บทที่ 2

การพัฒนาวิธี หลักการ และเครื่องมือของเทคนิค HPLC

2.1 การพัฒนาวิธีการแยกสตีรอยด์โดยเทคนิค HPLC

วิธีการพัฒนาเทคนิคการแยกสิ่งแรกที่ต้องพิจารณาคือ การเลือกใช้คอลัมน์โดยพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุลของสาร สภาพขั้ว (polarity) และการละลายได้ (solubility) ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของสารตัวอย่างรวมถึงสิ่งอื่นๆ ซึ่งอาจเจือปนอยู่กับสารที่ต้องการแยกอีกด้วย[46] มีข้อกำหนดบางอย่างของเทคนิคการแยก คือ (1) จะต้องแยกสารออกจากกันได้ดีพอสมควร (2) แยกสารได้ภายในเวลาน้อยที่สุด (3) ใช้ตัวทำละลายจำนวนน้อยที่สุดและสามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยๆได้ดีหลังจากที่หาสภาวะของการแยกที่เหมาะสมได้แล้วจะรายงานข้อมูลดังกล่าวในเทอมของประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยพิจารณาจากจำนวนแผ่นทางทฤษฎี (number of theoretical plate) เวลาที่ใช้วิเคราะห์ (analysis time) และปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง เป็นต้น[47]

ในการเลือกวิธีที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้แยกสตีรอยด์ มีหลักการที่ต้องพิจารณาดังนี้[48]

- ปริมาณสารผสมที่จะแยก
- จำนวนและปริมาณขององค์ประกอบที่จะแยกในสารผสมของสตีรอยด์
- ลักษณะทางกายภาพ - เคมีของสตีรอยด์
- โครงสร้างของสตีรอยด์ที่จะแยก

การหาสภาวะที่เหมาะสมในเทคนิค LC[24] ตัวแปรที่สำคัญในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LC คือ mobile phase, stationary phase, pH และ ionic effect อื่นๆ จุดประสงค์ของการหาสภาวะที่เหมาะสมก็คือ ต้องการเพิ่มความถูกต้องแม่นยำให้มากขึ้นและย่นเวลาในการวิเคราะห์ โดยเฉพาะเพื่อใช้วิเคราะห์สารที่ต้องปฏิบัติเป็นประจำ การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคนี้เหมือนกับเทคนิคการวิเคราะห์อื่นๆ แต่มีข้อกำหนดที่สำคัญคือ การพิจารณาคุณภาพของการแยก (separation quality) องค์ประกอบสารต่างๆ ในสารที่สนใจออกจากสารตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ก่อนอื่นจะพิจารณาถึงลักษณะทางกายภาพ-เคมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสตีรอยด์และโครงสร้างของสตีรอยด์ที่จะแยก อาทิเช่น ความสัมพันธ์ระหว่างสภาพขั้ว และการละลายได้ เป็นต้น

ลักษณะทางกายภาพ-เคมีของสตีรอยด์[1] เริ่มต้นจากโครงสร้างของสตีรอยด์ มี functional group ที่สำคัญในการใช้ตรวจสอบสาร เช่น conjugated double bond หรือคาร์บอนิล กรุ๊ป ที่สามารถดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม ถ้าเป็นโมเลกุลที่อยู่ในรูปของเกลือ เช่น เกลือโซเดียมของเอสโตรเจนซัลเฟต จะมีสมบัติของการละลายได้ การแตกตัว (ionization) สภาพขั้วที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อใช้เป็นข้อกำหนดในการเลือกใช้คอลัมน์ที่จะแยกและสอดคล้องกับการเลือกใช้ระบบตัวทำละลายและระบบเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสม สารประกอบสตีรอยด์จัดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลมาก มีสภาพขั้วแตกต่างกันตั้งแต่ลักษณะของ lipophilic เช่น sterol ซึ่งถูก esterified อยู่กับกรดไขมันจนถึงสารประกอบในกลุ่มของ glucoside steroid ซึ่งละลายน้ำได้ดี สตีรอยด์ส่วนมากมีสภาพขั้วปานกลางและมีแนวโน้มที่จะเป็นสารในกลุ่มของ lipophilicity เนื่องจากมีโมเลกุลเป็นไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) จึงมีการศึกษาด้วยเทคนิค adsorption chromatography ซึ่งใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่างๆกันมาก ส่วนสตีรอยด์โมเลกุลที่แตกตัวได้ก็สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค ion-exchange chromatography ในกรณีที่สตีรอยด์ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายๆกัน และแยกออกจากกันได้ยากด้วยระบบ adsorption จะสามารถนำมาวิเคราะห์แยกออกจากกันได้ด้วยระบบ liquid-liquid chromatography หรือระบบพาร์ติชั่น[42]

หลักการเบื้องต้นของการแยกแบบพาร์ติชั่น คือ ความแตกต่างในการละลายได้ของสารประกอบที่จะแยก การเลือกใช้ตัวทำละลายจัดเป็นหลักการสำคัญทางทฤษฎีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลาย (solvent-solute interaction) เนื่องจาก functional group ของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายที่ใช้เป็นผลจาก specific force เช่น การเกิดพันธะไฮโดรเจน ขึ้นเป็นแบบ dipole-dipole interaction ระหว่างตัวให้โปรตอนกับตัวรับโปรตอน ดังนั้นผลของการละลายได้จึงเกี่ยวข้องกับโครงสร้างหลักในโมเลกุลและ substituent ของโมเลกุลสามารถเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วให้เพิ่มขึ้นและลดลงได้[1]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลของ functional group ที่มีต่อค่าการละลายได้ของสตีรอยด์[1] จากโครงสร้างหลักของสตีรอยด์ฮอร์โมนดังที่กล่าวในข้อ 1.2 จะเห็นว่ามีลักษณะของ hydrophobic effect และมี polar effect จากกรุ๊ปข้างเคียงซึ่งมีอะตอมออกซิเจนเกาะอยู่ ทำให้สตีรอยด์ฮอร์โมนละลายน้ำได้บางเล็กน้อยเนื่องจากเกิด interaction ของไฮดรอกซิล กรุ๊ป ซึ่งแสดงถึงสภาพขั้วของโมเลกุลผลของโพลาร์ กรุ๊ป (polar group) ในสตีรอยด์ดังกล่าวทำให้สตีรอยด์ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วปานกลาง เช่น เมทานอล และอะซิโตน เป็นต้น ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสตีรอยด์และพฤติกรรมการแยกในกลไกแบบพาร์ติชั่นเกิดจากอิทธิพลของ substituent และ steric effect เช่น 17 β-oestradiol มีสภาพขั้วมากกว่า 17 α-oestradiol หลักเกณฑ์ทั่วไปของสภาพขั้วนั้น ขึ้นอยู่กับการที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนมากขึ้น (มี alkyl substitution) จะลดสภาพขั้วของโมเลกุล หรือถ้ามีอะตอมออกซิเจนอยู่ก็จะเพิ่มสภาพขั้วของโมเลกุลและการที่มี double bond อยู่ในนิวเคลียสของโมเลกุลจะทำให้สภาพขั้วเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ลำดับของสภาพขั้วในสารประกอบสตีรอยด์มีค่าเพิ่มขึ้นตามลักษณะของ functional group ดังนี้ คือ $-OCH_3 < -COOR < -C=O < -OH$[40]

ตัวแปรที่สำคัญในการพัฒนาวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) ในการแยกสารจะต้องพิจารณาและปรับปรุงตัวแปรที่สำคัญหลายประการ เช่น ส่วนประกอบของตัวชะ (eluent) อัตราการไหล (flow-rate) หรือ pH ของตัวทำละลายเป็นต้น เพื่อให้เกิดการแยกได้ดีที่สุด[24] ในการใช้เครื่อง HPLC ทุกครั้ง จะต้องมีการตรวจสอบค่า reproducibility ของผลการทดลองและความเสถียร (stability) ของเครื่องมือ เพื่อให้แน่ใจว่าค่า retention time ไม่เปลี่ยนแปลงมี resolution เหมือนเดิมและได้ baseline ที่เสถียร ในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องและวางแผนงานทดลอง เช่น วิธีการสกัด เทคนิคของการเก็บตัวอย่าง (sampling technique) และวิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง (storage method) ตลอดจนการตรวจสอบถึงความบริสุทธิ์ของตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้หรือสิ่งเจือปนต่างๆ ที่ปะปนอยู่ซึ่งอาจจะรบกวนการวิเคราะห์ได้[49]

แนวทางในการปฏิบัติบางประการของการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการแยก มีดังนี้[46]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เลือกใช้คอลัมน์ที่เหมาะสมแบบใดแบบหนึ่งเป็นอันดับแรก
- เลือกใช้อัตราการไหลของ mobile phase ที่ให้ข้อมูลการทดลองได้ค่อนข้างเร็ว เช่น 2.0-3.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- หาช่วงของค่า capacity factor (k') ของสารประกอบทุกตัวที่จะแยกในสารตัวอย่าง ค่า k' ที่เหมาะสมควรจะอยู่ในช่วง 2-6
- ปรับปรุงค่า selectivity factor (α) ของการแยก
- แยกสารประกอบมาตรฐานที่สนใจออกจากสารประกอบอื่นๆ
- ปรับปรุงจำนวนแผ่นทางทฤษฎี (N) ให้เหมาะสม
- หาค่า resolution ที่ต้องการโดยการเปลี่ยนแปลงตัวแปรที่เกี่ยวข้อง เช่น อัตราการไหล หรือความยาวของคอลัมน์ที่ใช้ เป็นต้น

2.1.1 <u>การเลือกใช้คอลัมน์</u>

มีการศึกษาบทบาทของ functional group ในโครงสร้างของสตีรอยด์โดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เอสโตรเจน และศึกษาพฤติกรรมการแยกทั้งในระบบ normal phase และ reversed-phase และเสนอว่าระบบ reversed-phase ใช้แยกได้ดีกว่า[29] Lin และ Heftmann ก็ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกเอสโตรเจนโดยใช้กลไกแบบ adsorption และ reversed-phase partition ได้รายงานว่า สิ่งที่มีบทบาทสำคัญในการแยกเอสโตรเจนด้วยเทคนิคนี้คือ จำนวนและตำแหน่งของไฮดรอกซิล กรุ๊ป ในโมเลกุลของสตีรอยด์ การที่มีคีโตน กรุ๊ป หรือ double bond อยู่ในโมเลกุลของเอสโตรเจนจะทำให้สภาพขั้วเพิ่มขึ้นในระบบ reversed-phase มากกว่าในระบบ adsorption นอกจากนี้ vicinal hydroxyl group ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน เมื่อมีการจัดวางตัว (orientation) เหมือนกันจะทำให้โมเลกุลของสารเหล่านั้นมีสภาพขั้วลดลง ปกติแล้วโครมาโตกราฟีแบบ reversed-phase partition ใช้แยกสารประกอบเอสโตรเจนที่มีโครงสร้างต่างๆกันเฉพาะที่ double bond ได้ดีกว่า เช่น oestrone และ equilin และยังได้เปรียบเทียบการใช้ระบบ adsorption และ reversed-phase partition HPLC ในการแยกสารประกอบเอนโดรเจนที่มีโครงสร้างต่างๆกันจำนวน 69 ชนิดและพบว่าจำนวนของไฮดรอกซิล และคีโตน กรุ๊ปในโมเลกุลของเอนโดรเจน เป็นแฟคเตอร์ที่สำคัญที่สุดในการศึกษาพฤติกรรมการแยกและ α, β - unsaturated keto group มีผลต่อสภาพขั้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของโมเลกุลได้พอๆกับไฮดรอกซิล กรุ๊ป แต่จะมีผลมากกว่า isolated keto group[37]

จากคุณสมบัติของการละลายได้และ/หรือสภาพขั้วของสารตัวอย่างสตีรอยด์ฮอร์โมน คอลัมน์ที่จะเลือกใช้ควรจะเป็นแบบ reversed-phase จากงานวิจัยหลายๆฉบับ นิยมเลือกใช้ระบบ reversed-phase HPLC ในการเลือกใช้คอลัมน์ที่เหมาะสมนั้นจะพิจารณาถึงความยาวของคอลัมน์และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ ซึ่งจะมีผลต่อเวลาที่ใช้แยกโดยมีแฟคเตอร์เกี่ยวข้อง 2 อย่างคืออัตราการไหล และความยาวคอลัมน์ที่ใช้[49]

2.1.2 การเลือกใช้ mobile phase

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของสารที่จะแยกและการเลือกใช้คอลัมน์แล้วมีตัวแปรที่สำคัญมากอีกอย่างหนึ่งของระบบโครมาโตกราฟีของเหลว คือ การหา mobile phase ที่เหมาะสม ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในระบบ LC มีทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) และ aqueous solvent ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกลไกการแยกและชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ เช่น ion-exchange chromatography จะใช้ aqueous solvent ส่วนใน partition, adsorption หรือ gel permeation chromatography จะใช้ทั้ง aqueous solvent และตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าใช้กับ UV detector ทั้งตัวทำละลายหรือสิ่งเจือปนอื่นๆ ที่ปนอยู่จะต้องไม่ดูดกลืนแสง UV และไม่รบกวนการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นที่เลือกใช้[49] มีการศึกษาผลของ mobile phase ที่มีต่อความจำเพาะทางเคมี (chemical selectivity) ในระบบ reversed-phase, normal bonded-phase และ adsorption chromatography และทฤษฎีกล่าวถึงผลของ mobile phase ที่มีต่อกลไกการแยกแบบ reversed-phase ซึ่งถือว่าเป็นเครื่องมือในการพัฒนาวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมของส่วนผสมของ mobile phase[24]

ระบบ reversed-phase หมายถึง ระบบที่มีการใช้ตัวชะโพลาร์ (polar eluent) ร่วมกับเฟสคงที่แบบนอนโพลาร์ เช่นการใช้คอลัมน์ μ Bondapak C_{18} กับ mobile phase ที่เป็นส่วนผสมของตัวทำละลาย 2 อย่าง (binary mixture) คือ น้ำกับเมทานอล หรืออะซิโตไนไตร สารที่เป็นโพลาร์มากจะชอบอยู่ในตัวทำละลาย และถูกแยกออกมาก่อน[51] Stewart และ Williams ได้รายงานผลของการใช้ multicomponent mobile phase ในระบบ LC ใช้เลือกความแรงของ mobile phase ที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และเพื่อปรับปรุง resolution ของสารที่แยกโดยการเปลี่ยนแปลงความจำเพาะของ mobile phase อีกด้วย และได้ประยุกต์ใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกคอร์ติโคสตีรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายๆกันโดยใช้ระบบ reversed-phase HPLC การใช้ mobile phase ลักษณะนี้เรียกว่า Ternary mixture[52]

การปรับสภาพของ mobile phase มีการศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนในยาเม็ดคุมกำเนิดโดยการเปรียบเทียบระบบ binary และ ternary solvent ที่เป็นส่วนผสมของน้ำ เมทานอล หรืออะซิโตไนไตรและ tetrahydrofuran(THF) ร่วมกับคอลัมน์แบบ reversed-phase ของบริษัทต่างๆ[24] Lee et al. รายงานการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณน้อยๆผสมใน mobile solvent เช่นอีเทอร์ (ether) ชนิดต่างๆ เพื่อปรับปรุงพฤติกรรมการแยกให้มีความจำเพาะมากขึ้นโดยการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนชนิดต่างๆ ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยระบบ binary mixture เช่น เมทานอล หรืออะซิโตไนไตรกับน้ำ พบว่าเมื่อใช้ organic modifier ที่เป็นไดเอทธิล อีเทอร์ (diethyl ether) หรืออีเทอร์ชนิดอื่นๆ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงลำดับของการแยกได้อย่างเด่นชัด คือ เกิดการแยกได้ดีขึ้นและใช้เวลาแยกสั้นกว่าเดิมและพบว่า ค่า capacity factor (k') ของสตีรอยด์ทุกตัวที่ศึกษามีค่าลดลงโดยที่ระดับของการลดลงในกลุ่มสตีรอยด์ที่มีโครงสร้างของฟีนอล (phenolic structure) อยู่ในวง A มีค่าน้อยกว่าในกลุ่มของสตีรอยด์ที่มี α ,β -unsaturated ketone อยู่ในวง A[50] จากการศึกษาบทบาทของ organic modifier ที่มีผลต่อกลไกการรีเทน (retention mechanism) ในระบบ reversed-phase HPLC McCormick และ Karger อธิบายไว้ว่าความจำเพาะในโพลาร์ กรุ๊ปของตัวถูกละลายมีส่วนเกี่ยวข้องกับ interaction ที่เกิดขึ้นระหว่างตัวถูกละลายกับ modifier บน stationary phase ในรูปแบบของพันธะไฮโดรเจน เนื่องจาก modifier ที่เติมลงใน binary solvent จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง hydrophobic (nonpolar) selectivity หรือเกิด hydrophobic expulsion ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกลไกการรีเทน ดังนั้น พวกตัวถูกละลายที่มีโครงสร้างของฟีนอลที่ถูกเหนี่ยวรั้ง (retard) ไว้นานกว่าอาจเกิดจากพันธะไฮโดรเจน กับอีเทอร์ ดังกล่าวจะถูกสกัดกั้นไว้ได้บางบน stationary phase ตัว modifier ที่ควรใช้ใน mobile phase ของระบบ reversed-phase HPLC จะต้องเป็นสารประกอบที่มีสมบัติเป็น hydrophobic มากๆเพื่อให้เกิดการดูดซับได้มากพอบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

hydrophobic bonded phase แต่จะต้องมีสมบัติที่เป็นโพลาร์ เช่น ether linkage ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาจำเพาะกับสารประกอบในสารผสมที่จะแยก(53)

Tscherne และ Capitano ได้รายงานการใช้ mobile phase ที่ผสมด้วยสารละลายเกลือซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) ในการแยกเอสโตรเจนที่มีโครงสร้างต่างกันเฉพาะที่ double bond บนคอลัมน์ μ Bondapak C_{18} พบว่า retention time ของ equilin ลดลงมากกว่าเอสโตรเจนตัวอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากอาจเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (π -complexation) ขึ้นระหว่าง double bond ที่ตำแหน่ง C_7 และ C_8 กับ Ag(54)

Gazdag et al. ได้แสดงให้เห็นบทบาทของ mobile phase additive (α-, β- และ γ - cyclodextrin) โดยวิธี HPLC เพื่อแยก D- และ L-norgestrel ซึ่งสตีรอยด์ทั้ง 2 ตัวนี้มีสมบัติเป็น optical isomer คือ มี stereochemistry ต่างกันเฉพาะที่ C_{13} ของเอทธิล กรุ๊ป เท่านั้น เป็นผลให้สามารถแยกสารไอโซเมอร์ดังกล่าวออกจากกันได้และระบบมีความจำเพาะมากขึ้น(55) ปัจจุบันมีการนำเครื่องคอมพิวเตอร์มาช่วยในการหาสภาวะที่เหมาะสมของ mobile phase ใน reversed-phase liquid chromatography (RPLC) เนื่องจากมีการใช้ RPLC วิเคราะห์สารตัวอย่างที่แยกออกจากกันได้ยากกว่าปกติกันมาก การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของ mobile phase เพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เกิดการแยกได้ดีขึ้น นั่นคือ การใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ร่วมกับวิธี HPLC จึงเป็นการควบคุมเวลาการวิเคราะห์ตลอดการทดลองได้โครมาโตแกรมที่เหมาะสม และบันทึกข้อมูลทางโครมาโตกราฟีไว้และประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้จำนวนมากๆ(56)

2.1.3 การเลือกใช้อัตราการไหลของตัวทำละลาย

ในวิธี HPLC หลังจากที่เลือกใช้คอลัมน์และหา mobile phase ที่เหมาะสมแล้วอัตราการไหลของ mobile phase ถือว่าเป็นตัวแปรทางโครมาโตกราฟีที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งแม้ว่าจะมีผลกระทบต่อการแยก (solute shift) น้อยกว่าตัวแปรอื่นๆ ก็ตาม เนื่องจากอัตราการไหลของตัวทำละลายนั้น มีผลโดยตรงต่อเวลาในการแยกและปริมาตรตัวทำละลายที่ต้องใช้ทั้งสิ้นตลอดการทดลองแต่ละครั้ง การแยกสารที่ดีควรจะทำที่อัตราการไหลค่าต่ำๆ เพื่อช่วยประหยัดตัวทำละลาย(56) เนื่องจากอัตราการไหลสัมพันธ์กับความเร็วของ mobile phase (U) ซึ่งมีผลต่อค่า retention time และ resolution ของการแยกและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลาที่ใช้วิเคราะห์มีค่าเท่ากับค่า retention time ของสารที่แยกออกหลังสุด ในแง่ปฏิบัติแล้วคอลัมน์จะใช้งานได้ดีที่ค่าอัตราการไหลที่เหมาะสม (optimum flow-rate)ในระบบ LC นั้นไม่มีการนิยามค่า flow-rate ที่เหมาะสมไว้ชัดเจนเหมือนกับระบบ GC แต่จะพิจารณาจากค่า U ของกราฟ H/U vs U และเลือกใช้อัตราการไหลตรงที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความชัน (slope) มากๆ นอกจากนี้การใช้อัตราการไหลค่าสูงๆ จะมีขีดจำกัด เนื่องจากอัตราการไหลจะสัมพันธ์กับ pressure drop ที่ผ่านคอลัมน์ยิ่งถ้า mobile phase มีความหนืดมากก็ยิ่งทำให้ pressure drop มีค่ามากขึ้นด้วย ในคอลัมน์ที่เป็นแบบ radial - pak จะทนความดันได้ต่ำกว่าคอลัมน์แบบ stainless steel[57] ในการพิจารณาอัตราการไหลของระบบการแยกแบบ isocratic สามารถเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของตัวชะที่เข้าสู่คอลัมน์ เพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุดภายในเวลาสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้กับงานวิเคราะห์ประจำ และการหาค่าอัตราการไหลที่เหมาะสมนั้นโดยทางปฏิบัติแล้วจะพิจารณาแฟคเตอร์ที่สำคัญ 3 อย่างคือ (1) resolution ที่ต้องการ (2) ความเร็วของการวิเคราะห์ และ (3) จำนวนสารที่จะแยก[49]

2.1.4 pH และ Ionic effect

pH และ ionic strength ของ mobile phase เป็นตัวแปรอย่างหนึ่งที่มีผลต่อความจำเพาะทางเคมีของการแยกในระบบ LC โดยเฉพาะกับเทคนิค ion - exchange chromatography.[24] Kong et al. ได้ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการแยกสารอินทรีย์โดยใช้ระบบ reversed-phase พบว่า การเปลี่ยนแปลง pH ของ mobile phase จะมีผลต่อค่า retention time ของสารประกอบที่แตกตัวได้อย่างเห็นได้ชัด[58] ปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุมเสถียรภาพของค่า pH และชนิดของเกลือบัฟเฟอร์ที่ใช้ก็สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการแยก (elution pattern) ได้เช่นเดียวกัน เช่นการแยก conjugated oestrogen ที่อยู่ในรูปของเกลือโซเดียม ซัลเฟต โดยใช้ mobile phase ที่ประกอบด้วย 0.001 M. KH_2PO_4/ MeOH (50:50, v/v)[46] Gupta ได้ปรับสภาพ pH ของ mobile phase เพื่อแยก hydroxyprogesterone caproate, medroxyprogesterone acetate และ progesterone โดยวิธี reversed-phase HPLC[42] Jorgen ได้ศึกษาผลของ pH ใน mobile phase เพื่อการวิเคราะห์ steroid glucuonide โดยวิธี RPLC[59] Simonian และ Capp

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้วิธี RPHPLC ศึกษาการแยก steroid-3-sulfate ออกจากสตีรอยด์ที่อยู่ในรูปอิสระ (free steroid) โดยการเติมเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ลงใน mobile phase และพบว่ากลไกการแยกแบบ ion-pair ไม่ถูกรบกวนจากสตีรอยด์ที่อยู่ในรูปอิสระ และกลไกการรีเทนของสตีรอยด์ซัลเฟตขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ อีกด้วย(60)

2.1.5 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิของคอลัมน์มีผลกระทบต่อระบบการแยกโดยวิธี HPLC ไม่มากนัก(24) มีการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อระบบ reversed-phase HPLC และพบว่าเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงก็ยังมีผลต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) และ pressure drop ได้เช่นกันเนื่องจากความหนืดของตัวทำละลายมีค่าลดลงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่กระจาย (diffusion coefficients) ของตัวถูกละลายมีค่ามากขึ้น(61) นอกจากนี้มีการศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิในการพัฒนาวิธีการใช้ mobile phase ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของตัวทำละลาย 4 ชนิด ทั้งในระบบ reversed-phase และ normal phase(62)

2.1.6 เทคนิคการตรวจวัด

เทคนิคโครมาโตกราฟีประกอบด้วยส่วนที่ใช้แยก (separation part) และส่วนที่ใช้ตรวจวัดสารที่แยกได้ (detection part) ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเทคนิคนี้จะต้องเลือกเครื่องตรวจวัดให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่จะแยก วิธีการเลือกใช้เครื่องตรวจวัดจะพิจารณาถึงชนิดของเครื่องตรวจวัดที่มีอยู่และสารประกอบที่จะศึกษา ในกรณีของ UV หรือ fluorescence detector ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในวิธี HPLC มีการเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสม (optimum wavelength) เพื่อเพิ่มความไวของการตรวจวัด รวมถึงการเปลี่ยนสารให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ที่สามารถตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดที่ต้องการได้(51)

2.1.6.1 การเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วในระบบโครมาโตกราฟีของเหลว ไม่จำเป็นต้องเลือกใช้ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดขององค์ประกอบในสารตัวอย่างก็ได้ แต่เลือกใช้ความยาวคลื่นที่สามารถใช้ตรวจสอบองค์ประกอบสารได้ทุกตัว(63) แม้ว่าจะเลือกใช้ UV detector เพื่อตรวจสอบโมเลกุลของสารอินทรีย์ซึ่งมีโครงสร้างเป็น aromatic และ conjugated กันมากก็ตาม แต่ยังมีสารอินทรีย์อีกหลายตัวที่มีค่าการดูดกลืนแสง (absorptivity) ต่ำในช่วง UV (220-340 nm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จึงมีการศึกษาและเลือกใช้ความยาวคลื่นในช่วง far UV (180-210 nm) เพื่อใช้วิเคราะห์คุณภาพและหาปริมาณสารในระบบโครมาโตรกราฟี เนื่องจากสารอินทรีย์ดังกล่าวมีค่าการดูดกลืนแสงสูงในช่วงนี้ และอาจใช้ตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำมากขึ้น แต่ก็มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการเลือกใช้ตัวทำละลาย และตัวทำละลายที่เหมาะสมจะต้องไม่ดูดกลืนแสงในช่วงนี้ด้วย เพื่อไม่รบกวนงานวิเคราะห์[51] Gluck และ Shek ได้กล่าวถึงปัญหาเกี่ยวกับการเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด ethinyloestradiol และ norethisterone ด้วย UV detector ที่สำคัญมี 2 ประการคือ (1) ethinyloestradiol มีค่า ε ต่ำที่ 254 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่นิยมใช้กันมากและ (2) ในยาเม็ดคุมกำเนิดมีปริมาณ ethinyloestradiol ในปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณของ norethisterone แม้ว่าที่ความยาวคลื่นช่วงสั้นๆ ethinyloestradiol จะมีค่า ε สูงมาก (ที่ 210 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 20,000 l/ mole-cm) แต่จะมีปัญหาเกิดขึ้นตามมา เช่น ต้องหาเครื่องตรวจวัดที่สามารถเปลี่ยนความยาวคลื่นได้ในช่วงกว้างๆ หรืออาจเกิดปัญหา noisy baseline ในกรณีที่เลือกใช้ตัวทำละลายไม่เหมาะสม นอกจากนี้ norethisterone ยังมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่ 210 นาโนเมตร และอาจต้องเปลี่ยนแปลง attenuation ในระหว่างการวิเคราะห์อีกด้วย ดังนั้น จึงเลือกใช้ที่ 280 นาโนเมตร เนื่องจากมีข้อดีที่ว่า ethinyl oestradiol ซึ่งมีปริมาณน้อย (low dose) ให้ค่าความไวสูงสุด (maximum sensitivity) ที่ λ_{max} 280 nm และเป็นการลดค่าการดูดกลืนแสงของ norethisterone ซึ่งมีความเข้มข้นสูงในสารตัวอย่าง ($\varepsilon_{280\ nm} \simeq 450$ l/mole-cm vs $\varepsilon_{244\ nm} \simeq 14{,}000$ l/mole-cm)[21]

Bond et al. ได้เลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจสอบสตีรอยด์-ฮอร์โมนในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด เนื่องจากสัดส่วนของโปรเจสโตเจน และเอสโตรเจนมีคุณสมบัติของการดูดกลืนแสง UV ได้ต่างกันคือที่ 240 นาโนเมตร ($\varepsilon_{max} \simeq 17{,}000$) เป็นค่าของการดูดกลืนแสง UV สูงสุดของ norgestrel, norethisterone และ norethisterone acetate ที่ 290 นาโนเมตร($\varepsilon_{max} \simeq 28{,}000$) เป็นของ mergestrol acetate และที่ 212 นาโนเมตร ($\varepsilon_{max} \simeq 8{,}000$) และที่ 280 นาโนเมตร ($\varepsilon_{max} \simeq 2{,}000$) เป็นของ ethinyloestradiol จะเห็นว่า "ideal wavelength" น่าจะเป็นความยาวคลื่นที่ 240 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามเพื่อความสะดวก ง่าย และรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ต่อการวิเคราะห์ จะเลือกใช้ที่ 212 หรือที่ 280 นาโนเมตร เหตุผลที่เลือกใช้ความยาวคลื่นนี้ คือ ความยาวคลื่นนี้ให้ค่าการดูดกลืนแสง UV สูงสุด สำหรับวิเคราะห์ ethinyloestradiol ซึ่งเป็นสตีรอยด์ที่ยากแก่การตรวจวัดเนื่องจาก มีค่า ε ต่ำ และมีปริมาณน้อยในเม็ดยา ส่วนปริมาณโปรเจสโตเจน นั้นมีปริมาณค่อนข้างมากและมีค่า ε_{max} สูงพอ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความยาวคลื่นดังกล่าว เพื่อตรวจสอบเอสโตรเจนได้สูงขึ้นและลดความไวของการตรวจสอบโปรเจสโตเจนลง(45)

2.1.6.2 <u>การตรวจสอบสตีรอยด์ในรูปของอนุพันธ์ของสารที่ดูดกลืนแสงหรือเรืองแสงได้</u> สตีรอยด์ที่มี chromophore ที่สามารถดูดกลืนแสง UV ได้ดีก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ส่วนสตีรอยด์ที่มีคาร์บอนิล กรุ๊ป อยู่อย่างน้อย 1 กรุ๊ป และไม่สามารถดูดกลืนแสง UV หรือดูดกลืนแสง UV ได้น้อย สามารถนำมาทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ กับสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งสามารถดูดกลืนแสง UV ได้ เช่น 2,4 - dinitrophenyl hydrazine (DNPH) การทำให้เป็นสารอนุพันธ์ นอกจากจะเป็นการปรับปรุงความไวให้มีค่าเพิ่มขึ้นแล้วยังช่วยให้สารประกอบสตีรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายๆกันแยกออกจากกันได้ดีขึ้นอีกด้วย(28) นอกจากนี้มีการทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ dansyl เพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนกลุ่มเอสโตรเจน โดยใช้ fluorescence detector เป็นเครื่องตรวจวัด สารประกอบ dansyl chloride (5- (dimethylamino) -1-naphthalene sulfonyl chloride) เป็นตัวทำให้เกิด fluorogenic labeling กับ functional group ในสตีรอยด์(29) แม้ว่า dansyl oestrogen สามารถดูดกลืนแสง UV ที่ 254 นาโนเมตรได้ดี แต่ให้ผลการวิเคราะห์ทั้งในด้านความไว และความจำเพาะต่ำกว่าการใช้กับ fluorescence detector พบว่าการใช้ dansyl derivative ทำให้ความไวของการตรวจวัดเพิ่มขึ้นถึง 500 เท่า(30) อย่างไรก็ตาม dansyl chloride อาจมีการสลายตัวได้เกิดเป็น dansyl hydroxide,dansyl dimethylamide และสารประกอบอื่นๆ ภายใต้สภาวะที่ใช้เตรียมสารอนุพันธ์ชนิดนี้ ดังนั้นจะต้องมีการกำจัดสารตัวกลางดังกล่าวออกจากสารเรืองแสงก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป การใช้สารอนุพันธ์ของ DNPH ก็มีข้อจำกัดเหมือนกัน เช่น การควบคุมปฏิกิริยาให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์รวดเร็วและมีความจำเพาะต่อ functional group ในสตีรอยด์ที่ศึกษา คือจะต้องได้อนุพันธ์ที่ดูดกลืนแสง UV ได้ดีขึ้นที่ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจสอบ นอกจากนี้ ควรรู้จักวิธีการแยกสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นออกมาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งอาจใช้เวลานานและผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์มากขึ้น[29]

2.2 หลักการ และทฤษฎีของวิธี HPLC

คำว่า "โครมาโตกราฟี" (Chromatography) หมายถึง ขบวนการที่ใช้แยกโมเลกุลของสารชนิดต่างๆ ที่ผสมกันอยู่ออกจากกันโดยอาศัยหลักการพื้นฐานของลักษณะการกระจายตัวของสารได้ต่างกันระหว่าง stationary phase และ mobile phase ขณะที่ตัวถูกละลายแต่ละตัวเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางซึ่งมีรูพรุน (porous medium) ภายใต้อิทธิพลของการไหลของตัวทำละลาย[1] ในปี 1906 Tswett นักชีววิทยาชาวรัสเซียเป็นผู้ค้นพบปรากฏการณ์นี้ ต่อมา Martin และ Synge ได้ตีพิมพ์รายงานเกี่ยวกับแนวทางในการพัฒนารูปแบบของเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบต่างๆที่จะนำไปสู่วิธีการปรับปรุงเครื่องมือสมัยใหม่เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น[64,65] ระบบโครมาโตกราฟีของเหลวมีชื่อเรียกในเทอมต่างๆ กันที่ใช้เรียกกันมากคือคำว่า High-pressure LC เนื่องจากต้องใช้ปั๊มช่วยทำให้เกิดความดันสูงเพื่อขับดันตัวทำละลายให้ได้อัตราการไหลตามที่ต้องการ ปัจจัยที่สำคัญอีก 2 ประการ คือ มีคอลัมน์ที่มีความสามารถแยกองค์ประกอบในสารผสมออกจากกันได้ดี และมีเครื่องตรวจวัด ซึ่งมีความไวสูงและตรวจวัดได้รวดเร็ว ดังนั้น ในปัจจุบันนี้ จึงนิยมเรียกเทคนิคนี้ว่า โครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง[49,66]

2.2.1 หลักการเบื้องต้นของ HPLC

กล่าวได้ว่า วิธี HPLC เป็นเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมแบบกายภาพ-เคมี องค์ประกอบของสารตัวอย่างที่ละลายอยู่ใน mobile phaseจะถูกรีเทนไว้อย่างจำเพาะบน stationary phase แล้วเกิดการแยกภายใต้อิทธิพลของการไหลของตัวชะขณะที่เคลื่อนที่ผ่านระบบโครมาโตกราฟี[67] เริ่มแรกวิธี HPLC ถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารปนเปื้อน (trace contaminant)เพื่อแก้ปัญหาในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ ตามขั้นตอนการวิเคราะห์ เช่น การแยก การพิสูจน์เอกลักษณ์สาร และหาปริมาณ โดยที่วิธีการแยกทำได้หลายวิธี เช่น การสกัด การตกผลึก การตกตะกอน การกลั่น electrophoresis หรือโครมาโตกราฟี เป็นต้น แต่ในบรรดาวิธีดังกล่าว วิธีโครมาโตกราฟีเป็นวิธีที่ใช้ประโยชน์ได้มากกว่า (versatile method) ทั้งทางด้านการวิเคราะห์คุณภาพและหาปริมาณ ทำให้วิธี HPLC ได้รับความสนใจและพัฒนาขึ้นอย่างรวด-เร็วกว่าบรรดาเทคนิคการแยกแบบอื่นๆ โดยพิจารณาจากข้อดี (advantage) ขีดจำกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(limitation) องค์ประกอบของสารที่แยก และหลักการในการเลือกใช้เครื่องมือ เป็นต้น[68]

2.2.1.1 เทคนิคต่างๆของ HPLC[25,64,67]

เทคนิคโครมาโตกราฟีแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 2 กลุ่ม ตามชนิดของ mobile phase คือ โครมาโตกราฟีของเหลว และโครมาโตกราฟีก๊าซเมื่อพิจารณาจากกลไกของการรีเทน วิธี HPLC แบ่งย่อยเป็นรูปแบบต่างๆตามชนิดของ stationary phase ที่ใช้ได้ดังนี้

(1) Adsorption เทคนิคนี้มี stationary phase เป็นอนุภาคของแข็ง เช่นซิลิกา เจล หรืออะลูมินา ซึ่งมี active surface อยู่ และมี mobile phaseเป็นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติตั้งแต่นอนโพลาร์จนถึงโพลาร์

(2) Ion-exchange เทคนิคนี้มีเรซินสำหรับแลกเปลี่ยนอิออน (ion - exchange resin) เป็น stationary phase สารประกอบที่ถูกแยกจะมี ionic strength ขบวนการแยกขึ้นกับชนิดของเรซินที่ใช้ ความเป็นกรด-ด่าง และค่า ionic strength ของ mobile phase

(3) Permeation เทคนิคนี้มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น gel permeation gel filtration หรือ steric filtration เป็นต้น ขบวนการแยกเกิดขึ้นในของแข็งรองรับ (solid support) ซึ่งเป็นรูพรุน หรือมีขนาดรูของอนุภาค (particle pore size) เป็นตัวกำหนดการแยก หลักการแยกเกิดขึ้นเนื่องจากน้ำหนักโมเลกุล และ/หรือ ขนาดของโมเลกุล

(4) Partition วิธี HPLC นี้มีการแยกเกิดขึ้นแบบพาร์ติชั่นระหว่าง mobile solvent กับสารที่ใช้บรรจุคอลัมน์ (packing material) ซึ่งใช้เป็น stationary phase[66] เมื่อก่อนเทคนิคนี้ใช้ stationary phase เป็นของเหลวเคลือบอยู่บนตัวรองรับเฉื่อย (inert support) เหมือนกับในเทคนิค GC โดยที่ stationary phase จะต้องไม่ละลายหรือละลายได้น้อยมากใน mobile phase ต่อมาเทคนิคพาร์ติชั่นของ HPLC มีการใช้ bonded phase ซึ่งมีกลไกการแยกเหมือนกันกับที่ใช้ของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งรองรับดังกล่าวแล้ว ชนิดของเทคนิคพาร์ติชั่นของ LC นี้เรียกว่า Reversed-phase chromatography ซึ่งใช้ stationary phase เป็นพวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นอนโพลาร์ร่วมกับ mobile phase ที่เป็นตัวทำละลายโพลาร์ โดยทั่วไปแล้ว bonded reversed-phase เป็นสารพวก alkyl silicone ที่เกิดพันธะกับ silica support และถูกนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างกันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้มีการนำ reversed-phase ใช้ร่วมกับ ionic mobile phase และเรียกชื่อใหม่ว่า Ion - pair chromatography จากเทคนิคต่างๆของวิธี HPLC การที่จะเลือกใช้กลไกการแยกแบบใดนั้นขึ้นกับชนิดและคุณสมบัติของสารที่จะแยกเป็นหลักในการพิจารณา

2.2.1.2 <u>การแยกในระบบ reversed-phase</u>

คำว่า "Reversed-phase" หมายถึง การใช้ตัวชะโพลาร์ร่วมกับ stationary phase แบบนอนโพลาร์ในการแยกโพลาร์โมเลกุล (polar molecule) ถ้าใช้ระบบ adsorption chromatography แยกแล้วอาจเกิด tailed peak และทำให้ประสิทธิภาพการแยกลดลง เนื่องจากเกิด interaction ขึ้นระหว่างโพลาร์โมเลกุล กับ stationary phase ซึ่งเป็นโพลาร์เหมือนกัน การใช้ reversed-phase สามารถแก้ปัญหานี้ได้ ระบบนี้มีตัวรองรับเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่เกิดเป็นพันธะแล้ว (bonded-hydro-carbon) เช่น ODS-silica และใช้ตัวชะเป็นสารละลายของเมทานอล หรืออะซีโตไนไตร แม้ว่าระบบ reversed-phase จะเหมาะสำหรับแยกสารโพลาร์โมเลกุลก็ตาม สำหรับกลุ่มของนอนโพลาร์โมเลกุล ก็สามารถแยกได้ดีเช่นเดียวกันโดยใช้ตัวชะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากขึ้น(51)

ระบบ reversed-phase HPLC(RPHPLC) ถูกนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารมากถึง 80% ของเทคนิค HPLC ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเหตุผลดังนี้(69)

- สามารถเตรียมเฟสลักษณะนี้ ได้ค่อนข้างง่ายมี reproducibility และความเสถียรสูง

- สามารถคาดคะเนลำดับการแยก (elution order) ได้ขึ้นอยู่กับระดับของ hydrophobicity ของตัวถูกละลาย

- ใช้องค์ประกอบหลักของ mobile phase คือ น้ำ ซึ่งมีราคาถูก ไม่เป็นพิษ และไม่ติดไฟ

- RPHPLC ใช้วิเคราะห์สารได้หลายชนิด คือ สามารถแยกสารทั้งที่เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นอนโพล่าร์ และสารประกอบที่แตกตัวได้

2.2.1.3 ข้อดีและข้อจำกัดของวิธี HPLC

วิธี HPLC มีข้อดีดังนี้

(1) การใช้วิธี HPLC สามารถแยกสารได้ภายในเวลาเป็นนาที หรือวินาที ทำให้งานวิเคราะห์ได้ผลเร็ว การที่มีคอลัมน์ที่สามารถแยกสารออกจากกันได้ดี และมีปั๊มที่ให้ความดันสูง ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลเร็วขึ้นและส่งผลให้การวิเคราะห์เร็วขึ้นด้วย

(2) ใช้แยกสารออกจากกันได้ดี คือสามารถแยกส่วนผสมของสารตัวอย่างออกจากกันได้และวิเคราะห์หาปริมาณได้ง่ายและได้ผลถูกต้องมีข้อผิดพลาด (error) น้อยกว่า 1% เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ มีเครื่องตรวจวัดที่มีความไวสูงขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ปกติแล้วเครื่องตรวจวัดจะสามารถตรวจวัดได้ต่ำถึง 10^{-9} กรัม เครื่องตรวจวัดบางชนิดสามารถตรวจสอบสารตัวอย่างได้ต่ำถึง 10^{-12} กรัม และ

(3) วิธี HPLC มีระบบเครื่องมือเป็นแบบอัตโนมัติและมีจำหน่ายอยู่ทั่วไป เช่น ระบบการฉีดสารตัวอย่าง หลังจากแยกสารแล้วให้เครื่องพิมพ์ค่า retention time (t_r) ของแต่ละพีค (peak) ออกมา หรือ อินติเกรท (integrate) หาพื้นที่เพื่อหาปริมาณ และเปลี่ยนกลับสู่สภาวะการทดลอง (conditions) เดิมได้อีกแล้วฉีดสารตัวใหม่ต่อไป HPLC บางเครื่องต่อเข้ากับ microprocessor เพื่อจัดระบบการเปรียบเทียบค่า t_r กับค่าที่บันทึกไว้ตรวจสอบพีคและบอกชื่อ ใช้พื้นที่พีคคำนวณหาความเข้มข้นของพีค โดยใช้กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ทุกขั้นตอนดังกล่าวทำงานเป็นไปอย่างอัตโนมัติ(67)

มีรายงานเปรียบเทียบข้อดีบางประการของวิธี HPLC กับ GC ไว้ดังนี้(25)

(1) ใช้ HPLC วิเคราะห์สารได้มากชนิดกว่า GC เนื่องจาก HPLC ไม่มีข้อจำกัดทางด้านการระเหยและเสถียรภาพต่อความร้อนของสาร จึงทำให้สามารถใช้ HPLC วิเคราะห์สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ได้ดีกว่า

(2) ตัวอย่างที่วิเคราะห์โดย HPLC ไม่จำเป็นต้องผ่านขบวนการ (pre - treatment) หรือผ่านเพียงเล็กน้อยก่อนการวิเคราะห์

(3) การที่สารแยกออกจากกันในทางโครมาโตกราฟีเป็นผลจาก interaction ระหว่างโมเลกุลของสารตัวอย่างกับ stationary phase และ mobile phase ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

gas phase จะไม่เกิด interaction แบบนี้แต่จะเกิดใน liquid phase เท่านั้น ดังนั้น การควบคุมและปรับปรุงความสามารถในการแยกสารโดย HPLC จึงสามารถทำได้ง่ายกว่า GC เช่น โดยการเปลี่ยนชนิดหรือความเข้มข้นของ mobile phase ก็จะสามารถดัดแปลงหรือแก้ไข interaction ของสารกับ stationary phase ได้ตามจุดประสงค์ที่ต้องการ

(4) HPLC มีคอลัมน์ให้เลือกใช้เพื่อให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่แยกมากกว่า GC เช่นคอลัมน์แบบ bonded phase คอลัมน์แบบ ion-exchange จึงทำให้สามารถใช้ HPLC ในการแยกสารตัวอย่างได้มากชนิดกว่า

(5) เนื่องจาก intermolecular interaction ในทางโครมาโตกราฟีเกิดที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง ดังนั้น การแยกสารโดย HPLC จึงใช้งานที่อุณหภูมิปกติของห้องปฏิบัติการได้ดี ส่วน GC นั้น มักจะต้องทำที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้องมากจึงจำเป็นต้องใช้พลังงานในการให้ความร้อนแก่คอลัมน์ของ GC ซึ่งต้องสิ้นเปลืองพลังงานมากกว่า HPLC มาก และ

(6) ในกรณีที่ต้องการตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์หรือทดสอบให้แน่ใจอีกครั้ง สามารถเก็บสารส่วนที่แยกได้โดย HPLC ได้ง่ายกว่า

ขีดจำกัดบางประการของวิธี HPLC

เครื่องมือ HPLC มีราคาแพงและต้องใช้ทุนทรัพย์มากในการวิจัย ต้องใช้ความชำนาญสูงในการปฏิบัติ ปกติแล้วใช้เวลาฝึกใช้เครื่องประมาณ 6-12 เดือน กล่าวได้ว่า วิธีโครมาโตกราฟี ดังเช่น HPLC นี้ จัดเป็นเครื่องมือพิสูจน์เอกลักษณ์สารที่ไม่ค่อยดีนัก (poor identifier) แต่ใช้แยกสารออกจากกันได้ดีมาก (superior resolution)แต่ไม่ให้ข้อมูลที่บ่งชี้สารแต่ละพีค นอกจากนี้ยังไม่มีเครื่องตรวจวัดที่เป็น universal และมีความไวมากพอ เช่น UV detector จะไวกับเฉพาะสารที่ดูดกลืนแสง UV ได้เท่านั้น(67)

แม้ว่า HPLC จะมีขีดจำกัดดังกล่าวก็ตามแต่วิธี HPLC สามารถใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้มากชนิดมีประสิทธิภาพสูงและให้ผลรวดเร็วกว่าวิธีทางเคมีดั้งเดิมซึ่งเสียเวลาและสิ้นเปลืองเคมีภัณฑ์มาก ปัจจุบันนี้เทคโนโลยีได้พัฒนาขึ้นมาก ถึงกับมีการประยุกต์ใช้คอมพิวเตอร์เข้ากับเครื่องมือ HPLC หลังจากที่ Tswett ได้ค้นพบหลักการนี้ จนกระทั่งเข้าสู่ศตวรรษแห่งเทคโนโลยีขั้นสูงภายใน 20 ปี ที่ผ่านมา ทำให้วิธี HPLC ได้รับการพัฒนาเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องมือที่ทันสมัยให้ทั้งความเร็ว ความไว และความจำเพาะ ทำให้ HPLC เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ (reliable) และใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง[70,71]

2.2.2 ทฤษฎีของ HPLC

ทฤษฎีของโครมาโตกราฟีของเหลวระบบต่างๆ โดยเฉพาะแบบพาร์ติชั่นอาศัยหลักการทั่วไปเหมือนกันคือ "Plate Theory" มีการประยุกต์ทฤษฎีนี้เข้ากับระบบการแยกทางโครมาโตกราฟี โดยให้ คอลัมน์, แผ่นเคลือบบาง หรือ แผ่นกระดาษถูกแบ่งออกเป็นหน่วยของการแยก (separation unit) ย่อยๆ ซึ่งอยู่ในสมดุล กันระหว่าง stationary phase และ mobile phase และเรียกหน่วยของการแยกนี้ว่า "Plate" ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการกลั่นลำดับส่วน (fractional distillation) ความหนาของแผ่นเหล่านี้เรียกว่า Height equivalent of a theoretical plate(HETP)หลักการเบื้องต้นของทฤษฎีพาร์ติชั่นโครมาโตกราฟีอย่างง่ายๆก็คือการแยกชั้นระหว่างของเหลว 2 ชนิด (liquid-liquid separation) ที่เกิดขึ้นในกรวยแยก โดยที่การแยกจำนวน 1 ครั้งเทียบได้กับจำนวน 1 แผ่นทางทฤษฎี (theoretical plate) ดังนั้น การแยกในระบบพาร์ติชั่น HPLC จึงมีจำนวนแผ่นมากกว่าการสกัดอย่างมาก จึงถือว่า จำนวนแผ่นทางทฤษฎีเป็นข้อมูลอ้างอิงในการแยกสาร การที่จะเพิ่มจำนวนแผ่นนี้ ทำได้ค่อนข้างยากแต่ก็สามารถเปลี่ยนแปลงได้ โดยการเพิ่มความยาวคอลัมน์หรือลดค่าของ HETP อย่างไรก็ตาม ก็มีผลเสียตามมา 2 ประการคือ (1) ยิ่งสารเคลื่อนที่นาน (มีจำนวนแผ่นมาก) ก็ยิ่งทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ดี หรืออีกนัยหนึ่งคือ ถ้าระบบการแยกนานขึ้น ความกว้างของโซน (zone) ก็เพิ่มขึ้นด้วย และ (2) จะเกิด band broadening เนื่องจากการแพร่กระจาย 2 แบบ คือ Eddy diffusion และ Longitudinal diffusion ซึ่ง effect 2 อย่างนี้ จะแปรผันกับอัตราการเคลื่อนที่ของ mobile phase[1]

ทฤษฎีของ LC ได้พัฒนามาจากหลักการของ GC รูปที่ 3 แสดงปริมาณสัมพันธ์ (quantitative relationship)ระหว่างความเร็วของ mobile phase (U) กับ HETP (H) โดยพิจารณาจากสมการของ Van Deemter[3] ในการปรับปรุงระบบ LLC คือ การใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูง และให้ความเร็วของ mobile phase สูงขึ้น พิจารณาจากค่าของประสิทธิภาพของคอลัมน์ หรือ band broadening จาก concept ของ HETP[72] Meyer ได้รวบรวมทฤษฎีของ HPLC ไว้เพื่อเสริมความรู้ความเข้าใจให้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นักโครมาโตกราฟี ทฤษฎีของ HPLC ได้ถูกพัฒนามาพร้อมๆกับการพัฒนาวิธีการแยก สำหรับการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการประจำ มีการอธิบายสมการสำคัญๆ พร้อมทั้งยกตัวอย่างประกอบไว้อย่างละเอียด(73)

เทอมต่างๆ ในระบบโครมาโตกราฟี(66) เทอมที่สำคัญๆซึ่งใช้อธิบายประกอบการพิจารณาข้อมูลต่างๆที่ได้จากการทดลองเพื่อให้เข้าใจคุณสมบัติของระบบ HPLC ได้ดีขึ้น เริ่มจากโครมาโตแกรม ในรูปที่ 4 มีดังนี้

(1) Capacity factor (k') หมายถึง การวัดค่าของการรีเทน (retention) ของสารที่อยู่ในคอลัมน์โดยเทียบกับ void volume เป็นตัวอ้างอิง ค่า k' = 0 จะไม่มีการรีเทนสารจะถูกชะออกมาที่ void volume ถ้า k' = 1 สารจะถูกชะออกมามีค่าเป็น 2 เท่าของ void volume ช่วงของค่า k' ที่เหมาะสมปกติแล้วจะมีค่าประมาณ 2-6 ดังสมการ (1)

$$k' = (V_r - V_o)/V_o \quad .....(1)$$

เมื่อ V_r = retention volume ของสารตัวอย่าง

V_o = void volume ของคอลัมน์

ถ้าอัตราการไหลของตัวชะที่เข้าคอลัมน์มีค่าคงที่สามารถเขียนแทนด้วย retention time

จะได้ $k' = (t_r - t_o)/t_o \quad .....(2)$

เมื่อ t_r = retention time ของสารตัวอย่าง

t_o = retention time ของสารที่ไม่ถูกรีเทนในคอลัมน์

คำว่า column void volume หมายถึง ปริมาณของตัวทำละลายทั้งหมดที่อยู่ภายในคอลัมน์ ณ เวลาใดๆ ส่วน void volume คือ ปริมาตรของช่องว่างทั้งหมดในระหว่างอนุภาค อาจเป็นช่องว่างระหว่างผนังคอลัมน์และอนุภาคที่บรรจุไว้และช่องว่างที่อยู่ในโครงสร้างรูพรุนของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์

การหาค่า V_o หรือ t_o

ปริมาตรของช่องว่างภายในคอลัมน์หาได้จาก retention time ของสารที่ไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถูกรีเทนไว้ การหาค่า t_o มีหลายวิธีแต่วิธีที่ง่ายที่สุดคือ การฉีดสารประกอบที่มีลักษณะเหมือนกันกับ mobile phase มากที่สุด เช่น การใช้ pentane เมื่อมี hexane เป็น mobile phase หรือบางครั้งค่า t_o มีค่าเท่ากับเวลาที่ mobile phase เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ เช่น การฉีด mobile phase แทนสารตัวอย่างและหาค่า t_o ได้จากความยาวของคอลัมน์หารด้วยความเร็วของ mobile phase ดังสมการ (3)[74]

$$t_o = \frac{L}{U} \quad \ldots\ldots\ldots (3)$$

เมื่อ L = ความยาวของคอลัมน์ และ U = ความเร็วของ mobile phase

Wells และ Clark ได้ศึกษาลักษณะของการแยกของสารประกอบบางอย่างเพื่อใช้หาค่า V_o ของ C_{18} bonded phase พบว่า สารละลายโซเดียมไนเตรตใช้ได้ผลดีกว่าสารประกอบอื่นๆ[75]

(2) <u>Separation factor</u> (α) หมายถึง องศาของการแยก (degree of separation) ของสาร 2 ชนิด ภายใต้สภาวะเดียวกันหรือใช้วัดความแตกต่างของสารผสมที่แยกออกจากกันและนิยามไว้ว่าเป็นสัดส่วนของค่า k' ของสาร 1 และสาร 2 ดังสมการ (4)

$$\alpha = k'_{1/k'_2} \quad \ldots\ldots\ldots (4)$$

ถ้า $\alpha = 1$ จะไม่เกิดการแยกและ $\alpha > 1$ จะเกิดการแยกให้เห็น ดังนั้น α จะต้องมีค่ามากกว่า 1 เสมอเพื่อให้สาร 2 ตัวแยกออกจากกันได้ดี ยิ่งค่า α มีค่ามากก็ยิ่งทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ดี

(3) <u>ประสิทธิภาพของคอลัมน์</u> (Column efficiency) มักใช้บ่งบอกคุณภาพของคอลัมน์ที่ใช้แยกโดยพิจารณาจากจำนวนแผ่นทางทฤษฎีของคอลัมน์ นิยามไว้ดังสมการ (5) และ (6)

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{W}\right]^2 \quad \ldots\ldots\ldots (5)$$

หรือ $$N = 5.54 \left[\frac{t_r}{W_{\frac{1}{2}}}\right]^2 \quad \ldots\ldots\ldots (6)$$

เมื่อ N = จำนวนแผ่นทางทฤษฎี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

t_r = retention time ของพีคสาร

W = ความกว้างที่ฐานของพีคในหน่วยเวลา

$W_{\frac{1}{2}}$ = ความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูงของพีค

เมื่อ N มีค่ามากขึ้น จะทำให้พีคคมชัดมากขึ้น (sharpness) และสารถูกชะโดยใช้ปริมาตรตัวทำละลายน้อยลง

(4) <u>ความสูงของแผ่นทางทฤษฎี</u>

เทอมนี้ก็ใช้อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ HPLC แทนด้วยสัญญลักษณ์ HETP หรือ H ดังสมการ (7)

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{.....} \quad (7)$$

ค่า H ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ เปรียบเทียบกับคอลัมน์อื่นที่มีอนุภาคบรรจุคอลัมน์เหมือนกัน ในแง่ปฏิบัติแล้วมักจะไม่คำนึงถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์เท่าไรนักในการประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่าง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถบ่งชี้ว่า สภาพของคอลัมน์นั้นยังเหมือนเดิมหรือไม่ เป็นการตรวจสอบความเสื่อมของคอลัมน์ที่ใช้แล้วโดยที่ค่า HETP มีค่าน้อย ประสิทธิภาพของคอลัมน์มีค่ามาก

(5) <u>Resolution (Rs)</u> Rs เป็นเทอมที่สำคัญเทอมหนึ่งในการประยุกต์ใช้วิธี HPLC สามารถหาค่า Rs ของสาร 2 ตัวที่อยู่ใกล้ชิดกันมากที่สุด จากสมการ (8)

$$Rs = (t_{r_2} - t_{r_1}) / \frac{1}{2}(W_1 + W_2) \quad \text{.....} \quad (8)$$

เมื่อ t_{r_1} และ t_{r_2} = retention time ของสาร 1 และสาร 2

W_1 และ W_2 = baseline width ของพีค 1 และพีค 2 ในหน่วยเวลา

เทอมต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วซึ่งได้แสดงถึงระบบการแยกนั้น มีความสัมพันธ์กันในสมการพื้นฐานของ LC ตามสมการ (9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$Rs = \frac{1}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\sqrt{N}\left(\frac{k'}{1+k'}\right) \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (9)$$

เมื่อ $$k' = \frac{k'_1 + k'_2}{2} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (10)$$

สมการนี้ประกอบด้วยตัวแปร 3 อย่างคือ plate number (N), capacity factor (k') และ selectivity factor (α) ปกติแล้วตัวแปรทั้ง 3 นี้ สามารถเปลี่ยนแปลงได้ เช่น ค่า N เปลี่ยนแปลงได้โดยเปลี่ยนขนาดของคอลัมน์ให้สั้นเข้าหรือยาวกว่าเดิม ค่า k' สามารถปรับปรุงได้โดยใช้ mobile phase ที่มี elution strength มากขึ้นหรือลดลง ส่วนค่า α นั้นจะขึ้นกับความจำเพาะของคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของระบบการแยกที่ใช้เท่านั้น เช่น adsorption, hydrophobic หรือ ion-exchange equilibria เป็นต้น ปรากฏการณ์เหล่านี้แสดงออกให้เห็นไม่ค่อยเด่นชัดมากนัก จะต้องทำการทดลองหาระบบการแยกที่ดีที่สุดโดยวิธี "Trial and error" การค้นพบระบบการแยกสารออกจากกันได้ดีที่สุดก็เปรียบเสมือนการค้นพบระบบที่มีค่า α สูงๆ[74] Hageman ได้ใช้สมการ (9) อธิบายค่า resolution ที่เกิดขึ้นระหว่างพีคที่อยู่ชิดกัน ค่า retention time ของสารที่ต้องการ และหาค่าของขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของการวิเคราะห์[76]

(6) <u>เวลาที่ใช้วิเคราะห์</u> ในที่นี้หมายถึงเวลาที่วัดได้จากค่า t_r ของพีคที่แยกออกหลังสุดของระบบที่กำลังศึกษา คำนวณได้จากสมการ (11)

$$t_r = t_o(1 + k') = N(H/U)(1 + k') \quad \ldots\ldots\ldots (11)$$

เมื่อแทนค่า H และ U จากสมการ (7) และสมการ (3) ตามลำดับ จากสมการ (11) สามารถทำให้เวลาที่ใช้วิเคราะห์สั้นเข้าได้โดยปรับค่าการรีเทนของพีคหลังสุดให้มีค่า k' ต่ำและเลือกใช้คอลัมน์สั้นๆ การหาเวลาที่เหมาะสม (time optimization) ในระบบ LC พิจารณาจากสมการ (11) และสมการ (9) โดยการแทนค่า N จากสมการ (9) ลงในสมการ (11) และจัดเทอมใหม่ เพื่อพิจารณาค่า t_r จะได้ดังสมการ (12)

$$t_r = 16R_s^2\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \cdot \frac{(1 + k')^3}{k'^2} \cdot \frac{H}{U} \quad \ldots\ldots\ldots (12)$$

นั่นคือ เวลาที่ใช้วิเคราะห์จะเป็น function ของ Rs ร่วมกับสภาวะที่ใช้ทดลองของคอลัมน์ในเทอมของ selectivity, capacity, efficiency และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mobile phase velocity จากวิธีทางคณิตศาสตร์เมื่อต้องการหาค่า t_r ต่ำสุดจะได้ $k' = 2$ แทนค่า k' ลงในสมการ (2) จะได้ $t_r = 3\ t_o$ (65)

Snyder ได้เสนอรายงานเกี่ยวกับการเลือกสภาวะของการทดลองที่ดีที่สุดและรวดเร็วโดยวิธี HPLC โดยการพิจารณาจากสมการ resolution กับสภาวะของการทดลอง เพื่อให้เกิดการแยกได้ดีที่สุดภายในเวลาสั้นที่สุด และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย โดยปรับปรุงตัวแปรทั้ง 3 ในสมการ (9) ดังกล่าวแล้ว(77,78)

2.3 เครื่องมือ HPLC

ส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC ในปัจจุบันนี้ได้รับการพัฒนาในรูปแบบที่ทันสมัยมากมีส่วนประกอบที่สำคัญหลายอย่างแสดงตาม block diagram ในรูปที่ 5 และแผนภาพแบบ schematic ของเครื่องมือ HPLC ในรูปที่ 6 เริ่มจากแหล่งเก็บตัวทำละลายเป็นที่จ่าย mobile phase ให้กับเครื่องปั๊มซึ่งมีมิเตอร์ควบคุมอัตราการไหล จากส่วนของปั๊มต่ออยู่กับที่ฉีดสารตัวอย่างและคอลัมน์ที่ใช้แยกสารที่แยกออกจากคอลัมน์จะผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดและแปลผลเป็นสัญญาณไฟฟ้าเข้าสู่เครื่องบันทึกสัญญาณออกมาเป็นโครมาโตแกรม(66)

2.3.1 แหล่งเก็บตัวทำละลาย (Solvent reservoir) ใช้เป็นที่เก็บ mobile phase เพื่อใช้เป็นตัวพาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ ตัวทำละลายที่ใช้จะต้องละลายสารตัวอย่างได้และต้องมีความบริสุทธิ์สูง ปกติแล้วจะใช้เกรด HPLC หรือเกรดสเปคโตรสโคปี (spectroscopic grade) การเลือกใช้ตัวทำละลายจะต้องคำนึงถึง ราคา ความหนืด ความเป็นพิษ และจุดเดือด ในทางปฏิบัติแล้วการเลือกใช้ตัวทำละลายจะพิจารณาสิ่งต่อไปนี้(74)

- ความเสถียรของคอลัมน์ (column stability)
- เหมาะสมกับเครื่องตรวจวัด (compatability with detector)
- การละลายของสารตัวอย่าง (solvency for sample)
- ไม่รบกวนการหาปริมาณสารคืนกลับของสารตัวอย่าง (noninterference with sample recovery)

ตัวทำละลาย ที่นิยมใช้กันมากคือ hexane, methylene chloride, acetonitrile, methanol และน้ำ เครื่องมือ HPLC บางระบบมี gradient device เพื่อทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หน้าที่ผสมตัวทำละลาย 2 ชนิด ให้มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวทำละลายให้คงที่

การทำให้ตัวทำละลายที่ใช้บริสุทธิ์

การเลือกใช้ตัวทำละลายที่สะอาดนั้นไม่เพียงแต่จะให้ผลการทดลอง reproducible เท่านั้นแต่ยังช่วยรักษาเครื่องอีกด้วย ตัวทำละลายที่ไม่สะอาด อาจทำให้เกิด baseline noise และ drift หรืออาจมีฝุ่นละอองไปอุดตันอยู่ในแหล่งเก็บตัวทำละลาย และใน inlet filter ตัว filter ที่อยู่ในแหล่งเก็บตัวทำละลายเป็นตัวกรอง mobile phase ที่สำคัญอย่างหนึ่งก่อนที่ตัวทำละลายจะเข้าสู่คอลัมน์เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้อนุภาคของสารแปลกปลอมเข้าไปสะสมอยู่ในตัวปั๊มและมีผลกระทบต่อระบบการทำงานของปั๊ม ควรจะมีการรักษา filter นี้ ให้สะอาดอยู่เสมอโดยการแช่ในสารละลาย 6 N. HNO_3 และเขย่าด้วยคลื่นเสียง (sonication) ประมาณ 5-10 นาที ดังนั้นตัวทำละลายที่จะใช้กับเครื่องมือ HPLC จะต้องผ่านการกรองหรือทำให้บริสุทธิ์และไล่ก๊าซออกก่อนทุกครั้ง(79)

2.3.2 <u>เครื่องปั๊ม</u> (Pump)(66) เป็นส่วนสำคัญมากอย่างหนึ่งของเครื่องมือ HPLC ใช้สำหรับผลิตความดันสูงเพื่อช่วยให้ตัวทำละลายไหลผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วคงที่และเหมาะสม ตัวปั๊มจะต้องเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี (chemically inert) เพื่อใช้ได้กับตัวทำละลายชนิดต่างๆ ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ทำให้การวิเคราะห์สารตัวอย่างได้มากชนิดขึ้น เมื่อปั๊มให้ความดันสูงจะทำให้การแยกเกิดขึ้นได้เร็วและมีประสิทธิภาพ ส่วนมากจะใช้ความดันประมาณ 1,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว มีอัตราการไหลของตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ในช่วง 0.5-2.0 มิลลิลิตรต่อนาที นอกจากนี้ปั๊มที่ดีจะมีระบบกำจัด pulse ที่เกิดขึ้นให้หมดหรือถูก damp ไว้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด noise และความไม่เสถียรของเครื่องตรวจวัด

ชนิดของเครื่องปั๊ม แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

(1) Constant pressure device
- Pneumatic
- Pneumatic amplifier

(2) Constant displacement device
- Syringe pump
- Reciprocating pump

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปั๊มที่นิยมใช้กันมากในเครื่องมือ HPLC แบบใหม่ๆ คือ reciprocating pump (รูปที่ 7) ลักษณะการทำงานของปั๊มชนิดนี้ เกิดจากการเติมตัวทำละลายเข้าในช่องว่างแล้วขับดันตัวทำละลายนี้ด้วยลูกสูบ การขับเคลื่อนลูกสูบแต่ละครั้งจะเปลี่ยนแปลงปริมาตรของตัวทำละลายได้ประมาณ 2-3 ไมโครลิตร จนถึงหลายๆมิลลิลิตร ในเครื่องมือบางแบบจะมีไดอะแฟรม (diaphragm) หรือ membrane แยกจากส่วนของลูกสูบที่ใช้ปั๊มตัวทำละลายอีกที แต่บางเครื่องจะออกแบบโดยให้ลูกสูบสัมผัสโดยตรงกับตัวทำละลาย ปัญหาหลักของปั๊มชนิดนี้ คือ มี pulse เกิดขึ้น เช่น ในปั๊มหัวเดียวที่มีมอเตอร์ขับเคลื่อนด้วยความเร็วคงที่ ระบบนี้จะมีความดันเกิดขึ้นในระหว่างการขับเคลื่อนลูกสูบขณะที่ขับดันและเติมตัวทำละลายใหม่ ในปั๊มรุ่นใหม่ๆ มีการออกแบบโดยการลด pulse ของเครื่องมือ เช่น อาจใช้ pulse damping system ใส่เข้าในส่วนของ output line ทำให้มีการดูดซับแรงบางส่วนไว้โดยการบาย-เบน (bending) หรือการบีบอัด (compressing) ในระหว่างที่มี pulse เกิดขึ้นมากๆ แล้วส่งแรงเข้าสู่ระบบการแยกในขณะที่มี pulse น้อยลง

มีการแก้ปัญหา pulse ใน reciprocating pump โดยการใช้ปั๊มหลายหัว (multiple pump head) ส่วนมากจะใช้ปั๊ม 2 หัว ระบบนี้ มีหัวหนึ่งทำหน้าที่ส่งตัวทำละลายขณะที่อีกหัวหนึ่งคอยบรรจุตัวทำละลายจากแหล่งเก็บ อย่างไรก็ตามเครื่องมือแบบ dual-head pump ยังคงมี pulse เหลืออยู่บางในระหว่างที่ลูกสูบหนึ่งเริ่มถอยหลังและเริ่มบรรจุตัวทำละลายเข้าสู่ช่องว่างในตัวปั๊ม (cavity) และขณะที่ลูกสูบอีกอันหนึ่งกำลังขับดันและเริ่มต้นส่งตัวทำละลาย นอกจากนี้มีการพัฒนาเครื่องมือโดยใช้ triple-head pump คือมีปั๊มหัวที่ 3 เป็นตัวส่งตัวทำละลายเพื่อลด pulse ลงอีกที ซึ่งปั๊มระบบนี้จะมี pulse เหลืออยู่น้อยมาก reciprocating pump ใช้สะดวกกว่าชนิดอื่น เพราะว่ามีปริมาตรปั๊มทั้งหมดขึ้นอยู่กับขนาดของแหล่งเก็บตัวทำละลายเท่านั้น ใช้งานได้ง่ายทั้งที่อัตราการไหลต่ำและสูง ทำให้ประยุกต์ใช้กับงานทั้งด้านวิเคราะห์และงานเตรียมปริมาณสาร จึงเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลายในระบบ HPLC ในปัจจุบันนี้

2.3.3 <u>ระบบฉีดสารตัวอย่าง</u> (Sample injection system)[66]

การฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC ส่วนมากจะใช้แบบ sample valve มี sample loop ทำด้วย stainless steel เป็นที่บรรจุสารตัวอย่างหลังจากที่ฉีดจาก syringe ในกรณีที่ใช้ความดันต่ำๆอาจใช้ sample injector เป็น syringe แบบง่ายๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่กระแสของ mobile phase ผ่าน rubber septum ในกรณีที่ใช้ความดันสูงๆ ก็ใช้ sample loop เป็นแบบ two-way valve (ดังรูปที่ 8) โดยมีตำแหน่งของวาล์ว (valve) ที่สามารถเติมสารละลายตัวอย่างเข้าไปใน loop ที่ความดันบรรยากาศปกติโดยใช้ syringe ฉีดเข้าไปขณะที่ mobile phase ซึ่งมีความดันสูงไหลผ่านอีก loop หนึ่งเข้าสู่คอลัมน์ แล้วหมุนวาล์วไปที่ตำแหน่งฉีด เพื่อให้ mobile phase ไหลผ่าน sample loop พาสารละลายตัวอย่างเข้าสู่ระบบการแยกต่อไป

ชนิดของเครื่องมือฉีดสารตัวอย่าง มี 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

(1) Septum injector

- Septumless injector
- Stop flow injector
- Valve injector

(2) Autoinjector system

- Syringe system
- Loop valve system

โดยทั่วไปแล้ว ระบบที่ใช้ syringe ฉีดสารเข้าสู่ loop valve จะให้ผลการฉีด reproducible มากกว่าเครื่องมือแบบเก่า ความแม่นยำของการส่งสารตัวอย่างด้วยเครื่องมือระบบนี้จะขึ้นอยู่กับความแม่นยำของการวัดปริมาตรใน syringe ดังนั้น ควรเลือกใช้ syringe ที่มีความแม่นยำสูงสุดในการวัดปริมาตรสารตัวอย่างที่จะใส่เข้าใน sample valve

ข้อดีของเครื่องมือระบบนี้ คือ

- ปริมาตรของสารตัวอย่าง เปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับปริมาตรของ loop
- ปริมาณสารตัวอย่างไม่เกิดการสูญหายเมื่อฉีดด้วยระบบนี้และเหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ที่มีปริมาณสารตัวอย่างน้อยๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4 <u>คอลัมน์</u> (Column)[3,46,66,79]

คอลัมน์เป็นหัวใจสำคัญของระบบโครมาโตกราฟีแบบที่ใช้คอลัมน์ทุกๆเทคนิค ในระบบ HPLC ส่วนมากจะใช้คอลัมน์ทำด้วยท่อ stainless steel ซึ่งบรรจุอนุภาคเฉพาะอย่างไปขึ้นกับธรรมชาติของสารตัวอย่างที่ต้องการแยก เนื่องจากความสามารถในการแยกของคอลัมน์เป็น function กับชนิดของอนุภาคที่บรรจุอยู่ภายในคอลัมน์ คอลัมน์ที่ใช้กันมี 2 แบบ คือ แบบที่ใช้วิเคราะห์แยกสาร และแบบที่ใช้แยกเตรียมสารปริมาณมากๆ ซึ่งแบบหลังนี้มีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า บริษัท Waters Associates ได้ออกแบบคอลัมน์ชนิดใหม่เรียกว่า "Radial-Pak column" ประกอบด้วยท่อ polyethylene sleeve หรือ flexible tube บรรจุอนุภาคอยู่ภายในและปิดหัวท้ายคอลัมน์ด้วย frit ร่วมกับเครื่องมือบีบตัวทุกๆทิศทาง เรียกว่า "Radial compression system" การติดตั้งคอลัมน์จะสอดตัว sleeve นี้เข้าใน compression chamber ลักษณะของคอลัมน์ระบบนี้จะเป็นการกำจัดช่องว่าง (void) และ channel ในระหว่างอนุภาค และ flexible wall กับ packed bed ภายในคอลัมน์ให้กระชับแน่น คือเป็นการลด wall effect ลง (bed uniformity) และเพิ่มค่า resolution เป็นผลให้คอลัมน์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

2.3.5 <u>อนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์</u> (Packing material)[3,46]

อนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ของ HPLC มีขนาดเล็กๆ (5-10 μm) เพื่อให้คอลัมน์มีประสิทธิภาพสูง ในระบบโครมาโตกราฟีแบบดั้งเดิมจะใช้ stationary phase เป็นแบบ normal phase โดยมีอนุภาคเป็นพวกซิลิกา และมีสภาพขั้วเป็น polar surface[66] (ดังรูปที่ 9 ก.) และมีการพัฒนา carbon material เพื่อใช้เป็นอนุภาคในระบบ HPLC[80] (ดังรูปที่ 9 ข.) ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการปรับปรุงประสิทธิภาพสำหรับ HPLC ระบบใหม่ๆ นิยมใช้อนุภาคที่เป็น bonded phase ซึ่งเป็นได้ทั้งแบบ normal phase และ reversed- phase ขึ้นอยู่กับ functional group ที่ผิวของอนุภาค พิจารณาจากสภาพขั้วของ functional group บน bonded phase จากน้อยไปหามากดังนี้

$$C_{18} \langle \text{phenyl} \langle \text{CN (R)} \langle NH_2 \langle \text{CN (N)} \langle \text{silica}$$

(——————increasing polarity ——————→)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอลัมน์ที่มี functional group เป็น - CN และ $-NH_2$ จะใช้แยกได้ทั้งแบบ normal phase และ reversed-phase รูปที่ 9 ค. แสดงลักษณะของ reversed-phase silica[66] ช่วงของ pH ที่ใช้ได้ใน reversed-phase มีค่า 2.0-8.0 เนื่องจากซิลิกา หรือ silicic acid ละลายได้ดีในสภาพที่เป็นด่าง เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ให้นานขึ้นควรใช้ mobile phase ที่มี pH ในช่วง 3.0-7.5 มีการประยุกต์ใช้คอลัมน์แบบ Radial-Pak cartridge วิเคราะห์แยกสาร เช่น ใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย C_8 reversed - phase (8 mm.i.d.) ร่วมกับ Z-module (รูปที่ 10 ก.) ของบริษัท Waters Associates[81] และการใช้คอลัมน์แบบ reversed-phase radial compression Novapak C_{18} (10 cm. x 8 mm.i.d., 5 µm) ของบริษัท Waters Associates เช่นเดียวกัน[10]

2.3.6 การ์ดคอลัมน์ (Guard-Column)[46,79,82]

เพื่อให้การทำงานของระบบโครมาโตกราฟีของเหลวเป็นไปด้วยดี จำเป็นต้องเลือกตัวทำละลายที่ดีและกรอง mobile phase ทุกตัวที่ใช้ โดยทั่วไปแล้วมีการใช้ pre-column filter ซึ่งใช้สำหรับกรองฝุ่นละออง และการ์ดคอลัมน์ (รูปที่ 10 ข.) ที่ใช้ป้องกันสารเคมี (chemical protection) อุปกรณ์ทั้ง 2 อย่างนี้ จะเป็นตัวช่วยป้องกันคอลัมน์ที่ใช้แยกสารไม่ให้ถูกกระทบกระแทกจาก mobile phase และสารละลายตัวอย่าง การ์ดคอลัมน์มีลักษณะเป็นคอลัมน์สั้นๆ สอดอยู่ด้านหน้าของคอลัมน์ใหญ่เพื่อใช้เก็บกักสิ่งสกปรกต่างๆซึ่งอาจทำให้อนุภาคในคอลัมน์เสื่อมลงหรือสมรรถนะของคอลัมน์ (column performance) เสียไป บริษัท Waters Associates ได้ผลิต Guard-Pak (รูปที่ 10 ค.) ขึ้นมา ซึ่งมีประสิทธิภาพของการแยกได้ประมาณ 100 plate มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับอนุภาคที่ใช้บรรจุคอลัมน์ เช่น C_{18}, CN และ Si(silica) เป็นต้น

2.3.7 เครื่องตรวจวัด (Detector)[66,83-85]

เครื่องตรวจวัดเป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งของระบบ HPLC ใช้ตรวจสอบความเข้มข้นขององค์ประกอบของสารตัวอย่างใน mobile phase แล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า เครื่องตรวจวัดมีหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางภายภาพและทางเคมีของตัวถูกละลาย ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ (eluate) เนื่องจากมีคุณสมบัติหลายประการที่สามารถใช้ตรวจสอบตัวถูกละลาย และยังไม่มีเครื่องตรวจวัดระบบใดที่สามารถตรวจสอบสารได้ทุกชนิด จึงมีการประยุกต์ใช้ระบบการตรวจสอบสารในรูปแบบต่างๆกัน อย่างไรก็ตาม เครื่องตรวจวัดที่ดี ควรจะมีคุณสมบัติและลักษณะดังต่อไปนี้

คุณสมบัติของเครื่องตรวจวัด

- สารที่แยกผ่านเครื่องตรวจวัด จะต้องไม่ผสมกันใหม่อีก
- ให้ช่วงเส้นตรงกว้างๆ เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณสารได้มากชนิด
- มีระดับ noise และ drift ต่ำ ทำให้สามารถตรวจวัดตัวถูกละลายปริมาณน้อยๆได้
- ตอบสนองได้รวดเร็ว (fast response time) เพื่อบันทึกพีคที่แยกออกมาได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง
- ไม่ว่องไว (insensitive) ต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล pulsation และอุณหภูมิ
- ไม่ควรเกิด band spreading
- ควรเป็นแบบไม่ทำลายสาร (nondestructive) ที่แยกออกมา
- ไม่ว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของตัวชะ จึงใช้กับระบบการแยกแบบ gredient ได้
- ควรจะมีความไวสูง
- ง่ายต่อการใช้งานให้ผลน่าเชื่อถือและราคาไม่แพง

ลักษณะของเครื่องตรวจวัด

(1) Noise คือ สิ่งที่รบกวนสัญญาณจากเครื่องตรวจวัด แต่ไม่รบกวนสารที่แยกได้ ลักษณะของ noise ที่สำคัญคือ short-term noise ใช้นิยามค่าขีดต่ำสุดของการตรวจวัด เกิดจากผลของ signal fluctuation อาจเกิดจากระบบอิเลคโทรนิคในเครื่องตรวจวัดหรือเครื่องบันทึกสัญญาณ และ pulse ที่เกิดจากเครื่องปั๊ม

(2) Sensitivity คือ การวัดปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ อาจแสดงค่าในเทอมของขีดต่ำสุดของการตรวจวัด และความไวนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารนั้นๆ ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(3) Response มักจะแสดงในเทอมของช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงในการตรวจสอบสาร

White ได้รวบรวมระบบเครื่องตรวจวัดแบบต่างๆรวมทั้งหลักการของแต่ละระบบไว้อย่างละเอียดรวม 2 ตอน คือ วิธีการตรวจวัดที่อาศัยหลักการของสเปคโตรสโคปีและเคมีไฟฟ้า และวิธีการตรวจวัดระบบอื่นๆ ปกติแล้วจะแบ่งชนิดของเครื่องตรวจวัดออกเป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ bulk property detector และ solute property detector ในที่นี้จะ กล่าวถึงระบบเครื่องตรวจวัดที่สำคัญๆ ดังนี้

2.3.7.1 เครื่องตรวจวัดแบบสเปคโตรสโคปี (Spectroscopic detector)

(ก). เครื่องตรวจวัดอุลตราไวโอเลท(Ultraviolet detector) มีการใช้ UV detector ร่วมกับระบบ HPLC มานานแล้วและยังคงเป็นที่นิยมกันแพร่หลายในปัจจุบันนี้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารใดๆ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ต่ำถึง 1 นาโนกรัม และหาความเข้มข้นของสาร โดยอาศัยกฎของเบียร์ (Beer's law) เมื่อไหลผ่าน flow cell จะเห็นว่าความไวเป็นสัดส่วนกับ path length ของ flow cell การออกแบบ flow cell จะมีผลต่อสมรรถนะของเครื่องตรวจวัด เนื่องจากอาจเกิด turbulence ขึ้น เครื่องตรวจวัดที่มีขาย มีการออกแบบ flow cell 3 แบบ คือ แบบ Z แบบ H และแบบ Tapered cell ซึ่ง flow cell เหล่านี้มี optical path length ยาว 10 มิลลิเมตร และมีปริมาตร 7.5-10 ไมโครลิตร หรืออาจมีขนาด 2-3 ไมโครลิตร ในเครื่องมือ micro - HPLC เครื่อง UV detector แบบแรกที่มีใช้และมีราคาถูกที่สุดคือ ระบบที่กำหนดความยาวคลื่นคงที่ (fixed-wavelength) ที่ 254 นาโนเมตร ต่อมามีการใช้ระบบที่ปรับความยาวคลื่นได้ (variable wavelength) ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถเพิ่มความไวได้โดยการเลือกความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงได้สูงสุด อย่างไรก็ตามเครื่องตรวจวัดระบบแรกก็สามารถให้ความไวสูงกว่าเครื่องตรวจวัดระบบหลังได้เหมือนกันเพราะว่ามี background noise ต่ำกว่า คุณสมบัติที่สำคัญของ UV detector คือเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายสารที่แยกได้

(ข). เครื่องตรวจวัดช่วงคลื่นวิซิเบิล (Visible wavelength) โดยทั่วไป บริษัทจะผลิตเครื่องมือที่มีทั้งช่วงแสง UV และวิซิเบิลรวมกัน ใช้สวิตช์ปรับที่ tungsten source เพื่อเลือกช่วงความยาวคลื่นวิซิเบิล จาก 400-800 นาโนเมตร ส่วนมากจะใช้กับ post -

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

column derivatisation เพื่อทำให้เกิดสารมีสี จากการพัฒนาเทคนิค pre-column และ post-column derivatisation ทำให้เครื่องตรวจวัดประเภทนี้มีความจำเพาะดีขึ้น และวิเคราะห์สารได้ต่ำถึง 50 นาโนกรัม

(ค). <u>เครื่องตรวจวัดแสงเรือง</u> (Fluorescence detector)

แสงเรือง คือ ปรากฏการณ์ luminescence ที่เกิดขึ้นเมื่อสารประกอบดูดกลืนแสงแล้วคายแสงออกมาที่ความยาวคลื่นยาวกว่าเดิม และเกิดได้ทุกๆ ช่วงของสเปคตรัมของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า แต่ที่มีใช้ในระบบ HPLC คือ การดูดกลืนแสงในช่วง UV หรือวิซิเบิล มีการใช้ flow fluorimeter มาพร้อมๆกับการผลิตเครื่องมือ HPLC และมีความไวดีมาก แบบหนึ่งในจำนวนเครื่องตรวจวัดที่มีใช้กับเครื่องมือ HPLC ทั้งหลาย ฟลูออริมิเตอร์แบบธรรมดาจะใช้ filter ในการเลือก excitation wavelength และ emission wavelength ปัจจุบันนี้ ฟลูออริมิเตอร์จะเป็นแบบที่ใช้ monochromator เป็นตัวเลือกความยาวคลื่นดังกล่าว การแยกร่วมกับเครื่องตรวจวัดระบบนี้จะต้องคำนึงถึงการเลือกใช้ตัวทำละลาย เนื่องจาก แสงเรืองจะมีความไวมากต่อสารที่เป็น deactivating species หรือ quencher เช่น ตัวทำละลายโพลาร์ บัฟเฟอร์ หรืออิออนของพวกเฮไลด์ชนิดต่างๆ การออกแบบ flow cell ต่างจากที่ใช้ใน UV detector เพราะว่า มีการคายแสงออกมาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีปริมาตร cell ประมาณ 5 ไมโครลิตร แต่ก็มี background noise อยู่บ้าง เนื่องจากมีแสงหลง (stray light) จากภายนอกรบกวน นอกจากนี้มีการใช้ปฏิกิริยาเคมีเป็นที่ผลิตแสงเรือง (chemiluminescence) และประยุกต์ใช้กับระบบ HPLC เพราะว่า ปฏิกิริยาเคมีจะให้ความจำเพาะสูง และเครื่องตรวจวัดประกอบด้วย photomultiplier เพียงอย่างเดียวเท่านั้น ไม่ต้องใช้แหล่งให้แสงจากภายนอก จึงไม่เกิดแสงหลงมากระทบ photomultiplier เหมือนอย่างในฟลูออริมิเตอร์ ดังนั้น เครื่องตรวจวัดระบบนี้จึงมีความไวมากกว่า

นอกจากนี้ มีการประยุกต์ใช้เครื่องตรวจวัดสเปคโตรสโคปีแบบอื่นๆ ร่วมกับระบบ HPLC เช่น Infrared, Atomic Absorption, Atomic Emission, MECA[3], Nuclear Magnetic Resonance และ Electron Spin Resonance เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.7.2 เครื่องตรวจวัดแบบเคมีไฟฟ้า (Electrochemical detector)

เครื่องตรวจวัดระบบนี้ใช้วัดคุณสมบัติทางไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบสารที่แยกได้โดยวิธี HPLC โดยการพิจารณาจากสมบัติของความจุไฟฟ้า ความต้านทานไฟฟ้า ความต่างศักย์ และกระแสไฟฟ้า เป็นหลักการของเทคนิคการตรวจสอบทางเคมีไฟฟ้า รายละเอียดของแต่ละระบบมีอยู่ในเอกสารอ้างอิง ตัวอย่างเช่น permittivity หรือ dielectric constant conductivity,potentiometry, และ voltammetry เป็นต้น

2.3.7.3 เครื่องตรวจวัดระบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเฟสของสารที่แยกได้ (Detector involving no phase change of the eluate) มีดังนี้

- Refractive index detector
- Optical activity
- Circular dichroism
- Photoionisation detector
- Piezoelectric crystal detection system
- Low-angle laser light scattering detector

3.3.7.4 เครื่องตรวจวัดระบบที่มีการเปลี่ยนแปลงเฟสของสารที่แยกได้ (Detector involving a phase change of the eluate) มีดังนี้

- Mass detector
- Gas - chromatographic detector
- Mass - spectrometric detector

จะเห็นว่าปัจจุบันนี้มีการประยุกต์ใช้เครื่องตรวจวัดหลายระบบต่อเข้ากับเครื่องมือ HPLC มีเครื่องตรวจวัดอีกระบบหนึ่งซึ่งนิยมใช้ตรวจสอบสารในระบบ HPLC กันอย่างแพร่หลาย นั่นคือ refractive index(RI) detector มีหลักการเกี่ยวกับการวัดการเปลี่ยนแปลงความเร็วหรือทิศทางของแสงที่ผ่านจากตัวกลางหนึ่งไปสู่อีกตัวกลางหนึ่ง โดยมีสัญญาณตอบสนอง (response) ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างค่าดรรชนีหักเหของแสงใน mobile phase อย่างเดียว และในสารละลายที่แยกได้ ใช้วิเคราะห์ภายใต้สภาวะการทดลองแบบ isocratic ใน RI detector มีขนาดของปริมาตร cell ที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครลิตร การออกแบบ RI detector มีข้อเสียหลายประการ

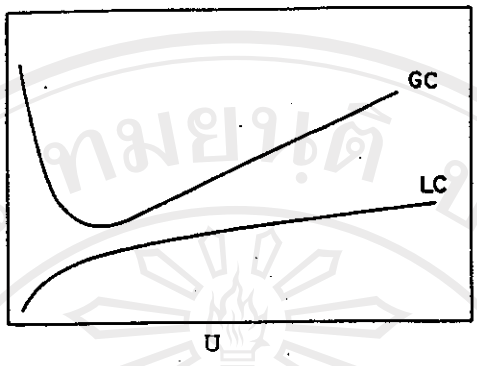
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คือ เกี่ยวข้องกับความไวของดรรชนีหักเหของแสงที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากองค์ประกอบของสารที่แยกได้ อุณหภูมิ และความดัน ค่า RI ที่วัดได้นั้นเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย (0.1 RIU)จะทำให้ขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของระบบนี้เปลี่ยนแปลงในช่วง 10^{-6}-10^{-8} กรัมต่อมิลลิลิตร ค่า RI จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิมากที่สุดและมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามถือว่า RI detector เป็น "universal technique" และถ้าใช้กับปั๊มที่ไม่มี pulse เกิดขึ้น จะช่วยเพิ่มความไวของระบบนี้ได้

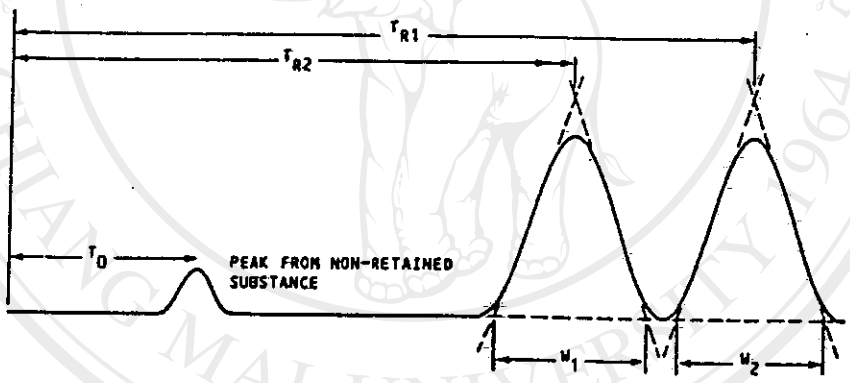
2.3.8 <u>เครื่องบันทึกสัญญาณ</u> (Recorder)[67]

เครื่องบันทึกสัญญาณ จัดเป็นส่วนประกอบของเครื่องมือ HPLC ที่จำเป็นอย่างหนึ่ง ทำหน้าที่แปลสัญญาณจากเครื่องตรวจวัดให้อยู่ในรูปของเวลา มักจะใช้ scale 10 mV และเปลี่ยนแปลงความเร็วกระดาษ (chart speed) ต่างๆเพื่อใช้อินติเกรทหาพื้นที่พีค และพิมพ์ค่า retention time โดยใช้ค่า t_r เป็นตัวกำหนดชนิดของสาร และพื้นที่ใต้พีค ใช้หาปริมาณสารที่วิเคราะห์ ปัจจุบันนี้นิยมใช้อินติเกรเตอร์แบบอัตโนมัติ ซึ่งสะดวกต่อการหาปริมาณ โดยการเชื่อมต่อสัญญาณจากเครื่องวัดเข้ากับเครื่องอินติเกรเตอร์โดยตรง สารที่แยกจากคอลัมน์แล้วผ่านเครื่องตรวจวัดและบันทึกโครมาโตแกรม ค่า retention time และพื้นที่พีคได้อย่างอัตโนมัติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

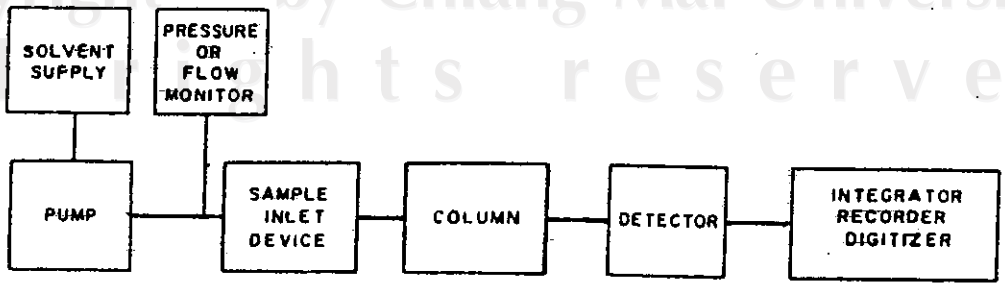


รูปที่ 3 HETP (H) curve ของ GC และ LC

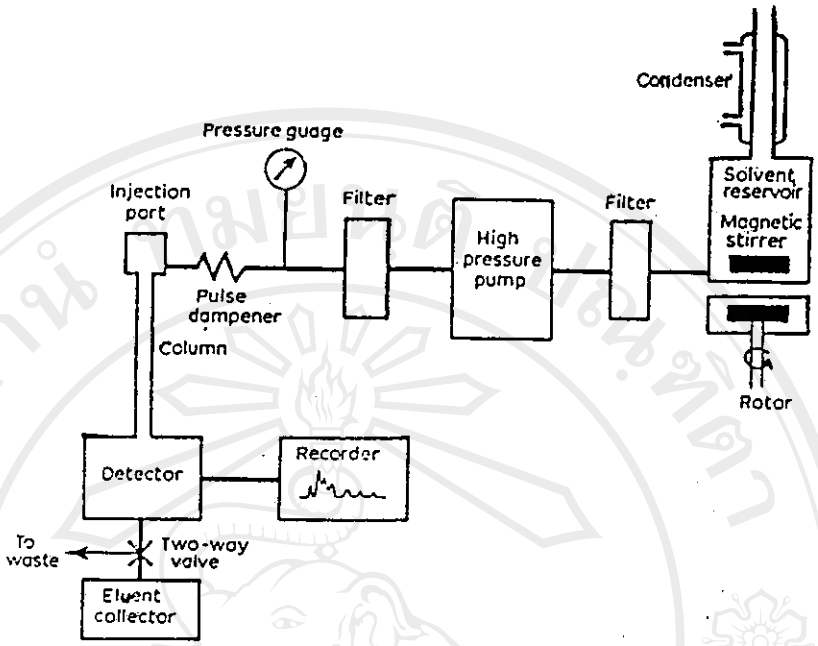


รูปที่ 4 โครมาโตแกรมใช้นิยามค่า retention time และ peak width ของระบบ HPLC

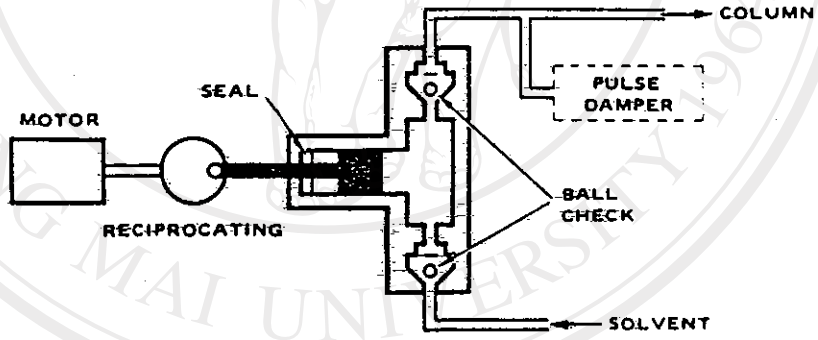
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



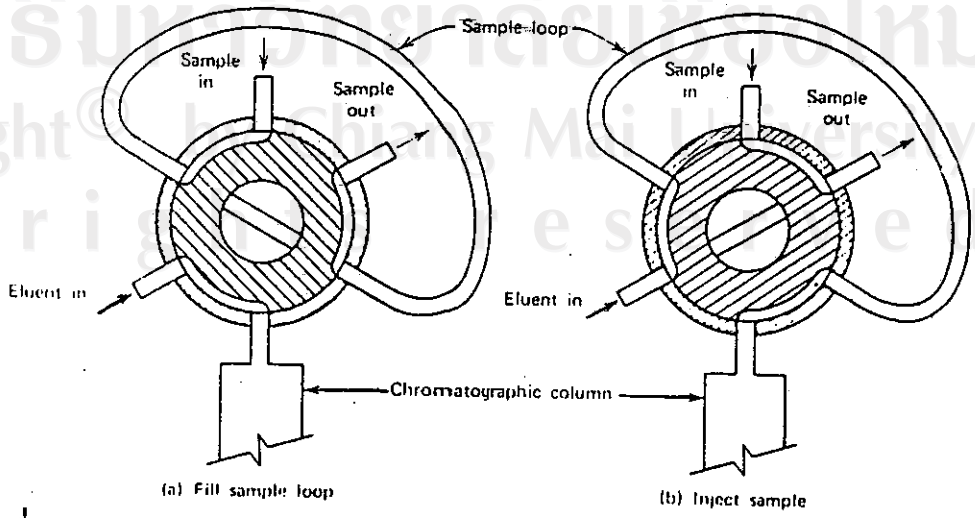
รูปที่ 5 Block diagram ของเครื่องมือ HPLC



รูปที่ 6 Schematic diagram ของระบบ HPLC

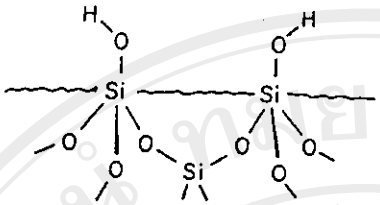


รูปที่ 7 Reciprocating pump

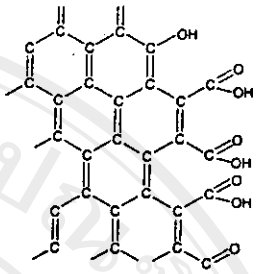


รูปที่ 8 Sample loop injector

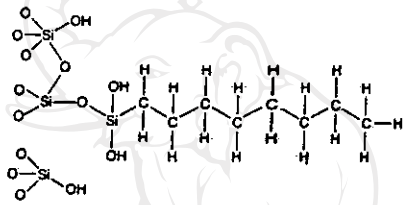
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



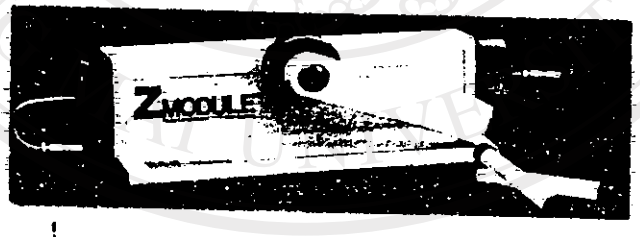
รูปที่ 9(ก) Silanol group บนผิวของ silica particle



รูปที่ 9(ข) Packing ที่เป็นโครงสร้างของคาร์บอน

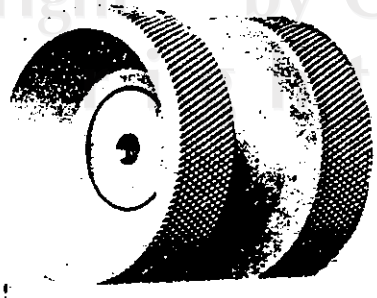


รูปที่ 9(ค) Reversed-phase silica



รูปที่ 10(ก) Radial compression separation system

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 10(ข) Guard column

รูปที่ 10(ค) Guard-Pak