รายงานวิจัย

เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC

LC Automatic Fraction Collector

รายนามคณะผู้วิจัย

นายสัตยา บุญรัตนชู

นางสาวทรงสุดา พรหมทอง

นายอุทัย ไทยเจริญ

นายก้องเกียรติ รักษ์วงศ์

นายฮัมดัน มะเซ็ง

ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่องานวิจัย เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC

ชื่อคณะผู้วิจัย นายสัตยา บุญรัตนชู นางสาวทรงสุดา พรหมทอง
นายอุทัย ไทยเจริญ นายก้องเกียรติ รักษ์วงศ์ และ นายฮัมดัน มะเซ็ง

หน่วยงาน ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC (LC Automatic Fraction Collector) การพัฒนาได้ออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างแบบถาดหมุนสามารถบรรจุขวดเก็บตัวอย่างได้สูงสุด 12 ขวด ความจุขวดละ 20 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC18F252 เป็นตัวควบคุม สามารถเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ต RS-232 อีกทั้งได้พัฒนาโปรแกรมส่วนติดต่อกับผู้ใช้งาน เพื่อใช้ควบคุมการทำงานและกำหนดค่าการเก็บตัวอย่าง ในรูปแบบกราฟฟิก (Graphic User Interface) ทำให้สะดวกต่อการใช้งานเป็นอย่างมาก

ผลของการทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถเก็บตัวอย่างจากการแยกได้อย่างแม่นยำ และสามารถวนรอบการเก็บตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติ เพื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่าง อีกทั้งยังสามารถบันทึกโครมาโตแกรมเพื่อเรียกดูย้อนหลังได้

คำสำคัญ : เครื่องเก็บตัวอย่าง, เครื่องบันทึกข้อมูล, HPLC

Research Title **LC Automatic Fraction Collector**

Name **Mr.Sathaya Bunratchoo Miss.Songsuda Promtong**
Mr.Utai Thaicharean Mr.Kongkiat Rakwong
and Mr.Humdan Maseng

Organization **Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University**

Abstract

This research was to design and to fabricate the automatic faction collector from LC (Liquid Chromatograph). The tray collector was developed to certain maximum of 12 vial (20 ml of each) by using the microcontroller (PIC18F252) connected to the computer via RS-232 port and it was developed the user's program to control the operating and setting of collection values on Graphic User Interface (GUI). It was very convenient to use.

The result of the operation testing of automatic fraction collector found that it could be collect precisely of fraction and automatic interval collection to add amount of sample and it could be saved the chromatogram for retraining.

Keyword : Fraction Collector, Data logger, HPLC

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญ	iv
รายการภาพประกอบ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย	1
1.2 การตรวจเอกสาร	2
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	5
2.1 หลักการทำงานเบื้องต้นของอุปกรณ์ LC	5
2.2 หลักการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างจากการแยกของอุปกรณ์ LC	8
2.3 สรุปท้ายบท	8
บทที่ 3 การออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC	9
3.1 การออกแบบชุดเก็บตัวอย่าง	9
3.2 การออกแบบวงจรอิเลคทรอนิกส์และ PCB	13
3.3 พัฒนาโปรแกรมไมโครคอนโทรลเลอร์และโปรแกรมคอมพิวเตอร์	17
3.4 สรุปท้ายบท	21
บทที่ 4 การทดสอบการทำงานของเครื่องต้นแบบ	22
4.1 การทดสอบการทำงานของเครื่องต้นแบบ	22
4.2 สรุปท้ายบท	25
บทที่ 5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดสอบ	26
5.1 สรุปขั้นตอนของการวิจัย	26
5.2 สรุปผลการทดสอบ	26
5.3 สรุปคุณสมบัติเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4 ปัญหาและข้อเสนอแนะ	27
5.5 แนวทางในการพัฒนาต่อไปในอนาคต	27
ภาคผนวก	28
ก. คู่มือการใช้งานเครื่อง / โปรแกรม	29
ข. การติดตั้งโปรแกรม	39
ค. Data Sheet	42
ง. เอกสารอ้างอิง	48

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
ภาพประกอบที่ 1-1 Diagram การเก็บตัวอย่างจากการแยกของอุปกรณ์ LC	1
ภาพประกอบที่ 2-1 Diagram พื้นฐานของ LC	5
ภาพประกอบที่ 2-2 ตัวอย่าง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100	6
ภาพประกอบที่ 2-3 ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย LC	7
ภาพประกอบที่ 2-4 Block diagram การเก็บตัวอย่างจากการแยกของอุปกรณ์ LC	8
ภาพประกอบที่ 3-1 ถาดเก็บตัวอย่างแบบถาดหมุนที่ออกแบบ	9
ภาพประกอบที่ 3-2 ถาดเก็บตัวอย่างที่สร้างขึ้น	10
ภาพประกอบที่ 3-3 ถาดเก็บตัวอย่างชั้นล่างรองรับขวดเก็บตัวอย่าง	10
ภาพประกอบที่ 3-4 แกนหมุนและเฟืองสำหรับขับถาดเก็บตัวอย่าง	11
ภาพประกอบที่ 3-5 Servo motor ควบคุมทิศทางของการเก็บตัวอย่าง	11
ภาพประกอบที่ 3-6 เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ (ด้านหน้า)	12
ภาพประกอบที่ 3-7 เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ (ด้านหลัง)	12
ภาพประกอบที่ 3-8 ด้านหลังเครื่องสำหรับเชื่อมต่อกับ PC และ LC	13
ภาพประกอบที่ 3-9 วงจรแปลงสัญญาณจาก Analog เป็นสัญญาณ Digital ขนาด 22 บิต	13
ภาพประกอบที่ 3-10 PCB วงจรแปลงสัญญาณจาก Analog เป็นสัญญาณ Digital ขนาด 22 บิต	14
ภาพประกอบที่ 3-11 วงจรสมบูรณ์ เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติส่วนควบคุม	15
ภาพประกอบที่ 3-12 วงจรสมบูรณ์ เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติส่วนเชื่อมต่อสัญญาณ	16
ภาพประกอบที่ 3-13 PCB สองหน้าของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ	16
ภาพประกอบที่ 3-14 PCB ที่ได้ออกแบบพร้อมอุปกรณ์	17
ภาพประกอบที่ 3-15 ตำแหน่งของพีคที่ใช้ระบุในตารางการเก็บตัวอย่าง	18
ภาพประกอบที่ 3-16 Flow chart การทำงานของโปรแกรม	19
ภาพประกอบที่ 3-17 โครมาโตแกรมต้นแบบที่ได้จากการ Export จาก Chemstation ในรูปแบบ CSV File	20
ภาพประกอบที่ 3-18 หน้าต่างตั้งค่าอัตราการไหลและความยาวท่อ	21
ภาพประกอบที่ 4-1 โครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC	23

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
ภาพประกอบที่ 4-2 ตารางเก็บตัวอย่าง	23
ภาพประกอบที่ 4-3 โครมาโตแกรมที่ได้จาก Data analysis report ของ HPCHEM	23
ภาพประกอบที่ 4-4 โครมาโตแกรมที่ได้จากการเก็บ Fraction ของ พีค ที่ 1	24
ภาพประกอบที่ 4-5 โครมาโตแกรมที่ได้จากการเก็บ Fraction ของ พีค ที่ 2	24
ภาพประกอบที่ 4-6 โครมาโตแกรมที่ได้จากการเก็บ Fraction ของ พีค ที่ 3	25
ภาพประกอบที่ 4-7 โครมาโตแกรมที่ได้จากการเก็บ Fraction ของ พีค ที่ 4	25
ภาพประกอบที่ ก-1 หน้าต่างหลัก SEC fraction collector v1.0b แสดงสถานะ Ready สีเทา	29
ภาพประกอบที่ ก-2 เมนูตั้งค่าเชื่อมต่อ RS-232	29
ภาพประกอบที่ ก-3 หน้าต่าง Com Port setup การเลือก COM Port และ กำหนดค่า Baud Rate	30
ภาพประกอบที่ ก-4 หน้าต่างหลักแสดงสถานะ Ready สีเหลือง	30
ภาพประกอบที่ ก-5 หน้าต่าง Maintenance ตั้งค่าอัตราการไหลและความยาวท่อ	31
ภาพประกอบที่ ก-6 หน้าต่างการตรวจสอบ / เปลี่ยนแปลง อัตราการไหล และ ความยามท่อ	32
ภาพประกอบที่ ก-7 หน้าต่างการทดสอบการทำงานของถาดเก็บตัวอย่าง	32
ภาพประกอบที่ ก-8 หน้าต่างทดสอบการทำงานของ Servo motor	33
ภาพประกอบที่ ก-9 หน้าต่าง File> Open เรียกโครมาโตแกรม	33
ภาพประกอบที่ ก-10 หน้าต่าง Open fileสำหรับเลือก file นามสกุล .mbd	34
ภาพประกอบที่ ก-11หน้าต่างสำหรับเลือก Sample_id	34
ภาพประกอบที่ ก-12 ขั้นตอนการ Import โครมาโตแกรม	35
ภาพประกอบที่ ก-13 หน้าต่าง Open file เพื่อเลือก CSV File ที่ต้องการ Import	35
ภาพประกอบที่ ก-14 เมนูค้นหาพีคอัตโนมัติ (Auto find Peak)	36
ภาพประกอบที่ ก-15 ตัวอย่าง ตารางเก็บตัวอย่าง	36
ภาพประกอบที่ ก-16 หน้าต่างหลักแสดงสถานะ Ready สีเขียว	37
ภาพประกอบที่ ก-17 โครมาโตแกรม ณ เวลาจริงและ Fraction ที่กำลังเก็บ	38
ภาพประกอบที่ ก-18 เมนู Exit เพื่อออกจากโปรแกรม	38
ภาพประกอบที่ ข-1 หน้าต่าง X-Frac Setup Wizard	39
ภาพประกอบที่ ข-2 หน้าต่าง Select Installation Folder	40

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

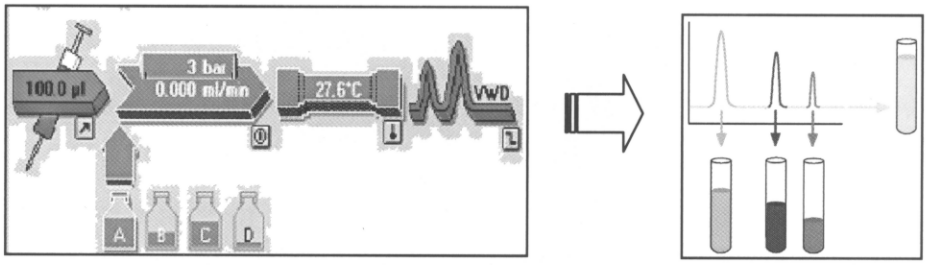
ภาพประกอบ	หน้า
ภาพประกอบที่ ข-3 หน้าต่าง Confirm Installation	40
ภาพประกอบที่ ข-4 หน้าต่าง Installing X-Frac	41
ภาพประกอบที่ ข-5 หน้าต่าง Installation Complete	41
ภาพประกอบที่ ค-1 คุณสมบัติโดยรวมของไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC18F252	42
ภาพประกอบที่ ค-2 ตัวถังแบบ SOIC	43
ภาพประกอบที่ ค-3 ตารางแสดงคุณสมบัติเทียบกับ เบอร์อื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน	43
ภาพประกอบที่ ค-4 Block Diagram ของ PIC18F252	44
ภาพประกอบที่ ค-5 คุณสมบัติโดยรวมของ MCP3551	45
ภาพประกอบที่ ค-6 รูปแบบการเชื่อมต่อข้อมูลแบบอนุกรมของ MCP3551	46
ภาพประกอบที่ ค-7 คุณสมบัติโดยรวมของ KIA278R05	46
ภาพประกอบที่ ค-8 คุณสมบัติโดยรวมของ ULN2804	47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

นักวิจัยในมหาวิทยาลัยส่วนใหญ่ประสบปัญหาคล้ายๆ กันคือขาดแคลนเครื่องมือวิจัยที่ทันสมัยเพื่อใช้ในการวิจัย เนื่องจากงบประมาณที่มีอยู่อย่างจำกัด เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัยที่มีอยู่ส่วนใหญ่แม้จะยังคงทำงานได้ แต่ก็ล้าสมัยและทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ กล่าวคือเครื่องมือวิจัยยังไม่สามารถทำงานแบบอัตโนมัติที่เต็มรูปแบบ ต้องคอยควบคุมการทำงานทีละขั้นตอนและต้องคอยจดบันทึกผลการทดลองทุกๆ ขั้นตอนด้วยตัวเอง ทำให้ต้องเสียเวลาคอยควบคุมการทำงานและบันทึกผลการทดลองไปพร้อมๆ กัน ในบางครั้งผลลัพธ์ที่ได้จากการทดลองก็มีมากหรือเร็วจนบันทึกไม่ทัน ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ละเอียดพอและเกิดการสูญเสียของข้อมูลที่สำคัญ หากจะซื้อเครื่องมือวิจัยใหม่ซึ่งทันสมัยกว่าและทำงานแบบอัตโนมัติได้ ค่าใช้จ่ายในการลงทุนก็ค่อนข้างสูง โดยที่เครื่องรุ่นเก่าที่มีอยู่ยังคงใช้งานได้ ไม่คุ้มค่ากันงบประมาณที่ลงทุนไป หนึ่งในเครื่องมือเหล่านี้ก็คือ เครื่อง Liquid Chromatograph (LC) ซึ่งใช้หลักในการแยกและวิเคราะห์สารประกอบในรูปของเหลว ซึ่งหากต้องการแยกเก็บตัวอย่างที่ผ่านการแยกจากคอลัมล์ (Column) มาแล้ว ก็สามารถทำได้โดยการนำขวดมารองรับสารตัวอย่างซึ่งจะไหลออกมาจาก Output ของ Detector ดังภาพประกอบที่ 1-1



ภาพประกอบที่ 1-1 Diagram การเก็บตัวอย่างจากการแยกของอุปกรณ์ LC

ปริมาณสารที่ได้จากการแยกในแต่ละครั้งจะมีปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่องมือวิจัยอื่น (เช่น NMR, Mass spectrometer) หากต้องการปริมาณที่มากพอจะต้องทำซ้ำโดยการฉีดตัวอย่างหลายๆ ครั้งซึ่งจะใช้เวลาค่อนข้างนาน (ประมาณสิบนาทีต่อการ

ฉีดตัวอย่างหนึ่งครั้งและจะได้สารที่ต้องการแยกประมาณ 5-10 ไมโครลิตร (ปริมาณในการฉีดตัวอย่างแต่ละครั้งจะไม่เกิน 100 ไมโครลิตร) ในปัจจุบันเครื่องเก็บตัวอย่างจากการแยก (Fraction Collector) มีหลายบริษัทในต่างประเทศที่ผลิตเพื่อจำหน่าย แต่มีราคาที่สูงมาก (หนึ่งแสนถึงสามแสนบาทขึ้นกับคุณสมบัติในการเก็บเช่น จำนวน Fraction การรักษาอุณหภูมิของสารตัวอย่าง เป็นต้น) จึงมีอุปสรรคด้านงบประมาณที่จะสั่งซื้อมาใช้งานในห้องปฏิบัติการหากความถี่ในการใช้งานไม่มากพอ แต่ด้วยโครงสร้างของ Detector ซึ่งจะให้สัญญาณ Output ที่เป็นสัญญาณ Analog สำหรับต่อเข้ากับ Chart recorder เพื่อบันทึกข้อมูลในรูปแบบของกราฟบนกระดาษกราฟ เราสามารถพัฒนาชุดควบคุมการหมุนของขวดเก็บตัวอย่างขึ้นมาเพื่อเลือกรับ Fraction ของตัวอย่างลงในขวดแบบอัตโนมัติได้ด้วยไมโครคอนโทรเลอร์และคอมพิวเตอร์ โดยอาศัยสัญญาณจาก Detector ซึ่งบอกลักษณะ Chromatogram ของสัญญาณว่าจะต้องเก็บตัวอย่าง ณ ตำแหน่งใดเวลาใดและสามารถทำซ้ำกระบวนการเดิมได้โดยอัตโนมัติเมื่อมีการฉีดตัวอย่างใหม่ ด้วยวิธีการนี้จะสามารถสร้าง Automatic Fraction Collector ได้ในราคาไม่เกิน 50,000 บาทต่อเครื่องในขณะเดียวกันสามารถนำไปประยุกต์ใช้กันเครื่องมือวิจัยรุ่นเก่า ที่ไม่สามารถเก็บข้อมูลผ่านคอมพิวเตอร์ได้ (เดิมใช้ Integrator ในการบันทึกกราฟ) ทำให้ลดการสิ้นเปลืองอุปกรณ์ของ Integrator ซึ่งมีราคาแพงและหาซื้อยาก

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 Iamphai, S. *et al.* 2005 (1) ศึกษา ผลของสารสกัดฮอร์โมนโพรเจสเทอโรน และ 17 แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเทอโรน จากแม่เพรียงทราย *Perinereis sp.* ต่อการพัฒนาเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ Penaeus monodom โดยศึกษาปริมาณของฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด จากแม่เพรียงทราย ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Reverse Phase Column C18 ขนาด 0.46 x 15 cm ด้วยอัตราการไหล 1 ml/min ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ คือ เมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 80 : 20 โดยปริมาตร และ แยกเก็บสารสกัดฮอร์โมนทั้ง 2 โดยเก็บ Fraction ของฮอร์โมนแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกมาจาก HPLC เพื่อนำสารสกัดฮอร์โมนที่แยกได้ไปใช้ในการศึกษาการพัฒนาของ cell ไข่กุ้งกุลาดำ

1.2.2. Hebestreit, M. *et al.* 2006 (2) ศึกษา การวิเคราะห์สารเริ่มต้นของ urinary norandrosterone ที่มีปริมาณน้อยด้วยเทคนิค spectrometry ที่วัดอัตราส่วนมวลของไอโซโทปที่ได้จากการเผาไหม้จากเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC/C/IRMS) โดยสารที่สนใจศึกษาคือ 19-norandrosterone (NA) แต่โดยทั่วไปใน urinary norandrosterone จะมี androsterone (AND) และ

etiocholanolone (ETIO) ปนอยู่ด้วยดังนั้นจึงต้องสกัด 19-norandrosterone (NA) ให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะวิเคราะห์ ซึ่งวิธีการศึกษาประกอบด้วย 7 ขั้นตอน คือ 1. การสกัดสารด้วยชุดสกัดของแข็ง RP-SPE 2. การทำปฏิกิริยา hydrolysis ด้วย เอนไซม์ 3. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (liquid – liquid extraction) 4. การแยกสารให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 1 ด้วย NP- HPLC 5. การแยกสารให้บริสุทธิ์ครั้งที่ 2 ด้วย RP- HPLC 6.วิเคราะห์สารที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค (GC/C/IRMS) 7. ประมวลผลการวิเคราะห์ ขั้นตอนที่ 4 และ 5 นั้นได้ใช้ HPLC ในการแยกสารซึ่งขั้นตอนที่ 4 ใช้เทคนิค NP-HPLC ในการแยกที่ได้จากการฉีดสาร 50 µl เข้า HPLC ที่มี Fraction Collector แบบอัตโนมัติ (Foxy 200, Isco, Lincoln, Nebraska, USA) ต่อกับ HPLC ใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด UV เพื่อเก็บ fraction 2 fraction คือ fractionที่1 มี NA และ AND รวมอยู่ด้วยกันเนื่องจากแยกไม่สมบูรณ์ และ Fraction ที่ 2 มี ETIO Fraction ที่ 1 ขั้นตอนที่ 4 นำมาแยก NA และ AND ให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิค RP-HPLC ในขั้นตอนที่ 5 แล้วเก็บ Fraction NA ที่บริสุทธิ์ที่ได้ในขั้นตอนที่ 5 นำไปวิเคราะห์สารที่ต้องการด้วยเทคนิค GC/C/IRMS ต่อไป

1.2.3. Vincent P. Nero. *et al.* 1984 (3) ศึกษา การทำให้ Polychlorinated Biphenyls (PCB) ในน้ำมันสะอาดขึ้นด้วยเทคนิค LC ก่อนทดสอบด้วย GC/MS ซึ่งในขั้นตอนการทำความสะอาด PCB ด้วย HPLC นั้นจะใช้ชุด Fraction Collector (Hewlett-Packard Model 79825A) ซึ่งควบคุมการทำงานด้วย microprocessor ต่อร่วมกับ HPLC โดยใช้ Multiwavelength UV-Visible Spectrophotometer เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ เพื่อเก็บสารที่ได้จากการทำความสะอาดนำไปทดสอบด้วย GC/MS ต่อไป

1.2.4. Aobchey, P. *et al.* 2002 (4) ศึกษา การผลิตผงสีแดงจากรากของ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ราก ขั้นตอนการสกัดสาร pigment นอกจากนำ crude มาแยกในขั้นตอนแรกด้วย TLC แล้ว ในขั้นตอนต่อมาได้ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วย LC ในการช่วยแยกสารเพื่อเก็บ Fraction และนำ Fractionของ pigment ที่บริสุทธิ์ที่ได้ไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ pigment ด้วย UV-Visible Spectroscopy, Mass Spectrometry และ C^{13} nuclear magnetic resonance spectroscopy ต่อไป

1.2.5. Annett, K. *et al.* (5) ศึกษา คุณสมบัติทางโครงสร้างของ humic และ สารประกอบเชิงซ้อนของmetal-humic ด้วยเทคนิค RP- HPLC และได้พัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีเพื่อแยกเก็บ Fraction ของ hydrophilic และ hydrophobic ของ humic โดยฉีด humic solution ผ่านคอลัมน์ชนิด C18 ใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด UV-Vis และ Fluorescence เพื่อเก็บ Fraction ของสารที่แยกได้

1.2.6. Dobrev, P.I. *et al.* 2005 (6) ศึกษา การสกัดสารให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ฮอร์โมนพืช auxin และ abscisic acid ด้วยเทคนิค Solid Phase Extraction ร่วมกับ 2D-HPLC โดยในส่วนการ

ทำสารสกัดจากฮอร์โมนให้บริสุทธิ์ด้วย 2D-HPLC นั้นได้ใช้ Fraction collector FC 203B (Gilson, Middleton,WI,USA) ในการเก็บสารสกัดที่ได้จากการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย HPLC และใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณ 2 ชนิดร่วมกัน คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ Diode Array Detector และ Fluorescence Detector โดยชุด Fraction Collector จะต่อกับ Fluorescence Detector

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1 สร้างเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ (Automatic Fraction Collector) ของอุปกรณ์ LC

1.3.2. ประยุกต์เทคโนโลยีขึ้นใช้เองและต่อยอดจากเทคโนโลยีที่มีอยู่

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 พัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ (Automatic Fraction Collector) ให้สามารถเก็บ Fraction ได้อย่างน้อย 10 Fraction ของอุปกรณ์ LC

1.4.2 พัฒนาโปรแกรมไมโครคอนโทรลเลอร์และโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อใช้ในการควบคุมและติดต่อผู้ใช้งาน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ประสิทธิภาพในการใช้งานอุปกรณ์ LC สูงขึ้น และใช้เวลาในการทำงานกับเครื่องมือวิจัยน้อยลง เพิ่มความสะดวกในการนำข้อมูลไปดำเนินการต่อเนื่องจากข้อมูลจะเก็บลงในคอมพิวเตอร์แทนที่จะพล็อตลงบนกระดาษกราฟซึ่งปรับเปลี่ยนสเกลได้ยาก

1.5.2. ได้เครื่อง Automatic Fraction Collector และ Integrator ไว้ใช้งานกับอุปกรณ์ LC รุ่นเก่าในราคาที่ไม่สูง

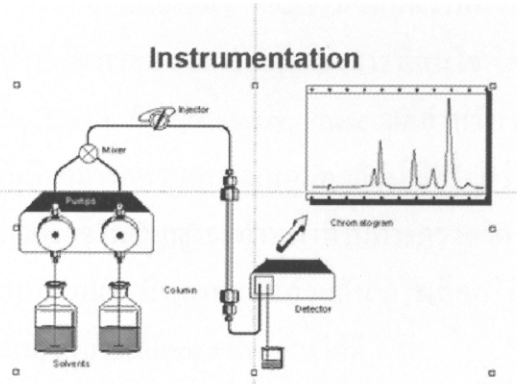
1.5.3. เป็นพื้นฐานเพื่อพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ในอนาคต เพื่อลดการนำเข้า และเพิ่มการพึ่งพาตนเอง

บทที่ 2

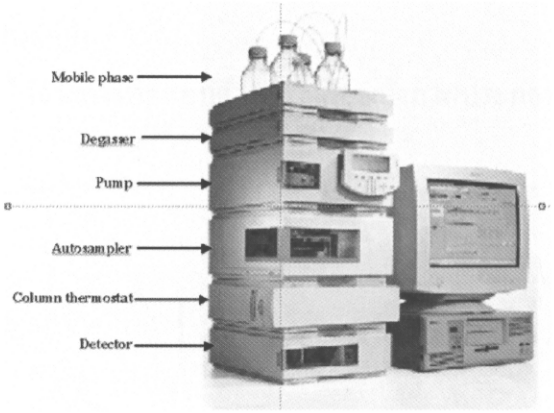
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 หลักการทำงานเบื้องต้นของอุปกรณ์ LC

เครื่อง LC (Liquid Chromatograph) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (Stationary Shase) ได้แก่ คอลัมน์ (Column) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ได้แก่ ตัวทำละลาย (Solvent) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ Mobile Phase หรือ Stationary Phase สารประกอบตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ Mobile Phase จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็วสารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ Mobile Phase หรือเข้ากันได้ดีกับ Stationary Phase จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรมโดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน รวมทั้งสามารถแยกเก็บตัวอย่างที่ผ่านการแยกจากคอลัมน์ได้เช่นกัน



ภาพประกอบที่ 2-1 Diagram พื้นฐานของ LC



ภาพประกอบที่ 2-2 ตัวอย่าง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

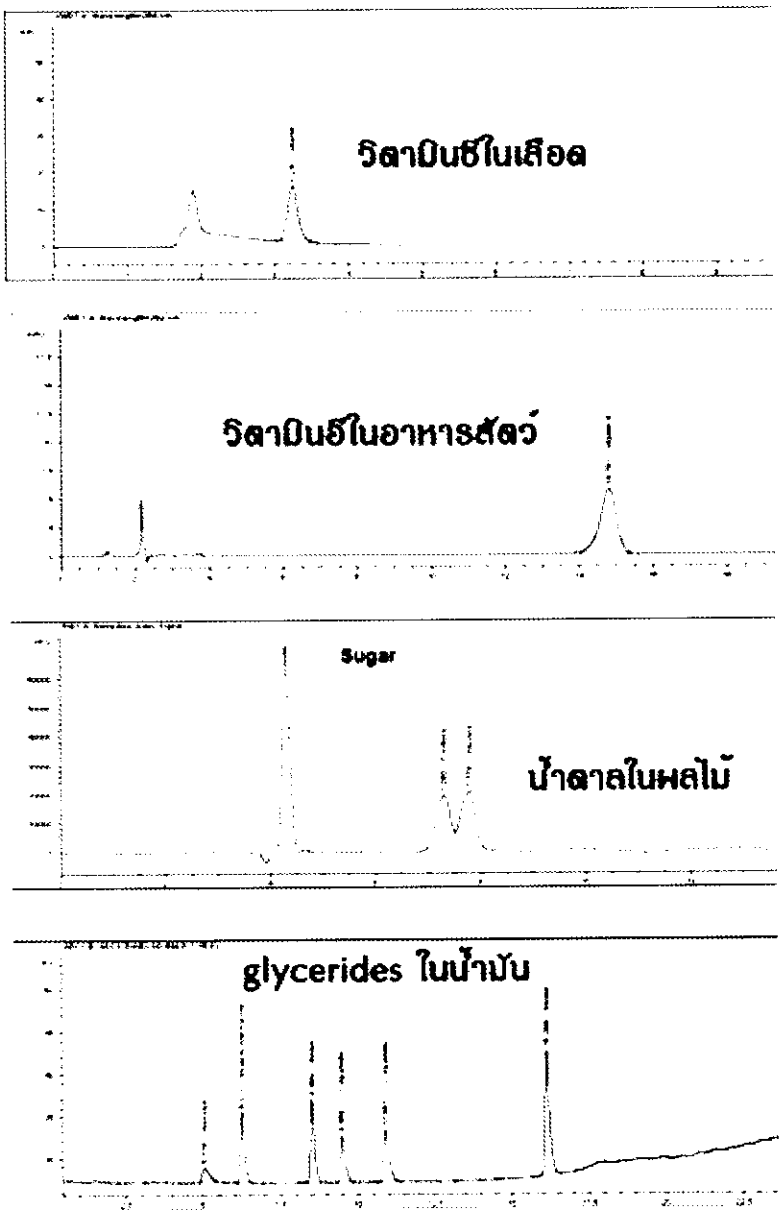
1. Mobile Phase / Solvent หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ Stationary Phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
2. Degaser ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน Mobile Phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ Column และ Detector
3. Pump ทำหน้าที่ส่งตัวทำละลาย (Mobile Phase) เข้าสู่ระบบ HPLC
4. Injector / Autosampler ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC
5. คอลัมน์ หรือจะเรียกว่า Stationary Phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง Mobile Phase กับ Stationary Phase แต่สำหรับ HPLC : Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ จึงเรียกว่า Column Thermostat
6. Detector คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี

ตัวอย่างการทดสอบด้วย HPLC เช่น หาปริมาณ

- วิตามินซี ในเลือด น้ำผลไม้
- วิตามินอี ในอาหารสัตว์
- น้ำตาลในน้ำผลไม้

- กลีเซอไรด์ ในน้ำมัน

ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดสอบด้วย LC แสดงดังภาพประกอบที่ 2-3

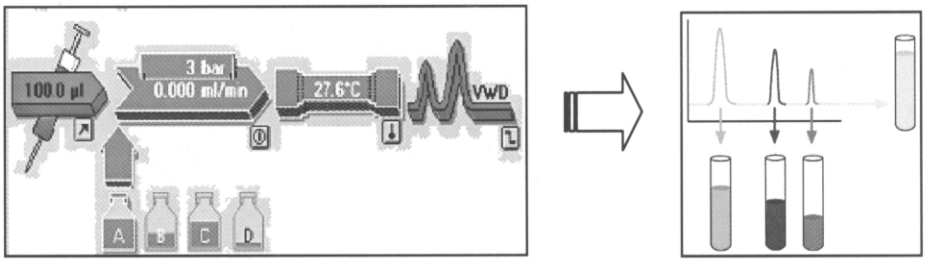


ภาพประกอบที่ 2-3 ตัวอย่างที่ทดสอบด้วย LC

ที่มา : http://share.psu.ac.th/blog/science-equipment/945

2.2 หลักการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างจากการแยกของอุปกรณ์ LC

จากหลักการทำงานเบื้องต้นของ LC จะเห็นได้ว่าตัวอย่างจะถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ หลังจากนั้นจะถูกตรวจวัดด้วย Detector ตัวอย่างที่ถูกแยก จะออกมาจากคอลัมน์ที่เวลาแตกต่างกัน หากต้องการแยกเก็บตัวอย่างที่ผ่านการแยกจากคอลัมน์มาแล้ว ก็สามารถทำได้โดยการนำขวดมารองรับสารตัวอย่างซึ่งจะไหลออกมาจาก Output ของ Detector ดังภาพประกอบที่ 2-4 ซึ่ง Automatic Fraction Collector จะต้องมีการเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ LC เพื่อให้การทำงานของ Automatic Fraction Collector มีการเข้าจังหวะกับการฉีดตัวอย่างของ LC รวมถึงจังหวะเวลาและระดับการตรวจจับของ Detector เพื่อความถูกต้องแม่นยำของการเลือกเก็บ Fraction ที่ต้องการได้



ภาพประกอบที่ 2-4 Block diagram การเก็บตัวอย่างจากการแยกของอุปกรณ์ LC

2.3 สรุปท้ายบท

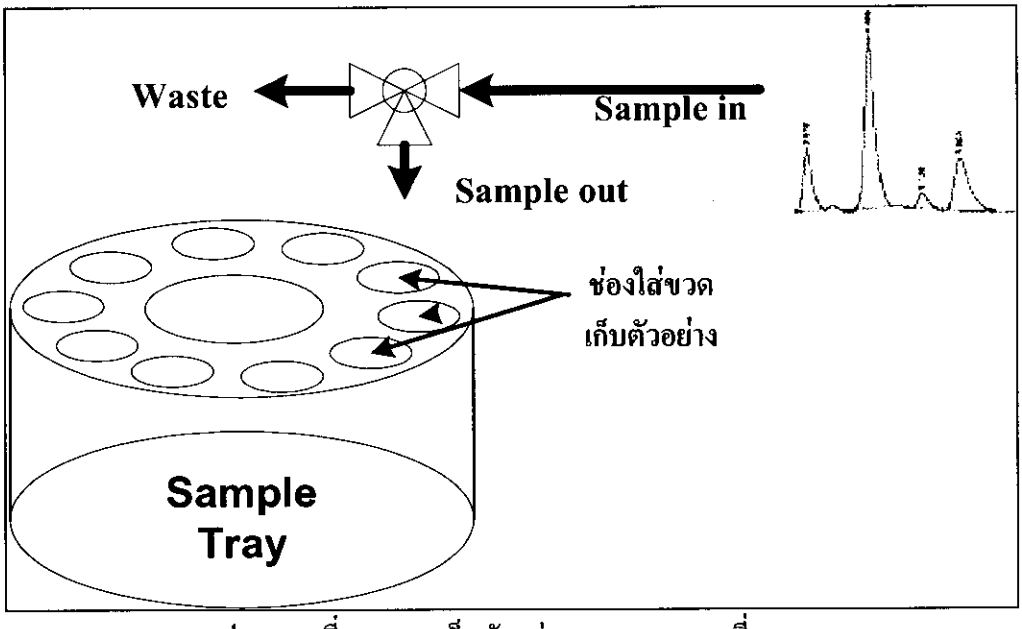
จากหลักการทำงานของ LC และขั้นตอนในการเก็บ Fraction นำไปสู่การออกแบบและสร้างเครื่องเก็บตัวอย่างต่อไปในบทที่ 3

บทที่ 3

การออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC

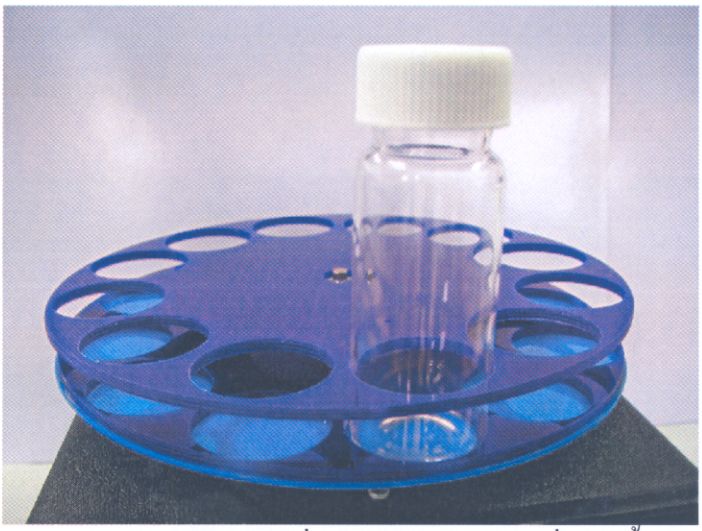
3.1 การออกแบบชุดเก็บตัวอย่าง

ขั้นตอนแรกได้พัฒนาถาดเก็บตัวอย่างและชุดควบคุมถาดเก็บตัวอย่าง โดยถาดเก็บตัวอย่างได้พัฒนาในลักษณะของถาดหมุน เนื่องจากสามารถออกแบบระบบควบคุมและชุดขับได้ง่ายกว่าระบบเก็บตัวอย่างแบบใช้แขนกล ซึ่งจะต้องควบคุมในลักษณะสามแกน (XYZ) ซึ่งถาดเก็บตัวอย่างที่ออกแบบจะมีลักษณะเหมือนแผ่นจาน 2 ชั้นเจาะช่องสำหรับใส่ขวดเก็บตัวอย่างสามารถหมุนได้ ดังแสดงในภาพประกอบที่ 3-1



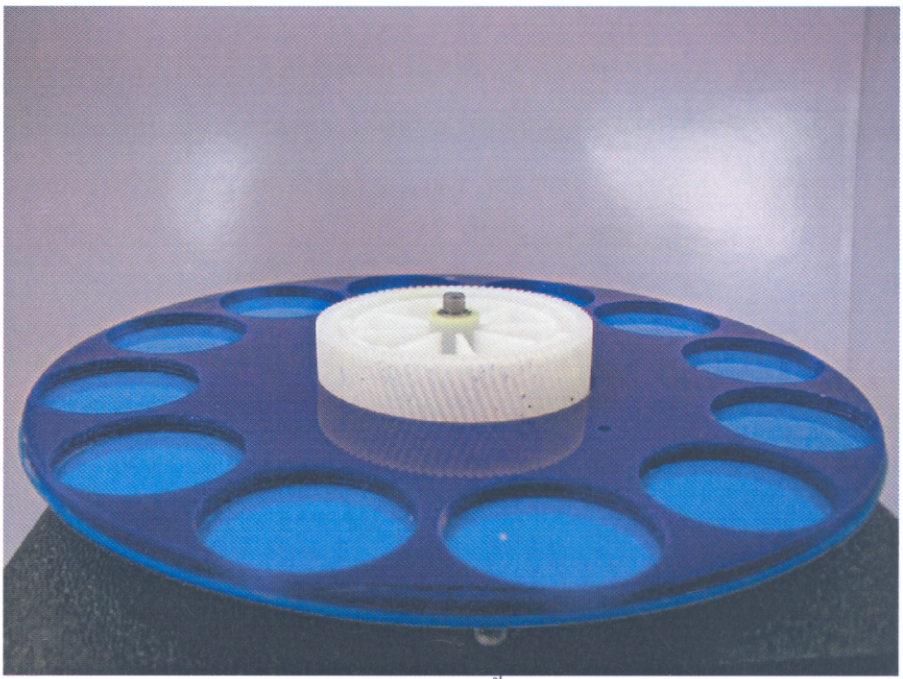
ภาพประกอบที่ 3-1 ถาดเก็บตัวอย่างแบบถาดหมุนที่ออกแบบ

ตัวอย่างที่ผ่านการแยกแล้วจะไหลออกมาตามท่อตามเวลาที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด และไหลผ่าน Three way valve ซึ่งจะถูกควบคุมโดยไมโครคอนโทรลเลอร์เพื่อเลือกว่าจะให้ตัวอย่างไหลลงสู่ขวดเก็บตัวอย่างใด หรือหากไม่ต้องการเก็บจะถูกปล่อยให้ไหลลงสู่ Waste เพื่อกำจัดต่อไป เมื่อได้รูปแบบของถาดเก็บตัวอย่างแล้วได้ดำเนินการสร้างตามต้นแบบที่ได้ออกแบบไว้ ดังภาพประกอบที่ 3-2



ภาพประกอบที่ 3-2 ถาดเก็บตัวอย่างที่สร้างขึ้น

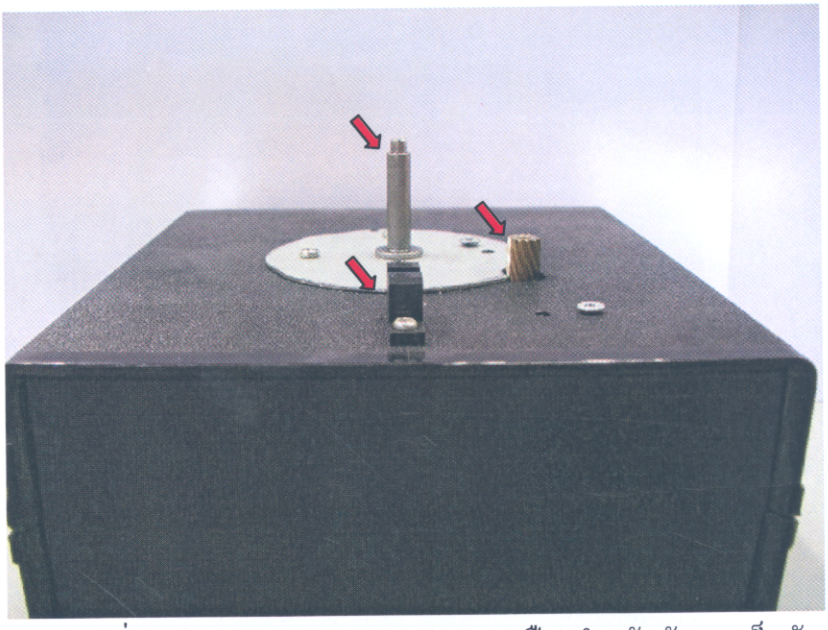
การสร้างเริ่มจากตัดแผ่นพลาสติกเป็นวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 152 มิลลิเมตร และเจาะช่องสำหรับใส่ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 28 มิลลิเมตร จำนวน 12 ช่องโดยชั้นล่างถูกรองโดยแผ่นพลาสติกที่ไม่ได้เจาะช่อง เพื่อใช้สำหรับรองรับขวดเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบที่ 3-3



ภาพประกอบที่ 3-3 ถาดเก็บตัวอย่างชั้นล่างรองรับขวดเก็บตัวอย่าง

ถาดเก็บตัวอย่างจะถูกวางอยู่บนแกนหมุนและถูกขับให้สามารถหมุนได้รอบโดยเฟืองทดรอบ ดังภาพประกอบที่ 3-4 การขับถาดเก็บตัวอย่างจะใช้ Stepping Motor ซึ่งจะมีความแม่นยำใน

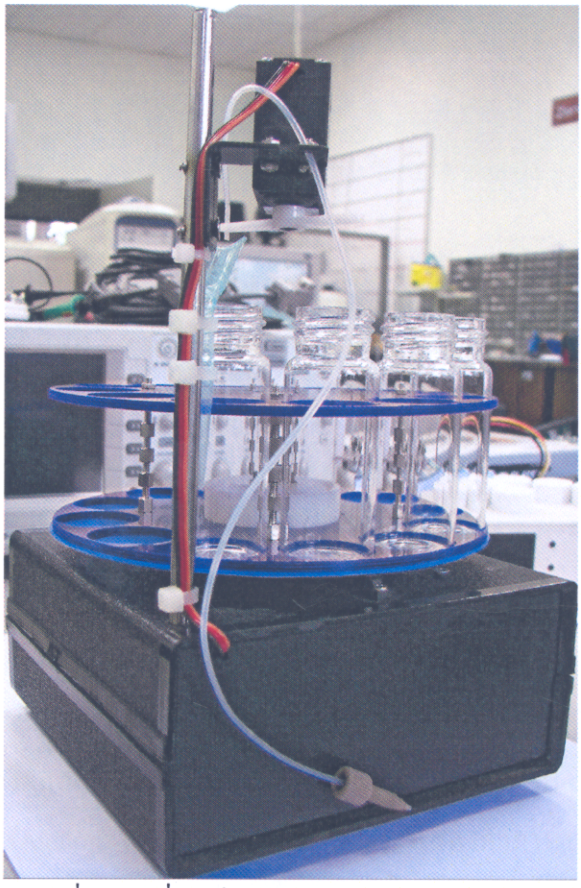
การกำหนดตำแหน่งของขวดเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมี Optical Sensor อีกตัวที่จะระบุตำแหน่งเริ่มต้นของถาดเก็บตัวอย่างอีกด้วย



ภาพประกอบที่ 3-4 Optical Sensor แกนหมุนและเฟืองสำหรับขับถาดเก็บตัวอย่าง

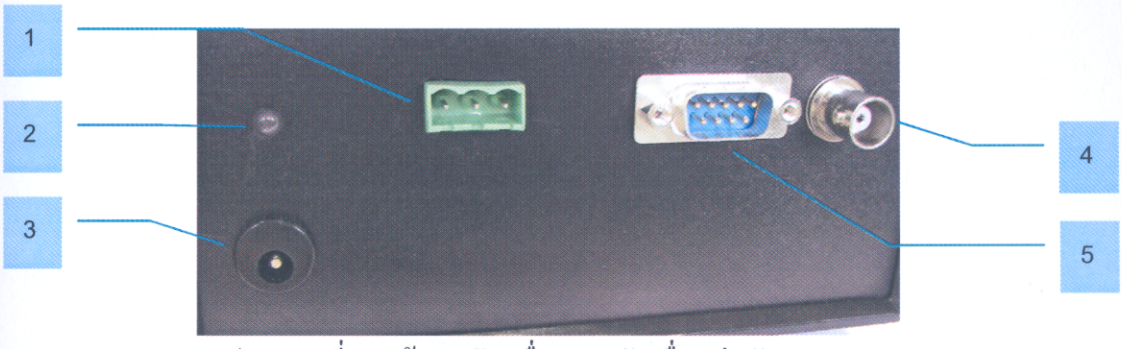
หลังจากนั้น นำถาดเก็บตัวอย่างทั้งสองชิ้นยึดเข้าด้วยกันด้วยอุปกรณ์ยึด PCB (Print Circuit Board) เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของถาดเก็บตัวอย่าง ขั้นตอนต่อไปได้ทำการติดตั้ง Servo motor สำหรับควบคุมการเก็บตัวอย่างของแต่ละ Fraction ที่ตรวจวัดได้ จากเดิมได้ออกแบบโดยใช้ Three way valve แต่เนื่องจาก Three way valve ขนาดเล็กมากสำหรับเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์มีราคาค่อนข้างสูงมาก (15,000 – 30,000 บาท) จึงไม่คุ้มทุนในการพัฒนาเป็นต้นแบบเพื่อนำมาสร้างเพิ่มเติมในอนาคต จึงได้ออกแบบใหม่โดยใช้ Servo motor แทนดังภาพประกอบที่ 3-5

ภาพประกอบที่ 3-5 Servo motor ควบคุมทิศทางของการเก็บตัวอย่าง



ภาพประกอบที่ 3-6 เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ (ด้านหน้า)

ภาพประกอบที่ 3-7 เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ (ด้านหลัง)



ภาพประกอบที่ 3-8 ด้านหลังเครื่องสำหรับเชื่อมต่อกับ PC และ LC

1 – RS-232 Port

2 – Communication status

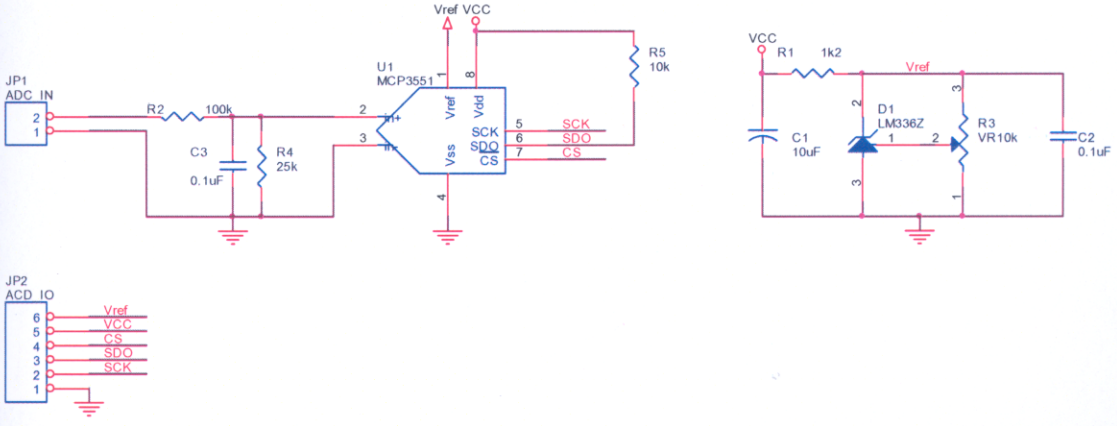
3 – Power input

4 – Analog input

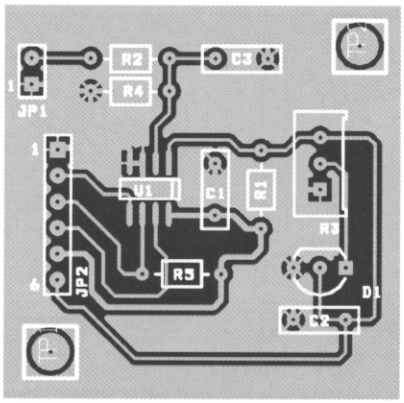
5 – Remote Port

3.2 การออกแบบวงจรอิเลคทรอนิกส์และ PCB

ในขั้นตอนแรกได้ออกแบบวงจรแปลงสัญญาณจาก Analog เป็นสัญญาณ Digital โดยใช้ตัวแปลงขนาด 22 บิต (Analog to Digital Converter) แสดงดังภาพประกอบที่ 3-9 เลือกใช้ MCP3551 เป็นตัวแปลงสัญญาณจาก Analog เป็น Digital ขนาด 22 บิตซึ่งเป็นความละเอียดที่สูงมากสามารถวัดได้ถึง 4,194,304 ระดับหรือละเอียดถึง 1 uV จากระดับแรงดัน 0-5 V ซึ่งเพียงพอต่อการใช้งาน นอกจากนี้ MCP3551 ยังสามารถหาซื้อได้ในประเทศในราคาไม่สูงมากนัก หลักการทำงานของวงจรในภาพประกอบที่ 3-9 LM336Z จะเป็นตัวสร้างแรงดันอ้างอิง 2.5 volt ให้แก่ MCP3551 ซึ่งจะมี R3 เป็นตัวต้านทานปรับค่าได้ สามารถปรับได้ละเอียดถึง 25 รอบเพื่อปรับแรงดันอ้างอิงให้คงที่ ที่ 2.5 volt



ภาพประกอบที่ 3-9 วงจรแปลงสัญญาณจาก Analog เป็นสัญญาณ Digital ขนาด 22 บิต

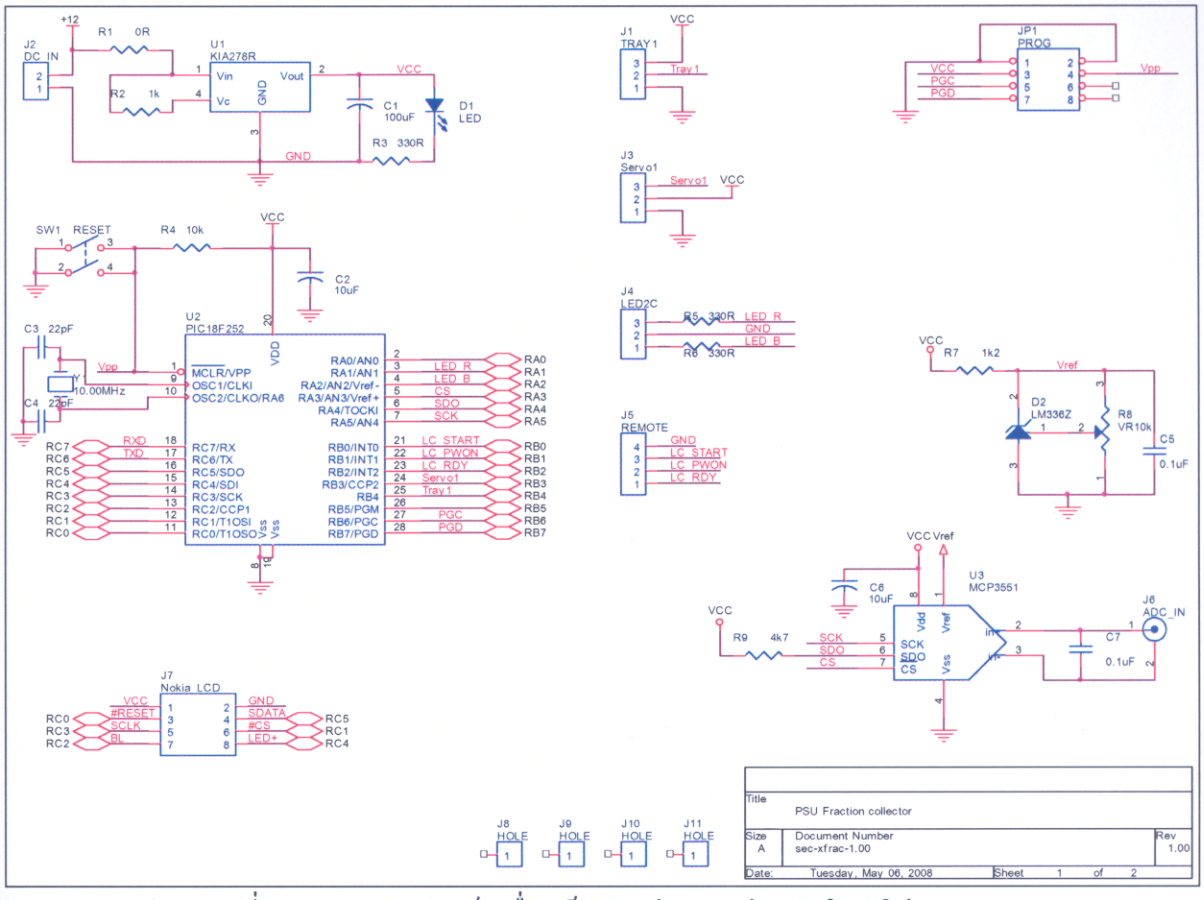


ภาพประกอบที่ 3-10 PCB วงจรแปลงสัญญาณจาก Analog เป็นสัญญาณ Digital ขนาด 22 บิต

ในส่วนของไมโครคอนโทรลเลอร์ได้เลือกใช้ PIC18F4550 ในตอนแรก ซึ่งสามารถเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่าน USB ได้เพื่อความสะดวกในการเชื่อมต่อ เนื่องจากคอมพิวเตอร์รุ่นใหม่ๆ ได้ตัดส่วนสื่อสารอนุกรมแบบ RS-232 ออกไป อย่างไรก็ตามจะยังคงความสามารถในการเชื่อมต่อผ่าน RS-232 ไว้เพื่อให้คอมพิวเตอร์รุ่นเก่าที่ไม่มี USB สามารถใช้เครื่องเก็บตัวอย่างนี้ได้ แต่จากการใช้งานจริงพบว่า อุปกรณ์ LC หลายรุ่นได้ใช้ระบบปฏิบัติการ Windows NT ซึ่งไม่สนับสนุนการใช้งานผ่าน USB ดั้งนั้นเพื่อความเข้ากันได้ของ Hardware และ Software จึงเปลี่ยนมาใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC18F252 แทนและเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่าน RS-232 อย่างเดียว โดยตัดส่วนเชื่อมต่อผ่าน USB ออกไป อย่างไรก็ตามสามารถใช้ ตัวแปลง USB เป็น RS-232 สำหรับคอมพิวเตอร์รุ่นใหม่ๆ ที่ไม่มีส่วนสื่อสารอนุกรมแบบ RS-232 ได้ วงจรสมบูรณ์ที่ได้ออกแบบไว้แสดงดังภาพประกอบที่ 3-11 และ ภาพประกอบที่ 3-12

โดยคุณสมบัติหลักของไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC18F252 มีดังนี้

- หน่วยความจำโปรแกรม 32 Kbytes
- หน่วยความจำ RAM 1,536 byte
- จำนวน in/out port เท่ากับ 3 port คือ A B และ C
- ตัวถังที่เลือกใช้เป็นแบบ SOIC 28 pin

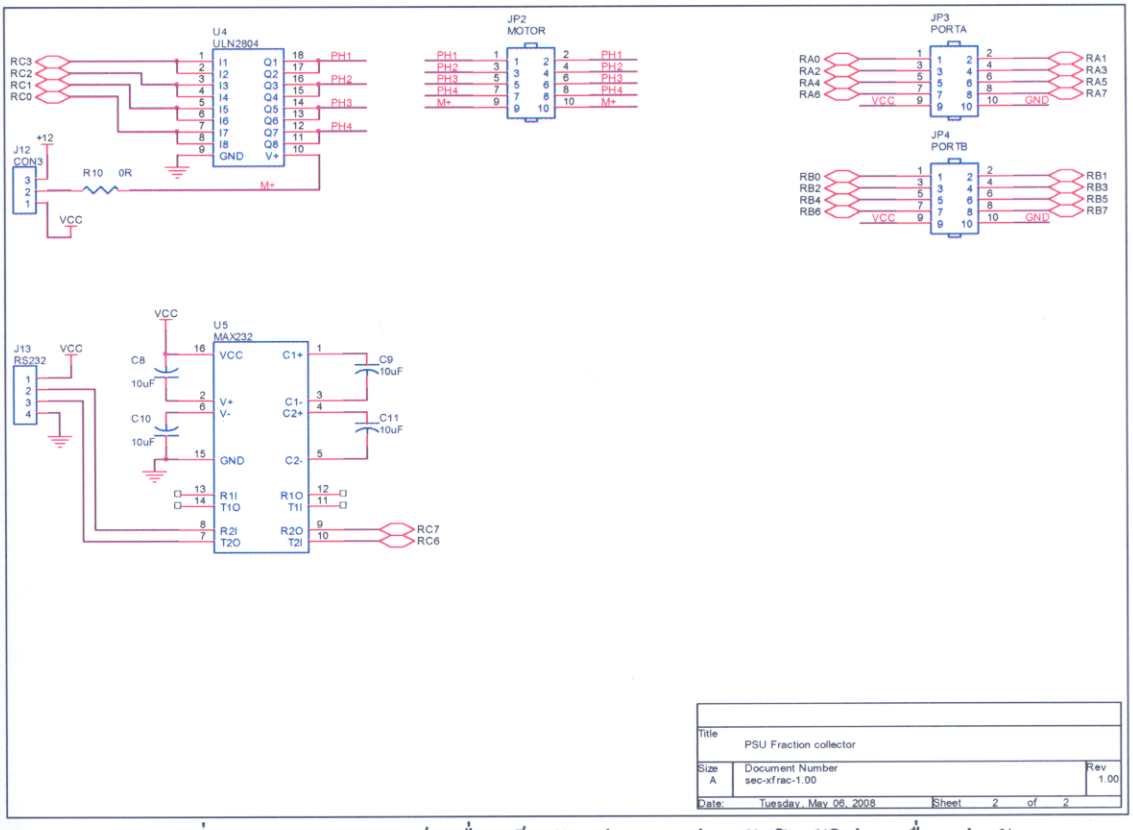


ภาพประกอบที่ 3-11 วงจรสมบูรณ์ เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติส่วนควบคุม

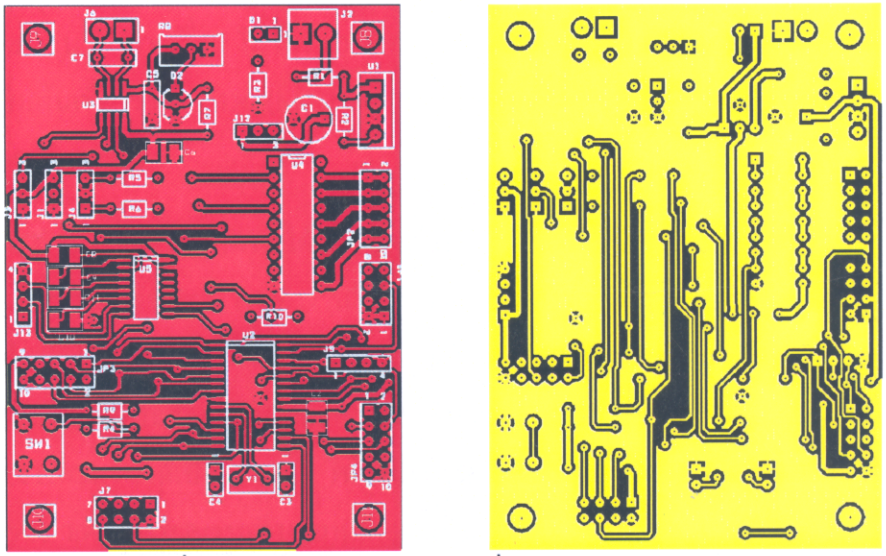
อธิบายการออกแบบและการทำงานของวงจรในภาพประกอบที่ 3-11 ได้ดังนี้

- JP1 เป็นพอร์ตเชื่อมต่อสำหรับการโปรแกรม PIC18F252 ซึ่งสามารถทำการโปรแกรมได้ทันทีโดยไม่ต้องถอดอุปกรณ์ใดๆ ออก (In Circuit Serial Programming) ซึ่งทำให้สะดวกต่อการปรับปรุงโปรแกรมเป็นอย่างมาก
- J1 เป็นพอร์ตสำหรับตรวจจับสัญญาณระบุตำแหน่งขวดที่ 1 ของถาดเก็บตัวอย่าง (Active hight)
- J2 เป็น DC input 6 – 12 volt
- J3 เป็นพอร์ตควบคุมการทำงานของ Servo motor
- J4 เป็นพอร์ตแสดงผลการทำงานด้วย LED
- J5 เป็นพอร์ตตรวจจับสัญญาณจากพอร์ต Remote ของอุปกรณ์ LC ซึ่งจะเป็นสัญญาณที่คอยบอกถึงเวลาเริ่มต้นของการ Start / Stop ทำให้ไมโครคอนโทรลเลอร์ทราบว่าควรจะเริ่มเก็บตัวอย่างได้เมื่อใด

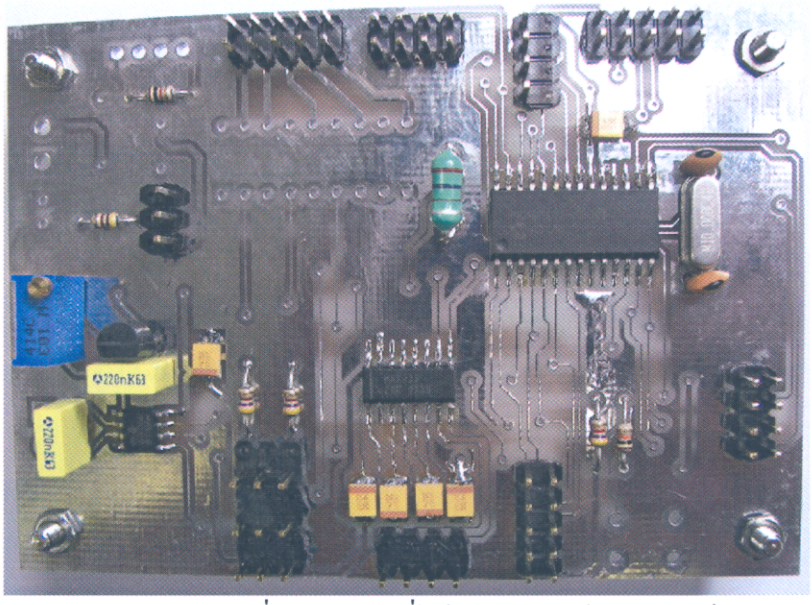
- J6 เป็นพอร์ตตรวจวัดสัญญาณอะนาล็อกจากอุปกรณ์ LC ซึ่งจะเป็นโครมาโตแกรมที่ได้จากตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector)
- J7 เป็นพอร์ตสำรองใช้เชื่อมต่อกับจอแสดงผลแบบ LCD



ภาพประกอบที่ 3-12 วงจรสมบูรณ์ เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติส่วนเชื่อมต่อสัญญาณ



ภาพประกอบที่ 3-13 PCB สองหน้าของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ



ภาพประกอบที่ 3-14 PCB ที่ได้ออกแบบพร้อมอุปกรณ์

จากภาพประกอบที่ 3-14 อุปกรณ์ส่วนใหญ่ที่ใช้สร้างเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติจะเป็นแบบ Serface Mount ซึ่งจะทำให้สามารถออกแบบ PCB ให้มีขนาดเล็กและสะดวกในการประกอบ

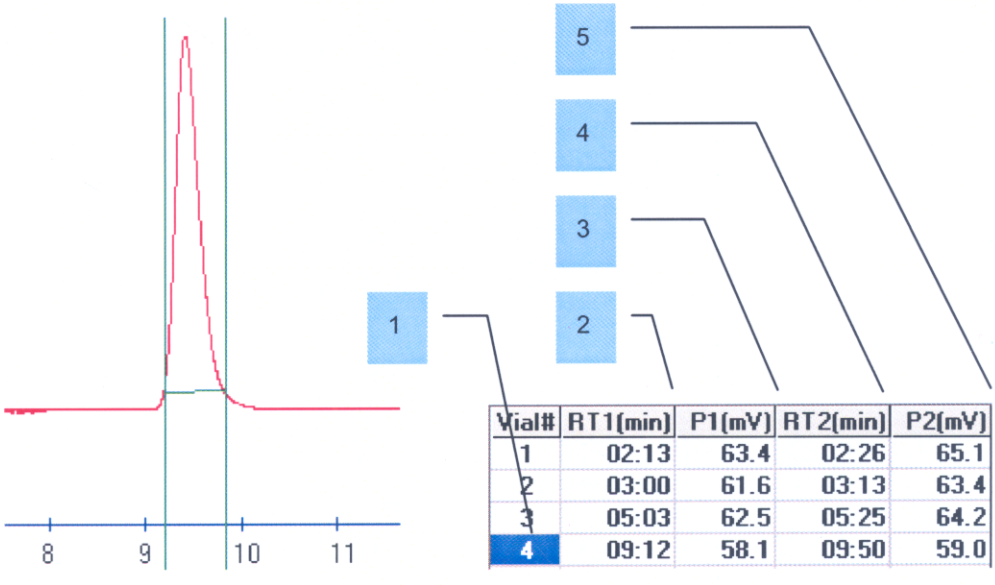
3.3 พัฒนาโปรแกรมไมโครคอนโทรลเลอร์และโปรแกรมคอมพิวเตอร์

Flow chart การทำงานของโปรแกรมบนไมโครคอนโทรลเลอร์แสดงดังภาพประกอบที่ 3-16 โดยเมื่อป้อนไฟเข้าเครื่อง ไมโครคอนโทรลเลอร์จะทำการตั้งค่าเริ่มต้นให้กับถาดเก็บตัวอย่างและตั้งค่าเริ่มต้นเพื่อใช้งาน ADC (MCP3551) หลังจากนั้นจะรอการติดต่อกับ คอมพิวเตอร์เพื่อคอยรับคำสั่งการทำงานต่างๆ

การทำงานของโปรแกรมได้ถูกออกแบบโดยใช้ Interrut และ Timer เป็นหลัก ดังนั้นไมโครคอนโทรลเลอร์จะสามารถทำงานได้หลายๆ งาน พร้อมๆ กันแบบกึ่งเวลาจริง (Real Time) ซึ่งจะทำให้สามารถ หมุนถาด ควบคุม Servo motor รับคำสั่งจากคอมพิวเตอร์ รับสัญญาณจาก ADC ได้พร้อมๆ กัน โดยจะมีบัฟเฟอร์สำหรับเก็บข้อมูล ADC จำนวน 640 bytes ซึ่งจะสามารถบันทึกโครมาโตแกรมได้เป็นเวลา 20 วินาทีจึงทำให้ไม่จำเป็นต้องส่งข้อมูลตลอดเวลาในจังหวะที่แน่นอน คอมพิวเตอร์จะสามารถทำงานหลักอย่างอื่นไปพร้อมๆ กันได้

ในส่วนของการควบคุมจากคอมพิวเตอร์ใช้การสื่อสารแบบ RS-232 โดยไมโครคอนโทรลเลอร์ได้ออกแบบโดยการใช้บัฟเฟอร์จำนวน 256 byte ทำให้สามารถส่งข้อมูลต่อเนื่องได้โดยไม่จำเป็นต้องรอให้คำสั่งล่าสุดเสร็จสิ้น และสุดท้ายได้ออกแบบตารางการเก็บตัวอย่างโดยใช้บัฟเฟอร์จำนวน 108 byte เพื่อใช้เก็บข้อมูลเริ่มต้นและสิ้นสุดของตัวอย่างจำนวน 12 Fraction โดยตารางการเก็บตัวอย่างของแต่ละ Fraction จะประกอบไปด้วย

1. หมายเลขขวดที่ต้องการเก็บ Fraction นั้น
2. เวลาเริ่มต้นที่จะเก็บ Fraction นั้น
3. ระดับความสูงของ พีค ที่จะเริ่มต้นเก็บ Fraction
4. เวลาสิ้นสุดที่จะไม่เก็บ Fraction นั้น
5. ระดับความสูงของ พีค ที่จหยุดเก็บ Fraction นั้น

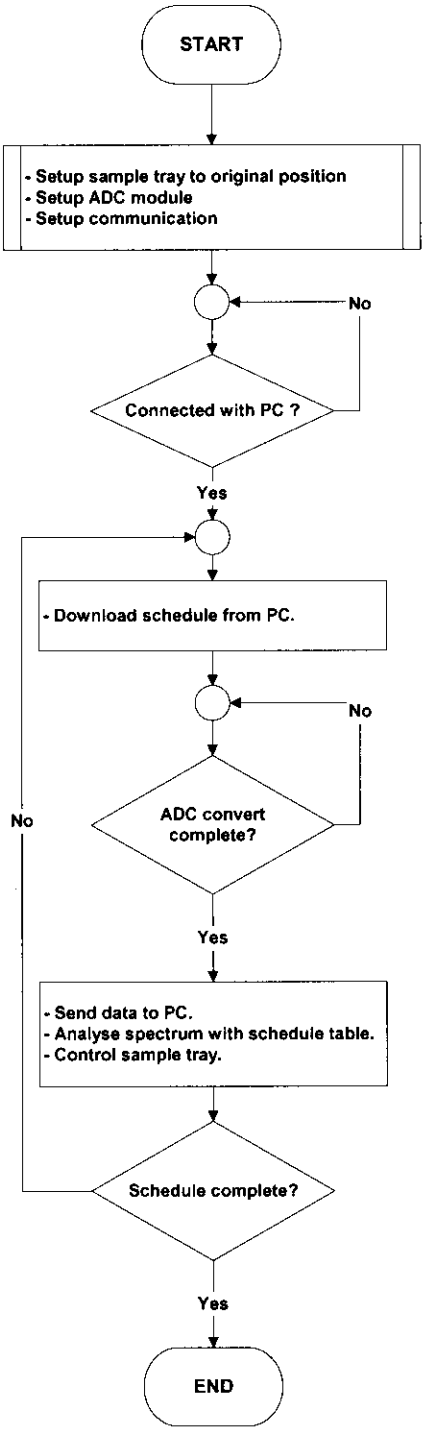


Vial#	RT1(min)	P1(mV)	RT2(min)	P2(mV)
1	02:13	63.4	02:26	65.1
2	03:00	61.6	03:13	63.4
3	05:03	62.5	05:25	64.2
4	09:12	58.1	09:50	59.0

ภาพประกอบที่ 3-15 ตำแหน่งของ พีค ที่ใช้ระบุในตารางการเก็บตัวอย่าง

โดยไมโครคอนโทรลเลอร์จะทำการตรวจสอบสัญญาณ Start จาก LC ซึ่งจะมีระดับแรงดัน 5 volt ที่สถานะปกติ และจะเป็น 0 volt เมื่อมีการฉีดตัวอย่าง ทำให้ไมโครคอนโทรลเลอร์ทราบถึงตำแหน่งอ้างอิงเริ่มต้นได้ เมื่อถึงเวลาที่กำหนดไว้ในตารางเก็บตัวอย่าง และระดับสัญญาณจาก Detector ถึงค่าที่ตั้งไว้ เครื่องเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บ Fraction นั้นๆ โดยอัตโนมัติ และหากระดับสัญญาณจาก Detector ลดต่ำลงกว่าค่าที่กำหนดไว้หรือเกินเวลาสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง เครื่องเก็บตัวอย่างจะหยุดการเก็บ Fraction นั้นทันที และเตรียมพร้อมสำหรับเก็บ Fraction ถัดไป อย่างไรก็

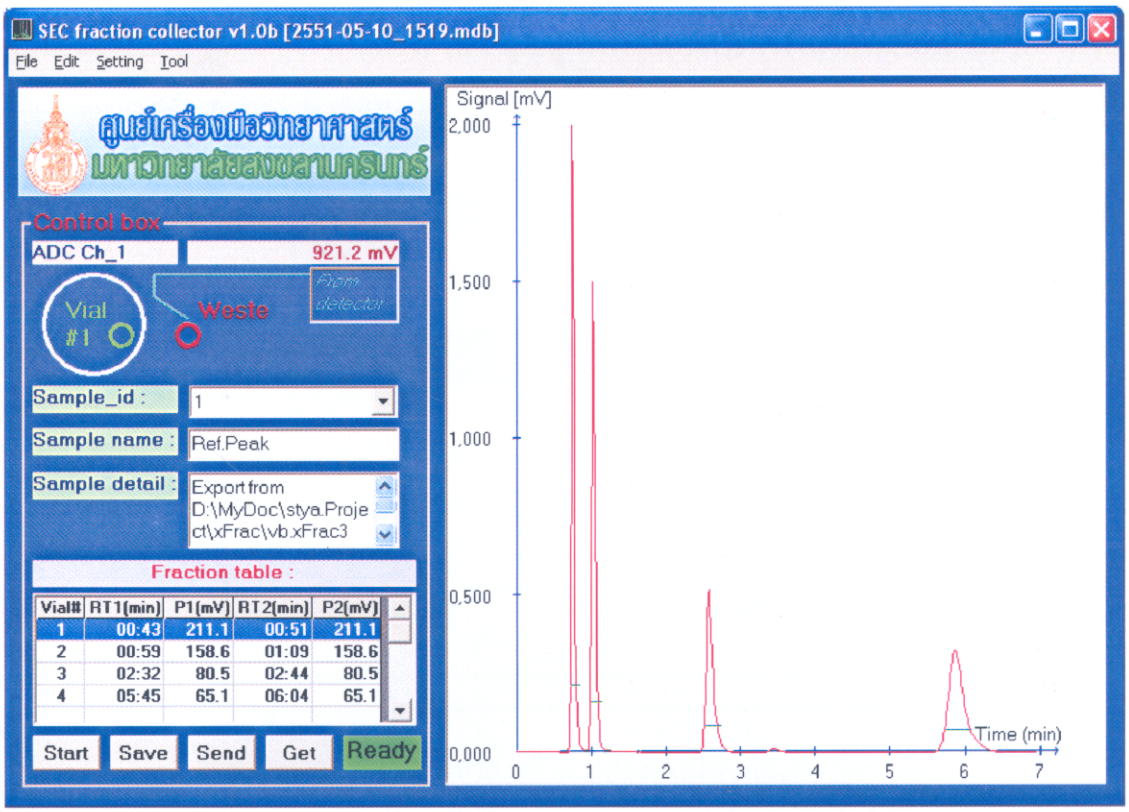
ตามสัญญาณที่วัดได้จาก Detector จะถูกหน่วงเวลาโดยไมโครคอนโทรเลอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวท่อจาก Detector ไปสู่ เครื่องเก็บตัวอย่างและอัตราการไหลของ Mobile phase เพื่อให้การเก็บตัวอย่างมีความแม่นยำและถูกต้องที่สุด



ภาพประกอบที่ 3-16 Flow chart การทำงานของโปรแกรม

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

โปรแกรมบนคอมพิวเตอร์ได้พัฒนาให้สามารถดึงข้อมูล Chromatogram จาก HPLC ในรูปแบบ CSV File ได้ โดยรูปแบบ CSV File สามารถสร้างจากโปรแกรม CHEMSTATION ได้ (จากการ Export ในหน้าต่าง Data Analysis) ซึ่งจะทำให้ผู้ใช้สามารถนำ Chromatogram เก่ามาเป็น Chromatogram ต้นแบบเพื่อกำหนดรูปแบบการเก็บ Fraction ของตัวอย่างได้ดังภาพประกอบที่ 3-17

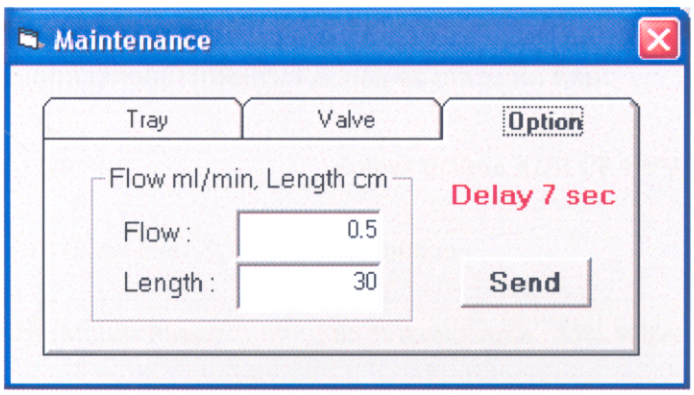


ภาพประกอบที่ 3-17 Chromatogram ต้นแบบที่ได้จากการ Export จาก Chemstation ในรูปแบบ CSV File

นอกจากนี้ยังได้พัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์ให้สามารถคำนวณค่าที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างได้แบบอัตโนมัติ โดยการ Click Tool > Auto find peak โปรแกรมจะคำนวณค่าที่เหมาะสมให้ อย่างไรก็ตาม ผู้ใช้งานสามารถแก้ไข เพิ่ม หรือ ลบ ข้อมูลการเก็บตัวอย่างได้อย่างง่ายดายด้วยการใช้งานแบบกราฟฟิก โดยการ Click บรรทัดที่ต้องการแก้ไข จากนั้นกดปุ่ม Shift ค้างไว้ พร้อมทั้ง Click โครมาโตแกรม ณ จุดเริ่มต้นที่ต้องการให้เริ่มเก็บ fraction จากนั้นเลื่อน Mouse ไป Click ตำแหน่งสิ้นสุดของโครมาโตแกรมที่ต้องการเก็บ fraction จากนั้นปล่อยปุ่ม Shift ที่กดค้างไว้ โปรแกรมจะทำการปรับปรุงตารางการเก็บตัวอย่างให้โดยอัตโนมัติ หากต้องการบันทึกตารางการเก็บตัวอย่างให้ทำการ Click **Save** โปรแกรมจะทำการบันทึกให้ทันที ซึ่งข้อมูลต่างๆ จะถูกจัดเก็บ

ในแฟ้มรูปแบบ MDB File (Microsoft Access) ดังนั้นผู้ใช้งานสามารถเรียกดูข้อมูลย้อนหลังของการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง สามารถสร้างแฟ้มใหม่เพื่อแยกเก็บในแต่ละตัวอย่างได้อย่างอิสระ

ในส่วนอื่นๆ ของโปรแกรมได้ทำการพัฒนาให้โปรแกรมสามารถคำนวณเวลาในการหน่วงของ ไมโครคอนโทรลเลอร์เนื่องจากระยะห่างของท่อระหว่าง Detector กับเครื่องเก็บตัวอย่าง ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงความยาวท่อจาก Detector สู่เครื่องเก็บตัวอย่างหรือเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ Mobile phase หรือหากต้องการเข้าสู่เมนูการทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่าง ให้ Click Tool > Option จะปรากฏหน้าต่างดังภาพประกอบที่ 3-18 ซึ่งโปรแกรมจะทำการคำนวณค่าหน่วงเวลาในการเคลื่อนที่ของ Fraction ที่ถูกตรวจจับได้จาก Detector ก่อนจะลงสู่ขวดเก็บตัวอย่างให้โดยอัตมัติ ซึ่งเวลาที่สามารถหน่วงได้สูงสุดเท่ากับ 20 วินาที (ADC บัฟเฟอร์เก็บได้สูงสุด 20 วินาที)



ภาพประกอบที่ 3-18 หน้าต่างตั้งค่าอัตราการไหลและความยาวท่อ

3.4 สรุปท้ายบท

เนื้อหาในภาพรวมของบทนี้ได้กล่าวถึง หลักการและวิธีการทางเทคนิคที่ใช้ในการออกแบบ ซึ่งได้พยายามเลือกแนวทางที่สามารถสร้างได้ง่ายหรือสร้างได้เองเพื่อประโยชน์ในการสร้างขึ้นใช้งานของผู้สนใจต่อไปในอนาคต ในบทถัดไป บทที่ 4 จะกล่าวถึงการทดสอบการใช้งานจริง ส่วนคู่มือการใช้เครื่องได้กล่าวไว้ในภาคผนวก ท้ายรายงาน

บทที่ 4

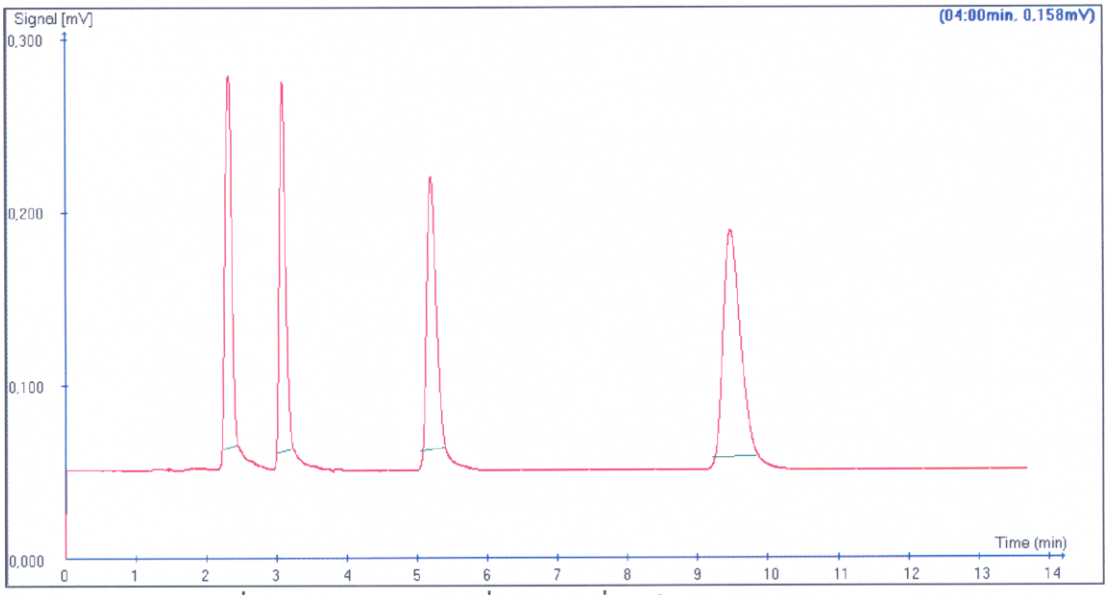
การทดสอบการทำงานของเครื่องต้นแบบ

4.1 การทดสอบการทำงานของเครื่องต้นแบบ

หลังจากเครื่องต้นแบบได้ถูกพัฒนาเสร็จสมบูรณ์ทั้งส่วนของถาดเก็บตัวอย่าง PCB โปรแกรมควบคุมภายในเครื่องเก็บตัวอย่าง และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ในขั้นตอนการทดสอบการทำงานได้ใช้ตัวอย่างสาร four peak ทดสอบการเก็บ fraction ของตัวอย่างแต่ละพีคซึ่งประกอบด้วยสาร4 พีค ที่ถูกแยกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ร่น Agilent 1100 โดยใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณคือ Variable Wavelength Detector (VWD) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งสภาวะที่ใช้แยกสารตัวอย่างเพื่อเก็บ Fraction ของแต่ละพีค ดังนี้

คอลัมน์ (Column)	: Zorbax Eclipse XDB C8 4.6*150 mm , 5 μm
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1.0 ml/min
เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase)	: 65 % Acetonitrile : 35% Water
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume)	: 10 ไมโครลิตร

โดยฉีดตัวอย่างจำนวน 3 ครั้งต่อเนื่องกัน โครมาโตแกรมที่บันทึกได้ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC แสดงดังภาพประกอบที่ 3-16 และตารางการเก็บตัวอย่างจากการคำนวณอัตโนมัติ แสดงดังภาพประกอบ 4-1 โดยการ Click Tool >> Auto find peak โปรแกรมที่พัฒนาขึ้นจะทำการคำนวณหาค่าความชันเพื่อหาจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของแต่ละ พีค โดยอัตโนมัติ

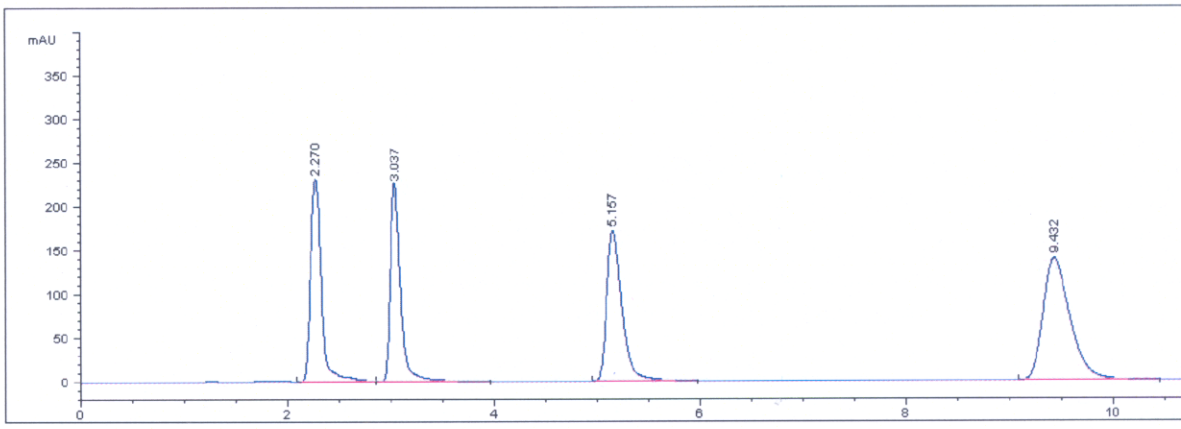


ภาพประกอบที่ 4-1 โครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ ของอุปกรณ์ LC

Fraction table :

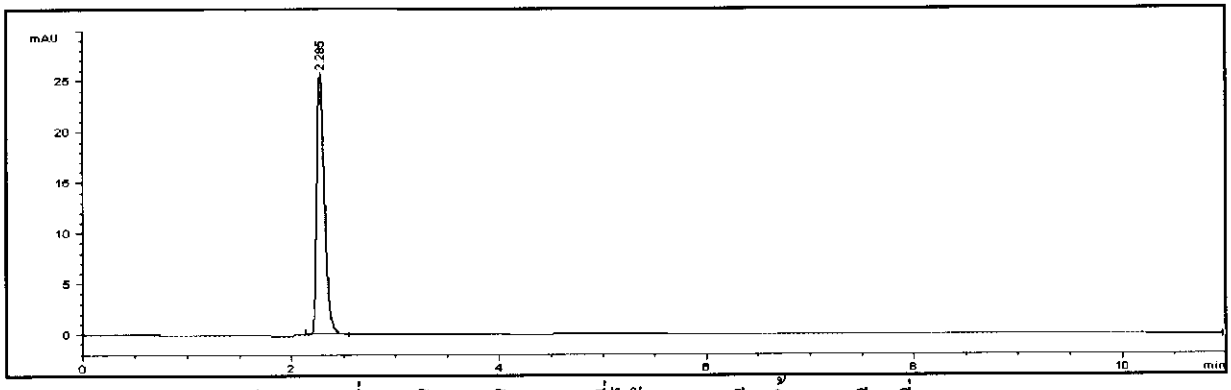
Vial#	RT1(min)	P1(mV)	RT2(min)	P2(mV)
1	02:13	63.4	02:26	65.1
2	03:00	61.6	03:13	63.4
3	05:03	62.5	05:25	64.2
4	09:12	58.1	09:50	59.0

ภาพประกอบที่ 4-2 ตารางเก็บตัวอย่าง

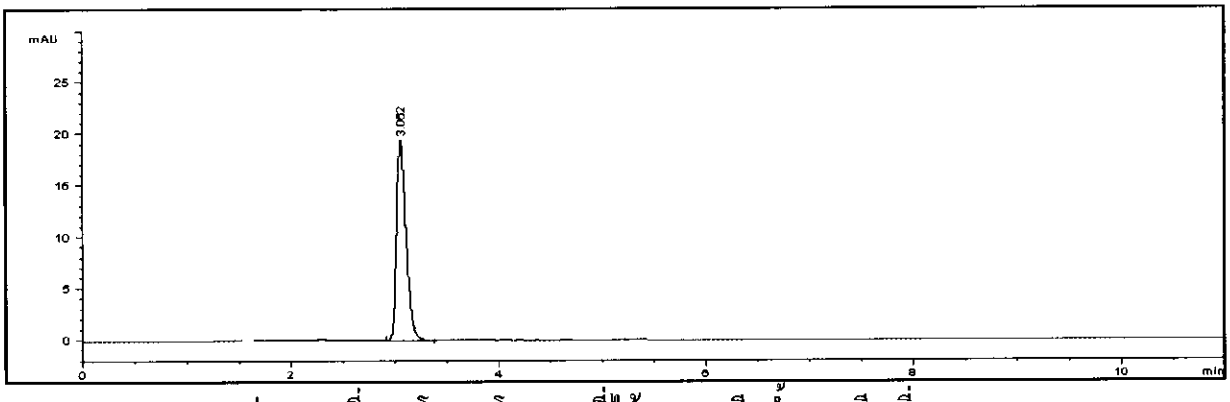


ภาพประกอบที่ 4-3 โครมาโตแกรมที่ได้จาก Data analysis report ของ HPCHEM

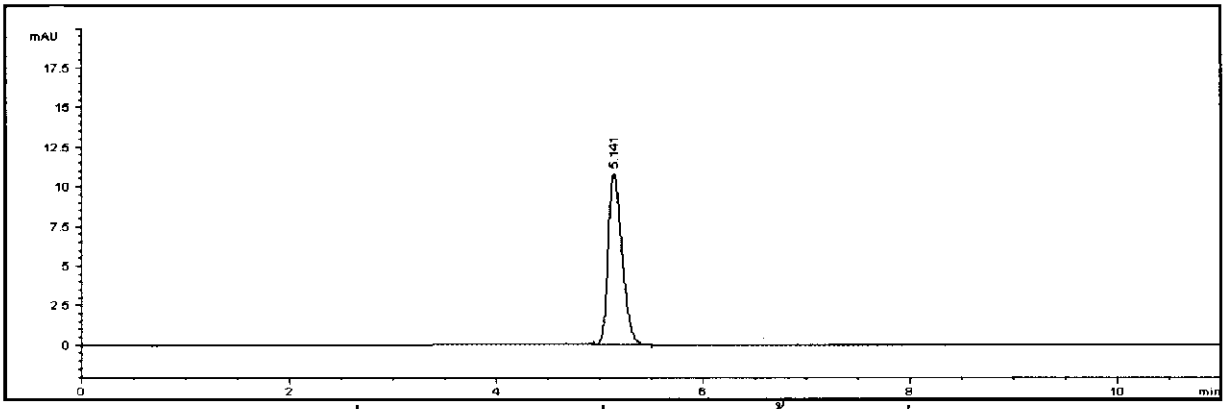
จากภาพประกอบที่ 4-1 และ 4-3 โครมาโตแกรมที่ได้จะเหมือนกัน แต่ โครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC จะมีค่า offset อยู่ประมาณ 50 mV (ฐานพีค ไม่เท่ากับ 0 mV) เนื่องจากไม่มีการทำ Auto zero เพื่อให้สัญญาณที่บันทึกกับข้อมูลเปรียบเทียบขณะเก็บตัวอย่างตรงกันนั่นเอง หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC นำกลับมาฉีดซ้ำอีกครั้งเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการเก็บ ผลการฉีดซ้ำแสดงได้ดังภาพประกอบที่ 4-4 ถึงภาพประกอบที่ 4-7 จากผลการทดสอบสามารถยืนยันได้ว่าเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC สามารถทำการเก็บตัวอย่างจากการแยกได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากเครื่องต้นแบบสามารถแยกเก็บตัวอย่างที่แยกออกมาในแต่ละ พีค ได้ตรงตามที่ตั้งไว้ อีกทั้งไม่มี พีค อื่นปะปนของแต่ละ พีค ที่แยกเก็บ



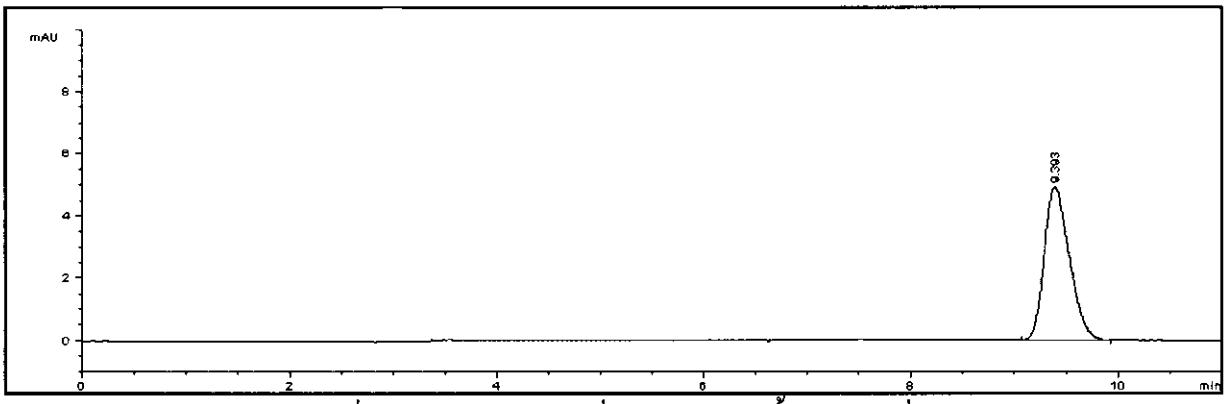
ภาพประกอบที่ 4-4 โครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดซ้ำของ พีค ที่ 1



ภาพประกอบที่ 4-5 โครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดซ้ำของ พีค ที่ 2



ภาพประกอบที่ 4-6 โครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดซ้ำของ พีค ที่ 3



ภาพประกอบที่ 4-7 โครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดซ้ำของ พีค ที่ 4

4.2 สรุปท้ายบท

จากผลการทดสอบการใช้งานจริง ได้ผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจทั้งผลการแยกเก็บของแต่ละ พีค และผลการเก็บสัญญาณโครมาโตแกรม ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเก็บโครมาโตแกรม ทดแทนเครื่อง LC รุ่นเก่าที่ใช้ XY Recorder ซึ่งไม่สามารถบันทึกโครมาโตแกรมลงคอมพิวเตอร์ได้ ในบทที่ 5 จะกล่าวถึงบทสรุปของการออกแบบและทดสอบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ รวมถึงปัญหาและข้อเสนอแนะ

บทที่ 5

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดสอบ

5.1 สรุปขั้นตอนของการวิจัย

การพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติของอุปกรณ์ LC (LC Automatic Fraction Collector) เริ่มจากปัญหาในการแยกเก็บ fraction ที่ผ่านการแยกด้วย LC ซึ่งค่อนข้างยุ่งยาก หากต้องคอยเก็บตัวอย่างที่แยกออกมาด้วยคน จึงได้ออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติขึ้นโดยใช้ขวดเก็บตัวอย่างแบบถาดหมุน ซึ่งออกแบบให้เก็บตัวอย่างได้สูงสุด 12 fraction ควบคุมการทำงานโดยอัตโนมัติด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์ ติดต่อผู้ใช้งานด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในรูปแบบกราฟฟิก

5.2 สรุปผลการทดสอบ

จากการทดสอบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติได้ผลการทดสอบการแยกเก็บ Fraction ที่ต้องการได้เป็นอย่างดี สามารถแยกเก็บ Fraction ที่อยู่ติดกันได้ภายใน 2 วินาทีหลังจากเก็บ Fraction ก่อนหน้าเสร็จ สามารถเก็บ Fraction ต่อเนื่องจากการฉีดตัวอย่างต่อเนื่อง ได้อย่างอัตโนมัติ โดยการตั้งค่าเริ่มต้นใน Fraction table เพียงครั้งเดียวและทำการบันทึกโครมาโตแกรมเพื่อเรียกดูในภายหลักได้โดยอัตโนมัติ

5.3 สรุปคุณสมบัติเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ

1) สามารถแยกเก็บตัวอย่างได้สูงสุด 12 Fraction ลงขวดขนาด 20 มิลลิลิตร จำนวน 12 ขวด
2) สามารถเริ่มต้นเก็บตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติโดยการตรวจจับสัญญาณ Start จากอุปกรณ์ LC
3) สามารถบันทึกโครมาโตแกรมเพื่อเรียกดูภายหลักได้
4) ความเร็วในการเปลี่ยนจากเก็บตัวอย่างลงขวดเป็นลง waste น้อยกว่า 0.5 วินาที (หรือจาก waste ลงขวด) ความเร็วในการหมุนขวดตัวอย่างต่อ 1 ขวดน้อยกว่า 0.4 วินาที หน่วงเวลา ก่อนเก็บ Fraction ถัดไป 1 วินาที

5) ใช้แหล่งจ่ายไฟกระแสตรง 6-12 volt ดึงกระแสสูงสุดขณะหมุนถาดเก็บตัวอย่าง 1 Amp

5.4 ปัญหาและข้อเสนอแนะ

ปัญหา

1) การสร้างถาดเก็บตัวอย่างต้องใช้ความแม่นยำในการตัดค่อนข้างสูงมาก เป็นการยากที่จะตัดพลาสติกให้ได้ตามขนาดที่ออกแบบไว้ด้วยมือ จึงได้ขอความอนุเคราะห์ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้าตัวด้วยเครื่องตัดอัตโนมัติ
2) ขวดเก็บตัวอย่างไม่สามารถปิดฝาได้ หากตัวอย่างที่เก็บมีความเป็นพิษอาจก่อให่เกิดอันตรายได้ หรือตัวอย่างที่มีจุดเดือดต่ำอาจจะระเหยสู่บรรยากาศได้

ข้อเสนอแนะ

1) หากไม่สามารถตัดแผ่นพลาสติกด้วยเครื่องตัดอัตโนมัติได้ สามารถตัดโดยใช้เครื่องคว้าน หรือใช้วิธีการตะไบ ให้ได้ตามขนาดที่ต้องการ ซึ่งจะทำได้ช้ากว่าเครื่องตัดอัตโนมัติ
2) หากจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างที่มีความเป็นพิษ สามารถนำเครื่องเก็บตัวอย่าง เข้าตู้ดูดไอสารเคมี เพื่อป้องกัน ไอระเหยที่เป็นพิษได้ โดยสามารถต่อท่อระหว่างเครื่องเก็บตัวอย่างกับ ตัวตรวจวัด ได้ยาวถึง 170 เซนติเมตร

5.5 แนวทางในการพัฒนาต่อไปในอนาคต

เนื่องจากเครื่องเก็บตัวอย่างที่สร้างขึ้นสามารถบันทึกโครมาโตแกรมเพื่อเรียกดูย้อนหลังได้ ดังนั้น หากต้องการนำข้อมูลโครมาโตแกรมมาประมวณผลต่อด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ คำนวณหาเส้นโค้งของสารมาตรฐาน รวมถึงการคำนวณหาค่าความเข้มข้น เพื่อทดแทนการใช้ Chart recorder ก็สามารถพัฒนาต่อได้ โดยใช้ความรู้ทางด้านการคำนวณทางคณิตศาสตร์ช่วยในการพัฒนาโปรแกรม ซึ่งจะสามารถทดแทน Chart recorder ซึ่งใช้กระดาษในการบันทึกได้

ง. เอกสารอ้างอิง

1. Iamphai, S., Meunpol, O., Suthikrai. W., and Piyaterathitiyorakul, S. 2005. Effects of Progesterone and 17α-Hydroxyprogesterone extracted from Polychaetes (*Perinereis* sp)on *Penaeus monodon* Oocyte development.31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology. 18 – 20 October .
2. Hebestreit, M., Flenker, U., Fubholl, G., Geyer, H., Guntner, U., Mareck, U., Piper, T., Thevis,M., Ayotteb, C., and Schanzer, W. 2006. Determination of the origin of urinary norandrosterone traces by gaschromatography combustion isotope ratio massspectrometry. Analyst, 131:1021–1026.
3. Vincent P. Nero, and Robert D. Hudson. 1984. Liquid Chromatographic Cleanup Prior to Determination of Polychlorinated Biphenyls in Oil by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. American Chemical Society. 56: 1041-1043.
4. Aobchey, P., Sriyam, S., Praharnripoorab, W., Lhieochaiphant, S., and Phutrakul, S. 2002.Production of Red Pigment from the Root of *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. by Root Cell Culture. CMU. Journal Vol. 1(1) : 66-78.
5. Annett, K., Birgit, S., and Hans, N. Determining of structural properties of humic substances and metal-humic-complexes by means of RP-HPLC. Presentation : poster.
6. Dobrev, P.I., Havlicek, L., Vagner, M., Malbeck, J., and Kaminek, M. 2005. Purification and determination of plant hormones auxin and abscisicacid using solid phase extraction and two-dimensional highperformance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1075: 159-166

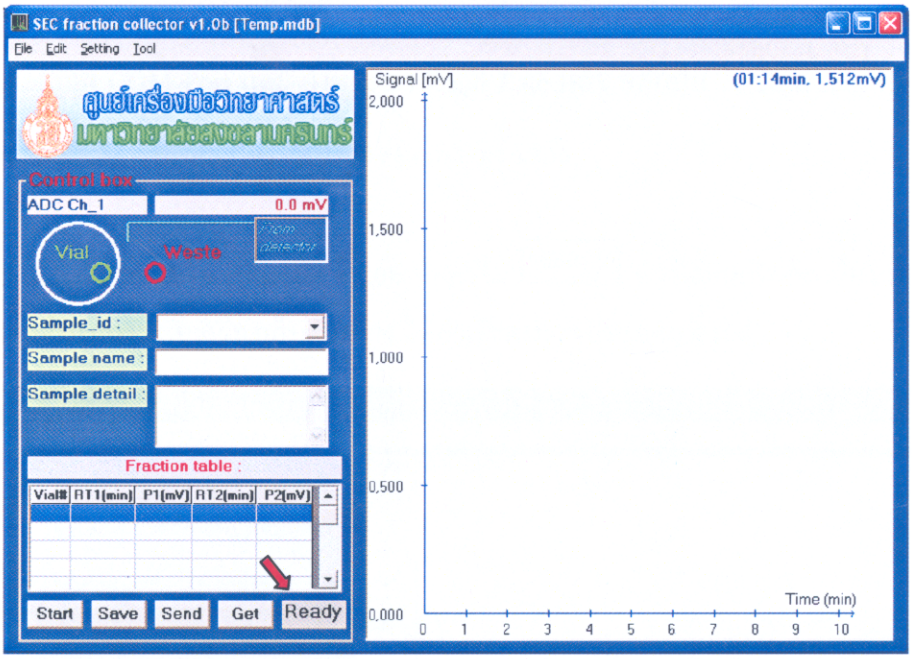
ภาคผนวก

ก. คู่มือการใช้งานเครื่อง / โปรแกรม

การใช้งานโปรแกรม SEC fraction collector v1.0b

1. คลิกไอคอน

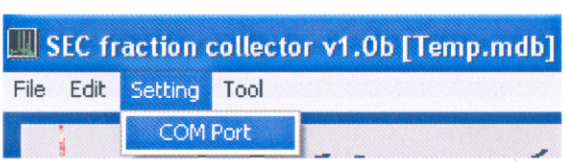
2. ปรากฏหน้าต่าง **SEC fraction collector v1.0b** และ ข้อความ Ready จะเป็นสีเทาหากการเชื่อมต่อกับเครื่องเก็บตัวอย่างยังไม่เรียบร้อย ดังภาพประกอบที่ ก-1



ภาพประกอบที่ ก-1 หน้าต่างหลักSEC fraction collector v1.0b แสดงสถานะ Ready สีเทา

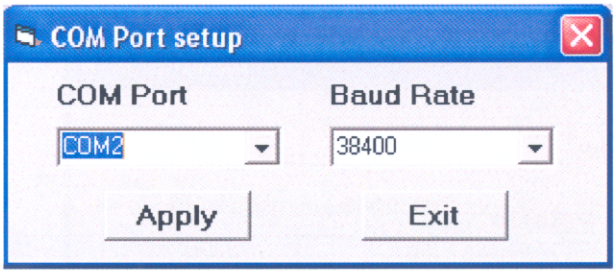
3. ในกรณีที่ติดตั้งโปรแกรมและใช้งานครั้งแรก จะต้องเปลี่ยนแปลงพอร์ตเชื่อมต่อ RS-232 เพื่อให้เครื่องให้ เครื่องเก็บตัวอย่างสามารถเชื่อมต่อกับโปรแกรมได้ ดังนี้

   3.1 ที่เมนูบาร์ เลือก **Setting > COM Port** ดังภาพประกอบที่ ก-2



ภาพประกอบที่ ก-2 เมนูตั้งค่าเชื่อมต่อ RS-232

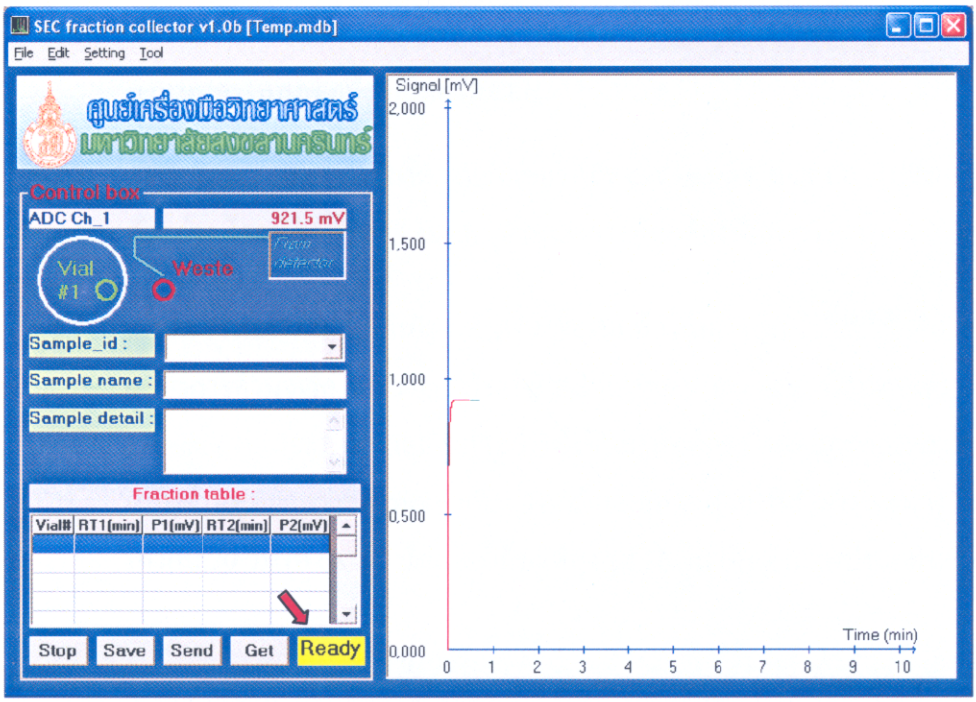
3.2 ได้หน้าต่าง Com Port setup แล้ว เลือก COM Port ที่ได้เชื่อมต่อไว้ และ กำหนด ค่า Baud Rate ไว้ที่ 38400 ดังภาพประกอบที่ ก-3



ภาพประกอบที่ ก-3 หน้าต่าง Com Port setup การเลือก COM Port และ กำหนดค่า Baud Rate

3.3 เมื่อเลือก COM Port และ กำหนดค่า Baud Rate แล้ว คลิกปุ่ม Apply และคลิกปุ่ม Exit เพื่อออกจากหน้าต่าง Com Port setup

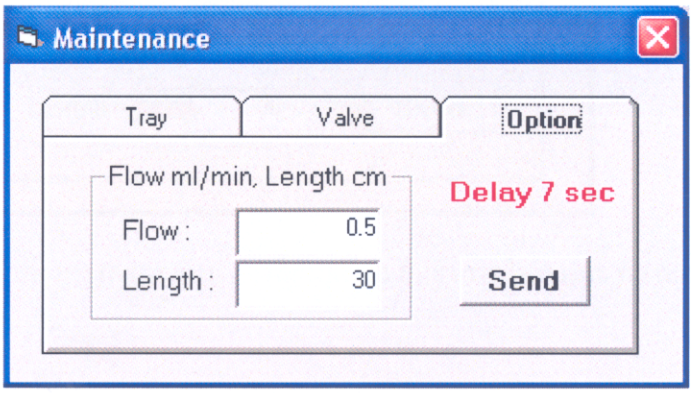
4. หน้าต่าง **SEC fraction collector v1.0b** ข้อความ Ready จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อสามารถเชื่อมต่อโปรแกรมกับเครื่องเก็บตัวอย่าง ได้สำเร็จดังภาพประกอบที่ ก-4



ภาพประกอบที่ ก-4 หน้าต่างหลักแสดงสถานะ Ready สีเหลือง

5. ทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่าง

5.1 ที่เมนูบาร์เลือก **Tool > Option** ปรากฏหน้าต่าง Maintenance ดังภาพประกอบที่ ก-5



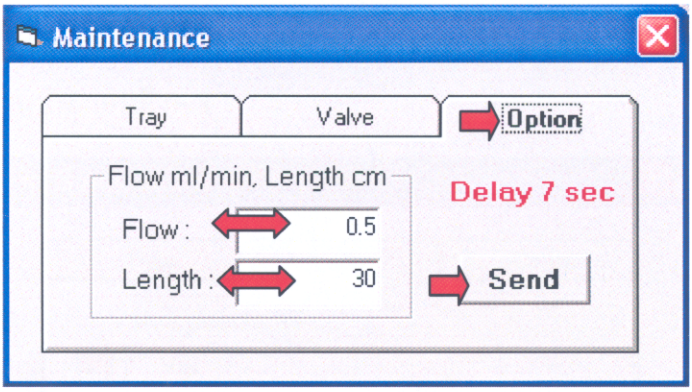
ภาพประกอบที่ ก-5 หน้าต่าง Maintenance ตั้งค่าอัตราการไหลและความยาวท่อ

5.2 ที่หน้าต่าง Maintenance คลิกที่ Tab Option เพื่อตรวจสอบ / เปลี่ยนแปลง อัตราการไหล และ ความยาวท่อ ดังนี้

5.2.1 ตรวจสอบ / เปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ Mobile phase โดยที่ ส่วนของ Flow : กำหนดค่าให้สอดคล้องกับเครื่อง LC

5.2.2 ตรวจสอบ / เปลี่ยนแปลงความยาวของท่อจาก Detector ของ LC ไปยังเครื่องเก็บตัวอย่าง โดยที่ส่วนของ Length : กำหนดค่าให้ถูกต้องกับการใช้งาน

5.2.3 เมื่อตรวจสอบ / เปลี่ยนแปลง ค่าตามใช้งานแล้วให้คลิกปุ่ม Send โปรแกรมจะทำการคำนวณค่าหน่วงเวลาในการเคลื่อนที่ของ fraction ที่ถูกตรวจจับได้จาก Detector ก่อนจะลงสู่ขวดเก็บตัวอย่างซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราไหล และความยาวของท่อ (เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตร) เวลาที่สามารถหน่วงได้สูงสุดเท่ากับ 20 วินาที (ADC บัฟเฟอร์เก็บได้สูงสุด 20 วินาที) ดังภาพประกอบที่ ก-6

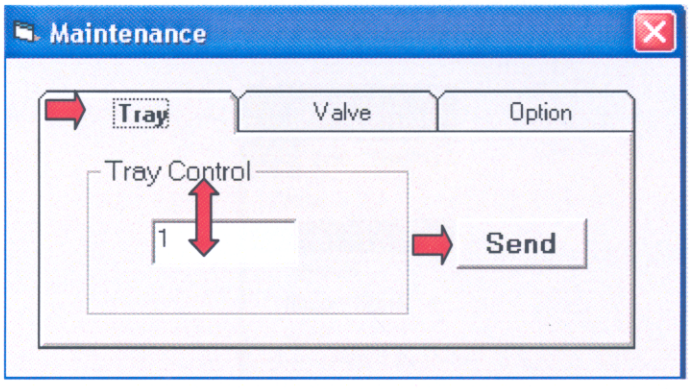


ภาพประกอบที่ ก-6 หน้าต่างการตรวจสอบ / เปลี่ยนแปลง อัตราการไหล และ ความยามท่อ

5.3 ที่หน้าต่าง Maintenance คลิกที่ Tab Tray เพื่อทดสอบการทำงานของถาดเก็บตัวอย่าง ดังนี้

5.3.1 ทดสอบการทำงานของถาดเก็บตัวอย่าง ที่ส่วนของ Tray Control ระบุตำแหน่งที่ต้องการให้ถาดเก็บตัวอย่างหมุน(ระบุได้ 1-12)

5.3.2 คลิกปุ่ม Send เครื่องเก็บตัวอย่างจะทำการ Calibration ตำแหน่งที่ระบุไว้อัตโนมัติ ดังภาพประกอบที่ ก-7

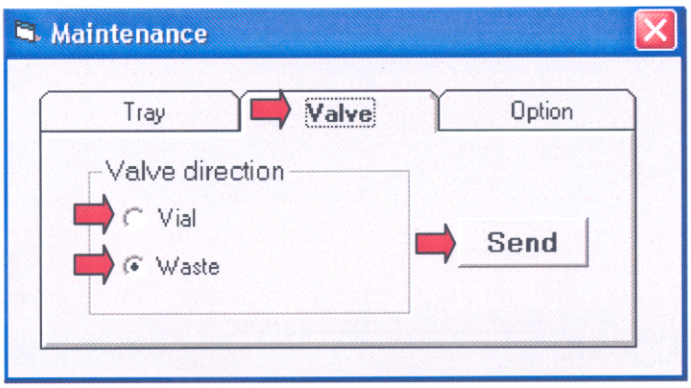


ภาพประกอบที่ ก-7 หน้าต่างการทดสอบการทำงานของถาดเก็บตัวอย่าง

5.4 ที่หน้าต่าง Maintenance คลิกที่ Tab Valve เพื่อทดสอบการทำงานของ Servo motor ดังนี้

5.4.1 ทดสอบการทำงานของ Servo motor โดยที่ส่วนของ Valve direction คลิกเลือก Vial (จะต้องมั่นใจว่าขวดเก็บตัวอย่างได้ถูกวางไว้ในตำแหน่งที่ถูกต้องแล้วมิเช่นนั้นถาดเก็บตัวอย่างอาจเสียหายจากสารเคมีที่หยดออกมาได้) หรือ Waste ตามต้องการ

5.4.2 คลิกปุ่ม Send Servo motor หมุนไปยังตำแหน่งที่เลือกจากข้อ 5.4.1 ดังภาพประกอบที่ ก- 8



ภาพประกอบที่ ก-8 หน้าต่างทดสอบการทำงานของ Servo motor

5.5 ที่หน้าต่าง Maintenance คลิก เพื่อออกจากหน้าต่าง Maintenance

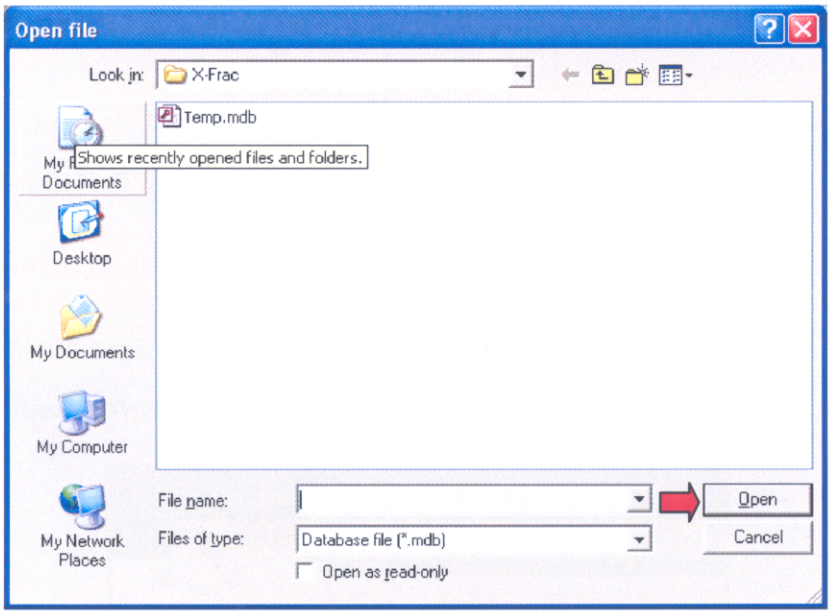
6. เรียกโครมาโตแกรม (Load Chromatogram) ที่ได้ทำการฉีดไปก่อนหน้านี้แล้วเพื่อนำมากำหนดตารางการเก็บตัวอย่าง มี 2 วิธี ดังนี้

6.1 เรียกโครมาโตแกรมจากโปรแกรม SEC fraction collector

1. เมนูบาร์เลือก **File > Open** ดังภาพประกอบที่ ก-9

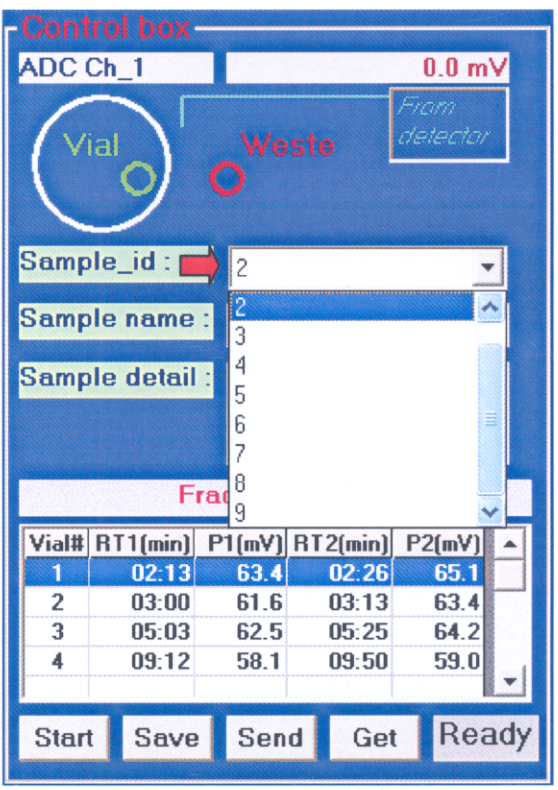
ภาพประกอบที่ ก-9 หน้าต่าง File> Open เรียกโครมาโตแกรม

2. หน้าต่าง Open file เลือก file นามสกุล .mbd ที่ต้องการแล้วคลิก Open ดังภาพประกอบที่ ก-10



ภาพประกอบที่ ก-10 หน้าต่าง Open fileสำหรับเลือก file นามสกุล .mbd

3. ที่หน้าต่างหลักของโปรแกรม คลิกที่ Sample_id เพื่อเลือกโครมาแกรมที่ต้องการเก็บ Fraction ดังภาพประกอบที่ ก-11



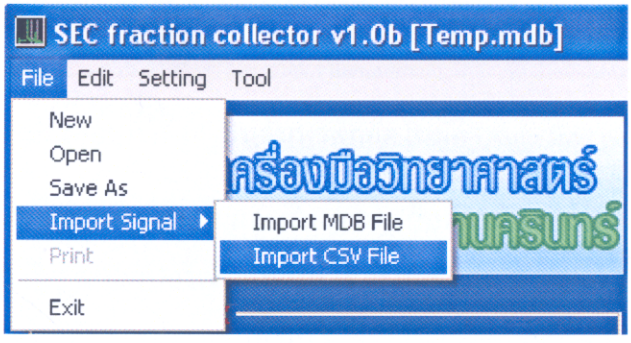
ภาพประกอบที่ ก-11 หน้าต่างสำหรับเลือก Sample_id

4. ที่หน้าต่างหลักจะปรากฏโครมาโตแกรมที่เรียกมาจากข้อ 3

6.2 กรณี Import โครมาโตแกรมจากเครื่อง LC ที่ได้ทำการฉีดไปก่อนหน้านี้แล้วเพื่อนำมากำหนดตารางการเก็บตัวอย่าง

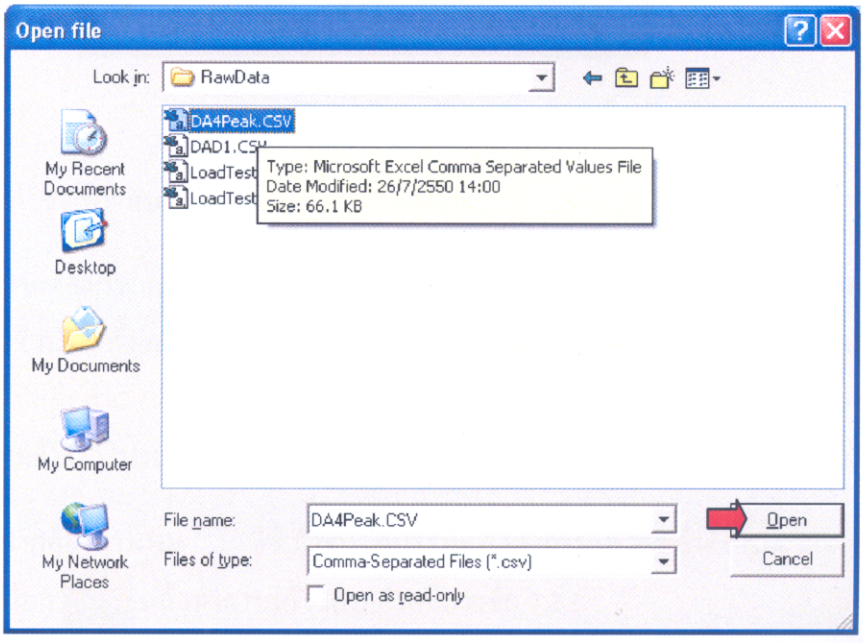
1. โครมาโตแกรมจาก เครื่อง LC Export เป็น .CSV ไฟล์

2. ทำการ Import .CSV ไฟล์ โดยที่ เมนูบาร์เลือก **File > Import Signal > Import CSV File** ดังภาพประกอบที่ ก-12



ภาพประกอบที่ ก-12 ขั้นตอนการ Import โครมาโตแกรม

3. เลือก.CSVไฟล์ ที่ต้องการ แล้วคลิก Open ดังภาพประกอบที่ ก-13

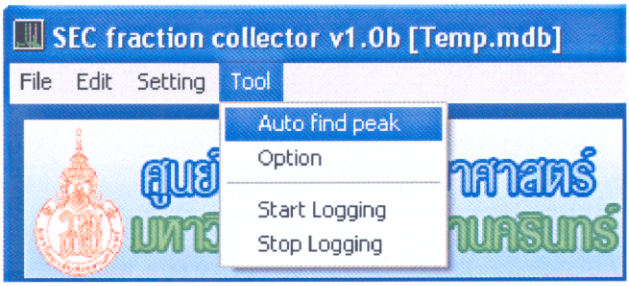


ภาพประกอบที่ ก-13 เลือก CSV File ที่ต้องการ Import

4. ที่หน้าต่างหลักจะปรากฏโครมาโตแกรมที่เรียกมาจากข้อ 3

7. กำหนดตารางการเก็บตัวอย่าง ในส่วนของ Fraction table: ดังนี้

7.1 ที่เมนูบาร์ เลือก **Click Tool > Auto find peak** ดังภาพประกอบที่ ก-14



ภาพประกอบที่ ก-14 เมนูค้นหาพีกอัตโนมัติ (Auto find peak)

7.2 โปรแกรมจะคำนวณหาจุดเริ่มต้นและสิ้นสุดการเก็บตัวอย่างของแต่ละพีกแต่ละ Fraction ให้โดยอัตโนมัติ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของความสูงพีก และ ส่วนของ **Fraction table:** จะได้ตารางเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบที่ ก-15

Fraction table :

Vial#	RT1(min)	P1(mV)	RT2(min)	P2(mV)
1	02:13	63.4	02:26	65.1
2	03:00	61.6	03:13	63.4
3	05:03	62.5	05:25	64.2
4	09:12	58.1	09:50	59.0

ภาพประกอบที่ ก-15 ตัวอย่าง ตารางเก็บตัวอย่าง

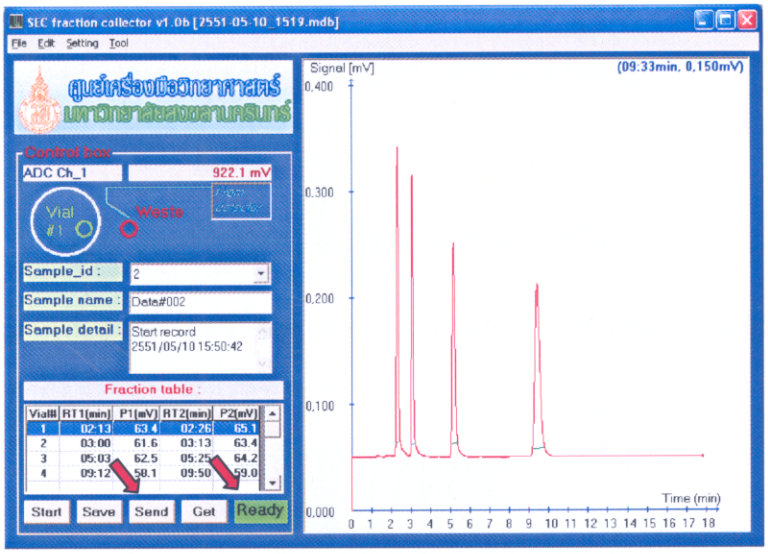
7.3 ต้องการแก้ไข /เพิ่ม/ลบ **Fraction table:** ทำได้ดังนี้

7.3.1 หากต้องการแก้ไข ใช้เม้าท์คลิก บรรทัดที่ต้องการแก้ไข จากนั้นกดปุ่ม Shift ค้างไว้ พร้อมทั้ง คลิกพีก ณ จุดเริ่มต้นที่ต้องการให้เริ่มเก็บ Fraction จากนั้นเลื่อนเม้าท์ไปคลิกตำแหน่งสิ้นสุดของพีกที่ต้องการเก็บ Fraction จากนั้นปล่อยปุ่ม Shift ที่กดค้างไว้โปรแกรมจะทำการปรับปรุงตารางการเก็บตัวอย่างให้โดยอัตโนมัติ

7.3.2 หากต้องการเพิ่ม ใช้เม้าท์คลิกบรรทัดที่ต้องการแทรกหลังจากนั้นให้คลิกขวา เลือก **Insert** แล้วทำการแก้ไขตามคำอธิบายข้อ 7.3.1

7.3.3 หากต้องการลบ ใช้เม้าท์คลิกบรรทัดที่ต้องการลบ จากนั้นคลิกขวา เลือก **Delete** บรรทัดที่เลือกไว้จะถูกลบไปทันที

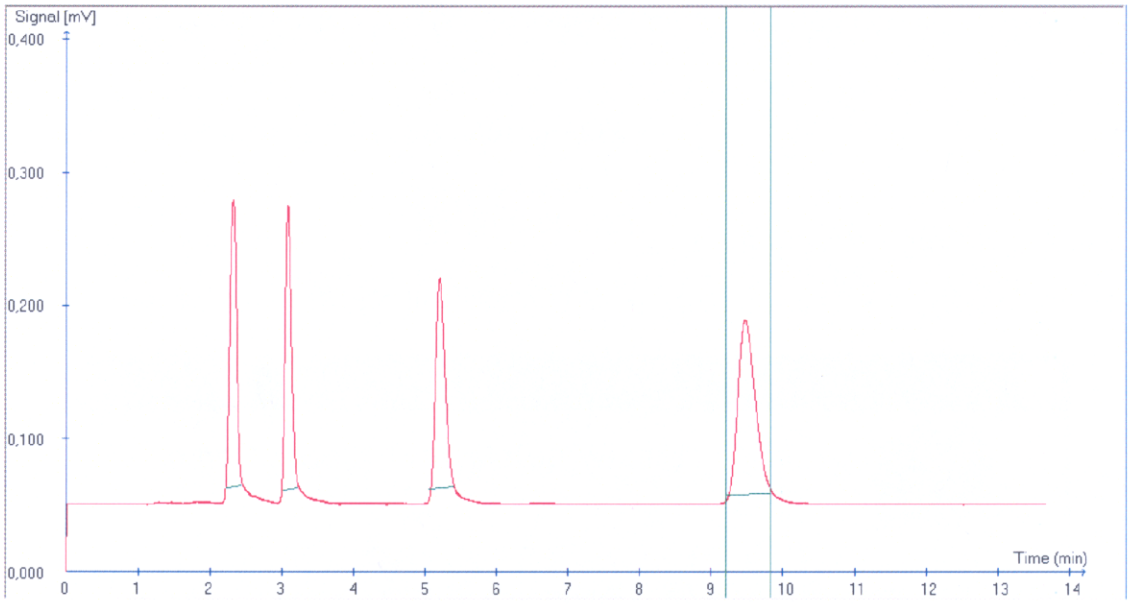
8. เมื่อกำหนดค่าในตารางการเก็บตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ให้คลิกปุ่ม **Send** ข้อความ **Ready** จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว (นั่นหมายถึงเครื่องพร้อมเก็บตัวอย่าง) ดังภาพประกอบที่ ก-16



ภาพประกอบที่ ก-16 หน้าต่างหลักแสดงสถานะ **Ready** สีเขียว

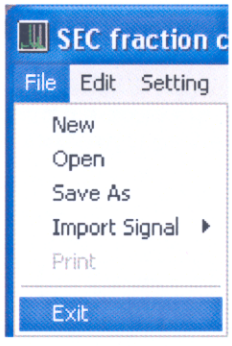
9. คลิกปุ่ม **Start** เครื่องจะเริ่มทำการเก็บ Fraction ให้โดยอัตโนมัติเมื่อเครื่อง LC เริ่มฉีดตัวอย่าง

10. ขณะที่เครื่องเก็บตัวอย่างกำลังทำงานจะแสดงภาพ โครมาโตแกรม ณ เวลาจริงพร้อมทั้ง Marker สีเขียวระบุ Fraction ที่กำลังเก็บตัวอย่าง ดังภาพประกอบที่ ก-17



ภาพประกอบที่ ก-17 โครมาโตแกรม ณ เวลาจริงและ Fraction ที่กำลังเก็บ

11. การออกจากโปรแกรม **SEC fraction collector v1.0b** เมื่อสิ้นสุดการเก็บ Fraction ทำโดย คลิกเลือก **File > Exit** ดังภาพประกอบที่ ก-18



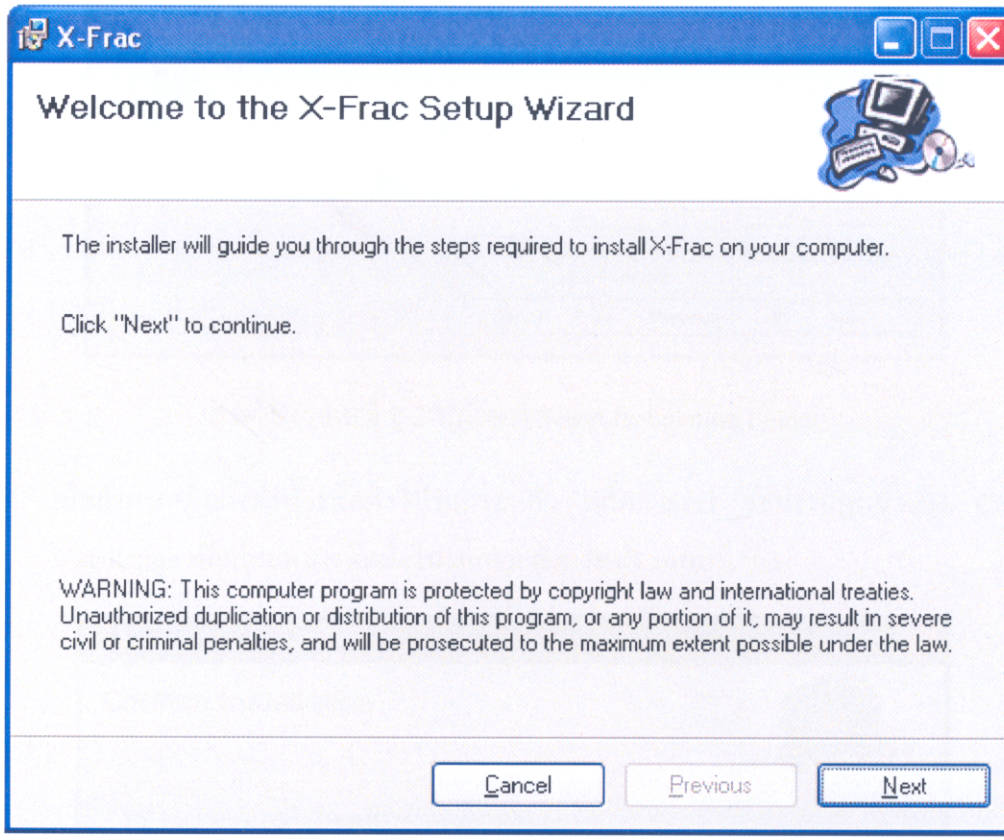
ภาพประกอบที่ ก-18 เมนู Exit เพื่อออกจากโปรแกรม

ข. การติดตั้งโปรแกรม

การติดตั้งโปรแกรม SEC fraction collector v1.0b

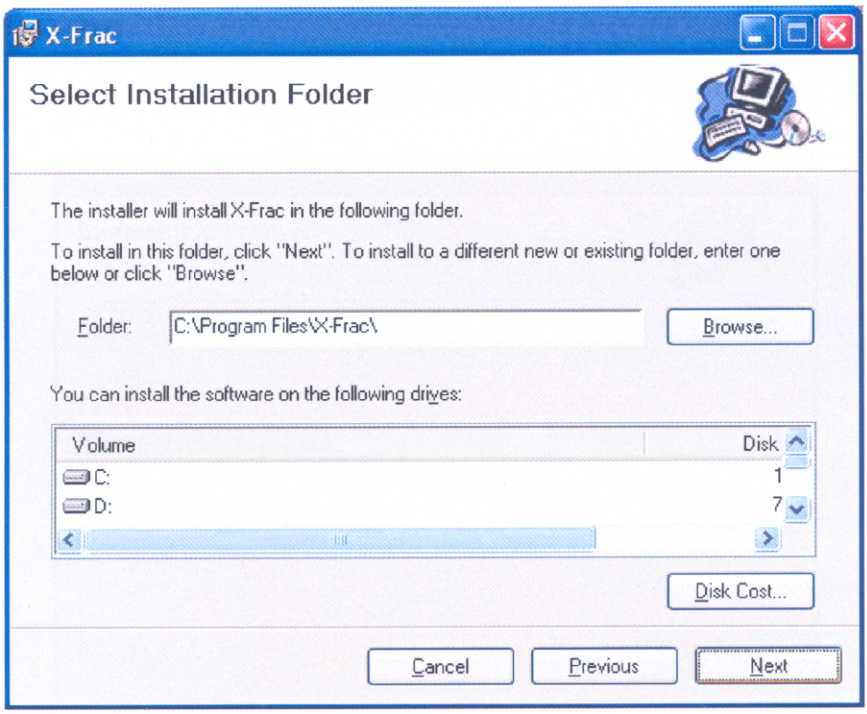
1. ดับเบิ้ลคลิ๊กไอคอนรูป

หลังจากนั้นจะปรากฏหน้าต่าง X-Frac Setup Wizard ดังภาพประกอบที่ ข-1



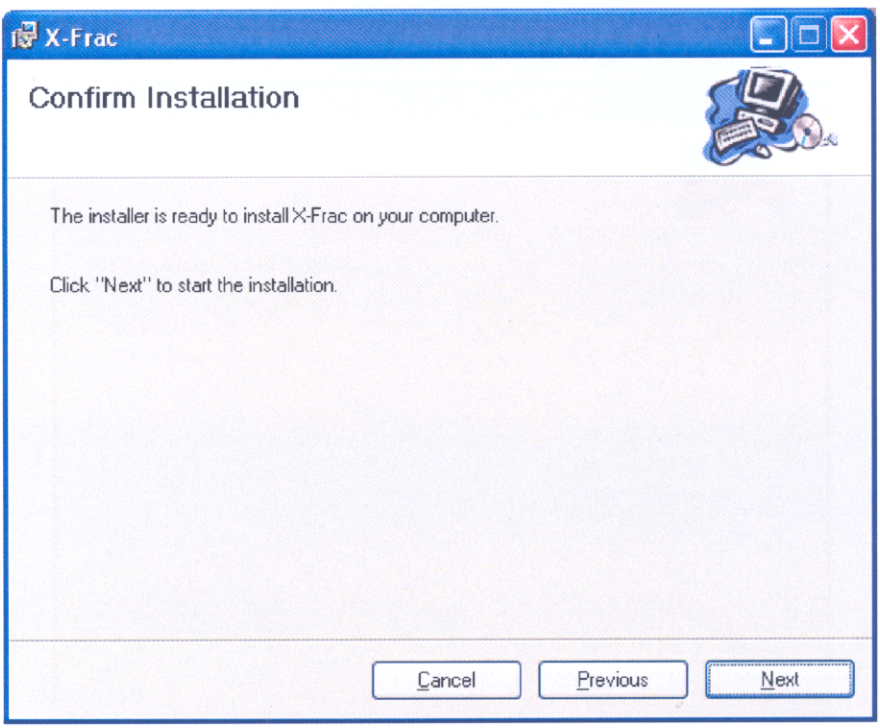
ภาพประกอบที่ ข-1 หน้าต่าง X-Frac Setup Wizard

2. หลังจากนั้นคลิ๊ก **Next** จะปรากฏหน้าต่าง Select Installation Folder เพื่อให้ผู้ใช้งานกำหนดตำแหน่งที่ต้องการติดตั้งโปรแกรม ดังภาพประกอบที่ ข-2 ซึ่งค่าเริ่มต้นจะกำหนดให้ติดตั้งที่ C:\Program Files\X-Frac\



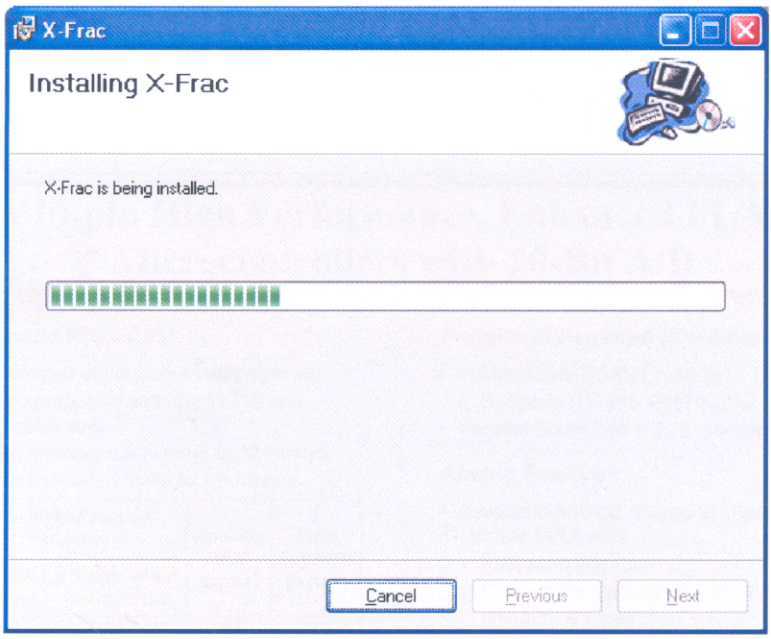
ภาพประกอบที่ ข-2 หน้าต่าง Select Installation Folder

3. เมื่อกำหนดตำแหน่งที่จะติดตั้งโปรแกรมแล้ว คลิ๊ก **Next** จะปรากฏหน้าต่าง Confirm Installation เพื่อยืนยันการติดตั้งโปรแกรม ดังภาพประกอบที่ ข-3



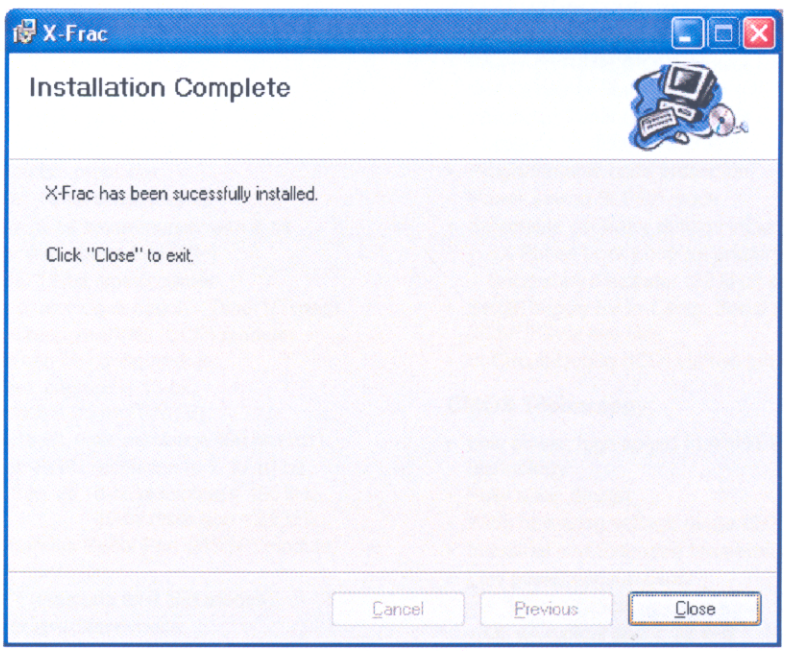
ภาพประกอบที่ ข-3 หน้าต่าง Confirm Installation

4. คลิ๊ก **Next** เพื่อยืนยันการติดตั้งโปรแกรมจะปรากฏหน้าต่าง Installing X-Frac แสดงขั้นตอนการติดตั้งโปรแกรมดังภาพประกอบที่ ข-4



ภาพประกอบที่ ข-4 หน้าต่าง Installing X-Frac

5. เมื่อการติดตั้งโปรแกรมเสร็จสิ้นจะปรากฏหน้าต่าง Installation Complete ดังภาพประกอบที่ ข-5 ให้คลิ๊ก **Close** เพื่อสิ้นสุดการติดตั้งโปรแกรม



ภาพประกอบที่ ข-5 หน้าต่าง Installation Complete

ค. Datasheet

1. PIC18F252

MICROCHIP

PIC18FXX2

28/40-pin High Performance, Enhanced FLASH Microcontrollers with 10-Bit A/D

High Performance RISC CPU:

- C compiler optimized architecture/instruction set
  - Source code compatible with the PIC16 and PIC17 instruction sets
- Linear program memory addressing to 32 Kbytes
- Linear data memory addressing to 1.5 Kbytes

Device	On-Chip Program Memory		On-Chip RAM (bytes)	Data EEPROM (bytes)
	FLASH (bytes)	# Single Word Instructions		
PIC18F242	16K	8192	768	256
PIC18F252	32K	16384	1536	256
PIC18F442	16K	8192	768	256
PIC18F452	32K	16384	1536	256

- Up to 10 MIPs operation:
  - DC - 40 MHz osc./clock input
  - 4 MHz - 10 MHz osc./clock input with PLL active
- 16-bit wide instructions, 8-bit wide data path
- Priority levels for interrupts
- 8 x 8 Single Cycle Hardware Multiplier

Peripheral Features:

- High current sink/source 25 mA/25 mA
- Three external interrupt pins
- Timer0 module: 8-bit/16-bit timer/counter with 8-bit programmable prescaler
- Timer1 module: 16-bit timer/counter
- Timer2 module: 8-bit timer/counter with 8-bit period register (time-base for PWM)
- Timer3 module: 16-bit timer/counter
- Secondary oscillator clock option - Timer1/Timer3
- Two Capture/Compare/PWM (CCP) modules. CCP pins that can be configured as:
  - Capture input: capture is 16-bit, max. resolution 6.25 ns (TCY/16)
  - Compare is 16-bit, max. resolution 100 ns (TCY)
  - PWM output: PWM resolution is 1- to 10-bit, max. PWM freq. @: 8-bit resolution = 156 kHz, 10-bit resolution = 39 kHz
- Master Synchronous Serial Port (MSSP) module, Two modes of operation:
  - 3-wire SPI™ (supports all 4 SPI modes)
  - I^2C™ Master and Slave mode

Peripheral Features (Continued):

- Addressable USART module:
  - Supports RS-485 and RS-232
- Parallel Slave Port (PSP) module

Analog Features:

- Compatible 10-bit Analog-to-Digital Converter module (A/D) with:
  - Fast sampling rate
  - Conversion available during SLEEP
  - Linearity ≤ 1 LSb
- Programmable Low Voltage Detection (PLVD)
  - Supports interrupt on-Low Voltage Detection
- Programmable Brown-out Reset (BOR)

Special Microcontroller Features:

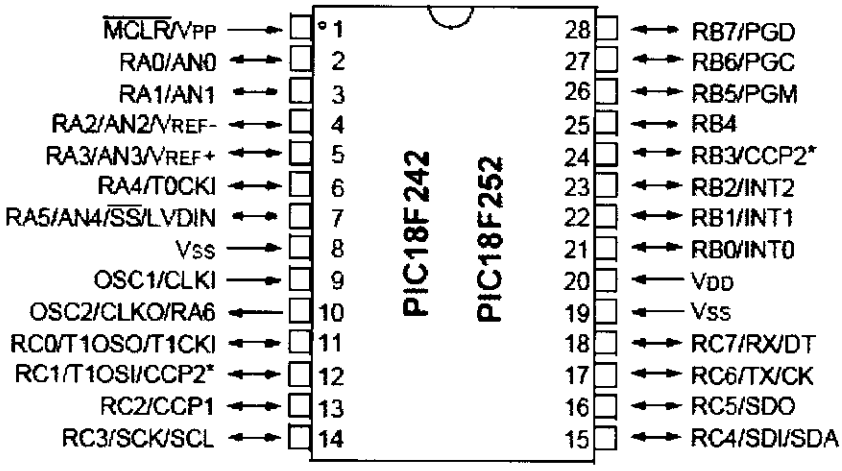
- 100,000 erase/write cycle Enhanced FLASH program memory typical
- 1,000,000 erase/write cycle Data EEPROM memory
- FLASH/Data EEPROM Retention: > 40 years
- Self-reprogrammable under software control
- Power-on Reset (POR), Power-up Timer (PWRT) and Oscillator Start-up Timer (OST)
- Watchdog Timer (WDT) with its own On-Chip RC Oscillator for reliable operation
- Programmable code protection
- Power saving SLEEP mode
- Selectable oscillator options including:
  - 4X Phase Lock Loop (of primary oscillator)
  - Secondary Oscillator (32 kHz) clock input
- Single supply 5V In-Circuit Serial Programming™ (ICSP™) via two pins
- In-Circuit Debug (ICD) via two pins

CMOS Technology:

- Low power, high speed FLASH/EEPROM technology
- Fully static design
- Wide operating voltage range (2.0V to 5.5V)
- Industrial and Extended temperature ranges
- Low power consumption:
  - < 1.6 mA typical @ 5V, 4 MHz
  - 25 µA typical @ 3V, 32 kHz
  - < 0.2 µA typical standby current

ภาพประกอบที่ ค-1 คุณสมบัติโดยรวมของไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC18F252

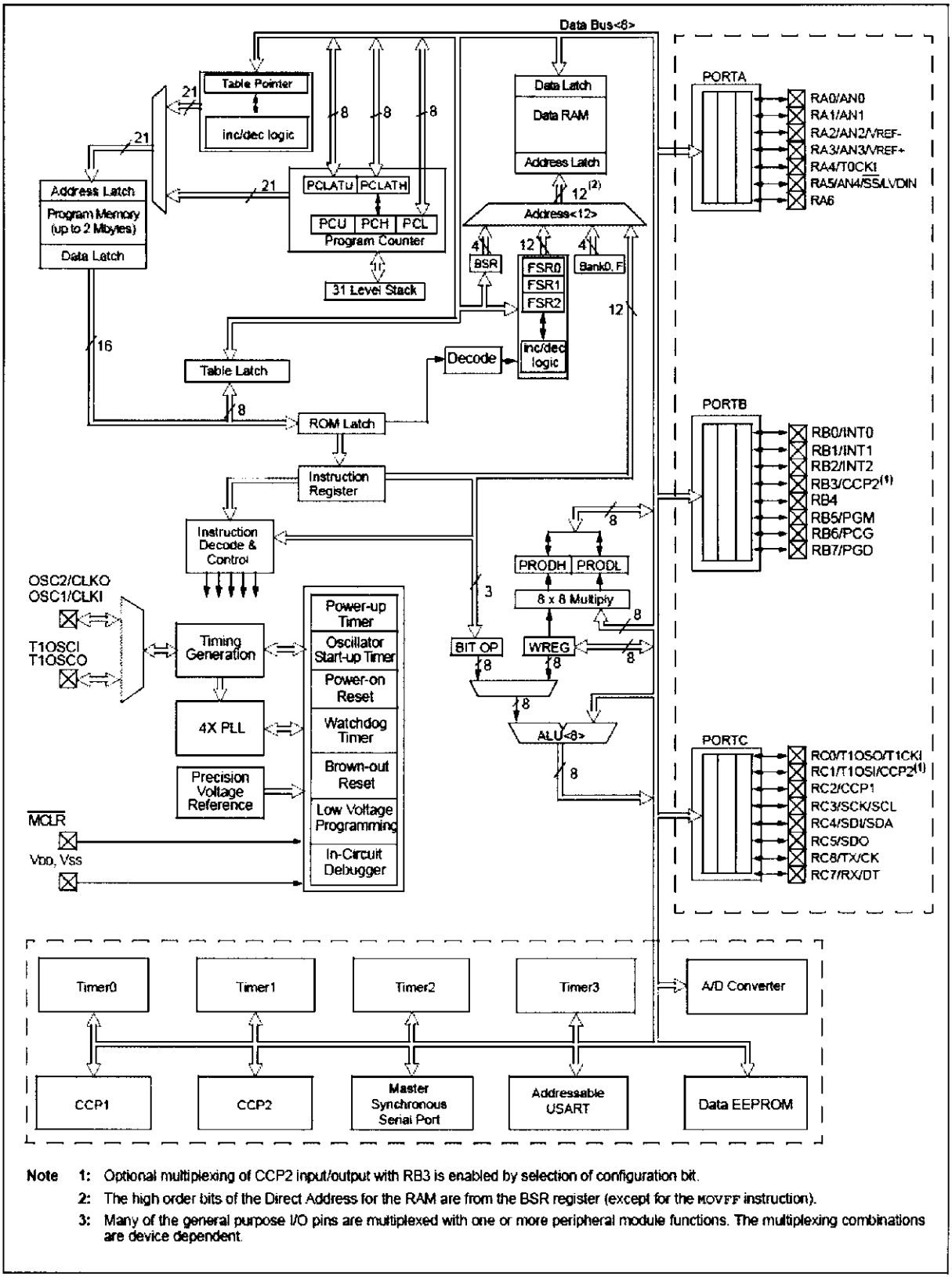
DIP, SOIC



ภาพประกอบที่ ค-2 ตัวถังแบบ SOIC

Features	PIC18F242	PIC18F252	PIC18F442	PIC18F452
Operating Frequency	DC - 40 MHz	DC - 40 MHz	DC - 40 MHz	DC - 40 MHz
Program Memory (Bytes)	16K	32K	16K	32K
Program Memory (Instructions)	8192	16384	8192	16384
Data Memory (Bytes)	768	1536	768	1536
Data EEPROM Memory (Bytes)	256	256	256	256
Interrupt Sources	17	17	18	18
I/O Ports	Ports A, B, C	Ports A, B, C	Ports A, B, C, D, E	Ports A, B, C, D, E
Timers	4	4	4	4
Capture/Compare/PWM Modules	2	2	2	2
Serial Communications	MSSP, Addressable USART	MSSP, Addressable USART	MSSP, Addressable USART	MSSP, Addressable USART
Parallel Communications	—	—	PSP	PSP
10-bit Analog-to-Digital Module	5 input channels	5 input channels	8 input channels	8 input channels
RESETS (and Delays)	POR, BOR, RESET Instruction, Stack Full, Stack Underflow (PWRT, OST)	POR, BOR, RESET Instruction, Stack Full, Stack Underflow (PWRT, OST)	POR, BOR, RESET Instruction, Stack Full, Stack Underflow (PWRT, OST)	POR, BOR, RESET Instruction, Stack Full, Stack Underflow (PWRT, OST)
Programmable Low Voltage Detect	Yes	Yes	Yes	Yes
Programmable Brown-out Reset	Yes	Yes	Yes	Yes
Instruction Set	75 Instructions	75 Instructions	75 Instructions	75 Instructions
Packages	28-pin DIP 28-pin SOIC	28-pin DIP 28-pin SOIC	40-pin DIP 44-pin PLCC 44-pin TQFP	40-pin DIP 44-pin PLCC 44-pin TQFP

ภาพประกอบที่ ค-3 ตารางแสดงคุณสมบัติเทียบกับ เบอร์อื่นๆ ในตระกูลเดียวกัน



Note 1: Optional multiplexing of CCP2 input/output with RB3 is enabled by selection of configuration bit.

2: The high order bits of the Direct Address for the RAM are from the BSR register (except for the MOVFF instruction).

3: Many of the general purpose I/O pins are multiplexed with one or more peripheral module functions. The multiplexing combinations are device dependent.

ภาพประกอบที่ ค-4 Block Diagram ของ PIC18F252

2. MCP3551

MICROCHIP

MCP3550/1/3

Low-Power, Single-Channel 22-Bit Delta-Sigma ADCs

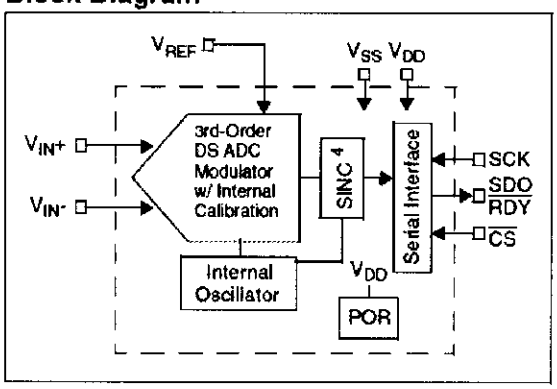
Features

- 22-bit ADC in Small 8-pin MSOP Package with Automatic Internal Offset and Gain Calibration
- Low-Output Noise of 2.5 μV_{RMS} with Effective Resolution of 21.9 bits (MCP3550/1)
- 3 µV Typical Offset Error
- 2 ppm Typical Full-Scale Error
- 6 ppm Maximum INL Error
- Total Unadjusted Error Less Than 10 ppm
- No Digital Filter Settling Time, Single-Command Conversions through 3-wire SPI Interface
- Ultra-Low Conversion Current (MCP3550/1):
  - 100 µA typical (V_{DD} = 2.7V)
  - 120 µA typical (V_{DD} = 5.0V)
- Differential Input with V_{SS} to V_{DD} Common Mode Range
- 2.7V to 5.5V Single-Supply Operation
- Extended Temperature Range:
  - -40°C to +125°C

Applications

- Weigh Scales
- Direct Temperature Measurement
- 6-digit DVMs
- Instrumentation
- Data Acquisition
- Strain Gauge Measurement

Block Diagram



Description

The Microchip Technology Inc. MCP3550/1/3 devices are 2.7V to 5.5V low-power, 22-bit Delta-Sigma Analog-to-Digital Converters (ADCs). The devices offer output noise as low as 2.5 μV_{RMS}, with a total unadjusted error of 10 ppm. The family exhibits 6 ppm Integral Non-Linearity (INL) error, 3 µV offset error and less than 2 ppm full-scale error. The MCP3550/1/3 devices provide high accuracy and low noise performance for applications where sensor measurements (such as pressure, temperature and humidity) are performed. With the internal oscillator and high oversampling rate, minimal external components are required for high-accuracy applications.

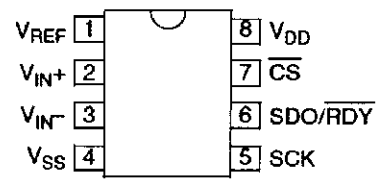
This product line has fully differential analog inputs, making it compatible with a wide variety of sensor, industrial control or process control applications.

The MCP3550/1/3 devices operate from -40°C to +125°C and are available in the space-saving 8-pin MSOP and SOIC packages.

Package Types:

MCP3550/1/3

SOIC, MSOP

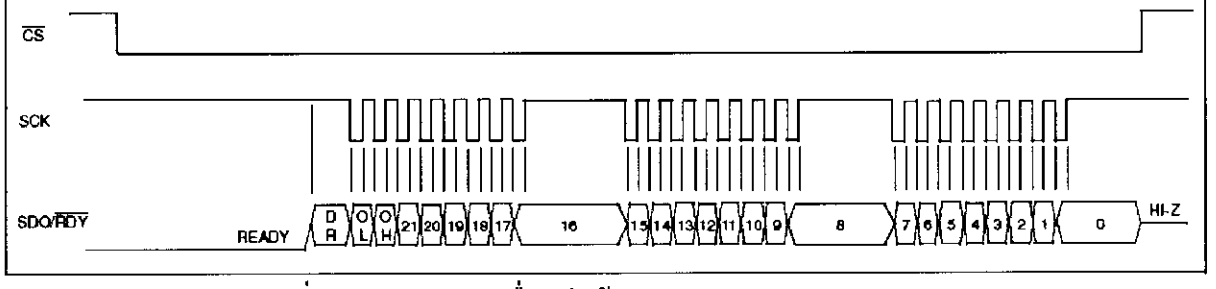


Device Selection Table

Part Number	Sample Rate	Effective Resolution	50/60 Hz Rejection
MCP3550-50	12.5 sps	21.9 bits	50 Hz
MCP3550-60	15 sps	21.9 bits	60 Hz
MCP3551	13.75 sps	21.9 bits	50/60 Hz (simultaneous)
MCP3553	60 sps	20.6 bits	N/A

ภาพประกอบที่ ค-5 คุณสมบัติโดยรวมของ MCP3551

Analog Input Voltage	OVL	OVH	Digital Output Code																				Decimal Code	Hexa
	B23	B22	B21	B20	B19	B18	B17	B16	B15	B14	B13	B12	B11	B10	B9	B8	B7	B6	B5	B4	B3	B2	B1	B0		B[23:0]
Vref +1 LSB	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2097153	600001
Vref	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2097152	600000
Vref - 1 LSB	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2097151	1FFFFF
2 LSB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	000002
1 LSB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	000001
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	000000
-1 LSB	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-1	3FFFFF
-2 LSB	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-2	3FFFFE
-Vref	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2097152	200000
-Vref -1LSB	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-2097153	9FFFFF
-Vref -2LSB	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-2097154	9FFFFE



ภาพประกอบที่ ค-6 รูปแบบการเชื่อมต่อข้อมูลแบบอนุกรมของ MCP3551

3. KIA278R05

KEC **SEMICONDUCTOR** | **KIA278R05PI~KIA278R15I**

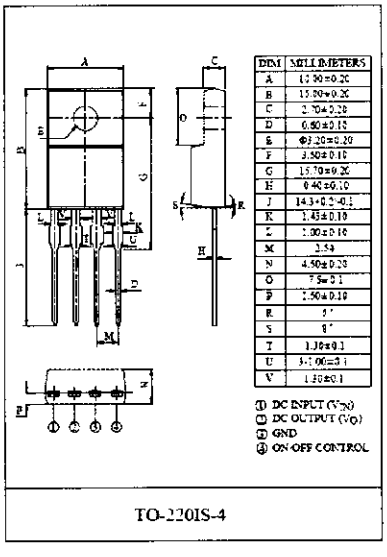
TECHNICAL DATA | **BIPOLAR LINEAR INTEGRATED CIRCUI**

4 TERMINAL 2A OUTPUT LOW DROP
VOLTAGE REGULATOR

The KIA278R × × Series are Low Drop Voltage Regulator suitable for various electronic equipments.
It provides constant voltage power source with TO-220 4 terminal lead full molded PKG. The Regulator has multi function such as over current protection, overheat protection and ON/OFF control.

FEATURES

- 2.0A Output Low Drop Voltage Regulator.
- Built in ON/OFF Control Terminal.
- Built in Over Current Protection, Over Heat Protection Function.



TO-220IS-4

LINE UP

ITEM	OUTPUT VOLTAGE (Typ.)	UNIT
KIA278R05PI	5	V
KIA278R06PI	6	
KIA278R08PI	8	
KIA278R09PI	9	
KIA278R10PI	10	
KIA278R12PI	12	
* KIA278R15PI	15	

* Note) * : Under Development.

ภาพประกอบที่ ค-7 คุณสมบัติโดยรวมของ KIA278R05

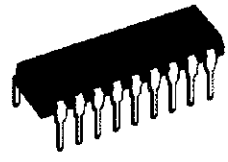
4. ULN2804

SGS-THOMSON MICROELECTRONICS

ULN2801A
ULN2802A - ULN2803A
ULN2804A - ULN2805A

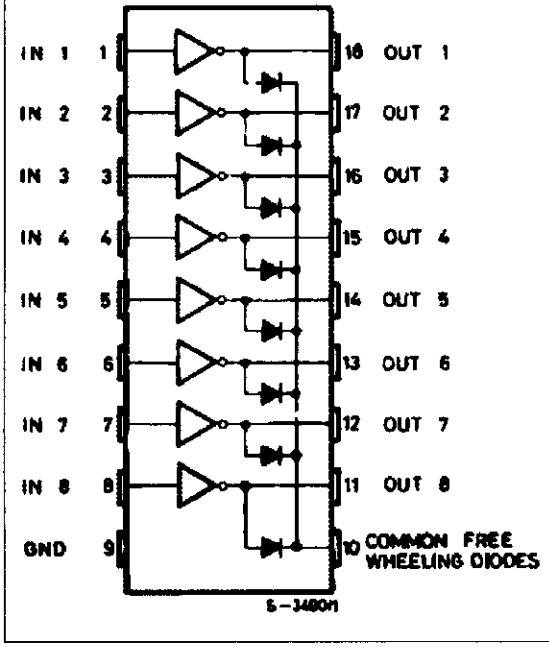
EIGHT DARLINGTON ARRAYS

- EIGHT DARLINGTONS WITH COMMON EMITTERS
- OUTPUT CURRENT TO 500 mA
- OUTPUT VOLTAGE TO 50 V
- INTEGRAL SUPPRESSION DIODES
- VERSIONS FOR ALL POPULAR LOGIC FAMILIES
- OUTPUT CAN BE PARALLELED
- INPUTS PINNED OPPOSITE OUTPUTS TO SIMPLIFY BOARD LAYOUT



DIP18

PIN CONNECTION (top view)



DESCRIPTION

The ULN2801A-ULN2805A each contain eight darlington transistors with common emitters and integral suppression diodes for inductive loads. Each darlington features a peak load current rating of 600mA (500mA continuous) and can withstand at least 50V in the off state. Outputs may be paralleled for higher current capability.

Five versions are available to simplify interfacing to standard logic families : the ULN2801A is designed for general purpose applications with a current limit resistor ; the ULN2802A has a 10.5kΩ input resistor and zener for 14-25V PMOS ; the ULN2803A has a 2.7kΩ input resistor for 5V TTL and CMOS ; the ULN2804A has a 10.5kΩ input resistor for 6-15V CMOS and the ULN2805A is designed to sink a minimum of 350mA for standard and Schottky TTL where higher output current is required.

All types are supplied in a 18-lead plastic DIP with a copper lead from and feature the convenient input-opposite-output pinout to simplify board layout.

ภาพประกอบที่ ค-8 คุณสมบัติโดยรวมของ ULN2804