



คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

เทคโนโลยีสุขภาพ เครื่องสำอางและการชะลอวัย

HEALTH, COSMETIC & ANTI-AGING TECHNOLOGY



ผศ.ดร.วรวิทย์ จันทรสุวรรณ

Asst.Prof. Woravith Chansuvarn,
Ph.D.



woravith



woravith



woravith.c@rmutp.ac.th



<http://sci.rmutp.ac.th/woravith>

หน่วย 4 วิธีโครมาโทกราฟี
บทเรียน 4.2

โครมาโทกราฟี แบบของเหลวแรงดันสูง

(High performance liquid chromatography)

#แผนการเรียนรู้และการประเมินผลการเรียนรู้

4.2

โครมาโทกราฟี แบบของเหลว แรงดันสูง

อธิบายหลักการและส่วนประกอบของ
เครื่อง HPLC



อธิบายประสิทธิภาพการแยก

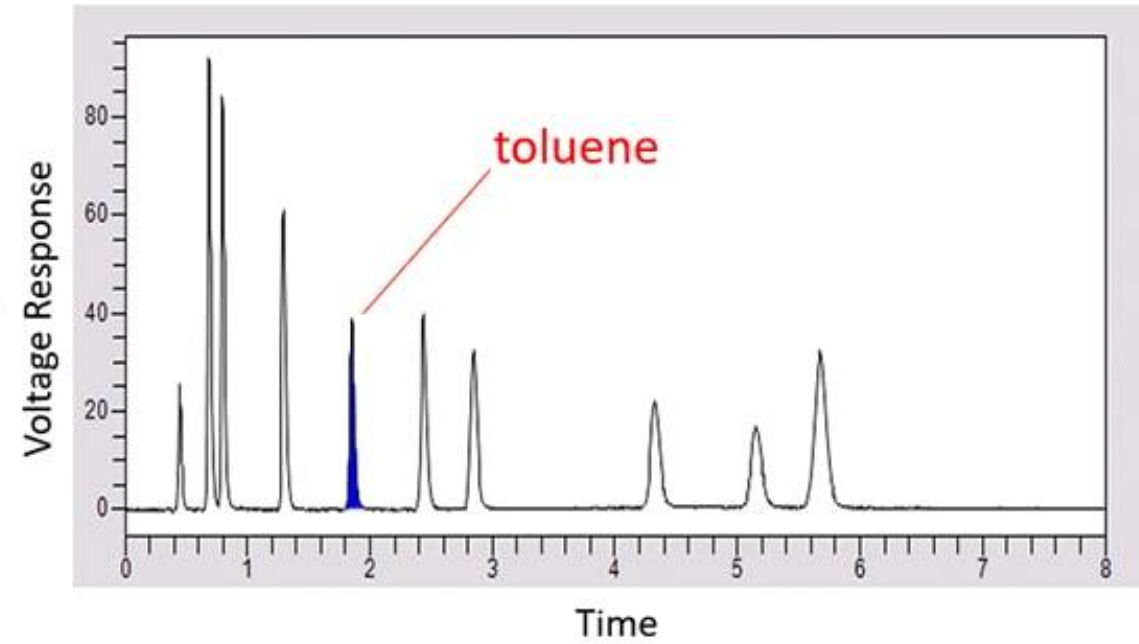
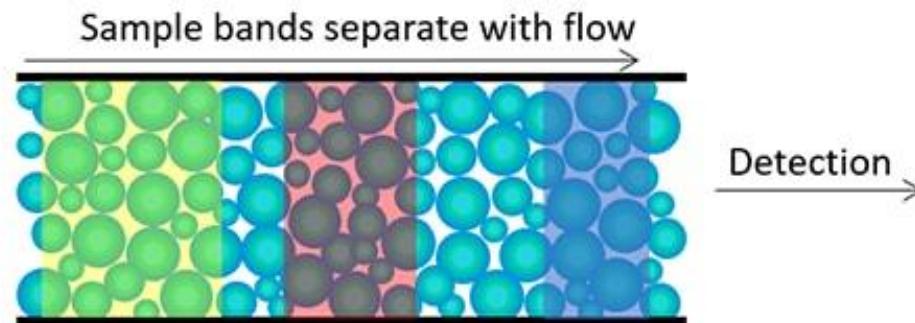
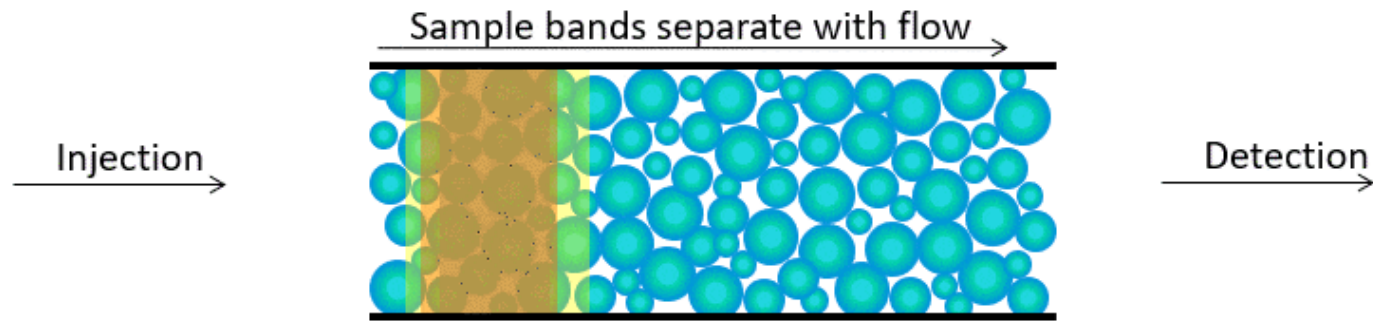


คำนวณการทำปริมาณวิเคราะห์
และการประยุกต์



ปฏิบัติการโครมาโทกราฟีแบบของเหลว
แรงดันสูง

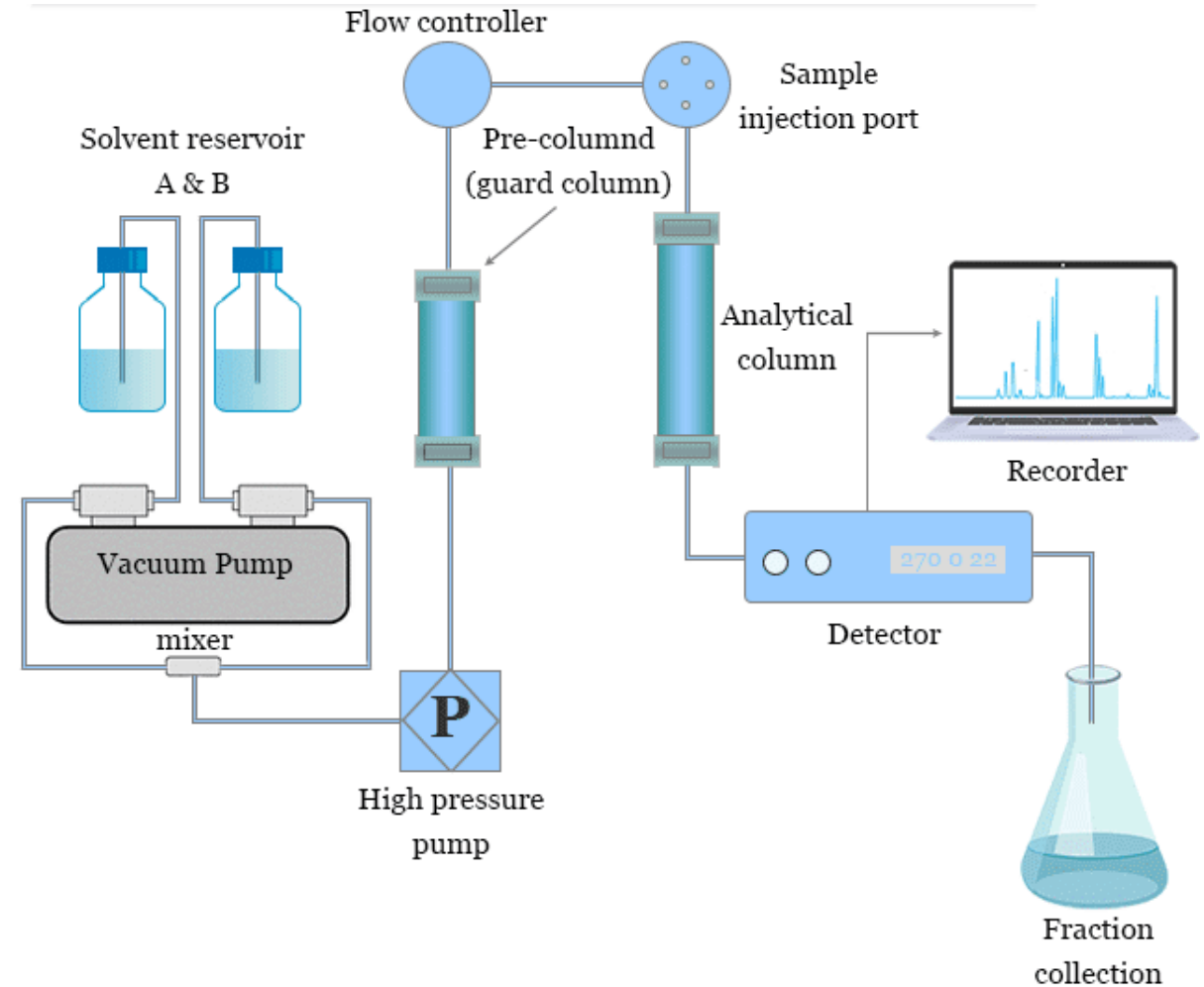




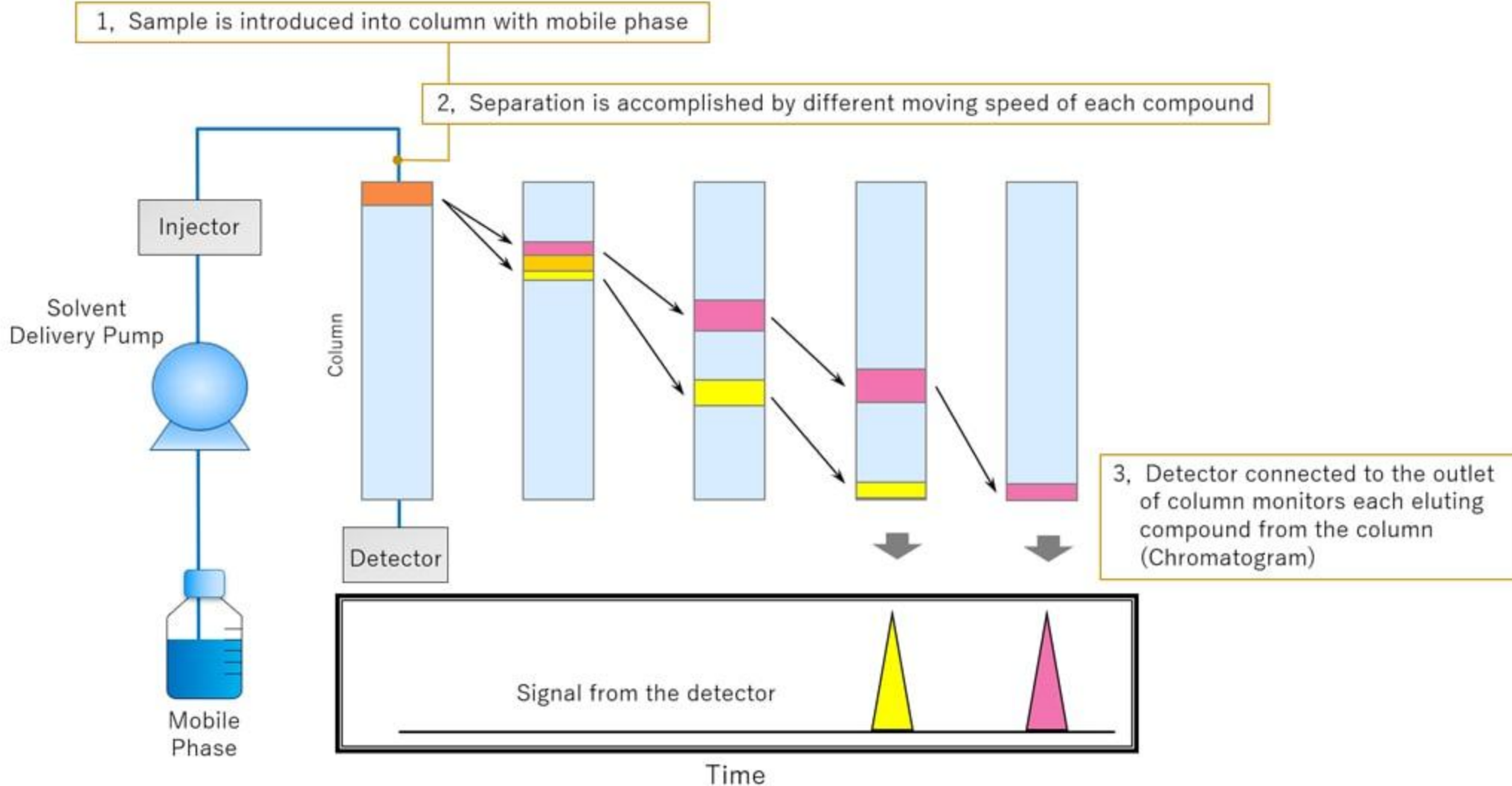
หลักการ HPLC

Mobile phase : Liquid (ของเหลว)

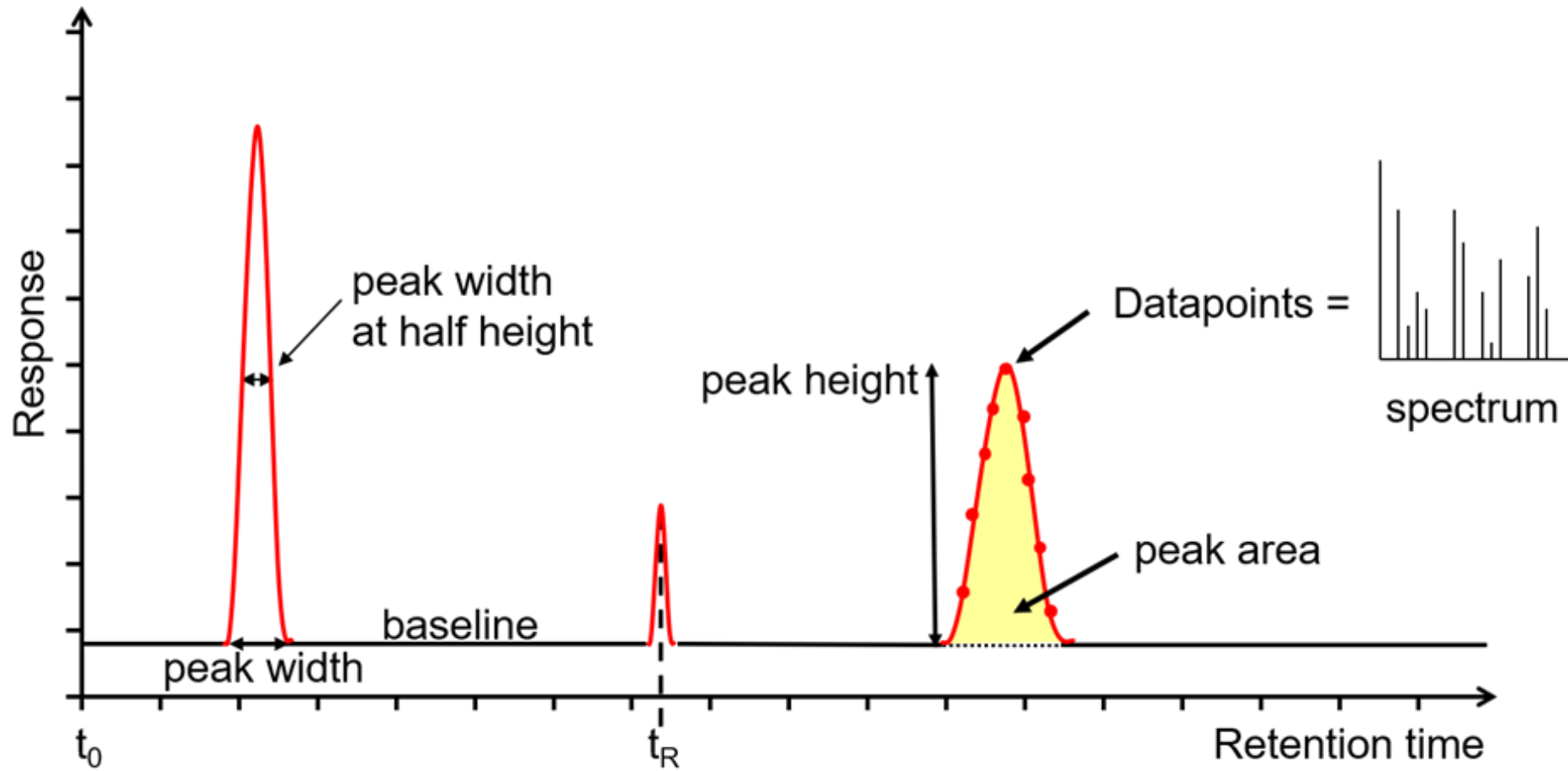
- คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้ MP เป็นของเหลว
- ขนาดอนุภาคของ SP มีขนาดเล็กมาก ๆ
- การไหลของ MP ต้องใช้แรงดันสูง ช่วยเพื่อทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารและตัวชะ และทำให้การแยกเกิดได้เร็วขึ้น จึงเรียกว่า โครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (High pressure liquid chromatography; HPLC)



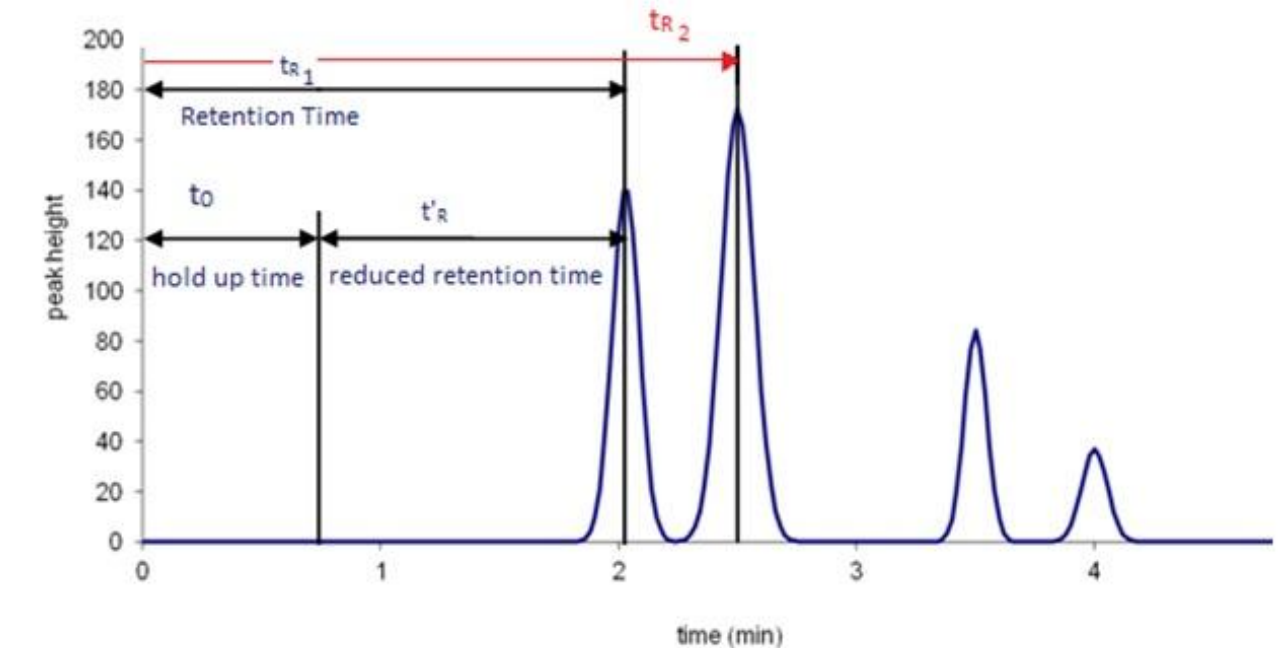
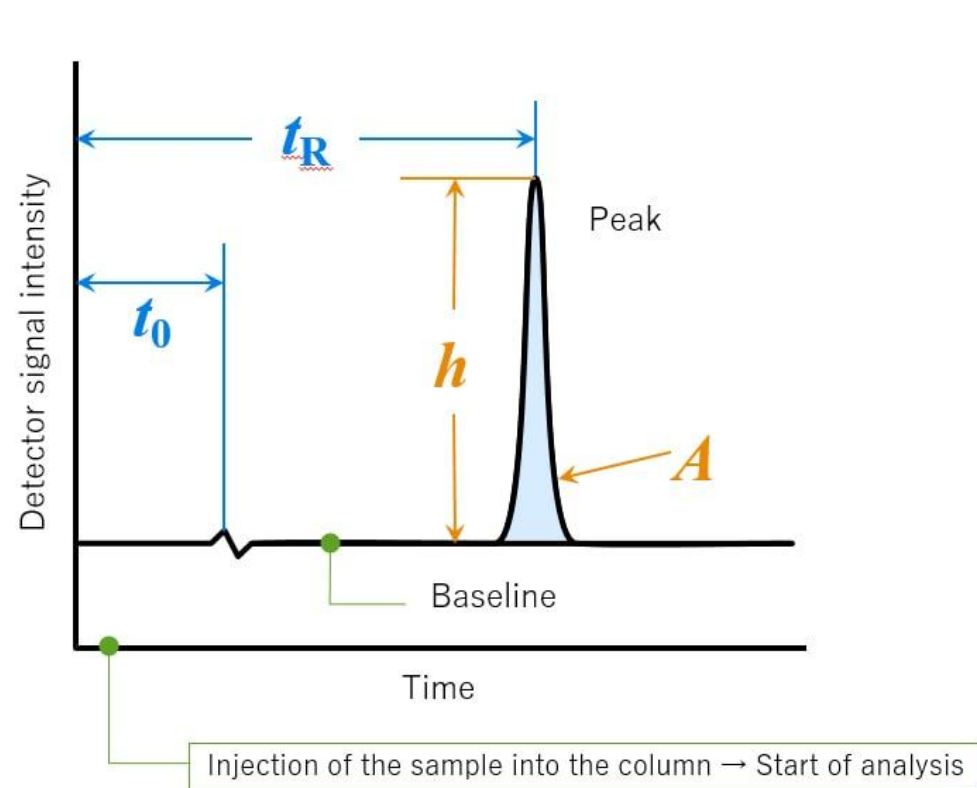
HPLC Principle



Signal response/Chromatogram

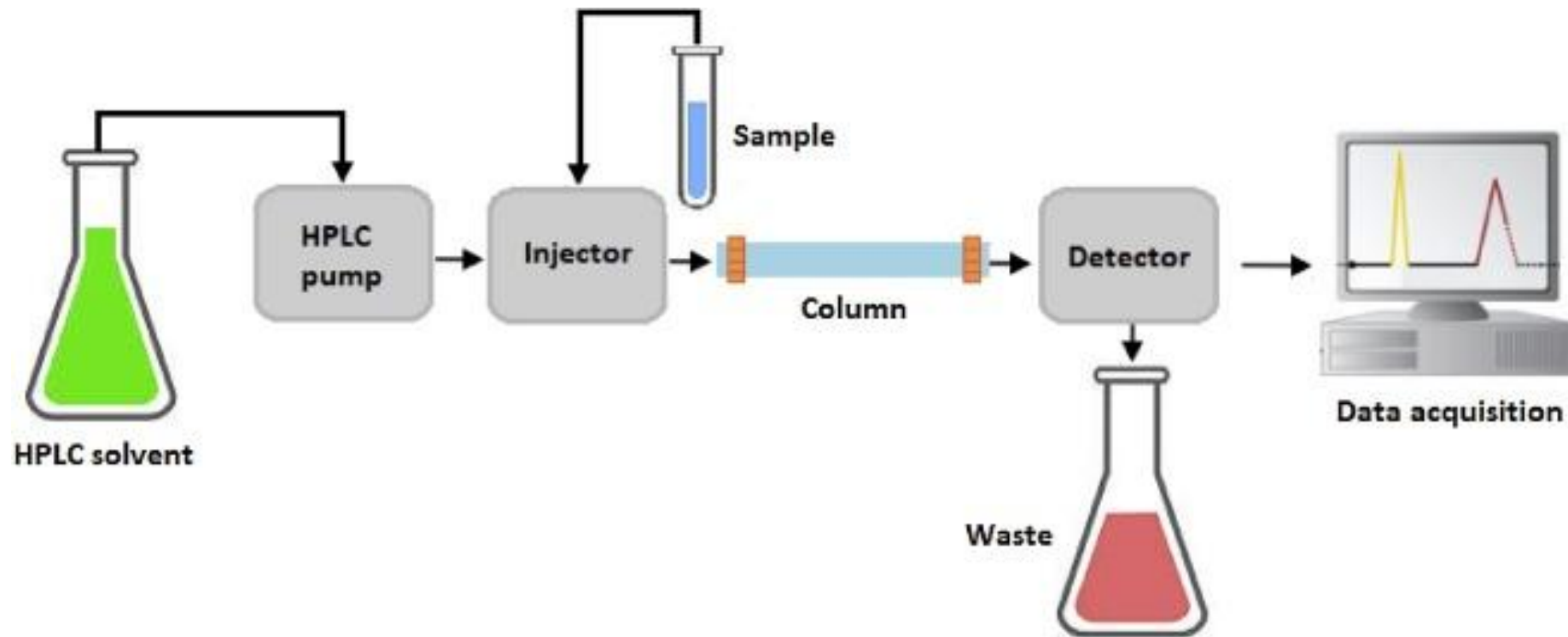


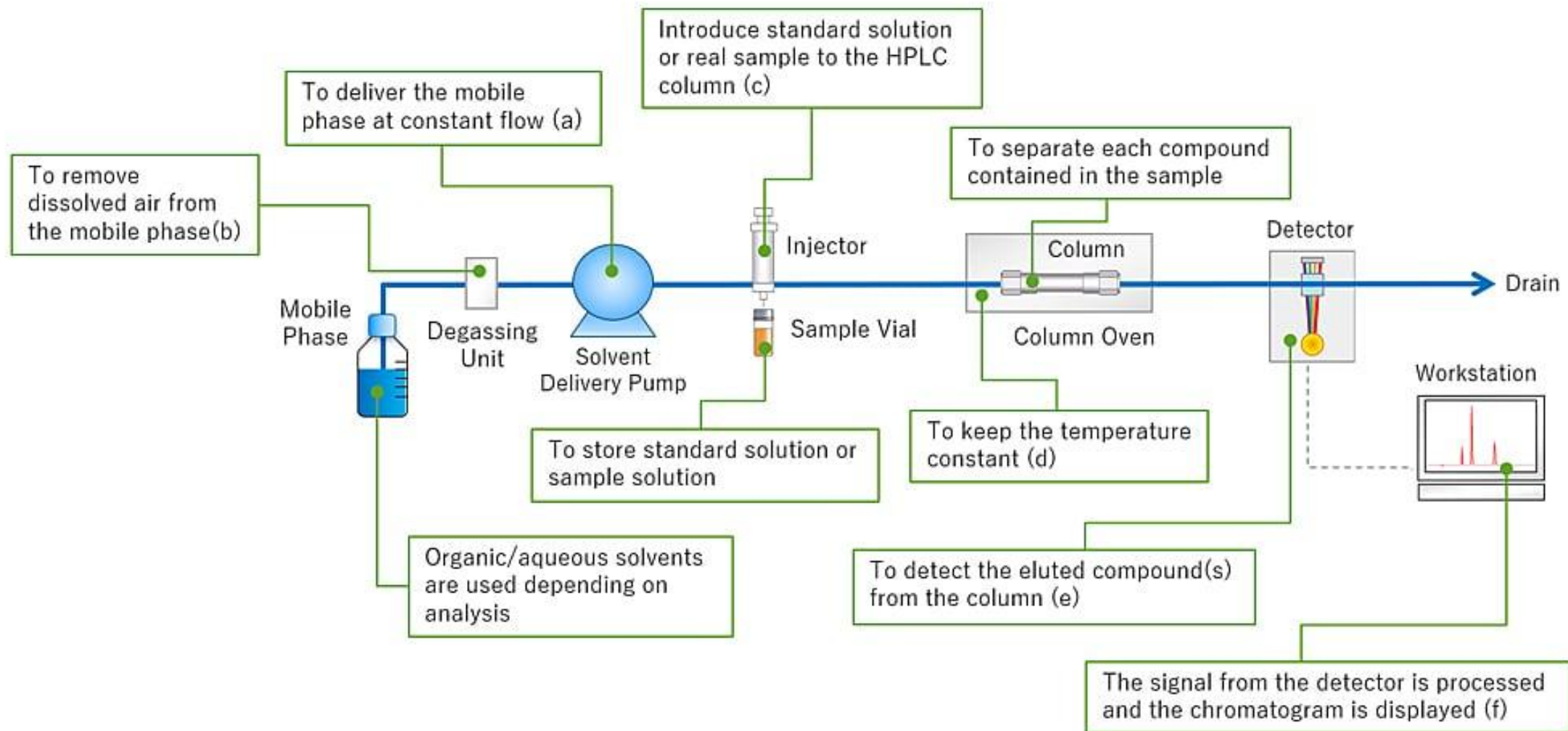
Signal response/Chromatogram



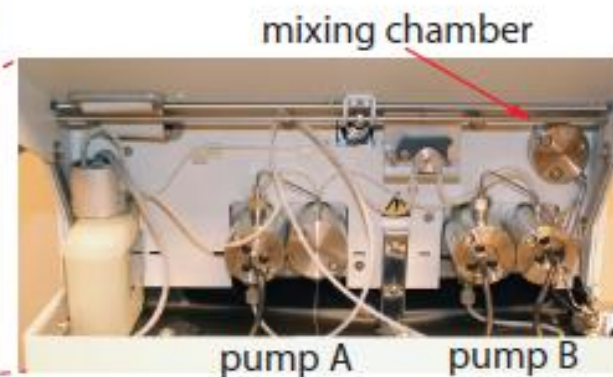
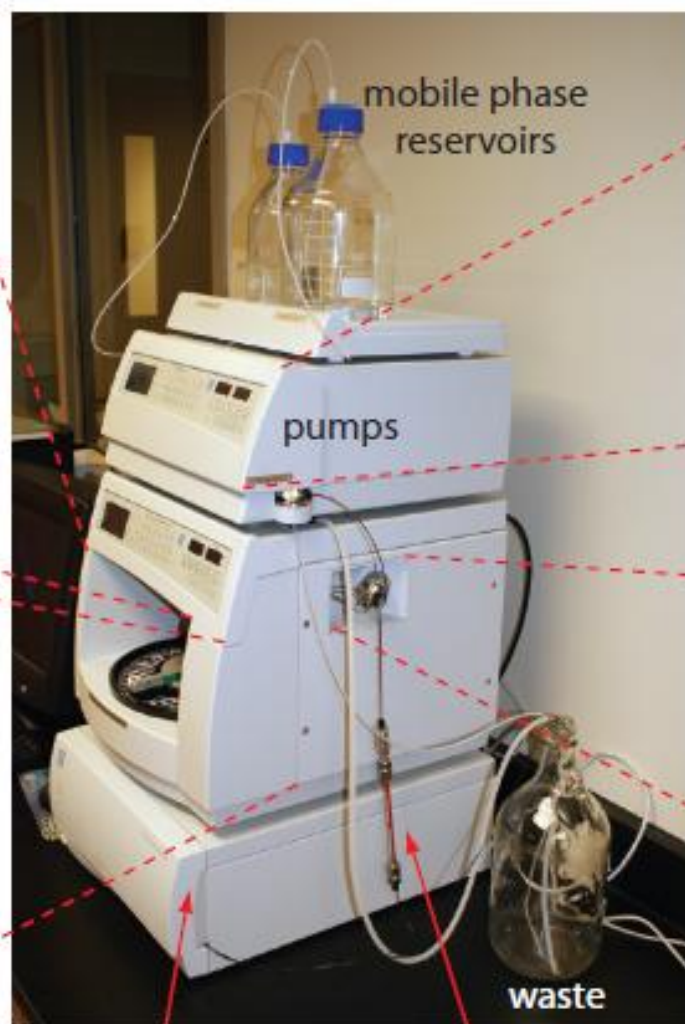
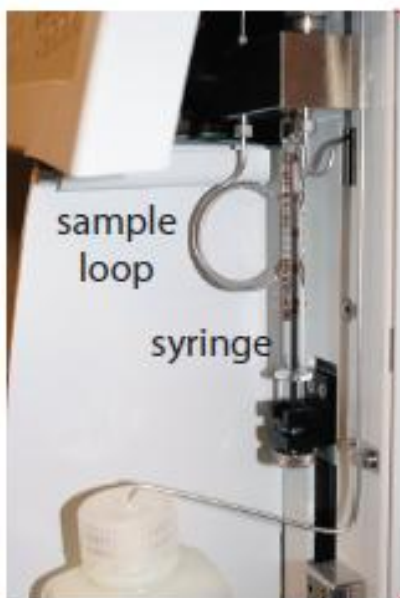
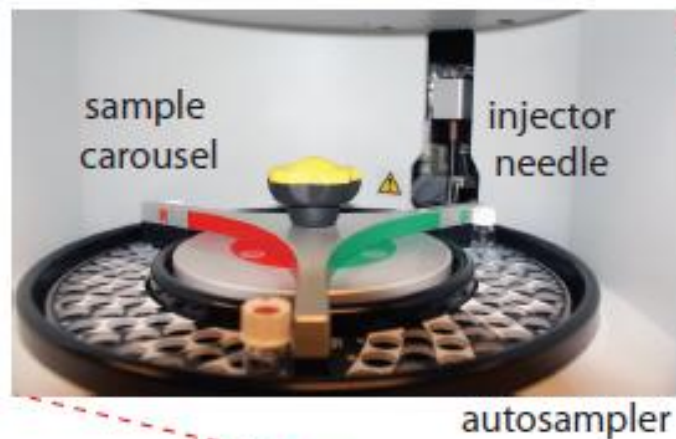
- t_R : Retention Time
- t_0 : Dead Time
- A : Peak Area
- h : Peak Height

HPLC Diagram





https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html



ส่วนประกอบของ HPLC

- **Mobile phase** ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะ เป็นของเหลวทำหน้าที่นำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์ เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
- **Degasser** ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศในตัวทำละลาย ไม่ให้มีฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector
- **Pump** ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายเข้าสู่ระบบ HPLC
- **Injector** ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC
- **Column** มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็น SP ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ
- **Detector** ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

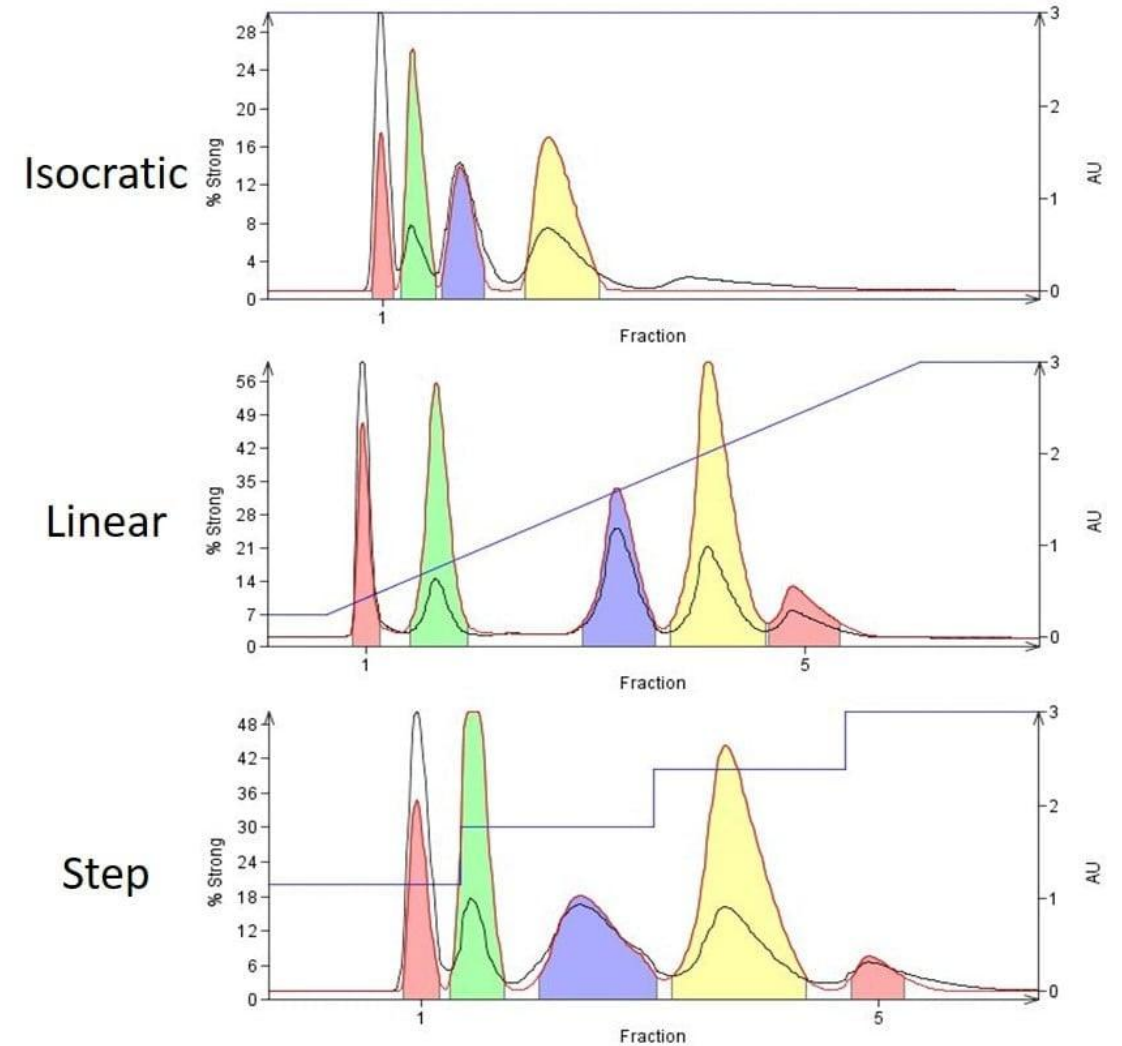
ตัวเก็บตัวทำละลาย (solvent reservoirs)

การเลือกใช้ MP ใน HPLC อาจพิจารณาจากคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- มีต้นทุนที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างคุ้มค่า
- ไม่เป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและอุปกรณ์
- ไม่มีปฏิกิริยากับสารตัวอย่างและ SP เพื่อไม่ให้เกิดการรบกวนผลการวิเคราะห์
- สารตัวอย่างต้องสามารถละลายได้ดีใน MP เพื่อให้การแยกมีประสิทธิภาพสูงสุด
- ตัวตรวจวัดไม่ควรตอบสนองต่อ MP หรือการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบ MP โดยเฉพาะในระบบ Gradient Elution

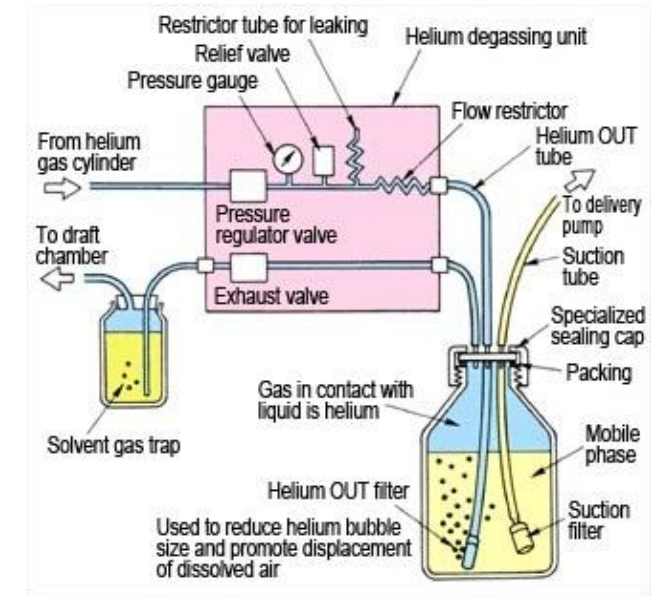
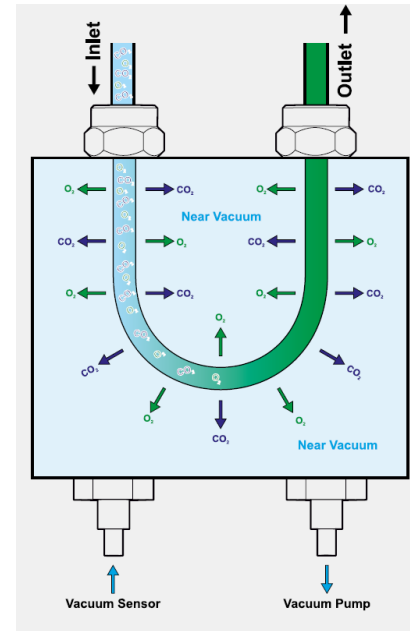
ระบบตัวทำละลาย

- **Isocratic elution** องค์ประกอบของ MP คงที่ตลอดระยะเวลา
- **Linear gradient elution** องค์ประกอบของ MP เปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง
- **Stepwise gradient elution** องค์ประกอบของ MP เปลี่ยนแปลงเป็นขั้นบันได (stepwise)



ตัวกำจัดแก๊ส (degassing)

- Refluxing
- Helium sparging
- Vacuum degassing



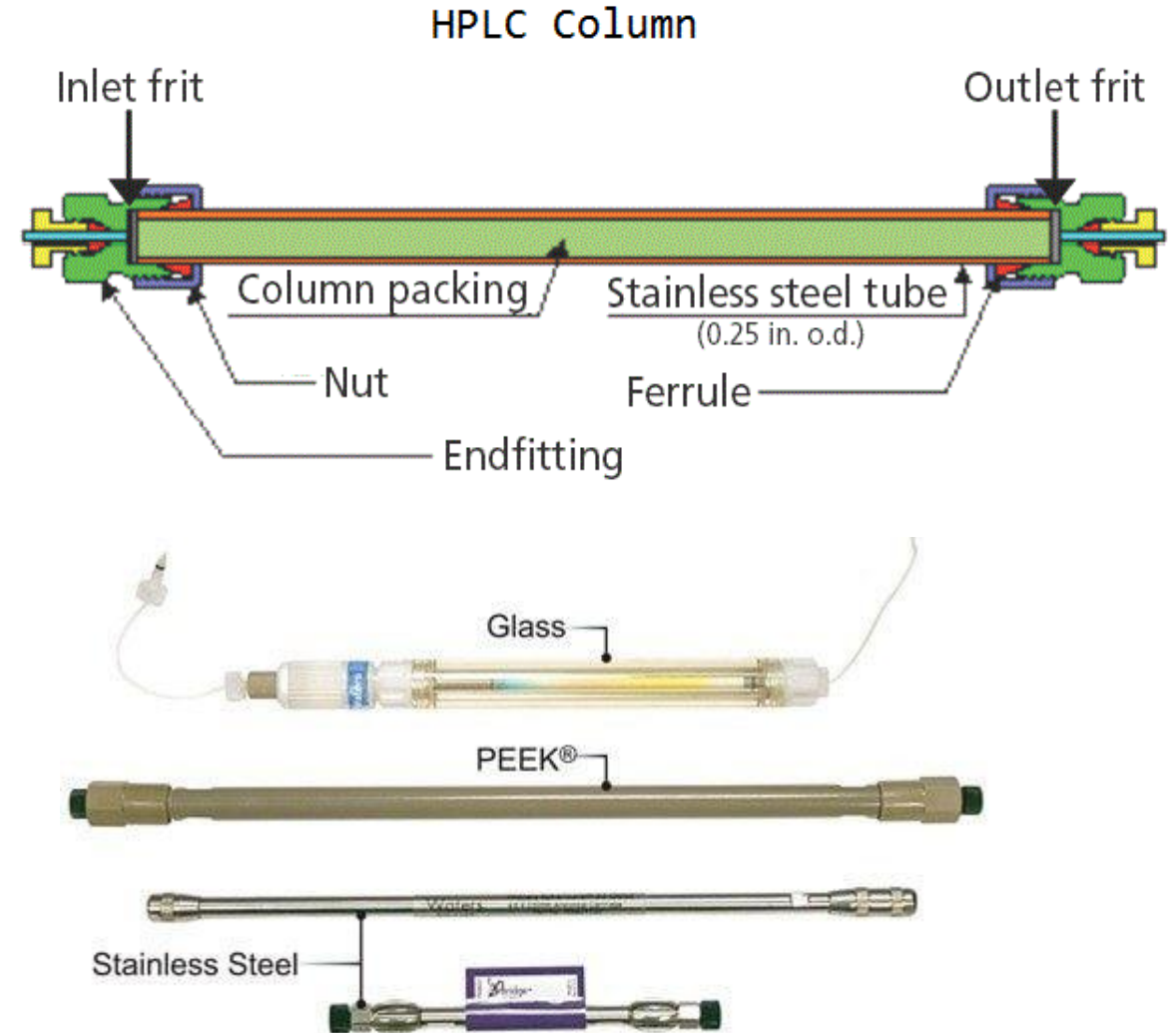
- Sonication
Ultra-sonic baths is not a viable standalone degassing method, since they can only remove about 30% of the dissolved gas present and at least 50% is required.

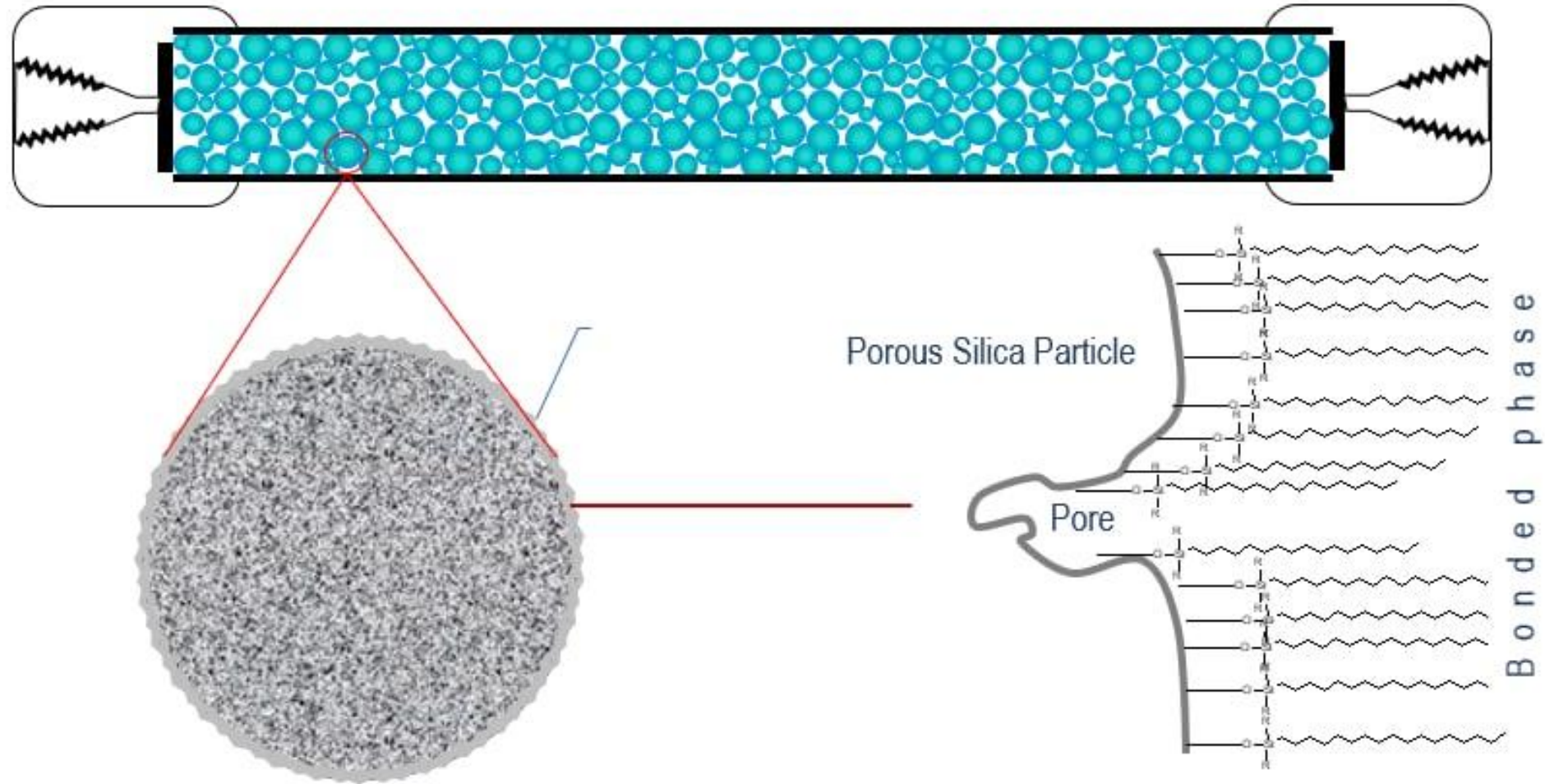
คอลัมน์ (Column)

- The separating function of the mixture samples.
- Sample passing through the stationary phase with the mobile phase, resulting in the separation of the sample components.

HPLC Column Types

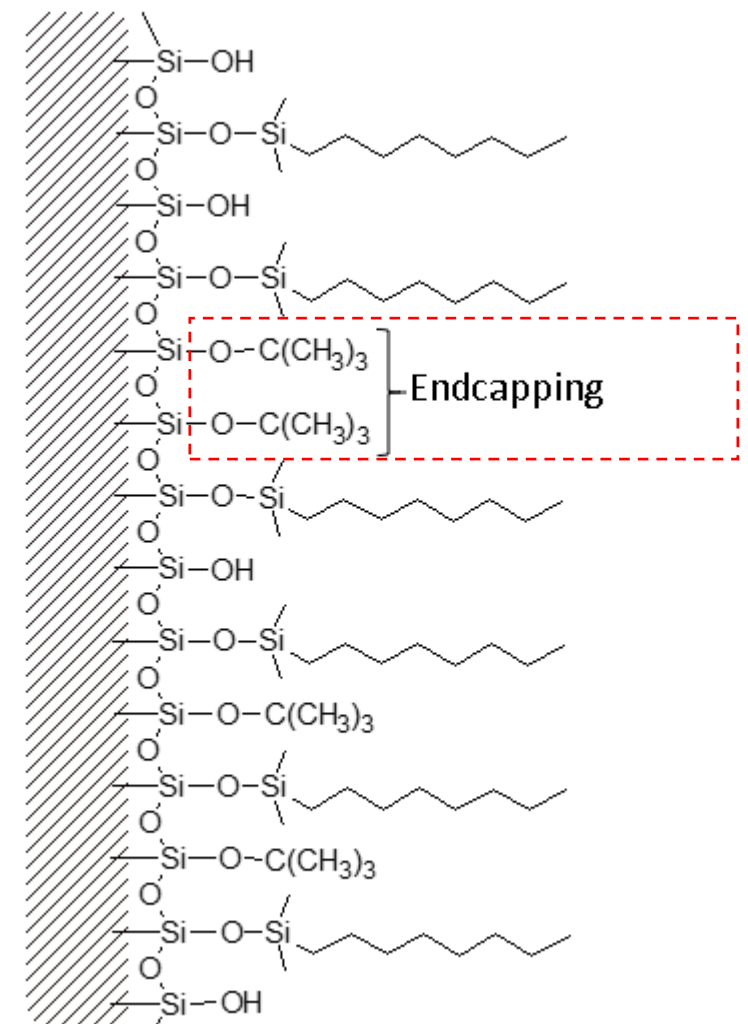
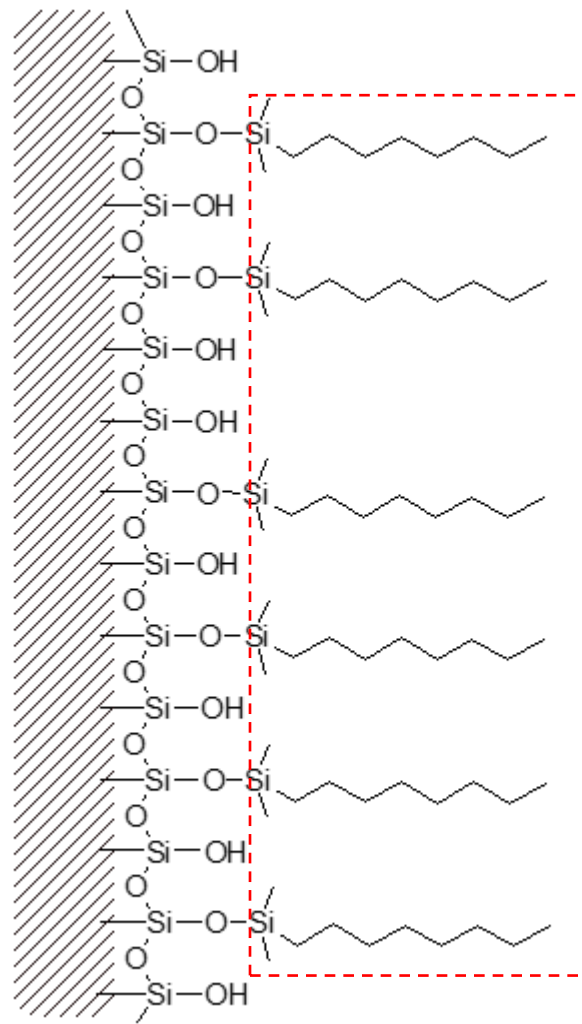
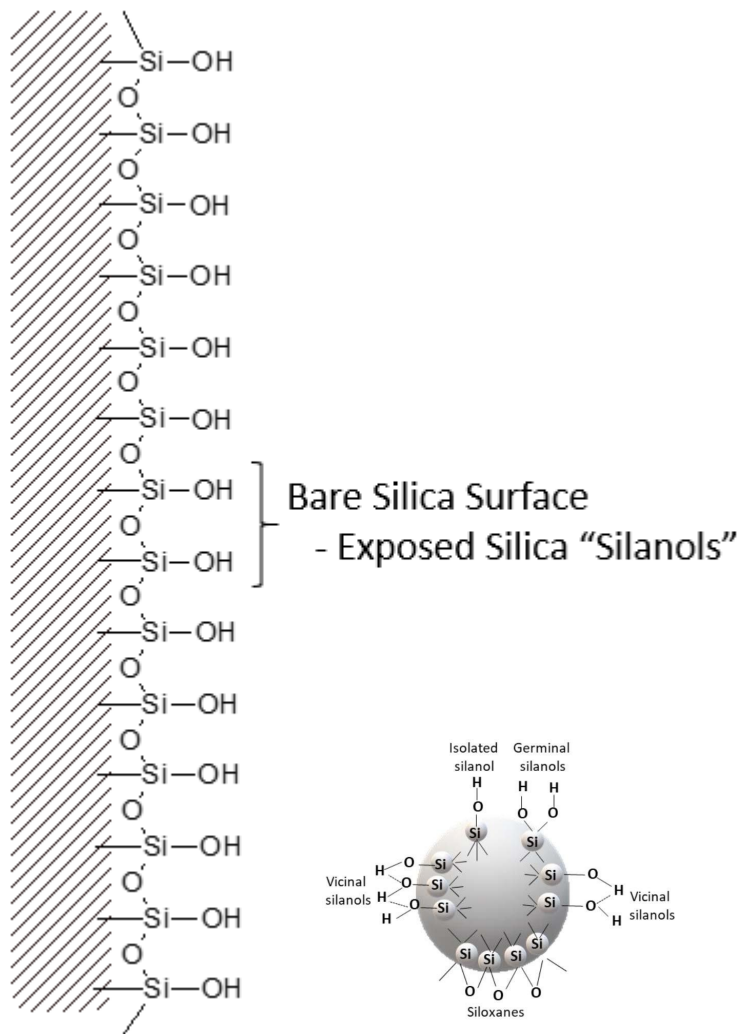
- Reverse-phase column (RPC)
- Normal-phase column (NPC)
- Ion-exchange column (IEC)
- Size-exclusion column (SEC)
- Affinity column (AC)



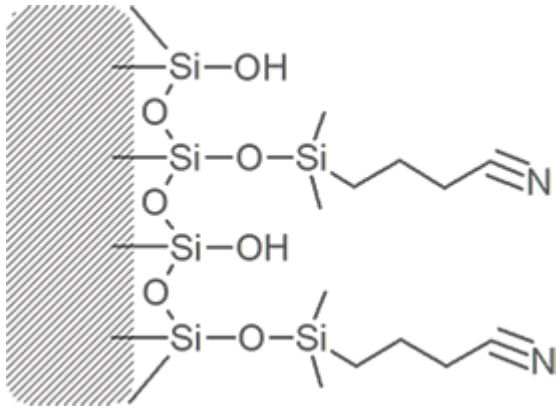


Traditional HPLC columns are packed with porous silica particles

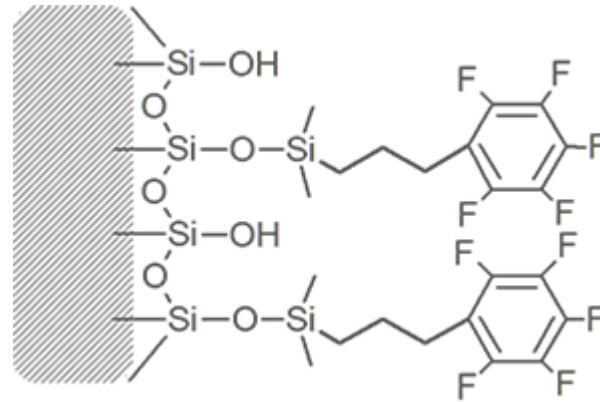
The Chemistry of Bonded Phases



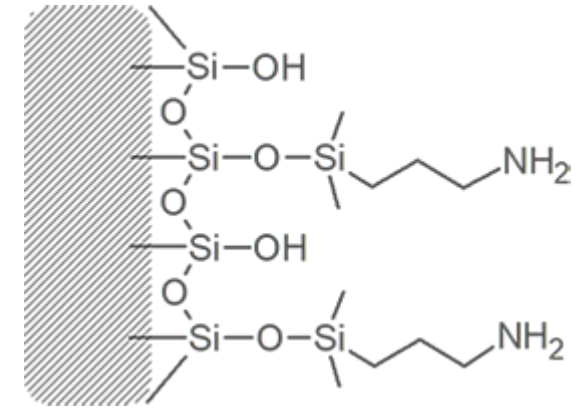
Normal phase



Cyano propyl

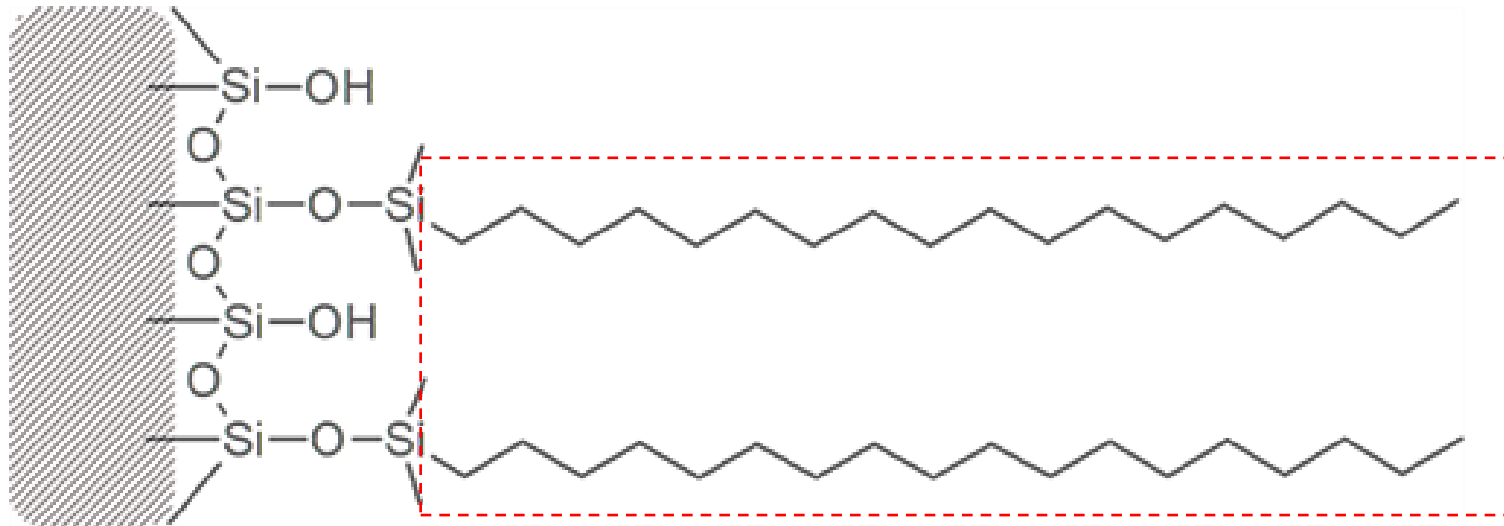


Pentafluorophenyl propyl

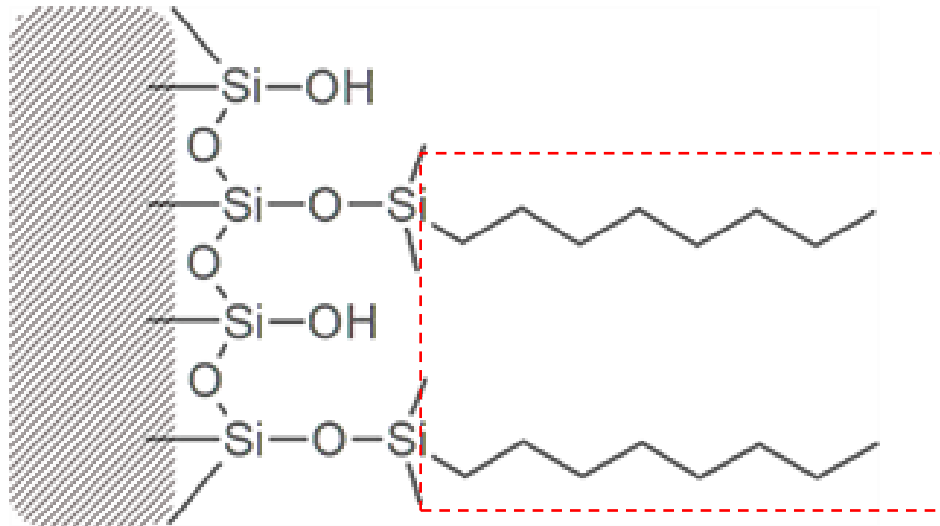


Amino propyl

Reverse phase

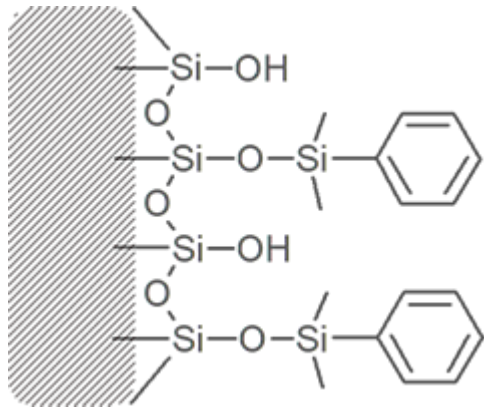


C18

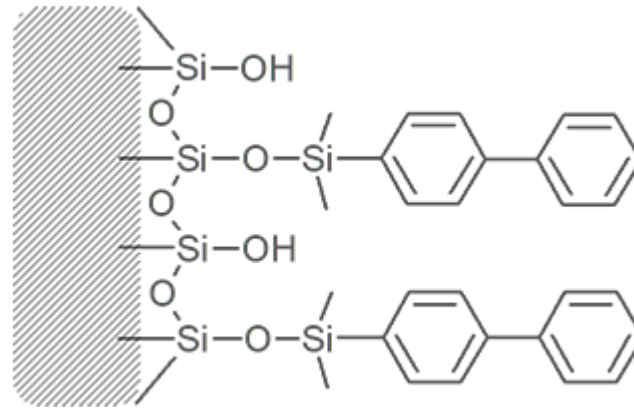


C8

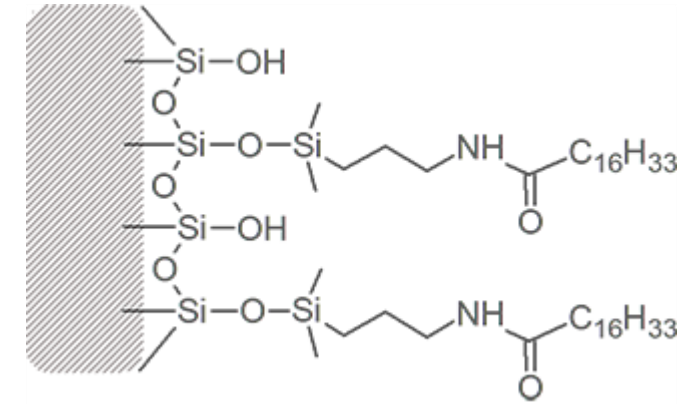
Reverse phase



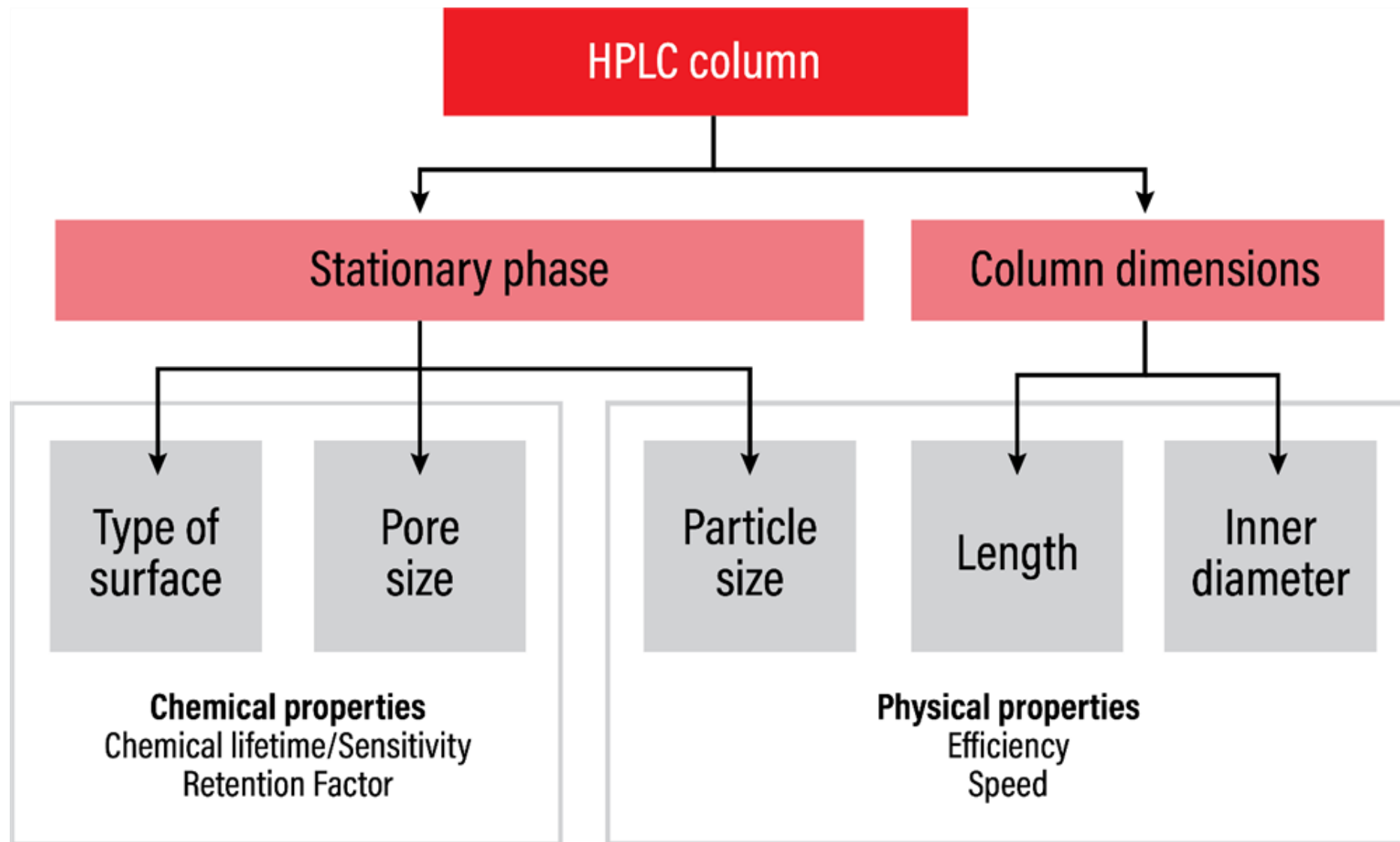
Phenyl

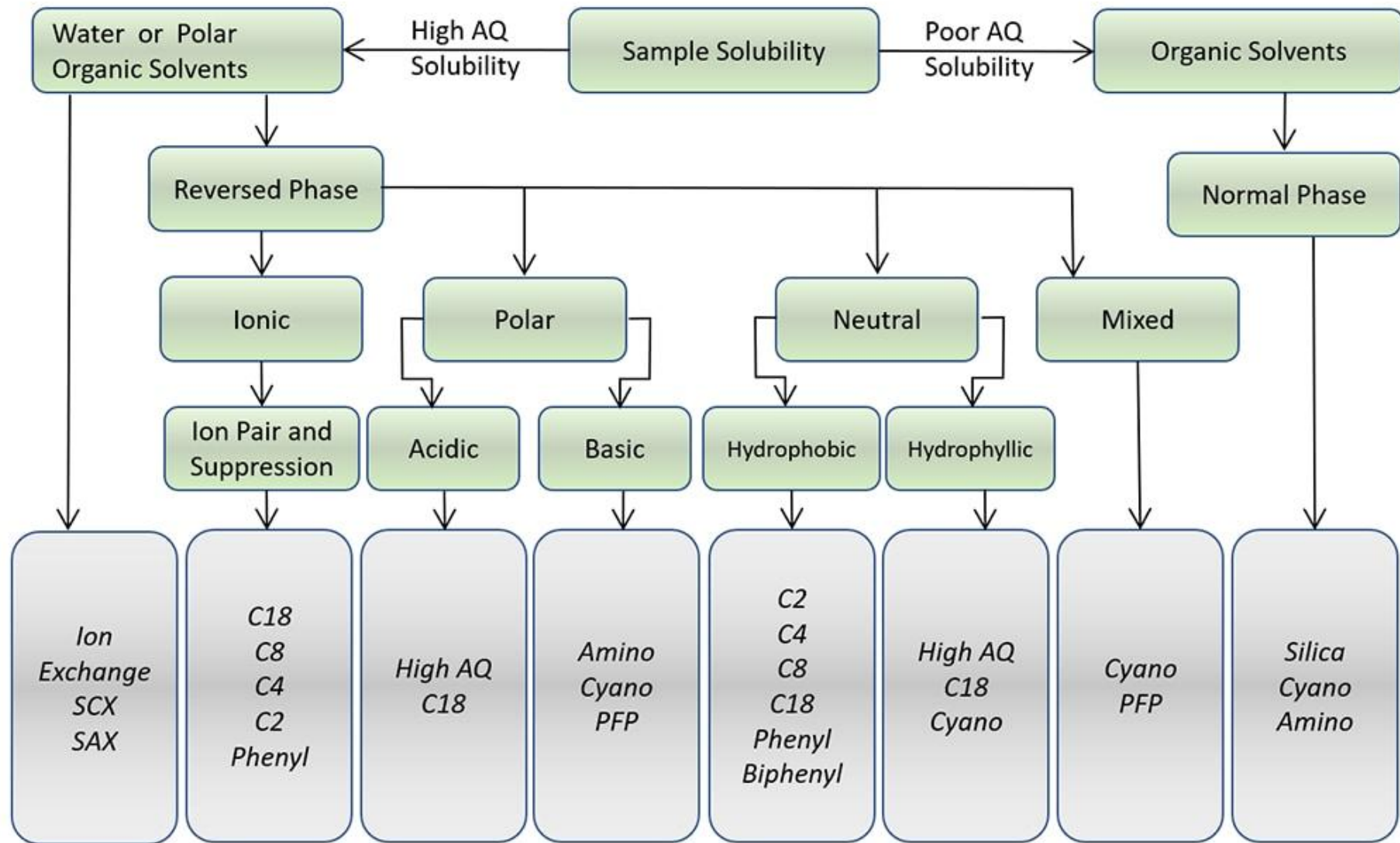


Biphenyl

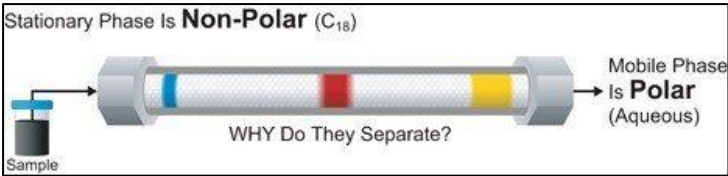
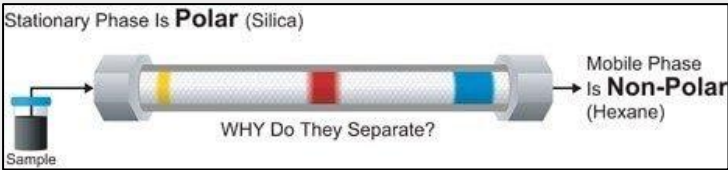
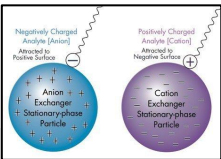


Alkyl amide



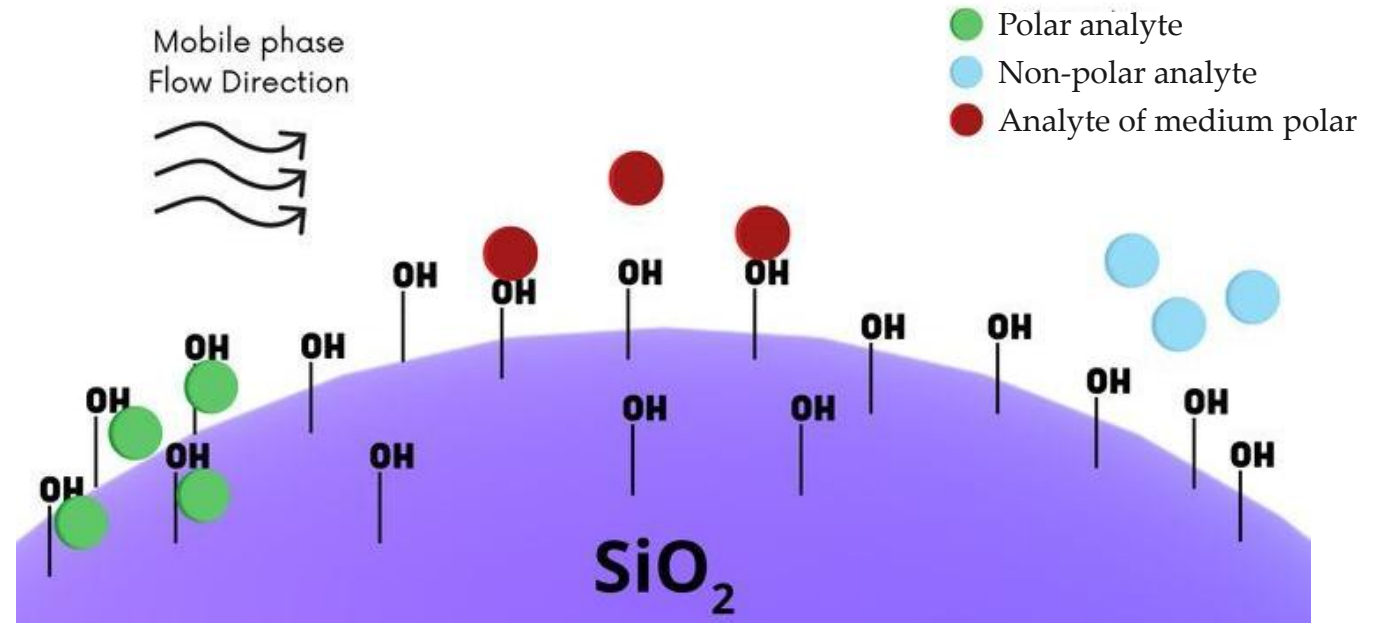
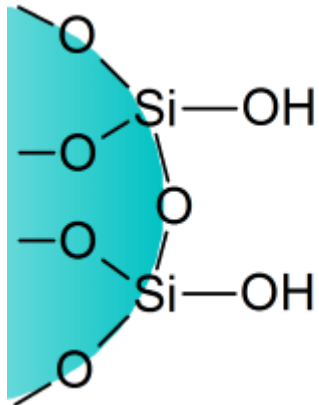


<https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-basics/index.html>

Column Types	Stationary Phase	Mobile Phase	Application
Reverse-Phase	Non-polar	Polar	Versatile, applicable to a wide range of compounds
			
Normal-Phase	Polar	Non-polar	Polar compounds, natural products
			
Ion-Exchange	Charged functional groups	Ions	Charged biomolecules
			
Size-Exclusion	Porous	Any compatible solvent	Separation based on size or molecular weight
Affinity	Ligand-specific interaction	Any compatible solvent	Purification and analysis of biomolecules

Normal phase column

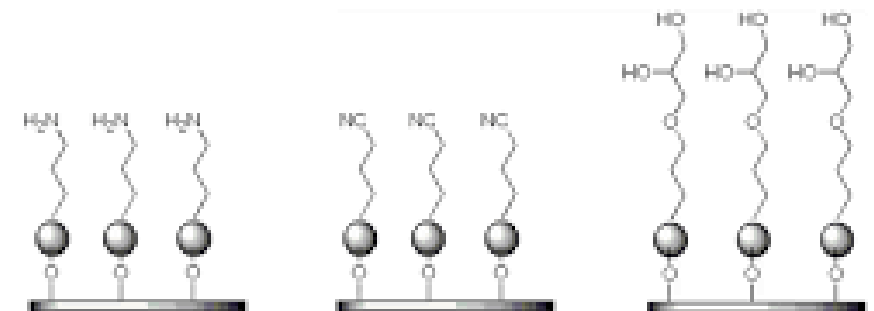
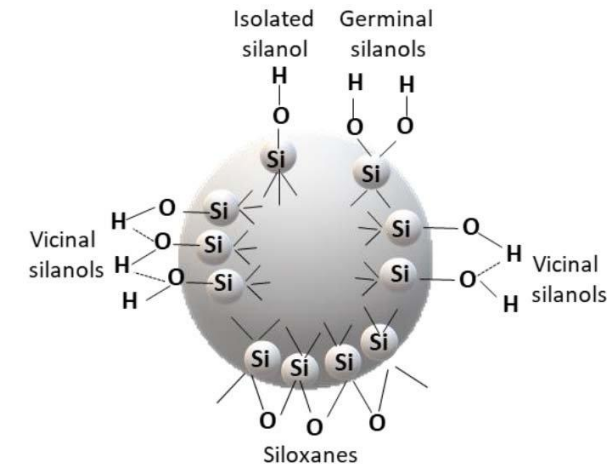
- SP มีสภาพความเป็นขั้วมากกว่า MP
- หลักการแยกอาศัยความมีขั้วของสาร
- สารที่มีขั้วจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับ SP (ชอบ SP, จึงถูกหน่วงไว้นาน)
- สารที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้วจะเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับ MP (ไม่ชอบ SP, ไม่ถูกหน่วงไว้นาน)
- สารที่มีขั้วจะถูกชะออกจากคอลัมน์ช้ากว่าสารที่ไม่มีขั้ว.



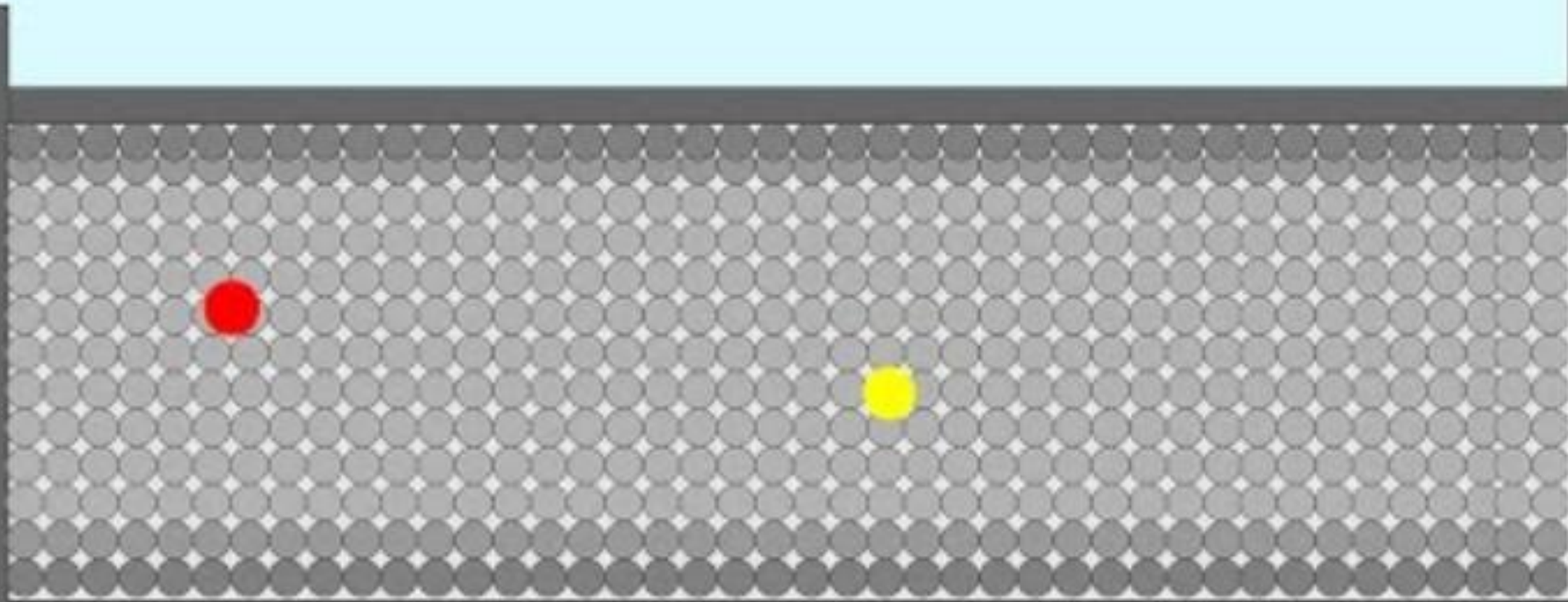
<https://learnaboutpharma.com/hplc-columns-definition-principle-types-and-maintenance>

Normal phase column

- SP เป็นตัวดูดซับอนินทรีย์ เช่น silica, alumina หรือสารที่มีขั้วปานกลางมาเกิดพันธะ (bonded phases) กับตัวดูดซับซิลิกา เช่น aminopropyl, nitrophenyl, diol
- การหน่วง (retention) จะเพิ่มขึ้นเมื่อสภาพขั้วของสารสูง จะถูกดูดซับไว้ได้นานบนพื้นผิว
- NPC ใช้ในการแยกโมเลกุลขนาดเล็ก กรดอินทรีย์ ยา
- NPC เหมาะสำหรับการแยกสารที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และมีโครงสร้างที่เป็นไอโซเมอร์กัน



HPLC - Normal Phase vs Reverse Phase



Advantages & Disadvantages

Advantages:

- Very versatile; can be used to separate a wide range of compounds
- High resolution
- Good selectivity

Disadvantages:

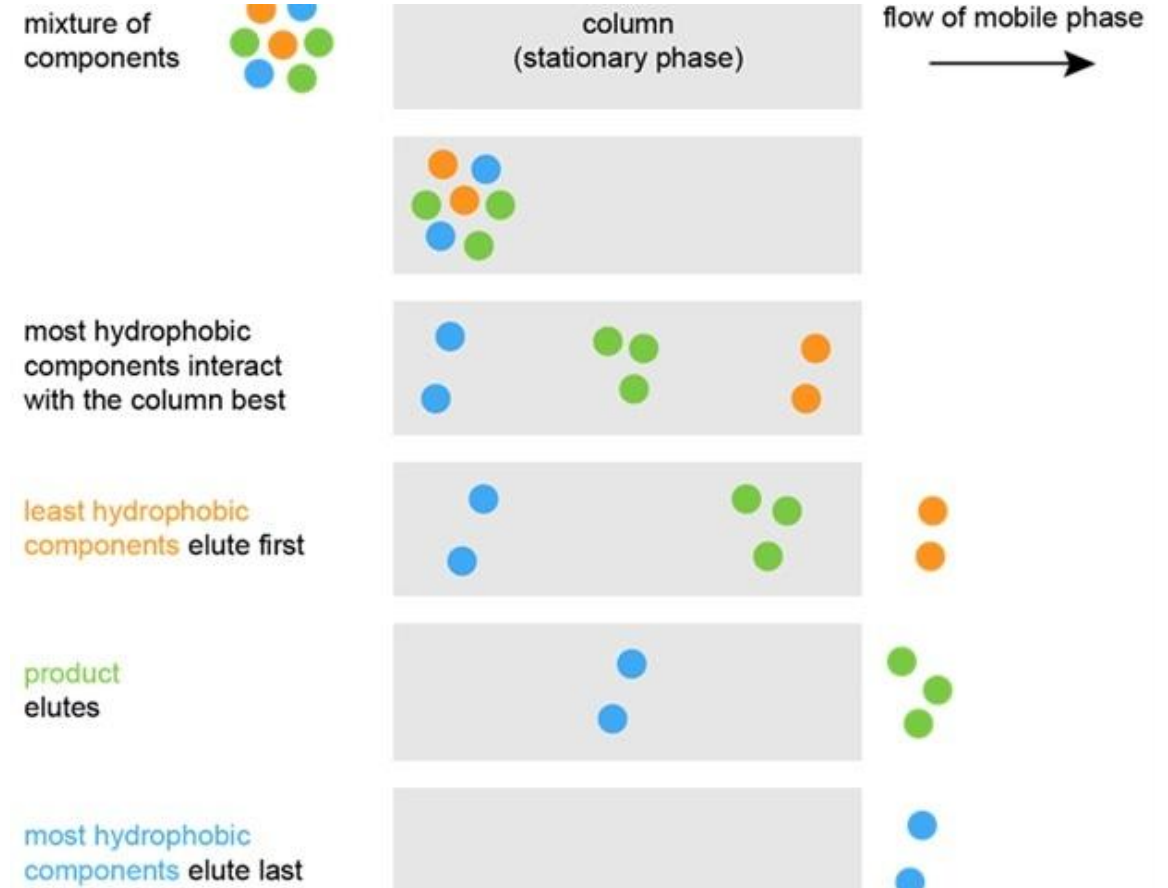
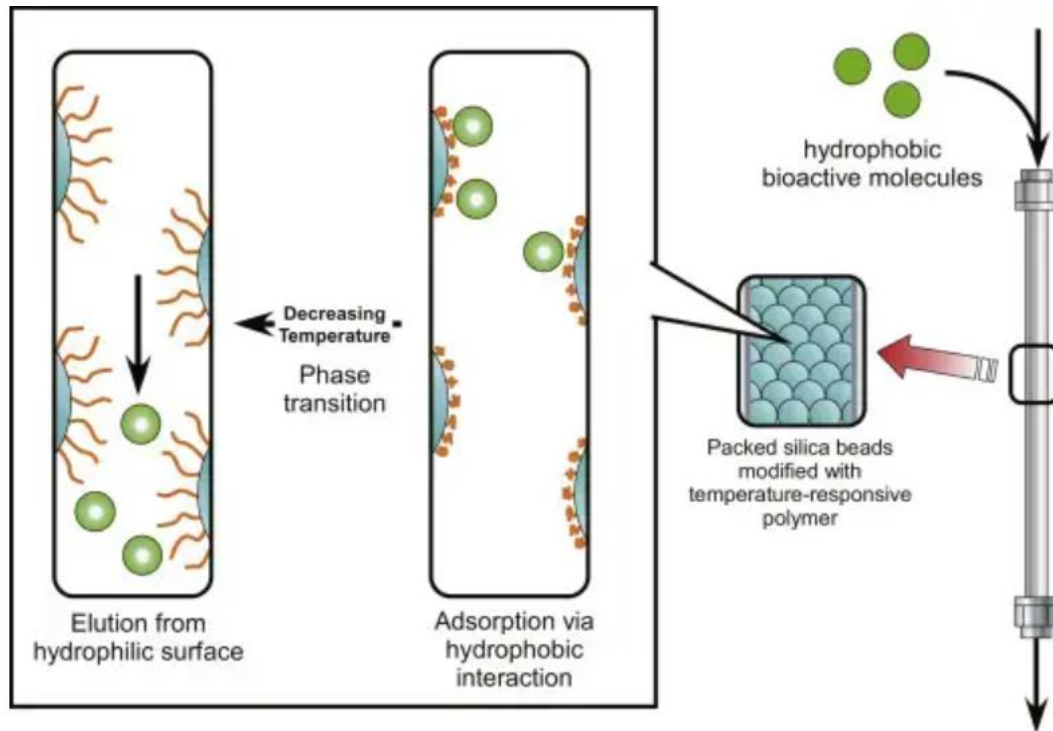
- Can be difficult to use; requires careful control of the MP composition and pH
- Susceptible to column fouling
- Not as compatible with aqueous MP as reverse phase columns

NPC picked-up

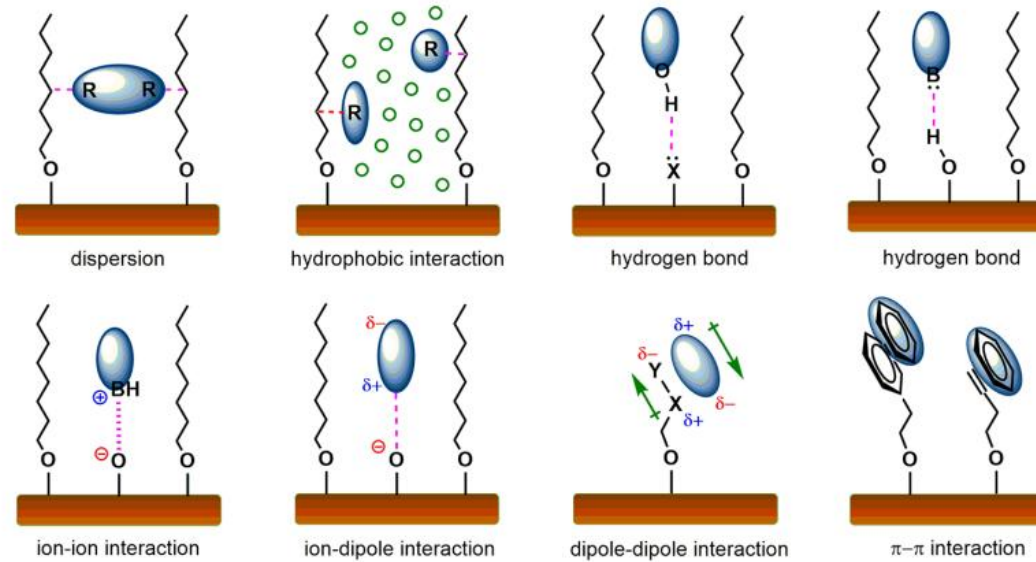
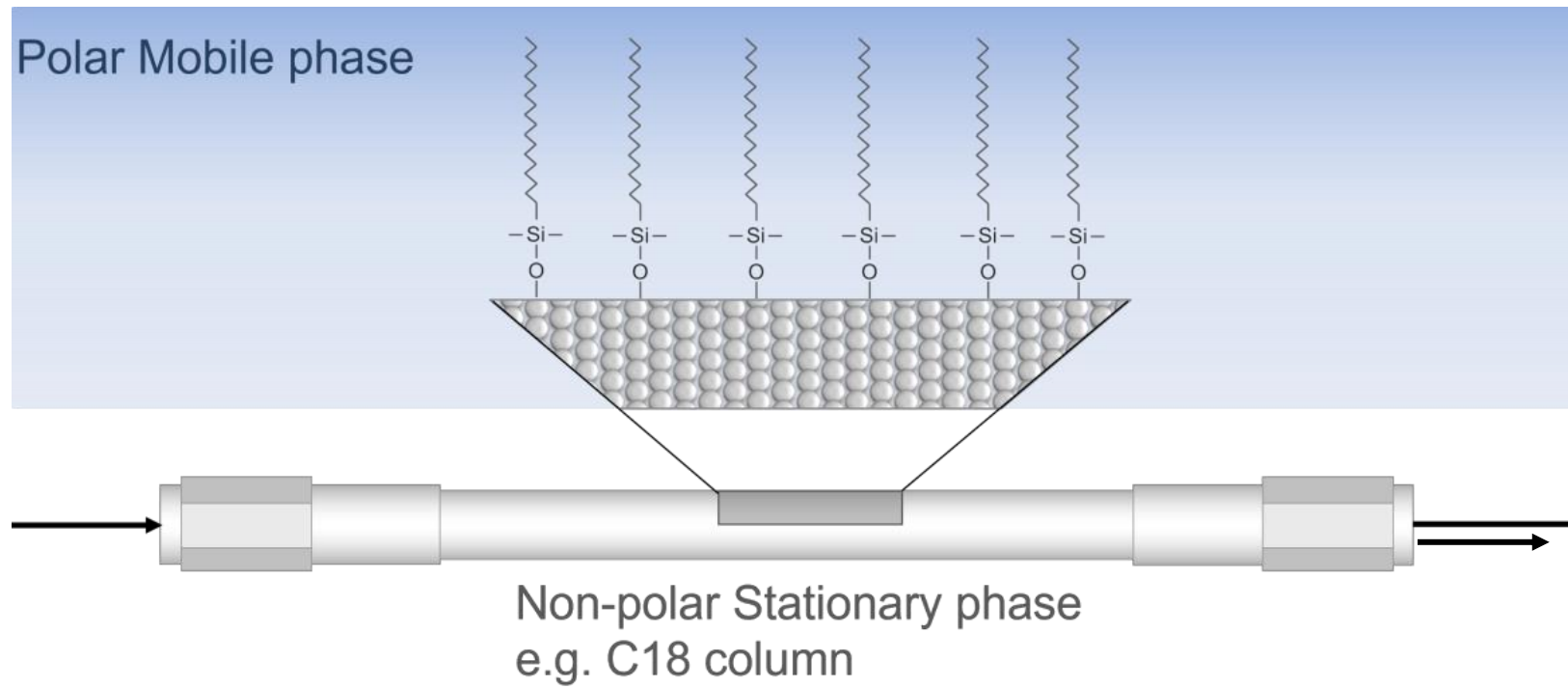
- The polarity of the compounds to be separated
- The desired resolution and selectivity
- The compatibility of the column with the mobile phase to be used
- The cost of the column

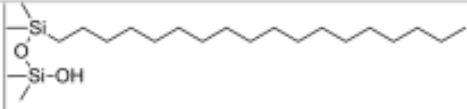
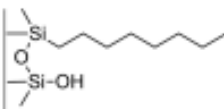
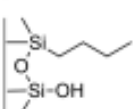
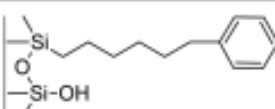
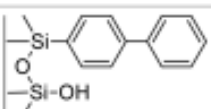
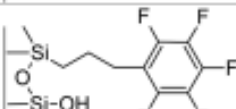
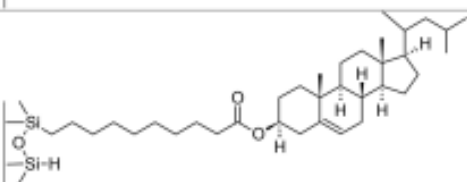
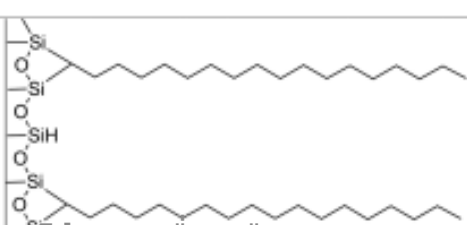
Reverse phase column

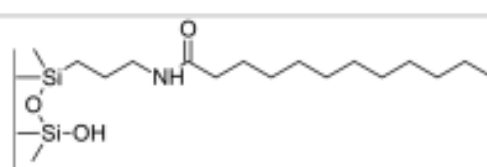
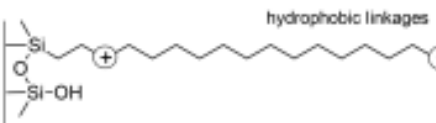
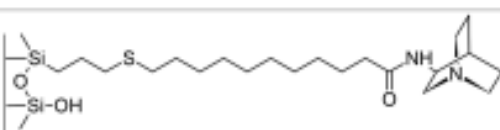
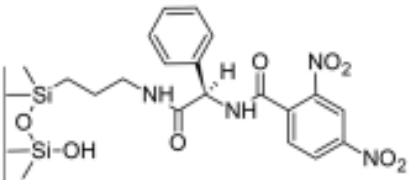
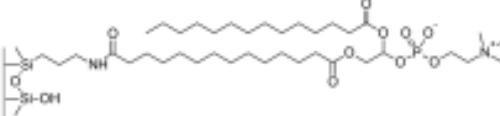
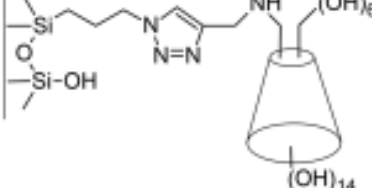
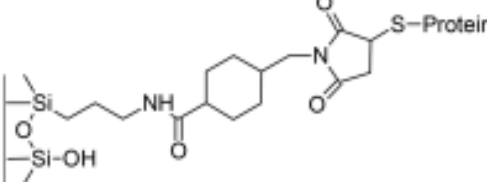
The stationary phase is usually an inert hydrocarbon that is interacting just with **hydrophobic solute**

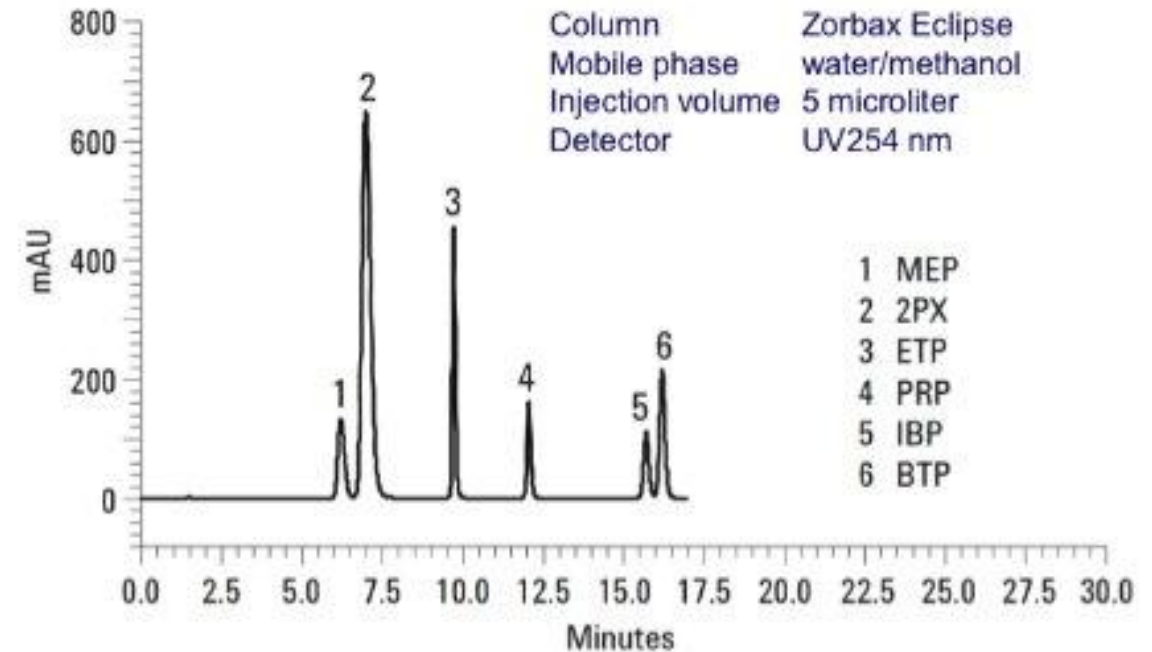
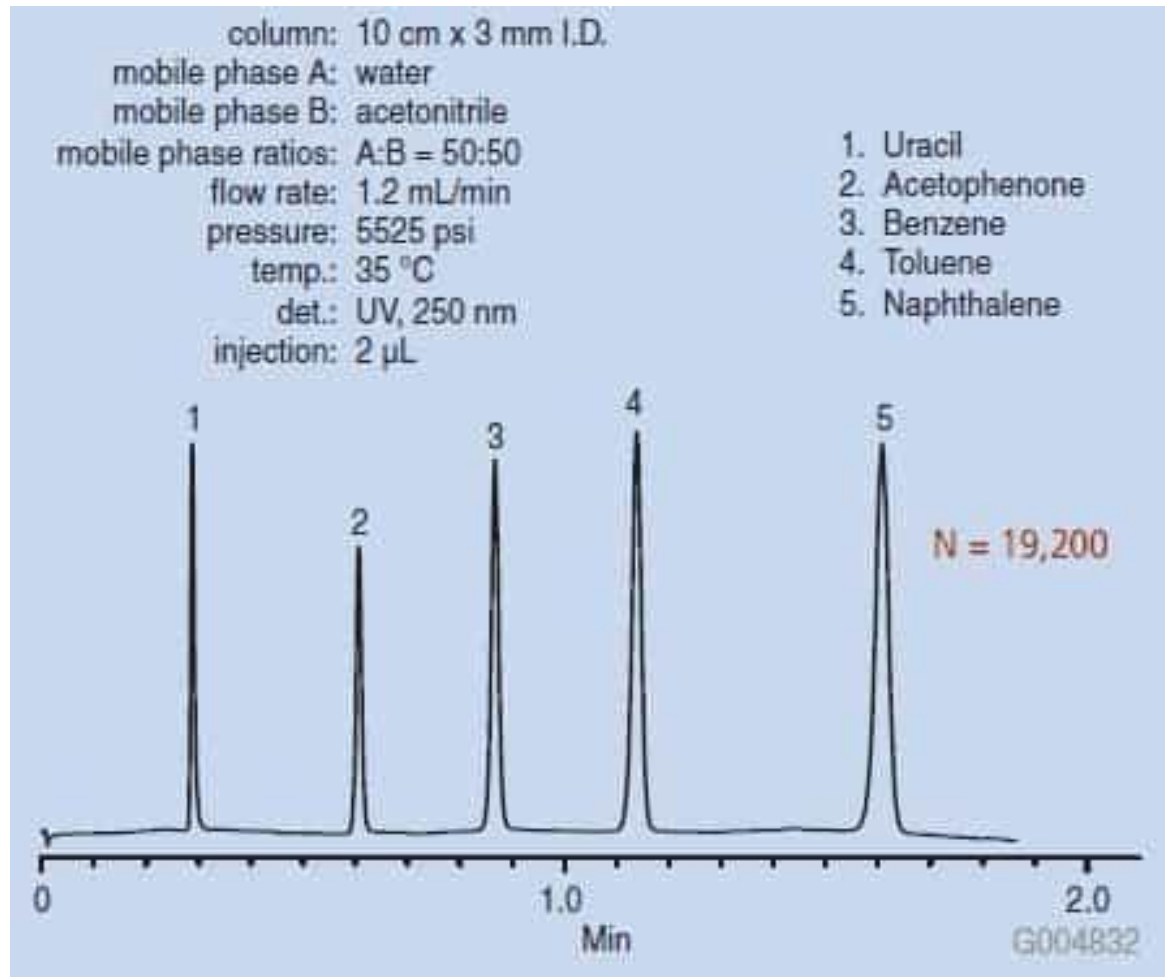


<https://biologynotesonline.com/reversed-phase-chromatography>



Stationary phase	Molecular structure ^a	Separation targets
Alkyl-bonded (C18, C8, C4)		Hydrophobic and moderately polar compounds, urinary steroids, polar and non-polar lipids, sulfonic acids
		
		
Phenyl-hexyl		Phenolic compounds, hydrocarbons, drug molecules
Biphenyl-silica		Aromatics, mycotoxins
FluoroSep-RP Phenyl		Halogenated aromatics, PAHs, vanillin analogues
Cholesterol hydride		Pharmaceutically related compounds, tetracyclines, steroids, catecholamines
Bidentate C18 hydride		

Stationary phase	Molecular structure ^a	Separation targets
N-acylamide phase		Estradiol diastereoisomers
Mixed mode		Hydrophilic and hydrophobic analytes, peptides, chlorpyrifos metabolites, markers in urine samples, fungal metabolites
		
Pirkle-type chiral phase		Drugs, pesticides, alcohols, amino acids
Immobilized artificial membrane, IAM		β -adrenolytic drugs, drug-membrane interactions
Click β -cyclodextrin		Nucleosides, oligosaccharides
Maleimide-modified human serum albumin (HSA) phase		Chiral solutes such as D, L-tryptophan, R/S-warfarin, R/S-ibuprofen



HPLC chromatogram for analysis of parabens.

Advantages & Disadvantages

Advantages:

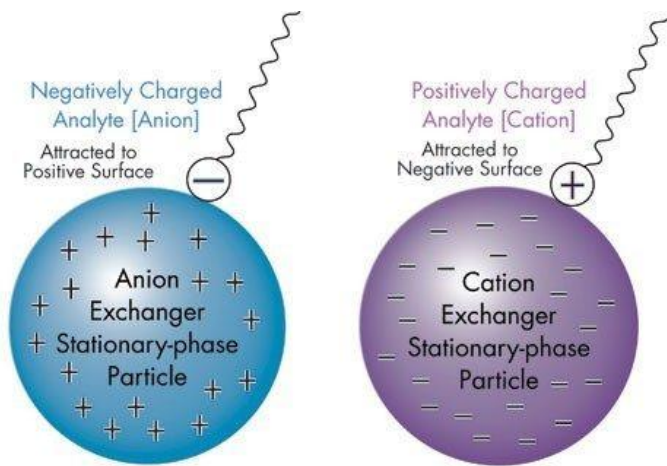
- Easy to use; do not require careful control of the mobile phase composition and pH
- Compatible with aqueous mobile phases
- Robust and durable

Disadvantages:

- Not as versatile as normal phase columns; cannot be used to separate all types of compounds
- Lower resolution and selectivity than normal phase columns

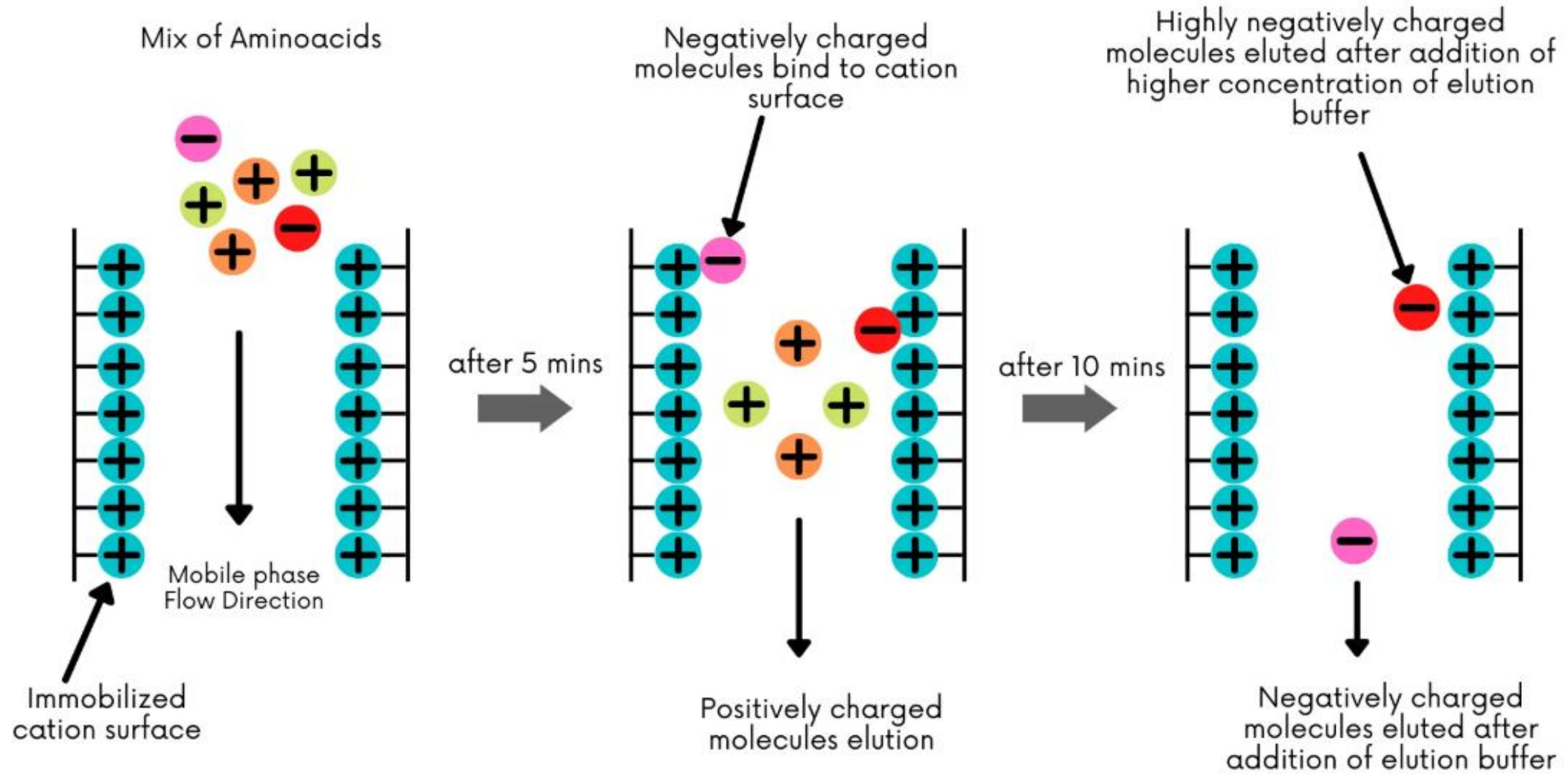
Ion-Exchange Columns

- To separation of molecules due to attractive ionic forces molecules in the analyte and the charged stationary phase.



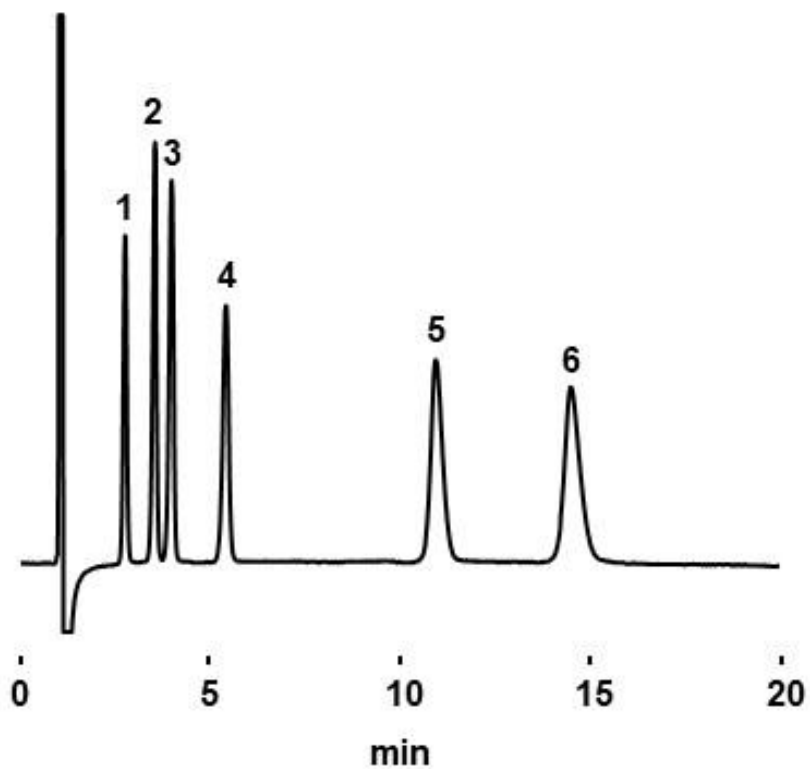
Analyte Type	Weak ACID e.g., $pK_a \sim 5$		Strong ACID	Weak BASE e.g., $pK_b \sim 10$		Strong BASE
Charge State vs. pH*	No charge at $pH < 3$	— [anion] at $pH > 7$	— [anion] Always Charged	+ [cation] at $pH < 8$	No Charge at $pH > 12$	+ [cation] Always Charged

Stationary Phase Particle	Strong Anion Exchanger	Weak Anion Exchanger e.g., $pK_a \sim 10$		Strong Cation Exchanger	Weak Cation Exchanger e.g., $pK_b \sim 5$	
Charge State vs. pH*	+ Always Charged	+ at $pH < 8$	No Charge at $pH > 12$	— Always Charged	No Charge at $pH < 3$	— at $pH > 7$
Mobile Phase pH Range						
to Retain analyte [capture]	$pH > 7$	$pH < 8$		$pH < 8$	$pH > 7$	
to Release analyte [elute]	$pH < 3$	$pH > 12$		$pH > 12$	$pH < 3$	

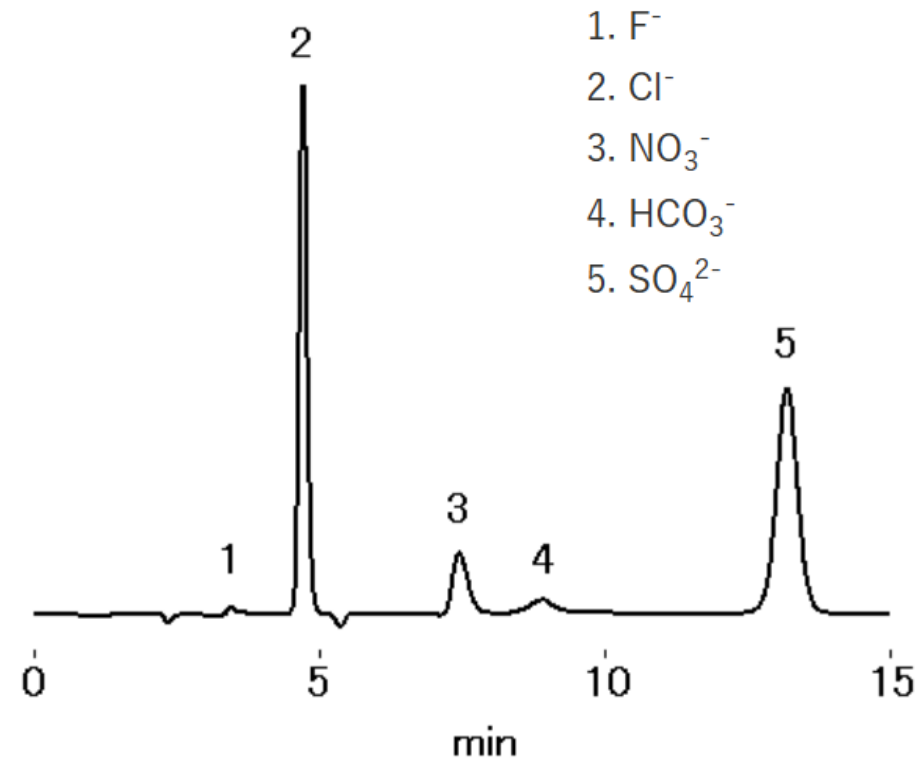


Column : Shodex IC SI-90 4E (4.0 mm I.D. x 250 mm)
Eluent : 1.8 mM Na_2CO_3 + 1.7 mM NaHCO_3 aq.
Flow rate : 1.5 mL/min
Detector : Suppressed conductivity
Column temp. : 30 °C

Column : Shodex IC SI-90 4E (4.0 mm I.D. x 250 mm)
Eluent : 1.8 mM Na_2CO_3 + 1.7 mM NaHCO_3 aq.
Flow rate : 1.0 mL/min
Detector : Suppressed conductivity
Column temp. : 25 °C

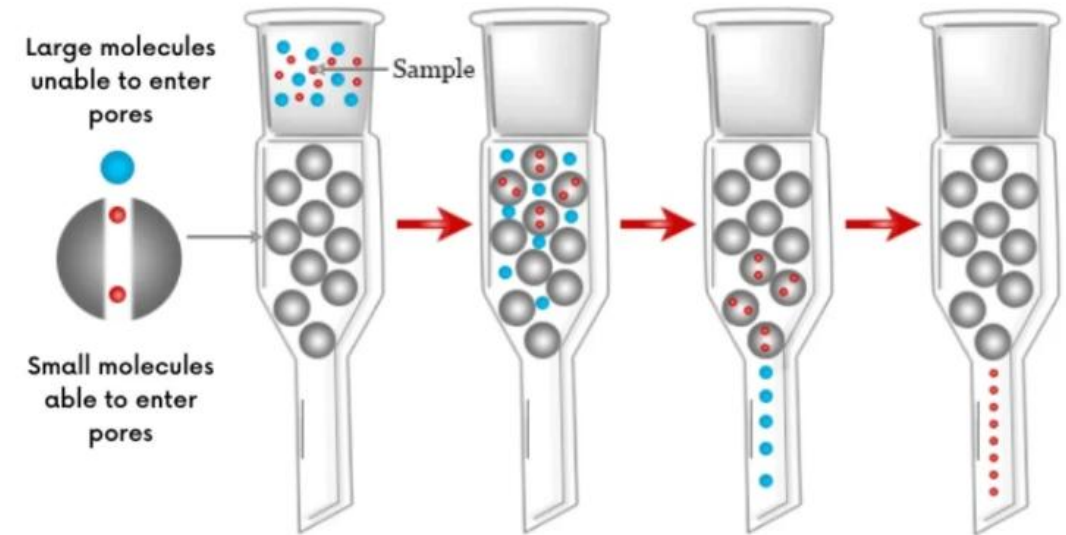


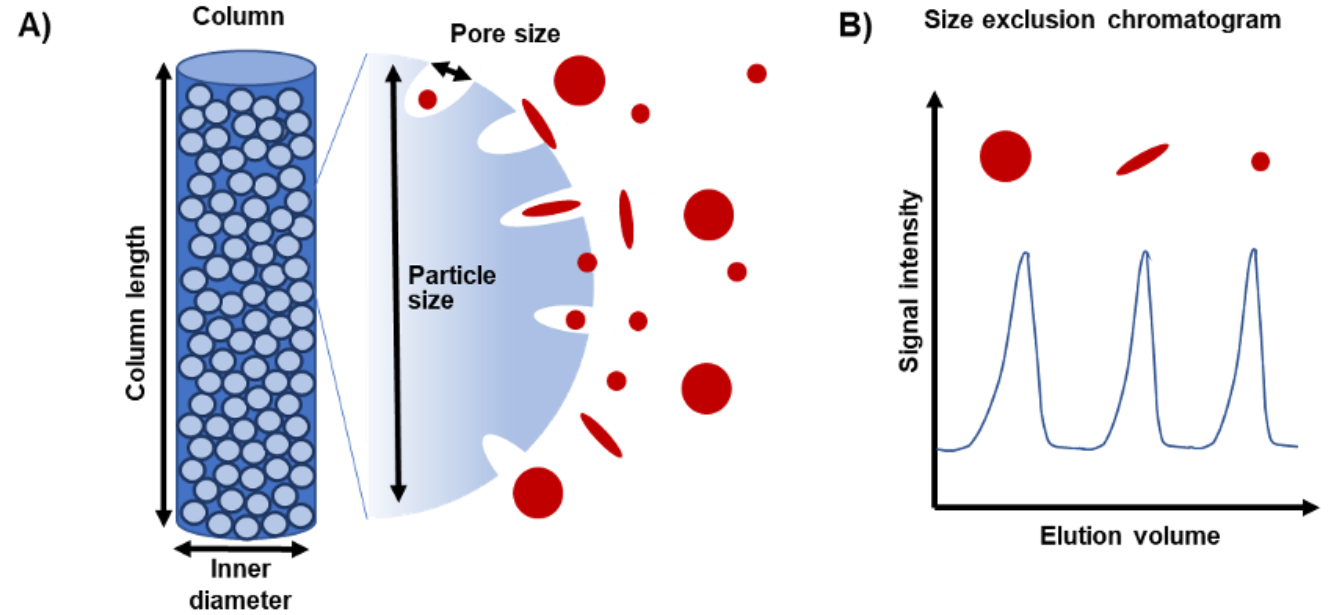
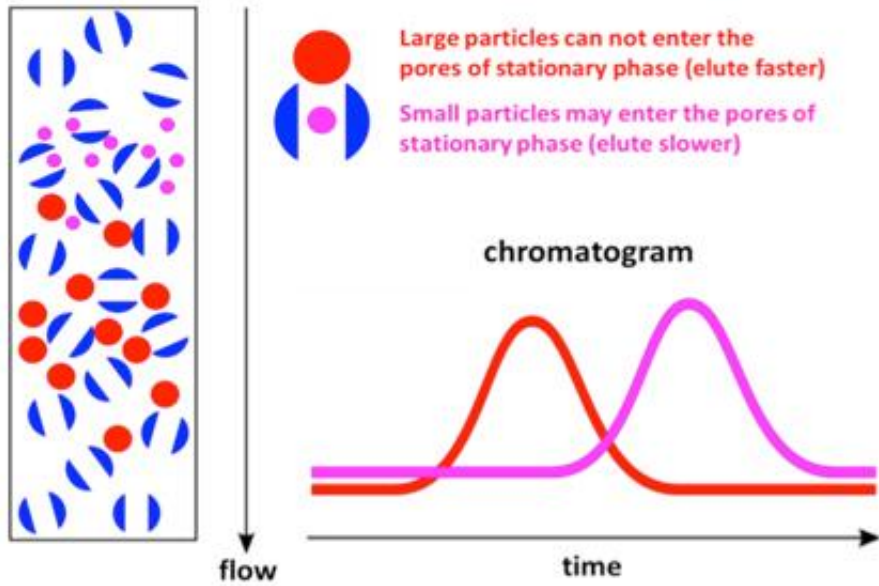
Sample : Mineral water, 20 μL



Size-Exclusion Columns

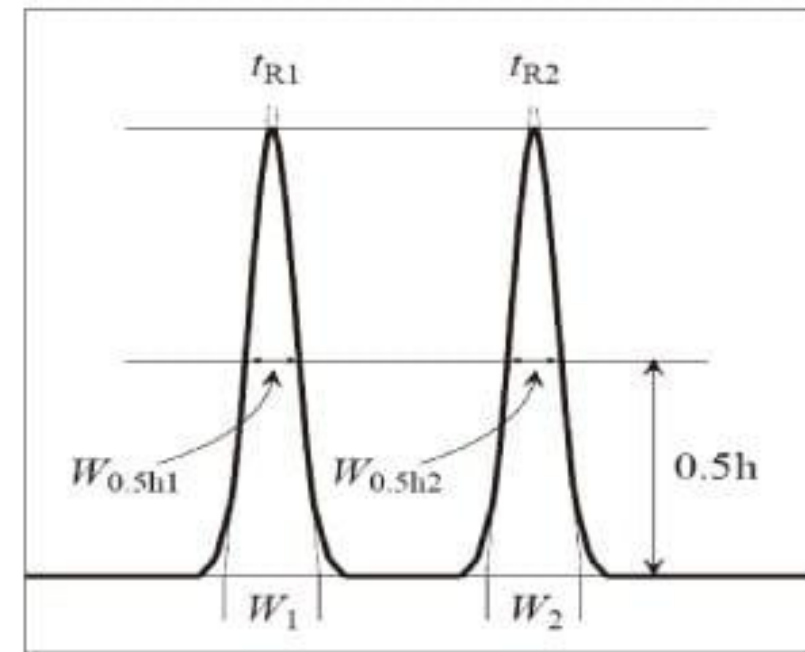
- The combination of polymers like polysaccharides and silica
- Do not rely on interaction with the analyte components but rather utilize sieving effect based on molecular weight of the analyte components.
- The molecules diffusing into the pores and retain.
- Too large molecules to enter the pores pass through the column rapidly, eluting as a single peak.





ประสิทธิภาพการแยก

- ตัวชี้วัดการกระจายตัวของแถบสารที่สนใจ ขณะที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์จนกระทั่งถึงระบบตรวจวัดในเครื่อง HPLC
- (ในอุดมคติ) พิกโครมาโทกราฟีควรมีลักษณะเป็นเส้นบางคมคล้ายเส้นดินสอ
- (ในความเป็นจริง) ผลจากการกระจายตัว (dispersion effects) ทำให้พีกมีรูปร่างโค้งมน และแผ่กว้างออกกลายเป็นรูปร่างแบบ Gaussian

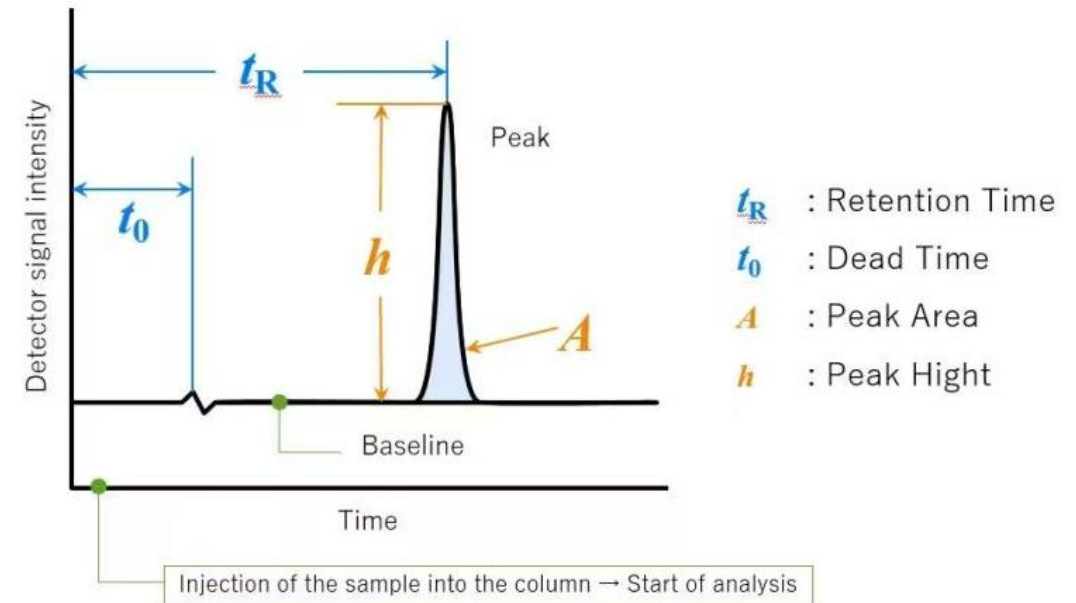


t_{R1}, t_{R2} : Retention time for each peak ($t_{R1} < t_{R2}$)
 $W_{0.5h1}, W_{0.5h2}$: Full width at half maximum (FWHM) of each peak
 W_1, W_2 : Width of each peak

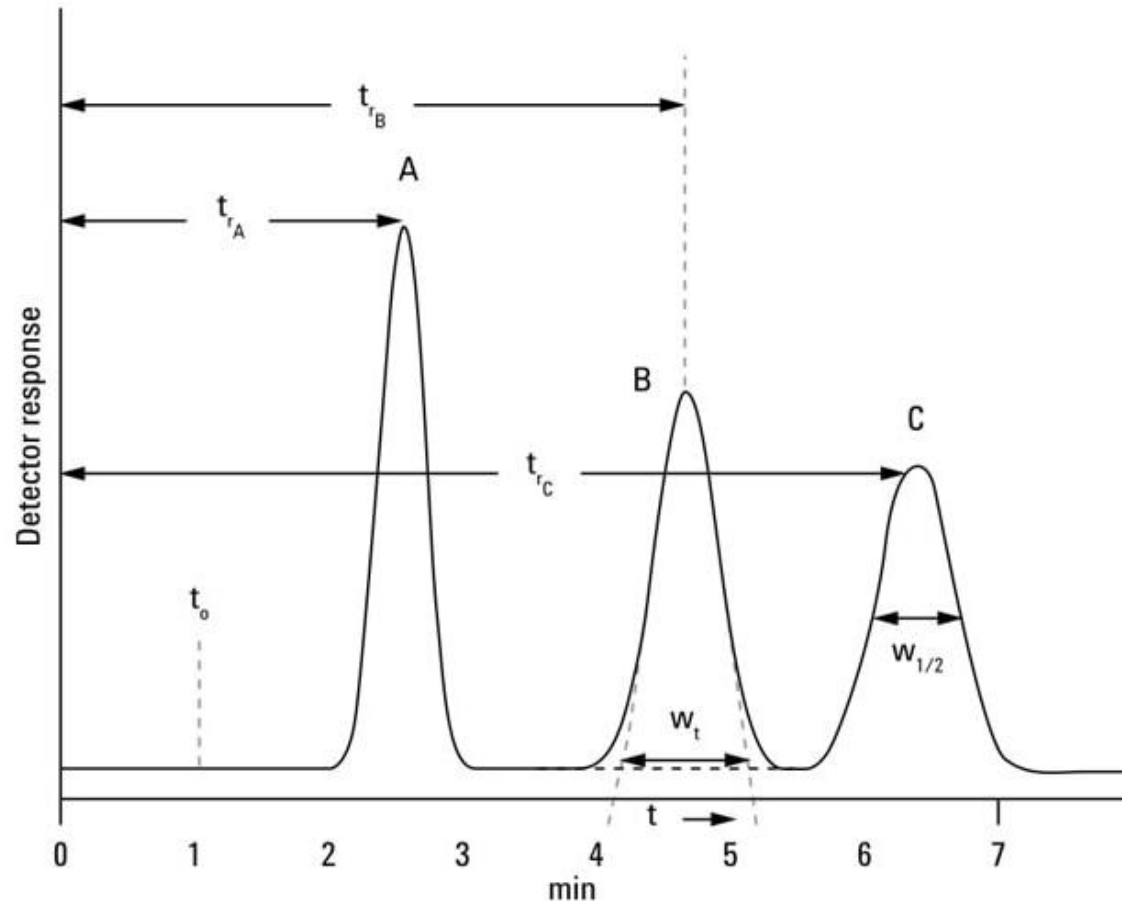
Fig. 1 Two Adjacent Peaks

โครมาโทแกรม

- พีก (peaks) พีกแทนสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกจากกัน ความสูงและพื้นที่ใต้พีกสัมพันธ์กับปริมาณสารในตัวอย่าง
- เวลาการหน่วง (retention time, t_R) คือเวลาที่ใช้ตั้งแต่การฉีดสารตัวอย่างจนกระทั่งสารแต่ละตัวถูกตรวจวัดที่ตัวตรวจวัด
- Dead time หรือ hold-up time (t_0) คือ ระยะเวลาที่ MP ใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์โดยไม่มีการกักเก็บสารใด ๆ ในคอลัมน์



โครมาโทแกรม



Chromatographic illustration of efficiency, retention factor and resolution

t_R = the time interval between sample injection point and the apex of the peak

t_0 = dead time

h = (peak height) vertical distance between a peak's apex and the baseline

A = (peak area) (A) the area enclosed by the peak and baseline

ประสิทธิภาพการแยก : Parameters

- 1) **theoretical plate (N)** เป็นค่าที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ ค่า N มากแสดงถึงประสิทธิภาพในการแยกดี
- 2) **capacity factor (k')** เป็นค่าที่แสดงว่าสารถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด
- 3) **tailing factor (T)** เป็นค่าที่บอกถึงลักษณะพีคของสารว่ามีความสมมาตรมากน้อยเพียงใด
- 4) **resolution (R_s)** เป็นค่าที่แสดงว่าพีคของสารสองพีคที่อยู่ติดกัน แยกออกจากกันมากน้อยเพียงใด

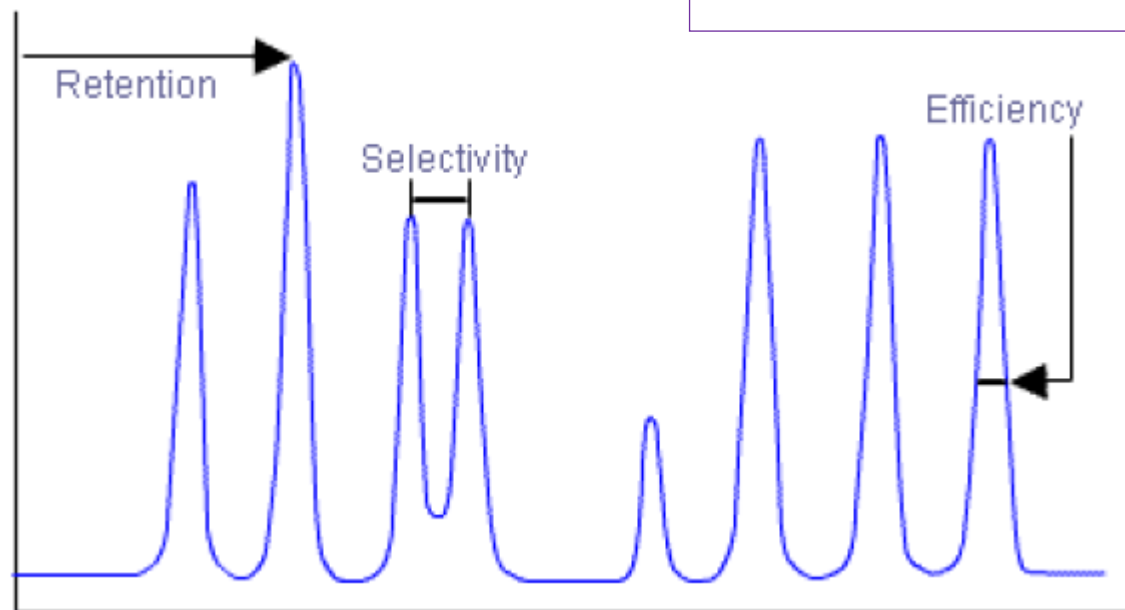
Parameter	US FDA guideline
N	>2000
k'	>2
T	≤2
R_s	>2

ประสิทธิภาพการแยก : Parameters

$$R_s = \underbrace{1/4\sqrt{N}}_{\text{Efficiency}} \times \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{Selectivity}} \times \underbrace{\frac{k}{1+k}}_{\text{Retention}}$$

จำนวนเพลต (N)
จะบอกถึง
ประสิทธิภาพของ
คอลัมน์

เมื่อ retention
factor (k) เพิ่ม
resolution ก็
จะเพิ่มขึ้น



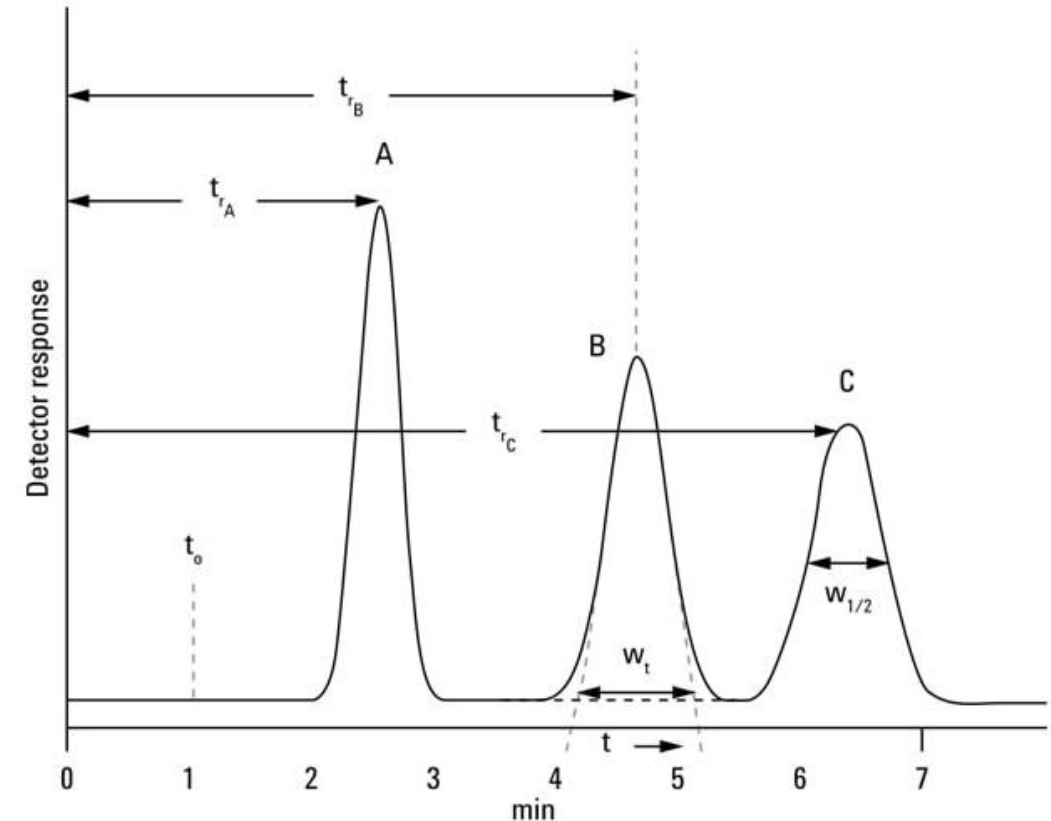
ความสามารถของคอลัมน์และ
เพลสเคลื่อนที่ที่มีผลต่อการแยกคู่
ของพีค ซึ่งจะบอกถึงการปรับ
resolution จะสัมพันธ์กับการ
ปรับองค์ประกอบของเพลส
เคลื่อนที่

ประสิทธิภาพการแยก : Resolution (R , R_s)

- R is calculated using the separation of two peaks in terms of their average peak width at the base ($t_{R2} > t_{R1}$).

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\left(\frac{w_1}{2} + \frac{w_2}{2} \right)} = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

เมื่อ t_{R1} และ $t_{R2} = t_R$ ของพีคที่ 1 และ 2
 w_1 และ w_2 = ความกว้างของฐานพีคที่ 1 และ 2

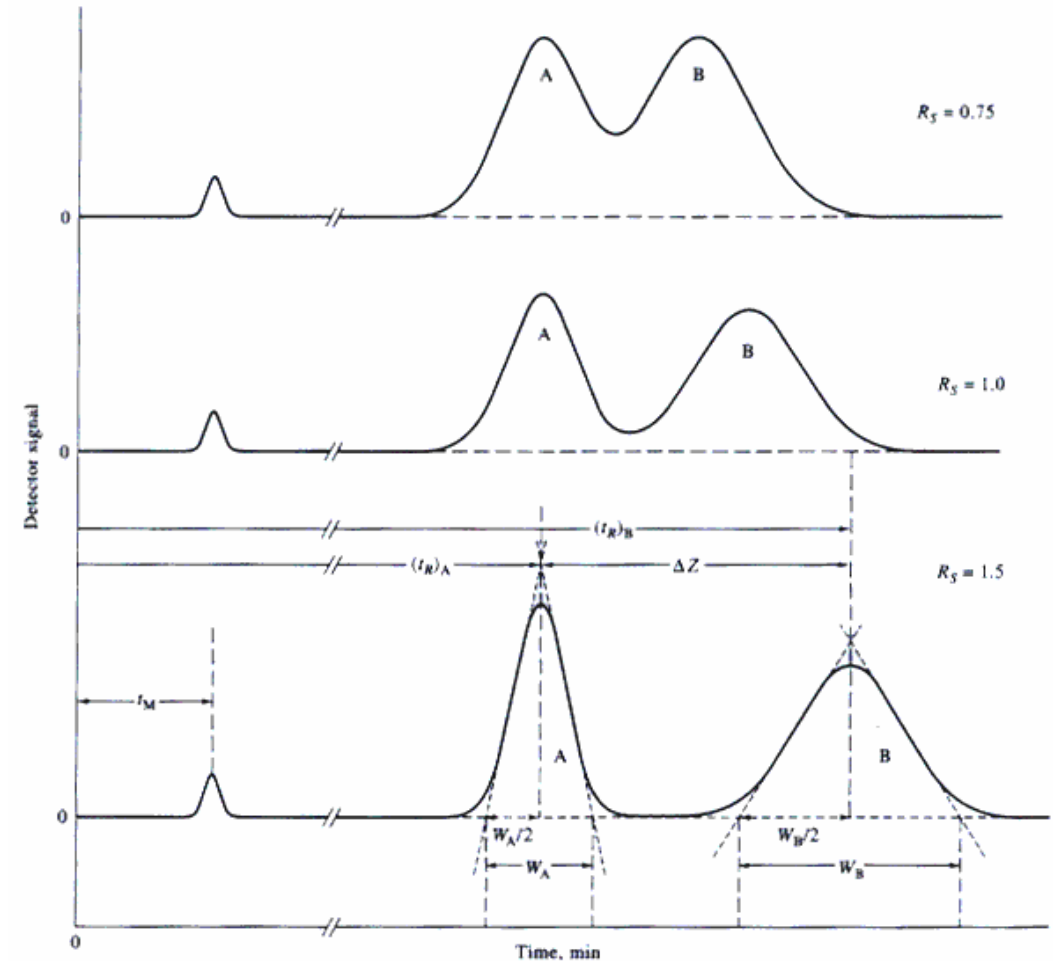
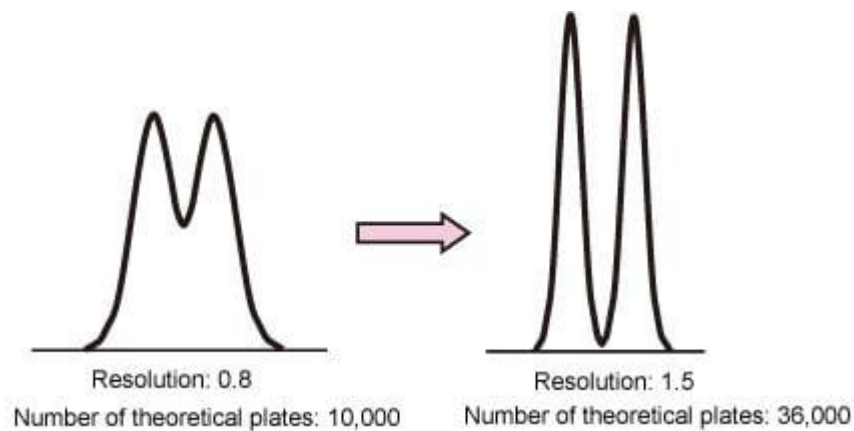


Chromatographic illustration of efficiency, retention factor and resolution

สำหรับพีคที่สมมาตรและมีค่า $R = 1$ จะมีพื้นที่พีคที่ซ้อนกันเพียง 2% ซึ่งเพียงพอสำหรับงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ ถ้าการแยกมีค่าเท่ากับ 1.5 พีคสามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์

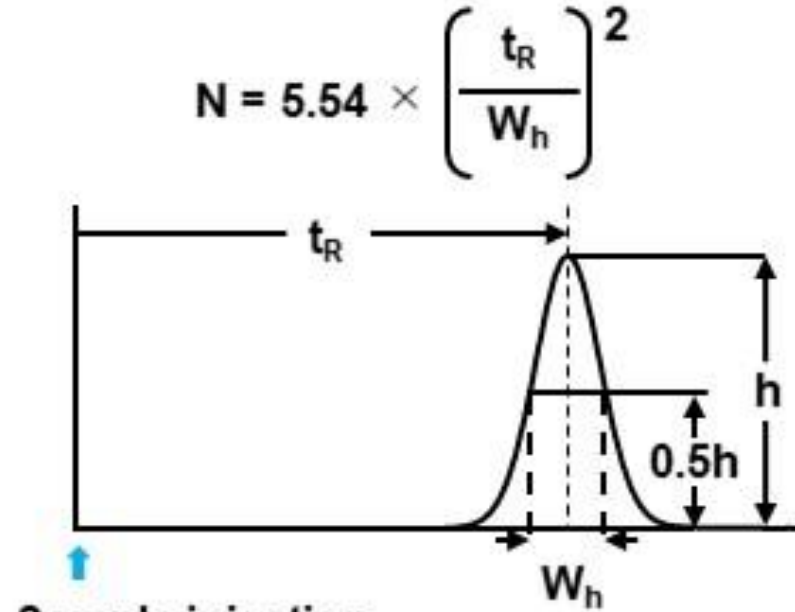
ประสิทธิภาพการแยก : Resolution (R)

A resolution value of 1.5 or greater between two peaks will ensure that the sample components are well (baseline) separated to a degree at which the area or height of each peak may be accurately measured.

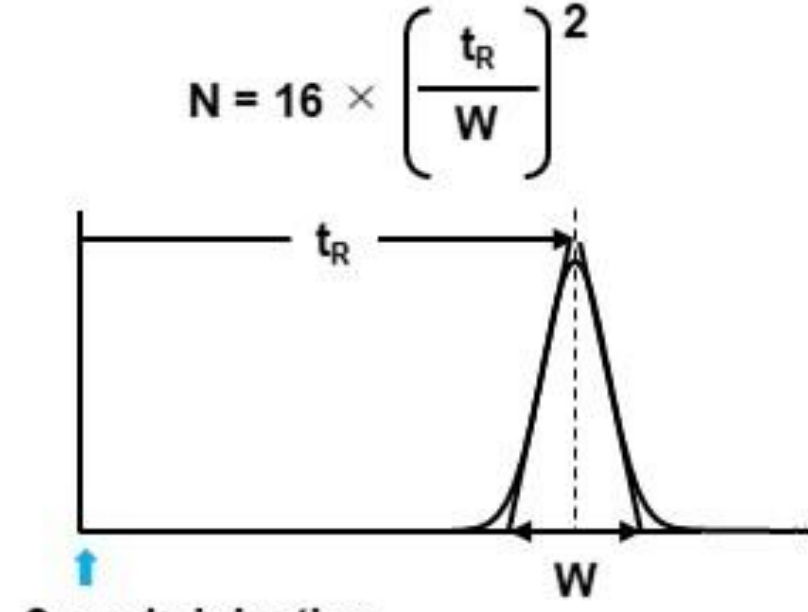


ประสิทธิภาพการแยก : Theoretical plate

[Half width method]

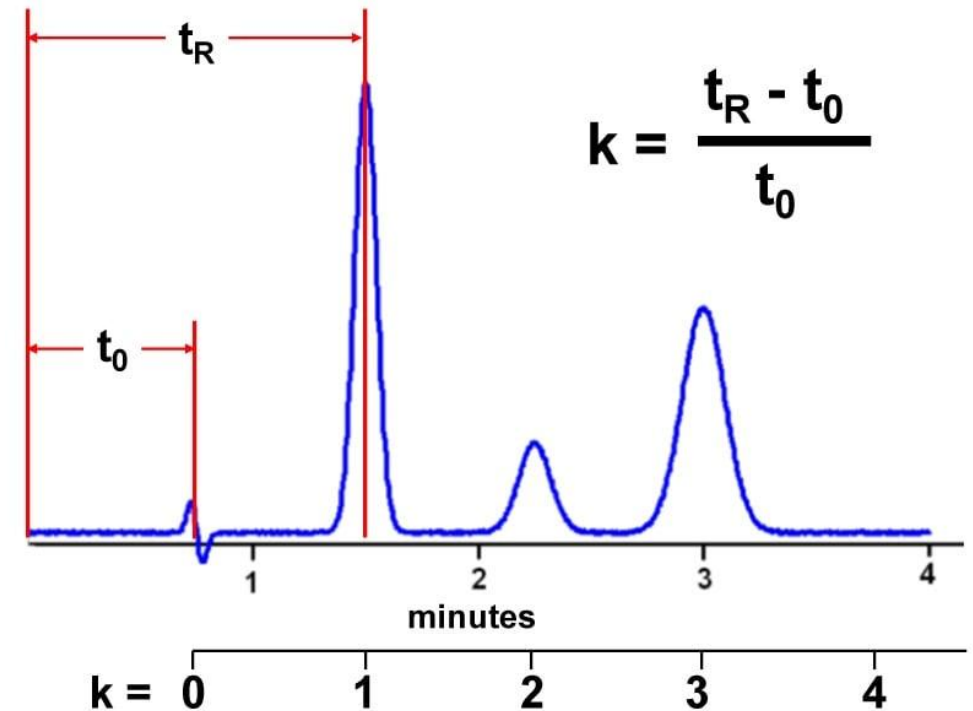


[Tangent method]



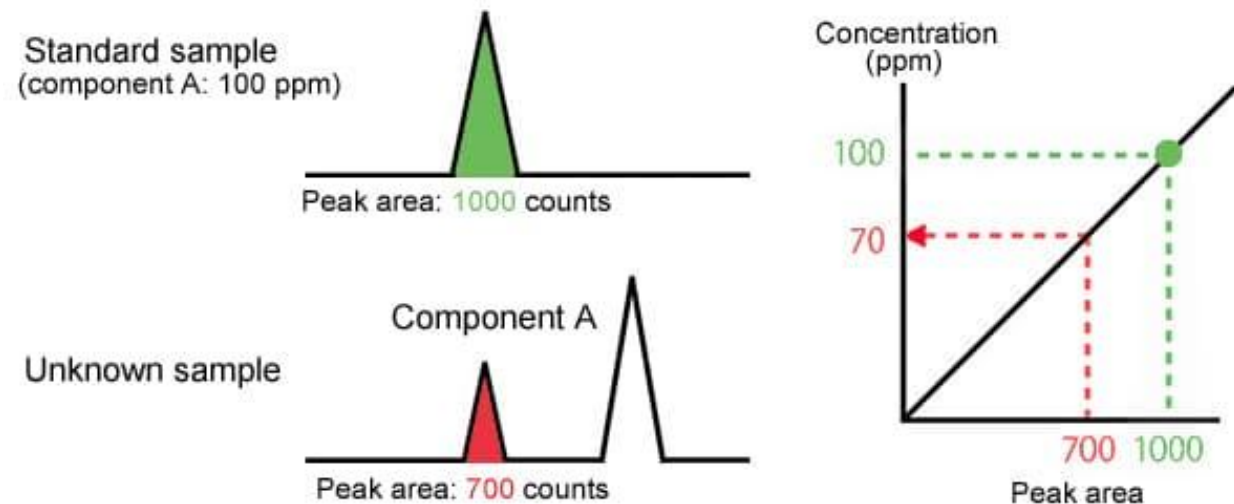
ประสิทธิภาพการแยก : Capacity factor

- ตัวแปรการหน่วง (retention factor, k') เป็นค่าที่ใช้ในการอธิบายพฤติกรรมของสารตัวอย่างที่เราสนใจว่าจะใช้เวลาอยู่ใน SP นานเท่าใด (t_R) เมื่อเทียบกับสารที่ถือว่าไม่ถูกหน่วงใน SP เลย (t_0)
 - ถ้า $k=0$ หมายถึง สารตัวอย่างใช้เวลาอยู่ใน SP เป็นศูนย์เท่าของเวลาที่อยู่ใน MP ซึ่งก็คือ ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์เลย
 - ถ้า $k=1$ หมายถึง สารตัวอย่างใช้เวลาอยู่ใน SP มากกว่าใน SP เป็น 2 เท่าของเวลาที่อยู่ใน คอลัมน์ นั่นคือ t_R ของพีคที่ออกมาจะใช้เวลา เป็นสองเท่าหรือมากกว่าเช่นกัน



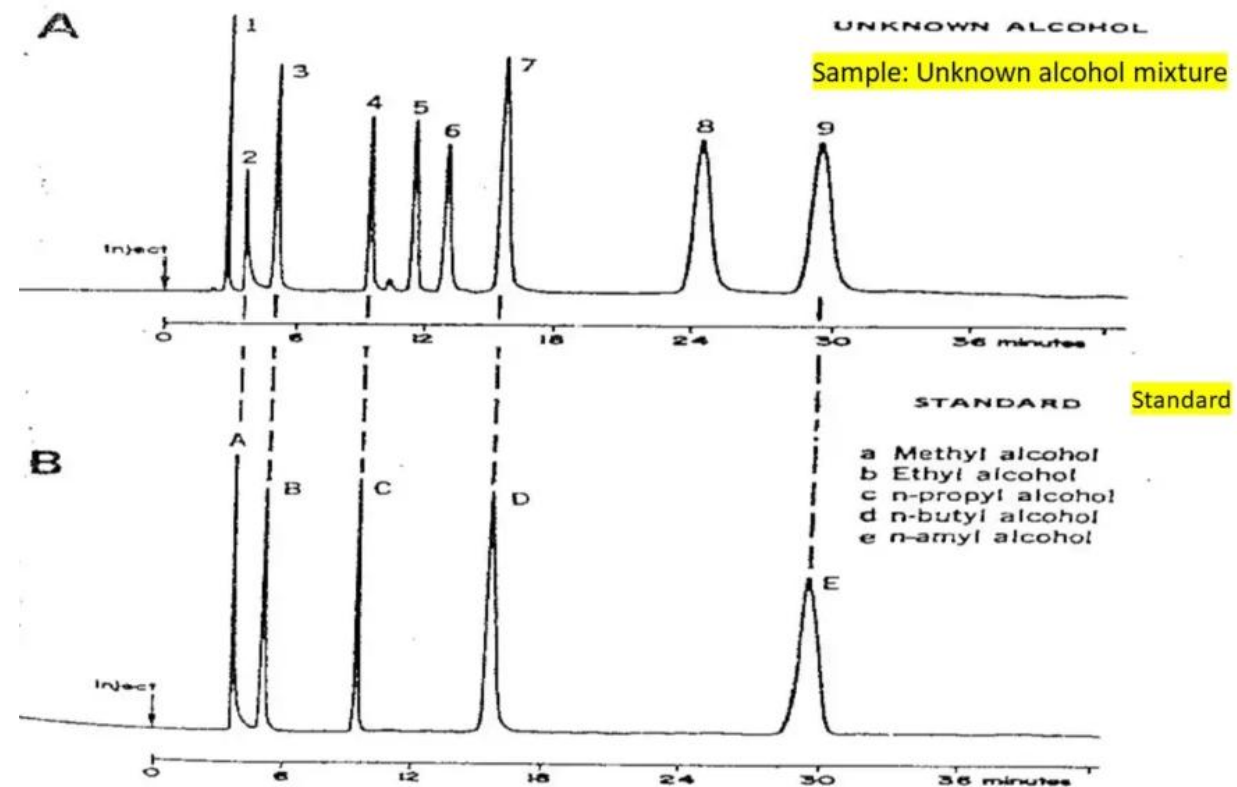
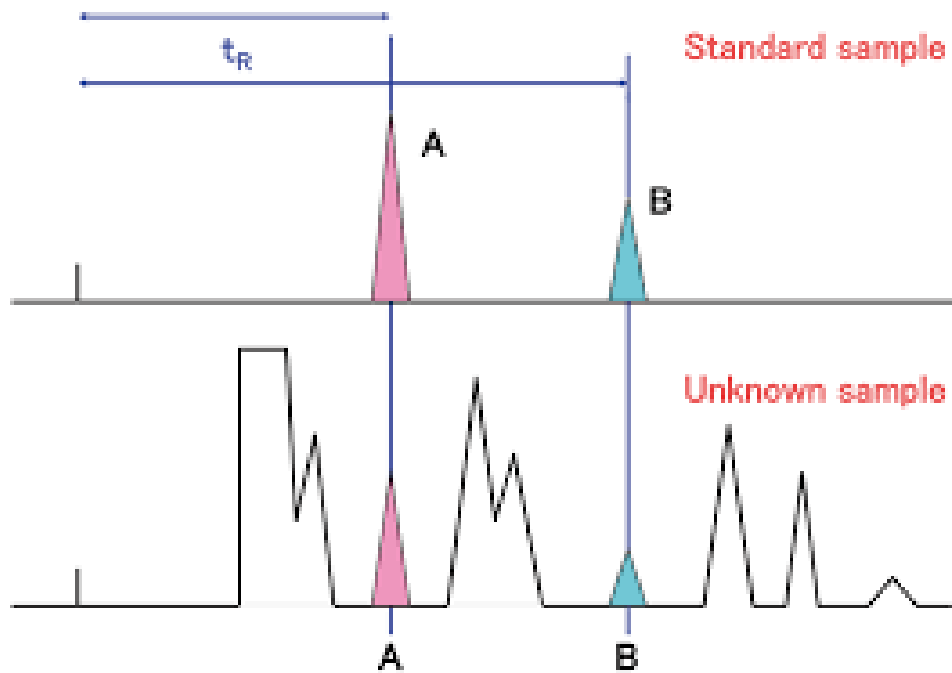
การทำปริมาณวิเคราะห์และการแปลผล

- วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน
- วิธีคำนวณโดยใช้บัญญัติไตรยางศ์
- วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)
- วิธีเติมสารมาตรฐาน (standard addition method)
- วิธี internal standard



Qualitative analysis

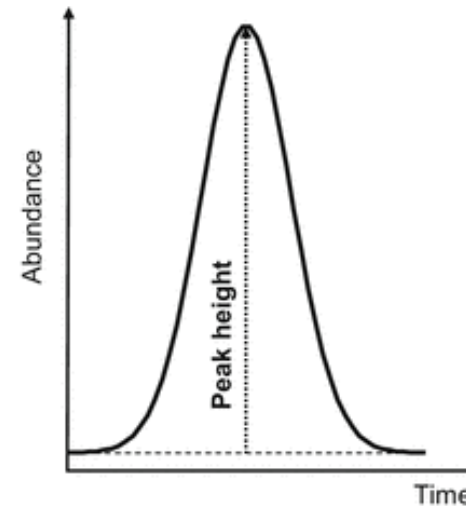
- เปรียบเทียบค่า t_R หรือ V_R ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน



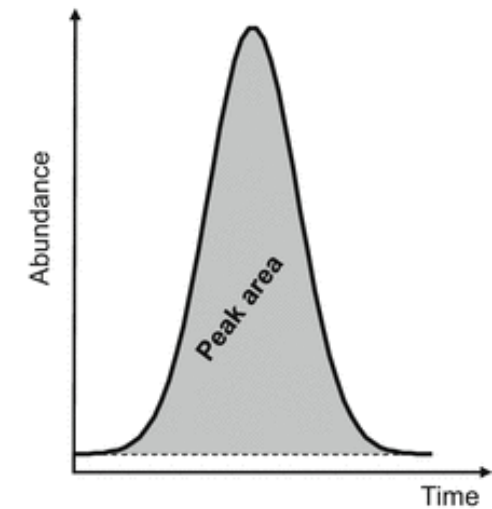
Quantitation

- วัดค่าความสูงของพีค (peak height) วัดได้จากการลากเส้นฐาน (base line) ของพีค แล้วลากเส้นตรงจากส่วนยอดตามแนวตั้งจนถึงเส้นฐาน ระยะทางของเส้นตรงจากฐานถึงส่วนยอดของพีค
- วัดพื้นที่ใต้พีค (peak area) ปริมาณสารตัวอย่าง โดยพื้นที่ใต้พีคนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสาร

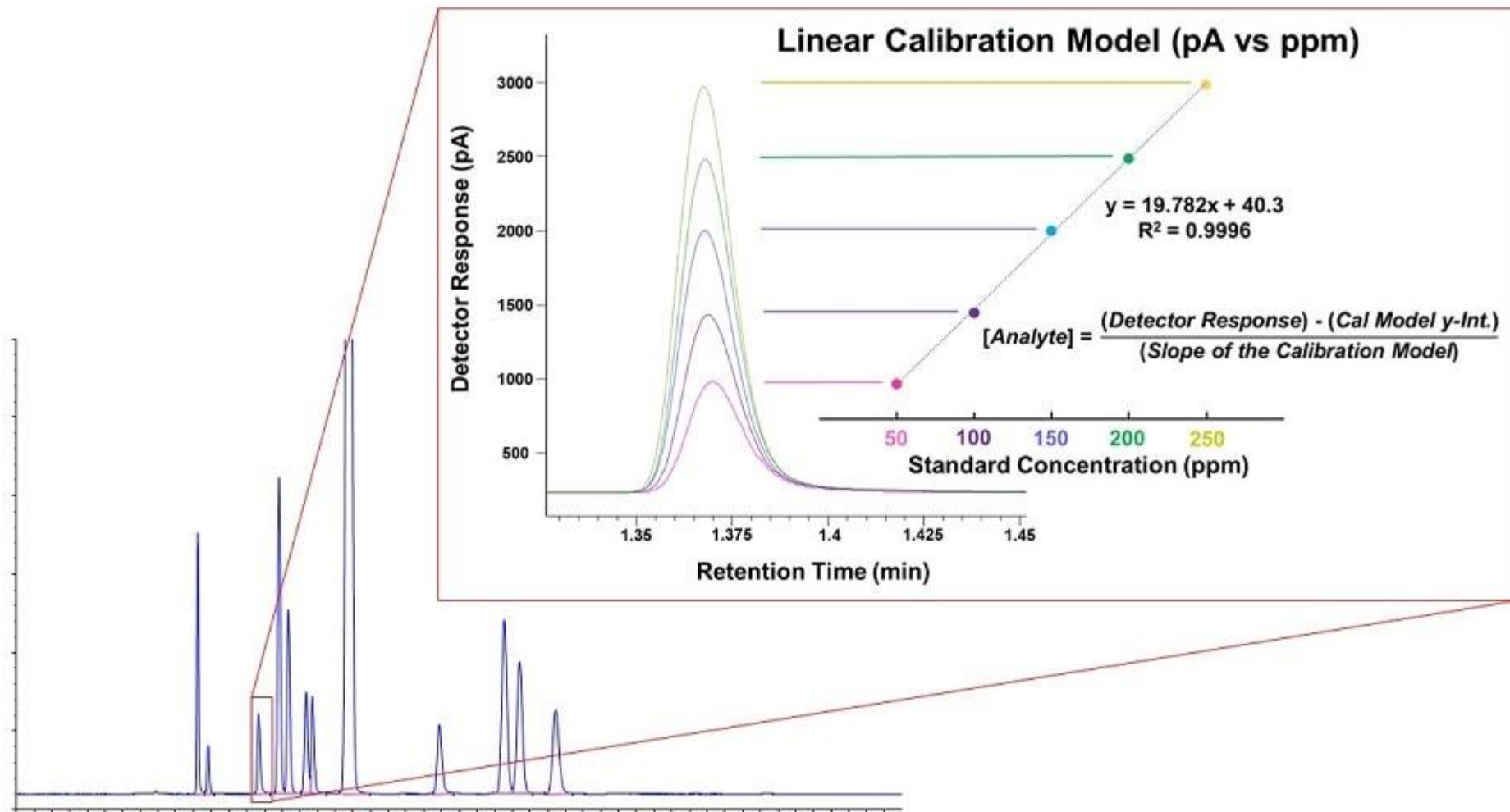
Peak height at maximum h



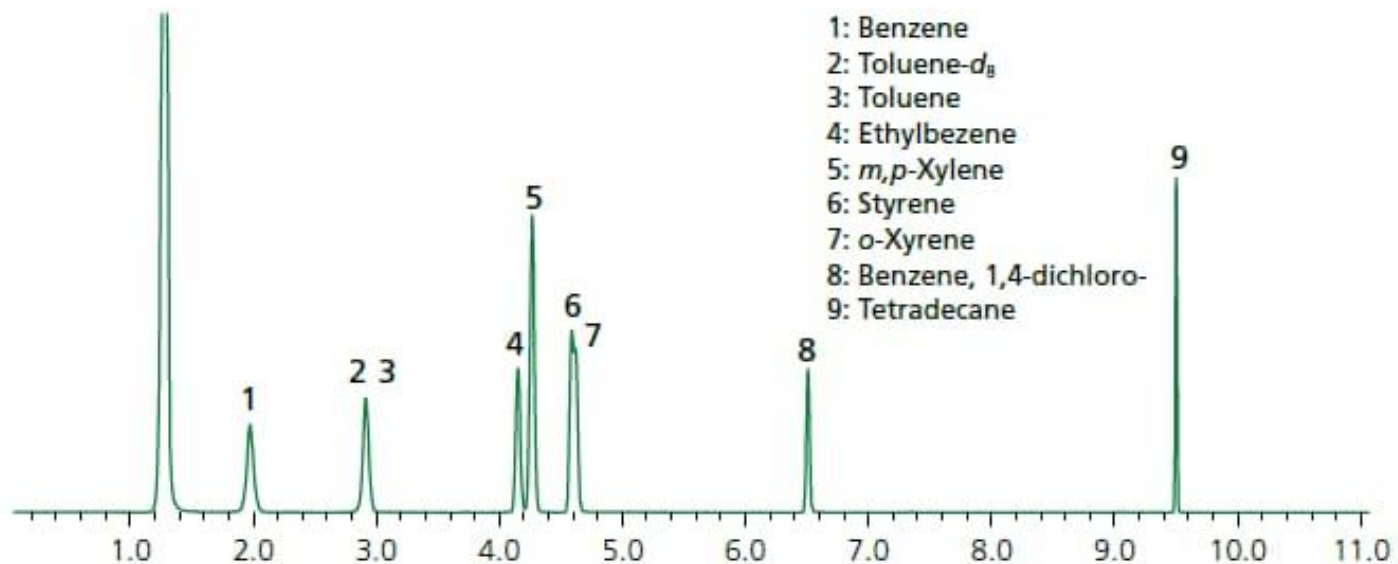
Peak area



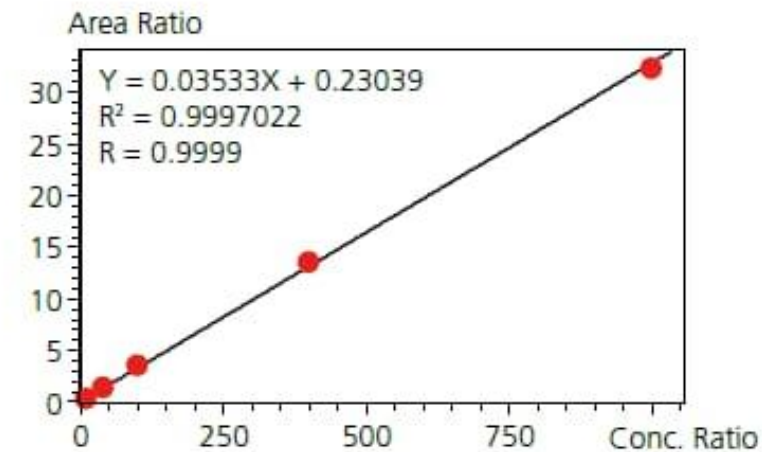
Quantitation : Calibration curve



Quantitation : Calibration curve

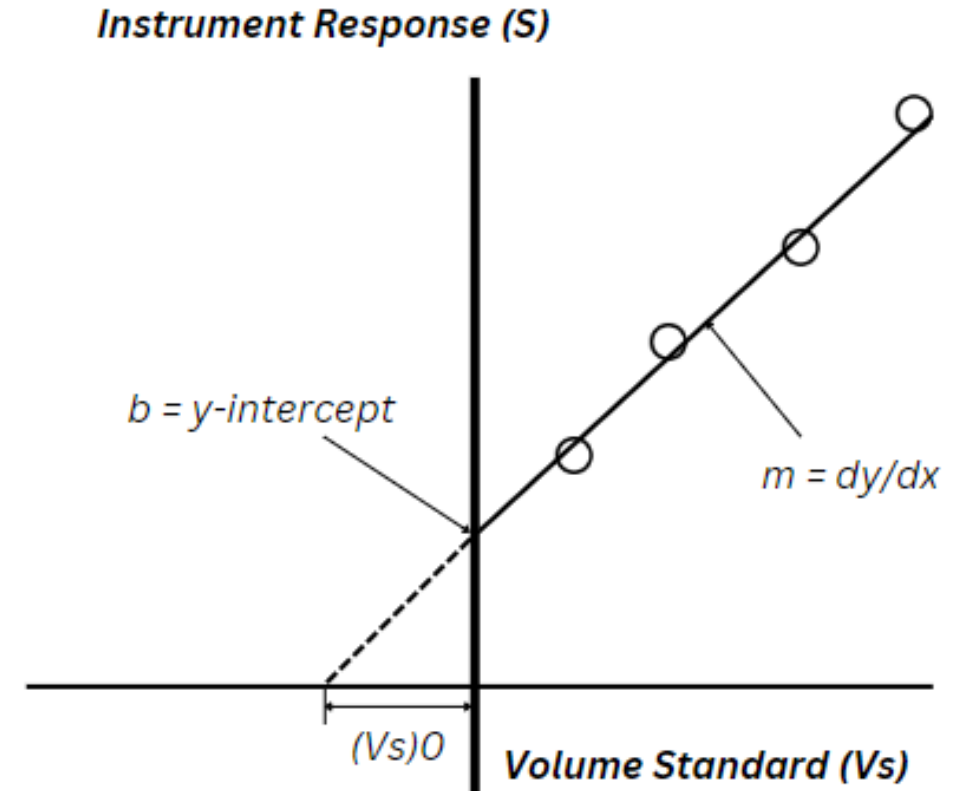
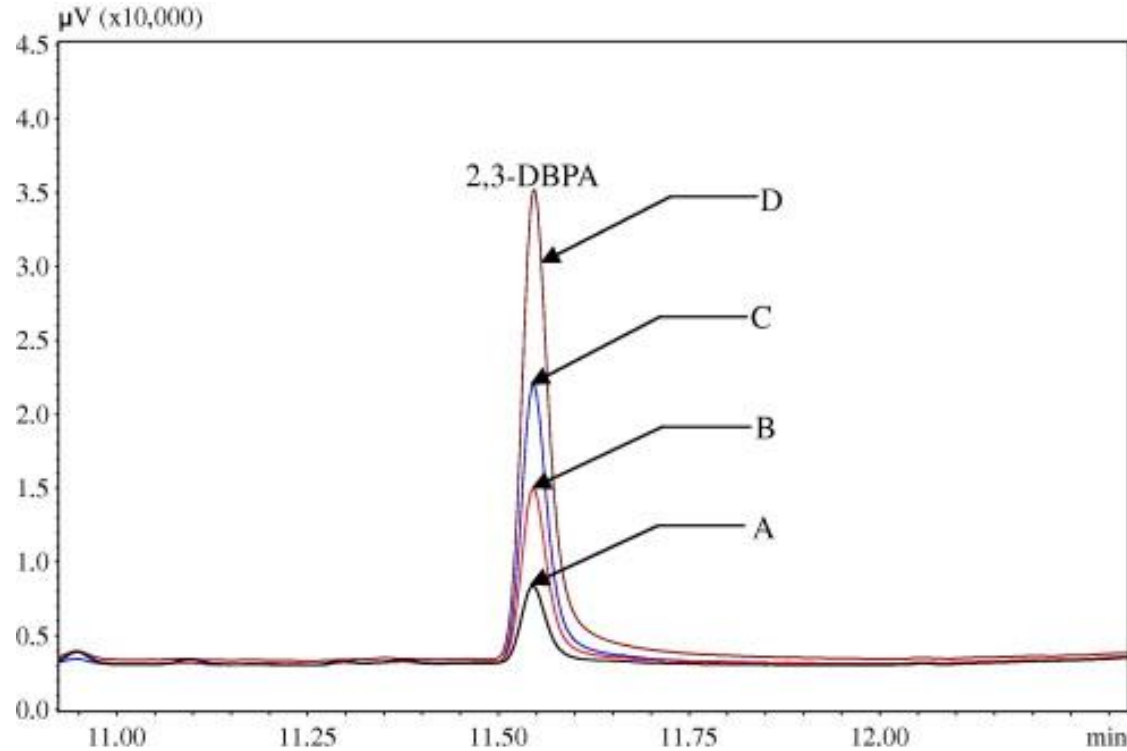


TIC Chromatogram for the 1000 ng Standard Sample using Nitrogen as a Carrier Gas

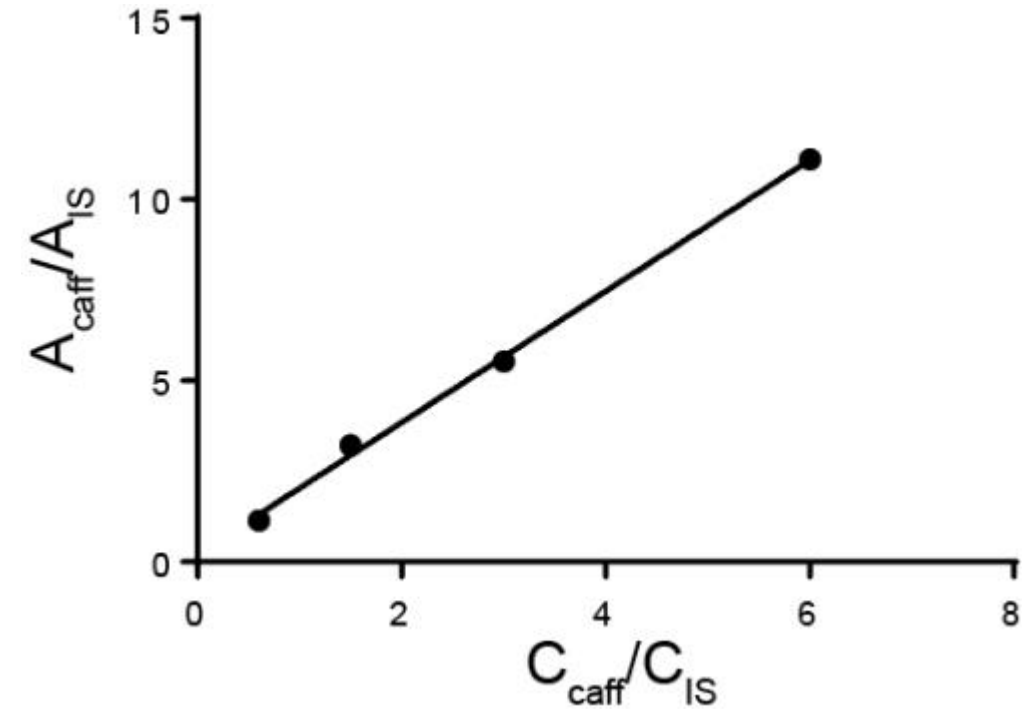
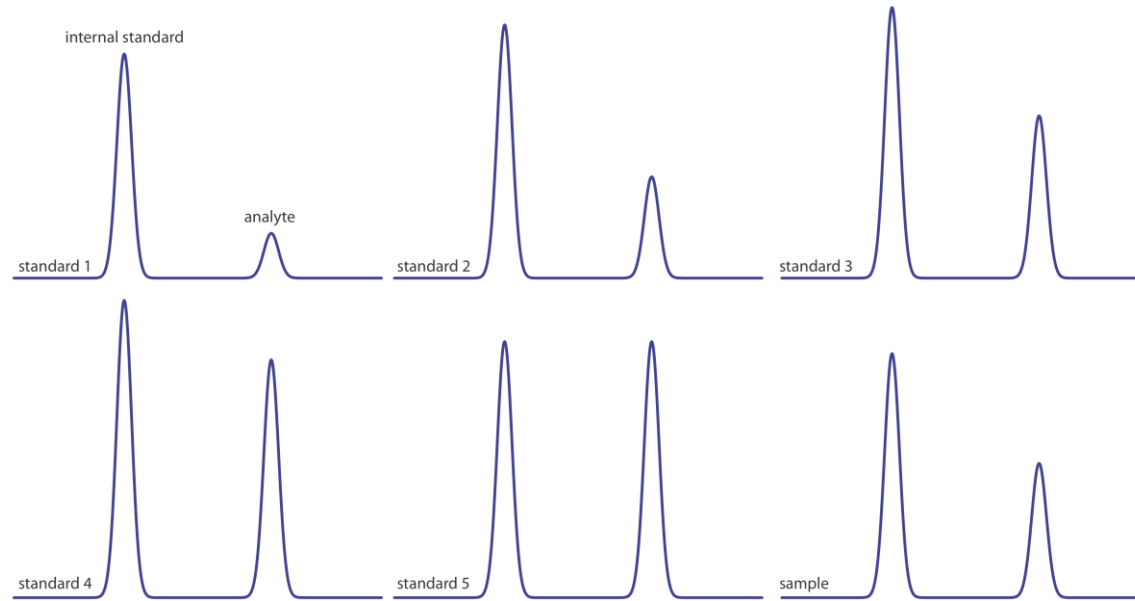


Toluene Calibration Curve Analyzed with Nitrogen as the Carrier Gas
(10 ng, 40 ng, 100 ng, 400 ng, 1000 ng)

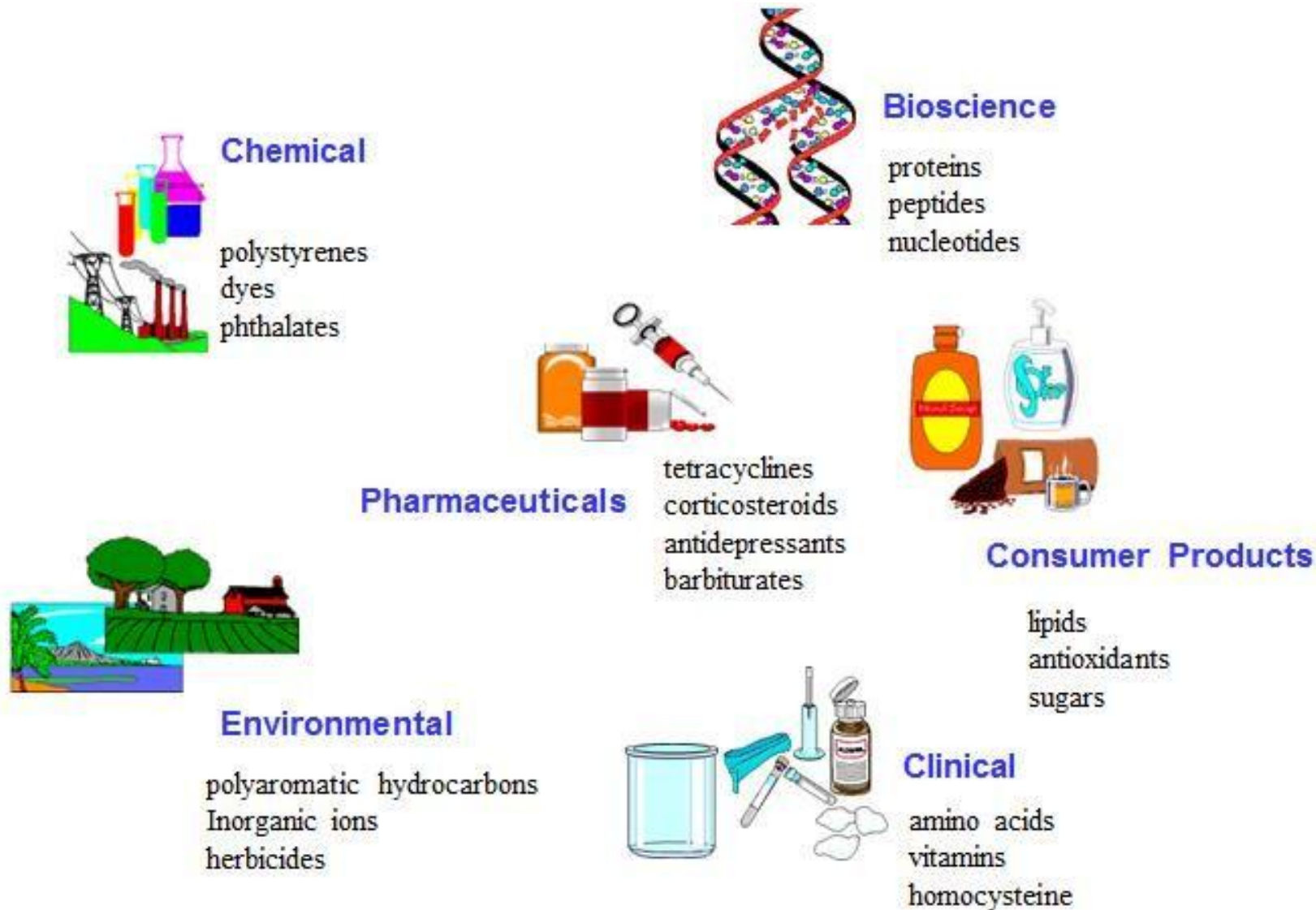
Quantitation : Standard addition method



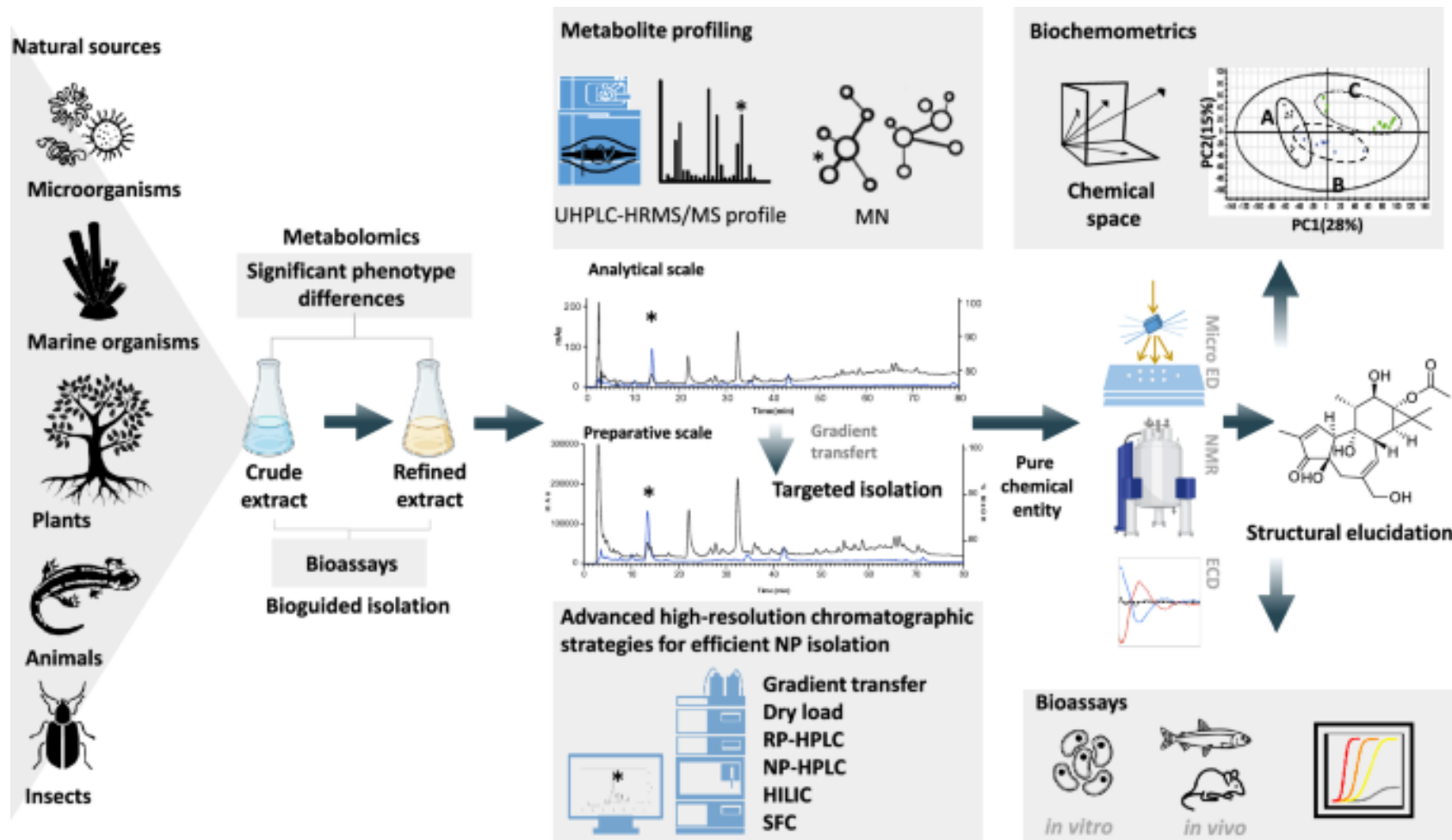
Quantitation : Internal addition method



การประยุกต์ (Applications)

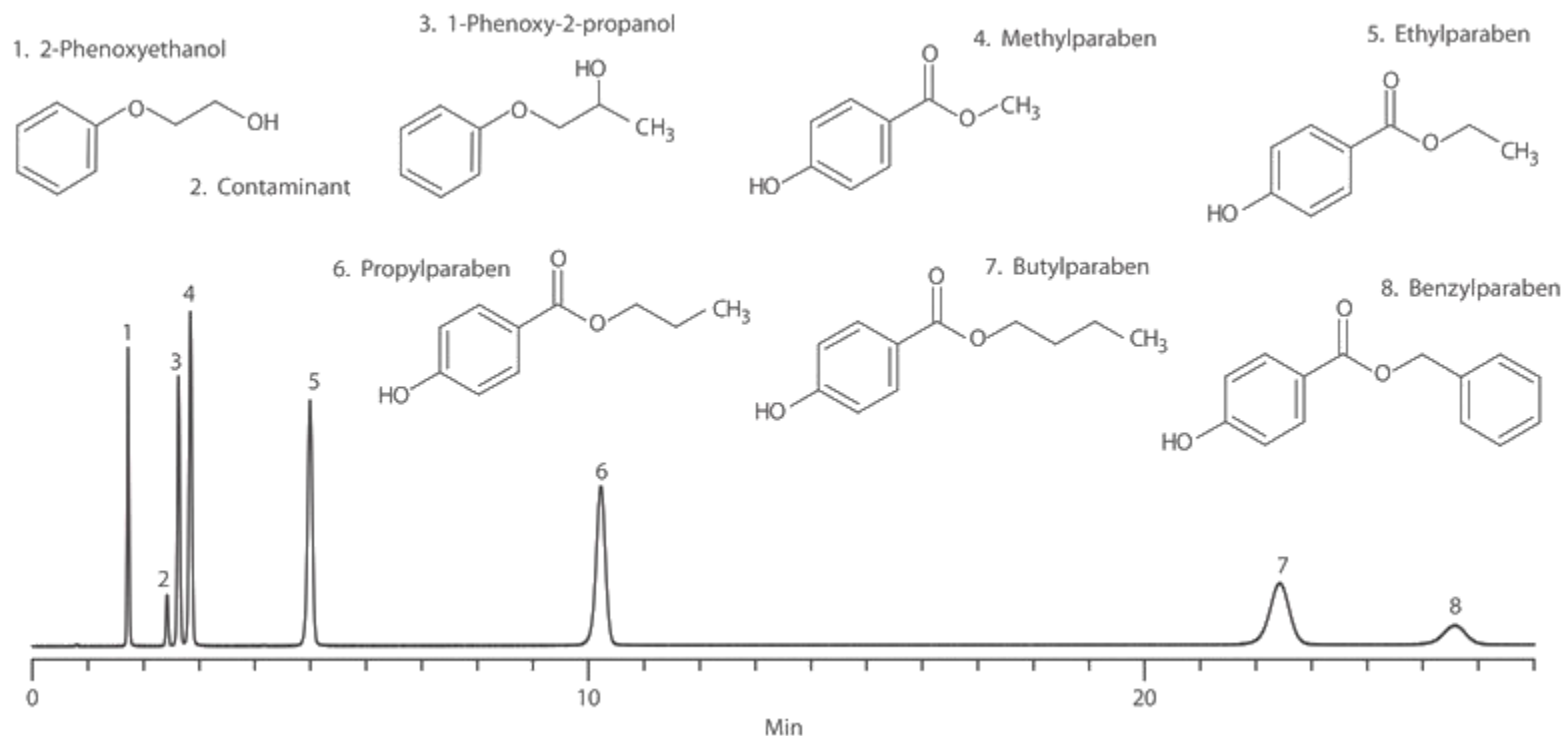


Applications :



Queiroz, E.F., Guillarme, D. & Wolfender, J.L. (2024). Advanced high-resolution chromatographic strategies for efficient isolation of natural products from complex biological matrices: from metabolite profiling to pure chemical entities. *Phytochem Rev* 23, 1415–1442. <https://doi.org/10.1007/s11101-024-09928-w>

Applications : Cosmetic Preservatives



Column : Ascentis Express RP-Amide, 10 cm x 3 mm I.D., 2.7 μ m particles (53918-U)

Mobile phase : [A] water; [B] methanol; (60:40, A:B)

Flow rate : 0.6 mL/min

Column temp. : 50 $^{\circ}$ C

Detector : UV, 250 nm

Injection : 1 μ L

แบ่งกลุ่มทำกิจกรรม 4.2

มอบหมายโจทย์ให้แต่ละกลุ่ม
ระดมสมองแก้ไขโดยวิธีการ
ร่วมแสดงความคิดเห็น

ให้แต่ละกลุ่มนำเสนอ วิธีการแก้ไขโจทย์ปัญหา

- 1) หลักการสำคัญหรือหลักพื้นฐานที่ถูกต้อง
 - 2) วิธีการคำนวณค่าที่ถูกต้อง
 - 3) วิธีอธิบายเชิงพฤติกรรม (วิธีปฏิบัติ) ที่ถูกต้อง
- โดยให้กลุ่มอื่น ๆ รับฟัง และซักถามในข้อที่สงสัย