



บทที่ 2

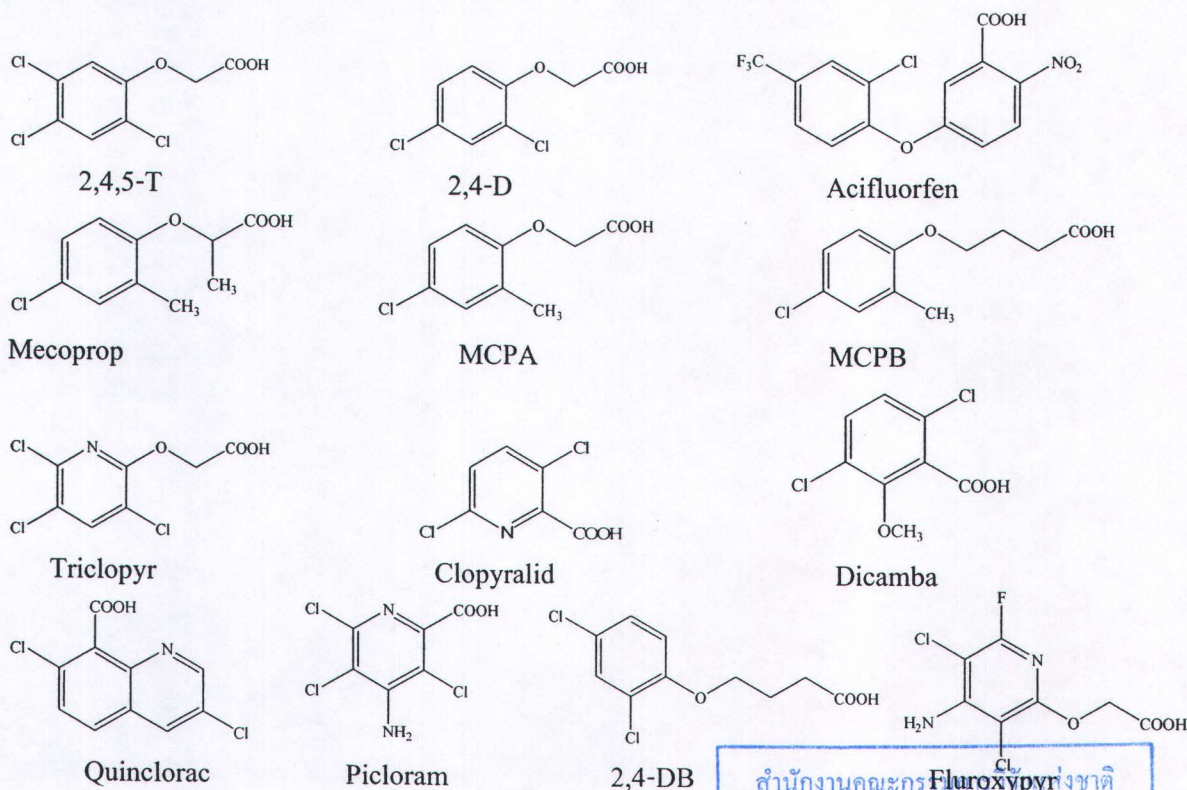
การเตรียมและทดสอบประสิทธิภาพของเคพิลาร์คอลดีนประเภทซิลิกามอนอลิต

และหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารกลุ่มฟีนอกซีแอซิด

และบิสฟีนอลเอไดโกลซิลิลอีเทอร์ บิสฟีนอลเอพไดโกลซิลิลอีเทอร์ และอนุพันธ์

2.1 คำนำ

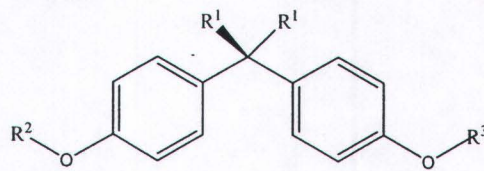
ฟีนอกซีแอซิด (phenoxy acids) สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.1 เป็นสารประเภทหนึ่งในกลุ่มของยาปราบวัชพืชที่นิยมใช้ในงานทางด้านเกษตรกรรม เพื่อช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ไม่ต้องการ หลังจากการฉีดพ่นสารเหล่านี้แล้วอาจทำให้ตกค้างอยู่บนพืชผัก หรือเกิดการปนเปื้อนลงในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำได้ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอกซีแอซิดจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ผ่านมีรายงานวิจัยการแยกและวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิดด้วยเทคนิค GC, HPLC และ CE แต่่วิธีการวิเคราะห์ที่ผ่านมามีการแยกและวิเคราะห์ฟีนอกซีแอซิดพร้อมกันครั้งละไม่เกิน 10 ชนิด ยกเว้น Kuang *et al.* ที่ทำการวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิดพร้อมกัน 13 ชนิดด้วยเทคนิค GC แต่ฟิกของสารบางตัวยังแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ ในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธี μ HPLC ให้สามารถวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิดประมาณ 13 ชนิด เพื่อให้ครอบคลุมยิ่งขึ้นและใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว



รูปที่ 2.1 สูตร โครงสร้างของสารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิด

สำนักงานคณะกรรมการ อาหารและยา
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 2 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน..... 245898
เลขเรียกหนังสือ.....

บิสฟีนอลเอไดโกลซิดิลอีเทอร์ (bisphenol-A-diglycidyl ether, BADGE) และบิสฟีนอลเอฟไดโกลซิดิลอีเทอร์ (bisphenol-F-diglycidyl ether, BFDGE) ดังสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2.2 เป็นสารตั้งต้นของการเตรียม อีพอกซีเรซินที่ใช้เป็นสารเคลือบภายในกระป๋องบรรจุอาหาร ซึ่งสาร BADGE และ BFDGE ที่ตกค้างอยู่ในสารเคลือบกระป๋องอาจเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์อื่นในระหว่างขั้นตอนการผลิต และอาจปนเปื้อนในอาหารที่บรรจุกระป๋องได้ สหภาพยุโรปได้กำหนดปริมาณของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ในอาหารไม่เกิน 1 mg/kg ซึ่งเมื่อเร็วๆ นี้ Leepipapiboon *et al.* ได้รายงานวิธีการวิเคราะห์สารเหล่านี้ด้วยเทคนิค HPLC อย่างไรก็ตามยังมีสารบางคู่ที่แยกจากกันไม่สมบูรณ์ และใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จึงสนใจที่จะต่อยอดงานวิจัยโดยพัฒนาวิธีของ μ HPLC และ CEC เพื่อให้ได้ค่าการแยกที่ดีขึ้นและใช้เวลาน้อยลง



สาร	R ¹	R ²	R ³
BADGE	CH ₃		
BADGE.H ₂ O	CH ₃		CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BADGE.2H ₂ O	CH ₃	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BADGE.HCl.H ₂ O	CH ₃	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BADGE.2HCl	CH ₃	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH
BADGE.HCl	CH ₃		CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH
BFDGE	H		
BFDGE.H ₂ O	H		CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BFDGE.2H ₂ O	H	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BFDGE.HCl.H ₂ O	H	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH
BFDGE.2HCl	H	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH	CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH
BFDGE.HCl	H		CH ₂ CH(Cl)CH ₂ OH

รูปที่ 2.2 สูตร โครงสร้างของ BADGEs และ BFDGEs

งานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาแยกและวิเคราะห์สารในกลุ่มฟีนอกซีแอซิด BADGEs และ BFDGEs ด้วยเทคนิคต่างๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

เนื่องจากฟีนอกซีแอซิดเป็นสารที่มีขั้วและกลายเป็นไอได้ยาก ในการแยกและวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค GC จึงต้องมีขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ของสารก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถเตรียมอนุพันธ์ได้หลายวิธี เช่น เตรียมผ่านปฏิกิริยาไซลิเลชัน [Rodriguez *et al.*: 2005, Pereiro *et al.*: 2004] เอสเทอร์ริฟิเคชัน [Catalina *et al.*: 2000, Hirahara *et al.*: 1997, Nilsson *et al.*: 1998, Kuang *et al.*: 2006] หรือแอลคิลเลชัน [Rimmer *et al.*: 1996] ทำให้ขั้นตอนยุ่งยากและใช้ระยะเวลานานเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการแยกและวิเคราะห์ฟีนอกซีแอซิดด้วยเทคนิค HPLC และ CE ในการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิค HPLC นิยมใช้คอลัมน์แยกสารเป็น C18 และใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างๆ กัน เช่น อะซิโตนไนโตรล-น้ำ [Cappiello *et al.*: 1997], เมทานอล-กรดฟอสฟอริก [Rosales-Conrado *et al.*: 2002], เมทานอล-แอมโมเนียมอะซิเตต [Wu *et al.*: 2005] เป็นต้น และใช้เครื่องตรวจวัดประเภทต่างๆ ได้แก่ ยูวี-วิสิเบิล [Rosales-Conrado *et al.*: 2002, Wu *et al.*: 2005] และแมสสเปกโตรเมทรี [Takino *et al.*: 2001, Cappiello *et al.*: 1997] และสำหรับการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค CE ได้มีการนำเทคนิค CE ประเภทต่างๆ มาใช้สำหรับการแยกฟีนอกซีแอซิด ได้แก่ เทคนิคอะพอลาร์โซนอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis, CZE) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 35 mM บอเรตบัฟเฟอร์-60 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 6.5 ที่มีการเติม 2 mM เมทิลเลดเบตาไซโคลเด็กซ์ทริน [Kruaysawat *et al.*: 2001] นอกจากนี้ยังมีรายงานของเทคนิคไมเซลล์าร์อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 39 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7, 42 mM SDS, 1670 mM ยูเรีย และ 22.2 % (v/v) เมทานอล และทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดประเภทฟลูออเรสเซนซ์ [Jung and Brumley: 1995] อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วย μ HPLC ที่คอลัมน์ประเภทมอนอลิตที่เป็นซิลิกา

สำหรับการวิเคราะห์ BADGEs และ BFDGEs ส่วนใหญ่นิยมวิเคราะห์ด้วยเทคนิค reversed phase HPLC โดยใช้คอลัมน์เป็น C18 และมีเฟสเคลื่อนที่เป็นอะซิโตนไนโตรลผสมกับน้ำ และใช้เครื่องตรวจวัดประเภทต่างๆ ได้แก่ ฟลูออเรสเซนซ์ [Lintschinger and Rueter: 2000, Berger *et al.*: 2001, Nerin *et al.*: 2002, Leepipatpiboon *et al.*: 2005] และแมสสเปกโตรเมทรี [Cottier *et al.*: 1997, Garcia and Losada: 2004] เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่ปรากฏว่ามีรายงานการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วย μ HPLC ที่ใช้คอลัมน์ประเภทมอนอลิตที่เป็นซิลิกา

2.2 การทดลอง

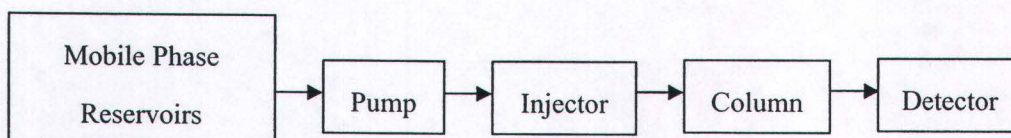
2.2.1 เครื่องมือและสารเคมี

1) สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมคอลัมน์มอนอลิต

fused-silica capillary ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 และ 200 μm , tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MOP), octadecyldimethyl-chlorosilane (ODS-Cl), urea, pyridine, poly(ethyleneglycol) (PEG, MW=10,000), octadecyl methacrylate, hexane, toluene, acetic acid (1M), diethylamine, α, α' -azobis-isobutyronitrile (AIBN), acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), sodium hydroxide และ hydrochloric acid

2) เครื่อง HPLC และอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย conventional HPLC

ระบบที่ใช้วิเคราะห์ใน conventional HPLC เป็นของบริษัท Agilent Technologies รุ่น Hewlette Packard 1100 series ประกอบด้วย automatic degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, diode array detector

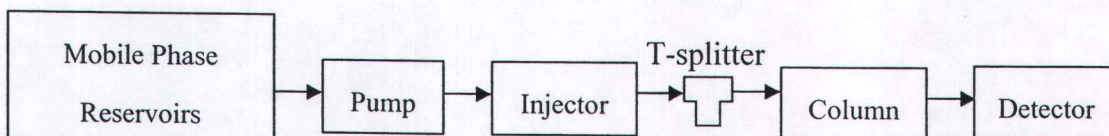


รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง HPLC: คัดแปลงจาก [Synder *et al.*: 1979]

3) เครื่อง HPLC และอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ด้วย μHPLC

ระบบที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้เป็นระบบ HPLC แบบ split flow/injection ประกอบด้วยเคมีไมโครปั๊ม (บริษัท Jasco รุ่น 3085PU), 7725 injector (บริษัท Rheodyne) ที่มี splitting T-joint และ on- or off-column UV detector (บริษัท Jasco รุ่น CE-1575)

ระบบที่ใช้หาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารเป็นระบบ HPLC แบบ split-flow/injection ประกอบด้วยปั๊ม (บริษัท Shimadzu รุ่น LC-10AD), 7725 injector (บริษัท Rheodyne) ที่มี splitting T-joint, UV detector (บริษัท GL Sciences รุ่น MU701) และ capillary flow cell (GL Sciences, cell volume 6 nL)



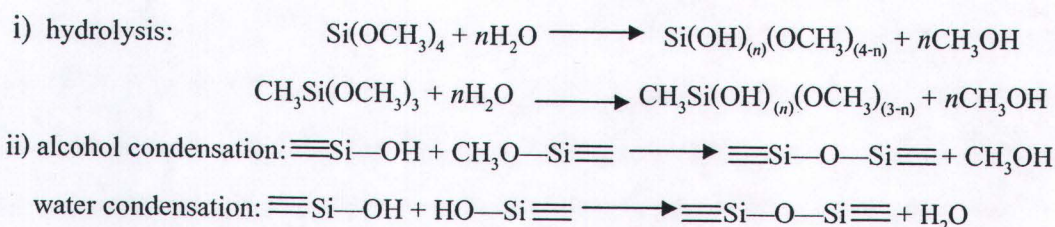
รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบอย่างง่ายของเครื่อง μHPLC แบบ split flow/injection

2.2.2 การเตรียมซิลิกาอมอนอลิทิกอะฟิลลารีคอลัมน์ [Miyamoto *et al.*: 2008, Núñez *et al.*: 2008]

อะฟิลลารีคอลัมน์ประเภทซิลิกาอมอนอลิตสามารถเตรียมได้แบบ *in situ* โดยเกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการ sol-gel เป็นซิลิกาอมอนอลิตภายในอะฟิลลารีได้เลย โดยก่อนเตรียมอมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ นำ fused-silica capillary (ความยาวประมาณ 3 เมตร) มาปรับสภาพพื้นผิวภายในโดยการล้างผิวด้านในอะฟิลลารีด้วย 1.0 M NaOH, น้ำ, 1.0 M HCl, น้ำ และอะซิโตน จากนั้นอัดอากาศเพื่อไล่อะซิโตนออก แล้วนำอะฟิลลารีไปอบให้แห้งในตู้อบที่ 40°C

เตรียมซิลิกาอมอนอลิทิกคอลัมน์โดยเปิดสารละลายไฮเลนที่ประกอบด้วย TMOS:MTMS (ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 9.0 mL ลงในสารละลายที่ประกอบด้วย PEG 0.9000 g, ยูเรีย 2.0250 g และ 10 mM กรดอะซิติก ปริมาตร 20.0 mL แล้วกวนให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิ 0 °C จากนั้นบรรจุสารละลายผสมดังกล่าวเข้าไปในอะฟิลลารีที่แช่ไว้ในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 40 °C แล้วปล่อยให้เกิดเจลและบ่มเจลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอะฟิลลารีไปเพิ่มอุณหภูมิในตู้อบขึ้นจนถึง 80 °C คงไว้ 10 ชั่วโมง แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 120 °C คงไว้ 4 ชั่วโมง หลังจากลดอุณหภูมิลง นำอะฟิลลารีที่มีเจลออกมาล้างด้วยเมทานอลโดยใช้ปั๊มของ HPLC เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำอะฟิลลารีไปอบในเตาอบที่อุณหภูมิ 330 °C เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จะได้อมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์โดยตัดอะฟิลลารีให้ได้ความยาวตามต้องการ

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการซอลเจลมีดังนี้ [Legigo-Quigley *et al.*: 2003]

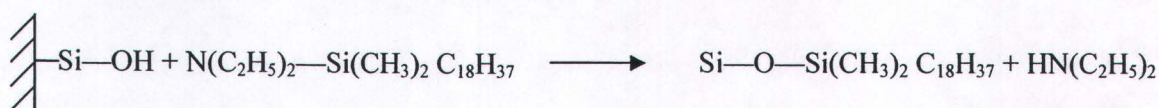


จากผลการเตรียมอมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์หลายครั้งด้วยกัน ได้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100 μm ยาว 40 cm ประมาณ 20 คอลัมน์ และ 200 μm ยาวประมาณ 30 หรือ 40 cm ประมาณ 40 คอลัมน์ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วย μHPLC โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล เฉพาะคอลัมน์ที่มีความสูงของเพลตน้อยกว่า 8 μm หรือจำนวนเพลตมากกว่า 1.25×10^5 เพลต/เมตร แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงและจะนำไปปรับปรุงพื้นผิวซิลิกาอมอนอลิตที่มีเฟสคงที่ต่างๆ ต่อไป

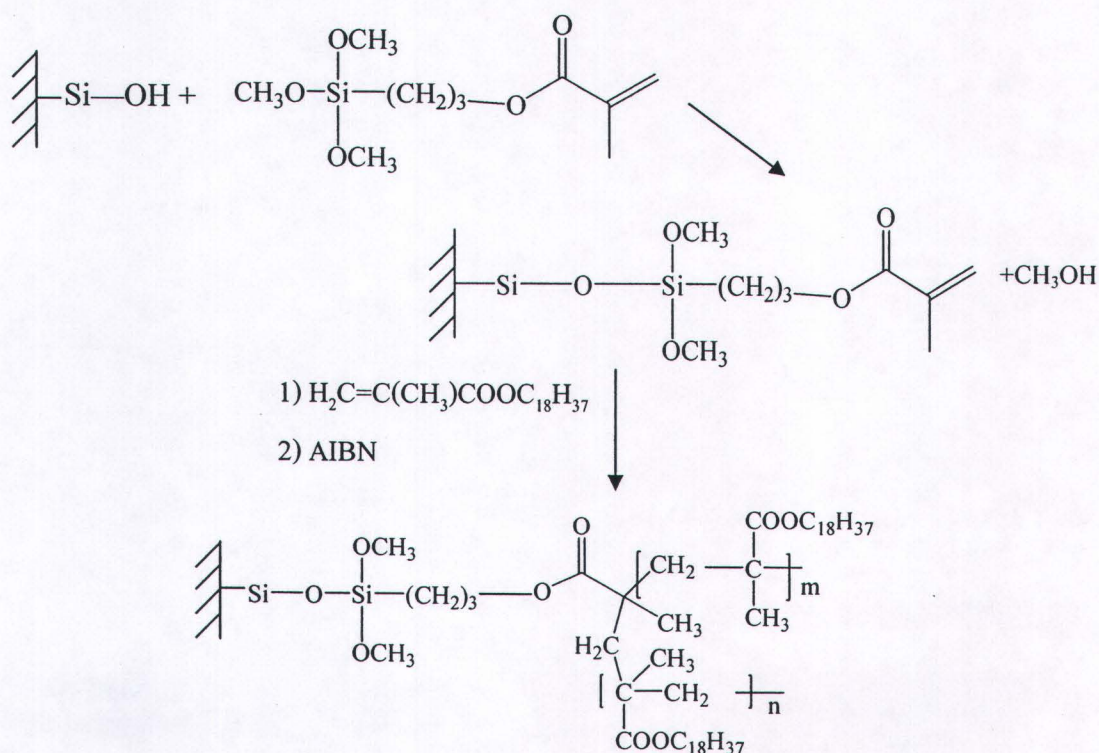
2.2.3 การปรับปรุงพื้นผิวซิลิกาอนอติให้แสดงสมบัติเป็นรีเวิร์สเฟส

2.2.3.1 การเตรียมคอลัมน์ ODS [Motokawa *et al.*: 2002]

การปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาอนอติให้มีเฟสคงที่เป็น ODS (C_{18}) หรือ คอลัมน์ ODS ทำได้โดยผ่านสารละลาย 20% ODS-DEA ในโทลูอีน เข้าไปในมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ด้วยความดันจากแก๊สไนโตรเจนที่ 5 bar ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำคอลัมน์ที่ได้มาล้างด้วย โทลูอีน และ THF อย่างละ 1 ชั่วโมง ตามด้วยเมทานอล 24 ชั่วโมง จากนั้นนำคอลัมน์ไปทดสอบประสิทธิภาพด้วย μ HPLC โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีน และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล



2.2.3.2 การเตรียมคอลัมน์ ODM [Núñez *et al.*: 2007]



การปรับปรุงพื้นผิวของซิลิกาอนอติให้ให้มีเฟสคงที่เป็น ODM หรือเรียกว่าคอลัมน์ ODM ทำได้ด้วยการใช้ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของ ODM ที่มี AIBN เป็นสารเริ่มปฏิกิริยา (initiator) ในขั้นตอนเริ่มจากเกิดพันธะระหว่างหมู่ซิลานอลบนพื้นผิวซิลิกาอนอติกับ MOP ก่อน โดยนำมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์มาบรรจุด้วยสารละลายผสมของ MOP: พิริดีน (1:1 โดยปริมาตร) และทิ้งไว้ในตู้อบที่ 80 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างคอลัมน์ด้วยเมทานอล หลังจากนั้นนำไป

ทดสอบคอลัมน์โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฮกซิลเบนซีน และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล คอลัมน์ที่ได้ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ (k) ของเฮกซิลเบนซีน $k_{\text{hexylbenzene}} \geq 0.3$ สามารถนำไปทำการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ในขั้นต่อไป แต่ถ้าได้ค่า $k_{\text{hexylbenzene}} < 0.3$ ให้นำไปทำการเกิดพันธะกับ MOP ซ้ำอีกครั้ง สำหรับขั้นการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ของ ODM เริ่มจากบรรจุสารละลายที่ประกอบด้วย ODM และ AIBN (ความเข้มข้น 20 mg/mL ในโทลูอีน) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เข้าไปในคอลัมน์ MOP แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในตูบที่ 80 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำคอลัมน์ที่ได้มาล้างด้วยโทลูอีน 24 ชั่วโมง แล้วตามด้วยเมทานอลอีก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำคอลัมน์ที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพด้วย μ HPLC โดยใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีน และเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล

ในงานวิจัยนี้เมื่อกล่าวถึงคอลัมน์ ODS หมายถึง มอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ที่ปรับปรุงผิวของเฟสคงที่ด้วย ODS-DEA และคอลัมน์ ODM หมายถึง มอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์ที่ปรับปรุงผิวของเฟสคงที่ด้วย poly(octadecyl methacrylate) และระบุขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกะปิลลารีคอลัมน์ต่อท้าย เช่น ODS100a หมายถึง คอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 μm โดยที่ a หรือ b หมายถึงลำดับของคอลัมน์

2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

2.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์

เตรียมมอนอลิทิกซิลิกาคอลัมน์หลายครั้งด้วยกัน และได้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 μm ยาว 40 cm ประมาณ 20 คอลัมน์ และ 200 μm ยาวประมาณ 30 หรือ 40 cm ประมาณ 40 คอลัมน์ นำไปทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วย μ HPLC ใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล เฉพาะคอลัมน์ที่มีความสูงของเพลตเชิงทฤษฎี (total theoretical plates height, H) $H < 8 \mu\text{m}$ หรือจำนวนเพลตเชิงทฤษฎี (number of theoretical plates, N) $N > 1.25 \times 10^5$ เพลต/เมตร (ใช้ $u = 1.0 \text{ mm/s}$, $u = L/t_0$ ตลอดงานวิจัยนี้ t_0 เป็นรีเทนชันไทม์ของยูราซิลซึ่งเป็น unretained compound และ L คือ ความยาวคอลัมน์) แสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงและนำคอลัมน์ที่ได้ไปปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่ต่างๆ ต่อไป

สำหรับคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูงได้ปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่เป็น RPLC โดยเตรียมคอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 และ 200 μm (ดังหัวข้อ 2.2.3.1) และคอลัมน์ ODM ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200 μm (ดังหัวข้อ 2.2.3.2) ยาว 30 cm และนำคอลัมน์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้วยเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตไนไตรล์ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ ODS ใช้สารทดสอบเป็นยูราซิลและอัลคิลเบนซีนที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 1-6 (C1-C6) ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ ODM ใช้สารทดสอบเป็นยูรา

ซิลและแอลคิลเบนซีน C1-C5 (เนื่องจากเฮกซิลเบนซีนใช้เวลาวิเคราะห์นาน) โดยใช้ u ต่ำๆ ตั้งแต่ 0.2 mm/s ไปจนถึงอัตราไหลสูงสุดของเข็มไมโครปั๊มที่ใช้งานได้ คือ 2.0 mL/min

รูปที่ 2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง k กับ u ของคอลัมน์ ODS100, ODS200 และ ODM200 ในเฟสเคลื่อนที่ 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตไนไตรล์ (คำนวณจากข้อมูลของ t_R ของอัลคิลเบนซีนและ t_0 ของยูราซิลในโครมาโทแกรม (ไม่ได้แสดงไว้ในที่นี้)) โดยค่า k สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

t_R และ t_0 คือ รีเทนชันไทม์ (migration time) ของสารและ unretained compound ตามลำดับ

ค่า k ของอัลคิลเบนซีนใน reversed-phase บ่งบอกได้ถึงอัตราส่วนปริมาตรของเฟสคงที่ต่อเฟสเคลื่อนที่ [Núñez *et al.*: 2007] รูปที่ 2.6 แสดงกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง $\log k$ และ z (z คือ จำนวนคาร์บอนในสายโซ่ตรงของอัลคิลเบนซีน) โดยที่ความชันของเส้นตรงเท่ากับ $\log \alpha(\text{CH}_2)$ ถ้า $\log \alpha(\text{CH}_2)$ หรือ $\alpha(\text{CH}_2)$ มีค่ามากกว่า แสดงถึงความไฮโดรโฟบิกของเฟสคงที่ที่มากกว่า [Núñez *et al.*: 2007]

จากรูปที่ 2.5 แสดงค่า k เฉพาะอัลคิลเบนซีนบางสาร พบว่าค่า k ของสารชนิดเดียวกันไม่ขึ้นกับ u ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีโดยทั่วไป และเมื่อเปรียบเทียบคอลัมน์ ODS ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกัน คือ ODS100 และ ODS200 (รูปที่ 2.5.a1 และ 2.5.b1) ODS100 ให้ค่า k ของโทลูอินและเฮกซิลเบนซีนที่สูงกว่าเล็กน้อย และค่า $\alpha(\text{CH}_2)$ ที่มากกว่า (ตารางที่ 2.1) บ่งบอกถึงความไฮโดรโฟบิกของคอลัมน์ ODS100 ที่มากกว่าหรือพื้นผิวของเฟสคงที่ที่เกิดพันธะกับ ODS-DEA ที่มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบการใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและอะซิโตไนไตรล์ของ ODS100 และ ODS200 (รูปที่ 2.5.a และ 2.5.b) พบว่า k ของอะซิโตไนไตรล์มีค่าน้อยกว่าเป็นผลจาก solvent strength ของอะซิโตไนไตรล์ที่มากกว่า [Synder *et al.*: 1997]

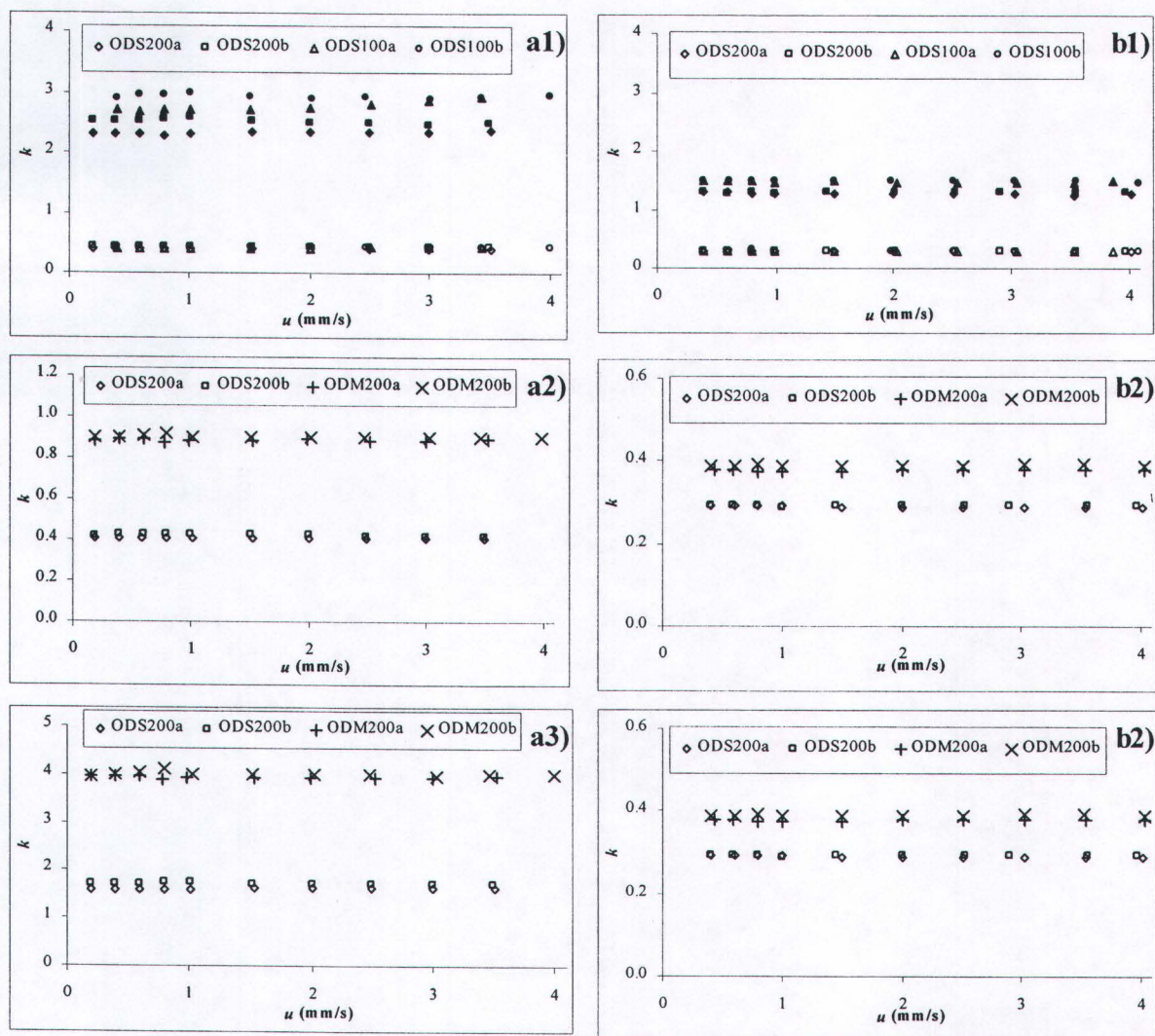
เมื่อเปรียบเทียบ k ของคอลัมน์ ODS200 และ ODM200 (รูปที่ 2.5.a2, 2.5.a3, 2.5.b2, 2.5.b3) โดยใช้สารทดสอบเป็นโทลูอิน (a2, b2) และเพนทิลเบนซีน (a3, b3) พบว่า k ของสารทั้งสองในคอลัมน์ ODM มีค่ามากกว่า และเมื่อพิจารณาค่า $\alpha(\text{CH}_2)$ (ตารางที่ 2.1) คอลัมน์ ODM200 ให้ค่า $\alpha(\text{CH}_2)$ ใกล้เคียงกับ ODS200 ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตไนไตรล์ ส่วนในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% อะซิโตไนไตรล์ การรีเทนของสารใน ODM จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ ODS เนื่องจากอะซิโตไนไตรล์จะเกิด solvation บน ODM ได้ดีกว่าเมทานอล ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับที่ได้รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [Núñez *et al.*: 2007] จากการที่คอลัมน์ ODM มีความไฮโดรโฟบิกมากทำให้สารรีเทนในคอลัมน์ได้นาน จึงเลือกใช้ความยาวคอลัมน์ ODM เพียง 30 cm เพื่อให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานมากนัก



จากตารางที่ 2.1 แสดงค่า H ของยูราซิลและแอลคิลเบนซีนที่ใช้เป็นสารทดสอบของคอลัมน์ ODS และ ODM ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอลและ 80% อะซิโตนไทรล์ ซึ่ง H คำนวณได้จาก $H = L/N$ พบว่าที่ $u = 1.0$ mm/s แอลคิลเบนซีนที่มีความยาวสายโซ่คาร์บอนเพิ่มขึ้น มีแนวโน้มของ H เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากสารรีเทนในคอลัมน์นานขึ้นทำให้เกิดการกระจายของโซนสารมาก เมื่อพิจารณา van Deemter plot (ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ u) ของคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 (รูปที่ 2.7) โดยแสดงเฉพาะสารทดสอบเป็นยูราซิล โทลูอินและเฮกเซน ทั้งในเฟสเคลื่อนที่เป็น 80% เมทานอล และ 80% อะซิโตนไทรล์ สำหรับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นอะซิโตนไทรล์ (รูปที่ 2.7b) ให้ประสิทธิภาพของการแยกสารดีกว่าเมทานอล (จุดต่ำสุดของ H มีค่าน้อยกว่าเลื่อนไปตำแหน่งที่ u สูงกว่า) นอกจากนี้ที่ u มาก ก็มีการเพิ่ม H ไม่มากนักเมื่อเทียบกับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นเมทานอล (รูปที่ 2.7a) เนื่องจากอะซิโตนไทรล์มีความหนืดน้อยกว่าทำให้สารมี diffusion coefficient ในเฟสเคลื่อนที่มาก [Ishizuka *et al.*: 2002]

เมื่อเปรียบเทียบ van Deemter plot ของคอลัมน์ ODS และ ODM (รูปที่ 2.8) พบว่ามีลักษณะแนวโน้มของกราฟที่คล้ายกัน แต่คอลัมน์ ODS ให้ H น้อยกว่าคอลัมน์ ODM (เช่น H เท่ากับ 8.6-8.9 μm และ 11.1 μm สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ที่ใช้สารทดสอบเป็น C5 ในเฟสเคลื่อนที่ 80% เมทานอล) แสดงว่า คอลัมน์ ODS ที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดีกว่าเล็กน้อย ในขณะที่งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีรายงานว่าสามารถเตรียมคอลัมน์ ODM ดีกว่าคอลัมน์ ODS (H เท่ากับ 13.8 μm และ 12.9 μm สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ที่ใช้สารทดสอบเป็น C5 ในเฟสเคลื่อนที่ 80% เมทานอล [Núñez *et al.*: 2007 รูปที่ 3]) อย่างไรก็ตาม คอลัมน์ที่เตรียมได้ในงานวิจัยนี้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้

ค่าความดันในการขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่ (back pressure, ΔP) ของคอลัมน์ที่เตรียมได้แสดงดังตารางที่ 2.1 ซึ่งความดันจะขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ L และความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่ u ดังนั้นจึงเปรียบเทียบเป็นค่าความดันต่อความยาวคอลัมน์ ($\Delta P/L$) ที่ค่า $u = 1.0$ mm/s พบว่าค่า $\Delta P/L$ ของคอลัมน์ต่างๆ ที่ได้อยู่ในช่วง 10.8-11.8 และ 10.9-13.5 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% เมทานอล และ 5.2-5.5 และ 5.9-6.4 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับ ในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% อะซิโตนไทรล์ ซึ่งค่าที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (10.3 และ 10.4 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% เมทานอล และ 5.2 และ 5.7 MPa/m สำหรับคอลัมน์ ODS และ ODM ตามลำดับในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็น 80% อะซิโตนไทรล์ สำหรับที่ค่า $u = 1.0$ mm/s [Núñez *et al.*: 2007 รูปที่ 4])

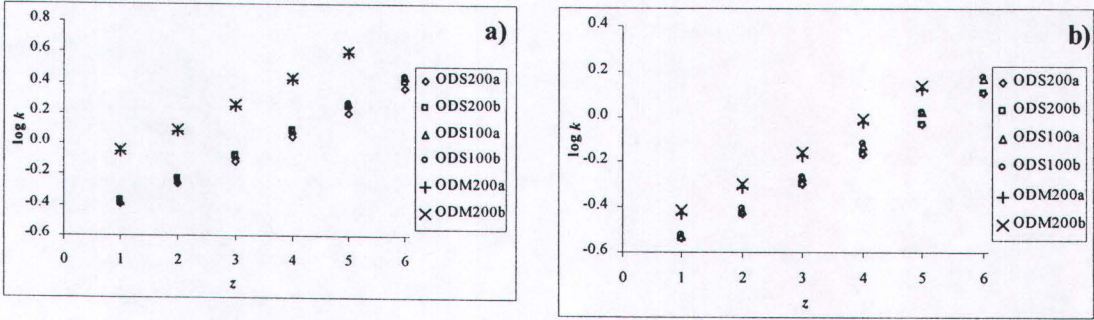


รูปที่ 2.5 ค่ารีเทนชันแฟกเตอร์ของสารทดสอบที่ความเร็วเชิงเส้นต่างๆ ของเฟสเคลื่อนที่ (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไนไตรท์ โดยที่ในรูป a1 และ b1 ใช้คอลัมน์ ODS100 (ยาว 40 cm) และ ODS200 (ยาว 30 cm) และสารทดสอบเป็นโทลูอิน (สัญลักษณ์โปร่ง) และเฮกซิลเบนซีน (สัญลักษณ์ทึบ) ส่วนรูป a2, a3, b2 และ b3 ใช้คอลัมน์ ODS200 (ยาว 40 cm) และ ODM200 (40 cm) และสารทดสอบเป็น โทลูอิน (a2, b2) และเพนทิลเบนซีน (a3, b3)

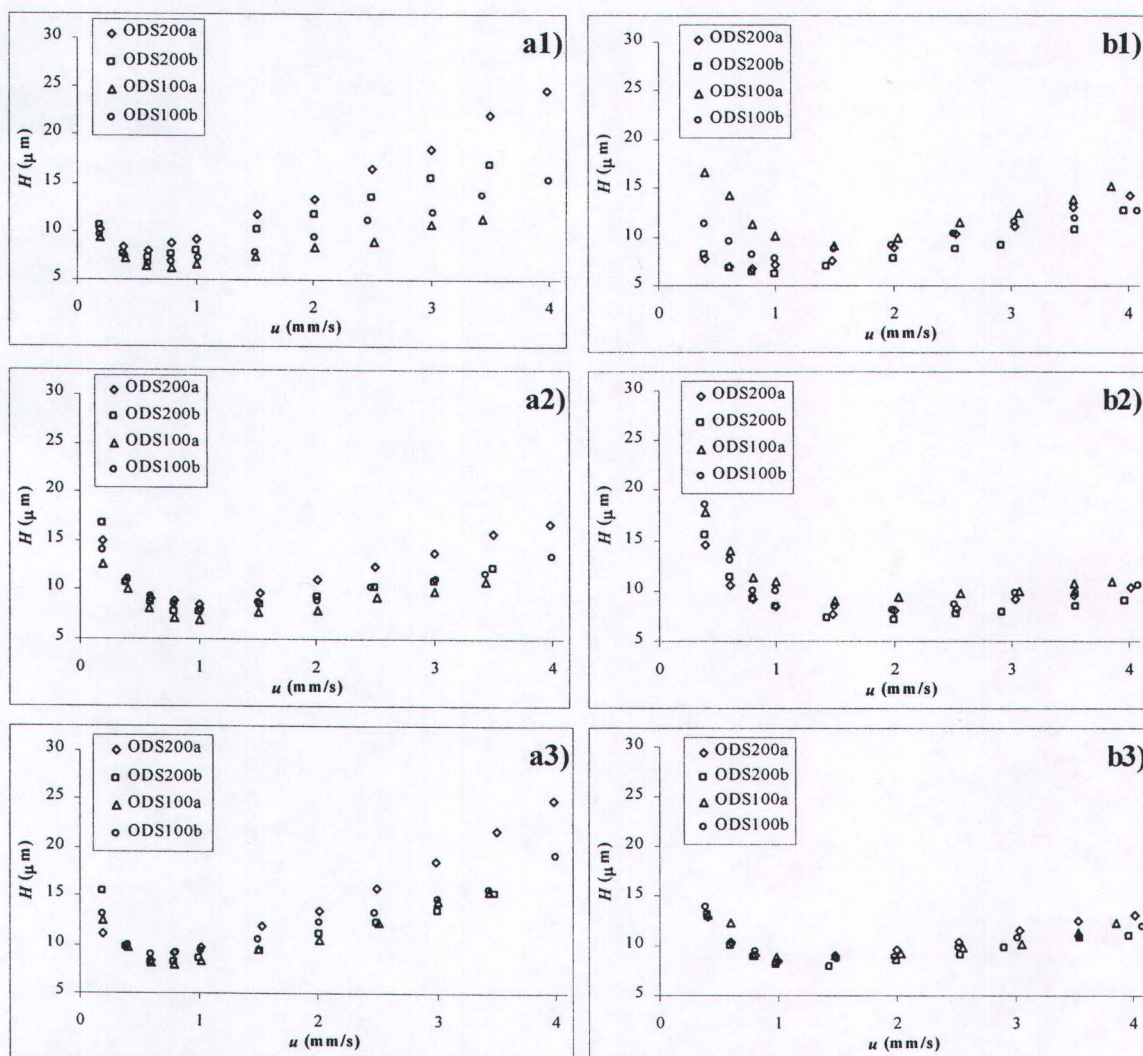
ตารางที่ 2.1 ค่า H , $\alpha(\text{CH}_2)$, และความดันในการขับเคลื่อนเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่	คอลัมน์	$H\ (\mu\text{m})$ ที่ได้จากสารทดสอบที่เป็น							$\alpha(\text{CH}_2)$	ความดัน (ΔP , MPa)	$\Delta P/L$ (MPa/m)
		uracil	C1	C2	C3	C4	C5	C6			
80% MeOH	ODS100a	6.6	7.0	7.5	7.2	7.6	8.4	8.3	1.46	5.1	12.8
	ODS100b	7.1	8.0	8.0	8.1	8.5	8.6	9.4	1.46	4.2	10.5
	ODS200a	9.2	8.6	8.8	9.0	9.5	8.9	9.8	1.42	4.3	10.8
	ODS200b	8.0	7.7	7.8	8.1	8.6	8.6	8.5	1.43	4.7	11.8
	ODM200a	10.2	9.8	10.2	10.4	10.9	11.1	-	1.46	3.2	10.9
	ODM200b	12.4	10.7	11.1	11.1	11.1	11.1	-	1.46	4.0	13.5
80% ACN	ODS100a	10.1	10.9	10.2	10.0	9.8	8.9	8.8	1.38	2.5	6.2
	ODS100b	7.8	10.0	9.4	9.8	9.1	8.5	8.3	1.38	1.7	4.2
	ODS200a	7.1	8.4	8.4	8.2	8.4	8.7	8.5	1.34	2.0	5.5
	ODS200b	6.1	8.4	8.1	7.8	8.0	8.1	8.1	1.35	2.2	5.2
	ODM200a	7.2	7.7	7.8	7.8	8.2	8.5	-	1.37	1.7	5.9
	ODM200b	7.8	8.1	8.2	8.1	8.1	8.4	-	1.37	1.8	6.4

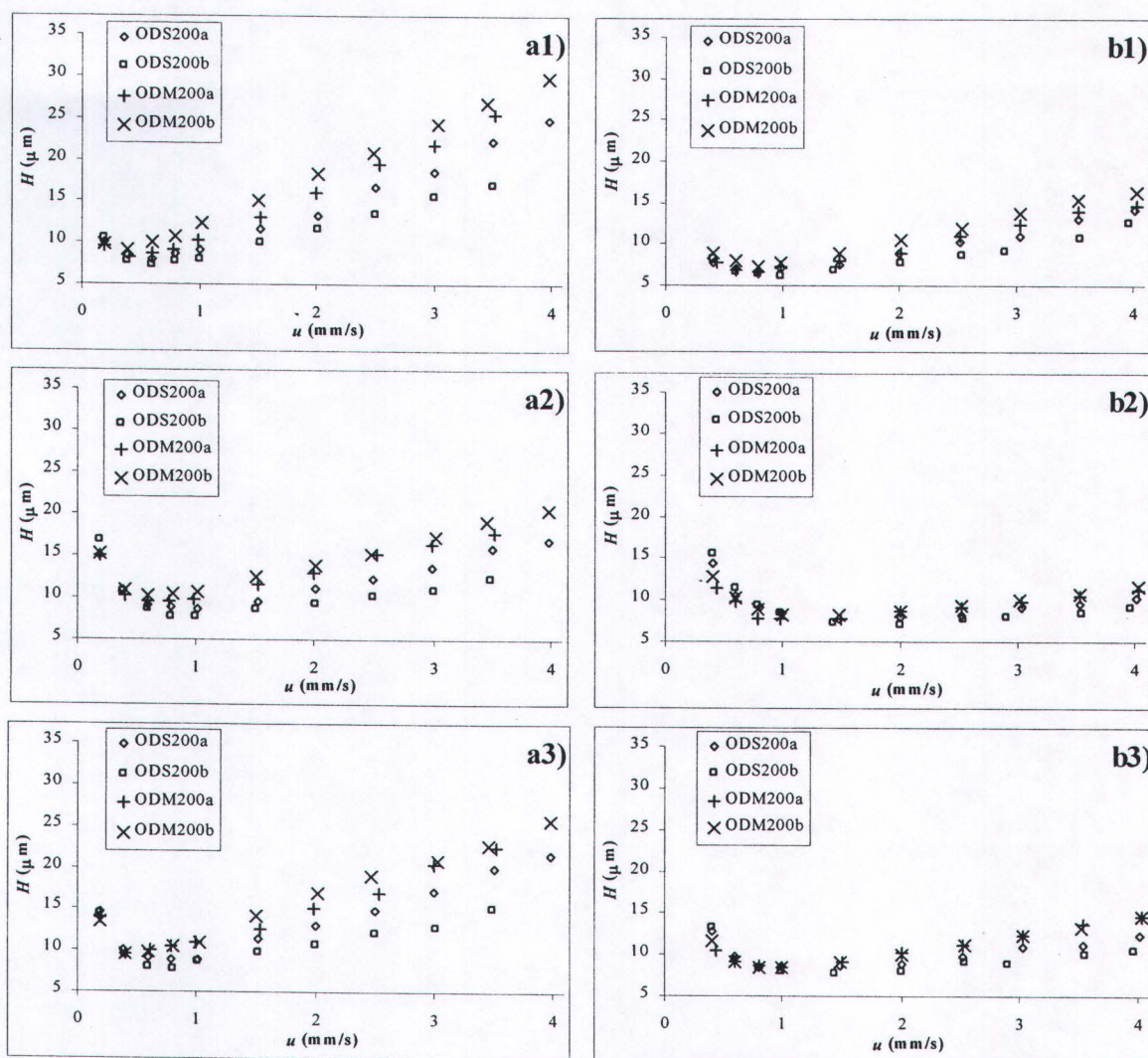
$\alpha(\text{CH}_2)$ คำนวณจากความชันของกราฟรูปที่ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ $\log \alpha(\text{CH}_2)$, ΔP ที่ $u = 1.0\text{ mm/s}$



รูปที่ 2.6 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log k$ กับ z ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ ($u=1.0\text{ mm/s}$) (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตไนไทรล์ สำหรับคอลัมน์ ODS100, ODS200 และ ODM200



รูปที่ 2.7 van Deemter plot สำหรับคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 ยาว 40 cm ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่ เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไทรล์ โดยที่สารทดสอบเป็นยูราซิล (a1, b1), โทลูอิน (a2, b2), เฮกซิลเบนซีน (a3, b3)



รูปที่ 2.8 van Deemter plot สำหรับคอลัมน์ ODS200 ยาว 40 cm และ ODM200 ยาว 30 cm ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น (a) 80% เมทานอล และ (b) 80% อะซิโตนไทรล์ โดยที่สารทดสอบเป็นยูราซิล (a1, b1), โทลูอิน (a2, b2), เพนทิลเบนซีน (a3, b3)

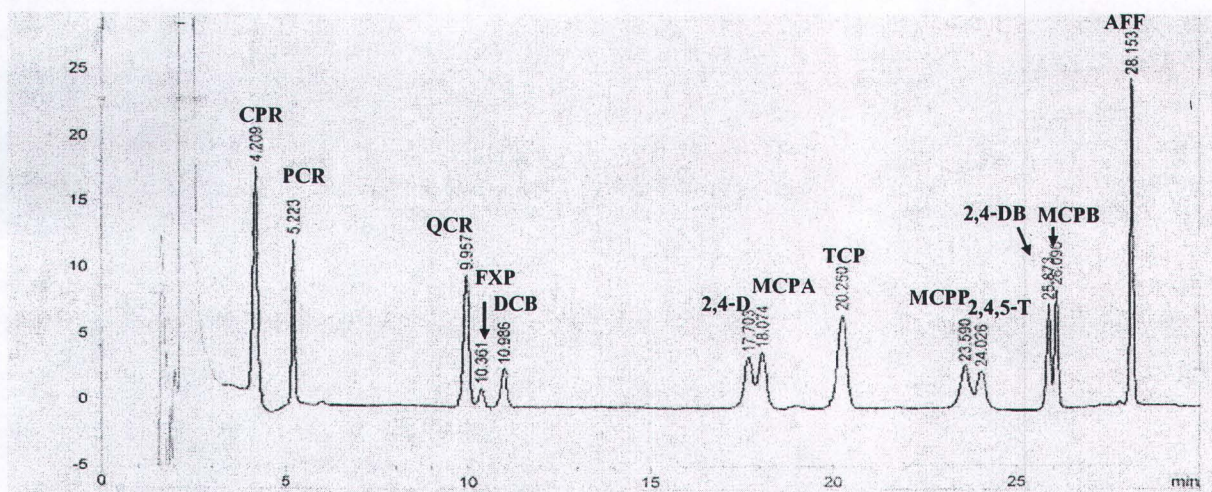
2.3.2 การแยก phenoxy acid herbicides 13 ชนิด ด้วย HPLC และ μ HPLC

ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของสาร และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารใน HPLC ด้วย conventional column เพื่อการแยกสารในเบื้องต้น พร้อมทั้งได้ทำการเตรียมมอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์ และปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่ให้เป็น RPLC รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ได้ และนำมาใช้ศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนที่และหาภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารใน μ HPLC

2.3.2.1 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก phenoxy acid herbicides ด้วย conventional HPLC

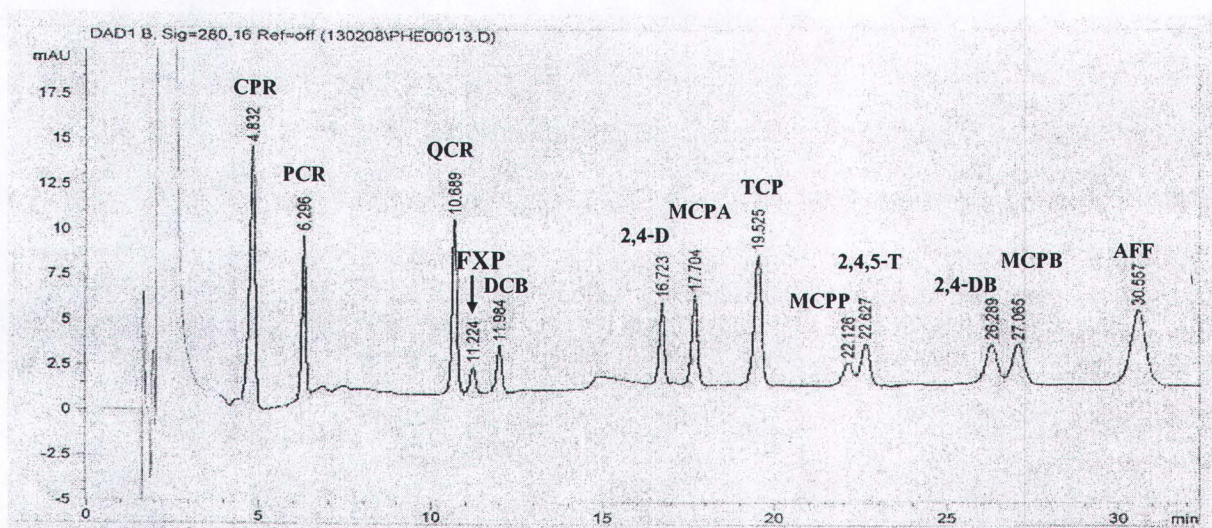
ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการแยกและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารกลุ่ม phenoxy acids และ acidic herbicides รวมทั้งหมด 13 ชนิด สูตรโครงสร้างของสารแสดงดังรูปที่ 2.1 โดยทำการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution (ช่วงเวลาต่างๆปรับส่วนผสมของตัวทำละลายอินทรีย์) ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ในการทดลองนี้เป็นอะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลีนที่ปรับเป็น pH 2.5 หรือ เมทานอล:สารละลายกรดอะซิติกที่ปรับเป็น pH 2.5 ได้ภาวะของ gradient elution ที่เหมาะสมที่สุดดังโครมาโทแกรมในรูปที่ 2.9 และ 2.10 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบภาวะการแยกที่ดีที่สุดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลีนกับเมทานอล พบว่าเมทานอลให้การแยกที่ดีกว่าอะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลีนแต่ระยะเวลาในการแยกสารจะนานกว่าจากโครมาโทแกรมในรูปที่ 2.10 พีกของสารบางพีกยังแยกออกจากกันไม่สมบูรณ์ ถึงแม้ว่าการแยกสารละลายมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides ที่ได้จะเพียงพอต่อการทำปริมาณวิเคราะห์แล้ว แต่ในกรณีที่วิเคราะห์ในตัวอย่างจริง เมทริกซ์อาจไปรบกวนการวิเคราะห์สาร ทำให้ปริมาณวิเคราะห์ผิดพลาดได้ จึงมีความสนใจศึกษาการแยกสารด้วย μ HPLC โดยใช้มอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์แบบ reversed-phase HPLC ต่อไป เพื่อให้ได้การแยกสารที่สมบูรณ์และใช้ระยะเวลาวิเคราะห์สารที่รวดเร็ว



รูปที่ 2.9 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides ด้วย conventional HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น อะซิโตรไนไทรล์:สารละลายกรดอะซิติกที่ pH 2.5 (B:A) ด้วย gradient profile ที่ช่วงเวลาต่างๆปรับ % B ดังนี้ 0-1.5 นาที (15% B), 2.0 นาที (20% B), 8 นาที (30% B), 18 นาที (35% B), 22 นาที (38% B), 25-30 นาที (60% B)

ภาวะอื่นของ HPLC: เครื่อง HPLC Agilent 1100 series, คอลัมน์ เป็น eclipse XDB-C8 ขนาด 5 μ m, 4.6 mm), อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$ C, อัตราไหล 1 mL/min, ตรวจวัดด้วย UV photodiode array และแสดงผลที่ความยาวคลื่น 280 nm, ปริมาณสารที่ฉีด 10 μ L



รูปที่ 2.10 โครมาโทแกรมการแยกสารมาตรฐานของ phenoxy acids และ acidic herbicides บางชนิดด้วย conventional HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น เมทานอล: สารละลายกรดอะซิติกที่ pH 2.5 (B:A) ด้วย gradient profile ที่เวลาต่างๆปรับ % B ดังนี้ 0-2 นาที (20% B), 4 นาที (40% B), 12 นาที (50% B), 12.1-35 นาที (55% B) ส่วนภาวะอื่นของ HPLC ดังรูปที่ 2.9

2.3.2.2 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารด้วย μ HPLC-UV detection

1) ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร phenoxy acid herbicides ด้วยคอลัมน์ ODS

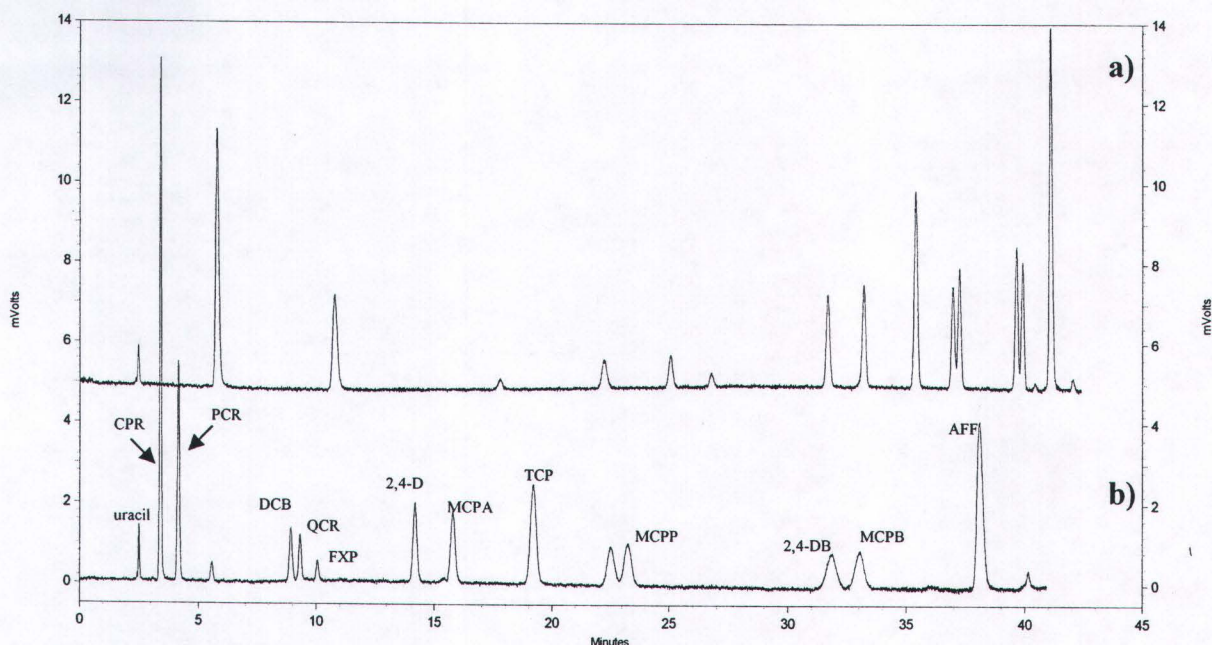
ได้ศึกษาพฤติกรรมของการเคลื่อนที่และการแยกของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดเป็น UV โดยนำคอลัมน์ ODS200 ที่เตรียมได้มาใช้เป็นคอลัมน์แยกสาร เนื่องจากคอลัมน์ ODS100 และ ODS200 ให้ประสิทธิภาพพอๆ กัน แต่คอลัมน์ ODS200 ให้ sample loading ที่มากกว่าจึงเลือกใช้คอลัมน์ ODS200 และใช้เฟสเคลื่อนที่ในภาวะที่เป็นกรด ประกอบด้วย 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในเมทานอล โดยในที่นี้ใช้กรดฟอร์มิกแทนกรดอะซิติก เนื่องจากในตอนนี้ได้ลองหาภาวะที่ใช้ในการแยกสารเบื้องต้นโดยใช้เครื่องตรวจวัด UV เพื่อจะนำภาวะที่ได้เป็นแนวทางไปใช้สำหรับเครื่องตรวจวัด MS สำหรับกรดที่นิยมเติมลงไปในเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ใน LC-MS ควรเป็นกรดกลายเป็นไอได้ง่าย เช่น กรดอะซิติก หรือ กรดฟอร์มิก แต่ส่วนใหญ่นิยมเลือกใช้กรดฟอร์มิกเนื่องจากแตกตัวให้โปรตอนได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองใน μ HPLC-MS จะศึกษาถึงผลของกรดอะซิติก หรือกรดฟอร์มิกที่มีต่อการวิเคราะห์สารอีกครั้งหนึ่ง

ในการแยกสารเบื้องต้นได้ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแบบ gradient elution (อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนไปในช่วงเวลาต่างๆ) เริ่มจากการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ (0.1% กรดฟอร์มิกในเมทานอล) จาก 20 เป็น 80% ภายใน 40 นาที (รูปที่ 2.11a) จะเห็นว่าในช่วงแรกๆ พีกของสารแยกออกจากกันได้ดี ส่วนพีกท้ายโครมาโทแกรมบางพีกยังแยกจากกันไม่สมบูรณ์ จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนรูปแบบของ gradient โดยในช่วงแรกเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อให้พีกสารส่วนต้นโครมาโทแกรมจะได้เคลื่อนที่ออกมาได้เร็วขึ้น แล้วในช่วงหลัง ลดอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ (เพิ่ม k หรือปรับ α) เพื่อปรับให้พีกท้ายโครมาโทแกรมแยกออกจากกันดีขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทดลองปรับเปลี่ยน gradient elution หลายๆ รูปแบบจนได้โครมาโทแกรมที่แยกสารได้สมบูรณ์และใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมภายใน 40 นาที ดังรูปที่ 2.11b

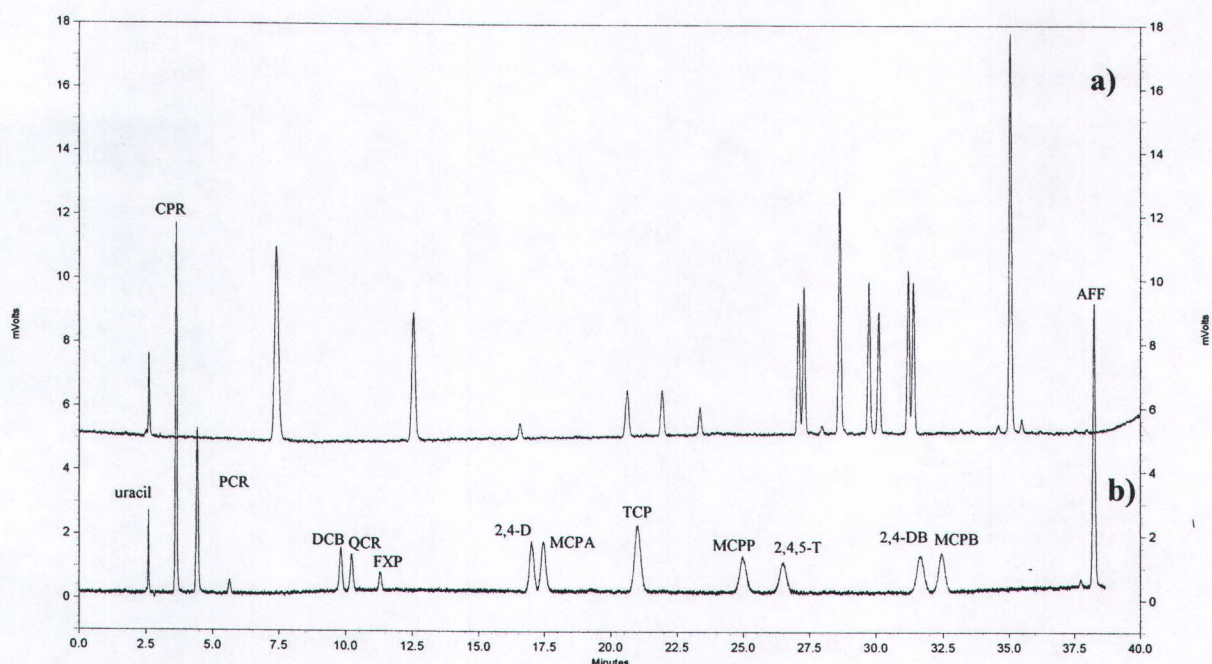
จากนั้นได้ทำการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์จากเมทานอลเป็นอะซิโตนไทรล์ และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นแบบ gradient elution จนได้ภาวะที่สามารถแยกสารได้ดีภายในระยะเวลาที่เหมาะสมแสดงดังรูปที่ 2.12b เมื่อเปรียบเทียบการแยกสารในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอะซิโตนไทรล์และเมทานอล จะเห็นว่าทั้งสองตัวทำละลายอินทรีย์สามารถแยกสารได้ดี และใช้ระยะเวลาในการแยกสารพอๆ กัน แต่มีลำดับการออกของสารสลับกัน 1 คู่ คือ MCPP กับ 2,4,5-T เนื่องจากเมื่อเปลี่ยนตัวทำละลายอินทรีย์ส่งผลต่อ selectivity ของสารได้

เมื่อเปรียบเทียบภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสารด้วย conventional column และ มอนอลิทิกคอลัมน์ (รูปที่ 2.10 และ 2.11) พบว่าคอลัมน์ทั้งสองประเภทสามารถใช้แยกและวิเคราะห์สารกลุ่มฟีนอกซีแอซิดได้ แต่ในมอนอลิทิกคอลัมน์สามารถแยกสารทุกพีกได้ baseline resolution ทั้ง

ในเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและอะซิโตนไทรล์ ถึงแม้ว่ามอนอลิติกคอลัมน์ใช้ระยะเวลาแยกสารที่นานกว่า เนื่องจากใช้ความยาวของมอนอลิติกคอลัมน์ค่อนข้างมาก



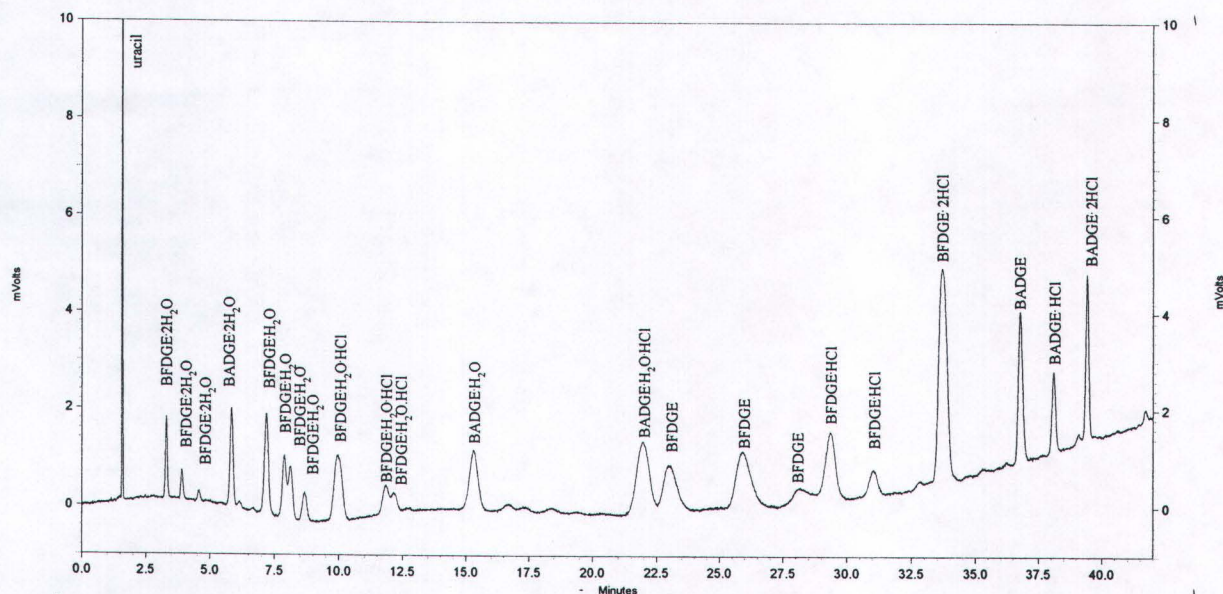
รูปที่ 2.11 โครมาโทแกรมของ phenoxo acid herbicides ด้วย μ HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% formic acid ในน้ำ:0.1% formic acid ในเมทานอล (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ a) 20-80%B (0-40 min) และ b) 45-44%B (0-3 min), 55%B (3-25 min), 55-60%B (25-26 min), 60%B (26-30 min), 60-80%B (30-35 min), 80%B (35-40 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200a (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.351 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 75:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm



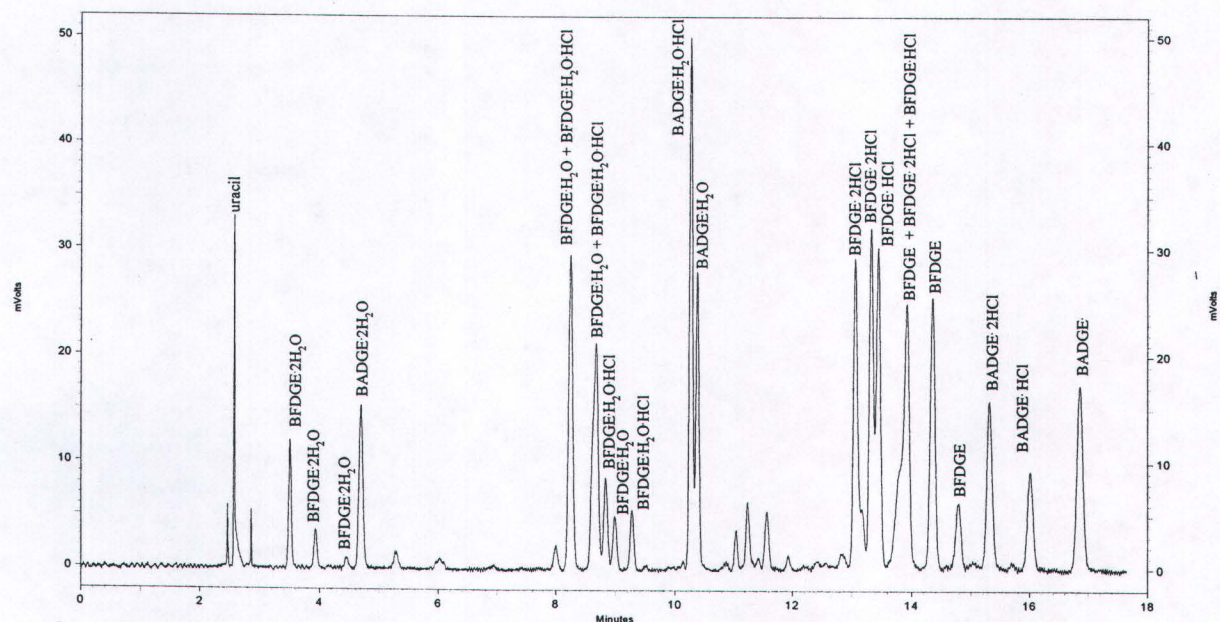
รูปที่ 2.12 โครมาโทแกรมของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในอะซิโตไนไทรล์ (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ a) 20-80%B (0-40 min) และ b) 32-40%B (0-3 min), 40%B (3-18 min), 40-42%B (18-19 min), 42%B (19-25 min), 42-60%B (25-30 min) และ 60%B (30-40min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200 (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.369 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio 78:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm

2) ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วยคอลัมน์ ODS

ได้ศึกษาพฤติกรรมของการเคลื่อนที่และการแยกของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วย μ HPLC-UV โดยนำคอลัมน์ ODS200 ที่เตรียมได้มาใช้เป็นคอลัมน์แยกสาร และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอลหรืออะซิโตไนไทรล์) โดยปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เป็นแบบ gradient elution สำหรับเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นน้ำและเมทานอล ได้ภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารดังรูปที่ 2.13 พิกของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์แต่ละชนิดแยกออกจากกันได้สมบูรณ์และสำหรับ BFDGE และอนุพันธ์บางตัวสามารถแยกไอโซเมอร์ออกจากกันได้ชัดเจน ถึงแม้ว่าเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะพอๆ กับการแยกสารด้วย conventional column ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ [Leepipatpiboon *et al.*: 2005] เมื่อเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ และอะซิโตไนไทรล์ (รูปที่ 2.14) พิกของสารบางพิกไม่สามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์



รูปที่ 2.13 โครมาโทแกรมของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ ด้วย μ HPLC โดยใช้ภาวะแยกดังนี้: เฟสเคลื่อนที่เป็น น้ำ:เมทานอล (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ 50%B (0-25 min), 50-80%B (25-45 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200 ยาว 40 cm และอัตราไหล 0.426 mL/นาที ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 90:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm



รูปที่ 2.14 โครมาโทแกรมของ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์ด้วย μ HPLC โดยใช้ภาวะการแยกดังนี้: เฟสเคลื่อนที่เป็น น้ำ:อะซิโตนไทรล์ (A:B) ด้วย gradient elution ดังนี้ 40-50%B (0-2 min), 50 (2-3 min), 50-60%B (3-5 min), 60%B (5-15 min) ภาวะอื่นๆ : คอลัมน์ ODS200b (ยาว 40 cm) และอัตราไหล 0.344 mL/min ($u = 2.5$ mm/s และ split ratio ประมาณ 73:1) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 220 nm

3) การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสาร (phenoxy acids และ acidic herbicides และ BADGE, BFDGE และอนุพันธ์) ด้วยคอลัมน์ ODM

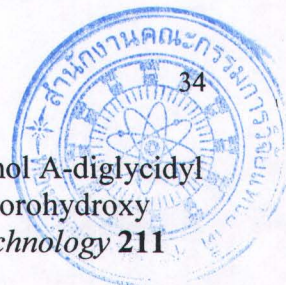
ได้ศึกษาพฤติกรรมเคลื่อนที่และการแยกของ phenoxy acid herbicides ด้วย μ HPLC ที่มีเครื่องตรวจวัดเป็น UV โดยนำคอลัมน์ ODM200 ที่เตรียมได้มาใช้เป็นคอลัมน์แยกสาร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในภาวะที่เป็นกรด ประกอบด้วย 0.1% กรดฟอร์มิกในน้ำ:0.1% กรดฟอร์มิกในตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอลหรืออะซิโตนไทรล์) แล้วปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution (ไม่ได้แสดงโครมาโทแกรมในที่นี้) พบว่าพีกที่ได้มีลักษณะ tailing อาจเนื่องจากสารแตกตัวได้บางส่วน จึงเกิดอันตรกิริยากับหมู่ซิลานอลที่เหลืออยู่บนเฟสคงที่ได้ นอกจากนี้ได้หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยก BADGE, BFDGE และอนุพันธ์โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ:ตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าไม่สามารถแยกพีกสารออกจากกันได้สมบูรณ์ถึงแม้ว่าจะใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ต่ำๆ แล้วก็ตาม ทำให้ในการแยกสารทั้งสองกลุ่มด้วยคอลัมน์ ODM ไม่ประสบผลสำเร็จ

2.4 สรุปผลการทดลอง

ได้เตรียมคอลัมน์มอนอลิติกซิลิกาคอลัมน์ แล้วนำไปปรับปรุงพื้นผิวเฟสคงที่ได้เป็นคอลัมน์ ODS และคอลัมน์ ODM จากนั้นนำคอลัมน์ ODS มาหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารในกลุ่ม phenoxy acids และ acidic herbicides โดยสามารถแยกพีกสารได้สมบูรณ์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารประมาณ 40 นาที ทั้งในเฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเมทานอลและอะซิโตนไทรล์ นอกจากนี้ได้นำคอลัมน์ ODS มาหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่ม BAGDE, BFDGE และอนุพันธ์ โดยในการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีตัวทำละลายเป็นเมทานอลสามารถแยกพีกสารออกจากกันได้สมบูรณ์ ใช้เวลาประมาณ 40 นาที ในขณะที่ตัวทำละลายเป็นอะซิโตนไทรล์ไม่สามารถแยกพีกสารทุกพีกออกจากกันได้สมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Berger U., Oehme M., and Girardin L. "Quantification of derivatives of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and novolac glycidyl ether (NOGE) migrated from can coatings into tuna by HPLC/fluorescence and MS detection" *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **369** (2001) 115-123.
- Cappiello A., Famiglini G., and Berloni A. "Large volume injection of acidic pesticides by reversed-phase micro high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **768** (1997) 215-222.
- Catalina M.I., Dalluge J., Vreuls R.J.J., and Brinkman U.A.T. "Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid-liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography-mass spectrometry" *Journal of Chromatography A* **877** (2000) 153-166.
- Cottier S., Riquet A.M., Feigenbaum A., Pollet B., Lapierre C., and Mortreuil P. "Identification of potential migrants from a vinyllic organosol varnish by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry" *Journal of Chromatography A* **771** (1997) 366-373.
- Garcia R.S. and Losada P.P. "Determination of bisphenol A diglycidyl ether and its hydrolysis and chlorohydroxy derivatives by liquid chromatography-mass spectrometry" *Journal of Chromatography A* **1032** (2004) 37-43.
- Hirahara Y., Miyata M., Kamakura K., Watanabe Y., Takeda H., Maeda K., and Tonogai Y. "Comparison between methyl and pentafluorobenzyl esterification for analysis of 9 phenoxy acid herbicides in agricultural products" *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* **43** (1997) 129-139.
- Ishizuka N., Kobayashi H., Minakuchi H., Nakanishi K., Hirao K., Hosoya K., Ikegami T., and Tanaka N. "Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **960** (2002) 85-96.
- Jung M. and Brumley W.C. "Trace Analysis of Fluorescein-Derivatized Phenoxy Acid Herbicides by Micellar Electrokinetic Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection" *Journal of Chromatography A* **717** (1995) 299-308.
- Kruaysawat J., Marriott P.J., Hughes J., and Trenerry C. "Separation of chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols by using capillary zone electrophoresis" *Electrophoresis* **22** (2001) 2179-2185.
- Kuang H., Chu X.G., Hou Y.X., and Xu C.L. "Simultaneous determination of 13 phenoxy acid herbicide residues in soybean by GC-ECD" *Analytical Letters* **39** (2006) 2617-2627.
- Leepipatiboon N., Sae-Khow O., and Jayanta S. "Simultaneous determination of bisphenol-A-diglycidyl ether, bisphenol-F-diglycidyl ether, and their derivatives in oil-in-water and aqueous-based canned foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection" *Journal of Chromatography A* **1073** (2005) 331-339.
- Legido-Quigley C., Marlin N. D., Melin V., Manz A., and Smith N. W. "Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science" *Electrophoresis* **24** (2003) 917-944.



- Lintschinger J. and Rauter W. "Simultaneous determination of bisphenol A-diglycidyl ether, bisphenol F-diglycidyl ether and their hydrolysis and chlorohydroxy derivatives in canned foods" *European Food Research and Technology* **211** (2000) 211-217.
- Miyamoto K., Takeshi H., Kobayashi H., Morisaka H., Tokuda D., Horie K., Koduki K., Makino S., Núñez O., Yang C., Kawabe T., Ikegami T., Takubo H., Ishihama Y., and Tanaka N. "High-Efficiency Liquid Chromatography Separation Utilizing Long Monolithic Silica Capillary Columns" *Analytical Chemistry* **80** (2008) 8741-8750.
- Motokawa M., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Jinnai H., Hosoya K., Ikegami T., and Tanaka N. "Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **961** (2002) 53-63.
- Nerin C., Philo M.R., Salafranca J., and Castle L. "Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography" *Journal of Chromatography A* **963** (2002) 375-380.
- Nilsson T., Baglio D., Galdo-Miguez I., Madsen J.O., and Facchetti S. "Derivatisation/solid-phase microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry for the analysis of phenoxy acid herbicides in aqueous samples" *Journal of Chromatography A* **826** (1998) 211-216.
- Núñez O., Ikegami T., Kajiwara W., Miyamoto K., Horie K., and Tanaka N. "Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate" *Journal of Chromatography A* **1156** (2007) 35-44.
- Núñez O., Nakanishi, K., and Tanaka, N. "Preparation of Monolithic Silica Columns for High-Performance Liquid Chromatography" *Journal of Chromatography A* **1191** (2008) 231-252.
- Pereiro I.R., Irimia R.G., Cano E.R., and Torrijos R.C. "Optimisation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phenoxy acid herbicides in water samples as silyl derivatives" *Analytica Chimica Acta* **524** (2004) 249-256.
- Rimmer D.A., Johnson P.D., and Brown R.H. "Determination of phenoxy acid herbicides in vegetation, utilising high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and methylation with trimethylsilyldiazomethane prior to gas chromatographic analysis with mass-selective detection" *Journal of Chromatography A* **755** (1996) 245-250.
- Rodriguez I., Rubi E., Gonzalez R., Quintana J.B., and Cela R. "On-fibre silylation following solid-phase microextraction for the determination of acidic herbicides in water samples by gas chromatography" *Analytica Chimica Acta* **537** (2005) 259-266.
- Rosales-Conrado N., Leon-Gonzalez M.E., Perez-Arribas L.V., and Polo-Diez L.M. "Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient" *Analytica Chimica Acta* **470** (2002) 147-154.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., and Glajeh J.L. (1997) Practical HPLC method development John Wiley&Son, Inc.

- Takino M., Daishima S., and Nakahara T. "Automated on-line in-tube solid-phase microextraction followed by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of chlorinated phenoxy acid herbicides in environmental waters" *Analyst* **126** (2001) 602-608.
- Wu J.M., Ee K.H., and Lee H.K. "Automated dynamic liquid-liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental waters" *Journal of Chromatography A* **1082**(2005) 121-127.