การวิเคราะห์ปริมาณสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาล

นางสาวกุลธิดา แหวนเพชร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543
ISBN 974-13-0463-3
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANALYSIS OF QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND IN MOLASSES

Miss Kulthida Waenpetch

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Environmental Science
Inter-Department of Environmental Science
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-13-0463-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ปริมาณสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาล
โดย	นางสาว กุลธิดา แหวนเพชร
สหสาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ พัฒนผลไพบูลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีระธิติวรกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุลธิดา แหวนเพชร : การวิเคราะห์ปริมาณสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาล (ANALYSIS OF QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND IN MOLASSES)
อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อมร เพชรสม, 97 หน้า. ISBN 974-13-0463-3

งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ได้แก่ สารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak) ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลด้วยเทคนิค ion suppression chromatography โดยเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 มิลลิเมตร x 250 มิลลิเมตร) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH เท่ากับ 5.00±0.01 อัตราส่วน 50 : 50 v/v อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย uv detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากสภาวะดังกล่าวสามารถแยก homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak และตรวจวัดได้ที่ระดับต่ำ เมื่อวิเคราะห์สาร bak ด้วยเทคนิค ion pair chromatography โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18} (3.9 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร) เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมธานอล : สารละลายเกลือโซเดียมเฮปเทนซัลโฟนิก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ที่ปรับpH เท่ากับ 3.50 อัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย uv detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่สภาวะดังกล่าวตรวจพบเฉพาะปริมาณรวมของสาร bak

จากการทดลองกำจัดสีซึ่งรบกวนการวิเคราะห์สาร bak ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลด้วยเทคนิค solid phase extraction โดยใช้ sep pak ODS พบว่าไม่สามารถกำจัดสีในกากน้ำตาลได้หมด เมื่อทดลองกำจัดสีในกากน้ำตาลโดยใช้ sep pak extract-clean cyano และตัวชะคือสารละลายผสมของสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH= 5.00±0.01 อัตราส่วน 70 : 30 v/v พบว่าสามารถกำจัดสีในกากน้ำตาลได้และเมื่อตรวจวัดในตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 13 แห่งโดยใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวและตรวจวัดด้วยเทคนิค ion suppression chromatography ตรวจพบ homologueC_{12}และ homologueC_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล 3 แห่ง โดยปริมาณที่ตรวจพบที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% > 7% >15%

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4072213323 : MAJOR INTER-DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD: BENZALKONIUM CHORIDE / MOLASSES / QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND

KULTHIDA WAENPETCH : ANALYSIS OF QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND IN MOLASSES. THESIS ADVISOR: ASSO. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D. 97 pp.

ISBN 974-13-0463-3

This research involved an analysis of quaternary ammonium compound, benzalkonium chloride (bak) a biocide uses in molasses, by using ion suppression chromatography. The analytical condition consists of acetonitrile : phosphate buffer (50 :50; v/v) as mobile phase, adjusted pH to 5.00±0.01, Hypurity cyano column (4.6 mmi.d x 250 mm), flow rate 1.00 ml/min. The bak was detect by uv-vissible photodiode array detector at wavelength 210 nm. This method can detect homologue C_{12} and homologue C_{14} . Another method used to analyze bak was ion pair chromatography which the analytical procedure composed of methanol : 5 mM heptane sulfonic acid sodium salt (50 : 50 v/v) as mobile phase , adjusted pH to 3.50, flow rate 1.00 ml/min, Novapak C_{18} column (3.9 mmi.d x 150 mm) and the amount of bak could be detected. However, this method could not detect the homologue C_{12} and C_{14} .

Due to the color of the molasses interfere with the analysis, thus solid phase extraction was use to eliminate the color of samples. The sep pak ODS was not able to get rid of color in molasses, while the used of sep pak extract-clean cyano and acetonitrile : phosphate buffer (70 : 30 v/v) adjusted pH to 5.00±0.01 as eluent could get rid of the color interference. From this condition when detect by ion suppression, the color in molasses disappeared and the result showed that both homologue C_{12} and homologue C_{14} of bak were detected in only 3 samples out of 13. The amount of homologues C_{12} and homologues C_{14} were detected in the order of 5% > 7% >15%.

Department…Environmental..Science… …. Student's

Field of study… Environmental..Science…. Advisor's name……

Academic year…….2000…….. Co –advisor's name…….

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.ดร.อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านช่วยให้คำแนะนำจัดหาอุปกรณ์และตัวอย่างกากน้ำตาลซึ่งใช้การทดลองในการวิจัยมาด้วยดีตลอด และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ พิพัฒนผลไพบูลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์, รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ การวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้ทดลองและสารเคมีบางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จากทางศูนย์เครื่องมือรวม มหาวิทยาลัยมหิดล ตลอดทั้งความช่วยเหลือของ คุณศิริชัย โฆษิตารัตน์ ในการใช้เครื่องมือให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ช่วยสนับสนุนเงินทางการวิจัยและเพื่อนๆทุกคนที่ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ..... .ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ..... ฎ
บทที่

1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 หลักการพื้นฐานของโครมาโทกราฟี 3
2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC.....5
2.3 กลไกการแยกทางโครมาโทรกราฟี.....8
2.4 พารามิเตอร์พื้นฐานทางโครมาโทกราฟี 11
2.5 กระบวนการผลิตน้ำตาล.....17
2.6 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22

3 วิธีดำเนินการวิจัย
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 27
3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางโครมาโทกราฟี 28
3.3 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ 29
3.4 การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด 29
3.5 การหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวชะ..... 29
3.6 การหาประสิทธิภาพการสกัด..... 30
3.7 การหาค่า breakthrough 30

สารบัญ (ต่อ)

3.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ในกากน้ำตาล..... 31
3.9 การหาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร 32

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง
4.1 ผลการทดลองเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม
ทางโครมาโทกราฟี 33

4.2 ผลการทดลองเมื่อการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง
ของการวิเคราะห์ 33
4.3 ผลการทดลองการหาขีดจำกัดของการตรวจวัด 42
4.4 ผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวชะ..... 42
4.5 ผลการทดลองการหาประสิทธิภาพการสกัด.....43
4.6 ผลการทดลองหาค่าbreakthrough.....43
4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์
ในกากน้ำตาล.....44
4.8 ผลการการหาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร..... 65

5 อภิปรายผลการวิจัย.....75

6 สรุปผลวิจัย.....80
รายการอ้างอิง.....82
ภาคผนวก 88
ประวัติผู้วิจัย 97

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงความแรงตัวทำละลาย ……... 14
2. แสดงค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกด้วยวิธีต่างๆ……16
3. แสดงการเลือกใช้ sep pak artridges…… 21
4. แสดงค่า retention timeสารbak เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography……36
5. แสดงค่า retention time พื้นที่homologueC_{12}ของสารละลายมาตรฐาน bak เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…….39
6. แสดงค่า retention time พื้นที่homologueC_{14}ของสาร bak เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…….40
7. แสดงค่า retention time จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกากน้ำตาลมิตรผล หนองใหญ่ เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak 25 พีพีเอ็มและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography……50
8. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่ตรวจวัดจากตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 13 แห่ง……..51
9. แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล อุตสาหการชลบุรี ความเข้มข้น 5 % 7% 15% เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography……..52
10. แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล สิงห์บุรี ความเข้มข้น 5 % 7% 15% เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…… 54
11. แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล ระยอง ความเข้มข้น 5 % 7% 15% เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography……..56
12. แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak เมื่อ spike สาร bak 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาล อุตสาหการชลบุรี ความเข้มข้น 5 % 7% 15% ค่า เปอร์เซนต์การกลับคืนสาร……...67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

13. แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak เมื่อ spike สาร bak 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาล สิงห์บุรี ความเข้มข้น 5 % 7% 15% ค่า เปอร์เซนต์การกลับคืนสาร……..…69
14. แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak เมื่อ spike สาร bak 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น……. 76
15. แสดงประสิทธิภาพการสกัด homologueC_{12}และ homologueC_{14}ของสาร bak และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…….73
16. แสดงข้อมูลกลุ่มประชากรที่วิเคระห์ทางสถิติสำหรับ homologue C_{12}ของสารbak…… 89
17. แสดงผลวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ homologue C_{12}ของสารbak…….. …..89
18. แสดงการทดสอบผลของปัจจัยกลุ่มประชากรที่ศึกษาที่มีผล ต่อปริมาณ homologue C_{12}…….. . 90
19. แสดงผลการประเมินผลจากปัจจัยกลุ่มประชากรแต่ละชนิดที่มีผล ต่อปริมาณ homologue C_{12}……. 90
20. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{12}ที่มี ในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น…….. 91
21. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{12}ที่มี ในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละโรงงาน……. 92
22. แสดงข้อมูลกลุ่มประชากรที่วิเคราะห์ทางสถิติสำหรับ homologue C_{14}ของสาร bak…… 93
23. แสดงผลวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ homologue C_{14}ของสาร bak……..…93
24. แสดงการทดสอบผลของปัจจัยกลุ่มประชากรที่ศึกษาที่มีผลต่อ ปริมาณ homologue C_{14}…. ……..94
25. แสดงผลการประเมินผลจากปัจจัยกลุ่มประชากรแต่ละชนิดที่มีผล ต่อปริมาณ homologue C_{14}……..94

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

26. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{14} ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น…….. 95

27. แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{14} ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละโรงงาน……...96

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงการจำแนกวิธีการทางโครมาโทกราฟี.....4
2. แสดงส่วนประกอบของเครื่องHPLC..... 5
3. วัสดุที่บรรจุในHPLCคอลัมน์.....6
4. แสดงผลของpHที่มีต่อการยึดของสารไอออนิก.....9
5. แสดงโครมาโทแกรมการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ.....11
6. แสดงขั้นตอนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ.....17
7. แสดงสูตรโครงสร้างสารbak..... 19
8. โครมาโทแกรมแสดงปริมาณสารละลายมาตรฐาน bak ที่วิเคราะห์ได้ที่ ความเข้มข้นต่างๆเมื่อเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18}(3.9mmi.d x 150 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมธานอล : 5 mM heptanesulfonic acid sodium salt pH= 3.5 อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร/นาที ตรงจวัดด้วย uv ที่ 254 nm.....34
9. โครมาโทแกรมแสดงปริมาณสารละลายมาตรฐาน bak ที่วิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้น ต่างๆเมื่อเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลาย อะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH=.5.00 อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร/นาที ตรงจวัดด้วย uv ที่ 210 นาโนเมตร..... 37
10. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่สารละลายมาตรฐาน bak ที่วิเคราะห์ได้ และความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน bak เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography และ เทคนิค ion pair chromatography.....41
11. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ homologue C_{12}ของสาร bak ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography.....43
12. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bakในตัวอย่างกากน้ำตาลมิตรผล ที่ความเข้มข้น 3 %เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography..... 46
13. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bakในตัวอย่างกากน้ำตาลมิตรผล ที่ความเข้มข้น 5 %เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography.....47

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

14. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารbakในตัวอย่างกากน้ำตาลหนองใหญ่ ที่ความเข้มข้น 3 %เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography…… 48
15. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สารbakในตัวอย่างกากน้ำตาลหนองใหญ่ ที่ความเข้มข้น 5 %เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography …… 49
16. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bakในตัวอย่างกากน้ำตาล อุตสาหการชลบุรีที่ความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…….. 58
17. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ เมื่อ spike สาร bak 35 พีพีเอ็ม ในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีที่ความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่านsep pak cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…….59
18. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bakในตัวอย่างกากน้ำตาล สิงห์บุรีที่ความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography……60
19. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ เมื่อ spike สาร bak 35 พีพีเอ็ม ในตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีที่ความเข้มข้น 5% 7% 15%เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…… 61
20. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bakในตัวอย่างกากน้ำตาล ระยองที่ความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography…….. 62
21. โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ เมื่อ spike สาร bak 35 พีพีเอ็ม ในตัวอย่างกากน้ำตาลระยองที่ความเข้มข้น 5% 7% 15%เมื่อผ่านsep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography …… 63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

22. แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมารสาร bak ที่วิเคราะห์ได้ในกากน้ำตาล อุตสาหการชลบุรี สิงห์บุรี ระยองที่ความเข้มข้น 5% 7% 15%.....64
23. แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์เปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร bak ของตัวอย่าง อุตสาหการชลบุรี สิงห์บุรี ระยองที่ความเข้มข้น 5% 7% 15%.....74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กากน้ำตาลเป็นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล กากน้ำตาลโดยทั่วไปมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกันแต่มีปริมาณขององค์ประกอบแตกต่างกัน ลักษณะของกากน้ำตาลมีสีน้ำตาลเข้มเป็นของเหลือที่สามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมโดยเฉพาะการหมัก(คงพัฒน์ พงษ์ไพบูลย์, 2523) และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ อุตสาหกรรมการผลิตผงชูรส ใช้ผสมเป็นอาหารสัตว์และส่งออก (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร, 2540)

โดยทั่วไปโรงงานน้ำตาลจะเติมสารฆ่าเชื้อในกากน้ำตาลเพื่อป้องกันการเน่าเสียของกากน้ำตาลเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งปริมาณสารฆ่าเชื้อที่เติมในกากน้ำตาลมีความสำคัญเพราะถ้ามีปริมาณน้อยกากน้ำตาลจะเน่าเสียแต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปทำให้เกิดการตกค้างของของสารในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กากน้ำตาล เมื่อโรงงานน้ำตาลปล่อยกากน้ำตาลที่เน่าเสียสู่สิ่งแวดล้อมทำให้เกิดการสะสมของสารฆ่าเชื้อที่มีในกากน้ำตาล สารฆ่าเชื้อที่ใช้เป็นสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ ได้แก่ สารประกอบ cetyltrimethylammonium bromide (ctab), benzalkonium chloride (bak)hexemine x-100, qemiquat 2850, talocide q, well-q

จากการศึกษาวิจัยเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ด้วยเทคนิค Ferricyanide method, Reineckate method, Thin layer chromatography, Bromophenol blue(Ambrus G, 1943) ซึ่งวิธีที่กล่าวข้างต้นสามารถวิเคราะห์ได้แต่ปริมาณรวมของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ แต่ไม่สามารถแยกองค์ประกอบของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ได้ต่อมาได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เนื่องจากสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นสารที่ระเหยยากเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ต้องเตรียมในรูปของอนุพันธ์และสารเกิดการสลายตัว เทคนิคดังกล่าวจึงเป็นเทคนิคที่ไม่เหมาะสมเหมือนเทคนิค HPLC ซึ่งสามารถแยกและหาปริมาณ homologue ของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์และปริมาณรวมของสารประกอบประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมาเป็นการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่มีในตัวอย่างของน้ำยาล้างตา เครื่องดื่ม แต่ยังไม่มีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ในตัวอย่างกากน้ำตาล ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ทำเพื่อศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อใช้สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็น markerในการติดตามถึงแหล่งที่มาของกากน้ำตาลเมื่อมีการปล่อยกากน้ำตาลสู่สิ่งแวดล้อมหรือใช้ตรวจสอบการตกค้างของสารที่มีในผลิตภัณฑ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาเทคนิคในการตรวจวัดสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ตกค้างใน ตัวอย่างกากน้ำตาลได้ในระดับต่ำด้วยเทคนิค HPLC
2. ประยุกต์เทคนิคทาง HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ เพื่อใช้เป็น marker ในตัวอย่างกากน้ำตาล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ตกค้างในกากน้ำตาลได้ระดับต่ำให้ผลที่แม่นยำ
2. ได้เสนอแนวทางในการวิเคราะห์สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์อื่นและในสิ่งแวดล้อม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

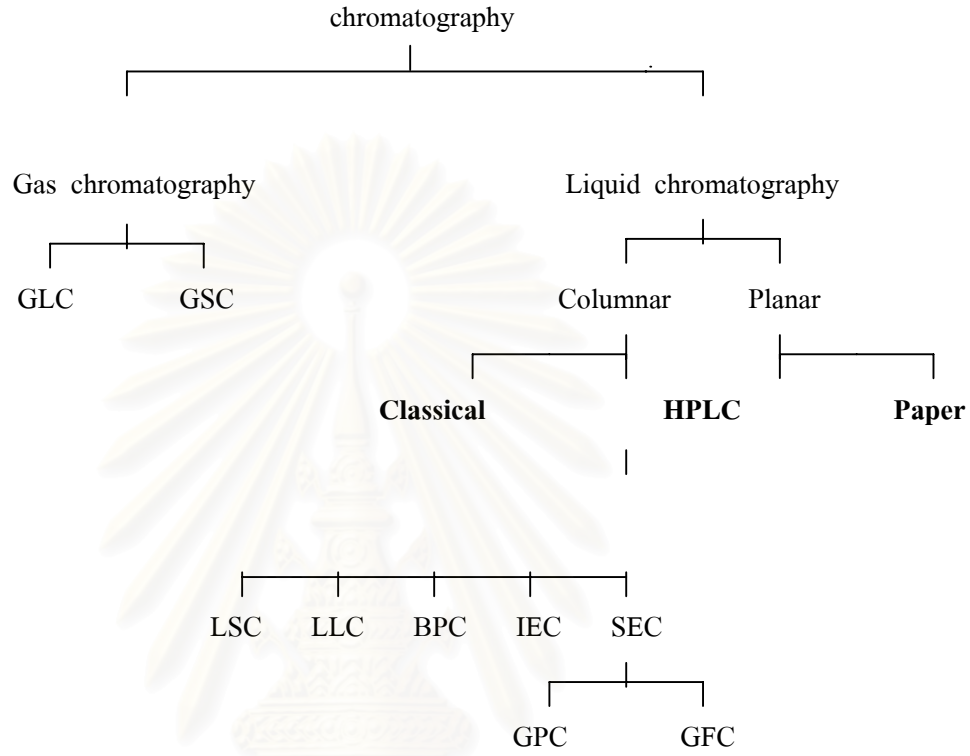
2.1 หลักการพื้นฐานของโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างสองเฟสคือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊สหรือของเหลวกับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุงที่บรรจุในคอลัมน์ เคลือบแผ่นกระจก หรือเคลือบบนกระดาษ เฟสอยู่กับที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบสารตัวอย่างออกจากกัน ความสามารถในการแยกสารขึ้นกับความจำเพาะของสารตัวอย่างที่มีต่อเฟสอยู่กับที่เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่องค์ประกอบสารชนิดต่างๆในสารตัวอย่างจะเคลื่อนผ่านเข้าออกระหว่างเฟสทั้งสองหลายๆครั้งหรือมีการหน่วงเหนี่ยวไว้กับเฟสอยู่กับที่ (พวงแก้ว ลัคนทินพร, 2539)

การกระจายตัวที่แตกต่างกันขององค์ประกอบเกิดจากความแตกต่างคุณสมบัติทางกายภาพหรือคุณสมบัติทางเคมี เช่น จุดเดือด การละลาย ความมีขั้ว ทำให้แต่ละองค์ประกอบเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันนำไปสู่การแยกในที่สุด การจำแนกเทคนิคทางโครมาโทกราฟีสามารถจำแนกโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เช่น ถ้าเฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊สเรียก แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) ถ้าเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลวเรียกว่าลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid chromatography) นอกจากนี้ยังจำแนกตามอัตรกิริยาดังรูปที่ 1

HPLC (High performance liquid chromatography) เป็นเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีการพัฒนาโดยลดขนาดอนุภาคที่บรรจุและใช้ปั๊มที่มีแรงดันสูงช่วยในการไหลของเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบใดที่เกิดอัตรกิริยาหรือกระจายตัวในชั้นของเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่าจะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานส่วนสารหรือองค์ประกอบใดที่มีอันตรกิริยาหรือกระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าจะถูกชะ(elute) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า HPLC มีข้อดีคือ มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสาร ให้ผลที่ถูกต้อง ใช้เวลาน้อย ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องคุณสมบัติการกลายเป็นไอและความเสถียรทางความร้อน

สามารถใช้งานได้ทั้งการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ปัจจุบันได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในงานหลายสาขาเช่น ทางอุตสาหกรรม วิทยาศาสตร์การแพทย์และทางด้านวิทยาศาสตร์



รูปที่ 1 แสดงการจำแนกวิธีการทางโครมาโทกราฟี (ที่มา: พวงแก้ว ลัคนทินพร, 2539)

GLC = Gas Liquid Chomatography

GSC = Gas Solid Chromatography

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

HPTLC = High Performance Thin-Layer Chromatography

PC = Paper Chromatography

TLC = Thin Layer Chromatography

LSC = Liquid Solid Chromatography

LLC = Liquid Liquid Chromatography

BPC = Bonded Phase Chromatography

IEC = Ion Exchange Chromatography

SEC = Size Exclusion Chromatography

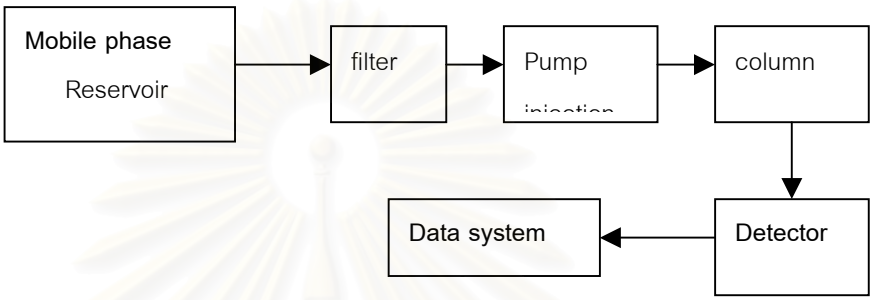
GPC = Gel Permeation Chromatography

GFC = Gel Filtration Chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC

HPLC เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิดเป็นเครื่องมือที่มีความไว (sensitivity) สูง สามารถประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC แสดงดังรูปที่ 2



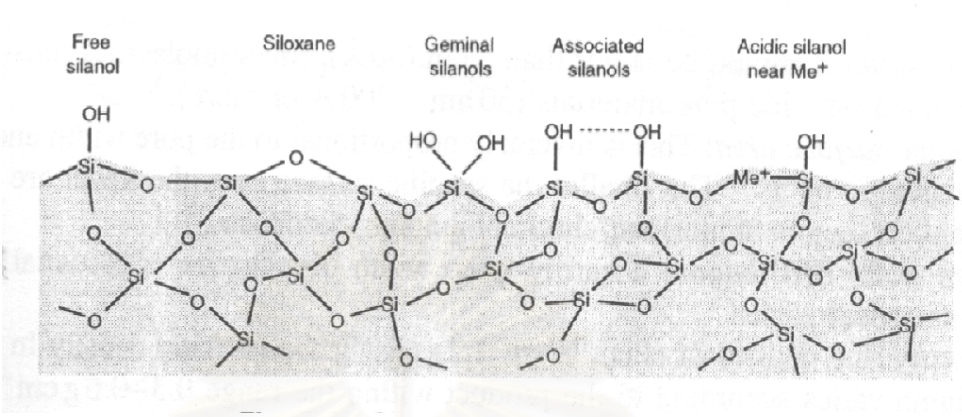
รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC (ที่มา: สุนันท์ รังสีกาญจน์ส่อง, 2534)

Mobile phase reservoir โดยทั่วไปมักใช้พวกแก้วหรือ stainless stell เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ใน HPLC ต้องปราศจากฟองอากาศซึ่งอาจเข้าไปรบกวนการทำงานของปั๊มหรือ detector จึงต้องมีการขจัดฟองอากาศโดยการกรองตัวทำละลายที่ต้องการใช้ผ่าน Millipore filter ภายใต้สูญญากาศ ส่วนปั๊มที่ใช้งานใน HPLC จะออกแบบเพื่อขับเฟสเคลื่อนที่ให้มีอัตราการไหลสม่ำเสมอ มีความดันคงที่และมี pulse เกิดน้อยที่สุด ปั๊มที่นิยมใช้ในระบบ HPLC ได้แก่ Reciprocating pump ซึ่งทำงานสองจังหวะคือจังหวะดูดเป็นจังหวะที่บรรรจุเฟสเคลื่อนที่และจังหวะผลักเป็นจังหวะที่ขับเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC ทำให้เกิดการแทนที่ที่แน่นอนของเฟสเคลื่อนที่ต่อหนึ่งหน่วยเวลา

คอลัมน์ใน HPLC ประกอบด้วยวัสดุบรรจุที่มีขนาด 3-10 ไมครอนโดยทั่วไปบรรจุในท่อ stainless steel มีความยาวโดยทั่วไป 25-30 เซนติเมตรและสามารถจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆ โดยพิจารณาจากเส้นผ่าศูนย์กลางภายในได้ดังนี้(เคมีสาร, 2537)

Microbore column	เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน	1-2 มิลลิเมตร
Analytical column	,,	3-5 ,,
Preparative column	,,	>10 ,,

ภายในคอลัมน์จะบรรจุอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ซึ่งวัสดุที่นิยมใช้เป็นเฟสอยู่กับที่คือ ซิลิกาเจล มีลักษณะดังรูปที่ 3



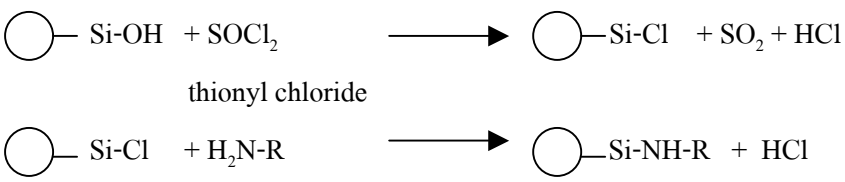
รูปที่ 3 วัสดุที่บรรจุใน HPLC คอลัมน์ (ที่มา: Veronika R.Meyer , 1998)

ซิลิกาเจลประกอบด้วยหมู่ Si-OH ที่มีความเป็นขั้วสูงแต่มีข้อเสียคือไม่มี reproducibility จึงได้มีการดัดแปลงเป็นแบบ boned phase โดยบดบัง Si-OH ด้วยหมู่ที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ Si-OH ซึ่งวิธีพื้นฐานการเกิดพันธะทางเคมีระหว่าง stationary liquid phase กับ supporter ซึ่งเป็นซิลิกามีอยู่ 3 วิธีได้แก่

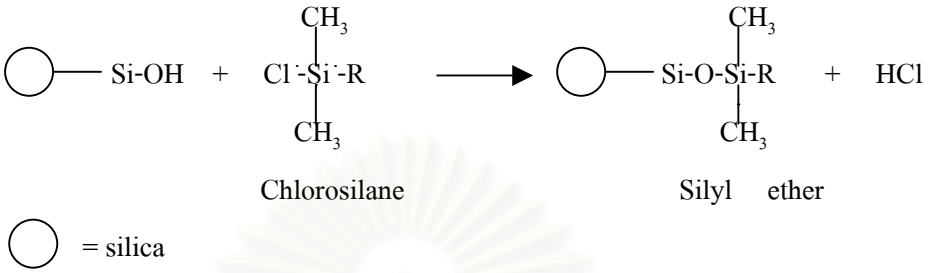
1. การเกิดปฏิกิริยาของ silanol group กับแอลกอฮอล์(ROH)ซึ่งหมู่ R อาจเป็นหมู่อัลคิล หรือ

ฟังก์ชั่นกรุ๊ปอื่นซึ่ง bond ของ silyl ถูก hydrolyse ได้ง่ายใน aqueous solution

2. การเกิดปฏิกิริยาของ silanol group กับ thionyl chloride ซึ่ง Si-Cl สามารถทำปฏิกิริยากับเอมีนเกิดเป็น Si-N



3. การเกิด Si-O-Si-C โดยการทำปฏิกิริยาของ silanol group กับ monochlorosilaneหรือ dichlorosilane ซึ่งเป็น bond phase ที่เสถียร



Polarity ของ boned phase จะขึ้นกับหมู่ R กรณีที่หมู่ Rเป็นพวกไม่มีขั้วเช่น C_{18}, C_8 การจับของตัวถูกละลายขึ้นกับจำนวนและชนิดของหมู่อัลเคนที่ใช้ ส่วนกรณีของ size exclusion chromatography เฟสอยู่กับที่ที่ใช้ได้แก่ polystyrene divinylbenzene (PSDVB) เมื่อสารตัวอย่างถูกแยกผ่านคอลัมน์จะผ่านต่อไปยังเครื่องตรวจวัด ซึ่งเครื่องตรวจวัดที่ดีควรมีความไว (sensitivity) เพียงพอ มีสัญญาณตอบรับที่ดี ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่และอุณหภูมิ ให้ค่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับเป็นเส้นตรง (linearity)ในช่วงกว้าง ไม่ทำลายสารตัวอย่างและมี internal volume น้อยๆเพื่อลดปัญหาความกว้างของพีก

เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในเทคนิค HPLC แบ่งออกเป็นสองประเภทคือ bulk property detector และแบบ solute property detector เครื่องตรวจวัดประเภท bulk property detector จะวัดคุณสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่เมื่อมีและไม่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เปรียบเทียบกันจะมีสภาพไวต่ำกว่าแบบ solute property detector ตัวอย่างเครื่องตรวจวัดชนิดนี้ได้แก่ refractive index, conductivity ส่วนแบบ solute property detector จะวัดคุณสมบัติทางกายภาพแต่ละส่วนประกอบของสารตัวอย่างที่แยกออกมาตัวอย่างเครื่องตรวจวัดประเภทนี้ได้แก่ ultraviolet visible absorbance, fluorescence, electrochemical detector

2.3 กลไกการแยกทาง HPLC

HPLC สามารถจำแนกการแยกตามกลไกโดยอาศัยอัตรกิริยาระหว่างสารกับเฟสอยู่กับที่เป็นหลัก

2.3.1 Adsorption Chromatography หรือ Liquid solid Chromatography (LSC)

เป็นเทคนิคใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน โดยใช้เฟสอยู่กับที่ชนิดที่มีขั้วและเฟสเคลื่อนที่ชนิดไม่มีขั้ว อนุภาคที่บรรจุใช้สารอนินทรีย์ที่มีขั้วเช่นซิลิกาหรือ alumina เป็นเฟสอยู่กับที่และสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้วเช่น เฮกเซน เมธิลีนคลอไรด์เป็นเฟสเคลื่อนที่ (สุนันท์ รังสีกาญจน์ส่อง, 2534) กลไกการแยกเกิดจากอัตรกิริยาของเฟสอยู่กับที่กับฟังชั่นกรุ๊ปของโมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีขั้ว การเหนี่ยวรั้งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนและชนิดของฟังชั่นนัลกรุ๊ปที่มีขั้ว ฟังชั่นนัลกรุ๊ปของสารที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ silanol group อิสระที่อนุภาคจะถูกเหนี่ยวรั้งแต่เนื่องจากพื้นที่ผิวของซิลิกามีสมบัติเป็นกรดอ่อนเมื่อสารที่เป็นเบสไปเกาะทำให้เกิด tailing peak นอกจากนี้มักดูดซับน้ำหรือสารมีขั้วทำให้ active site ถูก deactivate ทำให้ยากต่อการชะให้ได้พีกที่สมมาตร

2.3.2 Partition Chromatography

สามารถจำแนกได้เป็น 2 แบบคือ liquid liquid chromatography ซึ่งใช้ของเหลวที่เป็นเฟสอยู่กับที่เคลือบบนสารที่เป็น inert support โดยที่เฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ไม่ละลายซึ่งกันและกันแต่เนื่องจากในทางปฏิบัติทั้งสองเฟสละลายกันได้บ้างทำให้เฟสอยู่กับที่มีปริมาณน้อยลงเมื่อเปลี่ยนสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ จึงมีการพัฒนาแบบ bonded phase chromatography โดยทำให้เกิดพันธะเคมีกับอนุภาคที่ใช้เป็น innert support ชนิดของ bonded phase chromatography สามารถจำแนกเป็น

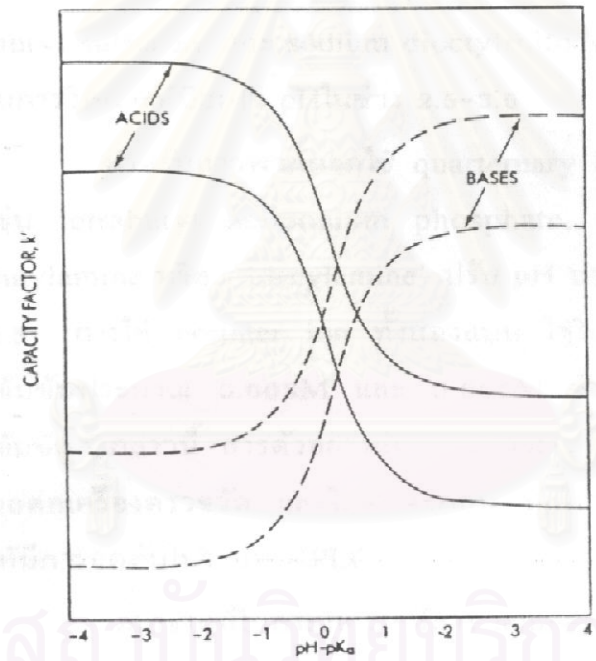
1) Normal phase chromatography เฟสอยู่กับที่มีสภาพขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่กลไกการแยกเหมือนกับ Adsoprtion chromatography

2) Reverse phase chromatography เฟสอยู่กับที่เป็นหมู่ฟังก์ชั่นที่ไม่มีขั้วหรือมีสภาพขั้วน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่

เฟสอยู่กับที่ที่นิยมใช้ใน reverse phase ได้แก่ C_{18}, C_8 และ alkyl aromatic phenyl เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น น้ำ สารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายเมธานอล กลไกการแยกขึ้นกับความแตกต่างของ hydrophobicity หรือความไม่มีขั้วของสาร สารที่ไม่มีขั้วจะถูกหน่วงเหนี่ยวได้ดีบนคอลัมน์และถูกชะออกช้ากว่าสารที่มีขั้วความเร็วของการถูกชะจะเพิ่มเมื่อลดสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ เทคนิค reverse phase สามารถประยุกต์ใช้แยกสารพวกไอออนิก สารประกอบที่

สามารถแตกตัว(ionizable compound) โดยดัดแปลงเฟสเคลื่อนที่ด้วยการควบคุม pH หรือการเติมสารพวก modifier เช่น counter ion ลงในเฟสเคลื่อนที่สามารถจำแนกตามกลไกได้เป็น

- Ion suppression chromatography ใช้แยกสารที่แตกตัวในสารละลายที่เป็นน้ำหรือสารพวกไอออนิกโดยการปรับ pH ของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้สารอยู่ในรูปสารที่ไม่แตกตัว (nonionic) สารที่แตกตัวที่ pH ของเฟสเคลื่อนที่จะถูกชะออกมาก่อนส่วนพวกที่ไม่แตกตัวจะถูกยึดเหนี่ยว (retain) บนคอลัมน์ การควบคุมการยึดเหนี่ยวของสารไอออนิกโดยวิธี ion suppression จะปรับ ionic strengthและ pH ของเฟสเคลื่อนที่ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมคือ pH ช่วง 3-8 ผลของ pHที่มีต่อการยึดเหนี่ยวสารพวกไอออนิกบนคอลัมน์ reverse phase ขึ้นกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน(H^+) ความสัมพันธ์ของค่า retention time หรือ capacity factor กับค่า pH-pKa แสดงได้ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงผลของ pH ที่มีต่อการยึดเหนี่ยวของสารไอออนิก (ที่มา: Waters sourcebook for chromatography column and supplies, 1985 อ้างถึงใน พวงแก้ว ลัคนทินพร, 2539)

จากรูปสารพวกกรดอ่อนจะ retain บนคอลัมน์นานเมื่อ pH เฟสเคลื่อนที่น้อยกว่าค่าpKa และถูกชะเร็วเมื่อ pH เฟสเคลื่อนที่สูงกว่าค่า pKa ส่วนสารพวกเบสจะให้ผลในทางตรงข้าม การแยกโดยเทคนิคนี้จะให้พีกที่แหลมแคบกว่าการแยกที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เหมือนกัน

- Ion pair chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารพวกกรดแก่ เบสแก่ ซึ่งไม่สามารถถูก suppression ในรูปสารที่ไม่แตกตัวช่วง pH 2-8 วิธี ion pair ทำโดยการปรับ pH เฟสเคลื่อนที่และเติมสารที่ใช้เป็น ion pair reagent ที่มีประจุตรงข้ามกับประจุสารตัวอย่าง counter ion ที่เติมจะไปจับกับไอออนสารตัวอย่างเกิด ion pair complex ในรูปสารที่ไม่แตกตัวจึงถูกหน่วงเหนี่ยวบนคอลัมน์นานและถูกชะออกมาช้ากว่าสารในรูปไอออนิก

ion pair reagent ที่นิยมใช้สำหรับสารพวกเบสได้แก่ alkylsulfonate sodium salt เช่น pentanesulfonate sodium salt, hexanesulfonate sodium salt ส่วนสารพวกกรด ion pair reagent ที่ใช้เป็นสารพวกควอเทอร์นารีเอมีนเช่น tetrabutyl ammonium phosphate, tetrabutyl amine การใช้ไอออนทั้งสองชนิดนิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.003 M และ 0.005 M การควบคุมการแยกหรือ retention time ของสารโดยเทคนิคนี้พิจารณาจากความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ ขนาดและความเข้มข้นของ ion pair reagent ที่ใช้ ถ้าเพิ่มความยาวของหมู่อัลคิลหรือความเข้มข้นของ ion pair reagent ค่า k′ของสารจะเพิ่มขึ้น

2.3.3 Ion exchange chromatography

กลไกการแยกโดยเทคนิค ion exchange เกี่ยวข้องกับสมดุลการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนสารตัวอย่างกับ counter ion ของ ion exchanger ที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีประจุเหมือนไอออนสารตัวอย่าง กลไกการแยกจะเกิดการแข่งขันระหว่างไอออนสารตัวอย่างกับไอออนที่มีในเฟสเคลื่อนที่ในการจับกับ ion exchanger การปรับปรุงความจำเพาะ(selectivity)ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายบัฟเฟอร์และ ionic strengthเพื่อลดการจับบนผิวของ ion exchanger

สารที่ใช้เป็น ion exchanger มีทั้ง organic และ inoganic resin ซึ่ง ion exchanger จำแนกได้เป็น anion exchanger มีประจุบวกเป็น active ionic groupได้แก่สารประกอบควอเทอร์นารีเอมีนใช้ในการแยกสารที่มีประจุลบส่วน cation exchange เฟสอยู่กับที่มีประจุลบเป็น active ionic group ได้แก่ พวก sulfonic acid เป็นพวก stong cationic group หรือ พวก carboxylic acid เป็น weak cationic groupใช้แยกสารที่มีประจุบวก

2.3.4 Size exclusion chromatography

เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างขนาดโมเลกุลของสารอนุภาคสารที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่เป็นพวกโพลีเมอร์ที่มีรุพรุนขนาดสม่ำเสมอ ถ้าสารตัวอย่างมีขนาดใหญ่กว่าขนาดอนุภาคเฟสอยู่กับที่จะถูกชะออกมาใช้เวลาอยู่ในเฟสเคลื่อนที่มาก

กลไกการแยกโดยเทคนิคนี้ตัวถูกละลายไม่เกิดอัตรกิริยาทางเคมีกับสารที่เป็นเฟสอยู่กับที่ แต่จะแยกสารตามขนาดโมเลกุลของสารสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

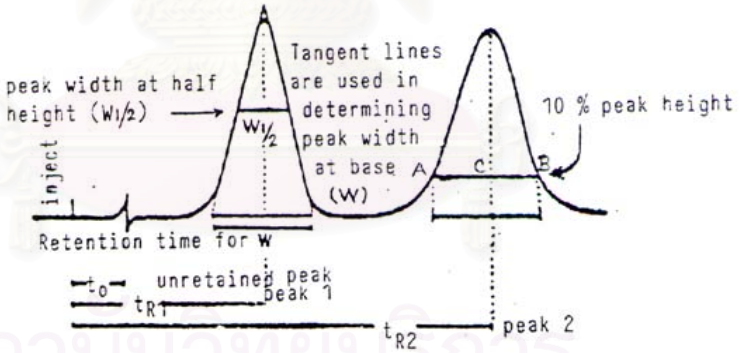
1) Gel filtration chromatography (GFC) เฟสอยู่กับที่เป็นสารพวก hydrophillic เฟสเคลื่อนที่เป็นพวกน้ำใช้แยกสารพวกโปรตีน

2) Gel permeation chromatography (GPC) เฟสอยู่กับที่เป็นพวก hydrophobic เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

2.4 พารามิเตอร์พื้นฐานทางโครมาโทกราฟี

การที่จะแยกสารออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพพารามิเตอร์พื้นฐานที่ต้องพิจารณาได้แก่

2.4.1 Retention time (t_R) เป็นค่าที่แสดงถึงระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่หรือคือเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนถึงตำแหน่งที่เป็นจุดยอดของพีกทางโครมาโทแกรมดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงโครมาโทแกรมการหาค่าพามิเตอร์ต่างๆ(ที่มา: สุนันท์ รังสีกาญจน์ส่อง, 2534)

ค่า t_R เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพแต่เมื่อสภาวะการทดลองเปลี่ยนค่า t_R จะมีค่าไม่คงที่จึงใช้พารามิเตอร์อื่นเช่น corrected retention time (t_R'), relative retention time แทน

2.4.2 Correct retention time (t_R') คือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวไว้กับเฟสอยู่กับที่

$$t_R' = t_R - t_0$$

โดยที่ t_0 คือ dead time หรือ เวลาที่สารที่ไม่ยึดเหนี่ยวคอลัมน์เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่หรือเทียบเท่ากับเวลาที่โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่

2.4.3 Retention volume (V_R) คือปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้พาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ หาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับ retention time ดังสมการ

$$V_R = f\, t_R$$

โดยที่ V_R คือ retention volume

F คือ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (มิลลิลิตร/นาที)

t_R คือ retention time ของสารตัวอย่าง

2.4.4 Corrected retention volume (V_R') คือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้พาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ แสดงความสัมพันธ์ดังสมการ

$$V_R' = V_R - V_0 = Ft_0$$

โดยที่V_0 คือ dead volume หรือ void volume เป็นปริมาตรที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.5 Capacity factor (k') เป็นค่าที่บอกถึงการหน่วงเหนี่ยวของสารบนคอลัมน์หาได้จากความสัมพันธ์

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

ค่า k ที่เหมาะสมควรมีค่าระหว่าง $1 < k' < 10$ ในกรณีที่ค่า k' ที่ได้จากการทดลองไม่เหมาะสมอาจทำให้การแยกของสารไม่ดีการปรับเปลี่ยนค่า k'ให้เหมาะสมทำได้โดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนผสมหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจากความแรงของตัวทำละลายจาก elutropic series ซึ่งจัดลำดับความแรงตัวทำละลายสำหรับเฟสอยู่กับที่แต่ละชนิดดังตารางที่ 1 ในทางปฏิบัติเพื่อให้การแยกเกิดขึ้นและไม่ใช้เวลาในการแยก k'นานถ้าต้องการเพิ่มค่า k' ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงน้อยในทางตรงข้ามถ้าต้องการลดค่าให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงความแรงตัวทำละลาย (ที่มา: Veronika R. Meyer, 1998)

Solvent	Strength e°	Viscosity η (mPas)	Refraction Index n^{20}	UV cutoff (nm)	Boling Point ($^{\circ}$C)	Dipole π^*	Acidity α	Basicity β
Fluoroalkane FC-78	-0.19	0.4	1.267	210	50			
n-Pentane	0.00	0.23	1.3575	195	36			
n-Hexane	0.00	0.33	1.3749	190	69			
Isoctane	0.01	0.50	1.3914	200	99			
Cyclohexane	0.03	1.00	1.4262	200	81			
Cyclopentane	0.04	0.47	1.4064	200	49			
Carbon tetrachloride	0.14	0.97	1.4652	265	77			
p-Xylene	0.20	0.62	1.4958	290	138	0.81	0.00	0.19
Diisopropyl ether	0.22	0.37	1.3681	220	68	0.36	0.00	0.64
Toluene	0.22	0.59	1.4969	285	111	0.83	0.00	0.17
Chlorobenzene	0.23	0.80	1.5248	290	132	0.91	0.00	0.09
Benzene	0.25	0.65	1.5011	280	80	0.86	0.00	0.14
Diethyl ether	0.29	0.24	1.3524	205	34.5	0.36	0.00	0.64
Dichloromethane	0.30	0.44	1.4242	230	40	0.73	0.27	0.00
Chloroform	0.31	0.57	1.4457	245	61	0.57	0.43	0.00
1,2-Dichloroethane	0.38	0.79	1.4448	230	83	1.00	0.00	0.00
Triethylamine	0.42	0.38	1.4010	230	89	0.16	0.00	0.84
Acetone	0.43	0.32	1.3587	330	56	0.56	0.06	0.38
Dioxane	0.43	1.54	1.4224	220	101	0.60	0.00	0.40
	0.46	0.37	1.3614	260	56	0.55	0.05	0.40
	0.48	0.46	1.4072	220	66	0.51	0.00	0.49

Methyl acetate	0.48	0.35	1.3689	220	53	0.36	0.00	0.64
Tetrahydrofuran	0.48	0.45	1.3724	260	77	0.55	0.00	0.45
tert. Butylmethyl	0.48	2.24	1.4783	270	189	0.57	0.00	.043
ether	0.49	0.67	1.3819	380	101	0.64	0.17	0.19
Ethyl acetate	0.50	0.37	1.3441	190	82	0.60	0.15	0.25
Dimethyl	0.55	0.94	1.5102	305	115	0.58	0.00	0.42
sulphoxide	0.60	2.3	1.3772	210	82	0.22	0.35	0.43
Nitromethane	0.68	1.20	1.3614	210	78	0.25	0.39	0.36
Acetonitrile	0.73	0.60	1.3284	205	65	0.28	0.43	0.29
Pyridine	High	1.26	1.3719	260	118	0.31	0.54	0.15
Isopropanol	Higher	1.00	1.3330	<190	100	0.39	0.43	0.18
Ethanol	Highest							
Methanol								
Acetic acid								
Water								
Salt solutions,								
buffers								

* Becomes solid at 350 bar!

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4.6 Selectivity factor (α) เป็นค่าที่บอกถึงการแยกของพีกสารที่ติดกันว่าแยกออกจากกันได้ดีเพียงใดและเป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่มีสภาวะการทำงานดีเพียงใด ในการแยกสารค่า α จะต้องมีค่ามากกว่า1จึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ค่า α สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ดังสมการ

$$\alpha = t_{R2}' / t_{R1}' = k_2' / k_1'$$

โดยที่ α คือ ค่า selectivity factor

k_2' คือ ค่า capacity factor ของพีกที่สอง

k_1' คือ ค่า capacity factor ของพีกแรก

t_{R1}' คือ ค่า corrected retention time ของพีกแรก

t_{R2}' คือ ค่า correction retention time ของพีกที่สอง

การควบคุมหรือการเปลี่ยนค่า α เพื่อให้สารสองชนิดที่ใกล้กันแยกออกจากกันทำได้โดยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ โดยเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบหรือการเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ นิยมใช้กับการแยกสารที่มีการแตกตัวเป็นไอออน การเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่จะทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลงแต่ค่า k' เปลี่ยนแปลงไม่มากนักนิยมใช้ในเทคนิค ion exchange, ion pair และ ion suppression นอกจากนี้อาจเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์หรือเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์

2.4.7 Column efficiency ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีกที่ถูกชะคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีพีกจะมีฐานที่แคบและพีกแยกออกจากกัน ค่าที่ใช้พิจารณาประสิทธิภาพคอลัมน์คือจำนวนเพลทของคอลัมน์ (Number of theoretical plate, N) สามารถคำนวณได้จากดังสมการ

$$N = a\,(t_R/W)^2$$

โดยที่ N คือ ค่า Number of theoretical plate

t_R คือ ค่า retention time ของสาร

W คือ ความกว้างของพีกที่ตำแหน่งความสูงที่กำหนด

a คือ ค่าคงที่ขึ้นกับการวัดความกว้างของพีกดังตารางที่2

ตารางที่ 2 แสดงค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีกโดยวิธีต่างๆ (ที่มา:พวงแก้ว ลัคนทินพร, 2539)

วิธี	a
ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง	5.54
ความกว้างของพีกที่ 4.4%ของความสูง	25
Tanger	16

การคำนวณค่า N มีประโยชน์ใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้เมื่อทำการทดลองที่สภาวะเดียวกันถ้าคอลัมน์ใดให้ค่า N สูงคอลัมน์นั้นมีประสิทธิภาพที่ดี

2.4.8 Heigh equivalent of a theoretical plate (HETP) เป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ซึ่งหาได้จากความสัมพันธ์

$$H = L/N$$

โดย H คือ ค่า Heigh equivalent of a theoretical plate

L คือ ความยาวของคอลัมน์

N คือจำนวนเพลท หรือ number of theoretical plate

2.4.9 Resolution (Rs) เป็นค่าที่บอกให้รู้ว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใดพิจารณาได้จากความสัมพันธ์

$$Rs = t_{R2} - t_{R1} / 0.5(W_1+W_2)$$

โดยที่ W_1 คือ ความกว้างของพีกแรก

W_2 คือ ความกว้างของพีกที่สอง

t_{R1} คือ ค่า retention time ของพีกแรก

t_{R2} คือ ค่า retention time ของพีกที่สอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

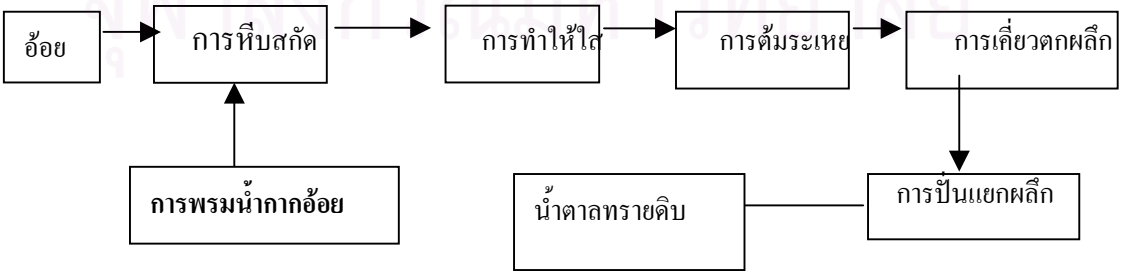
2.5 กระบวนการผลิตน้ำตาล

การผลิตน้ำตาลจากอ้อยคือการแยกน้ำตาลซูโครสออกจากต้นอ้อยภายหลังจาการกำจัดสิ่งเจือปนต่างๆออกจนได้ผลึกของน้ำตาลซูโครสที่บริสุทธิ์สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆดังต่อไปนี้

1. การสกัดน้ำอ้อยออกจากอ้อย (Extraction of juice)
2. การทำน้ำอ้อยให้บริสุทธิ์ (Purification of juice)
3. การตกผลึกน้ำตาล (Crytallization)
4. การแยกผลึกน้ำตาลออกจากน้ำตาล (Purging)

กระบวนการผลิตน้ำตาลเริ่มจากนำอ้อยที่ผ่านการชั่งน้ำหนักผ่านสายพานลำเลียงอ้อยไปยังใบมีดจากนั้นอ้อยจะถูกลำเลียงไปยังลูกหีบ (mills) เพื่อทำการสกัดน้ำอ้อยหรือการหีบอ้อย ในระหว่างการหีบสกัดจะมีการพรมน้ำโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70°C เพื่อสกัดน้ำอ้อยออกมาให้ได้มากที่สุด น้ำอ้อยที่สกัดได้จากลูกหีบแต่ละชุดจะไหลรวมกันเรียกว่า น้ำอ้อยรวม (mixed juice) ซึ่งมีค่า pHประมาณ 5.5 การหีบสกัดอ้อยถ้าใช้เวลาในการหีบสกัดอ้อยนานเกินไปจะเกิดการสูญเสียน้ำตาลเนื่องจากการเกิดอินเวอร์ชั่น และถ้าลูกหีบสกปรกจะเกิดการหมักหมมของจุลินทรีย์พวก *Leuconostoc mesenteroides* ทำให้น้ำอ้อยมีลักษณะเหนียวคล้ายวุ้น(กรมวิชาการเกษตร, 2523)

จากนั้นน้ำอ้อยที่ได้จากการหีบสกัดมีสีเขียวคล้ำและขุ่นจะผ่านกระบวนการทำน้ำอ้อยให้บริสุทธิ์ซึ่งโดยทั่วไปได้แก่ กระบวนการคือดีฟิเคชั่น (defication process) โดยใช้ปูนขาวปรับสภาพน้ำอ้อยให้เป็นกลางและจับตัวเป็นตะกอนของสารประกอบปูนขาวที่ไม่ละลายน้ำ(วรรณ์นภา, 2538) น้ำอ้อยเมื่อผ่านระบวนการดังกล่าวแล้วจะมีลักษณะใสจากนั้นนำน้ำอ้อยใสที่ได้ผ่านไปยังหม้อต้มสุญญากาศเพื่อระเหยน้ำออกก่อนส่งไปยังถังพักเพื่อผ่านขั้นตอนการเคี่ยวและขั้นตอนการตกผลึกน้ำตาล และขั้นตอนการปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกจากกากน้ำตาล



รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการผลิตน้ำตาลทรายดิบ (ที่มา: สันต์ ฉายาตระกูล, 2529)

ส่วนน้ำตาลทรายขาวเป็นผลึกน้ำตาลซูโครส ผลิตเหมือนน้ำตาลทรายดิบแต่มีการฟอกสี น้ำอ้อยและน้ำเชื่อมตามกรรมวิธี ซัลฟิเตชั่น คาร์โบเนชั่น และion exchange resin

2.5.1 กากน้ำตาล(Molasses)

เป็นผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายที่มีประโยชน์มีลักษณะเป็นของเหลวข้น เหนียวสีน้ำตาลปนดำเป็นของเหลวที่หล่อเลี้ยงผลึกน้ำตาลโดยทั่วไปแบ่งเป็น 3 ชนิด (ภัทรา มณีธวัช , 2520) ขึ้นกับกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลได้แก่

1. Blackstrap molasses หมายถึง กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว
2. Refinary molasses หมายถึง กากน้ำตาลที่ได้จาการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์
3. Invert molasses หมายถึงกากน้ำตาลที่ได้จากการกระทำบางส่วนของน้ำอ้อยแปร สภาพให้ข้นขึ้นโดยการระเหยเป็นกากน้ำตาลที่ไม่มีน้ำตาลชนิดที่จะนำไปผลิตเป็นน้ำตาลทรายได้

- ส่วนประกอบโดยทั่วไปของกากน้ำตาล

	ร้อยละ
น้ำ	17-25
น้ำตาลซูโครส	30-40
น้ำตาลอินเวอร์ส	10-25
เถ้า	7-15
สารอินทรีย์ที่ไม่ใช่น้ำตาล	10-20
ไนโตรเจน	0.86
ฟอสฟอรัส	0.18
แคลเซียม	0.50
โปแตสเซียม	3.00
เหล็ก	0.045
ทองแดง	0.45
โซเดียม	0.38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

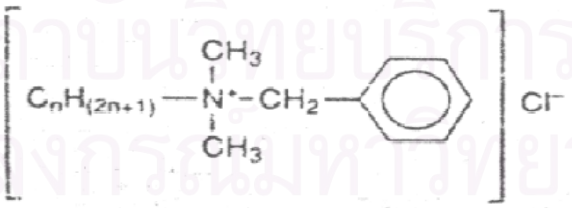
- ประโยชน์ของกากน้ำตาล

นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเช่น อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมเป็นผลพลอยได้จากการผลิตแอลกอฮอล์เช่น ethylene, acetone, chloroform, อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ อุตสาหกรรมการหมัก อุตสาหกรรมการผลิตผงชูรสและส่งเป็นสินค้าออก เพื่อป้องกันการเกิด inversion ของน้ำตาลจากแบคทีเรียและป้องกันการเน่าเสียของกากน้ำตาลสามารถนำกากน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการหมัก ในกระบวนการผลิตน้ำตาลจึงมีการเติมสารฆ่าเชื้อซึ่งเป็นสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (Quaternary ammonium compound) หรือ quat เช่น สารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium chloride) ซึ่งมีชื่อทางการค้าอื่นได้แก่ zephiran, Rodalon, Germinol, BTC, Benirol, Roccal, Osvan เป็นต้น Benzalkonium chloride เป็นสารประกอบที่ใช้ฆ่าเชื้อแบคทีเรียส่วนมากจะใช้ในผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมเช่น น้ำยาล้างตา นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว ใช้ทำความสะอาดในอุตสาหกรรมนมและอาหาร(Troller,1993) สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมสามารถเตรียมได้หลายวิธีขึ้นกับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ต้องการแต่ส่วนมากได้จากการทำปฏิกิริยาของ Alkylating agent กับ tertiary amine ดังสมการ

$$RX + R'R''R'''N \longrightarrow R'R''R'''RN^{+}X^{-}$$

Alkyl halide 3^{o} amine quaternary ammonium salt

โดยที่ R', R'', R''' และ R อาจจะเป็น aromatic ring, alkyl group, aryl group ที่เหมือนกันหรือต่างกันสำหรับ benzalkonium chlorideเป็นส่วนผสมของ alkyldimethylbenzylammonium chloride มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 7



(n = 12, 14, 16. 18)

benzalkonium chloride

รูปที่ 7 แสดงสูตรโครงสร้างของbenzalkonium chloride(ที่มา: Tayor R.B, 1992)

ลักษณะสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์จะเป็นผงสีขาวหรือ gelatin ละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ ละลายบ้างในเบนซิน ไม่ละลายในอีเธอร์ มีคุณสมบัติเป็นสารพวก cationic surfactant ค่า LD_{50} orally ในกบ 30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นอกจากสารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์แล้ว ในกระบวนการผลิตยังใช้สารฆ่าเชื้อซึ่งเป็นสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมชนิดอื่นเช่น Hexamine X100, Qemiquat 2850, W ell-Q และ Talocide Q เพื่อลดสีของน้ำอ้อย ควบคุมกลิ่น ลดการเกิด inversion ของน้ำตาล โดยทั่วไปในกระบวนการผลิตจะเติมสารฆ่าเชื้อในขั้นตอนก่อนและหลังการหีบอ้อยและเติมไปในน้ำอ้อยรวม

การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC สารตัวอย่างที่นำมาฉีดเข้าระบบได้ต้องเป็นสารละลายที่ใสไม่มีสิ่งเจือปน สิ่งที่จำเป็นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องคือการเตรียมตัวอย่างเช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การกรอง การทำปฏิกิริยา การตกตะกอน การเตรียม derivatize และวิธี solid phase extraction วิธีที่ใช้บ่อยคือการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่วิธีนี้อาจพบปัญหาจากการเกิดemulsion เทคนิค solid phase extraction เป็นวิธีเตรียมตัวอย่างที่ใช้หลักการ partition เหมือนการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่จะใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่สนใจโดยของแข็งจะบรรจุใน SPE เรียกว่า sep pak (ชูชีพ พึ่งสมพงษ์, 1996) ข้อดีการใช้ sep pakในการเตรียมตัวอย่างคือประหยัดเวลาเพราะมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างน้อย ให้ความแม่นยำสูงเมื่อทำปริมาณวิเคราะห์ไม่เกิดปัญหา emulsion

ขั้นตอนการใช้ sep pak ในการเตรียมตัวอย่างได้แก่

1. condition เป็นการเตรียม packing ที่บรรจุในแท่ง SPEให้พร้อมรองรับตัวอย่าง
2. load เป็นการใส่ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ packing ที่บรรจุใน sep pak
3. rinse เป็นการขจัดสารที่จับกับ solid phase extractionได้น้อยออก
4. elution เป็นการดึงเอาสารที่สนใจที่เกาะกับ packing ที่บรรจุใน sep pak ออกเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการเลือก SPE ให้เลือก packing ที่บรรจุใน sep pak มี polarity ตรงกับสารที่ต้องการแยก ตัวอย่างการเลือก cartridge แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการเลือกใช้ Sep pak cartridges (ที่มา : เพอชา เฮงตระกูล, 2529)

Sorbent หรือ Packing Material	**คุณสมบัติที่ผิว**	**การวิเคราะห์ที่ใช้**
C_{18}	Hydrophobic bonded silica	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ยา และ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลืองและปัสสาวะ - สารอินทรีย์ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำ น้ำเสีย - กรดอินทรีย์ ในพวกเครื่องดื่มและไวน์ - Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
C_8	Hydrophobic non-polar bonded	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous -ใช้เมื่อต้องการให้สาร retain น้อยลงกว่าแบบ C_{18} - ยาและ metabolite ของยาในเลือด น้ำเหลืองและปัสสาวะ - Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
Silica	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสารที่มี polarity ต่ำ ถึงปานกลางออกจากสารละลาย non-aqueous -ไวตามิน A D E K - ยาฆ่าแมลง -ไขมันชนิดต่างๆ - สารสกัดจากธรรมชาติ pigment จากพืช - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Cyanopropyl CN	Hydrophobic moderately nonpolar (Neutral)	- วิเคราะห์สารที่ละลายใน aqueous, organic - ยาและ metabolite ของยาจากน้ำใส่วนต่างๆของร่างกาย - ยาฆ่าแมลง - peptide ที่มีโครงสร้างเป็นสาร hydrophobic - metabolite จากเชื้อราและผลิตภัณฑ์จากการหมัก

2.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Auerbach, Lioyd และ Particia (1943) ได้หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมได้แก่ สารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak)โดยวิธี colorimetric method ในสารละลายทิงเจอร์ที่มีความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม โดยทำให้เกิดสารประกอบของควอเทอร์นารีแอมโมเนียมกับสารละลายโบรโมฟีนอลบลูอัตราส่วน1:1โดยมวลในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และสกัดแยกสารประกอบเชิงซ้อนให้อยู่ในชั้นของสารละลายเอธิลีนคลอไรด์และวัดความเข้มสีของสารประกอบเชิงซ้อน

Meryer (1980) ใช้เทคนิค reverse phase HPLC วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak) ที่มีในน้ำยาล้างตาความเข้มข้น 0.004% โดยใช้ μ bondapak CN 10 μm (30 cm x 4 mmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่คือ 60% acetonitrile : 40% 0.1 M sodium acetateปรับ pH เท่ากับ 5 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 2.0 มิลลิลิตร/นาที ใช้UVเป็นเครื่องตรวจวัดตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีด 30 ไมโครลิตร กรองตัวอย่างผ่าน filter ขนาด 1 μm ก่อนฉีดผ่านระบบ HPLC จากการทดลองพบว่าเทคนิคนี้สามารถแยก homologue ของสารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ โดยพบ homologue C_{12}>C_{14}>C_{16}>C_{10}, C_{18} ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (detection limit) มีค่า 40 พีพีเอ็ม ค่า reproducibility สำหรับ homologue C_{12} มีค่าRSD ± 2.0% , homologue C_{14} มีค่า RSD ± 3.7%และ homologue C_{16} มีค่า RSD ± 8.7%

Ruyter, Chronnelly และ Castagnoli (1980) ได้ใช้เทคนิค ion pair RP HPLC แยกสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมได้แก่ pyridostigmine, eostigmine, edrophonium โดยใช้ Lichrosorb RP 18 10 μm (15 cm x 0.32 cmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่คือ 0.01 M $C_7H_{15}SO_3Na^+$, 0.01 M NaH_2PO_4, 0.0025 M tetrabutylammonium hydrogensulfate ($TBAHSO_4^-$)ในสารละลายอะซิโตไนไตร : น้ำ อัตราส่วน(20 : 80 v/v) สำหรับวิเคราะห์ neostigmine และ edrophnium ใช้อัตราส่วนสารละลายอะซิโตไนไตร : น้ำ (17 : 83 v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร การทดลองจะให้ค่าช่วงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (linearity) ของ neostigmine ที่ความเข้มข้น 0-400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, pyridostigmine ที่ความเข้มข้น 0-1000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, edrophonium ที่ความเข้มข้น 0-1500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดทุกสารมีค่า 5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

Victorio และ Kennedy (1982) หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมได้แก่ ditallowdimethylammonium chloride (DTMAC) และ dodecyltrimethylammonium chloride(DDTMAC) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ดูดกลืนรังสี UV และ stearyldimethylbenzylammonium chloride(STEDBAC), 1-hexadecylpyridinium chloride ซึ่งเป็นสารที่ดูดกลืนรังสี UV ในแหล่งน้ำ โดยใช้ cyano amino column (25 cm x 4.6 mmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายคลอโรฟอร์ม : สารละลายเมธานอล อัตราส่วน (92 : 8 v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้ conductivity เป็นเครื่องตรวจวัดฉีดสารตัวอย่างที่วิเคราะห์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณสารดังกล่าวโดยเก็บตัวอย่างแหล่งน้ำจากพื้นที่ที่ต่างกัน 4 จุดปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร

จากนั้น preserved ด้วย 1% ฟอร์มาลีนและเติม linear alkylbenzene sulfonate (LAS)ในสภาวะที่เป็นกรด จากนั้นสกัดแยกสารประกอบเชิงซ้อนให้อยู่ในชั้นของสารละลายเมธิลีนคลอไรด์ นำไประเหยภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนและสกัดย้อนกลับ (back extraction) ด้วยน้ำกลั่น นำส่วนที่เหลือละลายในเฟสเคลื่อนที่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากการทดลองพบว่าสารแต่ละชนิดให้ค่า r^2>0.99 และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารตัวอย่างมีค่า 0.02 ไมโครกรัมและค่าการกลับคืนของสาร DTMAC มีค่า 20 พีพีบี STEDBAC มีค่า 10 พีพีบีและ DDTMAC มีค่า 10 พีพีบี การวิเคราะห์โดยวิธีนี้เมื่อเพิ่มขั้นตอนการ back extraction ด้วยน้ำกลั่นพบว่าสามารถกำจัดสารที่สามารถแตกตัวและลดความกว้างพีกของ LAS

Dennis และ Lioyd (1983) ศึกษาการหาปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak) โดยเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนของ bak กับสารละลาย methyl orange และสกัดด้วย 1,2 dichloroethane โดยใช้ homologue C_8 , C_{18}ของสาร bak เป็น internal standard วิเคราะห์ด้วยเทคนิค RP HPLC โดยมี μ bondapak CN 10 μm (30 cm x 4 mmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตร : 0.161 M sodium propionate อัตราส่วน (58 : 42 v/v) ปรับ pH เท่ากับ 5.35 ปริมาตรสารละลายที่ฉีด 180 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 2.0 มิลลิลิตร/นาที จากการทดลองพบว่าเป็นวิธีที่ลดปัญหาการรบกวนจากสารพวก active alkaloid และเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มค่า การกลับคืนของสารและมีความแม่นยำ

Helboe (1983) ได้ทำการแยกและหาปริมาณ long chain alkyltrimethylammonium ion ได้แก่ Dodecyltrimethylammonium bromide, Stearyltrimethylammonium bromide โดยใช้เฟส อยู่กับที่คือ Nucleosil CN 5 μm หรือ 7 μm (120 mm x 4.6 mmi.d) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายเมธานอล : น้ำที่มี 5 mM toluenesulphonic acid หรือ 0.4 mM sodiumnaphthalene2-sulphonate อัตราส่วน (55 : 45 v/v) ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที การทดลองพบว่า 5 mM toluenesulphonic acid หรือ 0.4 mM sodiumnaphthalene2-sulphonate สามารถปรับปรุงรูปร่างของพีกให้แหลมขึ้นสามารถวิเคราะห์สารได้ในระดับมิลลิกรัม/ลิตรและสามารถลดการเกิด tailing peak ของสารพวก long chain alkyltrimethylammoniuum และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดของสารมีค่า 0.4 nmol

Elrod และ Timothy (1992) ได้หาปริมาณสารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak) ในผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างตาโดยเทคนิค HPLC และ solid phase extraction หรือเทคนิค online column switching โดยใช้ cyanopropyl 5 μm (15 cm x 4.6 mmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่คือ น้ำ : THF : triethylamine อัตราส่วน (2500 : 1500 : 20 v/v) ปรับ pH เท่ากับ 3.0 ± 0.1 ด้วยกรดฟอสฟอริก อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 2.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีด 100 ไมโครลิตร และ preconcentration ด้วยเทคนิค solid phase extraction (SPE) โดยมี C_{18} เป็น sep pak cartridge และตัวชะคือ 70%THF และ 30%สารละลายเฟสเคลื่อนที่และใช้เทคนิค online column switchingโดยต่อ precolumn ของ Licrosorb RP 8 5 μm(10 mm x 4.6 mm i.d) กับ column switching system พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเทคนิค SPE เทคนิค online column switching พบว่า online column switching ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร
99.9-103.7%และทั้งสองเทคนิคให้ค่า $r^2 > 0.999$

Fan และ Wall (1993) ศึกษาการหาปริมาณสารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak)ในน้ำยาล้างตาที่มี tyloxapol เป็นส่วนประกอบโดยใช้เทคนิค solid phase extraction และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค reverse phase HPLC โดยใช้ nitrile bond silane CN 5 μm (150 mm x 4.6 mmi.d.) เป็นเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH= 5.00±0.1 อัตราส่วน(60 :40 v/v) ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ทำการpreconcentration สารละลายมาตรฐานbakที่มีในตัวอย่างโดยผ่านตัวอย่างไปยัง cyanopropyl cartridgeโดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวชะ การใช้เทคนิค SPE สามารถลดการรบกวนที่เกิดจาก tyloxapol และไม่มีพีกของ solvent จากการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.014-0.042 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบค่า r^2=0.999 ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของสารมีค่า 97-103% ค่า RSD 0.74-

1.52% พบว่าเป็นวิธีที่มีสภาพไว มีความจำเพาะ และมีความถูกต้องในการหาสาร bak ในน้ำยาล้างตาที่มี tyloxapol เป็นส่วนประกอบ

Paeson และคณะ (1994) ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมได้แก่ benzalkonium chloride, cetylpylidinium chloride, cetrimide ด้วยเทคนิค thin layer chromatography โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายเมธานอล : 25% สารละลายโซเดียมอะซิเตด : สารละลายอะซิโตน อัตราส่วน (65 : 35 : 20 v/v) โดยใช้ tetrabutylammonium hydrogen sulphate เป็น internal standard จากนั้นหาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมโดยทำปฏิกิริยากับ 2% m/I_2 และ 19 มิลลิลิตร สารละลายเมธานอล : น้ำ อัตราส่วน 1 : 1 v/v ก่อนวิเคราะห์ด้วย UV densitometry ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดมีค่า 0.2 ไมโครกรัมเป็นวิธีที่สามารถแยก homologue ของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมโดยมีค่า RSD 5%

Kummerer และ Eitel (1995) ได้ศึกษาการหาปริมาณสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมได้แก่ tetraethylammonium chloride, decyltrimethylammonium chloride, dodecyltrimethylammonium chloride, tetrabutylammonium chloride, tetradecyltrimethylammonium chloride, cetyltrimethylammonium chloride, steryltrimethylammonium chloride, cetyldimethylbenzylammonium chloride และ tetraamylammonium chloride โดยทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Q^+: BPB^{2-} อัตราส่วน 1 : 2 ปรับ pH เท่ากับ 8 ด้วยสารละลายฟอสเฟต จากนั้นสกัดแยกให้อยู่ในชั้นของคลอโรฟอร์มนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 608 นาโนเมตร พบว่าการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน Q^+: BPB^{2-} อัตราส่วน 1 : 2 ให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นและมีสภาพไว (sensitivity) เพิ่มขึ้น

Perhizkari, Miller และ Chen (1995) ศึกษาการหาปริมาณสารประกอบเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak)ในน้ำยาล้างตาที่มี 10%Phenylephrine ด้วยเทคนิค reverse phase HPLC โดยใช้ μ bondapak phenyl 10 μm (30 cm x 3.9 mmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตร : 50 Mm K_3PO_4 และ 57 mM hexanesulfonate ปรับ pH เท่ากับ 6.3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 1.8 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ปริมาตรสารละลายที่ฉีด 50 ไมโครลิตร จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของสารละลาย bak ที่ความเข้มข้น 50-150% มีค่า 103.8 $\pm$ 0.6% และที่ความเข้มข้นดังกล่าวให้ความสัมพันธ์เป็นสันตรงโดยมีค่า r^2 =1.00 (n=6) และจากการศึกษาความคง

ตัวของสารและการรบกวนที่เกิดจากความร้อน ความเป็นกรด เบส รังสี UV พบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการสลายตัวของสาร bak ในสารตัวอย่าง และไม่มีผลในการรบกวนพีกของสาร bak เป็นวิธีที่ให้ความแม่นยำและเที่ยงตรง

Taylor และคณะ (1997) ได้ใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมได้แก่ dequalinium และ cetylpyridinium chlorideในลูกกวาดโดยใช้ cyanopropyl silica 5 μm (100 mm x 4.6 mmi.d)เป็นเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ dequalinium (DQC)คือ 20 Mm phosphate buffer pH 2.5 : สารละลายเมธานอลอัตราส่วน(60 : 40 v/v) และ 5 Mm tetrabutylammonium bromide (TBA) สำหรับ cetylpyridinium chloride (CPC) เฟสเคลื่อนที่คือ 20 mM phosphate buffer pH 2.5 : สารละลายเมธานอลอัตราส่วน (60 : 40 v/v) และ 30 mM cetyltrimetylammonium bromide (CTAB) ฉีดสารละลายที่จะวิเคราะห์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที จากการทดลองพบว่าCPCให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (detection limit) 5 $\mu g/cm^3$, DQCมีค่า detection limit 1.5 $\mu g/cm^3$และค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร (% recovery)ของ CPC เท่ากับ 95.3%, DQC มีค่า 119%

Toomey, Dalrymple และ Jasperse (1997) ได้ศึกษาการหาปริมาณสารควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ในยาสระผมโดยใช้ spherisorb SCX 5 μm (150 mm x 4.6 mmi.d) เป็นเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมธานอลที่มี 0.06 M amoniumformate อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วยเครื่อง Evaporate light scatter ปริมาตรสารละลายที่ฉีด 20 ไมโครลิตร โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน N-hexadecyl N.N-dimethyl-1-hexadecaminium chloride, N,N-dimethyl-N–octadecylbenzenemethanaminium chloride ความเข้มข้น 200-600 พีพีเอ็ม นำยาสระผมตัวอย่างที่มีส่วนผสมของ polyoxypropylene, polyoxythylene, lanolin oil, petroleum jelly, polyoxyethylenecetylsteryl ether, 1-hexadecanol, 1-octadenol + 3% active quaternaryammonium(quats) ไป sonicate ค้างคืน1 คืนก่อนกรองผ่าน 0.45 μm PTFE filter จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ให้ค่า r^2=0.999และพบว่าวิธีนี้ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและเป็นวิธีที่เหมาะในการวิเคราะห์สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมที่ pH สูง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

- เครื่อง HPLC (Water 2690 Separation Module)
- Hyperity cyano colum (250 mm x 4.6 mmi.d)
- pH meter (Orion model 420 A)
- sep pak extract-clean cyano (Alltech) ขนาด 200 มิลลิกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- ชุด vacuum pump
- 0.45 μm HA membrane filter
- photodiode array detector
- ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร 250 มิลลิลิตร 50 มิลลิลิตร 5 มิลลิลิตร
- Sep pak ODS (J&W scientific)ขนาด 500 มิลลิกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร 50 มิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร 250 มิลลิลิตร
- หลอดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 100ไมโครลิตร 200ไมโครลิตร

3.2 สารเคมี

- สารละลายมาตรฐาน benzalkonium chloride ($C_{12}H_{25}N(CH_3)_2C_7H_7Cl$) SigmaUltra gradeที่มี homologue C_{12} : homologue C_{14} 65 : 35 เป็นส่วนประกอบหลัก
- ตัวอย่างกากน้ำตาลจากโรงงานมิตรผล หนองใหญ่ ระยอง ปราณบุรี สิงห์บุรี อุตสาหการชลบุรี สระบุรี อุตสาหการทีเอ็น นิวกว้าง สหการชลบุรี ตะวันออก บ้านโป่ง และสุพรรณบุรี
- สารละลายเมธานอล (HPLC grade)
- Deionize water
- 85% phosphoric acid (AR grade)
- สารละลายอะซิโตไนไตร (HPLC grade)
- heptane sulfonic acid sodium salt

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การศึกษาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมทางโครมาโทกราฟี

- เทคนิค ion pair chromatography

เตรียม stock solution สารละลายมาตรฐานเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak) ความเข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม โดยชั่งสารละลายมาตรฐานเบนซอลโคเนียมคลอไรด์หนัก 0.2500 กรัมในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 250 พีพีเอ็ม 100 พีพีเอ็ม 50 พีพีเอ็ม 10 พีพีเอ็ม 5 พีพีเอ็มและ 1 พีพีเอ็ม โดยปิเปตจาก stock solution ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร 5 มิลลิลิตร 2.5 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร 0.25 มิลลิลิตรและ 0.05 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร

จากนั้นศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ (สารละลายเมธานอล : 5 mM heptane sulfonic acid sodium salt ที่ปรับ pH เท่ากับ 3.50) โดยกรองเฟสเคลื่อนที่ผ่าน 0.45 μ membrane filter ตรวจวัดด้วย uv-visible ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18} (3.9 mmi.d x 150 mm)

- เทคนิค ion suppression chromtography

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม 35 พีพีเอ็ม 10 พีพีเอ็ม 5 พีพีเอ็ม 0.5 พีพีเอ็ม 0.25 พีพีเอ็ม โดยปิเปตจาก stock solution ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร 1.75 มิลลิลิตร 0.50 มิลลิลิตร 250 ไมโครลิตร 25 ไมโครลิตรและ12.5 ไมโครลิตรตามลำดับ ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ (สารละลายอะซิโตไนไตร์ : สารละลายฟอสเฟตที่ปรับ pH เท่ากับ 5.00) เตรียมโดยนำ 85% กรดฟอสฟอริกละลายในน้ำปรับ pH เท่ากับ 5.00 $\pm$ 0.01 จากนั้นกรองผ่าน 0.45 μ membrane filter ตรวจวัดด้วย uv-visible photodiode array ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า1.0 มิลลิลิตร/นาทีโดยเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm)

3.3.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามกฎของเบียร์

ทำการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสาร bak ที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์โดยเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน bak ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 250 พีพีเอ็ม 100 พีพีเอ็ม 50 พีพีเอ็ม 10 พีพีเอ็ม 5 พีพีเอ็มและ 1 พีพีเอ็ม ฉีดผ่านระบบ HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟีตามข้อ 3.3.1 โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18}(3.9 mmi.d x 150 mm) เฟสเคลื่อนที่ (สารละลายเมธานอล : 5 mM heptane sulfonic acid sodium salt ที่ปรับ pH เท่ากับ 3.50) จากนั้นทดลองซ้ำโดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ (สารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตที่ปรับ pH เท่ากับ 5.00 $\pm$ 0.01) สภาวะการทดลองตามข้อ 3.3.1 สารละลายแต่ละความเข้มข้นถูกฉีดผ่านระบบ HPLC 2 ครั้ง นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าพื้นที่พีกของสาร bak กับความเข้มข้นของสาร bak

3.3.3 การหาขีดจำกัดการตรวจวัด (detection limit)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bak หลายความเข้มข้นแล้ววิเคราะห์หาว่าความเข้มข้นใดให้โครมาโทแกรมที่อัตราส่วนสัญญาณของสารละลาย bak ต่อสัญญาณรบกวนไม่น้อยกว่า 2 : 1 โดยใช้สภาวะทางโครมาโทแกรมเป็นไปตามข้อ 3.3.1

3.3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของตัวชะในการชะสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็มผ่านไปยัง sep pak cyanopropylซึ่ง condition ด้วยสารละลายเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรและล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH= 5.00 $\pm$ 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร์ (80 : 20 v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและชะสารละลายมาตรฐาน bak ด้วยสารละลายผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึ่งปรับ pH=5.00 $\pm$ 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร อัตราส่วน 50 : 50 30 : 70 10 : 90 v/v ตามลำดับปริมาตร 4 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ถูกชะปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ (สารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตที่ปรับ pH เท่ากับ 5.00) อัตราส่วน 50 : 50 v/v ตรวจวัดด้วย uv-visible photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที

3.3.5 การหาประสิทธิภาพการสกัด

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร และผ่านสารละลายมาตรฐานไปยัง sep pak ODS ซึ่ง condition ด้วยสารละลายเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรและเก็บสารละลายที่ผ่าน sep pak ODS วิเคราะห์ปริมาณสาร bakโดยเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18}(3.9 mmi.d x 150 mm) เฟสเคลื่อนที่ (สารละลายเมธานอล : 5 mM heptanesulfonic acid sodium salt ที่ปรับ pHเท่ากับ 3.50 (50 : 50 v/v) ตรวจวัดด้วย uv-visible ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็ม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตรและผ่านสารละลายมาตรฐานไปยัง sep pak cyanopropyl ซึ่ง condition ด้วยสารละลายเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร และล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH=5.00 $\pm$ 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร (80 : 20 v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและชะสารละลายมาตรฐาน bak ด้วยสารละลายผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH= 5.00 $\pm$ 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร (30 : 70 v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ชะด้วยสารละลายผสมที่ใช้เป็นตัวชะปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ฉีดสารละลาย bak ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ (สารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH เท่ากับ 5.00 $\pm$ 0.01) อัตราส่วน 50 : 50 v/v ตรวจวัดด้วย uv-visible photodiode arrayที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที

3.3.6 การหาค่า breakthrough ของ sep pak

เตรียมตัวอย่างกากน้ำตาลความเข้มข้น 7% โดยชั่งตัวอย่างกากน้ำตาลหนัก 3.5 กรัม เตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็ม โดยปิเปตจาก stock solution ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีตัวอย่างกากน้ำตาลปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดด้วยน้ำกลั่น ผ่านตัวอย่างกากน้ำตาลปริมาตร 5 มิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร 15 มิลลิลิตรและ 20 มิลลิลิตรไปยัง sep pak extract-clean ซึ่งcondition ด้วยสารละลายเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรและล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH= 5.00 + 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร (80 : 20 v/v)ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและชะสารละลายมาตรฐาน bak ด้วยสารละลายผสมสารละลายฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ ปรับ pH = 5.00 ±0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร อัตราส่วน(30 : 70 v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ชะด้วยสารละลายผสมที่ใช้เป็นตัวชะปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ (สารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH เท่ากับ 5.00) อัตราส่วน (50 : 50 v/v) ตรวจวัดด้วย uv-visible photodiode array ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที

3.3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล

เตรียมสารละลายกากน้ำตาลมิตรผล,หนองใหญ่ความเข้มข้น 3%, 5% โดยชั่งตัวอย่างกากน้ำตาลหนัก 1.5 , 2.5 กรัมละลายในน้ำกลั่นใส่ขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตร condition sep pak ODS โดยต่อ sep pak เข้ากับชุด vacuum pump จากนั้น condition ด้วยสารละลายเมธานอลปริมาตร 3มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรผ่านตัวอย่างสารละลายกากน้ำตาลปริมาตร10 มิลลิลิตรไปยัง sep pak เก็บสารละลายที่ผ่าน sep pak วิเคราะห์ปริมาณสาร bak โดยเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18}(3.9 mmi.d x 150 mm) เฟสเคลื่อนที่ (สารละลายเมธานอล : 5mM heptanesulfonic acid sodium salt ที่ปรับ pHเท่ากับ 3.50 (50 : 50 v/v) ตรวจวัดด้วย uv-visible ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที

จากนั้นเตรียมสารละลายกากน้ำตาลทั้ง 13 แห่งความเข้มข้น 5%, 7%, 15%โดยชั่งตัวอย่างกากน้ำตาลหนัก 2.5, 3.5, 7.5 กรัมละลายในน้ำกลั่นใส่ขวดวัดปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อ sep pak extract-clean cyano เข้ากับชุด vacuum pump จากนั้น condition ด้วยสารละลายเมธานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านตัวอย่างสารละลายกากน้ำตาลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร (80 : 20 v/v) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรและชะสารละลายมาตรฐาน bak ด้วยสารละลายผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 : สารละลายอะซิโตไนไตร (30 : 70 v/v) ปริมาตร 4 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ชะด้วยสารละลายผสมที่ใช้เป็นตัวชะปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและวิเคราะห์ด้วยเทคนิคHPLC ฉีดสารละลาย bak ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH เท่ากับ5.00 อัตราส่วน (50 : 50 v/v) ตรวจวัดด้วย uv-visible photodiode array dector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่า 1.0 มิลลิลิตร/นาที

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทางโครมาโทกราฟี

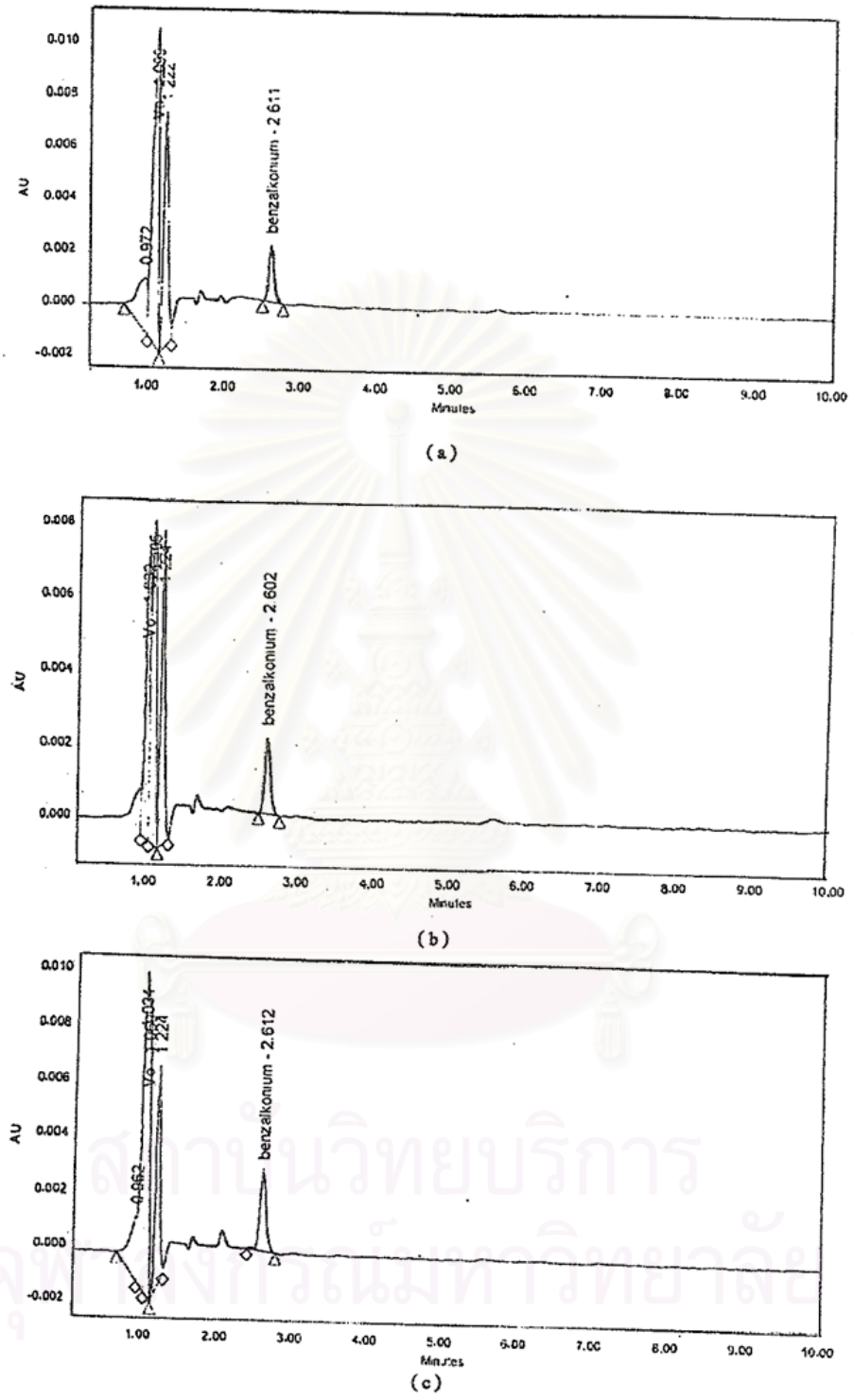
จากการทดลองเตรียมสารละลายมาตรฐาน bak ที่ความเข้มข้นต่างๆกันและวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography โดยสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารละลายมาตรฐาน bak เมื่อใช้เฟสอยู่กับที่เป็น Novapak C_{18}(3.9 mmi.d x 150 mm) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายเมธานอล : 5 mM heptane sulfonic acid sodium salt ปรับ pH=3.50 อัตราส่วน(50 : 50 v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 และโครมาโทแกรมรูปที่ 8 จากการใช้เทคนิคดังกล่าวพบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณรวมของสาร bak และค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงของสาร bakในแต่ละความเข้มข้นมีค่าน้อยเมื่อเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน bak ที่ความเข้มข้นต่ำ

เมื่อทำการทดลองโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน bak ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตรต์ : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 อัตราส่วน (50 : 50 v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรแสดงผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 5, 6 และโครมาโทแกรมดังรูปที่ 9 พบว่าสามารถแยก homologue C_{12}และ homologue C_{14}

4.2 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์

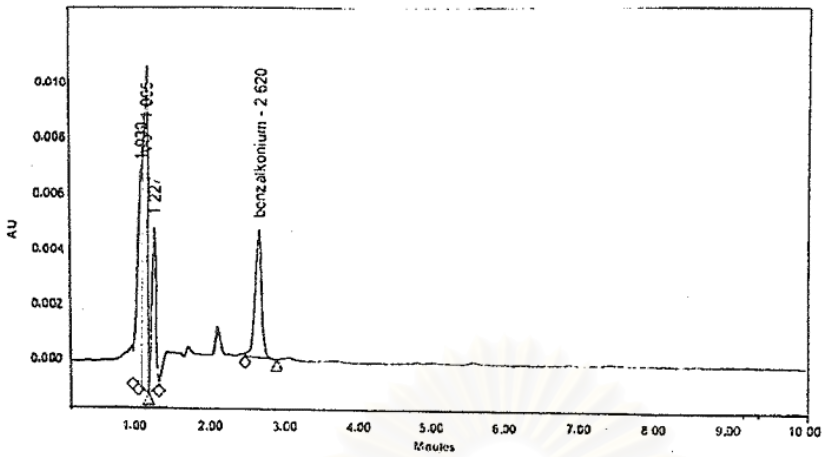
จากผลการทดลองเมื่อนำความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน bak แต่ละความเข้มข้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่วิเคราะห์ได้สำหรับเทคนิค ion pair chromatography แสดงความสัมพันธ์ดังสมการ $y= 204.58x + 9349.1$ ค่า $r^2= 0.986$ ดังรูปที่9 สำหรับเทคนิค ion supression chromatography homologue C_{12}แสดงความสัมพันธ์ดังสมการ $y = 121847x - 38112$ ค่า $r^2= 0.9957$ homologue C_{14}แสดงความสัมพันธ์ดังสมการ $y = 110628x - 50379$ ค่า $r^2= 0.9919$ (ค่า y คือพื้นที่ที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน bak ค่า x คือ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน bak)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

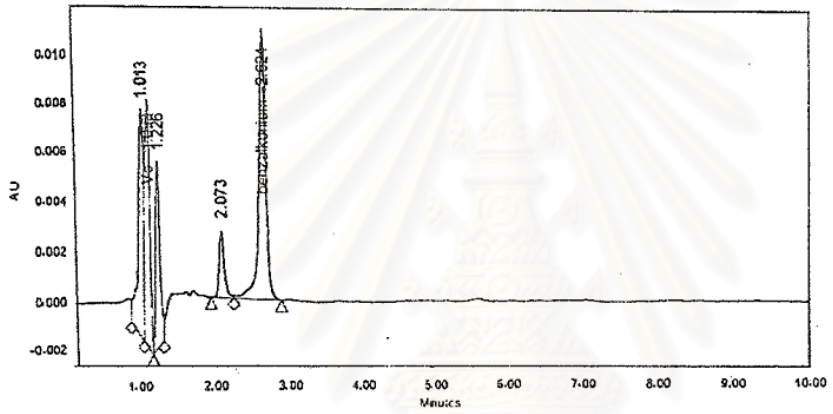


รูปที่ 8 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณสารละลายมาตรฐาน bak ที่วิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อเฟสอยู่กับที่คือ Novapak C_{18}(3.9 mmi.d x 150 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมธานอล : 5 mM heptane sulfonic acid sodium salt ปรับ pH = 3.50 อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร / นาที ตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (a) 1 พีพีเอ็ม (b) 5 พีพีเอ็ม (c) 50 พีพีเอ็ม (d) 100 พีพีเอ็ม (e) 250 พีพีเอ็ม (f) 25 พีพีเอ็มผ่าน sep pak

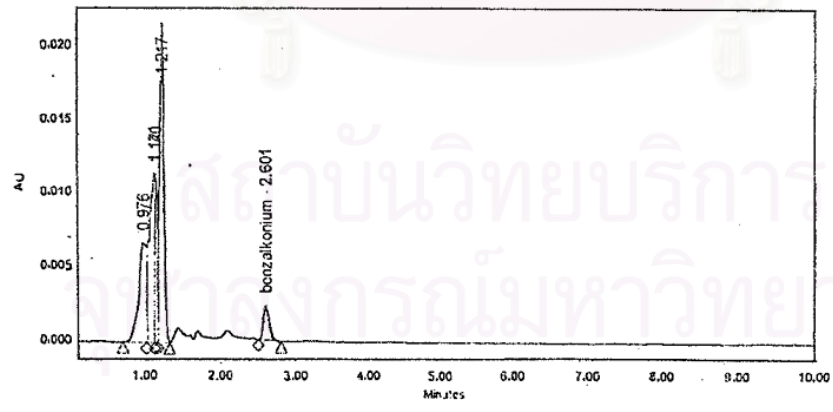
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(d)



(e)



(f)

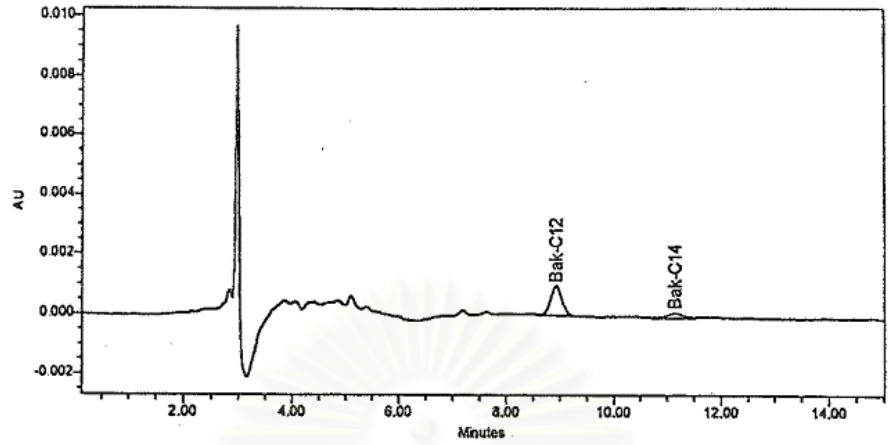
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19961431

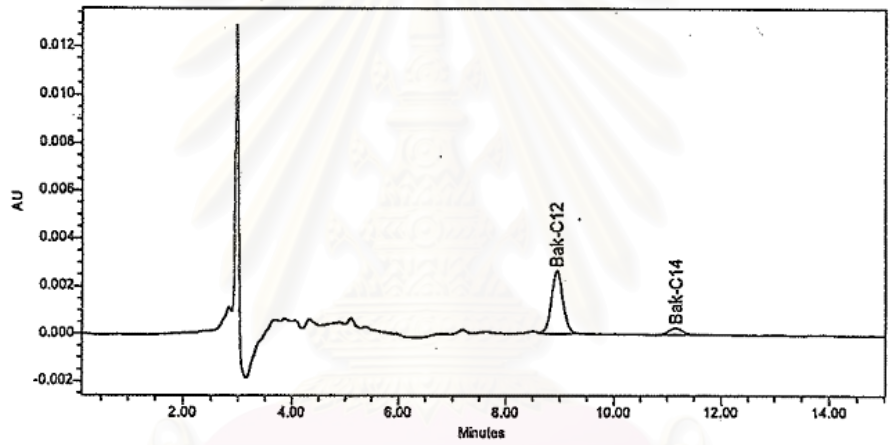
ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time พื้นที่ของสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้นต่างๆที่วิเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค ion pair chromatography

ความเข้มข้นสาร bak (พีพีเอ็ม)	การทดลองครั้งที่	ค่า retention time จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน bak (นาที)			$\bar{x}$	SD	RSD	พื้นที่สาร bak ที่วิเคราะห์ได้			$\bar{x}$	SD	RSD
1	1	2.611	2.616	2.608	2.612	0.004	0.155	11049	11078	11821	11316	437.583	3.867
	2	2.617	2.623	2.620	2.620	0.003	0.115	11050	11208	11311	11316	131.462	1.162
5	1	2.602	2.610	2.608	2.607	0.004	0.160	10974	12056	12541	11857	802.230	6.766
	2	2.613	2.614	2.610	2.612	0.002	0.080	11230	12145	12640	12005	715.350	5.959
50	1	2.620	2.617	2.615	2.617	0.003	0.096	18397	18415	18526	18446	69.864	0.379
	2	2.615	2.613	2.617	2.615	0.002	0.076	18207	18354	18513	18358	153.039	0.834
100	1	2.602	2.609	2.610	2.607	0.004	0.167	25938	25871	26013	25940	71.038	0.274
	2	2.611	2.610	2.614	2.612	0.002	0.080	25930	25764	26085	25926	160.531	0.619
250	1	2.601	2.605	2.609	2.605	0.004	0.154	61677	62354	62578	62203	469.096	0.754
	2	2.614	2.611	2.613	2.613	0.002	0.058	62250	62618	61975	62281	322.619	0.518

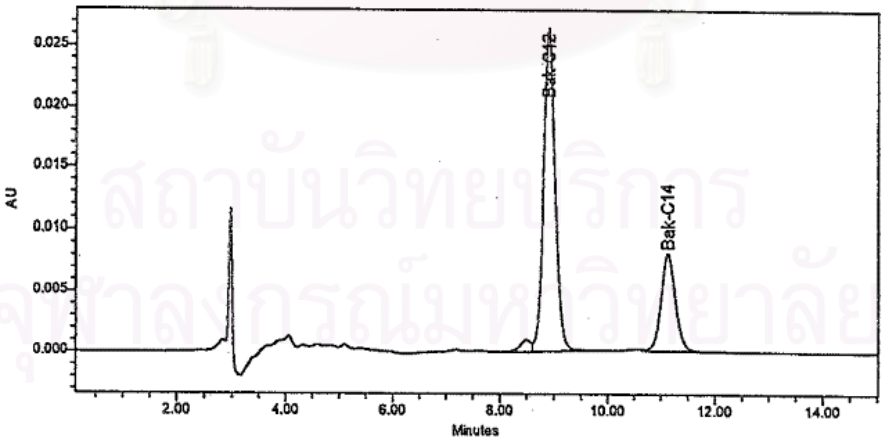
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)

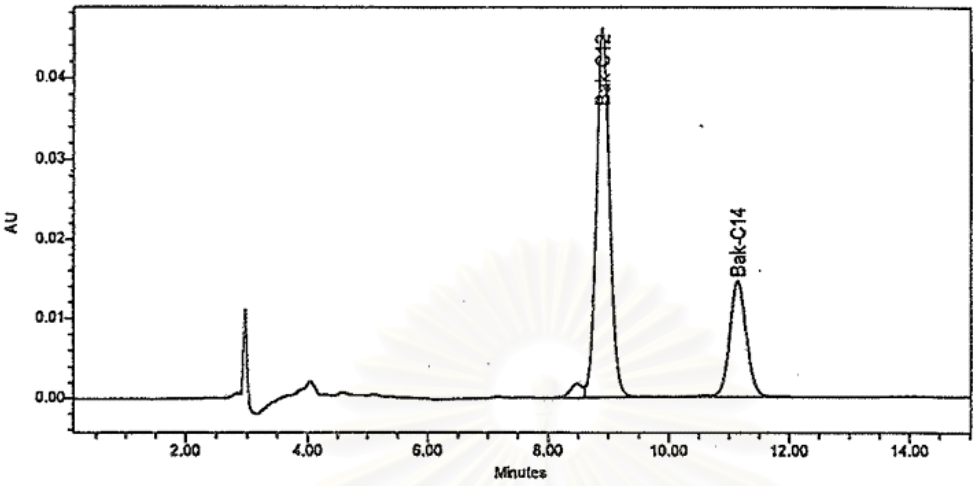


(b)

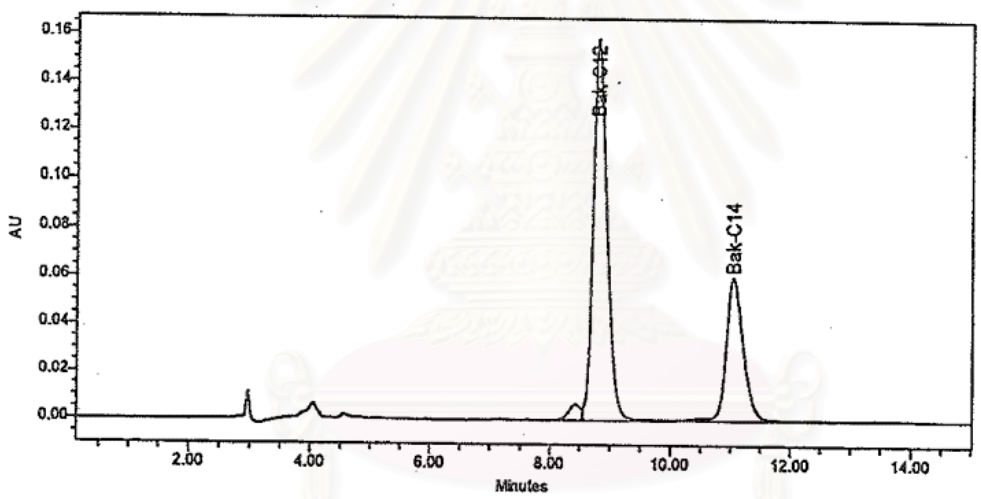


(c)

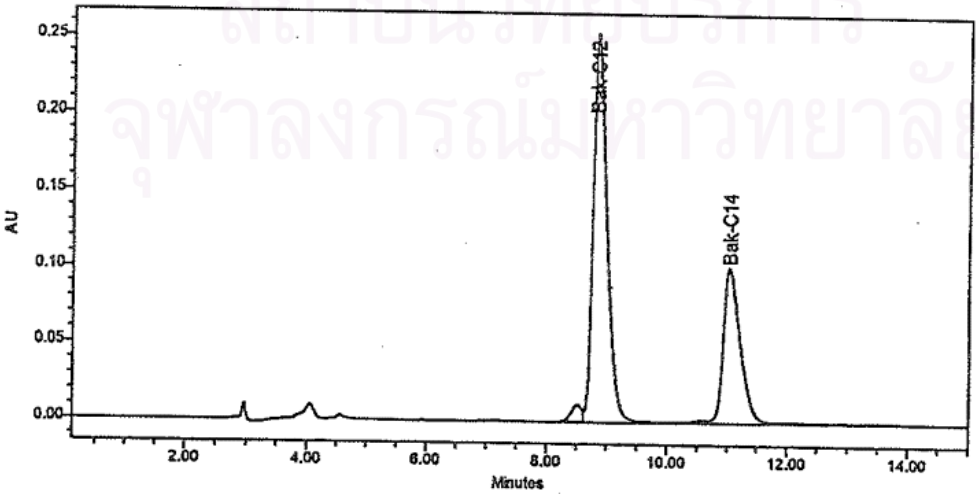
รูปที่ 9 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณสารละลายมาตรฐาน bak ที่วิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆเมื่อเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity CN (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายอะซิโตไนไตร์ : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปรับ pH = 5.00 อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร / นาที ตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร (a) 0.25 พีพีเอ็ม (b) 0.5 พีพีเอ็ม (c) 5 พีพีเอ็ม (d) 10 พีพีเอ็ม (e) 35 พีพีเอ็ม (f) 50 พีพีเอ็ม



(d)



(e)



(f)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time พื้นที่ homologue C_{12}ของสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้นต่างๆที่วิเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

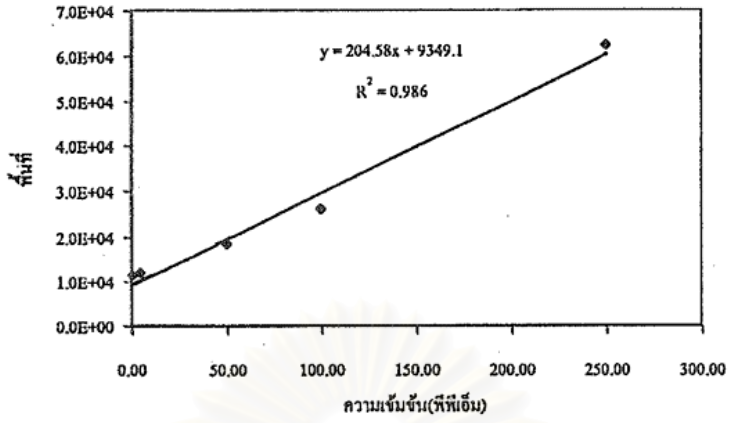
ความเข้มข้นสาร bak (พีพีเอ็ม)	การทดลองครั้งที่	ค่า retention time จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน bak (นาที)			$\bar{x}$	SD	RSD	พื้นที่ homologue C_{12}ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้			$\bar{x}$	SD	RSD
0.16	1	8.931	8.928	8.925	8.928	0.003	0.034	15224	14302	14181	14569	570.50	3.92
	2	8.930	8.927	8.926	8.928	0.002	0.023	15238	13942	14212	14464	683.80	4.73
0.33	1	8.947	8.945	8.940	8.944	0.004	0.040	39236	39795	39516	39516	279.50	0.71
	2	8.942	8.945	8.946	8.944	0.002	0.023	39504	39529	39624	39552	63.30	0.16
3.25	1	8.906	8.910	8.912	8.909	0.003	0.034	391784	390851	390743	391126	572.40	0.15
	2	8.909	8.911	8.914	8.911	0.003	0.028	390915	389706	390522	390381	616.70	0.16
6.50	1	8.910	8.908	8.911	8.910	0.002	0.017	695279	703597	696487	698454	4494.50	0.064
	2	8.908	8.911	8.908	8.909	0.002	0.019	694218	698175	696110	696168	1979.10	0.28
22.75	1	8.790	8.847	8.835	8.824	0.030	0.341	2567320	2543951	2556910	2556060	11707.60	0.46
	2	8.805	8.789	8.824	8.806	0.018	0.199	2558097	2537813	2546359	2547423	10183.80	0.40
32.50	1	8.829	8.831	8.825	8.828	0.003	0.035	4034576	4088270	4058240	4060362	26909.80	0.66
	2	8.833	8.830	8.828	8.830	0.003	0.028	4033540	4058772	4067958	4053423	17821.50	0.44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

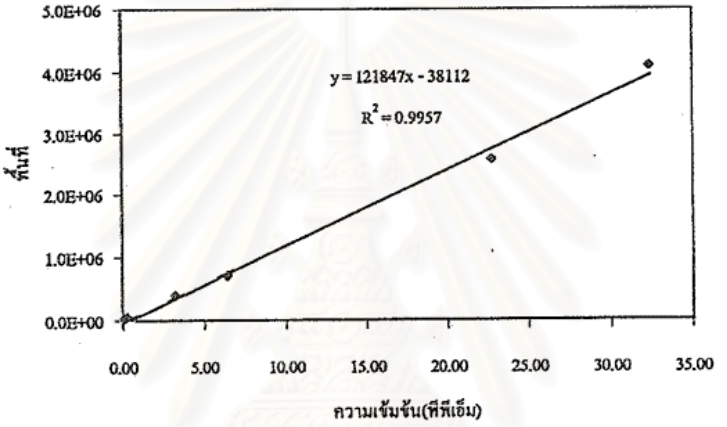
ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time พื้นที่ homologue C_{11}ของสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้นต่างๆที่วิเคราะห์ได้ ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

ความเข้มข้นสาร bak (พีพีเอ็ม)	การทดลองครั้งที่	ค่า retention time จากการฉีดสารละลายมาตรฐาน bak (นาที)			$\bar{x}$	SD	RSD	พื้นที่ homologue C_{11}ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้			$\bar{x}$	SD	RSD
0.09	1	11.144	11.146	11.450	11.247	0.176	1.566	2883	3336	3102	3107	226.50	7.29
	2	11.445	11.442	11.443	11.443	0.002	0.013	2897	3215	3120	3077	163.20	5.30
0.18	1	11.160	11.158	11.157	11.158	0.002	0.014	5274	5394	5345	5338	60.30	1.13
	2	11.162	11.163	11.160	11.162	0.002	0.014	5106	5218	5312	5212	103.10	1.98
1.75	1	11.132	11.133	11.131	11.132	0.001	0.009	149924	146296	148703	148308	1846.00	1.24
	2	11.133	11.135	11.137	11.135	0.002	0.018	148922	144037	147500	146820	2512.60	1.71
3.50	1	11.147	11.146	11.147	11.147	0.001	0.005	272335	274849	273106	273430	1287.90	0.47
	2	11.148	11.144	11.145	11.146	0.002	0.019	271957	273151	272269	272459	619.30	0.23
12.25	1	11.045	11.047	11.044	11.045	0.002	0.014	1211038	1188146	1197520	1198901	11508.30	0.96
	2	11.048	11.046	11.050	11.048	0.002	0.018	1200589	1197861	1187462	1195304	6927.00	0.58
17.50	1	11.036	11.035	11.038	11.036	0.002	0.014	2018060	1959795	1974321	1984059	30328.50	1.53
	2	11.035	11.036	11.039	11.037	0.002	0.019	1972853	1944851	1966753	1961486	14725.40	0.75

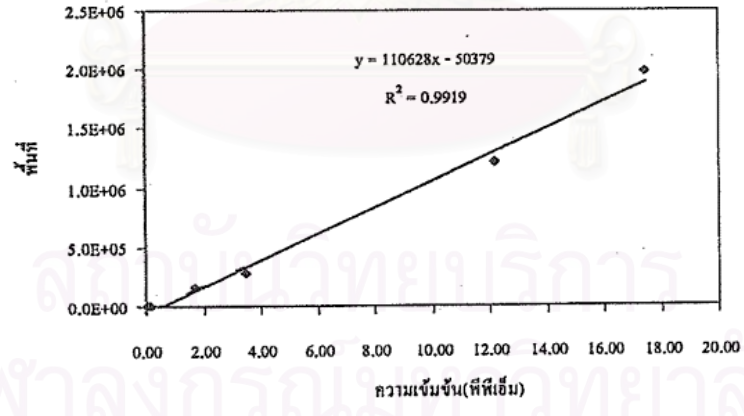
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน bak (a) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography (b) homologue C_{12} วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography (c) homologue C_{14} วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การหาขีดจำกัดการตรวจวัด

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด homologue C_{12}ของสาร bak เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography มีค่า 500 พีพีบี เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography สำหรับ homologue C_{12}, homologue C_{14} มีค่า 50 พีพีบี และ 100 พีพีบีตามลำดับ

4.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมตัวชะสารประกอบ bak

สำหรับผลการทดลองเพื่อหาตัวชะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน bak 25 พีพีเอ็มใช้ sep pak ODS และทดลองชะด้วยตัวชะชนิดแรกคือสารละลายเมธานอล : 5mM heptanesulfonic acid sodium salt ที่ปรับ pH=3.50 อัตราส่วน 60 : 40, 80 : 20, 100 : 0 v/v และสารละลายผสมของน้ำ : THF : triethylamine (250 : 150 : 2 v/v) : สารละลาย THF อัตราส่วน 30 : 70 v/v พบว่าเมื่อชะด้วยสารละลายผสมของน้ำ : THF : triethylamine (250 : 150 : 2 v/v) : สารละลาย THF อัตราส่วน 30 : 70 v/v ปริมาณ homologue C_{12}ที่วิเคราะห์ได้มีค่ามากกว่า

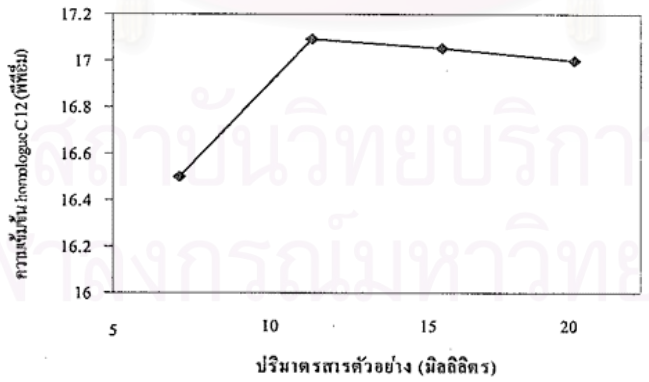
จากการชะสารละลายมาตรฐาน bak 35 พีพีเอ็ม ด้วยตัวชะสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 ที่มีอัตราส่วน 50 : 50, 70 : 30, 90 : 10 v/v พบว่าเมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีเฟสอยู่กับที่คือ Hyperity cyano (4.6 mmi.d x 250 mm) เฟสเคลื่อนที่คือสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 อัตราส่วน (50 : 50 v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 ที่มีอัตราส่วน 70 : 30 v/v เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณโดยเทียบจาก calibration curve ซึ่งแสดงดังรูปที่ 10 จะตรวจพบปริมาณ homologue C_{12}, homologue C_{14}มากกว่าตัวชะอัตราส่วนอื่น

4.5 ผลการหาประสิทธิภาพการสกัด

ผลที่ได้จากการใช้ตัวชะในการสกัดสาร bak สำหรับ sep pak แต่ละชนิดเมื่อนำมาคำนวณพบว่า sep pak ODS ประสิทธิภาพการสกัดปริมาณสาร bak มีค่า 62 % และเมื่อใช้ sep pak extract-clean cyano ประสิทธิภาพการสกัด homologue C_{12}ของสาร bak มีค่า 88% homologue C_{14}ของสาร bak มีค่า 80%

4.6 การหาค่า breakthrough ของ sep pak

ผลการทดลองเมื่อผ่านตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 7% ปริมาตร 5, 10 15 และ 20 มิลลิลิตรไปยัง sep pak extract-clean cyano และชะด้วยสารละลายอะซิโตรไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 ที่มีอัตราส่วน 70 : 30 v/v ปริมาตร 4 มิลลิลิตร พบว่ากากน้ำตาลเมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano สารละลายหลังผ่าน sep pak มีลักษณะใสและไม่มีสีของกากน้ำตาลและเมื่อนำสารละลายที่ได้วิเคราะห์ด้วย HPLC จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร bak และปริมาตรตัวอย่างกากน้ำตาลที่ผ่าน sep pak ดังรูปที่ 11 พบว่าเมื่อผ่านกากน้ำตาลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปริมาณสาร bak ที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณมากกว่าเมื่อผ่านกากน้ำตาลปริมาตร 15 มิลลิลิตรและ 20 มิลลิลิตร



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ homologue C_{12} ของสาร bak ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion supression chromatography และปริมาตรของตัวอย่างกากน้ำตาลเมื่อผ่าน sep pak extract – clean cyano

4.7 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล

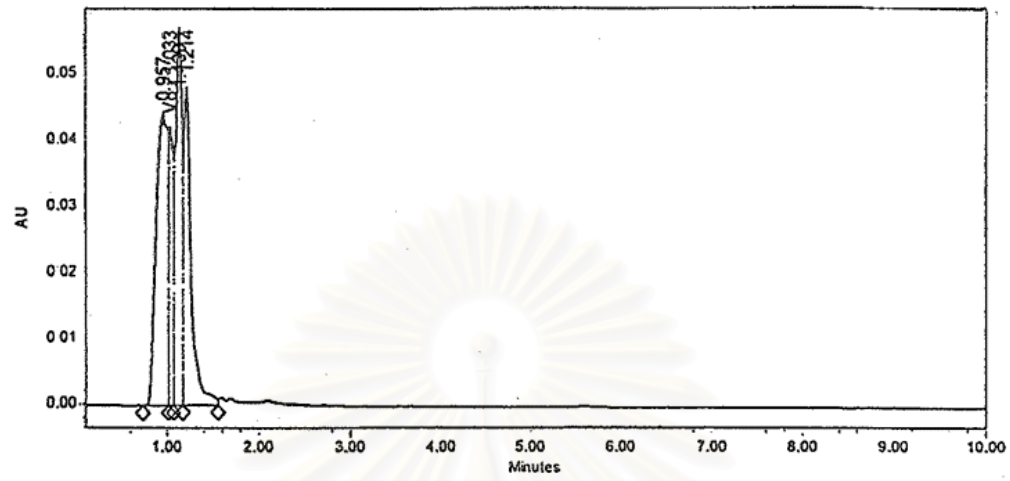
ผลที่ได้จากการทดลองเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ homologue C_{12}ในตัวอย่างกากน้ำตาลมิตรผลและหนองใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆกันโดยใช้เทคนิค ion pair chromatography และกำจัดสีในตัวอย่างกากน้ำตาลด้วยเทคนิค solid phase extraction ด้วย sep pak ODS โดยใช้ตัวชะสารละลายผสมของน้ำ : THF : triethylamine (250 : 150 : 2 v/v) : สารละลาย THF อัตราส่วน 30 : 70 v/v พบว่าเมื่อสารละลายหลังผ่าน sep pak ODS ยังคงมีสีของกากน้ำตาลซึ่งสีของกากน้ำตาลมีผลรบกวนการวิเคราะห์ทำให้ปริมาณสาร bak ที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยลงและตรวจวัดได้เฉพาะพีกของสารละลายไม่พบพีก homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak และเมื่อทดลองโดยผ่านกากน้ำตาลและเก็บสารละลายหลังจากผ่าน sep pak ODS มาวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติมสารละลายมาตรฐาน bakความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม(spike) และไม่เติมสารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม (unspike) ดังรูปที่ 12 –15 และตารางที่ 7 พบว่าปริมาณรวมของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้ในกรณี spike มีค่าน้อย

ผลของการวิเคราะห์ปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14}ของสาร bak เมื่อใช้เทคนิค ion suppression และกำจัดสีในตัวอย่างกากน้ำตาลด้วยเทคนิค solid phase extraction ด้วย sep pak extract-clean cyano ในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละโรงงานทั้ง 13 แห่งแสดงผลดังตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์พบปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14}ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล 3 แห่งได้แก่ อุตสาหการชลบุรี ระยอง สิงห์บุรี ที่ความเข้มข้นต่างๆซึ่งผลที่ได้จากตารางที่ 9-11 และโครมาโทแกรมรูปที่ 22 พบปริมาณ homologueC_{12}และ homologue C_{14}ของสาร bak ทุกโรงงานที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% > 7% > 15%

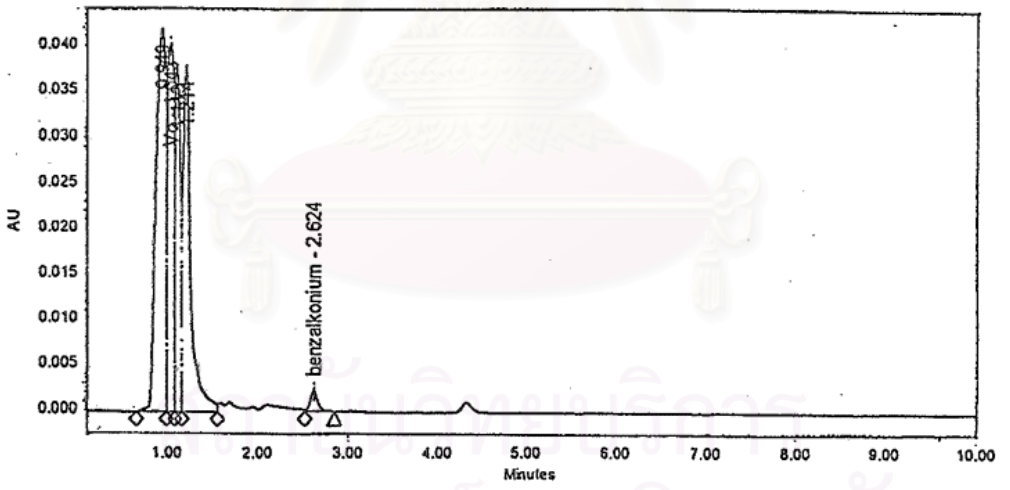
เมื่อผ่านกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 5 %, 7%, 15% ปริมาตร 10 มิลลิลิตรไปยัง sep pak extract-clean cyano ผลการทดลองแสดงดังโครมาโทแกรมรูปที่ 16-21 ตรวจพบปริมาณ homologue C_{12} ของสาร bak 0.33 ± 0.67 พีพีเอ็ม 0.27 ± 2.3 พีพีเอ็มและ 0.24 ± 3.72 พีพีเอ็ม ตรวจพบปริมาณ homologue C_{14} ของสาร bak 0.42 ± 0.27 พีพีเอ็ม 0.33 ± 2.6 พีพีเอ็ม และ 0.31 ± 2.2 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีตรวจพบปริมาณ homologue C_{12} ของ สาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5%, 7%, 15% มีค่า 0.47 ± 1.3 พีพีเอ็ม 0.30 ± 2.7 พีพีเอ็ม และ 0.25 ± 2.8 พีพีเอ็มส่วนhomologueC_{14} ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5%, 7%, 15% มีค่า 0.6 ±2.1 พีพีเอ็ม 0.44 ±3.2 พีพีเอ็ม 0.42 ±3.2 พีพีเอ็ม

ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14}ของ สาร bak เมื่อผ่านตัวอย่างกากน้ำตาลปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5%, 7%, 15%ไปยัง sep pak extract-clean cyano สำหรับ homologue C_{12} มีค่า 1.00 ± 1.8 พีพีเอ็ม 0.85 ± 2.4 พีพีเอ็ม และ 0.76 ± 2.2 พีพีเอ็ม homologue C_{14}ของ สาร bak มีค่า 0.46 ± 2.3 พีพีเอ็ม 0.44 ± 2.0 พีพีเอ็ม และ 0.40 ± 3.7 พีพีเอ็ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)

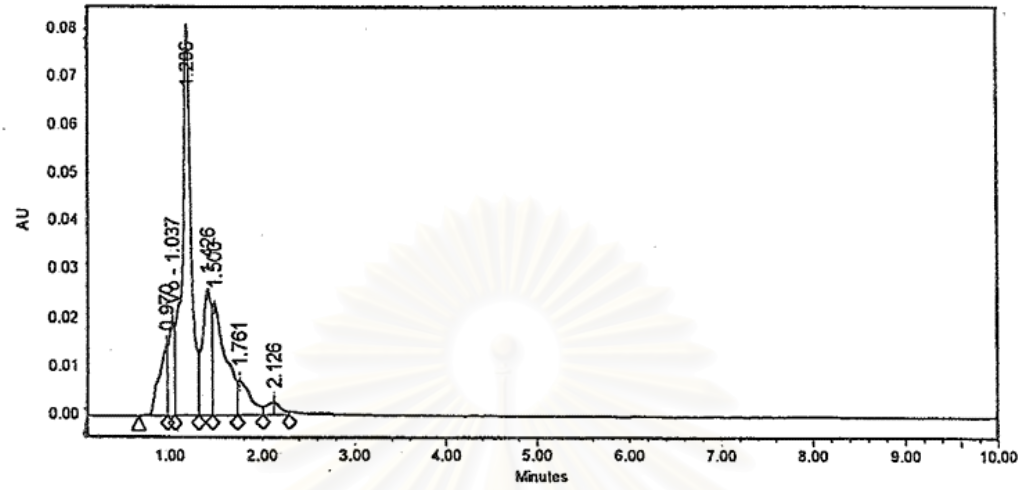


(b)

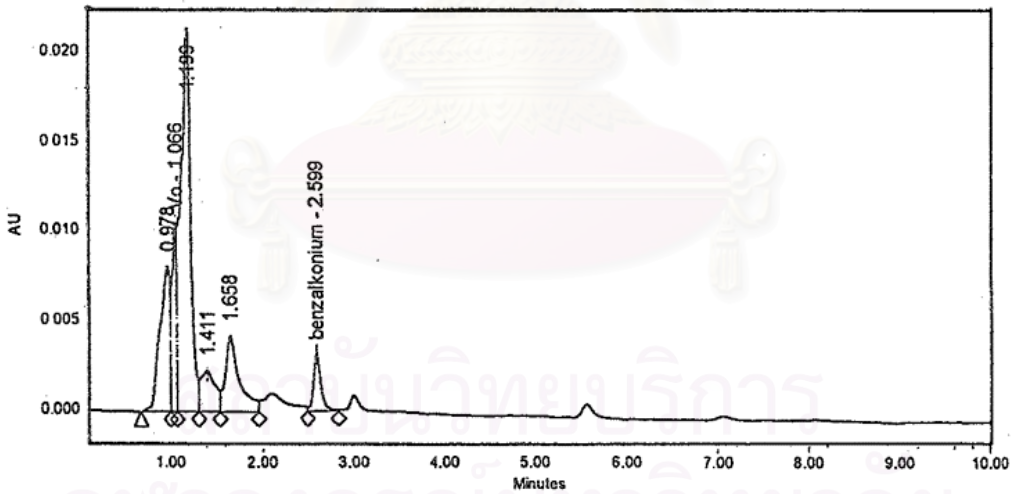
รูปที่ 12 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล มิตรผลความเข้มข้น 3 % เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography

(a) unspike (b) spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



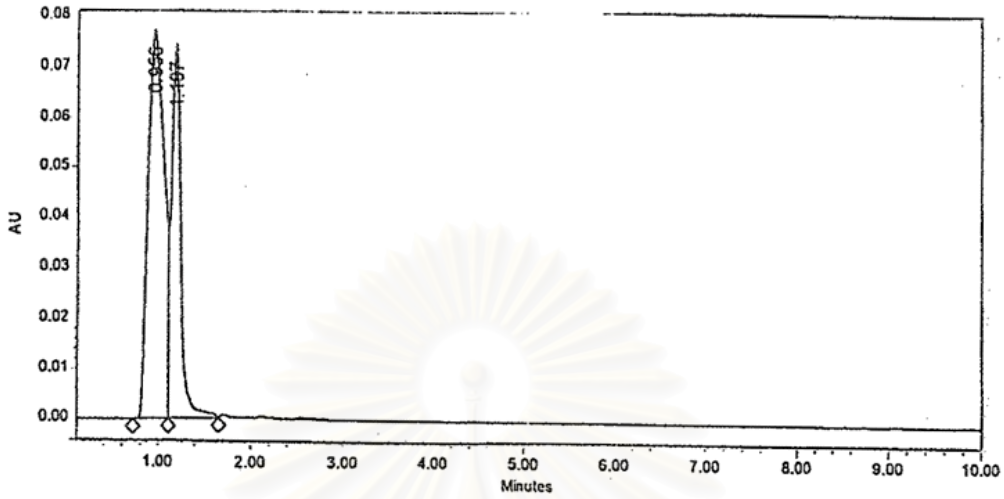
(a)



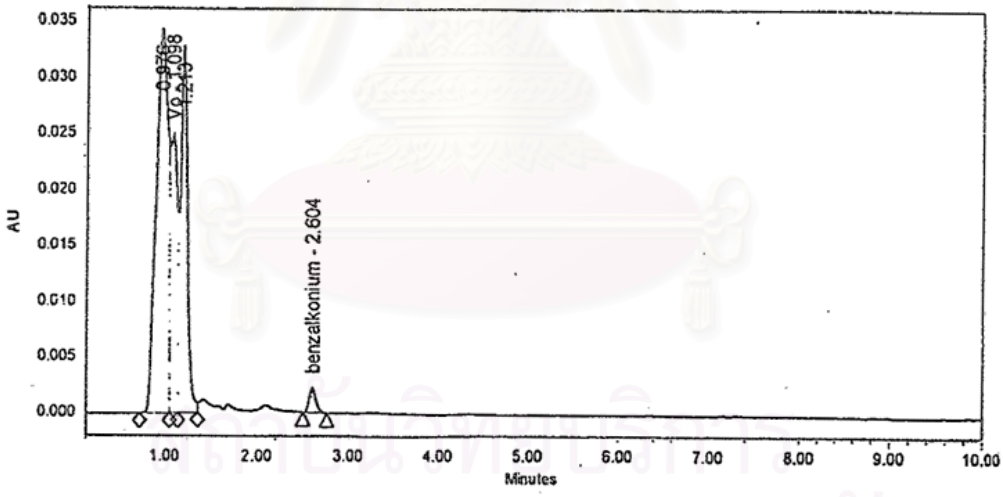
(b)

รูปที่ 13 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล มิตรผลความเข้มข้น 5 % เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography

(a) unspike (b) spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม



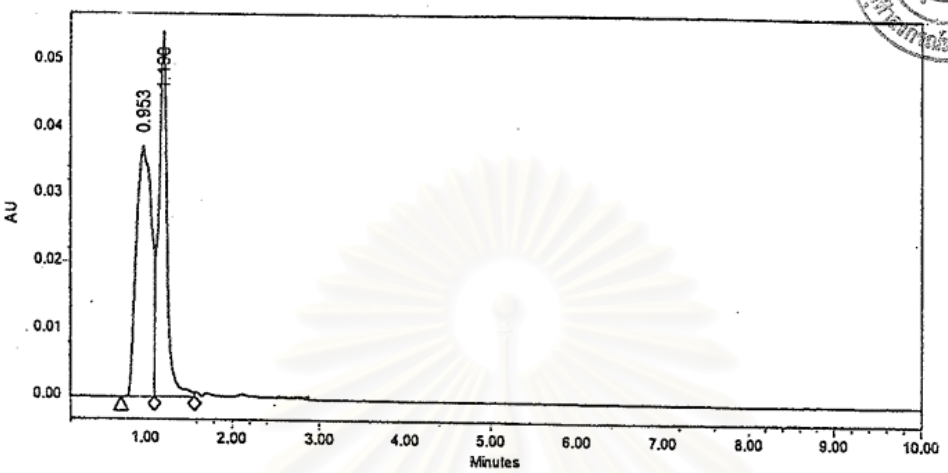
(a)



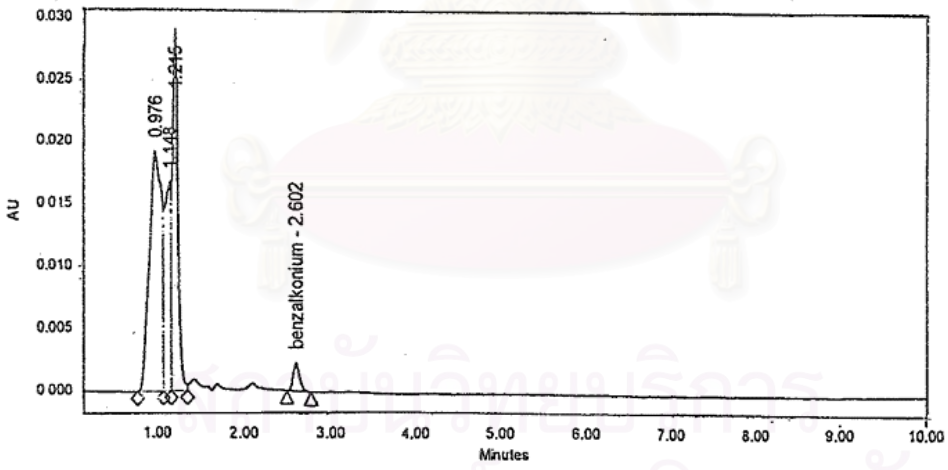
(b)

รูปที่ 14 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลหนองใหญ่ความเข้มข้น 3 % เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography

(a) unspike (b) spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม



(a)



(b)

รูปที่ 15 โครมาโทแกรมแสดงผลการวิเคราะห์สาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลหนองใหญ่ความเข้มข้น 5 % เมื่อผ่าน sep pak ODS และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography

(a) unspike (b) spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม

ตารางที่ 7 แสดงค่า retention timeที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างกากน้ำตาลมิตรผลและหนองใหญ่เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มด้วยเทคนิค ion pair chromatography

ตัวอย่างกากน้ำตาล	การทดลองครั้งที่	ค่า retention time จากการวิเคราะห์ (นาที)			$\bar{x}$	SD	RSD
3% มิตรผล + bak 25 พีพีเอ็ม							
	1	2.624	2.620	2.628	2.624	0.004	0.152
	2	2.630	2.621	2.629	2.627	0.005	0.188
	3	2.631	2.627	2.630	2.629	0.002	0.079
5% มิตรผล + bak 25 พีพีเอ็ม							
	1	2.600	2.599	2.610	2.603	0.006	0.234
	2	2.596	2.601	2.611	2.603	0.008	0.293
	3	2.612	2.608	2.607	2.609	0.003	0.101
3% หนองใหญ่ + bak 25 พีพีเอ็ม							
	1	2.604	2.610	2.605	2.606	0.003	0.123
	2	2.612	2.615	2.617	2.615	0.003	0.096
	3	2.609	2.614	2.618	2.614	0.005	0.173
5 % หนองใหญ่ + bak 25 พีพีเอ็ม							
	1	2.602	2.609	2.610	2.607	0.004	0.167
	2	2.611	2.614	2.617	2.614	0.003	0.115
	3	2.618	2.619	2.616	2.618	0.002	0.058

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่ตรวจวัดได้จากกากน้ำตาลทั้ง 13 แห่งด้วยเทคนิค ion suppresion chromatography

ตัวอย่างกากน้ำตาล ความเข้มข้น 7%	ระยอง	ปราณบุรี	นิวกว้าง	มิตรผล	อุตสาหการชลบุรี	สระบุรี	บ้านโป่ง	อุตสาหการที่เย็น	หนองใหญ่	ตะวันออก	สหการชลบุรี	สิงห์บุรี	อุพรรณบุรี
ความเข้มข้น homologue C_{12}ของสาร bak (พีพีเย็น)ที่ตรวจพบในตัวอย่างกากน้ำตาลปริมาตร 10 มิลลิลิตร	0.85	-	-	-	0.27	-	-	-	-	-	-	0.30	-
ความเข้มข้น homologue C_{14}ของสาร bak (พีพีเย็น)ที่ตรวจพบในตัวอย่างกากน้ำตาลปริมาตร 10 มิลลิลิตร	0.44	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	-	0.44	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}, homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{12}	1	8.999	9.184	9.205	9.132	9.215	9.215	9.230	9.224	9.220
	2	9.150	9.168	9.213	9.227	9.208	9.227	9.229	9.216	9.230
	3	9.210	9.174	9.187	9.219	9.220	9.208	9.220	9.227	9.219
ปริมาณ homologue C_{12} (พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล										
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	1	0.33	0.33	0.32	0.27	0.27	0.26	0.24	0.24	0.24
	2	0.33	0.33	0.32	0.27	0.27	0.26	0.25	0.24	0.25
	3	0.33	0.33	0.32	0.27	0.27	0.26	0.24	0.24	0.25
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{14}	1	11.262	11.254	11.300	11.458	11.564	11.571	11.617	11.685	11.704
	2	11.305	11.273	11.304	11.560	11.562	11.563	11.659	11.681	11.712
	3	11.312	11.273	11.287	11.601	11.550	11.570	11.687	11.675	11.718

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ปริมาณ homologue C_{14}										
(พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล	1	0.43	0.41	0.42	0.33	0.33	0.32	0.31	0.31	0.30
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	2	0.42	0.42	0.42	0.32	0.33	0.33	0.31	0.31	0.30
	3	0.42	0.42	0.42	0.32	0.33	0.33	0.30	0.30	0.31
ปริมาณ homologue C_{12}										
(พีพีเอ็ม)ในตัวอย่าง	1	6.70	6.58	6.40	3.79	3.79	3.77	1.62	1.62	1.63
กากน้ำตาล100%	2	6.67	6.54	6.45	3.79	3.80	3.77	1.65	1.63	1.66
	3	6.53	6.56	6.45	3.80	3.79	3.78	1.60	1.60	1.66
ปริมาณ homologue C_{14}										
(พีพีเอ็ม)ในตัวอย่าง	1	8.50	8.29	8.32	4.71	4.66	4.59	2.03	2.03	2.03
กากน้ำตาล100%	2	8.47	8.38	8.49	4.62	4.66	4.64	2.05	2.04	2.03
	3	8.46	8.30	8.40	4.62	4.67	4.66	2.03	2.03	2.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}, homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{12}	1	9.166	8.804	8.905	9.074	8.617	9.045	9.392	8.887	9.315
	2	9.106	8.914	9.017	9.096	8.645	9.084	9.364	9.125	9.297
	3	9.053	8.745	9.112	8.914	8.705	9.120	9.401	9.284	9.307
ปริมาณ homologue C_{12} (พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล										
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	1	0.48	0.48	0.48	0.30	0.30	0.30	0.25	0.25	0.25
	2	0.47	0.47	0.47	0.29	0.29	0.30	0.25	0.25	0.25
	3	0.47	0.47	0.47	0.30	0.30	0.30	0.24	0.25	0.25
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{14}	1	11.360	11.125	11.290	11.340	10.691	11.310	11.430	11.150	11.378
	2	11.342	11.130	11.300	11.335	10.921	11.308	11.417	11.235	11.324
	3	11.336	11.050	11.323	11.297	10.871	11.334	11.440	11.304	11.340

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3	การทดลอง ครั้งที่ 1	การทดลอง ครั้งที่ 2	การทดลอง ครั้งที่ 3
ปริมาณ homologue C_{14}										
(พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล	1	0.60	0.59	0.60	0.45	0.43	0.43	0.42	0.42	0.41
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	2	0.61	0.59	0.59	0.44	0.43	0.42	0.43	0.42	0.42
	3	0.60	0.59	0.60	0.44	0.43	0.43	0.42	0.41	0.42
ปริมาณ homologue C_{12}										
(พีพีเอ็ม)ในตัวอย่าง	1	9.58	9.58	9.50	4.26	4.21	4.20	1.67	1.68	1.67
กากน้ำตาล100%	2	9.30	9.49	9.35	4.20	4.20	4.26	1.63	1.67	1.67
	3	9.41	9.49	9.50	4.26	4.25	4.18	1.63	167	1.67
ปริมาณ homologue C_{14}										
(พีพีเอ็ม)ในตัวอย่าง	1	12.06	11.82	11.91	6.30	6.10	6.16	2.83	2.77	2.75
กากน้ำตาล100%	2	12.14	11.74	11.87	6.30	6.15	6.06	2.84	2.77	2.79
	3	11.90	11.89	11.95	6.27	6.15	6.19	2.79	2.75	2.77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}, homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

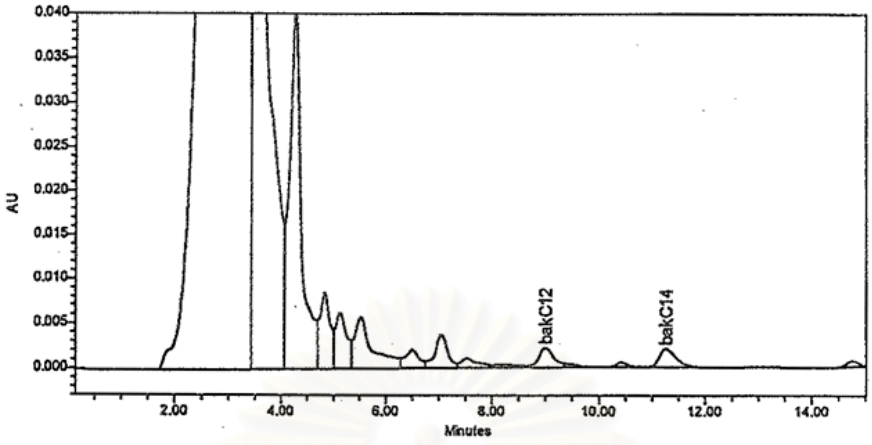
ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{12}	1	8.767	8.845	9.011	8.862	8.912	9.054	8.858	9.020	9.110
	2	8.770	8.906	9.017	8.880	9.014	9.075	8.983	9.102	9.124
	3	8.754	8.863	9.003	8.821	8.923	9.065	8.970	9.015	9.128
ปริมาณ homologue C_{12} (พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	1	1.14	0.97	0.96	0.85	0.86	0.86	0.77	0.76	0.76
	2	1.03	0.97	0.97	0.84	0.87	0.86	0.76	0.76	0.76
	3	0.99	0.97	0.97	0.80	0.87	0.86	0.76	0.76	0.76
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{14}	1	10.953	10.975	11.132	11.068	11.204	11.241	11.065	11.216	11.254
	2	10.901	11.021	11.125	11.072	11.276	11.250	10.979	11.280	11.261
	3	10.864	10.981	11.108	11.075	11.174	11.213	10.946	11.206	11.224

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

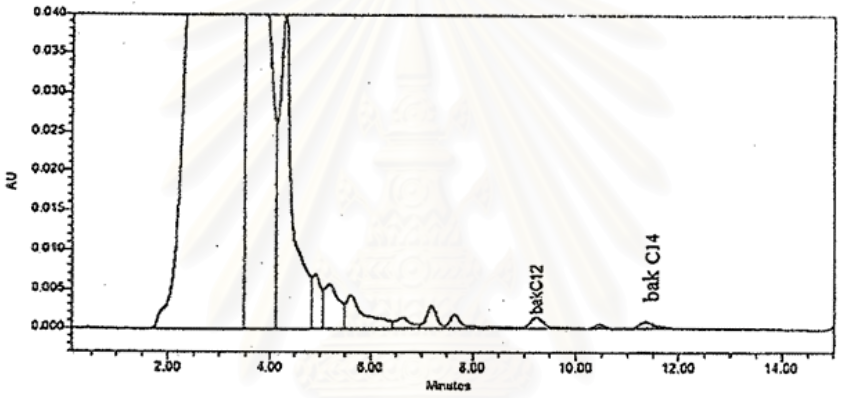
ตารางที่ 11 (ต่อ)

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ปริมาณ homologue C_{14}										
(พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล	1	0.47	0.47	0.46	0.44	0.44	0.44	0.40	0.40	0.40
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	2	0.46	0.46	0.46	0.44	0.44	0.44	0.39	0.40	0.40
	3	0.47	0.46	0.46	0.44	0.44	0.44	0.39	0.40	0.40
ปริมาณ homologue C_{12}										
(พีพีเอ็ม)ในตัวอย่าง	1	22.84	19.41	19.18	12.09	12.27	12.28	5.10	5.04	5.10
กากน้ำตาล100%	2	20.56	19.33	19.38	12.04	12.39	12.31	5.09	5.09	5.07
	3	19.75	19.35	19.36	11.40	12.37	12.26	5.09	5.05	5.06
ปริมาณ homologue C_{14}										
(พีพีเอ็ม)ในตัวอย่าง	1	9.47	9.41	9.14	6.27	6.32	6.27	2.68	2.68	2.68
กากน้ำตาล100%	2	9.15	9.28	9.13	6.31	6.32	6.29	2.61	2.69	2.69
	3	9.35	9.21	9.12	6.31	6.28	6.26	2.63	2.70	2.68

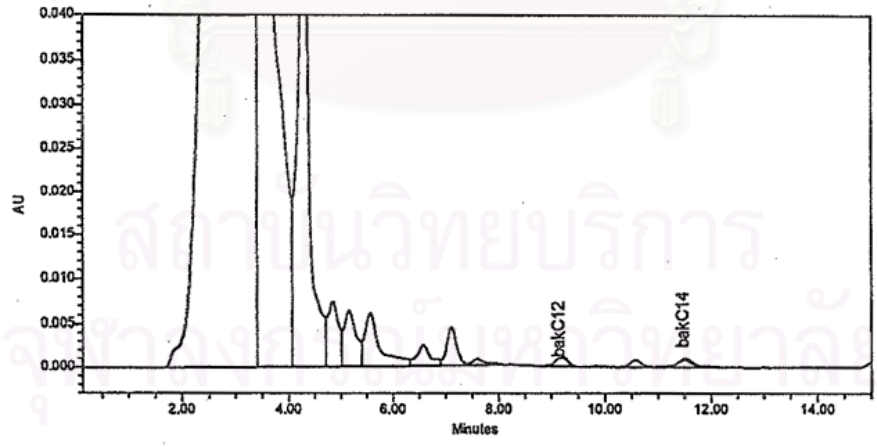
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)



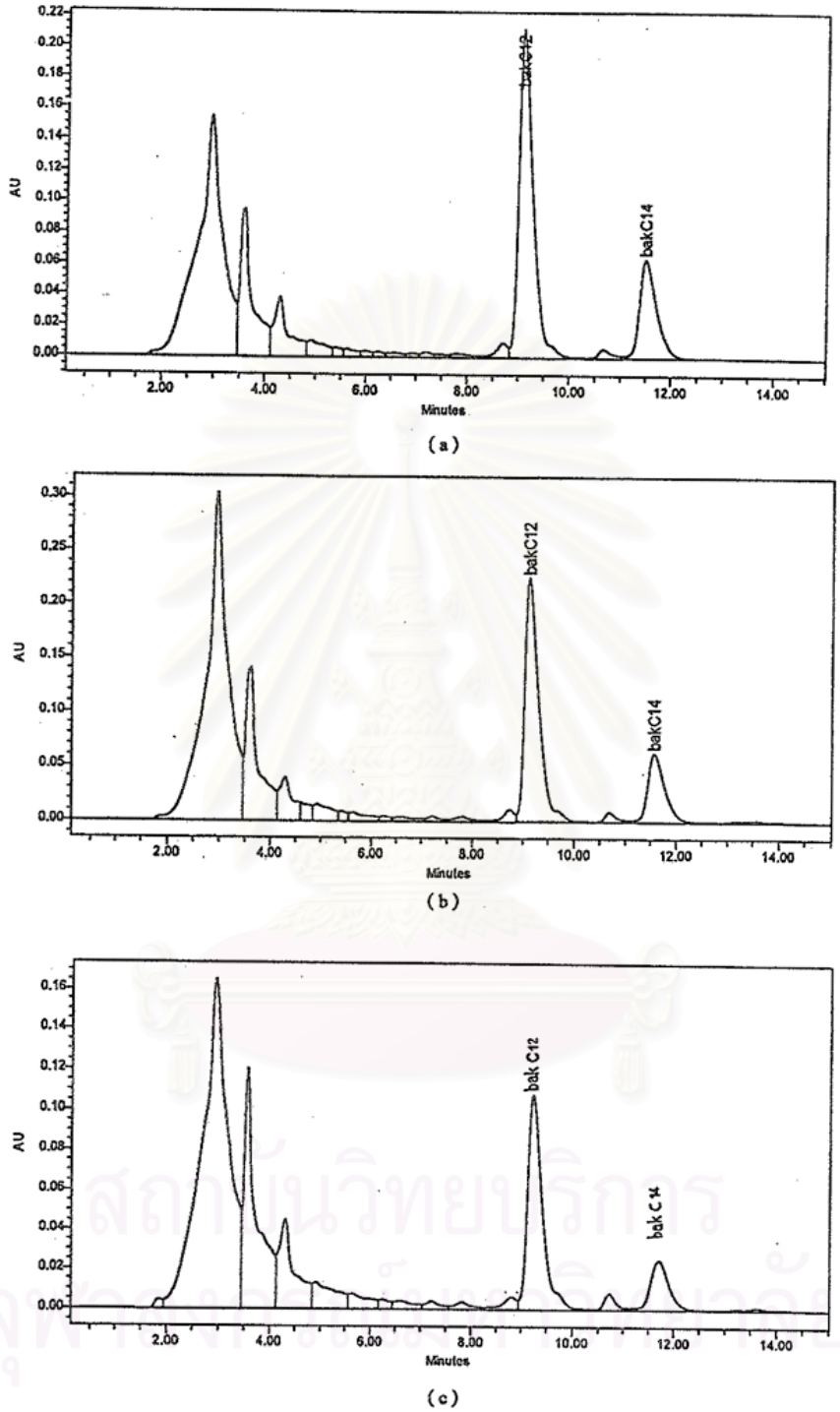
(b)



(c)

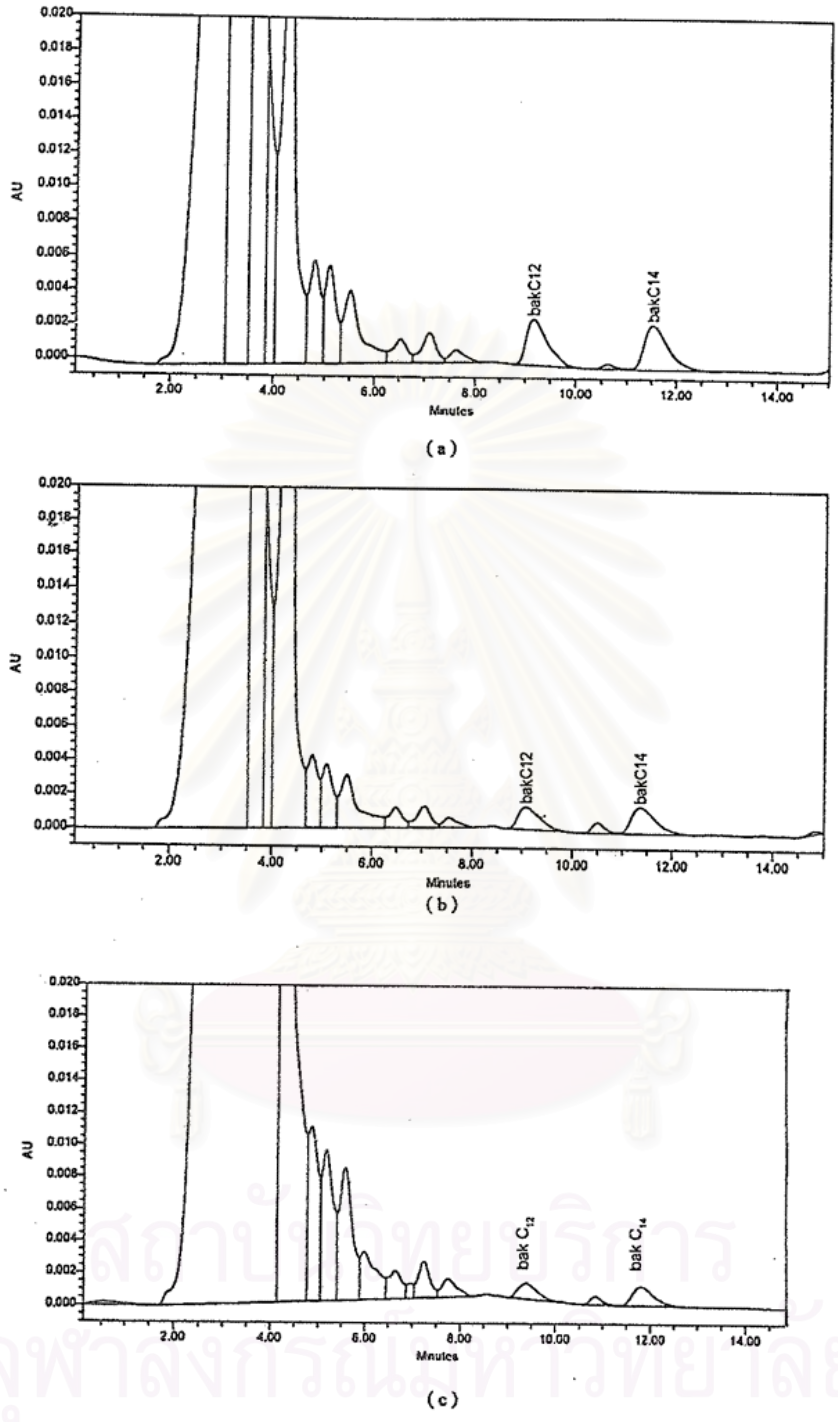
รูปที่ 16 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหกรรมชลบุรี เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

(a) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (b) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% (c) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15%



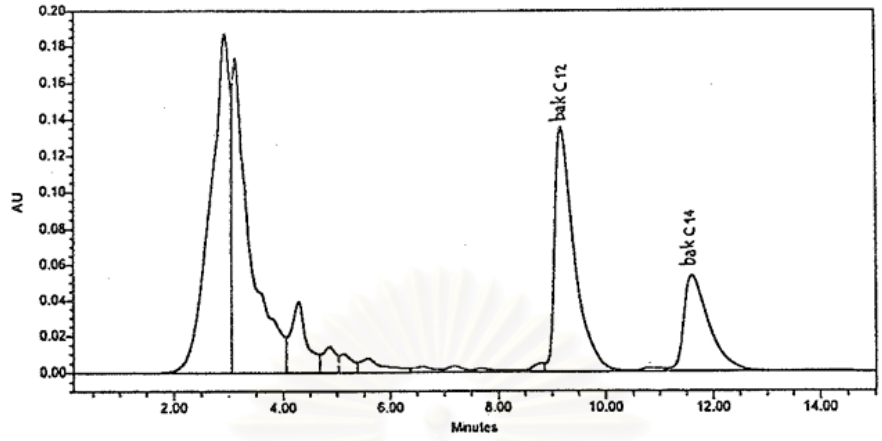
รูปที่ 17 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14}ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหกรรมชลบุรี เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

(a) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (b) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% (c) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15%

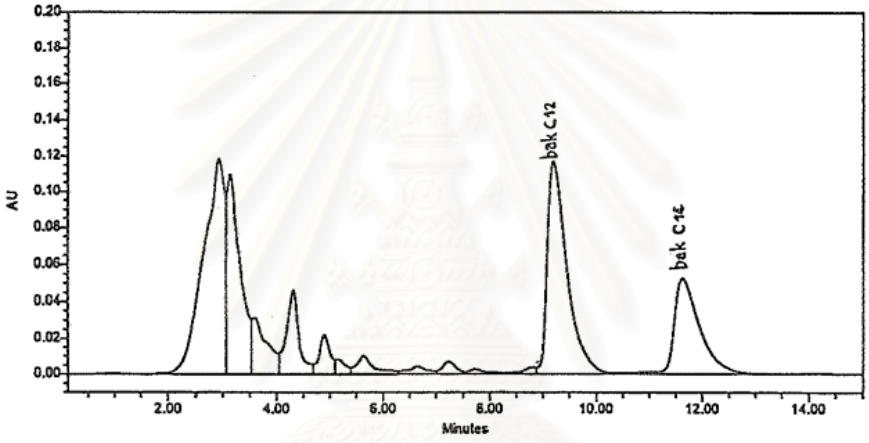


รูปที่ 18 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีเมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

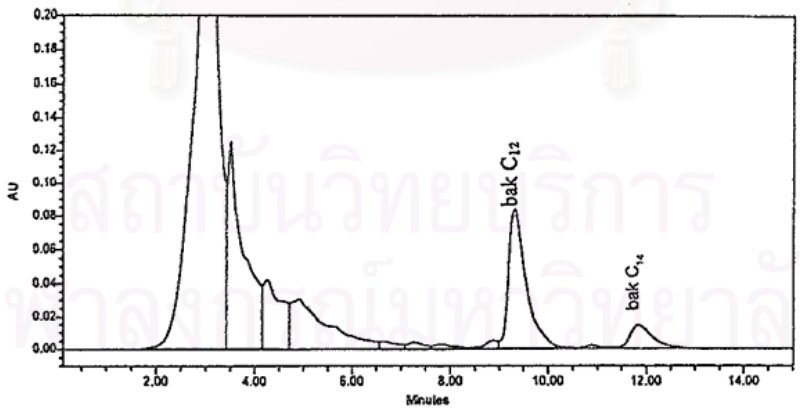
(a) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (b) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% (c) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15%



(a)



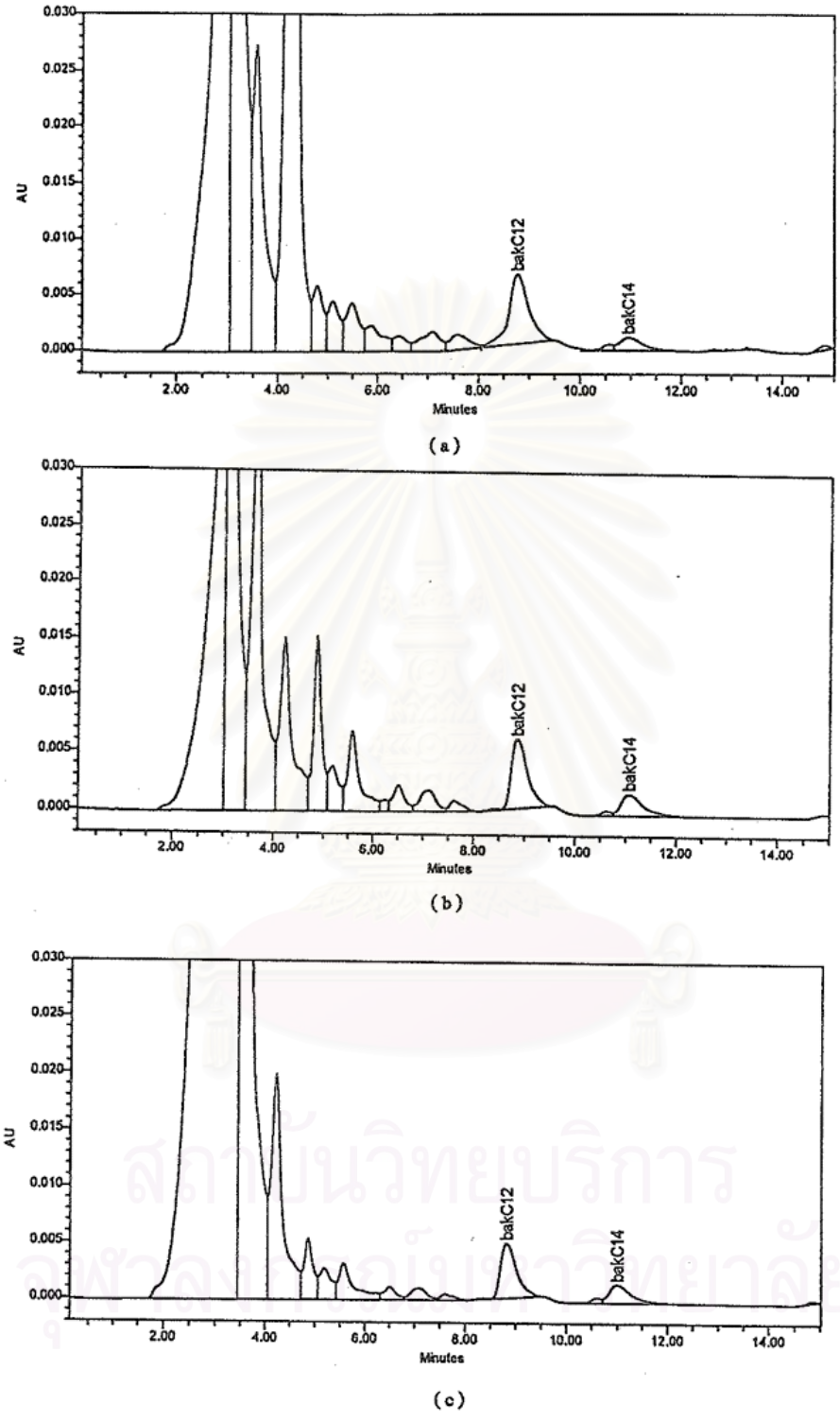
(b)



(c)

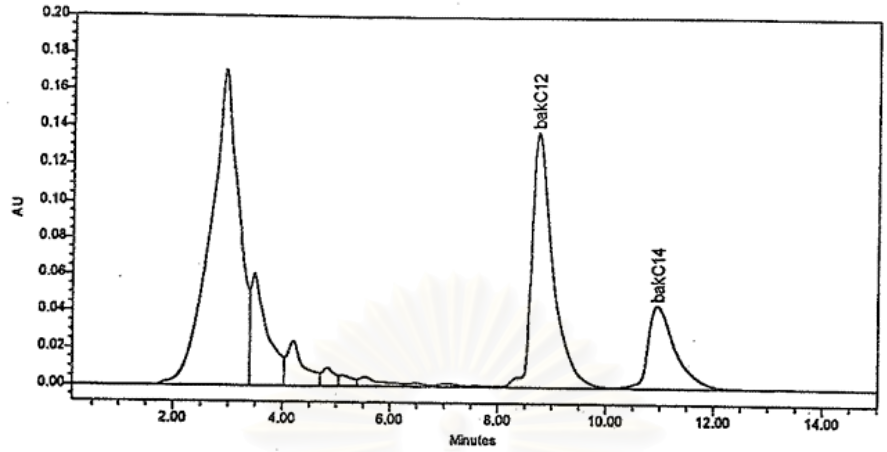
รูปที่ 19 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14}ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรี เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

(a) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (b) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% (c) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15%

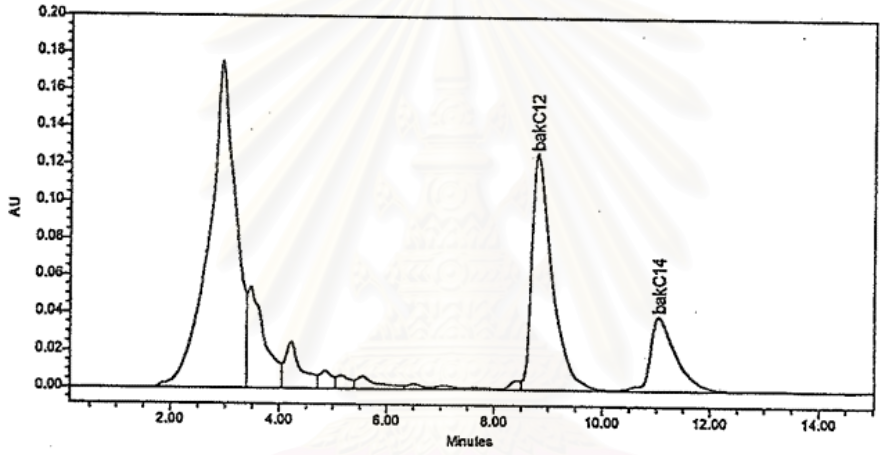


รูปที่ 20 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างกากน้ำตาลระยองเมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

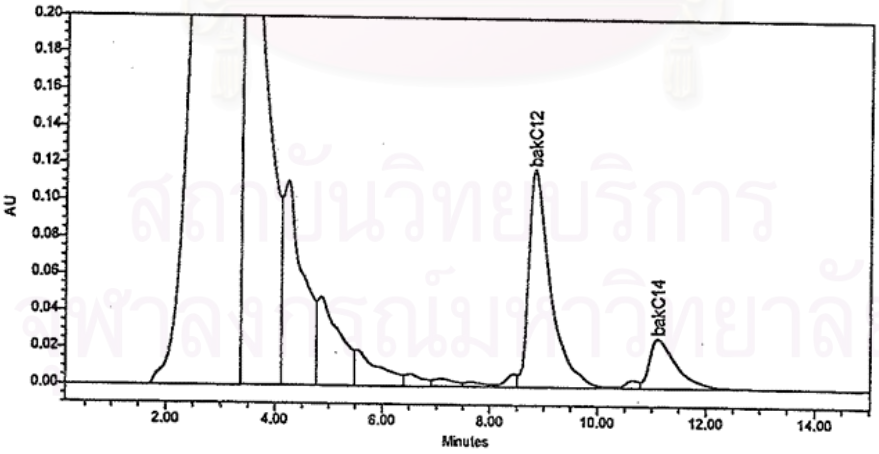
(a) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (b) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% (c) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15%



(a)



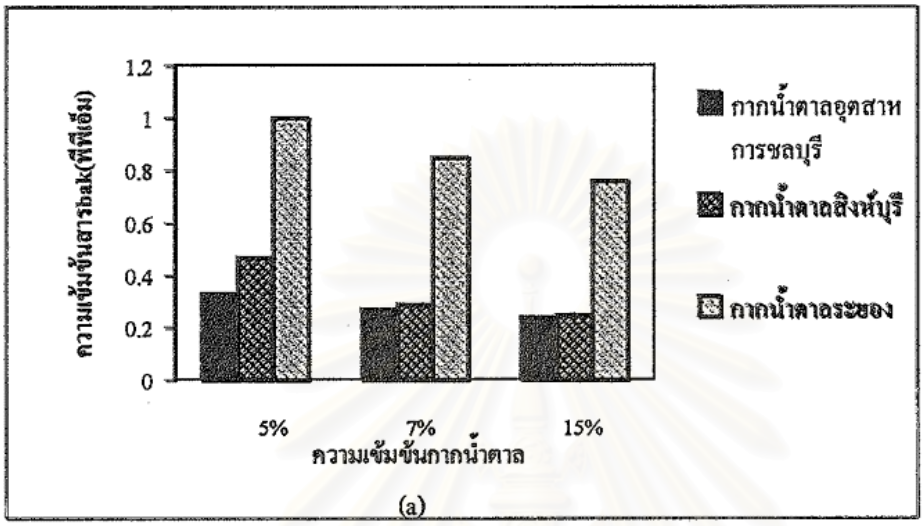
(b)

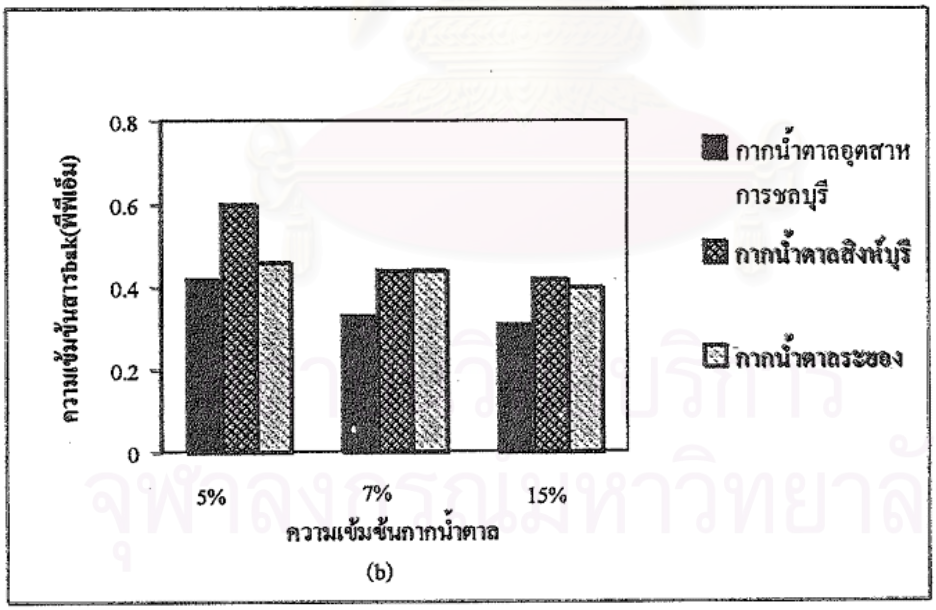


(c)

รูปที่ 21 โครมาโทแกรมแสดงปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลระยองเมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

(a) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (b) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% (c) ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15%





รูปที่ 22 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร bak ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างกากน้ำตาล อุตสาหการชลบุรี สิงห์บุรี ระยอง ที่ความเข้มข้น 5% 7% 15%

(a) homologue C_{12} (b) homologue C_{14}

4.8 การหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร

ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของ homologue C_{12} และ homologue C_{14}ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรี ระยอง สิงห์บุรีที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% 7% และ 15% ปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลจากผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12-14 พบว่า ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของ homologue C_{12}สาร bak ที่ความเข้มข้น 5% > 7% > 15% ในตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 3 แห่ง เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็ม ตรวจพบปริมาณ homologue C_{12} ในตัวอย่างอุตสาหการชลบุรีที่ความเข้มข้น 5 % มีค่า 18.57 พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 7 % มีค่า 17.05 พีพีเอ็ม และความเข้มข้น15 % มีค่า 9.02 พีพีเอ็ม

ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีปริมาณ homologue C_{12} เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็มที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% มีค่า 14.01 พีพีเอ็ม ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% มีค่า 12.73 พีพีเอ็ม และความเข้มข้นกากน้ำตาล 15% มีค่า 8.94 พีพีเอ็ม ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองปริมาณ homologue C_{12} เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็มที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% มีค่า 15.44 พีพีเอ็ม ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7% มีค่า 13.76 พีพีเอ็ม และความเข้มข้นกากน้ำตาล 15% มีค่า 12.66 พีพีเอ็ม

ปริมาณ homologue C_{14} ที่ตรวจพบในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีเมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็ม ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5 % มีค่า 6.95 พีพีเอ็ม ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7 % มีค่า 6.89 พีพีเอ็ม ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15 % มีค่า 3.12 พีพีเอ็ม ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรี ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5 % มีค่า 8.21 พีพีเอ็ม ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7 % มีค่า 8.01 พีพีเอ็มและ ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15 % มีค่า 3.37 พีพีเอ็ม ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5 % มีค่า 7.28 พีพีเอ็ม ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 7 % มีค่า 6.22 พีพีเอ็ม และที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 15 % มีค่า 4.68 พีพีเอ็ม

ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของ homologue C_{12}สาร bak ของตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีที่ความเข้มข้น 5%, 7%, 15% มีค่า 80.18, 76.11, 38.60 ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีที่ความเข้มข้น 5%, 7%, 15% มีค่า 59.51, 54.63, 38.20 ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองที่ความเข้มข้น 5%, 7%, 15% มีค่า 63.48, 56.73, 52.30 ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของ homologue C_{14} ของสาร bak ของตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีที่ความเข้มข้น 5%, 7%, 15% มีค่า 53.28, 53.52, 22.97 ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีที่ความเข้มข้น 5%, 7%, 15% มีค่า 62.06, 61.28, 24.08 ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองที่ความเข้มข้น 5%, 7%, 15% มีค่า 55.64, 47.16, 34.93 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12} , homologue C_{14} ของสาร bak เมื่อ เติมสารละลายมาตรฐาน bak (spike) 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรี ความเข้มข้น 5% 7% 15% และค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนสาร เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ค่า retention time(นาที) homologue C_{12}	1	9.074	9.085	9.089	9.110	9.124	9.125	9.236	9.231	9.231
	2	9.120	9.097	9.086	9.114	9.120	9.127	9.200	9.227	9.234
	3	9.108	9.112	9.107	9.120	9.117	9.134	9.224	9.225	9.219
ปริมาณ homologue C_{12} (พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาลปริมาตร10มิลลิลิตรเมื่อ spike bak 35 พีพีเอ็ม	1	18.50	18.59	18.62	17.09	17.05	17.01	9.04	9.00	9.03
ค่า retention time(นาที) homologue C_{14}	1	11.495	11.511	11.514	11.562	11.549	11.565	11.706	11.654	11.667
	2	11.513	11.508	11.498	11.558	11.557	11.550	11.668	11.640	11.670
	3	11.507	11.510	11.517	11.561	11.546	11.568	11.700	11.650	11.700

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลอุตสาหการชลบุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ปริมาณ homologue C_{14} (พีพีเอ็ม) ในกากน้ำตาล ปริมาตร 10มิลลิลิตรเมื่อ spike bak 35 พีพีเอ็ม	1	6.95	6.95	6.94	6.92	6.84	6.89	3.11	3.14	3.11
เปอร์เซนต์การกลับคืน homologue C_{12}	1	79.86	80.39	80.30	75.50	76.39	76.43	38.68	38.50	38.63
	2	79.86	80.39	80.30	75.50	76.39	76.43	38.68	38.50	38.63
	3	79.86	80.39	80.30	75.50	76.39	76.43	38.63	38.50	38.63
เปอร์เซนต์การกลับคืน homologue C_{14}	1	53.22	53.39	53.22	53.79	53.14	53.63	22.85	23.10	22.94
	2	53.30	53.30	53.22	53.87	53.14	53.55	22.85	23.10	22.94
	3	53.30	53.39	53.22	53.87	53.14	53.55	22.94	23.20	22.85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}, homologue C_{14} ของสาร bak เมื่อ เติมสารละลายมาตรฐาน bak (spike) 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรี ความเข้ม ข้น 5% 7% 15% และค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนสาร เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{12}	1	9.178	9.204	9.241	9.203	9.258	9.287	9.230	9.336	9.318
	2	9.201	9.195	9.256	9.214	9.276	9.295	9.224	9.310	9.309
	3	9.186	9.218	9.261	9.208	9.308	9.271	9.215	9.312	9.298
ปริมาณ homologue C_{12} (พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล										
ปริมาตร10มิลลิลิตรเมื่อ	1	14.05	14.00	13.99	12.74	12.75	12.69	8.989	8.92	8.94
spike bak 35 พีพีเอ็ม										
ค่า retention time(นาที)										
omologue C_{14}										
	1	11.580	11.495	11.652	11.605	11.087	11.728	11.633	11.506	11.741
	2	11.601	11.500	11.667	11.624	11.318	11.730	11.650	11.628	11.732
	3	11.595	11.462	11.670	11.631	11.230	11.715	11.684	11.704	11.727

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลสิงห์บุรีความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ปริมาณ homologue C_{14} (พีพีเย็ม) ในกากน้ำตาล ปริมาตร10 มิลลิลิตรเมื่อ spike bak 35 พีพีเย็ม	1	8.16	8.23	8.21	8.01	8.00	8.01	2.44	2.44	1.78
เปอร์เซนต์การกลับคืน homologue C_{12}	1	59.64	59.42	59.38	54.68	54.72	54.46	38.37	38.10	38.20
	2	59.69	59.47	59.42	54.72	54.76	54.46	38.37	38.10	38.20
	3	59.69	59.42	59.42	54.68	54.72	54.50	38.41	38.10	38.20
เปอร์เซนต์การกลับคืน homologue C_{14}	1	61.71	62.36	62.12	61.71	61.79	61.88	16.48	16.48	11.18
	2	61.63	62.36	62.20	61.79	61.79	61.96	16.40	16.48	11.10
	3	61.71	62.36	62.12	61.79	61.79	61.28	16.48	16.57	11.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงค่า retention time ปริมาณ homologue C_{12}, homologue C_{14} ของสาร bak เมื่อ เติมสารละลายมาตรฐาน bak (spike) 35 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลระยอง ความเข้มข้น 5% 7% 15% และค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนสาร เมื่อผ่าน sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างกากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{12}	1	8.746	8.856	9.024	8.795	8.903	9.030	8.828	9.015	9.084
	2	8.752	8.900	9.028	8.784	9.005	9.052	8.795	9.106	9.116
	3	8.760	8.906	9.010	8.801	8.916	9.028	8.967	9.008	9.120
ปริมาณ homologue C_{12} (พีพีเอ็ม)ในกากน้ำตาล										
ปริมาตร10มิลลิลิตรเมื่อ	1	15.41	15.45	15.46	13.78	13.77	13.73	12.64	12.67	12.67
spike bak 35 พีพีเอ็ม										
ค่า retention time(นาที)										
homologue C_{14}										
	1	10.956	10.965	11.025	11.043	11.198	11.236	11.106	11.200	11.246
	2	10.903	11.012	11.119	11.040	11.267	11.240	11.048	11.278	11.258
	3	10.854	10.945	11.100	11.058	11.200	11.204	11.060	11.210	11.220

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ผลการวิเคราะห์	จำนวนซ้ำ	ตัวอย่างจากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 5%			ตัวอย่างจากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 7%			ตัวอย่างจากน้ำตาลระยองความเข้มข้น 15%		
		การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
ปริมาณ homologue C_{14} (พีพีเอ็ม) ในกากน้ำตาล ปริมาตร10 มิลลิลิตรเมื่อ spike bak 35 พีพีเอ็ม	1	7.33	7.25	7.26	6.23	6.22	6.20	4.69	4.64	4.70
เปอร์เซนต์การกลับคืน	1	62.72	63.65	63.74	56.83	56.75	56.57	52.18	52.35	52.35
homologue C_{12}	2	63.21	63.65	63.69	56.88	56.70	56.57	52.22	52.35	52.35
	3	63.38	63.65	63.69	57.05	56.70	56.57	52.22	52.35	52.35
เปอร์เซนต์การกลับคืน	1	56.00	55.35	55.50	47.27	47.18	47.02	35.02	35.61	35.10
homologue C_{14}	2	56.08	55.42	55.50	47.27	47.18	47.02	35.10	34.61	35.10
	3	56.00	55.42	55.50	47.27	47.18	47.02	35.10	34.61	35.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

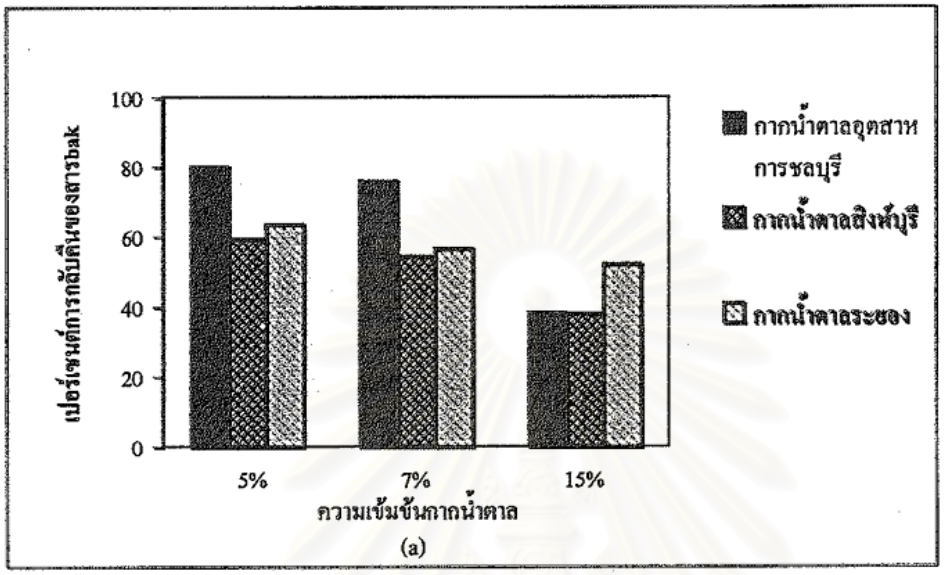
ตารางที่ 15 แสดงประสิทธิภาพการสกัด homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bakด้วยเทคนิค ion suppression chromatography

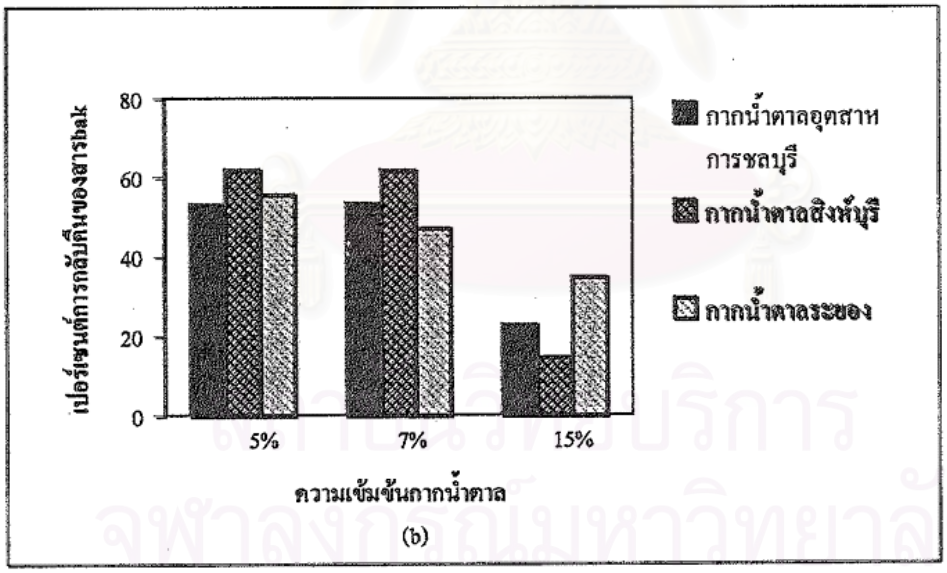
สารละลายมาตรฐาน bak	การทดลองครั้งที่	พื้นที่ที่วิเคราะห์ได้			$\bar{x}$	SD	RSD	ความเข้มข้นเฉลี่ยของสาร bak (พีพีเอ็ม)ในปริมาตร	
								5 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร
Homologue C_{12} ผ่าน sep pak									
	1	4829745	4851230	4847562	4840574	16220	0.34	40.40	20.02
	2	4816037	4841250	4857621					
ไม่ผ่าน sep pak	1	2567320	2543951	2556910	2551742	10945.7	0.43	22.75	22.75
	2	2558097	2537813	2546359					
Homologue C_{14} ผ่าน sep pak	1	2130541	2103254	2125630	2121826	13519	0.64	19.63	9.81
	2	2126087	2135064	2110380					
ไม่ผ่าน sep pak	1	1211038	1188146	1197520	1197103	9217.0	0.77	12.25	12.25
	2	1200589	1197861	1187462					

% ประสิทธิภาพการสกัด homologue C_{12} = (ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน bak ผ่าน sep pak / ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน bak ไม่ผ่าน sep pak)* 100
= (20.02/22.75)*100 = 88

% ประสิทธิภาพการสกัด homologue C_{14} = (9.81/12.25)*100 = 80.08

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 23 แผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร bak ของตัวอย่างกากน้ำตาล อุตสาหการชลบุรี สิงห์บุรี ระยอง ที่ความเข้มข้น 5% 7% 15%

(a) homologue C_{12} (b) homologue C_{14}

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมคลอไรด์ด้วยเทคนิคทาง HPLC ได้แก่ ion pair chromatography และ ion suppression chromatography พบว่าเมื่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (bak) ด้วยเทคนิค ion pair chromatography โดยใช้ Novapak C_{18}เป็นเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายเมธานอล : 5mM heptanesulfonic acid sodium salt อัตราส่วน 50 : 50 v/v ตรวจวัดด้วย uv-visible ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรดังรูปที่ 8 พบว่าสภาวะการทดลองดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้เฉพาะปริมาณรวมของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ไม่สามารถแยก homologue C_{12} และ homologue C_{14}

จากหลักการของเทคนิค ion pair chromatography จะเติมสารที่ใช้เป็น ion pair reagent ซึ่งมีประจุตรงข้ามกับสารตัวอย่างโดย counterion ที่เติมลงไปจะจับกับไอออนสารตัวอย่างเกิดเป็นสารที่ไม่แตกตัวในการทดลองเติมสาร heptanesulfonic acid sodium salt เพื่อให้ประจุลบ heptane sulfonic acid sodium salt จับกับประจุบวกของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์เป็นสารที่ไม่แตกตัวสามารถpartition กับเฟสอยู่กับที่ได้แต่จากโครมาโทรแกรมรูปที่ 8 พบว่าวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์แต่ไม่สามารถแยก homologue C_{12} และ homologue C_{14} เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ทางโครมาโทกราฟีที่ได้จากการคำนวณ (พวงแก้ว ลัคนทินพร, 2539) ค่า $k' = 1.68$ จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์จับกับส่วนของเฟสอยู่กับที่ได้น้อยอาจเป็นเพราะการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสาร bak กับ ion pair reagent ไม่เกิดแบบ ion pair แต่เกิดแบบ ion exchanger บนผิวของเฟสอยู่กับที่สาร bak บางส่วนที่สามารถยึดเหนี่ยวกับเฟสอยู่กับที่ได้ปริมาณสาร bak ที่วิเคราะห์ได้จึงมีค่าน้อย

เนื่องจากเทคนิค ion pair chromatography ไม่สามารถแยก homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของสาร bak อาจเป็นเพราะการปรับ pH= 3.50 สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี homologue C_{12}และ homologue C_{14} ไม่มีความแตกต่างกันและการเกิดสมดุลทางเคมีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารที่ใช้เป็น ion pair reagent กับสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์เป็นสารที่ไม่แตกตัวต้องใช้เวลานานทำให้การจับกันของ ion pair reagent กับสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์เกิดได้เพียงบางส่วน

จากการตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรด้วยเทคนิค ion pair chromatography พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสาร bak ที่วิเคราะห์ได้มีค่าต่ำอาจเป็นเพราะสภาพไวในการตรวจวัดสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์มีค่าต่ำเมื่อวิเคราะห์ด้วยระบบทางโครมาโทกราฟีดังกล่าว

เมื่อวิเคราะห์หาสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ในตัวอย่างกากน้ำตาลพบว่าสีในตัวอย่างกากน้ำตาลมีผลรบกวนการวิเคราะห์ เพื่อลดการรบกวนการวิเคราะห์ดังกล่าวจึงใช้เทคนิค solid phase extraction เพื่อกำจัดสีและกำจัด matrix ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาล จากการทดลองใช้ sep pak ชนิด ODS โดยให้สีและ matrix ที่มีในกากน้ำตาลจับกับ sep pak ODS และเก็บส่วนของสารละลายเมื่อผ่าน sep pak มาวิเคราะห์ ผลที่ได้พบว่าไม่สามารถตรวจพบปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ในตัวอย่างกากน้ำตาลจากหนองใหญ่และมิตรผลและเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็ม ในตัวอย่างกากน้ำตาลและผ่านตัวอย่างกากน้ำตาลไปยัง sep pak ODS พบว่าปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานซึ่งไม่ผ่านขั้นตอน solid phase extraction

แสดงว่าสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์บางส่วนสามารถจับกับ sep pak ODS สาเหตุที่ผลการวิเคราะห์ได้ปริมาณสารน้อยอาจเป็นเพราะการเลือก cartridge ที่ใช้ไม่เหมาะสมในการแยกสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์นอกจากนี้ยังพบว่าการกำจัดสีด้วยเทคนิค solid phase extraction โดยใช้ sep pak ODS สารละลายที่ได้เมื่อผ่านขั้นตอนดังกล่าวยังคงมีสีเหลืองของกากน้ำตาลสีกากน้ำตาลที่มีอยู่อาจจะรบกวนการวิเคราะห์ทำให้ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อย สาเหตุอื่นที่ไม่สามารถตรวจพบสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์อาจเป็นเพราะปริมาณสารที่มีอยู่มีค่าน้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจวัดของสารหรือสารฆ่าเชื้อที่เติมในกากน้ำตาลเป็นสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

เมื่อเปลี่ยนเทคนิคในการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน bak ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography โดยใช้ Hyperity cyano เป็นเฟสอยู่กับที่และใช้สารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH= 5.00 ± 0.01 อัตราส่วน 50 : 50 v/v เป็นเฟสเคลื่อนที่ตรวจวัดด้วย uv-visible detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.00 มิลลิลิตร/นาที พบว่าที่สภาวะดังกล่าวสามารถแยก homologue C_{12}และ homologue C_{14} ของ bak

เนื่องจากเฟสอยู่กับที่ประกอบด้วยหมู่ cyano ซึ่งมีความเป็นขั้วมากกว่า C_{18} และที่ pH 5.00 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์สามารถ partition กับเฟสอยู่กับที่ซึ่งประกอบด้วยหมู่ cyanoได้ดี ซึ่ง เมื่อพิจารณาจากค่า k' ซึ่งได้จากการคำนวณ (พวงแก้ว ลัคนทินพร, 2539) มีค่า 2.072 สำหรับ

homologue C_{12} และค่า k′ ของ homologue C_{14} มีค่า 2.843 สามารถสนับสนุนเหตุผลดังกล่าว โดยกลไกการเกิดอาจเกิดจากการจับกันระหว่างประจุบวกที่ตำแหน่ง ไนโตรเจนของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์กับหมู่ cyano ของ silyl group ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

จากการทดลองโดยใช้เทคนิค ion suppression พบว่าสามารถวิเคราะห์สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ได้ระดับต่ำแต่เมื่อวิเคราะห์ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำลักษณะพีกที่ได้เป็น tailing ซึ่งอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยากับหมู่ silanol group ที่เหลือมีผลทำให้การวิเคราะห์ปริมาณสารเกิดความผิดพลาดนอกจากนี้ pH ของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อการแยกของสารถ้ามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยทำให้ค่า retention time ที่ได้คลาดเคลื่อน

จากการทดลองเมื่อตรวจวัดปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ในตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 13 แห่งด้วยเทคนิค ion suppresion chromatography พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ในตัวอย่างกากน้ำตาล 3 แห่งได้แก่ สิงห์บุรี อุตสาหการชลบุรีและระยอง โดยตรวจพบ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ จากผลดังกล่าวแสดงว่าโรงงานสิงห์บุรี อุตสาหการชลบุรีและระยองใช้สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์เป็นสารฆ่าเชื้อส่วนอีก 10 โรงงานที่ไม่ตรวจพบสารสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์อาจเป็นเพราะปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างกากน้ำตาลดังกล่าวมีค่าน้อยกว่าขีดจำกัดการตรวจวัด (detection limit) หรืออาจเป็นเพราะใช้สารฆ่าเชื้อซึ่งเป็นสารประกอบควอร์เทอร์นาร์แอมโมเนียคลอไรด์ชนิดอื่น เช่น ctab ซึ่งมีสูตรโครงสร้างต่างจากสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ทำให้เมื่อวิเคราะห์สารดังกล่าวด้วยเทคนิค ion suppression chromotography โดยใช้สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะสมในการตรวจวัดสารดังกล่าว

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 3 แห่งที่ความเข้มข้น 5% , 7% และ 15% และหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (% Recovery) โดยเติมสารละลายมาตรฐานเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 35 พีพีเอ็ม ลงในตัวอย่างกากน้ำตาลก่อนผ่านขั้นตอน solid phase extraction พบว่าความเข้มข้นของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่มีในทั้ง 3 โรงงานเมื่อเติมสารละลายมาตรฐานเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (spike)

และไม่เติมสารละลายมาตรฐาน (unspike) ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่ ความเข้มข้น 5% > 7% > 15% ตามลำดับ และเมื่อหาเปอร์เซนต์ประสิทธิภาพของการสกัดโดยใช้ตัวชะเป็น สารละลายอะซิโตไนไตร์ : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับ pH = 5.00 พบว่ามีค่า 88 % สำหรับ homologue C_{12} และ 80.08% สำหรับ homologue C_{14} จากข้อมูลแสดงถึงปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ซึ่งวิเคราะห์ได้จากตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละความเข้มข้นมีค่าต่างกันแสดงให้เห็นว่า matrix ซึ่งเป็นส่วนประกอบในกากน้ำตาลส่งผลในการรบกวนการวิเคราะห์ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 15% มี matrix เป็นส่วนประกอบมากกว่าที่ 7% , 5% ทำให้ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 7% และ 5% ตามลำดับซึ่งผลจาก matrix ดังกล่าวส่งผลให้ค่าการกลับคืนของสารในตัวอย่างกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 15% ที่ได้ในตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 3 โรงงานมีค่าลดลง นอกจากนี้สาเหตุที่ทำให้การวิเคราะห์มีข้อผิดพลาดอาจเกิดจากขั้นตอนการ preconcentration ด้วยเทคนิค solid phase extraction เนื่องจากขั้นตอนการ load ตัวอย่างกากน้ำตาลโดยทั่วไป เมื่อเพิ่มปริมาตรตัวอย่างกากน้ำตาลปริมาณของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่วิเคราะห์ได้ควรมีค่ามาก แต่เนื่องจาก matrix ที่มีอยู่มากในกากน้ำตาลไม่ได้ผ่านขั้นตอนการแยกด้วยเทคนิคอื่นก่อนทำให้ breakthrough ของตัวอย่างกากน้ำตาลเมื่อผ่าน sep pak cartridge มีค่า 10 มิลลิลิตร

จากการทดลองพบว่า extract-clean cyano cartridge สามารถที่จะจับสีของกากน้ำตาลไว้เมื่อ load กากน้ำตาลผ่าน sep pak cartridge จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนการล้างด้วยสารละลายอะซิโตไนไตร : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH=5.00 อัตราส่วน 20 : 80 v/v ซึ่งในขั้นตอนนี้สามารถชะสีของกากน้ำตาลที่จับกับ sep pak cartridge แต่ที่ความเข้มข้นตัวอย่างกากน้ำตาล 15% พบว่ายังมีสีของกากน้ำตาลบางส่วนจับกับ sep pak cartridge หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างเมื่อชะด้วยสารละลายที่ใช้เป็นตัวชะทำให้เกิดการปนเปื้อนของสีกากน้ำตาลในสารละลายสุดท้ายก่อนที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ทำให้ปริมาณสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ที่วิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้น 15 % มีค่าน้อยลง

ในการทดลองเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกากน้ำตาลที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน 0.45 ไมโครเมตรโดยไม่ผ่าน sep pak cartridge กับตัวอย่างกากน้ำตาลที่ผ่านการกำจัดสีโดยผ่าน sep pak extract-clean cyano พบว่าสีของกากน้ำตาลมีผลในการรบกวนการวิเคราะห์สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดเป็น UV ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดพื้นที่พีกของสารเบนซอลโค

เนียมคลอไรด์ของตัวอย่างกากน้ำตาลได้และเมื่อพิจารณาถึงตัวชะถึงแม้จะมีความแรงพอที่จะชะสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์แต่จากผลการทดลองจะพบพีกของสารอื่นที่ให้ค่า retention time ใกล้กับพีกของ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ซึ่งตัวชะสามารถที่จะชะสารอินทรีย์บางชนิดใน matrix มีคุณสมบัติคล้ายกับสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์มีผลในการรบกวนการวิเคราะห์สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาด

จากการพิจารณาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของ homologue C_{12}สาร bak จากเทคนิค solid phase extraction ของตัวอย่างกากน้ำตาลจาก อุตสาหการชลบุรี สิงห์บุรีและระยอง พบว่าที่ความเข้มข้น 5% ให้ค่ามากกว่า 7% และ 15% จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อ matrixในกากน้ำตาลมีปริมาณมากขึ้นการใช้เทคนิค solid phase extraction ในการแยกสารเพียงอย่างเดียวอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากในตัวอย่างกากน้ำตาลส่วนประกอบคือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ส ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แคลเซียม เหล็ก ทองแดง โซเดียมและสารอินทรีย์บางชนิด ซึ่งขั้นตอนการล้างด้วยสารละลายที่ใช้เป็น wash solvent อาจไม่สามารถที่จะชะพวกน้ำตาลและสารอนินทรีย์ที่มีกากน้ำตาลได้หมด สารอนินทรีย์ เช่น แคลเซียม เหล็ก ทองแดงและโซเดียมซึ่งมีประจุบวกและขนาดเล็กกว่าสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์สามารถที่จะแย่งจับกับ extract-clean cyano cartridge ได้ดีกว่าสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ ปริมาณของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่ถูกชะด้วยตัวชะมีค่าน้อยเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography ปริมาณที่วิเคราะห์ได้จึงมีค่าน้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากการวิเคราะห์สารประกอบ bak ด้วยเทคนิค ion pair chromatography พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณรวมของสาร bak โดยไม่สามารถแยก homologue C_{12} และ homologue C_{14} และเมื่อตรวจวัดสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลด้วยเทคนิคดังกล่าว ไม่พบสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาลมิตรผลและหนองใหญ่ เมื่อ spike สารละลายมาตรฐาน bak ความเข้มข้น 25 พีพีเอ็มในตัวอย่างกากน้ำตาลและกำจัดสีที่รบกวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค solid phase extraction ด้วย sep pak ODS พบว่าไม่สามารถกำจัดสีที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลและปริมาณสาร bak ที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อย การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion pair chromatography และกำจัดสีในตัวอย่างกากน้ำตาลด้วย sep pak ODS จึงไม่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร bak ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาล

เมื่อวิเคราะห์สาร bak ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography พบว่าสามารถแยกและวิเคราะห์ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ได้ที่ระดับต่ำโดยค่าขีดจำกัดการตรวจวัดของ homologue C_{12} มีค่า 50 พีพีบี และ homologue C_{14} มีค่า 100 พีพีบี จากการทดลองกำจัดสีด้วยเทคนิค solid phase extraction ด้วย sep pak extract-clean cyano และวิเคราะห์ปริมาณสาร bak ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography สามารถตรวจพบ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ในตัวอย่างกากน้ำตาล 3 แห่ง ได้แก่ อุตสาหการชลบุรี สิงห์บุรี และระยอง

จากการทดสอบผลทางสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่ความเข้มข้น 5% 7% 15% เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ion suppression chromatography ด้วย ANOVA ดังตารางที่ 16 – 27 ค่า significanceที่ได้จากการทดลองมีค่าน้อยกว่าค่า significance ที่ 0.05 ดังนั้นปริมาณ homologue C_{12} และ homologue C_{14} ของสาร bak ที่ความเข้มข้น 5% 7% 15% มีปริมาณแตกต่างกัน เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย scheffe และ LSD ดังตารางที่ 20, 21,26 และ 27 โดยปริมาณที่ตรวจพบที่ความเข้มข้น 5 % > 7%> 15%

ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร bak ที่วิเคราะห์ในตัวอย่างกากน้ำตาลทั้ง 3 แห่งที่ความเข้มข้น 5% > 7% และ 15% เนื่องจาก matrix และสีที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลมีผลในการรบกวน

การวิเคราะห์ปริมาณ สาร bak ทำให้ปริมาณสาร bak ที่ความเข้มข้น15%มีค่าน้อยกว่า 7% และ 5% เนื่องจากสาร bak ประกอบด้วย homologue C_{12} และ homologue C_{14} โดยมีปริมาณ homologue แต่ละชนิดที่แตกต่างกันประกอบกับข้อมูลของชนิดของสารฆ่าเชื้อที่แต่ละโรงงานใช้ เมื่อเกิดการตกค้างของสารbakในสิ่งแวดล้อมเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ตกค้างโดยใช้เทคนิค ion suppression chromatography สามารถจะใช้เป็นตัวตรวจสอบได้ว่าแหล่งที่มาของสารมาจากโรงงานใดได้ นอกจากนี้สามารถประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ bak ในผลิตภัณฑ์อื่นหรือวิเคราะห์สารควอเทอร์นารีชนิดอื่นที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อม

จากการทดลองกำจัดสีด้วยเทคนิค solid phase extraction ด้วย sep pak extract-clean cyano สามารถกำจัดสีของกากน้ำตาลได้แต่ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้มีค่าน้อยเมื่อความเข้มข้นกากน้ำตาลมากขึ้น เพื่อให้การวิเคราะห์ถูกต้องมากขึ้นควรจะมีการเพิ่มขั้นตอนการกำจัด matrix ด้วยวิธีอื่นก่อนผ่านขั้นตอนการ preconcentration ด้วย sep pak นอกจากนี้อาจพัฒนาขั้นตอนเทคนิค solid phase extraction โดยทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2523. เอกสารวิชาการอ้อย เล่มที่ 1. หน้า 210-254. พิมพ์ครั้งที่ 1. ธนประดิษฐ์การพิมพ์.

คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์ และไพเราะ ทิพยทัศน์. 2523. ลักษณะการเป็นอาหารเชื้อของกากน้ำตาล.

จรัญ จันทลักขณา. 2540. สถิติวิธีวิเคราะห์และการวางแผนงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

ปรีชญา เถาสุวรรณ. 1991. Ion pair chromatography. SA newsletter. 2 (11) : 2-6.

พวงแก้ว ลัคนทินพร. 2539. ลิควิดโครมาโทกราฟีในงานวิเคราะห์. พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

เพอชา เฮงตระกูล และ ปรีชญา เถาสุวรรณ. 1992. การเตรียมตัวอย่างโดยเทคนิค solid phase extraction. SA newsletter. 3 (3) : 8-11.

ภัทรา มณี ธวัช. 2520. กากน้ำตาล. วารสารน้ำตาล. 13 (1) : 1-8.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534. ลิควิดโครมาโทกราฟี. ในหลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. หน้า 730-809. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร. 2540. การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล.โครงการศึกษาวิจัยผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สันต์ ฉายตระกูล. 2529. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาขีดความสามารถทางเทคโนโลยี ของอุตสาหกรรมไทย. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.หน้า 33-49.

สุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง. 2534. คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

.

Ambrus, G. , Lioyd T.T. and Particia A.M. 1987. Direct determination of benzalkonium chloride in ophthalmic systems by reverse phase high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical Science. 76, No. 2 : 174-176.

Auerbach, M.E. 1943. Germicidal Quaternary Ammonium salts in dilute solution a colorimetric assay method. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Analytical. 15 : 492-493.

Bettero, A., Semenzato A. 1990. Reverse phase high performance liquid chromatography applied to the direct analysis of untreated heterophasic systems. Journal of Chromatography. 507 : 403-407.

Bleau , G. and Desaulniers, M. 1989. High performance liquid chromatography assay of benzalkonium in plasma. Journal of Chromatography. 487 : 221-2217.

Budavari, S. , and others. 1989. The Merck Index. 11th ed.

Chatton, L.G. and Okamura, K.O. 1973. Assay of quaternary ammonium compounds in various dosage forms by acid–dye method. Journal of Pharmaceutical Science. 62 : 1328-1331.

Cybulski, Z.R. 1984. Dertermination of benzalkonium chloride by gas chromatography. Journal of Pharmaceutical Science. 73 : 1700-1702.

Daoud, N.N. 1983. Determination of benzalkonium chloride by chemical ionization mass spectroscopy. Journal of Pharmaceutical Science. 72 : 290-292.

Dennis, F.M. and Lioyd ,T.T. 1983. Dertermination of benzalkonium chloride in the presence of interfering alkaloids and polymeric substrates by reverse phase high pressure liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical Science. 72, No. 5 : 521-525.

Elrod, L. and Timothy, Jr. 1992. Determination of benzalkonium chloride in eye care products by high performance liquid chromatography and solid phase extraction or on-line column switching. Journal of Chromatography. 625: 362-367.

Fan, T.Y. and Wall, G.M. 1993. Determination of benzalkonium chloride in ophthalmic solution containing tyloxapol by solid phase extraction and reverse phase high performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical Science. 82 : 1172-1174.

Greving, J.E. 1979. Analysis of Quaternary ammonium compounds and basic drugs based on ion pair adsorption high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 186 : 683-690.

Helboe, P. 1983. Separation and quantitative determination of long chain alkyltrimethylammonium ions by reversed phase ion pair liquid chromatography using ultraviolet-absorbing counter ions. Journal of Chromatography. 679 : 117-122.

Kirk, O. 1982. Quaternary ammonium compounds. Encyclopedia of chemical technology. 3rd ed. 19 : 521-531.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Kummerer, K. and Eitel, A. 1997. Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospital by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with post-column ion pairing and fluorescence detection. Journal of Chromatography. 774 : 281-286.

Liedekerke, B.M. and Nelis, H.J. 1989. High performance liguid chromatography of quaternary ammonium compounds on polystyrene-divinylbenzene column. Anal.chem. 61 : 728-732.

Meryer , R.C. 1980. Determination of benzalkonium chloride by reverse phase high pressure liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical Science. 69, No. 10 : 1148-1150.

Nakamura, K. and Morikawa, Y. 1982. Separation of surfactant mixtures and their homologs by liquid chromatography. JAOCS. 59 : 64-68.

Paesen, J. , Quintens I. and Thoiyhi G. 1994. Quantitative analysis of quaternary ammonium antiseptics using thin layer densitometry. Journal of Chromatography. 677 : 377-384.

Parhizkari , G. , Miller R.B. and Chen C. 1995. A stability indicate hplc for the benzalkonium chloride in phenylephrine HCL 10% opthalmic solution . Journal of Liquid chromatography . 18 , No. 3 : 553-563.

Parkin, J. E. 1993. Salting out solvent extraction for pre–concentration of benzalkonium chloride prior to high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 635 : 75-80.

Rosssmoore, H.W. 1995. Handbook of biocide and preservative use. 1st ed. Grate Britain.

Ruyter, D. M, Cronnelly R. and Castagnoli N. 1980. Reverse phase ion pair chromatography of quaternary ammonium compounds determination of pyridinium, neostigmine and edrophonium in biological fluids. Journal of Chromatography. 183 : 193-201.

Suorth T. 1990. Determination of fungistatic quaternary ammonium compound in bevarages and watersamples by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 507 : 421-425.

Suzuki, S. 1989. Analysis of benzalkonium chloride by gas chromatography. Journal of Chromatography. 463 : 188-191.

Taylor, R.B. 1997. Determination of quaternary ammonium chloride dequalinium and cetylpyridinium chloride in candy based lozenges by high performance liquid chromatography. Analyst. 122 : 973-976.

Thomas, M.S. 1992. Analysis of surfactant . Sufactant science series. 40 : 203-211.

Toomey, A.B. , Dalrymple, D.M. and Jasperse, J.L. 1997. Analysis of quaternary ammonium compound by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. Journal Liquid Chromatography .
20 : 1037-1047.

Victorio,T.W. and Kennedy, M.J. 1982. Determination of trace levels of quaternary ammonium compounds in river water by liquid chromatography with conductometric detection. Anal.chem. 54 : 1631-1633.

Weiss, C.S. and Haztertt, J.S. 1992. Determination of quaternary ammonium compounds by capillary electrophoresis using direct and indirect UV detection. Journal of Chromatography. 608 : 325-332.

Yamamoto, K. 1992. Interaction between sulphonephthalein dyes and quaternary ammonium ions in aqueous solution. Analytical science. 8 : 299-305.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

แสดงข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

General Linear Model

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลกลุ่มประชากรที่วิเคราะห์ทางสถิติสำหรับ homologue C_{12}ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
CONC	1	5%	27
	2	7%	27
	3	15%	27
TYPE	1	autsahakarn chonburi	27
	2	singburi	27
	3	rayong	27

ตารางที่ 17 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของ homologue C_{12}ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

Descriptive Statistics

	CONC	TYPE	Mean	Std. Deviation	N
CARBON12	1	1	6.5422	.1002	9
		2	9.4667	9.592E-02	9
		3	19.9067	1.1752	9
		Total	11.9719	5.8824	27
	2	1	3.7867	1.118E-02	9
		2	4.2311	3.919E-02	9
		3	12.1567	.3068	9
		Total	6.7248	3.9222	27
	3	1	1.6300	2.291E-02	9
		2	1.6578	1.641E-02	9
		3	5.0767	2.236E-02	9
		Total	2.7881	1.6492	27
	Total	1	3.9863	2.0495	27
		2	5.1185	3.3115	27
		3	12.3800	6.2084	27
		Total	7.1616	5.6088	81

ตารางที่18 แสดงการทดสอบผลของปัจจัยของกลุ่มประชากรศึกษาที่มีผลต่อปริมาณ homologue C_{12}

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CARBON12

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[a]
Corrected Model	2504.699[b]	8	313.087	1881.723	.001	.995	15053.787	1.000
Intercept	4154.375	1	4154.375	24968.699	.001	.997	24968.699	1.000
CONC	1146.322	2	573.161	3444.823	.001	.990	6889.647	1.000
TYPE	1120.188	2	560.094	3366.286	.001	.989	6732.572	1.000
CONC * TYPE	238.189	4	59.547	357.892	.001	.952	1431.569	1.000
Error	11.980	72	.166					
Total	6671.054	81						
Corrected Total	2516.679	80						

a. Computed using alpha = .05

b. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .995)

ตารางที่19 แสดงผลจากการประเมินผลของพารามิเตอร์ต่างๆของ homologue C_{12}

Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[a]
						Lower Bound	Upper Bound			
CARBON12	Intercept	5.077	.136	37.337	.001	4.806	5.348	.951	37.337	1.000
	[CONC=1]	14.830	.192	77.125	.001	14.447	15.213	.988	77.125	1.000
	[CONC=2]	7.080	.192	36.820	.001	6.697	7.463	.950	36.820	1.000
	[CONC=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[TYPE=1]	-3.447	.192	-17.925	.001	-3.830	-3.063	.817	17.925	1.000
	[TYPE=2]	-3.419	.192	-17.780	.001	-3.802	-3.036	.814	17.780	1.000
	[TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=1] * [TYPE=1]	-9.918	.272	-36.471	.001	-10.460	-9.376	.949	36.471	1.000
	[CONC=1] * [TYPE=2]	-7.021	.272	-25.819	.001	-7.563	-6.479	.903	25.819	1.000
	[CONC=1] * [TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=2] * [TYPE=1]	-4.923	.272	-18.105	.001	-5.465	-4.381	.820	18.105	1.000
	[CONC=2] * [TYPE=2]	-4.507	.272	-16.573	.001	-5.049	-3.965	.792	16.573	1.000
	[CONC=2] * [TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=3] * [TYPE=1]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=3] * [TYPE=2]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=3] * [TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.

a. Computed using alpha = .05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Post Hoc Tests

CONC

ตารางที่ 20 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{12}ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CARBON12

	(I) CONC	(J) CONC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1	2	5.2470*	.111	.001	4.9695	5.5245
		3	9.1837*	.111	.001	8.9062	9.4612
	2	1	-5.2470*	.111	.001	-5.5245	-4.9695
		3	3.9367*	.111	.001	3.6592	4.2142
	3	1	-9.1837*	.111	.001	-9.4612	-8.9062
		2	-3.9367*	.111	.001	-4.2142	-3.6592
LSD	1	2	5.2470*	.111	.001	5.0257	5.4683
		3	9.1837*	.111	.001	8.9624	9.4050
	2	1	-5.2470*	.111	.001	-5.4683	-5.0257
		3	3.9367*	.111	.001	3.7154	4.1580
	3	1	-9.1837*	.111	.001	-9.4050	-8.9624
		2	-3.9367*	.111	.001	-4.1580	-3.7154

Based on observed means. The error term is Error.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TYPE

ตารางที่ 21 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{12}ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละโรงงาน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CARBON12

	(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1	2	-1.1322*	.111	.001	-1.4097	-.8547
		3	-8.3937*	.111	.001	-8.6712	-8.1162
	2	1	1.1322*	.111	.001	.8547	1.4097
		3	-7.2615*	.111	.001	-7.5390	-6.9840
	3	1	8.3937*	.111	.001	8.1162	8.6712
		2	7.2615*	.111	.001	6.9840	7.5390
LSD	1	2	-1.1322*	.111	.001	-1.3535	-.9109
		3	-8.3937*	.111	.001	-8.6150	-8.1724
	2	1	1.1322*	.111	.001	.9109	1.3535
		3	-7.2615*	.111	.001	-7.4828	-7.0402
	3	1	8.3937*	.111	.001	8.1724	8.6150
		2	7.2615*	.111	.001	7.0402	7.4828

Based on observed means. The error term is Error.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

General Linear Model

ตารางที่ 22 แสดงข้อมูลกลุ่มประชากรที่วิเคราะห์ทางสถิติสำหรับ homologue C_{14}ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
CONC	1	5%	27
	2	7%	27
	3	15%	27
TYPE	1	autsahakarn chonburi	27
	2	singburi	27
	3	rayong	27

ตารางที่ 23 แสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ homologue C_{14}ของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์

Descriptive Statistics

	CONC	TYPE	Mean	Std. Deviation	N
CARBON14	1	1	8.4011	8.328E-02	9
		2	11.9200	.1200	9
		3	9.2511	.1322	9
		Total	9.8574	1.5316	27
	2	1	4.6478	3.492E-02	9
		2	6.1867	8.631E-02	9
		3	6.2922	2.333E-02	9
		Total	5.7089	.7677	27
	3	1	2.0344	7.265E-03	9
		2	2.7844	3.206E-02	9
		3	2.6711	3.018E-02	9
		Total	2.4967	.3373	27
	Total	1	5.0278	2.6633	27
		2	6.9637	3.8426	27
		3	6.0715	2.7431	27
		Total	6.0210	3.1911	81

ตารางที่ 24 แสดงการทดสอบผลของปัจจัยกลุ่มประชากรศึกษาที่มีผลต่อปริมาณ homologue C_{14}

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CARBON14

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[a]
Corrected Model	814.258[b]	8	101.782	18310.644	.001	1.000	146485.149	1.000
Intercept	2936.436	1	2936.436	528264.942	.001	1.000	528264.942	1.000
CONC	735.382	2	367.691	66147.608	.001	.999	132295.215	1.000
TYPE	50.699	2	25.349	4560.348	.001	.992	9120.696	1.000
CONC * TYPE	28.178	4	7.045	1267.309	.001	.986	5069.238	1.000
Error	.400	72	5.559E-03					
Total	3751.094	81						
Corrected Total	814.659	80						

a. Computed using alpha = .05

b. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = .999)

ตารางที่ 25 แสดงผลจากการประเมินผลของพารามิเตอร์ต่างๆของ homologue C_{14}

Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power[a]
						Lower Bound	Upper Bound			
CARBON14	Intercept	2.671	.025	107.480	.001	2.622	2.721	.994	107.480	1.000
	[CONC=1]	6.580	.035	187.218	.001	6.510	6.650	.998	187.218	1.000
	[CONC=2]	3.621	.035	103.030	.001	3.551	3.691	.993	103.030	1.000
	[CONC=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[TYPE=1]	-.637	.035	-18.115	.001	-.707	-.567	.820	18.115	1.000
	[TYPE=2]	.113	.035	3.225	.002	4.327E-02	.183	.126	3.225	.889
	[TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=1] * [TYPE=1]	-.213	.050	-4.292	.001	-.312	-.114	.204	4.292	.989
	[CONC=1] * [TYPE=2]	2.556	.050	51.415	.001	2.456	2.655	.973	51.415	1.000
	[CONC=1] * [TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=2] * [TYPE=1]	-1.008	.050	-20.276	.001	-1.107	-.909	.851	20.276	1.000
	[CONC=2] * [TYPE=2]	-.219	.050	-4.404	.001	-.318	-.120	.212	4.404	.991
	[CONC=2] * [TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=3] * [TYPE=1]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=3] * [TYPE=2]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.
	[CONC=3] * [TYPE=3]	0[b]	.	.	.	.	.	.	.	.

a. Computed using alpha = .05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Post Hoc Tests

CONC

ตารางที่ 26 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{14}ที่มีในตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละความเข้มข้น

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CARBON14

	(I) CONC	(J) CONC	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1	2	4.1485*	.020	.001	4.0978	4.1992
		3	7.3607*	.020	.001	7.3100	7.4115
	2	1	-4.1485*	.020	.001	-4.1992	-4.0978
		3	3.2122*	.020	.001	3.1615	3.2629
	3	1	-7.3607*	.020	.001	-7.4115	-7.3100
		2	-3.2122*	.020	.001	-3.2629	-3.1615
LSD	1	2	4.1485*	.020	.001	4.1081	4.1890
		3	7.3607*	.020	.001	7.3203	7.4012
	2	1	-4.1485*	.020	.001	-4.1890	-4.1081
		3	3.2122*	.020	.001	3.1718	3.2527
	3	1	-7.3607*	.020	.001	-7.4012	-7.3203
		2	-3.2122*	.020	.001	-3.2527	-3.1718

Based on observed means. The error term is Error.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TYPE

ตารางที่ 27 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเชิงซ้อนของปริมาณ homologue C_{14}ที่มีในตัวอย่าง
กากน้ำตาลแต่ละโรงงาน

Multiple Comparisons

Dependent Variable: CARBON14

	(I) TYPE	(J) TYPE	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1	2	-1.9359*	.020	.001	-1.9866	-1.8852
		3	-1.0437*	.020	.001	-1.0944	-.9930
	2	1	1.9359*	.020	.001	1.8852	1.9866
		3	.8922*	.020	.001	.8415	.9429
	3	1	1.0437*	.020	.001	.9930	1.0944
		2	-.8922*	.020	.001	-.9429	-.8415
LSD	1	2	-1.9359*	.020	.001	-1.9764	-1.8955
		3	-1.0437*	.020	.001	-1.0842	-1.0033
	2	1	1.9359*	.020	.001	1.8955	1.9764
		3	.8922*	.020	.001	.8518	.9327
	3	1	1.0437*	.020	.001	1.0033	1.0842
		2	-.8922*	.020	.001	-.9327	-.8518

Based on observed means. The error term is Error.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาว กุลธิดา แหวนเพชร เกิดวันที่ 24 มีนาคม พ.ศ.2517 ที่ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2540

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย