

หน่วยที่ 4 วิธีโครมาโทกราฟี

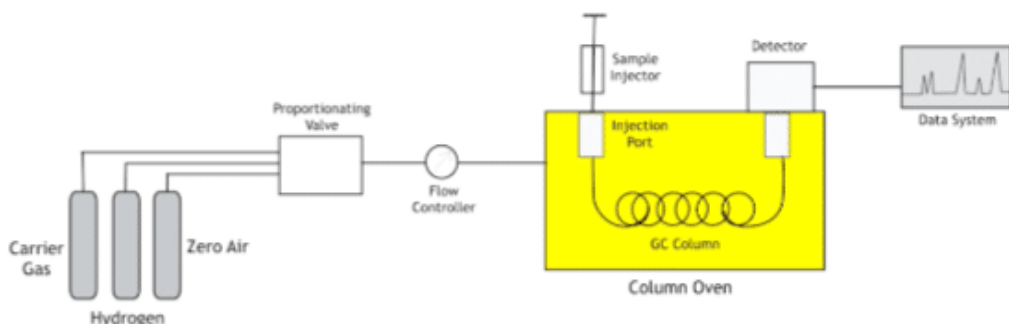
บทเรียน 4.1 โครมาโทกราฟีแบบแก๊ส

จุดประสงค์การสอน

1. บอกหลักการและส่วนประกอบของเครื่อง GC
2. อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์และตัวตรวจวัด
3. คำนวณการทำปริมาณวิเคราะห์และการแปลผล
4. ปฏิบัติการโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส

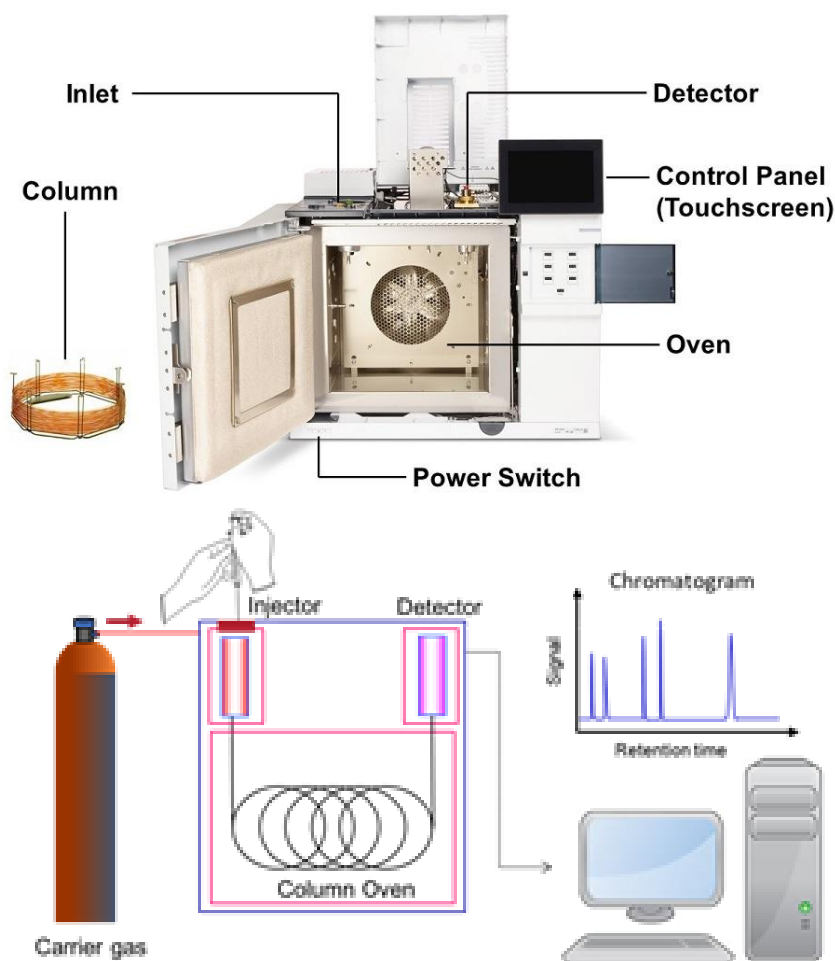
4.1.1 ส่วนประกอบของเครื่อง GC

แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยได้โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง ไอที่เกิดขึ้นจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือแก๊สตัวพา (carrier gas) ตามอัตราการไหลที่ต้องการ ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยสารที่ทำหน้าที่ในการแยก เรียกว่า เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) สารผสมจะถูกแยกออกเป็น ส่วน ๆ ที่คอลัมน์นี้ด้วยความแตกต่างของสมบัติทางเคมี โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล หรือจุดเดือด สารที่แยกได้ผ่านออกไปสู่ตัวตรวจวัด (detector) ทำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าส่งไปยังระบบประมวลผล (data system) ซึ่งสามารถคำนวณและรายงานผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) หรืออาจเรียกสั้น ๆ ว่า พีก (peak) ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ หรือเทียบปริมาณของสารตัวอย่างได้ในเชิงปริมาณ



ภาพที่ 4.1 หลักการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (เรียกว่า GC) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยง่ายและกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่กึ่งระเหย โดยอาศัยหลักการแยกระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ สำหรับเฟสอยู่กับที่ของเทคนิค GC คือ สารที่เคลือบผิวหรือบรรจุอยู่ในคอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ คือ แก๊สตัวพา นิยมใช้เป็นแก๊สฮีเลียม เมื่อสารผสมถูกฉีด ณ บริเวณหัวฉีด (injector) ซึ่งเป็นบริเวณที่ให้ความร้อนมีอุณหภูมิสูงพอที่จะทำให้สารผสมเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นไอ (แก๊ส) และส่วนแก๊สของสารผสมจะเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ โดยอาศัยแก๊สตัวพา และมีการให้ความร้อนของคอลัมน์ด้วยตัวควบคุมอุณหภูมิ ทำให้เกิดกระบวนการแยกชั้น จากนั้นสารผสมที่ถูกแยกภายในคอลัมน์จะเคลื่อนที่เข้าสู่ตัวตรวจวัด และผลที่ได้จะแสดงในรูปแบบของโครมาโทแกรม ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่อง GC ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 4.2 ส่วนประกอบของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

1. แก๊สตัวพา

แก๊สตัวพา (carrier gases) มีหน้าที่นำแก๊สตัวอย่างจากจุดฉีด (injection port) ผ่านเข้าสู่คอลัมน์และไปยังตัวตรวจวัด แก๊สที่ใช้ร่วมกับเครื่อง GC ต้องเป็นแก๊สเฉื่อยที่ไม่ทำปฏิกิริยา (inert) กับโมเลกุลของสารตัวอย่าง เช่น แก๊สฮีเลียม (He) อาร์กอน (Ar) หรือไนโตรเจน (N₂) ซึ่งแก๊สเหล่านี้

ไม่เป็นพิษต่อผู้ทดลอง ในบางกรณีอาจใช้แก๊สไฮโดรเจน (H_2) หรือแก๊สอื่นบางตัวก็อาจใช้เป็นแก๊สตัวพาได้ ตามความเป็นจริงแล้ว แก๊ส H_2 ใช้ได้ผลดีที่สุด แต่ไม่ค่อยนิยมใช้ เพราะเกิดอันตรายได้ง่ายเนื่องจากเป็นแก๊สที่ไวไฟ และระเบิดได้

ตารางที่ 4.1 สมบัติและคุณลักษณะของแก๊สตัวพา

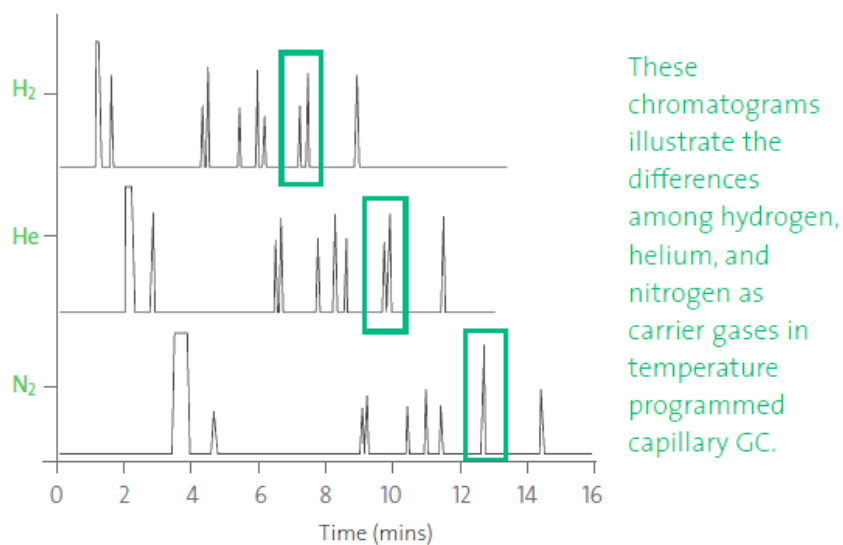
แก๊สตัวพา	สมบัติและคุณลักษณะ	ข้อดี	ข้อเสีย
He	- เป็นแก๊สที่ไม่ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างหรือของเหลวในคอลัมน์ - มีความนำความร้อน (thermal conductivity) สูง ซึ่งช่วยในการตรวจจับโดย TCD - มีความหนาแน่นต่ำ ทำให้มีการไหลที่สม่ำเสมอ	- ความเสถียรเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความแม่นยำสูง - ให้สัญญาณที่ชัดเจนและคมในกรณีใช้กับ TCD	- ราคาแพง - ต้องมีการจัดเก็บและจัดการที่เหมาะสมเพื่อรักษาความบริสุทธิ์
H_2	- มีการแพร่กระจายที่รวดเร็ว (high diffusivity) ส่งผลให้สามารถลดระยะเวลาการวิเคราะห์ได้ - ให้การแยกตัวอย่างที่ดีเนื่องจากความต้านทานภายในคอลัมน์ที่ต่ำ	- ช่วยให้การวิเคราะห์มีความรวดเร็วและประสิทธิภาพสูง - สามารถเพิ่มความละเอียดในการแยกตัวอย่างได้เมื่อเทียบกับแก๊สบางชนิด	- มีความเสี่ยงในด้านความปลอดภัยสูงเพราะเป็นแก๊สที่ไวต่อการระเบิด - อาจมีการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างบางชนิดในกรณีที่ไม่ต้องการให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี
N_2	- เป็นแก๊สที่ไม่ทำปฏิกิริยาและมีความเสถียรสูง - มีความหนาแน่นสูงกว่าแก๊สตัวพาชนิดอื่น ส่งผลให้มีการไหลที่ช้าและความดันภายในคอลัมน์ที่ต่ำออกไป	- มีราคาถูกและหาได้ง่ายเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่ไม่ต้องการความไวสูงมาก - ให้ความเสถียรในกรณีที่ไม่ต้องการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับตัวอย่าง	- ประสิทธิภาพการแยก (R) ตัวอย่างต่ำกว่าเมื่อเทียบกับฮีเลียมหรือไฮโดรเจนเนื่องจากความต้านทานภายในคอลัมน์ที่สูงกว่า - การวิเคราะห์อาจใช้เวลานานกว่าเนื่องจากความช้าในการไหลของแก๊ส

นอกจากชนิดของแก๊สตัวพาแล้ว อัตราการไหลของแก๊สตัวพาก็มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ดังนี้

1. มีผลต่อค่ารีเทนชันไทม์ (retention time, t_R) ขององค์ประกอบของสารตัวอย่างที่ผ่านในคอลัมน์ ถ้าอัตราการไหลเร็วจะทำให้องค์ประกอบของสารออกจากคอลัมน์ได้เร็ว และลักษณะพีคจะกว้าง

2. มีผลต่อขนาดของสัญญาณของตัวตรวจวัด คือถ้าไหลช้าจะทำให้ความสูงของพีคเพิ่มขึ้น ดังนั้นการควบคุมการไหลของแก๊สตัวพาจึงเป็นสิ่งสำคัญมากในการทำเทคนิค GC การควบคุมการไหลของแก๊สทำได้โดยการควบคุมความดัน นอกจากจะมีเครื่องควบคุมความดันของแก๊สแล้วต้องมีเส้นลวดที่มีรูเล็ก ๆ เป็นแคปิลารีเข้าช่วยด้วย ซึ่งจะทำให้ตั้งระยะการไหลของแก๊สได้กว้างขึ้นจาก 0-200 cm^3/min หรือมีความดันเป็น 0-60 psi

การพิจารณาเลือกใช้แก๊สตัวพาในเทคนิค GC อาจประกอบด้วยหลายปัจจัย ทั้งนี้แก๊ส He ยังคงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับแก๊สตัวพาในเทคนิค GC อย่างไรก็ตาม แก๊ส H_2 กำลังได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น เนื่องจากผู้ผลิตเครื่อง GC กำลังพัฒนาเครื่องมือใหม่ที่ปรับแต่งให้เหมาะกับแก๊ส H_2 มากยิ่งขึ้น ซึ่งแม้ว่า H_2 จะมีความไวไฟ แต่สมบัติการแพร่กระจายที่สูงช่วยให้สามารถใช้ความเร็วในแนวเส้นตรงที่สูงขึ้นและทำให้การวิเคราะห์ใช้เวลาอันน้อยลง ในขณะที่ยังคงประสิทธิภาพการแยก (resolution) ใกล้เคียงกับ He (ดังภาพที่ 4.3) แสดงผลการทดลองใช้สารผสมไม่มีขั้วทดสอบในสถานะอุณหภูมิคงที่ โดยใช้แก๊ส He, H_2 และ N_2 พบว่าแก๊ส H_2 มี t_R และ R_S ดีกว่าซึ่งช่วยให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้มากขึ้นและลดค่าใช้จ่ายต่อการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง



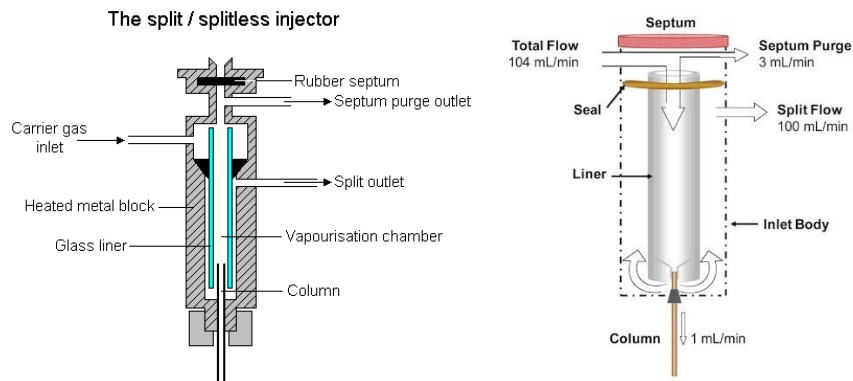
ภาพที่ 4.3 ผลของแก๊สตัวพาที่มีต่อประสิทธิภาพการแยกและเวลาการวิเคราะห์

(ที่มาภาพ : <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=17974>)

2. ระบบฉีดสารตัวอย่าง

ระบบฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system) หรือส่วนฉีดสารตัวอย่าง (injector port) เป็นบริเวณที่ใช้ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์โดยทั่วไปส่วนที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไป มักจะมีตัวให้ความร้อน (heater) ติดตั้งอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไอ แสดงดังภาพที่ 4.4

โดยระบบฉีดสารตัวอย่างเป็นขั้นตอนสำคัญในเทคนิค GC โดยมีหน้าที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์แยก โดยต้องควบคุมทั้งปริมาณ และความเร็วในการฉีดให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดการแยกสารอย่างมีประสิทธิภาพ และลดความคลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ให้น้อยที่สุด



ภาพที่ 4.4 ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (injector port)

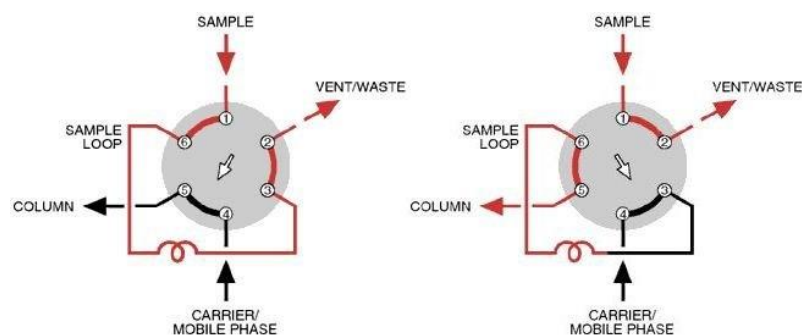
สารตัวอย่างอาจเป็นของเหลวหรือแก๊สก็ได้ ซึ่งหากสารตัวอย่างเป็นของเหลวจะต้องถูกทำให้ระเหยกลายเป็นไอก่อนเข้าสู่คอลัมน์ โดยผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่บริเวณห้องฉีดสารตัวอย่าง (sample chamber) โดยปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ขึ้นกับสถานะของสารผสมตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลว ประมาณ 5–50 ไมโครลิตร แต่ถ้าตัวอย่างเป็นแก๊ส ประมาณ 1 ถึง 10 มิลลิลิตร

การฉีดสารตัวอย่างในปริมาณที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ หากมากเกินไปอาจทำให้เกิดการกระจุกตัวของสาร ส่งผลให้การแยกไม่สมบูรณ์ และหากน้อยเกินไปอาจให้สัญญาณที่ต่ำเกินไปสำหรับการตรวจวัด ซึ่งเทคนิคในการฉีดสารตัวอย่าง อาจจำแนกตามสถานะของสารผสม ดังนี้

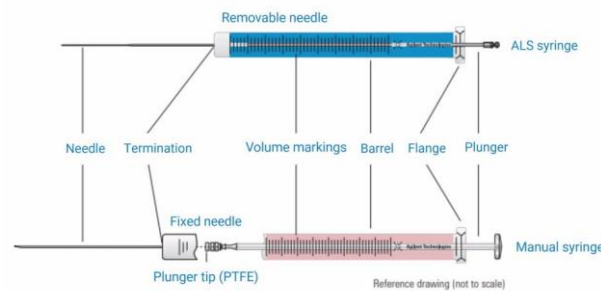
1) สำหรับสารตัวอย่างในสถานะแก๊ส

- ระบบวาล์วควบคุมการฉีด (gas sampling valve) เป็นระบบที่ให้ความแม่นยำและความสม่ำเสมอสูง เหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ที่ทำซ้ำบ่อย (routine analysis) โดยสามารถกำหนดปริมาตรของสารที่จะเข้าสู่คอลัมน์ได้อย่างอัตโนมัติ (ภาพที่ 4.5)

- การฉีดด้วยเข็ม (gas syringe) เป็นวิธีง่ายและใช้ได้ในกรณีที่ไม่ต้องการความแม่นยำสูงมาก แต่มักไม่แม่นยำเท่ากับระบบวาล์ว (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.5 วาล์วควบคุมการฉีด (gas sampling valve)



ภาพที่ 4.6 เข็มฉีดยา (gas syringe)

2) สำหรับสารตัวอย่างในรูปของเหลว

- ใช้เข็มฉีดยาแบบไมโครลิตร (micro syringe) โดยสามารถวัดปริมาตรได้อย่างแม่นยำถึง 0.005 mL (5 ไมโครลิตร)
- เมื่อฉีดเข้าสู่ห้องฉีด (sample chamber) สารจะถูกทำให้ระเหยทันทีด้วยอุณหภูมิที่ควบคุมให้สูงกว่าจุดเดือดของสารแต่ไม่สูงจนทำให้สารสลายตัว จากนั้นจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ด้วยแก๊สตัวพา

3) สำหรับสารตัวอย่างเป็นของแข็ง จะทำการวิเคราะห์โดย GC โดยตรงไม่ได้ ต้องใช้เทคนิคการนำสารตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาทางเคมีให้ได้สารประกอบที่กลายเป็นไอได้ จากนั้นจึงนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ เช่น กรดไขมันสามารถเปลี่ยนเป็นเมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) ที่กลายเป็นไอได้โดยทำปฏิกิริยากับโบรอนไตรคลอไรด์ (BCl_3) หรือโบรอนไตรฟลูออไรด์ (BF_3) ในเมทานอล ในบางกรณีใช้วิธีการเติมส่วนของเครื่องมือไพโรไลซิส (pyrolysis equipment) เข้ากับเครื่อง GC สารตัวอย่างที่เป็นของแข็งจะถูกใส่ในเครื่องไพโรไลซิส เมื่อให้ความร้อนสูงพอจะสามารถกลายเป็นไอได้ ไอของสารตัวอย่างจะถูกพาเข้าไปในเครื่อง GC ด้วยแก๊สตัวพา

ห้องฉีดสารตัวอย่าง (sample chamber) เป็นบริเวณที่เกิดการระเหยของสารตัวอย่างก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ต้องควบคุมอุณหภูมิให้สูงพอสำหรับการระเหยแต่ไม่สูงจนทำให้สารสลาย มักมีการออกแบบที่แตกต่างกันไปตามผู้ผลิต แต่มีหลักการทำงานเดียวกัน ภายในมักมีซับใน (liner) เพื่อรองรับการฉีดสาร และช่วยให้การระเหยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ตัวห้องฉีดจะถูกปิดด้วย septum ซึ่งเป็นวัสดุอย่างซิลิโคนที่สามารถทนความร้อน และป้องกันการรั่วของแก๊สได้เมื่อแทงเข็มผ่านเข้าไป

เทคนิคการฉีดสารในเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย GC นั้นอาจแตกต่างกันขึ้นกับชนิด ปริมาณ ความเข้มข้นของสารผสม ผู้ใช้จึงจำเป็นต้องพิจารณาเพื่อให้มีประสิทธิภาพการแยกที่ดีที่สุด สรุปได้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เทคนิคการฉีดสารในเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย GC

เทคนิคการฉีด	ลักษณะ	ข้อดี	ข้อจำกัด
split injection	แบ่งสารบางส่วนทิ้ง ไม่เข้าคอลัมน์ ทั้งหมด	ลด overload ในคอลัมน์ เหมาะสำหรับสารที่มีความ เข้มข้นสูง	ไม่เหมาะกับสารที่มี ปริมาณน้อย
splitless injection	ฉีดสารทั้งหมดเข้าสู่ คอลัมน์	เหมาะสำหรับสารที่มีความ เข้มข้นต่ำ ต้องการความไว สูง	ใช้เวลาฉีดนานกว่า และ ต้องควบคุมอุณหภูมิ อย่างแม่นยำ
on-column injection	ฉีดสารโดยตรงเข้าไป ในคอลัมน์	ลดการสูญเสียสาร ไม่ เกิดปฏิกิริยาในห้องฉีด	ไม่เหมาะกับตัวอย่างที่มี องค์ประกอบไม่เสถียร
headspace injection	ใช้เฉพาะไอของสาร ในภาชนะปิด	ลดการรบกวนจากของแข็ง/ ของเหลว เหมาะกับสาร ระเหย	ต้องใช้เครื่องมือเพิ่มเติม

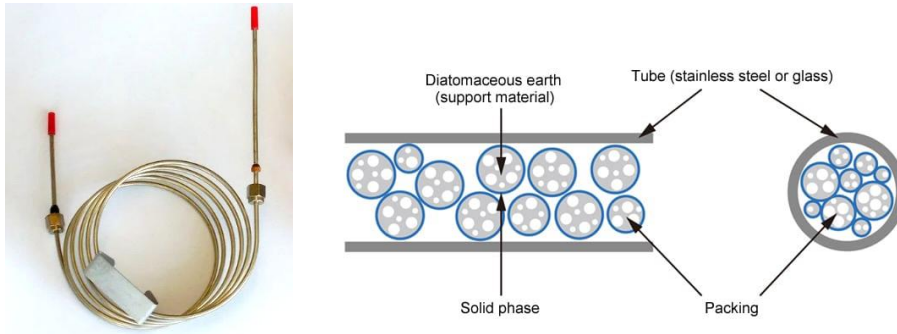
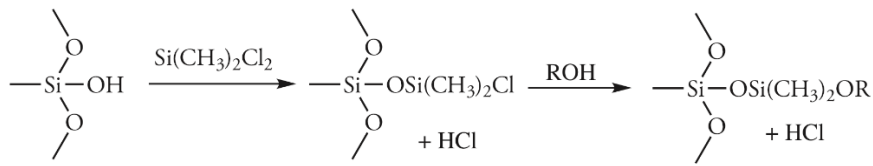
3. คอลัมน์

คอลัมน์ (column) เป็นส่วนที่ใช้แยกสารตัวอย่าง คอลัมน์ที่ใช้กันทั่วไปใน GC นั้นมีอยู่ 2 ประเภท คือ คอลัมน์แบบแพ็ค (packed column) และคอลัมน์แบบแคปิลารี (capillary column) การเลือกใช้คอลัมน์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสมบัติของสารผสม

1) คอลัมน์แบบแพ็ค (packed column) คอลัมน์ชนิดนี้มีทั้งแบบที่ทำด้วยแก้ว เหล็กกล้าไม่เป็นสนิม ทองแดง หรืออะลูมิเนียม โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 2–6 m และมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2–4 mm ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยวัสดุรองรับที่เป็นของแข็ง (solid support) ที่มีขนาดอนุภาคตั้งแต่ 37–44 μm ถึง 250–354 μm ถ้ามีความยาวมาก คอลัมน์จะถูกขดเป็นวงกลม (coil) เพื่อให้บรรจุลงในเตา (oven) ได้ คอลัมน์แบบแพ็คสามารถใช้ได้กับการวิเคราะห์ทั้ง GSC และ GLC โดยถ้าเป็น GSC จะใช้สารของแข็งที่เป็นตัวดูดซับบรรจุในคอลัมน์ เช่น ซิลิกา อะลูมินา เป็นต้น แต่ถ้าเป็นการวิเคราะห์แบบ GLC ต้องใช้ของแข็งเป็นวัสดุรองรับฉาบด้วยของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ เรียกของเหลวนี้ว่า ซับสเตรต (substrate)

วัสดุรองรับที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ไดอะตอมไมท์ หรือดินเบา (diatomaceous earth) ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างซิลิกา อนุภาคเหล่านี้มีความพรุนสูง โดยมีพื้นที่ผิวระหว่าง 0.5–7.5 m^2/g ทำให้เกิดการสัมผัสที่เพียงพอระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส พื้นผิวของไดอะตอมไมท์จะมีหมู่ซิลานอล ($-\text{SiOH}$) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่ใช้งานสำหรับการดูดซับ โมเลกุลของสารละลายในเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของแข็ง (gas-solid chromatography, GSC)

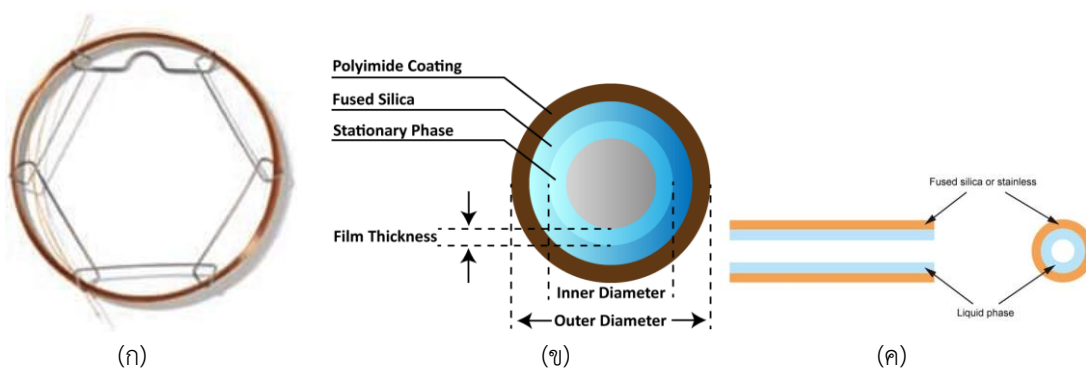
ส่วนเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-ของเหลว (gas-liquid chromatography, GLC) วัสดุบรรจุจะถูกเคลือบด้วยเฟสอยู่กับที่ที่เป็นของเหลว เพื่อป้องกันไม่ให้วัสดุบรรจุที่ไม่ได้เคลือบดูดซับ สารละลาย ซึ่งจะทำให้คุณภาพของการแยกสารลดลง พื้นผิวที่มีหมู่ซิลานอลจะถูกทำให้ไม่ทำปฏิกิริยา โดยการทำปฏิกิริยากับไดเมทิลไดคลอโรไซเลน (dimethyldichlorosilane) และล้างด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล ก่อนที่จะเคลือบอนุภาคด้วยเฟสอยู่กับที่



ภาพที่ 4.7 คอลัมน์แบบแพ็ค

(ที่มาภาพ : <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals/columns.html>)

2) คอลัมน์แบบแคปิลารี (capillary column) คอลัมน์ชนิดนี้ใช้ได้เฉพาะการวิเคราะห์แบบเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว (GLC) เท่านั้น ความยาวของคอลัมน์มีตั้งแต่ 10 ถึง 100 m หรือมากกว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ภายในประมาณ 0.2 ถึง 0.5 mm คอลัมน์แคปิลารีส่วนใหญ่หรือเกือบทั้งหมดทำด้วยซิลิกาหลอม (fused silica) เนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูงและมีจุดที่เกิดปฏิกิริยาต่ำ (มีปริมาณโลหะ ≤ 1 ppm และกลุ่ม OH < 120 ppm) เหตุผลที่ไม่ใช้โลหะเพราะโลหะสามารถเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีได้หลายชนิด และเมื่อภายในคอลัมน์ต้องใช้อุณหภูมิสูงอาจทำให้โลหะเกิดปฏิกิริยาบางอย่างในคอลัมน์ได้ ตามปกติอุณหภูมิของคอลัมน์ต้องสูงกว่าจุดเดือดของสารตัวอย่าง 10 ถึง 25°C พื้นผิวนอกของท่อมักเคลือบด้วยเรซินโพลีอิมิด (polyimide) ทำให้มีความแข็งแรงและง่ายต่อการใช้งาน ดังภาพที่ 4.8 (ข)

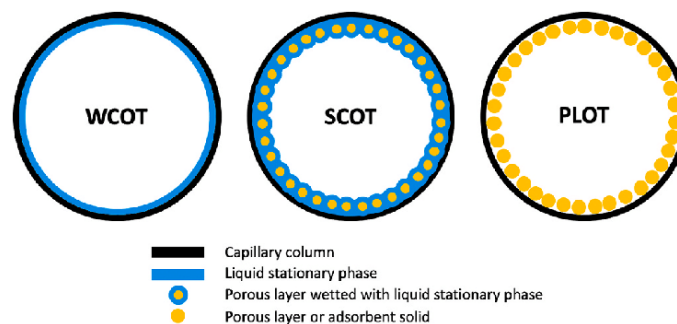


ภาพที่ 4.8 คอลัมน์แบบแคปิลารี (ก) รูปแบบคอลัมน์ (ข) มองด้านหน้า และ (ค) มองด้านข้าง

วิธีการเตรียมคอลัมน์แคปิลารีโดยใช้ของเหลวซึ่งเป็นเฟสอยู่กับที่ (liquid stationary phase) ใส่ในท่อแคปิลารี โดยของเหลวนั้นจะฉาบผิวของคอลัมน์เป็นฟิล์มบาง ๆ ที่มีความหนาน้อยกว่า $1\text{ }\mu\text{m}$ ดังภาพที่ 4.8 (ค) ความหนาของแผ่นฟิล์มของเหลวนี้จะมีผลต่อการแยกด้วย ซึ่งคอลัมน์แคปิลารีมีประสิทธิภาพการแยกสูงกว่าคอลัมน์แพ็คเกจถึง 100 เท่า และสามารถใช้กับขนาดของสารตัวอย่างที่น้อยกว่า $0.01\text{ }\mu\text{L}$ ความจุของคอลัมน์แคปิลารีทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยฉาบผิวของคอลัมน์แก้วด้วยวัสดุที่มีรูพรุน เช่น แกรไฟต์ โลหะออกไซด์ และซิลิเกต ให้มีลักษณะเป็นชั้นผิวบางก่อน ซึ่งจะทำให้พื้นที่ผิวที่จะให้ของเหลวมาฉาบบ่อยู่มากขึ้น

คอลัมน์แคปิลารีสามารถแบ่งออกเป็นสามประเภทหลัก ดังนี้

1. wall-coated open tubular (WCOT) เป็นคอลัมน์ที่มีการเคลือบฟิล์มบางของเฟสอยู่กับที่บนผนังภายในของท่อแคปิลารี
2. support-coated open tubular (SCOT) เป็นคอลัมน์ที่มีการเคลือบชั้นบางของวัสดุรองรับที่มีเฟสอยู่กับที่บนผนังภายในของท่อแคปิลารี
3. porous-layer open tubular (PLOT) เป็นคอลัมน์ที่มีการเคลือบชั้นบางของวัสดุที่มีรูพรุนบนผนังภายในของท่อแคปิลารี



ภาพที่ 4.9 ประเภทคอลัมน์แคปิลารี

คอลัมน์แคปิลารีมีประสิทธิภาพการแยกดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากมีจำนวนเพลตทางทฤษฎีมากกว่า และมีความยาวกว่าคอลัมน์แบบแพ็คเกจหลายเท่า เช่น คอลัมน์แคปิลารีในภาพที่ 4.8 (ก) มีจำนวนเพลตทางทฤษฎีประมาณ 4,300 เพลตต่อเมตร รวมเป็นจำนวนเพลตทางทฤษฎี 129,000 เพลตทั้งหมด ในขณะที่คอลัมน์แบบแพ็คเกจสามารถรองรับปริมาณตัวอย่างที่มากกว่าได้ อย่างไรก็ตาม ด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็ก คอลัมน์แคปิลารีจึงต้องใช้ตัวอย่างในปริมาณที่น้อยมาก โดยทั่วไปจะน้อยกว่า $10^{-2}\text{ }\mu\text{L}$

ลำดับการชะ (elution order) ในเทคนิคแก๊ส-ของเหลวโครมาโทกราฟี (GLC) ขึ้นอยู่กับสองปัจจัยหลัก ได้แก่ จุดเดือดของสารละลาย และปฏิกิริยาระหว่างสารละลายกับเฟสอยู่กับที่ หากส่วนประกอบของสารผสมมีจุดเดือดที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การเลือกใช้เฟสอยู่กับที่ที่ไม่มีผลต่อการแยกสารมากนัก แต่หากสารละลายสองชนิดมีจุดเดือดใกล้เคียงกัน การแยกสารจะสามารถเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อเฟสอยู่กับที่มีปฏิกิริยาเฉพาะกับสารละลายชนิดใดชนิดหนึ่ง

โดยหลักทั่วไป สารละลายที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) จะแยกได้ง่ายขึ้นเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ที่ไม่มีขั้ว ในขณะที่สารละลายที่มีขั้ว (polar) จะแยกได้ง่ายกว่าเมื่อใช้เฟสอยู่กับที่ที่มีความเป็นขั้ว สำหรับการเลือกเฟสอยู่กับที่ มีเกณฑ์สำคัญหลายประการ ได้แก่

- เฟสอยู่กับที่ที่จะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย
- ต้องมีความเสถียรทางความร้อน
- ต้องมีความระเหยต่ำ
- ต้องมีความเป็นขั้วในระดับที่เหมาะสมกับส่วนประกอบของตัวอย่าง

ตารางที่ 4.3 สมบัติของเฟสอยู่กับที่ใน GLC

เฟสอยู่กับที่	สภาพขั้ว	ชื่อทางการค้า	ขีดจำกัดอุณหภูมิ (°C)	การประยุกต์ใช้
squalane	nonpolar	Squalane	150	low-boiling aliphatics hydrocarbons
Apiezon L	nonpolar	Apiezon L	300	amides, fatty acid methyl esters, terpenoids
polydimethyl siloxane	slightly polar	SE-30	300–350	alkaloids, amino acid derivatives, drugs, pesticides, phenols, steroids
phenylmethyl polysiloxane (50% phenyl, 50% methyl)	moderately polar	OV-17	375	alkaloids, drugs, pesticides, polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls
trifluoropropylmethyl polysiloxane (50% trifluoropropyl, 50% methyl)	moderately polar	OV-210	275	alkaloids, amino acid derivatives, drugs, halogenated compounds, ketones
cyanopropylphenylmethyl polysiloxane (50% cyanopropyl, 50% phenylmethyl)	polar	OV-225	275	nitriles, pesticides, steroids
polyethylene glycol	polar	Carbowax 20M	225	aldehydes, esters, ethers, phenols

ที่มา: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis

คอลัมน์จะถูกบรรจุอยู่ในเตาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้เพื่อที่จะทำให้คอลัมน์มีอุณหภูมิสูงพอที่จะทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นไออยู่ตลอดเวลา อุณหภูมิที่ใช้ต้องไม่สูงเกินไปจนทำให้ของเหลวที่เป็นเฟสอยู่กับที่กลายเป็นไอ ปกติอุณหภูมิที่ใช้จะต่ำกว่าระบบฉีดสารตัวอย่างประมาณ 10°C

อุณหภูมิของคอลัมน์จะมีผลต่อค่าเวลาการหน่วง (retention time, t_R) และประสิทธิภาพการแยกอย่างมาก ที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ไอของสารตัวอย่างส่วนใหญ่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ เพราะการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้การละลายของสารตัวอย่างในเฟสอยู่กับที่ลดลงจึงทำให้สารตัวอย่างออกมาได้อย่างรวดเร็ว ถ้ามีสารผสมอยู่หลายตัวก็จะทำให้สารเหล่านั้นถูกแยกออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาใกล้เคียงกัน

4. ตัวตรวจวัด

ตัวตรวจวัด (detector) เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารเชิงเดี่ยวที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผล สามารถจำแนกประเภทของตัวตรวจวัดได้เป็นหลายประเภทตามสมบัติการตรวจวัด โดยรูปแบบตรวจวัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ flame photometric detector (FID) ใช้ในการตรวจหาสารประกอบอินทรีย์ (สารประกอบที่มี C-C, C-H bonds) และ electron capture detector (ECD) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดที่ดีในการตรวจหาสารประกอบที่มีอะตอมแฮโลเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ยาฆ่าแมลง และยากำจัดวัชพืช เป็นต้น

ตารางที่ 4.4 ตัวตรวจวัด

Detector	Selectivity	Detectability	Linearity
Flame ionization detector (FID)	No	2 pg C/s	10^7
Thermal conductivity detector (TCD)	No	≈ 300 pg/mL	10^{4-6}
Electron capture detector (ECD)	Halogens	fg/s	10^4
Nitrogen-phosphorus detector (NPD)	N, P	fg–pg N, P/s	10^{4-7}
Halogen-specific detector (XSD)	Halogens	pg Cl/s	10^4
Thermionic ionization detector (TID)	N, P	≈ 100 fg N/s, ≈ 100 fg P/s	N: 10^5 , P: 10^4
Photoionization detector (PID)	Aromatics	pg	10^6
Flame photometric detector (FPD)	S, P	pg ^a	S: 10^3 , P: 10^5
Pulsed flame photometric detector (PFPD)	Tuneable for 28 elements	pg S/s, 100 pg P/s ^a	S, P: 10^3
Atomic-emission detector (AED)	Tuneable for any element	pg/s ^a	10^{3-4}
Electrolytic conductivity detector (ELCD) or Hall electrolytic conductivity detector	S, N, halogens	pg	10^6
Mass spectrometric detector (MSD)	Yes	fg–pg	10^{4-7}
Fourier transform infrared (FTIR)	Yes	pg	10^2

^a The detectability considerably varies among particular elements.

pg, picogram; fg, femtogram.

5. ระบบประมวลผล

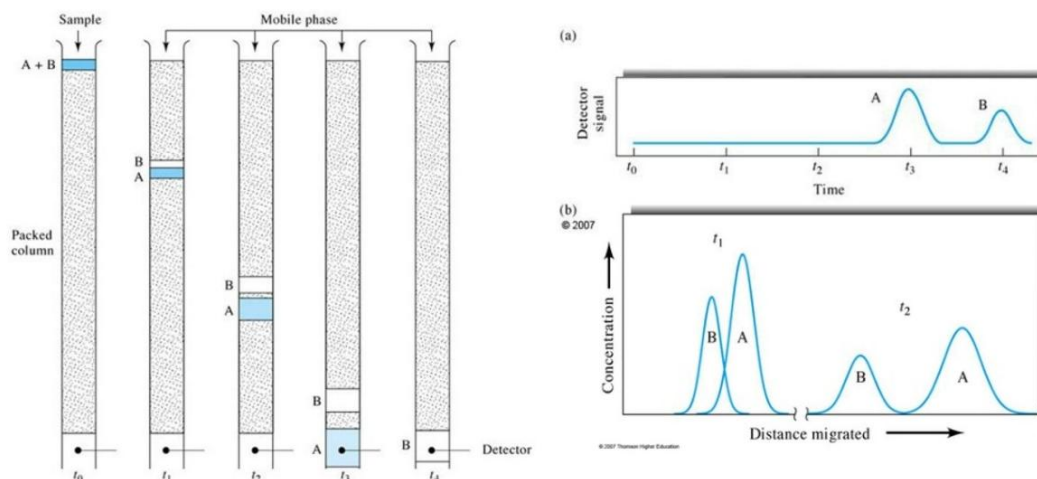
ระบบประมวลผล (data system) เป็นส่วนที่ประมวลผลและข้อมูลต่าง ๆ ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ซึ่งจะคำนวณและรายงานผลเป็นเวลาการหน่วง (retention time, t_R) คือเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของของพีกที่ได้จากโครมาโทแกรม เวลาการหน่วงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อระบุว่าเป็นสารชนิดใดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ลักษณะและขนาดของพีกที่ได้จากโครมาโทแกรมใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้

4.1.2 ประสิทธิภาพของคอลัมน์และตัวตรวจวัด

1. ทฤษฎีการชะ

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ไหลลงในส่วนบนของคอลัมน์ จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ เมื่อเราเติมเฟสเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์อีก คือ เติมตัวชะ (eluent) มันจะผลักดันด้วยแรงขับ (driving force) ให้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ สารตัวอย่างที่ถูกพาลงมาจะพบกับเฟสอยู่กับที่ส่วนใหม่ จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสทั้งสองอีก เมื่อเติมตัวชะต่อไปอีกเรื่อย ๆ จะทำให้สารตัวอย่างถูกพาลงมาส่วนล่างของคอลัมน์เป็นขั้นบันไดเรื่อย ๆ จนในที่สุดออกจากคอลัมน์ เพราะว่าการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากการพาของเฟสเคลื่อนที่หรือตัวชะเท่านั้น ดังนั้น อัตราเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์จึงขึ้นอยู่กับเศษส่วนของเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ถ้าสารตัวอย่างที่นำมาใส่ในคอลัมน์มีตัวถูกละลายมากกว่าหนึ่งชนิด และตัวถูกละลายมีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายหรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วนต่างกัน พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายนั้นต่างกัน ทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายทั้งสองชนิดออกจากกันได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.10 (ก) ถ้าโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติเหมือนกัน และการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกละลายสามารถเคลื่อนที่ได้เท่ากันหมด ซึ่งโครมาโทแกรมที่เป็นอุดมคติจะเป็นโซนแบบแถบ (band) หรือพีก ที่ไม่มีลักษณะการกระจาย

แต่เนื่องจากโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติไม่เหมือนกัน บางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า ทำให้โครมาโทแกรมที่ได้เป็นพีกที่มีความกว้าง (band broadening) ดังแสดงภาพที่ 4.10 (ข) ระยะเวลาที่ใช้ในการชะสารแต่ละชนิดออกมาเรียกว่า เวลาการหน่วง หรือ รีเทนชันไทม์ (retention time, t_R)



ภาพที่ 4.10 แผนผังแสดงการชะสารผสมของตัวถูกละลาย 2 ชนิดในเทคนิคโครมาโทกราฟี

ลักษณะของพิกที่ได้จะกว้างหรือแคบมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง คือ

1. การใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์
2. การแพร่กระจายของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ (longitudinal diffusion)
3. การไหลของโมเลกุลของสารตัวอย่างในคอลัมน์มีทิศทางที่แตกต่างกัน และได้ระยะทางที่ต่างกัน เพราะขนาดและรูปร่างของเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์แตกต่างกัน (Eddy diffusion)
4. โมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้นระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ (non equilibrium mass transfer)

จากปัจจัยแรก ซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่จะใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์พร้อมกันหมดทุกโมเลกุล การใส่สารตัวอย่างที่กระจายเป็นวงกว้างจะมีผลให้ได้พิกที่กว้าง เมื่อพิกของสารตัวอย่างที่ใส่ลงไปมีความกว้างมาก จะมีผลทำให้การแยกสารออกจากกันได้ไม่ดีเท่าที่ควร ด้วยเหตุผลนี้เวลาใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ หรือหยดสารตัวอย่างลงบนกระดาษ หรือเพลตในการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) หรือโครมาโทกราฟีแบบกระดาษแบบชั้นผิวบาง (thin layer chromatography) ต้องพยายามทำให้เป็นวงที่เล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้

สำหรับการควบคุมขนาดของปัจจัยข้ออื่นนั้น สามารถทำได้โดยควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่ และขนาดของคอลัมน์ พิกจะมีความกว้างมากขึ้น ถ้ามีการกระจายเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากสารตัวอย่างอยู่ในคอลัมน์เป็นเวลานานเกินไป การที่จะทำให้สารตัวอย่างไม่อยู่ในคอลัมน์นานเกินไป สามารถทำได้โดยเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะมีผลให้การแยกสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นไม่ดี พิกไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ดังนั้น จึงเป็นความจำเป็นที่ต้องควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมที่จะให้การแยกของสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นได้

ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้นระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ได้ พบว่าตัวอย่างจะใช้เวลาอยู่กับเฟสหนึ่งมากกว่าอีกเฟสหนึ่งได้มากกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งมีผลทำให้พิกที่ได้กว้าง เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะมีผลทำให้มีเวลาน้อยที่จะทำให้สารตัวอย่างเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง เมื่อขาดการเกิดสมดุลขึ้น จะมีผลทำให้พิกที่ได้กว้าง

สรุปได้ว่าในกรณีที่เกิดการแพร่กระจายของสารตัวอย่างขึ้นจะทำให้พิกที่ได้กว้าง การทำให้การแพร่กระจายลดลงสามารถทำได้ โดยเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เร็วขึ้น จะมีผลทำให้สารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ได้เพราะมีเวลาน้อย จะเป็นสาเหตุทำให้พิกกว้างขึ้น แสดงว่าการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ สามารถทำให้แบนด์กว้างหรือแคบก็ได้ ขึ้นอยู่กับว่าองค์ประกอบใดมีผลมากกว่ากัน ถ้าสมดุลระหว่างเฟสทั้ง 2 เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว การเพิ่มอัตราการไหลก็จะทำให้พิกที่ได้แคบ เพราะสามารถจัดผลของการเกิดการแพร่กระจาย ถ้าสมดุลเกิดขึ้นช้า การเพิ่มอัตราการไหลเพื่อจัดผลของการแพร่กระจาย ไม่สามารถทำให้พิกแคบลงได้ ดังนั้น การควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จึงเป็นสิ่งสำคัญมากในการทำโครมาโทกราฟี

2. ทฤษฎีเพลตของโครมาโทกราฟี

ทฤษฎีเพลต (plate theory) เป็นแนวคิดที่ใช้ในการอธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ในเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยเปรียบเทียบคอลัมน์เป็นเสมือนการแยกตัวอย่างออกเป็นชั้น ๆ หรือเรียกว่า เพลตทางทฤษฎี (theoretical plates, N) ซึ่งในแต่ละเพลตทางทฤษฎีจะเกิดสมดุลระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่

แนวคิดนี้ถูกพัฒนามาจากทฤษฎีของการกลั่นแบบแบ่งส่วน (fractional distillation) ซึ่งใช้โมเดลของเพลตเพื่ออธิบายการแยกองค์ประกอบของสารผสมในคอลัมน์ โดยจำนวนเพลตทางทฤษฎีของคอลัมน์มีผลต่อประสิทธิภาพการแยกสาร หากคอลัมน์มีจำนวนเพลตทางทฤษฎีสูง จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการแยกสาร จำนวนเพลตของคอลัมน์สามารถคำนวณได้จากสมการ (4.1)

$$N = \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad \text{.....(4.1)}$$

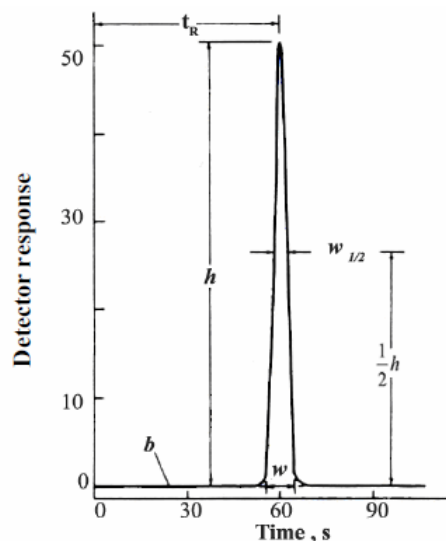
หรือในรูปแบบที่ใช้ค่าครึ่งหนึ่งของความสูงที่สุดของพีค

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad \text{.....(4.2)}$$

หรือ

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{.....(4.3)}$$

เมื่อ t_R = เวลาการหน่วง (retention time) หรือเวลาที่สารใช้ในการออกจากคอลัมน์
 w_b = ความกว้างของพีคที่ฐาน (peak width)
 $w_{1/2}$ = ความกว้างของพีคที่ความสูงครึ่งหนึ่ง (peak width at half height)



ภาพที่ 4.11 โครมาโทแกรมของเฮปเทน (Heptane) ที่ได้จากคอลัมน์ที่มีความยาว 50 cm

จำนวนเพลต N จะมีผลต่อลักษณะของพีค ถ้า N มีจำนวนมาก ๆ จะได้พีคที่มีลักษณะแคบและคมชัด การเพิ่ม N ให้มากขึ้นมีได้หมายความว่าต้องเพิ่มความยาวของคอลัมน์ เพราะถ้าความยาวของคอลัมน์เพิ่มขึ้นจะทำให้ t_R เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้พีกว้างเหมือนเดิม การเพิ่ม N ให้มากขึ้นหมายความว่าต้องเพิ่มให้มากขึ้นใน 1 หน่วยของความยาวคอลัมน์ที่ยาวเท่าเดิม แสดงว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ (efficiency) ขึ้นอยู่กับจำนวนเพลต ถ้าค่า N เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพของคอลัมน์จะเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากการเปรียบเทียบค่า N ที่เพิ่มขึ้นต้องเปรียบเทียบกับคอลัมน์ที่มีความยาวเท่ากันด้วย ดังนั้นการพิจารณาประสิทธิภาพของคอลัมน์จากจำนวนเพลต N จึงไม่สะดวก เราใช้ค่าความสูงของเพลตทางทฤษฎี (height equivalent to a theoretical plate, HETP) บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์สะดวกกว่า โดย HETP (ใช้สัญลักษณ์ย่อ H) ซึ่งหมายถึงความยาวของคอลัมน์ต่อจำนวนเพลต N เรียกสั้น ๆ ว่า plate height คำนวณได้จากสมการ

$$HETP = L/N \quad \text{.....(4.4)}$$

เมื่อ L = ความยาวของคอลัมน์ (cm)
 N = จำนวนเพลตทางทฤษฎีในคอลัมน์

คอลัมน์ที่ดีนั้นต้องมีค่า HETP น้อย นั่นคือ N ควรมีค่ามากที่สุดและคอลัมน์ควรสั้นที่สุดเพื่อให้ H มีค่าน้อย เนื่องจาก N จะมีค่าได้มาก เมื่อความกว้างของพีคมีค่าน้อย ดังนั้นสรุปได้ว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์จะดีเมื่อพีคที่ได้มีความกว้างน้อยหรือแคบ ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะลดลงเมื่อความกว้างของพีคมากขึ้น ซึ่งจะมีผลถึงการแยกสารผสมด้วย ถ้าประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีก็ทำให้การแยกสามารถเกิดขึ้นได้ดี เมื่อแทนค่าสมการ (4.1) ลงในสมการ (4.4)

$$H = L \left(\frac{w}{4t_R} \right)^2 \quad \text{.....(4.5)}$$

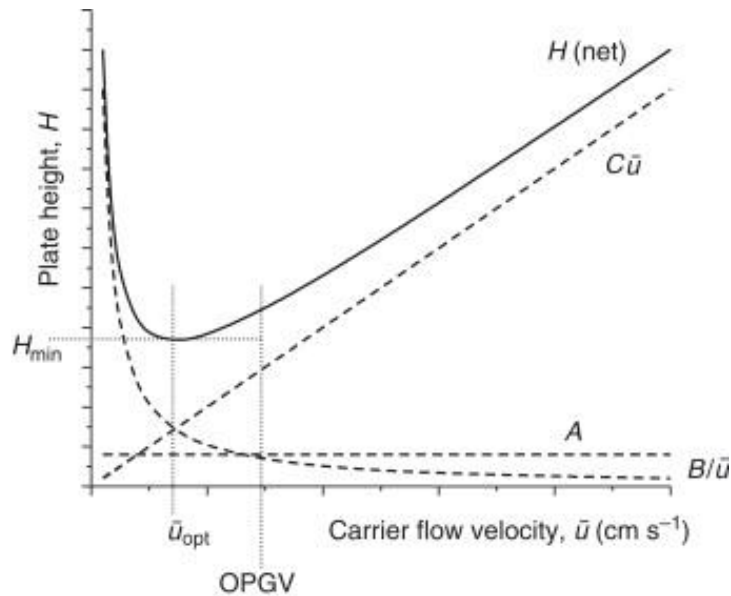
ค่าของ HETP ยิ่งต่ำ หมายความว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพการแยกสารสูงขึ้น ซึ่งก็คือจำนวนเพลตทางทฤษฎีที่มากขึ้นหมายถึงคอลัมน์มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการแยกสาร

สมการ Van Deemter เป็นสมการที่อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพการแยกสารในคอลัมน์โครมาโทกราฟี (H) กับอัตราการไหลเชิงเส้น u ของเฟสเคลื่อนที่ ดังสมการ

$$H = A + B/u + Cu \quad \text{.....(4.6)}$$

เมื่อ A = ความไม่เป็นระเบียบของช่องทางการไหลของโมเลกุลในคอลัมน์ (Eddy diffusion)
 B = การแพร่กระจายของโมเลกุลตามแนวยาวของคอลัมน์ (longitudinal diffusion)
 C = การต้านทานต่อการถ่ายโอนมวลของสาร (mass transfer resistance)
 u = อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (linear velocity)

จากสมการ Van Deemter จะเห็นได้ว่าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ส่งผลโดยตรงต่อ HETP และต้องมีค่าที่เหมาะสมเพื่อให้คอลัมน์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด



ภาพที่ 4.12 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ส่งผลโดยตรงต่อ HETP

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์

- ความยาวของคอลัมน์ (column length, L) คอลัมน์ที่ยาวขึ้นมักมีจำนวนเพลตทางทฤษฎีมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพสูงขึ้น
- เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคตัวพา (particle size of stationary phase, d_p) อนุภาคที่มีขนาดเล็กช่วยเพิ่มจำนวนเพลตทางทฤษฎี แต่ทำให้เกิดความต้านทานต่อการไหลเพิ่มขึ้น
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate of mobile phase, F) อัตราการไหลที่เหมาะสมทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารในคอลัมน์ลดลง
- ชนิดของเฟสอยู่กับที่ เฟสอยู่กับที่ที่เหมาะสมจะช่วยให้การแยกมีประสิทธิภาพมากขึ้น

3. ตัวตรวจวัด

ตัวตรวจวัดเป็นส่วนสำคัญเปรียบเสมือนสมองของเครื่อง GC เพื่อบ่งบอกว่ามีสารที่ต้องการวิเคราะห์ หรือมีสารอื่นที่แตกต่างไปจากแก๊สตัวพาออกจากคอลัมน์หรือไม่ ถ้าจะสามารถวัดได้ว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใด ตัวตรวจวัดจึงต้องเป็นเครื่องมือที่มีลักษณะเฉพาะสามารถให้สัญญาณกับสารต่าง ๆ ได้ ให้สภาพไวที่สูงพอ มีการตอบสนองที่ดีในช่วงความเข้มข้นของสารที่กว้างพอและอาจจะมีหลากหลายชนิดตามความเหมาะสมของงาน ลักษณะเฉพาะที่ต้องการของตัวตรวจวัด เมื่อพิจารณาการทำงานของตัวตรวจวัด สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทอย่างกว้าง ๆ คือ ตัวตรวจวัดที่วัดปริมาณสารได้โดยตรงเมื่อเมื่อสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ และตัวตรวจวัดที่วัดขนาดแล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้าเมื่อสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์

1) ตัวตรวจวัดที่วัดปริมาณสารได้โดยตรงเมื่อเมื่อสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ เช่น

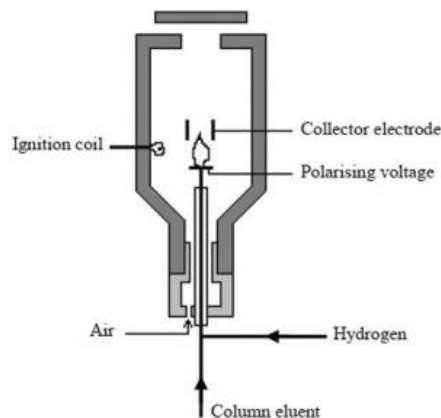
- automatic recording buret ตัวตรวจวัดนี้ใช้เฉพาะไอสารที่เป็นกรดหรือเบส

ไอของสารที่ระเหยออกมาจะดูดซึมเข้าไปในไทเทรชันเซลล์และถูกไทเทรตโดยอัตโนมัติ

- ไนโตรมิเตอร์ (Nitrometer) นำมาใช้ปี ค.ศ. 1953 เฉพาะการใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวพาเท่านั้น เมื่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์พาสารตัวอย่างเข้าไปในไนโตรมิเตอร์ ซึ่งบรรจุโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ไว้เต็ม แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกดูดซับไปหมด เหลือแต่แก๊สตัวอย่างที่อยู่บนสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งวัดเก็บได้ด้วยบิวเรตขนาดต่าง ๆ
- อินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (infrared spectrometer) ไอของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์สามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้แตกต่างกันตามปริมาณและชนิดของสาร ดังนั้นไอของสารที่ออกจากคอลัมน์จึงสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อโดยวิธี Infrared spectrophotometry
- แมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer, MS) องค์ประกอบที่ออกจากคอลัมน์ในเทคนิค GC สามารถนำไปวิเคราะห์ต่อโดยใช้เครื่อง MS ซึ่งทำให้สามารถพิสูจน์หรือทำนายชนิดขององค์ประกอบต่าง ๆ ได้ดี เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมาก เพราะได้ผลดี แต่ราคาสูง

2) ตัวตรวจวัดที่วัดขนาดแล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้าเมื่อสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ โดยตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ในเทคนิค GC เช่น

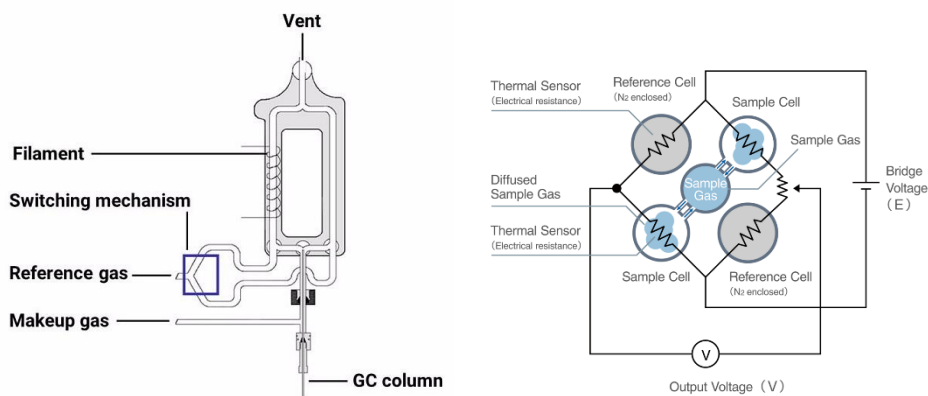
- **Flame ionization detector (FID)** เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์ทุกตัวสามารถเกิดการไอออไนซ์ (ionization) ได้ในเปลวไฟ ทำให้เกิดกระแสของไอออนที่สามารถสะสมอยู่ระหว่างขั้วที่มีประจุตรงข้าม 2 ขั้วได้ตามปริมาณของไอออน กระแสที่เกิดขึ้นนี้ยังมีปริมาณน้อยต้องใช้อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ขยายให้มีปริมาณกระแสไฟฟ้ามากขึ้น ดังนั้น ตัวตรวจวัดชนิดนี้จึงมีราคาแพงพอสมควร ลักษณะของตัวตรวจวัด แสดงดังภาพที่ 4.13 ตัวตรวจวัด FID เป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดเนื่องจากมีความไวสูง มีช่วงการใช้งานกว้าง เปลวไฟที่ใช้ในการทำให้อินทรีย์เกิดการไอออไนซ์ คือเปลวไฟจากแก๊สไฮโดรเจน ดังนั้น ตัวตรวจวัดนี้อาจเรียกว่า hydrogen flame ionization



ภาพที่ 4.13 ตัวตรวจวัด FID

ตัวตรวจวัด FID สามารถตรวจวัดสารตัวอย่างอินทรีย์ที่ระเหยกลายเป็นไอได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นสารประกอบที่ถูกออกซิไดซ์มาแล้ว เช่น carbonyl และ carboxyl group โดยปริมาณหรือจำนวนอะตอมของคาร์บอนที่เกิดการไอออไนซ์หรือถูกออกซิไดซ์จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณกระแสของไอออนที่เกิดขึ้น ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารตัวอย่าง ตัวตรวจวัดชนิดนี้สามารถวิเคราะห์สารประกอบที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ ได้ดีกว่าตัวตรวจวัด TCD ถึง 1000 เท่า

- **Thermal conductivity detector (TCD)** ตัวตรวจวัดประกอบด้วยใยเส้นลวด (filament) ที่ทนความร้อนอยู่ตรงกลางหลอดเล็ก ๆ หรือแท่งโลหะที่แก๊สต้องผ่านเข้าไปใยเส้นลวดจะถูกทำให้ร้อนด้วยกระแสไฟฟ้า เมื่อผ่านสารที่ถูกแยกพร้อม แก๊สตัวพาไปยังเส้นลวด มันจะเป็นตัวนำความร้อนออกจากใยเส้นลวด ทำให้ความร้อนของใยเส้นลวดเปลี่ยนแปลง เมื่อปรับความร้อนของใยเส้นลวดให้เท่าเดิม โดยปรับความต้านทานของวงจรไฟฟ้า จะทำให้เกิดสัญญาณส่งเข้าเครื่องบันทึกผล ซึ่งขนาดของสัญญาณจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารตัวอย่าง ลักษณะของเทอร์มัลคอนดักติวิตีตัวตรวจวัดแสดงในภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 ตัวตรวจวัด TCD

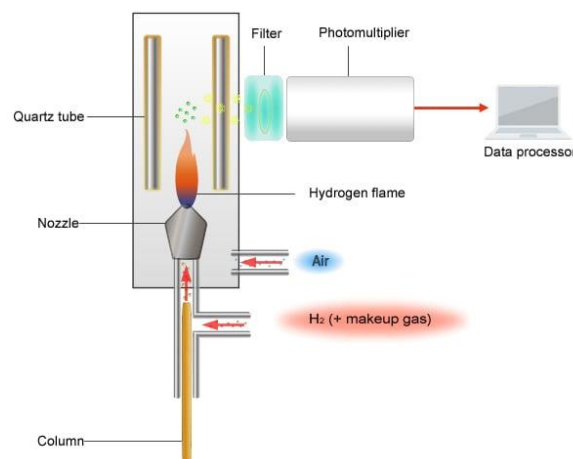
เนื่องจากตัวตรวจวัดชนิดนี้เป็นชนิดหนึ่งที่วัดค่าการนำความร้อนของแก๊ส ดังนั้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องรักษาให้ผนังของตัวตรวจวัดมีอุณหภูมิคงที่เสมอ ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ทางปริมาณได้ผลถูกต้อง ตารางที่ 4.5 เป็นตารางแสดงค่าการนำความร้อน (thermal conductivity) ของไอของสารชนิดต่าง ๆ จากตารางจะเห็นว่าแก๊ส H₂ และ He มีค่าการนำความร้อนสูงกว่าสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เป็นอย่างมาก ดังนั้นควรใช้แก๊ส H₂ หรือ He เป็นแก๊สตัวพาผ่านไปในเครื่องก่อน จนกระทั่งอุณหภูมิของตัวตรวจวัดคงที่ หลังจากการชะ (elute) สารตัวอย่างที่เป็นสารอินทรีย์ออกจากคอลัมน์เข้าตัวตรวจวัด จะปรากฏว่าการนำความร้อนของแก๊สออกจากใยเส้นลวดจะลดลง ทำให้ใยเส้นลวดมีอุณหภูมิสูงขึ้น วงจรไฟฟ้าจะไม่สมดุลเกิดการปรับใหม่เพื่อทำให้ความร้อนของใยเส้นลวดเท่าเดิม จึงทำให้เกิดเป็นสัญญาณไปยังเครื่องบันทึก แต่ถ้าใช้ N₂ เป็นแก๊สตัวพาจะทำให้ความไวลดลง เพราะค่าการนำความร้อนของแก๊ส N₂ ใกล้เคียงกับสารตัวอย่างมาก

ตารางที่ 4.5 ค่าการนำความร้อนของไอของสารชนิดต่าง ๆ

Gas	Thermal Conductivity (mW/m·K)
N ₂	26.0
Ar	17.9
H ₂	186.9
He	156.7
C ₂ H ₄	20.5
CH ₄	34.1
C ₂ H ₆	21.3

- **Flame photometric detector (FPD)** ตัวตรวจวัดชนิดนี้ให้แก๊สไฮโดรเจนทำให้เกิดเปลวไฟเช่นเดียวกับ FID แทนที่จะวัดปริมาณไอออนของสารตัวอย่างที่เกิดไอออนซ์ FPD จะใช้หลอดหลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier, PMT) วัดปริมาณแสงที่ถูกปล่อยออกมาในเปลวไฟ เมื่อไอออนของสารตัวอย่างเข้าไปในเปลวไฟ ตามปกติ FPD เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในเทคนิค GC เพื่อการตรวจวัดสารประกอบที่มีธาตุกำมะถัน (S) ฟอสฟอรัส (P) และสารประกอบอินทรีย์ของดีบุก (Sn) หรือสารประกอบจำพวกออร์แกโนเมทัลลิก (organometallic) ที่มีอะตอมของโลหะที่สามารถถูก excited ในเปลวไฟของไฮโดรเจนได้ หรือสารประกอบที่มีอะตอมของแฮโลเจน หลักการทำงานของ FPD อาศัยการที่สารประกอบเหล่านี้ปล่อยโฟตอนที่ความยาวคลื่นเฉพาะเมื่อถูกเผาไหม้ในเปลวไฟไฮโดรเจน-อากาศ แสงที่ปล่อยออกมาจะถูกกรองผ่านฟิลเตอร์เพื่อเลือกความยาวคลื่นที่ต้องการ ก่อนเข้าสู่หลอด PMT ซึ่งจะแปลงความเข้มของแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้า

FPD มีความไวสูงต่อสารประกอบของกำมะถันและฟอสฟอรัส ทำให้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและการตรวจหาสารประกอบกำมะถันในปิโตรเลียม อย่างไรก็ตาม FPD มีข้อจำกัดในเรื่องของความเสถียรและความไวต่อสภาวะแวดล้อม เช่น อัตราการไหลของแก๊สและความสะอาดของระบบ ซึ่งต้องการการควบคุมอย่างเคร่งครัดเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ

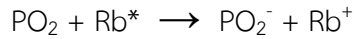
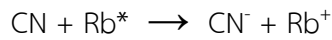


ภาพที่ 4.15 ตัวตรวจวัด FPD

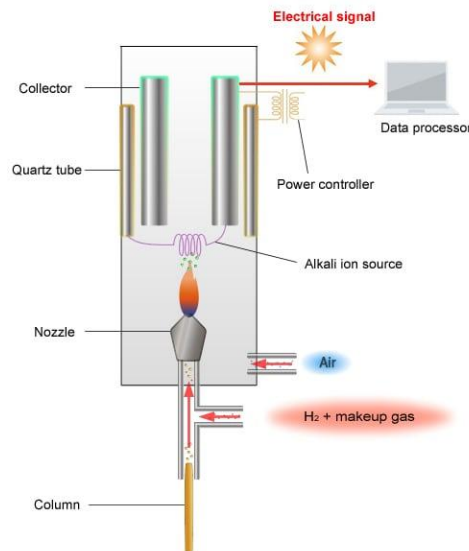
- **Nitrogen phosphorus detector (NPD)** หรือตัวตรวจวัดเทอร์มิโอนิก (thermionic detector, FTD) เป็นตัวตรวจวัดที่มีความไวสูงและเลือกจำเพาะสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนและสารประกอบฟอสฟอรัสทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ความจำเพาะของ FTD ต่อสารประกอบฟอสฟอรัสนั้นน้อยกว่าตัวตรวจวัดแบบ FPD นอกจากนี้ FTD ไม่ตอบสนองต่อสารประกอบไนโตรเจนอนินทรีย์ (inorganic nitrogen)

FTD ทำงานโดยใช้เปลวไฟไฮโดรเจน-อากาศเพื่อเผาไหม้สารที่ออกมาจากคอลัมน์ ในกระบวนการนี้ จะมีการใช้ platinum coil ที่เคลือบด้วยสารแอลคาไล เช่น รูบิเดียม (Rb) ซึ่งถูกให้ความร้อนด้วยไฟฟ้าจนเป็นพลาสมา เมื่อสารประกอบที่มีไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสสัมผัสกับ

platinum coil ที่ร้อน จะเกิดการแตกตัวเป็นไอออน Rb radical (Rb*) ที่เกิดขึ้นจากความร้อน พลาสมาจะจับกับ CN หรือ สารประกอบอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัส ดังสมการ



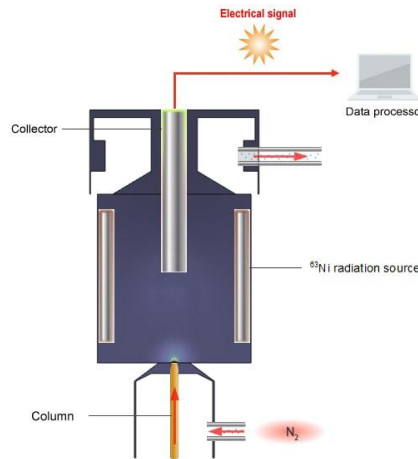
ไอออนเหล่านี้จะถูกดึงดูดไปยังอิเล็กโทรดรวบรวม (collector electrode) ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าที่สามารถวัดได้ สัญญาณไฟฟ้านี้จะถูกขยายและส่งไปยังระบบประมวลผลข้อมูล



ภาพที่ 4.16 ตัวตรวจวัด FTD

- **Electron Capture Detector (ECD)** หลักการของตัวตรวจวัดชนิดนี้ คือ แก๊สตัวพาที่ออกจากคอลัมน์เข้าตัวตรวจวัดจะถูกทำให้เกิดการไอออไนซ์ด้วยรังสีเบต้า (β) ที่เกิดจากสารกัมมันตภาพรังสี เช่น ^3H หรือ ^{63}Ni หรือ ^{55}Fe จากการไอออไนซ์จะทำให้เกิดอิเล็กตรอนและอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นนี้จะวิ่งไปที่ขั้วสะสม (collector electrode) ทำให้เกิดความต่างศักย์ระหว่างขั้วทั้งสองและยังมีอิเล็กตรอนเหลืออยู่อีกจำนวนหนึ่งเป็น electron cloud ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น เมื่อมีสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์เข้าไปในตัวตรวจวัดโมเลกุลของสารตัวอย่างจะดูดกลืนอิเล็กตรอนไว้ได้จำนวนหนึ่งตามปริมาณของสารตัวอย่าง ทำให้กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจากอิเล็กตรอนลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะทำให้เกิดเป็นสัญญาณ ส่งไปยังเครื่องบันทึก

แก๊สตัวพาที่เหมาะสมสำหรับ ECD คือไนโตรเจน หรืออาร์กอน +10% มีเทน ความไวของเครื่องขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของแก๊สตัวพาซึ่งทำให้เกิด electron cloud และอุณหภูมิของตัวตรวจวัด เนื่องจากแก๊สออกซิเจนและน้ำเป็นสารที่ดูดกลืนอิเล็กตรอนได้ ดังนั้น ถ้าแก๊สตัวพามีน้ำหรือออกซิเจนปนอยู่จะทำให้ความไวของตัวตรวจวัดลดลง ลักษณะของตัวตรวจวัด ECD แสดงดังภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.17 ตัวตรวจวัด ECD

ECD เป็นตัวตรวจวัดที่ไวต่อสารประกอบอินทรีย์ที่มีอะตอมของธาตุที่มี electronegativity สูง เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ออกซิเจน และฮาโลเจน ECD เป็นตัวตรวจวัดที่ใช้ได้ดีสำหรับงานวิเคราะห์สารจำพวกยาฆ่าแมลง สารประกอบอินทรีย์ที่มีตะกั่ว และพวก polychlorinatedbiphenyl (PCB) ตัวตรวจวัด ECD ไม่สามารถใช้วิเคราะห์สารไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวได้ สารประกอบที่ไม่สามารถใช้กับตัวตรวจวัด FID และ TCD สามารถนำมาใช้กับ ECD ได้ผล

ตัวตรวจวัดชนิดอื่น ๆ อีกนอกเหนือจากที่กล่าวมา ซึ่งได้ผลิตขึ้นมาสำหรับใช้กับงานเฉพาะอย่างหรือเป็นตัวตรวจวัดที่ดัดแปลงแก้ไขมาจากตัวตรวจวัดที่กล่าวมาแล้วเพื่อให้มีความไวสูงขึ้นสำหรับงานเฉพาะอย่างที่ต้องการ เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ตัวตรวจวัด (nitrogen-phosphorus detector, NPD) ตัวตรวจวัดชนิดนี้ได้ดัดแปลงมาจากตัวตรวจวัดชนิด FID เพื่อให้มีความไวต่อสารประกอบที่มีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเท่านั้น ตัวตรวจวัด NPD มีเกลือแอลคาไลเฮไลต์ (alkali-halide salt) วางอยู่เหนือเปลวไฟ เกลือแอลคาไลจะมีผลทำให้ความไวของตัวตรวจวัดที่มีต่อสารประกอบของไนโตรเจน

การพิจารณาว่าควรเลือกใช้ตัวตรวจวัดชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารและความไวของตัวตรวจวัด ตัวตรวจวัดแต่ละชนิดเหมาะสำหรับวิเคราะห์สารแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ต้องเลือกใช้ให้ตรงตามความสามารถของมัน อย่างไรก็ตามเราสามารถสรุปได้ว่า ตัวตรวจวัดที่ดีต้องมีสมบัติดังต่อไปนี้

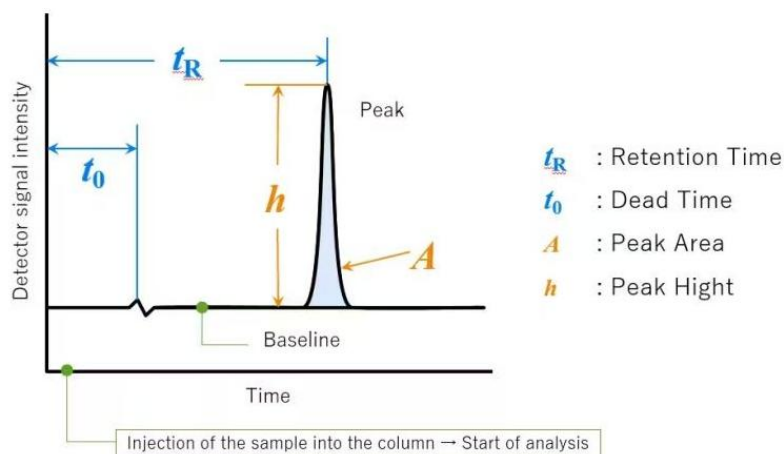
1. สัญญาณรบกวนที่เกิดขึ้นควรน้อยมาก (low noise)
2. มีความไวสูง (high sensitivity) และควรไวต่อไอของสารทุกชนิด
3. มีความรู้สึกต่อสารอย่างรวดเร็ว แม้ว่าปริมาณน้อย (rapid response) ในการชะ (elute) สารออกจากคอลัมน์ สารที่ออกจากคอลัมน์จะค่อย ๆ ออกมาทีละน้อยจนถึงมาก แล้วลดน้อยลงอีกทำให้เกิดเป็นพีก ดังนั้นตัวตรวจวัดต้องรู้สึกหรือติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารได้ดี จึงจะทำให้เกิดพีกและการแยกชั้นได้

4. ผลที่ได้จากตัวตรวจวัดจะต้องเหมือนกันทุกครั้งเมื่อใช้สารตัวอย่างชนิดเดียวกัน (high reproducibility)
5. ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความดันของแก๊สตัวพาหรืออุณหภูมิ และไม่เกิดปฏิกิริยาต่อแก๊สตัวพา
6. ไม่ทำลายหรือเปลี่ยนแปลงสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งมีความสำคัญมาก ถ้าต้องการเก็บสารที่แยกได้นี้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป
7. ราคาถูก

4.1.3 การทำปริมาณวิเคราะห์และการแปลผล

1. โครมาโทแกรม

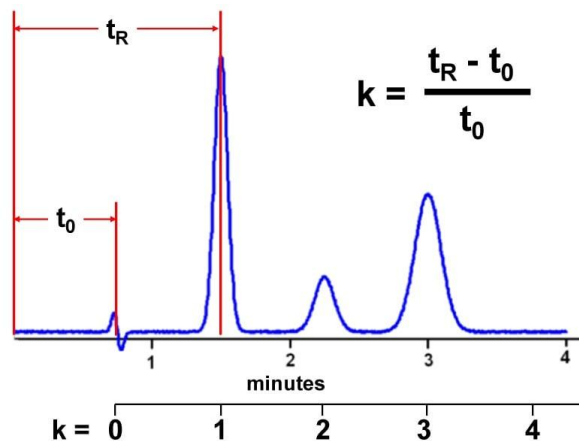
โครมาโทแกรมของ GC เป็นผลลัพธ์ที่ได้จากการแยกสารตัวอย่างในคอลัมน์ โดยแสดงผลในรูปแบบกราฟที่มีแกนนอนเป็นเวลา เรียกว่า เวลาการหน่วง (retention time, t_R) และแกนตั้งแสดง ความเข้มข้นหรือสัญญาณของสารที่ตรวจวัดได้ ลักษณะสำคัญของโครมาโทแกรม ดังภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.18 ลักษณะสำคัญของโครมาโทแกรม

คำศัพท์ของโครมาโทแกรม

- พีก (peaks) พีกแทนสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกจากกัน พีกที่ชัดเจนและแยกจากกันอย่างสมบูรณ์บ่งบอกถึงการแยกสารที่ดี โดยความสูงและพื้นที่ใต้พีกสัมพันธ์กับปริมาณสารในตัวอย่าง
- เวลาการหน่วง (retention time, t_R) คือเวลาที่ใช้ตั้งแต่การฉีดสารตัวอย่างจนกระทั่งสารแต่ละตัวถูกตรวจวัดที่ตัวตรวจวัด ซึ่ง t_R เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการระบุสาร เทียบกับเวลาที่ใช้สำหรับองค์ประกอบที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (t_0) หรือ ระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ถูกตรวจวัดโดยสารที่มีลักษณะเคมีคล้ายกันมักจะมี t_R ที่ใกล้เคียงกัน
- ตัวแปรการหน่วง (retention factor, k) เป็นค่าที่ใช้ในการอธิบายพฤติกรรมของสารตัวอย่างที่เราสนใจว่าจะใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่นานเท่าใด (t_R) เมื่อเทียบกับสารที่ถือว่าไม่ถูกหน่วงในเฟสอยู่กับที่เลย (t_0) ดังภาพที่ 4.18



ภาพที่ 4.19 ตัวแปรการหน่วง

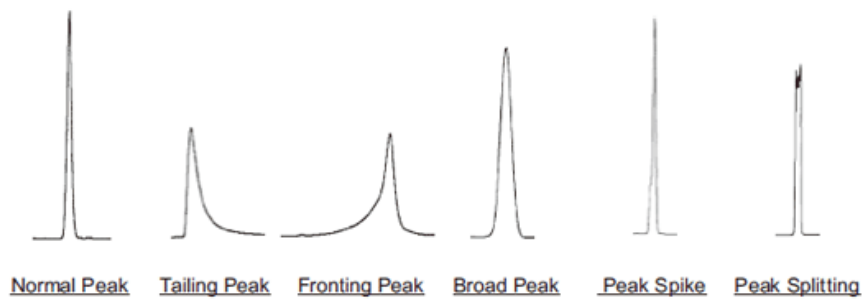
ค่า retention factor ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของเฟสอยู่กับที่ องค์ประกอบและสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ค่า pH และอุณหภูมิ เป็นต้น ค่า retention factor (k) ที่ดี ควรจะมีค่าอยู่ระหว่าง 2-10 เพราะหากค่า k มากย่อมส่งผลต่อเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่มากเกินไป และอาจส่งผลต่อรูปร่างของพีคในด้านความกว้างและความสูง โดยจะมีผลต่อค่าประสิทธิภาพของ คอลัมน์หรือสมรรถนะของวิธีการที่แสดงให้เห็นในจำนวนเพลตทางทฤษฎี (theoretical plates, N)

ถ้า $k = 0$ หมายถึง สารตัวอย่างใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่เป็นศูนย์เท่าของเวลา ที่อยู่ใน เฟสเคลื่อนที่ ซึ่งก็คือไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์เลย

ถ้า $k = 1$ หมายถึงสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่มากกว่าในเฟสเคลื่อนที่ เป็น 2 เท่าของเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ นั่นคือ t_R ของพีคที่ออกมาจะใช้เวลาเป็นสองเท่าหรือมากกว่า เช่นกัน

- dead time หรือ hold-up time (t_0) คือ ระยะเวลาที่แก๊สตัวพาใช้ในการเคลื่อนที่ ผ่านคอลัมน์โดยไม่มีการกักเก็บสารใด ๆ ในคอลัมน์ สามารถหาค่านี้ได้โดยการฉีดสารที่ไม่ถูกหน่วง หรือกักเก็บไว้ เช่น มีเทน หรืออากาศเข้าไปในระบบ และวัดเวลาในการออกมาของสารนั้น ค่า t_0 นี้ เป็นค่าพื้นฐานที่สำคัญในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC เนื่องจากช่วยในการคำนวณและปรับปรุงการ แยกสารในตัวอย่าง

- รูปร่างของพีค (peak shape) พีคที่มีรูปร่างสมมาตรและแคบบ่งบอกถึงการแยกที่มี ประสิทธิภาพและระบบที่ทำงานได้ดี พีคที่มีหาง (tailing) หรือแบน (fronting) อาจบ่งชี้ปัญหาหลักไ การแยกระหว่างสารตัวอย่างกับเฟสอยู่กับที่ หรือความผิดปกติของคอลัมน์ เป็นต้น



ภาพที่ 4.20 รูปทรงของพีก

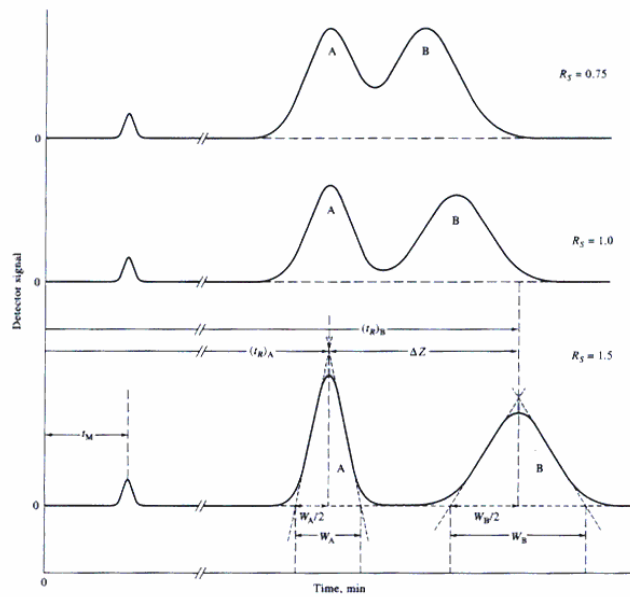
- ฐานของพีก (peak baseline) คือ เส้นฐานที่คงที่และราบเรียบเป็นสิ่งสำคัญในการวัดพื้นที่ใต้พีกและการคำนวณปริมาณสาร การสั่นหรือความไม่เสถียรของฐานพีกอาจเกิดจากสัญญาณรบกวนของตัวตรวจวัด หรือปัญหาในระบบแก๊สตัวพา

- ประสิทธิภาพการแยก (resolution, R or R_s) คือการวัดความสามารถในการแยกพีกที่อยู่ใกล้เคียงกัน ปริมาณการแยกระหว่างพีก 2 พีก คือความแตกต่างระหว่าง t_R ระหว่างพีกทั้งสอง กับผลรวมของครึ่งหนึ่งของความกว้างของพีกทั้งสอง พบว่าถ้า t_R ของพีกทั้งสองแตกต่างกันมาก การแยกจะเกิดได้ดี แต่ถ้าความกว้างของพีกมีค่ามาก การแยกเกิดขึ้นได้ไม่ดี สำหรับพีกที่สมมาตรคือมีรูปร่างเป็น normal gaussian โดยการแยกที่ดีจะมีระยะห่างระหว่างพีกที่ชัดเจน โดยไม่เกิดการทับซ้อนกันของสัญญาณ

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\left(\frac{w_1}{2} + \frac{w_2}{2} \right)} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_1 + w_2} \quad \text{.....(4.7)}$$

เมื่อ t_{R_1} และ t_{R_2} = retention time ของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
 w_1 และ w_2 = ความกว้างของฐานพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

สำหรับพีกที่สมมาตรและมีค่า $R = 1$ จะมีพื้นที่พีกที่ซ้อนกันเพียง 2% ซึ่งเพียงพอสำหรับงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ ถ้าการแยกมีค่าเท่ากับ 1.5 พีกสามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์ ลักษณะของการแยกดังแสดงในภาพที่ 4.21

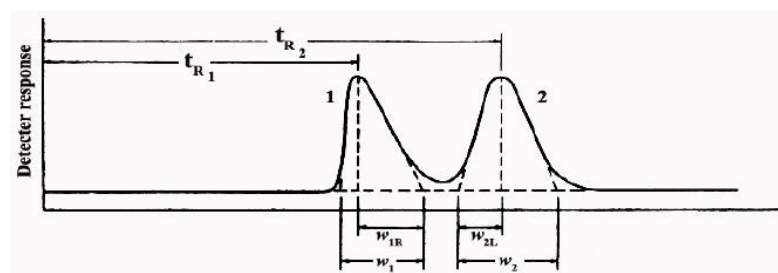


ภาพที่ 4.21 ประสิทธิภาพการแยก

แต่ในกรณีที่พีกไม่สมมาตร ควรใช้สมการ

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1R} + w_{2L}} \quad \dots(4.8)$$

สมการ 4.7 และ 4.8 สามารถใช้ค่า retention volume (V_R) แทนค่า t_R ได้ ค่า w_{1R} และ w_{2L} สามารถวัดได้จากพีกของโครมาโทแกรม ดังแสดงในภาพที่ 4.22 สำหรับหน่วยของ w_{1R} และ w_{2L} ต้องใช้ให้สอดคล้องตามค่า t_R หรือ V_R

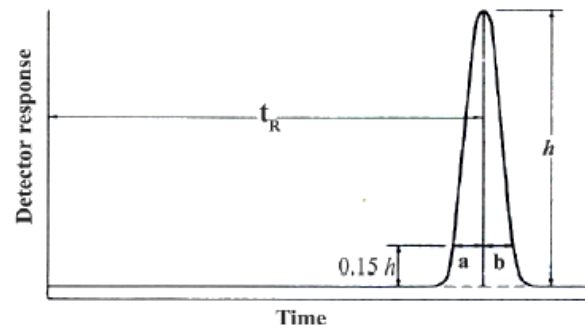


ภาพที่ 4.22 แสดงการหาค่า w_{1R} และ w_{2L} จากโครมาโทแกรมของพีกที่ไม่สมมาตร

ตามปกติพีกที่ได้จะไม่สมมาตรมีหาง (peak tailing) ดังแสดงในภาพที่ 4.22 พีกที่ 1 มีหางซึ่งจะมีผลทำให้การแยกไม่ดี การพิจารณาว่าพีกสมมาตรหรือไม่ พิจารณาได้จาก asymmetry factor (a_f)

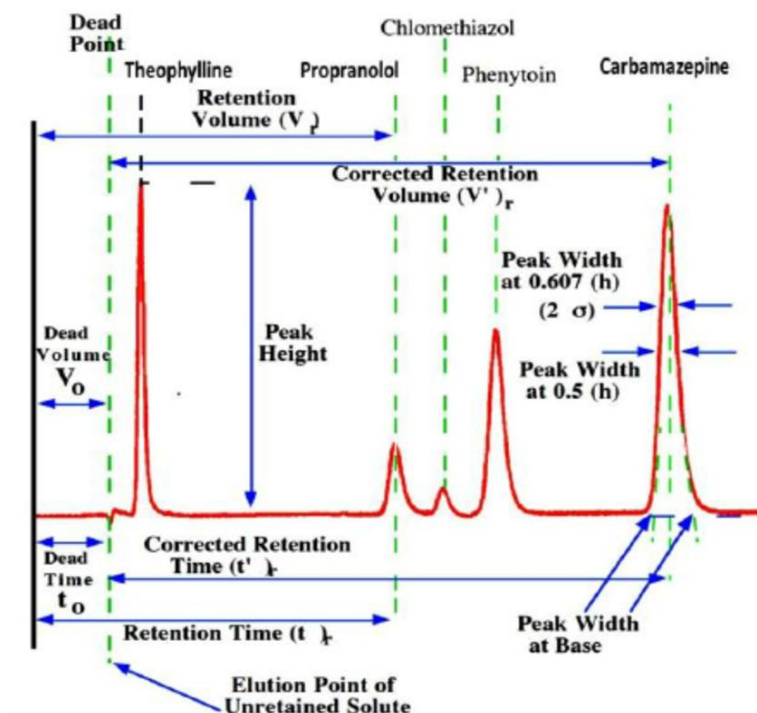
$$a_f = \frac{W_{0.15R}}{W_{0.15L}} \quad \dots\dots(4.9)$$

โดยใช้ความกว้างของพีกที่มีความสูงเท่ากับ 0.15 เท่าของความสูง (0.15h) ด้านขวาหารด้วย ด้านซ้าย ดังแสดงในภาพที่ 4.23



ภาพที่ 4.23 โครมาโทแกรมแสดงการวัดค่าความกว้างของพีกด้านซ้ายและขวาที่มีความสูง 0.15h

- ความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำในสภาวะเดียวกันควรแสดงความสอดคล้องในค่า t_R และความสูงของพีก ซึ่งเป็นการยืนยันความเสถียรของระบบ GC



ภาพที่ 4.24 องค์ประกอบของโครมาโทแกรมของ GC

2. เทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วย GC

ตัวอย่างส่วนใหญ่ไม่สามารถฉีดเข้าไปในคอลัมน์ของเครื่อง GC ได้โดยตรง ดังนั้น การเตรียมตัวอย่างจึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่สุดก่อนการวิเคราะห์สารด้วย GC ความซับซ้อนของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะความซับซ้อนของตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ในตัวอย่าง และขีดจำกัดของระดับที่ต้องการตรวจวัดโดยเครื่อง GC

การเตรียมตัวอย่างอาจเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและมีผลต่อความแม่นยำของการวิเคราะห์สาร โดยเฉพาะสำหรับสารอินทรีย์และสารอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds, VOCs) วิธีการเตรียมตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ การสกัด (extraction) การทำความสะอาดตัวอย่าง (cleanup) การทำอนุพันธ์ (derivatization) การเปลี่ยนรูปเป็นเฟสไอระเหย (transfer to vapor phase) และการเพิ่มความเข้มข้นของสาร (pre-concentration) เป็นต้น โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยังส่งผลต่อพารามิเตอร์ทางสถิติที่สำคัญของการวิเคราะห์ ได้แก่

1. ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection, LOD) ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจพบได้ที่ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด
2. ขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถวัดค่าได้อย่างมีความหมายทางปริมาณ
3. ขีดจำกัดของความเป็นเส้นตรง (limit of linearity, LOL) ขอบเขตสูงสุดของความเข้มข้นของสัญญาณตอบสนองจากเครื่องมือ
4. ช่วงไดนามิกเชิงเส้น (linear dynamic range, LDR) ช่วงของความเข้มข้นที่เครื่องมือสามารถให้การตอบสนองที่เป็นเส้นตรง

การสกัดเป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่ใช้มาแต่เดิม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารวิเคราะห์ออกจากเมทริกซ์ของตัวอย่างให้ได้ผลดีที่สุดทั้งในด้านประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจง เทคนิคการสกัดที่สำคัญ ได้แก่

1. การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (solid-phase extraction, SPE) ใช้ในการแยกสารวิเคราะห์ออกจากตัวอย่างที่เป็นของแข็ง
2. การสกัดด้วยของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction, LLE) ใช้ในการสกัดสารจากตัวอย่างที่เป็นสารละลาย

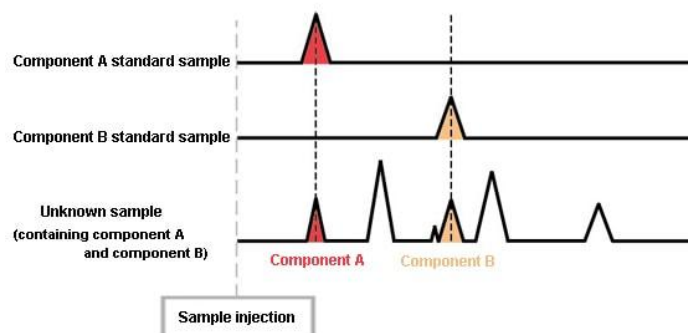
3. การประยุกต์ใช้เทคนิค GC

เทคนิค GC สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้

1) การวิเคราะห์ทางคุณภาพ

การวิเคราะห์ทางคุณภาพ (qualitative analysis) ในเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า t_R ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ทราบค่า t_R แล้ว โดยที่เงื่อนไขการทดลองต้องเหมือนกันหมด เพื่อให้การเปรียบเทียบมีความแม่นยำและเชื่อถือได้ ซึ่งหลักการนี้ใช้เพื่อยืนยันตัวตนของสารในตัวอย่างโดยอาศัยการจับคู่ค่าเวลาการเก็บรักษากับสารมาตรฐาน แต่วิธีการวิเคราะห์นี้มีข้อจำกัดที่สำคัญ หากไม่มีสารมาตรฐานที่เหมาะสมหรือทราบล่วงหน้าว่าควรใช้

สารมาตรฐานชนิดใดในการเปรียบเทียบ เราจะสามารถเดาหรือระบุได้ว่าสารตัวอย่างนั้นควรเป็นอะไร วิธีนี้จึงไม่สามารถดำเนินการได้ในกรณีที่ข้อมูลสารมาตรฐานไม่ครบถ้วนหรือไม่พร้อมใช้งาน นอกจากนี้ การรักษาสภาวะการทดลองให้คงที่ เช่น อุณหภูมิ อัตราการไหลของแก๊ส และการตั้งค่าของเครื่อง GC มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อค่า t_R การเลือกสารมาตรฐานที่เหมาะสมและการควบคุมเงื่อนไขการทดลองอย่างเข้มงวดจะช่วยให้การวิเคราะห์ทางคุณภาพสามารถยืนยันตัวตนของสารในตัวอย่างได้อย่างถูกต้องและมีความแม่นยำมากขึ้น



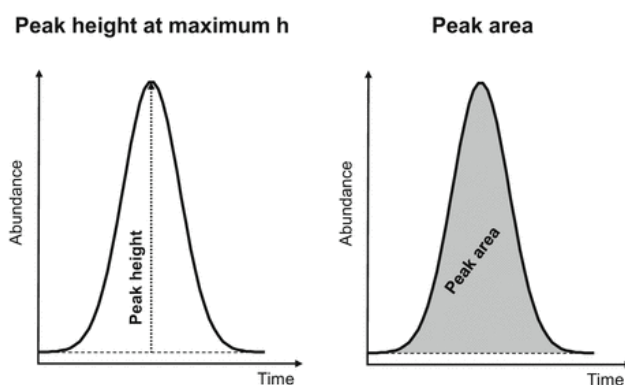
ภาพที่ 4.25 โครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างสารมาตรฐานกับสารตัวอย่าง

(ที่มาภาพ: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals/results.html>)

2) การวิเคราะห์ทางปริมาณ

การวิเคราะห์ทางปริมาณ (quantitative analysis) เพื่อคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับขนาดพีค ซึ่งสามารถวัดได้ 2 แบบ คือวัดค่าความสูงของพีคและวัดพื้นที่ใต้พีค

1. วัดค่าความสูงของพีค วัดได้จากการลากเส้นฐาน (base line) ของพีค แล้วลากเส้นตรงจากส่วนยอดตามแนวตั้งจนถึงเส้นฐาน ระยะทางของเส้นตรงจากฐานถึงส่วนยอดของพีค คือความสูงของพีค ความถูกต้องของปริมาณที่ได้ขึ้นอยู่กับความถูกต้องของการวัดความสูงของพีค ดังภาพที่ 4.26 (ก)



ภาพที่ 4.26 การวัดค่าความสูงของพีคและวัดพื้นที่ใต้พีค

2. วัดพื้นที่ใต้พีค ในเทคนิค GC การวัดพื้นที่ใต้พีคเป็นขั้นตอนสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง โดยพื้นที่ใต้พีคนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารที่ปรากฏในตัวอย่าง สามารถวัดและคำนวณได้หลายวิธี ดังนี้

- วิธีอินทิเกรต (integrator method) ตัวตรวจวัดจะประมวลผลสัญญาณและคำนวณหาพื้นที่ใต้พีคออกมาโดยอัตโนมัติ พื้นที่ใต้พีคที่ได้จะเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณสารในตัวอย่างเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน

- วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นที่ทราบแน่นอนจะถูกฉีดเข้าไปเครื่อง GC พร้อมกับสารตัวอย่าง จากโครมาโทแกรมที่ได้จะเปรียบเทียบค่า t_R และขนาดของพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกับสารตัวอย่าง

- วิธีคำนวณโดยใช้บัญญัติไตรยางศ์ ในการทดลองที่ดำเนินการภายใต้สภาวะเดียวกัน เช่น ค่าการไหลของแก๊สและอุณหภูมิที่คงที่ สามารถนำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานมาสร้างสมการไตรยางศ์เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารในตัวอย่างได้

- วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ทำการฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทราบปริมาณแน่นอนเข้าสู่เครื่อง GC บันทึกค่า t_R และขนาดของพื้นที่ใต้พีคในแต่ละระดับความเข้มข้น พล็อตกราฟโดยใช้แกนตั้งเป็นค่าพื้นที่ใต้พีคและแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เมื่อได้กราฟมาตรฐานแล้ว สามารถใช้ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์มาอ้างอิงและอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟนี้

- วิธีเติมสารมาตรฐาน (standard addition method) โดยใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างกันหลาย ๆ ขนาดเติมลงในสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นคงที่ ทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน นำโครมาโทแกรมมาวัดขนาดของพีคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น จากนั้นเขียนกราฟระหว่างขนาดของพีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน จากกราฟสามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ วิธีทำกราฟมาตรฐานและวิธีเติมสารมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิค GC จะเหมือนกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของเทคนิคการวิเคราะห์วิธีอื่น ๆ

- วิธี internal standard คือการเติมสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่ง (ซึ่งเรียกว่า internal standard) ที่มีปริมาณคงที่ลงในสารมาตรฐานตัวที่สนใจที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วนำมาทำโครมาโทแกรมหาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่พีคหรือค่าที่นับได้ของสารมาตรฐานทั้งสอง จากนั้นนำค่าอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารมาตรฐานทั้งสองมาเขียนกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานตัวที่สนใจ เมื่อนำอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (internal standard) มาเทียบกับกราฟมาตรฐานจะสามารถทราบปริมาณสารตัวอย่างได้

4.1.4 ปฏิบัติการโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส

1. ปฏิบัติการส่วนประกอบของเครื่อง GC
2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ
(คู่มือปฏิบัติการ)

สรุปท้ายบทเรียน

แก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารผสมที่สามารถระเหยได้ โดยอาศัยหลักการที่สารแต่ละชนิดมีปฏิสัมพันธ์กับเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์แตกต่างกัน ทำให้เวลาที่สารออกจากคอลัมน์ หรือเวลาการหน่วงมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ในการระบุและหาปริมาณของสารในตัวอย่าง ส่วนประกอบหลักของเครื่อง GC ประกอบด้วย ระบบฉีดสารตัวอย่าง คอลัมน์ เตาอบ ตัวตรวจวัด ระบบประมวลผล การหาปริมาณสารในตัวอย่างด้วย GC มักใช้การวัดพื้นที่ใต้พีค หรือความสูงของพีคจากโครมาโทแกรม ซึ่งจะเทียบกับสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นทราบแน่นอน วิธีการที่นิยมใช้ ได้แก่ การใช้สารมาตรฐานภายในและการสร้างกราฟมาตรฐาน เครื่อง GC สามารถใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างชนิดต่าง ๆ เช่น วิเคราะห์แก๊สธรรมชาติ สารเจือปนในแก๊สต่าง ๆ สารประกอบไนโตรเจน สารประกอบของซัลเฟอร์และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช เช่น organophosphate และ organochlorine เป็นต้น วิเคราะห์อากาศและสิ่งแวดล้อม เช่น CO, NO₂, SO₂ เป็นต้น วิเคราะห์มลพิษในน้ำและดินเช่น กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่าย (VOCs) หรือ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

วิธีการสอนและกิจกรรม

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

สื่อการสอนและอุปกรณ์การสอน

1. เอกสาร power point
2. เอกสารประกอบการสอน
3. <https://microbenotes.com/gas-chromatography>
4. https://www.glsclences.com/technique/technique_data/gc/basics_of_gc/p1_4.html
5. <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals/results.html>
6. Explain Construction and Working of Gas Chromatography.
<https://www.youtube.com/watch?v=N98gkUwzMvl>

งานที่มอบหมาย

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

การวัดผล

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

แบบฝึกหัด

1. ทำกิจกรรม
2. ใบกิจกรรม

บรรณานุกรม

1. Averill, B. A. (2012). *Principles of General Chemistry*.
<https://2012books.lardbucket.org/books/principles-of-general-chemistry-v1.0m/index.html>
2. Aryal, S. (May 6, 2024). *Gas Chromatography: Principle, Parts, Steps, Procedure, Uses*. Microbe Notes. <https://microbenotes.com/gas-chromatography>
3. *Basics of Gas Chromatography*. (n.d.).
https://www.glsciences.com/technique/technique_data/gc/basics_of_gc/p2_2.html
4. Christian, G. D., Dasgupta, P. K., & Schug, K. A. (2014). *Analytical Chemistry* (7th ed.). John Wiley & Sons.
5. *Fundamentals of Gas Chromatography*. (n.d.).
<https://www.emerson.com/documents/automation/application-note-fundamentals-of-gas-chromatography-rosemount-en-105270.pdf>
6. *Gas Chromatography*. (n.d.).
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)
7. Grob, R. L., & Barry, E. F. (2004). *Modern Practice of Gas Chromatography*. 4th ed. Wiley-Interscience
8. *Gas Chromatography Hydrogen Carrier Gas*. (n.d.)
<https://www.elementlabsolutions.com/ie/chromatography-blog/post/gas-chromatography-hydrogen-carrier-gas>
9. Harvey, D. (2019). *Analytical Chemistry 2.1*. <https://chem.libretexts.org/>

10. Harris, D. C. (2020). *Quantitative chemical analysis* (10th ed.). W. H. Freeman and Company.
11. McNair, H. M., & Miller, J. M. (2009). *Basic Gas Chromatography* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
12. Poole, C. F. (2012). *Gas chromatography* (2nd ed.). Elsevier.
13. Robinson, J. W., Frame, E. M. S, & Frame G. M. (2021). *Instrumental Analytical Chemistry*. CRC Press

หน่วยที่ 4 วิธีโครมาโทกราฟี

บทเรียน 4.2 โครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง

จุดประสงค์การสอน

1. อธิบายหลักการและส่วนประกอบของเทคนิค HPLC
2. อธิบายประสิทธิภาพการแยก
3. คำนวณการทำปริมาณวิเคราะห์และการประยุกต์
4. ปฏิบัติการโครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง

4.2.1 หลักการและส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

1. หลักการของเทคนิค HPLC

เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก ตรวจสอบ และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารผสมภายใต้สภาวะที่มีแรงดันสูง ระบบ HPLC อาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งทำให้เกิดการแยกสารแต่ละชนิดภายในตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าไป เนื่องจากสารแต่ละชนิดมีอัตราการละลายและปฏิสัมพันธ์กับเฟสทั้งสองที่แตกต่างกัน สารที่มีความเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่มักจะถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า ในขณะที่สารที่มีปฏิสัมพันธ์สูงกับเฟสอยู่กับที่มักจะใช้เวลาานกว่าในการแยกออก เมื่อสารแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์ จะถูกตรวจจับโดยตัวตรวจจับและส่งสัญญาณในรูปของสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารที่วัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกแปลงเป็นกราฟที่เรียกว่า โครมาโทแกรม (chromatogram) ซึ่งใช้ในการระบุและวิเคราะห์ปริมาณ

HPLC มีข้อได้เปรียบเหนือเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบดั้งเดิม เนื่องจากมีความเร็วและประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า สามารถใช้กับสารที่ไม่ระเหยง่าย และให้ผลลัพธ์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง HPLC มีหลายประเภทขึ้นอยู่กับกลไกการแยกสาร ได้แก่

- reverse phase HPLC (RP-HPLC) ใช้เฟสอยู่กับที่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และเฟสเคลื่อนที่มีขั้ว (polar mobile phase)
- normal phase HPLC (NP-HPLC) ใช้เฟสอยู่กับที่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic stationary phase) หรือมีขั้ว (polar stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ที่ไม่มีขั้ว (non-polar mobile phase)
- ion exchange chromatography (IEC) ใช้สำหรับแยกสารที่มีประจุ เช่น กรดอะมิโน และไอออนของโลหะ

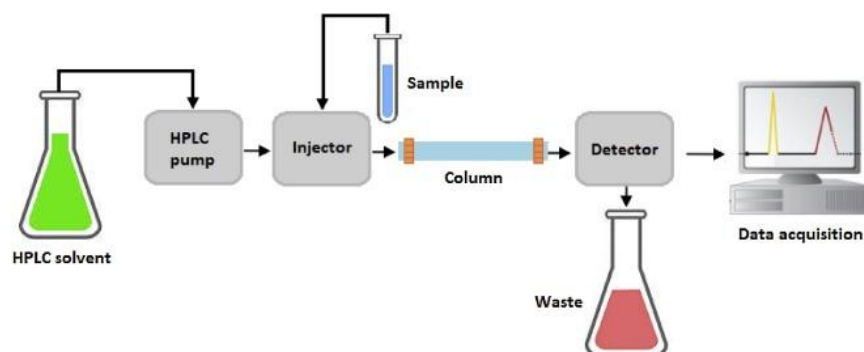
- size exclusion chromatography (SEC) แยกสารตามขนาดโมเลกุล นิยมใช้ในการวิเคราะห์โพรตีนและพอลิเมอร์
- chiral chromatography ใช้แยกสารที่มีสมบัติเชิงแสง (chiral compounds)

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบระหว่าง normal phase HPLC กับ reverse phase HPLC

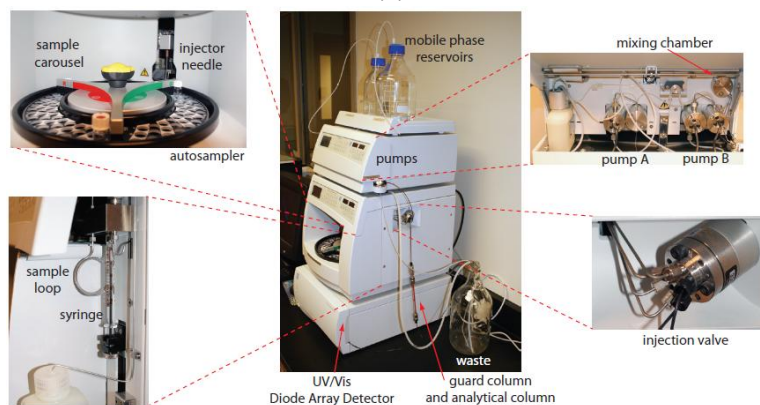
	normal phase HPLC (NP)	reverse phase HPLC (RP)
นิยาม	เฟสอยู่กับที่ที่ชอบน้ำ	เฟสอยู่กับที่ที่ไม่ชอบน้ำ
หลักการแยก	สภาพความมีขั้ว	จำนวนไฮโดรคาร์บอน
เฟสอยู่กับที่	มีขั้ว (ซิลิกา เจล)	ไม่มีขั้ว (C18, C12, C8)
เฟสเคลื่อนที่	ไม่มีขั้ว (ตัวทำละลายอินทรีย์)	มีขั้ว (น้ำ/สารอินทรีย์)
องค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่	เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน ไอโซโพรพานอล เมทานอล	น้ำ เมทานอล แอซีโตไนไตรล์ เทตระไฮโดรฟิวแรน
การเคลื่อนที่สารตัวอย่าง	สารไม่มีขั้วเคลื่อนที่ออกมาก่อน	สารมีขั้วเคลื่อนที่ออกมาก่อน

2. ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

ส่วนประกอบหลักเครื่อง HPLC ดังภาพที่ 4.27



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.27 แผนภาพองค์ประกอบของเทคนิค HPLC

1) ตัวเก็บตัวทำละลาย

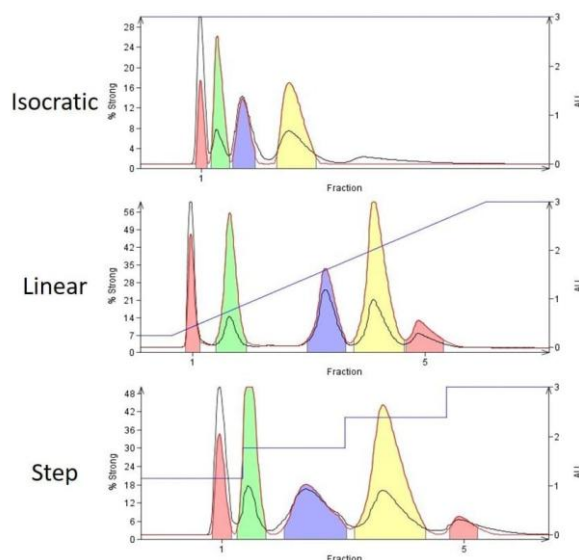
ตัวเก็บตัวทำละลาย (solvent reservoirs) เป็นภาชนะสำหรับเก็บสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในระบบ HPLC โดยภาชนะบรรจุสารละลายควรเป็นแก้วที่จะสามารถในการรักษาความบริสุทธิ์ของสารละลายตัวชะ ซึ่งประกอบด้วยสารเคมี น้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ ตามปกติควรต่อกับตัวกำจัดแก๊ส (degassing system) เพื่อดูดออกซิเจนหรือไนโตรเจนที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองแก๊สในคอลัมน์หรืออาจรบกวนตัวตรวจวัด เมื่อเตรียมสารละลายเสร็จแล้ว จำเป็นต้องกรองสารละลายผ่านเยื่อเลือกผ่าน (เมมเบรน) ที่มีรูพรุนขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ เพื่อกำจัดอนุภาคที่อาจเป็นสิ่งปนเปื้อนและส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการแยกสาร

การชะ (elution) ในเทคนิค HPLC เป็นกระบวนการที่ใช้เฟสเคลื่อนที่นำพาสารตัวอย่างผ่านคอลัมน์ที่มีเฟสอยู่กับที่ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการแยกสารผสมออกจากกัน การเลือกใช้รูปแบบการชะขึ้นอยู่กับสมบัติของสารที่ต้องการแยกและประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ โดยรูปแบบหลัก ๆ ได้แก่ isocratic elution, linear gradient elution และ stepwise gradient elution

- ระบบ isocratic elution องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดระยะเวลาของการวิเคราะห์ กล่าวคือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ การชะระบบ isocratic condition จะทำให้เวลาในการแยกนาน และสารตัวอย่างที่ถูกชะออกมาทีหลังมักจะมีหาง (tailing)

- ระบบ linear gradient elution องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง โดยมีการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ในการชะในอัตราส่วนที่เป็นเส้นตรง (linear)

- ระบบ stepwise gradient elution องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงเป็นขั้นบันได (stepwise) โดยมีการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลายในช่วงเวลาที่กำหนดในช่วงเวลาหนึ่ง ต่อจากนั้นก็ควบคุมให้คงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง แล้วก็เพิ่มขึ้นอีก แล้วควบคุมให้คงที่อีกเป็นเช่นนี้ตลอดการทดลอง



ภาพที่ 4.28 รูปแบบการชะโดยใช้ตัวทำละลาย

เฟสเคลื่อนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเทคนิค HPLC ทำหน้าที่ลำเลียงตัวอย่างจากตัวฉีดตัวอย่างไปยังตัวตรวจวัดและมีอิทธิพลต่อการแยกสารอย่างมาก โดยสมบัติของเฟสเคลื่อนที่ เช่น องค์ประกอบสารตัวชะ (elution) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และแรงไอออนิก มีผลต่อการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ การเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC อาจพิจารณาจากสมบัติดังต่อไปนี้

- มีต้นทุนที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างคุ้มค่า
- ไม่เป็นอันตราย ต่อผู้ปฏิบัติงานและอุปกรณ์
- ไม่มีปฏิกิริยากับสารตัวอย่างและเฟสอยู่กับที่ เพื่อไม่ให้เกิดการรบกวนผลการวิเคราะห์

วิเคราะห์

- สารตัวอย่างต้องสามารถละลายได้ดีในเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้การแยกมีประสิทธิภาพสูงสุด
- ตัวตรวจวัดไม่ควรตอบสนองต่อเฟสเคลื่อนที่หรือการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ โดยเฉพาะในระบบ gradient elution

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ใน HPLC สามารถแบ่งตามวิธีการแยกได้ดังนี้

1. เฟสเคลื่อนที่ใน reverse phase ในระบบ reverse phase chromatography (RPC) ซึ่งเหมาะกับการแยกสารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว จะต้องใช้เฟสอยู่กับที่ที่มีขั้วต่ำ (non-polar) ดังนั้น เฟสเคลื่อนที่มักประกอบด้วยน้ำ (water) เป็นตัวทำละลายหลัก และอาจมีตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว เช่น เมทานอล แอซีโตนไนโตรล์ หรือเตตระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran, THF) ผสมในสัดส่วนที่เหมาะสม การปรับค่า pH และการใช้สารเพิ่มประสิทธิภาพการแยก เช่น การใช้บัฟเฟอร์ควบคุมค่า pH เพื่อช่วยปรับปรุงการแยกของสารที่แตกตัวเป็นไอออน หรือการใช้สารจับคู่ไอออน (ion-pairing Reagents) เพิ่มความสามารถในการแยกสารที่มีประจุโดยเพิ่มการยึดเหนี่ยวกับเฟสอยู่กับที่

2. เฟสเคลื่อนที่ใน normal phase ในระบบ normal phase chromatography (NPC) ซึ่งเหมาะกับการแยกสารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วสูง จะต้องใช้เฟสอยู่กับที่ที่ถูกเคลือบด้วยสารที่มีขั้วสูง (polar coating) ดังนั้น เฟสเคลื่อนที่จะเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน (hexane) เฮปเทน (heptane) ไอโซออกเทน (iso-octane) ร่วมกับตัวทำละลายที่มีขั้วเล็กน้อย เช่น ไอโซโพรพานอล (isopropanol) เอทิลแอซีเตต (ethyl acetate) หรือคลอโรฟอร์ม (chloroform) ทั้งนี้เมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วในเฟสเคลื่อนที่ สารตัวอย่างที่มีขั้วจะถูกหน่วงไว้ในคอลัมน์นานขึ้น

3. เฟสเคลื่อนที่ใน ion exchange ในระบบ ion exchange chromatography (IEC) เฟสเคลื่อนที่มักเป็นสารละลายเกลือในน้ำ (aqueous salt solutions) โดยอาจเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว เช่น เมทานอล ในปริมาณที่พอเหมาะเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแยก สามารถปรับแรงของตัวทำละลายได้โดยการควบคุม ค่า pH ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นของเกลือ

4. เฟสเคลื่อนที่ใน size exclusion chromatography (SEC) ในระบบ SEC องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่มักไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการวิเคราะห์ เนื่องจากตัวตรวจวัดมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ควรพิจารณาในการเลือกเฟสเคลื่อนที่สำหรับ SEC เช่น ควรเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายสารตัวอย่างได้ดี ต้องรักษาความหนืด (viscosity) ของเฟสเคลื่อนที่ให้คงที่ ไม่ควรใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น แอซีโตน (acetone) แอลกอฮอล์ DMSO

และน้ำ หากใช้วัสดุบรรจุคอลัมน์ที่ทำจากพอลิสไตรีน และควรควบคุมแรงไอออนิกโดยเติมเกลือในปริมาณที่เหมาะสม

แนวทางปฏิบัติที่ช่วยลดปัญหาที่อาจเกิดขึ้นของการเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ และเพิ่มประสิทธิภาพการแยกโดยเทคนิค HPLC ของห้องปฏิบัติการ

- ควรใช้ตัวทำละลายและน้ำที่มีคุณภาพสูง เช่น น้ำ milli-Q grade และตัวทำละลายเกรด HPLC grade เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน
- กำจัดฟองอากาศออกจากตัวทำละลาย (degassing) ป้องกันการเกิดฟองในระบบ ซึ่งอาจรบกวนการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- วิธีการผสมตัวทำละลายต้องเหมือนกันทุกครั้ง
- การเปลี่ยนแปลงเฟสเคลื่อนที่ต้องเป็นไปอย่างค่อยเป็นค่อยไป ควรล้างระบบด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วใกล้เคียงกันก่อนเปลี่ยนไปใช้เฟสเคลื่อนที่ใหม่
- ทำความสะอาดระบบหลังใช้บัฟเฟอร์ ล้างระบบด้วยน้ำทันทีหลังจากใช้บัฟเฟอร์ เพื่อป้องกันการตกผลึกในปั๊มและท่อส่งตัวทำละลาย
- เลือกภาชนะเก็บตัวทำละลายให้เหมาะสม เช่น ไม่ควรเก็บตัวทำละลายในภาชนะพลาสติก เนื่องจากอาจเกิดการชะล้าง (leaching) ของพลาสติกไซเซอร์ ห้ามใช้ขวดแก้วกับสารละลายที่มีค่า pH > 8.0 เนื่องจากไอออนโลหะอาจละลายออกมาได้ หรือควรใช้ภาชนะเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม (stainless steel) สำหรับสารละลายที่มี pH สูง
- ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของตัวทำละลายบางชนิด ตัวทำละลายที่ไวต่อออกซิเดชัน เช่น THF และคลอโรฟอร์ม ควรเก็บในภาชนะที่มีการครอบด้วยไนโตรเจน (nitrogen cover)
- การบำรุงรักษาระบบส่งตัวทำละลาย ใช้ตัวกรองตัวทำละลาย (solvent inlet filter) ในภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ และควรทำความสะอาดท่อส่งตัวทำละลายเป็นระยะ โดยใช้การไหลย้อนกลับ (back flushing) หรือการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication)

2) ปั๊มแรงดันสูง

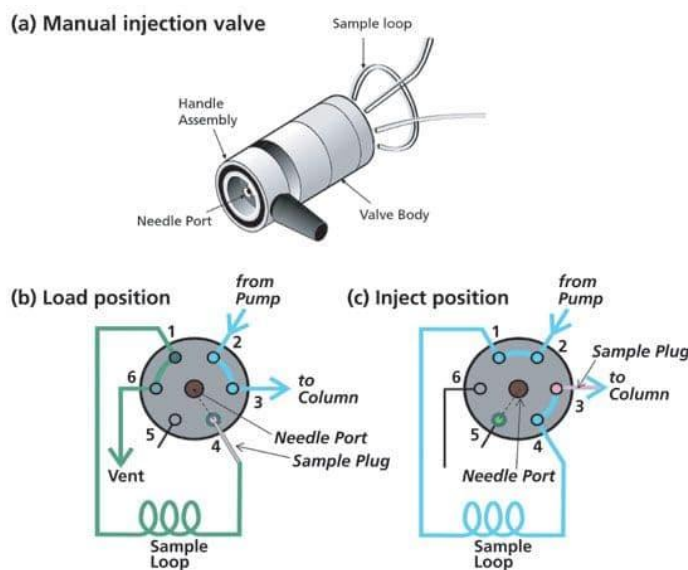
ปั๊มแรงดันสูง (high pressure pump) ทำหน้าที่ดันตัวทำละลายตัวชะจากภาชนะบรรจุเข้าสู่ระบบของเครื่องมือ เช่น ส่วนฉีดสารคอลัมน์ ตัวตรวจวัด และผ่านท่อทิ้งสารลงในขวดทิ้งสาร ปั๊มแรงดันสูงที่นิยมใช้คือ แบบควบคุมอัตราการไหลให้คงที่ (current flow) โดยก่อนเปิดใช้เครื่องมือจะต้องตรวจสอบและกำจัดฟองอากาศออกจากระบบให้หมดก่อน ซึ่งจะต้องทำก่อนต่อคอลัมน์เข้าในระบบ ในการแยกสารสามารถดำเนินการโดยใช้สารละลายตัวชะที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นตลอดการทดลอง เรียกว่า ระบบ isocratic หรือมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหรือความเข้มข้นของสารละลายตัวชะในระหว่างการทดลอง เรียกว่า ระบบ gradient โดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของสารละลายตัวชะขณะทำการทดลอง 1 ตัวอย่าง จะต้องใช้สารละลายตัวชะอย่างน้อย 2 ชนิด โดยสารละลายตัวชะที่ผสมกันจะต้องเข้ากันได้ทุกสัดส่วนที่อุณหภูมิ 25°C หากอัตราส่วนของสารละลายตัวชะในสถานะเริ่มต้นของการวิเคราะห์แตกต่างจากอัตราส่วนในสถานะสุดท้ายมาก เมื่อจบการทดลองครั้งหนึ่งแล้วต้องการเริ่มต้น วิเคราะห์รอบใหม่ควรปรับอัตราส่วนของสารละลายตัวชะเป็นค่ากลางก่อนเข้าสู่สถานะเริ่มต้น

3) 프리คอลัมน์ (precolumn)

เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มขึ้นอีก 1 อัน เรียกว่า precolumn มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งาน แต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่า เพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์นี้ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทินที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะบริสุทธิ์ขึ้น

4) ตัวฉีดตัวอย่าง

ตัวฉีดตัวอย่าง (injector) ใช้ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่กระแสของเฟสเคลื่อนที่ ระบบฉีดสารเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องมือที่ทำหน้าที่นำสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้เครื่องฉีดสารอัตโนมัติโดยควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ ระบบฉีดสารตัวอย่างได้ถูกพัฒนาขึ้นอีกเป็นแบบ sampling valve ที่ทนต่อแรงดันสูงของเฟสเคลื่อนที่ วาล์วเป็นระบบหกช่อง (six-port valve) โดยตำแหน่งที่ 1 และ 4 จะต่อกับ loop ที่ใช้บรรจุสารตัวอย่าง ตำแหน่งที่ 2 และ 3 จะต่อกับปั๊มและคอลัมน์ ตำแหน่งที่ 5 และ 6 เป็นตำแหน่งที่ไหลออกของตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ การทำงานมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนที่ เรียกว่า load ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปใน loop จนเต็ม ส่วนเกินจะไหลออกที่ตำแหน่งที่ 6 ขั้นตอนที่ 2 เป็นการฉีดมีการปรับทิศทางการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เฟสเคลื่อนที่จะพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์



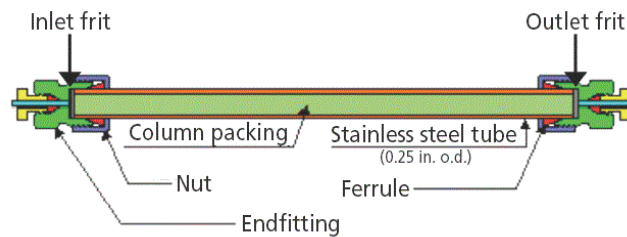
ภาพที่ 4.29 วาล์วเป็นระบบ six-port

5) คอลัมน์

คอลัมน์ในระบบ HPLC ถือเป็นส่วนสำคัญที่ทำหน้าที่แยกสารในตัวอย่าง โดยภายในคอลัมน์จะบรรจุวัสดุที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ ซึ่งเป็นหัวใจหลักในการแยกสารผสมออกจากกัน วัสดุโครงสร้างของคอลัมน์ส่วนใหญ่ผลิตจากเหล็กกล้าไม่เป็นสนิม เนื่องจากต้องการความทนทานต่อแรงดันสูง โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในอยู่ระหว่าง 2.1 - 4.6 mm และมีความยาวตั้งแต่ 30 - 300

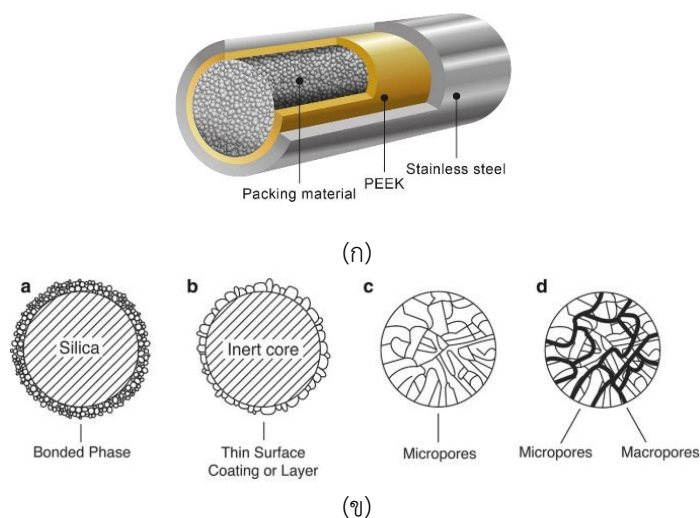
mm ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยอนุภาคซิลิกาที่มีรูพรุน ซึ่งมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 3-10 ไมครอน อนุภาคเหล่านี้อาจมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอหรือทรงกลม

ประสิทธิภาพของคอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปวัดด้วยจำนวนเพลตทางทฤษฎี (theoretical plates) อยู่ที่ประมาณ 40,000–60,000 เพลตต่อเมตร โดยสมมติว่าอัตราส่วน $V_{\max}/V_{\min}$ อยู่ที่ประมาณ 50 คอลัมน์ที่มีความยาว 25 cm และประสิทธิภาพ 50,000 plates/m จะมีจำนวน theoretical plates ทั้งสิ้นประมาณ 12,500 และมี peak capacity อยู่ที่ประมาณ 110



ภาพที่ 4.30 ลักษณะคอลัมน์ในระบบ HPLC

วัสดุบรรจุในคอลัมน์ (packing material) หรือของแข็งตัวดูดซับ (solid support) ต้องมีความแข็งแรงและทนต่อความดันสูงได้ เนื่องจากในกระบวนการแยกสารจะมีการไหลของเฟสเคลื่อนที่ด้วยแรงดันสูง รูปร่างของอนุภาคที่ใช้ในคอลัมน์สามารถเป็นทรงกลม (spherical) หรือมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน (amorphous) ก็ได้ โดยอนุภาคเหล่านี้มีขนาดอนุภาค รูพรุนและพื้นที่ผิวที่แตกต่างกันเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารกับเฟสอยู่กับที่ นอกจากนี้ ยังมีการใช้อนุภาคไมโครพอลิเมอร์ (porous polymer microparticles) โดยเฉพาะในระบบ reverse phase ซึ่งอนุภาคพอลิเมอร์มีความสามารถในการรองรับช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างของเฟสเคลื่อนที่ได้กว้าง (pH 1 ถึง 13) ในขณะที่อนุภาคซิลิกามีช่วงค่าที่จำกัดอยู่ที่ประมาณ pH 2.5 ถึง 7



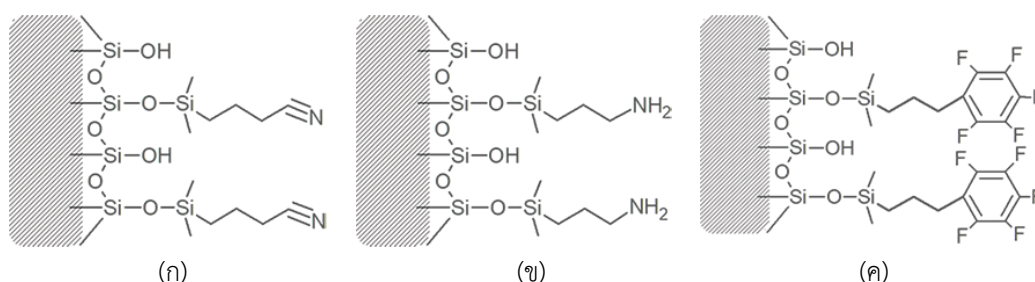
ภาพที่ 4.31 วัสดุบรรจุในคอลัมน์ (packing material)

ของแข็งตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน HPLC คือ ซิลิกาและอะลูมินา การเลือกใช้สามารถจัดแบ่งตามประเภทของสารที่นำมาวิเคราะห์ ดังนี้

- ถ้าเป็นสารประเภทกรด (acidic compound) ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
- ถ้าเป็นสารที่เป็นเบสเล็กน้อย pK_b น้อยกว่า 5 ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ
- โมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว เช่น Olefinic และ aromatic ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
- สารที่มีกลุ่มแฮโลเจน ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
- สารที่ไวต่อกรด ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ
- สารที่ไวต่อเบส ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ

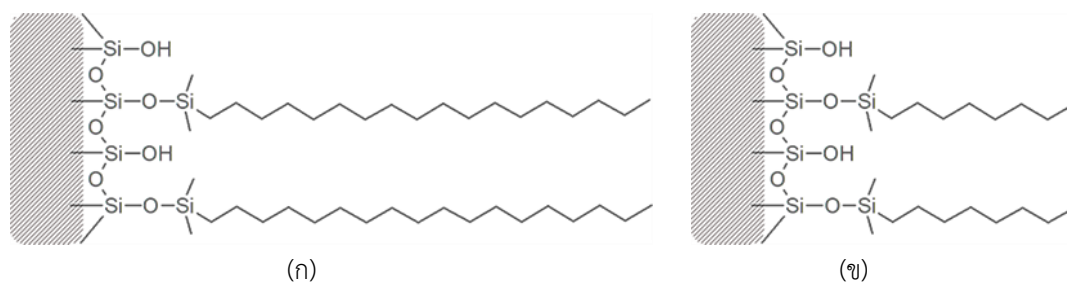
เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ของคอลัมน์ที่มีบทบาทสำคัญในการแยกสาร โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 แบบหลัก คือ

- Normal phase คือ เฟสอยู่กับที่ในระบบ normal phase มีสภาพความเป็นขั้วสูง ซึ่งเตรียมโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นของแข็งตัวดูดซับ การเตรียมเฟสอยู่กับที่ทำได้โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างหมู่ฟังก์ชันของสารอินทรีย์ (ทั้งที่มีขั้วและไม่ขั้ว) กับหมู่ไฮดรอกซิล (Si-OH) บนพื้นผิวของซิลิกาเจล สารอินทรีย์ที่นิยมใช้ในระบบการนี้จะเป็นสารที่มีหมู่ฟังก์ชันขั้ว เช่น cyano-propyl, amino-propyl และ pentafluorophenyl propyl ซึ่งช่วยให้เฟสอยู่กับที่ที่มีความขั้วสูงกว่าตัวทำละลาย (เฟสเคลื่อนที่) ที่มักจะเป็นตัวทำละลายที่มีความขั้วต่ำ เช่น เฮกเซนหรือคลอโรฟอร์ม



ภาพที่ 4.32 โครงสร้างทางเคมีของคอลัมน์ระบบ Normal Phase (ก) cyano-propyl (ข) amino-propyl และ (ค) pentafluorophenyl propyl

- Reverse phase คือ ระบบ reverse phase เฟสอยู่กับที่将有สภาพขั้วต่ำ โดยกระบวนการเตรียมจะใช้สารเคมีอินทรีย์ที่มีสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง เช่น octadecyl (C18), octyl (C8) หรือ aromatic phenyl เมื่อเฟสอยู่กับที่ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง (ไม่ชอบน้ำ) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในระบบนี้จะเป็นสารละลายที่มีความขั้วสูงกว่า เช่น น้ำหรือสารละลายผสมน้ำกับสารละลายอินทรีย์ เพื่อให้เกิดการแยกสารตามความแตกต่างในความชอบของสารต่อขั้วของเฟสทั้งสอง



ภาพที่ 4.33 โครงสร้างทางเคมีของคอลัมน์ระบบ Reverse Phase (ก) octadecyl (C18) และ (ข) octyl (C8)

ตารางที่ 4.7 เฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ในระบบ NP และ RP

Mode	Stationary phases	Mobile phases
Normal phase	1. Cyano propyl bonded with siloxane 2. Amino bonded with siloxane 3. Silica gel with siloxane 4. Diol bonded with siloxane 5. Di methyl amino bonded with siloxane	1. n-Hexane 2. n-Heptane 3. Iso-octane 4. Methylene chloride 5. Ethyl acetate 6. Propylamine 7. Dichloromethane 8. Diethyl ether
Reverse phase	1. Octadecyl (C18) 2. Octyl (C8) 3. Butyl (C4) 4. C3 5. Phenyl	Mixture of water (buffer) and 1. Acetonitrile 2. Methanol 3. Acetone 4. Tetrahydrofuran 5. 2-propanol.

6) ส่วนควบคุมอุณหภูมิ

ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (temperature control) การทำ HPLC ปกติทั่วไปนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น ส่วนควบคุมอุณหภูมิอาจใช้เป็นถังน้ำหุ้มคอลัมน์ไว้ (water jacketed) เพื่อให้อุณหภูมิคงที่ แต่ถ้าต้องการให้เวลาการหน่วง (t_R) ของสารตัวอย่างให้สั้นลง อาจเพิ่มอุณหภูมิให้แก่คอลัมน์ ลักษณะเช่นเดียวกับแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้เตาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

7) ตัวตรวจวัด

ตัวตรวจวัด (detector) ตรวจจับและแปลงสัญญาณของสารที่แยกออกมาเป็นสัญญาณไฟฟ้า เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณจากการวัดตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสัญญาณจากการวัดสารละลายตัวชะ ชนิดของตัวตรวจวัดที่ใช้ขึ้นอยู่กับลักษณะของสารที่วิเคราะห์ เช่น UV-Vis วัดการดูดกลืนแสงในย่านอัลตราไวโอเลตและแสงที่ตามองเห็น ตัวตรวจวัดการเรืองแสง (fluorescence) ตรวจจับสารที่มีการเรืองแสง ตัวตรวจวัด refractive index ใช้กับสารที่ไม่มีการดูดกลืนแสงในย่าน UV-Vis และ mass spectrometry (MS) ใช้ร่วมกับ HPLC เพื่อระบุโครงสร้างของสารที่ตรวจวัด

7.1) ตัวตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล (ยูวี) เป็นตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุด โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในย่านยูวีและวิสิเบิล (ย่านความยาวคลื่น 190-600 nm) สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในย่านดังกล่าวข้างต้นได้ สารละลายตัวเซที่ ใช้จะต้องไม่ดูดกลืนแสงในย่านความยาวคลื่นที่วิเคราะห์หลักการทำงานใช้กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต ตัวตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลตวิสิเบิล สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้

1) Fixed-wavelength detectors เป็นตัวตรวจวัดที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในบางย่าน

2) Variable-wavelength detectors เป็นตัวตรวจวัดที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการ

3) Diode array detectors เป็นตัวตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร โดยสามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน วัดได้ตั้งแต่ 190-850 nm ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง (reverse optics) คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่านไปยัง flow cell แล้วผ่านไปยัง monochromator คือ slit และ grating เมื่อแสงตกกระทบบน rating แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของ diode array ตรวจวัด สัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม สารตัวอย่างที่เหมาะสมกับตัวตรวจวัดต้องเป็นตัวอย่างที่สามารถดูดกลืนแสงได้

7.2 ตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ เป็นตัวตรวจวัดที่วัดความวาวแสงของสารเมื่อถูกกระตุ้นด้วยรังสี UV มีความไวในการตรวจวัดสูงกว่าตัววัดแสง UV ประมาณ 1,000 เท่า แหล่งกำเนิดแสง สำหรับลำแสงกระตุ้นเป็นไอปรอทและหลอดซีนอนความดันสูง

7.3 ตัวตรวจวัดชนิดอิเล็กโทรเคมีคัล เป็นตัวตรวจวัดที่อาศัยค่าทางเคมีไฟฟ้าของสารที่ถูกแยกออกจากคอลัมน์ ได้แก่ แอมเพอโรเมตริ์ คูลอมเมตริ์ โวลแทมเมตริ์ และการนำไฟฟ้า ใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ปริมาณน้อยในน้ำและของเหลว

ตารางที่ 4.8 ตัวตรวจวัดในเทคนิค HPLC

Detector Basis	Type ^b	Maximum Sensitivity ^c	Flow Rate Sensitive	Temperature Sensitivity	Useful with Gradient ?	Available Commercially ?
UV absorption	S	5×10^{-10}	No	Low	Yes	Yes
IR absorption	S	10^{-6}	No	Low	Yes	Yes
Fluorometry	S	10^{-10}	No	Low	Yes	Yes
Refractive index	G	5×10^{-7}	No	$\pm 10^{-4}^{\circ}\text{C}$	No	Yes
Conductometric	S	10^{-8}	Yes	$\pm 1^{\circ}\text{C}$	No	Yes
Moving wire	G	10^{-8}	Yes	None	Yes	Yes
Mass spectrometry	S	10^{-10}	No	None	—	Yes
Polarography	S	10^{-10}	Yes	$\pm 1^{\circ}\text{C}$	—	No
Radioactivity	S	—	No	None	Yes	No

^aMost of these data were taken from: L., R. Snyder and J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York: Wiley-Interscience, 1964, p. 162.

^bG = general; S = selective

^cSensitivity for a favorable sample in grams per milliliter.

8) ระบบประมวลผลและบันทึกผล

ระบบประมวลผลและบันทึกผล ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของอุปกรณ์ภายในเครื่องทั้งหมด รวมถึงการจัดการข้อมูลจากตัวตรวจวัด หลังจากที่ได้รวบรวมสัญญาณจากสารในตัวอย่าง ระบบนี้จะแปลงสัญญาณดังกล่าวให้อยู่ในรูปแบบของโครมาโทแกรม ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณและเวลา โครมาโทแกรมประกอบด้วยสองส่วนหลัก คือ

- เส้นฐาน (baseline) เป็นเส้นที่แสดงระดับสัญญาณพื้นฐานของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งแสดงถึงความคงที่และความบริสุทธิ์ของตัวทำละลาย หากเส้นฐานมีความผันผวนหรือไม่สม่ำเสมอ อาจบ่งบอกถึงปัญหาของระบบ เช่น การปนเปื้อนหรือการมีฟองอากาศในตัวทำละลาย
- พีค (peak) เป็นส่วนที่แสดงถึงการตรวจจับสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง เมื่อสารที่แยกออกจากคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจวัด สัญญาณจะเกิดขึ้นในรูปของพิกยอดแหลม ซึ่งความสูงและรูปร่างของพีคจะสัมพันธ์กับปริมาณและลักษณะของสารที่ตรวจวัด

นอกจากนี้ การกำหนดรีเทนชันไทม์ (t_R) เป็นหนึ่งในสมบัติที่สำคัญของโครมาโทแกรม โดย t_R หมายถึง เวลาที่ผ่านไปตั้งแต่เริ่มฉีดตัวอย่างจนกระทั่งสารถึงจุดสูงสุดของพีค ค่านี้มีความสำคัญในงานวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพราะใช้ในการระบุสารที่ถูกแยกออกจากกันในตัวอย่าง แต่ละสารจะมี t_R เฉพาะตัวภายใต้เงื่อนไขการวิเคราะห์ที่กำหนด

ความสูงของพีคยังเป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง ทำให้สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ โดยการเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ระบบประมวลผลและบันทึกผลจึงไม่เพียงแต่แสดงผลในรูปแบบโครมาโทแกรมเท่านั้น แต่ยังสามารถในการคำนวณพื้นที่ใต้พีค (peak area) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญในการประเมินปริมาณของสารในตัวอย่าง

9) ขวดทิ้งสาร

ขวดทิ้งสาร (waste bottle) ใช้รองรับของเสียที่ออกมาจากส่วนของตัวตรวจวัดแล้ว ต้องคอยระวังอย่าให้ของเสียล้นขวดทิ้งสาร เพราะอาจทำให้มีสัญญาณรบกวน (noise) ที่สูงได้

4.2.2 ประสิทธิภาพการแยก

ประสิทธิภาพการแยกของพีคในเทคนิคโครมาโทกราฟี คือ ตัวชี้วัดการกระจายตัวของแถบสารที่สนใจ ขณะที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์จนกระทั่งถึงระบบตรวจวัดในเครื่อง HPLC ซึ่งในอุดมคติแล้วนั้น พีคโครมาโทกราฟีควรมีลักษณะเป็นเส้นบางคมคล้ายเส้นดินสอ ในความเป็นจริง ผลจากกระบวนการกระจายตัว (dispersion effects) ทำให้พีคมีรูปร่างโค้งมนและแผ่กว้างออกกลายเป็นรูปร่างแบบ Gaussian

1. พารามิเตอร์บ่งชี้ประสิทธิภาพของเทคนิค HPLC

1) theoretical plate (N) เป็นค่าที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ ค่า N มากแสดงถึงประสิทธิภาพในการแยกดี

2) capacity factor (k') เป็นค่าที่แสดงว่าสารถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด

3) tailing factor (T) เป็นค่าที่บอกถึงลักษณะพีกของสารว่ามีความสมมาตรมากน้อยเพียงใด

4) resolution (R_s) เป็นค่าที่แสดงว่าพีกของสารสองพีกที่อยู่ติดกัน แยกออกจากกันมากน้อยเพียงใด

เกณฑ์การยอมรับค่าพารามิเตอร์พื้นฐานเพื่อแสดงประสิทธิภาพการแยกของระบบตามมาตรฐาน USFDA guideline ดังแสดงในตาราง 4.9

ตารางที่ 4.9 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์

Parameter	US FDA guideline
N	>2000
k'	>2
T	≤2
R_s	>2

2. ขั้นตอนการแยกสารด้วย reverse phase HPLC

ลำดับการแยกสารด้วย reverse phase HPLC สรุปเป็นขั้นตอน ดังนี้

1) เลือกเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ สำหรับการแยกให้เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไป คอลัมน์ที่เป็น C18 (reverse phase) ชนิด silica end-caped (type B) ควรเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำกับแอซีโตไนไตรล์ เนื่องจากแอซีโตไนไตรล์มีค่าการดูดกลืนแสงยูวีและความหนืดต่ำทำให้ สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำถึง 220 nm ได้ หรือเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำกับบัฟเฟอร์ที่ pH ค่อนข้างเป็นกรด เพื่อลดการแตกตัวของหมู่ซิลานอล (silanol group) ของเฟสอยู่กับที่

ตารางที่ 4.10 ขั้นตอนและเงื่อนไขการแยกด้วย reverse-phase HPLC

Separation variable	Preferred Initial Choice
Column	
dimensions	150 mm x 4.6 mm
particle size	5 μ m
stationary phase	C8 or C18
Mobile phase	
solvents A-B	water-acetonitrile (for neutral samples)
%B solvent	variable
buffer	25 mM phosphate buffer pH 2.5 or 0.1% trifluoroacetic acid or formic acid
flow rate	1-2 mL/min
temperature	35°C

2) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยก การที่บอกถึงประสิทธิภาพการแยก (resolution) พิจารณาได้จากสมการ

$$R_s = 0.25 \sqrt{N} (\alpha - 1) \left(\frac{k}{k+1} \right) \quad \dots\dots(4.10)$$

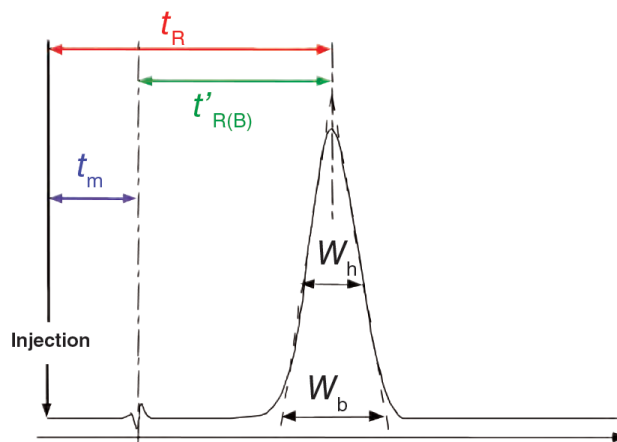
i ii iii

จากสมการ 4.10 จะพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยก จะแบ่งเป็น 3 พารามิเตอร์ คือ

ส่วน i คือ จำนวนเพลตของคอลัมน์ (plate number, N) เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้บ่งชี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยสะท้อนถึงคุณภาพของการบรรจุสารในคอลัมน์และความสามารถในการแยกสารอย่างมีประสิทธิภาพของคอลัมน์ (efficiency)

ค่า N นี้คำนวณได้จากโครมาโทแกรม โดยพิจารณาจากความกว้างของพีก (peak width) เปรียบเทียบกับเวลา t_R ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ กล่าวคือ พีกที่แคบและชัดเจนจะบ่งบอกว่าคอลัมน์มีจำนวนเพลตสูงและมีการแยกที่ดี ในทางตรงกันข้าม หากพีกกว้างแสดงว่าการแยกไม่ดีและจำนวนเพลตต่ำ

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$



ภาพที่ 4.34 การหาจำนวนเพลตของคอลัมน์

ค่า N ที่มากแสดงถึงการกระจายตัวของสารน้อย และเป็นตัวบ่งชี้ว่าเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูง

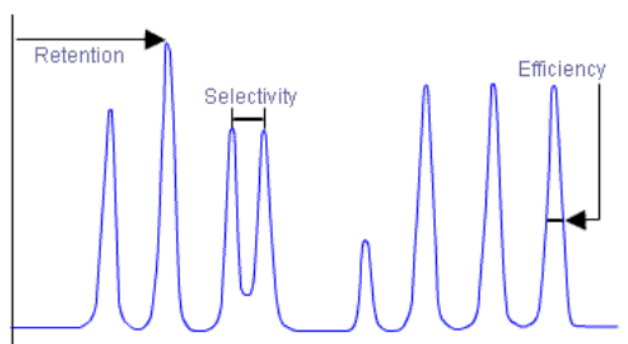
ส่วน ii คือ สมรรถนะการเลือก (selectivity factor, α) เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้บ่งบอกประสิทธิภาพของการแยกสารสองชนิดที่มีพีกอยู่ใกล้กัน โดยคำนวณจากอัตราส่วนของค่า retention factor (k) ของสารที่มีเวลาการหน่วงมากกว่ากับสารที่มีค่าน้อยกว่า ($\alpha = k_2/k_1$ เมื่อ $k_2 > k_1$) โดยไม่พิจารณาความกว้างของพีก คำนี้อสะท้อนถึงความแตกต่างในการจับของสารกับเฟสอยู่กับที่

หรือ relative partition coefficient ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการแยกสารที่มีสมบัติใกล้เคียงกันได้ดี โดยทั่วไป ค่า α ที่มากกว่า 1 เป็นเงื่อนไขพื้นฐานของการแยกที่เกิดขึ้นจริง และค่าที่เหมาะสมสำหรับการแยกที่มีประสิทธิภาพควรอยู่ระหว่าง 1.5–4.0 ทั้งนี้ ค่าดังกล่าวขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ลักษณะและพื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการแยก

ส่วน iii คือ แฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, k') หรือ พารามิเตอร์ตัวแปรการหน่วง (retention factor) ซึ่งจะเป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างหน่วงอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก ค่า k' นี้หาได้จาก corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ (t_R) หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ (t_0) ดังสมการ

$$k = \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$$

ค่า k เป็นตัวบ่งชี้ระยะเวลาที่สารถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ก่อนจะถูกชะออกมา และมีความสัมพันธ์กับลักษณะของพีค เช่น ความกว้าง ความสูง และความง่ายในการตรวจวัด โดยปกติค่า k ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 2–5 เพื่อให้การแยกสารมีประสิทธิภาพและใช้เวลาไม่มาก สำหรับสารที่มีความซับซ้อนสามารถยอมรับค่า k ในช่วง 1–16 ได้ โดยควรตรวจสอบอย่างน้อยหนึ่งพีค เช่น พีคแรก เพื่อให้มั่นใจว่าสารที่ต้องการถูกแยกออกจากตัวทำละลายหรือสิ่งเจือปนที่มักจะถูกชะออกในช่วงเวลาใกล้ t_0 ซึ่งเป็นเวลาที่ตัวทำละลายออกจากคอลัมน์ การมีค่า k สูงเกิน 10–15 ไม่เป็นที่แนะนำ เพราะจะทำให้พีคกว้างขึ้น ใช้เวลานาน และลดความสามารถในการแยกสาร อีกทั้งปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อค่า k ได้แก่ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ชนิดของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของระบบ ดังนั้น การควบคุมค่า k ให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกสารใน HPLC ทั้งในด้านความแม่นยำ ความรวดเร็ว และประสิทธิภาพการแยกของผลการวิเคราะห์

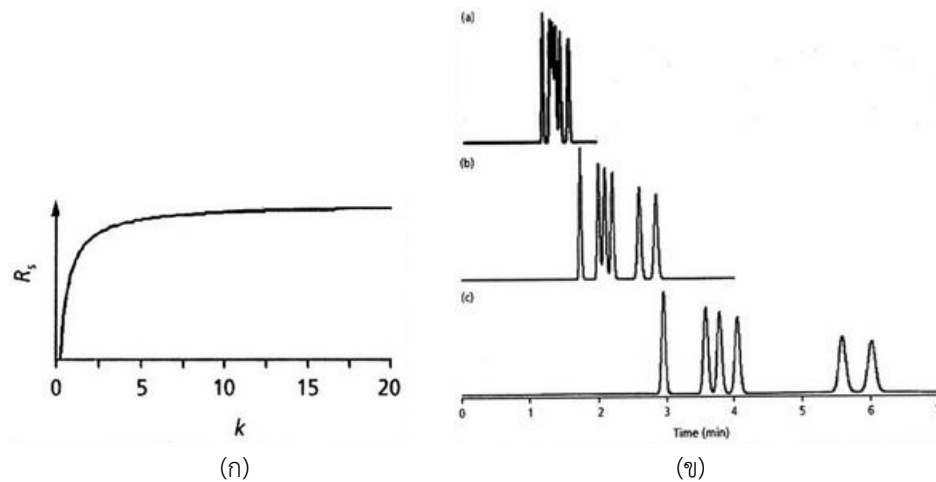


ภาพที่ 4.35 แผนภาพโครมาโทแกรมแสดงตัวแปรของประสิทธิภาพการแยก

3) การปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่

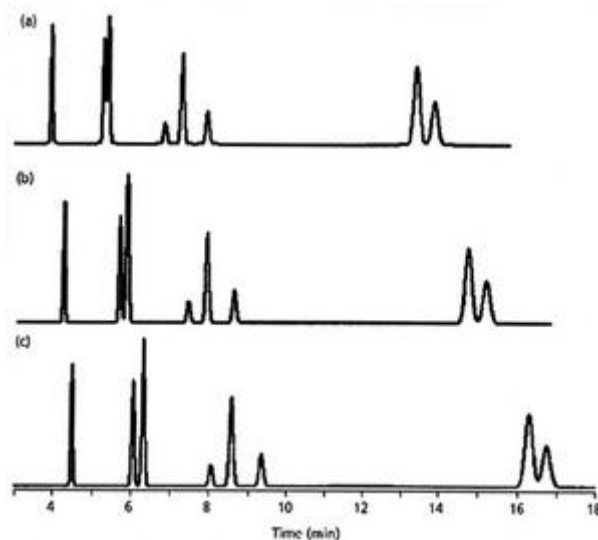
3.1) การปรับความแรงตัวทำละลาย (solvent strength) เริ่มต้นการแยกสารด้วยสิ่งที่ทำได้ง่ายที่สุดก่อน นั่นคือ การปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ ตามส่วน iii ของสมการที่ 4.10 ถ้าสร้างกราฟระหว่าง k กับ R_s จะได้กราฟตามภาพที่ 4.35(ก) นั่นคือ R_s จะดีเมื่อ retention หรือ capacity

factor อยู่ในช่วง $2 < k < 20$ ซึ่งในทางปฏิบัติจะค่อย ๆ ลดความแรงของตัวทำละลาย B (organic solvent) ลงทีละ 10% จาก 90% เป็น 80% และ 70% ตามลำดับ จน t_R ของทุกพีคอยู่ในช่วง $2 < k < 20$ ตามภาพที่ 4.35(ข)



ภาพที่ 4.36 ผลของการปรับความแรงตัวทำละลาย (ก) ความสัมพันธ์ระหว่าง R_s กับ k' และ (ข) ผลของการลดความแรงของตัวทำละลาย B (a) 80%, (b) 70%, (c) 60%

3.2) การปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย B อย่างละเอียด (fine tuning) อีกครั้ง เพื่อให้ได้ $R_s > 1.5$ ดังภาพที่ 4.36



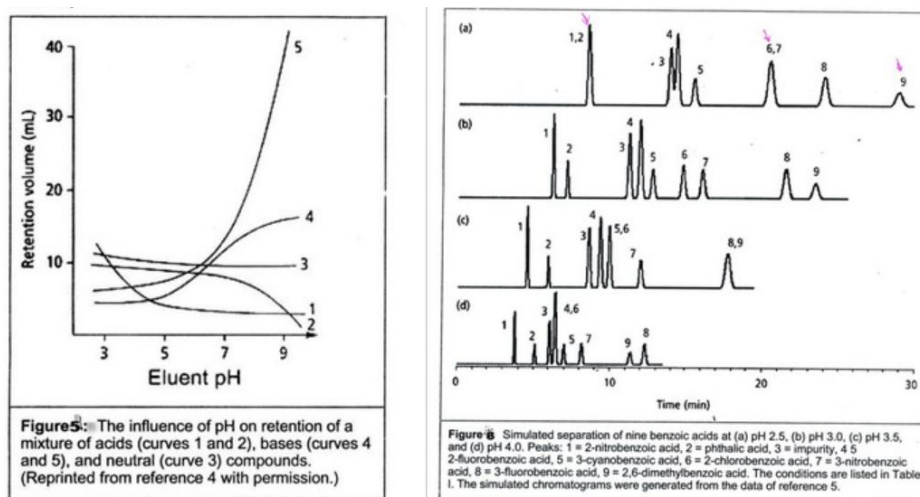
ภาพที่ 4.37 การปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย B อย่างละเอียด (a) 48%, (b) 47% และ (c) 46%

3.3) การเปลี่ยนชนิดเฟสเคลื่อนที่ การปรับ solvent strength เพียงอย่างเดียว อาจจะแยกสารได้มาก แต่สารบางชนิดแม้จะลองปรับความเข้มข้นของ acetonitrile (ACN) ทุกความ

เข้มข้นแล้ว การแยกชั้ดก็ยังไม่ดี จะต้องเปลี่ยนชนิดของเฟสเคลื่อนที่ ตามส่วน ii ของสมการที่ (4.10) จาก acetonitrile เป็น methanol (MeOH) แล้วทำ fine tuning อีกครั้ง แต่ถ้าการแยกชั้ดยังไม่น่าพอใจอีก ก็ต้องเปลี่ยนชนิดของเฟสเคลื่อนที่อีกครั้งเป็น tetrahydrofuran (THF)

3.4) การใช้สารอินทรีย์เป็นเฟสเคลื่อนที่ (organic mobile phase) สองชนิดผสมกัน ถ้าใช้ทั้ง acetonitrile, MeOH และ THF แล้วแต่การแยกชั้ดก็ยังไม่ดี ให้ใช้ solvent ผสม

4) ความเป็นกรด-เบสของเฟสเคลื่อนที่ (pH) สำหรับตัวอย่างที่สามารถแตกตัวได้แนะนำให้ใช้ 0.025 M phosphate buffer pH 2.5 ซึ่งจะช่วยลดการแตกตัวของสารที่เป็นกรดและหมู่ซัลโฟนอลของเฟสอยู่กับที่ ทำให้การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเฟสอยู่กับที่กับสารที่เป็นกรดหรือเบสน้อยลง การเกิด peak tailing ก็น้อยลงด้วย



ภาพที่ 4.38 อิทธิพลของความเป็นกรด-เบสของเฟสเคลื่อนที่ (pH)

จะเห็นว่า เมื่อ pH ของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยน เวลาการหน่วงของสารที่เป็นกรด (เส้น 1, 2) และสารที่เป็นเบส (เส้น 3, 4) จะเปลี่ยนอย่างมาก ดังนั้น การปรับ selectivity ของสารประเภทที่แตกตัวได้ โดยการปรับ pH จะมีผลอย่างมาก ซึ่งการปรับ pH ของเฟสเคลื่อนที่ จะต้องให้ความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ (%B) คงที่ และโดยการค่อย ๆ ปรับ pH เพิ่มขึ้นทีละ 0.5-1 เพราะการเปลี่ยน pH เพียงเล็กน้อย จะทำให้ทั้ง retention และลำดับของ peak เปลี่ยนไปมาก ดังภาพที่ 4.37 (ข)

5) อุณหภูมิของคอลัมน์ (column temperature) โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์จะทำให้ t_R เปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งจะมีผลต่อสารตัวอย่างที่มีความแรงทางประจุ (ionic strength) มากกว่าสารตัวอย่างที่เป็นกลาง โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 1°C จะทำให้ t_R เปลี่ยนไป 1-3% ดังนั้น การปรับอุณหภูมิจะมีผลต่อ selectivity เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

6) การคัดเลือกคอลัมน์ (column selection) การปรับ selectivity โดยการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์เป็นวิธีที่ไม่สะดวกนัก และมีราคาแพงกว่าการเปลี่ยนชนิดของเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นจะใช้วิธีนี้เมื่อการปรับด้วยปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วก็ยังไม่ทำให้การแยกดีขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ คือ การเปลี่ยนชนิดของเฟสอยู่กับที่จาก C8 หรือ C18 เป็น cyano column และ phenyl column

ซึ่งจะมีผลต่อ selectivity และลำดับการถูกชะออกจากคอลัมน์ (peak spacing) ทำให้ไม่สามารถทำนายการเปลี่ยน selectivity จากคอลัมน์หนึ่งไปอีกคอลัมน์หนึ่งได้

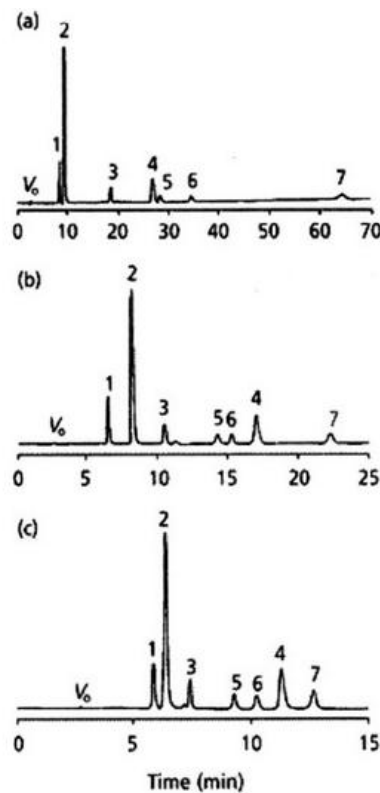


Figure 7: Separation of a substituted benzoic acid sample using 250 mm X 4.6 mm (a) C8, (b) phenyl, and (c) cyano columns. Mobile phase: (a) 25% methanol-buffer, (b) 35% methanol-buffer, (c) 35% methanol-buffer. Peaks: 1 = phthalic acid, 2 = 2-nitrobenzoic acid, 3 = 2-fluorobenzoic acid, 4 = 3-nitrobenzoic acid, 5 = 2-chlorobenzoic acid, 6 = 3-fluorobenzoic acid, 7 = *m*-toluic acid. (Reprinted from reference 6 with permission.)

ภาพที่ 4.39 ผลการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์

7. การเปลี่ยนสมบัติทางกายภาพของคอลัมน์ การปรับ selectivity โดยการปรับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ pH อุณหภูมิ และชนิดของคอลัมน์แล้ว ทำให้การแยกโดยรวมและ peak spacing เป็นที่น่าพอใจ แต่ยังมีพีกบางคู่ที่ยังแยกได้ไม่สมบูรณ์ ($R_s < 1.5$) การปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของตัวคอลัมน์ ตามส่วน i ของสมการ (4.10) จะช่วยให้การแยกดีขึ้น โดยเริ่มปรับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ก่อน จากนั้นจึงปรับขนาดของคอลัมน์ โดยการเพิ่มความยาวคอลัมน์ และสุดท้ายจึงลดขนาดของวัสดุรองรับจาก 5 mm เป็น 3 mm แต่การเพิ่มความยาวและลดขนาดของวัสดุรองรับลงจะมีผลต่อความดันและระยะเวลาในการแยก

8) การเปลี่ยนระบบเฟสเคลื่อนที่แบบ isocratic มาใช้แบบ gradient

4.2.3 การทำปริมาณวิเคราะห์และการประยุกต์

1) การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

เทคนิค HPLC เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกสารในตัวอย่าง โดยทั่วไปแล้ว HPLC ไม่ได้ถูกนำมาใช้เป็นวิธีหลักในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่จะใช้เพื่อยืนยันชนิดของสารที่อาศัยการเปรียบเทียบกับลักษณะของพีกที่ได้จากโครมาโทแกรม สามารถทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1. การเปรียบเทียบค่า t_R กับสารมาตรฐาน เป็นวิธีที่ง่ายและมีความแม่นยำในการยืนยันตัวตนของสาร โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะถูกวิเคราะห์ภายใต้สภาวะการทดสอบที่เหมือนกัน หากค่า t_R ที่วัดได้ตรงกันทั้งสองกรณี ก็แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างนั้นมีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน นอกจากนี้ การยืนยันยังสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะการวิเคราะห์ เช่น การเลือกใช้คอลัมน์หรือเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน หาก t_R ยังคงเหมือนเดิม จะยิ่งช่วยเสริมความน่าเชื่อถือของการระบุชนิดสาร

2. การเติมสารมาตรฐาน (spiking method) วิธีการเติมสารมาตรฐานเข้มข้นปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายตัวอย่าง (spike) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ยืนยันความถูกต้องของการระบุสาร ในกรณีที่สารตัวอย่างและสารมาตรฐานเป็นชนิดเดียวกัน การเติมสารมาตรฐานจะทำให้พื้นที่พีกหรือความสูงของพีกในโครมาโทแกรมเพิ่มขึ้นโดยที่ค่า t_R ยังคงเดิม การเพิ่มขึ้นของสัญญาณนี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าการระบุสารนั้นถูกต้อง

2) การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC มักดำเนินการโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถให้ความแม่นยำและความเที่ยงตรงสูง ในการเตรียมกราฟมาตรฐานมีวิธีหลัก 2 รูปแบบ ได้แก่

1. วิธี external standard

วิธีนี้ได้รับความนิยมเนื่องจากมีความสะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่ถูกต้อง โดยในขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐานจะใช้งานสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันประมาณ 3 – 5 ค่า ทำการวิเคราะห์แต่ละค่า แล้วจึงสร้างกราฟโดยวางความเข้มข้นของสาร (แกนนอน) เทียบกับพื้นที่พีกหรือความสูงของพีก (แกนตั้ง) ที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นกราฟเส้นตรงซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคำนวณปริมาณสารในตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบค่า t_R และพื้นที่พีกที่ได้จากตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้

2. วิธี internal standard

ในวิธีนี้จะมีการเติมสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ลงในสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานในปริมาณเท่ากัน โดยสารมาตรฐานภายในจะต้องเป็นสารที่ไม่มีในตัวอย่างและมีสมบัติใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดการตอบสนองของตัวตรวจวัดในลักษณะที่คล้ายคลึงกับสารตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จะสร้างกราฟมาตรฐานโดยเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกนนอน) กับอัตราส่วนของพื้นที่พีกของสารตัวอย่างต่อพื้นที่พีกของสารมาตรฐานภายใน (แกนตั้ง) จากนั้นปริมาณสารในตัวอย่างจะถูกคำนวณโดยการเทียบอัตราส่วนที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

การใช้วิธี internal standard นั้นให้ความแม่นยำและเที่ยงตรงสูง เนื่องจากการใช้สารมาตรฐานภายในช่วยชดเชยความแปรปรวนระหว่างการฉีดตัวอย่างและการตอบสนองของตัวตรวจวัดได้อย่างดี สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมควรมีสมบัติดังต่อไปนี้

- ไม่มีอยู่ในตัวอย่าง เพื่อป้องกันการรบกวนของสัญญาณ

- มีสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ที่ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง เพื่อให้การแยกและการตอบสนองของตัวตรวจวัดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน
- ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารในคอลัมน์หรือสารละลายตัวชะ เพื่อคงความเสถียรของการวิเคราะห์
- มีค่า t_R ที่ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง แต่แยกออกมาได้อย่างชัดเจน เพื่อให้สามารถแยกแยะฟีกของสารมาตรฐานภายในและสารตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง

4.2.4 ปฏิบัติการโครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง

1. ปฏิบัติการส่วนประกอบของเครื่อง HPLC
2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณสารด้วย reverse phase HPLC (ดูคู่มือปฏิบัติการ)

สรุปท้ายบทเรียน

เทคนิค HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยก ตรวจสอบ และวิเคราะห์องค์ประกอบของสารผสมภายใต้สภาวะที่มีแรงดันสูง ระบบ HPLC อาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุเฟสอยู่กับที่ ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย แหล่งเก็บตัวทำละลาย ปั๊มส่งตัวทำละลาย ตัวฉีดตัวอย่าง คอลัมน์แยกสาร ตัวตรวจวัดสัญญาณ ระบบประมวลผลข้อมูล และอุปกรณ์กำกับอุณหภูมิของคอลัมน์ เป็นต้น ตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยกของเทคนิค HPLC ได้แก่ ค่าแฟกเตอร์ความจุ (k) ซึ่งบ่งบอกถึงระยะเวลาที่สารถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์, ค่า selectivity (α) ที่แสดงระดับการแยกของสารสองชนิดที่อยู่ใกล้กัน จำนวนเพลทของคอลัมน์ (N) ที่สะท้อนประสิทธิภาพในการบรรจุคอลัมน์และความคมของฟีก รวมถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น ขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุคอลัมน์ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิการทำงาน และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น

วิธีการสอนและกิจกรรม

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

สื่อการสอนและอุปกรณ์การสอน

1. เอกสาร power point
2. เอกสารประกอบการสอน
3. <https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-basics/index.html>

งานที่มอบหมาย

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม

2. ใบกิจกรรม

การวัดผล

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

แบบฝึกหัด

1. ทำกิจกรรม
2. ใบกิจกรรม

บรรณานุกรม

1. Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (8th ed.). W.H. Freeman and Company.
2. Harvey, D. (2019). *Analytical Chemistry 2.1*. <https://chem.libretexts.org/>
3. Wu, P. W., Chang, C. C., & Chou, S. S. (2003). Determination of formaldehyde in cosmetics by HPLC method and acetylacetone method. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11(1) 8-15. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2728>
4. Nicoletti, I., Corradini, C., Cogliandro, E., & Cavazza, A. (1999). Determination of alpha-hydroxy acids in cosmetic products by high-performance liquid chromatography with a narrow-bore column. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(4) 265–274. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.1999.196577.x>
5. Huang, W. S., Lin, C. C., Huang, M. C., & Wen, K.-C. (2002). Determination of α -hydroxyacids in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10(2) x-xx. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2761>
6. Robinson, J. W., Frame, E. M. S, & Frame G. M. (2021). *Instrumental Analytical Chemistry*. CRC Press

หน่วยที่ 4

วิเคราะห์โครมาโทกราฟี

บทเรียน 4.3 การวิจัยและการประยุกต์เทคนิคโครมาโทกราฟี

จุดประสงค์การสอน

1. อธิบายการประยุกต์เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส
2. อธิบายการประยุกต์เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง
3. ปฏิบัติการประยุกต์ใช้โครมาโทกราฟีกับอาหารหรือเครื่องสำอาง

4.3.1 การประยุกต์เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส

1) การประยุกต์ใช้ GC ในงานวิจัยด้านเภสัชกรรมและสมุนไพร

ในงานวิจัยด้านสมุนไพร เทคนิค GC มีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพร การวิเคราะห์ด้วย GC ช่วยให้สามารถระบุชนิดและปริมาณของสารสำคัญในสมุนไพร ซึ่งมีประโยชน์ในการประเมินคุณภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพร นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ยังสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีคุณภาพและมาตรฐาน รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร

เทคนิค GC เป็นเครื่องมือหลักในการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด เช่น เทอร์พีน แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ และเอสเทอร์ ซึ่งมีสมบัติระเหยง่ายและสามารถวิเคราะห์ได้ดีด้วยเทคนิค GC การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยมีความสำคัญในการประเมินคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเวชสำอางจากสมุนไพร การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ สารประกอบในน้ำมันหอมระเหยบางชนิดอาจก่อให้เกิดการแพ้หรือระคายเคืองต่อผิวหนัง การวิเคราะห์ด้วย GC ช่วยให้สามารถตรวจสอบและควบคุมปริมาณของสารเหล่านี้ในผลิตภัณฑ์ได้

ตัวอย่างรายงานวิจัย

1. Kenneth และคณะ (2023) รายงานวิจัยเรื่อง GC-FID guided identification and quantification of detectable phytochemicals in selected commercial chamomile

herbal tea มีวัตถุประสงค์ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารออกฤทธิ์ในชาคาโมไมล์ สมุนไพรเชิงพาณิชย์ เพื่อประเมินคุณภาพและความถูกต้องของผลิตภัณฑ์

วิธีการเตรียมตัวอย่าง โดยสกัดสารจากชาคาโมไมล์ด้วยตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ สภาวะการวิเคราะห์ด้วยตัวตรวจวัด GC-FID ประกอบด้วย

- คอลัมน์ HP-5MS (30 m×250 μ m×0.25 μ m)
- แก๊สพา ฮีเลียม (อัตราการไหล 1 mL/min)
- อุณหภูมิ เริ่มต้นที่ 50°C เพิ่มขึ้นที่ละ 3°C/min จนถึง 150°C แล้วเพิ่มเป็น 300°C ที่ 10°C/min
- ตรวจวัดด้วย flame ionization detector (FID)

ผลการวิจัยตรวจพบสารไฟโตเคมีคอลหลัก 3 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอยด์ ประกอบด้วย rutin (10.47%), kaempferol (8.44%), naringenin (4.1%) ไกลโคไซด์ ประกอบด้วย cardiac glycoside (4.37%), cyanogenic glycoside (14.33%) และสารต้านโภชนาการ ประกอบด้วย oxalate (16.77%), phytate (4.63%)

2) การประยุกต์ใช้ GC ในงานวิจัยอาหารและยา

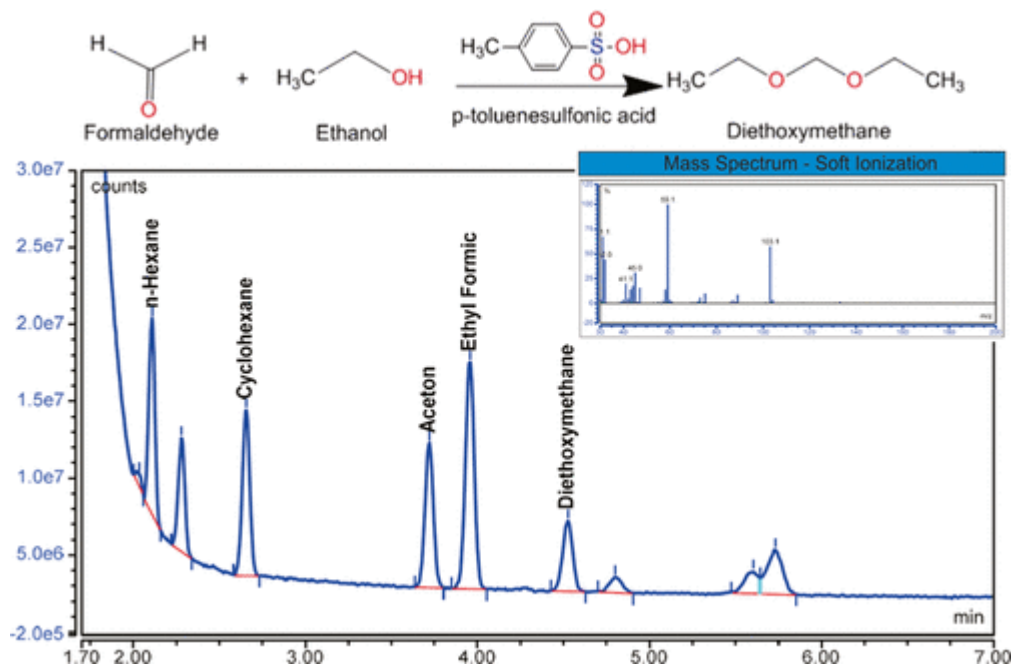
ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เทคนิค GC มีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางยา และการตรวจสอบสารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ยา การวิเคราะห์ด้วย GC สามารถใช้ในการตรวจหาตัวทำละลายตกค้าง (residual solvents) ในผลิตภัณฑ์ยา ซึ่งเป็นข้อกำหนดสำคัญในการควบคุมคุณภาพตามมาตรฐานเภสัชตำรับ นอกจากนี้ GC ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์เมแทบอลิต์ของยาในตัวอย่างชีวภาพ เช่น เลือดและปัสสาวะ ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์และกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา

ตัวอย่างรายงานวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอะคริลาไมด์โดยวิธี GC ที่มีการตรวจวัด FID อะคริลาไมด์จัดเป็นสารก่อมะเร็งที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงในกระบวนการปรุงอาหาร อะคริลาไมด์เป็นผลผลิตพลอยได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดระหว่างหมู่เอมีโนของแอสพาราจีนกับหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ การเตรียมตัวอย่างโดยสกัดอะคริลาไมด์จากตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปกำจัดไขมัน น้ำมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนก่อนการเตรียมอนุพันธ์ด้วยแซนไธนดรออล การเตรียมตัวอย่างให้สะอาดขึ้น ความเข้มข้นของแซนไธนดรออลและกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เวลาและอุณหภูมิในการเตรียมอนุพันธ์ และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ความเข้มข้น 70-140,000 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ($r^2 = 0.9994$) ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดการหาปริมาณได้เท่ากับ 14 และ 70 นาโนกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้หาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด 6 ตัวอย่าง พบว่ามีอะคริลาไมด์ในช่วงความเข้มข้น 1.52-13.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 78.10-111.87 (อนุวัฒน์ และวรารุช, 2562)

3) การประยุกต์ใช้ GC ในงานวิจัยเครื่องสำอาง

การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์สำหรับการตรวจหาฟอร์มาลดีไฮด์ในเครื่องสำอางประเภทครีม โดยใช้เครื่อง GC-FID และ GC-MS โดยใช้ *p*-toluenesulfonic (PTS) acid ในเอทานอลเป็นสารช่วยสร้างอนุพันธ์ (derivatizing agent) ดังสมการ นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ฟอร์มาลดีไฮด์กับวิธีมาตรฐานเดิมโดยใช้ DNPH ด้วย HPLC-DAD



ภาพที่ 4.40 โครมาโทแกรมอนุพันธ์ฟอร์มาลดีไฮด์ โดยใช้เครื่อง GC-FID

4.3.2 การประยุกต์เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง

1) การประยุกต์ใช้ HPLC ในงานวิจัยด้านเภสัชกรรมและสมุนไพร

HPLC เป็นเครื่องมือหลักในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยาที่ผลิตขึ้นใหม่ โดยสามารถหาสารตกค้างหรือสารที่ไม่ต้องการในกระบวนการสังเคราะห์ยาได้ ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในยาแก้ปวดหรือยาด้านจุลชีพ เพื่อยืนยันความถูกต้องและความมีประสิทธิภาพในการผลิต การศึกษาการปล่อยยา (drug release) และการแพร่กระจายของยาในร่างกาย สามารถใช้วัดระดับการปล่อยของสารออกฤทธิ์ในตัวอย่างชีวภาพ เช่น เลือดหรือปัสสาวะ นอกจากนี้ยังติดตามการเปลี่ยนแปลงของยาในร่างกายเกิดการสลายตัวและเปลี่ยนเป็นเมตาบอไลต์ HPLC จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาการเผาผลาญและความปลอดภัยของยา

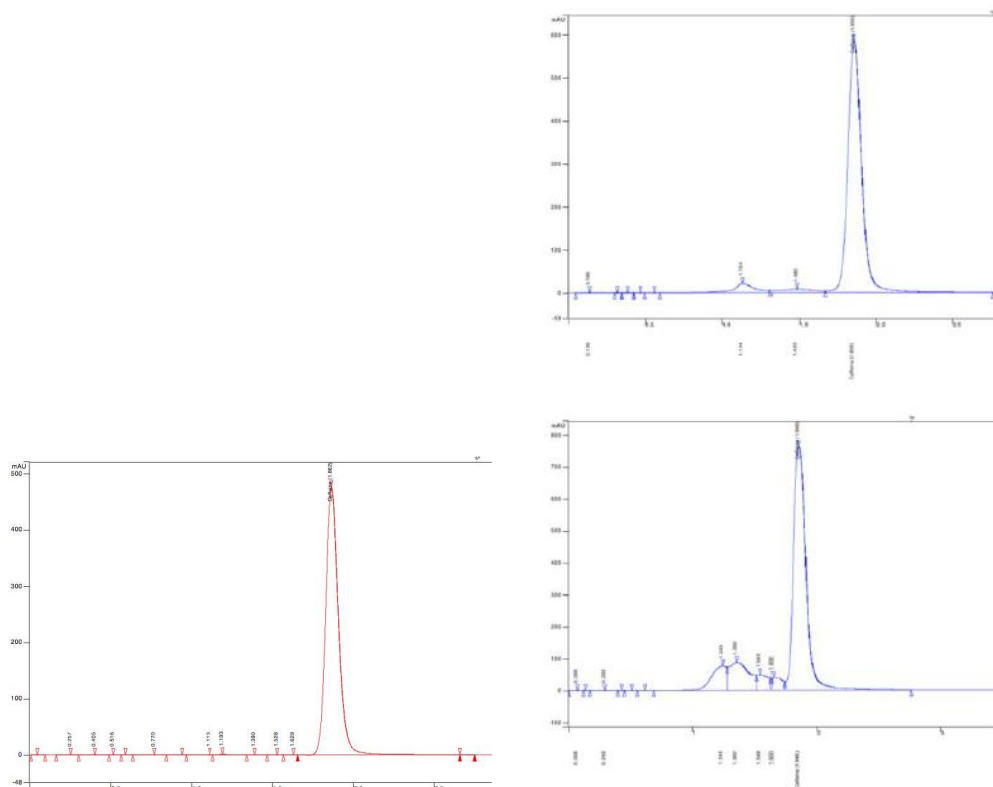
สมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์หลายชนิดที่อาจมีประสิทธิภาพทางยา HPLC ช่วยให้สามารถแยกและวิเคราะห์สารเหล่านี้ได้อย่างละเอียด เช่น การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารประกอบอื่น ๆ ที่มีบทบาทในระบบชีวภาพ ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์สารประกอบในใบชา รากโสม หรือสมุนไพรไทยที่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงามและอาหารเสริม การประเมินคุณภาพและความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ตัวอย่างรายงานวิจัย

การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากพืชสกุลเคอร์คูมาด้วยเทคนิค RP-HPLC ได้รับการพัฒนาขึ้น โดยใช้คอลัมน์ RP-C18 และเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย แอซีโตไนไตรล์และกรดแอสติก 2% ด้วยระบบ gradient elution ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm วิธีนี้มีความไว ความเฉพาะเจาะจง และความแม่นยำสูง ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัด (LOD) ของเคอร์คูมิน (curcumin) ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) เท่ากับ 0.09, 0.14 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ช่วงของความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ความเข้มข้น 5-200 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนของเคอร์คูมิน ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน มีค่าระหว่าง 95.06 ถึง 102.19% วิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากเหง้าขมิ้นและเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของขมิ้นได้

2) การประยุกต์ใช้ HPLC ในงานวิจัยด้านอาหารและยา

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารกลุ่มลดน้ำหนัก โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับตัวตรวจจับรังสียูวี (UV detection) และประเมินปริมาณคาเฟอีนที่ผู้บริโภคได้รับในแต่ละวันจากผลิตภัณฑ์เหล่านี้ มีการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนประกอบของคาเฟอีนจำนวน 20 ชนิด การทดลองใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำกลั่น 65%/แอซีโตไนไตรล์ 35% ความเร็วการไหล 1 mL/นาที ชนิดคอลัมน์ C18 การตรวจวัดด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 274 nm

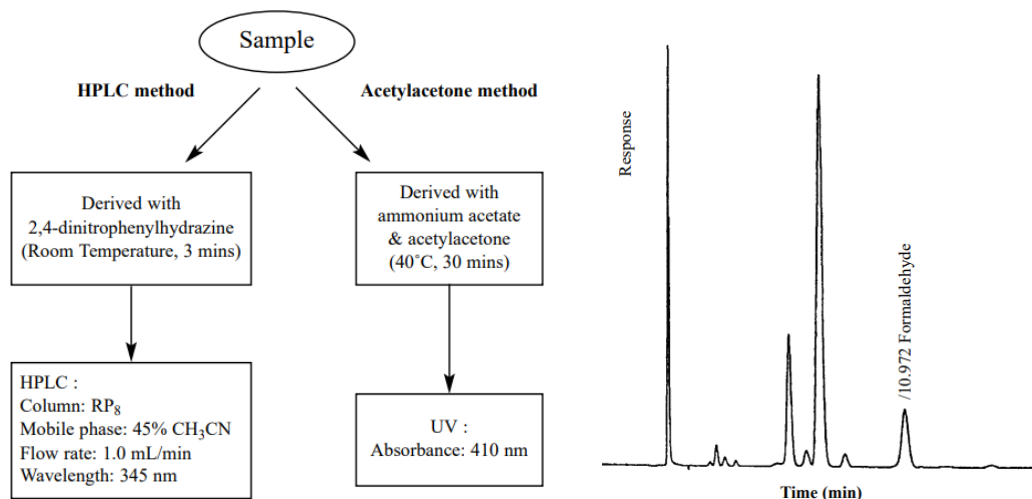


ภาพที่ 4.41 โครมาโทแกรม (ก) คาเฟอีนมาตรฐาน 60 $\mu\text{g/mL}$ และ (ข) สารตัวอย่าง

3) การประยุกต์ใช้ HPLC ในงานวิจัยด้านเครื่องสำอาง

Gao และคณะ (2011) พัฒนาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและไวต่อการตรวจจับโดยใช้ HPLC สำหรับการตรวจหา hydroquinone, phenol และสารกันเสียอีก 6 ชนิด (methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben, butyl paraben, sorbic acid และ salicylic acid) ในผลิตภัณฑ์ครีมเครื่องสำอาง โดยใช้ Reverse-phase HPLC โดยมีคอลัมน์ชนิด C18 ใช้ระบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลายที่เป็นกรดอ่อนผสมกับเมทานอล ตรวจวัดด้วย UV detection ที่ 210 nm ทำการสกัดตัวอย่างจากครีมโดยการใช้ methanol extraction ตามด้วยการกรอง วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารทั้ง 8 ชนิดได้ภายใน 20 นาที มี limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ต่ำมาก แสดงถึงความไวสูง ความเที่ยงตรง (precision) และความถูกต้อง (accuracy) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

Wu และคณะ (2003) พัฒนาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ใช้เทคนิค HPLC โดยทำอนุพันธ์ฟอร์มาลดีไฮด์กับ 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจวัด เนื่องจากฟอร์มาลดีไฮด์ไม่สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรงด้วย HPLC ได้ดี จึงต้องทำให้เกิดอนุพันธ์ที่สามารถตรวจจับได้ง่ายขึ้น และตรวจวัดด้วย UV ที่ 345 nm ตัวอย่างเครื่องสำอางถูกเตรียมโดยการละลายในน้ำ ชนิดคอลัมน์เป็น Licosorb RP8 เฟสเคลื่อนที่เป็น acetonitrile 45%, อัตราการไหล 1.0 mL/min โดยสรุปผลมีช่วงความถูกต้อง (linearity) ระหว่าง 0.1–5.0 µg/mL ค่า recovery อยู่ในช่วง 95–105% ค่า LOD = 0.02 µg/mL และ LOQ = 0.07 µg/mL



ภาพที่ 4.42 ขั้นตอนการวิเคราะห์และโครมาโทแกรมของอนุพันธ์ฟอร์มาลดีไฮด์ด้วย 2,4-DNPH

4.3.3 ปฏิบัติการประยุกต์ใช้โครมาโทกราฟีกับอาหารหรือเครื่องสำอาง

- 1) ปฏิบัติการประยุกต์ใช้โครมาโทกราฟีกับอาหาร
- 2) ปฏิบัติการประยุกต์ใช้โครมาโทกราฟีเครื่องสำอาง
- 3) รายงานวิจัย
(คู่มือปฏิบัติการ)

สรุปท้ายบทเรียน

การประยุกต์ใช้ GC ในงานวิจัยในด้านต่าง ๆ การวิเคราะห์สารตกค้างในอาหาร เช่น ตรวจหาสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ วิเคราะห์สารปนเปื้อนอาหารทอด ตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร ด้านเครื่องสำอาง เช่น วิเคราะห์ปริมาณสารระเหยในน้ำหอม และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ตรวจสอบสารปนเปื้อนที่อาจเป็นอันตราย เช่น พาราเบน และฟีนอกซีเอทานอล ด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสมุนไพร เช่น วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในพืชสมุนไพรและพืชยา ตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากพืช เช่น ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และอัลคาลอยด์ ใช้ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อให้มั่นใจว่ามีปริมาณสารสำคัญที่เหมาะสม

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ถือเป็นหนึ่งในเครื่องมือสำคัญในงานวิจัยทั้งด้านเภสัชกรรมและสมุนไพร เนื่องจากสามารถแยกและวิเคราะห์สารประกอบที่มีความซับซ้อนได้อย่างละเอียดและแม่นยำ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพรและการประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม

วิธีการสอนและกิจกรรม

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

สื่อการสอนและอุปกรณ์การสอน

1. เอกสาร powerpoint
2. เอกสารประกอบการสอน

งานที่มอบหมาย

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

การวัดผล

1. ทำกิจกรรมกลุ่ม
2. ใบกิจกรรม

แบบฝึกหัด

1. ทำกิจกรรม
2. ใบกกิจกรรม

บรรณานุกรม

1. อนุวัฒน์ รัศมีสมศรี และวราวุธ ดิยพงศ์พัฒนา. (2562). แก๊สโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน สำหรับการหาปริมาณอะคริลาไมด์ในมันฝรั่งทอด. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 27(3) 389-406.
2. Averill, B. A. (2012). *Principles of General Chemistry*.
<https://2012books.lardbucket.org/books/principles-of-general-chemistry-v1.0m/index.html>
3. Christian, G. D., Dasgupta, P. K., & Schug, K. A. (2014). *Analytical Chemistry* (7th ed.). John Wiley & Sons.
4. Gao, W., & Legido-Quigley, C. (2011). Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. *Journal of chromatography. A*, 1218(28), 4307–4311. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.064>
5. Harvey, D. (2019). *Analytical Chemistry 2.1*. <https://chem.libretexts.org/>
6. Kenneth C. Ugoeze, Nora Amadi, Ngozi A. Okoronkwo, Sunday O. Abali, Kennedy E. Oluigbo, Bruno C. Chinko. (2023). GC-FID guided identification and quantification of detectable phytochemicals in selected commercial chamomile herbal tea. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 14, 1-11
7. Yuniati, W., Amelia, T., Ibrahim, S., & Damayanti, S. (2021). Analytical method development for determining formaldehyde in cream cosmetics using hyphenated gas chromatography. *ACS Omega*, 6, 42, 28403–28409. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c04792>
8. Lehotay, S. J., & Hajšlová, J. (2002). Application of gas chromatography in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(9–10) 686-697. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00805-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00805-1).
9. Analysis of Preservatives in Cosmetics by HPLC. (March 25, 2021). PerkinElmer, Inc.
10. Chanthathamrongsiri, N., Anannaweenusorn, P., Chuenta, W., Saraarporn, S., & Plianwong, S. (2023). Analytical method development and validation for simultaneous determination of triamcinolone acetate, betamethasone valerate and clobetasol propionate in cream

formulation by RP-HPLC. *Science, Engineering and Health Studies*, 17, 23050024. <https://doi.org/10.69598/sehs.17.23050024>

11. Robinson, J. W., Frame, E. M. S, & Frame G. M. (2021). *Instrumental Analytical Chemistry*. CRC Press
12. Huang, X., Liu, L., Xu, Q., & Rohrer, J. (n.d.). *Determination of Coumarins in Cosmetics*. <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-1128-LC-Coumarins-Cosmetics-AN71662-EN.pdf>