



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพิสูจน์เอกลักษณ์ลิปดโดยแก๊สโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิต่างๆ โดยไม่ต้องใช้สารอ้างอิง

โดย รศ. ดร. คณิต กฤษณังกูร และคณะ

พฤศจิกายน 2542

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุโดยแก๊สโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิต่างๆ โดยไม่ต้องใช้สารอ้างอิง

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร. คณิต กฤษณังกูร

- 2. ผศ. นฤมล จี๋ยโชค

สังกัด

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนวิจัยสนับสนุนการวิจัย

Gas Chromatographic Identification of Lipids at Various Temperature Without a Reference

Abstract

Recently Krisnangkura et al (J. Chromatogr. Sci. (1997) 35,329) showed that the migration of fatty acid methyl esters (FAMES) along the gas chromatographic column follows Eq.1.

$$\ln \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) = a + bn + \frac{c}{T} + \frac{dn}{T} \quad \text{Eq 1.}$$

Where t_R and t_m are retention times of sample and hold-up time respectively, a , b , c and d are column constants, n is carbon number and T is absolute temperature.

In this study, Eq 1 has been use as a tool to convert equivalent chain length (ECL) of FAMES to Kovats retention index or vice versa without re-injection the sample into a gas chromatographic column. For a non-polar OV-101 phase, the highest difference of the calculated retention index from the literature for common FAMES is 5 units which is lower than 1.5%. Thus, Eq 1 can be used to calculate both ECL and Kovats retention index simultaneously without a FAME as the reference. Analyst would have alternatives whether to use the more general system of Kovats retention index or a specific system of ECL for identification of FAMES.

Using column-slicing method of Calvalli and Guinchard (J. Chromatogr. Sci (1975) 33,) Eq 1 is rearranged to Eq 2 and Eq 2 is used to predict retention times of FAMES in both linear and non-linear temperature programmed gas chromatography (TPGC). The differences between the experimental and predicted values increase as the carbon length of FAMES and temperature program rate increase. The differences are too high and unacceptable for accurate identification of FAMES. It is generally known that carrier gas viscosity tend to increase as temperature increases and carrier gas flow will be lower when inlet pressure is kept constant. Consequently a flow correction factor is added to Eq 2. Eq 3 is obtained and it is used to predict the retention times of lipid homologues eluted from both linear and non-linear TPGC.

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\left(a + bn + \frac{c + dn}{T_i} \right)} \right) \quad \text{Eq 2}$$

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m [1 + g(T_i - T_1)]}{m} \left(1 + e^{\left(a + bn + \frac{c+dn}{T_i} \right)} \right) \quad \text{Eq 3}$$

where g is the flow correction factor due to change in temperature T_i and T_1 are initial column temperature and temperature at time t , respectively.

The highest percent difference between experimental and predicted value is less than 1.5% for methyl linolate at the temperature program rate as high as 10 °C/min. However, the differences tend to be higher at higher temperature gradient or higher carbon chain length. The slope of the plot between calculated retention time and carbon number is slightly shallower than that of the experimental curve. This is probably due to temperature different between inside and outside (oven) the column, which arises from resistant to heat transfer across the capillary wall. The capillary column wall has three layers, i.e. outside protective coating, fused silica and the liquid phase. When metal (aluminum) which has higher heat transfer than organic resin is used as an outside coating the percent differences between the experimental and predicted retention times are not improved. It is concluded if there be any resistant to heat transfer across the capillary wall, the protective coating would have a very minor contribution. Nevertheless, the effect of heat transfer across the capillary wall can not be answer at this time.

When the column has been broken intentionally or accidentally up to 30% in length, it does not affect the numerical values of the four column constants. The same values can be used to predict retention times of FAMES in either isothermal GC or temperature programmed GC.

Key words: Capillary column, equivalent chain length, gas chromatography, retention index, temperature programming.

การพิสูจน์เอกลักษณ์ลิปิดโดยแก๊สโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิต่างๆ โดยไม่ต้องใช้สารอ้างอิง

บทคัดย่อ

ในปี ค.ศ. 1997 คณิศ และคณะ (J. Chromatogr. Sci. (1997) 35,329) ได้เสนอสมการทำนายการเคลื่อนที่สารในแก๊สโครมาโตกราฟี คือ

$$\ln\left(\frac{t_R - t_m}{t_m}\right) = a + bn + \frac{c}{T} + \frac{dn}{T} \quad (\text{สมการ 1})$$

โดย t_R และ t_m เป็นเวลาคงค้างของสารตัวอย่างและสารไม่คงค้าง (เวลาสุญญ) ตามลำดับ a, b, c และ d เป็นค่าคงที่ของคอลัมน์ n เป็นจำนวนคาร์บอน หรือจำนวนคาร์บอนเทียบเท่า T เป็นอุณหภูมิสัมบูรณ์ การศึกษานี้ได้ขยายขอบเขตการใช้งานของสมการ 1 นี้ให้กว้างออกไป โดยใช้ในการเปลี่ยนค่ากลับป้อนมา ระหว่างค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่ากับค่าดัชนีคงค้างโคเวทซ์ โดยไม่ต้องทำการทดลองฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีอีกครั้งหนึ่ง เมื่อทำการทดสอบกับคอลัมน์ ไม่มีความเป็นขั้วโอวี 101 พบว่า ความแตกต่างของเวลาคงค้างระหว่างการคำนวณและผลการทดลองต่ำกว่า 5 หน่วยดัชนีคงค้าง หรือคิดเป็นร้อยละต่ำกว่า 1.5 นั่นคือ สมการ 1 นี้ สามารถคำนวณความยาวคาร์บอนเทียบเท่า และดัชนีคงค้างในเวลาเดียวกันโดยไม่ต้องมีกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์เป็นสารอ้างอิง ซึ่งช่วยให้ผู้วิเคราะห์จะเลือกใช้วิธีทั่วไปด้วยค่าดัชนีคงค้าง หรือวิธีเฉพาะด้วยความยาวคาร์บอนเทียบเท่าในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์

เมื่อนำวิธีการแบ่งส่วนคอลัมน์ของ Calvalli และ Quinchard (J. Chromatogr. Sci (1975) 33,) มารวมเข้ากับสมการ 1 จะให้สมการ 2 เพื่อใช้ในสถานะโปรแกรมอุณหภูมิ ทว่า ความหนืดและอัตราไหลของแก๊สตัวพาจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ ดังนั้น จำเป็นต้องมีตัวประกอบปรับแก้อัตราไหลที่เปลี่ยนแปลงไป ดังสมการ 3

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\left(a + bn + \frac{c + dn}{T_i} \right)} \right) \quad (\text{สมการ 2})$$

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m [1 + g(T_i - T_1)]}{m} \left(1 + e^{\left(a + bn + \frac{c + dn}{T_i} \right)} \right) \quad (\text{สมการ 3})$$

โดย g คือตัวประกอบปรับแก้อัตราไหลเนื่องจากอุณหภูมิ T_1 และ T_i คืออุณหภูมิเริ่มต้นและอุณหภูมิ ณ เวลา i ตามลำดับ ความแตกต่างสูงสุดระหว่างค่าเวลาคงค้างที่คำนวณได้จากสมการ 3 และค่าที่ได้จากการทดลองต่ำกว่าร้อยละ 1.5 สำหรับกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ที่ทำในสถานะ โปรแกรม $10^\circ\text{C}/\text{นาที}$ อย่าง

ไรก็ตาม ความแตกต่างนี้มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อ อัตราเพิ่มอุณหภูมิค่อนข้างสูง และความยาวคาร์บอนสูงขึ้น ความชันของเส้นกราฟที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่างเวลาคงค้างจากการคำนวณกับจำนวนคาร์บอนจะชันน้อยกว่าเส้นกราฟที่ได้จากการทดลอง ทั้งนี้อาจสืบเนื่องมาจากการถ่ายเทความร้อนผ่านผนังคอลัมน์ (มี 3 ชั้น ผิวเคลือบภายนอก คอลัมน์ซิลิกา และวสุภาคนิ่งภายใน) ทำให้อุณหภูมิภายในคอลัมน์ต่ำกว่าด้านนอกเล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบโดยเปลี่ยนวัสดุเคลือบภายนอกเป็นโลหะอะลูมิเนียม ซึ่งนำความร้อนได้ดีกว่าเรซินโพลิอิมิด ความแตกต่างร้อยละของเวลาคงค้างระหว่างการคำนวณกับการทดลองจากคอลัมน์ทั้งสองไม่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ผิวเคลือบภายนอกซึ่งเป็นชั้นบางมากมีผลต่อการถ่ายเทความร้อนน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การถ่ายเทความร้อนทั้งระบบ อย่างไรก็ตาม ขณะนี้จึงยังไม่อาจจะสรุปได้แน่ชัดว่าการถ่ายเทความร้อนผ่านผนังคอลัมน์มีผลต่อเวลาคงค้างหรือไม่

การหักสั้นลงของคอลัมน์ถึงร้อยละ 30 จะยังไม่ส่งผลกระทบต่อหรือเปลี่ยนแปลงค่าคงตัวของคอลัมน์ทั้งสี่ ค่าคงตัวทั้งสี่นั้นยังสามารถทำนายเวลาคงค้างสารได้แม่นยำทั้งในสภาวะอุณหภูมิคงที่ และสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ

คำหลัก คอลัมน์แบบแคพิลลารี ความยาวไซคาร์บอนเทียบเท่า แก๊สโครมาโตกราฟี เวลาคงค้าง โปรแกรมอุณหภูมิ

สัญลักษณ์และตัวย่อ

C_m ความเข้มข้นของสารในวัฏภาคเคลื่อน

C_s ความเข้มข้นของสารในวัฏภาคนิ่ง

ECL ความยาวโซ่คาร์บอนเทียบเท่า

F อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

I คัดขึ้นค้ำ

k' เป็นตัวประกอบค้ำ และ $k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$

m จำนวนส่วนคอลัมน์ที่แบ่ง

n จำนวนคาร์บอน

R_f Retardation factor

V_m ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่

V_s ปริมาตรของวัฏภาคนิ่ง

t_m เวลาที่สารกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคเคลื่อนที่ หรือเวลาค้ำของสารไม่ค้ำ

t_s เวลาที่สารกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง

t_R เวลาค้ำไม่ปรับแก้

t_R' เวลาค้ำปรับแก้ ($= t_R - t_m$)

T อุณหภูมิสัมบูรณ์

TPGC แก๊สโครมาโตกราฟีในสถานะโปรแกรมอุณหภูมิ

α เวลาค้ำสัมพัทธ์

β อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อวัฏภาคนิ่ง

ΔH° โมลาร์เอนทัลปีของการระเหย

ΔS° โมลาร์เอนโทรปีของการระเหย

ΔG° พลังงานกิบส์

$\Delta \mu^\circ$ ศักย์เคมีของการระเหย

δH การเปลี่ยนแปลงเอนทัลปีของการระเหยต่อ 1 เมทิลิน

δS การเปลี่ยนแปลงเอนโทรปีของการระเหยต่อ 1 เมทิลิน

$\delta \mu$ การเปลี่ยนแปลงศักย์เคมีของการระเหยต่อ 1 เมทิลิน

สารบัญ

Abstract	ก
บทคัดย่อ	ค
สัญลักษณ์และคำย่อ	ง
บทนำ	1
หลักการพื้นฐาน	1
การวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร	2
1. การใช้เวลาคงค้างในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร	3
1. การใช้ค่า $\log(\text{retention time})$	5
2. การใช้ค่าคงค้างสัมพัทธ์	6
3. การใช้ค่าดัชนีคงค้าง	7
4. การใช้ค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า	10
6. การใช้สารอื่น	13
7. การวิเคราะห์เอกลักษณ์โดยใช้คอลัมน์สองอันที่มีสภาพขั้วต่างกัน	14
8. การวิเคราะห์โดยอาศัยค่าการตอบสนองสัมพัทธ์ของเครื่องตรวจวัด	14
9. การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารโดยไม่ใช้สารอ้างอิง	14
ทฤษฎี	16
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	18
วัสดุอุปกรณ์	18
วิธีดำเนินการทดลอง	19
การเตรียมสารตัวอย่าง	19
การหาค่าคงตัวคอลัมน์	21
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	25
1. ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีคงค้างและความยาวคาร์บอนเทียบเท่า	25
1.1 ค่าคงตัวของคอลัมน์	26
1.2 การหาค่าดัชนีคงค้างโกเวทซ์กรค ไขมันเมทิลเอสเทอร์จากตัวประกอบคงค้าง	27
1.3 การหาค่าดัชนีคงค้างโกเวทซ์กรค ไขมันเมทิลเอสเทอร์จาก ECL	28
1.4 การหาค่าดัชนีคงค้างโกเวทซ์ไขมันแอลกอฮอล์	29
1.5 สรุปและข้อคิด	30
2. การทำนายเวลาคงค้างในแก๊สโครมาโตกราฟีแบบโปรแกรมอุณหภูมิ	31
2.1 ค่าคงตัวของคอลัมน์	32
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคาร์บอนกับเวลาคงค้าง	32

2.3 การทำนายเวลาคงค้างใน TPGC ตามสมการ Eq 52	34
2.4 แก๊สตัวพาและการปรับแก้ χ	37
2.5 การทำนายเวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากแก๊สพิษ	40
2.6 ผลของอุณหภูมิคอลัมน์	42
2.7 สรุปและข้อเสนอแนะ	46
3. ผลของความยาวคอลัมน์ต่อค่าคงตัวคอลัมน์	47
3.1 สภาวะอุณหภูมิคงที่	47
3.2 สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ	49
3.3 สรุปและเสนอแนะ	52
เอกสารอ้างอิง	53
ผลงานที่ตีพิมพ์	55
ภาคผนวก ก	57
ภาคผนวก ข	63

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารโดยแก๊สโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิต่างๆ โดยไม่ต้องใช้สารอ้างอิง

บทนำ

แก๊สโครมาโตกราฟีเป็นศาสตร์การแยกสารแขนงหนึ่งที่แยกมาจากโครมาโตกราฟีทั่วไป โดยมีแก๊สเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่พาสารไปตามคอลัมน์ เมื่อ Martin & Synge⁽¹⁾ ได้ประดิษฐ์เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีเครื่องแรกออกมาในปี ค.ศ. 1941 แก๊สโครมาโตกราฟีก็ได้รับความนิยมอย่างรวดเร็ว และมีการพัฒนาทั้งด้านทฤษฎี เครื่องมือ และการประยุกต์ใช้ไปอย่างมาก ปัจจุบันแก๊สโครมาโตกราฟีได้แบ่งแยกออกไปเป็น Gas solid chromatography (GSC) และ Gas liquid chromatography (GLC) ซึ่งแตกต่างกันตรงสารบรรจุ (packing material) คอลัมน์ของ Gas solid chromatography นั้นสารบรรจุจะเป็นของแข็งมีคุณสมบัติดูดซับสารต่างๆ ได้ดี กลไกการแยกสารจะเป็นการดูดซับสารตัวอย่างโดยสารดูดซับที่แตกต่างกัน แก๊สโครมาโตกราฟีชนิดนี้มักใช้แยกสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก หรือใช้แยกแก๊สเป็นส่วนใหญ่ ส่วน Gas liquid chromatography นั้นสารบรรจุมักเป็นสารเหลว (เพื่อลดการดูดซับสารตัวอย่าง) เคลือบผิวของเหลวชั้นบางๆ โดยของเหลวนี้จะทำหน้าที่ในการแยกสารด้วยกลไกการแบ่งละลายของสารตัวอย่างระหว่างของเหลวที่เคลือบ (วัฏภาคนิ่ง) กับแก๊สตัวพา (วัฏภาคเคลื่อนที่) GLC มักใช้แยกสารอินทรีย์และสารชีวโมเลกุลทั่วไปที่สามารถระเหยเป็นไอ หรือสามารถเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ที่ระเหยง่ายได้ และรายงานการวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับโครมาโตกราฟีชนิดนี้ ทั้ง GSC และ GLC ยังแบ่งแยกตามลักษณะคอลัมน์ที่ใช้คือ packed และ capillary columns ทฤษฎีการแยกสารระหว่างคอลัมน์ทั้งสองนี้จะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเฉพาะในส่วนของผลกระทบขององค์ประกอบต่างๆ ต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์

แม้โครมาโตกราฟีที่รายงานโดยทเวดค์ในปี ค.ศ. 1906⁽²⁾ นั้นจะกล่าวถึงแค่เพียงความสามารถในการแยกสารผสมที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ในบทความของ Martin & Synge ที่รายงานผลการประดิษฐ์เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีนั้นได้แสดงถึงความสามารถในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารไว้ด้วย ปัจจุบันแก๊สโครมาโตกราฟีนอกจากใช้เป็นเครื่องมือในการแยกสารแล้วยังถูกใช้เป็นเครื่องมือ (1) ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร (2) ในการวิเคราะห์ปริมาณ และ (3) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (Physicochemical properties) ต่างๆ และอุณหพลศาสตร์ (Thermodynamic properties)

หลักการพื้นฐาน⁽³⁾

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในแก๊สโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้กันส่วนใหญ่จะใช้คุณสมบัติการแบ่งละลายของสารตัวอย่างใน 2 วัฏภาคคือ วัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ สัมประสิทธิ์การแบ่งละลายระหว่าง 2 วัฏภาค (K) มีค่า ซึ่งสัมพันธ์กับค่า R_f (retardation factor) คือ

$$R_f = \frac{C_m V_m}{C_s V_s + C_m V_m}$$

Eq 4

$$R_f = \frac{1}{1 + K/\beta} \quad \text{Eq 5}$$

โดย C_s และ C_m เป็นความเข้มข้นของสารในวัฏภาคนิ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่ V_m และ V_s คือปริมาตรของวัฏภาคนิ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่ ตามลำดับ และ β คืออัตราส่วนระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อวัฏภาคนิ่ง

ในอีกมุมมองหนึ่งของโครมาโตกราฟีจะกำหนดค่า retardation factor (R_f) ในรูปของอัตราส่วนการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างและตัวระ คือ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่วัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไป(ในเวลาเท่ากัน)}} \quad \text{Eq 6}$$

$$R_f = \frac{t_m \times F}{(t_m + t_s) \times F} \quad \text{Eq 7}$$

$$R_f = \frac{1}{1 + k'} \quad \text{Eq 8}$$

โดย F เป็นอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ t_s และ t_m เป็นเวลาที่สารกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ ตามลำดับ และ k' เป็นตัวประกอบคงค้าง (retention factor)

$$k' = \frac{t_s}{t_m} \quad \text{Eq 9}$$

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad \text{Eq 10}$$

t_R คือเวลาทั้งหมดของสารตัวอย่างกระจายตัวในคอลัมน์ หรือค่าเวลาลากค้างไม่ปรับแก้ (uncorrected retention time) จากความสัมพันธ์ระหว่างสมการ (Eq 5) และสมการ (Eq 8) จะได้

$$K = \beta \cdot k' \quad \text{Eq 11}$$

หรือ
$$t_R = t_m + t_m \cdot \frac{K}{\beta} \quad \text{Eq 12}$$

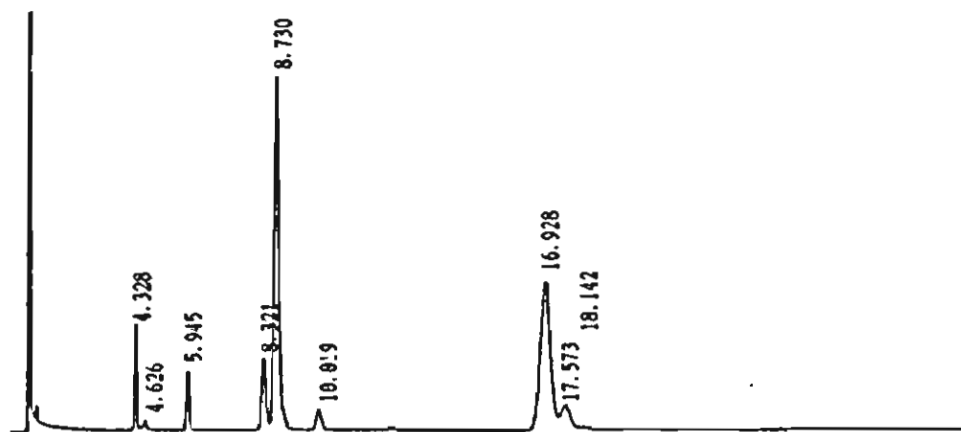
สมการ (Eq 12) นี้ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารค่อนข้างมาก เพียงแค่ผู้วิเคราะห์ส่วนใหญ่จะใช้โดยไม่รู้ถึงความสัมพันธ์นี้

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในแก๊สโครมาโตกราฟีสามารถทำได้หลายวิธี วิธีการที่ใช้กันมาช้านานและยังใช้กันมาจนปัจจุบันได้แก่การใช้ค่าเวลาลากค้าง ทั้งที่เป็นเวลาลากค้างปรับแก้ (Corrected retention time) และ ไม่ปรับแก้ (Uncorrected retention time)

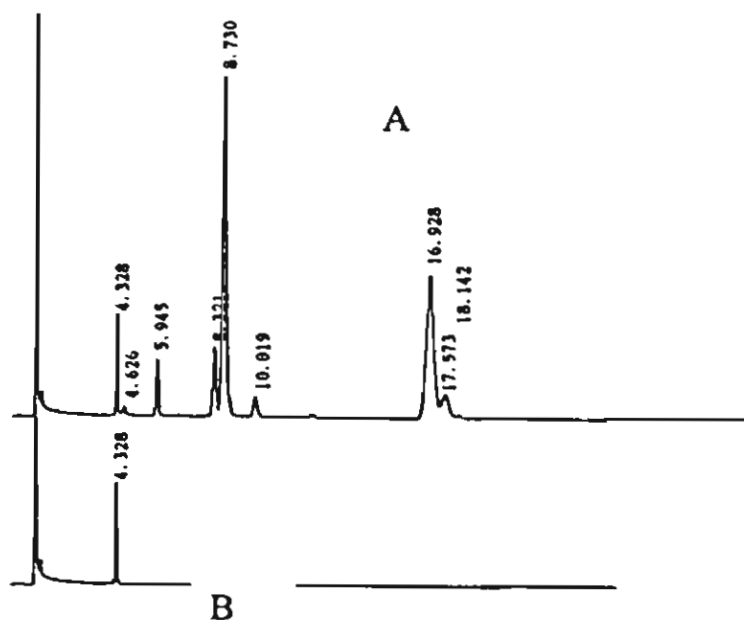
1. การใช้เวลาคงค้างในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารด้วยวิธีนี้กระทำโดยการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปในเครื่องโครมาโตกราฟ หากบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องประมวลผล ผลที่ได้จะเป็นโครมาโตแกรมดังรูปที่ 1 เครื่องประมวลผลนี้จะพิมพ์ค่าเวลาคงค้างไม่ปรับแก้ให้ด้วย แต่หากบันทึกข้อมูลด้วยเครื่องจดบันทึก (Recorder) ข้อมูลที่ได้จะมีแค่เพียงรูปแก๊สโครมาโตแกรมเท่านั้น โดยไม่มีค่าเวลาคงค้างพิมพ์ออกมา



รูปที่ 1 แก๊สโครมาโตแกรมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารกระทำโดยการฉีดสารอ้างอิงเข้าไปก่อน หรือหลังเสร็จสิ้นการวิเคราะห์สารตัวอย่าง แล้วนำค่าเวลาคงค้างมาเปรียบเทียบ ดังรูปที่ 2 หากค่าเวลาคงค้างตรงกัน (อาจจะยอมให้คลาดเคลื่อนได้เล็กน้อย) สารตัวอย่างอาจจะเป็นสารตัวเดียวกับสารอ้างอิง แต่หากเวลาคงค้างต่างกันมาก ผู้วิเคราะห์สามารถจะสรุปได้ว่าสารตัวอย่างเป็นสารต่างกับสารอ้างอิง วิธีนี้ทำได้สะดวกและรวดเร็ว แต่มีข้อเสียค่อนข้างมาก



รูปที่ 2 แก๊สโครมาโตแกรมของกรดไขมัน

เอสเทอร์ (A) และ palmitoyl methyl ester (B)

จากสมการ (Eq 12) เวลาคงค้างไม่ปรับแก้ (t_R) ของสารแปรตามค่า K หรือสัมประสิทธิ์การแบ่ง
 กระจาย ซึ่งถือเป็นคุณลักษณะเฉพาะตัวของสารในวัฏภาคคู่หนึ่งๆ ทว่าค่า K นี้แปรเปลี่ยนตามอุณหภูมิการ
 ทดลอง ดังนั้น การจะใช้ค่าเวลาคงค้างในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารจะต้องพยายามรักษาอุณหภูมิและ
 สภาพอื่นๆ ของการทำโครมาโตกราฟีให้คงที่ ค่า K ของสารอินทรีย์ทั่วไป มักจะเปลี่ยนไปประมาณ 1
 เท่าตัว เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไปประมาณ 30 °C ถ้าต้องการจะให้ค่า K นี้คลาดเคลื่อนไปไม่เกินร้อยละ 1.0
 การวิเคราะห์จะต้องรักษาอุณหภูมิของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีไม่ให้เบี่ยงเบนไปเกินกว่า 0.3 °C นอก
 จากนี้ เวลาคงค้างสารยังขึ้นกับค่า t_m ซึ่งเป็นเวลาที่สารค้ำวอย่างอยู่ในวัฏภาคเคลื่อนที่ หรือในอีกความ
 หมายหนึ่งของ t_m คือ เป็นเวลาคงค้างของสารที่ไม่แทรกค้ำวเข้าไปใน วัฏภาคนิ่งเลข (ได้แก่สารไม่คง
 ค้าง) มักได้แก่แก๊สเฉื่อย ค่า t_m นี้จะเป็นค่าวัดอัตราเร็วของแก๊สค้ำวพา (carrier gas) ได้อีกทางหนึ่ง หาก
 อัตราไหลของแก๊สค้ำวพาสูง สาร ไม่คงค้างก็จะถูกพาออกจากคอลัมน์ค้ำวเวลาที่สั้นลง คือ t_m ค่า ดังนั้น
 การทำโครมาโตกราฟีจะต้องรักษาอัตราไหลของแก๊สค้ำวพาให้คงที่ตลอดเวลา ส่วนค่า β เป็นอัตราส่วน
 ระหว่างปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อวัฏภาคนิ่ง ค่านี้ค่อนข้างจะคงที่สำหรับคอลัมน์หนึ่งๆ ทว่า
 คอลัมน์นี้จะคงอยู่กับห้องปฏิบัติการ หรือเครื่องโครมาโตกราฟหนึ่งๆ เท่านั้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวมานี้
 เวลาคงค้างสารแม้จะใช้สะดวกและง่ายในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร แต่ก็มีจุดอ่อนอยู่มาก นอกจาก
 ปัจจัยของอุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สค้ำวพาแล้ว ขนาดและช่องว่างในระบบโครมาโตกราฟแต่ละ
 ตัวยังมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ข้อมูลจากแต่ละห้องปฏิบัติการไม่สามารถจะสื่อสารกัน หรือนำไป
 เปรียบเทียบกันได้

หลายห้องปฏิบัติการได้ใช้ค่าเวลาคงค้างปรับแก้ (t'_R) คือเวลาคงค้างที่หักค่า t_m ออกไป โดย
 กล่าวว่า ค่า t'_R นี้สามารถลดความผิดพลาดลงได้ระดับหนึ่ง เพราะได้หักลบช่องว่างของระบบคอลัมน์
 ออกไปแล้ว อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาสมการ (Eq 12) โดยนำมาจัดรูปใหม่ดังสมการ (Eq 13) คือ

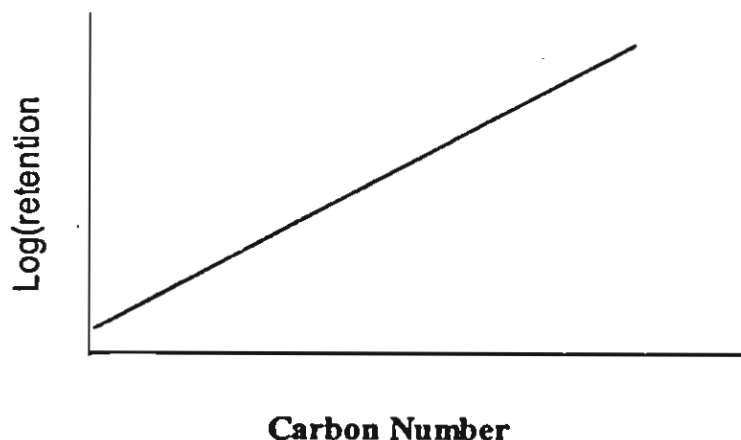
$$t'_R = t_m \cdot \frac{K}{\beta} \quad \text{Eq 13}$$

ค่า t'_R ในสมการ (Eq 13) นี้ยังคงขึ้นกับค่า K , t_m และ β ดังนั้น ในความเห็นของผู้เขียนเองนั้น
 ความคลาดเคลื่อน (คิดเป็นร้อยละ) ในการวัดค่าทั้งสองนั้นไม่น่าจะแตกต่างกันในเชิงทฤษฎี แต่อาจจะ
 แตกต่างกันในเชิงปฏิบัติ กล่าวคือ การวัดค่าคงค้างไม่ปรับแก้ นั้น การวัดค่าจะเริ่มทันทีที่ฉีดสารค้ำวอย่าง
 เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ การจะกดปุ่มเริ่มบันทึกข้อมูลพร้อมๆ กันกับขณะที่ฉีดสารค้ำวอาจหา
 ขำนาญพอควร และจะให้กดได้พร้อมกันอย่างสม่ำเสมอเป็นเรื่องที่กระทำได้ค่อนข้างยาก นั่นคือ ในส่วน
 นี้จะมีความคลาดเคลื่อนของตัวบุคคล (human error) เข้ามาเป็นค้ำวแปร ซึ่งแก้ไขได้โดยการใช้เครื่องฉีด
 สารอัตโนมัติ (auto-sampler) อย่างไรก็ตาม ความสะดวกในการวัดค่าทั้งสองนั้นแตกต่างกันในหลายๆ
 กรณี เช่น ห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องประมวลผล หรือคอมพิวเตอร์ในการจัดเก็บข้อมูล เครื่องมือทั้งสอง
 สามารถบันทึกเวลานับแต่เริ่มฉีดสาร จนถึงเวลาที่สารค้ำวอย่างถูกพาออกมาจากคอลัมน์ พร้อมกับพิมพ์ค่า
 t_m ให้กรณีนี้ การใช้ค่าเวลาคงค้างไม่ปรับแก้จะให้ความสะดวกมากกว่า แต่หากผู้วิเคราะห์ใช้เครื่องจด

บันทึก (recorder) ในการเก็บข้อมูล เครื่องนี้ไม่ให้ข้อมูลอื่นใดนอกจากตัวพิก ผู้วิเคราะห์จะต้องวัดค่าต่างๆ เองทั้งหมด การหาค่าเวลาคงค้างไม่ปรับแก้จะยุ่งยากกว่าค่าเวลาคงค้างปรับแก้ โดยถือเอาค่าเวลาคงค้างของตัวทำละลายเป็นค่า t_m ระยะทางจากพิกของตัวทำละลายถึงยอดพิกของสารตัวอย่าง ถือเป็นเวลาคงค้างปรับแก้ของสาร ข้อเสียอีกข้อหนึ่งของการวิเคราะห์สาร โดยใช้เวลาคงค้างนี้ คือ หากตัวอย่างเป็นสารผสมมากชนิด สารอ้างอิงที่ใช้เปรียบเทียบจะต้องมากขึ้นด้วย และการวิเคราะห์เอกลักษณ์ก็เป็นไปในลักษณะเคามากกว่า

2. การใช้ค่า $\log(\text{retention time})$

วิธีนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในอนุกรมฟังก์ชันเดียวกัน (homologous series) ซึ่งจะลดจำนวนสารอ้างอิงลงเหลือเพียง 2-3 ตัวเพื่อใช้สร้างกราฟเส้นตรง (ดังกราฟรูปที่ 3) เมื่อได้กราฟเส้นตรงแล้ว การวิเคราะห์เอกลักษณ์สามารถกระทำได้ทั้งอนุกรม (โดยเชิงทฤษฎี) ในเชิงปฏิบัตินั้นจะสามารถใช้ได้ครบเท่าที่ความสัมพันธ์ยังเป็นเชิงเส้น



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างจำนวนคาร์บอนกับค่า $\log(\text{เวลาคงค้าง})$

วิธีนี้เริ่มใช้มาตั้งแต่ James and Martin (1952)⁽⁴⁾ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log(\text{เวลาคงค้างปรับแก้})$ กับจำนวนคาร์บอนในอนุกรมฟังก์ชันเดียวกัน ความสัมพันธ์สามารถเขียนออกมาเป็นรูปสมการคณิตศาสตร์ได้คือ

$$\log(t_R - t_m) = A + Bn \quad \text{Eq 14}$$

สมการ (Eq 14) นี้ใช้กันอย่างแพร่หลายมาก เพราะใช้งานง่าย สะดวกและให้ความแม่นยำในระดับที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตาม ความถูกต้องของการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การควบคุมสถานะการทดลองให้คงที่ตลอดเวลา ซึ่งรวมถึงอุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สตัวพา ระหว่างการวิเคราะห์สารตัวอย่างและสารอ้างอิง ข้อเสียของวิธีนี้ที่มีการกล่าวกันมากคือ ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log(\text{เวลาคงค้าง})$

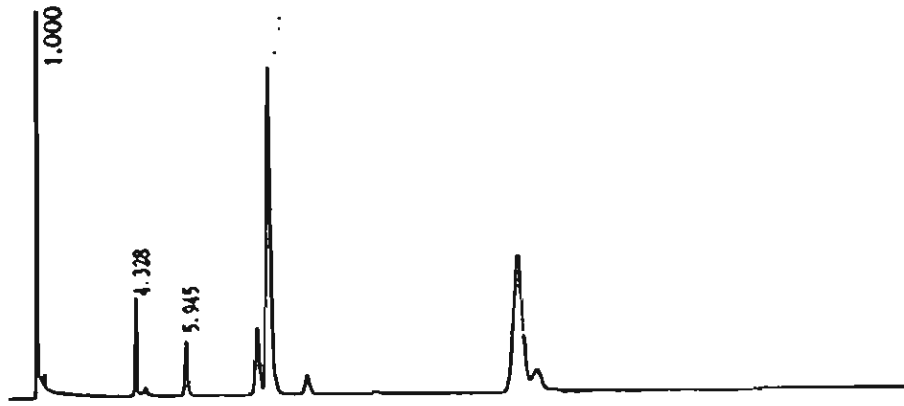
ปรับแก้) กับ จำนวนคาร์บอนนั้นไม่เป็นเชิงเส้นเสียที่เคียว หรือสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นในระนาบๆ เท่านั้น อย่างไรก็ตามความโค้งของเส้นนี้น้อยมาก ในทางปฏิบัตินั้นเกือบจะไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ทว่าข้อเสียอย่างมากของวิธีนี้คือ ไม่สามารถนำข้อมูลจากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟหนึ่งไปใช้กับเครื่องอื่นๆ ได้ อีกทั้งการวิเคราะห์ยังจะต้องนิยามสารอ้างอิงอย่างสม่ำเสมอ เพื่อตรวจสอบสถานะของเครื่อง ข้อเสียอีกประการหนึ่งของสมการ (Eq 13) คือ การวัดค่าเวลาคงค้างปรับแก้ โดยปกติมักใช้เวลาคงค้างไม่ปรับแก้ลบด้วยเวลาคงค้างของตัวทำละลาย (ใช้เวลาคงค้างของตัวทำละลายเป็นค่า t_m) ซึ่งไม่ใช่วิธีการที่ถูกต้องนัก แต่ให้ความสะดวกอย่างมาก ดังนั้นค่าเวลาคงค้างปรับแก้จึงยังไม่ถูกต้อง และอาจจะเป็นสาเหตุที่กล่าวอ้างกันว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log(\text{เวลาคงค้างปรับแก้})$ กับจำนวนคาร์บอนไม่เป็นเส้นตรงจริงๆ การวัดค่า t_m นั้นกระทำได้ง่ายมาก หากเครื่องตรวจวัดของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟเป็นแบบนำความร้อน (thermal conductivity detector, TCD) ทั้งนี้เพราะเครื่องตรวจวัด TCD นี้จะตรวจวัดแก๊สไนออนได้ดี และแก๊สไนออนนี้เป็นแก๊สที่ยอมรับกันทั่วไปว่าไม่แทรกตัวเข้าสู่ภาคนิ่ง (เกือบจะทุกชนิด) จึงถือเป็นตัววัดค่า t_m ได้ถูกต้องที่สุด⁽⁵⁾ ทว่าเครื่องตรวจวัดแบบเปลวไฟ (flame ionization detector, FID) ซึ่งเป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมแพร่หลายนั้นไม่ตอบสนองต่อแก๊สไนออน ค่า t_m จึงกระทำการวัดโดยตรงไม่ได้ และต้องใช้วิธีการคำนวณที่ค่อนข้างยุ่งยาก⁽⁶⁾ และยังไม่สามารถนำมาปรับใช้ในงานประจำ (routine) ได้ วิธีการคำนวณส่วนใหญ่จะเริ่มจากสมการ (Eq 14)

3. การใช้ค่าคงค้างสัมพัทธ์ (Relative retention, α)

ค่าคงค้างสัมพัทธ์นี้ไม่มีหน่วย หาได้จากเวลาคงค้างปรับแก้หรือปริมาตรคงค้างปรับแก้ของสารหารด้วยเวลาคงค้างปรับแก้หรือปริมาตรคงค้างปรับแก้ของสารอ้างอิงที่ผสมลงไปในตัวอย่าง Smith และคณะ⁽⁷⁾ แนะนำให้ใช้โนแนน (nonane) เป็นสารอ้างอิง จากรูป 4 ถ้าให้สารตัวที่ 1 (เวลาคงค้าง 4.328 นาที) เป็นสารอ้างอิงที่เติมลงไป สารตัวอย่างที่ 1 ถูกชะออกที่เวลา 5.945 นาที และสมมุติค่า t_m เป็น 1.000 นาที ค่าคงค้างสัมพัทธ์จะเป็น

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} \quad \text{Eq 15}$$

$$\alpha = \frac{5.945 - 1.000}{4.328 - 1.000} = 1.485$$



รูปที่ 4 แก๊สโครมาโตแกรมของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ผสม nonane

ค่าคงค้ำสัมพัทธ์นี้เป็นค่าที่แนะนำให้ใช้วิเคราะห์เอกลักษณ์ของสาร เพราะค่านี้แปรตามสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสารตัวอย่าง และสารอ้างอิงเท่านั้น ดังสมการ (Eq 18)

จากสมการ (Eq 12)

$$t_{R(x)} - t_m = t_m \cdot \frac{K_{(x)}}{\beta} \quad \text{Eq 16}$$

$$\text{และ } t_{R(C9)} - t_m = t_m \cdot \frac{K_{(C9)}}{\beta} \quad \text{Eq 17}$$

หารสมการ (Eq 16) ด้วยสมการ (Eq 17) จะได้

$$\frac{t_{R(x)}}{t_{R(C9)}} = \frac{K_{(x)}}{K_{(C9)}} \quad \text{Eq 18}$$

สถานะการทำโครมาโตกราฟที่มีผลต่อการวิเคราะห์จะลดลงเหลือเพียงสองตัวคือ อุณหภูมิของคอลัมน์ และวัฏภาคนิ่ง ซึ่งมีผลต่อสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสาร แต่หากสารตัวอย่างเป็นแอลเคน ซึ่งเป็นสารในอุดมคติจะขึ้นเคียงกันกับสารอ้างอิง (nonane) ผลของอุณหภูมิจะหักล้างกัน และค่าคงค้ำสัมพัทธ์นี้ค่อนข้างคงที่ แม้การใช้ค่าคงค้ำสัมพัทธ์จะให้ข้อดีเชิงทฤษฎี แต่การใช้งานจะยุ่งยากมากขึ้น ประกอบกับช่วงที่มีการแนะนำค่านี้ออกมานั้นได้มีการใช้ระบบดัชนีคงค้ำ หรือดัชนีคงค้ำของโกเวทซ์ (Kovats retention index) ระบบค่าคงค้ำสัมพัทธ์จึงไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร

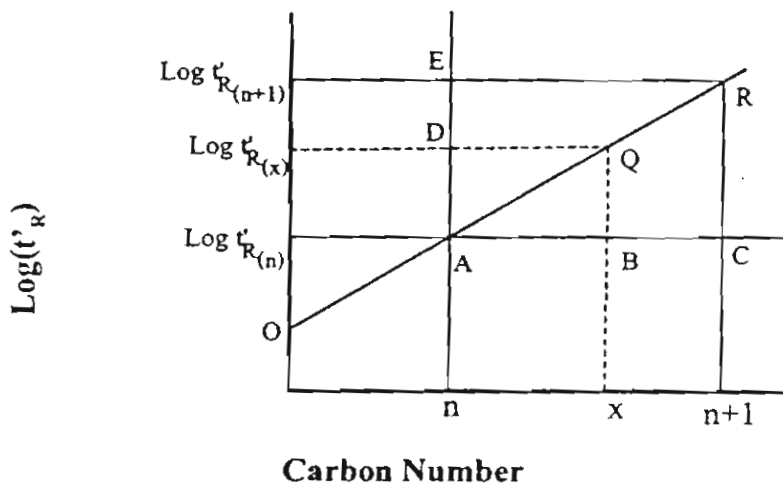
4 การใช้ค่าดัชนีคงค้ำ (Retention Index, I)

วิธีนี้เสนอโดยเวห์ลลีและโกเวทซ์ (Wehrli and Kovats)⁽⁸⁾ ในปี ค.ศ. 1958 เพื่อใช้เป็นวิธีทั่วไปในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร วิธีนี้มีจุดเด่นคือ ข้อมูลที่ได้จากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟหนึ่งสามารถนำไปปรับใช้กับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟอื่นๆ การศึกษาจึงได้ขยายผลออกไปอย่างกว้างขวาง

ปัจจุบันมีสารอินทรีย์ที่วิเคราะห์บนวิภาคหนึ่งค่าๆ รวบรวมไว้หลายหมื่นตัวเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร ซึ่งสร้างความสะดวกในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารเบื้องต้นเป็นอย่างมาก ดัชนีคงค้าง (I) นี้คำนวณตามสมการ (Eq 19) คือ

$$I = 100n + 100 \frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \quad \text{Eq 19}$$

โดย $t'_{R(n)}$ เป็นเวลาคงค้างปรับแก้ของสาร x $t'_{R(n)}$ และ $t'_{R(n+1)}$ เป็นเวลาคงค้างของนอร์มัลพาราฟินที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น n และ $n+1$ ความหมายของสมการ (Eq 19) นี้ อาจจะทำให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น โดยเริ่มจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $\log(\text{เวลาคงค้างปรับแก้กับจำนวนคาร์บอน})$ (รูปที่ 5) คือ



รูปที่ 5 แสดงการหาค่าดัชนีคงค้าง

แกน Y เป็นค่า $\log(\text{เวลาคงค้างปรับแก้})$ และแกน X เป็นจำนวนคาร์บอน ลากเส้นระนาบจากจุด $t'_{R(n)}$, $t'_{R(x)}$ และ $t'_{R(n+1)}$ และลากเส้นตั้งฉากจากจุด n , x , และ $n+1$ พร้อมกับกำหนดจุดตัดต่างๆ ดังรูปที่ 5 พร้อมกับให้สามเหลี่ยมคล้ายหลายรูป และจากสามเหลี่ยมคล้ายเหล่านี้สามารถพิสูจน์ได้ว่า

$$\frac{AD}{AE} = \frac{AQ}{AR} \quad \text{Eq 20}$$

และ
$$\frac{AQ}{AR} = \frac{AB}{AC} \quad \text{Eq 21}$$

$\therefore$
$$\frac{AD}{AE} = \frac{AB}{AC} \quad \text{Eq 22}$$

แทนค่าจะได้
$$\frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} = \frac{x - n}{(n+1) - n} \quad \text{Eq 23}$$

เทอมทางขวาเป็นเศษส่วนของ 1 คาร์บอน เมื่อแทนค่าสมการ (Eq 23) นี้ลงในสมการ (Eq 19) จะได้

$$I = 100 \left(n + \frac{x - n}{(n+1) - n} \right) \quad \text{Eq 24}$$

นั่นคือ ค่าดัชนีคงค้างก็คือจำนวนคาร์บอน (n) ของนอร์มัลพาราฟินที่ถูกชะออกมาระหว่างนอร์มัลพาราฟินที่มีจำนวนคาร์บอน n และ n+1 กับเศษส่วนคาร์บอนที่เกินมาคูณด้วย 100 คิวเลข 100 นี้เชื่อว่า โกวาทซ์ประสงคให้คำนวณเศษส่วนออกมาไม่น้อยกว่า 2 ตำแหน่ง

การพิจารณาดัชนีคงค้างในสมการ (Eq 19) ชากจะบอกได้ว่า ดัชนีคงค้างนี้จะแปรเปลี่ยนไปตามสภาวะการทดลองหรือไม่อย่างไร ค่า log (เวลาคงค้างปรับแก้) แต่ละเทอมนั้น ได้กล่าวไว้ตอนต้นแล้วว่า แปรตามอัตราการไหลของแก๊สตัวพา และอุณหภูมิอย่างมาก แต่เมื่อจับมารวมกันค่าต่างๆ เหล่านี้จะหักลบกันพอดี ดังนั้น ดัชนีคงค้างนี้จึงแปรตามสภาวะการทำโครมาโตกราฟีน้อยมาก หรือมีค่าค่อนข้างคงที่ ดังจะเห็นได้จากสมการข้างล่างนี้

แทนค่า สมการ (Eq 13) ลงในสมการ (Eq 19)

$$I = 100n + 100 \frac{(\log t_m + \log K_x - \log \beta) - (\log t_m + \log K_n - \log \beta)}{(\log t_m + \log K_{(n+1)} - \log \beta) - (\log t_m + \log K_n - \log \beta)} \quad \text{Eq 25}$$

$$I = 100n + 100 \frac{\log K_x - \log K_n}{\log K_{(n+1)} - \log K_n} \quad \text{Eq 26}$$

หรือ
$$I = 100n + 100 \frac{\log (K_x / K_n)}{\log (K_{(n+1)} / K_n)} \quad \text{Eq 27}$$

สมการ (Eq 27) นี้โยงสัมพันธ์ระหว่างค่าดัชนีคงค้างกับดัชนีสัมพัทธ์ แต่จะต่างจากดัชนีสัมพัทธ์ในสมการ (Eq 15) เล็กน้อย คือ ใช้สารพาราฟินที่มีจำนวนคาร์บอนต่างๆ กันเป็นตัวเปรียบเทียบ อุณหภูมิของคอลัมน์และวัฏภาคหนึ่ง ซึ่งมีผลต่อสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสาร และทำให้ค่าดัชนีคงค้างนี้แปรเปลี่ยนไปเล็กน้อยที่อุณหภูมิต่างๆ กัน และตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น หากสารตัวอย่างเป็นแอลเคน ซึ่งเป็นสารในอนุกรมฟังก์ชันเดียวกันกับสารอ้างอิง (นอร์มัลพาราฟิน) ผลของอุณหภูมิจะหักล้างกัน และค่าดัชนีคงค้างนี้ค่อนข้างคงที่ แต่หากเป็นสารต่างอนุกรมฟังก์ชันกัน ค่านี้อาจเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตามหมู่ฟังก์ชัน แม้ดัชนีคงค้างนี้จะใช้กันเป็นเครื่องมือช่วยวิเคราะห์เอกลักษณ์สารอินทรีย์ทั่วไปได้กว้างขวางมาก ปัจจุบันมีการรวบรวมค่านี้ไว้อ้างอิงทั้งที่เป็นหนังสือ⁽⁹⁾ จำหน่าย ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารทำได้ง่ายขึ้น ดัชนีคงค้างนี้จะมีข้อเสียเช่นกัน คือ หากสารตัวอย่างไม่ใช่สารแอลเคน บางครั้งชากที่จะโยงสัมพันธ์ระหว่างค่าของมันกัน โครงสร้างสารอินทรีย์ และถ้าสารตัวอย่างมีความเป็นขั้วสูง โครงสร้างใหญ่ นอร์มัลพาราฟินที่ใช้อ้างอิงจะต้องมีขนาดใหญ่มากขึ้น ซึ่งหาได้ค่อนข้างยากหรือมีราคาแพง ด้วยเหตุดังกล่าว จึงมีการใช้สารอนุกรมฟังก์ชันเดียวกันกับสารตัวอย่างเป็นสารอ้างอิง เช่น กรดไขมัน เมทิลเอสเทอร์ คีโตน แอลกอฮอล์ หรือสเตอรอยด์ และมีชื่อเรียกต่างกันไป

5. การใช้ค่าความยาวคาร์บอนเทียบเท่า (Equivalent chain length, ECL)^(10, 11)

วิธีนี้เป็นวิธีที่เรียนแบบจากดัชนีคงค้างที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น โดยใช้กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์เป็นสารอ้างอิงแทนสารนอร์อัลฟาพีน สูตรที่ใช้ในการคำนวณคล้ายคลึงกัน คือ

$$ECL = n + \frac{\log t_{R(x)} - \log t_{R(n)}}{\log t_{R(n+1)} - \log t_{R(n)}} \quad \text{Eq 28}$$

หรือ

$$ECL = n + 2 \cdot \frac{\log t_{R(x)} - \log t_{R(n)}}{\log t_{R(n+2)} - \log t_{R(n)}} \quad \text{Eq 29}$$

ค่าที่คำนวณได้นั้นไม่ถูกต้องด้วย 100 และเป็นจำนวนคาร์บอนของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ตัวอย่าง หากสารอ้างอิงที่ใช้เป็นกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนคู่ทั้งสองตัว โดยมีจำนวนคาร์บอนต่างกัน 2 อะตอม (n และ n+2) ซึ่งเป็นสารที่พบทั่วไปในธรรมชาติ เศษส่วนทางขวามือจะคูณด้วย 2

และแทนค่าสมการ (Eq 13) ลงในสมการ (Eq 28) และ สมการ (Eq 29) จะได้สมการ (Eq 30) และ สมการ (Eq 31) ในรูปของค่า K คล้ายสมการ (Eq 27) คือ

$$ECL = n + \frac{\log (K_x / K_n)}{\log (K_{(n+1)} / K_n)} \quad \text{Eq 30}$$

$$ECL = n + 2 \cdot \frac{\log (K_x / K_n)}{\log (K_{(n+2)} / K_n)} \quad \text{Eq 31}$$

เนื่องจากกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์มีไม่มากพอที่จะรวบรวมเป็นรูปเล่มของหนังสือ หรือเป็นแผ่น CD แต่จะพบเห็นได้ทั่วไปในบางบทของหนังสือเกี่ยวกับกรดไขมัน หรือในบทความปริทัศน์ ค่า ECL ของกรดไขมันบางตัวที่พบเห็นในธรรมชาติบ่อยๆ (บนคอลัมน์ คาร์โบแว็กซ์ 20 เอ็มและคอลัมน์ไซลาร์ 10 ซี) ได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

เมื่อพิจารณาค่า ECL ของกรดไขมัน ไม่อิมตัวที่มีจำนวนคาร์บอนต่างกันแต่มีพันธะคู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกัน เช่น 16:1Δ9, 18:1Δ9, 20:1Δ11 ซึ่งมีค่า ECL บนคอลัมน์คาร์โบแว็กซ์เป็น 16.18, 18.18 และ 20.14 ตามลำดับ นั่นคือพันธะคู่ที่ปรากฏบนตำแหน่งคาร์บอนใกล้เคียงกันในโซ่คาร์บอนจะเพิ่มค่า ECL แก่กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใกล้เคียงกัน กรณีตัวอย่างที่ยกมาให้เห็นนี้เพิ่มค่าให้ประมาณ 0.18 หน่วยจากจำนวนคาร์บอนหลัก

ตารางที่ 1 ค่า ECL ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์บนคอเลสเตอรอล คาร์โบแวกซ์ 20 เอ็ม และคอเลสเตอรอล 10 ซี⁽¹²⁾

เมทิลเอสเทอร์	ECL	
	คาร์โบแวกซ์ 20 เอ็ม	ไซลาร์ 10 ซี
16:0	16.00	16.00
16:1Δ9	16.18	17.08
18:0	18.00	18.00
18:1Δ9	18.18	19.00
18:2Δ9,12	18.58	20.07
18:3Δ6,9,12	18.85	21.10
18:3Δ9,12,15	19.18	21.28
18:4Δ6,9,12,15	19.45	22.12
20:0	20.00	20.00
20:1Δ11	20.14	20.90
20:2Δ11,14	20.56	-
20:3Δ5,8,11	20.66	22.22
20:3Δ8,11,14	20.78	22.72
20:3Δ11,14,17	20.95	23.10
20:4Δ8,11,14,17	21.37	24.13
20:5Δ5,8,11,14,17	21.55	24.77
22:0	22.00	22.00
22:1Δ13	22.14	22.8
22:4Δ7,10,13,16	22.90	25.70
22:5Δ4,7,10,13,16	23.15	25.96
22:5Δ7,10,13,16,19	23.50	26.83
22:6Δ4,7,10,13,16,19	23.74	27.40
24:0	24.00	24.00

หมายเหตุ : ตัวเลขข้างหน้าหมายถึงจำนวนคาร์บอน ตัวเลขที่ตามหลัง : คือจำนวนพันธะคู่ และตัวเลขตามหลัง Δ คือตำแหน่งในโซ่คาร์บอน

กรดไขมันในธรรมชาติมีความหลากหลายและซับซ้อน การวิเคราะห์เอกลักษณ์ด้วยค่า ECL จะช่วยลดจำนวนกรดไขมันอ้างอิงลงอย่างมาก อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์เอกลักษณ์กรดไขมันอาจจะต้องใช้คอลัมน์ที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันออกไป ค่า ECL ของกรดไขมันต่างๆ ในแต่ละคอลัมน์ก็จะเปลี่ยนไป และต้องหาค่าใหม่ เจมีสันและเรด (Jamieson and Reid)⁽¹³⁾ ได้ศึกษาค่า ECL ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเม

ทิลเอสเทอร์ที่มีพันธะคู่หลายคู่ด้วยคอลิมน์ต่างๆ และสรุปในรูปสมการ (Eq 32) ที่สะดวกต่อการนำไปใช้ คือ

$$ECL_x = a ECL_{18:3} + b \quad \text{Eq 32}$$

โดย $ECL_{18:3}$ = ECL ของเมทิลแอลฟาไลโนลิเนต ซึ่งจะบ่งชี้ถึงความมีขี้ของวัตถุดิบ

a และ b = ค่าคงที่และเปลี่ยนไปตาม ค่า $ECL_{18:3}$

ECL_x = ECL ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์

ค่าคงตัว a และ b ของกรดไขมันบางตัวได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2

สมการ (Eq 32) ของเจมีสันและเรดนี่จะช่วยให้การวิเคราะห์เอกลักษณ์กรดไขมันไม่อิ่มตัวพันธะคู่หลายพันธะง่ายขึ้นโดยใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัวเมทิลแอลฟาไลโนลิเนตอ้างอิงเพียงตัวเดียว การหาค่า ECL ของกรดไขมันอื่นๆ ทำได้ดังตัวอย่างคือ การวิเคราะห์กรดไขมันด้วยคอลิมน์คาร์โบแวกซ์ 20 เอ็มได้ค่า ECL เท่ากับ 19.18 (ค่าในตารางที่ 1) เมื่อแทนค่าลงในสมการ (Eq 32) จะได้

ตารางที่ 2 ค่าคงตัว a และ b ของกรดไขมันบางตัว [$ECL_x = a ECL_{18:3} + b$]⁽¹³⁾

เมทิลเอสเทอร์	a	b
18:3 ω6	0.907	1.480
18:4 ω3	1.258	-4.661
20:2ω9	0.658	7.690
20:2ω6	0.647	8.127
20:3ω9	0.910	3.080
20:3ω6	0.915	3.208
20:3ω3	0.986	2.189
20:4ω6	1.119	-0.509
20:4ω3	1.350	-4.606
20:5ω3	1.518	-7.602
22:4ω6	1.266	-1.448
22:5ω6	1.441	-4.600
22:5ω3	1.527	-5.843
22:6ω3	1.792	-10.726

$$ECL_x = 19.18a + b \quad \text{Eq 33}$$

นำค่า a และ b ของกรดไขมันต่างๆ ในตารางที่ 2 มาแทนค่าเช่น กรดไขมัน 20:4ω3 มีค่า

a = 1.350 และ b = -4.606

$$\therefore ECL_{20:4} = 19.18 \times 1.350 - 4.606$$

$$= 21.287$$

ECL ของกรดไขมัน 20:4 $\Delta^{4,11,14,17}$ (20:4 ω 3) ในตารางที่ 1 มีค่าเท่ากับ 21.37 ซึ่งคลาดเคลื่อนไป 0.083 หน่วย ถ้าเป็นกรดไขมัน 22:6 ω 3 ค่า $a = 1.729$ และ $b = -10.726$

$$ECL_{22:6} = 19.18 \times 1.729 - 10.726$$

$$= 23.64$$

ค่าที่ถูกต้องในตารางที่ 1 เท่ากับ 23.74 ซึ่งคลาดเคลื่อนไป 0.095 หน่วย

ในทำนองเดียวกัน ถ้าวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ไฮลาร์ 10 ซิ ซึ่งมีสภาพความเป็นขั้วสูงขึ้น กรดไขมัน 18:3 ω 3 มีค่า ECL เท่ากับ 21.27 เมื่อแทนค่าลงในสมการ (Eq 32) จะได้

$$ECL_x = 21.27a + b \quad \text{Eq 34}$$

ใส่ค่า a และ b ของกรดไขมัน 20:4 ω 3 และ 22:6 ω 3 จะได้

$$ECL_{20:4} = 20.27 \times 1.350 - 4.606$$

$$= 24.11$$

$$\text{คลาดเคลื่อน} = 24.13 - 24.11 = 0.02$$

$$ECL_{22:6} = 20.27 \times 1.792 - 10.726$$

$$= 27.39$$

$$\text{คลาดเคลื่อน} = 27.40 - 27.39 = 0.01$$

ค่าที่คำนวณได้ใกล้เคียงกับการทดลองในตารางที่ 1 แม้ตัวอย่างข้างต้นจะเป็นการเปรียบเทียบคอลัมน์ที่มีผู้รายงานไว้แล้วก็ตาม คาดว่าสมการ (Eq 32) นี้จะสามารถขยายผลไปยังคอลัมน์อื่นๆที่ยังไม่มีการรายงานได้

ในบางครั้งการทำโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิคงที่นั้นต้องใช้เวลานานกว่าสารตัวสุดท้ายจะถูกชะออกจากคอลัมน์ หากเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น กรดไขมันที่มีขนาดเล็กจะถูกชะออกเร็วเกินไปและแยกออกจากกันไม่ได้ดี การทำโครมาโตกราฟีจึงต้องทำแบบโปรแกรมอุณหภูมิ การทำโครมาโตกราฟีแบบโปรแกรมอุณหภูมินี้จะใช้การคำนวณค่า ECL ตามสมการ (Eq 29) ไม่ได้ ครุพติกและโบฮอฟ (Krupcik and Bohov)⁽¹⁴⁾ จึงสร้างสมการเพื่อคำนวณค่า ECL ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ แต่สมการค่อนข้างซับซ้อนและยุ่งยากประกอบกับค่าที่คำนวณได้ยังมีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่คำนวณได้ภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ คาดว่าการหาค่า ECL ที่สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิจะต้องใช้เวลาในการพัฒนาอีกระยะหนึ่งเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำขึ้น การหาค่า ECL จึงจะเป็นที่ยอมรับทั่วไป สมการของครุพติกและโบฮอฟนี้จึงไม่นำมาใช้ได้ ณ ที่นี้

6. การใช้สารอื่น

นอกเหนือจากสารนอร์มัลแอลเคนและกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์แล้ว ยังมีการใช้สารอื่นๆ เป็นสารอ้างอิง แต่ก็ไม่ใช่ที่นิยมทั่วไป เช่น ketone number⁽¹⁵⁾ steroid number⁽¹⁶⁾ เป็นต้น

7. การวิเคราะห์เอกลักษณ์โดยใช้คอลัมน์สองอันที่มีสภาพขั้วต่างกัน⁽¹⁷⁾

วิธีการนี้ต้องใช้คอลัมน์ 2 อัน การวิเคราะห์เอกลักษณ์อาจจะทำโดยใช้ค่าดัชนีคงค้าง หรือค่า ECL ก็ได้ ค่าที่ได้จะนำมาเทียบกับค่าอ้างอิงบนคอลัมน์นั้นๆ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความมั่นใจและความถูกต้องของการวิเคราะห์ได้อีกระดับหนึ่งเช่น ECL ของเมทิลโอเลิเควบนคอลัมน์ไฮลาร์ 10ซี (ตารางที่ 1) จะมีค่าเท่ากับ 19.00 กรณีเช่นนี้ หากการวิเคราะห์ใช้เพียงคอลัมน์เดียวอาจจะสรุปเป็นกรดไขมัน 19:0 ได้ แต่ถ้าวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์คาร์โบแว็กซ์ 20เอ็ม เมทิลโอเลิเควจะออกที่ค่า ECL เท่ากับ 18.16 ส่วนเมทิลโนนอะเดเคนโอเอต (methylnonadecanoate) จะออกที่ค่า ECL เท่ากับ 19.00 เหมือนเดิม อย่างไรก็ตาม แม้การใช้คอลัมน์สองอันจะเพิ่มความมั่นใจและความถูกต้องในการวิเคราะห์สูงขึ้น แต่ในทางปฏิบัตินั้นต้องเสียเวลาอย่างมาก อย่างน้อยต้องเพิ่มเวลาเป็นสองเท่า เว้นแต่จะมีการออกแบบเครื่องโครมาโตกราฟให้สามารถแยกสารตัวอย่างออกเป็นสองส่วน เข้าสู่คอลัมน์และเครื่องตรวจวัดสองอันพร้อมๆ กันก็จะประหยัดเวลาลงได้

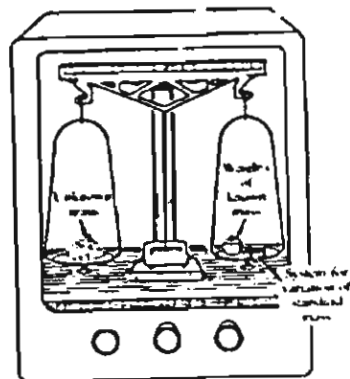
8. การวิเคราะห์โดยอาศัยค่าการตอบสนองสัมพัทธ์ของเครื่องตรวจวัด⁽¹⁸⁾

วิธีการนี้เครื่องโครมาโตกราฟจะต้องมีเครื่องตรวจวัดอย่างน้อย 2 ชนิดซึ่งอาจจะ คอแบบอนุกรม (สารที่ระเหยออกจากคอลัมน์จะผ่านเข้าไปยังเครื่องตรวจวัดที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ) หรือคอแบบขนาน (สารที่ระเหยออกจากคอลัมน์จะถูกแยกออกเป็นสองส่วนเพื่อผ่านเข้าไปยังเครื่องตรวจวัดสองชนิด) อัตราส่วนของการตอบสนองของสารจากเครื่องตรวจวัดสองตัวจะบ่งบอกคุณลักษณะของสาร และใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป เครื่องตรวจวัดที่เลือกจะต้องตอบสนองต่อสารตัวอย่างต่างกัน เช่นการเลือกใช้ FID และ ECD (Electron capture detector) กับสารจำพวกออร์แกโนเฮไลด์ (organohalide) หรือ FID กับ NPD (Nitrogen/phosphorus Detector) ในการวิเคราะห์สารในโครเจน เป็นต้น วิธีนี้ค่อนข้างจะยุ่งยาก อีกทั้งเมื่อเครื่องตรวจวัดใช้งานไประยะเวลาหนึ่ง ความไวตอบสนองของเครื่องตรวจวัดจะลดลง และลดลงตามสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ก่อให้เกิดความยุ่งยากมากขึ้น ดังนั้น การวิเคราะห์จะต้องทำการฉีดสารตัวอย่างและสารอ้างอิงเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟในเวลาไล่เรียงกัน เพื่อว่าความไวตอบสนองจะเปลี่ยนแปลงไม่มาก อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังคงมีความยุ่งยากและไม่เป็นที่นิยมใช้กัน

9. การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารโดยไม่ใช้สารอ้างอิง

วิธีการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารที่กล่าวมาข้างต้นนั้นมีความคล้ายคลึงกันส่วนหนึ่งคือ จะต้องใช้สารอ้างอิงฉีดเข้าไปในเวลาไล่เรียงกันกับสารตัวอย่างเพื่อช่วยให้การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารแม่นยำขึ้น วิธีการดังกล่าวนอกจากล่าช้าและเสียเวลาในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารมากขึ้นแล้ว ยังจะต้องมีสารอ้างอิงพร้อมอยู่เสมอ และหากจะเปรียบเทียบการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารกับการชั่งสารแล้ว การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารใน ข้อที่ 1 และ 3 อาจจะเทียบได้กับการชั่งสารด้วยเครื่องชั่งแบบ 2 จานหรือ 2 แขน (Double beam balance) ดังรูปที่ 6 คือ การชั่งน้ำหนักจะวางวัตถุลงบนจานข้างหนึ่งและค่อยๆ ใส่น้ำหนักลงบนจานอีกข้างหนึ่งจนกระทั่งเข็มของเครื่องชั่งชี้ตรงจุดศูนย์พอดี น้ำหนักของวัตถุที่ชั่ง

จะเท่ากับค้อนน้ำหนักบนจานอีกข้างหนึ่ง วิธีการนี้ให้ผลแม่นยำ แต่การชั่งจะใช้เวลานาน เครื่องชั่งชนิดนี้จึงพบเห็นในห้องปฏิบัติการต่างๆ น้อยลง



รูปที่ 6 เครื่องชั่ง 2 จาน

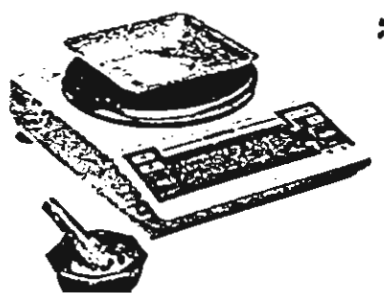
การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารใน ข้อที่ 2 และ 4 อาจจะทำได้กับการชั่งสารด้วยเครื่องชั่งจานเดียว (single pan balance) ในรูปที่ 7 เครื่องชั่งนี้อาจจะมีแขนเดียว (single beam) สอง (double beam) หรือสามแขน (triple beam) และมีค้อนน้ำหนักอ้างอิงเพียง 1-3 ค้อนเลื่อนไปมา การชั่งหาน้ำหนักจึงทำได้สะดวกและรวดเร็วกว่าเครื่องชั่งแบบ 2 จานที่กล่าวมาข้างต้น



รูปที่ 7 เครื่องชั่งแขนเดียว

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารได้พัฒนามาเพียงจุดนี้ ซึ่งให้ความสะดวกในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารได้ระดับหนึ่ง แต่หากเราจะมองหรือเปรียบเทียบการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารกับการชั่งสารดังที่กล่าวมาแล้ว จะพบว่า ในการชั่งสารนั้น ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องชั่งแบบไม่มีแขน (top loading balance, ดังรูปที่ 8) เครื่องชั่งนี้ สามารถชั่งสารได้สะดวกและรวดเร็วกว่าเครื่องชั่งสองแบบแรกมาก และการชั่งสารจะไม่มีค้อนน้ำหนักอ้างอิงขณะใช้งาน แต่ค้อนน้ำหนักอ้างอิงจะใช้สอบเทียบเครื่องชั่งมาจากโรงงาน ในกรณีเครื่องชั่งเป็นแบบเครื่องชั่งแรงกล (mechanical) ภายในเครื่องชั่งจะมีขดลวดสปริงเป็นตัวรับน้ำหนัก เมื่อค้อนน้ำหนักกดลงบนจาน สปริงนี้จะยืดออกตามน้ำหนัก สปริงนี้จะต่อกับแขนกลซึ่งจะหมุน เข็มของหน้าปัทม์และเขียนเป็นสเกล (Scale) น้ำหนักให้ผู้ใช้อ่านค่าได้โดยตรง ผู้ใช้จะใช้ชั่งหาน้ำหนัก

วัดได้โดยไม่ต้องตึงคัมน้ำหนักอ้างอิงอีกต่อไป (แต่ผู้ใช้อาจจะมีคัมน้ำหนักนี้ไว้เพื่อสอบเทียบความคลาดเคลื่อนเมื่อใช้งานไประยะหนึ่ง) ทำให้การชั่งน้ำหนักทำได้สะดวกและรวดเร็ว



รูปที่ 8 เครื่องชั่งไม่มีแขน (Top loading)

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในการศึกษานี้ ได้พยายามที่จะพัฒนา ไปถึงจุดที่ไม่ต้องใช้สารอ้างอิงในขณะใช้งาน ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารทำได้ความสะดวกและรวดเร็ว การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารดังกล่าวนี้ สามารถทำได้โดยนำสมการทางอุณหพลศาสตร์มาช่วยในการทำนายการเคลื่อนที่สารในแก๊สโครมาโตกราฟี ในปี ค. ศ. 1997 Krisnangkura *et al* ⁽¹⁹⁾ ได้ใช้สมการนี้ในการทำนายค่าเวลาคงค้างของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนต่างๆ กัน ตามสมการ (Eq 35)

$$\ln \frac{(t_r - t_m)}{t_m} = a + bn + \frac{c}{T} + d \frac{n}{T} \quad \text{Eq 35}$$

โดย t_r และ t_m เป็นค่าเวลาของสารตัวอย่างและตัวทำละลายตามลำดับ และ a, b, c, d เป็นค่าคงที่สำหรับสารแต่ละกลุ่มบนคอลัมน์แต่ละชนิด และยังชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสมการดังกล่าวในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารโดยไม่ต้องใช้สารอ้างอิงได้อีกด้วย สำหรับกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์บน

Omegawax ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร a, b, c และ d มีค่า ดังสมการ (Eq 36)

$$\ln \frac{(t_r - t_m)}{t_m} = -8.296 - 0.493n + \frac{1530}{T} + 388 \frac{n}{T} \quad \text{Eq 36}$$

การคำนวณหาค่า $\log(\text{retention factor})$ ของกรดไขมันอิ่มตัวเมทิลเอสเทอร์ที่มีจำนวนคาร์บอนต่างๆ ด้วยสมการ (Eq 36) นี้ให้ค่าใกล้เคียงกับการทดลองอย่างมากและคาดว่าจะสามารถใช้แทนสารอ้างอิงได้

ทฤษฎี

การเคลื่อนที่ของสารในแก๊สโครมาโตกราฟีนั้นสามารถวิเคราะห์ในเทอมของอุณหพลศาสตร์ (thermodynamics) (Guillaume and Guinchart, 1994) ⁽¹⁹⁾ ดังสมการ (Eq 37) คือ

$$\ln k' = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} + \ln \beta \quad \text{Eq 37}$$

หรือ

$$\ln k' = -\frac{\Delta \mu^\circ}{RT} + \ln \beta \quad \text{Eq 38}$$

โดย k' เป็นอัตราส่วนคงค้าง (retention factor) ของสารมีค่าเท่ากับ

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \quad \text{Eq 39}$$

และ t_r เป็นค่าเวลาคงค้างของสารตัวอย่าง t_m เป็นค่าเวลาคงค้างของสารไม่คงค้าง (unretained compound) R เป็นค่าคงตัวของแก๊ส T เป็นอุณหภูมิเคลวิน (Kelvin) และ β ปริมาตรวัฏภาคนิ่ง (stationary phase)/ ปริมาตรวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ΔG° หรือ $\Delta\mu^\circ$ เป็นพลังงานกิบส์เชิงโมลาร์หรือความต่างศักย์เคมีมาตรฐาน (partial molar Gibbs energy or standard chemical potential difference) ของสารและมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับผลต่างของ ΔH° (โมลาร์เอนทัลปีมาตรฐาน: standard molar enthalpy) และ ΔS° (โมลาร์เอนโทรปีมาตรฐาน: standard molar entropy) คือ

$$\Delta\mu^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad \text{Eq 40}$$

สำหรับสารนอร์มัลแอลเคนที่มีจำนวนคาร์บอน n ความสัมพันธ์ของค่าความต่างศักย์เคมีสามารถเขียนได้เป็น

$$\Delta\mu_n^\circ = \Delta\mu^\circ + n\delta\mu \quad \text{Eq 41}$$

$\Delta\mu_n^\circ$ เป็นความต่างศักย์เคมีมาตรฐานของสารตัวอย่างที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น n $\Delta\mu^\circ$ เป็นความต่างศักย์เคมีมาตรฐานของสารตัวอย่างที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น 0 และ $\delta\mu$ เป็นศักย์เคมีที่เปลี่ยนไปต่อหนึ่งหน่วยเมทิลีน (one methylene unit) เมื่อแทนค่าสมการ (Eq 37) ลงในสมการ [Eq 41] จะได้

$$\Delta\mu_n^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ + n\delta H - nT\delta S$$

$$\text{หรือ} \quad \Delta\mu_n^\circ = (\Delta H^\circ + n\delta H) - (T\Delta S^\circ + nT\delta S) \quad \text{Eq 42}$$

แทนค่าสมการ (Eq 42) ลงในสมการ (Eq 38) จะได้

$$\ln k' = -\frac{(\Delta H^\circ + n\delta H) - (T\Delta S^\circ + nT\delta S)}{RT} + \ln \beta \quad \text{Eq 43}$$

$$\text{หรือ} \quad \ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} - \frac{n\delta H}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \frac{n\delta S}{R} + \ln \beta \quad \text{Eq 44}$$

$$\text{หรือ} \quad \ln k' = a + bn + \frac{c}{T} + d\frac{n}{T} \quad \text{Eq 35}$$

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

หากการวิเคราะห์กระทำที่อุณหภูมิคงที่ สมการ (Eq 35) จะลดรูปเป็น

$$\ln k' = a' + b'n \quad \text{Eq 45}$$

$$\text{โดย} \quad a' = a + \frac{c}{T} \quad \text{Eq 46}$$

$$\text{และ} \quad b' = b + \frac{d}{T} \quad \text{Eq 47}$$

สมการ (Eq 45) นี้ก็คือสมการของ James and Martin⁽⁴⁾ ซึ่ง Kovats⁽⁸⁾ ได้นำไปใช้เป็นฐานของการคำนวณ Kovats' indices และ Miwa และ คณะ⁽¹⁰⁾ ได้ใช้เป็นฐานของการคำนวณค่า Equivalent Chain Length ที่ใช้กันแพร่หลายในขณะนี้

ในทำนองเดียวกัน หากการวิเคราะห์กระทำที่ค่า n คงที่ สมการ (Eq 35) จะลดรูปเป็น

$$\ln k' = a'' + \frac{b''}{T} \quad \text{Eq 48}$$

โดย $a'' = a + bn$ Eq 49

และ $b'' = c + dn$ Eq 50

สมการ (Eq 48) นี้ก็คือสมการของ van't Hoff⁽²⁰⁾ ที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของค่า อุณหพลศาสตร์ต่างๆ ดังนั้นสมการ (Eq 35) นี้ จึงเป็นการรวมสมการของ James and Martin และ van't Hoff เข้าด้วยกัน ขอบข่ายการใช้งานจึงน่าจะกว้างมากขึ้น

ในปี ค.ศ. 1995 Calvalli and Guinchart⁽²¹⁾ ได้ใช้วิธีการแบ่งพิจารณาคอลัมน์เป็นส่วนมาใช้ในการทำนายเวลาคงค้างสารในสภาวะ TPGC โดยเริ่มจากสมการ van't Hoff เป็น

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\frac{b'' + a''}{T(t_{i-1})}} \right) \quad \text{Eq 51}$$

โดย m = จำนวนส่วนคอลัมน์ที่แบ่ง $T(t_{i-1})$ เป็นอุณหภูมิในแต่ละส่วนคอลัมน์
เมื่อนำสมการ Eq 35 และ Eq 51 มารวมกันจะได้เป็น Eq 52

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\left(\frac{a + bn + \frac{c}{T(t_{i-1})} + \frac{dn}{T(t_{i-1})}}{T(t_{i-1})} \right)} \right) \quad \text{Eq 52}$$

สมการ Eq 52 จะเป็นสมการที่ใช้ในการคำนวณค่าเวลาคงค้างสารในอนุกรมฟังก์ชันเดียวกันทั้งอนุกรมในสภาวะ TPGC

วัสดุอุปกรณ์วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

แก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph) model 14A บริษัท Shimadzu จำกัด ตัวตรวจวัดแบบ Flame Ionization Detector (FID) เครื่องประมวลผลและบันทึกผล C-R4A Chromatopac

คอลัมน์ คอลัมน์ที่ใช้ในการทดลองเป็นคอลัมน์ประเภท fused silica capillary column เคลือบด้วย

1. โอเมกาวกซ์ (OMEGAWAX) วัสดุชนิดหนึ่ง poly(ethylene glycol) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกัน 3 ขนาด ดังนี้คือ เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร (บริษัท Supelco Bellefonte, PA)
2. OV-101 เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ความยาว 15 เมตร (บริษัท Supelco Bellefonte, PA)
3. 5% phenyl (equivalent) polycarborane-siloxane (HT-5) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.2 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร ภาชนะนอกเคลือบด้วยโลหะอะลูมิเนียม (บริษัท SGE International Pty Ltd Victoria Australia)
4. 5% phenyl (equivalent) polycarborane-siloxane (HT-5) เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.2 ไมโครเมตร ความยาว 30 เมตร เมตร ภาชนะนอกเคลือบด้วย polyimide resin (บริษัท SGE International Pty Ltd Victoria Australia)

วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างประเภทเมทิลเอสเทอร์และลิปิดอื่นๆ

สารตัวอย่างประเภทลิปิด ได้แก่ กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่ซื้อโดยตรงจากบริษัทในรูปแบบของเมทิลเอสเทอร์ ไขมันแอลกอฮอล์ ตะไฮโดรคาร์บอน เตรียมโดยการชั่งสารตัวอย่างมาประมาณ 1 - 5 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (vial) เดิมเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าจนกระทั่งสารตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกับตัวทำละลาย ในกรณีที่สารตัวอย่างมีความยาวของสายคาร์บอนยาวมากจะละลายในตัวทำละลายได้เพียงเล็กน้อยต้องนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

สารตัวอย่างประเภทกรดไขมันอิสระ

สารตัวอย่างประเภทกรดไขมันอิสระ และกรด (free fatty acids) เปลี่ยนให้อยู่ในรูปแบบของเมทิลเอสเทอร์โดยใช้วิธีเมทิลเลชัน (methylation) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Kalayasiri et al⁽²²⁾ มีขั้นตอนดังนี้

- ก. ชั่งสารตัวอย่างมาประมาณ 5-10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง จุกเกลียว (screw cap tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร เดิมโทลูอีน 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้ เข้ากัน
- ข. เติม methanolic HCl (4% ใน CH₃OH) 1 มิลลิลิตร
- ค. ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ค้างทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- ง. เติมสารละลาย Na₂CO₃ (4% ใน H₂O) 1 มิลลิลิตร

จ. เดิมเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วใช้ พาสเตอร์ปิเปตดูดสารละลายชั้นบนใส่ใน vial ขนาด 1 dram แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง เดิมผง Na_2SO_4 (anhydrous) เพื่อดูดน้ำที่ติดปนอยู่ เขย่าแล้วทิ้งไว้สักครู่ จนกระทั่งสารละลายใสรินสารละลายใส่ vial อันใหม่แล้วนำไปทำให้แห้งภายใต้ แก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นเดิมเฮกเซนเพื่อปรับ ปริมาตรให้เหมาะสม (ปริมาตร 1-2 มิลลิลิตร)

สารตัวอย่างเมล็ดพืช

การทำปฏิกิริยาทรานสมิเทชันในเมล็ดพืชให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ทำได้โดยวิธีการ transmethylation โดยตรงในเนื้อเชื้อ (in situ) โดยวิธีของ Kalayasiri *et al*⁽²²⁾ คล้ายกับข้างต้น เมล็ดพืช นำมาอบแห้ง ที่ 105°C 1 คืน แกะส่วนที่เป็นเปลือกแข็งทิ้งไป ส่วนเนื้อนำบดในโถรงบดยาจนละเอียด ชั่งมาประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดจุกเกลียว (screw cap tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร เดิมโทลูอิน 1 มิลลิลิตร เดิมสารเคมีหมุ่เมทิล (methylating agent) เพื่อเร่งปฏิกิริยาโดยใช้ HCl (4% ใน CH_3OH) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เปิด - จุกแล้วรินส่วนที่ใสใส่หลอดใหม่ขนาดเท่ากัน ทำให้สารละลายเป็นกลางโดยเติม Na_2CO_3 (4% ใน H_2O) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เดิมเฮกเซนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ให้แยกชั้น แล้วใช้พาสเตอร์ปิเปตดูดชั้นเฮกเซน (ชั้นบน) ซึ่งมีเมทิลเอสเทอร์ละลายอยู่ใส่ใน vial แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เดิม Na_2SO_4 (anhydrous) ลงไปเล็กน้อยเพื่อดูดน้ำ โดยเดิมแล้วเขย่าทิ้งไว้สักครู่ จนกระทั่งสารละลายใสใช้ พาสเตอร์ปิเปตดูดสารละลายใส่ vial แล้วนำไปทำให้แห้งภายใต้ แก๊สไนโตรเจน หลังจากนั้นเดิมเฮกเซน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารตัวอย่างผสมด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี

ค่าของสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

แก๊สตัวพา (carrier gas) แก๊สไนโตรเจน

ความดันเกจ - แก๊สไนโตรเจน 0.75-1.75 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

- แก๊สไฮโดรเจน 0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

- อากาศ 0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

อุณหภูมิ - อินเจกเตอร์ (injector port) 230 องศาเซลเซียส

- ตัวตรวจวัด (detector) 230 องศาเซลเซียส

- เตาอบ (oven) ใช้แบบอุณหภูมิคงที่ (isothermal)

ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป 0.2-0.4 ไมโครลิตร

การหาค่าคงตัวคอธมัน

ค่าคงตัวคอธมันสำหรับสารอนุกรมฟังก์ชันเดียวกัน (homologous series) หาตามวิธีของ Krisnangkura *et al*⁽¹⁹⁾ ได้โดยการนิยามสารตัวอย่างอนุกรมฟังก์ชันนั้นเข้าไปในคอลัมน์ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน จำนวนสารตัวอย่าง และอุณหภูมิซึ่งมากจะให้ผลดีเชิงสถิติ แต่ในทางปฏิบัตินั้นจะมีขอบเขตจำกัด ศึกษา นี้เลือกสารนอร์มัลพาราฟิน C15-C20 และอุณหภูมิ 140-170 โดยเพิ่มครั้งละ 5 °ซ นำค่าเวลาคงค้างที่ได้ มาใส่ลงใน Microsoft Excel (version 8.0) Spread sheet ที่ 1

Spreadsheet 1 เวลาคงค้างของสารนอร์มัลพาราฟิน C15-C20 ที่อุณหภูมิ 170-200 °C (เซลล์ B5-H10) และเวลาคงค้างของเฮกเซนที่อุณหภูมิ 140-170 (เซลล์ B3-H3) °C

Microsoft Excel - Book1.xls								
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help								
H14								
	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2	อุณหภูมิ C	140	145	150	155	160	165	170
3	เวลาคงค้าง(เฮกเซน)	0.844	0.845	0.846	0.846	0.847	0.848	0.849
4	จำนวนคาร์บอน, n	เวลาคงค้าง สารตัวอย่าง (นาท)						
5	15	5.605	4.705	4.070	3.545	3.115	2.758	2.466
6	16	8.717	7.158	6.067	5.168	4.440	3.844	3.362
7	17	13.902	11.201	9.301	7.768	6.533	5.541	4.742
8	18	22.524	17.851	14.565	11.922	9.844	8.194	6.876
9	19	36.696	28.660	22.994	18.496	15.000	12.300	10.142
10	20	59.895	46.112	36.461	28.862	23.088	18.629	15.107
11								

ที่อุณหภูมิคงที่ สมการ (Eq 35) จะลดรูปลงเป็น

$$\ln \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) = a' + b'n \quad \text{Eq 53}$$

โดย $a' = a + \frac{c}{T}$ Eq 46

และ $b' = b + \frac{d}{T}$ Eq 47

เปลี่ยนค่าเวลาคงค้างในตารางให้อยู่ในรูป natural log (ตัวประกอบคงค้าง) โดยใช้เวลาคงค้างเฮกเซนเป็นค่า จะได้ค่าในเซลล์ B16-H21 ของ Spreadsheet ที่ 2

Spreadsheet 2 แสดงค่าตัวประกอบคงค้างของนอร์มัลพาราฟินที่อุณหภูมิ 140-170 °C (เซลล์ B16-H21)

Microsoft Excel - Book1.xls												
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help												
B16 =LN(B5-B13/B13)												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
12												
13												
14	อุณหภูมิ (C)	140	145	150	155	160	165	170				
15	n	Natural log (retention factor)										
16	15	1.730	1.519	1.338	1.160	0.985	0.812	0.644				
17	16	2.233	2.011	1.820	1.631	1.445	1.262	1.085				
18	17	2.739	2.508	2.302	2.102	1.904	1.711	1.523				
19	18	3.248	3.002	2.786	2.572	2.363	2.159	1.960				
20	19	3.749	3.494	3.265	3.038	2.818	2.603	2.393				
21	20	4.248	3.981	3.740	3.500	3.268	3.043	2.821				
22												
23												
24												

- เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $\ln k'$ (อยู่บนแกน Y) กับจำนวนคาร์บอน (อยู่บนแกน X) ตาม Eq 45 จะได้จุดตัดแกน y คือ a' และความชันของเส้นกราฟ คือ b' และที่อุณหภูมิ 140 °C ให้ค่า a' (intercept) เท่ากับ -5.832 และความชัน (slope) เท่ากับ 0.504 ดังเซลล์ B22 และ B23 ของ spreadsheet ที่ 3 ตามลำดับ ส่วนจุดตัดแกน Y และความชันเส้นกราฟที่อุณหภูมิอื่นๆ ได้แสดงไว้ใน เซลล์ C22 – H23

Spreadsheet 3 แสดงการหาค่า a' และ b' ที่คำนวณได้ตามสมการ Eq 45

Microsoft Excel - Book1.xls												
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help												
B22 =INTERCEPT(B16:B21,B4:B21)												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
12												
13	อุณหภูมิ (C)	140	145	150	155	160	165	170				
14	1000/T	2.420	2.391	2.363	2.338	2.309	2.282	2.257				
15	n	Natural log (retention factor)										
16	15	1.730	1.519	1.338	1.160	0.985	0.812	0.644				
17	16	2.233	2.011	1.820	1.631	1.445	1.262	1.085				
18	17	2.739	2.508	2.302	2.102	1.904	1.711	1.523				
19	18	3.248	3.002	2.786	2.572	2.363	2.159	1.960				
20	19	3.749	3.494	3.265	3.038	2.818	2.603	2.393				
21	20	4.248	3.981	3.740	3.500	3.268	3.043	2.821				
22	Intercept	-5.832	-5.875	-5.873	-5.862	-5.863	-5.881	-5.885				
23	Slope	0.504	0.493	0.481	0.468	0.457	0.448	0.438				
24												

เมื่อเขียนกราฟระหว่างจุดตัดแกน Y (a') และความชัน (b') อยู่บนแกน Y กับ 1/อุณหภูมิสัมบูรณ์ อยู่บนแกน X ตามสมการ Eq 46 และ Eq 47 จะได้ค่าคงตัว a, b, c และ d ของคอลัมน์สำหรับสารนอร์มัล พาราฟิน ซึ่งมีค่าเท่ากับ -0.637, -0.517, 214.43 และ 421.91 ตามลำดับ

Spreadsheet 4 แสดงการหาค่า a, b, c และ d ตาม Eq 46 และ Eq 47

Microsoft Excel - Book1.xls												
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help												
J22 = -INTERCEPT(B22:H22,I22:I24,B45:I4)												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
12												
13	อุณหภูมิ (C)	140	145	150	155	160	165	170				
14	1000/T	2.420	2.391	2.363	2.338	2.309	2.282	2.257				
15	n	Natural log (retention factor)										
16	15	1.730	1.519	1.338	1.160	0.985	0.812	0.644				
17	16	2.233	2.011	1.820	1.631	1.445	1.262	1.085				
18	17	2.739	2.506	2.302	2.102	1.904	1.711	1.523				
19	18	3.248	3.002	2.798	2.572	2.363	2.159	1.960				
20	19	3.749	3.494	3.265	3.038	2.816	2.603	2.393				
21	20	4.248	3.981	3.740	3.500	3.268	3.043	2.821				
22	Intercept	-5.832	-5.875	-5.873	-5.862	-5.863	-5.881	-5.885	(a)	-5.370	215.135	(c)
23	Slope	0.504	0.493	0.481	0.488	0.457	0.446	0.436	(b)	-0.517	422.243	(d)
24												

ในทำนองเดียวกัน หากกำหนดให้จำนวนคาร์บอนคงที่ สมการ (Eq 35) จะลดรูปลงเป็น

$$\ln \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) = a'' + \frac{b''}{T} \quad \text{Eq 48}$$

โดย $a'' = a + bn$ Eq 49

และ $b'' = c + dn$ Eq 50

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural log(ตัวประกอบคงค้าง) อยู่บนแกน Y กับ 1/อุณหภูมิสัมบูรณ์ ตามสมการ Eq 48 จะให้จุดตัดแกน Y เท่ากับ a'' และความชันเส้นกราฟเท่ากับ b'' ดังแสดงใน spreadsheet ที่ 5 a'' และ b'' นี้สามารถหาได้บน Microsoft Excel spread sheet เดียวกัน spreadsheet ที่ 2 ให้ค่า a'' เท่ากับ -14.195 และ b'' เท่ากับ 6.575 สำหรับนอร์มัลเดคาเพนเทน (n-decapentane) ส่วนค่า a'' และ b'' ของสารแอลเคนอื่นๆนั้นได้แสดงไว้ในตารางเดียวกัน (เชล I17-J23)

Spreadsheet 5 แสดงการหาค่า a" และ b"

Microsoft Excel - Book1.xls										
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help										
=INTERCEPT(B16:H16,I16:I14)										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
12										
13	อุณหภูมิ (C)	140	145	150	155	160	165	170		
14	1000/T	2.420	2.391	2.363	2.336	2.309	2.282	2.257		
15	n	Natural log (retention factor)							Intercept (a')	Slope (b')
16	15	1.730	1.519	1.338	1.160	0.985	0.812	0.644	-14.195	8.575
17	16	2.233	2.011	1.820	1.631	1.445	1.262	1.085	-14.818	8.957
18	17	2.739	2.508	2.302	2.102	1.904	1.711	1.523	-15.120	7.374
19	18	3.246	3.002	2.786	2.572	2.363	2.159	1.960	-15.660	7.807
20	19	3.749	3.494	3.265	3.038	2.816	2.603	2.393	-16.208	8.241
21	20	4.248	3.981	3.740	3.500	3.268	3.043	2.821	-16.753	8.673
22										
23										
24										

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง a" และ b" กับ จำนวนคาร์บอนตามสมการ Eq 49 และ Eq 50 โดยให้ a" และ b" อยู่บนแกน Y และจำนวนคาร์บอนอยู่บนแกน X จะได้ค่าคงตัวคอรัลัมน์ a, b, c และ d ดัง spreadsheet ที่ 6 ซึ่งเป็นค่าเดียวกันกับค่าที่หาได้จากการเขียนกราฟระหว่าง natural log (ตัวประกอบคง) กับจำนวนคาร์บอนก่อนแล้วความด้วย 1/อุณหภูมิสัมบูรณ์ หากค่า a, b, c และ d ที่หาได้จาก 2 วิธีมีค่าไม่ตรงกัน การทดลองควรจะเริ่มต้นโดยการฉีดสารเข้าไปคอลัมน์ใหม่หมด จนกว่าจะให้ค่าเดียวกัน

Spreadsheet 6 Spread sheet แสดงการหาค่า a, b, c และ d ตาม Eq 49 และ Eq 50

Microsoft Excel - Book1.xls										
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help										
=INTERCEPT(B26:H26,I15:I15)										
	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
13										
14	140	145	150	155	160	165	170			
15	2.420	2.391	2.363	2.336	2.309	2.282	2.257	Intercept	Slope	
16	1.730	1.519	1.338	1.160	0.985	0.812	0.644	-14.195	8.575	
17	2.233	2.011	1.820	1.631	1.445	1.262	1.085	-14.818	8.957	
18	2.739	2.508	2.302	2.102	1.904	1.711	1.523	-15.120	7.374	
19	3.246	3.002	2.786	2.572	2.363	2.159	1.960	-15.660	7.807	
20	3.749	3.494	3.265	3.038	2.816	2.603	2.393	-16.208	8.241	
21	4.248	3.981	3.740	3.500	3.268	3.043	2.821	-16.753	8.673	
22								(a)	-0.370	216.136 (c)
23								(b)	-0.817	422.243 (d)
24										

การคำนวณเวลาคงค้างสารใน TPGC ตามสมการ Eq 52 นั้นค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ดังนั้นจึงแยกออกไปไว้ในภาคผนวก

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ดังที่ได้กล่าวไว้ในวัตถุประสงค์แล้วว่าการศึกษานี้มุ่งพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารด้วยสมการ (Eq 35) โดยไม่ใช้สารอ้างอิง และความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์สารโดยไม่ใช้สารอ้างอิงนั้นมีความเป็นไปได้สูง⁽¹⁾ ดังนั้น การศึกษานี้มุ่งเน้นที่จะขยายขอบเขตการใช้สมการ (Eq 35) นี้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารให้กว้างออกไป โดยชกการศึกษาออกเป็นหัวข้อย่อยๆ โดยจะสรุปปัจจัยและวิจารณ์ผลเป็นเรื่องๆ ไป

1 ความสัมพันธ์ระหว่างดัชนีคงค้างและความยาวคาร์บอนเทียบเท่า

การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในแก๊สโครมาโตกราฟีนั้นส่วนมากจะเชื่อมโยงกับค่าคงที่สมดุลภาพ (equilibrium constant, K) และค่า K นี้มักเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ แต่ดัชนีคงค้างโกเวตส์ (Kovats retention index) และ ECL ได้แก้ไขจุดอ่อนของค่า K ไปส่วนหนึ่งคือ โดยการปรับแก้ K ของสารตัวอย่างด้วย K ของนอร์มัลแอลเคน หรือกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ K ตามสมการ (Eq 27) และ สมการ (Eq 30) การปรับแก้ด้วยวิธีนี้จะใช้ได้ผลต่อสารตัวอย่างที่มีหน่วยเมทิลีนหลายๆ เพื่อให้แรงกระทำนี้เป็นแรงหลักระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคนิ่ง ผลกระทบอันเนื่องมาจากอุณหภูมิคือแรงกระทำระหว่างสารอ้างอิงกับวัฏภาคนิ่งจะมีความคล้ายคลึงกับแรงกระทำระหว่างสารตัวอย่างกับวัฏภาคนิ่งมากที่สุด แต่หากสารตัวอย่างเป็นสารค่างอนุกรมฟังก์ชันกันกับสารอ้างอิง เช่น สารตัวอย่างเป็นกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ แต่สารอ้างอิงเป็นนอร์มัลแอลเคน ผลของอุณหภูมิคือแรงกระทำระหว่างหมู่คาร์บอกซิลเมทิลในสารตัวอย่างจะแตกต่างไปจากหมู่เมทิลของสารอ้างอิง และหากสารตัวอย่างมีจำนวนหน่วยเมทิลีนน้อย แรงกระทำของหมู่คาร์บอกซิลเมทิลจะยิ่งชัดเจนขึ้น ส่งผลให้ค่าดัชนีโกเวตส์ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์มีค่าไม่คงที่แต่จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นหรือลดตามจำนวนหน่วยเมทิลีนในโมเลกุล ถึงแม้ว่าจุดอ่อนนี้จะเป็นที่เข้าใจกันดี แต่ก็ยังไม่มีวิธีการอื่นใดที่จะสามารถแก้ไขได้ในขณะนี้ จึงอาจจะกล่าวสรุปได้ว่า วิธีการทั้งสองยังนับเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในปัจจุบันนี้ ดังนั้น หากสามารถพัฒนาวิธีการที่สะดวกในการเปลี่ยนค่าทั้งสองนี้กลับไปมาสะดวก ก็จะช่วยให้ผู้ใช้ได้รับผลประโยชน์มากขึ้น

สมการ (Eq 54) สามารถแยกพิจารณาได้คือ เทอมทางซ้ายเป็น ค่า k' ($=K/\beta$) ของสารตัวอย่าง และเทอมทางขวาเป็นค่าคงที่ทางอุณหพลศาสตร์ของของสารนอร์มัลแอลเคน I จะมีค่าเท่ากับ 100 n สมการ (Eq 35) เปลี่ยนเป็นสมการ (Eq 54) ซึ่งจะโยงสัมพันธ์สารตัวอย่างกับค่าดัชนีคงค้างโกเวตส์ ในทำนองเดียวกัน หากเทอมทางขวาเป็นค่าคงที่ทางอุณหพลศาสตร์ของของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ สมการ (Eq 35) เปลี่ยนเป็นสมการ (Eq 55) ก็จะโยงสัมพันธ์สารตัวอย่างเข้ากับค่า ECL

$$\ln \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) = a' + \frac{b'I}{100} + \frac{c'}{T} + \frac{d'I}{100T} \quad \text{Eq 54}$$

$$\ln \left(\frac{t_R - t_m}{t_m} \right) = a'' + b''ECL + \frac{c''}{T} + \frac{d''ECL}{T} \quad \text{Eq 55}$$

รวมสมการ Eq 54 และ Eq 55 จะได้ Eq 56 และสมการ Eq 56 จะเป็นสมการไฮเปอร์บอริกระหว่างค่าดัชนีคงค้างโกเวทซ์กับค่า ECL

$$a' + \frac{b'I}{100} + \frac{c'}{T} + \frac{d'I}{100T} = a'' + b''ECL + \frac{c''}{T} + \frac{d''ECL}{T} \quad \text{Eq 56}$$

การศึกษาทั้งหมดในหัวข้อนี้ เลือกใช้คอลัมน์แบบแคพิลลารี เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม ขาว 15 เมตร เคลือบวัฏภาคหนึ่ง OV-101 หน้า 0.2×10^{-6} เมตร

1.1 ค่าคงที่ของคอลัมน์

ค่าคงที่ของคอลัมน์ a, b, c และ d หาคาณวิธีของ Krisnangkura et al⁽¹⁹⁾ สำหรับสารนอร์มัลแอลเคนได้ให้รายละเอียดไว้ในบทวิธีการคำนวณการวิจัย และได้ค่า $a = -6.37$, $b = -0.517$, $c = 214.43$ และ $d = -429.911$ แทนค่า a, b, c และ d ลงในสมการ Eq 43 จะได้

$$\ln k' = -6.37 - \frac{0.517I}{100} + \frac{214.43}{T} + \frac{429.911}{100T} \quad \text{Eq 57}$$

ซึ่งใช้ในการคำนวณหาค่าดัชนีคงค้าง ส่วนของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์นั้นได้ข้อมูลเวลาคงค้างที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้

ตารางที่ 3 เวลาคงค้างของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (C16–C20) ที่อุณหภูมิ 170–200 °C บนคอลัมน์ OV-101 ขาว 15 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 ไมโครเมตร

อุณหภูมิ (°C)	170	175	180	185	190	195	200
เวลาคงค้างเฮกเซน	1.009	1.008	1.007	1.007	1.006	1.005	1.004
จำนวนคาร์บอน (n)	เวลาคงค้าง (นาที)						
16	12.288	10.133	8.448	7.185	6.135	5.243	4.540
17	18.418	14.923	12.241	10.233	8.582	7.214	6.149
18	27.664	22.123	17.884	14.715	12.151	10.048	8.430
19	41.902	33.047	26.311	21.375	17.385	14.202	11.744
20	63.184	49.286	38.719	30.260	24.956	20.092	16.429

นำค่าเวลาคงค้างที่ได้นั้นเปลี่ยนเป็นค่า natural log (ตัวประกอบคงค้าง และนำไปหาค่า a, b, c และ d จะได้ค่า $a = -7.56$, $b = -0.511$, $c = 1398.89$ และ $d = 415.03$ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า natural log(ตัวประกอบคงค้าง) ที่คำนวณได้จากตารางที่ 3 โดยใช้ค่าเวลาคงค้างของเฮกเซนเป็นค่า t_m พร้อมทั้งจุดตัดแกน y ความชันเส้นกราฟ และค่า คงที่กอลัมน์ a, b, c และ d

อุณหภูมิ (°C)	170	175	180	185	190	195	200	Intercept	Slope
16	2.414	2.203	2.000	1.814	1.629	1.439	1.259	-15.73	8036.30
17	2.848	2.625	2.412	2.215	2.019	1.821	1.634	-16.24	8454.67
18	3.274	3.042	2.819	2.611	2.405	2.197	2.001	-16.76	8874.00
19	3.702	3.459	3.224	3.007	2.79	2.575	2.37	-17.26	9286.32
20	4.121	3.869	3.623	3.369	3.17	2.944	2.732	-17.77	9695.60
Intercept	-4.411	-4.459	-4.489	-4.420	-4.533	-4.580	-4.63	-7.56, a	1398.89, c
Slope	0.427	0.417	0.406	0.390	0.385	0.376	0.37	-0.511, b	415.03, d

แทนค่า a, b, c และ d ลงในสมการ (Eq 35) จะได้

$$\ln k' = -7.56 - 0.51 \ln + \frac{1398.89}{T} + \frac{415.03n}{T} \quad \text{Eq 58}$$

1.2 การหาค่าดัชนีคงค้างโกเวทซ์กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากตัวประกอบคงค้าง

ดัชนีคงค้างโกเวทซ์ของกรดไขมันสามารถคำนวณได้จากตัวประกอบคงค้าง โดยนำค่าตัวประกอบคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ในตารางที่ 4 พร้อมทั้งอุณหภูมิสัมบูรณ์มาแทนค่าลงในสมการ Eq 57 ดัชนีคงค้างที่คำนวณได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 5 พร้อมทั้งค่าดัชนีคงค้างที่มีผู้รายงานไว้อยู่ในวงเล็บ ความแตกต่างดัชนีโกเวทซ์สูงสุดเป็น 10.22 หน่วย หรือ 0.44 % เป็นกรดไขมันคาร์บอน 20 อะตอมที่อุณหภูมิ 175 °C ดัชนีโกเวทซ์ที่รายงานโดย Krop et al.⁽²³⁾ นั้นอุณหภูมิมีผลต่อดัชนีโกเวทซ์น้อยมาก คือมีอัตราการเพิ่มประมาณ 0.10 – 0.23 ค่อการเพิ่มอุณหภูมิ 10 °C แต่ค่าที่ คำนวณตามสมการ Eq 57 นี้จะให้อัตราเพิ่มประมาณ 2.43-2.68 หน่วยค่อ การเพิ่มอุณหภูมิ 10 °C และค่าที่คำนวณได้นี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Entre ซึ่งรายงานไว้ 3.7 หน่วยค่อ 10 °C

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าดัชนีคงค้างไอแกวทซ์ของกรดไขมันอิ่มตัวเมทิลเอสเทอร์ที่คำนวณได้จากการ
Eq 45 ที่อุณหภูมิต่างๆ กับค่าที่ได้รายงานไว้โดย Krop et al⁽²³⁾ (ตัวเลขในวงเล็บ)

จำนวน คาร์บอน	170 °C	175 °C	180 °C	185 °C	190 °C	195 °C	200 °C
16	1907.77 (1908.8)	1907.07 (1908.7)	1907.16 (1908.9)	1910.37 (1908.9)	1912.90 (1909.0)	1913.18 (1909.0)	1915.06 (1909.1)
17	2007.52	2006.49	2009.65	2009.34	2011.90	2012.60	2015.14
18	2105.43 (2109.4)	2104.74 (2109.6)	2104.96 (2109.7)	2107.70 (2109.8)	2109.88 (2109.8)	2110.45 (2110.0)	2113.08 (2110.2)
19	2203.81	2202.98	2202.77	2205.74	2207.60	2208.83	2211.56
20	2300.12 (2309.7)	2299.58 (2309.8)	2299.13 (2310.0)	2295.37 (2310.1)	2304.06 (2310.2)	2304.87 (2310.3)	2308.17 (2311.0)

1.3 การหาค่าดัชนีคงค้างไอแกวทซ์กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จาก ECL

ค่าดัชนีคงค้างนอกจากจะคำนวณด้วยประกอบคงค้างตามสมการ Eq 57 แล้ว ยังสามารถจะ

คำนวณได้จากค่า ECL โดยแทนค่าคงตัวคอลัมน์ต่างๆ ลงในสมการ Eq 56 จะได้ Eq 59

$$-6.37 - \frac{0.517I}{100} + \frac{214.43}{T} + \frac{429.91I}{100T} = -7.56 - 0.511ECL + \frac{1398.89}{T} + \frac{415.03ECL}{T} \quad \text{Eq 59}$$

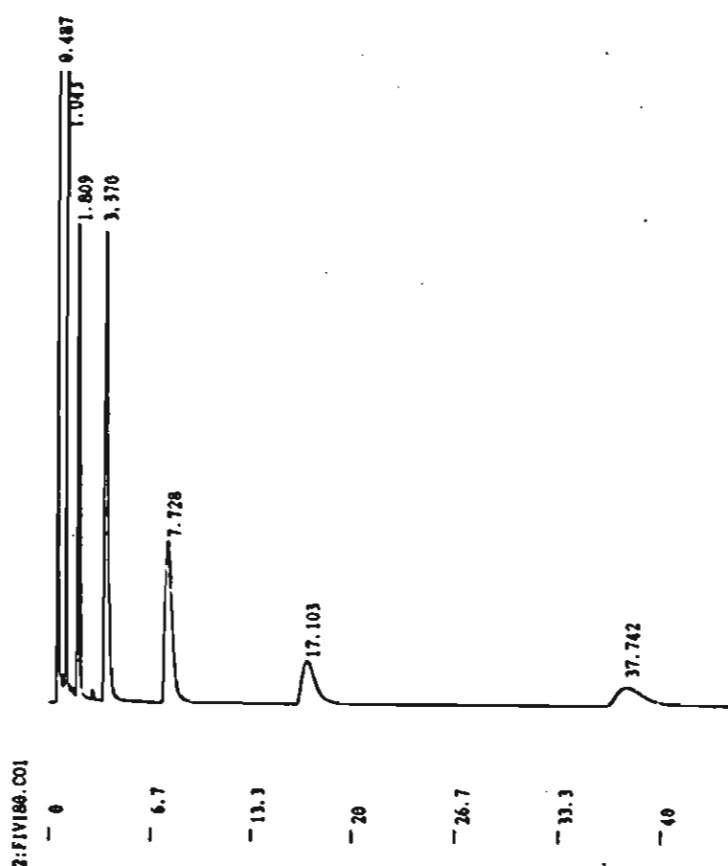
ตารางที่ 6 ได้รวบรวมค่า ECL ของกรดไขมันบางตัวบนคอลัมน์ dimethyl polysiloxane (DB-1) เมื่อนำมา
แทนค่าลงในสมการ Eq 59 จะได้ค่าดัชนีไอแกวทซ์และรวมไว้ในตารางเดียวกัน ความแตกต่างสูงสุด
ระหว่างค่าที่คำนวณตามสมการ Eq 59 โดยใช้ข้อมูลจากคอลัมน์ OV-101 กับค่าที่รายงานจากคอลัมน์
DB-1 ประมาณ 1.65% ส่วนหนึ่งของความแตกต่างอาจจะเนื่องมาจากวิฤภาคนิ่งจาก 2 บริษัทนั้นไม่
เหมือนกันทุกประการ

ตารางที่ 6 แสดงค่าดัชนีไอแกวทซ์ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์บางตัวที่คำนวณได้จากค่า ECL บน
คอลัมน์ OV-101ตามสมการ Eq 59 โดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้รายงานบนคอลัมน์ DB-1

FAMES	ECL ⁽²⁴⁾	I ₂₀₀ (DB-1) ⁽²³⁾	I ₂₀₀ (OV-101)	% Difference
Methyl decanoate	10.00	1305.6	1327.2	-1.65
Methyl dodecanoate	12.00	1506.9	1523.1	-1.08
Methyl tetradecanoate	14.00	1708.0	1719.1	-0.65
Methyl oleate	17.72	2076.4	2083.5	-0.34
Methyl linoleate	17.64	2066.4	2075.7	-0.45
Methyl linolenate	17.69	2069.6	2080.6	-0.53
Methyl erucate	21.66	2482.6	2471.5	0.45

1.4 การหาค่าดัชนีคงค้างโกนเวทซ์ไขมันแอลกอฮอล์

สมการ Eq 35 ได้มาจากสมการทางอุณหพลศาสตร์เบื้องต้น ซึ่งน่าจะครอบคลุมสารเคมีอินทรีย์อื่นๆ นอกเหนือจากแอลเคน และกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ในบทนี้จึงนำสมการ Eq 35 มาใช้หาค่าดัชนีคงค้างของไขมันแอลกอฮอล์ รูปที่ 9 เป็นโครมาโตแกรมไขมันแอลกอฮอล์ความยาวคาร์บอนคู่ 12 – 22 อะตอม ทำที่ 180 °C คิวบิกบนคอลัมน์เป็นเวลาคงค้าง มีหน่วยเป็นนาที่ นำข้อมูลคงค้างนี้และอุณหภูมิแทนลงในสมการ Eq 57 จะได้ค่าดัชนีคงค้างของไขมันแอลกอฮอล์แต่ละตัว ซึ่งสรุปไว้ในตารางที่ 7 ค่าที่คำนวณได้นั้นใกล้เคียงกับที่รายงานโดย Pacakova and Felde⁽⁹⁾ ความแตกต่างสูงสุดประมาณร้อยละ 1



รูปที่ 9 โครมาโตแกรมไขมันแอลกอฮอล์คาร์บอนคู่ 12-22 อะตอม บนคอลัมน์ OV-101 ยาว 15 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. อุณหภูมิ 180 °C.

ตารางที่ 7 ปริมาณค่านิจคังไขมันแอลกอฮอล์ที่ได้จากโครมาโตแกรมรูปที่ 9 และคำนวณตามสมการ Eq 57 ($t_m = 0.487$ นาที) กับที่รายงานโดย Pacakava and Feldt⁽⁹⁾

Fatty alcohols	Retention time (minutes)	Ln k'	I ₁₈₀ (OV-101)	I ₁₈₀ (SE-30)	% Difference
Dodecanol	1.043	0.133	1456.2	1471	1.005
Tetradecanol	1.809	0.999	1665.4	1669	0.215
Hexadecanol	3.576	1.847	1870.4	1864	-0.343
Octadecanol	7.728	2.699	2076.1	2060	-0.784
Eicosanol	17.103	3.530	2276.8	n/a	-
Docosanol	37.742	4.337	2471.8	n/a	-

1.5 สรุปและข้อคิด

การศึกษานี้ได้ขยายขอบข่ายการใช้งานของสมการ Eq 35 ที่ใช้หาค่า ECL ให้กว้างออกไปใช้หาค่านิจคังคัง อีกทั้งยังสามารถเปลี่ยนค่า ECL ที่มีการรายงานไว้แล้วให้เป็นค่านิจคังคัง ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารอินทรีย์สะดวกมากยิ่งขึ้น ค่านิจคังคังนี้เป็นระบบวิเคราะห์เอกลักษณ์สารในแก๊สโครมาโตกราฟีที่ใช้กันมากที่สุดระบบหนึ่ง หนังสือที่ Pacakova and Feldt⁽⁹⁾ ได้รวบรวมค่านิจคังคังกว่า 6000 ตัวอย่าง บนวิทยุภาคหนึ่งหลายชนิด และบริษัท Sadtler ซึ่งรวบรวม NMR, IR และ mass spectra ของสารอินทรีย์ต่างๆ ก็ได้มีการรวบรวมค่านิจคังคังไว้จำหน่ายเช่นกัน ทว่าความนิยมใช้ค่านิจคังคังนั้น ไม่แพร่หลายเท่ากับการใช้ NMR, IR และ mass spectrum อาจเนื่องมาจาก ระบบทั้ง 3 อันหลังนี้โยงสัมพันธ์กับโครงสร้างเคมีโดยตรง แต่ระบบค่านิจคังคังนั้น โยงสัมพันธ์กับค่าคงที่สมดุล K และค่านิจคังคังนี้จะเกี่ยวข้องหรือไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับโครงสร้างเคมีของสาร แม้นักเคมีจะพยายามแยกโครงสร้างของสารตัวอย่างเป็นส่วนๆ เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทของแต่ละหมู่ฟังก์ชันที่จะส่งผลต่อค่านิจคังคัง (หรือค่า K) ก็ตาม⁽²⁵⁾ นั้นเป็นเพียงความพยายามที่จะแยกโครงสร้างของสารตัวอย่างเท่านั้น แต่ค่า K นั้นไม่ได้ขึ้นกับสารตัวอย่างแต่เพียงอย่างเดียว มันยังขึ้นกับตัวทำละลาย หรือวิทยุภาคหนึ่งที่ใช้เคลือบด้วย เมื่อวิทยุภาคหนึ่งเปลี่ยน ค่านิจคังคังก็จะเปลี่ยนตามด้วย ดังนั้น ซึ่งเป็นปัญหาอย่างมากสำหรับผู้ที่ใช้แก๊สโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สาร วิทยุภาคหนึ่งที่ใช้นอติดคิดว่าดีแล้ว มักถูกแทนที่ด้วยวิทยุภาคหนึ่งตัวใหม่ที่ดีกว่าเสมอ ด้วยเหตุนี้ ค่านิจคังคังที่เคยมีผู้รวบรวมไว้มักจะใช้ไม่ได้เพราะคอลัมน์นั้นได้เลิกใช้กันไปแล้ว การจะรวบรวมใหม่ต้องใช้ทั้งเวลา และก็ยังคงมีปัญหาเดิมอีก คือ เมื่อรวบรวมได้แล้ว อาจจะมีวิทยุภาคหนึ่งที่ใหม่และดีกว่าออกมาวางจำหน่าย ทำให้รู้สึกว่าการที่ทุ่มเทในการรวบรวมค่านิจคังคังนั้น ไม่คุ้มกับการใช้งาน

ปัญหานี้เราคงมีความเห็นในเชิงบวกว่า ค่านิจคังคังของคอลัมน์ที่ใช้นอติดที่มีผู้รวบรวมไว้ นั้นอาจจะไม่สูญเปล่า ถ้าหากมีการพัฒนาสมการคณิตศาสตร์ที่จะใช้เปลี่ยนค่านิจคังคังจากวิทยุภาคหนึ่ง

ไปสู่อีกวัฏภาคนึงหนึ่ง โดยที่ไม่ต้องทำการฉีดสารตัวอย่างเข้าไปบนคอลัมน์อีกครั้งหนึ่ง คำนี้นักเคมีก็จะถูกเปลี่ยนกลับวัฏภาคนึงตัวใหม่อย่างรวดเร็ว การศึกษาในบทนี้จะป็นตัวอย่างที่ดี และอาจจะถือเป็นแนวทางในการพัฒนาสมการคณิตศาสตร์เพื่อเปลี่ยนค่าคำนี้นักเคมีจากวัฏภาคนึงหนึ่งไปยังอีกวัฏภาคนึงหนึ่ง

2. การทำนายเวลาคงค้างในแก๊สโครมาโตกราฟีแบบโปรแกรมอุณหภูมิ (TPGC)

จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้เพื่อขยายสมการ Eq 35 มาใช้ในการทำนายเวลาคงค้างของกราดไขมันเมทิลเอสเทอร์ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ เนื่องจาก การแยกและวิเคราะห์สารด้วยแก๊สโครมาโตกราฟีจะมีความซับซ้อนมากขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้ทันกับสารตัวอย่างทางชีวภาพที่จะนำมาวิเคราะห์นั้นนับว่าจะซับซ้อนมากขึ้น อีกทั้งการวิเคราะห์สารก็ได้พยายามที่จะลดขั้นตอนการสะกัด และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางเคมีให้เหลือน้อยที่สุด แก๊สโครมาโตกราฟีแบบอุณหภูมิคงที่ที่มีจุดอ่อนคือ หากอุณหภูมิที่ใช้ต่ำ สารโมเลกุลสูงจะถูกพาออกจากคอลัมน์ช้ามาก และพีคจะแบนราบจนมองไม่เห็น หากใช้อุณหภูมิสูงขึ้น สารโมเลกุลต่ำๆ จะถูกชะออกมาใกล้กับตัวทำละลายจนเกือบจะไม่สามารถแยกออกจากกัน ดังนั้น TPGCจึงมีความสำคัญมากขึ้นตามลำดับ การวิเคราะห์เอกลักษณ์สารใน TPGC และการทำนายเวลาคงค้างใน TPGC จะมีความซับซ้อนกว่าในสภาวะอุณหภูมิคงที่ van den Dool and Kratz ⁽²⁶⁾ ในปี ค.ศ. 1963 ได้เสนอสมการง่ายๆ ในการทำนายคำนี้นักเคมีใน TPGC เชิงเส้น สมการการทำนายเวลาคงค้างใน TPGC ปัจจุบันได้พัฒนาไปมาก สามารถจะทำนายเวลาคงค้างใน TPGC แบบ เชิงเส้นและแบบขั้นบันได 1 หรือ หลายขั้น (multi-step TPGC) ได้ค่อนข้างแม่นยำ⁽²⁷⁻³²⁾ แต่กระบวนการและสมการคณิตศาสตร์มีความซับซ้อนมาก นอกจากนี้ การคำนวณจะสามารถคำนวณสารตัวอย่างเพียงตัวเดียวจากข้อมูลแต่ละชุด

การศึกษานี้ได้ขยายสมการ Eq 35 นี้ในการทำนายเวลาคงค้างของกราดไขมันเมทิลเอสเทอร์ทั้งอนุกรม โดยนำเอาวิธีการของ Calvalli and Guinchard⁽²¹⁾ เข้ามาช่วย หลักการง่ายของ Calvalli and Guinchard คือแบ่งพิจารณาคอลัมน์ทั้งอันออกเป็นส่วนๆ โดยแต่ละส่วนถือเป็นคอลัมน์ในสภาวะอุณหภูมิคงที่ที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น สมมุติให้คอลัมน์ยาว 10 เมตรแบ่งออกเป็น 10 ส่วน แต่ละส่วนจะมีความยาว 1 เมตร สารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ส่วนที่ 1 ที่อุณหภูมิ 100 °C เวลาคงค้างในคอลัมน์ส่วนที่ 1 นี้ คำนวณโดยใช้สภาวะอุณหภูมิคงที่ที่ 100 °C ได้สมมุติเท่ากับ 1 นาทีพอดี สารตัวอย่างนี้เข้าสู่ส่วนที่ 2 ของคอลัมน์ต่อไป ทว่าอุณหภูมิใน oven ได้เปลี่ยนไปตามอัตราการโปรแกรม เช่น 2 °C ต่อนาที การคำนวณหาเวลาคงค้างในส่วนที่ 2 นี้ก็จะกระทำเช่นเดียวกันกับส่วนที่ 1 เพียงแต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 100 + 2 (102 °C) สมมุติให้ได้เวลาคงค้างเท่ากับ 0.9 นาที สารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ส่วนที่ 2 ไปเข้าสู่ส่วนที่ 3 ของคอลัมน์ อุณหภูมิจะเปลี่ยนเป็น 100 + 2 X 1.9 (=103.8 °C) การคำนวณหาเวลาคงค้างในส่วนที่ 3 นี้ก็จะกระทำเช่นเดียวกันกับส่วนที่ 1 เพียงแต่เปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 103.8 °C และคำนวณลักษณะนี้ต่อไปเรื่อยๆ จนครบ 10 ส่วน เวลาคงค้างก็จะเป็นเวลาคงค้างจากส่วนย่อยทั้ง 10 ส่วนรวมกัน Calvalli and Guinchard ได้กล่าวว่าหากการแบ่งส่วนนี้ยิ่งมาก เวลาคงค้างที่คำนวณได้จะใกล้เคียงกับผลการ

ทดลองมากขึ้น และตัวเลข 500 ส่วนเป็นตัวเลขที่ให้ความถูกต้องที่ยอมรับได้ สมการที่ Calvalli and Guinchard ให้ไว้ โดยเริ่มจากสมการ van't Hoff คือ

$$\ln k' = y + \frac{x}{T} \quad \text{Eq 48}$$

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\frac{x}{T(t_i-1)} + y} \right) \quad \text{Eq 51}$$

โดย m เป็นจำนวนส่วนคอลัมน์ที่ถูกแบ่ง T คืออุณหภูมิที่เวลา t ของส่วนคอลัมน์ที่ $i-1$ สมการ Eq 49 สามารถลดรูปให้ง่ายลงเป็น

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} (1 + k') \quad \text{Eq 50}$$

แทนค่า k' ในสมการ Eq 35 ลงในสมการ Eq 59 จะได้

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\left(a + bn + \frac{c}{\theta_i} + \frac{dn}{\theta_i} \right)} \right) \quad \text{Eq 60}$$

โดย θ_i คือ $T(t_i)$ ในสมการ Eq 51

2.1 ค่าคงที่ของคอลัมน์

ค่าคงที่ของคอลัมน์ a, b, c และ d หาคาณวิธีของ Krisnangkura et al⁽¹⁹⁾ ซึ่งได้ให้รายละเอียดไว้ในบทวิธีการดำเนินการวิจัย การศึกษาในหัวข้อนี้ได้เลือกคอลัมน์แบบแคพิลลารี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย Omegawax หน้า 0.2×10^{-6} เมตร (จากบริษัท Supelco Bellefonte PA) เป็นคอลัมน์ที่มีความเป็นขั้วสูงเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ และให้ค่า $a = -7.55, b = -0.48, c = 1496$ และ $d = 379$ แทนค่าลงในสมการ Eq 51 ได้

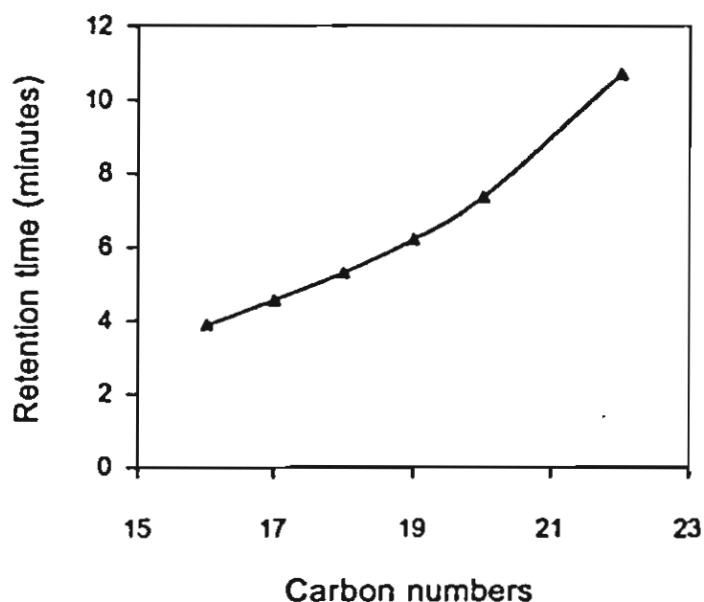
$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m}{m} \left(1 + e^{\left(-7.55 - 0.48n + \frac{1496}{\theta_i} + \frac{379n}{\theta_i} \right)} \right) \quad \text{Eq 61}$$

ใช้ในการทำนายเวลาคงค้างใน TPGC

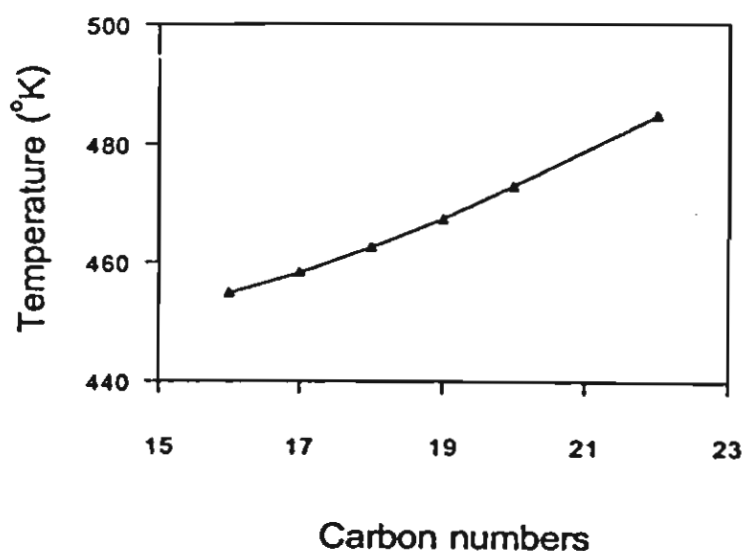
2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคาร์บอนกับเวลาคงค้าง

van den Dool and Kartz⁽²⁶⁾ ซึ่งเป็นผู้บุกเบิกการทำนายดัชนีคงค้างใน TPGC ได้กล่าวว่าดัชนีคงค้างสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นกับจำนวนคาร์บอนอะตอม แต่ Krupsik and Bohov⁽¹⁴⁾ และ Knoppel et al⁽²⁹⁾ ได้แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวไม่เป็นเชิงเส้น และ Krupsik and Bohop ยังคาดว่าความสัมพันธ์

ระหว่างอุณหภูมิและจำนวนคาร์บอนอะตอมไม่เป็นเชิงเส้น การศึกษานี้ได้ (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่า กราฟระหว่างเวลาคงค้างและจำนวนอะตอมของคาร์บอนไม่ให้เป็นเส้นตรง (รูปที่ 10) และกราฟระหว่าง อุณหภูมิกับจำนวนคาร์บอนก็ไม่เป็นเส้นตรงเช่นกัน (รูปที่ 11) ใน TPGC เชิงเส้น อุณหภูมิ 170–220 °C 2 °C/นาที



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาคงค้างกับจำนวนคาร์บอนของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ใน TPGC เชิงเส้น อุณหภูมิ 170–220 °C 2 °C/นาที



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับจำนวนคาร์บอนของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ใน TPGC เชิงเส้น อุณหภูมิ 170–220 °C 2 °C/นาที

2.3 การทำนายเวลาคงค้างใน TPGC ตามสมการ Eq 52

ตารางที่ 8 ได้รวบรวมเวลาคงค้างจาก TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (2 – 10 °C ต่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 52 ความคลาดเคลื่อนของค่าที่คำนวณได้จะค่อยเพิ่มขึ้นตามจำนวนคาร์บอน (หรือเวลาคงค้าง) และสูงตามอัตราเพิ่มอุณหภูมิ ความคลาดเคลื่อนสูงสุดอยู่ที่เวลาคงค้างที่คำนวณได้จากกรดไขมัน 22 คาร์บอนอะตอมที่อัตราเพิ่มอุณหภูมิ 10 °C/ นาที ซึ่งสูงถึงร้อยละ 6.26 และ 5.96 ใน 2 การทดลอง

ตารางที่ 8 ก เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (2 °C ต่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 52

2C/min	temp	t ₀ =0.981	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.945	Exp 2	%Δ	Average
16	181.76	5.88	5.94	1.05	181.39	5.70	5.70	0.08	0.56
17	185.10	7.55	7.66	1.41	184.66	7.33	7.38	0.65	1.03
18	189.18	9.59	9.76	1.75	188.66	9.33	9.41	0.84	1.30
19	193.93	11.97	12.20	1.92	193.34	11.67	11.82	1.25	1.58
20	199.26	14.63	14.93	2.01	198.61	14.30	14.52	1.48	1.75
22	211.05	20.52	21.10	2.74	210.31	20.15	20.59	2.12	2.43

ตารางที่ 8 ข เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (4 °C ต่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 52

4C/min	temp	t ₀ =0.944	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.945	Exp 2	%Δ	Average
16	189.88	4.97	4.96	-0.19	189.89	4.97	5.15	3.43	1.62
17	194.58	6.15	6.17	0.40	194.60	6.15	6.34	3.00	1.70
18	199.95	7.49	7.55	0.83	199.97	7.49	7.68	2.44	1.63
19	205.85	8.96	9.08	1.31	205.87	8.97	9.15	2.00	1.65
20	212.10	10.53	10.72	1.81	212.13	10.53	10.70	1.57	1.69
22	220.00	13.89	14.36	3.27	220.00	13.90	14.04	1.01	2.14

ตารางที่ 8 ค เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (6 °C ค่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 52

6C/min	temp	t ₀ =1.00	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.99	Exp 2	%Δ	Average
16	197.92	4.65	4.62	-0.72	197.72	4.62	4.54	-1.77	-1.24
17	203.53	5.59	5.58	-0.16	203.32	5.55	5.50	-0.96	-0.56
18	209.69	6.61	6.65	0.54	209.46	6.58	6.56	-0.24	0.15
19	216.20	7.70	7.78	1.02	215.96	7.66	7.69	0.39	0.71
20	220.00	8.84	9.01	1.88	220.00	8.80	8.91	1.29	1.59
22	220.00	11.96	12.50	4.31	220.00	11.89	12.34	3.66	3.98

ตารางที่ 8 ง เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (8 °C ค่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 52

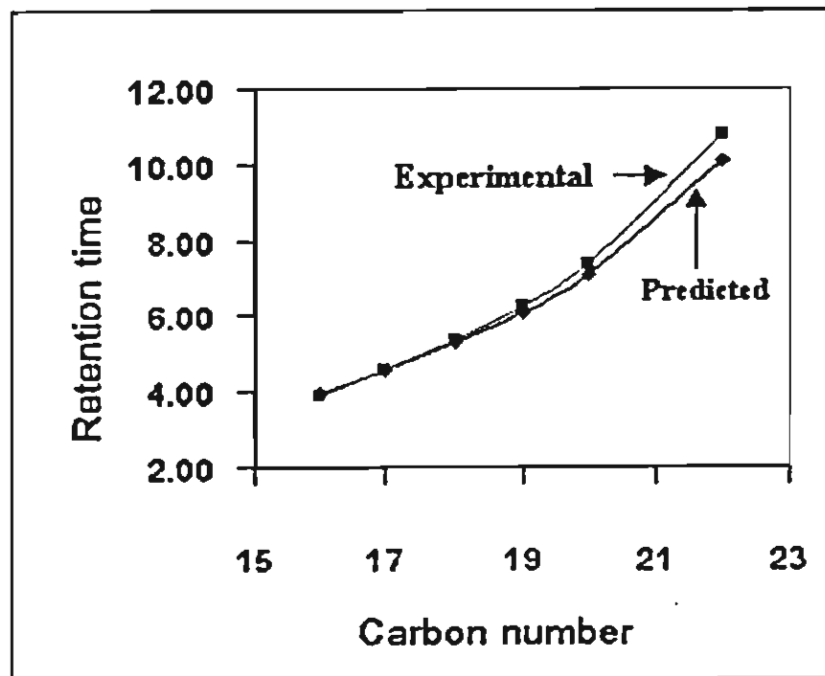
8C/min	temp	t ₀ =0.948	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.951	Exp 2	%Δ	Average
16	202.83	4.10	4.07	-0.82	202.90	4.11	4.08	-0.79	-0.81
17	208.85	4.86	4.86	0.07	208.93	4.87	4.86	-0.13	-0.03
18	215.34	5.67	5.70	0.57	215.42	5.68	5.71	0.57	0.57
19	220.00	6.52	6.62	1.51	220.00	6.53	6.63	1.49	1.50
20	220.00	7.53	7.75	2.88	220.00	7.54	7.86	4.06	3.47
22	220.00	10.41	11.01	5.41	220.00	10.44	11.02	5.30	5.36

ตารางที่ 8 จ เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (10 °C ค่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 52

10C/min	temp	t ₀ =0.998	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.999	Exp 2	%Δ	Average
16	209.38	3.94	3.92	-0.45	209.40	3.94	3.90	-1.03	-0.74
17	215.83	4.58	4.59	0.15	215.86	4.59	4.57	-0.35	-0.10
18	220.00	5.27	5.33	1.08	220.00	5.28	5.31	0.65	0.86
19	220.00	6.09	6.24	2.42	220.00	6.09	6.22	2.05	2.23
20	220.00	7.11	7.39	3.83	220.00	7.11	7.36	3.38	3.61
22	220.00	10.08	10.75	6.26	220.00	10.08	10.69	5.67	5.96

เมื่อมองภาพรวมของเส้นกราฟ (รูปที่ 12) จะเห็นว่าเส้นกราฟที่ได้จากการคำนวณนั้นมีความชันต่ำกว่าเส้นกราฟที่ได้จากการทดลอง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เวลาคงค้างสารที่ได้จากการทดลองนั้นสูง

กว่าที่ได้จากการคำนวณ และสูงห่างออกไปเมื่อความยาวคาร์บอนมากขึ้น ความแตกต่างนี้อาจสืบเนื่องมาจากสาเหตุต่างๆ เช่น



รูปที่ 12 เวลาคงตัวของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ 170-220 °C อัตราเพิ่ม 10 °C/นาที เปรียบเทียบระหว่างผลทางทดลองและการคำนวณจากสมการ Eq 52

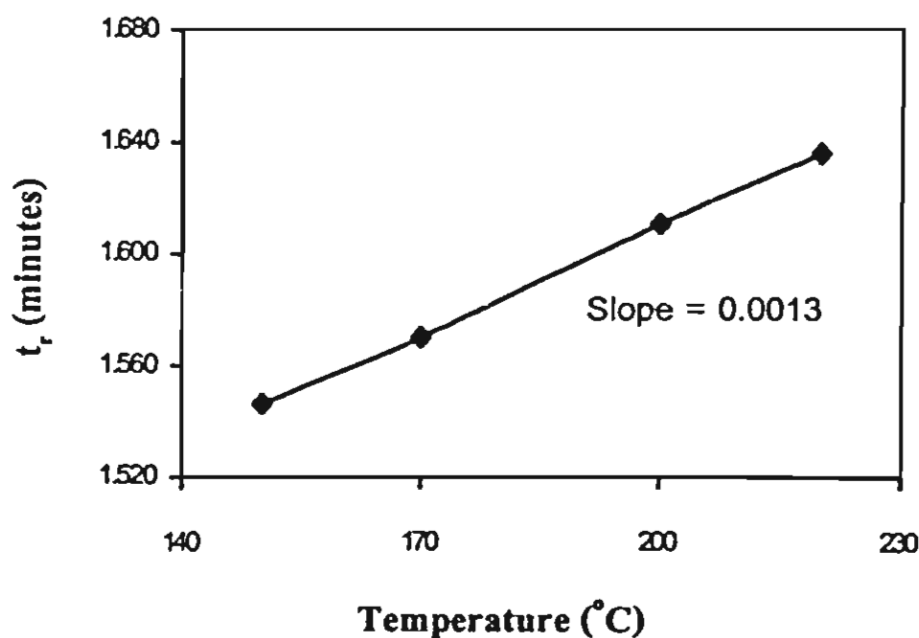
1. อัตราไหลของแก๊สตัวพา แม้ Calvalli and Guinchard จะกล่าวว่าอัตราไหลของแก๊สตัวพาไม่ผลต่อการคำนวณน้อยมาก สิ่งที่น่าสนใจที่แตกต่างจากผลงานของ Calvalli and Guinchard นั้นคือ Calvalli and Guinchard นั้นศึกษาสารที่ละตัว แต่การศึกษานี้ได้ใช้ค่าคงตัวชุดเดียวในการคำนวณสารทั้งหมด ดังนั้นอัตราไหลของแก๊สตัวพาที่ไม่คงที่ข้อมส่งผลกระทบต่อความแม่นยำในการคำนวณ แก๊สทั่วไปจะมีความหนืดสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น⁽³⁾ และถ้ารักษาความดันคงที่ปลายขาเข้าคอลัมน์ให้คงที่ (ซึ่งเป็นสภาวะการทดลองจริง) อัตราไหลของแก๊สตัวพาจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ การลดลงของอัตราไหลของแก๊สตัวพาจะส่งผลให้สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง
2. อัตราส่วนวัฏภาค (β) เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสสารจะขยายตัวตามสัมประสิทธิ์การขยายตัว แก้วซิลิกาที่ใช้ทำคอลัมน์จะขยายตัวได้ต่ำกว่าวัฏภาคนิ่ง ดังนั้นช่องว่างภายในคอลัมน์จะลดลง สารตัวอย่างจะระเหยและถูกพาออกจากคอลัมน์ลดน้อยลง
3. อุณหภูมิคอลัมน์ โคષปฏิกิริยาควบคุมและการวัดอุณหภูมิเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟจะอยู่ภายนอกคอลัมน์ เมื่ออุณหภูมิ oven ขึ้นถึงอุณหภูมิที่กำหนด อุณหภูมิภายในคอลัมน์อาจจะต่ำกว่าภายนอกเล็กน้อย เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนผ่านผนังคอลัมน์ ซึ่งมีด้วยกัน 3 ชั้น คือ polyimide resin ที่เคลือบผิวด้านนอก ซิลิกาที่ใช้ทำคอลัมน์ และวัฏภาคนิ่ง (Omegawax) ที่เคลือบภายใน หากอุณหภูมิเท่า

จริงภายในคอลัมน์ต่ำกว่าภายนอก (ที่ใช้ในการคำนวณ) สารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์ช้ากว่าการคำนวณ

4. ความถูกต้องในการหาค่าคงตัวคอลัมน์
5. สมการคำนวณ การคำนวณ โดย Approximate summation มักให้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริง⁽¹⁾ จากปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นนี้ การปรับแก้อัตราไหลแก๊สตัวพาสามารถทำได้ง่ายด้วยสมการคณิตศาสตร์

2.4 แก๊สตัวพาและการปรับแก้ t_m

ดังที่กล่าวมาข้างต้น อัตราไหลของแก๊สตัวพาจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และเพื่อให้รู้แน่ชัดว่าอัตราไหลของแก๊สตัวพาจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเท่าใด ทำโดยการนิศเฮกเซนซึ่งใช้เป็นตัววัดค่า t_m ของการศึกษานี้ ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยรักษาความดันของแก๊สวัดความดันให้คงที่ตลอดการทดลอง เมื่อนำค่าเวลาคงค้างของเฮกเซนกับอุณหภูมิจะได้กราฟเส้นตรงดังรูปที่ 13 โดยมีค่าความชันเป็น 0.0013 นาทีต่อ °C



รูปที่ 13 เวลาคงค้างของเฮกเซนที่อุณหภูมิ 150 – 220 °C

นำค่านี้ไปปรับเปลี่ยนค่า t_m เป็น $t_m (1 + g(\theta_i - T_i))$ และสมการ Eq 52 เปลี่ยนเป็น

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m (1 + g(\theta_i - T_i))}{m} \left(1 + c \left(\frac{-7.55 - 0.48n}{\theta_i} + \frac{1496}{\theta_i} + \frac{379n}{\theta_i} \right) \right) \quad \text{Eq 53}$$

โดย g เป็นเวลาคงค้างของสเกลเซนที่เพิ่มคือ 1°C เวลาคงค้างที่คำนวณตามสมการ Eq 53 นี้สรุปไว้ในตาราง 12 ความชันของเส้นกราฟจะใกล้เคียงกับผลการทดลองมากขึ้น ความแตกต่างๆ สูงสุดลดลงเหลือร้อยละ -2.79 แต่ความชันที่คำนวณได้ยังคงต่ำกว่าผลการทดลอง (รูปที่ 14) จึงอาจจะกล่าวได้ว่า นอกจากปัจจัยของอัตราไหลของแก๊สตัวพาที่เปลี่ยนไปแล้ว น่าจะยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลให้ค่าการคำนวณต่ำกว่าผลการทดลอง

ตารางที่ 9 ก เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ $170 - 220^{\circ}\text{C}$ โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (2°C ต่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 53

2C/min	temp	$t_0=0.981$	Exp 1	% Δ	temp	$t_0=0.945$	Exp 2	% Δ	Average
16	181.84	5.92	5.94	0.27	181.47	5.74	5.70	-0.71	-0.22
17	185.23	7.62	7.66	0.49	184.79	7.40	7.38	-0.29	0.10
18	189.38	9.69	9.76	0.67	188.86	9.44	9.41	-0.27	0.20
19	194.22	12.12	12.20	0.67	193.63	11.82	11.82	-0.03	0.32
20	199.66	14.84	14.93	0.60	199.01	14.52	14.52	0.03	0.31
22	211.74	20.88	21.10	1.06	211.00	20.51	20.59	0.38	0.72

ตารางที่ 9 ข เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ $170 - 220^{\circ}\text{C}$ โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (4°C ต่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 53

4C/min	temp	$t_0=0.944$	Exp 1	% Δ	temp	$t_0=0.945$	Exp 2	% Δ	Average
16	190.11	5.03	4.96	-1.42	190.12	5.03	5.15	2.25	0.42
17	194.91	6.23	6.17	-1.01	194.93	6.24	6.34	1.63	0.31
18	200.41	7.61	7.55	-0.76	200.43	7.61	7.58	0.88	0.06
19	206.46	9.12	9.08	-0.45	206.48	9.13	9.15	0.26	-0.10
20	212.90	10.73	10.72	-0.09	212.92	10.74	10.70	-0.33	-0.21
22	220.00	14.25	14.36	0.79	220.00	14.25	14.04	-1.53	-0.37

ตารางที่ 9 ค เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ $170 - 220^{\circ}\text{C}$ โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (6°C ต่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 53

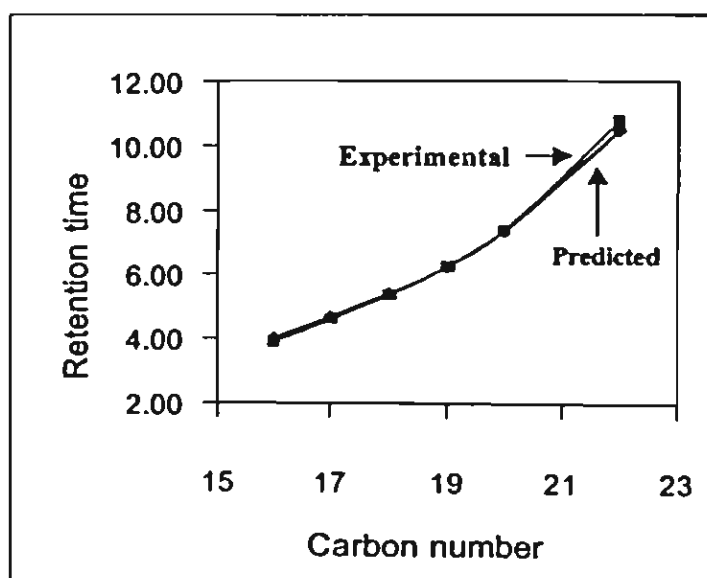
6C/min	temp	$t_0=1.00$	Exp 1	% Δ	temp	$t_0=0.99$	Exp 2	% Δ	Average
16	198.33	4.72	4.62	-2.25	198.13	4.69	4.54	-3.33	-2.79
17	204.08	5.68	5.58	-1.87	203.87	5.65	5.50	-2.69	-2.28
18	210.41	6.74	6.65	-1.33	210.18	6.70	6.56	-2.13	-1.73
19	217.12	7.86	7.78	-0.98	216.87	7.82	7.69	-1.64	-1.31
20	220.00	9.05	9.01	-0.43	220.00	9.00	8.91	-1.04	-0.73
22	220.00	12.36	12.50	1.09	220.00	12.29	12.34	0.40	0.75

ตารางที่ 9 ง เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (8 °C ค่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 53

8C/min	temp	t ₀ =0.948	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.951	Exp 2	%Δ	Average
16	203.41	4.18	4.07	-2.66	203.48	4.19	4.08	-2.63	-2.65
17	209.61	4.95	4.86	-1.95	209.69	4.96	4.86	-2.15	-2.05
18	216.31	5.79	5.7	-1.61	216.39	5.80	5.71	-1.60	-1.60
19	220.00	6.68	6.62	-0.94	220.00	6.69	6.63	-0.96	-0.95
20	220.00	7.75	7.75	-0.05	220.00	7.77	7.86	1.17	0.56
22	220.00	10.83	11.01	1.61	220.00	10.85	11.02	1.50	1.56

ตารางที่ 9 จ เวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ใน TPGC ตั้งแต่ 170 – 220 °C โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่างๆ กัน (10 °C ค่อนาที) พร้อมทั้งค่าที่คำนวณได้จากสมการ Eq 53

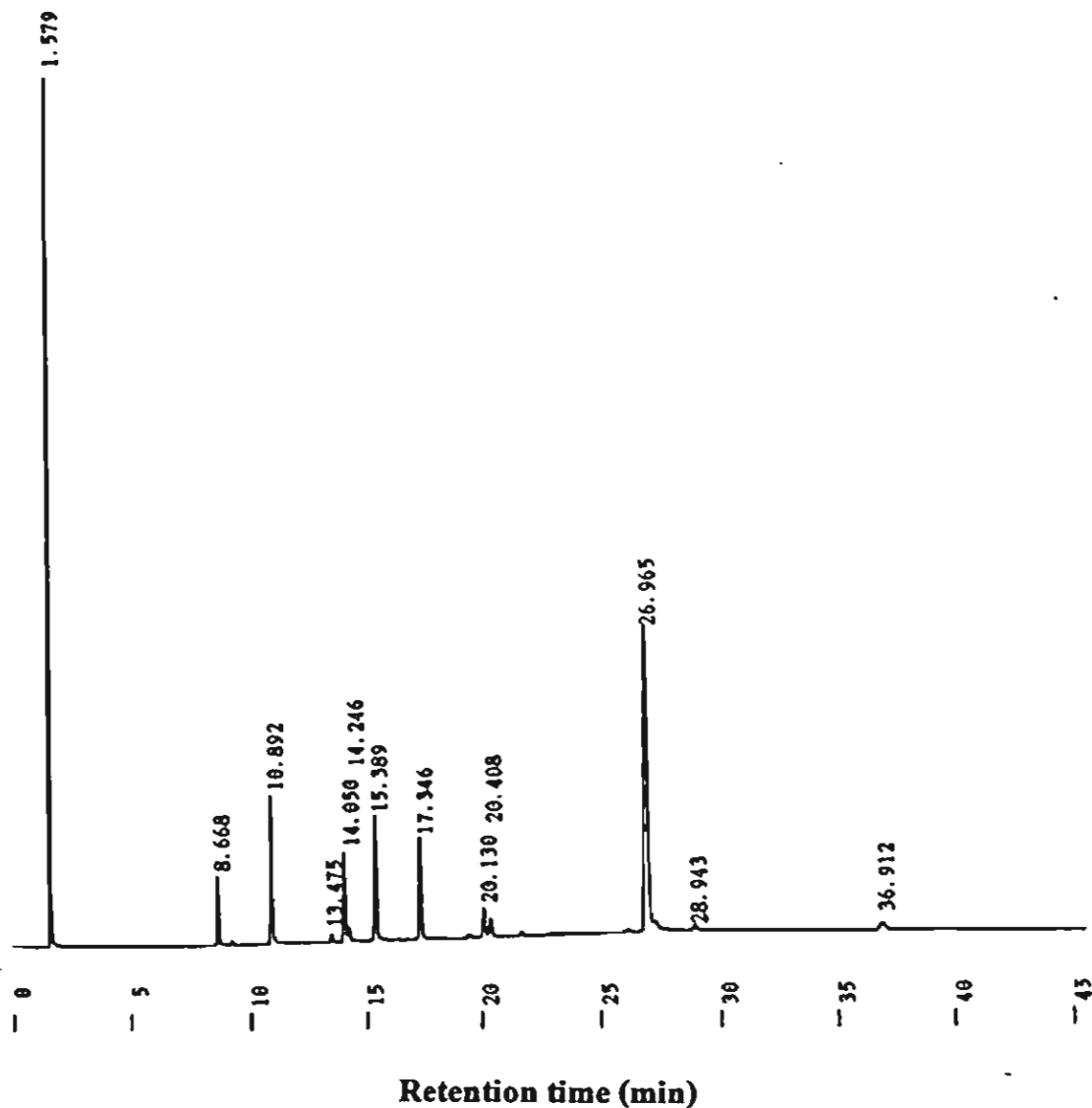
10C/min	temp	t ₀ =0.998	Exp 1	%Δ	temp	t ₀ =0.999	Exp 2	%Δ	Average
16	210.15	4.02	3.92	-2.48	210.17	4.00	3.90	-2.56	-2.52
17	216.81	4.68	4.59	-2.04	216.84	4.69	4.57	-2.55	-2.30
18	220.00	5.40	5.33	-1.40	220.00	5.41	5.31	-1.84	-1.62
19	220.00	6.27	6.24	-0.48	220.00	6.27	6.22	-0.87	-0.68
20	220.00	7.35	7.39	0.53	220.00	7.36	7.36	0.06	0.29
22	220.00	10.51	10.75	2.23	220.00	10.68	10.69	0.09	1.16



รูปที่ 14 เวลาคงค้างของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ 170-220°C อัตราเพิ่ม 10 °C/นาทึ เปรียบเทียบระหว่างผลกาทดลองและการคำนวณจากสมการ Eq 53

2.5 การทำนายเวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากแอลคิล

กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่จะใช้ในการทดสอบนี้ได้จากเมล็ดพันธุ์คอกกล้า โดยการใช้ *in situ* transmethylation ตามวิธีของ Kalayasiri et al.⁽²²⁾ คั่งรายละเอียดในวิธีดำเนินการ โดยศึกษาที่ อุณหภูมิ 170 – 220 องศาเซลเซียส ต่อเวลาที่ หยุดที่อุณหภูมิเริ่มต้น(initial hold time) 0 นาที และหยุดที่อุณหภูมิสูงสุด (final hold time) 60 นาที หรือสั่งให้หยุดเองเมื่อเห็นว่าสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์หมดแล้ว โครมาโตแกรมที่ได้แสดงในรูปที่ 15 คิวเลขบนยอดพีคเป็นเวลาคงค้าง (นาที)



รูปที่ 15 โครมาโตแกรมกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดคอกกล้าใน TPGC อุณหภูมิ 170 – 220 องศาเซลเซียส ต่อเวลาที่ หยุดที่อุณหภูมิเริ่มต้น(initial hold time) 0 นาที และหยุดที่อุณหภูมิสูงสุด (final hold time) 60 นาที

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบเวลากลาง้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดคอกกล้า (มี methyl heptadecanoate เป็น internal standard) ที่ได้จาก การคำนวณตามสมการ Eq 53 กับผลการทดลอง

FAMES	ECL ^a	Oven temperature 170 to 220 °C (2 °C/min.,				Oven temperature 170 to 250 °C (4 °C/min.,			
		T	I _g	Eq. 53	Δ (%)	T	I _g	Eq. 53	Δ (%)
Methyl palmitate	16.00	187.42	8.71	8.67	-0.48	199.23	7.37	7.28	-1.25
Methyl palmitoleate	16.18	188.15	9.07	-	-	200.33	7.58	-	-
Methyl heptadecanoate	17.00	191.80	10.90	10.89	-0.07	205.15	8.79	8.75	-0.51
Methyl stearate	18.00	196.90	13.45	13.475	0.19	211.50	10.37	10.36	-0.10
Methyl oleate	18.18	197.88	13.94	14.05	0.78	212.68	10.67	10.74	0.62
Methyl linoleate	18.59	200.19	15.10	15.39	1.88	215.42	11.35	11.56	1.79
Methyl linolenate	19.21	203.85	16.92	17.35	2.46	219.64	12.41	12.72	2.41
Methyl arachidate	20.00	208.72	19.36	-	-	225.09	13.77	-	-
Methyl eicosa-11-enoate	20.18	209.86	19.93	20.13	0.99	226.34	14.04	14.26	1.52
Methyl behenate	22.00	220.00	25.85	-	-	238.91	17.23	-	-
Methyl erucate	22.18	220.00	26.49	26.97	1.76	240.14	17.53	17.92	2.17
Methyl linocerate	24.00	220.00	34.78	-	-	250.00	20.58	21.08	2.39
Methyl tetracosenoate ^b	24.18	220.00	35.83	36.91	2.93	250.00	20.89	21.59	3.23

^a 910 references 19 and 12, ^b tentative identification as 24:1

นำค่า ECL ของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ชนิดมาแทนลงในสมการ Eq 53 จะได้ค่าเวลาคงค้างที่ใกล้เคียงกับที่คิดต่างๆ ในโครมาโตแกรม (รูปที่ 15) ดังตารางที่ 10 ค่าความคลาดเคลื่อนสูงสุด 2.93% ที่อัตราการเพิ่มเป็น 2 °C ต่อ นาที และความคลาดเคลื่อนเพิ่มสูงเป็น 3.23 % เมื่ออัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 4 °C ต่อ นาที

2.6 ผลของอุณหภูมิคอลัมน์

ในหัวข้อ 2.3 ได้กล่าวถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลให้ค่าเวลาคงค้างของการคำนวณต่ำกว่าการทดลอง การปรับแก้อัตราไหลของแก๊สตัวพาที่ตัวสมการคณิตศาสตร์สามารถลดความแตกต่างลงได้ระดับหนึ่ง ดังนั้น ความแตกต่างนี้น่าจะต้องมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย อุณหภูมิภายในคอลัมน์และภายนอกคอลัมน์น่าจะมีผลแตกต่างกันและส่งผลให้ค่าเวลาคงค้างที่คำนวณได้ลดน้อยลง ทว่าการขณนี้ยังไม่มียุทธวิธีใดที่จะวัดอุณหภูมิภายในคอลัมน์ การศึกษาจึงมุ่งเน้นไปยังการถ่ายเทความร้อนผ่านผนังคอลัมน์ ซึ่งมี 3 ชั้น ส่วนของวฏภาคหนึ่ง และอีกชั้นหนึ่งไม่สามารถจะเปลี่ยนแปลงได้ จึงเหลือแค่ผนังชั้นนอก ซึ่งเคลือบด้วย polyimide resin ที่เป็นถ่ายเทความร้อนต่ำ หากเปลี่ยนเป็นโลหะ เช่นอะลูมิเนียมที่มีจำหน่ายน่าจะส่งถ่ายความร้อนได้ดีกว่า

คอลัมน์ aluminium clad มักจะเป็นตัวเลือกในกรณีที่ต้องใช้สภาวะอุณหภูมิสูงๆ (สูงกว่า 300 °C) ด้วยคุณสมบัติการกระจายความร้อนที่ดีของโลหะ ดังนั้น คอลัมน์ที่จะเคลือบด้วยอะลูมิเนียมจึงเป็นคอลัมน์ที่มีวฏภาคนิ่งที่ทนความร้อนได้สูง การเลือกวฏภาคนิ่งเพื่อใช้ในการศึกษานี้จึงถูกจำกัดให้เลือกคอลัมน์ HT-5 (บริษัท SGE International Pty Ltd Victoria Australia) เป็นสาร polycarborane-siloxane ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มม ยาว 25 เมตร เคลือบด้วย HT-5 หนา 0.1 ไมโครเมตร มีค่าคงตัวคอลัมน์ $a = -8.097$, $b = -0.534$, $c = 364.63$ และ $d = 435.93$ และสมการในการคำนวณเวลาคงค้างในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิคือ

$$t_R = \sum_{i=1}^m \frac{t_m (1 + g(\theta_i - T_i))}{m} \left(1 + c \left(\frac{-8.097 - 0.534a + \frac{364.63}{\theta_i} + \frac{435.93a}{\theta_i}}{\theta_i} \right) \right) \quad \text{Eq 54}$$

การทดลองนี้ได้เปลี่ยนมาใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น Finigan 9001 ของบริษัท Fisons Instrument มีตัวตรวจวัดแบบแฟมไอออไนเซชันคั่นคั่นกับเครื่องประมวลผลโดยใช้โปรแกรม การวิเคราะห์สารทำโดยใช้คอลัมน์แบบแคพิลลารี แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพา อัตราไหล 1-2 มิลลิเมตร/นาที ฉีดสารตัวอย่างโดยใช้เครื่องฉีดสารแบบอัดโนมิตีรุ่น AS 9000 จากบริษัท Fisons Instrument และ Split ratio 1:50 สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคน C16 – C22 ที่สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิตั้งแต่ 150 – 180 °C จากการทดลองและจากการคำนวณตามสมการ Eq 54 ได้สรุปไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ก เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 2 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5
เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการ
คำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
2 oC/min	(to =1.057)			(to =1.337)		
n	Cal	Exp	%Δ	Cal	Exp	%Δ
16	4.08	4.15	1.69	5.04	5.12	1.62
17	5.81	5.91	1.69	7.04	7.16	1.72
18	8.18	8.31	1.56	9.71	9.86	1.49
19	11.19	11.34	1.35	13	13.15	1.16
20	14.72	14.87	1.01	16.73	16.85	0.73
21	18.6	18.73	0.69	20.74	20.81	0.34
22	22.64	22.73	0.4	24.86	24.9	0.17

ตารางที่ 11 ข เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 4 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5
เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการ
คำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
4 oC/min	(to =1.057)			(to =1.35)		
n	Cal	Exp	%Δ	Cal	Exp	%Δ
16	3.98	4.02	0.92	4.85	4.87	0.35
17	5.43	5.47	0.68	6.46	6.47	0.2
18	7.22	7.24	0.28	8.38	8.38	-0.04
19	9.26	9.25	-0.08	10.5	10.48	-0.22
20	11.42	11.4	-0.18	12.72	12.68	-0.34
21	13.63	13.6	-0.2	14.95	14.9	-0.32
22	15.82	15.8	-0.13	17.15	17.1	-0.27

ตารางที่ 11 ค เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 6 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5
เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการ
คำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
6 oC/min	(to =1.063)			(to =1.34 0)		
n	Cal	Expt	%Δ	Cal	Expt	%Δ
16	3.89	3.89	-0.08	4.65	4.65	-0.06
17	5.16	5.13	-0.64	5.99	5.98	-0.12
18	6.6	6.55	-0.76	7.5	7.47	-0.36
19	8.15	8.07	-0.95	9.07	9.04	-0.37
20	9.72	9.63	-0.93	10.66	10.61	-0.44
21	11.27	11.18	-0.81	12.21	12.17	-0.33
22	12.77	12.7	-0.55	13.71	13.69	-0.15

ตารางที่ 11 ง เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 8 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5
เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการ
คำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
8 oC/min	(to =1.1)			(to =1.333)		
n	Cal	Expt	%Δ	Cal	Expt	%Δ
16	3.91	3.91	-0.08	4.49	4.45	-0.83
17	5.04	5.02	-0.46	5.65	5.6	-0.89
18	6.26	6.22	-0.64	6.9	6.82	-1.17
19	7.51	7.45	-0.76	8.16	8.07	-1.15
20	8.75	8.69	-0.69	9.39	9.3	-0.94
21	9.95	9.9	-0.47	10.58	10.51	-0.67
22	11.09	11.07	-0.15	11.73	11.68	-0.45

ตารางที่ 11 จ เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 10 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการคำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
10 oC/min	(to =1.09)			(to =1.35)		
n	Cal	Expt	%Δ	Cal	Expt	%Δ
16	3.82	3.77	-1.33	4.41	4.35	-1.38
17	4.83	4.76	-1.53	5.44	5.36	-1.49
18	5.89	5.79	-1.67	6.51	6.41	-1.56
19	6.94	6.83	-1.57	7.56	7.46	-1.34
20	7.96	7.86	-1.27	8.58	8.48	-1.14
21	8.94	8.85	-1.02	9.55	9.47	-0.84
22	9.87	9.81	-0.64	10.49	10.45	-0.38

ตารางที่ 11 ฉ เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 15 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการคำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
15 oC/min	(to =1.09)			(to =1.027)		
n	Cal	Expt	%Δ	Cal	Expt	%Δ
16	3.66	3.58	-2.32	3.52	3.48	-1.24
17	4.48	4.36	-2.68	4.34	4.26	-1.95
18	5.28	5.15	-2.58	5.15	5.03	-2.32
19	6.05	5.91	-2.42	5.92	5.78	-2.42
20	6.76	6.63	-1.96	6.64	6.5	-2.2
21	7.44	7.32	-1.6	7.31	7.17	-1.91
22	8.16	8.08	-0.95	8.01	7.88	-1.65

ตารางที่ 11 ข เวลาคงค้างของสารนอร์มัลแอลเคนใน TPGC (150–180 °C 20 °C/นาที) บนคอลัมน์ HT-5 เปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองจากคอลัมน์เคลือบภายนอกด้วย polyimide resin aluminium และการคำนวณตามสมการ Eq 54

Polyimide clad				Aluminium clad		
20 oC/min	(to =1.08)			(to =1.033)		
n	Cal	Expt	%Δ	Cal	Expt	%Δ
16	3.52	3.45	-1.94	3.43	3.36	-1.99
17	4.22	4.12	-2.43	4.13	4.03	-2.56
18	4.88	4.76	-2.46	4.79	4.66	-2.72
19	5.49	5.37	-2.23	5.39	5.26	-2.47
20	6.05	5.94	-1.85	5.96	5.82	-2.41
21	6.62	6.54	-1.22	6.52	6.38	-2.15
22	7.28	7.25	-0.41	7.17	7.04	-1.8

ผลการศึกษาี้ หลังจากได้ทำการทำซ้ำ 3 ครั้งข้อมูลที่ได้นั้น ไม่มีความแตกต่างระหว่างคอลัมน์ที่เคลือบด้วยโลหะอะลูมิเนียม หรือเคลือบด้วยเรซิน polyimide ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากชั้นที่เคลือบภายนอกมีความบางมาก เมื่อเทียบกับผนังซิลิกาที่ใช้ทำคอลัมน์ การคำนวณการถ่ายเทความร้อนของผนังชั้นนอกสุดนี้จึงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับชั้นอื่นๆ

2.7 สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในหัวข้อที่ 2 นี้ชี้ให้เห็นได้ว่าค่าคงที่คอลัมน์ทั้ง 4 ของสมการ Eq 35 ที่หาจากสถานะอุณหภูมิที่นั้นสามารถจะนำไปใช้ในสถานะโปรแกรมอุณหภูมิได้ ความคลาดเคลื่อนไปจากผลการทดลองอยู่ในเกณฑ์ต่ำ แต่หากมีการศึกษาต่อไปถึงปัจจัยต่างๆ ที่จะส่งผลกระทบต่อความแม่นยำแล้ว ความถูกต้องของสมการนี้จะสูงขึ้นได้ สิ่งที่ได้ปรับแก้ไปแล้วส่วนหนึ่ง คือตัวประกอบปรับแก้อัตราไหลของแก๊สตัวพา ซึ่งช่วยให้ค่าเวลาคงค้างที่ได้จากการคำนวณใกล้เคียงกันผลการทดลองมากขึ้น ส่วนความต้านทานการถ่ายเทมวลของผนังเคลือบชั้นนอกสุด แม้จะไม่ให้ผลตามที่คาดคะเนไว้ แต่ก็ให้ผลที่เป็นประโยชน์หลายประการ เช่น ค่าคงที่คอลัมน์ของคอลัมน์เมื่อหาจากเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟหนึ่ง (Finigan 9001) สามารถจะนำไปใช้กับเครื่อง Shimadzu 14A ได้ นอกจากนี้ค่าคงที่คอลัมน์ HT-5 ทั้งสอง (polyimide and aluminium clad) สามารถใช้ค่าเดียวกันในได้ (ข้อมูลในตารางที่ 11 ใช้ค่า a, b, c และ d เดียวกัน) ซึ่งจะสะดวกต่อบริษัทผู้ผลิตอย่างมาก คือผลิตออกมาครั้งละหลายๆ แต่หาค่าคงที่คอลัมน์เพียงคอลัมน์เดียว

การศึกษาเพื่อนำสมการพื้นฐาน Eq 35 นี้ ไปประยุกต์ใช้ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมินี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้น ซึ่งสามารถขยายการศึกษานี้ออกไปได้อีกมาก เช่น การขยายออกไปถึง multi-step programming การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณค่า n จากเวลาคงค้างซึ่งใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารโดยตรง นอกจากนี้แล้ว ปัจจุบันได้มีอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ที่จะควบคุมอัตราไหลในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิจากที่คลอค ซึ่งการคำนวณค่าเวลาคงค้างอาจจะไม่ต้องใช้ตัวปรับแก้อัตราไหล หรือสามารถใช้สมการ Eq 51 ได้โดยตรง

3. ผลของความยาวคอลัมน์ต่อค่าคงตัวคอลัมน์

สมการ Eq 35 สามารถใช้วิเคราะห์เอกลักษณ์สารได้ดีทั้งในสภาวะอุณหภูมิกงที่ หรือปรับเปลี่ยนมาอยู่ในรูปสมการ Eq 51 ก็สามารถใช้ คำนวณเวลาคงค้างสารใน TPGC ความถูกต้องในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารนั้นขึ้นกับค่าคงตัวคอลัมน์อย่างมาก ดังนั้น ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบต่างๆ ที่จะส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงค่าคงตัวคอลัมน์นี้มีความจำเป็น เพื่อจะได้หลีกเลี่ยงในขณะวิเคราะห์สาร ปัจจัยที่จะศึกษาในหัวข้อนี้ได้แก่ความยาวคอลัมน์ กล่าวคือ หากคอลัมน์ที่ใช้งานอยู่นั้นเกิดการแตกหักและสั้นลง จะส่งผลกระทบต่อความแม่นยำในการวิเคราะห์เอกลักษณ์สารหรือไม่ อย่างไร การทดลองนี้ทำโดยวิธีการง่ายๆ คือ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มม ยาว 30 เมตร ภายในเคลือบด้วย Omegawax หนา 0.2×10^{-6} เมตร (จากบริษัท Supelco Bellefonte PA)) ที่ได้หาค่าคงที่ไว้แล้ว (จากการศึกษาในข้อ 2 การทำนายเวลาคงค้างในแก๊สโครมาโตกราฟีแบบโปรแกรมอุณหภูม) มีค่า $a = -7.55$, $b = -0.48$, $c = 1496$ และ $d = 379$ (สำหรับกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์) นำคอลัมน์นี้มาตัดให้สั้นลงทีละ 3 เมตร เหลือ 27, 24 และ 21 เมตรตามลำดับ แล้วทดสอบความคลาดเคลื่อนของเวลาคงค้างจากการคำนวณกับเวลาคงค้างจากการทดลองที่ได้จากฉีกรีดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดเงาะและเมล็ดขางพาราโคย in situ transmethylation ตามวิธีของ Kalayasiri และได้กล่าวรายละเอียดในวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สภาวะอุณหภูมิกงที่

ในสภาวะอุณหภูมิกงที่การคำนวณค่า ECL ทำได้ง่าย โดยแทนค่า a , b , c และ d ลงในสมการ Eq 35 จะได้ Eq 54

$$\ln k' = -7.55 - 0.48 \cdot ECL + \frac{1496}{T} + \frac{379 \cdot ECL}{T} \quad \text{Eq 54}$$

ความยาวคาร์บอนเทียของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ที่คำนวณได้จากคอลัมน์ยาว 27 เมตร 24 เมตร และ 21 เมตร อุณหภูมิ 170 – 200 °C ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 12 – 14 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 เวลาคงค้างของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดเงาะและเมล็ดขางพาราที่ระเหยออกจากคอลัมน์ Omegawax 250 ขนาด 27 เมตร ที่อุณหภูมิ 170 - 200 °C และความยาวคาร์บอนเทียบเท่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ Eq 54

FAMES	ECL	170 °C ($t_b=0.618$)		180 °C ($t_b=0.637$)		190 °C ($t_b=0.635$)		200 °C ($t_b=0.643$)	
		t_b	ECL	t_b	ECL	t_b	ECL	t_b	ECL
16:0	16.00	4.529	16.03	3.380	16.00	2.538	16.00	2.016	15.99
17:0	17.00	6.341	17.04	4.573	17.02	3.326	17.02	2.551	17.02
18:0	18.00	8.950	18.04	6.277	18.02	4.432	18.04	3.291	18.04
18:1	18.18	9.544	18.22	6.700	18.23	4.724	18.26	3.497	18.27
18:2	18.59	11.199	18.68	7.781	18.69	5.423	18.72	3.917	18.70
18:3	19.21	14.042	19.31	9.597	19.32	6.595	19.37	4.715	19.38
20:0	20.00	18.287	20.04	12.158	20.03	8.130	20.05	5.704	20.06
20:1	20.18	19.281	20.19	12.875	20.20	8.633	20.24	6.055	20.22

ตารางที่ 13 เวลาคงค้างของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดเงาะและเมล็ดขางพาราที่ระเหยออกจากคอลัมน์ Omegawax 250 ขนาด 24 เมตร ที่อุณหภูมิ 170 - 200 °C และความยาวคาร์บอนเทียบเท่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ Eq 54

FAMES	ECL	170 °C ($t_b=1.096$)		180 °C ($t_b=1.02$)		190 °C ($t_b=1.106$)		200 °C ($t_b=1.072$)	
		t_b	ECL	t_b	ECL	t_b	ECL	t_b	ECL
16:0	16.00	7.934	15.99	5.347	15.96	4.400	15.98	3.385	15.97
17:0	17.00	11.116	17.01	7.246	16.98	5.756	16.88	4.287	17.00
18:0	18.00	15.745	18.02	9.951	17.99	7.665	18.01	5.532	18.02
18:1	18.18	16.776	18.20	10.618	18.20	8.166	18.23	5.810	18.21
18:2	18.59	19.685	18.65	12.329	18.66	9.275	18.70	6.510	18.66
18:3	19.21	24.703	19.29	15.236	19.30	11.385	19.34	7.790	19.30
20:0	20.00	32.187	20.02	19.310	20.00	14.065	20.02	9.616	20.05
20:1	20.18	34.02	20.17	20.45	20.17	14.094	20.21	10.192	20.26

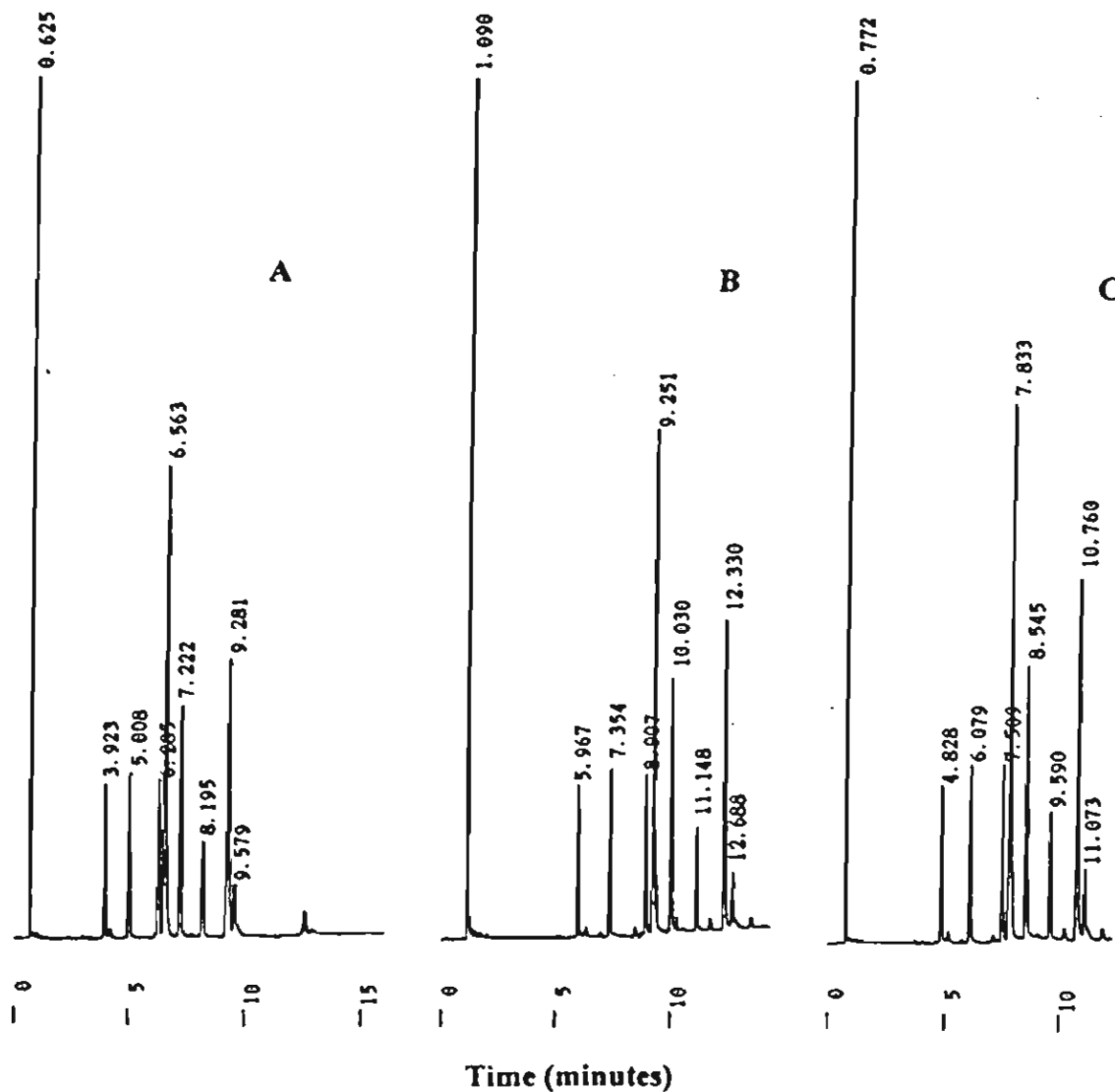
ตารางที่ 14 เวลาคงค้างของกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดเงาะและเมล็ดขางพาราที่ชะออกจากคอลัมน์ Omega wax 250 ขนาด 21 เมตร ที่อุณหภูมิ 170 - 200 °C และความยาวคาร์บอนเทียบเท่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการ Eq 54

FAMES	ECL	170 °C ($t_0=0.753$)		180 °C ($t_0=0.815$)		190 °C ($t_0=0.82$)		200 °C ($t_0=0.83$)	
		t_R	ECL	t_R	ECL	t_R	ECL	t_R	EC#
16:0	16.00	5.587	15.99	4.252	15.98	3.245	15.95	2.567	15.95
17:0	17.00	7.815	16.99	5.751	17.00	4.24	16.97	3.243	16.98
18:0	18.00	11.045	17.99	7.894	18.00	5.636	17.98	4.178	18.00
18:1	18.18	11.786	18.17	8.424	18.19	5.998	18.19	4.446	18.24
18:2	18.59	13.809	18.62	9.757	18.64	6.887	18.66	5.010	18.69
18:3	19.21	17.302	19.25	12.044	19.27	8.359	19.30	6.010	19.36
20:0	20.00	22.537	19.98	15.287	20.00	10.311	19.98	7.237	20.02
20:1	20.18	23.810	20.13	16.172	20.15	10.937	20.17	7.660	20.22

ความคลาดเคลื่อนสูงสุดของ กรดไขมันอื่นตัวอยู่ที่ 0.06 หน่วยคาร์บอน และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเท่ากับ 0.17, 0.13 และ 0.14 หน่วยคาร์บอนสำหรับคอลัมน์ยาว 27, 24 และ 21 เมตร ตามลำดับ นั่นคือ ขนาดความยาวคอลัมน์ที่ลดสั้นลงถึงร้อยละ 30 จะยังไม่ส่งผลต่อค่าคงตัวคอลัมน์

3.2 สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ (TPGC)

การศึกษายังได้ทดสอบกับกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดเงาะและเมล็ดขางพาราในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ 170 – 220 °C ดังรูปที่ 16 เนื่องจากยังไม่สามารถพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการคำนวณค่า ECL ในสภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ การศึกษาจึงใช้การคำนวณเวลาคงค้างจากค่า ECL โดยใช้สมการ Eq 53 และคำนวณโดยใช้ Microsoft Excel version 8 ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก ผลที่คำนวณได้สรุปไว้ในตารางที่ 15 แยกค่าสูงสุดของคอลัมน์ยาว 27, 24 และ 21 เมตรประมาณร้อยละ 1.16, 1.51 และ 1.18 ตามลำดับ



รูปที่ 16 แก๊สโครมาโตแกรมกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์และกรดไขมันจากคอลัมน์
 Omegawax 250 (0.25 mm I.D.) ในสภาวะ TPGC ตั้งแต่ 170 °C - 220 °C อัตราเพิ่ม 4 °C/นาที หุตุที่
 อุณหภูมิสุดทำย 60 นาที คัวเลขบนยอดพิค คือ เวลาคงค้ำเป็นนาที

A; คอลัมน์ยาว 27 เมตร, หุตุที่อุณหภูมิเริ่มคั้น 1 นาที.

B; คอลัมน์ยาว 24 เมตร, หุตุที่อุณหภูมิเริ่มคั้น 1 นาที.

C; คอลัมน์ยาว 21 เมตร, หุตุที่อุณหภูมิเริ่มคั้น 1.5 นาที

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบเวลาคงค้างกรดไขมันเมทิลเอสเทอร์จากเมล็ดงาและขางพาราที่ชะออกจากคอลัมน์แก๊สโครมาโทกราฟีใน TPGC กับเวลาคงค้างจากการคำนวณตามสมการ Eq 53

FAMEs	ECL ^a	27 meter (t ₀ =0.625)			24 meter (t ₀ =1.090)			21 meter (t ₀ =0.772)		
		Experimental	Calculated	%Δ ^b	Experimental	Calculated	%Δ	Experimental	Calculated	%Δ
16:0	16.00	3.923	3.96	-0.94	5.976	6.05	-1.24	4.828	4.842	-0.29
17:0	17.00	5.008	5.05	-0.84	7.354	7.43	-1.03	6.079	6.104	-0.41
18:0	18.00	6.285	6.33	-0.72	8.907	8.97	-0.71	7.509	7.548	-0.52
18:1	18.18	6.563	6.58	-0.26	9.251	9.26	-0.10	7.833	7.824	0.11
18:2	18.59	7.222	7.17	0.72	10.030	9.93	1.00	8.545	8.468	0.90
18:3	19.21	8.195	8.10	1.16	11.148	10.98	1.51	9.590	9.477	1.18
20:0	20.00	9.281	9.35	-0.74	12.33	12.33	0.00	10.760	10.805	-0.42
20:1	20.18	9.579	9.64	-0.64	12.688	12.65	0.30	11.073	11.113	-0.36

^a from references 12 and 19

^b %Δ= ผลต่างร้อยละระหว่างการทดลองและการคำนวณ

3.3 สรุปและเสนอแนะ

การศึกษาในบทนี้ อาจกล่าวโดยสรุปได้ว่าความยาวคลื่นไม่มีผลต่อค่าคงตัวคลื่นทั้ง 4 ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี กล่าวคือ หากพิจารณาสมการ Eq 31

$$\ln k' = a + b\alpha + \frac{c}{T} + \frac{d\alpha}{T} \quad \text{Eq 35}$$

เทอมทางซ้ายมือ ซึ่งค่า

$$\ln k' = \ln K - \ln \beta \quad \text{Eq 55}$$

ค่า K (ค่าคงที่สมดุลภาพ) ไม่ควรเปลี่ยนแปลง เนื่องจากวัฏภาคนิ่งนั้นและแก๊สตัวพายังคงเดิม และการตัดคลื่นก็ไม่มีผลต่อค่า β (อัตราส่วนวัฏภาค) ดังนั้น ผลการทดลองนี้ เป็นการยืนยันหลักการทางทฤษฎี และผู้วิเคราะห์จะเกิดความสบายใจได้ว่า หากคลื่นเกิดการแตก หรือหักสั้นลง ผู้ใช้ยังคงสามารถใช้ค่าคงตัวคลื่นเดิมได้ต่อไป จนกว่าโครงสร้างทางเคมีของวัฏภาคนิ่งเปลี่ยนแปลงไป เช่นถูกออกซิไดซ์ หรือสลายด้วยน้ำ เมื่อถึงจุดดังกล่าว ค่าความอำนาจการแยกสารจะเปลี่ยนแปลงไปถึงจุดที่จะต้องเปลี่ยนคลื่นตัวใหม่แล้ว

เอกสารอ้างอิง

1. Martin A.J.P. and Synge, R.L.M., *Biochem. J.*, **35**: 1358 (1941).
2. Twsett, M. S. "Khromfilli v Rastitel'nom i Zhivotnom Mire" Izd Karbasnikov, Warsaw, (1910) 380. (cited by R. P.W. Scott in "*Techniques and Practice of Chromatography*" Marcel Deckker, Inc, New York,(1995) p4.
3. คณิต กฤษณังกูร แก๊สโครมาโตกราฟี (ISBN 974-621-213-3) งานเอกสารและการพิมพ์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี, 2540
4. James, A.T. and Martin, A.J.P. Gas-liquid partition chromatography: The separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.* **50**:679-690 (1952).
5. Gold, H.J. Estimation of Column Holdup Time in Gas Chromatography When Using Ionization Detectors. *Anal Chem.* **34**:174(1962).
6. Wainright, M.S. and J.K. Haken. Evaluation of Procedure for the Estimation of Dead Time. *J. Chromatogr.* **184**:1(1980).
7. Smith, J.F. Relative G.L.C. retention data using a single standard. *Chem. Ind. (London)* **32**: 1024-1025 (1960).
8. Kovats, E. Gas chromatographic characterization of organic compounds. Part 1. Retention indexes of aliphatic halides, alcohols, aldehydes and ketones. *Helv. Chim. Acta* **41**:1915-1932 (1958).
9. Pacakova, V. and Feltl, L. (translated by Stulik, K. Masson, M. ed.). *Chromatographic Retention Indices: An Aid to Identification of Organic Compounds*. Ellis Horwood, Ltd., London, 1992.
10. Miwa, T.K. Micolajczak, K.L. Earle, F.R. and Wolff, I.A. Gas chromatographic characterization of fatty acids: Identification constants for mono- and dicarboxylic methyl esters. *Anal. Chem.* **32**: 1739-1742 (1960).
11. Woodford, F.P. and van Gent, C.M. Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters: the "carbon-number" as a parameter for comparison of columns. *J. Lipid Res.* **1**: 188-190 (1960).
12. Christie, W.W. "Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide", The Oily Press, Scotland 1990, p98-98.
13. Jamieson, G.R. and E.H. Reid. The Analysis of Oils and Fats By Gas Chromatography VIII. Correlation of Retention Data With Polarity of Stationary Phase. *J. Chromatogr.* **42**:304(1969).

14. Krupcik, J. and Bohov, P. *Use of equivalent chain lengths for the characterization of fatty acid methyl esters separated by linear temperature-programmed gas chromatography. J. Chromatogr.* 346:34-42 (1985).
15. Ackman, R.G., Letters to editor. *J. Chromatogr. Sci.* 10: 535-536 (1972).
16. Vandenheuvel, W.J.A., Gardiner, W.L. and Horning, E.C. *A Comparison of the Behavior of the Hydrocarbons Used as Reference Standards in the Determination of "Steroid Numbers" and "Methylene Units"; Selective Retention of Steroid Hydrocarbons By Polar Stationary Phases. J. Chromatogr.* 20:387-395(1967).
17. Yabumoto, K., Jennings, W.G. and Yamaguchi, M. Gas Chromatographic Retention as Identification Criteria. *Anal Biochem.* 78:244(1977).
18. McNair, H.M. and E.T. Bonelli, "Basic Gas Chromatography", 5th ed., Varian Aerograph, Walnut Creek, 1969.
19. Krisnangkura, K., Tancharoon, A., Konkao, C. and Jeyashoke, N. *An alternative method for determination of equivalent chain length or carbon number of fatty acid methyl esters in gas chromatography. J. Chromatogr. Sci.* 35:329-332 (1997).
20. Guillaume, Y. and Guinchard, C. *Effect of ester molecular structure and column temperature on retention of eight esters in gas chromatography. Chromatographia* 39: 438-442 (1994).
21. Calvalli, E.J. and Guinchard, C. *Forecasting retention times in temperature-programmed gas chromatography. J. Chromatogr. Sci.* 33:371-376 (1995).
22. Kalayasiri, P., Jeyashoke, N. and Krisnangkura, K. *Survey of Seed Oils for Use as Diesel Fuels, J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol. 73 p. 471-474 (1996).
23. Krop, H.B., M.v. Velzen, M.J., Parsons J.R. and Govers H.A.J. *Determination of environmentally relevant physical-chemical properties of some fatty acid esters. J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:309-315 (1997).
24. Christie, W.W. *Equivalent Chain Length of Methyl Ester Derivatives of Fatty Acids on Gas Chromatography: A Reappraisal. J. Chromatogr.* 447:305-314 (1988).
25. Chretien J.R. and Dubois J.E. *New Perspectives in the Prediction of Kovats Indices. J. Chromatogr.* 126:171-189(1976).
26. Van den Dool, H. and Kratz, P.D. *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr.* 11:463-471 (1963).

27. Zhu, A. *Calculation of retention indices in temperature-programmed capillary gas chromatography. J. Chromatogr.* 331:229-235 (1985).
28. Guan, Y. and Zhou, L. *Live retention database for identification in multi-step temperature-programmed capillary gas chromatography. J. Chromatogr.* 552:187-195 (1991).
29. Knoppel, M. De Bortoli, A. Peil and H. Vissers. *Reproducibility of temperature-programmed gas chromatographic retention indices with non-polar glass capillary columns. J. Chromatogr.* 279:483-492(1983).
30. Whalen-Pedersen, E.K. and Jurs, P.C. *Calculation of linear temperature programmed capillary gas chromatographic retention indices of polycyclic aromatic compounds. Anal. Chem.* 53:2184-2187(1981).
31. Sun, Y. Zhang, R. Wang, Q. and Xu, B. *Programmed temperature gas chromatographic retention index. J. Chromatogr.* 657:1-15 (1993).
32. Gonzalez F.R. and Nardillo A.M. Retention in Multistep Programmed-temperature Gas Chromatography and Flow Control Linear Head Pressure Programs. *J. Chromatogr. A.* 757:109-118(1997).
33. Jennings W. In "Gas Chromatography with Glass Capillary Column" Academic Press New York, (1978) p85.

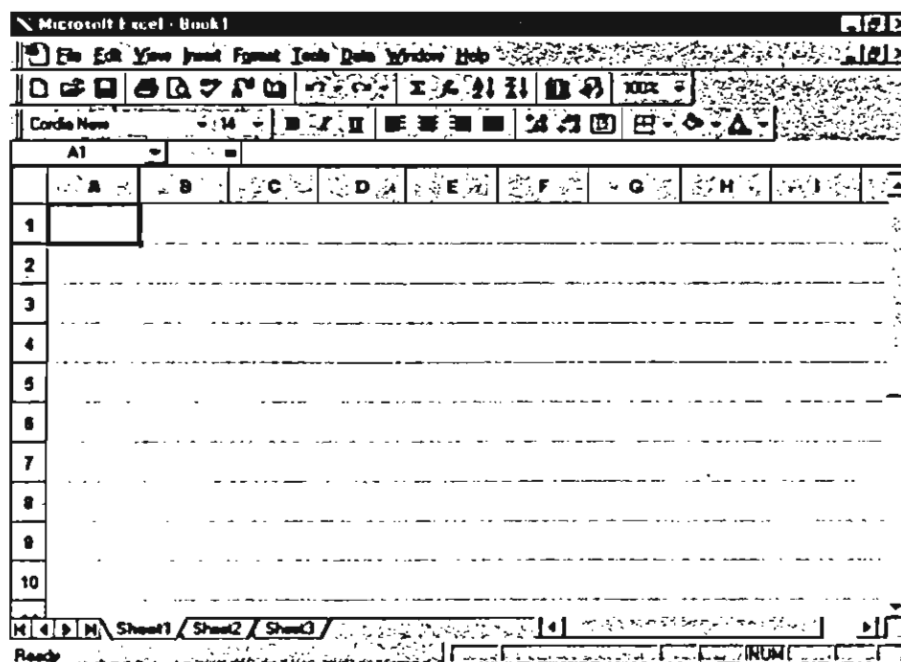
ผลงานที่ตีพิมพ์

1. K. Kittiratanapaiboon, N. Jeyashoke and K. Krisnangkura. The relationship of Kováts retention indices and equivalent chain lengths of fatty acid methyl esters on a methyl silicone capillary column. *J. Chromatogr. Sci.* 36: 361-364(1998)
2. K. Kittiratanapaiboon, N. Jeyashoke and K. Krisnangkura. Forecasting retention times of fatty acid methyl esters in temperature-programmed gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 36: 541-546(1998).
3. Nilratananisakorn S., Jeyashoke N. and Krisnangkura K. *Effect of Column Length on Forecasted Retention Times and Equivalent Chain Length of Fatty Acid Methyl Esters in an Isothermal and Temperature-programmed Gas Chromatography.* Submitted the revised manuscript to Science Asia.

4. คณิศา กิดศิริคนโทบุลย์ นฤมลจิรัช และ คณิศ กฤษณังกูร การหาค่าดัชนีโกแวตซ์ของกรค ไขมัน เมทิลเอสเทอร์บนคอลัมน์โอวี-101 โดยไม่ใช้สารอ้างอิง วารสารวิทยาศาสตร์ ปีที่ 53/4 262 –268 (2542).
5. คณิศา กิดศิริคนโทบุลย์ นฤมลจิรัช และ คณิศ กฤษณังกูร การหาค่าดัชนีโกแวตซ์ของกรค ไขมัน เมทิลเอสเทอร์บนคอลัมน์โอวี-101 โดยไม่ใช้สารอ้างอิง การประชุมวิชาการ วทท ครั้งที่ 24(2541), 394-395.
6. วณิดา วงศ์สัมพันธชัย นฤมลจิรัช และ คณิศ กฤษณังกูร ความแปรผันของประสิทธิภาพของ แคปิลลารีคอสตาร ในอนุกรมพียงันเคียวกัน การประชุมวิชาการ วทท ครั้งที่ 25(2542), 1242-1243.
7. คณิศา กิดศิริคนโทบุลย์ นฤมลจิรัช และ คณิศ กฤษณังกูร การทำนายเวลาคงค้างของกรค ไขมันเม ทิลเอสเทอร์ที่สภาวะโปรแกรมอุณหภูมิ การประชุมวิชาการ วทท ครั้งที่ 25(2542), 1244-1245.

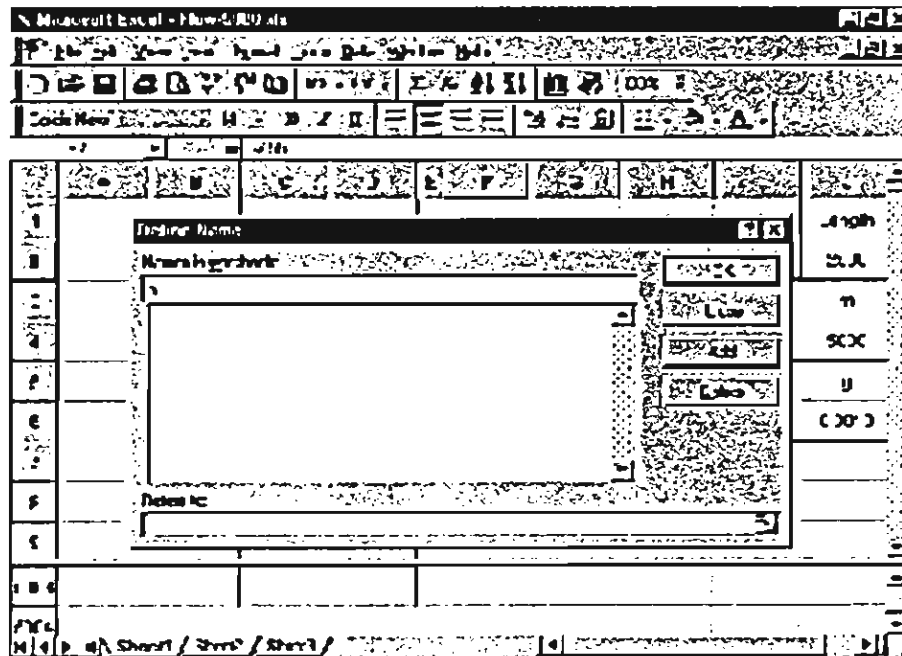
ภาคผนวก ก

การคำนวณเวลาคงค้างจากจำนวนคาร์บอน หรือ ECL ใน TPGC โดยใช้ Microsoft excel 97 (version 8.0) เมื่อเปิดโปรแกรม Excel จะได้ ภาพหน้าจอ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ภาพหน้าจอเมื่อเปิด โปรแกรม Excel version 8.0

จากนั้นเริ่มป้อนข้อมูลค่าคงที่ต่างๆ ของสมการ Eq 53 โดยเริ่มที่เซลล์ F1 – J2 โดยใส่ค่า a, b, c, d และความยาวคอลัมน์เป็นเซนติเมตร ในรูปที่ 1 มีค่า 2500 (คือ 25 เมตร) ค่านี้จะไม่มีผลต่อค่าเวลาคงค้างที่คำนวณได้ ไม่ว่าจะใส่ 1000 หรือ 3000 จะให้ค่าเวลาคงค้างเท่ากัน click mouse ที่เซลล์ F2 click insert ที่ Menu bar ซึ่ไปที่ Name และ click ที่ define จะให้ ภาพหน้าจอ ดังรูปที่ 2 ให้พิมพ์ a และ [Enter] ซึ่งเป็นการกำหนดค่าในเซลล์ F2 นี้เป็นค่าคงที่ a



รูปที่ 2

จากนั้นให้กำหนดเขต G2 = b เขต H2 = cc เขต I2 = d และ J2 = L

- เขต F4 เป็นค่า x ใส่ค่าโดยการพิมพ์ [= cc + d*CN] และกำหนดเป็นค่าคงที่ x เขต G4 เป็นค่า y ใส่ค่าโดยการพิมพ์ [= a + b*CN] และกำหนดเป็นค่าคงที่ y เขต H5 กำหนดเป็นค่าคงที่ Ti (initial temperature) เขต I4 กำหนดเป็นค่าคงที่ Tf (final temperature) เขต J4 คือจำนวนส่วนคอลัมน์ที่แบ่ง กำหนดเป็นค่าคงที่ m เขต F6, G6, H6, I6, J6, กำหนดเป็นค่าคงที่ ht (hold time), G (temperature gradient), CN (carbon number, t0 (hold up time) s (slope) ตามลำดับ เมื่อกรอกข้อมูลเรียบร้อยแล้วให้ภาพหน้าจอ ดังรูปที่ 3

Microsoft Excel - Book1										
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	Tr	Ln		a	b	c	d	Length
2						-7.55	-0.48	1498	379	2500
3						x	y	Ti	Tf	m
4						9834.00	-18.110	443	493	1000
5						Hold time	Gradient	n	ln	g
6						0	0	22	0.948	0.0013
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										

รูปที่ 3

พิมพ์ข้อความเขต A1 – D1 ตามรูปที่ 4 ใส่ค่า 0 ที่ เขต A2 และ C2 เขต D2 พิมพ์ $[=t0+s*(B2-Ti)]$ และ
เขต B2 พิมพ์ $[=IF(C2<ht,Ti,IF(Ti+G*(C2-hi)<Tf,(Ti+G*(C2-hi)),Tf))]$

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	tr	tm	a	b	c	d	Length	
2	0	443.00	0	0.948	-7.55	-0.48	1496	379	2500	
3					x	y	ti	tf	m	
4					9834.00	-18.110	443	493	1000	
5					Hold time	Gradient	n	tm	g	
6					0	8	22	0.948	0.0013	
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										

รูปที่ 4

เขต A3 พิมพ์ $[=A2+L/m]$ เขต C3 พิมพ์ $[=C2+D2/m*(1+EXP(x/B2+y))]$ Drag Mouse จากเขต B2 - B3
เขต B3 จะขึ้นแถบค่า จากนั้น click Edit ที่ Menu bar ซึ่ไปที่ Fill และ click ที่ Down จะได้ภาพหน้าจอ
ดังรูปที่ 5

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	tr	tm	a	b	c	d	Length	
2	0	443.00	0	0.9480	-7.55	-0.48	1496	379	2500	
3	8.5		0.001		x	y	ti	tf	m	
4					7560.00	-15.230	443	493	5000	
5					Hold time	Gradient	n	tm	g	
6					0	8	16	0.948	0.0013	
7										
8										
9										
10										
11										

รูปที่ 5

ทำลักษณะเดียวกันกับเซลล์ D2 และ D3 จะได้ภาพหน้าจอดังรูปที่ 6

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	ir	lm		a	b	c	d	Length
2	0	443.00	0	0.9480		-7.55	-0.48	1498	379	2500
3	2.5	443.48	0.058	0.9488		x	y	π	π	m
4						9834.00	-18.110	443	493	1000
5						Hold time	Gradient	n	lm	g
6						0	8	22	0.948	0.0013
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										

รูปที่ 6

ใช้ Mouse ป้ายแถบเซลล์ A3 – B3 ดังรูปที่ 7

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	ir	lm		a	b	c	d	Length
2	0	443.00	0	0.9480		-7.55	-0.48	1498	379	2500
3	2.5	443.48	0.058	0.9488		x	y	π	π	m
4						9834.00	-18.110	443	493	1000
5						Hold time	Gradient	n	lm	g
6						0	8	22	0.948	0.0013
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										

รูปที่ 7

วาง mouse ที่มุมล่างของเซลล์ D3 ให้ได้เครื่องหมาย + ที่มุมพอดี กดปุ่มซ้ายของ mouse แล้วลาก (drag) ลงไปจนถึงแถบที่ 1003 (หรือเซลล์ D1003) แล้วปล่อย mouse (จะลากเป็นหลายจังหวะก็ได้) จะได้หน้าจอหน้าแรกดังรูปที่ 8

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	IR	IRm		a	b	c	d	Length
2	0	443.00	0	0.9480		-7.55	-0.48	1498	379	2500
3	2.5	443.08	0.007	0.9481		x	y	TI	TI	m
4	5	443.11	0.014	0.9481		7580.00	-15.230	443	493	1000
5	7.5	443.17	0.021	0.9482		Hold time	Gradient	n	IRm	g
6	10	443.22	0.027	0.9483		0	8	18	0.948	0.0013
7	12.5	443.27	0.034	0.9484						
8	15	443.33	0.041	0.9484						
9	17.5	443.38	0.048	0.9485						
10	20	443.44	0.055	0.9488						
11	22.5	443.49	0.062	0.9488						
12	25	443.55	0.068	0.9487						
13	27.5	443.60	0.075	0.9488						

รูปที่ 8

ในรูปที่ 8 นั้นจะมองไม่เห็นค่าตอบ การจะทำให้มองเห็นค่าตอบในหน้าเดียวกันทำได้ 2 วิธีคือ 1 split screen โดยใช้ Mouse click ที่บรรทัดที่ 11 (Row 11) บรรทัดที่ 11 จะขึ้นแถบคำเลื่อน Mouse ไป click Window บน Menu bar และ click Split หน้าจอจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน เลื่อน Scroll bar แนวตั้งทางขวามือไปจนถึงแถวที่ต้องการ (1003) ก็จะมองเห็นค่าตอบบนหน้าจอเดียวกัน หรืออาจจะ Temp และ IR ในเซลล์ F8 และ G8 ส่วนเซลล์ F9 พิมพ์ [=B1003-273] ค่าอุณหภูมิในเซลล์ B1003 จะถูกเปลี่ยนเป็นเซลล์ชีตส ในเซลล์ F9 และเซลล์ G9 พิมพ์ [=C1003] ค่าเวลาคงค้างสารจะปรากฏที่เซลล์ G9 นี้ ดังภาพหน้าจอรูปที่ 9

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	IR	IRm		a	b	c	d	Length
2	0	443.00	0.0000	0.9480		-7.55	-0.48	1498	379	2500
3	0.5	443.01	0.0014	0.9480		x	y	TI	TI	m
4	1	443.02	0.0028	0.9480		7580.00	-15.230	443	493	5000
5	1.5	443.03	0.0041	0.9480		Hold time	Gradient	n	IRm	g
6	2	443.04	0.0055	0.9481		0	8	18	0.948	0.0013
7	2.5	443.06	0.0069	0.9481						
8	3	443.07	0.0083	0.9481		Temp	IR			
9	3.5	443.08	0.0098	0.9481		179.50	4.175			
10	4	443.09	0.0110	0.9481						
5002	2500	478.40	4.1747	0.9914						
5003	2500.5	478.40	4.1752	0.9914						

รูปที่ 9

Worksheet ในรูปที่ 9 นี้จะเป็นหน้าจอขณะใช้งาน เมื่อต้องการคำนวณเวลาคงค้างสาร เพียงแค่พิมพ์ตัวเลขข้อมูลที่จะเปลี่ยนแปลงลงไป ในเซลล์ที่ต้องการ เช่น จำนวนคาร์บอนหรือ ECL = 20 ใส่ค่า 20

ลงในเซลล์ H6 เวลาคงตัวของสกรู = 1.000 ใส่ค่านี้ลงใน I6 อัตราเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 4 °C/นาที ที่ใส่
เลข 4 ลงในเซลล์ G6 เมื่อพิมพ์ค่าลงไปแต่ละครั้ง Excel จะคำนวณค่าอย่างรวดเร็ว ค่าตอบจะปรากฏใน
ภาพหน้าจอรูปที่ 10 โดยมีค่าอุณหภูมิเท่ากับ 214.18 °C ในเซลล์ F9 และเวลาคงค้าง (IR) เท่ากับ 11.045
นาทีในเซลล์ G9

Microsoft Excel - Flow 5000.xls										
File Edit View Insert Format Tools Data Window Help										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Position	Temp	Ir	Im		a	b	c	d	Length
2	0	443.00	0	1.0000		-7.55	-0.48	1496	379	2500
3	2.5	443.12	0.029	1.0002		x	y	n	m	
4	5	443.23	0.058	1.0003		9076.00	-17.150	443	493	1000
5	7.5	443.35	0.087	1.0005		Hold time	Gradient	n	Im	g
6	10	443.46	0.116	1.0006		0	4	20	1.000	0.0013
7	12.5	443.58	0.144	1.0008						
8	15	443.69	0.173	1.0009		Temp	IR			
9	17.5	443.80	0.201	1.0010		214.18	11.045			
10	20	443.92	0.229	1.0012						
1002	2500	487.16	11.039	1.0574						
1003	2502.5	487.18	11.045	1.0574						

รูปที่ 10

ภาคผนวก ข

โปรแกรม Qbasic ที่ใช้ในการคำนวณเวลาคงค้างสารใน TPGC คัดแปลงจาก Calvalli and Guinchard⁽²¹⁾

CLS

PRINT "PREDICTION OF RETENTION TIME OF TPGC"

PRINT

PRINT

a = -7.55

b = -0.48

c = 1496

d = 379

n = 1000

DO

DO

PRINT "HOW MANY STAGE DO YOU HAVE IN YOUR TEMPERATURE PROGRAM?"

INPUT "(A STAGE INCLUDE A FACULTATIVE HOLD OF THE INITIAL TEMPERATURE):", r

s = VAL(r\$)

LOOP UNTIL s > 0

PRINT

PRINT

REDIM Ti(s), ht(s), Tf(s), g(s)

PRINT "INITIAL TEMPERATURE OF STAGE No1";

INPUT r\$

Ti(1) = VAL(r\$)

FOR i = 1 TO s

DO

PRINT "FINAL TEMPERATURE OF STAGE No"; i; ":";

INPUT r\$

Tf(i) = VAL(r\$)

LOOP UNTIL Tf(i) > Ti(i)

IF i < s THEN Ti(i + 1) = Tf(i)

DO

```

        PRINT "HOLD TIME OF STAGE"; i;
        INPUT r$
        ht(i) = VAL(r$)
    LOOP UNTIL ht(i) >= 0
    DO
        PRINT "TEMPERATURE GRADIENT OF STAGE No"; i; ":";
        INPUT r$
        g(i) = VAL(r$)
    LOOP UNTIL g(i) > 0
        PRINT
        PRINT
    NEXT I
    PRINT "Ti", "HOLD", "Tf", "G"
    FOR i=1 TO s
        PRINT Ti(i), ht(i), Tf(i), g(i)
    NEXT
    INPUT "ARE THOSE VALUES CORRECT ? (Y/N)", r$
    LOOP WHILE (r$ <> "Y" AND r$ <> "y")
    PRINT
    DO
        INPUT "ENTER THE VALUE OF DEAD TIME:", r$
        t0 = VAL(r$)
    LOOP UNTIL t0 > 0
        PRINT "DEAD TIME = "; t0
    DO
        INPUT "IS THIS VALUE CORRECT ? (y/n)", r$
    LOOP WHILE (r$ <> "y" AND r$ <> "Y")
        PRINT
        PRINT
    DO
        PRINT
        INPUT "THE CARBON NUMBER= ", r$

```

```

        CN = VAL(r$)
        x = a + b * CN
        y = c + d * CN
    REDIM t(s, 1)
    t(0, 1) = 0
    FOR I = 1 TO s
        t(i, 0) = t(i - 1, 1) + ht(i)
        t(i, 1) = t(i, 0) + (Tf(i) - Ti(i)) / g(i)
    NEXT I
    PRINT
    tr = 0
    FOR i = 0 TO n
        'CALCULATION OF THE OVEN TEMPERATURE j=0
        DO
            J=j+1
            LOOP UNTIL tr < t(j, 1) OR j = s
            IF tr < t(1, 0) THEN TEMP = Ti(j) ELSE TEMP = Ti(j) + g(1) * (tr - t(j, 0))
            IF tr > t(s, 1) THEN TEMP = Tf(s)
            'CALCULATION OF tr+Dtr
            tr = tr + t0 * (1 + EXP(x + y / (TEMP + 273))) / n
        NEXT i
    PRINT "retention time = "; tr,
    PRINT "Temperature = "; TEMP.
    PRINT "ECL = "; CN
    INPUT "DO YOU WANT TO CALCULATE OTHER CARBON NUMBER ? ", a$
    LOOP UNTIL a$ = "n" and a$="Y"

```