สารบัญ

		หน้า
คำนำ		
คำชี้แจงเกี่ยวกับกระบวนวิชา		**(1)**
คำชี้แจงการใช้ตำราเรียนได้ด้วยตนเอง		**(3)**
แบบประเมินผลก่อนเรียน		**(4)**
ตอนที่ 1	ทฤษฎีและพารามิเตอร์พื้นฐานทางโครมาโทกราฟี	1
1.1	บทนำ	5
1.2	กระบวนการทางโครมาโทกราฟี	7
1.3	ภาพของการแยกในระบบโครมาโทกราฟี	9
1.4	การจำแนกวิธีการแยกโครมาโทกราฟีของเหลว	10
1.4.1.	การจำแนกโดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่	10
1.4.1.1.	โครมาโทกราฟีของไหลวิกฤติยิ่งยวด	10
1.4.1.2.	โครมาโทกราฟีของเหลว	10
1.4.1.3.	แก๊สโครมาโทกราฟี	10
1.4.2.	การจำแนกโดยอาศัยเทคนิคของรูปแบบการทำโครมาโทกราฟี	12
1.4.2.1.	โครมาโทกราฟีแบบแผ่น	12
1.4.2.2.	โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	12
1.4.3.	การจำแนกโดยอาศัยรูปแบบของการพัฒนาการแยก	13
1.4.3.1.	Elution Development	13
1.4.3.2.	Frontal Analysis	13
1.4.3.3.	Displacement Development	1 3
1.4.4.	การจำแนกโดยอาศัยกลไกการหน่วงเหนี่ยว	15
1.4.4.1.	การดูดซับ (Adsorption Chromatography)	15
1.4.4.2.	การแบ่งส่วน (Partition Chromatography)	15
1.4.4.3.	การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange Chromatography)	15
1.4.4.4.	การขจัดขนาด (Sixe Exclusion Chromatography)	15

1.4.4.5. ค่าสัมพรรคภาพ (Affinity Chromatography) 15
1.5 พีค โครมาโทแกรมและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง 17
1.5.1. พีค (Peak) 17
1.5.1.1. ความสูงของพีค (Peak height, h) 17
1.5.1.2. พื้นที่ของพีค (Peak Area, A) 17
1.5.2. โครมาโทแกรม (Chromatogram) 18
1 . 6 . พารามิเตอร์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการแยก 19
1.6.1. Retention 19
1.6.2. ปัจจัยความจุ (Capacity Factor) 21
1.6.3. ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) 22
1.6.4. ขนาดของการแยก (Resolution) 25
1.7. การขยายแถบของการแยกและประสิทธิภาพของคอลัมน์ 28
1.7.1. บทนำ 28
1.7.2. ทฤษฎีที่ใช้อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ 29
1.7.2.1. ทฤษฎีเพลท (Plate Theory) 30
1.7.2.2. ทฤษฎีอัตรา (Rate Theory) 33
1.7.3. พารามิเตอร์ใน Van Deemter Equation 35
1.7.3.1. Eddy Diffusion 35
1.7.3.2. Longitudinal Diffusion 36
1.7.3.3. Resistance to Mass Transfer 37
1.8. การปรับความเหมาะสมของการแยก 40
1.8.1. ค่าการหน่วงเหนี่ยว 40
1.8.2. ค่าความจำเพาะเจาะจง 40
1.8.3. ประสิทธิภาพของคอลัมน์ 41
แบบฝึกหัด 44

ตอนที่ 2: รูปแบบการแยกทางโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง 51
(Modes of HPLC Separations)
2.1. บทนำ 57
2.2. รูปแบบการแยก 59
2.3. ความสำคัญของสภาพมีขั้ว (polarity) 60
2.4. การเลือกตัวทำละลายในระบบ HPLC 61
2.5 อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล (molecular Interaction) 63
2.5.1. ความสำคัญ 63
2.5.2. ไอออนิก 63
2.5.3. ไดโพล 64
2.5.4. พันธะไฮโดรเจน 64
2.5.5. ไดโพลเหนี่ยวนำ 65
2.5.6. การกระจาย 66
2.6. Bonded Phase Chromatography 67
2.7. Adsorption and Normal Phase Chromatography 69
2.7.1. บทนำ 69
2.7.2. กลไกการหน่วงเหนี่ยว 69
2.7.3. เฟสอยู่กับที่ 70
2.7.4. เฟสเคลื่อนที่ 74
2.7.5. ข้อดีของ Normal Phase Chromatography 75
2.7.6. คำแนะนำที่เกี่ยวข้องกับการใช้..... 75
2.7.7. เชิงปฏิบัติ 76
2.7.8. การประยุกต์ 76
2.8. Reverse Phase Chromatography 77
2.8.1. บทนำ 77
2.8.2. กลไกการหน่วงเหนี่ยว 77
2.8.2.1. Solvaphobic Theory 79

2.8.2.2. Partioning Theory 79
2.8.3. เฟสอยู่กับที่ 80
2.8.3.1. Silica-based Bonded phase 80
2.8.3.2. Polymer Bonded Phase 82
2.8.4. เฟสเคลื่อนที่ 82
2.8.5. ข้อดีของ Reverse Phase Chromatography 83
2.8.6. คำแนะนำเกี่ยวข้องกับการใช้.. 84
2.8.7. เชิงปฏิบัติ 85
2.8.7.1. Ion Suppression Chromatography 86
2.8.7.2. Ion -Pair Chromatography 87
2.8.7.3การเกิดสารเชิงซ้อนของไอออนโลหะ 91
2.8.7.4. Micelle Formation 92
2.8.8. การประยุกต์ 93
2.9. Ion -Exchange Chromatograph 94
2.9.1. บทนำ 94
2.9.2. Ion Chromatography 98
2.9.3. กลไกการหน่วงเหนียว 103
2.9.4. เฟสอยู่กับที่ 106
2.9.4.1จำแนกโดยชนิดของตัวรองรับ 106
2.9.4.2จำแนกโดยหมู่ฟังก์ชันที่เป็นตัวแลกเปลี่ยน 110
2.9.5. เฟสเคลื่อนที่ 111
2.9.6. คำแนะนำเกี่ยวข้องกับการใช้..... 115
2.9.7. เชิงปฏิบัติ 115
2.9.8. การประยุกต์ 116
2.10. Size Exclusion Chromatography 117
2.10.1. บทนำ 117
2. 10. 1.1 Gel Filtration Chromatography (GFC) 117

2.10.1.2 Gel Permeation Chromatography (GPC) 118
2.10.2. กลไกการหน่วงเหนียว 118
2.10.3. เฟสอยู่กับที่ 120
2.10.4.เฟสเคลื่อนที่ 123
2.10.5. คำแนะนำเกี่ยวข้องกับการใช้.... 124
2.10.6. เชิงปฏิบัติ 124
2.10.7. การประยุกต์ 125
2.11. Affinity Chromatography 128
2.11.1 บทนำ 128
2.11.2 กลไกการหน่วงเหนี่ยว 128
2.11.3 เฟสอยู่กับที่ 129
2.11.4 เฟสเคลื่อนที่ 131
2.11.5 เชิงปฏิบัติ 133
2.11.6 การประยุกต์ 133
2.12. Chiral Separations 135
2.12.1. บทนำ 135
2.12.2.กลไกการหน่วงเหนี่ยว 135
2.12.3.เฟสอยู่กับที่ 136
2.12.3.1. Chiral Phase with cavities 137
2.12.3.2. Chiral Affinity Phase 138
2.12.3.3. Chiral Phase ที่อาศัยหลัก multi hydrogen bond formation 139
2.12.3.4. Chiral π -donor และ Chiral π -acceptor 139
2.12.3.5. Chiral Ligand-Exchange Chromatography Phase 140
2.12.4. เฟสเคลื่อนที่ 141

2.12.5. คำแนะนำที่เกี่ยวข้องกับการใช้... 141

แบบฝึกหัด 143

ตอนที่ 3: เครื่องมือโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง 161

(HPLC Instrumentation)

3.1. บทนำ 167

3.2. ระบบส่งตัวทำละลาย 169

3.2.1. การแบ่งชนิดของปั๊มโดยอาศัยอัตราการไหล 170

3.2.2. การแบ่งชนิดของปั๊มโดยอาศัยวัสดุที่ใช้ผลิต 171

3.2.3. การแบ่งชนิดของปั๊มโดยอาศัยกลไกการแทนที่ตัวชะสาร 173

3.2.4. การลดการเกิดจังหวะของปั๊ม 176

3.2.4.1. การออกแบบลูกเบี้ยว 176

3.2.4.2. Pulse Dampemners 177

3.2.5. การปรับความเหมาะสมของอัตราการไหลที่สม่ำเสมอ 179

3.2.5.1 Pressure Loop 179

3.2.5.2 Flow Loop 179

3.3. การกรองและการกำจัดแก๊สในตัวทำละลาย 180

3.3.1. การกรอง 180

3.3.1.1. ชนิดของตัวกรอง 181

3.3.2. การกำจัดแก๊ส 185

3.3.2.1. External Vaccuum Degassong 185

3.3.2.2. Helium Sparging 186

3.3.2.3. On-line degassing 187

3.4. Isocratic และ gradient Pumping System 188

3.4.1. Isocratic Pumping System 188

3.4.2. Gradient Pumping System 188

3.4.2.1. High Pressure Mixing 189

3.4.2.2. Low pressure Mixing 190
3.5. Sample Introduction 191
3.6. คอลัมน์ 194
3.6.1. เฟสอยู่กับที่ 195
3.6.2. pore Size 198
3.6.3. Particle Size 200
3.6.4. Internal Diameter of Column 201
3.6.5. Column Length 201
3.6.6. วัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์ 202
3.6.7. การเลือกใช้คอลัมน์ 203
3.6.8. การใช้และดูแลรักษาคอลัมน์ 203
3.6.9. สิ่งที่ต้องพิจารณาในการเลือก... 204
3.6.10. คำแนะนำในการเลือกรูปแบบของ.... 205
3.7. ตัวตรวจวัด 206
3.7.1. บทนำ 206
3.7.1.1. ตัวตรวจวัดแบ่งโดยสมบัติการตรวจวัด 207
3.7.1.2. ตัวตรวจวัดแบ่งโดยลักษณะการทำลายสาร... 208
3.7.2. คุณลักษณะเฉพาะของตัวตรวจวัด 209
3.7.2.1. สัญญาณการรบกวน 209
3.7.2.2. ความไวและขีดจำกัดการตรวจวัด 210
3.7.2.3. ช่วงเชิงเส้น 211
3.7.3. ตัวตรวจวัดการดูดกลืนคลื่นแสง 212
3.7.3.1. การตรวจวัดการดูดกลืนแสงโดยตรง 213
3.7.3.2. การตรวจวัดการดูดกลืนแสงโดยอ้อม 218
3.7.4. ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ 219
3.7.4.1. การทำอนุพันธ์ 224
(a) Pre – Column derivatisation 224

(b) Post-Column Derivatisation 225
3.7.5. ตัวตรวจวัดไฟฟ้าเคมี 228
3.7.5.1. Conductivity Detector 229
3.7.5.2. Amperometric Detector 231
3.7.6. ตัวตรวจวัดแมสสเปกโตรเมตรี 232
3.7.7. ตัวตรวจวัด Refractive Index Detector 234
3.7.8. ตัวตรวจวัดแบบอื่นๆ 235
แบบฝึกหัด 236

ตอนที่ 4: การวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง
(Analysis with HPLC) 247
4.1. บทนำ 250
4.2. การทำคุณภาพวิเคราะห์ 250
4.2.1. การใช้ข้อมูลของค่า Retention 251
4.2.2. Standard Addition หรือ Spiking 252
4.2.3. Internal Standard 253
4.2.4. Isotropic Labelling 254
4.2.5. Enzyme Peak Shift 255
4.2.6. การใช้ Ultraviolet และ Mass spectrum Libraries 256
4.3. การทำปริมาณวิเคราะห์ 258
4.3.1. บทนำ 258
4.3.2. การอินทิเกรต 258
4.3.2.1. วิธีการวัดด้วยมือ 260
(a) ความสูงของพีค 260
(b) พื้นที่ของพีค 261
4.3.2.2. วิธีการวัดด้วยเครื่องมือทางไฟฟ้า 263
4.3.2.3. ความผิดพลาดในการวัดขนาดของพีค 266

4.3.3. การคำนวณ 270
4.3.3.1. บทนำ 270
4.3.3.2. Normalisation 271
4.3.3.3. Area Normalization with response factor 271
4.3.3.4. External Standard Method 272
4.3.3.5. Internal Standard Method 275
4.3.3.6. Standard Addition Method 279
4.3.3.7การตรวจสอบวิธีการและการยอมรับ.... 281
แบบฝึกหัด 282

ตอนที่ 5: อภิธานศัพท์เกี่ยวกับโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง
(Glossary HPLC terms) 285
ภาษาไทย 286
ภาษาอังกฤษ 290

แบบประเมินผลหลังเรียน 299
เฉลยแบบประเมินผลก่อนและหลังเรียน 314
ภาคผนวก 317
บรรณานุกรม 335