ตอนที่ 4 การวิเคราะห์ด้วย HPLC
(Analysis with HPLC)

เค้าโครงเรื่อง

4.1. บทนำ

4.2. การทำคุณภาพวิเคราะห์

4.2.1. การใช้ข้อมูลของค่า Retention

4.2.2. Standard Addition หรือ Spiking

4.2.3. Internal Standard

4.2.4. Isotropic Labelling

4.2.5. Enzyme Peak Shift

4.2.6. การใช้ Ultraviolet และ Mass spectrum Libraries

4.3. การทำปริมาณวิเคราะห์

4.3.1. บทนำ

4.3.2. การอินทิเกรต

4.3.2.1 วิธีการวัดด้วยมือ

4.3.2.2 วิธีการวัดด้วยเครื่องมือทางไฟฟ้า

4.3.2.3 ความผิดพลาดในการวัดขนาดของพีค

4.3.3. การคำนวณ

4.3.3.1. บทนำ

4.3.3.2. Normalisation

4.3.3.3. Area Normalization with response factor

4.3.3.4. External Standard Method

4.3.3.5. Internal Standard Method

4.3.3.6. Standard Addition Method

4.3.3.7 การตรวจสอบวิธีการและการยอมรับ....

สาระสำคัญ

1. การจัดการกับข้อมูล แบ่งออกได้ 2 ลักษณะคือในแง่คุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์
   ในแง่คุณภาพวิเคราะห์ เพื่อที่จะหาชนิดของสารที่สนใจในตัวอย่าง
   ในแง่ปริมาณวิเคราะห์ เพื่อที่จะหาปริมาณของแต่ละองค์แระกอบในสารตัวอย่าง
2. มีเทคนิคต่างๆจำนวนมากที่นำมาช่วยในการตรวจสอบชนิดขององค์ประกอบต่างๆในตัวอย่าง เช่น การเปรียบเทียบค่า retention time, Spiking, Internal Standard, Isotropic Labeling, Enzyme Peak Shift, UV และ Mass Spectrometry Libraries
3. พื้นที่พีคหรือความสูงของพีคจะถูกเปลี่ยนเป็นข้อมูลตัวเลขโดยมือหรือวิธีทางไฟฟ้า การวัดความสูงของพีคง่ายกว่าการวัดพื้นที่ของพีค และสามารถทำได้ง่ายด้วยมือ ความสูงของพีคจะได้รับผลกระทบจากเงื่อนไขการแยกมากกว่า ทำให้ผลที่ได้ไม่ถูกต้อง
4. วิธีการวัดพื้นที่พีคด้วยมือมี 3 วิธีคือผลคูณความสูงของพีคกับความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูง, Condal-Bosch area และ Foley Measurement
5. ความผิดพลาดทางเรขาคณิตที่มากับการวัดด้วยมือได้แก่ ความผิดพลาดของความสูง ความกว้างครึ่งหนึ่งของความสูง และการกำหนดตำแหน่งเส้นฐาน
6. การรบกวนที่ยอมรับโดย ASTM มี 3 ชนิดได้แก่ short-term noise, long-term noise และ drift
7. จากข้อเสนอของ ACS ค่า LOD จะวัดที่ S/N ratio = 3:1 และค่า LOQ จะวัดที่ S/N ratio 10:1
8. หลังจากการอินทิเกรต การตอบสนองของเครื่องจะถูกเปลี่ยนเป็นความเข้มข้นของสารที่สนใจโดยอาศัยกราฟเทียบมาตรฐาน มี 5 วิธีการที่นำมาใช้ในการหาปริมาณสัมพัทธ์ขององค์ประกอบต่างๆในตัวอย่างได้แก่ Area Normalisation, Area Normalisation with Response factor, External Standard, Internal Standard และ Standard Addition

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาบทนี้จบแล้ว นักศึกษาควรจะมีความสามารถต่อไปนี้

1. อธิบายความแตกต่างของการทำคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์
2. อธิบายวิธีการต่าง ๆ และการประยุกต์ที่ใช้เทคนิคของการคุณภาพวิเคราะห์
3. อธิบายวิธีการที่ใช้ในการหาความสูงและพื้นที่ของพีค
4. อธิบายแหล่งที่มาของความผิดพลาดในการวัดพื้นที่พีค
5. อธิบายวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาหาปริมาณของสาร
6. อธิบายความแตกต่างระหว่างวิธี Normalisation External Standard Internal Standard และ Standard Addition
7. อธิบายความหมายของการตรวจสอบความยอมรับได้ของวิธีการ

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์ด้วย HPLC (Analysis with HPLC)

4.1. บทนำ

วัตถุประสงค์หลักสำหรับการใช้ HPLC ก็เพื่อการแยก การตรวจสอบหาชนิดขององค์ประกอบต่างๆในสารตัวอย่าง ตลอดจนการหาปริมาณหรือความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆ วัตถุประสงค์เทอมเรียกกันโดยทั่วไปว่าการทำคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative analysis) และเทอมหลังเรียกว่าการทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis)

สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในระบบโครมาโทกราฟและผลิตสัญญาณออกมาซึ่งถูกบันทึกโดยสถานีเก็บข้อมูล หรือกระดาษบันทึกสัญญาณ จากนั้นสัญญาณจะต้องถูกเปลี่ยนเป็นข้อมูลทางด้านคุณภาพและปริมาณ การจัดการข้อมูลจะเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการวิเคราะห์

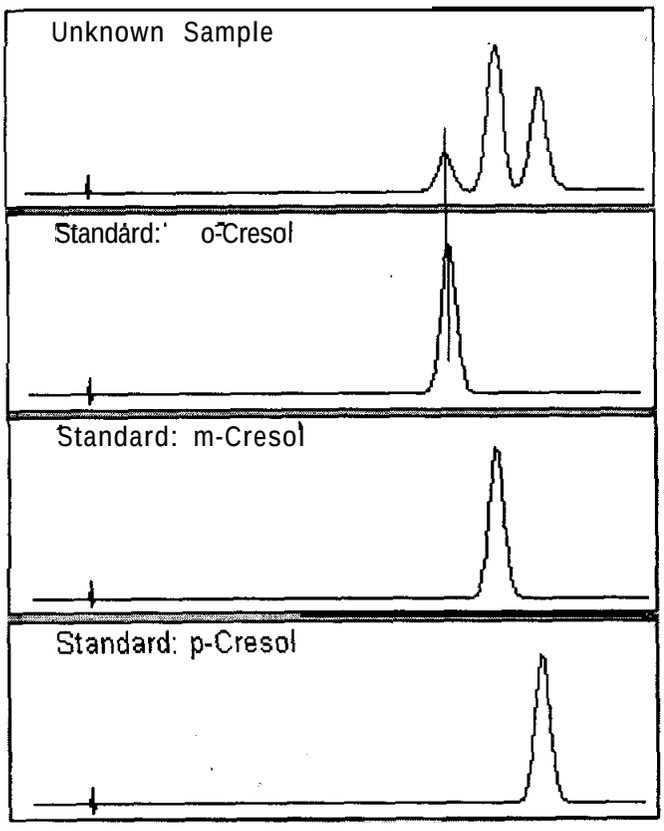
4.2. การทำคุณภาพวิเคราะห์

สำหรับระบบ HPLC ที่กำหนด ภายใต้ที่เงื่อนไขต่างๆ สารที่สนใจจะมีค่า retention time (t_R) หรือ retention volume (V_R) คงที่ เนื่องจากสารประกอบต่างๆมีอยู่จำนวนมากมายมหาศาล การกำหนดลักษณะของแต่ละพีคโดยอาศัยค่า retention time เพียงอย่างเดียวจึงเป็นไปไม่ได้ เว้นเสียแต่ว่าองค์ประกอบเดี่ยวๆในสารตัวอย่างทราบก่อนทำการวิเคราะห์

มีวิธีการต่างๆมากมายที่ถูกนำมาช่วยในการตรวจสอบองค์ประกอบในสารตัวอย่าง เทคนิคส่วนมากเช่น “spiking” และ enzyme peak shift methods จะถูกนำมาใช้ในการยืนยันลักษณะขององค์ประกอบที่คาดว่ามีอยู่ในตัวอย่าง ถ้าหากไม่ทราบชนิดขององค์ประกอบเลยก็อาจจะใช้การรวมเทคนิคต่างๆเพื่อที่จะให้ลักษณะเฉพาะตัวของสารนั้นๆ

4.2.1. การใช้ข้อมูลของค่า retention

เป็นวิธีการที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบลักษณะของพีคมากที่สุด โดยการเปรียบเทียบค่า retention time หรือในบางครั้งอาจจะใช้ค่า capacity factor ขององค์ประกอบต่างๆในสารตัวอย่างกับของสารประกอบอ้างอิงมาตรฐาน เพื่อที่จะลดผลจากแมทริกซ์ในสารตัวอย่างที่มีต่อค่า retention time สารตัวอย่างควรจะทำการวิเคราะห์ภายใต้เงื่อนไขเดียวกันหรือคล้ายคลึงกับกับที่ใช้กับสารอ้างอิง ได้แก่ คอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล และอุณหภูมิ



รูปที่ 4.1. การใช้สารมาตรฐาน เพื่อตรวจชนิดขององค์ประกอบต่างๆในสารตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบค่า Retention times

โดยการเปรียบเทียบค่า retention time ของพีคต่างๆในโครมาโทแกรมทั้งสอง อย่างไรก็ดีจะมีตัวแปรต่างๆในระบบโครมาโทกราฟี และอาจจะมีสารประกอบบางอย่างที่ไม่ทราบให้ค่า retention time เท่ากัน ดังนั้นค่า retention time จึงใช้เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นเท่านั้น

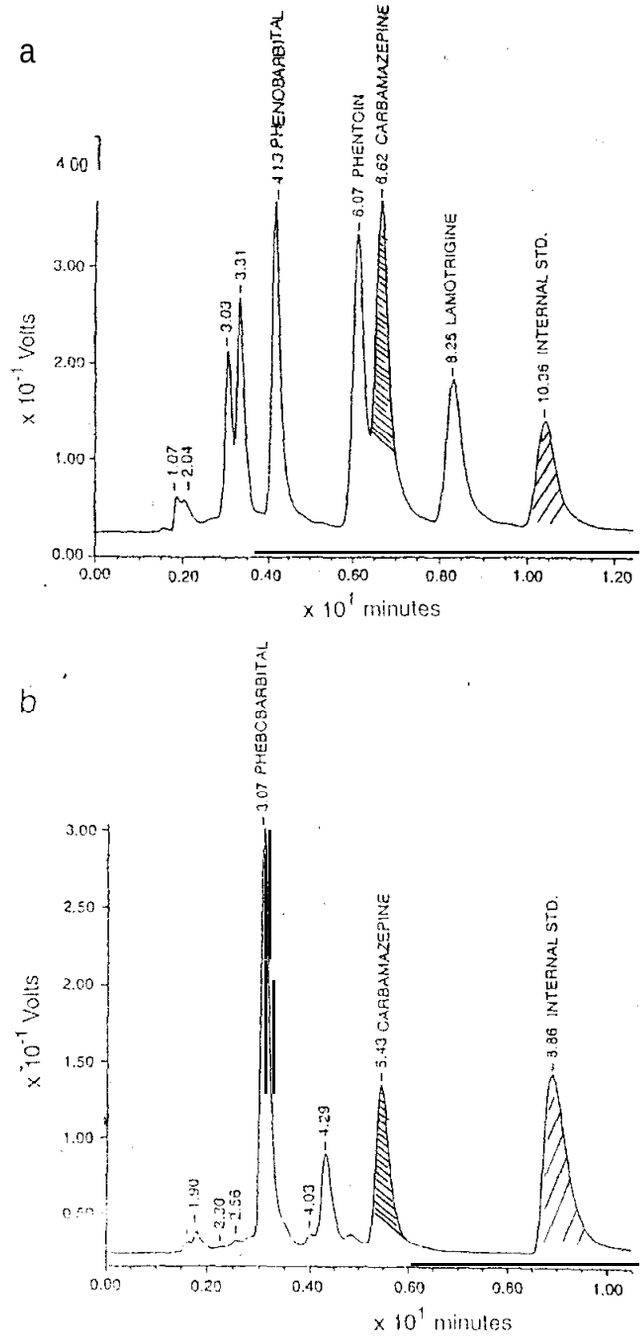
ค่าการหน่วงเหนี่ยวสัมพัทธ์ของสารประกอบชนิดหนึ่งบนระบบที่แตกต่างกัน 2 ระบบ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบลักษณะของพีคเบื้องต้น วิธีการนี้จะขึ้นอยู่กับ หลักฐานที่ว่าความเป็นไปได้ที่สารประกอบที่แตกต่างกันสองชนิดจะแสดงพฤติกรรมที่เหมือนกันภายใต้เงื่อนไขที่แตกต่างกันเป็นไปได้น้อยมาก ดังนั้นการใช้คอลัมน์ที่แตกต่างกัน เช่น nonpolar และ polar column การใช้ตัวตรวจวัดที่แตกต่างกัน เช่น UV และ fluorescence detection หรือใช้วิธีการที่แตกต่างกันเช่น chromatography และ electrophoresis จะช่วยยืนยันลักษณะของพีคในสารตัวอย่าง

ปัญหาของวิธีนี้คือ ความแปรปรวนของอัตราการไหล องค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ และอุณหภูมิ จะมีผลต่อค่า Retention อย่างมีนัยสำคัญ เพื่อแก้ไขปัญหาเหล่านี้ โดยปกติจะทำการวัดสารมาตรฐานก่อน หรือหลังสารตัวอย่างทันที แต่ค่า Retention ก็ไม่ใช่วิธีสัมบูรณ์ในการตรวจสอบลักษณะ

4.2.2. Standard addition หรือ spiking

ในเทคนิคนี้ สารตัวอย่างจะถูกนำมาวิเคราะห์ก่อน จากนั้นเติมสารที่ทราบชนิดและมีอยู่ในสารตัวอย่างในปริมาณน้อยและทราบแน่นอนลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและทำการวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้ง ถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณของพีคของสารประกอบที่สอดคล้องกับสารที่เติม ก็สามารถตรวจสอบชนิดของสารนั้นเบื้องต้นได้ เทคนิค "**spiking**" ประยุกต์ใช้ได้เมื่อทราบว่าในตัวอย่างมีสารอะไรอยู่ สารมาตรฐานที่ทราบจึงจะเติมลงไปได้เพื่อสามารถตรวจสอบชนิดของแต่ละองค์ประกอบ ถ้าหากไม่ทราบชนิดขององค์ประกอบในสารตัวอย่างเลย เทคนิคนี้จะใช้ไม่ได้

4.2.3. Internal standard



รูปที่ 4.2. การตรวจสอบสารตัวอย่างโดยการเติม Internal Standard (a) Plasma เติม IS เพื่อหาค่า retention timeภายใต้เงื่อนไขการทดลอง (b) ตัวอย่างที่สกัดได้จากคนไข้ที่ได้รับ Carbam,azepine และ Phenobarbital

วิธีนี้เมื่อถูกนำมาใช้ในการหาชนิดขององค์ประกอบในสารตัวอย่างผสม เมื่อความสม่ำเสมอของค่า retention time ขององค์ประกอบในสารตัวอย่างและสารมาตรฐานไม่เพียงพอ การเปลี่ยนแปลงของค่า retention time จากของผสมมาตรฐานกับของผสมตัวอย่างเนื่องมาจากความยุ่งยากของแมทริกซ์ในตัวอย่างที่ไม่สามารถเลียนแบบได้ ดังนั้นสารประกอบที่ทราบชนิด (Internal standard)ที่ไม่มีในตัวอย่างปริมาณน้อยจะถูกเติมลงในของผสมสารมาตรฐานและของตัวอย่างก่อนทำการวิเคราะห์

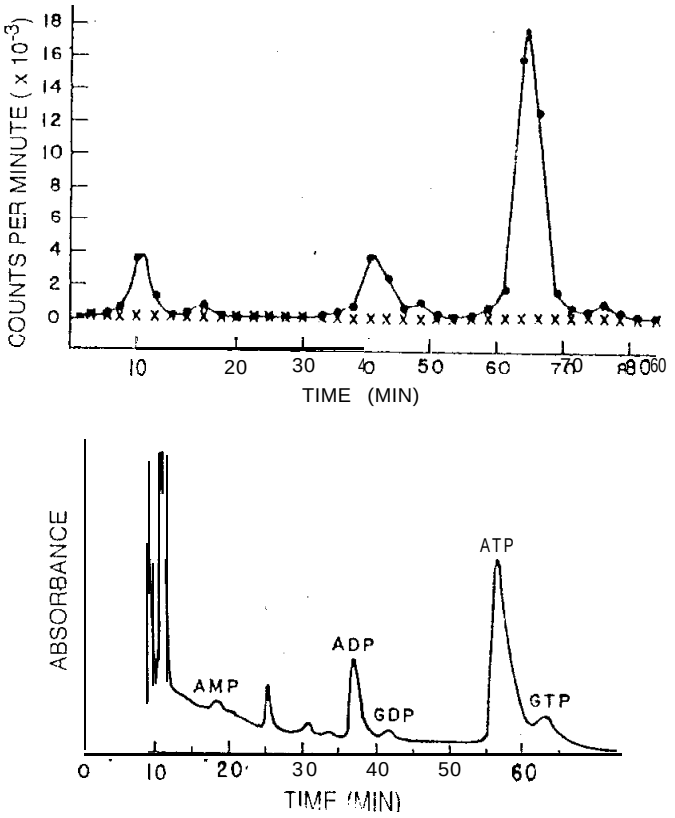
ถ้าหากค่า retention time ของพีคเคลื่อนที่จากตัวอย่างเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน จะมี 2 วิธีการที่จะตรวจสอบองค์ประกอบที่สนใจ ขึ้นอยู่กับจำนวนพีคในตัวอย่าง

ถ้าหากว่ามีเพียง 2-3 พีคที่แยกกันดีอยู่ และค่า retention time ของ internal standard เพิ่มในตัวอย่างเมื่อเทียบกับในสารมาตรฐาน คำนวณค่าความแตกต่างของค่า retention time ของ internal standard ในสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง ค่าที่แตกต่างนี้นำไปลบออกจากค่า retention time ของพีคอื่นๆแต่ละพีคก่อนที่จะนำไปเปรียบเทียบโครมาโทแกรมกับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน

ถ้าหากว่ามีพีคจำนวนมากในสารตัวอย่าง หรือพีคถูกชะออกมาใกล้เคียงกันมาก อาจจะต้องตรวจสอบพีคโดยอาศัยค่า selectivity (α) เมื่อ t_1 หมายถึงค่า retention time ของ internal standard ข้อได้เปรียบของวิธีนี้คือค่าอัตราส่วนการหน่วงเหนี่ยวสัมพัทธ์จะให้ตัวเลขที่มีความสม่ำเสมอมากกว่า

42.4. Isotope labeling

การใช้สารมาตรฐานอีกรูปแบบหนึ่ง สารกัมมันตรังสีมาตรฐานที่ทราบปริมาณเติมลงในสารละลาย เก็บสารที่ออกมาเป็นส่วนๆ พล็อตค่าการนับของส่วนต่างๆ พีคของสารที่สนใจก็สามารถตรวจสอบได้ วิธีการนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการศึกษาแมทาบอริซึมในเซลล์ของ purine และ pyridines analogs



รูปที่ 4.3. การใช้ Isotope labeling

4.2.5. Enzyme Peak shift

เทคนิคนี้จะมีประโยชน์มากทางด้านชีวเคมีสำหรับในการยืนยันลักษณะของพืค โดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยาเอนไซม์ กับ nucleotides หรือหมู่ nucleotides เทคนิคนี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการบอกชนิดของ nucleotides ในสารที่สกัดได้จากเซลล์ ซึ่งไม่เพียงแต่ชนิดของสารที่เข้าทำปฏิกิริยาจะถูกยืนยันเท่านั้น ยังบอกลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอีกด้วย

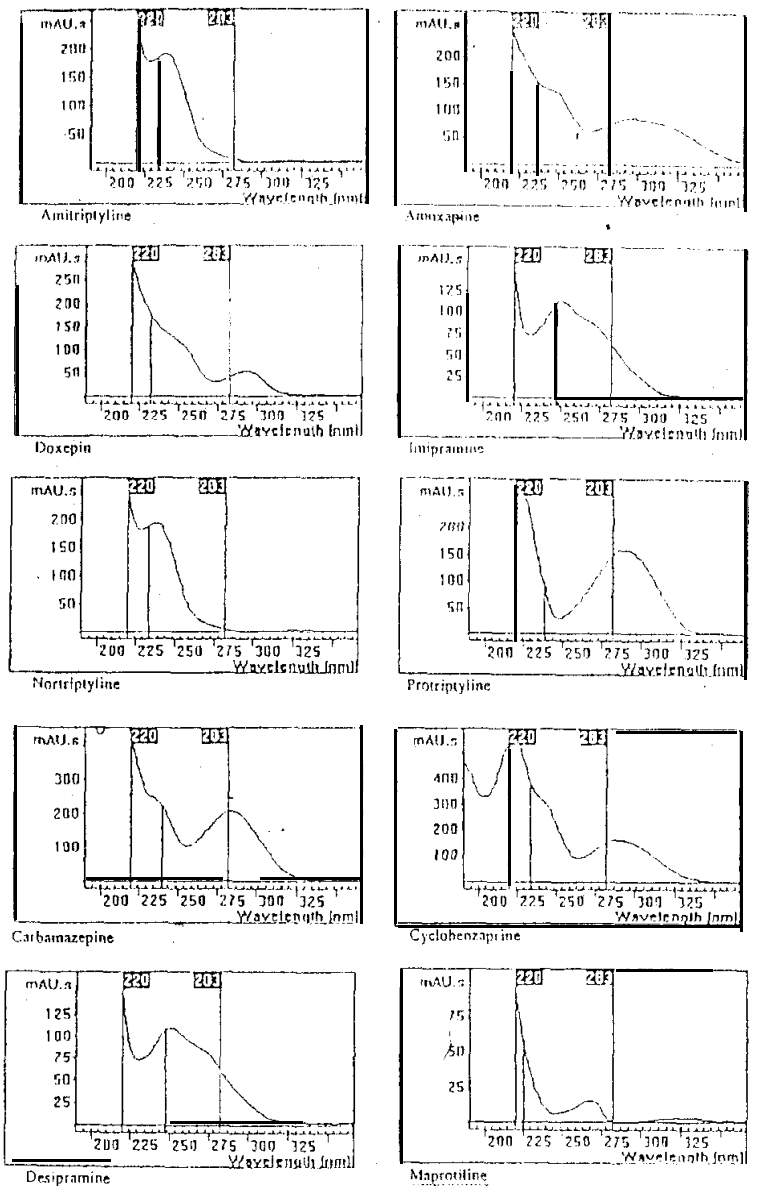
ในวิธีนี้สารตัวอย่างจำนวนหนึ่งจะถูกวิเคราะห์ ในขณะที่ส่วนที่สองถูกนำไปเข้าตู้อบโดยใส่เอนไซม์มากเกินพอ ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับสารที่สนใจ เมื่อเอนไซม์หยุดทำงาน สารส่วนที่สองจะนำเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟ การตรวจสอบลักษณะจะอาศัยการหายไปของพีคของสารตั้งต้น หรือการปรากฏของพีคที่ให้ค่า retention time ที่สอดคล้องกับสารที่ทราบชนิด วิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ cytidine ในตัวอย่างซีรัม สารตัวอย่างเติมเอนไซม์ cytidine deaminase ในตู้อบ cytidine จะถูกเปลี่ยนเป็น uridine เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารตั้งต้นและที่เกิดปฏิกิริยา พีค cytidine จะหายไปและ uridine จะเข้ามาแทนที่

4.2.6. การใช้ Ultraviolet และ mass spectrometry Libraries

Photo Diode Array (PDA) detectors ได้รับความนิยมมากขึ้นเนื่องจากสามารถตรวจวัดค่า retention time และ UV spectra เพื่อช่วยในการตรวจสอบลักษณะของพีค และวอร์ฟแวร์เพจเกจของ PAD ส่วนมากจะมี libraries สำหรับสารมาตรฐานที่นักวิเคราะห์สามารถสร้างเองได้ เมื่อวิเคราะห์สารตัวอย่าง retention time และ spectra ของพีคในสารตัวอย่างสามารถเปรียบเทียบกับกับของสารมาตรฐานที่เก็บไว้ใน libraries เนื่องจากรูปร่างของ UV spectra ขึ้นอยู่กับเงื่อนไขของการทดลองที่ได้รับ ทำให้ standrad libraries ไม่ค่อยได้รับความนิยม

นอกจากนี้ PDA ยังสามารถตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวของพีค (homogeneity) software algorithms ถูกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารประกอบที่จุดยอดของพีคกับสเปกตราที่ได้ที่จุดอื่นตลอดพีค โดยทั่วๆไป ความเป็นเนื้อเดียวของพีคจะถูกแปลเป็นความบริสุทธิ์ของพีค อย่างไรก็ดีถ้าพีคที่สมมาตร 2 พีคซ้อนซับกันได้อย่างสมบูรณ์ ดังรูป แต่ไม่บริสุทธ์

ในขณะที่มีการใช้การตรวจวัดโดย PDA ในการสร้าง UV libraries ระบบข้อมูลของคอมพิวเตอร์ยังถูกนำมาใช้ในการเก็บข้อมูลและควบคุมกระบวนการในการตรวจวัดใน mass spectrometer ในวิธินี้ mass spectra จะไม่ขึ้นกับเงื่อนไขในการทดลองมากนัก จึงเป็นไปได้ที่จะซื้อ mass spectra libraries สำหรับตรวจสอบสาร ใน mass spectral data system จะบันทึกสเปกตรา relative abundance bar และยังวิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบข้อมูลกับ mass spectrometry libraries



& 4.4. UV spectra สำหรับ tricyclic antidepressants

กิจกรรม 4.1
ให้นักศึกษาสรุปวิธีการที่นำมาใช้ในการทำคุณภาพวิเคราะห์ทางด้านโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง

4.3. การทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis)

4.3.1. บทนำ

วัตถุประสงค์อื่นสำหรับการวัดพีคคือ การหาปริมาณตัวถูกละลาย แม้ว่าเทคนิค HPLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องสูงมาก ผลของการทำปริมาณวิเคราะห์จะขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของกระบวนการวิเคราะห์ จากการเตรียมสารตัวอย่าง ผ่านกระบวนการแยก การตรวจวัดผลของสัญญาณ การแปลความหมายของผล จะมีแหล่งของความผิดพลาดอยู่ 3 แหล่งในการหาปริมาณโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี คือ

1.) เทคนิคการสุ่มเก็บตัวอย่างและการฉีดสารตัวอย่าง
2.) การออกแบบเครื่องมือ
3.) การวัดขนาดของพีค

ในตอนนี้จะอธิบายถึงวิธีที่ใช้โดยทั่วๆไปในการหาปริมาณ

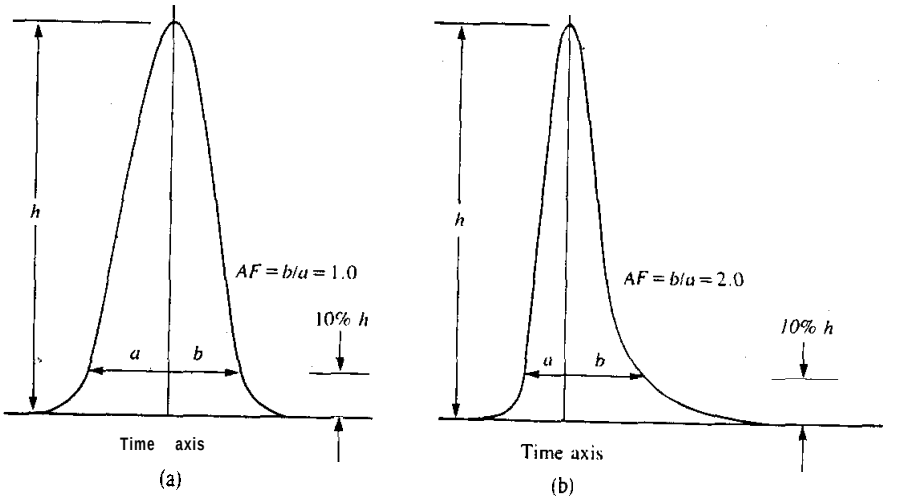
4.3.2. การอินทิเกรต

ในขั้นตอนการอินทิเกรตประกอบด้วย การเปลี่ยนสัญญาณจากการตรวจวัดเป็นข้อมูลที่เป็นตัวเลข เนื่องจากสัญญาณจากการตรวจวัดอยู่ในรูปโครมาโทแกรม ตัวอินทิเกเตอร์หรือคอมพิวเตอร์จำเป็นจะต้องเปลี่ยนพื้นที่พีค หรือความสูงของพีคเป็นตัวเลขโดยมือ หรือโดยวิธีทางไฟฟ้า

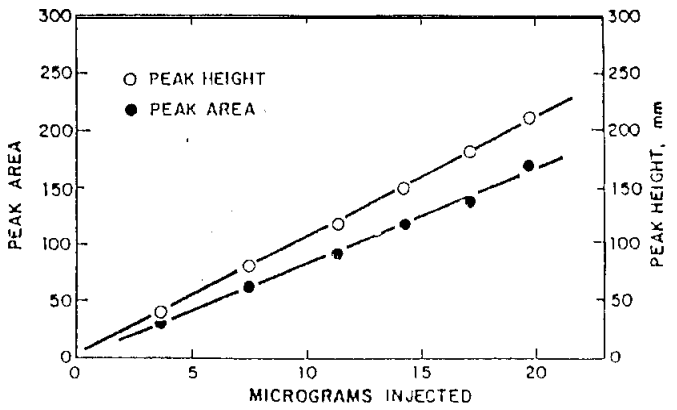
ในการวัดความสูงของพีค แม้ว่าจะเป็นการประมาณ สามารถทำได้ด้วยความถูกต้องดีกว่าและง่ายกว่าการวัดพื้นที่พีค ในกรณีที่มีขนาดการแยกต่ำ ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นการลดข้อมูลด้วยมือที่ง่ายและรวดเร็ว และต้องการการแยกที่น้อยกว่าสำหรับการคำนวณที่ถูกต้อง แต่การวัดความสูงของพีคจะได้รับผลกระทบจากความแปรปรวนในเงื่อนไขการแยกมากกว่าการวัดพื้นที่พีค และผลที่ได้จะไม่ถูกต้องเท่ากับการวัดพื้นที่พีค

ยังมีปัจจัยต่างๆที่มีต่อความถูกต้องของการปริมาณวิเคราะห์ ในรูปแบบการรบกวนที่เส้นฐาน (noise) และเส้นฐานลอยเลื่อน (drift) ซึ่งจะมีผลต่อพื้นที่มากกว่าความสูง เนื่องจากทำให้พื้นที่สูญเสียไปที่ขอบที่เป็นหางซึ่งเป็นส่วนที่กว้างที่สุด พีคที่ไม่สมมาตร ความอิ่มตัวของตัวตรวจวัดหรือไม่เป็นเชิงเส้น ซึ่งจะมีผลมากต่อความสูงของพีค

การวัดความสมาตรของพีค สามารถทำได้โดยใช้ค่า Peak Asymmetry Factor (AF) คำนวณโดยสูตร AF = b/a



รูปที่ 4.5. Peak Asymmetry Factor (AF) (a) พีคมีสามาตร (b) พีคไม่มีสมมาตร



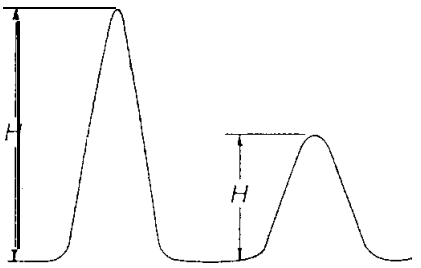
รูปที่ 4.6. แสดงกราฟเทียบมาตรฐานเปรียบเทียบการวัดความสูงและการวัดพื้นที่ของพีค

4.3.2.1. วิธีการวัดด้วยมือ (Manual methods)

ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ความถูกต้องของแต่ละการวัดจะขึ้นอยู่กับ ตำแหน่งการลากเส้นสัมผัสหรือเส้นฐาน และการคำนวณแต่ละครั้ง ซึ่งอาจจะแตกต่างจากพีคหนึ่งไปยังอีกพีคหนึ่งภายในการทดลองเดียวกัน ถ้าหากใช้ strip-chart recorder ทุกพีคจะต้องอยู่บนกระดาษแผ่นเดียวกัน ซึ่งจะจำกัดช่วงเชิงเส้นขององค์ประกอบสารที่สนใจที่ต้องการวิเคราะห์ และความเร็วของชาร์ทต้องสูง เพื่อการวัดความกว้างที่ฐานที่พีคที่แคบกว้างพอที่จะวัดได้อย่างถูกต้อง

a) ความสูงของพีค

จะวัดที่เส้นฐานถึงจุดยอดของพีคดังแสดงในรูป ถ้าเส้นที่ฐานไม่เสถียร เส้นที่ฐานจะต้องต่อออกไปจากจากจุดเริ่มของพีค จนถึงจุดจบของพีค ความสูงของพีคไม่ควรใช้สำหรับพีคที่รูปร่างไม่สมมาตรหรือมีไหล่



รูปที่ 4.7. การวัดความสูงของพีค

ความสูงของพีค จะมีความถูกต้องมากกว่าในกรณีที่พีคมีขนาดการแยกต่ำ และง่ายต่อการทำด้วยมือ

กิจกรรม 4.2
ให้นักศึกษาอธิบายขีดกำจัดของการใช้ความสูงของพีค (Peak Height) ในการหาปริมาณสาร

(b) พื้นที่ของพีค

วิธีการวัดด้วยมือเพื่อที่จะเปลี่ยนพื้นที่จากสัญญาณตัวตรวจวัดเป็นข้อมูลตัวเลข ได้แก่

(1) planimetry

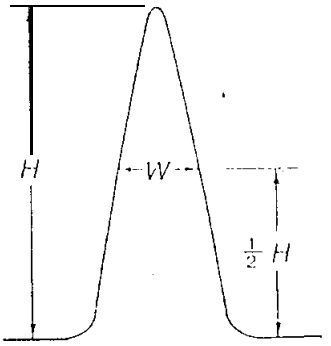
(2) ใช้ผลคูณของความสูงพีคกับความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

(3) พื้นที่สามเหลี่ยม

(4) ตัดและชั่ง

เฉพาะวิธีที่ (2) เท่านั้นที่ยังใช้อยู่

ในการใช้ใช้ผลคูณของความสูงพีคกับความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูง ควรจะใช้กับพีคที่สมมาตรเท่านั้น การที่ใช้ความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูงแทนความกว้างที่ฐานเพื่อลดความผิดพลาดเนื่องพีคมีหาง หรือเส้นที่ฐานไม่สม่ำเสมอ ดังแสดงในรูป



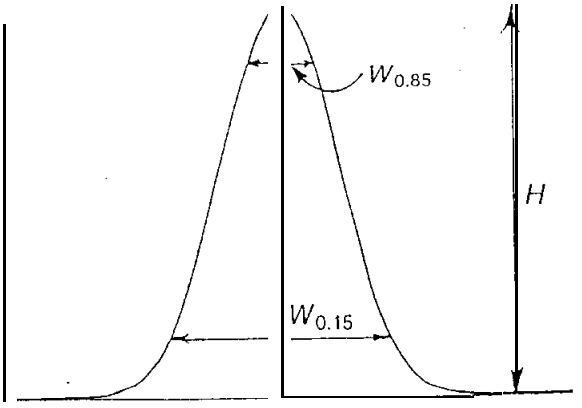
รูปที่ 4.8. การวัดพื้นที่ของพีค

ความถูกต้องของวิธีนี้จะได้รับอิทธิพลจากการวัดความกว้าง และพีคที่แคบจะมีผลต่อความแม่นยำของการวัด ค่าตัวเลขที่ได้จะแทน 93.9% ของพื้นที่ที่ถูกต้องทางทฤษฎี

ได้มีวิธีการที่ทันสมัยและถูกต้องมากกว่า 2 วิธีในการวัดพื้นที่พีคที่ไม่สมมาตรด้วยมือ

1. **Condal-Bosch area** จะใช้ค่าเฉลี่ยของความกว้างของพีคที่ 15% และ 85% ของความสูงแทนความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูง (ดังรูป) ค่าตัวเลขที่ได้จะแทน 100.4% ของพื้นที่ที่ถูกต้องทางทฤษฎี

$$A = H \times (w_{0.15} + w_{0.85})/2$$

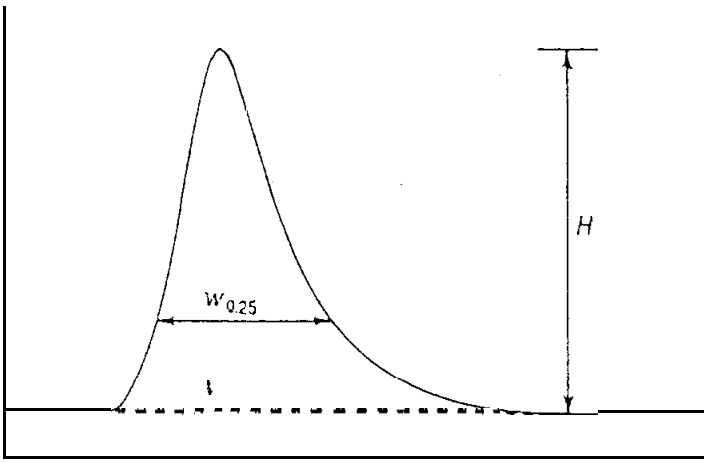


รูปที่ 4.9. Condal-Bosch area

2. **Foley's equation** สำหรับการวัดพื้นที่ของพีคที่แยกแต่ไม่สมมาตร หรือพีคที่สมมาตร เป็นวิธีการที่ถูกต้องสูงกว่าวิธีที่กล่าวมา โดยความกว้างจะวัดที่ 25% ของความสูง ค่าที่วัดได้จะนำมาคำนวณโดยสมการ Foley

$$\mathbf{A = 0.753\,(W_{0.25})}$$

ค่าตัวเลขที่ได้จะแทน 100.3% ของพื้นที่ที่ถูกต้องทางทฤษฎีสำหรับพีคที่สมมาตร



รูปที่ 4.10. การวัดพื้นที่พีค โดยวิธี Foley

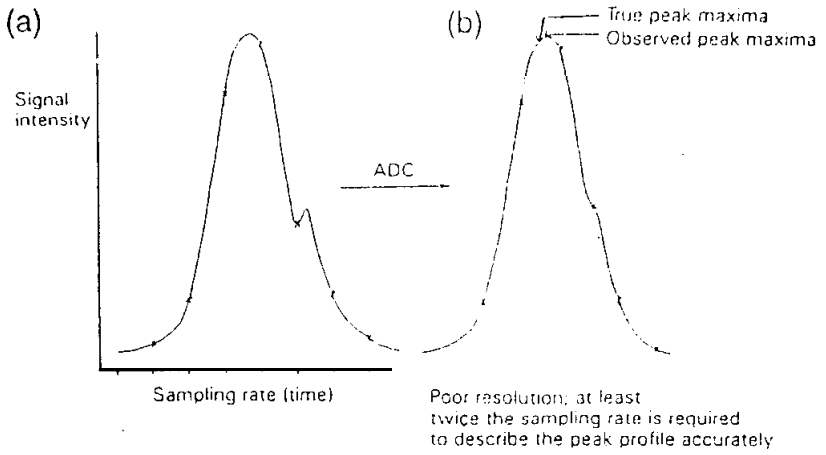
กิจกรรม 4.3
ให้นักศึกษาอธิบายความแตกต่างในการใช้ความสูง (height) และพื้นที่ (area) ของพีคในการหาปริมาณสาร

4.3.2.2. การวัดด้วยเครื่องมือทางไฟฟ้า (Electronic devices)

การวัดพื้นที่ที่ถูกต้องมากที่สุดโดยการลดข้อมูลทางไฟฟ้าด้วยตัวอินทิเกรต หรือคอมพิวเตอร์ ในห้องปฏิบัติการส่วนมากจะใช้วิธีการทั้งสองนี้

ลักษณะที่สำคัญ 2 ประการที่ต้องการสำหรับกระบวนการไฟฟ้าของข้อมูลทางโครมาโทรกราฟีคือ ความถูกต้องของการเปลี่ยนสัญญาณอนาลอกเป็นดิจิตอลและซอร์ฟแวร์ ซอร์ฟแวร์ต้องการเพื่อการตรวจวัดพีค การปรับความถูกต้องของเส้นฐานลอยเลื่อน การคำนวณพื้นที่พีค และค่า retention time และความเข้มข้นขององค์ประกอบในสารตัวอย่างและผลิตรายงานในขั้นตอนสุดท้าย

สัญญาณอนาลอกจากตัวตรวจวัดจะเปลี่ยนเป็นข้อมูลดิจิตอลฐาน 2 ซึ่งต้องการโดย computer interface ได้แก่ signal buffering amplification attenuation และ analog-to-digital converter(A/D converter) A/D converter จะสุ่มสัญญาณอนาลอกด้วยอัตราที่คงที่และเพียงพอที่จะอธิบายพีคได้อย่างถูกต้อง อย่างน้อย 10 จุดต่อวินาที เป็นค่าที่ยอมรับโดยทั่วไป สำหรับพีคที่มีหางจะต้องการเพิ่มขึ้น มิฉะนั้นแล้วรายละเอียดจะหายไป ผลของอัตราการสุ่มสัญญาณที่มีต่อการแยกดังแสดงในรูป

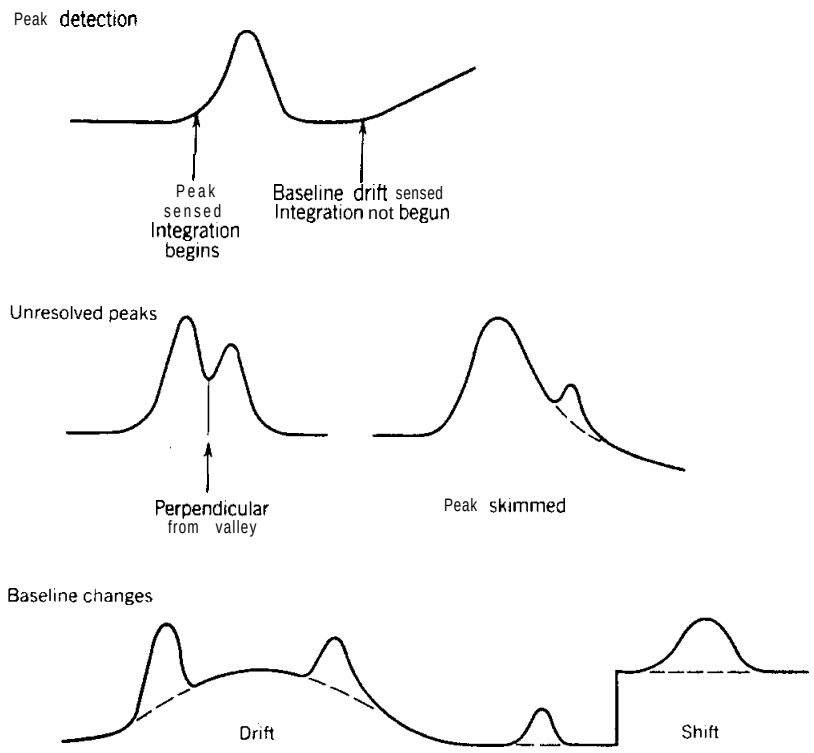


รูปที่ 4.11 ผลของอัตราการสุ่มตัวอย่างในการเปลี่ยนสัญญาณอนาลอกเป็นดิจิตอลที่มีต่อการแยก (a) การพล็อตสัญญาณอนาลอก (b) สัญญาณดิจิตอลที่แทน

ตัวอินทิเกรตและคอมพิวเตอร์ที่มีจำหน่ายทางการค้า จะมีการใส่โปรแกรมสำหรับการคำนวณมาตรฐานก่อนที่จะคำนวณพื้นที่ ซอร์ฟแวร์จะต้องรู้ว่ามีพีคอยู่ ดังนั้น peak detection

algorithm จะถูกเขียนขึ้นเพื่อติดตามขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold) เหนือเส้นฐาน เมื่อเกินค่าขีดเริ่มเปลี่ยน การบันทึกพีคจะเกิดขึ้น

ในระหว่างการแยกทางโครมาโทกราฟี เส้นที่ฐานอาจจะลอยเลื่อนในทิศทางที่เป็นบวก หรือเป็นลบ และสูงเกินค่าขีดเริ่มเปลี่ยน correcting algorithm จะถูกใส่เข้าไปในซอร์ฟแวร์เพื่อเส้นฐานที่ลอยเลื่อน และคำนวณพื้นที่พีคที่เหมาะสม ความไวของความชันสามารถกำหนดได้เพื่อให้เกิดความแตกต่างระหว่างจุดเริ่มของพีคและจุดเริ่มของเส้นที่ฐานที่มีความชัน การวัดพื้นที่พีคที่เหมาะสมจะต้องเอาใจใส่ในการพิจารณาการวัดสิ่งเหล่านี้

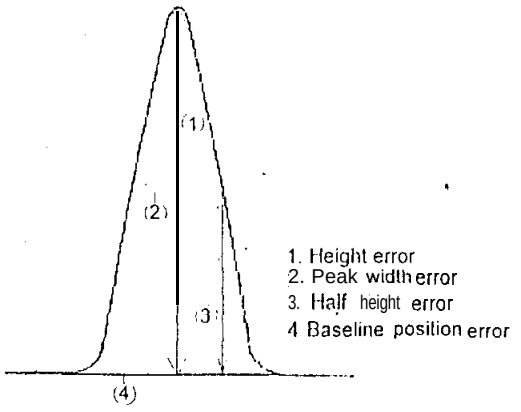


รูปที่ 4.12. ตัวอย่างวิธีการอินทิเกรตพื้นที่พีคในโครมาโทแกรมโดยใช้สถานีข้อมูลในคอมพิวเตอร์

กิจกรรม 4.4
ให้นักศึกษาอธิบายบทบาทของคอมพิวเตอร์กับการวิเคราะห์ทางด้านโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง

4.3.2.3. แหล่งของความผิดพลาดในการวัดขนาดของพีค

ข้อผิดพลาดที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางเรขาคณิตของการวัดด้วยมือ ดังแสดงในรูป



รูปที่ 4.12. ความผิดพลาดที่เกี่ยวข้องกับการวัดด้วยมือ

ความผิดพลาดที่สำคัญที่สุดคือความผิดพลาดที่เกี่ยวข้องกับการวัดความสูง ความกว้างที่ฐาน และความกว้างที่ครึ่งหนึ่งของความสูงและตำแหน่งของเส้นที่ฐาน ความผิดพลาดในการวัดพื้นที่พีคจะเป็นผลรวมของความผิดพลาดทั้ง 4 ส่วนความผิดพลาดในการวัดความสูงของพีคจะเป็นรวมของการวัดความสูงและการวัดตำแหน่งเส้นฐาน ในการวัดด้วยมือการวัดความสูงจะมีความแม่นยำสูงกว่าการวัดพื้นที่พีค

การวัดพีคที่ไม่ถูกต้องด้วยเครื่องมืออาจจะมีสาเหตุมาจากวิธีการต่างๆ เช่นความไม่สมมาตร การรบกวน เส้นที่ฐานลอยเลื่อน และพีคแยกออกจากกันไม่ดี

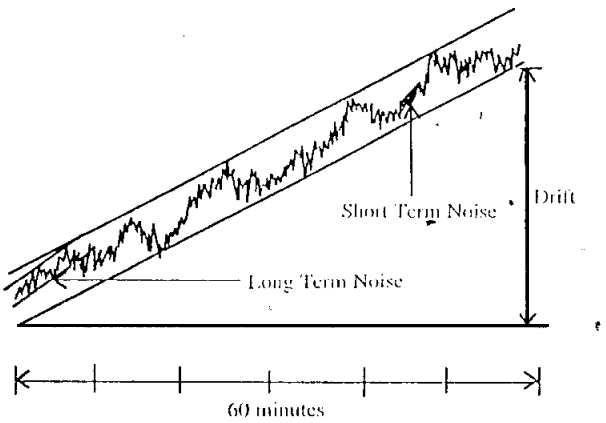
noise อาจจะเป็นทางเคมี หรือไฟฟ้า และกำหนดว่าคือความแปรปรวนแบบสุ่มในสัญญาณที่ออกมา ที่ไม่ได้มาจากการที่ตัวถูกละลายผ่านเข้าไปในตัวตรวจวัด แบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

1) Short –term noise กำหนดว่าคือความแปรปรวนแบบสุ่มในสัญญาณที่ออกมาจากตัวตรวจวัด ที่มีความถี่มากกว่า 1 cycle/sec. ทำให้เส้นที่ฐานไม่เรียบ

2) Long-term noise จะมีลักษณะเป็นแอ่ง หรือพีคเป็นการยากที่จะแยกออกจาก พีคจริงๆที่ความเข้มข้นระดับต่ำมากๆ

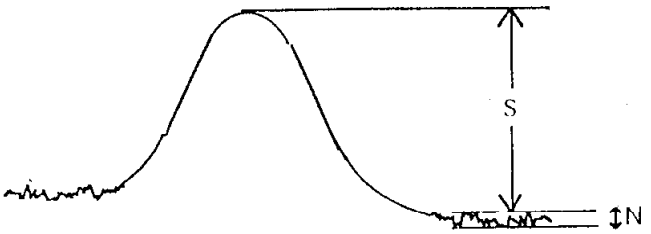
3) Drift การเคลื่อนที่ขึ้น หรือลงอย่างสม่ำเสมอของเส้นฐาน ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของเงื่อนไขทางโครมาโทกราฟี เช่น อุณหภูมิ การโปรแกรมตัวทำละลายและเนื่องมาจากความไม่เสถียรของเครื่องมือเนื่องจากผลอุณหภูมิในตัวตรวจวัด

ที่เล็กที่สุดที่วัดได้ แยกชัดเจนจากการรบกวนที่เส้นฐาน จะอธิบายในเทอมของอัตราส่วนของสัญญาณต่อการรบกวน (S/N Ratio) ซึ่งจะเปรียบเทียบความสูงของพีคกับความสูงของการรบกวนรอบๆดังแสดงในรูป



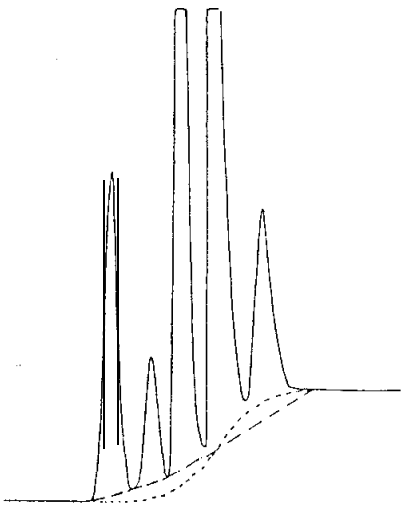
รูปที่ 4.13. ชนิดต่างๆของสัญญาณการรบกวน

โดยการกำหนดของ The American Chemical Society (ACS) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD)ที่ S/N =3 กำหนดพีคที่มีค่าน้อยที่สุดว่าเป็นพีค เป็นพีคที่เล็กที่สุดที่ตรวจวัดได้ แต่เล็กเกินกว่าที่จะหาปริมาณได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ) กำหนดว่าเป็นพีคที่เล็กที่สุดที่สามารถวัดพื้นที่ได้อย่างถูกต้องคือวัดที่ S/N =10



รูปที่ 4.14. อัตราส่วน สัญญาณต่อการรบกวน (S/N ratio)

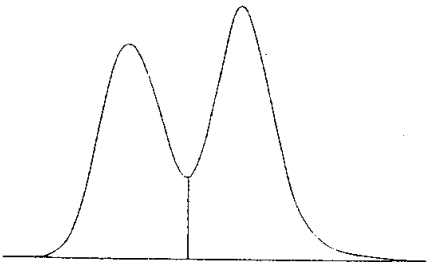
เส้นฐานลอยเลื่อนอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดหลายประการคือ พื้นที่ ค่า retention time และช่วงการทำงานของตัวตรวจวัด เมื่อพีคถูกชะออกมาความชันของเส้นฐาน เส้นฐานที่ลากใต้พีคโดยปกติจะเป็นเส้นตรง เส้นฐานที่ถูกต้องอาจจะเป็นเส้นโค้ง ดังนั้นพื้นที่ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอาจจะเนื่องมาจากการวางตำแหน่งเส้นฐานที่ไม่ถูกต้อง



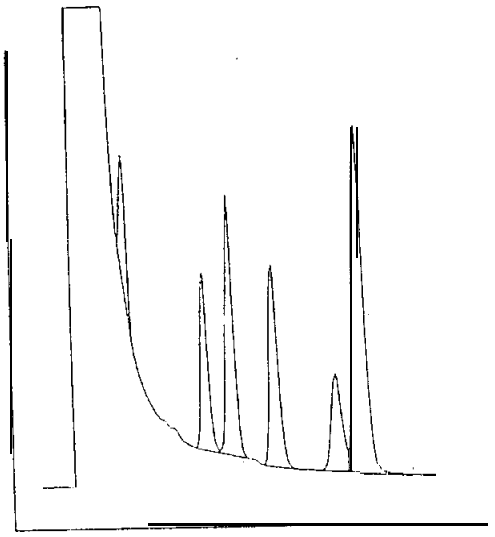
รูปที่ 4.15. ความผิดพลาดที่เกี่ยวข้องกับการวางตำแหน่งเส้นฐานที่ไม่ถูกต้อง

ความถูกต้องของการวิเคราะห์หาปริมาณ พีคแต่ละพีคจะต้องแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ พีคที่แยกออกจากกันไม่สมบูรณ์จะเป็นอุปสรรคในขั้นตอนสุดท้ายในการวัดพีค algorithms ที่เขียนในวอร์ฟแวร์ส่วนมากจะช่วยในการหาพื้นที่ที่แยกออกจากกันไม่ดี แต่นักวิเคราะห์จะต้องเป็นผู้ตัดสินใจเลือกแนวทางที่ดีที่สุด วิธีที่ดีที่สุดคือการลากเส้นตั้งฉากระหว่างร่องของพีค 2 พีค ที่ซอร์ฟแวร์ตรวจพบไปยังเส้นฐาน วิธีนี้จะใช้เมื่อ

1. พีคมีสมมาตรและมีความสูง ความกว้างใกล้เคียงกัน
2. ร่องระหว่างพีคทั้งสองไม่มากกว่า 5% ของความสูงของพีค
3. เส้นที่ฐานราบเรียบ
4. การรบกวนไม่มากนัก



รูปที่ 4.16. การอินทิเกรตพีคที่ซ้อนกันโดยวิธีลากเส้นตั้งฉากระหว่างของพีคร่อง 2 ร่อง



รูปที่ 4.17. การอินทิเกรตพีคที่แยกจากกันไม่ชัดเจนโดยวิธี Tangential Skim

ในกรณีพีคที่ไม่สมมาตร วิธี tangential skim จะมีความถูกต้องมากกว่า โดยมากจะใช้หาพื้นที่ใต้พีคที่เล็กกว่าที่อยู่ไหล่หรือหางของพีคที่ใหญ่กว่า โดยสมมุติว่าความชันของเส้นฐานส่วนใหญ่มาจากพีคใหญ่ และความเข้มข้นของพีคเล็กจะแทนได้อย่างถูกต้องด้วยพื้นที่เหนือพีคที่ใหญ่กว่า แต่วิธีนี้จะให้พื้นที่พีคเล็กต่ำกว่าเป็นจริง ยกเว้นมีขนาดเล็กและแคบกว่าพีคใหญ่มากๆ

กิจกรรม 4.5
ให้นักศึกษาสรุปชนิดต่าง ๆ ของการรบกวน และความผิดพลาดที่เกี่ยวข้องกับการวัดขนาดของพีค

4.3.3. การคำนวณ (calculation)

4.3.3.1. บทนำ

การอินทิเกรตพีคจะเป็นขั้นตอนแรกของการจัดการกับข้อมูลสำหรับการหาความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆในตัวอย่าง การอินทิเกรตพีคเพื่อเปลี่ยนสัญญาณตัวตรวจวัดเป็นสัญญาณตัวเลข จะมีอยู่ด้วยกัน 5 วิธีหลักเพื่อหาข้อมูลขององค์ประกอบสัมพัทธ์เกี่ยวกับตัวอย่าง ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

ในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน เป็นรูปแบบที่ใช้ในการทำนายค่าของตัวแปรอิสระ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารที่สนใจ เมื่อทราบเพียงตัวแปรตามคือสัญญาณการตอบสนองต่อการวิเคราะห์เท่านั้น วิธีการโดยปกติที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน จะอาศัยหลักการ linear least-squarees fit เพื่อหาเส้นตรงที่ดีที่สุดสำหรับ linear regression ดังแสดงโดยสมการ

$$Y = mX + C$$

เมื่อ m คือความชันของเส้นตรง
b คือจุดตัดของความชันกับแกน Y

"Regression" ถูกกำหนดว่าเป็นความสัมพันธ์เชิงฟังก์ชันระหว่างตัวแปรที่สัมพันธ์กันสองตัว หรือมากกว่า และ "**linear**" ชี้ให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสองเป็นเชิงเส้น นักเคมีวิเคราะห์โดยมากจะนิยมกราฟเทียบมาตรฐานเชิงเส้น เนื่องจากข้อมูลง่ายต่อการแปลความหมาย

4.3.3.2. normalization (% ของพื้นที่)

ในวิธีนี้ จะสมมุติว่าองค์ประกอบทั้งหมดในตัวอย่างถูกชะออกมาและตรวจวัดทั้งหมด วิธีนี้พื้นที่ของทุกพีคจะถูกวัดและรวมกัน รวมคิดเป็น 100% พื้นที่ของแต่ละพีค (X) สามารถหาได้โดย

$$\% X = \frac{A_X}{A_X + A_Y + A_Z} \times 100$$

เมื่อ A_x, A_y และ A_z แทนพื้นที่ของสาร X, Y และ Z

กิจกรรม 4.6
ให้นักศึกษาสรุปขีดกำจัดของการหาปริมาณโดยวิธี Normalisation

4.3.3.3. Area Normalisation with Response factor

จากในวิธีแรกนั้น การตอบสนองของตัวตรวจวัดต่อองค์ประกอบต่างๆในตัวอย่างมีค่าไม่เท่ากัน พื้นที่พีคสัมพัทธ์ไม่จำเป็นต้องแทนองค์ประกอบที่แท้จริงในตัวอย่าง ดังนั้นค่า response factor สำหรับแต่ละองค์ประกอบจึงเป็นสิ่งจำเป็นในการ normalization ค่า response factor จะคำนวณโดยเทียบกับสารอ้างอิง

$$F_X = \frac{F_r A_r W_X}{A_X W_r}$$

เมื่อ A_x และ A_r แทนพื้นที่พีคของตัวถูกละลาย (X) และของพีคสารอ้างอิง

w_x และ w_r แทนความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (X) และของสารอ้างอิง

และ F_x และ F_r แทน response factor ของตัวถูกละลาย (X) และของสารอ้างอิง

ดังนั้นพื้นที่ที่ถูกต้องของสาร X หาได้โดย $A_x \times F_x$

แม้ว่าค่า response factor จะหาได้จากการวัดเพียงครั้งเดียว แต่ควรจะใช้วิธีเทียบมาตรฐาน โดยใช้ตัวถูกละลายอย่างน้อย 3 เข้มข้นพล็อตกับการตอบสนองของตัวตรวจวัดแล้วลากเส้นตรงที่ดีที่สุด ความชันของเส้นตรงคือ response factor

กิจกรรม 4.7
ให้นักศึกษาสรุปขีดกำจัดของการหาปริมาณ โดยวิธี Area Normalization with Response Factor

4.3.3.4. External Standandisation

วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายวิธี แต่จะใช้หลักการเดียวกัน เริ่มจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีองค์ประกอบที่สนใจอยู่ ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น จากนั้นนำมาตวรจหาการตอบสนองของตัวตรวจวัด

อัตราส่วนของปริมาณของสารมาตรฐานต่อการตอบสนอง (โดยปกติจะใช้พื้นที่พีค หรือความสูง) ซึ่งเรียกว่า "response factor (RF)" สำหรับองค์ประกอบนั้นๆ

$$\mathbf{RF} = \frac{\text{ปริมาณ (STD)}}{\text{พื้นที่ (STD)}}$$

เมื่อวิเคราะห์สารตัวอย่างปริมาณของแต่ละองค์ประกอบหาได้โดยการคูณการตอบสนอง (พื้นที่พีค หรือความสูงของพีค) ขององค์ประกอบนั้นด้วยค่า RF

ปริมาณ = พื้นที่ x RF

$$= \text{พื้นที่ (สารตัวอย่าง)} \times \text{RF (สารตัวอย่าง)}$$

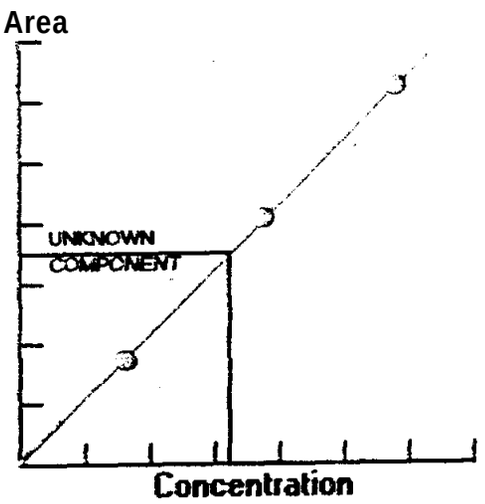
$$= \frac{\text{พื้นที่ (สารตัวอย่าง)} \times \text{ปริมาณ(มาตรฐาน)}}{\text{พื้นที่ (มาตรฐาน)}}$$

เนื่องจากความถูกต้องของวิธีการ External Standard Method จะขึ้นโดยตรงกับความถูกต้องของปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีด correction factor จะต้องนำมาคำนวณในผลลัพท์ด้วย ถ้าหากว่าปริมาตรที่ฉีดต่างกัน

$$\text{correction factor} = \frac{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด}}{\text{ปริมาตรสารมาตรฐานที่ฉีด}}$$

$$\text{ปริมาณ} = \frac{\text{พื้นที่ (ตัวอย่าง)} \times \text{ปริมาณ (สารมาตรฐาน)}}{\text{F} \times \text{พื้นที่ (สารมาตรฐาน)}}$$

หรือโดยพล็อตกราฟเทียบมาตรฐานระหว่างพื้นที่พีค(ความสูงของพีค) กับความเข้มข้น จากเคอร์ฟเทียบมาตรฐาน สามารถนำมาหาความเข้มข้นของสารที่สนใจในตัวอย่างได้



รูปที่ 4.18. กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับใช้ใน External Standardization

ในกรณีที่ง่ายที่สุด สารมาตรฐานจะถูกนำมาวิเคราะห์ครั้งหนึ่งก่อนสารตัวอย่าง เพื่อสร้างเคอร์ฟเทียบมาตรฐาน จากนั้นตัวอย่างจะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อทั้งหมด และคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สนใจได้

วิธีอื่น สารมาตรฐานอาจจะถูกนำมาวิเคราะห์สลับกับสารตัวอย่าง เช่น วิเคราะห์สารมาตรฐาน 3 ตามด้วยตัวอย่าง 6 และตามด้วยสารมาตรฐานอีก 3 หรือ สารมาตรฐาน 2 ตามด้วยตัวอย่าง 3 และตามด้วยสารมาตรฐานอีก 2 ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

วิธีนี้ ต้องการความแม่นยำของปริมาตรที่ฉีดสารแต่ละครั้ง และต้องฉีดในปริมาตรที่เท่ากันทุกครั้ง

วิธีนี้การตอบสนองของตัวตรวจวัดและเครื่องมือต้องเสถียรเพื่อหลีกเลี่ยงการเทียบมาตรฐานบ่อยๆ แม้ว่าจะกระทำด้วยความระมัดระวังแล้ว ความสม่ำเสมอของผลที่ได้จะอยู่ในช่วง 1-5% วิธีการ external Standard จะมีประโยชน์อย่างมาก โดยเฉพาะกรณีที่หา Internal Standard ไม่ได้ หรือกรณีที่สารตัวอย่างมีความหลากหลายในช่วงกว้างที่ต้องการวิเคราะห์

ข้อดีของ External Standard Method

1. ผลที่ได้อาจจะเป็นผลสัมบูรณ์ หรือผลสัมพัทธ์
2. ผลไม่ขึ้นอยู่กับพีคอื่นๆทั้งหมด
3. ความไวของตัวตรวจวัด อาจจะเปลี่ยนแปลงได้ในขณะที่ทำการวิเคราะห์
4. ตัวอย่างทั้งหมดไม่จำเป็นต้องถูกชะออกมาหรือถูกตรวจวัด
5. ไม่จำเป็นต้องมี Internal Standard

ข้อด้อยของ External Standard Method

1. ผลจะขึ้นโดยตรงอยู่กับความไวของตัวตรวจวัด เมื่อเป็นเช่นนี้จะต้องการความเสถียรของตัวตรวจวัดในระยะยาว เว้นเสียแต่ว่าจะทำการเทียบมาตรฐานบ่อยๆ
2. ผลจะขึ้นโดยตรงอยู่กับขนาดสารตัวอย่างที่ถูกฉีด

3. ผลจะขึ้นอยู่กับความเอาใจใส่ในการถ่ายปริมาตรและความสม่ำเสมอของการสกัดและการทำอนุพันธ์
4. การเทียบมาตรฐานเครื่องมือบ่อยๆเป็นสิ่งจำเป็น
5. ความถูกต้องและความแม่นยำ จะถูกจำกัดโดยเงื่อนไขต่างๆดังกล่าว

การประยุกต์ของ External Standard Method

1. เมื่อต้องการปริมาณ หรือความเข้มข้นสัมบูรณ์และ Internal Standard ไม่สามารถใช้ได้
2. เมื่อสารตัวอย่างทั้งหมดไม่ถูกชะออกมา หรือตรวจวัด และ Internal Standard ไม่สามารถใช้ได้
3. เมื่อขนาดของสารตัวอย่างและความไวของตัวตรวจวัดมีค่าคงที่
4. เมื่อใช้ Gas Sampling Valve และ liquid Sampling Loop ต้องมีปริมาตรที่ฉีดคงที่

กิจกรรม 4.8
ให้นักศึกษาสรุปขีดกำจัดของการหาปริมาณโดยวิธี External Standards

4.3.3.5. Internal Standardisation

เพื่อที่จะให้ได้รับความถูกต้องในการหาปริมาณของสารประกอบต่างๆ ในการวิเคราะห์เดียวกัน จะต้องคำนึงถึงความแตกต่างในการตอบสนองของสารประกอบเหล่านี้ ต่อตัวตรวจวัด ในวิธี External Standard Method จะใช้สารมาตรฐานบริสุทธิ์ ที่ให้ calibration factor ที่จะใช้ในการหาปริมาณสารตัวอย่าง

ในวิธี Internal Standard Method และ วิธีหา % พื้นที่ การเทียบมาตรฐานแบบนี้จะนำไปสู่ค่า Relative Response Factors (RRFs) ในวิธี IS ค่า RRFs สำหรับพีคเฉพาะจะถูกคำนวณเทียบกับพีคของ IS ซึ่งเพิ่มมาจากสารประกอบที่เติมลงไปในของผสม

ในวิธี % Normalisation พีคของสารที่สนใจซึ่งอยู่ในของผสมแล้ว จะถูกเลือกขึ้นมาเพื่อใช้เปรียบเทียบกับพีคอื่นๆทั้งหมด ซึ่งเรียกว่า "Assigned Standard" ไม่ว่าจะในกรณีใดๆ ค่า RRFs ของ IS หรือ "Assigned Standard" มีค่าเท่ากับ 1 (โดยคำจำกัดความ) ในทั้งสองกรณี การคำนวณค่า RRFs จะเหมือนกัน และใช้สูตรดังแสงต่อไปนี้

$$\text{RRF} = \frac{\text{ปริมาณ}}{\text{พื้นที่}} \times \frac{\text{พื้นที่ IS}}{\text{ปริมาณ IS}}$$

ในการที่จะใช้วิธีนี้ จะต้องมีสารประกอบต่อไปนี้

1. จะต้องมีสมบัติทางเคมีเหมือนกับสารประกอบที่สนใจ
2. จะต้องถูกชะออกมาในที่ว่างในโครมาโทแกรมและแยกออกมาจากองค์ประกอบอื่นๆในของผสม จะให้ดีจะต้องถูกชะออกมาใกล้กับองค์ประกอบที่สนใจ
3. ปริมาณสารตัวอย่าง = $\frac{\text{พื้นที่ (ตัวอย่าง)} \times \text{ปริมาณ (IS)} \times \text{RRF (ตัวอย่าง)}}{\text{พื้นที่ (IS)}}$

โดยปกติ IS จะเติมลงใน calibration Mixture และในสารตัวอย่างในปริมาณเท่าๆกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ calibration Mixture องค์ประกอบที่สนใจจะมีพื้นที่พีคที่แน่นอนเช่นเดียวกับของ IS อัตราส่วนพื้นที่พีคเหล่านี้สำหรับองค์ประกอบที่สนใจและ IS ที่มีปริมาณเท่ากันเรียกว่า relative response factor (RRF)

เมื่อนำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ อัตราส่วนพื้นที่นี้คูณด้วย RRF จะได้ปริมาณขององค์ประกอบที่สนใจ ยกตัวอย่างเช่น ถ้าหากอัตราส่วนเหมือนกับใน Calibration Sample ดังนั้นปริมาณขององค์ประกอบตัวอย่างจะเหมือนกับใน calibration sample ถ้าหากอัตราส่วนสูงกว่าหรือต่ำกว่าที่พบใน calibration Sample ปริมาณขององค์ประกอบตัวอย่างจะสอดคล้องกัน ซึ่งหมายความว่าปริมาณแท้จริงของตัวอย่างที่ฉีดไม่สำคัญ เฉพาะอัตราส่วนของพื้นที่พีคเท่านั้น

ข้อได้เปรียบที่สำคัญของวิธี IS คือเติมก่อนจะเริ่มกระบวนการ เช่น การสกัด การสูญเสียใดๆของสารตัวอย่างจะเกิดขึ้นกับ IS เช่นเดียวกัน ดังนั้นจะมีผลต่ออัตราส่วนของพื้นที่พีค

ข้อดีของวิธี IS

1. ผลจะมีความถูกต้องสูงมาก
2. ผลอาจจะสมบูรณ์ หรือสัมพัทธ์ก็ได้
3. ผลไม่ขึ้นอยู่กับความไวของตัวตรวจวัด นั่นคือไม่มีผลต่อความแปรปรวนในระยะยาว
4. ผลไม่ขึ้นอยู่กับขนาดสารตัวอย่างที่ฉีด
5. ผลไม่ขึ้นอยู่กับพีคอื่นๆทั้งหมด
6. ความไวของตัวตรวจวัดสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในขณะวิเคราะห์
7. ตัวอย่างทั้งหมดไม่จำเป็นต้องถูกชะ หรือถูกตรวจวัดทั้งหมด

ข้อด้อยของวิธี IS

1. สารประกอบ IS ต้องถูกเติมลงไปในสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์
2. ต้องการการเทียบมาตรฐานของเครื่องมือ

การประยุกต์ของวิธี IS

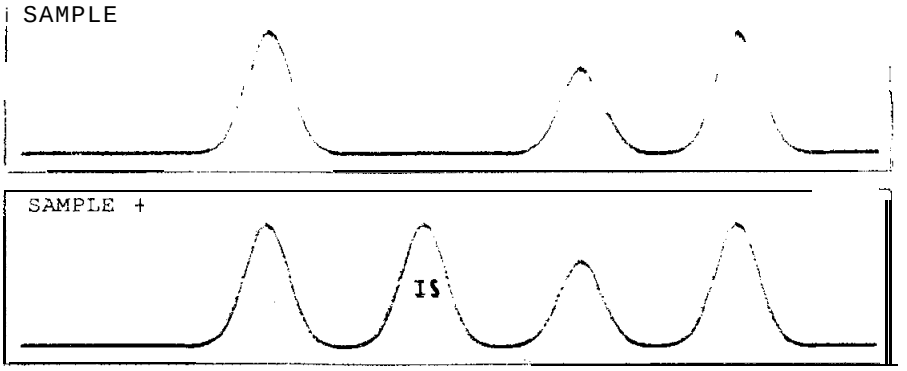
1. ใช้ในที่ซึ่งต้องการความถูกต้องและความแม่นยำสูงสุด
2. ใช้ในที่ซึ่งสารประกอบทั้งหมดไม่ถูกชะ หรือถูกตรวจวัด
3. ปริมาณสัมบูรณ์ หรือความเข้มข้นเป็นที่ต้องการ
4. ประสิทธิภาพของการสกัดไม่คงที่

ลักษณะสำคัญของ IS

1. IS จะต้องแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆในสารตัวอย่าง
2. IS จะต้องไม่มีอยู่ในตัวอย่าง
3. IS จะต้องมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับพีคที่ต้องการหาปริมาณ

4. IS จะต้องมีค่า RT ที่เหมาะสม
5. ทราบความบริสุทธิ์
6. มีโครงสร้างทางเคมี

เฉพาะวิธีนี้จะใช้สำหรับแก้ไขความผิดพลาดในการเตรียมตัวอย่าง หรือการฉีดสารตัวอย่าง และเพื่อช่วยหาเปอร์เซนต์การเอากลับคืนของสารตัวอย่าง สารที่เป็น Internal Standard จะถูกเติมลงในสารตัวอย่างในขั้นตอนแรกสุดในกระบวนการวิเคราะห์ เตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีสารที่สนใจขึ้นมา 2-3 ความเข้มข้น เติม internal standard ลงไปในความเข้มข้นเท่ากัน และลงในสารตัวอย่างด้วย จากนั้นสารมาตรฐานและสารตัวอย่างทั้งหมดจะเข้าสู่ระบบการบำบัดเช่นเดียวกันจนถึงขั้นการตรวจวัด

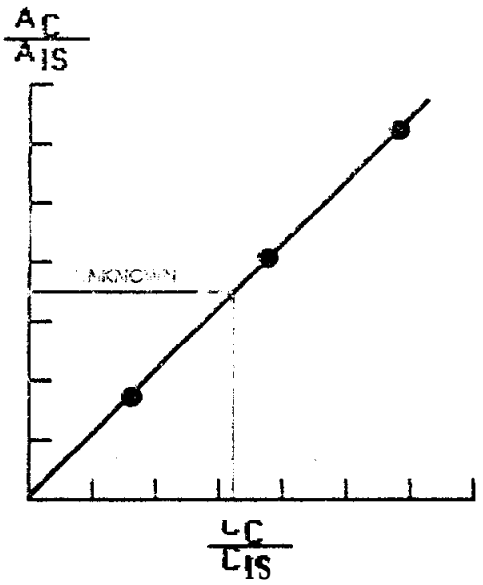


รูปที่ 4.19. โครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง และสารตัวอย่างที่เติม Internal Standard

ในการเลือก Internal Standard ในกระบวนการวิเคราะห์มีความสำคัญมากและจะต้องระมัดระวังเพื่อหลีกเลี่ยงการเพิ่มความผิดพลาด ความต้องการ Internal standard มีดังนี้

1. ไม่ควรมีอยู่ในสารตัวอย่างโดยปกติ
2. ควรจะแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆทั้งหมดในสารตัวอย่าง
3. ควรถูกชะออกมาใกล้เคียงกับตัวถูกละลายที่สนใจ
4. ควรเติมลงในระดับความเข้มข้นที่ให้พื้นที่พีคใกล้เคียงกับของสารที่สนใจ
5. สมบัติทางเคมีและกายภาพควรจะคล้ายคลึงกับตัวถูกละลายที่สนใจ

6. ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบใดๆในตัวอย่าง
7. ควรจะมีความบริสุทธิ์สูง



รูปที่ 4.20. กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับใช้ใน Internal Standardization

กราฟเทียบมาตรฐานจะสร้างโดยการพล็อตอัตราส่วนของสัญญาณการตอบสนอง (พื้นที่พีค หรือความสูงของพีค) สำหรับตัวถูกละลายแต่ละชนิดเทียบกับของ Internal Standard กับความเข้มข้นของตัวถูกละลาย อัตราส่วนของพื้นที่สำหรับแต่ละองค์ประกอบในตัวอย่างสามารถคำนวณได้ และอัตราส่วนเหล่านี้ ปริมาณของแต่ละองค์ประกอบสามารถหาได้

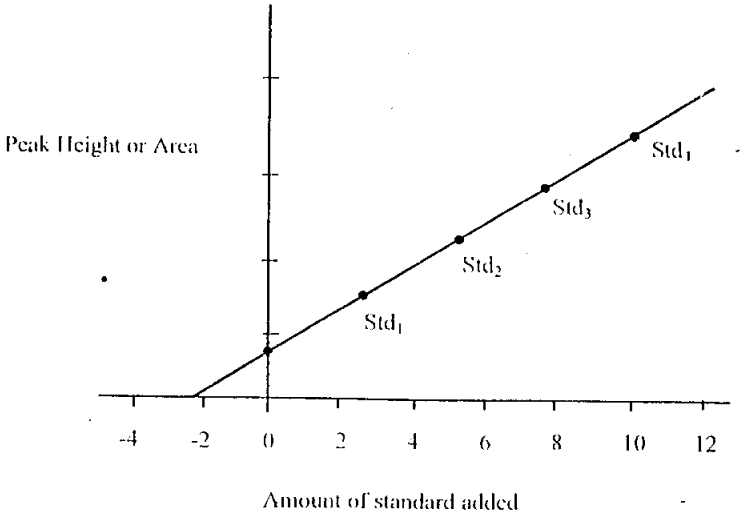
กิจกรรม 4.9
ให้นักศึกษาสรุปขีดจำกัดของการหาปริมาณโดยวิธี Internal Standards

4.3.3.6. Standard Addition

วิธีนี้ถูกนำมาใช้น้อยที่สุดในการหาปริมาณ เป็นการใช้เพื่อให้แน่ใจว่าสารเทียบมาตรฐานอยู่ในแมทริกซ์เช่นเดียวกับในสารตัวอย่าง ในวิธีนี้ สารตัวอย่างจะถูกนำมาวิเคราะห์ก่อนเพื่อที่จะหา

ความเข้มข้นโดยประมาณของตัวถูกละลายที่สนใจ จากนั้นตัวถูกละลายที่สนใจที่ทราบความเข้มข้นต่างๆจะเติมลงในตัวอย่างที่เตรียมไว้ในปริมาณเท่าๆกันหลายๆ ขวด เพื่อเพิ่มสัญญาณจากการตอบสนองของตัวตรวจวัด นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้มาทำการวิเคราะห์ หลักของวิธีการนี้คือสัญญาณที่เพิ่มมาจากการเติมสารมาตรฐานจะเป็นสัดส่วนกับสัญญาณเริ่มต้น วิธีนี้จะประยุกต์ใช้ได้เมื่อทราบความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างการตอบสนองของเครื่องและความเข้มข้นของสารที่สนใจ

เพื่อหาความเข้มข้นของสารสารตัวอย่างเริ่มต้น สัญญาณตัวตรวจวัดพล็อตกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป ดังรูป



รูปที่ 4.21. กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับใช้ใน Standard Addition

สัญญาณที่มีในขณะที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน จะแทนความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวอย่าง ซึ่งสามารถหาได้ โดยการลากเส้นต่อออกไปตัดที่แกน X ค่าสัมบูรณ์บนแกน X คือความเข้มข้นตอนเริ่มต้น ในทางปฏิบัติการใช้วิธี standard addition ไม่ง่ายนัก เนื่องการเพิ่มสารมาตรฐานลงในสารตัวอย่างจะเพิ่มปริมาตรของสารตัวอย่าง และอีกอย่างหนึ่งในการหาปริมาณใช้วิธี extrapolation มากกว่า interpolation ทำให้วิธีการนี้มีความแม่นยำต่ำกว่าวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานแบบอื่นๆ

กิจกรรม 4.10
ให้นักศึกษาสรุปขีดกำจัดของการหาปริมาณโดยวิธี Standard Addition

กิจกรรม 4.11
ให้นักศึกษาเปรียบเทียบข้อดี ข้อเสีย ขีดจำกัด และการประยุกต์ใช้ ของวิธีการหาปริมาณในรูปแบบต่าง ๆ

4.3.3.7. การตรวจสอบวิธีการและการยอมรับได้ของวิธีการ

นักเคมีวิเคราะห์จะต้องมีความแน่ใจว่า วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณที่ใช้นั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ ซึ่งจำเป็นจะต้องทำการวิเคราะห์แบลงค์ด้วยเพื่อความแน่ใจว่าไม่มีพีคแปลกปลอมอยู่ สำหรับตัวอย่างจริงควรจะทำการ spike ด้วยสารมาตรฐาน เพื่อหาเปอร์เซนต์การเอากลับคืน ตัวอย่างที่เลือกควรทำการวิเคราะห์ซ้ำๆหลายครั้ง เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการ ในกรณีที่มีวิธีการอื่นอยู่ ควรจะทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบผล และรายละเอียดและขั้นตอนทั้งหมดควรจะทำการบันทึกไว้อย่างชัดเจน

กิจกรรม 4.12
อ่านบทความเพิ่มเติมทางด้านวิทยาการใหม่ ๆ ในวารสารโครมาโทกราฟี (Journal of Chromatography) ที่ฝ่ายวารสารและเอกสาร อาคาร 2 ชั้นหนึ่งและชั้น 2 สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยติดต่อกับบรรณารักษ์ผู้ให้บริการ

แบบฝึกหัด

1. จงอธิบายวิธีการต่างๆในการทำคุณภาพวิเคราะห์ทางด้านโครมาโทกราฟีมา 3 วิธี
2. ในการทำคุณภาพวิเคราะห์ สิ่งสำคัญที่จำเป็นต้องใช้และควบคุมในการวิเคราะห์คืออะไร
3. จงอธิบายวิธีการต่างๆในการทำปริมาณวิเคราะห์ทางด้านโครมาโทกราฟีมา 5 วิธี
4. ข้อที่ต้องคำนึงถึงในการเลือกสารที่จะใช้เป็น Internal Standards คืออะไร
5. ประโยชน์ของ Ultraviolet and Mass Spectrum Library คืออะไร
6. ข้อจำกัดของการใช้ความสูงของพีค (Peak Height) ในการหาปริมาณคืออะไร
7. จงบอกวิธีการต่างๆในการหาพื้นที่ของพีค 3 วิธี
8. จงบอกชนิดต่างๆของสัญญาณการรบกวน (Noise) ที่อาจพบในโครมาโทแกรม
9. จงเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธี External และ Internal Standards
10. ความสำคัญของ Linear Least Square Method ในการทำปริมาณวิเคราะห์ทางด้านโครมาโทกราฟี

เฉลยแบบฝึกหัดและอธิบายพิมเติม

1. ตอบ

1 .โดยการใช้ข้อมูลของค่า retention เช่น retention time, retention volume หรือ capacity factor

2. โดยวิธีการ Standard Addition หรือ Spiking

3. Isotope Labelling

2. ตอบ

สารมาตรฐานที่เป็นสารเดียวกันกับสารที่สนใจ เพื่อใช้หาค่า retention ของสารที่สนใจในระบบที่ต้องการแยก และต้องควบคุมเงื่อนไขการวิเคราะห์ เช่น องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล คอลัมน์ที่ใช้ ทั้งสารมาตรฐานและสารตัวอย่างต้องถูกวิเคราะห์ภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน

3. ตอบ

1. Nornalization
2. Area Normalization with Respons factor
3. External Standards
4. Internal Standards

5. Standard Addition

4. ตอบ

จะต้องมีสมบัติทางเคมีเหมือนองค์ประกอบที่สนใจ และถูกชะออกมาในโครมาโทแกรมโดยไม่เกิดการซ้อนทับกับพีคขององค์ประกอบอื่นๆในสารตัวอย่าง และถูกชะออกมาใกล้เคียงกับองค์ประกอบที่สนใจ

5. ตอบ

ใช้ในการอ้างอิง และเปรียบเทียบ เช่นค่า retention และ Spectra ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง ใช้เป็นแนวทางในการทำนายเงื่อนไขในการวิเคราะห์ หรือหาชนิดของสารตัวอย่างได้

6. ตอบ

รูปร่างของพีคต้องสมมาตรและเส้นที่ฐานต้องเสถียร จึงจะทำให้การวัดถูกต้องและแม่นยำ

7. ตอบ

1. ใช้วิธีวัดด้วยเครื่องมือที่เรียกว่า Planimeter
2. การคำนวณโดยใช้พื้นที่สามเหลี่ยม
3. การวัดด้วยอินทิเกรเตอร์

8. ตอบ

มี 3 ชนิดคือ Short term Noise, Long term Noise และ Drift

9. ตอบ

วิธี External Standard ทำได้สะดวกกว่า ตัวอย่างทั้งหมดไม่จำเป็นต้องถูกชะออกมา และ ผลที่ได้อาจเป็นผลสัมบูรณ์ หรือผลสัมพัทธ์ แต่ ขึ้นอยู่กับความไวของตัวตรวจวัด และจำเป็นต้องทำการเทียบมาตรฐานเครื่องมือบ่อยๆ

วิธี Internal Standard ผลการวิเคราะห์ไม่ขึ้นกับความไวของตัวตรวจวัด ลดความผิดพลาดต่างๆที่เกิดในระหว่างกระบวนการวิเคราะห์ แต่หาปริมาณสัมบูรณ์ไม่ได้ และสารมาตรฐานต้องเติมลงในสารตัวอย่าง ในการเลือก Internal Standards มีขีดจำกัดในการเลือกมาก

10. ตอบ

เนื่องจากในการหาปริมาณสารทางด้านโครมาโทกราฟี จะอาศัยความสัมพันธ์การตอบสนองของตัวตรวจวัดกับปริมาณ (รูปความเข้มข้น)ที่ผ่านเข้าไปในตัวตรวจวัด ซึ่งจะอยู่ในลักษณะเชิงเส้น

(linear) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (Calibration Curve) เพื่อหาเส้นตรงที่ดีที่สุด (Best Fit) จำเป็นต้องอาศัยวิธี Linear Least Square Method

---