริมาณของ enzyme ทำงานได้น้อยลง ทำให้การส่งสัญญาณประสาทในสมองเสื่อมมีผลต่อระบบสัมผัสการเคลื่อนไหว และการทำงานของระบบหายใจ การเสียชีวิตเนื่องจากระบบหายใจถูกกด ตัวอย่างของสารพิษกลุ่มนี้คือ

สารพิษที่มีพิษร้ายแรง : monocrotophos , methyl parathion , methamidophos

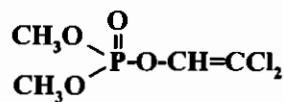
สารพิษที่มีพิษปานกลาง : dichlorvos , triazophos , chlorpyrifos , dimethoate , diazinon



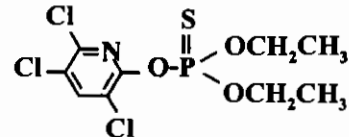
monocrotophos



methyl parathion



dichlorvos



chlorpyrifos

3. กลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate Insecticide)

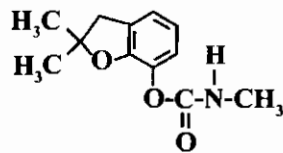
เป็นสารที่กำจัดศัตรูพืชได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะแมลงชนิดปากดูด ศัตรูพืชที่อยู่ในดิน เช่น ไส้เดือนฝอย และหอยทาก สารพิษในกลุ่มนี้มีทั้งที่เป็นพิษร้ายแรง และพิษปานกลาง

โดยมีระยะเวลาในการตกค้างสั้น และมีความปลอดภัยสูงแก่ผู้บริโภค ถ้ามีการใช้สารพิษอย่างถูกต้องและปลอดภัย

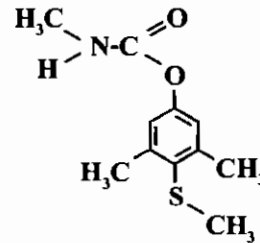
พิษวิทยาของสารพิษกลุ่มนี้ จะมีลักษณะคล้ายกันกับสารพิษในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต แต่ร่างกายของคนที่ได้รับสารพิษกลุ่มนี้ จะกลับคืนสู่สภาวะปกติได้เร็วกว่าการเกิดสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ตัวอย่างของสารพิษกลุ่มนี้คือ

สารพิษที่มีพิษร้ายแรง : carbofuran , methomyl

สารพิษที่มีพิษปานกลาง : methiocarb , carbaryl , BPMC



Carbofuran

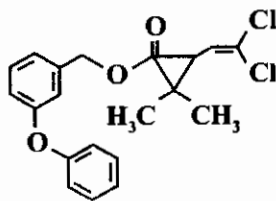


Methiocarb

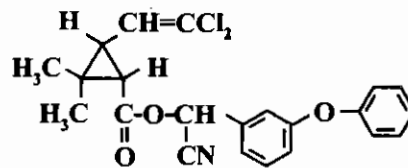
4. กลุ่มไพรีทรอยด์ (Pyrethroid Insecticide)

เป็นสารพิษที่ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช ที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เพราะมีการสลายตัวได้รวดเร็ว สามารถใช้แทนสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต แต่มีระยะเวลาที่น้อยกว่าได้เร็วและมีราคาแพงกว่าสารพิษในกลุ่มอื่นๆ

พิษวิทยาของสารกลุ่มนี้ จะเป็นพิษต่อระบบประสาทของแมลง ทำให้แมลงสลบในทันที และตายในที่สุด แต่มีพิษน้อยต่อคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ตัวอย่างสารพิษในกลุ่มนี้คือ permethrin , cypermethrin , fenvalerate



Permethrin



Cypermethrin

ความเป็นพิษของสารพิษ จะมีระดับการวัด 4 ระดับ ซึ่งเป็นมาตรฐานสากล คือ

ความเป็นพิษระดับร้ายแรงยิ่ง พิษร้ายแรง พิษปานกลาง และพิษน้อย จะใช้ค่า LD₅₀ ซึ่งทดลองกับหนู โดยการทดลองทางปาก และทางผิวหนัง โดยสารพิษที่ใช้จะอยู่ในรูปของแข็งและในรูปของเหลว ซึ่งให้ค่าความเป็นพิษต่างกัน ดังแสดงในตาราง

การจัดระดับความเป็นพิษของสารพิษที่ใช้ในการเกษตร

ชนิดของความเป็นพิษ	LD ₅₀ สำหรับหนู (มก./กก. น้ำหนักตัว)			
	พิษทางปาก		พิษทางผิวหนัง	
	ของแข็ง	ของเหลว	ของแข็ง	ของเหลว
Ia พิษร้ายแรงยิ่ง (Extremely Hazardous)	< 5	< 20	< 10	< 40
Ib พิษร้ายแรง (Highly Hazardous)	50 – 500	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II พิษปานกลาง (Moderately Hazardous)	50 – 500	200 – 2,000	100 – 1,000	400 – 4,000
III พิษน้อย (Slightly Hazardous)	> 500	> 2,000	>1,000	> 4,000

The WHO Recommended Classification of Pesticide by Hazard and Guidelines to Classification

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลง DDT และ endosulfan sulfate ที่ตกค้างในพืชผัก เช่น ผักคะน้า กะหล่ำปลี และผักนึ่ง เป็นต้น โดยวิธีคาปิลลารีแก๊สโครมาโทกราฟี

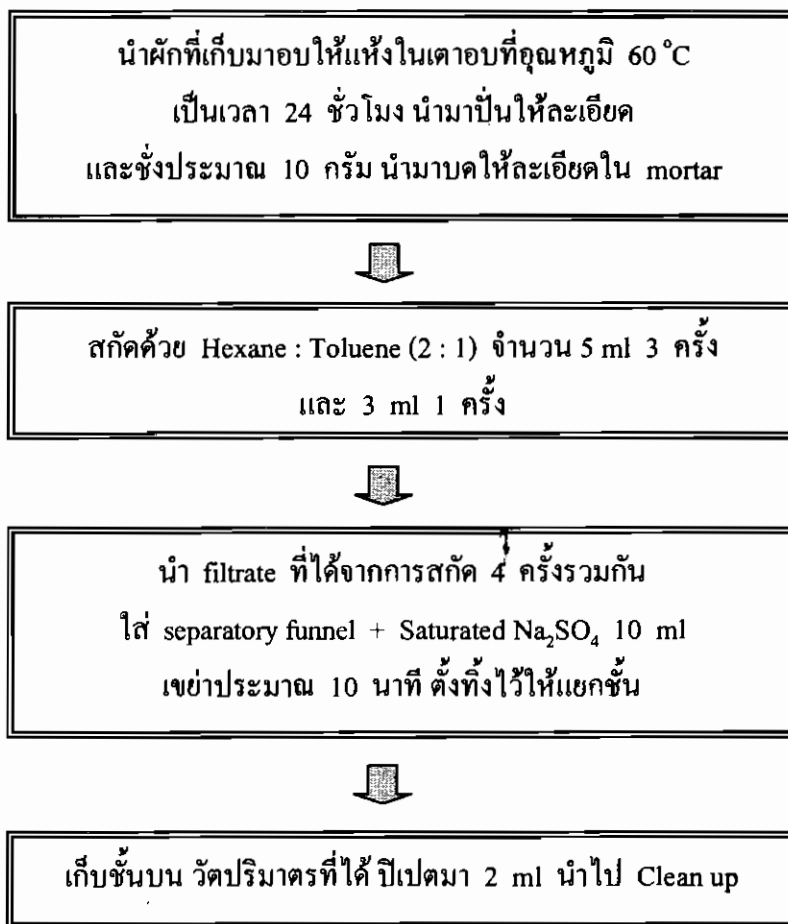
สารเคมีและเครื่องมือ

1. เครื่อง GC HP 6890
2. column HP 1 (methylsiloxane) 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m
3. Auto injector HP G2613A
4. Detector μ ECD
5. Vortex mixer
6. สารมาตรฐานยาฆ่าแมลง DDT และ endosulfan sulfate
7. ตัวอย่างผัก
8. ตัวทำละลาย hexane กับ toluene
9. anhydrous Na_2SO_4

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างผักที่สนใจวิเคราะห์มาทำการเตรียมให้ได้ตัวอย่างที่สะอาด ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1.1 ขั้นตอนการสกัด



1.2 ขั้นตอนการ Clean up

* Pack column

* ชั่ง florisil ประมาณ 0.5 gm , Na_2SO_4 2 ส่วน ประมาณ 1.0 gm และ 0.2 gm

* ใส่สำลีลงในคอลัมน์ขนาดเล็ก (สามารถใช้ pasteur pipette) ตามด้วย Na_2SO_4 0.2 gm ที่อิมด้วยตัวทำละลาย Hexane : Toluene (2 : 1) เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ให้แน่น

* ใส่ florisil 0.5 gm ที่อิมด้วยตัวทำละลาย Hexane : Toluene (2 : 1) เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ให้แน่น

* ใส่ Na_2SO_4 1.0 gm ที่อิมด้วยตัวทำละลาย Hexane : Toluene (2 : 1) เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ให้แน่น

* ขั้นตอนการใส่ตัวอย่าง และ Elute

* ใส่ sample 2 ml ตามด้วย Hexane : Toluene (2 : 1) จำนวน 2 ml 2 ครั้ง

* เก็บ Eluent ที่ได้ใน vial ขนาด 2 ml แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC

ให้เตรียมตัวอย่างเหมือนกันทั้งหมด 3 ชุด (ทำ 3 ซ้ำ)

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานยาฆ่าแมลงที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 4 ระดับคือ 0.001 , 0.005 , 0.01 และ 0.015 ppm โดยใช้ Hexane : Toluene (2 : 1) เป็นตัวทำละลาย ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละระดับลงใน vial ขนาด 2 ml ที่ใช้สำหรับใส่กับ tray -ของ auto injector
3. ติดตั้งคอลัมน์ HP 1 ใน oven ของ GC ต่อเข้ากับ inlet และ detector μECD
4. เสียบปลั๊ก เปิดเครื่อง stabilizer คอมพิวเตอร์ และ GC
5. เริ่มไขในการ run chromatogram มีดังนี้

Column	: HP-1 (methylsiloxane), 30 m x 320 μm i.d. Film thickness 0.25 μm
Carrier gas	: He
Makeup gas	: N_2
Injection volume	: 1 μl , splitless mode
Oven temperature program	: 85 $^{\circ}\text{C}$ hold 5 min ramp 1 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 195 $^{\circ}\text{C}$ hold 5 min ramp 2 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ hold 1 min
Detector	: μECD

6. ทำการ condition คอลัมน์ที่อุณหภูมิของ oven 300 $^{\circ}\text{C}$ จน base line เรียบสม่ำเสมอ ไม่มีสัญญาณรบกวน
7. สร้าง method สำหรับ run chromatogram (อ่านวิธีการใช้เครื่องมือให้เข้าใจมาก่อนลงมือปฏิบัติ)
8. run chromatogram แบบ sequence จนครบหมดทุกขวด ใน tray ของ auto injector
9. เปิดหน้าต่าง Instrument 1 Offline เลือก Data analysis
10. สร้าง calibration curve จากข้อมูลที่ได้ในการ run chromatogram สารมาตรฐาน (ดูวิธีสร้างได้ในข้อ [9])
 - * ในกรณีที่นักศึกษาไม่ทราบว่าพีคใดคือสารอะไร ในการสร้าง calibration curve นักศึกษาต้องลงมือวิเคราะห์สารมาตรฐานเดี่ยว เพื่อยืนยันว่าพีคใด คือยาม่าแมลงตัวใดก่อน
11. เปิด file สารตัวอย่าง สั่ง print report จะได้ข้อมูลของสารตัวอย่าง รายงานความเข้มข้นเป็น ppm

12. ปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ GC และถังแก๊ส

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการวิเคราะห์ที่ได้ คือ ความเข้มข้นเป็น ppm ของสารตัวอย่าง ให้นักศึกษาคำนวณย้อนกลับเป็นปริมาณสารตกค้างยาฆ่าแมลงในผักเป็น mg/kg ของผัก

คำถาม

1. จงอธิบายการทำงานของดีเทคเตอร์ μECD
2. สามารถใช้ดีเทคเตอร์ FID แทน μECD ได้หรือไม่
3. Na_2SO_4 ทำหน้าที่อย่างไรในการเตรียมตัวอย่าง
4. ทำไมต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้สะอาดก่อนฉีดเข้าเครื่อง GC

การทดลองที่ 7.5 การหาปริมาณ BTEX ในน้ำเสีย

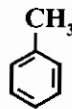
(Determination of BTEX in waste water)

BTEX คือสารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds , VOCs) ชนิดหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วย Benzene Toluene Ethylbenzene และ Xylene จัดเป็นสารอินทรีย์ระเหยประเภท aromatic hydrocarbon สารอินทรีย์ระเหย BTEX ถูกนำมาใช้กันมากในอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ทั้งที่เป็นส่วนประกอบของน้ำมันเชื้อเพลิง และใช้เป็นตัวทำละลายในการชะล้างต่าง ๆ ทำให้ BTEX มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้ โดยเฉพาะในแหล่งน้ำต่างๆ เช่น น้ำบาดาล น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือน้ำทิ้งจากปั้มน้ำมัน และที่สำคัญอาจเกิดการรั่วของน้ำมันเชื้อเพลิงจากถังเก็บใต้ดิน

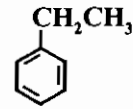
โครงสร้างของ BTEX คือ



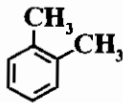
benzene



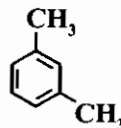
toluene



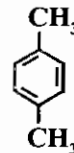
ethylbenzene



o-xylene



m-xylene



p-xylene

BTEX มีประโยชน์และโทษ ดังนั้นการนำ BTEX มาใช้ จึงควรระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ประโยชน์ของ BTEX

ใช้ในกระบวนการผลิตสารเคมีหลายชนิด เช่น styrene , phenol , cyclohexane และ aniline นอกจากนี้ยังเป็นตัวทำละลายในห้องปฏิบัติการ ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การผลิตสี น้ำ

มันเคลือบเงา แลกเกอร์ กาว ยาง พลาสติก หนังกี๊ยม ยาน้ำแมลง ยากำจัดวัชพืช ทินเนอร์ หมึกพิมพ์ สารฟอกสี ล้างสี และตัวเร่งค่าออกเทนในน้ำมันเครื่องยนต์ เป็นต้น

อันตรายจาก BTEX

BTEX เป็นสารเสพติดประเภทมีฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง ผู้ได้รับสารนี้สะสมไปนานๆ สามารถเกิดโรคมะเร็ง (carcinogen) เช่น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) เกิดการเบี่ยงเบนทางพันธุกรรม (mutagenic) และเกิดการอักเสบของไขสันหลังได้ จากการสัมผัสจะทำให้เกิดการระคายเคือง และทำให้เนื้อเยื่ออักเสบได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเทคนิคในการเตรียมตัวอย่าง BTEX ด้วยวิธี SPME ก่อนฉีดเข้าเครื่อง GC
2. หาปริมาณ BTEX ในน้ำเสียจากน้ำทิ้งของปั้มน้ำมัน

สารเคมีและเครื่องมือ

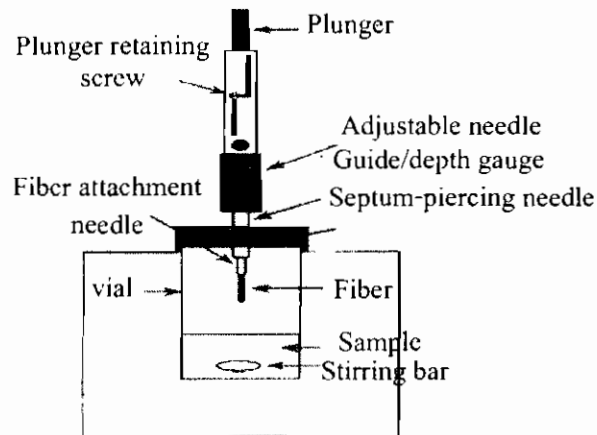
1. เครื่อง GC HP 6890
2. Column HP 1 (methylsiloxane) 30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m
3. Detector FID
4. SPME holder (Solid phase microextraction)
5. 100 % PDMS fiber
6. สารมาตรฐาน BTEX
7. vial ขนาด 20 ml พร้อม septum และฝาปิดอะลูมิเนียม

วิธีการทดลอง

1. ให้นักศึกษาเก็บน้ำทิ้งจากปั้มน้ำมัน จำนวน 10 ml บรรจุใส่ลงในขวด vial ขนาด 20 ml พร้อมรีบปิดฝาด้วย septum และอะลูมิเนียม แล้ว clamp ให้แน่น ทำทั้งหมด 3 ขวด (ทำ 3 ซ้ำ) แล้วนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน BTEX ให้มีความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0, 0.005, 0.05, 0.5 และ 1 ppm โดยในขั้นแรกเตรียมเป็น stock solution ของ BTEX เข้มข้น 1,000 ppm โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นจึงค่อยเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานทั้ง 5 ระดับโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย
3. เปิดสารละลายมาตรฐานใส่ vial ขนาด 20 ml จำนวน 10 ml พร้อมกับรีบปิดด้วย septum และฝาอะลูมิเนียม พร้อม clamp ให้แน่น
4. ติดตั้งคอลัมน์ HP 1 ใน oven ของ GC ต่อเข้ากับ inlet และ detector FID
5. เสียบปลั๊ก เปิดเครื่อง stabilizer คอมพิวเตอร์ และ GC
6. เงื่อนไขในการ run chromatogram มีดังนี้

Column	: HP 1 (methyl siloxane) , 30 m x 0.32 mm i.d. Film thickness 0.25 μ m
Carrier gas	: He
Inlet temp.	: 200 °C
Injection mode	: split 50 : 1
Detector	: FID
Nebulizer	: H ₂
Makeup gas	: N ₂
Oxidant	: Air zero
Oven temperature program	: 40 °C hold 3 min ramp 10 °C/min to 130 °C hold 4 min 130 °C (4 min) 40 °C (3 min) / 10 °C/min

7. ทำการ Condition คอลัมน์ที่อุณหภูมิของ oven 300 °C จน base line นิ่ง ไม่มีสัญญาณรบกวน
8. สร้าง method สำหรับ run chromatogram
(อ่านวิธีการใช้เครื่องมือให้เข้าใจก่อนลงมือปฏิบัติ)
9. เตรียมสารตัวอย่างสำหรับฉีดโดย นำ vial ที่บรรจุสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง มาทำการสกัด BTEX ออกโดยใช้ SPME ดังนี้



นำ vial อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 °C โดยใช้ water bath ปิดฝีม SPME holder ลงใน vial แล้วดันไฟเบอร์ให้ออกมาอยู่ส่วนไอของ vial (ไม่จุ่มอยู่ในสารละลาย) ให้เวลาในการสกัด หรือดูดซับตัวอย่าง BTEX 10 - 15 นาที จากนั้นดึงไฟเบอร์เข้าเก็บภายในเข็ม แล้วดึง SPME holder ออกจาก vial นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยปัก SPME holder ผ่านทาง septum แล้วดันไฟเบอร์ออกพร้อมกด start จากนั้นค้างไว้ที่เครื่อง GC 5 นาทีเพื่อให้เกิดการ desorption fiber เข้าเก็บในเข็มแล้วจึงดึง SPME holder ออกจากเครื่อง GC

หมายเหตุ :

- * ขั้นตอนการสกัดหรือดูดซับตัวอย่างจาก vial 10 - 15 นาที นั้น ต้องจับเวลาให้ทั่วๆ กันทุกๆ vial
- * การกด start ที่เครื่อง GC สามารถทำได้เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที หรือ desorp BTEX ออกจากไฟเบอร์เสร็จแล้ว ซึ่งต้องจับเวลาที่

ใช้ในการ desorp ให้เท่าๆ กันทุกครั้งที่ฉีด หรือกด start ทันทีที่
ดับไฟเบอร์ออกจากเข็ม

* นักศึกษาต้องศึกษาวิธีการใช้ SPME จากอาจารย์ผู้ควบคุมก่อน
ลงมือปฏิบัติ

10. run chromatogram ของสารมาตรฐาน BTEX และตัวอย่างน้ำเสียที่เก็บมาจนครบ
11. เปิดหน้าต่าง Instrument 1 Offline เลือก Data analysis
12. สร้าง Calibration curve จาก file ของสารมาตรฐานที่ run chromatogram ไว้
(ดูวิธีการได้ในหัวข้อ [9])
13. เปิด file สารตัวอย่าง ตั้ง print report จะได้ข้อมูลของสารตัวอย่าง รายงาน
ความเข้มข้นเป็น ppm
14. Cool down เครื่อง GC
15. หลังจาก Oven และ detector มีอุณหภูมิลดลงเท่ากับ 40 °C ปิดเครื่อง
คอมพิวเตอร์ เครื่อง GC และแก๊ส ตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการวิเคราะห์ที่ได้ คือความเข้มข้นเป็น ppm ของ BTEX ในตัวอย่างน้ำทิ้งที่
เก็บมาจากปั๊มน้ำมัน ให้นักศึกษาสรุปว่าสารตัวใดที่พบมากที่สุด ด้วยเหตุผลอะไร

คำถาม

1. สารอินทรีย์ระเหย (VOCs) คืออะไร นอกจาก BTEX แล้ว นักศึกษายังรู้จัก
กลุ่มสารอินทรีย์ระเหยชนิดอื่นอีกหรือไม่
2. SPME คืออะไร ทำหน้าที่อย่างไรในการทดลอง
3. ให้เรียงลำดับ RT ของ BTEX ในโครมาโทแกรม
4. ให้นักศึกษาค้นคว้าเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง VOCs ก่อนฉีดเข้า
เครื่อง GC แล้วแลกเปลี่ยนความรู้กันในชั้นเรียน