2. ใส่สารตัวอย่าง วิธีใส่สารตัวอย่างให้ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างให้ได้ขนาดตามต้องการแล้วใส่ลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง พยายามปล่อยสารละลายตัวอย่างออกจากปิเปตให้ใกล้ส่วนบนของของแข็ง ที่บรรจุในคอลัมน์ให้มากที่สุด อย่าทำให้สารตัวอย่างกระจายไปติดข้างคอลัมน์ สารตัวอย่างจะอยู่บนส่วนบนสุดของคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 10.9 (1)

สารตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์มีได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีโพลาริตีแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับฟังก์ชันนอลกรุ๊ฟ ดังแสดงในตารางที่ 10.4 สารตัวอย่างที่มีโพลาริตีสูงก็จะอยู่ในคอลัมน์ได้นาน คือ มีรีเทนชันไทม์มากในการทำโครมาโตกราฟีแบบธรรมดา

ตารางที่ 10.4 สารต่าง ๆ จัดตามฟังก์ชันนอลกรุ๊ฟที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีเรียงตามโพลาริตี

High Polarity	Organic acids (RCOOH), base ($NH_{,}$, $\bar{O}H$)	Long retention time
	Alcohols (ROH), thiol (RSH)	
	Amines (RNH_2), hitro groups ($RNO_{,}$)	
	Aldehydes (RCHO), Ketones ($R-\overset{\overset{0}{\|}}{C}-R'$)	
	Esters (RCOOR')	
	Halides (RF, RCI, RBr, RI)	
	Unsaturated hydrocarbons (R-C=C-R')	
	Saturated hydrocarbons ($R—CH_2—CH_2—R'$)	
Low polarity	Perfluorocarbons (C_nF_{2n+2})	Short retention time

สารตัวอย่างที่จัดเรียงในตารางที่ 10.4 จะช่วยให้สามารถทำนายได้ว่าสารตัวใดควรถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ก่อนหรือหลัง

ตัวอย่างที่ 10.4 จงเรียงลำดับการอีลูทสารต่อไปนี้ จากรีเทนชันไทม์ต่ำสุดไปหามากที่สุด ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบธรรมดา

$CH_3CH_2CH_3$, CH_3COOCH_3, $CH_3CH(NH_2)CH_3$,

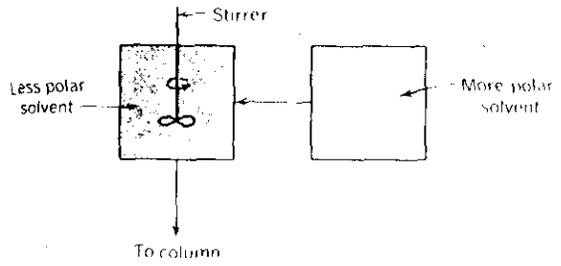
CH_3CH_2COOH, $CH_3CH_2CH_2OH$, $CH_3CH=CH_2$, $CH_3CH_2CH_2Cl$

ตอบ

$$CH_3CH_2CH_3 < CH_3CH=CH_2 < CH_3CH_2CH_2Cl < CH_3COOCH_3$$
$$< CH_3CH(NH_2)CH_3 < CH_3CH_2CH_2OH < CH_3CH_2COOH$$

3. **ทำการอีลูท** เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์เรียบร้อยแล้วให้เติมตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสที่เคลื่อนที่หรือตัวอีลูท ตัวอีลูทจะไหลลงสู่คอลัมน์ตามแรงดึงดูดของโลก เราสามารถปรับขนาดของอัตราการไหลได้ถ้าไหลเร็วเกินไปโดยใช้จุกปิดเปิด ที่ต่อเข้ากับปลายข้างล่างของคอลัมน์ แต่ถ้าตัวอีลูทไหลช้าเกินไปสามารถช่วยทำให้ไหลเร็วขึ้นได้โดยใช้เครื่องดูดช่วย ดังแสดงในรูปที่ 10.10 เมื่อให้เวลาในการอีลูทเพียงพอและเหมาะสม สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมจะสามารถแยกออกจากกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 10.9 (2, 3)

การเลือกใช้ตัวอีลูทขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ถ้าต้องการอีลูทสารตัวอย่างที่เป็นโพลาร์ต้องใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูง ชนิดของตัวทำละลายที่เรียงตามโพลาริตีได้แสดงไว้ในตารางที่ 10.2 ในบางครั้งพบว่าการใช้ตัวอีลูทเพียงตัวเดียวไม่สามารถอีลูทสารผสมทุกตัวในสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ได้ ต้องมีการเปลี่ยนตัวอีลูทให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละตัว ตัวอย่างเช่น สารตัวอย่างเป็นสารผสมของสารหลายชนิดที่มีโพลาริตีต่างกัน การเลือกใช้ตัวอีลูทควรเลือกตัวที่ไม่มีโพลาร์ (non-polar) ก่อน ตัวอีลูทจะสามารถอีลูทสารตัวอย่างที่ไม่มีโพลาร์หรือมีโพลาร์น้อยที่สุดออกมาก่อน จากนั้นเปลี่ยนตัวอีลูทให้มีโพลาริตีสูงขึ้น ก็จะทำให้สารที่มีโพลาร์ถูกอีลูทออกมาได้ตามลำดับ วิธีที่ดีในการเปลี่ยนตัวอีลูทจากไม่มีโพลาร์เป็นมีโพลาร์คือต้องค่อย ๆ เปลี่ยนอย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งทำได้โดยใช้ตัวอีลูทที่มีโพลาร์สูงกว่าไหลเข้าไปผสมในถังของตัวอีลูทที่มีโพลาร์ต่ำกว่า แล้วคนตัวทำละลายทั้งสองให้เข้ากัน จากนั้นค่อยปล่อยเข้าไปในคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 10.12 การทำเช่นนี้จะทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ลงตามคอลัมน์ได้เร็วขึ้นตามกำลังของตัวอีลูทที่ถูกผสมด้วยตัวทำละลายที่มีโพลาร์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ วิธีการนี้จะทำให้แบนด์ที่ได้ไม่มีหาง การเพิ่มกำลังหรือความเป็นโพลาร์ของตัวอีลูทอย่างต่อเนื่องตามที่กล่าวมาคล้ายกับการโปรแกรมอุณหภูมิในการทำก๊าซโครมาโตกราฟี



รูปที่ 10.12 การเปลี่ยนโพลาริตีของตัวอีลูทอย่างต่อเนื่อง

4. **เก็บสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์** สารละลายที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์สามารถเก็บได้เป็นส่วน ๆ (fraction) เช่น ส่วนละ 1 ถึง 10 ลบ.ซม. แล้วนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป เมื่อสามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างในแต่ละส่วนได้ก็ทำให้สามารถสร้างเคอร์ฟของการอีลูทได้ (elution curve) และศึกษาได้ว่าส่วนใดของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์จะมีสารตัวอย่างมากที่สุด และถ้าต้องการเก็บสารตัวอย่างให้ได้สมบูรณ์ จะต้องเก็บตั้งแต่ส่วนใดถึงส่วนใด ถ้าการไหลของตัวอีลูทช้ามาก การเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ จะเสียเวลามากในการเฝ้าดู เราสามารถใช้เครื่องมือช่วย ซึ่งเรียกว่า fraction collector

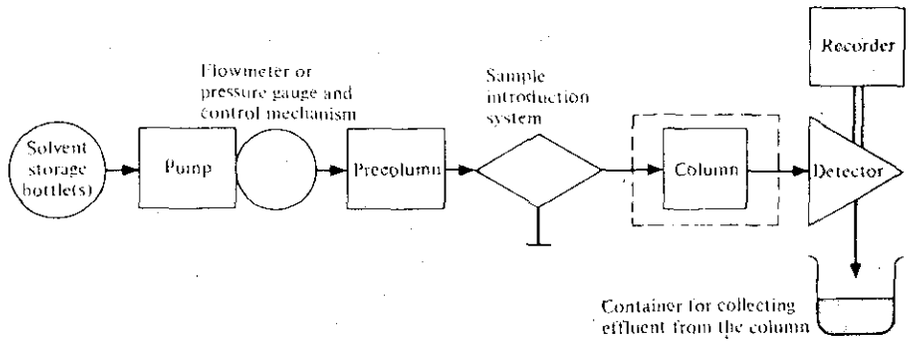
5. **การวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์** (Detection) สารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี คือ ใช้การวิเคราะห์ทางแสง (optical method) เช่น UV, IR และ fluorescence เป็นต้น หรือใช้การวิเคราะห์ทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (Electroanalytical method) เช่น การทำโวลแทมเมตรี การวัดค่าการนำไฟฟ้า และวัดค่าศักย์ไฟฟ้า เป็นต้น

เทคนิคการวิเคราะห์วิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน และยังคงใช้ได้ดีจนถึงปัจจุบันโดยที่สารตัวอย่างต้องมีปริมาณมากพอสมควร จึงจัดประเภทของการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้เป็น Classical Liquid Chromatography หรือ Conventional Liquid Chromatography ในปัจจุบันเทคนิคของการทำลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ได้ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง และ

สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยลง โดยใช้เครื่องมือช่วย ทำให้เกิดเทคนิคของการวิเคราะห์ขึ้นใหม่ เรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC คือ เทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่สามารถแยกได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เพราะใช้ความดันช่วย และของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดเล็ก จากรูปที่ 10.11 แสดงให้เห็นแล้วว่า เมื่อใช้ของแข็งบรรจุในคอลัมน์ขนาดเล็ก ๆ จะทำให้มีค่า HETP ต่ำ และอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ไม่มีผลต่อค่า HETP ดังนั้นการใช้ความดันช่วยทำให้เฟสที่เคลื่อนที่ไหลได้เร็วขึ้นจะไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง เนื่องจากการทำ HPLC ต้องใช้ความดันช่วยจึงต้องมีเครื่องมือสำหรับปั๊มตัวอีลูท และเนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้มีจำนวนน้อย ดังนั้น หลังจากที่สารตัวอย่างถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ต้องมีเครื่องมือที่เรียกว่า ดีเทคเตอร์วัดสารปริมาณน้อย ๆ ที่ถูกอีลูทออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนประกอบของเครื่องมือต่าง ๆ ที่ช่วยในการวิเคราะห์จะรวมกันเข้าเป็นเครื่องมือ 1 ชุดของ HPLC ซึ่งสรุปเป็นแผนภาพได้ดังแสดงในรูปที่ 10.13

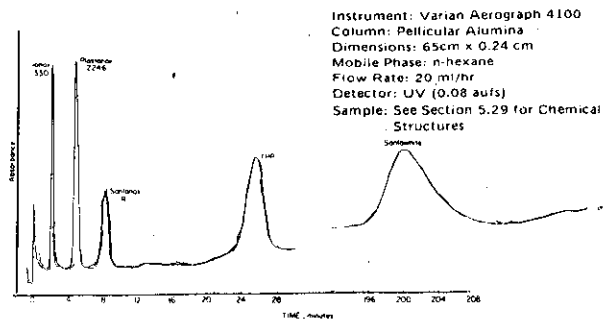


รูปที่ 10.13 *แผนภาพของเครื่องมือ HPLC ส่วนของเส้นประหมายถึงเตาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิขอคอลัมน์ได้*

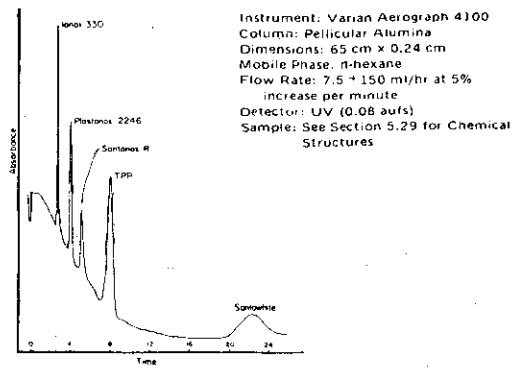
ส่วนประกอบต่าง ๆ แต่ละส่วนทำหน้าที่ดังต่อไปนี้

1. ถังใส่ตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (Solvent reservoir) ถังใส่ตัวทำละลายจะทำด้วยแก้วหรือสเตนเลสก็ได้ มีขนาดบรรจุ 1-2 ลิตร ตามปกติควรต่อกับตัวทำลายก๊าซ (degassing system) เพื่อดูดก๊าซออกซิเจนหรือไนโตรเจน ที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองก๊าซในคอลัมน์ หรืออาจรบกวนเครื่องวัดดีเทคเตอร์ ตัวทำลายก๊าซประกอบด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ส่วนให้ความร้อน ตัวคนสารละลาย และส่วนทำการกลั่น (distillation system) ถ้าการวิเคราะห์ใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว เครื่องมือก็มีถังใส่ตัวทำละลาย และตัวทำลายก๊าซเพียงชุดเดียว แต่ถ้าต้องใช้ตัวทำละลายผสมในการอีลูทต้องมีเครื่องมือ 2 ชุด ต่อเชื่อมกันเพื่อทำให้ตัวทำละลายสามารถผสมกันและเปลี่ยนโพลาริตีได้อย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งเรียกว่า การโปรแกรมตัวทำละลาย (solvent programming)

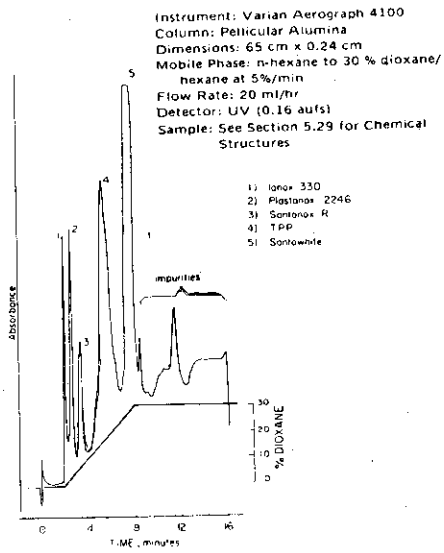
การอีลูทโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพียงตัวเดียว (isocratic condition) จะทำให้ใช้เวลาในการแยกนาน และสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกมาทีหลังมักจะมีหาง ดังแสดงในรูปที่ 10.14 (a) แต่ถ้าเปลี่ยนตัวอีลูทโดยทำการโปรแกรมตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีกที่ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 10.14 (c) การโปรแกรมตัวทำละลายสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง โดยการเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อย ๆ หรือทำเป็นขั้น (Stepwise) คือเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงเวลาหนึ่ง ต่อจากนั้นก็ควบคุมให้คงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง แล้วก็เพิ่มขึ้นอีก จากนั้นก็ควบคุมให้คงที่อีกเป็นเช่นนี้ตลอดการทดลอง



(a) Isocratic conditions



(b) Flow programming



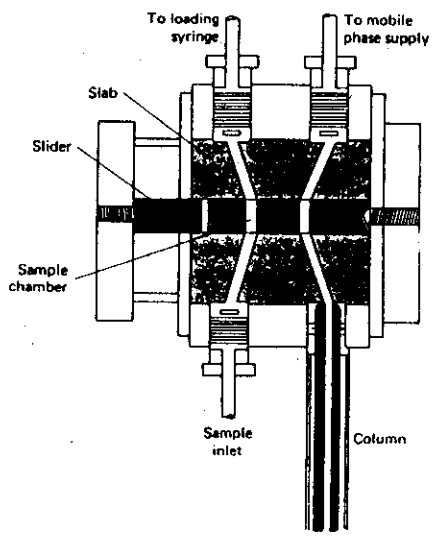
(c) Solvent programming

รูปที่ 10.14 การแยกโดยใช้เครื่องมือ HPLC

2. เครื่องปั๊ม (pump) ทำหน้าที่ปั๊มตัวทำละลายเข้าคอลัมน์ด้วยความดันอย่างน้อย 1000 psi (lbs/in^2) ความดันที่เหมาะสมและใช้ได้ดีคือ 4000 ถึง 6000 psi ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลของตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 3 ลบ.ซม./นาที อัตราการไหลควรควบคุมให้คงที่ เบี่ยงเบนได้ไม่เกิน ±2% เนื่องจากการไหลมีผลโดยตรงต่อเวลาที่ใช้ในการแยก ถ้าเพิ่มความเร็วของการไหลของตัวทำละลายจะทำให้สารตัวอย่างถูกอีลูทได้เร็วขึ้น ดังนั้นในการแยก ถ้าทำการโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีกที่ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 10.14 (b) การโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลายสามารถทำได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบเป็นขั้น เช่นเดียวกับการโปรแกรมตัวทำละลาย

3. <u>Precolumn</u> เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มขึ้นอีก 1 อัน เรียกว่า precolumn มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งาน แต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่า เพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์นี้ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทินที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวอีลูทที่บริสุทธิ์ขึ้น

4. ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (Sample injection system) ส่วนฉีดสารตัวอย่างที่ใช้ใน HPLC มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 10.15 วาล์วที่ใช้คือ สไลเดอร์วาล์ว (Slider valve) ที่ผลิตขึ้นจากบริษัท Kel-F สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าทางวาล์วโดยเข็มฉีดยา จากนั้นตัวสไลเดอร์จะเคลื่อนจากซ้ายมือไปขวามือ จนกระทั่งสารตัวอย่างอยู่ในทิศทางการไหลของตัวอีลูท สำหรับขนาดของวาล์วที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปจะมีหลายขนาด ตั้งแต่ 2μl ถึง 100 μl



รูปที่ 10.15 ส่วนฉีดสารตัวอย่าง

5. **คอลัมน์** (Column) คอลัมน์สำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC ทำด้วยหลอดแก้วอย่างหนาหรือสเตนเลส มีขนาดความยาว 15 ถึง 150 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2-3 มิลลิเมตร คอลัมน์ขนาดที่ยาวเป็นเมตรก็สามารถใช้ได้เช่นกันโดยขดเป็นวงกลม

สารที่บรรจุในคอลัมน์มี 2 ชนิด เช่นกัน คือ ชนิดที่เป็นของแข็งดูดซับ ซึ่งต้องมีขนาดเล็กมาก และมีได้หลายขนาด มีชื่อเรียกทางการค้าต่าง ๆ กัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10.5 อีกชนิดหนึ่งเป็นของเหลวฉาบบนของแข็งซัพพอท ซึ่งมีทั้งแบบธรรมดาและกลับเฟส (reverse phase) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 10.6

ของแข็งตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน HPLC คือ ซิลิกา และอะลูมินา การเลือกใช้สามารถจัดแบ่งตามประเภทของสารที่นำมาวิเคราะห์ได้ดังนี้

ก) ถ้าเป็นสารประเภทกรด (acidic compound) ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

ข) ถ้าเป็นสารที่เป็นเบสเล็กน้อย pK_b น้อยกว่า 5 ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ

ค) โมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว เช่น Olefinic และ aromatic ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

ง) สารที่มีกลุ่มฮาโลเจนควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

จ) สารที่ไวต่อกรด ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

ฉ) สารที่ไวต่อเบส ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ

สำหรับการเลือกเฟสที่อยู่กับที่ ซึ่งเป็นของเหลวที่ฉาบบนของแข็งซัพพอท ให้พิจารณาเลือกตามโพลาริตีของสารตัวอย่าง และตัวอีลูทที่ใช้เช่นเดียวกับการทำ Conventional liquid Chromatography

นอกจากนี้เฟสที่อยู่กับที่ยังสามารถใช้เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ (ion-exchange resin) เรซินที่นำมาใช้ใน HPLC ต้องเป็นชนิด Strong Cation หรือ Strong anion exchanger ซึ่งมีหลายชนิด และมีชื่อเรียกทางการค้าต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 10.7 สำหรับทฤษฎีและหลักการของการแลกเปลี่ยนไอออนและรายละเอียดต่าง ๆ ของ ion-exchange chromatography จะกล่าวไว้ในบทที่ 11

ตารางที่ 10.5 ของแข็งดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์สำหรับ HPLC

Adsorbent	Form[a]	Particle diameter, μm[b]	Trade name
Silica gel	M	4	MicroSil Silica Gel[c]
	M	5	Partisil 5[d]
	M	10	Partisil 10[d]
	M	20	Partisil 20[d]
	P	40	HS Pellosil[d]
	P	40	HC Pellosil[d]
	M	5,10,30	LiChrosorb S1-60[e]
	M	5,10,30	LiChrosorb S1-100[e]
	M	5,10,15,20	Polygosil-60[f]
	M	40	Chromasorb LC-1[g]
	M	5,10,20	LiChrosphere S1-100[e]
	M	10	Vydac 101IR[h]
	M	10	Vydac 101TP[h]
	M	5,10	Spherisorb S-W[i]
	M	10	μPorasil[j]
Alumina	M	5,10,30	LiChrosorb Alox-T[e]
	M	5,10,20	LiChrosorb Alox 60-D[e]
	M	40	Chromosorb LC-3[g]
	M	5,10,20	Spherisorb AY[i]
	P	40	HS Pellumina[d]
	P	40	HC Pellumina[d]
Polyamide	P	40	Pellamidon[d]

[a]M = porous microparticulate; P = pellicular.
[b]The diameters are average particle diameters.
[c]Manufactured by Micromeritics Instrument Corp.
[d]Manufactured by Whatman, Inc.
[e]Manufactured by E. Merck.
[f]Manufactured by Macherey-Nagel.
[g]Manufactured by Johns-Manville.
[h]Manufactured by the Separations Group.
[i]Manufactured by Phase Separations Limited.
[j]Manufactured by Waters Associates.

ตารางที่ 10.6 ของเหลวที่ฉาบบนของแข็งซัพพอท ใช้บรรจุในคอลัมน์สำหรับ HPLC

Liquid group	Type	Particle diameter, μm	Trade name
Amine	Normal	10	MicroSil NH_2[a]
		10	LiChrosorb NH_2[b]
		5,10	Polygosil 60-D-NH2[c]
		5,10	Nucleosil NH2[c]
		10	μ Bondapak NH2[d]
		10	Spherisorb S5NH[e]
Nitrile	Normal	10	MicroSil CN[a]
		5,10	Polygosil 60-D-CN[c]
		10	Vydac 501TP[f]
		5	Spherisorb S5CN[e]
		5,10	Nucleosil CN[c]
		10	Chromosorb LC-8[g]
		10	μ Bondapak CN[d]
Amine and nitrile	Normal	10	Partisil-10 PAC[h]
		40	Co:Pell PAC[h,i]
Octyl (C_8H_{17})	Reverse phase	4	MicroSil C_8[a]
		5,10	LiChrosorb RP-8[b]
		5,10	Polygosil-60-D-C_8[c]
		5,10	Nucleosil C_8[c]
		10	Vydac 2081 R[f]
Octadecyl ($C_{18}H_{37}$)	Reverse phase	4	MicroSil C_{18}[a]
		5,10	Polygosil-60-D-C18[c]
		5,10	LiChrosorb RP-18[b]
		5,10	Nucleosil C18[c]
		10	μ Bondapak C18[d]
		10	Vydac 201 IR[f]
		5	Partisil-5 ODS[h]
		10	Partisil-10 ODS-2[h]
		40	Co:Pell ODS[h,i]

[a] Manufactured by Micromeritics Instrument Corp.
[b] Manufactured by E. Merck.
[c] Manufactured by Macherey-Nagel.
[d] Manufactured by Waters Associates.
[e] Manufactured by Phase Separations Ltd.
[f] Manufactured by the Separations Group.
[g] Manufactured by Johns-Manville.
[h] Manufactured by Whatman, Inc.
[i] A pellicular on glass beads.

ตารางที่ 10.7 เรซินที่ใช้บรรจุในคอลัมน์สำหรับ HPLC

Type	Particle diameter, μm	Trade name
Anion exchanger	10	Partisil-10 SAX[a]
	10	LiChrosorb AN[b]
	10	Ionex-SB10[c]
	10	Vydac 301TP[d]
	5,10	Nucleosil SB[c]
	40	As Pellionex SAX[a,e]
Cation exchange.	10	Partisil-10 SCX[a]
	10	LiChrosorb KAT[b]
	10	Ionex SA10[c]
	10	Vydac 401TP[d]
	5,10	Nucleosil SA[c]
	40	HC Pellionex SCX[a,e]

[a] Manufactured by Whatmah, Inc.
[b] Manufactured by E. Merck.
[c] Manufactured by Macherey-Nagel.
[d] Manufactured by the Separations Group.
[e] A pellicular on a glass bead.

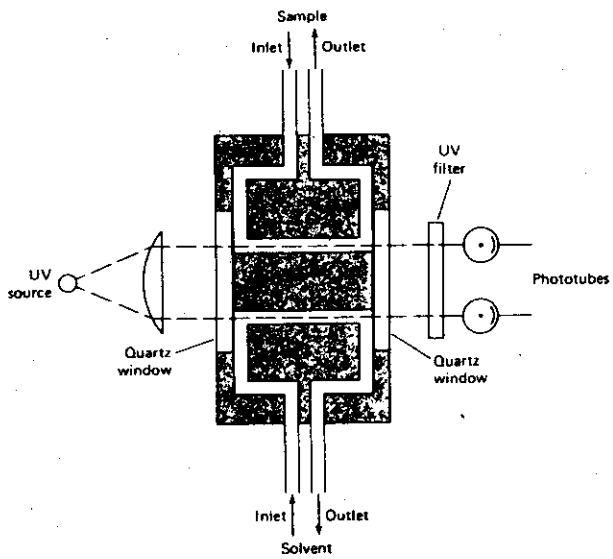
6. **ส่วนควบคุมอุณหภูมิ** (Temperature Control) ตามปกติการทำลิควิดโครมาโตกราฟีทั่ว ๆ ไป นิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น ส่วนควบคุมอุณหภูมิอาจใช้เป็นถังน้ำหุ้มคอลัมน์ไว้ (water jacketed) เพื่อทำให้อุณหภูมิคงที่ แต่ถ้าต้องการให้รีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างสั้นขึ้น อาจเพิ่มอุณหภูมิให้แก่คอลัมน์ก็ได้เช่นเดียวกับก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้เตา (oven) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้

7. **ดีเทคเตอร์** (Detector) ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC ไม่มีชนิดที่มีความไวสูงแบบก๊าซโครมาโตกราฟี ดีเทคเตอร์จะเป็นชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถวัดปริมาณของสารได้ตามคุณสมบัติของสารนั้น ๆ ตารางที่ 10.8 ได้แสดงชนิดต่าง ๆ ของดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC สำหรับดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตหรือแสงวิสิเบิล (UV Spectophotometer) มีลักษณะการทำงานดังแสดงในรูปที่ 10.16

ตารางที่ 10.8 ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน 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	$\pm 10^{-4}$ °C	No	Yes
Conductometric	*S*	10^{-8}	Yes	±1°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	±1°C	—	No
Radioactivity	*S*	—	No	None	Yes	No

[a] Most of these data were taken from: L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York: Wiley-Interscience, 1964, p. 165. With permission.
[b] *G* = general; *S* = selective.
[c] Sensitivity for a favorable sample in grams per milliliter.



รูปที่ 10.16 อุลตราไวโอเลต ดีเทคเตอร์สำหรับ HPLC

เปรียบเทียบการวิเคราะห์ระหว่างวิธี GC กับ HPLC

ทั้ง GC และ HPLC เป็นเทคนิคของการวิเคราะห์วิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่ใช้เครื่องมือช่วย ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแยกและประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพ

และทางปริมาณได้ดีทั้งสองชนิด เมื่อเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของทั้งสองวิธีพบว่า วิธี HPLC มีข้อดีอยู่หลายประการ คือ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ วิธี HPLC ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียมที่ยุ่งยากก่อน (pre-treatment) ขอเพียงแต่ให้สารตัวอย่างอยู่ในสภาพที่เป็นของเหลว ก็สามารถนำมาฉีดเข้าเครื่อง แล้วทำโครมาโตแกรมได้เลยโดยตรง

2. วิธี HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารได้มากชนิดกว่าวิธี GC เพราะ HPLC ไม่มีข้อจำกัดว่าต้องเป็นสารที่ระเหยได้ ทำให้สามารถใช้ HPLC วิเคราะห์สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ ได้

3. วิธี HPLC มีคอลัมน์ให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมของสารตัวอย่างได้มากชนิดกว่า GC ทำให้ใช้ในการวิเคราะห์สารได้มากชนิดกว่า

4. สามารถทำให้การแยกดีขึ้นได้ โดยเปลี่ยนความเข้มข้นหรือชนิดของเฟสที่เคลื่อนที่ได้ตามความเหมาะสมได้มากมาย

5. การเกิดปฏิกิริยาการแบ่งส่วนหรือดูดซับ ระหว่างสารตัวอย่างกับเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ สามารถเกิดที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้น การแยกสารโดยวิธี HPLC จึงใช้งานที่อุณหภูมิปกติของห้องปฏิบัติการได้ ในขณะที่วิธี GC ต้องทำที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง จึงจำเป็นต้องให้พลังงานความร้อนแก่คอลัมน์ ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธี HPLC

6. ในกรณีที่ต้องการเก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หรือทดสอบด้วยวิธีอื่นให้แน่ใจอีกครั้งหนึ่ง พบว่า วิธี HPLC สามารถทำได้ง่ายกว่าวิธี GC

7. สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนของสารอนินทรีย์ได้

สำหรับข้อดีของวิธี GC คือ มีความสามารถในการแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้ดี ให้ผลที่เที่ยงตรงและรวดเร็วกว่าวิธี HPLC เครื่องมือมีส่วนประกอบที่ไม่ซับซ้อนและราคาถูกกว่า

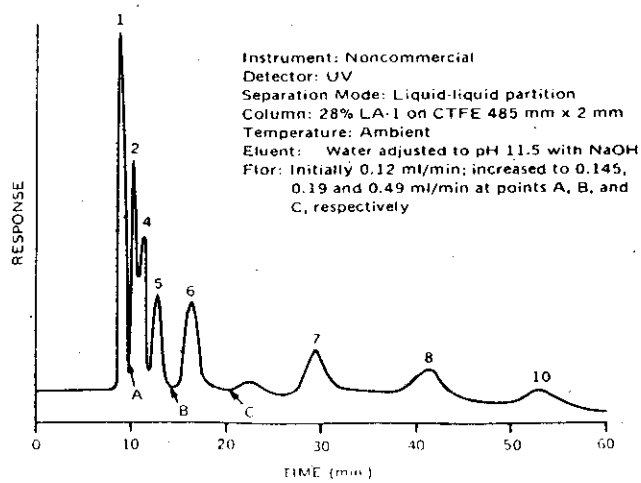
การประยุกต์วิธี HPLC ทางการวิเคราะห์

เนื่องจากโครมาโตแกรมที่ได้ของ HPLC และ GC มีลักษณะเหมือนกัน ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ทางคุณภาพและการวิเคราะห์ทางปริมาณจึงทำได้แบบเดียวกันทุกประการ

กล่าวคือ การวิเคราะห์ทางคุณภาพสามารถทำได้โดยเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูมของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน หรือโดยต่อเครื่อง HPLC เข้ากับเครื่องมือที่สามารถช่วยในการพิสูจน์ได้ เช่น เครื่อง IR NMR, และ mass spectrophotometer ดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 9

สำหรับการวิเคราะห์ทางปริมาณสามารถทำได้โดยวัดขนาดของพีกด้วยวิธีการวัดความสูง วัดพื้นที่พีก ใช้เพลนิมิเตอร์ หรือใช้อินทิเกรเตอร์ เมื่อทราบขนาดของพีกแล้วสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยเทียบขนาดของพีกสารตัวอย่างกับพีกสารมาตรฐาน ซึ่งสามารถทำได้ 3 แบบ คือ วิธีเทียบกับสารมาตรฐานเพียงตัวเดียว วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) และวิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition) หรือใช้วิธี Internal normalization หรือใช้วิธี Correction factor ดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 9 เช่นกัน

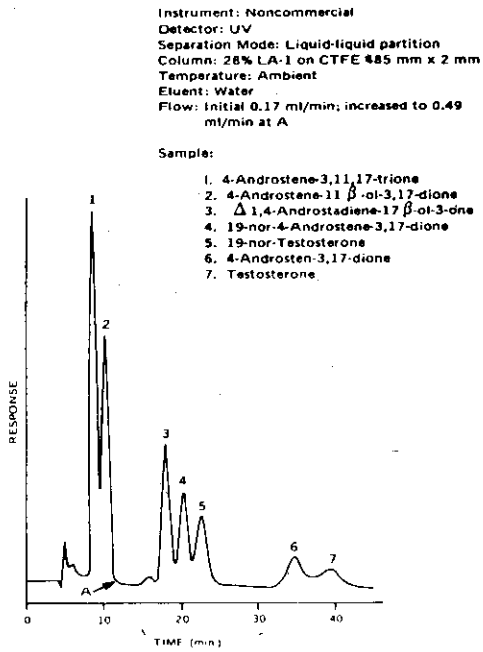
วิธี HPLC สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารได้มากมายหลายชนิด ทั้งทางชีวเคมี ทางอาหาร ทางเภสัช และทางเทคนิคการแพทย์ ซึ่งจะขอยกตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ได้จากการทำ HPLC สารบางชนิดมาแสดงไว้ในรูปข้างล่างนี้



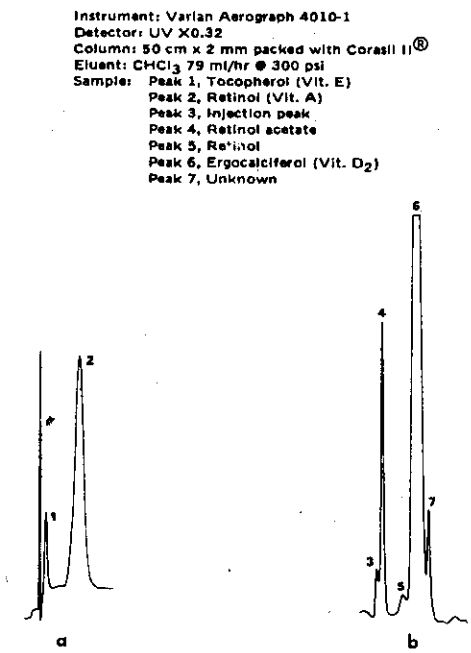
No.

1 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol-17α-glucosiduronic acid (estradiol-17α-glucosiduronic acid)
2 1,3,5(10)-estratrien-3,16α,17β-triol (estriol)
3 1,3,5(10)-estratrien-3,16α,17α-triol (17-epiestriol)
4 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-16,17-dione (16-ketoestrone)
5 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol-16-one (16-ketoestradiol)
6 1,3,5(10)-estratrien-3,16β,17β-triol (16-epiestriol)
7 1,3,5(10),6,8-estrapentaen-3-ol-17-one (equilinen)
8 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol (estradiol)
9 1,3,5(10)-estratrien-2-methoxy-3-ol-17-one (2-methoxyestrone)
10 1,3,5(10),7-estratetraen-3-ol-17-one (equilin)
11 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one (estrone)

รูปที่ 10.17 การแยกฮอร์โมนอีสโตรเจน



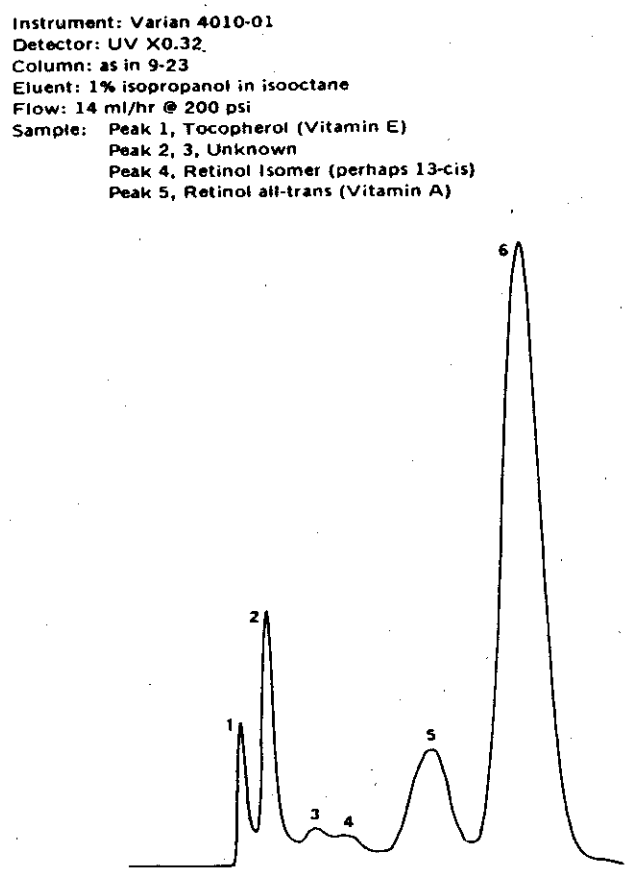
รูปที่ 10.18 การแยกฮอร์โมนแอนโดรเจน



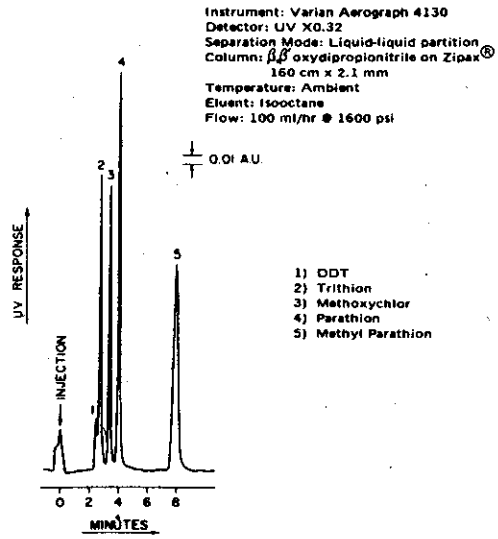
รูปที่ 10.19 a) การแยกวิตามิน A และ E

b) การแยกวิตามิน A และ D_2

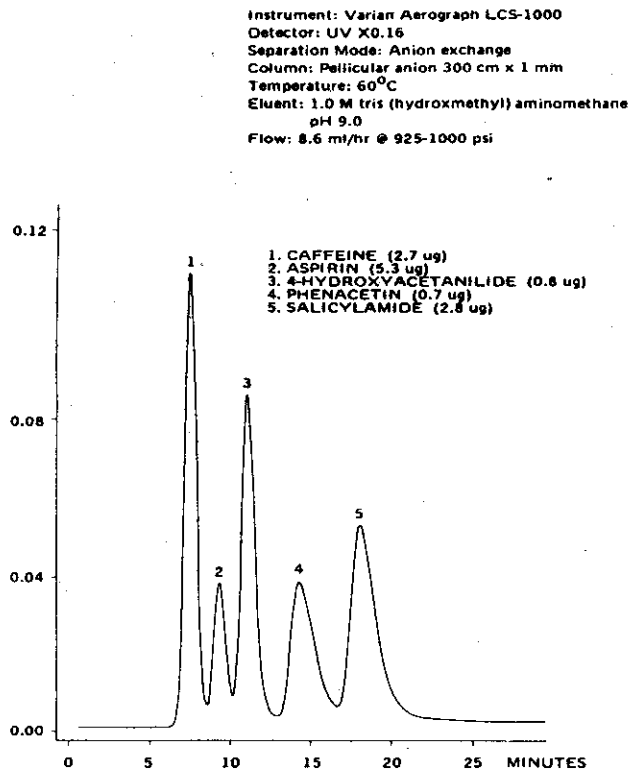
เมื่อทำการเปลี่ยนตัวทำละลายในการแยกวิตามิน A และ E จากรูปที่ 10.19 (a) มาเป็นตัวทำละลายผสมของ 1% isopropyl alcohol ใน iso octane และเปลี่ยนเงื่อนไขของการทดลองบางอย่างเป็นเงื่อนไข ดังแสดงในรูปที่ 10.20 เมื่อเปรียบเทียบการแยกระหว่างรูปที่ 10.19 (a) กับรูปที่ 10.20 ซึ่งเป็นสารตัวอย่างอย่างเดียวกัน พบว่า การใช้เงื่อนไขตามรูปที่ 10.20 สามารถแยกได้ดีกว่าเงื่อนไขตามรูปที่ 10.19 (a)



รูปที่ 10.20 โครมาโตแกรมของการแยกวิตามิน A และ E



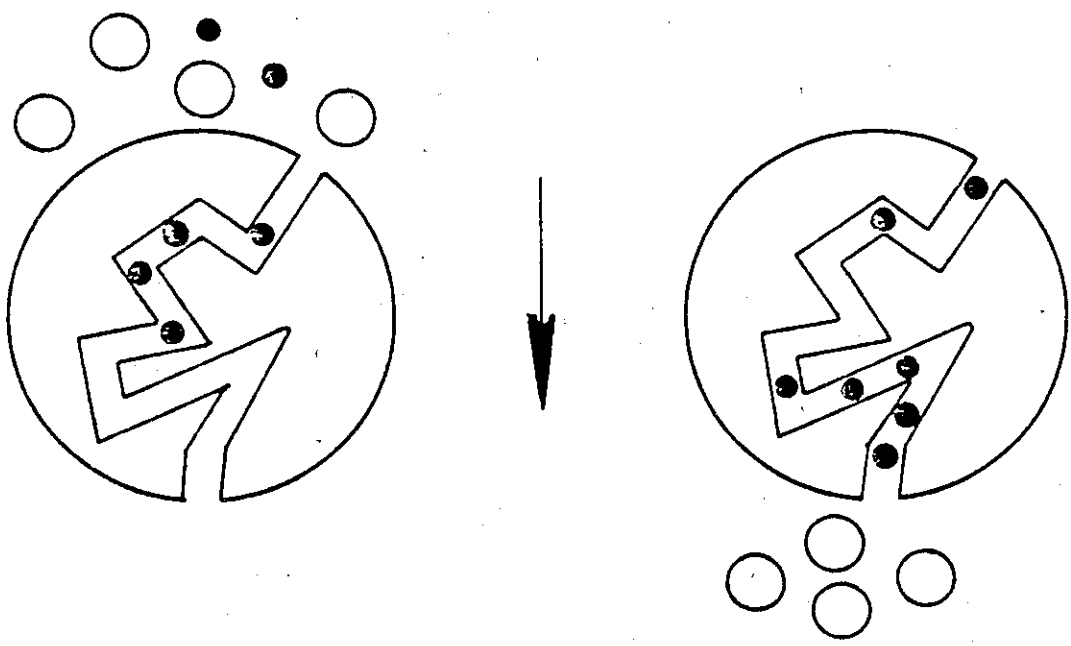
รูปที่ 10.21 โครมาโตแกรมของยาฆ่าแมลง (insecticide)



รูปที่ 10.22 การแยกสารที่ใช้เป็นยาระงับปวด

เอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี (exclusion chromatography)

โครมาโตกราฟีชนิดนี้ ใช้เป็นเทคนิคในการแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ๆ เฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่มีลักษณะโมเลกุลเป็นเจล มีรูพรุนขนาดใหญ่ ขนาดของรูแน่นอน สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถเข้าไปในรูของเจลได้ก็จะถูกพาออกมาจากคอลัมน์ได้ง่ายด้วยเฟสที่เคลื่อนที่ สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กเพียงพอที่จะเข้าไปในรูของเจลก็จะถูกกักไว้ ทำให้ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นาน ดังแสดงในรูปที่ 10.23 เนื่องจากขนาดของโมเลกุลขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล คือ ถ้าโมเลกุลมีขนาดใหญ่ ก็จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุด จะถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า ก็จะถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ตามลำดับ ขนาดรูของเจลที่จะยอมให้โมเลกุลของสารตัวอย่าง ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ ผ่านเข้าไปได้ เรียกว่า exclusion limit เช่น เจลที่มี exclusion limit เท่ากับ 30,000 จะยอมให้สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย



รูปที่ 10.23 รูของเจลจะมีผลทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเดินทางออกจากคอลัมน์ได้ช้า

กว่า 30,000 ผ่านเข้าไปได้ ทำให้เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ช้า แต่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30,000 จะไม่สามารถเข้าไปได้ จึงไม่ถูกกักไว้ ทำให้เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้อย่างง่ายดาย ตามปกติ exclusion limit ของเจลมีขนาดตั้งแต่ 400 ถึง 50×10^6 การเลือกใช้ชนิดของเจลเพื่อบรรจุในคอลัมน์ ต้องพิจารณาจากสารตัวอย่างที่ต้องการแยก คือต้องเลือกใช้เจลที่มีรูขนาดที่ให้สารชนิดหนึ่งผ่านเข้าไปได้ แต่อีกชนิดหนึ่งไม่สามารถเข้าไปได้ จึงจะเกิดการแยกที่ดี

เจลที่ใช้ในการทำเอกซคลูชันโครมาโตกราฟีแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. **เจลชนิดอ่อน** (Soft Gels) เจลชนิดนี้ คือ สารโพลีเมอร์ (Polymeric matterial) ที่ได้จากการ cross linked สารพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น dextran ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Sephadex ปกติ Sephadex ที่ใช้ยังแบ่งได้อีกหลายชนิดตามขนาดรูที่เกิดจากการ Cross-linked ดังแสดงในตารางที่ 10.9 หรือได้จากการ Cross-linked สารจำพวก อะไครลาไมด์ (acrylamide) ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Gel P มีได้หลายขนาดเช่นเดียวกัน การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้เจลชนิดอ่อนนี้จะมีชื่อเรียกว่า gel filtration chromatography

ตารางที่ 10.9 ชนิดของ Sephadex Gels.

Sephadex type	Water Regain gH_2O/g Dry Sephadex	Bed Volume cm^3/g Dry Sephadex	Fractionation Range for Peptides and Globular Proteins, M.W.
G-10	1.0±0.1	2 – 3	up to 700
G-15	1.5±0.2	2.5 – 3.5	up to 1500
G-25	2.5±0.2	4 – 6	1,000 to 5,000
G-50	5.0±0.3	9 – 11	1,500 to 30,000
G-75	7.5±0.5	12 – 15	3,000 to 70,000
G-100	10.0±1.0	15 – 20	4,000 to 150,000
G-150	15.0±1.5	20 – 30	5,000 to 400,000
G-200	20.0±2.0	30 – 40	5,000 to 800,000

2. **เจลชนิดแข็ง** (Semirigid gels) เจลชนิดนี้ได้จากการ cross-linked สารพวกโพลีสไตรีน (พวกเดียวกับเรซิน) มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Beads S ถ้าใช้เจลชนิดนี้เป็นเฟสที่อยู่กับที่บรรจุในคอลัมน์ จะมีชื่อเรียกว่า Gel permeation chromatography

ทั้งเจลชนิดอ่อนและชนิดแข็ง เมื่อต้องการนำมาใช้ต้องนำไปแช่ในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ หรือตัวทำละลายไฮโดรฟิลลิกก่อน จนกระทั่งพองตัวเต็มที่แล้วจึงบรรจุในคอลัมน์ วิธีเอกซ์คลูชัน โครมาโตกราฟี มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีสำหรับสารที่มีน้ำหนัก โมเลกุลสูง ๆ เช่น เปปไตด์ โปรตีน ฮีโมโกลบิน ฯลฯ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นวิธีการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้ด้วย ซึ่งทำได้โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอนหลาย ๆ ขนาด และมีโครงสร้างเหมือนกับสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ จากนั้นหาค่ารีเทนชันโวลูมของสารมาตรฐานแต่ละตัวนำค่ารีเทนชันโวลูมมาพลอตกราฟเทียบกับค่าล็อกของน้ำหนักโมเลกุลจะได้กราฟที่เป็นเส้นตรง จากนั้นนำสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ และหาค่ารีเทนชันโวลูมของสารตัวอย่าง จากค่ารีเทนชันโวลูม สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้จากกราฟมาตรฐาน

สมการที่สามารถใช้อธิบายหลักการของเอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟีได้ดี คือ สมการที่ 9.14 คือ

$$V_R = V_m + K_d V_s \qquad \text{..... (10.10)}$$

สำหรับสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ หรือน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า exclusion limit ของเจล พบว่าสามารถเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาเดียวกับตัวทำละลาย นั่นคือ V_R จะมีค่าเท่ากับ V_m (V_m คือ ปริมาตรของเฟสที่เคลื่อนที่ซึ่งเรียกว่า Void Volume) ในกรณีนี้ค่า K_d จะมีค่าเท่ากับ 0 เพราะไม่เกิดการกระจายของสารตัวอย่างระหว่างเฟสที่อยู่กับที่กับเฟสที่เคลื่อนที่แต่อย่างใด ($K_d = C_s/C_m = 0$ เพราะว่า $C_s = 0$) เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กลงเพียงพอที่จะเข้าไปอยู่ในเจลได้หมด จะพิจารณาได้ว่า ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เข้าไปอยู่ในเจลกับที่อยู่ในตัวทำละลายนอกเจลนั้น ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น $C_s = C_m$ นั่นคือ $K_d = C_s/C_m = 1$ สำหรับ V_s ซึ่งคือปริมาตรของเฟสที่อยู่กับที่ (pore volume) สามารถหาได้โดยใช้สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้หมด มาหาค่ารีเทนชันโวลูม (V_R) แล้วแทนค่าลงในสมการที่ 10.10 โดยใช้ $K_d = 1$ สำหรับ

ค่า V_m ทราบได้จากการใช้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารู หาค่ารีเทนชันโวลูม ซึ่งจะได้ $V_R = V_m$ โดยการแทนค่าต่าง ๆ ที่ทราบก็สามารถคำนวณหาค่า V_s ได้ สำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่างกลางจะเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้บางส่วน แสดงว่า ค่า K_d จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่า K_d ของสารตัวอย่างนั้น มีค่าเท่ากับเท่าใดได้เมื่อทราบค่า V_s, V_m และ V_R ของสารนั้น ๆ แล้ว

ตัวอย่างที่ 10.5 สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80,000 ถูกนำมาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุเจล ซึ่งมี exclusion limit เท่ากับ 40,000 ปรากฏว่าวัดค่ารีเทนชันโวลูมได้เท่ากับ 25 ลบ.ซม. เมื่อเปลี่ยนเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงเป็นขนาดที่สามารถเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้หมด พบว่ามีรีเทนชันโวลูมเท่ากับ 152 ลบ.ซม. จากนั้นนำสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ พบว่ามีรีเทนชันโวลูมเท่ากับ 102 ลบ.ซม. จงคำนวณหาค่า Void Volume (V_m) และ Pore Volume (V_s) ของคอลัมน์และหาค่า K_d ของสารตัวอย่าง

วิธีทำ เมื่อใช้สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 80,000 ซึ่งสูงกว่า exclusion limit แสดงว่า $K_d = 0$ และ $V_R = V_m = 25$ ลบ.ซม. เมื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กจะได้ $V_R = 152$ ลบ.ซม. และ $K_d = 1$ นั่นคือ สามารถหา V_s ได้จากสมการที่ 10.10

$$V_R = V_m + K_d V_s$$

$$152 = 25 + (1)\, V_s$$

$$\therefore\ V_s = 127 \text{ ลบ.ซม.}$$

เมื่อเปลี่ยนเป็นสารตัวอย่างที่ให้ค่ารีเทนชันโวลูมเท่ากับ 102 ลบ.ซม. แสดงว่าสารตัวอย่างนี้มีค่า K_d ที่สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 10.10 เช่นกัน คือ

$$102 = 25 + K_d\,(127)$$

$$\therefore\ K_d = 0.61$$

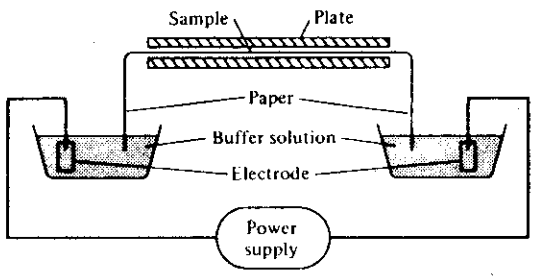
อิเล็กโตรฟอเรซีส (Electrophoresis)

อิเล็กโตรฟอเรซีส หมายถึง การเคลื่อนที่ของอนุภาคคอลลอยด์ที่มีประจุภายในสารละลาย ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า อนุภาคที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาสนาม

ไฟฟ้าลบ อนุภาคคอลลอย์ที่มีประจุต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่สวนทางกัน อนุภาคที่มีประจุเหมือนกันจะเคลื่อนที่ได้เร็วหรือช้าต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนประจุ ขนาด และน้ำหนักของอนุภาคนั้น (ขึ้นอยู่กับ charge to mass ratio) อนุภาคที่มีประจุสูงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอนุภาคที่มีประจุต่ำ และอนุภาคที่มีขนาดใหญ่และน้ำหนักมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็กและน้ำหนักน้อย จะเห็นได้ว่า การแยกโดยวิธีนี้ไม่ต้องมีเฟสที่เคลื่อนที่ ไอออนของสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ได้ด้วยแรงดึงดูดของประจุ แสดงว่า ไม่มีกระบวนการแบ่งส่วนของสารตัวอย่างระหว่างเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่เกิดขึ้น จึงไม่สามารถจัดวิธีวิเคราะห์นี้ไว้เป็นเทคนิคหนึ่งของโครมาโตกราฟี แต่จะขอนำมากล่าวไว้ในบทนี้ เพราะว่าเป็นเทคนิคของการแยกที่มีส่วนคล้ายโครมาโตกราฟีมาก

วิธีอิเล็กโตรฟอเรติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี ขึ้นอยู่กับเทคนิคของการแยกว่าเกิดขึ้นโดยมีตัวกลางช่วยค้ำจุนหรือไม่ ถ้าการแยกนั้นเกิดขึ้นภายในสารละลายโดยตรงจากการผ่านสนามไฟฟ้าลงในสารละลาย แล้วทำให้เกิดการแยกขึ้นจะเรียกว่า free-solution method วิธีนี้ใช้ได้ดีมากในการแยกโปรตีน สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีได้เป็นอย่างดี แต่มีปัญหาคือแต่ละส่วนที่แยกออกจากกันได้ในสารละลายมีโอกาสผสมกันได้ง่าย ถ้าเกิดการคนขึ้น และเทคนิคของการนำเอาส่วนที่แยกได้ออกจากสารละลายทำได้ยาก อีกวิธีหนึ่งคือใช้ตัวกลางช่วยค้ำจุน ตัวกลางที่ใช้ได้แก่ กระดาษ (ใช้กระดาษชนิดเดียวกับการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี) เมมเบรนของเซลลูโลสอะซิเตต ผงเซลลูโลส starch gel agar gel เรซิน ผงแก้ว และซิลิกาเจล เป็นต้น สำหรับตัวกลางเหล่านี้ยกเว้น กระดาษ และเมมเบรนของเซลลูโลสอะซิเตตต้องถูกเตรียมให้เป็นแผ่นบาง ๆ (thin layer) โดยใช้แผ่นแก้วหรือพลาสติกยึดเหมือนกับการทำ TLC เมื่อเตรียมแผ่นกระดาษหรือแผ่น thin layer ได้แล้วให้นำมาทำให้ชุ่มด้วยสารละลายอิเล็กโตรไลต์ จากนั้นจุดสารตัวอย่างลงบนกึ่งกลางของแผ่นกระดาษหรือแผ่น thin layer จากนั้นขึงกระดาษให้ตึงระหว่างเพลตแก้ว 2 แผ่น ที่ห่างกันพอสมควร ให้ส่วนปลายของกระดาษทั้งสองข้างยื่นเลยแผ่นแก้วไปจุ่มอยู่ในน้ำยาอิเล็กโตรไลต์ในบีกเกอร์เล็ก ๆ ดังรูปที่ 10.24 ให้กระแสผ่านเข้าไปในกระดาษโดยให้มีศักย์ไฟฟ้าประมาณ 5 โวลต์ ต่อความยาวของกระดาษ 2 ซม. โดยใช้กระแสตรงที่ได้จากแบตเตอรี ปล่อยให้เกิดอิเล็กโตรฟอเรซีสนาน ๆ หลายชั่วโมง จนกระทั่งมีการเคลื่อนที่ของสารประกอบ

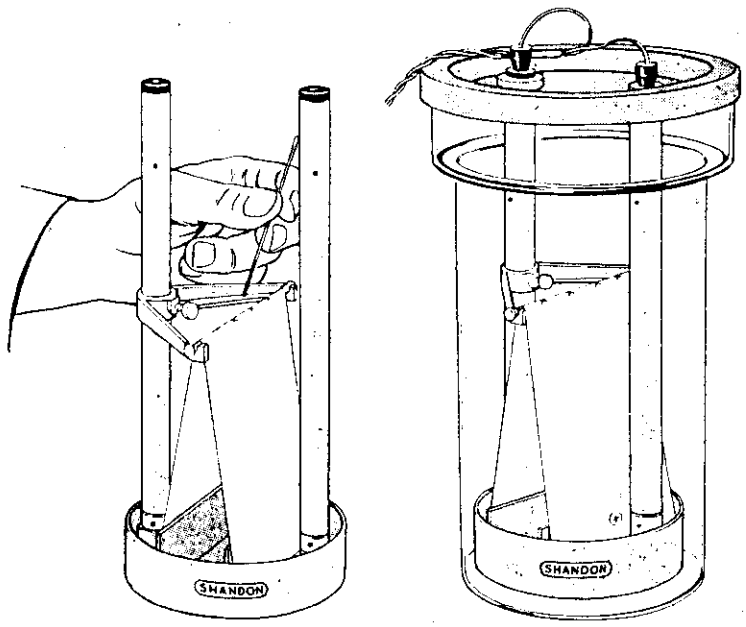
และแยกจากกันโดยสมบูรณ์ น้ำยาที่ใช้เป็นอิเล็กโตรไลต์ที่ดีที่สุดคือ สารละลายเจือจางของกรดน้ำส้ม เข้มข้น 0.01 โมลาร์ หรือสารละลายแอมโมเนียเจือจาง ในการแยกสารจำพวกโปรตีนจำเป็นต้องใช้บัฟเฟอร์เข้าช่วย สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ บาร์บิทาล



รูปที่ 10.24 แสดงแผนภาพอย่างง่ายในการทำอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี

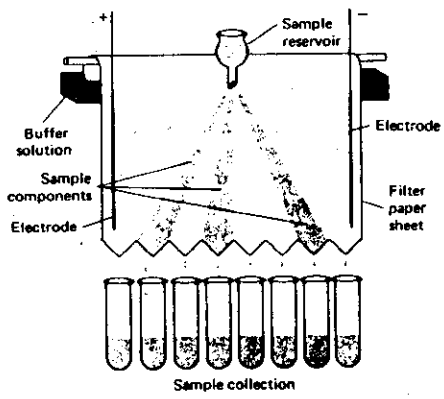
จะเห็นได้ว่าวิธีการทำอิเล็กโตรฟอเรซีสแบบที่ 2 นี้ คล้ายคลึงกับการทำโครมาโตกราฟีมาก จึงมีชื่อเรียกเทคนิคและวิธีการนี้ว่า อิเล็กโตรโครมาโตกราฟี (Electrochromathography) ถ้าใช้กระดาษในการทำอิเล็กโตรฟอเรซีสจะเรียกเป็นชื่อเฉพาะว่า เปเปอร์-อิเล็กโตรฟอเรซีส (paper electrophoresis) ถ้าใช้เจลที่ยึดอยู่บนแผ่นแก้ว จะเรียกว่า เจลอิเล็กโตรฟอเรซีส (gel electrophoresis)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ ได้พัฒนาและปรับปรุงแก้ไขให้ดีขึ้นเรื่อย ๆ จนได้เครื่องมือที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ เครื่องมือที่เป็นรูปทรงสามเหลี่ยมทำด้วยภาชนะที่ไม่เป็นสนิม มีราวแท่งแก้วอยู่ข้างบนสำหรับพาดกระดาษ แล้วปล่อยชายลงมาสองข้างตรึงอยู่กับราวข้างล่างสองอัน โดยให้ชายทั้งสองข้างของกระดาษจุ่มลงในถาดของน้ำยาอิเล็กโตรไลต์ข้างล่างอีกทีหนึ่ง ซึ่งทำให้สามารถทำได้ครั้งละหลาย ๆ แถบ และมีฝาครอบอีกทีหนึ่ง ดังแสดงในรูปที่ 10.25



รูปที่ 10.25 เครื่องมือการทำอิเล็กโตรโครมาโตกราฟีแบบทรงสามเหลี่ยม

ถ้าต้องการเก็บสารตัวอย่างที่แยกได้ ต้องใช้วิธีทำอิเล็กโตรฟอเรซีสอย่างต่อเนื่อง โดยให้แผ่นกระดาษอยู่ในแนวยืน สารตัวอย่างจะถูกใส่ลงในกระดาษตรงส่วนบนสุด สารตัวอย่างจะแยกออกจากกันด้วยแรงดึงดูดของประจุในสนามไฟฟ้า แต่มันจะเคลื่อนต่ำลงมาได้ด้วยการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายตัวอย่างที่ไหลออกจากกระดาษสามารถเก็บได้เป็นส่วน ๆ ดังแสดงในรูปที่ 10.26

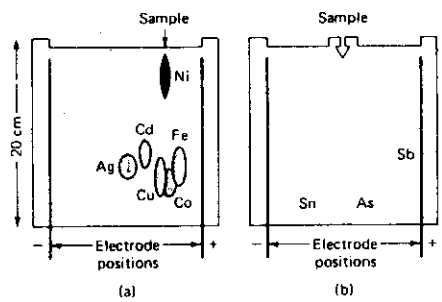


รูปที่ 10.26 การทำเปเปอร์อิเล็กโตรฟอเรซีสที่สามารถเก็บส่วนที่แยกได้

การประยุกต์วิธีอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี

วิธีอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางเทคนิคการแพทย์ และชีวเคมีได้เป็นอย่างดี การประยุกต์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางทางเทคนิคการแพทย์ คือ การแยกโปรตีน หรือสารที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ ออกจากเซรุ่ม ปัสสาวะ ของเหลวในไขสันหลัง น้ำในกระเพาะอาหาร หรือของเหลวอื่น ๆ ในร่างกาย การประยุกต์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในทางชีวเคมี คือแยกโมเลกุลของสารต่าง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกัน เช่น สารจำพวกอัลคาลอยด์ สารปฏิชีวนะ กรดนิวคลีอิก วิตามิน สารมีสีตามธรรมชาติ สเตอรอยด์ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และกรดอินทรีย์

นอกจากนี้ วิธีอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการแยกไอออนของสารอนินทรีย์ได้ด้วย ตามรูปที่ 10.27(a) แสดงการแยกไอออนของโลหะ 6 ตัว ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน การเคลื่อนที่ของไอออนสามารถเคลื่อนไปทางขั้วแคโทด หรือแอโนดก็ได้ขึ้นอยู่กับประจุของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะนั้น ๆ จะเห็นได้ว่านิกเกิลไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เพราะนิกเกิลเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นตะกอนกับไดเมทิลไกลออกซีมซึ่งไม่มีประจุ ตามรูปที่ 10.27(b) แสดงการเคลื่อนที่ของไอออน Sn^{2+}, As^{3+} และ Sb^{3+} โดยการทำอิเล็กโตรฟอเรซีสอย่างต่อเนื่อง แล้วเก็บสารที่แยกได้ทางปลายข้างหนึ่งของกระดาษ



รูปที่ 10.27 อิเล็กโตรโคมาโตแกรมของสารอนินทรีย์

a) แคทไอออนแต่ละตัวเข้มข้น 0.005 M ในสารละลาย 0.1 M tartaric acid สารละลายที่ใช้ชะล้างหรือบัฟเฟอร์ คือสารผสมของ 0.01 M ammonium tartrate 0.005 M dimethyl glyoxime และ 4 M ammonia สังเกตจุดของโลหะได้โดยใช้ H_2S สภาวะของการทดลอง 160 V, 100 mamp. ในเวลา 20 นาที

b) การทำอิเล็กโตรฟอเรซีสอย่างต่อเนื่อง เพื่อแยกสารละลายผสมของ 0.005 M As(III) 0.005 M Sb(III) และ 0.005 M Sn(II) ใน 0.02 M tartaric acid, 0.04 M lactic acid และ 0.04 M dl alanine สังเกตจุดของโลหะได้โดยใช้ H_2S สภาวะการทดลอง 300 V 95 m amp.

แบบฝึกหัดบทที่ 10

1. จงอธิบายความหมายของคำต่อไปนี้
   a) Retardation factor (R_f)
   b) Reverse phase chromatography
   c) isocratic elution
   d) gradient elution
   e) Pre-column
2. สารตัวอย่างประกอบด้วยสาร 2 ชนิด ถูกแยกออกจากกันด้วยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี หลังจากทำการดีเวลลอป 1 ชั่วโมง ได้ solvent front เท่ากับ 10.3 ซม. สารตัวอย่าง A เคลื่อนที่ได้ 7.5 ซม. สารตัวอย่าง B เคลื่อนที่ได้ 2.3 ซม. จากจุดเริ่มต้น จงคำนวณหาค่า R_f

   ตอบ 0.73, 0.22
3. หลังจากทำการดีเวลลอป TLC ปรากฏว่าได้ solvent front เท่ากับ 15.0 ซม. และสารประกอบชนิดที่ 1 เคลื่อนที่ได้ 11.6 ซม. ชนิดที่ 2 เคลื่อนที่ได้ 5.6 ซม. และชนิดที่ 3 เคลื่อนที่ได้ 1.5 ซม. จากจุดเริ่มต้น จงคำนวณหาค่า R_f ของสารประกอบแต่ละชนิด

   ตอบ 0.773, 0.37, 0.10
4. สารตัวอย่างที่ไวต่อซิลิกาชนิด A มีค่า R_f = 0.50 เมื่อใช้ 1 : 3 เบนซีนต่อเมทานอลเป็นตัวทำละลาย เมื่อใช้สารตัวอย่างเดิม แต่เปลี่ยนเป็นซิลิกาชนิด B ปรากฏว่ามีค่า R_f = 0.40 จงแสดงว่า ซิลิกาชนิดใดมีความไวต่อสารตัวอย่างมากกว่ากัน
5. คอลัมน์กลาสมีพื้นที่หน้าตัด 1.00 ตร.ซม. ถูกนำมาบรรจุของแข็งสูง 10.0 ซม. ความหนาแน่นของของแข็ง คือ 2.5 กรัม/ลบ.ซม. ใช้ของแข็งเท่ากับ 15.0 กรัม
   a) จงคำนวณหาค่า R_f ของตัวถูกละลายที่มีค่า K_d เท่ากับ 1.0, 2.0, และ 4.0 ตามลำดับ
   b) จงหาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการอีลูทตัวถูกละลายส่วนที่เข้มข้นที่สุดออกจากคอลัมน์
6. คอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโตรกราฟีแบบแบ่งส่วน ถูกเตรียมโดยใช้หลอดแก้วที่มี

เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10 มิลลิเมตร บรรจุด้วยซิลิกาเจลที่แห้ง 30 กรัม (ความหนาแน่น = 2.3 กรัม/ลบ.ซม.) ก่อนที่ใส่ซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ได้นำไปแช่น้ำ ปรากฏว่าซิลิกาเจลจะดูดน้ำไว้ได้ 7.0 กรัม เมื่อบรรจุในคอลัมน์แล้วได้ความสูงเท่ากับ 32.0 ซม. จากนั้นนำตัวถูกละลายผสม 2 ชนิด ใส่ลงในคอลัมน์แล้วอีลูทด้วยคลอโรฟอร์ม จงคำนวณหาปริมาตรของคลอโรฟอร์มที่ต้องใช้ในการอีลูทให้ตัวถูกละลายส่วนที่เข้มข้นมากที่สุดออกจากคอลัมน์ได้เมื่อ K_d ของตัวถูกละลายมีค่าเท่ากับ 2.0 และ 3.2 ตามลำดับ

7. จงหาค่า R_f ของฟีนอล และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2 ซม. ยาว 30 ซม. บรรจุอะลูมินา 83 กรัม (ความหนาแน่น = 3.6 กรัม/ลบ.ซม.) น้ำ 96 ลบ.ซม. และสารผสมของบิวทานอลกับไพริดีน 61 ลบ.ซม. เมื่อมีค่า K_d เท่ากับ 0.194 และ 3.42 ตามลำดับ
8. โดยใช้คอลัมน์เดียวกันกับโจทย์ข้อ 7 จงหาค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายของ gallic acid และ protocatechnic acid เมื่อมีค่า R_f เท่ากับ 0.43 และ 0.74 ตามลำดับ
9. Prolinol มีค่า R_f = 0.26 เมื่อใช้สารบิวทานอลอิ่มตัวใน 1% NH_3 เป็นตัวอีลูท โดยการใช้เงื่อนไขเดิม พบว่า Aspartidiol มีค่า R_f = 0.23 จะต้องใช้คอลัมน์ยาวเท่าใดจึงจะทำให้การแยก (Resolution, R) มีค่าเท่ากับ 1.00

   เมื่อ H = 0.0032, A_s = 0.27, A_m = 0.64
10. ถ้าคอลัมน์ในโจทย์ข้อ 9 ยาว 80 ซม. จะต้องการค่า HETP เท่ากับเท่าใด
11. จะต้องใช้ตัวอีลูทจำนวนเท่าใดในโจทย์ข้อ 9 เพื่อทำให้ส่วนที่มี Prolinol มากที่สุดถูกอีลูทออกจากคอลัมน์
12. คอลัมน์อะลูมินามีค่า A_s = 0.16 และ A_m = 0.57 มีจำนวนเพลต (N) = 6200 เพลต ในช่วงความยาว 18 ซม. ถ้า sulfanilic acid มีค่า R_f = 0.51 และ sulfamethazine มีค่า R_f = 0.55 ในคอลัมน์นี้ จงคำนวณหาค่าการแยก (R)
13. t-amylalcohol - glacial acetic acid-water ผสมกันในอัตราส่วน 4:1:1 แล้วนำมาใช้เป็นตัวอีลูทสำหรับการแยกสารผสมของสีย้อมต้องใช้คอลัมน์ยาวเท่าใดเพื่อทำการแยก bromothymol blue (R_f = 0.88) ออกจาก metacresol purple (R_f = 0.66) ให้ได้สมบูรณ์

    เมื่อ H = 0.0023, A_s = 0.13, A_m = 0.38
14. สารตัวอย่างชนิดหนึ่งถูกอีลูทได้อย่างรวดเร็ว เมื่อใช้คอลัมน์อะลูมินาและอะซิโตนเป็น

ตัวอีลูท ถ้าเปลี่ยนตัวอีลูทเป็นคลอโรฟอร์ม ท่านคิดว่าสารตัวอย่างจะถูกอีลูทได้เร็วขึ้นหรือช้าลง

15. จงเรียงลำดับการอีลูทที่ท่านคิดว่าเป็นไปได้ของสารต่อไปนี้เมื่อใช้อะลูมินาบรรจุในคอลัมน์

butanol, butyl chloride, hexanoic acid, hexane และ 2-hexene

16. จงทำนายลำดับการอีลูทของสารต่อไปนี้ เมื่อใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยแคลเซียมออกไซด์

butanol, methanol, hexanol และ ethanol

17. จงเรียงลำดับการอีลูทของสารต่อไปนี้ เมื่อใช้การวิเคราะห์แบบ Liquid-Solid Chromatography (LSC)

C_6H_5COOH, C_6H_6, C_6H_5Cl, C_6H_5OH

10. สารประกอบ A, B และ C มีค่ารีเทนชันไทม์ (t_R) 1.25, 15.0 และ 22.5 ซม. ถ้าสารประกอบ A ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ จงคำนวณหาค่ารีเลทีฟรีเทนชันของ C เทียบกับ B

ตอบ 1.55

19. จงคำนวณหาค่าคาพาซิตีแฟคเตอร์ (k′) ของสาร B และ C ในโจทย์ข้อ 18

ตอบ 11.0, 17.0

20. ข้อมูลต่อไปนี้ได้จากการทำ reverse phase ของ HPLC ค่ารีเทนชันไทม์ทั้งหมดวัดจากพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ จงคำนวณหาค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารแต่ละตัวเทียบกับ 3-methoxy tyramine

สารประกอบ	**รีเทนชันไทม์, นาที**
Vanilline mandelic acid	3.23
Normetanephrine	3.87
Metanephrine	5.81
3-Methoxy tyramine	7.31
Homovanillic acid	11.70

21. จงคำนวณหาค่าคาพาซิตีแฟคเตอร์ (k′) ของสาร Normetanephrine ในโจทย์ข้อ 20 ถ้า t_m มีค่าเท่ากับ 0.15 นาที

ตอบ 25.8

22. ค่ารีเทนชันไทม์ของยาปราบศัตรูพืชต่อไปนี้ ถูกแยกโดยวิธี reverse phase HPLC สมมติว่าใช้อัตราการไหล 1.15 ลบ.ซม./นาที จงคำนวณหาค่ารีเทนชันโวลูมของยาปราบศัตรูพืชแต่ละตัว

Pesticide	Retention time, minute
Baygon	5.25
Carbamate	6.03
Barban	12.41

23. โดยใช้คอลัมน์ยาว 25.0 ซม. พบว่า เบนซินมีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 33.0 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 15.1 นาที จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎีและ HETP

ตอบ 0.327 cm/plate

24. ค่ารีเทนชันไทม์ของสารประกอบอินทรีย์ในการทำลิควิดโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ยาว 100 ซม. มีค่าเท่ากับ 10.0 นาที ความกว้างของพีกมีค่าเท่ากับ 24 วินาที จงคำนวณหา HETP ของคอลัมน์

ตอบ 0.10 mm/plate

25. จงคำนวณหาการแยกระหว่างพีก 2 พีก ซึ่งมีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 18.5 และ 20.9 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 130 และ 182 วินาที

ตอบ 0.92

26. จงคำนวณหาการแยกของโครมาโตกราฟิกพีก 2 พีก ค่ารีเทนชันไทม์ของพีกที่ 1 มีค่าเท่ากับ 10.52 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 0.38 นาที ค่ารีเทนชันไทม์ของพีกที่ 2 มีค่าเท่ากับ 11.36 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 0.48 นาที การแยกที่ได้เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หรือไม่

ตอบ 2.0, เพียงพอ

27. ค่ารีเทนชันไทม์ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000 ผ่านลงในคอลัมน์ของเจลที่มี exclusion limit 80,000 มีค่าเท่ากับ 15 ลบ.ซม. ค่ารีเทนชันโวลูมของสารแนพทาลีน

(น้ำหนักโมเลกุล 128) ผ่านลงในคอลัมน์ชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากับ 124 ลบ.ซม. เมื่อนำสารตัวอย่างมาผ่านในคอลัมน์ของเจลนี้บ้าง ปรากฏว่าได้ค่ารีเทนชันโวลูมเท่ากับ 87 ลบ.ซม. จงคำนวณหาปริมาตรของเฟสที่อยู่กับที่ (pore volume, V_s)และค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (K_d) ของสารตัวอย่าง

ตอบ 109 ลบ.ซม., 0.66

28. โดยวิธี gel filtration chromatography น้ำตาลซูโครสมีโมเลกุลขนาดเล็กพอที่จะเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้หมด มีค่ารีเทนชันโวลูม = 195 ลบ.ซม. เมื่อใช้ Blue dextran ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีขนาดใหญ่มาก ซึ่งไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูของเจลได้ จะมีค่ารีเทนชันโวลูม = 39 ลบ.ซม. จงคำนวณหาค่ารีเทนชันโวลูมของ Cytochrom C เมื่อ Cytochrom C มีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายในคอลัมน์ชนิดนี้เท่ากับ 0.81

ตอบ 1.7×10^2 ลบ.ซม.

29. จงหาน้ำหนักโมเลกุลของ Chymotrypsinogen จากข้อมูลที่ได้จากการทำเอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี ดังนี้

สารประกอบ	M.W.	V_R, cm^3
Cytochrome C	13,000	140
Myoglobin	16,900	133
Ovalbumin	46,000	107
Urease	483,000	45
Chymotrypsinogen	?	125

ตอบ 23,000

30. จากข้อมูลข้างล่างนี้ จงคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง (Unknown)

Protein	M.W.	Relative mobility
Lysozyme	14,400	0.90
Trysin	23,300	0.73
Lactate dehydrogenase	36,000	0.57
Ovalbubin	43,000	0.54

Catalase	62,000	0.38
Brovine Serum albumin	68,000	0.48
Unknown	?	0.68