บทที่ 2

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

บทที่ 2

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

High Performance Liquid Chromatography

(HPLC)

HPLC คือ วิธีการของคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว และเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ จึงใช้ขนาดอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ขนาดเล็กมากๆ เมื่อเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็ก การไหลของเฟสเคลื่อนที่จึงต้องใช้แรงดันเข้าช่วย เพื่อทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย และทำให้การแยกเกิดได้เร็วขึ้น การแยกในระบบ HPLC จึงมีความหมายเป็น

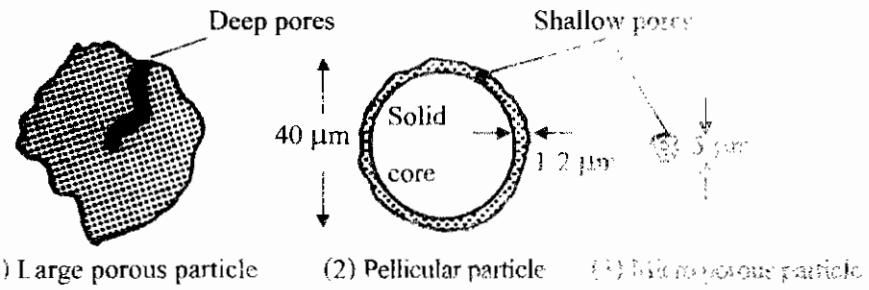
High performance liquid chromatography

High pressure liquid chromatography

High speed liquid chromatography

ปกติอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลว (LC) แบ่งได้เป็น 3 ขนาด คือ

1) **Large porous particle** หรือ **Macro porous particle** มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย (d_p) เท่ากับ 50-250 μm ใช้ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวทั่วๆ ไป
2) **Pellicular particle** มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย (d_p) เท่ากับ 30-50 μm ใช้ได้ในระบบ HPLC ปกติจะใช้ในงานของ preparative scale
3) **Micro porous particle** มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย (d_p) เท่ากับ 5-10 μm ใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC

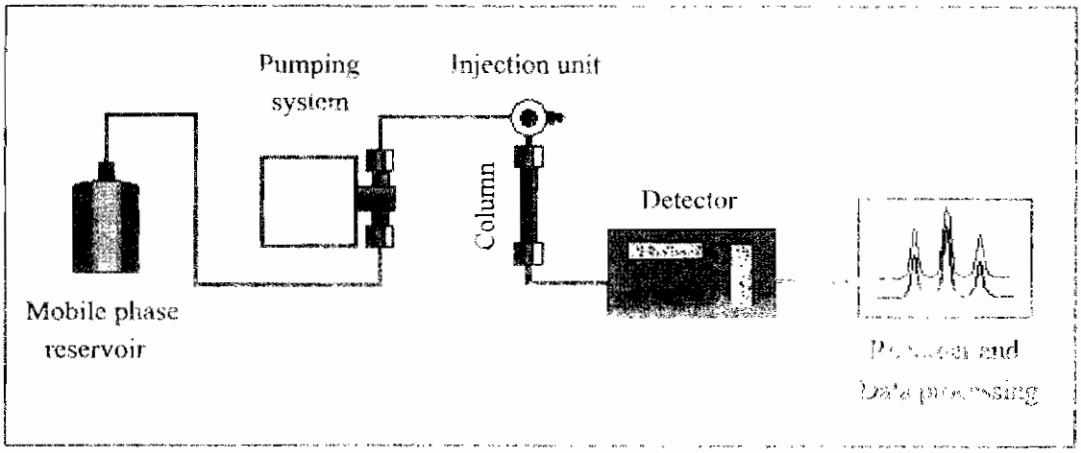


รูปที่ 2.1 แสดงชนิดอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ [illegible]

เครื่องมือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC Instrumentation)

เครื่องมือ HPLC มีส่วนประกอบ คือ

- Mobile phase reservoir
- Pumping system
- Injection unit
- Column
- Detector
- Recorder and data processing



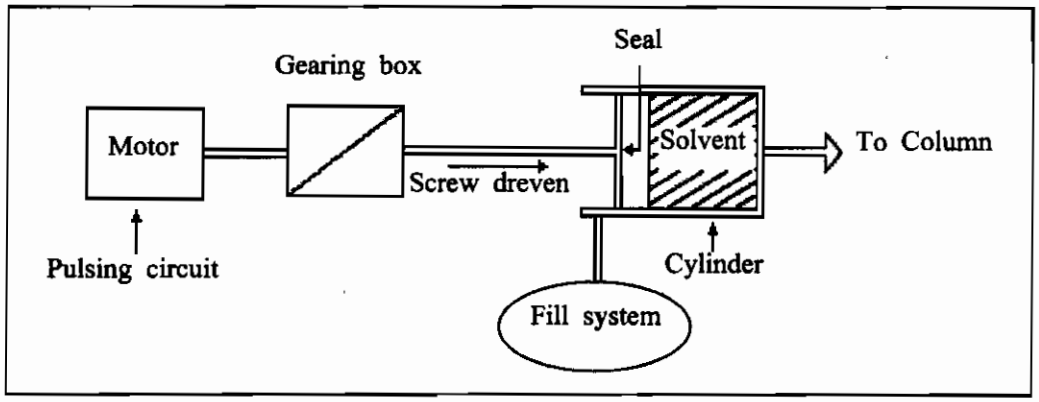
รูปที่ 2.2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบ [illegible]

2.2 การแบ่งชนิดของปั๊มตามกลไกการทำงานของระบบ

สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.2.1 Mechanical pump หรือ Constant volume pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้คงที่ แบ่งเป็น

2.2.1.1 Syring pump หรือ Constant displacement



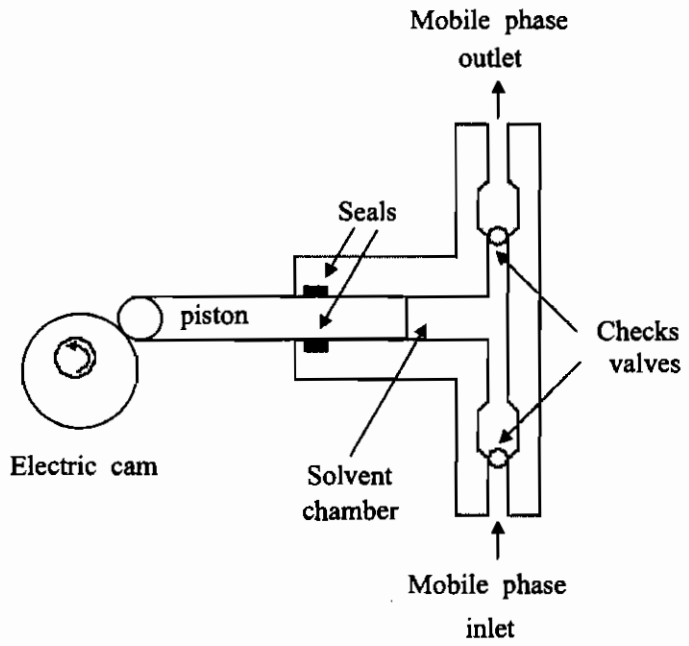
รูปที่ 2.3 Syring pump

มีลักษณะเป็นกระบอกสูบคล้ายเข็มฉีดยา บรรจุตัวทำละลายไว้ มีก้านสูบซึ่งเคลื่อนที่แบบสกรู (screw) โดยใช้ gear box และมีมอเตอร์เป็นตัวควบคุมอัตราการไหล โดยควบคุมให้ก้านสูบเคลื่อนที่เร็วหรือช้า ภายในกระบอกสูบมีปริมาตร 200-500 ml ปริมาตรของตัวทำละลายจะถูกจำกัดด้วยขนาดของกระบอก ดังนั้นควร run chromatogram เสร็จก่อนตัวทำละลายหมดกระบอกสูบ

ข้อดีของปั๊มชนิดนี้ คือสามารถให้ความดันที่ค่อนข้างสูงได้ ไม่มีการกระตุก (pulse free) ทำง่ายและแข็งแรง ไม่มี check valve จึงไม่ต้องดูแลมาก

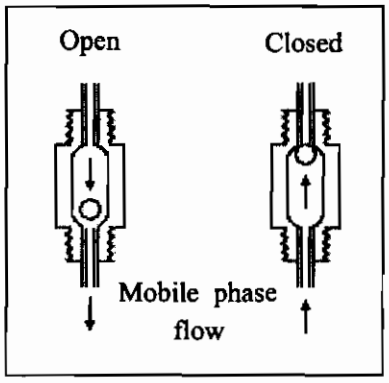
ข้อเสีย คือ ถูกจำกัดปริมาตรของตัวทำละลาย เมื่อใช้หมดต้องหยุดเปลี่ยน หรือเติมสารละลายทำให้เสียเวลา และอัตราการไหลอาจเปลี่ยนแปลงได้บ้างเมื่อใช้ความดันสูง

2.2.1.2 ปั๊มแบบชักลูกสูบ (Reciprocating pump) ปั๊มชนิดนี้นิยมใช้กันมาก



รูปที่ 2.4 Reciprocating pump

ก้านสูบของปั๊มจะเคลื่อนที่เข้าออกตลอดเวลาการทำงาน เมื่อลูกสูบเคลื่อนที่เข้า จะมีการดันเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ และเมื่อลูกสูบเคลื่อนที่ออก จะดึงเฟสเคลื่อนที่จากภาชนะบรรจุเข้าสู่ลูกสูบโดยผ่าน check valve การควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กระทำได้โดยการปรับความเร็วของการชักลูกสูบ

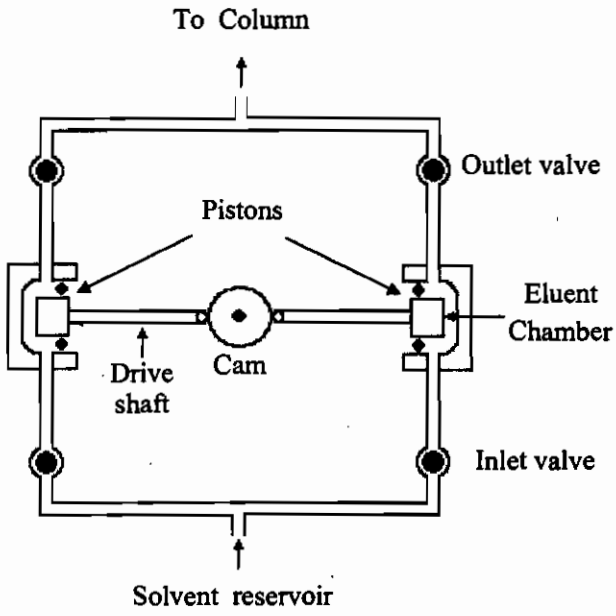


รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะการทำงานของ check valve

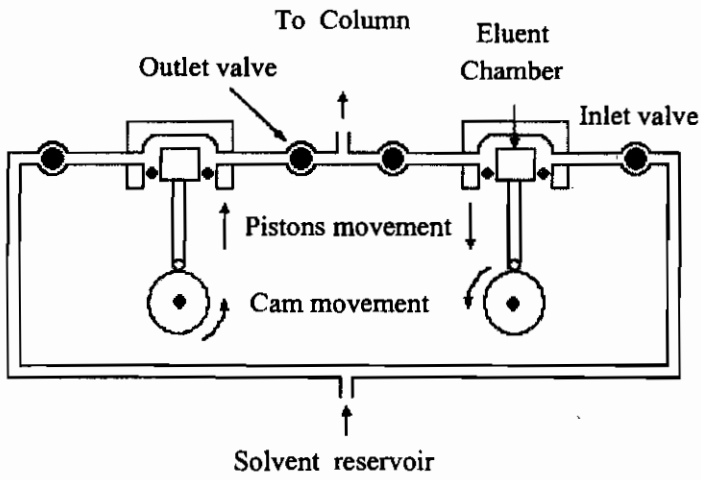
ข้อดีของ Reciprocating pump คือ

1. มีปริมาตรภายในต่ำ ทำให้การเปลี่ยนแปลงชนิดตัวทำละลายทำได้ง่าย
2. อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ดี ไม่ต้องคำนึงถึง back pressure ของคอลัมน์
3. ไม่มีข้อจำกัดขนาดของภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่

ข้อเสีย คือ การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่เกิด pulse ทำให้มี noise ถ้าต้องการขจัด pulse ต้องมี pulse damper ซึ่งทำให้ยุ่งยากในการเปลี่ยนตัวทำละลาย จึงไม่เหมาะกับการทำ gradient elution เพื่อให้การไหลของตัวทำละลายสม่ำเสมอ มีความแน่นอนสูง จึงได้พัฒนาเป็น Single cam dual piston reciprocating pump และได้พัฒนาให้ดีขึ้นโดยทำเป็นแบบ twin cam dual piston reciprocating pump ทำให้การไหลของตัวทำละลายไม่มี pulse ดังแสดงในรูปที่ 2.6



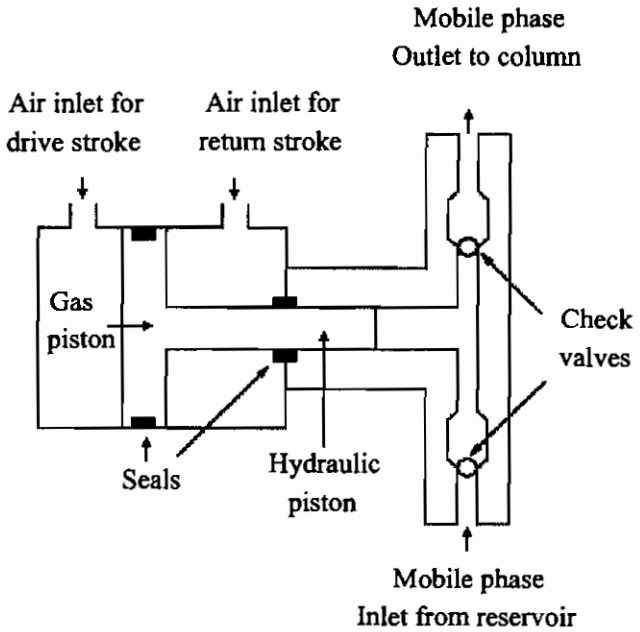
รูปที่ 2.6 Single cam dual piston reciprocating pump



รูปที่ 2.7 twin cam dual piston reciprocating pump

ปั๊มแบบนี้ทำให้ตัวทำละลายไหลได้อย่างสม่ำเสมอ และมีความเที่ยงสูง

2.2.2 Pneumatic amplifier pump (Constant pressure pump) ใช้ความดันของแก๊สในการขับเคลื่อนลูกสูบ อากาศจากกระบอกสูบจะมีความดันสูงประมาณ 10 bar (150 psi) จะอัดเข้าที่ลูกสูบ ซึ่งพื้นที่ของลูกสูบ (gas piston) จะมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับ hydraulic piston



รูปที่ 2.8 Pneumatic amplifier pump

ความดันที่ให้กับเฟสเคลื่อนที่ = $\frac{\text{gas pressure x area of gas piston}}{\text{area of hydraulic piston}}$

$$P_{app} = P_i \times \frac{A_g}{A_h}$$

ถ้าความดันที่ให้ (P_i) = 10 bar

$\frac{\text{area of gas piston}}{\text{area of hydraulic piston}}$ = 50 : 1

$$\therefore \quad P_{app} = 10 \times \frac{50}{1}$$

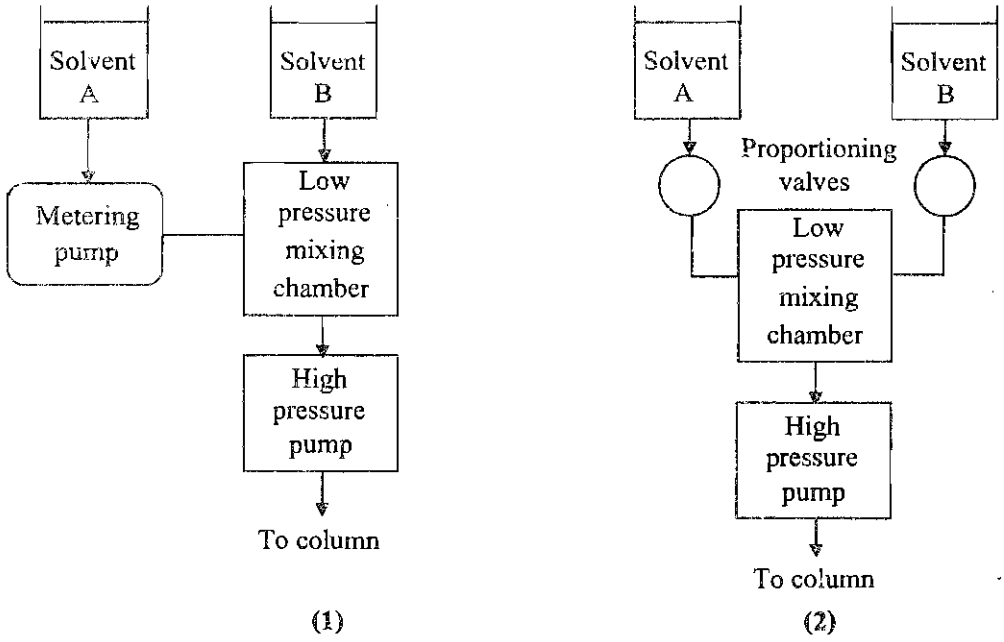
= 500 bar (7500 psi)

ข้อดีของปั๊มนี้ คือ ใช้ได้ดีที่ความดันค่อนข้างสูง การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ค่อนข้างคงที่ ทำให้อัตราการไหลค่อนข้างคงที่และมี noise ต่ำ

ข้อเสีย คือ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่มีขีดจำกัด (คือ แปรผันกับอัตราการไหล) อัตราการไหลจะคงที่ เมื่อ pressure drop ของเครื่อง LC คงที่ และถ้ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์ ความถูกต้องและความเที่ยง (accuracy and precision) จะลดลง

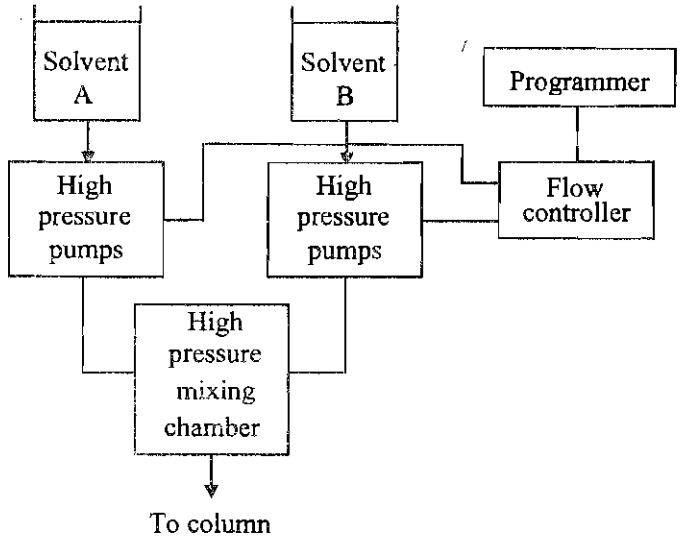
ส่วนประกอบอื่นๆ ของปั๊มที่จะทำให้การทำงานสมบูรณ์ คือ

1. **Flow controller** เป็นตัวควบคุมการไหล
2. **Pressure monitoring device** เป็นอุปกรณ์ใช้ตรวจวัดความดัน อยู่ระหว่างทางเข้าคอลัมน์กับปั๊ม การตรวจวัดความดันจะทำให้ทราบว่า การทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ มีสิ่งอุดตันค้างหรือไม่ อุปกรณ์ที่ใช้มี 2 ชนิด
   - ก. Pressure transducer หรือ Strain guage
   - ข. Bourdon tube หรือ diaphragm guage
3. **Solvent flow programming equipment** ใช้ทำ gradient elution แบ่งเป็น 2 แบบ
   - ก. Low pressure gradient ใช้ผสมตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศ แล้วใช้ปั๊มความดันสูงปั๊มเข้าคอลัมน์



รูปที่ 2.9 Low pressure gradient

ข. High pressure gradient จะใช้ High pressure pump ปั๊มตัวทำละลายเข้าสู่ mixing chamber ก่อนเข้าสู่คอลัมน์



รูปที่ 2.10 High pressure gradient

4. **Pulse damper** เป็นอุปกรณ์สำหรับลดการกระตุกเป็นจังหวะ (pulse) ของปั๊ม

2.3 การแบ่งชนิดของปั๊มโดยอาศัยวัสดุที่ใช้ในการผลิต

เนื่องจากการทำ HPLC มีตัวทำละลาย หรือเฟสเคลื่อนที่ให้เลือกใช้ได้หลายชนิดตามวิธีการวิเคราะห์ของสารตัวอย่างแต่ละชนิด ชนิดของตัวทำละลายได้แก่ น้ำ บัฟเฟอร์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว วัสดุที่นำมาใช้ผลิตปั๊มแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.3.1 โลหะ โลหะที่นำมาใช้ในการผลิตปั๊มสำหรับงาน HPLC มี 2 ชนิด คือ

2.3.1.1 Stainless steel เป็นวัสดุที่นำมาใช้มากที่สุด เกรดของ stainless steel ที่นำมาใช้ คือ 316 ซึ่งมีความแข็งแรง ทนต่อการกัดกร่อน เสถียรต่อความร้อน ตัวทำละลายที่สามารถกัดกร่อน 316 stainless steel ได้ คือ กรดเกลือ

2.3.1.2 Titanium เป็นวัสดุที่ทนต่อการกัดกร่อนได้เช่นเดียวกับ stainless steel แต่สามารถทนแรงดันได้สูงกว่า แต่มีข้อเสียคือ สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนกับไอออนบางตัวได้ และมีราคาแพงกว่า

2.3.2 ไม่ใช่โลหะ วัสดุที่ไม่ใช่โลหะ สามารถนำมาใช้ทดแทนพวกโลหะได้ดีกับการใช้ตัวทำละลายพวก กรด-เบส และเกลือที่มีความเข้มข้นสูงๆ ตัวทำละลายเหล่านี้เมื่อใช้นานๆ จะทำให้โลหะเกิดการกัดกร่อน และนอกจากนี้งานที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างทางชีวภาพก็ไม่เหมาะกับการใช้โลหะ เพราะตัวอย่างทางชีวภาพสามารถสลายตัวได้เมื่อสัมผัสกับโลหะ กลุ่มที่ไม่ใช่โลหะ แล้วนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของปั๊ม คือ

2.3.2.1 Teflon (polytetrafluoroethylene) ใช้ได้กับงานความดันต่ำ ไม่เกิน 2000 psi และเหมาะกับงานทางชีวภาพ

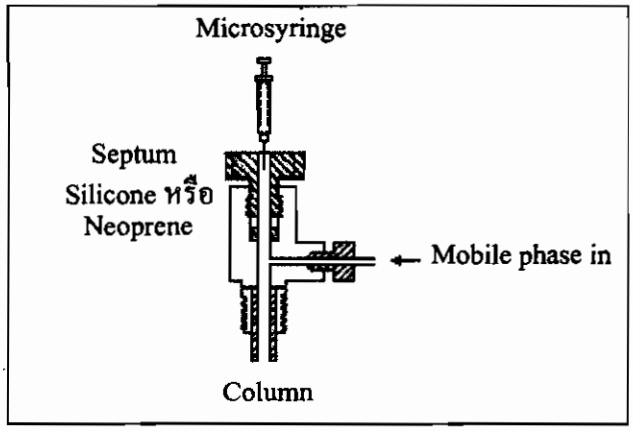
2.3.2.2 PEEK (polyethylethylketone) ทนแรงดันได้สูงกว่า Teflon ใช้ได้กับความดันสูงถึง 5000 psi เฉื่อยต่อตัวทำละลายอนินทรีย์ที่สามารถทำลาย stainless steel แต่ไม่เหมาะกับตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ใช้โดยทั่วไปใน normal phase HPLC

2.3.2.3 Ceramic ถูกนำมาใช้ได้ดี มีความเสถียรทางเคมีสูง แต่มีราคาสูงและแตกง่าย

3. หน่วยฉีดสารตัวอย่าง (Injection Unit)

การฉีดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ต้องมี reproducibility สูง ขนาดของตัวอย่างที่ใช้ต้องไม่ overload column และทำให้ column efficiency ลดลง การฉีดสารตัวอย่างต้องทำให้ได้แบนด์ (band) ที่แคบที่สุด

3.1 Syringe injection เป็นวิธีการฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ syringe ฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum เหมือนใน GC ดังแสดงในรูปที่ 2.11

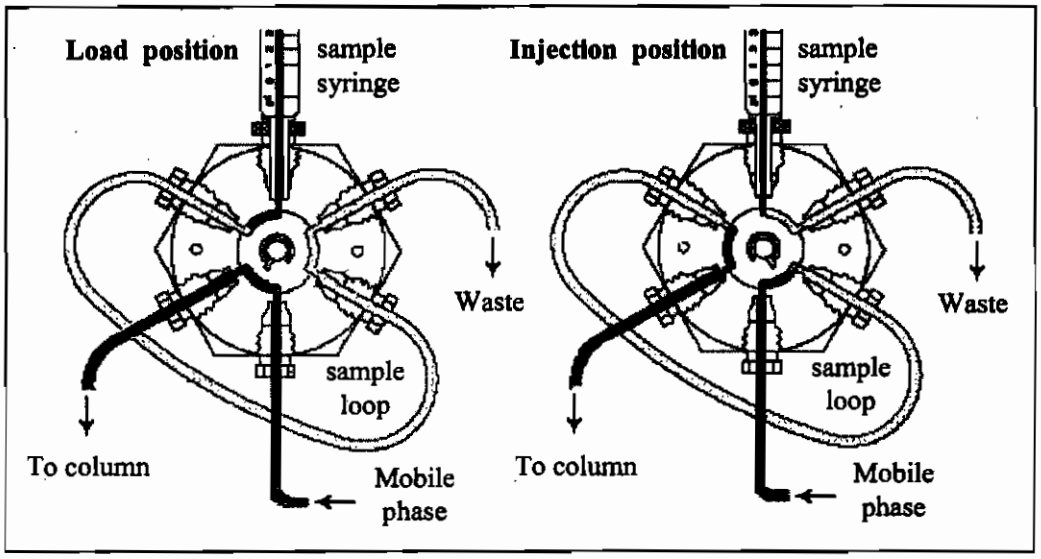


รูปที่ 2.11 Syringe injection

ข้อเสีย คือรั่ว (leak) ได้ง่าย เวลาฉีดถ้าตัวทำละลายถูก septum จะทำให้ septum เสียได้ และเกิดการปนเปื้อนกับสารตัวอย่างได้ง่าย จึงไม่นิยมใช้

3.2 Sampling valve มี 2 แบบ คือ

3.2.1 External loop valve ใช้มากที่สุดมี loop ที่กำหนดขนาดตัวอย่างแน่นอน มี six ports ดังแสดงในรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 Sampling valve ชนิด external loop

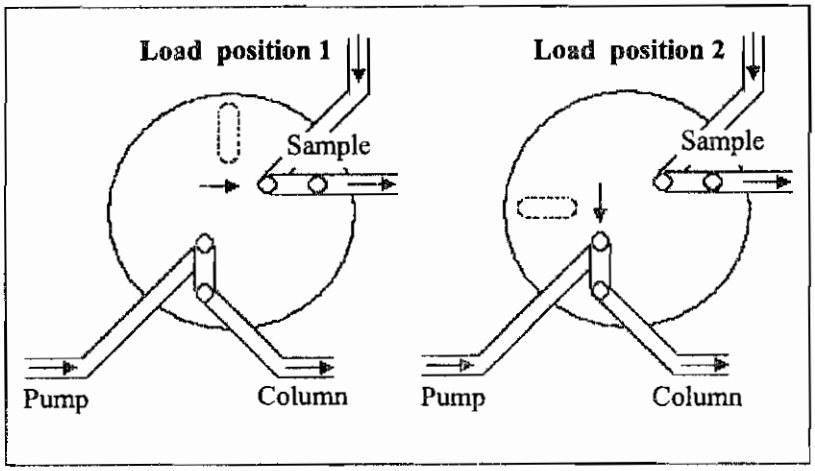
ข้อดี คือ

- ใช้กับปริมาตรของตัวอย่างได้หลายขนาด โดยเลือกขนาดของ loop
- มี High reproducibility
- สามารถฉีดสารตัวอย่างที่ความดันสูงได้โดยไม่รบกวน solvent flow
- ไม่ใช้ septum ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนในสารตัวอย่างได้

ข้อเสีย คือ ต้องใช้สารละลายตัวอย่างให้มากกว่า sample loop

ขนาดของ loop มีหลายขนาดขึ้นอยู่กับปริมาตรของสารตัวอย่างที่ต้องการใช้ โดยทั่วไปมีขนาดอยู่ในช่วง 5 µl ถึง 5 ml ความถูกต้องของการวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับขนาดของ loop ด้วย ความผิดพลาดไม่เกิน 5 % สำหรับ loop ขนาด 2 ml และอาจถึง 30 % สำหรับ loop ขนาด 5 µl ข้อเสียของ loop ขนาดใหญ่มีผลทำให้ โครมาโทแกรมเกิด band broadening การใช้ loop ขนาดเล็ก และตัวอย่างเข้มข้นขึ้นจะให้ผลดีกว่า การฉีดตัวอย่างในปริมาตรที่แน่นอนแต่ไม่เต็ม loop (partial) จะให้ความเที่ยงน้อยกว่าการฉีดแบบเต็ม loop แต่ทั้งนี้การฉีดแบบไม่เต็ม loop สามารถมีความเที่ยงสูงขึ้นถ้าผู้ปฏิบัติทำด้วยความระมัดระวัง และมีเทคนิคที่ดีในการใช้เข็มฉีดตัวอย่าง

3.2.2 Internal loop valve ใช้กับขนาดของตัวอย่างที่มีน้อยกว่า มี four ports ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 Sampling valve ชนิด internal loop

Injection valve แบบนี้จะกำหนดขนาดของ loop ตายตัว ปรับเปลี่ยนขนาดไม่ได้

4. <u>คอลัมน์</u> (Column)

ใน HPLC ส่วนของคอลัมน์ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Guard column และ Separating column

4.1 Guard Column มีขนาด 5.0 cm x 4.6 mm id. วัสดุที่บรรจุอยู่เป็นประเภทเดียวกับคอลัมน์ที่ใช้แยก (Separating column) แต่มีขนาดใหญ่กว่าและความจุมากกว่า ทำหน้าที่กรอง particulate matter และ non eluted component ทำให้เพิ่มอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ใช้แยกควร repack ได้เอง และ recondition ได้ง่าย

4.2 Separating column ต้องทำด้วย stainless steel ที่ทนต่อความดันสูงๆ ผิวด้านในเรียบ id. เท่ากันตลอด

External diameter 6.35 mm (1/4 inch)

Internal diameter	4.6 mm
length	10 - 100 cm นิยม 25 cm
particle size	5 - 50 μm

แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

4.2.1 คอลัมน์สำหรับงานวิเคราะห์ (Analytical column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ทางคุณภาพและทางปริมาณ ในวิธี HPLC

4.2.2 คอลัมน์สำหรับเตรียมตัวอย่าง (Preparative column) เป็นคอลัมน์ที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน แล้วเก็บแต่ละส่วนที่แยกออกจากกันได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไป

4.3 การเลือกคอลัมน์ (Column selection)

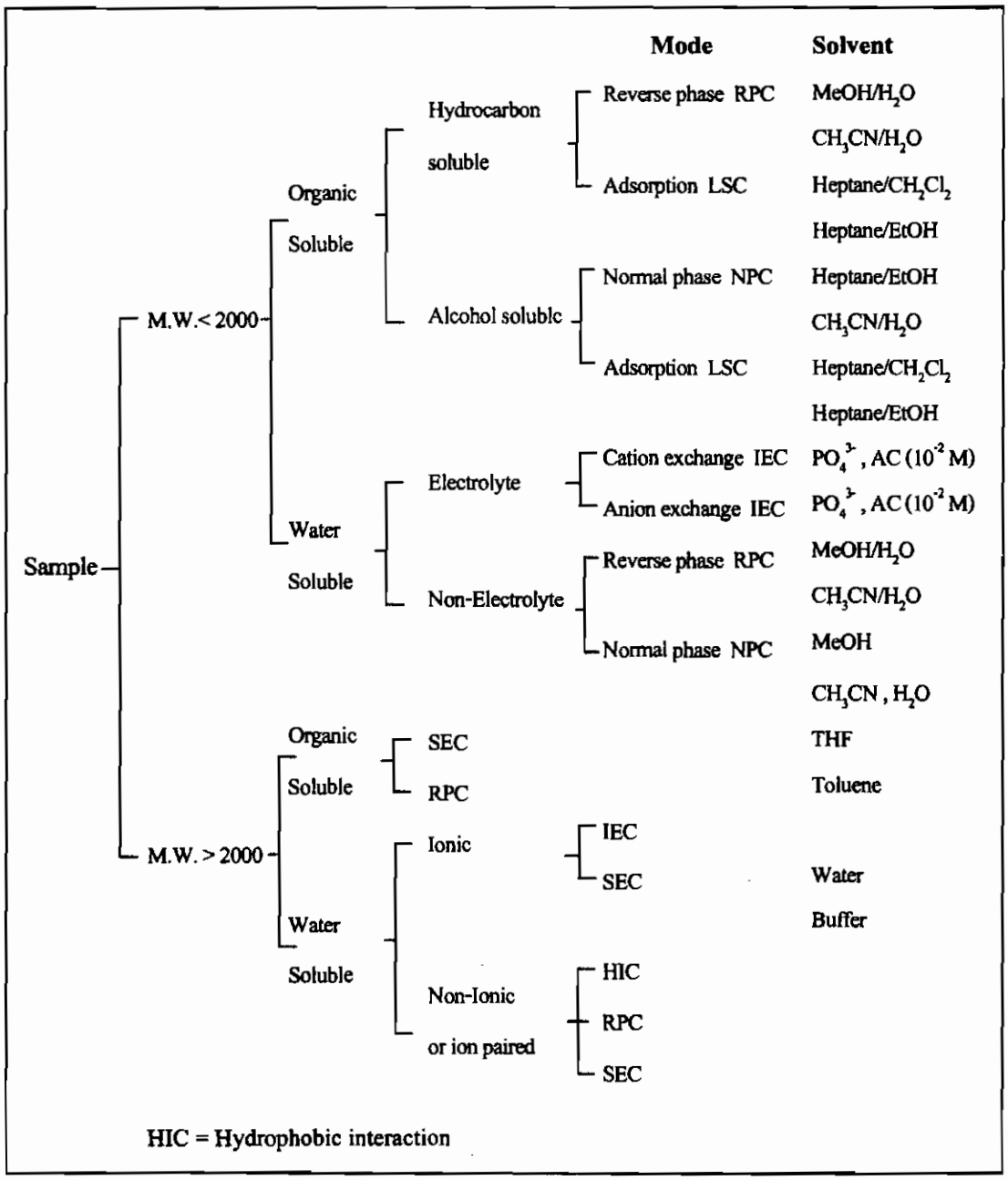
การเลือกคอลัมน์ หรือเลือกระบบ HPLC ในการวิเคราะห์ตัวอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างว่าเป็นประเภทใด เช่น polynuclear aromatic hydrocarbons , carbohydrate , peptide หรืออื่นๆ ไม่มีทฤษฎีหรือกฎเกณฑ์ตายตัวสำหรับการเลือกคอลัมน์ เพื่อนำไปใช้กับสารตัวอย่างประเภทต่างๆ การหาเงื่อนไขทางโครมาโทกราฟีให้เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยก เป็นกระบวนการที่ต้องทำก่อน เมื่อเลือกคอลัมน์ได้แล้ว สารชนิดเดียวกันสามารถใช้ได้กับคอลัมน์หลายชนิด แต่แต่ละชนิดจะมีเงื่อนไขทางโครมาโทกราฟีต่างกัน และให้โครมาโทแกรมที่ต่างกัน ดังนั้นขั้นตอนของการเลือกคอลัมน์ จึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการเริ่มต้นสำหรับงาน HPLC

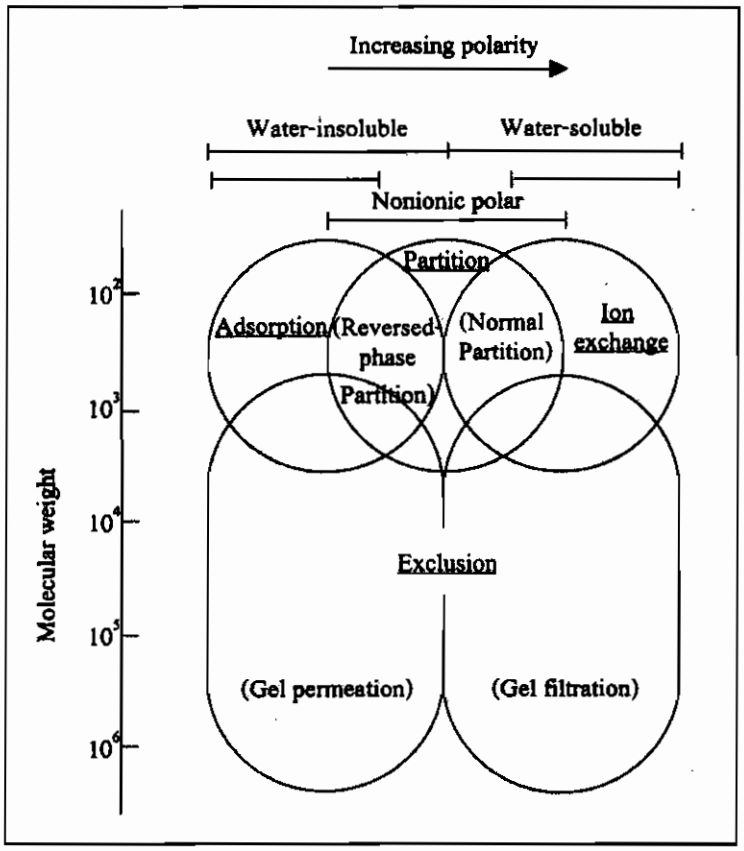
อนุภาคของเฟสอยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์ คือตัวสำคัญที่จะทำให้เกิดการแยกได้ตามที่ต้องการหรือไม่ และเมื่อแยกได้แล้ว การใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน เงื่อนไขตัวทำละลายเดียวกัน ต้องให้ผลเหมือนกัน คอลัมน์ได้ถูกปรับปรุงขึ้นมากมาย เพื่อให้การแยกดีขึ้น ประสิทธิภาพดีขึ้น และมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น เพื่อให้ตรงตามความต้องการ ดังนั้นการเลือกคอลัมน์จึงอาจใช้วิธีการดูจาก specification ของผู้แทนจำหน่ายที่นำเสนอว่า คอลัมน์ที่จำหน่ายนี้ใช้ได้อย่างไรบ้าง ตรงกับความต้องการหรือไม่ เช่น ต้องการแยกตัวอย่างที่มี pH ต่ำ โดยใช้ระบบ reverse – phase ควรใช้ reverse – phase ชนิด polymer base เป็นตัว ซับพอต (support) แต่ถ้าใช้ silica เป็นตัวซับพอต พบว่าคอลัมน์จะทนไม่ได้กับ pH ที่ต่ำกว่า 2.5 เป็นต้น ซึ่งเป็นข้อควรระมัดระวัง

การเลือกระบบ HPLC (HPLC mode) ก่อนเป็นขั้นแรก จะทำให้สามารถเลือกชนิดของคอลัมน์ได้ถูกต้อง การเลือก LC mode ให้พิจารณาข้อมูลของสารตัวอย่างในสิ่งต่อไปนี้ คือ

- ขนาดของโมเลกุล คือมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหรือสูง
- สภาพขั้ว คือเป็นสาร polar , nonpolar หรือ ionic
- การละลาย คือเป็นสารละลาย aqueous หรือ nonaqueous

วิธีการพิจารณาเลือก LC mode





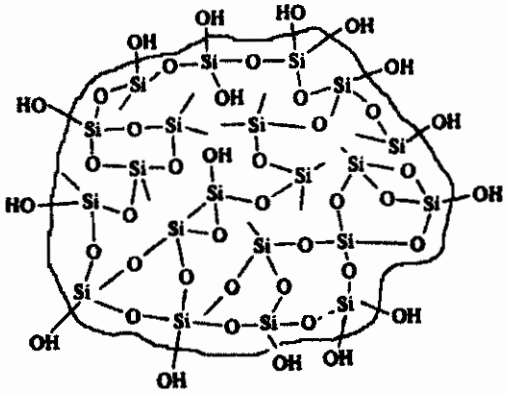
หลังจากที่เลือกระบบในการทำ HPLC ได้แล้ว ในแต่ละระบบยังมีคอลัมน์ให้เลือกอีกหลายประเภท การตัดสินใจว่าควรเลือกคอลัมน์ชนิดใดมาใช้ในการวิเคราะห์ ให้พิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของคอลัมน์ที่จะเลือกดังนี้

- ค่ารีเทนชันและความจำเพาะเจาะจง (t_R , k' และ α)
- สมรรถนะของคอลัมน์ โดยดูจากค่า Efficiency , selectivity , symmetry และ resolution
- มีความเสถียรและความทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH (stability)
- ให้ผลการทดลองที่แน่นอนและเที่ยงตรง (consistency)
- ราคา ถ้ามีคอลัมน์ 2 ชนิดที่จะตัดสินใจเลือกโดยคอลัมน์ทั้งสองให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน ให้ตัดสินใจเลือกชนิดที่มีราคาถูกกว่า

4.4 การจำแนกชนิดของโครมาโทกราฟีตามกลไกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์

4.4.1 Adsorption chromatography ทำให้เกิดโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า liquid – solid chromatography (LSC)

เฟสที่อยู่กับที่จะมีสภาพขั้วสูง สามารถดูดซับโมเลกุลของสารตัวอย่างไว้ได้ด้วยแรงดึงดูดระหว่างขั้ว โดยเกิดพันธะไฮโดรเจน ตัวดูดซับเหล่านี้ ได้แก่ ซิลิกา และ อะลูมินา ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่มีสภาพขั้วสูงที่ผิวหน้า ซิลิกาจะได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาถูก มีหมู่ซิลานอล (Si - OH) ที่ว่องไวบนผิวหน้า ดังแสดงในรูปที่ 2.15 ระบบ LSC จัดเป็น normal phase chromatography เพราะมีเฟสอยู่กับที่ที่มีสภาพขั้วสูง เหมาะสำหรับการแยกพวก alkaloid , steroid , vitamins , triglycerides , sex hormone และ peptides เป็นต้น



รูปที่ 2.15 โครงสร้างของ ซิลิกาเจล

ในกระบวนการแยกสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ จะเกิดจากการแข่งขันกัน ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับตัวถูกละลาย ในการดูดซับที่เฟสอยู่กับที่ ตัวถูกละลายจะถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ เนื่องจากโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่เข้าแย่งดูดซับแทน ซึ่งจะเข้าแย่งที่ได้จะต้องมีความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength) สูงกว่า เพื่อทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ต้องใช้เฟสเคลื่อนที่จากความแรงต่ำๆ ไปหาสูง คือ จาก nonpolar ⟶ polar ทำให้ในระบบของ LSC สามารถทำนายรีเทนชันไทม์ (t_R) ของตัวถูกละลายได้ตามลำดับของสภาพขั้วดังนี้

aliphatic hydrocarbon < olefin < aromatic hydrocarbon < organohalide < organosulfide < ether < nitrocompound < aldehyde , ketone , ester < alcohols , amines < sulfones < sulfoxides < amides < carboxylic acid

ข้อควรคำนึงถึงสำหรับ LSC

1) พื้นที่ผิวของซิลิกาเป็นกรดอ่อน สารที่เป็นเบสอาจเกาะติดแน่น ทำให้เกิดเป็น tailing peak ดังนั้นไม่ควรใช้กับสารที่เป็นเบส สารที่มีฤทธิ์เป็นกรดใช้ได้ดี แต่ต้องไม่เป็นกรดมากเกินไป สำหรับอะลูมินาใช้กับสารที่เป็นเบสได้ดีกว่า

2) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ควรบริสุทธิ์มากๆ เพราะสิ่งเจือปนที่มีขั้วจะทำลายซิลิกาโดยเข้าดูดซับที่ active site ได้อย่างถาวร

3) การใช้ตัวทำละลายหลายๆ ตัวผสมกันจะทำให้ selectivity ดีกว่าใช้เพียงตัวเดียว

4) Tailing peak เกิดกับตัวอย่างที่มีขั้วมาก หรือมี ionized group สามารถแก้ไขได้โดยการเติม anti tailing agent เช่น ตัวอย่างเป็นกรดให้เติม 1% acetic acid หรือ phosphoric acid ถ้าเป็นเบสให้เติม tertiary amine เช่น triethylamine หรือ ammonia แต่โดยทั่วไปจะแก้ปัญหาโดยการใช้ reverse phase chromatography

4.4.2 Partition chromatography ทำให้เกิดโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า liquid – liquid chromatography (LLC) การใช้ของเหลวเป็นเฟสอยู่กับที่ทำได้โดยเคลือบของเหลวบนของแข็งซับพอต (solid support) โดยที่ของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ต้องไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับเฟสเคลื่อนที่ การแยกเกิดขึ้นได้โดยใช้หลักการเดียวกับการสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ดีกว่าคือเกิดกระบวนการ partition ได้หลายครั้งตามจำนวนเพลตตามทฤษฎี ในทางปฏิบัติการผ่านเฟสเคลื่อนที่ลงไปในคอลัมน์นานๆ อาจละลายเฟสอยู่กับที่ได้บ้าง คอลัมน์อาจมีประสิทธิภาพลดลง การแก้ไขหรือหลีกเลี่ยงการเกิด solvent stripping ทำได้โดยใช้ตัวซะที่อิ่มตัวด้วยเฟสอยู่กับที่ วิธีการของ partition ไม่ค่อยเหมาะกับการทำ Gradient elution

เนื่องด้วยข้อจำกัดของการทำ liquid – liquid partition chromatography มีมากทำให้การวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิดนี้ใน HPLC จึงมีน้อย ด้วยเหตุผลที่คอลัมน์สามารถเกิด solvent stripping ได้จึงมีการพัฒนาคอลัมน์ที่ใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว โดยทำให้ของเหลวเกิด bond กับของแข็งซับพอต (solid support) จึงเกิดเทคนิคในการทำโครมาโทกราฟีที่เรียกว่า bond phase chromatography

4.4.3 Bond phase chromatography (BPC) เหตุผลที่ต้องพัฒนาการทำ partition chromatography มาเป็น bond phase chromatography นอกจากการแก้ปัญหา solvent stripping แล้วยังทำให้

1) สามารถแยกสารที่เป็น polar , nonpolar , ionic และ ionizable molecule ที่ผสมกันอยู่ได้โดยใช้เพียงคอลัมน์เดียว

2) เลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ได้มากชนิดขึ้น

3) สามารถใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นพวก water – buffer และ methanol – acetonitrile ที่มีราคาถูกกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น

4) สามารถทำ gradient elution ได้ผลดี

5) ไม่มีข้อจำกัดของแรงดันขาเข้าของเฟสเคลื่อนที่

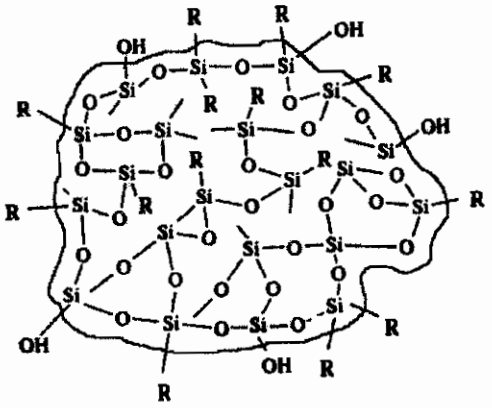
เฟสอยู่กับที่ชนิด bond phase เกิดขึ้นได้โดยการนำซิลิกามา modified โดยทำปฏิกิริยากับตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นเฟสอยู่กับที่ โดยให้เกิดพันธะที่หมู่ไซลานอล (Si-OH) ดังรูปที่ 2.16 ซิลิกาเจล ที่นำมาใช้เป็นฐานต้องมีคุณสมบัติ

1) เป็นอนุภาคขนาดเล็ก (3 , 5 , 10 μm)

2) มีพื้นที่ผิวมาก

3) ควบคุมขนาดรูพรุน (เกือบทั้งหมดใช้ชนิด microporous silica)

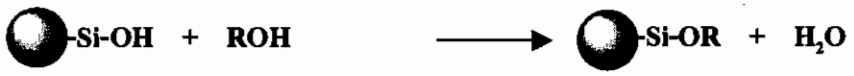
4) แข็ง และทนต่อแรงต่างๆ ทาง mechanic



รูปที่ 2.16 modified silica

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการ modified silica เป็น bond phase stationary phase มี 3 แบบ คือ

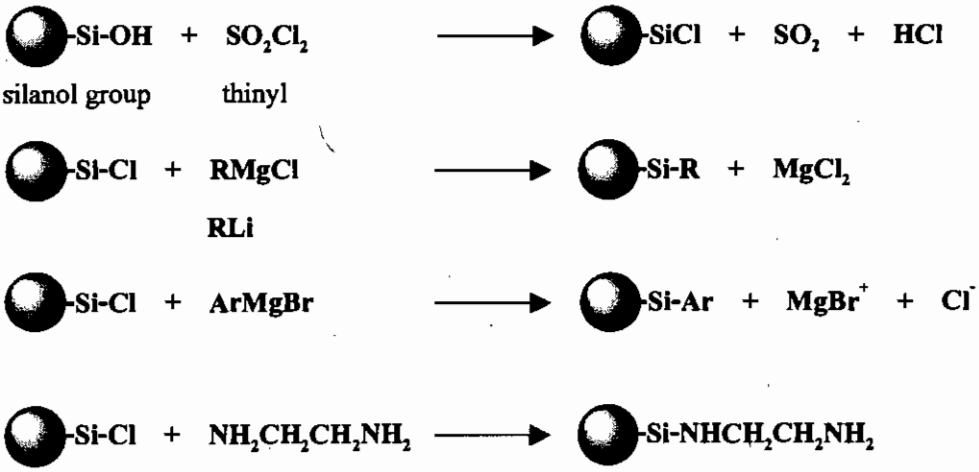
1) หมู่ไซลานอลทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์



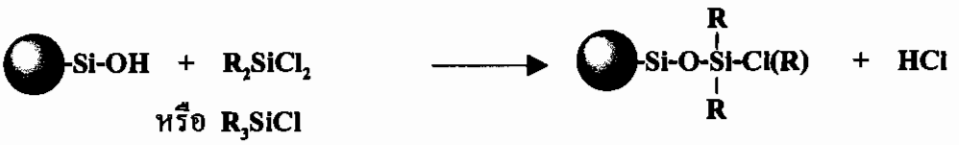
Silanol group silyl

การเกิด bond phase แบบนี้เป็นชนิดแรกที่คิดขึ้น ไม่ค่อยดีนักเพราะ ether bond (Si-O-R) ที่เกิดขึ้นสามารถถูก hydrolyse ได้ง่ายใน aqueous acidic condition

2) **Chlorination** เป็นวิธีที่สะดวก ใช้หมู่ไซลานอลทำปฏิกิริยากับ SO_2Cl_2 ได้ SiCl ที่ทำปฏิกิริยาต่อกับ Gringnard reagent หรือ organolithium เกิดเป็น Si-C bond ที่คงทนต่อการแตกตัว



3) **Silylation** วิธีนี้นิยมใช้มากในปัจจุบัน โดยใช้สารพวก organochlorosilane หรือ organoalkoxysilane ทำให้เกิดพันธะเคมีแบบ siloxane ที่เสถียร (-Si-O-Si-C) pH ที่เหมาะสม คือ > 2 - < 7.5 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เรียกว่า Silanization



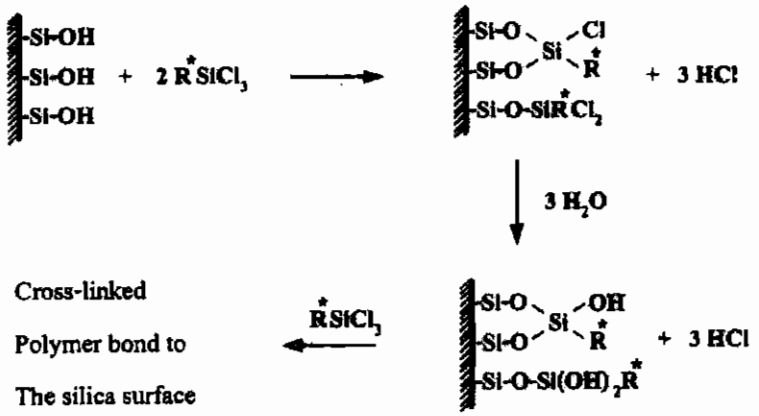
Chlorosilane Silyl ether พันธะ Siloxane

ปฏิกิริยาที่สภาวะไม่มีน้ำ (anhydrous conditions) จะได้ monomeric phase ถ้าเกิด polymerization ภายใต้สภาวะที่ควบคุมความชื้น จะได้ polymeric phase

3.1) ตัวอย่างของ bonded phase แบบ monomeric phase วิธีเตรียมให้ใช้ silica กับ dimethyl chlorosilane

Silanol group Silylating agent monomeric bonded phase

3.2) ตัวอย่างของการเกิด bond phase แบบ polymeric phase จะใช้ di- หรือ tri - chlorosilane



Polymeric phase จะมีความจุของสารตัวอย่างสูง ใช้กับ gradient elution ได้ดี bonded phase สามารถมีคุณสมบัติต่างๆ กัน หรือเป็นต่างๆ ชนิดได้ โดยการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันนอล R* ใน Silylating agent (R^*SiCl_3) ทำให้เกิดการแบ่ง bonded phase เป็น 2 ชนิด คือ

- Normal phase BPC
- Reverse phase BPC

Normal-phase BPC

กลุ่ม R* จะเป็นสารที่สภาพขั้วมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ หลักการเลือกเฟสที่เคลื่อนที่คล้ายกับ LSC การเปลี่ยน R* ให้มีหมู่ฟังก์ชันนอลต่างๆ กัน จะทำให้เกิด selectivity แตกต่างกัน functional group R* ได้แก่

diol	$-(CH_2)_3-O-CH_2-\underset{\displaystyle OH}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-OH$
cyano	$-(CH_2)_3C\equiv N$
amino	$-(CH_2)_n-NH_2$ n = 3 หรือ 4
dimethyl amino	$-(CH_2)_3N(CH_3)_2$
diamine	$-(CH_2)_3NH(CH_2)_2NH_2$

การทำ NP-BPC มีลักษณะคล้ายคลึงกับ LSC แต่มีข้อดีกว่า คือ

1) ไม่จำเป็นต้องควบคุมปริมาณน้ำในตัวทำละลายเพราะน้ำไม่สามารถ deactivated ที่ active sites บนคอลัมน์ได้ เนื่องจากเป็น " Capped " column คือไม่มี Si-OH เหลืออยู่ เพราะเกิด bonded phase ไปแล้ว

2) เกิดสมดุลได้เร็วกว่า LSC ทำให้สามารถทำ gradient elution ได้ง่าย ใช้เวลาในการทดลองน้อย

3) ใช้กับตัวทำละลายได้หลายชนิด ดังนั้นถ้าคอลัมน์สกปรกก็ทำความสะอาดได้โดยล้างกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้ว เช่น ethylacetate หรือ methanol เป็นต้น

4) มี Selectivity ต่างไปจาก LSC

ข้อควรคำนึง

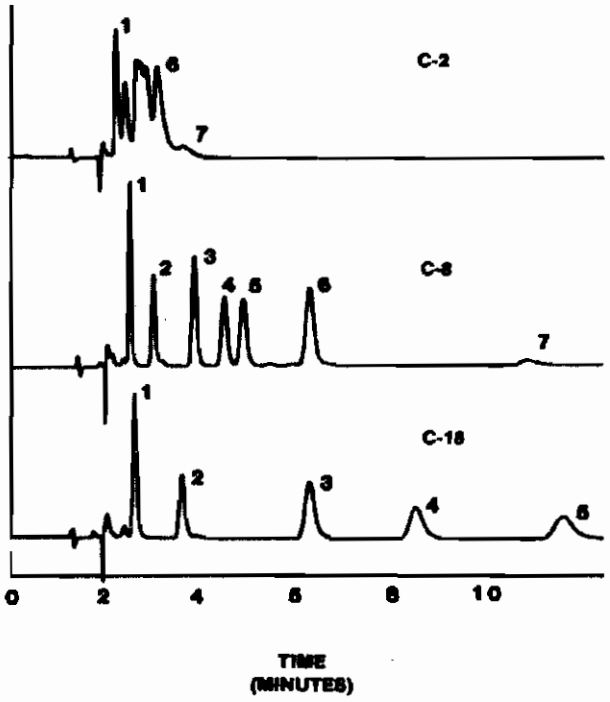
1) ถ้าสารที่วิเคราะห์มีแนวโน้มที่จะแตกตัวเป็นไอออน เมื่อใช้ NP-BPC เช่น amino ($-NH_2$) ควรแก้ไขโดยการเติมกรดอาซิติกลงในเฟสเคลื่อนที่

2) เมื่อใช้ packing ที่มี functional group เป็น $-NH_2$ และ -CN อาจเกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างได้ ทำให้คอลัมน์เกิดการเปลี่ยนแปลงไป จึงควรระวัง

Reverse phase BPC

กลุ่ม R* จะเป็นสารที่มีสภาพขั้วน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ การเลือกเฟสเคลื่อนที่ เลือกจาก polar ⟶ nonpolar เทคนิคนี้เหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลาย หรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ดี เนื่องจากมีสารประกอบอินทรีย์จำนวนมากที่มีพฤติกรรมเช่นนี้ จึงนิยมใช้ RP-BPC มากใน HPLC

หมู่ฟังก์ชันนอล R* ใน RP-BPC ได้แก่ $-C_{18}H_{37}$, $-C_8H_{17}$, $-C_6H_{13}$, $-C_2H_5$,



รูปที่ 2.17 แสดงการแยกเมื่อใช้คอลัมน์ RP-BPC ที่มีจำนวน C ต่างๆ เท่ากัน

ความนิยม RP-BPC มีมากเพราะ

1) สามารถนำมาแยกได้ทั้ง nonionic และ ionic compound

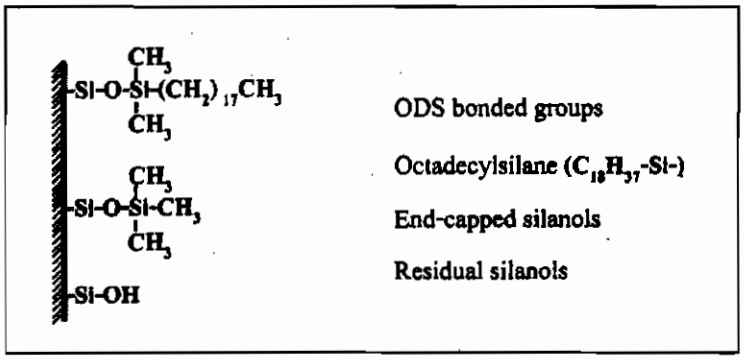
2) ใช้ pH ควบคุมเฟสเคลื่อนที่ได้

3) เฟสเคลื่อนที่ใช้ น้ำ เมธานอล ซึ่งหาง่าย ราคาไม่แพง มีความบริสุทธิ์สูง

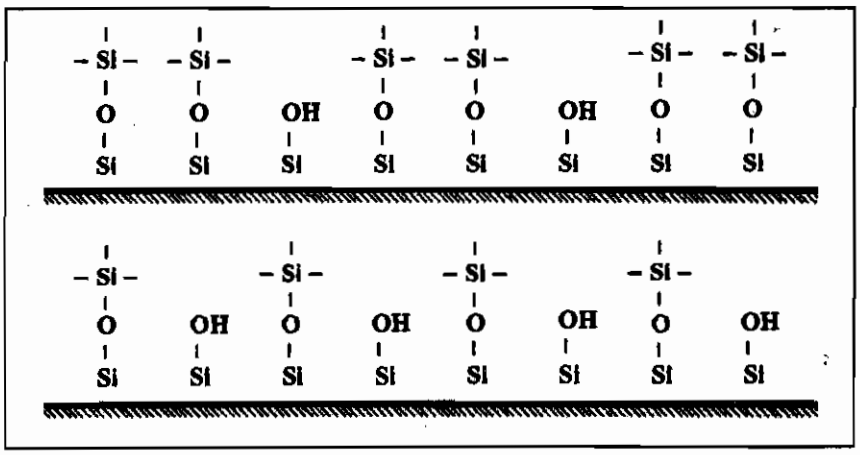
4) สามารถทำนายลำดับการอีลูทของสารตัวอย่างได้ดี เพราะเป็นไปตามคุณสมบัติของการไม่ชอบน้ำ

5) สมดุลที่เกิดในคอลัมน์รวดเร็ว เหมาะกับการทำ gradient elution

สิ่งสำคัญที่เกิดขึ้นในการสังเคราะห์ BPC โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับชนิด RP-BPC คือ เปอร์เซนต์ของการ silanization (หรือ coverage) ซึ่งหมายถึงจำนวน silanol group ที่ทำปฏิกิริยากับ silylating agent ในทางปฏิบัติ จะได้ % coverage ประมาณ 45% ถ้าเปอร์เซนต์สูงมีผลให้ capacity และ selectivity สูงตามไปด้วย การมี -Si-OH เหลืออยู่มากๆ จะมีผลทำให้เกิด tailing แบบเดียวกับการทำ LSC แต่ถ้า silanol group ที่เหลือถูกไฮโดรไลซีส และทำปฏิกิริยากับ trimethylchlorosilane (small silylating) จะเกิด trimethyl silyl ether ที่เรียกว่า end-capped คอลัมน์ชนิดเดียวกันแต่มี % coverage หรือ carbon load ต่างกัน จะมีผลของการหน่วงเหนี่ยวตัวอย่างไม่เหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และรูปที่ 2.18



structure of an ODS (C_{18}) surface



แสดง surface coverage

ความสามารถในการหน่วงเหนี่ยว และการแยกของคอลัมน์ bonded phase ขึ้นอยู่กับ

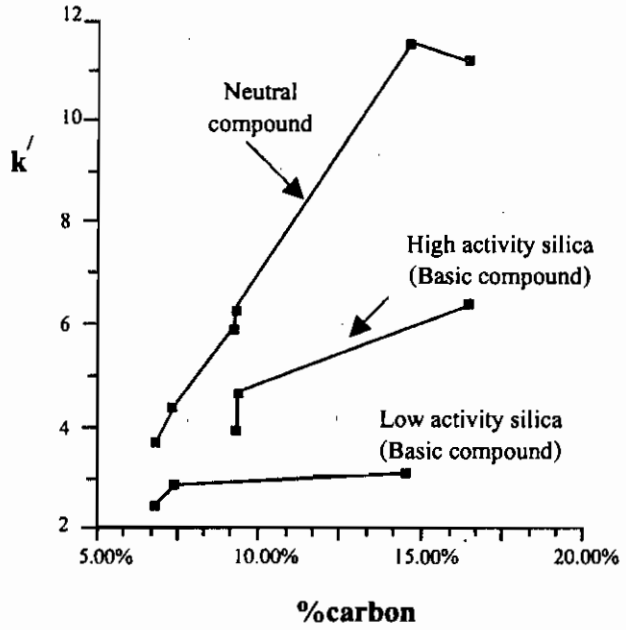
1. หมู่ฟังก์ชันนอลที่เลือกทำ bonded phase
2. ชนิดของ silica ที่ใช้ทำเป็นฐาน และการทำ pre-treatment
3. ปริมาณสารที่เกิดพันธะ (carbon load) ปริมาณคาร์บอนที่ใส่ลงในเฟสอยู่กับที่ วัดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักของซิลิกา ปริมาณคาร์บอนที่ใส่เข้าไปยิ่งมีปริมาณมาก ยิ่งเพิ่มการหน่วงเหนี่ยว
4. ปริมาณการเกิดพันธะ end capped ที่เรียกว่า พันธะทุติยภูมิ

ตารางที่ 2.1 สรุปการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง NP-BPC และ RP-BPC

	Normal phase	**Reverse phase**
Compound	Polar substituents	Non-polar substituents
Stationary phase polarity	High (alkyl-amines , alkyl-nitriles)	Low (alkyl-silanes)
Solvent polarity	Low to medium	Medium to high
Solvent strength	Non polar ⟶ polar	polar ⟶ Non polar
Sample elution order	Least polar first	Most polar first
Effect of increasing Solvent polarity	Reduces elution time	Increase elution time
Cautions :	Ketone & aldehydes not good for alkylamine	Use between pH 2-8

ตารางที่ 2.2 การถูกหน่วงเหนี่ยวของ Acetophenone โดยคอลัมน์ C_{18} ชนิดต่างๆ

Column	**Percentage carbon load**	**K'**
Dupont Zorbax ODS	20	15.7
Merck Lichrosorb RP-18	22	10.3
Beckman Ultrasphere ODS	12	11.3
Whatman Partisil ODS-3	10	12.0
Water Resolve C_{18}	10	12.4
Water μBondapak C_{18}	10	7.9
Water Nova-Pak C_{18}	7	5.5



รูปที่ 2.18 ความแปรปรวนของการหน่วงเหนี่ยวของตัวอย่างที่ใช้คอลัมน์ C_{18} ซึ่งมี % คาร์บอนต่างๆ กัน

เนื่องจากคอลัมน์ที่ใช้งานใน HPLC มีหลายชนิดและหลายบริษัท เมื่อต้องการเลือกคอลัมน์มาใช้งานต้องศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของคอลัมน์ชนิดนั้นๆ ก่อน

<u>ตัวอย่างการกำหนดคุณลักษณะของคอลัมน์</u> เช่น

คอลัมน์ ultra C_{18} ของ Restek

Physical Characteristics :

Particle size	*: 5 μm , spherical*	*fully end-cap*
Pore size	*: 100 °A*	*carbon load 20%*
pH range	*: 2.5 to 7.5*	*temperature limit 80 °C*

Chromatographic Properties :

A very retentive , high-purity reverse phase packing that exhibits excellent peak shape for a wide range of compound

Application :

Carbonyls , fatty acids , glycerides , anilines , fat soluble vitamins , phthalates , barbiturates , steroids , amino acids and acid

4.4.4 Ion pair chromatography การวิเคราะห์สารที่เป็นไอออน ตามปกติไม่สามารถใช้ reverse phase column ได้ แต่โดยการทำให้สารตัวอย่างที่เป็นไอออนนั้นเกิดเป็น neutral species จะทำให้สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ reverse phase column เทคนิคนี้เรียกว่า Ion pair chromatography (IPC) หรือ Paired-ion chromatography (PIC) หรือ Ion interaction chromatography

หลักการ : ทำให้สารตัวอย่างที่เป็นไอออนเกิดเป็น neutral species โดยการเกิด ion-pair กับเคาน์เตอร์ไอออน (counter ion) ที่มีอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

วิธีการนี้เหมาะกับการแยกสารตัวอย่างที่เป็น กรด-เบส ทั้ง strong และ weak รวมทั้ง amino acid ด้วย โดยการทำให้กรดและเบสที่ต้องการแยกแตกตัวได้น้อยลง หรือไม่แตกตัวเลยโดยการปรับ pH ทำให้สารตัวอย่างอยู่เป็นโมเลกุล ไม่แตกตัวเป็นไอออนแล้วแยกโดยใช้คอลัมน์ RP-BPC เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็นพวก methanol หรือ acetonitrile + buffer solution ก็สามารถชะกรดหรือเบสนั้นออกจากคอลัมน์ได้ ถ้าเพิ่ม ion-pair ลงใน mobile phase ให้มากขึ้น retention time ของตัวถูกละลายหรือตัวอย่างจะมากขึ้น

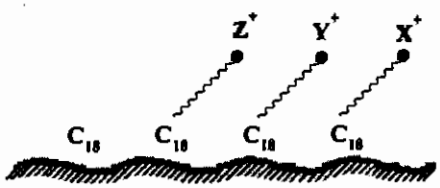
ปัจจุบันนิยมใช้มากกว่า ion exchange เพราะได้ประสิทธิภาพดีกว่า

เทคนิคของ ion-pair ยังใช้แยกไอออนชนิดอื่นได้ โดยอาศัยหลักการเดียวกับ solvent extraction คือ ionized compound (A^+_{aq}) ที่ละลายได้ดีในน้ำ สามารถทำให้มาอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ได้โดยใช้เคาน์เตอร์ไอออน (B^-_{aq}) ที่เหมาะสมแล้วเกิดเป็น ion-pair

$$A^+_{(aq)} + B^-_{(aq)} \rightleftharpoons (A^+B^-)_{org}$$

ion-pair A^+B^- มีคุณสมบัติเป็น non ionic compound เมื่อผ่านในคอลัมน์ reverse phase C_{18} จะสามารถแยกได้ ถ้าต้องการให้ถูกชะออกจากคอลัมน์ ให้ทำลายเคาน์เตอร์ไอออน B^-

ตัวอย่าง ion-pair reagent สำหรับแคตไอออน ได้แก่ alkyl sulphonic acids สำหรับแอนไอออน ได้แก่ tetrabutyl ammonium หรือ dibutylamine ammonium salt



~~~● คือ RSO_3^-

alkyl sulphonic acid

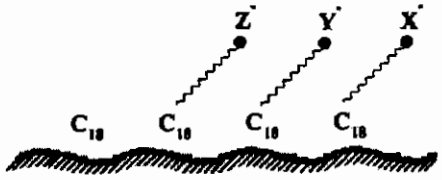
ทำหน้าที่เป็นเคาน์เตอร์ไอออน

Stationary phase ชนิด RP.BP.

ใช้กับตัวอย่างที่เป็นเบส เช่น

$R\text{-}NH_3^+ + R\text{-}SO_3 \rightleftharpoons [R\text{-}NH_3^+ \, ^-SO_3\text{-}R]$

Sample Ion-pair reagent neutral molecule



~~~● คือ $N(C_4H_9)_4^+$

alkyl sulphonic acid

ทำหน้าที่เป็นเคาน์เตอร์ไอออน

Stationary phase ชนิด RP.BP.

ใช้กับตัวอย่างที่เป็นกรด เช่น

$R\text{-}COO^- + N(C_4H_9)_4^+ \rightleftharpoons [R\text{-}COO^{-+}N(C_4H_9)_4]$

Sample Ion-pair reagent neutral molecule

Retention time ของตัวถูกละลายควบคุมได้โดย

1) Vary ความยาวของ Ion-pairing agent

   t_R เพิ่มเมื่อความยาวของ Ion-pairing agent เพิ่ม

2) Vary ความเข้มข้นของ Ion-pairing agent

   t_R เพิ่มเมื่อความเข้มข้นของ Ion-pairing agent เพิ่ม

3) เปลี่ยนแปลง pH

4) เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่

ตารางที่ 2.3 การใช้ระบบของ reverse – phase Ion - pair chromatography

Sample	Mobile phase	Ion – pair reagent หรือ counter ion
Amine	0.1 M $HClO_4/H_2O$/acetonitrile	ClO_4^-
	$H_2O/CH_3OH/H_2SO_4$	$C_{12}H_{25}SO_3^-$
Carboxylic acids	pH 7.4	$(C_4H_9)_4N^+$
	pH 7.4	$(C_4H_9)_4N^+$
Sulfonic acids	H_2O/C_3H_7OH	$(C_{16}H_{33})(CH_3)_3N^+$
	pH 7.4	$(C_4H_9)_4N^+$
	pH 3.8	Bis-(2-ethylhexylphosphate)
Dyes	pH 2-4 ; H_2O/CH_3OH	$(C_4H_9)_4N^+$

เทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์สารผสมที่เป็น ionic และ nonionic ผสมกัน มีชื่อเรียกได้หลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงชื่อที่ใช้เรียกวิธีการทำโครมาโทกราฟีโดยให้ไอออนที่ต้องการวิเคราะห์เกิดอันตรกิริยากับไอออนของรีเอเจนต์ที่เติมลงในเฟสเคลื่อนที่

Chromatographic process	Reagent ion
Ion-pair chromatography	Pairing ion
Paired-ion chromatography	PIC reagent
Surfactant chromatography	Surfactance ion
Dynamic ion-exchange chromatography	Ion-pair reagent
Ion-interaction chromatography	Ion-interaction reagent
Hetaeric chromatography	Hetaer ion
Mobile phase ion chromatography	Pairing reagent

4.4.5 Affinity chromatography คอลัมน์ที่ทำให้เกิดเทคนิคของการวิเคราะห์ที่เรียกว่า affinity chromatography เป็นคอลัมน์ที่ใช้ลิแกนด์สัมพรรคภาพ (affinity ligand) ซึ่งเป็นสารทางชีวภาพ ได้แก่ immobilized enzyme หรือ antigen เกิดพันธะกับของแข็งซับพอต (solid support) สารตัวอย่างที่เป็นโมเลกุลของสารทางชีวภาพ เช่น enzyme inhibitor หรือ antibody ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับลิแกนด์สัมพรรคภาพ จะถูกล็อกไว้ในคอลัมน์ ส่วนองค์ประกอบอื่น ๆ ในสารตัวอย่าง จะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยไม่ถูกหน่วงเหนี่ยว โมเลกุลของตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้โดยการปรับเปลี่ยน pH และ ionic strength ของเฟสเคลื่อนที่ที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์และเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้

วิธีการของ affinity chromatography มีความจำเพาะเจาะจงสูง การแยกที่ดีโดยเทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างที่สม่ำเสมอของของแข็งซับพอต หรือตัวรองรับ (support)

ของแข็งซับพอต ได้แก่ agarose , cellulose , dextrin , silica , polyacrylamide

ความสำเร็จของการใช้เทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกปฏิกิริยาเคมีที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อระหว่างลิแกนด์สัมพรรคภาพกับตัวซับพอต ประโยชน์ที่ได้รับจากวิธีการนี้ นอกจากจะแยกสารทางชีวภาพแล้วยังเป็นวิธีการเพิ่มความเข้มข้นด้วย นอกจากนี้ยังใช้เป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์จากสารที่สกัดได้

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างสารที่นำมาทำการแยกโดยเทคนิค Affinity chromatography

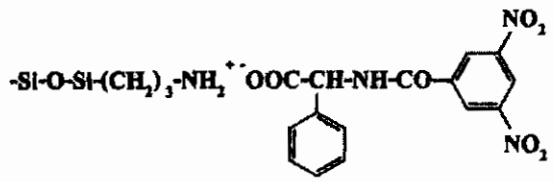
Immobilised ligand	**โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์**
Di และ trivalent metal ions	โปรตีนที่มี His , Trp และ Cys residues
Lectins	Glycoproteins , cells
Carbohydrates	Lectins
Reactive dyes	โปรตีนส่วนใหญ่รวมทั้ง nucleotide-binding proteins
Nucleic acids	Exo- และ endonucleases , polymerases
Amino acids	Proteases
Nucleotides , cofactors , substrates และ inhibitor	Enzymes
Protein A , Protein G	immonoglobulins
Hormones , drugs	Receptor antigens
Antibodies	antigens
antigens	Antibodies

4.4.6 Chiral chromatography เป็นเทคนิคการทำโครมาโทกราฟีที่สามารถแยกสารประกอบประเภท enantiomer หรือเป็นสารที่มี optically active โดยอาศัยหลัก stereoselectivity ใช้มากในการทำยาให้บริสุทธิ์ เนื่องจากว่ามีเพียงหนึ่งเดียวใน enantiomers เท่านั้นที่แสดงผลทางด้านเภสัชวิทยา ส่วนอีกองค์ประกอบหนึ่งไม่มีผล หรืออาจมีผลข้างเคียง

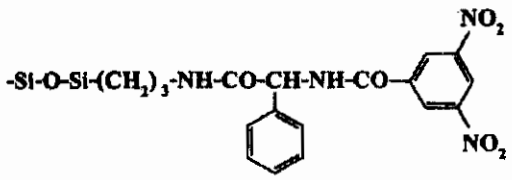
Chiral stationary phase (CSPs) จะมีราคาแพงกว่า Column HPLC ทั่วๆ ไป 3-5 เท่า

ตัวอย่าง CSPs ได้แก่

a) " Pirkle" CSPs พัฒนาขึ้นโดย W.H.Pirkle University of illinois คือสารที่เป็น derivatives ของ phenyl-glycine หรือ leucine ที่ bonded กับ 5 μm Silica มีทั้งที่อยู่ในรูป ionic และ covalent ดังนี้

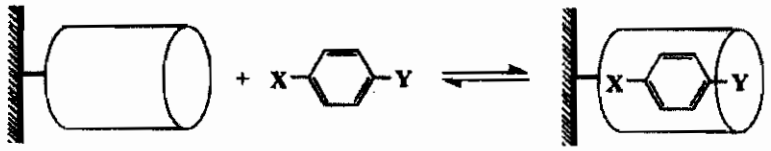


ionic

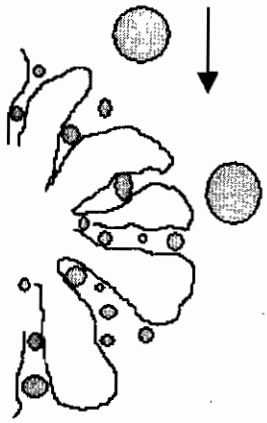


covalent

b) Cyclodextrin bonded phases Cyclodextrins คือ cyclic chiral carbohydrates ที่ประกอบด้วย 6-12 หน่วยของ glucose โดย bonded กับ 5 μm Silica



4.4.7 Size exclusion chromatography Size exclusion chromatography (SCE) เป็นวิธีการของโครมาโทกราฟี โดยใช้ stationary phase เป็นเจลที่มีรูพรุนขนาดต่างๆ โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของเจลจะผ่านออกจากคอลัมน์พร้อมๆ กับเฟสเคลื่อนที่ ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กที่ลอดผ่านเข้าไปในรูพรุนของเจลจะออกจากคอลัมน์ที่หลัง ทำให้เกิดการแยกได้ การแยกจึงขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจล ว่าจะยอมให้โมเลกุลขนาดใดรอดผ่านเข้าไปในเจลได้ ซึ่งเรียกว่า exclusion limit



โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า exclusion limit จะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเจล และออกจากคอลัมน์ทีหลัง ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าก็จะออกจากคอลัมน์ก่อน

เจลที่ใช้มี 3 ชนิด คือ

Solf gel คือ เจลที่สามารถบวม (swell) ให้มีขนาดใหญ่ได้หลายเท่าตัว เมื่ออยู่ในตัวทำละลาย ตัวอย่างเช่น polydextran หรือ agarose ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Sephadex มีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.6 ถ้าเป็นพวก polyaerylamide จะมีชื่อทางการค้าว่า Bio-gel P.

Semi rigid gel เป็นเจลที่ค่อนข้างแข็ง บวมโดยมีขนาดใหญ่กว่าเดิมเพียง 1.1-1.8 เท่า เช่น polyvinyl acetate หรือ polystyrene มีชื่อทางการค้าว่า Bio-Beads

Rigid gel จะมีขนาดรูคงที่ ไม่บวมเมื่อถูกตัวทำละลาย เช่นแก้วที่มีรูพรุน หรือเม็ด silica ที่มีรูพรุน

ตารางที่ 2.6 ชนิดของ Sephadex Gels

Sephadex type	Water regain g H_2O/g dry Sephadex	Bed volume cm^3/g dry Sephadex	Fractionation range for piptides 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 1,500
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

ตารางที่ 2.7 แสดงคุณสมบัติของ packings material บางชนิดสำหรับ Size – Exclusion Chromatography

Type	Particle size μm	Average pore size , A°	Molecular Weight* Exclusion Limit
Polystyrene-	10	10^2	700
divinylbenzene		10^3	(0.1 to 20) x 10^4
		10^4	(1 to 20) x 10^4
		10^5	(1 to 20) x 10^5
		10^6	(5 to 10) x 10^6
silica	10	125	(0.2 to 5) x 10^4
		300	(0.03 to 1) x 10^5
		500	(0.05 to 5) x 10^5
		1000	(5 to 20) x 10^5

*A molecular weight above which no retention occurs

ในหลักการของโครมาโทกราฟีทั่วๆ ไป ความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ต่างๆ มีดังนี้

$$t_R = t_m (1 + k') \qquad \text{หรือ}$$

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

$$V_R = t_m (1 + k') F \qquad \text{เพราะว่า } V_R = t_R F$$

$$= V_m (1 + k')$$

$$= V_m \left(1 + k_d \frac{V_s}{V_m}\right)$$

$$V_R = V_m + K_d V_s$$

สำหรับใน SEC ให้ $V_m = V_0$ void volume (volume of mobile phase outside the porous beads)

$V_S = V_i$ Pore volume (volume of mobile phase inside the porous beads)

นั่นคือใน SEC $V_R = V_O + K_d V_i$

การหาค่า V_O และ V_i ใน SEC ทำได้โดย

1) เลือกตัวถูกละลายที่มีขนาดใหญ่กว่า Exclusion limit

∴ ตัวถูกละลายจะออกมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่

$$K_d = \frac{[A]_S}{[A]_m} = 0$$

นั่นคือ $V_R = V_O$

2) เลือกตัวถูกละลายที่มีขนาดเล็กมากๆ ที่สามารถรอดผ่านรูพรุนเจลได้

$$\therefore \quad [A]_S = [A]_m$$

$$K_d = \frac{[A]_S}{[A]_m} = 1$$

$$V_R = V_O + K_d V_i$$

$$= V_O + V_i$$

เมื่อทราบ V_O จากข้อ 1) ก็สามารถหา V_i ได้

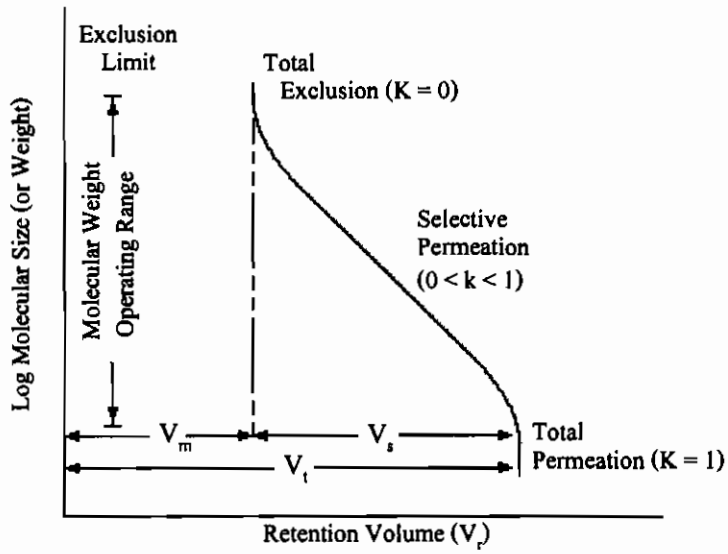
แสดงว่าในกระบวนการ SEC การแยกของตัวถูกละลายจะเกิดขึ้นกับตัวถูกละลายที่มีค่า K_d ระหว่าง 0 – 1 ถ้า $K_d > 1$ กลไกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์จะเปลี่ยนไปไม่ใช่ระบบของ SEC

การเลือกเฟสอยู่กับที่ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของตัวถูกละลายขนาดรูพรุนของเจลจะต้องมีหลายขนาดให้ครอบคลุมขนาดของ solute ตั้งแต่เล็กสุด ⟶ ใหญ่สุด ถ้าตัวถูกละลายมีหลายชนิดปนกัน (มีหลายขนาดปนกัน) คือมีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กัน แต่เจลมีรูพรุนเพียงขนาดเดียว พบว่าจะไม่สามารถแยกตัวถูกละลายแต่ละชนิดออกจากกันได้

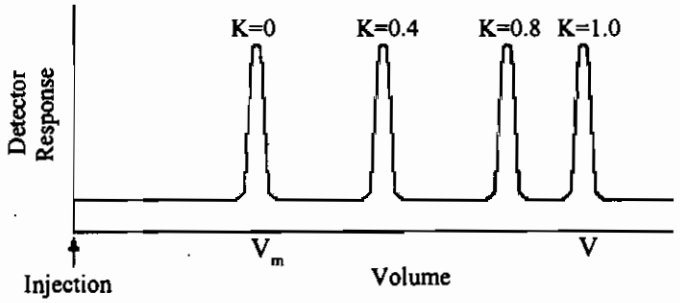
เมื่อพิจารณา Calibration curve ที่ได้จากการพลอตกราฟของ log (M.W.) กับ V_R จะได้กราฟดังรูปที่ 2.19

ถ้าเฟสอยู่กับที่มีขนาดรูพรุนเฉลี่ยต่างๆ กัน ก็จะมีลักษณะเคอร์ฟที่แตกต่างกันเป็นเฉพาะตัวของเฟสอยู่กับที่ชนิดนั้นๆ ลักษณะความชันจะเป็นตัวควบคุมการกระจายของขนาดรูพรุนในอนุภาคที่ใช้บรรจุคอลัมน์ ถ้าขนาดของรูพรุนมีช่วงกระจายกว้าง slope จะชัน คอลัมน์สามารถใช้กับการแยกสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันมากได้ แต่ใช้แยกสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันได้ไม่ดี

ถ้าขนาดของรูพรุนมีช่วงการกระจายของรูพรุนแคบลง slope จะราบกว่า จะใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 2.20



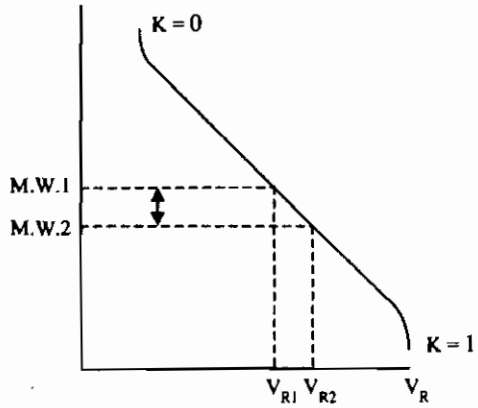
Size – Exclusion Chromatogram



รูปที่ 2.19 แสดงลักษณะของ calibration curve และโครมาโทแกรมของ size exclusion chromatography

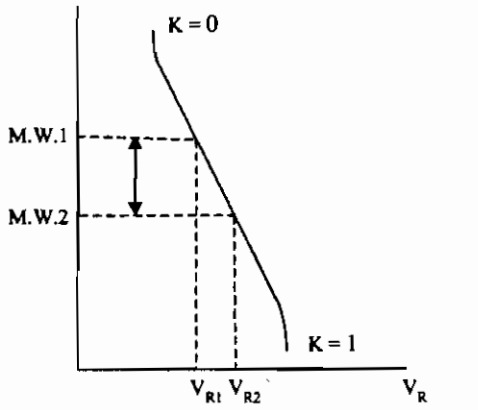
ลักษณะ slope เป็นตัวควบคุมการกระจายของรูพรุน

กราฟ a



ถ้า Slope มีความชันน้อย จะใช้แยกสารที่มี M.W. ใกล้เคียงกันได้ดี M.W. ใกล้เคียงกัน V_R ต่างกันมาก แต่ใช้ได้กับสารที่มี M.W. แตกต่างกันได้ไม่มากชนิด

กราฟ b



ถ้า Slope มีความชันมาก จะใช้แยกสารที่มี M.W. ต่างๆ กันได้หลายชนิด แต่จะแยกสารที่มี M.W. ใกล้ๆ กันได้ไม่ดี

V_{R1} - V_{R2} ทั้งสองรูปเท่ากัน ในขณะที่ $M.W._1 - M.W._2$ ทั้งสองรูปต่างกัน ทั้งนี้เพราะความชันต่างกัน

รูปที่ 2.20 การกระจายของรูพรุนทำให้เคอร์ฟมีความชันแตกต่างกัน
รูป a มีการกระจายขนาดของรูพรุนแคบกว่ารูป b

ประโยชน์ของ SEC

1. ใช้แยกสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่นพวกสารพอลิเมอร์ สารประกอบชีวภาพ
2. ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง
3. ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ เช่น ความแข็ง ความทนแรงดึง และความเสถียร เพราะพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีหลายขนาดปนกัน โดยมีการกระจายขนาดของโมเลกุลอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น โครมาโทแกรมที่ได้สำหรับพอลิเมอร์สังเคราะห์ จึงมีลักษณะเป็นพีก ซึ่งจากโครมาโทแกรมที่ได้นี้จะมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางกายภาพ

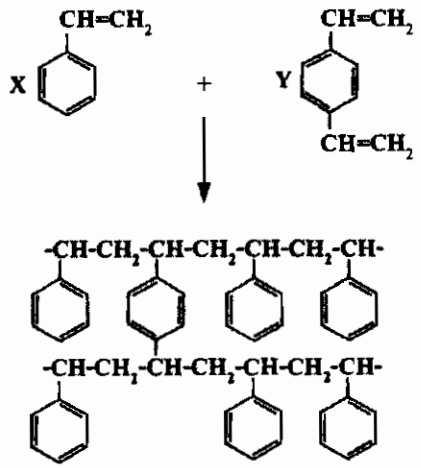
4.4.8 Ion-exchange chromatography เป็นวิธีการของโครมาโทกราฟีที่เฟสอยู่กับที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนกับไอออนของสารตัวอย่าง ถ้าสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เป็นแคตไอออนเฟสอยู่กับที่ต้องเป็น cation exchanger ถ้าสารตัวอย่างเป็นแอนไอออนเฟสอยู่กับที่ต้องเป็น anion exchanger หมู่ฟังก์ชันนอล ที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออน แบ่งได้เป็น 2 ระดับ ขึ้นอยู่กับองศาของการแตกตัวของกรดและเบส ที่เป็นหมู่ฟังก์ชันนอล

	Cation exchanger	**Anion exchanger**
strong	Sulphonic acid $-SO_3H$	Quaternary amine $-NR_3$
weak	Carboxylic acid -COOH Phenolic -OH	Tertiary amine $-HNR_2$ และ Secondary amine $-H_2NR$ (R แทนด้วยกลุ่มของสารอินทรีย์)

ตัวแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchanger) ที่ใช้ในโครมาโทกราฟีของเหลวแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

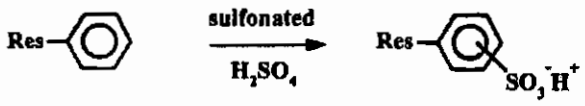
1) **Organic resin** เตรียมได้จากการ polymerize สารอินทรีย์ ต่อไปนี้
   - Styrene + divinyl benzene
   - Polymethylcrylate

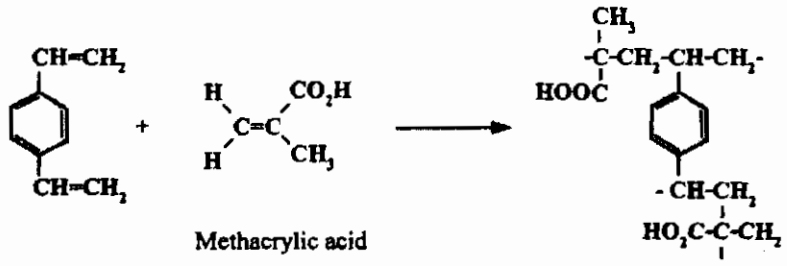
- Methacrylic + divinylbenzene
- Acrylic + divinylbenzene



จากนั้น Introduce functional group ที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนไอออนเข้าไปที่ benzene ring กรณีของ cation exchange resin

- Weak R-COOH
- Strong $R\text{-}SO_3H$



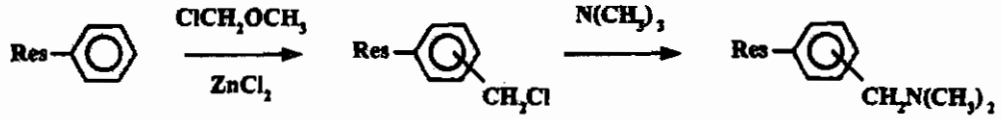


Methacrylic acid

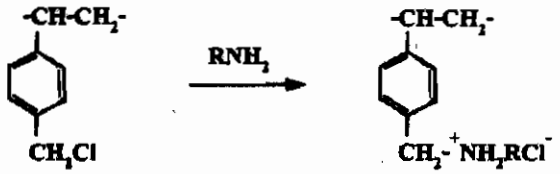
กรณีของ Anion exchange resin

- Weak $R\text{-}CH_2\text{-}NH_3^+OH^-$
- Strong $R\text{-}CH_2\text{-}N(CH_3)_3^+OH^-$

$R\text{-}CH_2\text{-}NH(CH_3)_2^+OH^-$

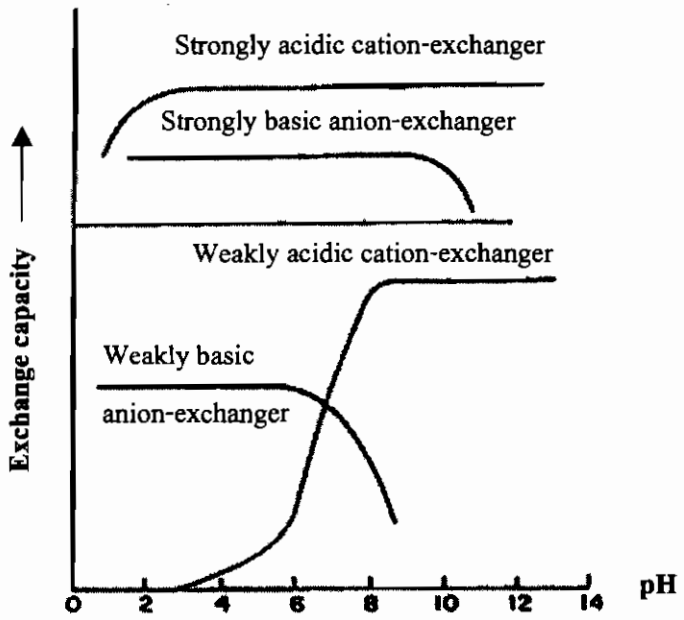


Friedel – Craft reaction



การแลกเปลี่ยนไอออนขึ้นอยู่กับ pH

pH มีผลต่อการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชันนอลที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออนกับตัวอย่าง ซึ่งผลของ pH จะมีต่อ weak cation exchanger และ weak anion exchanger มากกว่า strong cation exchanger และ strong anion exchanger ดังแสดงในรูปที่ 2.21

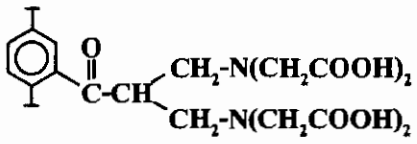


รูปที่ 2.21 ผลของ pH ที่มีต่อการแลกเปลี่ยนไอออน

2) **Silica based resin** เป็น porous silica beads ขนาด (25-37 μm) เคลือบด้วย polymer resin มีลักษณะเป็น pellicular เรซินส่วนใหญ่เป็นพวก methacrylate polymer (M.W. ≅ 500) มี $-N(CH_3)_3^+$ เป็นfunctional group

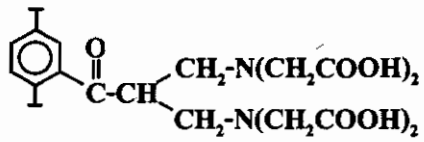
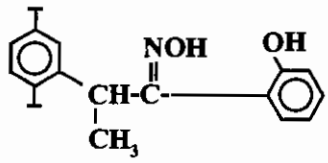
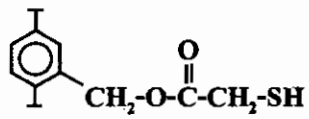
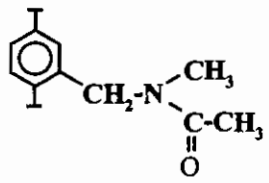
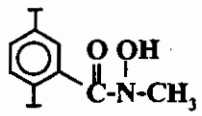
Ion exchange capacity	~	0.12 meq/g
pH ที่ใช้	~	4 - 9

3) **Chelating resin** เป็นเรซินที่ถูกดัดแปลงให้มีหมู่ฟังก์ชันนอลเป็น chelate ที่สามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนของตัวอย่างได้เรซินชนิด macroporous เช่น



ไอออนที่สามารถเข้าไปเกิดสารเชิงซ้อนกับหมู่ฟังก์ชันนอลที่ modify เข้าไปในเรซินได้แก่ Cu^{2+}, U^{6+}, Th^{4+}, Zn^{4+} ที่ pH 2.0

ตัวอย่าง chelating resins บางชนิด ที่เตรียมโดย Rohm and Haas XAD-4

Resin structure	Ions retained
	Cu^{2+} , U^{6+} , Th^{4+} , Zr^{4+} at pH 2.0
	Cu^{2+} pH 3.5 Mo^{6+} pH 0-3
	Au^{3+} , Ag^{+} , Hg^{2+} , Bi^{3+}
	Au^{3+} , Platinum group metal ions
	Ti^{4+} , Zr^{4+} , Mo^{6+} , Fe^{3+} , Th^{4+} etc.

สำหรับ ion-exchanger ที่นำมาใช้ใน HPLC มี 3 ชนิด คือ

1. Micro particulate resin based on styrene-divinyl benzene co-polymer
2. Porous layer bead , consisting of solid core of glass or polymer with a thin surface layer of ion-exchange material , or a silica bead with ion-exchange group boned to the surface
3. Bond phase based on microparticulate silica

Ion exchange equilibria

สมดุลที่เกิดขึ้นในการแลกเปลี่ยนไอออน มีดังนี้

$$A_s + B_r \longleftrightarrow A_r + B_s \qquad \text{——— 2.1}$$

$$b\,A_s + a\,B_r \longleftrightarrow b\,A_r + a\,B_s \qquad \text{——— 2.2}$$

จาก 2.1 $$K^{A}_{B} = \frac{(A_r)[B_s]}{[A_s](B_r)} \qquad \text{——— 2.3}$$

; ( ) แทนความเข้มข้นของตัวอย่างที่เรซิน

[ ] แทนความเข้มข้นของตัวอย่างในสารละลาย

จาก 2.2 $$K^{A}_{B} = \frac{(A_r)^b[B_s]^a}{[A_s]^b(B_r)^a} \qquad \text{——— 2.4}$$

$$\text{Weight Distribution Coefficient } (D_g) = \frac{(A_r)}{[A_s]} = \frac{\text{m mole } A_r/\text{g resin}}{\text{m mole } A_s/\text{ml solution}} \qquad \text{——— 2.5}$$

$$= \frac{(\text{m moles of } A_r)\,(\text{ml solution})}{(\text{m moles of } A_s)\,(\text{g resin})} \qquad \text{——— 2.6}$$

$$\text{Volume Distribution Coefficient } (D_v) = D_g\,\rho \qquad \text{——— 2.7}$$

เมื่อ ρ = resin bed density $$= \frac{\text{grams of dry resin}}{\text{ml resin bed volume}} \qquad \text{——— 2.8}$$

ในโครมาโทกราฟีทั่วไปที่กล่าวไว้คือ $$k' = K_d\frac{V_s}{V_m} = \frac{C_sV_s}{C_mV_m} = \frac{(\text{m moles of } A_r)}{(\text{m moles of } A_s)}$$

นั่นคือจาก 2.6 จะได้ $$D_g = \frac{k'\ \text{ml solution}}{\text{g resin}} \qquad \text{——— 2.9}$$

$$k' = \frac{D_g\ (\text{g resin})}{(\text{ml solution})} \qquad \text{——— 2.10}$$

ในรูปแบบของการทำ ion-exchange chromatography สำหรับการวิเคราะห์แคตไอออน และแอนไอออนของสารอนินทรีย์ และ กรด-เบส ของสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและละลายน้ำได้ โดยใช้ร่วมกับตัวตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้า จะมีชื่อเรียกเทคนิคนี้เฉพาะว่า Ion chromatography (IC) แทนการเรียก HPLC ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดไว้ในบทที่ 4

4.5 Mobile phase selection

การปรับความเหมาะสมในการแยกด้วยวิธี HPLC สามารถทำได้โดยการเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

การปรับเปลี่ยนความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength) จะมีผลต่อการปรับเปลี่ยนค่า k'

การเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายจะทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงในการแยก (α)

การปรับอัตราการไหลของตัวทำละลายมีผลต่อเวลาในการหน่วงเหนี่ยวของตัวถูกละลายในคอลัมน์

นั่นคือ ชนิด ส่วนผสม และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะมีผลต่อค่า α และ k' k' เปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากการเกิด solvent-solute interaction ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและธรรมชาติของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย

Interaction ที่เกิดขึ้นมี 4 ชนิด คือ

- Dispersion Interaction
- Dipole Interaction
- Dielectric Interaction
- Molecular complex formation

เมื่อ k' เปลี่ยนไปจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแยก

solvent strength (ε^0) หรือ polarity index (P') จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า k'

polarity index (P') คือพารามิเตอร์ที่คิดจากค่าการละลายของตัวทำละลายแต่ละตัวในตัวทำละลายของ

dioxane (d) low dipole proton acceptor

nitro methane (n) high dipole proton aeceptor

ethyl alcohol (e) high dipole proton donor

โดยการวัดเป็นค่า partition coefficient (K'_g) ของแต่ละตัวทำละลาย

$$P' = \log (K'_g)_e + \log (K'_g)_d + \log (K'_g)_n \qquad \text{——— 2.11}$$

ค่า P' ของตัวทำละลายแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2.8

ถ้ามีการใช้ตัวทำละลายผสม ค่า polarity P' สามารถคำนวณได้จาก

$$P'_{AB} = \phi_A P'_A + \phi_B P'_B \qquad \text{——— 2.12}$$

P'_A , P'_B = polarity indexes ของตัวทำละลาย A , B

ϕ_A , ϕ_B = volume fraction ของตัวทำละลาย A , B

ในการทำ LC เมื่อต้องการเปลี่ยนแปลงค่า k' สามารถทำได้โดย การเปลี่ยน polarity index ของเฟสเคลื่อนที่โดยปกติการเปลี่ยน P' ไป 2 unit จะทำให้ค่า k' ต่างจากเดิมไป 10 เท่า

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2} \quad \text{สำหรับ reverse phase หรือ} \qquad \text{——— 2.13}$$

$$= 10^{(P'_1 - P'_2)/2} \quad \text{สำหรับ normal phase}$$

สมการนี้เป็นสมการเพียงประมาณ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคำนวณหาส่วนผสมของตัวทำละลายเพื่อให้ได้ค่า k' ที่เหมาะสม

ตารางที่ 2.8 Solvent strength parameter , polarity indices และ physical properties ของตัวทำละลายบางชนิด

Solvent	Viscosity at 25 °C (cP)	Solubility parameter , δ	Solvent strength , ϵ^{ϕ}	Polarity index , P'
n-Hexane	0.30	14.9	0.01	0.1
Methylbenzene	0.55	18.2	0.29	2.3
Dichloroethane	0.43	19.8	0.32	3.4
1,2-Dichloroethane		20.0		3.7
Trichloromethane	0.57	19.0	0.26	4.4
Carbontetrachloride	0.90	8.60	0.18	1.6
Tetrahydrofuran	0.46	18.6	0.57	4.0
Ethanol	1.08	25.9	0.88	4.3
Methanol	1.326	29.4	0.95	6.6
Water	1.333	47.8	Large	10.0
1,4-Dioxane	1.2	20.4	0.56	4.8
Acetonitrile	0.34	23.9	0.65	6.2

ตัวอย่าง ในการใช้คอลัมน์ C18 (reverse – phase column) พบว่าสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์และตัวอย่างมีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 0.48 นาที และ 31.3 นาที ตามลำดับ เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น 30% MeOH : 70% H_2O จงคำนวณหา (a) ค่า k' และ (b) ส่วนผสมของ MeOH : H_2O เมื่อต้องการให้ k' มีค่าประมาณ 5

(a) $$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m} = \frac{31.3 - 0.48}{0.48} = 64$$

(b) จากสมการ 2.12 $P'_{ผสม} = \phi_{MeOH} P'_{MeOH} + \phi_{H2O} P'_{H2O}$

จากตารางที่ 2.8 $P'_{MeOH} = 5.1$, $P'_{H2O} = 10.2$

$P'_{ผสม} = 0.30 \times 5.1 + 0.70 \times 10.2$

$= 8.7$

จากสมการ 2.13 $\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{\left(P'_2 - P'_1\right)/2}$

$\frac{5}{64} = 10^{(P'_2 - 8.7)/2}$ take log

$-1.11 = \left(P'_2 - 8.7\right)/2 = 0.5P'_2 - 4.35$

$P'_2 = 6.5$

ให้ X คือ volume fraction ของเมทานอลในตัวทำละลายผสมตัวใหม่

$\therefore \quad 6.5 = 5.1X + (1 - X)\,10.2$

$X = 0.73 = 73\,\%$

นั่นคือ ถ้าต้องการให้เฟสเคลื่อนที่ตัวใหม่มีค่า $k' = 5$ จะต้องใช้ส่วนผสมของเมทานอล = 73% น้ำ 27%

กรณีที่ใช้ตัวทำละลายที่มี polarity index ที่เหมาะสมแล้ว แต่ยังปรากฏว่าการแยกยังไม่ดี พีก 2 พีกยังซ้อนทับกัน การทำให้การแยกดีขึ้นจึงจำเป็นต้องทำโดยการเพิ่มค่า α ของคัวถูกละลายทั้งสอง ซึ่งทำได้โดยการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายหรือส่วนผสมของตัวทำละลายที่ยังคงรักษาให้ค่า k' เท่าเดิม

Snyder [Snyder L.R. (1974) J.Chromatogr.,92 : 223] ได้พัฒนาวิธีการเลือกตัวทำละลายเพื่อทำให้การแยกดีขึ้นใน reverse phase LC โดยจัดแบ่งตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่เป็น 8 class โดยตัวทำละลายที่อยู่ใน class เดียวกันจะมีค่า α (selectivity) ใกล้เคียงกัน

Class of Mobile phase

I. Aliphatic ethers hexamethylphosphoric acid amide and alkyl amines

II. Aliphatic alcohol , methanol

III. Tetrahydrofuran , Pyridine derivatives , dimethylsulfoxide , amides (except formamide)

IV. Formamide , acetic acid benzyl alcohol , glycols

V. Methylene chloride , 1-2 dichloromethane

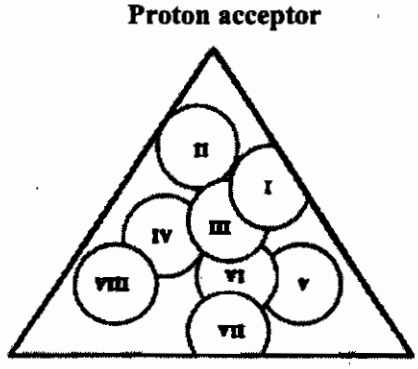
VI. Halogenated alkanes , esters , ketones , dioxanes , nitriles , aniline

VII. Benzene and benzene derivatives , aliphatic nitrocompound

VIII. Chloroform , m-cresol , water , fluoroalkanol

ตัวทำละลายแต่ละกลุ่มสามารถจัดอยู่ในกรอบสามเหลี่ยม (solvent classification triangle) ที่ด้านของสามเหลี่ยมแทนคุณสมบัติของตัวทำละลาย ในการเป็น proton donor , proton acceptor และ dipole characteristic ดังแสดงในรูปที่ 2.22 จะเห็นได้ว่าตัวทำละลายกลุ่มที่ VIII เป็น proton donor ที่ดี และชอบทำปฏิกิริยากับ basic solute เช่น amine หรือ sulfoxide

ในทางกลับกัน ตัวทำละลายกลุ่มที่ I เป็น proton acceptor ที่ชอบทำปฏิกิริยากับ hydroxylate solutes เช่น phenol ส่วนตัวทำละลายกลุ่มที่ V จะทำปฏิกิริยาอย่างแรงกับตัวทำละลายที่มีค่า dipole moment สูง เช่น nitriles หรือ amine



รูปที่ 2.22 การจำแนกชนิดของตัวทำละลาย 8 กลุ่มตามคุณสมบัติความจำเพาะเจาะจง และสภาพขั้วในรูปสามเหลี่ยม

เมื่อต้องการพัฒนาการแยกในระบบ reverse phase ขั้นแรกคือ เลือกตัวทำละลายผสมที่ให้ค่ารีเทนชันของตัวอย่างในช่วง $2 < k' < 10$ จากนั้นให้เลือกตัวทำละลายที่ยังคงให้ค่ารีเทนชันไทม์ในช่วงนี้ แต่มีค่า α ต่างกัน หรือต่างกลุ่ม (different selectivity group)

ตารางที่ 2.9 และ 2.10 คือตารางของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกับการทำโครมาโทกราฟีแต่ละชนิด

ตารางที่ 2.9 ตัวอย่างเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ใน adsorption หรือ normal phase chromatography

ตัวทำละลาย	Solvent strength		ลักษณะเฉพาะ
	ซิลิกา	อะลูมินา	
n-hexane	0.01	0.01	ค่าไดโพลน้อย
n-heptane	0.01	0.01	ค่าไดโพลน้อย
Isooctane	0.01	0.01	ค่าไดโพลน้อย
1-chlorobutane	0.2	0.26	ค่าไดโพลมาก
Cholroform	0.26	0.40	ตัวให้โปรตอน
Methylene chloride	0.32	0.42	ค่าไดโพลมาก
Ethyl Acetate	0.38	0.58	ตัวให้โปรตอน
Tetrahydrofuran	0.44	0.57	ตัวรับโปรตอน
Propylamine	0.5	-	ตัวรับโปรตอน
Acetonitrile	0.5	0.65	ค่าไดโพลมาก
methanol	0.7	0.95	ตัวรับโปรตอน

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ใน Reverse phase Chromatography

ตัวทำละลาย	สภาพขั้วตัวทำละลาย (P')
Water	10.2
Dimethyl sulfoxide	7.2
Ethylene glycol	6.9
Acetonitrile	5.8
Methanol	5.1
Acetone	5.1
Dioxane	4.8
Ethanol	4.3
Tetrahydrofuran	4.0
α - Propanol	3.9

4.6 Optimization HPLC Separation

ปรับปรุงระบบของ HPLC ให้มีการแยกเหมาะสมทำได้โดย การปรับปรุงค่า α , k' และ N พารามิเตอร์ทั้งสามชนิดจะมีผลต่อการทำโครมาโทกราฟีอย่างมาก เช่น การเพิ่มค่าการหน่วงเหนี่ยว (k') จาก $k'=1$ ถึง $k'=10$ จะเพิ่มการแยกในระบบ Isocratic separation ได้มาก

การปรับความเหมาะสมของพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อการแยกที่ดีขึ้นใน HPLC มีดังนี้

4.6.1 การปรับความเหมาะสมของค่าปัจจัยความจุ (k') ทำได้ดังนี้

1. ปรับความแรงของตัวทำละลาย
2. ปรับชนิดและขนาดของเฟสอยู่กับที่

ค่าปัจจัยความจุของคอลัมน์หนึ่งๆ จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อมีการลดค่าความแรงของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่แรง หมายถึงตัวทำละลายที่พาตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ส่วนตัวทำละลายที่อ่อนจะพาตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ถ้าหากการหน่วงเหนี่ยวของคอลัมน์มีค่าสูงหรือต่ำเกินไปจนทำให้การปรับความแรงของตัวทำละลายไม่ได้ผล จำเป็นต้องเปลี่ยนคอลัมน์ที่ใช้แยก

4.6.2 การปรับความจำเพาะเจาะจง (Selectivity , α) ทำได้ดังนี้

1. การเปลี่ยนองค์ประกอบหรือชนิดของเฟสเคลื่อนที่
2. การใช้สารเติมแต่งใส่ลงในเฟสเคลื่อนที่
3. การเปลี่ยนแปลงค่า pH
4. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ
5. การเปลี่ยนแปลงเฟสอยู่กับที่

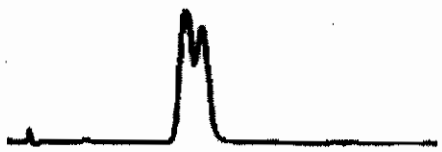
ชนิดของเฟสเคลื่อนที่จะมีบทบาทอย่างมากในการทำ LC และมีผลต่อความจำเพาะเจาะจง การเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นคนละชนิดจะทำให้ผลของการแยกแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นคอลัมน์ชนิดเดียวกัน

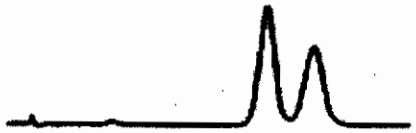
4.6.3 การปรับปรุงประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Efficiency , N)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์ขึ้นอยู่กับจำนวนเพลตตามทฤษฎี ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของคอลัมน์ การลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ และเพิ่มอุณหภูมิ สามารถทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีขึ้นได้ ในทางปฏิบัติการปรับปรุงประสิทธิภาพของคอลัมน์ ให้เหมาะสมทำได้โดย

1. ลดอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่
2. ใช้ตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำ
3. เพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์
4. ลดขนาดของอนุภาคเฟสอยู่กับที่
5. ใช้คอลัมน์ 2 คอลัมน์ หรือมากกว่าต่อเป็นอนุกรม

ตัวอย่าง การแยกสาร A และ B เมื่อทำการปรับปรุงโดยเพิ่มค่าของพารามิเตอร์ k', α, N จะได้ผลดังนี้

1.  การแยก A + B

2.  increase k'

3. increase N

4. increase α

5. ดีเทคเตอร์ (Detector)

สัญญาณที่ได้จากดีเทคเตอร์ต้องเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น

$$S = RF \times C \qquad \text{——— 2.14}$$

S = out put signal of a detector

RF = Response factor

C = Sample concentration

ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC มีหลายชนิด การเลือกใช้ต้องให้สัมพันธ์กับสารตัวอย่าง และผลที่ต้องการด้วย

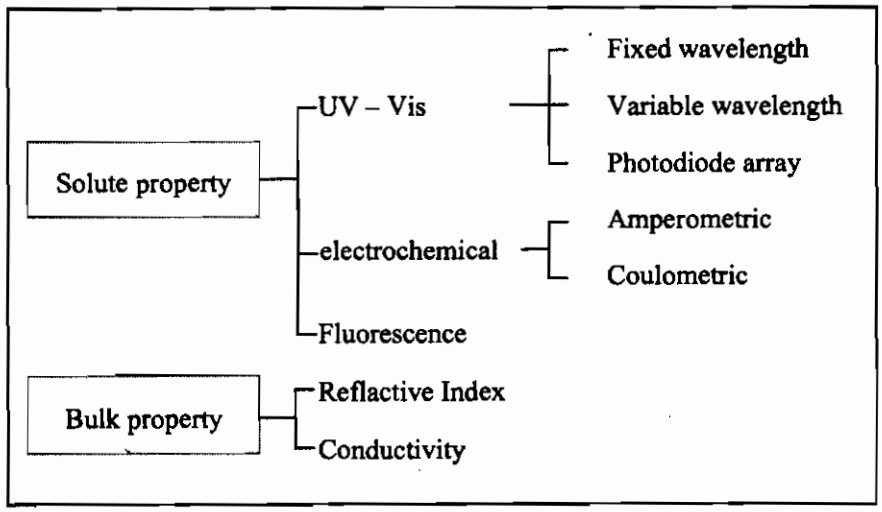
คุณสมบัติของดีเทคเตอร์ที่ดีสำหรับ HPLC คือ

1. High sensitivity
2. Large linear dynamic range
3. Universal or Selective response
4. Response independent of variations in operating parameters , such as pressure , flow rate , temperature , etc.
5. Low dead volume คือปริมาตรของ detector cell ปกติต้องต่ำสุดเท่าที่จะต่ำได้ ประมาณ 8-20 µl และต้องไม่มากกว่า 10 % ของ elution volume เพราะถ้า dv มาก จะทำให้เพิ่ม dispersion
6. Nondestructive of sample
7. Stable over long period of operation
8. Reliable and easy to use
9. Cheap

ดีเทคเตอร์ใน HPLC แบ่งเป็น 2 แบบ ตามคุณสมบัติของการตรวจวัด

1. Bulk property detectors หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของสารละลาย (เฟสเคลื่อนที่ + สารตัวอย่าง) เช่น refractive index , conductivity detector

2. Solute property detector เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียว เช่น UV-Vis , fluorescence และ electrochemical detector (วัดคุณสมบัติของตัวถูกละลายที่ออกจากคอลัมน์เมื่ออยู่ในตัวทำละลาย)



รูปที่ 2.23 แผนภาพของการจำแนกประเภทชนิดของดีเทคเตอร์สำหรับ HPLC

การเลือกใช้ดีเทคเตอร์

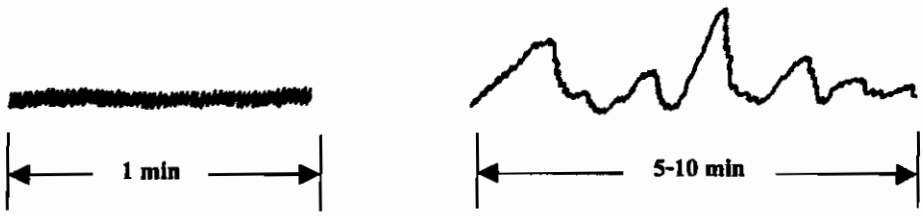
ต้องศึกษาข้อมูลจำเพาะ (specification) ของเครื่องด้วย เมื่อต้องการใช้งาน สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณา คือ

1. สัญญาณรบกวน (noise) สัญญาณรบกวนเกิดขึ้นจากอุปกรณ์ไฟฟ้า การเปลี่ยนแปลงสัญญาณของดีเทคเตอร์ การเพิ่มขึ้นลงของ line voltage การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลง flow rate , pulse จาก pump เป็นต้น ดีเทคเตอร์ที่ดีต้องมีสัญญาณรบกวนต่ำ

สัญญาณรบกวนแบ่งเป็น 2 แบบ คือ

1) Short term noise เป็นความแปรปรวนของสัญญาณที่เกิดขึ้นในลักษณะเป็นคลื่นถี่ๆ บนเส้นฐาน ในลักษณะของ High frequency noise

2) Long term noise เป็นความแปรปรวนของสัญญาณที่เกิดขึ้นเป็นแอ่ง หรือเป็นพีกที่เส้นฐาน บางครั้งเป็นการยากที่จะแยกออกจากพีกของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำๆ

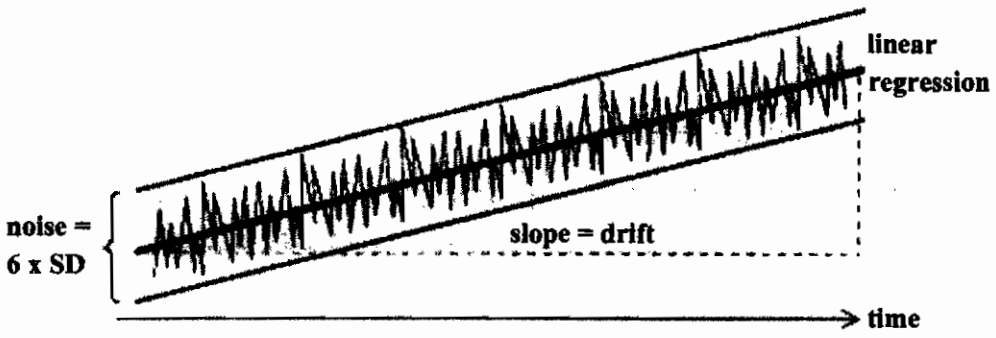


Short term noise **Long – term noise**

2. detector drift การเบี่ยงเบนของดีเทคเตอร์อาจทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเส้นฐานขึ้นหรือลง

up scale drift **down scale drif**

ค่า drift คือความชันของเส้นตรงที่ได้จาก linear regression ของสัญญาณที่เกิดขึ้นบนเส้นฐาน และค่า noise คือค่าที่เท่ากับ 6 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นตรงที่ทำ regression เมื่อเกิดการ drift ดังแสดงในรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 แสดงการเกิด drift , slope คือค่า drift และ noise = 6 SD
ดีเทคเตอร์ที่ดีควรมีค่า drift ต่ำ คือมีค่า slope น้อย

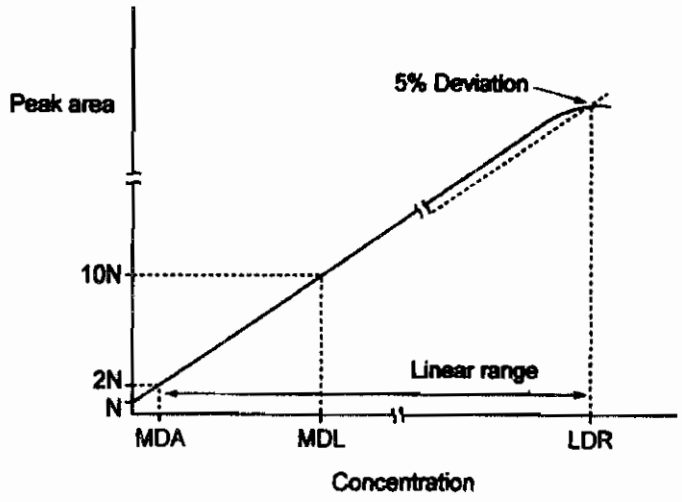
3. Sensitivity ความไวของดีเทคเตอร์ที่ตอบสนองต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ แสดงได้ในเทอมอัตราส่วนของสัญญาณการตอบสนองต่อความเข้มข้นของตัวอย่าง ซึ่งหมายถึงสัญญาณที่ตอบสนองต่อหนึ่งหน่วยความเข้มข้น ดีเทคเตอร์ที่มีความไวสูงจะให้พีกที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเทคเตอร์ที่มีความไวต่ำ เมื่อตัวอย่างมีความเข้มข้นเท่ากัน แต่ทั้งนี้ noise ของเครื่องต้องต่ำด้วย ถ้าดีเทคเตอร์ให้สัญญาณมากและ noise มากด้วยอาจมีความไวไม่ดีเท่ากับดีเทคเตอร์ที่ให้สัญญาณน้อยกว่าและ noise น้อยกว่า ดังนั้นความไวของดีเทคเตอร์สามารถพิจารณาได้จาก S/N ดีเทคเตอร์ที่ให้สัญญาณ S/N สูงกว่า จะมีความไวสูงกว่าชนิดที่ให้สัญญาณ S/N น้อย เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่เท่ากัน

4. Detection limit คือความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือว่าเป็นสัญญาณที่เกิดจากตัวอย่าง คือความเข้มข้นที่ให้สัญญาณเป็น 2 หรือ 3 เท่าของ noise (S/N = 2 or 3) ซึ่งเรียกว่า minimum detection amount (MDA) หรือ limit of detection (LOD) มีหน่วยเป็น μg/ml หรือ mg/lit ในการทดลองสามารถหาได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) โดยการพลอตกราฟระหว่างพื้นที่พีกกับความเข้มข้น จะได้กราฟเส้นตรงในรูปสมการ

$$y = a + bx \qquad \text{———— 2.15}$$

a คือ intercept ที่หมายถึง noise ของเครื่องหรือสัญญาณของแบลงค์ จากนั้นให้ใช้สัญญาณเป็น 2 เท่าของค่า intercept เพื่อหาค่าความเข้มข้นจากแกน x ดังแสดงในรูปที่ 2.25

5. Linearity หรือ Linear dynamic range คือช่วงความเข้มข้นของตัวอย่างที่ดีเทคเตอร์ตอบสนองอย่างเป็นเส้นตรง ซึ่งเป็นความเข้มข้นตั้งแต่ MDA จนถึงความเข้มข้นที่เบี่ยงเบนไปจากเส้นตรงประมาณ 5% ดังแสดงในรูปที่ 2.25 ตามปกติในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ทางปริมาณ จุดแรกของ calibration curve จะถูกกำหนดให้มีค่าประมาณ 10 เท่าของ noise (10N) ซึ่งเรียกว่า method detection limit (MDL) หรือ Limit of quantitative (LOQ) และในการรายงานผลการวิเคราะห์เมื่อพบว่าผลที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง MDA-MDL (LOD-LOQ) ให้รายงานผลว่าเป็นประมาณค่าที่วิเคราะห์ได้ (~) ถ้าผลที่ได้ต่ำกว่า MDA แต่มีสัญญาณสูงกว่า noise ให้รายงานว่า น้อยกว่า MDA (< MDA) ถ้าผลที่วิเคราะห์ได้ไม่มีสัญญาณใดๆ เกิดขึ้นให้รายงานว่า ND (not detectable)



รูปที่ 2.25 แสดงวิธีการหา MDA (LOD) , MDL (LOQ) และ Linear dynamic range

5.1 UV-Vis detector

อาศัยหลักการดูดกลืนความเข้มแสงในช่วงความยาวคลื่น UV-Visible 190 - 800 nm ของสารตัวอย่าง เมื่อสารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์แล้วผ่านเข้าไปในตัวตรวจวัดที่มีแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ผ่านอยู่ในตอนเริ่มต้น โดยมีความเข้มของแสงในตอนเริ่มต้นเท่ากับ P_0 เมื่อแสงผ่านตัวอย่างจะเกิดการดูดกลืนความเข้มของแสงจำนวนหนึ่ง แล้วยอมให้แสงผ่านออกไปได้ P ตามกฎของ Beer-Lambert 's Law จะได้

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon bc \qquad \text{———— 2.16}$$

จากสมการแสดงว่าค่าการดูดกลืนความเข้มแสงของสารตัวอย่าง (A) จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นโดยขึ้นกับ optical path – length (b) และ molar absorptivity ของตัวถูกละลาย ดีเทคเตอร์ชนิดนี้นิยมใช้ใน HPLC เพราะว่าไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลของเฟสเคลื่อนที่และ อุณหภูมิ UV จะใช้มากกว่า Visible ดีเทคเตอร์ชนิดนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางใน HPLC เพราะไวต่อสารประกอบอินทรีย์เกือบทุกชนิด

การดูดกลืนแสงของเฟสเคลื่อนที่และสารตัวอย่างต้องแตกต่างกัน (λ_{max}อยู่คนละที่) ความยาวคลื่นที่เลือกใช้นั้นตัวถูกละลายต้องดูดกลืนได้ดี ในขณะที่ตัวทำละลายต้องมีค่าการดูดกลืนต่ำ

UV - Vis detector แบ่งได้เป็น 3 ชนิด

5.1.1 Fix wavelength จะพบว่าถ้ามีสารหลายชนิดผสมกันซึ่งแต่ละชนิดมี λ_{max} ต่างกัน ทำให้ค่าการดูดกลืนที่ได้ไม่เท่ากัน สารบางชนิดที่มีปริมาณมาก อาจดูดกลืนได้น้อย ทำให้การวิเคราะห์สารประกอบบางชนิดมีความไวต่ำ

Detector ชนิดนี้ : Low price

: Sensitive only for defined wavelength

แหล่งกำเนิดแสงที่ให้ความยาวคลื่นเฉพาะมีดังนี้

: UV lamp ทำด้วยปรอทที่ความดันต่ำ จะให้แสงที่ 254 , 313 , 365 nm

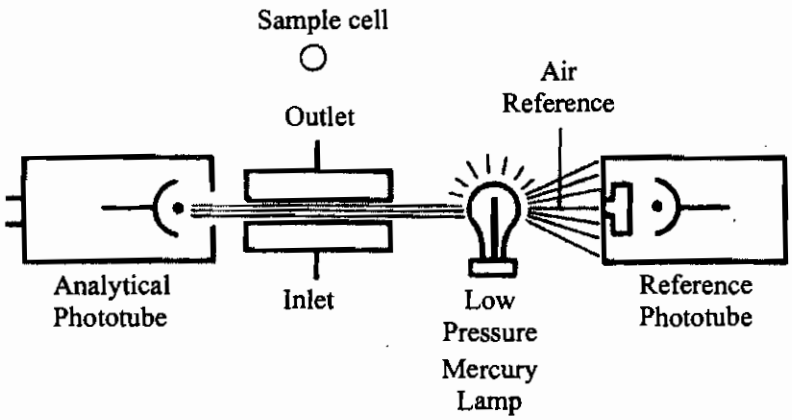
UV lamp ทำด้วย Zn จะให้แสงที่ 214 , 308 nm

UV lamp ทำด้วย Cd จะให้แสงที่ 229 , 326 nm

UV lamp ทำด้วย Mg จะให้แสงที่ 206 nm

5.1.2 Variable wavelength ใช้ D_2 lamp ซึ่ง vary wavelength ตั้งแต่ 190-400 nm และ W – lamp ตั้งแต่ 400 – 800 nm และใช้ตัวทำแสงเอกรงค์ (monochromator) ในการเลือกความยาวคลื่น สามารถใช้กับ gradient elution

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์ในการนำมาใช้มากกว่าเพราะสามารถเลือกใช้ความยาวคลื่นได้ตามต้องการให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง และตัวทำละลายที่นำมาใช้ เช่น อะซิโตไนไตรล์ และ เมทานอล สามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 190 และ 210 nm ซึ่งต่ำกว่าความยาวคลื่นของสารตัวอย่าง ทำให้ไม่รบกวนการวิเคราะห์ ถ้ามีการเลือกใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ก็สามารถเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ไม่ใช่ λ_{max} ของตัวทำละลายนั้น แต่เลือกให้ตรงกับ λ_{max} ของตัวอย่าง ตารางที่ 2.11 และ 2.12 แสดงค่า λ_{max} ของสารตัวอย่าง และตัวทำละลายในเทอมของ UV cut off



รูปที่ 2.26 แผนภาพของการตรวจวัดด้วย UV – Vis detector

ตารางที่ 2.11 Absorbing UV Chromophores

Chormophore	**λmax**	**Absorbing strength**
Acetylide	177	Medium
Aldehyde	210	Strong
Azido	190	Medium
Amine	195	Weak
Ether	185	Weak
Ethylene	190	Medium
Ketone	190	Weak
Nitrite	225	Weak
Nitro	210	Strong
Oxime	190	Medium
Thiol	195	Weak
Thioketone	205	Strong
Thioether	194	Medium
Conj. ring	varies	Strong

Strength is related to the absorption coefficient weak = 0-4000 medium = 4000-8000 strong = 8000-

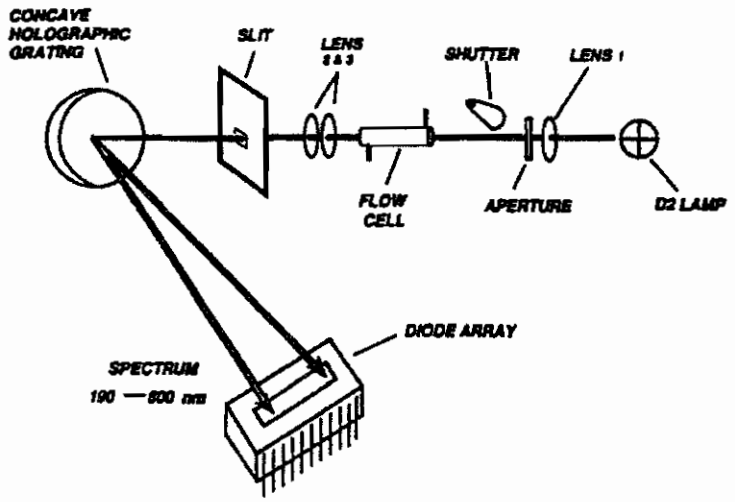
From : "Instrumental Methods of Analysis" by Willard , Merritt and Dean , 4th Ed., D.Van Nostrand Co. Inc., 1965

ตารางที่ 2.12 UV Transmittance Cut offs (nm) for Typical LC Solvents

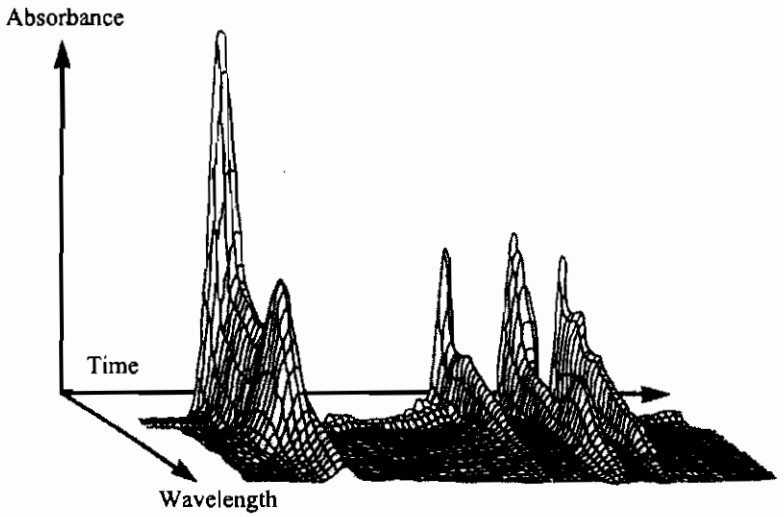
Solvent	Cut off
Acetone	330
Acetonitrile	190
Benzene	280
Butyl acetate	255
Butyl ether	235
Carbon disulfide	380
Carbon tetrachloride	265
Chloroform	245
Cyclohexane	210
1,2-dichloroethane	230
Dimethylformamide	270
p-dioxane	220
Ethyl ether	220
Ethyl acetate	260
Heptane , Hexane , Pentane	210
Methanol , Ethanol	210
Methylcyclohexane	210
Methylene chloride	241
Nitromethane	380
Tetrahydrofuran	220
Toluene	285
zylene	290

From : "Instrumental Methods of Analysis" by Willard , Merritt and Dean 4th Ed., D.Van Nostrand Co. Inc., 1965

5.1.3 Diode Array สามารถวัดแสงหลายๆ ความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน ระบบทางเดินแสงจะเป็นแบบย้อนแสง (reverse optics) คือ แสงจากแหล่งกำเนิดจะผ่านไปยัง flow through cell ก่อน แล้วจึงค่อยไปยัง monochromator หรือ grating เมื่อแสงตกกระทบ grating ก็จะถูกแยกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบกับ photo diode array แผนภาพของ detector ชนิดนี้ แสดงในรูปที่ 2.27



รูปที่ 2.27 Diode array detector



รูปที่ 2.28 ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้จาก diode array detector

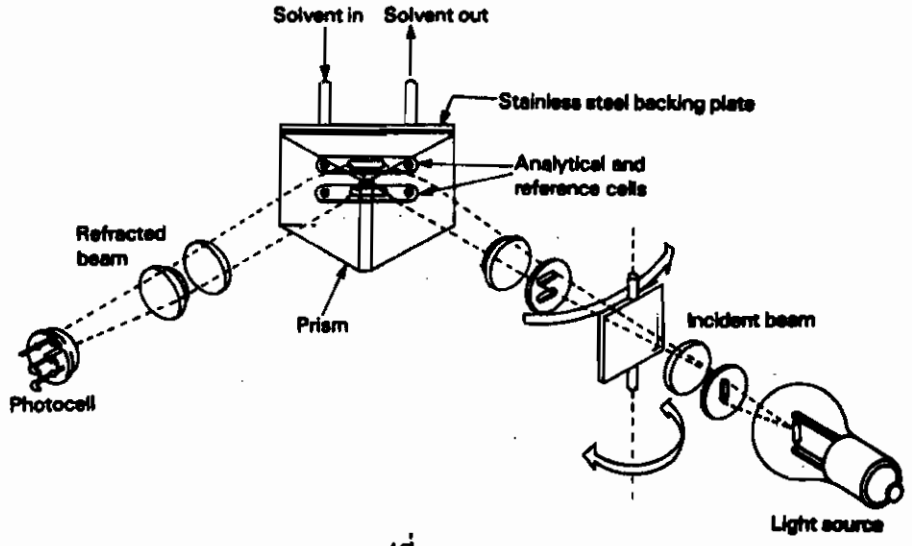
5.2 Refractive index (RI) detector

จัดเป็น Universal type detector นิยมรองจาก UV – detector เป็นการวัดความแตกต่างของ RI ระหว่าง Column effluent กับ reference solution (mobile phase)

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ใช้กับ Gradient elution ไม่ได้

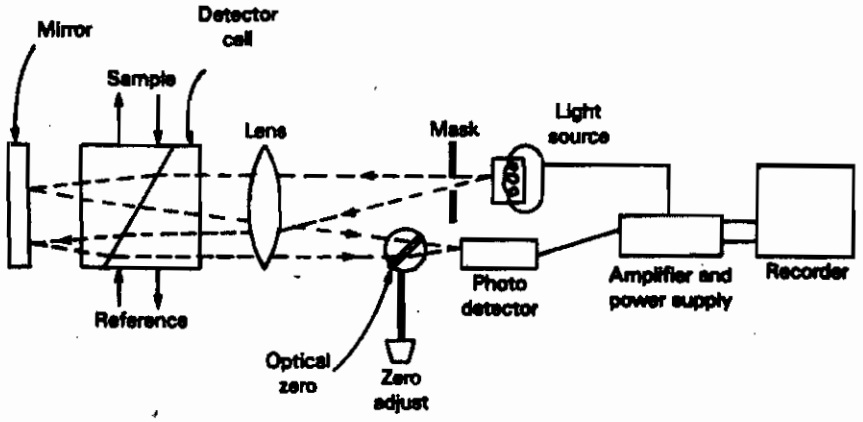
RI detector มี 3 ชนิดคือ

1. Fresnel refractometer



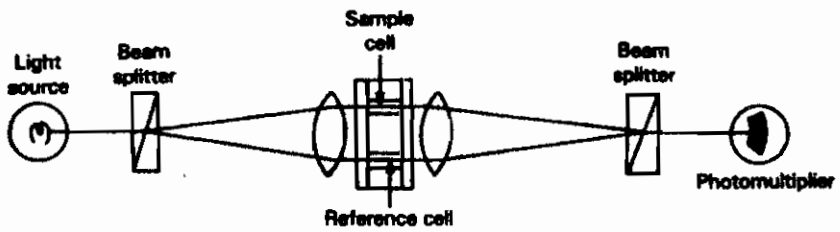
รูปที่ 2.29

2. Detection Refractometer



รูปที่ 2.30

3. Interferometric Refractometer



รูปที่ 2.31

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีข้อเสีย คือ

- Less specificity
- Sensitive towards temperature and pressure

5.3 Fluorescent detector

มีความไวสูงมากต่อสารประกอบ fluorescent ให้ background ต่ำ เพราะเลือก excite และ emission wavelength ได้ ใน HPLC นิยมน้อยกว่า UV เพราะ Selective เกินไป

$$X + h\nu \longrightarrow X^*$$

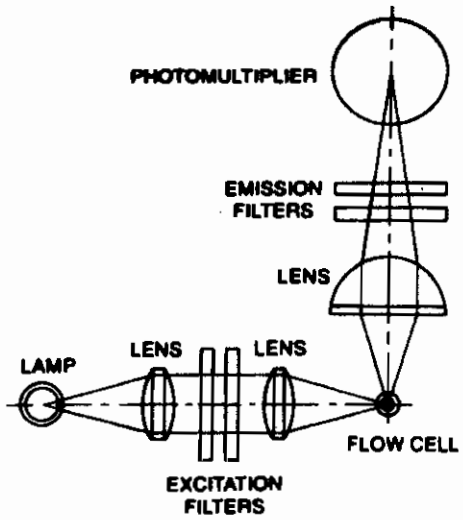
Excited state

$$\downarrow$$

$$X + h\nu'$$

Fluorescent $10^{-6} - 10^{-9}$ sec

Phosphorescent $> 10^{-4}$ sec



รูปที่ 2.32 แสดงแผนภาพของ fluorescent detector

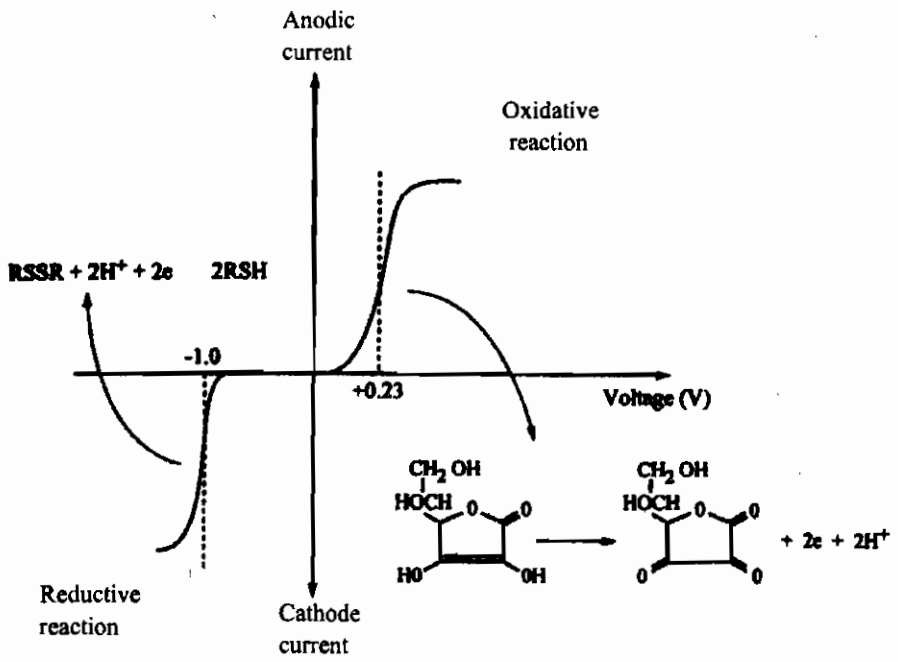
เนื่องจาก fluorescent detector มีความจำเพาะเจาะจงสูง จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารที่สนใจที่อยู่ในตัวอย่างที่ซับซ้อน (complex sample matrices) ได้ดี ตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์ adrenaline , alflatoxins , polynuclear aromatic hydrocarbons และ estrogen นอกจากนี้ยังใช้กับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่สามารถเกิดปฏิกิริยา derivatization แล้วให้สารที่มีคุณสมบัติเป็น fluorescent

5.4 Electrochemical detector

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางพอสมควรเพราะมี high selectivity และ specificity โดยการเลือกใช้ขั้วที่เหมาะสมและหลักการวัดคุณสมบัติทางไฟฟ้าของสารละลายในเซลล์ไฟฟ้าเคมี จึงสามารถแบ่งชนิดของดีเทคเตอร์ได้เป็นดังนี้

5.4.1 Conductivity detector ใช้ได้กับการวิเคราะห์ inorganic และ organic ion ในหลักการของ ion exchange chromatography (หรือเทคนิคของการวิเคราะห์ที่เรียกว่า ion chromatography , IC)

5.4.2 Amperometric detector ใช้วัดปริมาณกระแสที่เกิดจากการออกซิไดซ์ หรือรีดิวซ์สารตัวอย่างเมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมกับสารละลายตัวอย่าง ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 2.33



รูปที่ 2.33 ตัวอย่างการตรวจวัด organic disulphide และ ascorbic acid ด้วย Amperometric trace detector

5.4.3 Polarography detector หรือ Voltammetry เป็นเทคนิคของการวัดกระแสที่เกิดขึ้นที่ขั้วทำงานเมื่อทำการเปลี่ยนค่าศักย์ไฟฟ้าของ voltammetric cell ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่าง current – voltage จะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์

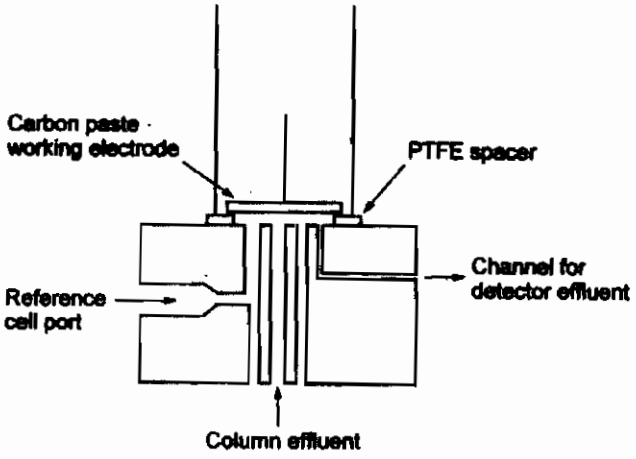
5.4.4 Coulometry detector เป็นเทคนิคของการวัดปริมาณไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในเซลล์ของดีเทคเตอร์

Electrochemical detector ที่มีจำหน่ายทางการค้าทั่วไปจะอยู่บนฐานของการวัดกระแสและปริมาณไฟฟ้า การทำงานขึ้นอยู่กับการออกแบบของเซลล์ที่จะให้ตัวชะผ่านเข้าไปแล้ววัดค่าทางไฟฟ้าโดยเลือกใช้งาน เช่น amperometric mode หรือ coulometric mode กระแสที่เกิดขึ้นจะต้องมีขีดจำกัดของการแพร่กระจายในช่วง (1-20%) เพื่อความถูกต้องของค่าที่วัดได้ รูปร่าง

งขั้วทำงานควรมีพื้นที่ผิวมากๆ และตัวชะหรือเฟสเคลื่อนที่ต้องพาตัวถูกละลายมาสัมผัสกับขั้วเป็นฟิล์มบางๆ เพื่อให้มีความไวมากที่สุด และต้องแน่ใจว่าการวัดต้องกลับไปกลับมาได้อย่างรวดเร็วระหว่างการมีตัวถูกละลายกับไม่มีตัวถูกละลายมาสัมผัสที่ขั้ว

ตารางที่ 2.13 แสดงชนิดของสารประกอบที่สามารถตรวจวัดได้ด้วย electrochemical detector

Oxidation	**Reduction**
Hydrocarbons	Olefins
Benzines	Esters
Amides	Ketones
Amines	Aldehydes
Phenols	Ethers
Quinolines	Diazo compounds
Catecholamines	Nitro compounds



รูปที่ 2.34 แผนภาพของ electrochemical detector

ตารางที่ 2.14 Some of the characteristics are listed for different detectors

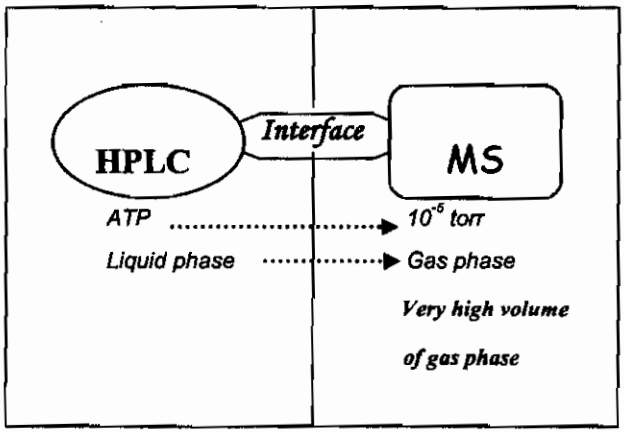
Type	Response	Noise level	C_N g /ml	Linear range	Flow cell volumn , µl
UV – visible absorption	Selective	10^{-4} au	10^{-8}	10^{4}- 10^{5}	1 – 8
Fluorescence	Selective	10^{-7} au	10^{-12}	10^{3}- 10^{4}	8 – 25
Conductivity	Selective	10^{-2}µs cm^{-1}	10^{-7}	10^{3}- 10^{4}	1 – 5
Amperometric	Selective	0.1 nA	10^{-10}	10^{4}- 10^{5}	0.5 – 5
Reflactive index	Universal*	10^{-7} riu	10^{-6}	10^{3}- 10^{4}	5 – 15

* there must be a difference between the refractive index of the solutes and that of the mobile phase

5.5 MS Detector

ส่วนประกอบของ MS detector จะมีวิธีใช้ที่ยุ่งยากและซับซ้อนกว่าดีเทคเตอร์ชนิดอื่นๆ สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และหาโครงสร้างของสารประกอบได้ ถูกจัดให้เป็นชุดของเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งเรียกว่า LC-MS

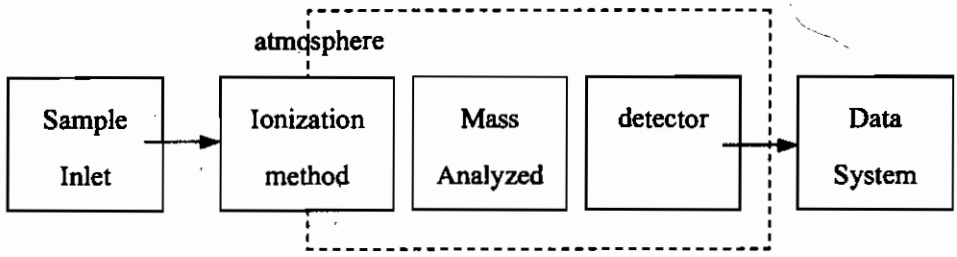
การต่อ LC เข้ากับ MS ต้องมี interface ดังแสดงในรูปที่ 2.35



รูปที่ 2.35 การต่อ LC กับ MS

ปัญหาใหญ่ในการต่อ LC เข้ากับ MS คือการไม่ match กันของขนาดตัวทำละลายที่ออกจาก LC กับ MS detector จึงต้องสร้าง interface ที่มีความสามารถสูงในการกำจัดไอของ mobile phase ออกไป เพื่อให้ interface ทำงานได้ดี คอลัมน์ที่ใช้ต้องเป็น narrow bore column เพื่อให้ได้ small solvent และ flow rate ต่ำหน้าที่และการทำงานของ interface มีดังนี้คือ

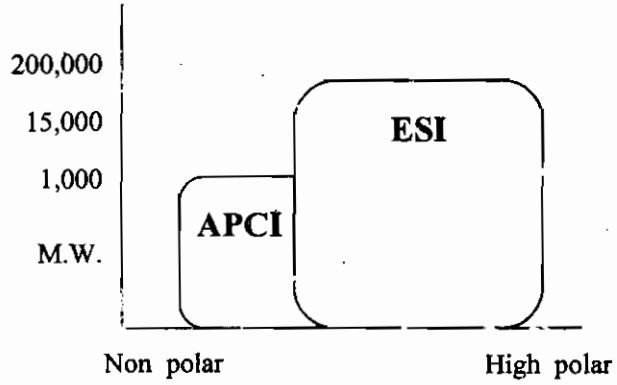
- สามารถ remove เฉพาะไอของ solvent โดยที่ sample ไม่เกิดการสูญเสียก่อนเข้า ion source โดยใช้เทคนิคของการสเปรย์ (spray) ให้เฟสเคลื่อนที่เป็นฝอยๆ เหมือนละอองในอากาศ (aerosol) หรือเรียกว่า microdroplets
- สามารถเปลี่ยนสถานะของสารตัวอย่าง จากรูปแบบที่เป็นไอออนในสารละลายมาเป็นโมเลกุล หรือไอออนในสถานะแก๊สได้โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือไม่เกิดการสลายตัว
- split แยกเฉพาะส่วน (fraction) โมเลกุลของตัวอย่างเข้า ion source
- ต้องใช้ pump ที่มีความสามารถสูงในการ remove solvent vapour
- การเกิด ionization ของตัวอย่าง ต้องเกิดโดยตรงที่ interface แล้วส่งต่อไปยัง mass analyzer



รูปที่ 2.36 แผนภาพของ MS – detector

ระบบของ interface ช่วงแรกๆ ใช้ [illegible]เรือ He ในการ remove solv vapour ออกก่อนที่ sample จะเข้า ion source ซึ่งประสิทธิ[illegible]ของระบบนี้มีน้อย จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคของการ interface ขึ้นมาหลายแบบ ได้แก่

- Moving belt interface (MB)
- Continuous flow fast atom bombardment (CF – FAB)
- Thermospray interface (TS)
- Particle beam interface (PB)
- Atmospheric pressure ionization interface (API) จัดเป็น soft ionization และใช้กันมากในปัจจุบันแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ
    - Electrospray ionization (ESI)
    - Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)



รูปที่ 2.37 Relative Applicability of API technique

Electrospray มีชื่อเรียกอีกหลายชื่อ ที่เป็นที่รู้จักกัน คือ

- Ionspray
- Nanospray
- Sonic spray
- Pure electrospray
- ESI , ES , IS

ใช้หลักการให้สารที่ออกมาเกิด Ionization ก่อนเป็น charge droplet แล้วจึงค่อย evaporate solvent ออกไป ใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่เป็น polar ไม่ควรใช้กับตัวอย่าง non – polar เช่น PAHs , PCBs

ตัวอย่างที่นำมาใช้กับ ESI แล้วให้ผลดีได้แก่

- ตัวอย่างที่เป็นไอออนในสารละลาย เช่น surface conjugates quaternary amines
- ควรเติม charge induce เช่น methanol เข้าไปด้วย
- ประกอบด้วย heteroatoms เช่น carbonates , benzodiazepines
- มีประจุมากกว่า 1 ในสารละลาย เช่น protein , peptides

Atmospheric Pressure chemical Ionization (APCI) ใช้หลักการให้ตัวทำละลายเกิด evaporation ก่อน แล้วค่อยเกิด ionization ใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่เป็น non – polar สารที่สนใจต้องทนความร้อน เพราะต้องผ่าน heater block ก่อน ตัวอย่างที่นำมาใช้แล้วได้ผลดี ได้แก่

- ตัวอย่างที่ไม่สามารถใช้กับ ESI ใช้ได้กับตัวอย่างที่มี M.W. ปานกลาง
- ใช้กับการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 2 ml/min และทำให้กลายเป็นไอที่อุณหภูมิสูงถึง 600 °C ซึ่งสูงกว่า ESI
- ตัวอย่างสามารถสลายตัวได้ด้วยความร้อน
- ทนต่อเกลือได้มากกว่า ESI

Mass Spectra เกิดขึ้นได้อย่างไร ?

เมื่อเกิด Ion ขึ้นใน ion source แล้วจะถูกส่งต่อไปยัง mass analyzer ที่ mass analyzer ไอออนต่างๆ จะถูกแยกออกมาตามขนาด m/z

mass analyser มีหลายชนิดได้แก่

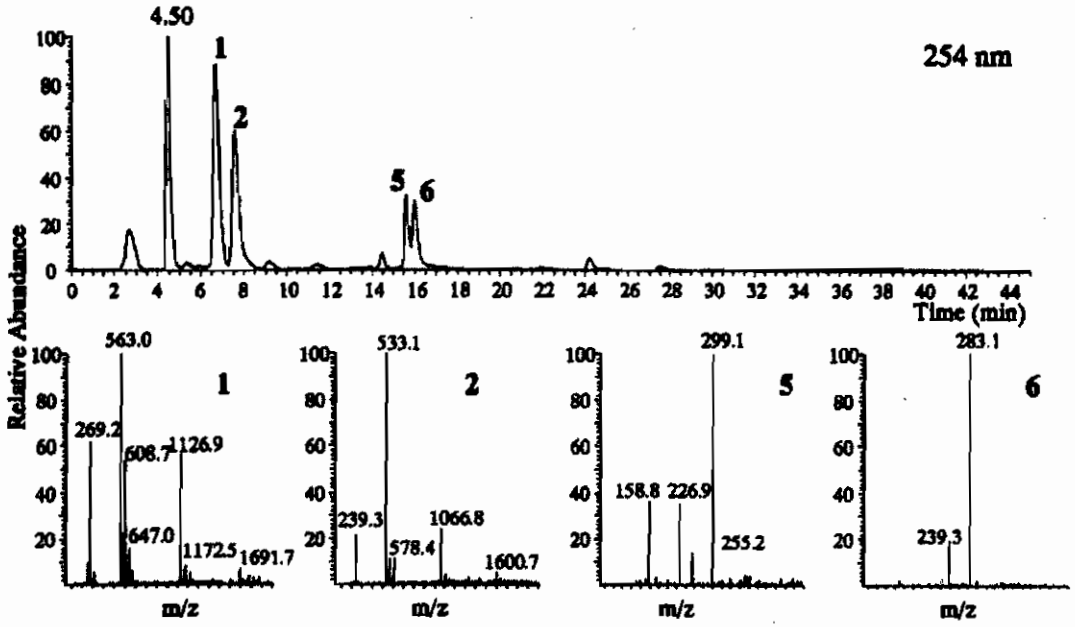
- Quadrupole
- Ion trap
- Magnetic sector
- Time of flight

Ion ที่มีขนาด m/z ต่างๆ กัน จะถูกแยกออกไปยัง detector และนับ (counted)

Mass spectrum ที่แสดงจะเป็นค่า relative abundance ของ ion ที่มีค่า m/z ต่างๆ กัน

Detector MS สามารถแยกโมเลกุลได้ตามขนาด mass to eharge ratio

Detector MS สามารถบอกได้ว่า ตัวอย่างนั้นมีอะไรอยู่ และเป็นปริมาณเท่าไร



รูปที่ 2.38 ตัวอย่าง mass spectrum ในการทำ LC – MS

UV (254 nm) trace of a crude extract of ***Rubia tinctorum*** roots and mass spectra (single MS) of the chromatographic peaks for individual anthraquinones lucidin primeveroside (**1**) , ruberythric acid (**2**) , pseudopururin (**5**) , and munjistin (**6**). Mass spectra were obtained with NI-ESI with post-column addition of ammonia

6. Recorder และ Data processing

ปัจจุบันการบันทึกข้อมูล และประมวลผลต่างๆ สามารถทำได้โดยใช้ soft ware computer ที่บริษัทผู้ผลิตเครื่องมือเป็นผู้สร้างขึ้น และระบบการทำงานของเครื่องมือทั้งหมดถูกควบคุมได้ด้วยคอมพิวเตอร์ ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง และเที่ยงตรงมากขึ้น ข้อมูลที่ถูกบันทึกไว้ในหน่วยความจำของเครื่องคอมพิวเตอร์ทำให้ผู้วิเคราะห์มีความสะดวก และง่ายในการนำข้อมูลมาประมวลผล และเก็บผลนั้นไว้ได้โดยไม่สิ้นเปลืองกระดาษบันทึกผล