

เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Automatic Fraction Collector for High Performance Liquid Chromatograph

ทรงสุตา พรหมทอง¹ ฮัมดัน มะเซ็ง¹ อุทัย ไทยเจริญ¹ ก้องเกียรติ รักวงศ์¹ และสัตยา บุญรัตน์ชู^{1*}
Songsuda Promthong¹, Humdan Maseng¹, Utai Thacharean¹, Kongkai Rakwong¹ and Sathaya Bunratchoo^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสนอการพัฒนาเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติสำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Automatic Fraction Collector) การพัฒนาได้ออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างแบบถาดหมุนสามารถบรรจุขวดเก็บตัวอย่างได้สูงสุด 12 ขวด ความจุขวดละ 20 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์ PIC18F252 เป็นตัวควบคุมสามารถเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ต RS-232 อีกทั้งได้พัฒนาโปรแกรมส่วนติดต่อกับผู้ใช้งานเพื่อใช้ควบคุมการทำงานและกำหนดค่าการเก็บตัวอย่างในรูปแบบกราฟิก (Graphic User Interface) ทำให้สะดวกต่อการใช้งานเป็นอย่างมาก ผลของการทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างที่ได้พัฒนาขึ้น สามารถเก็บตัวอย่างจากการแยกของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงได้อย่างแม่นยำ และสามารถวนรอบการเก็บตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติเพื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่าง อีกทั้งยังสามารถบันทึกโครมาโทแกรมเพื่อเรียกดูย้อนหลังได้อีกด้วย

คำสำคัญ: เครื่องเก็บตัวอย่าง เครื่องบันทึกข้อมูล โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Abstract

This research aimed to present the development of an HPLC Automatic Fraction Collector, which was designed to automatically collect separated fractions from high-performance liquid chromatography (HPLC). The rotating tray-type fraction collector was designed to accommodate a maximum of 12 sample vials, with each vial having a capacity of 20 milliliters. It was controlled by a PIC18F252 microcontroller and can be connected to a computer via an RS-232 port. Additionally, a user interface program had been developed to facilitate user control and configuration of sample collection parameters in a graphical user interface (GUI), ensuring ease of use. The testing results of the developed fraction collector demonstrated its precise collection of samples from HPLC separation, particularly for high-performance liquid chromatography of high fluidity. The system allowed for automatic cycling of the sample collection process to increase sample volume. Furthermore, it enabled the recording of chromatograms for subsequent retrospective analysis.

Keywords: fraction collector, data logger, HPLC

บทนำ

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจซึ่งผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ ได้แก่ คอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ตัวทำละลาย ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน สารประกอบตัวใดที่สามารถเข้ากันได้กับตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้า

¹ สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

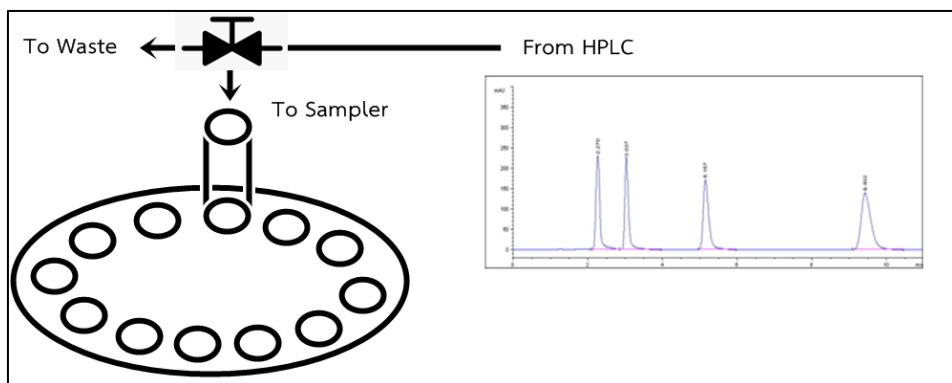
¹ Office of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110

*Corresponding author: e-mail: sathaya.b@psu.ac.th

Received: September 16, 2023, Accepted: November 2, 2023, Published: July 16, 2024



กันได้ไม่ดีกับตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าจะถูกแยกออกมาที่หลัง โดยสารประกอบที่ถูกแยกออกมาได้นั้นจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่าโครมาโทแกรมสามารถระบุได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ กรณีเชิงคุณภาพจะระบุด้วยเวลาที่สารถูกแยกออกมาสอดคล้องกับเวลาเดียวกับสารมาตรฐานที่เวลาเดียวกันด้วยสภาวะการแยกเดียวกัน กรณีเชิงปริมาณจะเป็นการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการแยกเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อระบุเป็นปริมาณสารที่ตรวจวัดได้ หากต้องการแยกเก็บสารประกอบที่ผ่านการแยกจากคอลัมน์สามารถทำได้โดยการนำขวดมารองรับ ณ เวลาที่สารประกอบนั้นถูกแยกออกมาแทนการปล่อยให้ไหลลงสู่ขวดรับของเสีย หรืออาศัยเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ แผนผังการเก็บ Fraction แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนผังการเก็บตัวอย่างจากการแยกของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติใช้สำหรับการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการแยกโดยคอลัมน์ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงซึ่งสามารถแยกสารที่มีความซับซ้อนโดยให้สารที่มีความบริสุทธิ์สูงแต่มีปริมาณน้อยมาก เช่น การแยกสารสำคัญในตัวอย่างสกัดจากกัญชา (ธนวัฒน์ และคณะ, 2564) ตัวอย่างสกัดจากพืชกระท่อม (Mudge and Brown, 2017) จึงจำเป็นต้องมีการฉีดตัวอย่างและวนรอบการเก็บหลาย ๆ ครั้ง จนกว่าจะได้ปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ กระบวนการนี้ต้องใช้เวลาและความแม่นยำของการเก็บตัวอย่างในแต่ละส่วนที่ผ่านการแยก ถึงแม้ว่าการเก็บตัวอย่างจากการแยกสามารถทำได้ด้วยมือแต่ก็ประสบปัญหาเนื่องจากขาดความน่าเชื่อถือและเป็นภาระเพราะต้องใช้ระยะเวลาในการเก็บนาน ในขณะที่เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์มีราคาแพง การออกแบบและสร้างเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัตินั้นสามารถทำได้หลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับเป้าหมายและต้นทุนในการสร้างเครื่องมือ อย่างไรก็ตามในส่วนของภาคเก็บตัวอย่างมักมีการออกแบบภาคเก็บตัวอย่างในสองรูปแบบ คือ การออกแบบให้ภาควัดบรรจุขวดเก็บตัวอย่างอยู่กับที่และออกแบบให้มีส่วนเคลื่อนที่ในแนวแกน X และแกน Y เพื่อเคลื่อนย้ายตัวอย่างไปยังขวดเก็บตัวอย่าง (Diaz *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021) อีกรูปแบบในการออกแบบภาคเก็บตัวอย่างซึ่งสามารถสร้างได้ง่ายกว่า คือ การออกแบบภาควัดเก็บตัวอย่างให้เคลื่อนที่แบบภาคหมุนให้ขวดเก็บตัวอย่างเคลื่อนที่ไปยังตัวอย่างที่ต้องการจัดเก็บ (Medina *et al.*, 2023)

ด้วยสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบมีให้บริการทดสอบด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทั้งรูปแบบให้บริการทางวิชาการและให้บริการใช้เครื่องมือด้วยตนเอง มีผู้เข้ามาใช้บริการที่หลากหลายทั้งนักวิจัย อาจารย์ นักศึกษา เพื่อรองรับงานวิจัย วิทยานิพนธ์ รวมทั้งนักวิทยาศาสตร์ประจำสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ ในการดำเนินการวิจัยจำเป็นต้องเก็บสารตัวอย่างที่เกิดจากการแยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแต่ไม่มีส่วนของการเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ ทำได้เพียงแยกเก็บรองรับด้วยมือซึ่งไม่สะดวก ดังนั้นคณะวิจัยจึงมีแนวคิดที่จะออกแบบและสร้างเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติเพื่อต่อพ่วงกับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงขึ้นใช้เองภายในห้องปฏิบัติการโดยใช้อุปกรณ์ที่หาได้ไม่ยาก ต้นทุนต่ำ สามารถสร้างได้เอง เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการและรองรับผู้มาใช้บริการที่ต้องการเก็บแยกส่วนที่ได้ เพื่อนำไปต่อยอดงานวิจัยต่อไปได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อออกแบบและสร้างเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อทดสอบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่ได้สร้างขึ้น

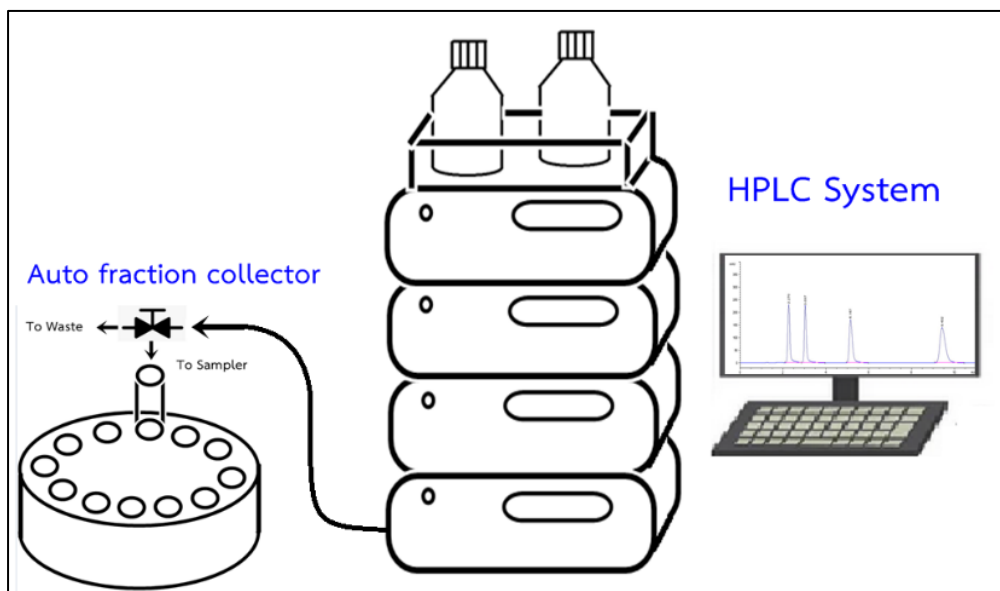
ระเบียบวิธีวิจัย

1. เครื่องมืออุปกรณ์ ตัวอย่างและสารเคมีในการทำวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยี่ห้อเอจิลেন্টเทคโนโลยี รุ่น 1100 ผลิตจากประเทศเยอรมนี ที่มีตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Variable Wavelength Detector (VWD) คอลัมน์สำหรับใช้แยกสารชนิด Zorbax Eclipse XDB C8 ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ยี่ห้อเอจิลেন্টเทคโนโลยี ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาคือวัสดุอ้างอิงที่ผ่านการรับรอง (Certified reference material; CRM) ชื่อ Isocratic Sample Part Number 01080-68704 ทั้งหมดซื้อจากบริษัท เวิลด์สยามกรุ๊ป จำกัด ประเทศไทย สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ อะซิโตนไตรล์ (AR grade) ยี่ห้อ Labscan ซื้อจากห้างหุ้นส่วนจำกัดไฮชายน์ ประเทศไทย น้ำปราศจากไอออน ผลิตใช้เองในห้องปฏิบัติการสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบโดยใช้เครื่องผลิตยี่ห้อ Millipore SAS รุ่น Milli-Q Direct 8 System

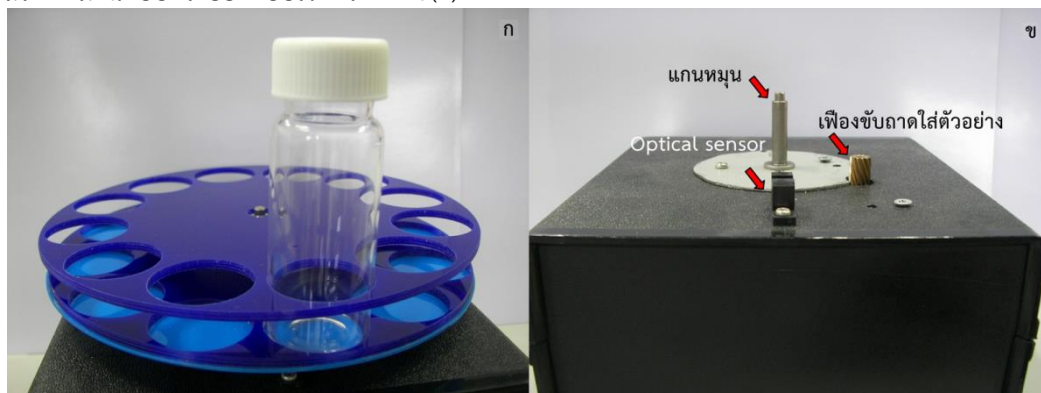
2. ออกแบบและสร้างภาคเก็บตัวอย่าง

เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่ออกแบบจะมีการเชื่อมต่อกับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อให้การทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติมีการเข้าจังหวะกับการฉีดตัวอย่างของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในแต่ละรอบของการฉีดตัวอย่างรวมถึงจังหวะเวลาที่ปรากฏของสารประกอบ (Retention Time) และระดับสัญญาณของตัวตรวจวัด และเพื่อความถูกต้องแม่นยำในการเลือกเก็บสารประกอบแต่ละส่วน ในกรณีนี้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงยี่ห้อเอจิลেন্ট รุ่น 1100 สามารถเชื่อมต่อสัญญาณผ่าน Remote port ของเครื่องมือซึ่งจะให้สัญญาณแรงดันที่ระบุถึงช่วงเวลาที่เริ่มฉีดตัวอย่างในแต่ละรอบ ในขั้นตอนการออกแบบเครื่องเก็บตัวอย่างได้ออกแบบส่วนเก็บตัวอย่างแบบถาดหมุนและออกแบบให้บรรจุขวดเก็บตัวอย่างขนาด 20 มิลลิลิตร ได้จำนวน 12 ขวดซึ่งเพียงพอต่อการใช้งานในการแยกเก็บตัวอย่างที่จะใช้เก็บ ถาดเก็บตัวอย่างที่ออกแบบจะมีลักษณะเหมือนแผ่นจาน 2 ชั้นเจาะช่องสำหรับใส่ขวดเก็บตัวอย่างสามารถหมุนได้ แผ่นผังการเชื่อมต่อของเครื่อง แสดงดังในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผ่นผังการเชื่อมต่อของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติกับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

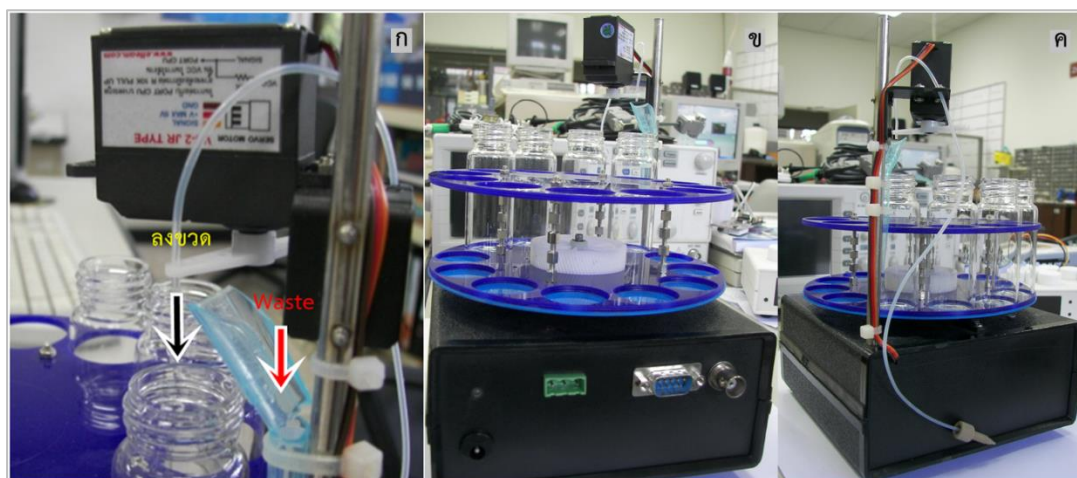
ตัวอย่างที่ผ่านการแยกแล้วจะไหลออกมาตามท่อตามเวลาที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิดและไหลผ่านเซอร์โวมอเตอร์ซึ่งจะทำหน้าที่เหมือนวาล์วสามทางถูกควบคุมโดยไมโครคอนโทรลเลอร์เพื่อเลือกจะให้ตัวอย่างไหลลงสู่ขวดเก็บตัวอย่างหรือถูกปล่อยให้ไหลทิ้งเพื่อกำจัดต่อไป เมื่อได้รูปแบบของภาคเก็บตัวอย่างแล้วได้ดำเนินการสร้างตามต้นแบบที่ได้ออกแบบไว้ ดังภาพที่ 3(ก)



ภาพที่ 3 ภาคเก็บตัวอย่างที่สร้างขึ้น (ก) แกนหมุนและเซ็นเซอร์ตรวจจับตำแหน่งเริ่มต้นของภาคหมุน (ข) ภาคเก็บตัวอย่างจะถูกวางอยู่บนแกนหมุนและถูกขับให้สามารถหมุนได้รอบโดยเฟืองทดรอบ ดังภาพที่ 3 (ข) การขับเคลื่อนตัวอย่างจะใช้ Stepper Motor ซึ่งจะมีความแม่นยำในการกำหนดตำแหน่งของขวดเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมี Optical Sensor สำหรับระบุตำแหน่งเริ่มต้นของภาคเก็บตัวอย่างเพื่อใช้เป็นตำแหน่งอ้างอิงอีกด้วย

3. สร้างแขนกลสำหรับคัดกรองตัวอย่าง

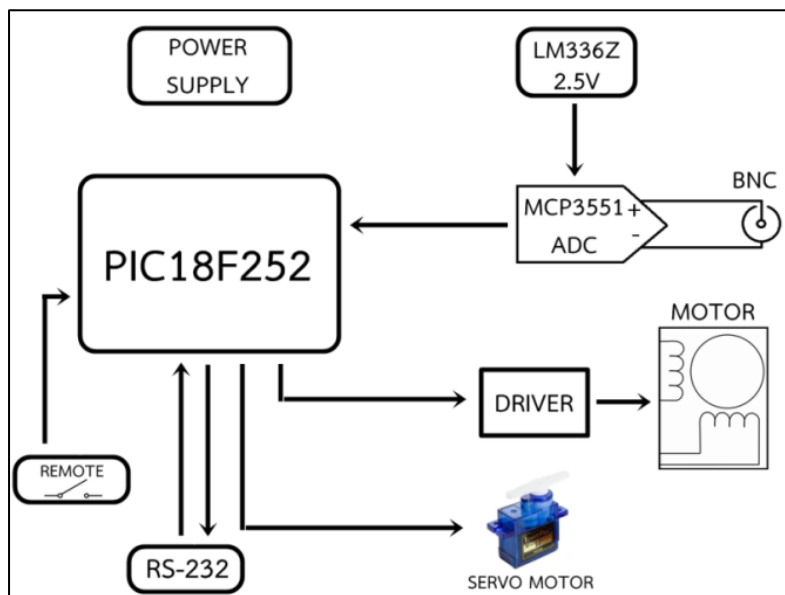
ขั้นตอนต่อไปได้ทำการติดตั้งเซอร์โวมอเตอร์สำหรับควบคุมการเก็บตัวอย่างของแต่ละ Fraction ที่ตรวจวัดได้ ทดแทนการใช้วาล์วแบบสามทาง เนื่องจากวาล์วแบบสามทางขนาดเล็กสำหรับเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์มีราคาค่อนข้างสูง (15,000 – 30,000 บาท) จึงได้ออกแบบโดยใช้เซอร์โวมอเตอร์ทำหน้าที่ควบคุมทิศทางการไหลของตัวอย่างดังภาพที่ 4(ก) ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายและสามารถทำงานได้เป็นอย่างดี ตัวเครื่องที่ประกอบแล้วเสร็จด้านหน้าและด้านหลังแสดงดังภาพที่ 4(ข) และ 4(ค)



ภาพที่ 4 เซอร์โวมอเตอร์ควบคุมทิศทางการเก็บตัวอย่าง (ก) ตัวเครื่องด้านหลัง (ข) และตัวเครื่องด้านหน้า (ค)

4. ออกแบบวงจรควบคุมและแผ่นวงจรพิมพ์

ออกแบบวงจรแปลงสัญญาณจากแอนาล็อกเป็นสัญญาณดิจิทัล (Analog to Digital Converter ; ADC) โดยใช้ตัวแปลงขนาด 22 บิต เบอร์ MCP3551 ซึ่งมีความละเอียดในการแปลงสัญญาณที่สูงมากสามารถวัดได้ถึง 4,194,304 ระดับหรือละเอียดถึง 1 ไมโครโวลต์ จากระดับแรงดันตรวจวัด 0-2.5 โวลต์เพียงพอต่อการใช้งาน นอกจากนี้ MCP3551 ยังสามารถหาซื้อได้ในประเทศไทยในราคาไม่แพง (www.es.co.th) การออกแบบวงจรควบคุมแสดงได้ดังแผนผังในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แผนผังวงจรควบคุมของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ

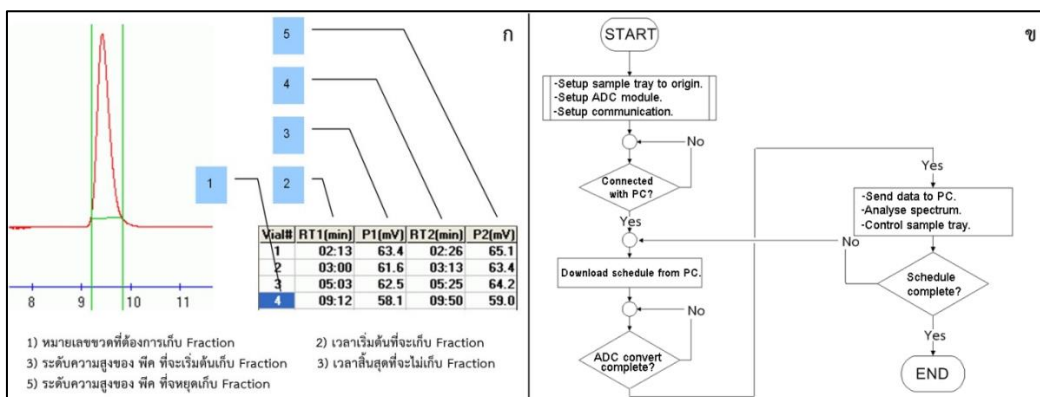
จากภาพที่ 5 ส่วน LM336Z จะเป็นตัวสร้างแรงดันอ้างอิง 2.5 โวลต์ให้แก่ MCP3551 ซึ่งจะมีตัวต้านทานปรับค่าได้สามารถปรับแรงดันอ้างอิงให้แม่นยำที่ 2.5 โวลต์ ในส่วนของไมโครคอนโทรลเลอร์ได้เลือกใช้ PIC18F252 ทำหน้าที่เป็นหน่วยประมวลผลและควบคุมการทำงานต่าง ๆ ได้แก่ (1) อ่านค่าสัญญาณโครมาโทแกรมจาก ADC เบอร์ MCP3551 ผ่านการเชื่อมต่อแบบ SPI (2) ควบคุมภาคเก็บตัวอย่างโดยการควบคุม Stepper motor ผ่านวงจรขับ A4988 ซึ่งผลิตโดยบริษัท Allegro MicroSystems (3) เชื่อมต่อกับสัญญาณ Remote ซึ่งเป็นสัญญาณ TTL จากเครื่อง HPLC เป็นสัญญาณที่ใช้ระบุถึงเวลาเริ่มต้นของการฉีดตัวอย่างในแต่ละครั้ง ทำให้เวลาในการฉีดตัวอย่างของ HPLC และเวลาเก็บตัวอย่างของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติตรงกัน (4) เชื่อมต่อกับเซอร์โวมอเตอร์ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมตำแหน่งในการปล่อยตัวอย่างให้ลงขวดรับของเสียหรือลงขวดเก็บตัวอย่าง (5) เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่าน RS-232 อย่างไรก็ตามสามารถใช้ตัวแปลง USB เป็น RS-232 สำหรับคอมพิวเตอร์รุ่นใหม่ ๆ ที่ไม่มีส่วนสื่อสารอนุกรมแบบ RS-232

5. พัฒนาโปรแกรมไมโครคอนโทรลเลอร์และโปรแกรมคอมพิวเตอร์

การควบคุมจากคอมพิวเตอร์เลือกใช้การสื่อสารแบบ RS-232 โดยไมโครคอนโทรลเลอร์ถูกออกแบบให้มีการใช้บัฟเฟอร์จำนวน 256 byte ทำให้สามารถส่งข้อมูลต่อเนื่องได้โดยไม่ต้องรอให้คำสั่งล่าสุดเสร็จสิ้น และสุดท้ายได้ออกแบบตารางการเก็บตัวอย่างโดยใช้บัฟเฟอร์จำนวน 108 byte เพื่อใช้เก็บข้อมูลเริ่มต้นและสิ้นสุดของตัวอย่างจำนวน 12 Fraction โดยตารางการเก็บตัวอย่างของแต่ละ Fraction จะประกอบไปด้วยข้อมูลดังภาพที่ 6(ก)

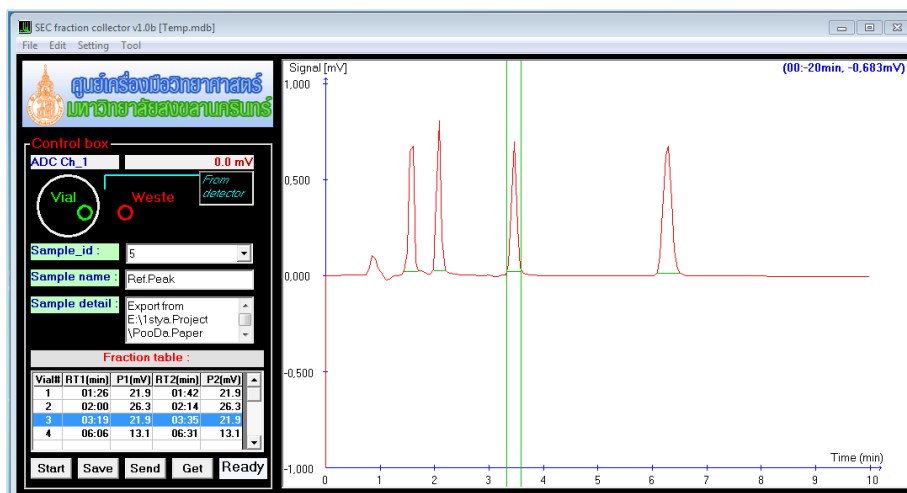
ผังการทำงานของโปรแกรมบนไมโครคอนโทรลเลอร์แสดงดังภาพที่ 6(ข) ขั้นตอนการทำงานเริ่มจากเมื่อป้อนไฟเข้าเครื่อง ไมโครคอนโทรลเลอร์จะทำการหมุนภาคเก็บตัวอย่างเพื่อหาตำแหน่งเริ่มต้นของภาคเก็บ

ตัวอย่างจาก Optical sensor และตั้งค่าเริ่มต้นเพื่อใช้งาน ADC (MCP3551) หลังจากนั้นจะรอการติดต่อจากคอมพิวเตอร์เพื่อคอยรับคำสั่งการทำงานต่าง ๆ ไมโครคอนโทรลเลอร์จะทำการตรวจสอบสัญญาณ START จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงผ่านทาง Remote port ซึ่งจะมีระดับแรงดัน 5 โวลต์ที่สถานะปกติ และจะเป็น 0 โวลต์ เมื่อมีการฉีดตัวอย่าง ทำให้ไมโครคอนโทรลเลอร์ทราบถึงตำแหน่งอ้างอิงเริ่มต้นเมื่อมีการฉีดตัวอย่างได้ เมื่อถึงเวลาที่กำหนดไว้ในตารางเก็บตัวอย่างและระดับสัญญาณจากตัวตรวจวัดถึงค่าที่ตั้งไว้ เครื่องเก็บตัวอย่างจะทำการเก็บ Fraction นั้น ๆ โดยอัตโนมัติ และหากระดับสัญญาณจากตัวตรวจวัดลดต่ำกว่าค่าที่กำหนดไว้หรือเกินเวลาสิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง เครื่องเก็บตัวอย่างจะหยุดการเก็บ Fraction นั้นทันที และเตรียมพร้อมสำหรับเก็บ Fraction ถัดไป อย่างไรก็ตามสัญญาณที่วัดได้จากตัวตรวจวัดจะถูกหน่วงเวลาโดยไมโครคอนโทรลเลอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวท่อจากตัวตรวจวัดไปสู่เครื่องเก็บตัวอย่างและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้การเก็บตัวอย่างมีความแม่นยำและถูกต้องที่สุด การทำงานของโปรแกรมได้ถูกพัฒนาโดยใช้ Interrupt และ Timer เป็นหลัก ดังนั้นไมโครคอนโทรลเลอร์จะสามารถทำงานได้หลาย ๆ งาน พร้อม ๆ กันแบบกึ่งเวลาจริง (Real Time) ซึ่งจะทำให้สามารถหมุนถาด ควบคุมเซอร์โวมอเตอร์ รับคำสั่งจากคอมพิวเตอร์ รับสัญญาณจาก ADC ได้พร้อม ๆ กัน โดยจะมีบัฟเฟอร์สำหรับเก็บข้อมูล ADC จำนวน 640 bytes ซึ่งจะสามารถบันทึกโครมาโทแกรมได้เป็นเวลา 20 วินาที ทำให้ไม่จำเป็นต้องส่งข้อมูลตลอดเวลาในจังหวะที่แน่นอน คอมพิวเตอร์จะสามารถทำงานอย่างอื่นไปพร้อม ๆ กันได้

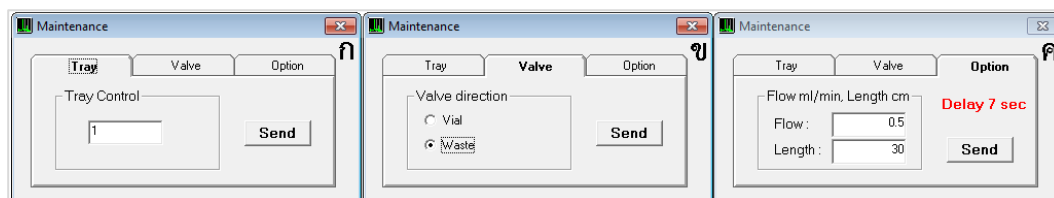


ภาพที่ 6 ข้อมูลคำสั่งการจัดเก็บ Fraction ในรูปแบบตาราง (ก) ผังการทำงานของโปรแกรม (ข)

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้พัฒนาให้สามารถดึงข้อมูลโครมาโทแกรมจากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในรูปแบบ CSV File ได้ โดยรูปแบบ CSV File สามารถสร้างจากโปรแกรม Chemstation จากการ Export ในหน้าต่าง Data Analysis ซึ่งจะทำให้ผู้ใช้สามารถนำโครมาโทแกรมที่มีอยู่แล้วมาเป็นโครมาโทแกรมต้นแบบเพื่อกำหนดรูปแบบการเก็บ Fraction ของตัวอย่างได้ดังภาพที่ 7 เนื่องจากความแม่นยำในการเก็บตัวอย่างเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ที่สุดจึงได้พัฒนาให้โปรแกรมสามารถคำนวณเวลาในการหน่วงของไมโครคอนโทรลเลอร์จากระยะห่างของท่อระหว่างตัวตรวจวัดกับวาล์วเก็บตัวอย่าง (Delay volume from detector to collection valve) ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงความยาวท่อจากตัวตรวจวัดสู่เครื่องเก็บตัวอย่างหรือเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ Mobile phase จะต้องคำนวณค่าหน่วงเวลานี้ทุกครั้ง การเข้าสู่เมนูการทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างและการกำหนดค่าความยาวท่อ ให้ Click Tool > Option จะปรากฏหน้าต่างดังภาพที่ 8 ซึ่งโปรแกรมจะทำการคำนวณค่าหน่วงเวลาในการเคลื่อนที่ของ Fraction ที่ถูกตรวจวัดได้จากตัวตรวจวัดก่อนจะลงสู่ขวดเก็บตัวอย่างให้โดยอัตโนมัติทำให้เกิดความแม่นยำในการเก็บตัวอย่างมากขึ้น



ภาพที่ 7 หน้าต่างแสดงผลการทำงานของโปรแกรมที่พัฒนาขึ้น



ภาพที่ 8 หน้าต่างควบคุมตำแหน่งเก็บตัวอย่าง (ก) ควบคุมตำแหน่งวาล์ว (ข) และตั้งอัตราการไหลและความยาวท่อ (ค)

6. ขั้นตอนทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ

เมื่อเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติได้ถูกพัฒนาเสร็จสมบูรณ์ทั้งส่วนของภาคเก็บตัวอย่าง แผ่นวงจรพิมพ์ โปรแกรมไมโครคอนโทรลเลอร์ และโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ในขั้นตอนการทดสอบการทำงานด้วยตัวอย่างที่ใช้ศึกษา คือ วัสดุอ้างอิงที่ผ่านการรับรอง ชื่อ Isocratic Sample เป็นตัวอย่างที่ใช้เพื่อทดสอบการเก็บตัวอย่างจากการแยกผ่านเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่พัฒนาขึ้นโดยสภาวะการแยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแสดงดังตารางที่ 1

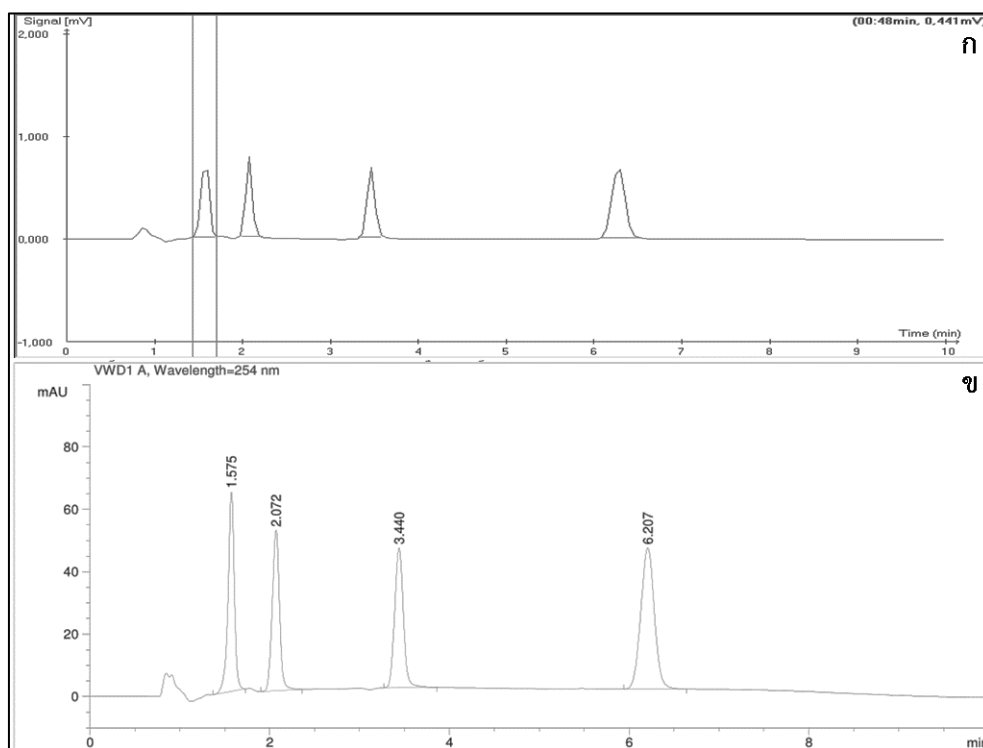
ตารางที่ 1 สภาวะการแยกสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงต่อกับเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนอัตโนมัติ

สภาวะการแยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	
คอลัมน์	Zorbax Eclipse XDB C8 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาวคอลัมน์ 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน
อุณหภูมิคอลัมน์	40 องศาเซลเซียส
เฟสเคลื่อนที่	อะซิโตนไตรล์ 65 ส่วน ต่อ น้ำ 35 ส่วน โดยปริมาตร
อัตราการไหล	1.0 มิลลิตรต่อนาที
ตัวตรวจวัดความยาวคลื่น	254 นาโนเมตร
ปริมาตรที่ฉีด	10 ไมโครลิตร

ผลการวิจัย

ขั้นตอนการทดสอบการทำงานของเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่พัฒนาขึ้น ได้ใช้ตัวอย่างสาร Isocratic Sample เป็นตัวอย่างทดสอบการเก็บตัวอย่างจากการแยก โดยเมื่อสารตัวอย่างผ่านการแยกจะให้สารประกอบ 4 Fraction ที่ถูกแยกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณ

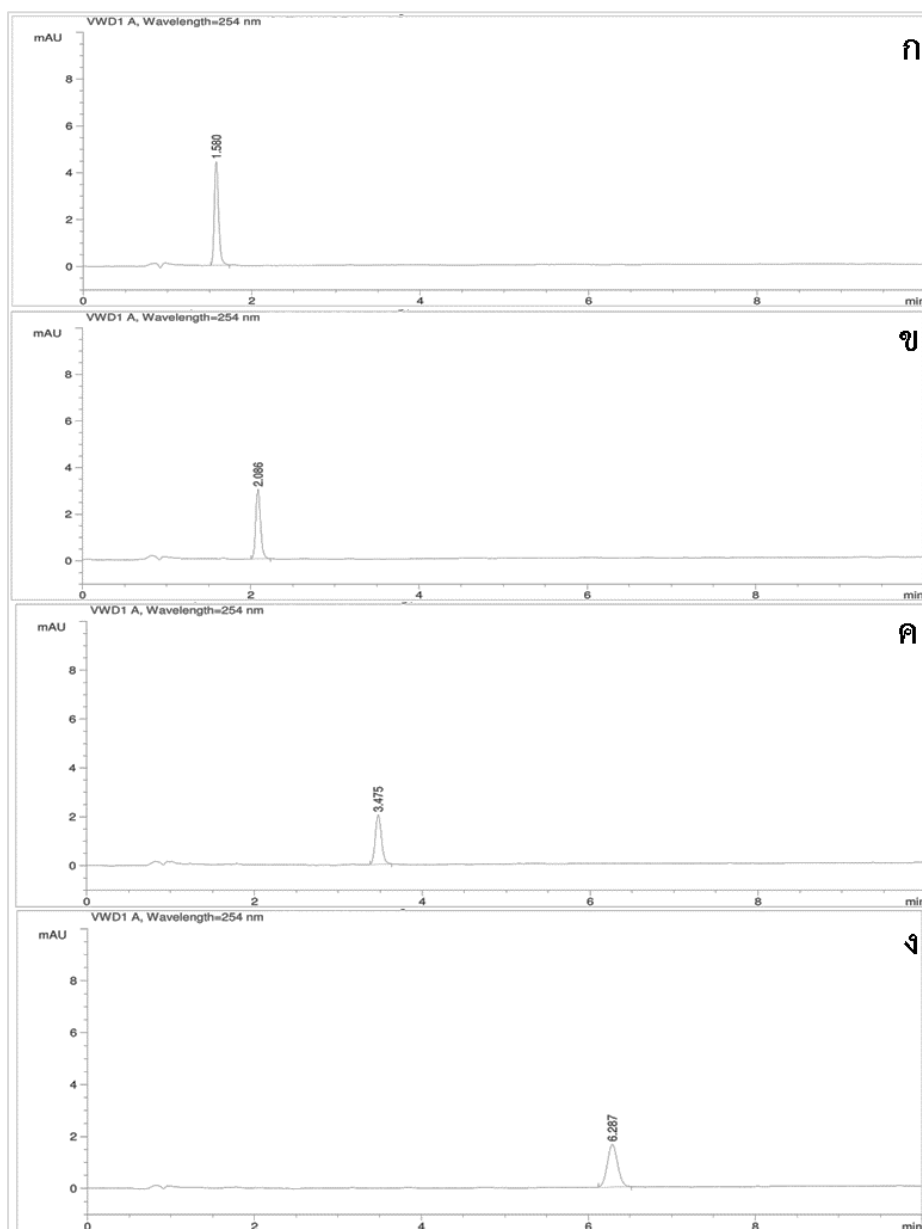
ชนิด VWD ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากสภาวะที่ใช้แยกสารตัวอย่างเพื่อเก็บ Fraction ของแต่ละฟีกโครมาโทแกรมที่บันทึกได้ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติและที่บันทึกด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ดังภาพที่ 9(ก) และ 9(ข) ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติทั้ง 4 Fraction นำกลับมาฉีดซ้ำอีกครั้งด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตามสภาวะดังตารางที่ 1 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการเก็บตัวอย่าง ผลการฉีดซ้ำของแต่ละ Fraction ที่จัดเก็บด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ ให้ผลการแยกเก็บที่สมบูรณ์ปรากฏเพียงฟีกเดียวของสารประกอบเท่านั้น แสดงได้ดังภาพที่ 10 และเมื่อวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการนำ Isocratic Sample แยกเก็บด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติทั้ง 4 ฟีกจำนวน 4 Fraction แต่ละ Fraction มีการฉีดซ้ำ 10 ซ้ำเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของ Isocratic Sample ผลพบว่าพื้นที่ใต้กราฟคิดเป็นร้อยละสำหรับแต่ละ Fraction แสดงดังตารางที่ 2



ภาพที่ 9 โครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ (ก) โครมาโทแกรมที่ได้จากโปรแกรม Chemstation ของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (ข)

ตารางที่ 2 พื้นที่ใต้กราฟแต่ละ Fraction ที่เก็บด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติเทียบกับ Isocratic Sample

รายการ	พื้นที่ใต้กราฟ (เปอร์เซ็นต์)			
	ฟีกที่ 1	ฟีกที่ 2	ฟีกที่ 3	ฟีกที่ 4
Isocratic Sample	22.35	20.90	22.04	37.71
Fraction 1 (10 ซ้ำ)	100.00	0.00	0.00	0.00
Fraction 2 (10 ซ้ำ)	0.00	100.00	0.00	0.00
Fraction 3 (10 ซ้ำ)	0.00	0.00	100.00	0.00
Fraction 4 (10 ซ้ำ)	0.00	0.00	0.00	100.00



ภาพที่ 10 โครมาโทแกรมที่ได้จากการนำตัวอย่างที่เก็บด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติ Fraction ที่ 1 (ก) Fraction ที่ 2 (ข) Fraction ที่ 3 (ค) และ Fraction ที่ 4 (ง)

สรุปผลการวิจัย

เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่ออกแบบสามารถทำการเก็บตัวอย่างจากการแยกได้อย่างสมบูรณ์ โดยเครื่องต้นแบบสามารถแยกเก็บตัวอย่างที่แยกออกมาในแต่ละ Fraction ได้ตรงตามที่ตั้งโปรแกรมไว้ และสามารถแยกเก็บตัวอย่างจากการฉีดตัวอย่างซ้ำเพื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติและจากการทดสอบในการเก็บตัวอย่างสาร Isocratic Sample ซึ่งประกอบไปด้วย 4 Fraction เมื่อนำตัวอย่างที่แยกเก็บมาฉีดซ้ำพบว่า ไม่มี Fraction อื่นปนเปื้อนจากการเก็บ นอกจากนี้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถสื่อสารกับเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติได้ตามที่ออกแบบไว้ สามารถทดสอบการทำงานของเครื่องในขั้นตอนต่าง ๆ เช่น เลื่อนตำแหน่งถาดเก็บตัวอย่างไปยังตำแหน่งที่กำหนด ควบคุมตำแหน่งของเซอร์โวมอเตอร์เพื่อกำหนดตำแหน่งของวาล์วไปยังตำแหน่งลงขวดรับของเสียหรือลงขวดเก็บตัวอย่างได้

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่ได้ออกแบบและสร้างขึ้นนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้สูงสุด 12 Fraction ควบคุมการทำงานโดยอัตโนมัติด้วยไมโครคอนโทรลเลอร์ ติดต่อผู้ใช้งานด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในรูปแบบกราฟิก สามารถสร้างได้ง่ายโดยใช้วัสดุที่หาซื้อได้ในประเทศ ต้นทุนต่ำและซ่อมบำรุงได้ง่าย จากการทดสอบเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติได้ผลการทดสอบการแยกเก็บ Fraction ที่ต้องการได้เป็นอย่างดี สามารถเก็บ Fraction ได้อย่างต่อเนื่องจากการฉีดตัวอย่างซ้ำเพื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติจากการตั้งค่าเริ่มต้นใน Fraction table เพียงครั้งเดียวและทำการบันทึกโครมาโทแกรมเพื่อเรียกดูในภายหลังได้อีกด้วย สรุปคุณสมบัติเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่พัฒนาขึ้น ดังนี้

1. สามารถแยกเก็บตัวอย่างได้สูงสุด 12 Fraction ใช้ขวดขนาด 20 มิลลิลิตร จำนวน 12 ขวด
2. สามารถเริ่มต้นเก็บตัวอย่างได้โดยอัตโนมัติโดยการตรวจจับสัญญาณ START จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
3. สามารถบันทึกโครมาโทแกรมเพื่อเรียกดูภายหลังได้
4. ความเร็วในการสลับจากเก็บตัวอย่างลงขวดเก็บ Fraction เป็นลงขวดรับของเสีย น้อยกว่า 0.5 วินาที หรือจากขวดรับของเสียสลับขวดเก็บ Fraction
5. ความเร็วในการหมุนขวดเก็บตัวอย่างต่อ 1 ขวดย่นกว่า 0.4 วินาที หน่วงเวลาก่อนเก็บ Fraction ถัดไป 1 วินาที

6. ใช้แหล่งจ่ายไฟกระแสตรง 6-12 โวลต์ ดึงกระแสสูงสุดขณะหมุนถาดเก็บตัวอย่าง 1 แอมป์

เมื่อเทียบกับ Application note ของบริษัท GILSON (Stevens *et al.*, 2003) ซึ่งกล่าวถึงค่าที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างจากการแยกของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบเชิงพาณิชย์ คือ เวลาในการเปลี่ยนตำแหน่งของวาล์ว (Collection valve switch time) ไม่ควรเกิน 1 วินาที ซึ่งเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติที่สร้างขึ้นสามารถทำได้ 0.5 วินาที เป็นไปตามคุณลักษณะที่กำหนด และในส่วนของเวลาที่หน่วงจากการเคลื่อนที่ของตัวอย่างจากตัวตรวจวัดไปยังวาล์ว (Delay volume from detector to collection valve) จะส่งผลต่อความแม่นยำและปริมาณตัวอย่างที่เก็บได้ ซึ่งเครื่องเก็บตัวอย่างที่สร้างขึ้นได้ออกแบบโปรแกรมให้คำนวณค่านี้โดยอัตโนมัติเพียงแค่นับความยาวท่อและอัตราการไหลของตัวอย่างซึ่งสอดคล้องตาม Application note ดังกล่าว ส่งผลให้สามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างแม่นยำมากขึ้น คณะผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะในการปรับปรุงเครื่องเก็บตัวอย่างที่ออกแบบและสร้างขึ้นนี้ให้ดียิ่งขึ้นโดยการใช้ไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่นใหม่ขึ้น เช่น ESP32 ซึ่งจะทำการพัฒนาโปรแกรมของตัวเครื่องทำได้ง่ายและมีศักยภาพมากขึ้นเนื่องจาก ESP32 เป็นไมโครคอนโทรลเลอร์รุ่นใหม่ที่มีราคาไม่แพงมีหน่วยความจำขนาดใหญ่และสามารถเชื่อมต่อผ่านระบบ WiFi ได้ นอกจากนี้ในการเก็บตัวอย่างจะได้สารบริสุทธิ์ แต่มีความเข้มข้นต่ำ ผู้ใช้งานสามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ได้จากการเก็บวนซ้ำหลาย ๆ รอบรวมกันแต่ละ Fraction ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างแยกส่วนแบบอัตโนมัติได้ โดยการนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเทคนิคเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนหรือเทคนิคระเหยสารโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน ทำให้สารที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและนำไปต่อยอดในงานวิจัยได้ เช่น นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง High resolution mass spectrometry (HR-MS) เพื่อยืนยันชนิดของสารประกอบนั้น ๆ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์รหัสโครงการวิจัย SEC5022010161S ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยส่งผลให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบและขอขอบคุณ ดร. มณฑิลา เกียรติวิโรจน์กุล ซึ่งเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยในการให้คำปรึกษาพร้อมทั้งเอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วง สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบุคลากรสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ธนวัฒน์ ทองจีน, สรเพชร มาสุต, พิธีธรรม เทียมเทียบรัตน์, สายัณห์ เรืองเขตร, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, พิเชฐ บัญญัติ, ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์ และอัสวชัย ช่วยพรหม. 2564. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณแคนนาบินอยด์ในใบกัญชาด้วยวิธี Ultra High Performance Liquid Chromatography. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 63(3): 505-523.
- Diaz, D., Iglesia, A., Barreto, F. and R. Borges. 2021. DIY universal fraction collector. Analytical Chemistry. 93: 9314–9318.
- Medina, D.V., Lozada-Blanco, A., Rodríguez, J.G., Lanças, F.M. and Á.J. Santos-Neto. 2023. An open-source smart fraction collector for isocratic preparative liquid chromatography. HardwareX. 15.
- Mudge, E.M. and P.N. Brown. 2017. Determination of mitragynine in mitragynaspeciosa raw materials and finished products by liquid chromatography with UV detection: single-laboratory validation. Mudge&Brown:Journal of aoaCInternatlona. 100: 18–24.
- Stevens, J., Hamstra, A., Roenneburg, L., Hegeman, T., Esser, C., Black, R. and D. V. Langen. 2003. Optimizing purified sample recovery on reverse-phase HPLC systems. [Online]. Available: <https://yiqi-oss.oss-cn-hangzhou.aliyuncs.com/aliyun/944/Company/Technology/2009112173635.pdf>. (Retrieved August, 2023).
- Wang, X., Gao, M. and X. Zhang. 2021. Microliter-level multi-channel fraction collector for high-throughput separation system. Journal of Chromatography A. 1656.