บทที่ 12
การวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
(Analysis by High Performance Liquid Chromatography)

ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เป็นเทคนิคหรือวิธีแยกองค์ประกอบของสารละลายที่ประกอบด้วยสารหลายชนิดที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันให้แยกออกจากกันได้ และสามารถทำการตรวจวัดทางคุณภาพและปริมาณของสารเหล่านี้ได้โดยเทียบกับสารมาตรฐานแต่ละชนิด HPLC สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

หลักในการแยกองค์ประกอบของสารอาหารโดย HPLC

การแยกสารโดยใช้เทคนิคนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้คอลัมน์ (column) ซึ่งภายในบรรจุด้วยวัฏภาคกับที่ (stationary phase), การเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก การเลือกต้องเลือกให้เหมาะสมและสัมพันธ์กับคุณสมบัติของ column , mobile phase และสารที่จะแยก HPLC จะใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางแคบซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2-80 มิลลิเมตร ซึ่งสารที่ถูกบรรจุในคอลัมน์จะมีขนาดเล็กตั้งแต่ 50 x 10^{-6} m) ดังนั้นต้องใช้ความดันสูง 1000-6000 psi การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่จะใช้ในอัตรา 0.1-10 มิลลิลิตร/ นาที HPLC ใช้วิเคราะห์สารละลายที่ไม่สามารถวิเคราะห์ด้วย Gas liquid chromatography (GLC) เช่น สารที่ถูกทำลายง่ายด้วยความร้อน สารที่ไม่ระเหย

ข้อควรระวังในการใช้ HPLC คือ solvent ต้องไม่มีตะกอนของสารใดๆ ซึ่งจะทำให้ pump ทำงานหนักและขณะกำลังทำงานอาจย้อนหลับไปอุดคอลัมน์ทำให้คอลัมน์เสียหาย ซึ่งราคาค่อนข้างสูง ก่อนใช้ต้องกรองmobile phase และควรมี guard column ต่อไว้กับ column เพื่อรองรับสิ่งเจือปนจาก mobile phase ก่อนถึง column

ความแตกต่างของ Liquid Chromatography และ High Performance Liquid Chromatography

1. Liquid Chromatography (LC) การใช้สารดูดซับจะมีขนาดใหญ่กว่าใน HPLC ซึ่งจะบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1-5 เซนติเมตร

2. ใน LC ใช้ความดันในระบบน้อยกว่า HPLC คือในช่วง 0.1-1 บรรยากาศ แต่ HPLC จะเริ่มที่ 1 บรรยากาศ ไม่เกิน 30 บรรยากาศ

3. อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ของ LC จะช้ามากคือ 0.1มิลลิลิตร/ นาที หรือน้อยกว่านี้ ซึ่งใน HPLC จะเริ่มที่ 1 มิลลิลิตร/ นาที

4. LC column ไม่ต้องใช้ปั๊ม การเคลื่อนที่ของตัวทำละลายอาศัยแรงโน้มถ่วง แต่ HPLC ต้องใช้ปั๊มเนื่องจากพื้นที่ในคอลัมน์น้อยกว่า

หลักการในการตรวจวัดทั้งโดยคุณภาพและปริมาณขึ้นอยู่กับ

- สารที่ต้องการจะแยกว่าเป็นสารประเภทใด สารอินทรีย์, สารอนินทรีย์, กรด, ไขมัน, ฮอร์โมน, วิตามิน เป็นต้น
- คุณสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในเรื่องโครงสร้าง ขนาดโมเลกุล การเรืองแสง การดูดกลืนแสง การแยกตัว

กลไกในการแยกสารประกอบอาหาร

ภายในคอลัมน์ จะบรรจุด้วยสารที่ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งประกอบด้วยอนุภาค (innert support) ที่ถูกเคลือบผิวไว้ด้วยสารที่มีคุณสมบัติในการดูดซับพวก liquid phase สารละลายที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกฉีดเข้าไปในระบบ เมื่อสารละลายผ่านเข้าไปในคอลัมน์ สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับ (adsorption) และถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับ (desorption) บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ ผลที่ตามมาคือ สารประกอบแต่ละตัวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ด้วยความเร็วที่ต่างกัน อัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ (affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ การที่สารประกอบที่ต้องการวิเคราะห์จะ เคลื่อนที่ออกไปจาก stationary phase ได้เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับการเกาะจับกันทางเคมีของสาร (chemical attraction Force) ที่ต้องการวิเคราะห์ กับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ และยังขึ้นอยู่กับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์และชนิดของ mobile phase ซึ่งจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีในขณะที่กำลังเกิดการแยกของสารอยู่นั้น สารแต่ละสารก็มีส่วนหนึ่งเกาะอยู่กับเป็นวัฏภาคอยู่กับที่ (stationary phase) บางส่วนก็เคลื่อนไปกับโดยวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) สารตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่ จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็วก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารตัวใดที่สามารถเข้ากันไม่ได้ดีกับวัฏภาคเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ช้าก็จะออกมาในเวลา

ต่างๆกัน สารที่แยกออกมาก็จะถูกตรวจสัญญาณด้วย detector และแยกเป็นโครมาโตแกรม

อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่เกาะกับวัฏภาคอยู่กับที่ (stationary phase) ต่อความเข้มข้นของสารที่เคลื่อนที่ไปกับ mobile phase มีค่าคงที่เฉพาะตัวของสารแต่ละสารซึ่งเรียกว่า distribution coefficienk (K)

ให้ K_x = distribution coefficienk ของสาร x

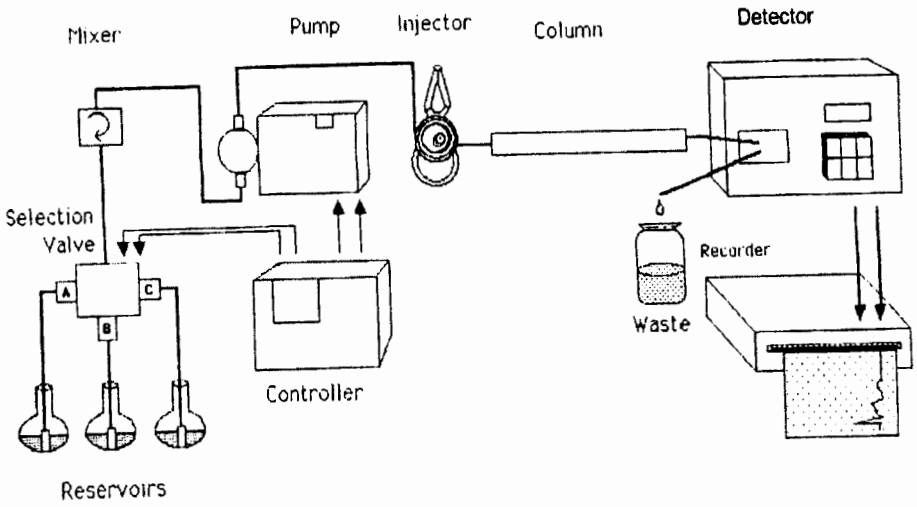
$[X]_s$ = ความเข้มข้นของสาร x ใน stationary phase

$[X]_m$ = ความเข้มข้นของสาร x ใน mobile phase

$K_x - [X]_s / [X]_m$ = ค่าคงที่

ค่า K_x ของสารแต่ละสารมีค่าแตกต่างกัน จึงทำให้เกิดกลไกของการแยกขึ้นได้ถ้าค่า K มีค่ามากแสดงว่า สารประกอบชอบที่จะกระจายตัว อยู่ในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าถ้าค่า K มีค่าน้อยแสดงว่าสารประกอบนี้จะกระจายตัวในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสที่อยู่กับที่และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว

ค่า K_x จะขึ้นกับค่า affinity จะขึ้นกับสาร stationary phase

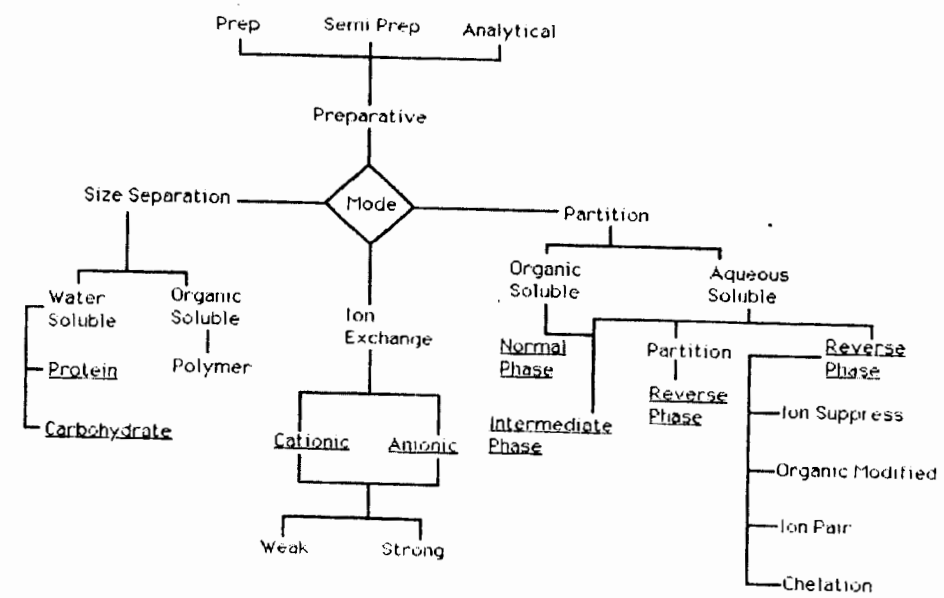


ภาพที่ 12.1 ส่วนประกอบต่างๆของเครื่อง High Pressure Liquid Chromatography

ที่มา : Marvin C. McMaster. HPLC ; A Practical User's Guide

เลือกวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ซึ่งมีหลายชนิดซึ่งขึ้นอยู่กับกลไกของการแยกต่างกัน แบ่งออกได้ดังนี้

1. Adsorption Chromatography
2. Liquid – Liquid (partition) chromatography
3. Ion Exchange Chromatography
4. Size Exclusion Chromatography



ภาพที่ 12.2 การเลือกคอลัมน์ชนิดต่างๆ

ที่มา : Marvin C. McMaster. HPLC ; A Practical User's Guide

1. Adsorption chromatography หรือ Liquid Solid Chromatography (LSC)

โครมาโตรกราฟีชนิดนี้ใช้คอลัมน์จะบรรจุด้วยตัวดูดซับเป็นของแข็งที่มีรูพรุน มีพื้นที่ผิวมาก เพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดซับตัวอย่างของ solid phase เช่น ผง silica gel, alumina, activated charcoal โดยมี active siteเป็น silinol group เคลือบอยู่บนผิวของ silica gel ซึ่งทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารที่เป็นสารประเภทมีขั้ว (polar functional group)

ดังนั้น LSC จึงเหมาะกับการแยกสารที่มีขั้ว (polar) เช่น แอลกอฮอล์, กรด ชนิดต่าง ๆ ออกจากสารที่ไม่มีขั้ว(non-polar) เช่น aromatic hydrocarbon ได้

Liquid – Liquid (Partition) Chromatography

โครมาโตรกราฟีนี้มี 2 ชนิดคือ Normal phase (NP) และ Reverse phase (RP)

Normal phase (NP) จะมี stationary phase เป็นสารที่มีขั้ว ส่วนใหญ่จะบรรจุด้วย silica gel ซึ่งมักใช้กับ partition/ adsorption chromatography ซึ่งจะทำให้สารประกอบ (Analyte) แต่mobile phase จะไม่มีขั้ว (Non polar) สารชนิด polar ถูกยึดไว้ (retain) และในขณะเดียวกันก็จะไม่ยึดสารพวก non – polar ปล่อยให้หลุดไป ด้วยอัตราที่แตกต่างกันของกำลังขั้ว (polarity) ใน Normal phase chromatograph ชนิดนี้อธิบายสั้น ๆ ว่า polar like polar

Reverse phase (RP)

จะมีลักษณะตรงข้ามกับ Normal phase chromatography คือ **stationary phase จะเป็นพวก non polar** แต่ mobile phase จะเป็นของเหลวที่มีขั้ว (polar) ก็จะถูกหน่วงเหนี่ยว (retain) อยู่ใน stationary phase คอลัมน์ที่ใช้มักเป็นชนิด C-18 ชนิด non-polar ในคอลัมน์บรรจุด้วย octadecylsilyl coated silica

ตารางที่ 12.1 ความแตกต่างของ Normal และ Reversed Phase

	Normal	**Reverse**
Packing polarity	High	Low
Solvent	Low	High
Elution order	Non-polar first, then polar	Polar first, then non-polar
Effect of increasing solvent polarity	Decreases retention time	Increases retention Time

ที่มา : Harris, D.C. 1996

TYPES OF REVESE PHASE PACKINGS

. C18

. C8

. PHENYL

. CN

. C4

ตารางที่ 12.2 คุณสมบัติทางกายภาพของตัวทำละลาย

POLARiTY SOLVENT INDEX	VISCOSITY $CP_2 20^{\circ}$	BOILING POINT.0°C(1atm)	MISCIBILTY NUMBER(M)	SOLVENT GROUP
-0.4 ISO-OCTANE	0.50	99.2	29	0
0.0 N-HEXANE	0.313	68.7	29	0
0.0 CYCLOHEXANE	0.98	80.7	28	0
2.3 TOLUENE	0.59	101.6	23	7
3.4 METHYLENE CHLORIDE	0.44	39.8	20	5
4.2 TETRAHYDROFURAN	0.55	66.0	17	3
4.3 ETHYL ACETATE	0.47	77.1	19	6
4.3 I-PROPANOL	2.30	97.2	15	2
5.2 ETHANOL	1.20	78.3	14	2
6.2 ACETONITRILE	0.37	81.6	11,17	6
6.2 ACETIC ACID	1.26	117.9	14	4
6.6 METHANOL	0.60	64.7	12	2
9.0 WATER	1.00	100.0	-	9

HPLC – Detector และ Recorder

เมื่อสารที่จะวิเคราะห์แยกออกมาจากคอลัมน์แล้วจะผ่านเข้าไปใน Detector ที่ใช้วัดความเข้มข้นของสารได้ การจะเลือกใช้ดีเทคเตอร์ชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่ต้องการจะวัดโดยมีหลักการโดยสรุปดังนี้

1. **UV – Visible detector** ใช้กับสารที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วง Ultraviolet และ / หรือช่วง Visible light เช่นสารพวก Aromatic compounds, COOH (acids), $CONH_2$ (amides), CONH – (peptide)

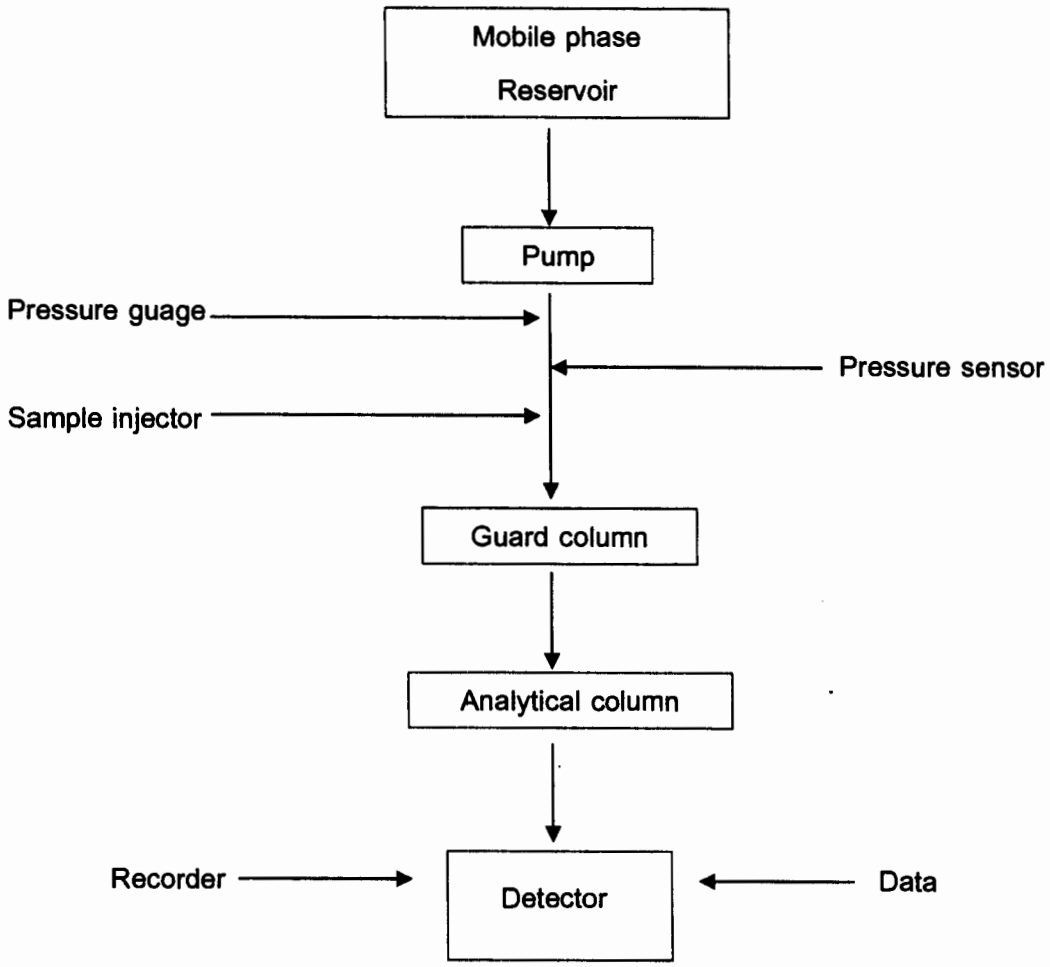
2. Fluorescence detector ใช้กับสารบางประเภทซึ่งเรืองแสงหรือเราสามารถทำสารนั้นเรืองแสงได้เช่น Polycyclic hydrocarbon, Aflatoxins, amino acids และวิตามินต่างๆที่เรืองแสงได้

3. Refractive index detector สารที่ไม่ดูดแสงมากนัก และไม่เรืองแสงด้วย เช่น Carbohydrates, fatty acids, lipids, polymers อาจวัดความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบดัชนีหักเห (Refractive index) ของของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาโดยใช้ นอกจากนี้ยังมี detector แบบอื่นๆ เช่น Electrochemical detector (ใช้ตรวจหาสารพวก Aromatic amines, Phenolic compounds), Conductivity detector ใช้ตรวจหาสารพวก inorganic ions เช่น Cl^-, SO_4^{2-}, Na^+ หรือถ้าสารที่แยกในคอลัมน์เป็นสารกัมมันตรังสีอาจวัดได้โดยเครื่องวัดรังสี โดยใช้ Radioactive detector เป็นต้น

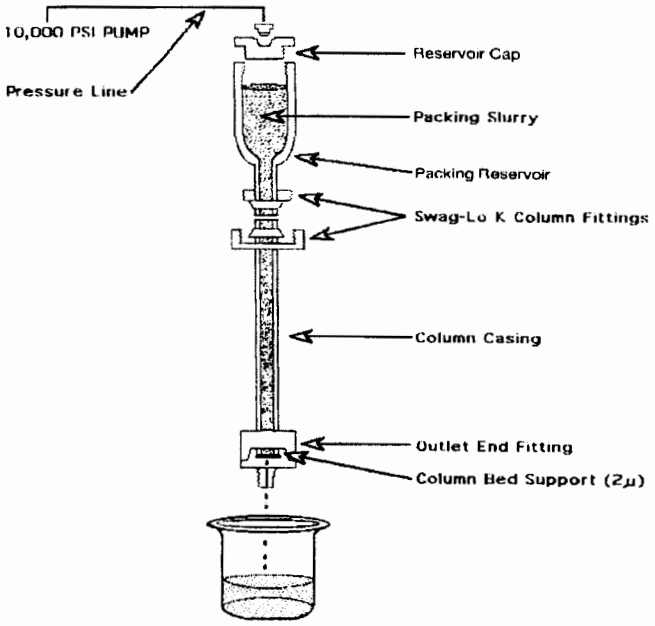
Recorder เป็นส่วนที่บันทึกผลที่ได้จาก detector โดยปรากฏเป็น peak area, peak height ของสารแต่ละตัวด้วย

องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

1. ภาชนะที่บรรจุ mobile phase
2. Degaser
3. ระบบปั๊ม ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ
   2.1 mechanical pump
   2.2 pneumatic pump
4. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน
5. อุปกรณ์ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC (injection)
6. อุปกรณ์ที่ใช้ทำ gradient elution
7. คอลัมน์
8. เครื่องตรวจวัด detector

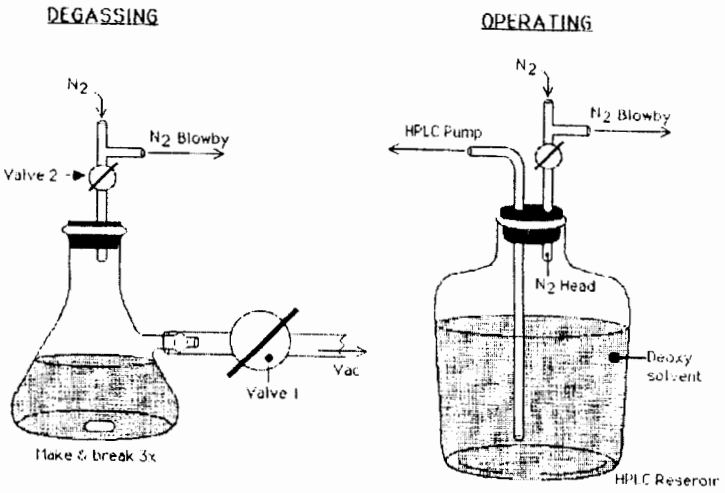


ภาพที่ 12.3 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



ภาพที่ 12.4 การบรรจุเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ใน HPLC

ที่มา : Marvin C. McMaster. HPLC; A Practiceal User's Guide



ภาพที่ 12.5 การไล่อากาศออกจากเฟสเคลื่อนที่

ที่มา : Marvin C. McMaster. HPLC ; A practical User's Guide

1. ภาชนะบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ mobile phase reservoir

เป็นภาชนะที่ใช้สำรับใส่สารตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในการวิเคราะห์ ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ส่วนใหญ่จะมีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร ภาชนะที่ใช้บรรจุเฟสเคลื่อนที่ก็คือต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่เฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนี้ยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหา (detector) ขณะทำการทดลอง

การเลือกวัฏภาคนิ่ง (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase/ Solvent) ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้แยกตัวอย่าง เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่วัฏภาคอยู่กัยที่ (stationary phase) ในที่นี้คือคอลัมน์และคอลัมน์ที่นิยมใช้คือ C18 reverse phase ชนิด silica end caped (type B) จะสามารถแยกสารโดยทั่วไปได้ดีอยู่แล้ว ส่วนวัฏภาคนิ่งควรใช้ น้ำกับ acetonitrile (เนื่องจาก acetonitrile มีค่าการดูดกลืนแสงยูวีและมีความหนืดต่ำทำให้สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำถึง 220 nm) หรือน้ำกับบัฟเฟอร์ที่พีเอชค่อนข้างเป็นกรดเพื่อลดการแตกตัวของ silanol group ของวัฏภาคนิ่ง

2. Degaser ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศใน mobile phase เพื่อป้องกันไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่คอลัมน์ และ detector ซึ่งจะขัดขวางการเดินทางของสารตัวอย่าง ทำให้เกิดผลเสียต่อการวิเคราะห์ การไล่ฟองอากาศ (แก๊สออกซิเจน) เพื่อป้องกันไม่ให้แก๊สออกซิเจนทำปฏิกิริยากับวัฏภาคเลื่อนที่และวัฏภาคอยู่กับที่ การไล่ฟองอากาศสามารถทำได้ 2 วิธี วิธีแรกคือนำ mobile phase ไปเข้าเครื่อง degas ก่อนนำมาใส่ในภาชนะบรรจุ mobile phase อีกวิธีในเครื่อง HPLC รุ่นใหม่จะมีเครื่อง degas ต่ออยู่ภายในเครื่องและทำงานอัตโนมัติ

3. ระบบของปั๊ม Pumping System

ในเครื่อง HPLC จะมีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคที่มีขนาดเล็กบรรจุอยู่ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคที่มีขนาดเล็กและคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กจึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันสูงเพื่อดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไปในระบบปั๊มแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

3.1 mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้มีค่าคงที่

3.2 pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้มีค่าคงที่

Mechanical Pumps หรือ Constant flow pumps แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

3.1.1 ปั๊มแบบกระบอกสูบ (Syringe pumps หรือ constant displacement pump) ปั๊มชนิดนี้มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ (cylinder) ซึ่งบรรจุตัวทำละลายไว้แล้ว มีก้านสูบ (plunger) ซึ่งจะเคลื่อนที่เป็นแบบสกรู ผ่านกล่องเกียร์ (gear box) โดยมี stepping motor เป็นตัวควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่โดยจะไปทำให้ก้านสูบเคลื่อนที่เร็วขึ้นหรือช้าลง

3.1.2 ปั๊มแบบชักลูกสูบ (reciprocating pumps)

ก้านสูบของปั๊มจะเคลื่อนที่เข้าออกตลอดเวลาการทำงาน เมื่อลูกสูบเคลื่อนที่เข้าไปจะไปดันเฟสเคลื่อนที่ให้เข้าสู่คอลัมน์ และเมื่อเคลื่อนที่ออกจะดึงเอาเฟสเคลื่อนที่ออกจากภาชนะที่ใส่เฟสเคลื่อนที่ เข้าลูกสูบผ่าน check valve การควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กระทำได้โดยปรับอัตราเร็วของการชักลูกสูบผ่านมอเตอร์และคอมพิวเตอร์

หลักการเลือกปั๊มเพื่อใช้กับ HPLC

1. สามารถใช้ได้ถึงความดัน 3,000 psi ถ้าความดันสูงกว่านี้จะทำให้คอลัมน์เสื่อม ความดันนี้จะขับเคลื่อนให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ขนาดเล็กขนาดยาว 30 ซม. ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็ก และอย่างน้อยต้องใช้ความดันได้ 500 psi
2. สามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ในปริมาตรมากๆ
3. ปั๊มและส่วนประกอบควรทำด้วยเหล็กไร้สนิมและทนต่อการสึกกร่อนของสารเคมี
4. สามารถให้เฟสเคลื่อนที่ไหลได้ถึง 3 มิลลิลิตร/นาที และคงที่

4. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices)

อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดันจะอยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์นี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าคอลัมน์ ความดันนี้จะเป็นสิ่งที่ชี้บอกว่ามีการอุดตันหรือไม่หรือการทำงานของปั๊ม ล้มเหลวหรือไม่ การทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับตัวแปร (parameter) ต่างๆเป็นไปได้อย่างเหมาะสมอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน ได้แก่ pressure transducer หรือ strain gauge, Bourdon tube หรือ Diaphram gauge

5. อุปกรณ์ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ injection (Sample Introduction Devices)

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์มีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้

สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปที่คอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ วิธีที่ง่ายที่สุดคือใช้วิธีฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย syringe และเข้าไปใน microsampling valve ควรต้องระมัดระวังเนื่องจากความดันภายในสูงถึง 5000-6000 psi ซึ่งmicrosampling valve สามารถทนความดันสูงได้ดี สารตัวอย่างสามารถใช้ได้ตั้งแต่ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร

6. อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำ Gradient Elution

การแยกโดยใช้ gradient elution หมายถึงการแยกภายใต้เงื่อนไขมาตรฐาน (standardized condition) เพื่อดูองค์ประกอบที่หลากหลายของสารและความยากง่ายในการแยกสารนั้นๆ ซึ่งโดยทั่วไปการแยกสารผสมที่ซับซ้อนวิธีที่สะดวกในการแก้ปัญหาคือการใช้ gradient elution ซึ่งเหมือนกับการทำ temperature programming ใน GC ทำได้โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ (ionic strength) สัดส่วนขององค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่, pH ของเฟสเคลื่อนที่จากรูปจะเห็นว่ารูป (a) เป็นแบบ isocratic elution , (b) เป็นแบบ isocratic elution ซึ่งจะเห็นได้ว่าช่วงแรกทำให้การแยกดีและใช้เวลาสั้นกว่าและให้ความไวที่ดีขึ้น แม้แต่สารบางตัวที่แยกไม่ออกด้วยวิธีการแบบ isocratic elution แต่เมื่อใช้ isocratic elution ก็สามารถแยกออกได้ สภาวะเริ่มต้นการทำ gradient elution เหมือนกับสภาวะเริ่มต้นในขั้นตอนการคัดเลือกคอลัมน์ แต่เปลี่ยน gradient time เป็น 5-100% solvent A ในเวลา 30 นาที และคงที่ที่ 100%A อีก 5 นาที และในการปฏิบัติการแต่ละครั้งเมื่อสิ้นสุดจะต้องรอให้คอลัมน์คงที่เหมือนสภาวะเริ่มต้นคือ 5%A

อุปกรณ์ที่ใช้กับ gradient elution ใน HPLC แบ่งได้เป็น

6.1 แบบ low pressure gradient

เป็นแบบที่ใช้ผสมตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศและต่อจากนั้นจะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

6.2 แบบ high pressure gradient

เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนเข้าสู่คอลัมน์

การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างที่ทำ gradient elution สามารถทำได้โดยการตั้งโปรแกรมเป็นแบบเส้นตรง

7. **คอลัมน์ หรือ stationary phase** มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase **ซึ่งมีจำกัดเฉพาะกลุ่ม**

7.1 Adsorotion (Normal phase) :Si / CN /NH_2

7.2 Partiition (Normal phase) : Si

7.3 Ion Exchange : Strong CX /AX

7.4 Bonded Phase (Reverse phase) : C18 /C8 / C6 /C2 / Phenyl 1 / CN /NH_2

โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์จะทำให้ retention time เปลี่ยนแปลง ซึ่งจะมีผลต่อ ionic sample มากกว่า neutral sample โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส จะทำให้ retention time ของ ionic sample เปลี่ยนไป 1-2% ดังนั้น เพื่อความสม่ำเสมอของ retention time ควรควบคุมอุณหภูมิให้คงที่

การเลือก mode of separation เมื่อรู้คุณสมบัติของสารที่ต้องการแยกด้วย HPLC จะต้องมีการเลือก mode คือ

1. Adsorotion (Normal phase)
2. Partiition (Normal phase)
3. Ion Exchange
4. Bonded Phase (Reverse phase)

8. **เครื่องตรวจวัด (Detector)**

เครื่องตรวจวัดสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

8.1 Bulk property หรือ general detectors

8.2 Solute property หรือ selective detectors

8.1 Bulk property detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของ mobile phase และตัวถูกละลาย เช่น refractive index detectors และ conductivity detectors

8.2 Solute property detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียว เช่น UV – VIS, fluorescence หรือ electrochemical detectors เป็นต้น

ยูวี – วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV – VIS Detectors)

หลักการทำงานของเครื่องตรวจหาชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เครื่องชนิดนี้จะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ปัจจุบัน ยูวี – วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น

Fixed–wavelength UV detector ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ประกอบด้วย flow – through cell และแหล่งกำเนิดแสง (light source) ที่ใช้เป็นแบบหลอดที่ทำด้วยปรอทที่ความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่เปล่งออกมา ความยาวคลื่น 254 nm โดยทำให้เป็นลำแสงด้วยเลนซ์ที่ทำด้วยควอทซ์ แล้วให้แสงนี้ผ่านเซลล์ของสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง นอกจาก mercury lamp แล้ว อาจ ใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่นได้แก่ Zn lamp (206nm) และ Cd lamp (214nm) สำหรับ D_2 lamp (Deuterium lamp) จะเปล่งแสงในช่วงยูวี (200-400nm) และบางช่วงของวิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่ใช้ฟิลเตอร์กรองแสง หรือใช้โมโนโครเมเตอร์ แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ จะใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp

Variable UV - VIS detector ประกอบด้วย D_2 และ W lamp (tungsten lamp) หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190-800 nm และมีโมโนโครเมเตอร์เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามต้องการได้สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป เพราะสามารถเลือกความยาวของคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดใช้ในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้โดยที่ตัวทำละลายหรือสารประกอบที่ปนอยู่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี

เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers) ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเหของแสง (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่องระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ bulk property หรือ general detector ดังนั้นจะใช้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกทำละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

ฟลูออเรสเซนซ์ดีเทคเตอร์ (Fluorescent detector) ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จะมีสภาพความไวสูงและเฉพาะ (selective) เนื่องจากมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น (exited) ด้วยแสงยูวีจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่านเครื่องกรองแสงหรือโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามที่ต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างออกที่มาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมา

ซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะซึ่งจะผ่านไปยังฟิลเตอร์หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการ ออกจากนั้นจึงให้แสงผ่านเข้าไปยังดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์

ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างโดย HPLC

การแยกสารตัวอย่างโดยHPLC ต้องผ่านขั้นตอนต่างๆคือ การเลือกปริมาณตัวอย่าง column, detector, solvent (mobile phase), flow rate

1. เมื่อเลือก column และเตรียมจาก solvent จากนั้น run ที่ flow rate 1 ml/ min เพื่อไล่ฟองอากาศออก ทำจนค่า absorbance คงที่
2. เตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ฉีดเข้าไปที่ละตัวและบันทึกค่า
3. retention time ถ้าสารมาตรฐานยังไม่ออกจากคอลัมน์ให้เปลี่ยนความเข้มข้นของ mobile phase
4. ถ้าสารมาตรฐานยังไม่ออกจาก columnภายใน 30 นาที ให้เปลี่ยนคอลัมน์ ที่มี polarity ต่างกัน
5. ถ้าสารมาตรฐานออกเร็วไปและไม่แยกจากกันให้เปลี่ยนแฟคเตอร์ต่างๆดังนี้คือ
   5.1 Flow rate
   5.2 Solvent composition
   5.3 ชนิดของ mobile phase
   5.4 เปลี่ยนคอลัมน์เป็นชนิดต่างๆ

การทำคุณภาพวิเคราะห์ (Quanlitative Analysis)

จุดประสงค์ที่สำคัญของการทำโครมาโตรกราฟีก็เพื่อจะวิเคราะห์สารตัวอย่างว่าเป็นสารอะไรมีกี่ชนิดและเป็นสารอะไรบ้าง โดยทั่วไปในการวิเคราะห์จะใช้วิธีเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน โดยเริ่มต้นด้วยการวิเคราะห์สารตัวอย่างเสียก่อนจนได้การแยกที่ดี แล้วจึงใช้สารมาตรฐานวิเคราะห์ที่สภาวะเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบ

การทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis)

ใช้การคำนวณพื้นที่พีกหรือความสูงของพีก

1. ความสูงของพีก (Peak height)

ความสูงของพีก (h) ที่ได้จากสัญญาณไฟฟ้าของดีเทคเตอร์นั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเซลล์จึงสามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้

2. การวัดพื้นที่ของพีก (Peak area measurement)

การใช้พื้นที่พีกเพื่อนำไปหาปริมาณของสารตัวอย่างนั้น ได้จากการอาศัยความจริงที่ว่าปริมาณสารหรือความเข้มข้นของสารจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับพื้นที่พีก การหาพื้นที่สามารถทำได้หลายวิธีในแต่ละเทคนิคจะให้ความเที่ยงตรงที่ต่างกัน วิธีวิเคราะห์ใช้การทำ calibration curve จากสารมาตรฐานที่ให้ความเข้มข้นต่างๆกันกับความสูงของพีกหรือพื้นที่พีก การหาปริมาณของสารตัวอย่างการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะเดียวกับสารมาตรฐาน ความสูงพีกหรือพื้นที่พีกนำไปอ่านจาก calibration plot ได้เลย

การประยุกต์ใช้ HPLC ในอุตสาหกรรมอาหาร

1. วิเคราะห์หาวิตามินทั้งที่อยู่ในรูป water soluble vitamins และ fat – soluble vitamin
2. วิเคราะห์หาอะมิโนแอซิดในอาหาร
3. วิเคราะห์ โปรตีนในอาหาร
4. วิเคราะห์ ไขมันในอาหาร
5. วิเคราะห์ คาร์โบไฮเดรด
6. วิเคราะห์ สารอินทรีย์ในอาหาร
7. วิเคราะห์หา Mycotoxins ใน เมล็ดธัญพืช
8. วิเคราะห์หา Food additives และ Food preservatives
9. วิเคราะห์หายาฆ่าแมลง ในอาหาร
10. วิเคราะห์หาสารที่ให้ความขมในอาหาร, Phenolic compounds ในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์
11. วิเคราะห์หา Organic bases
12. วิเคราะห์หา N – Nitroso compounds ในอาหารและเครื่องดื่ม
13. วิเคราะห์หา Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
14. วิเคราะห์หา Anion และ Cations ในอาหาร
15. การวิเคราะห์เพื่อแยกการตรวจสอบหาชนิดขององค์ประกอบต่างๆ ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Internal Standard สิ่งที่ต้องพิจารณา

1. สารที่จะใช้เป็น internal standard จะต้องไม่เป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบหรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง

2. Internal standard จะต้องเป็นสารบริสุทธิ์

3. สารที่เป็น internal standard จะต้องแยกออกจากสารตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์

4. Internal standard ที่เติมลงไปควรมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณ

5. Internal standard จะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง

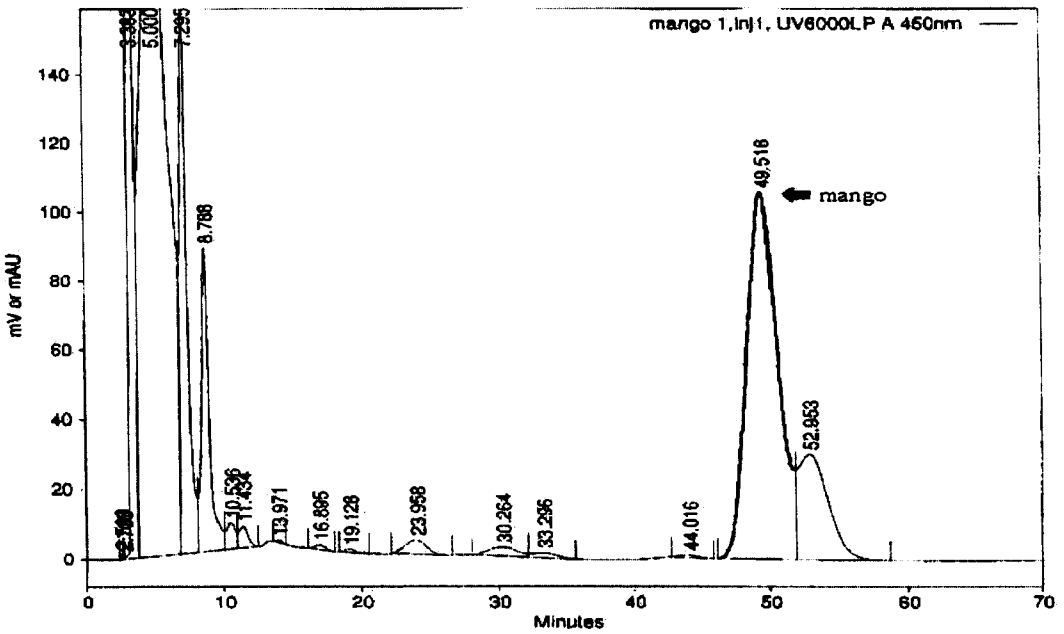
6. Internal standard ที่ใช้ควรจะต้องเป็น linear relation ในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์

Internal standard ที่นิยมใช้มี 3 วิธีคือ

1. Classical Method โดยชั่งสารมาตรฐานที่รู้น้ำหนักแน่นอน ผสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

2. Stock Solution Method ใช้ได้ดีเมื่อสารตัวอย่างทำการวิเคราะห์สม่ำเสมอ สามารถเตรียมสารมาตรฐานไว้ใช้ได้หลายครั้ง เมื่อจะใช้ก็นำมาเจือจางตามที่คำนวณไว้

3. Calibration method โดยเตรียมสารมาตรฐานหลายความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์หาพื้นที่ หลังจากนั้นก็เขียนกราฟมาตรฐานขึ้นมาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่และความเข้มข้น เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่างต่อไป



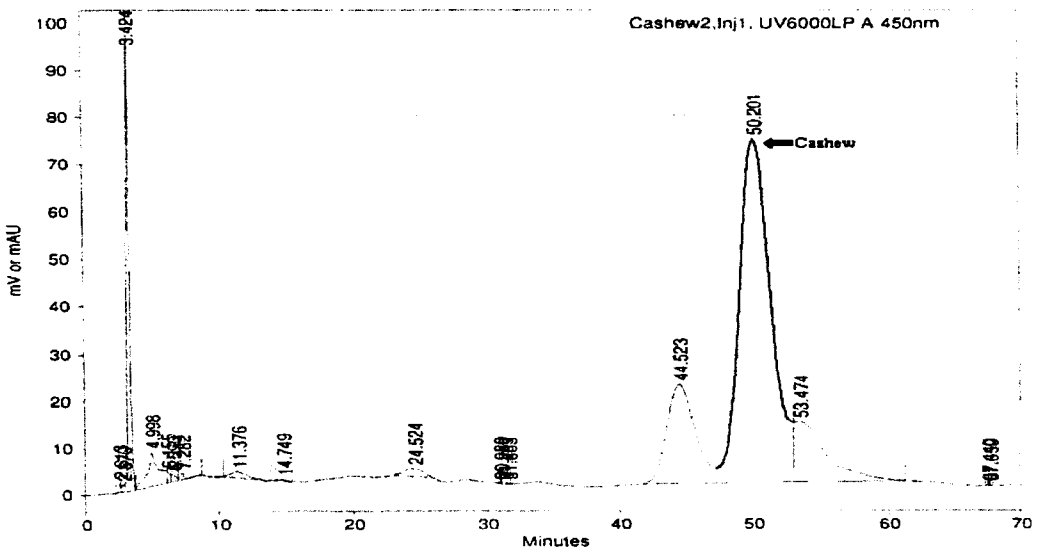
ภาพที่ 12.6 แสดง โครมาโทแกรมของ ß carotene จากมะม่วงโชคอนันต์
ที่มา : วิเคราะห์โดย เครื่อง HPLC model Thermo Separation products

Column : 10 μm C-18 bonded phase, 30 cm × 4 mm

Mobile phase : CH_3OH 100%

Flow rate 1 ml / min

Detector : Uv absorption, 254 nm



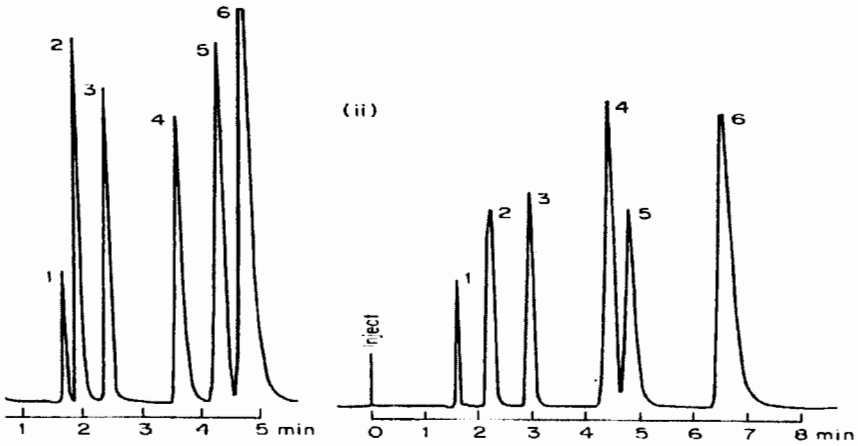
ภาพที่ 12.7 แสดงโครมาโทแกรมของ ß carotene จากมะม่วงหิมพานต์
ที่มา : วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC model Thermo Separation Products

Column : 10 μm C-18 bonded phase, 30 cm × 4 mm

Mobile phase : CH_3OH 100%

Flow rate 1 ml / min

Detector : Uv absorption, 254 nm



ภาพที่ 12.8 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมเมื่อเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

ที่มา : Marvin C. McMaster. HPLC: A practical User's Guide

Column : 10 μm C-18 bonded phase, 30 cm × 4 mm

Mobile phase : CH_3OH/H_2O 50:50 both containing 0.005 Mol dm^{-3} pentane sulphonic acid pH 2.5

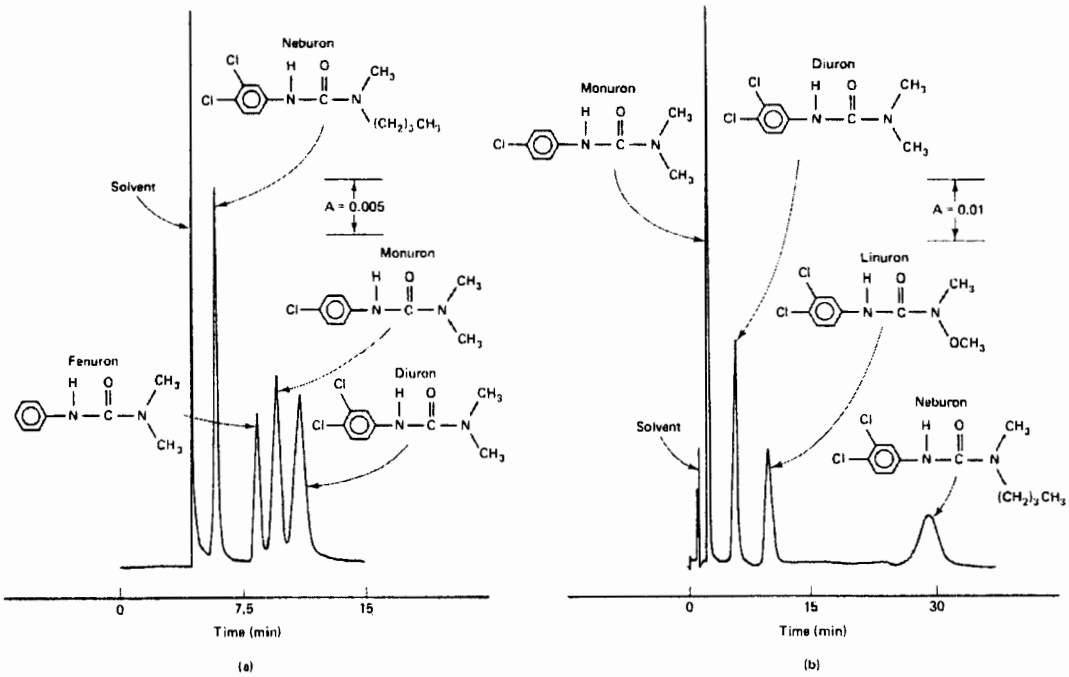
Flow rate 2 cm^3 min^{-1}

Detector : Uv absorption, 254 nm

Sample : 1 = maleic acid 2 = phenylephrine

3 = norephedrine 4 = naphazoline

5 = phenacetin 6 = pyrilamine



ภาพที่ 12.9 การเปรียบเทียบchromatogram ของ urea เมื่อใช้ mobile phase ต่างกัน

(a) nonpolar mobile phase 0.1% dioxane in hexane

(b) polar mobile phase 35% methanol in water

ที่มา : Larry G. Hargis, (1988)

ตัวอย่างการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในเครื่องดื่มชนิดหนึ่ง

คอลัมน์ : 8 x100 mm μ-Bondapak C18 (a reverse phase column)

วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) 0.5% phosphoric acid in 40% aqueous methanol

Detector : UV detector

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมเครื่องมือ

1. กรองวัฏภาคเคลื่อนที่และสารละลายตัวอย่างผ่านเครื่องกรองซึ่งใช้ membrane ขนาด 0.4-0.5 ไมครอน
2. ปรับความดันในเครื่อง HPLC เริ่มต้นที่ 800 psi

3. ปรับ flow rate วัฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตร/ นาที

4. เปิด UV detector

5. หมุน injector lever ไปที่ load

การวิเคราะห์สารมาตรฐาน

1. ไปเปตสารละลาย m-methoxybenzoic acid 1.00 mM จำนวน 5.0 มิลลิลิตร (inter nal standard), 0.200 mM caffeine และ 1.00 mM benzoic acid ในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและกรอง

2. inject สารละลาย 50 มิลลิลิตร

3. ใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมด 15 นาที

4. จดค่า peak area, relative area และ molar response ratio ของสารที่ inject เข้าในเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

1. ไปเปตเครื่องดื่มตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 5 มิลลิลิตร นำไปกรอง

2. เติม internal standard 5.00 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและกรอง

3. inject สารละลายตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร

4. จดค่า peak are, relative area และ molar response ratio ของสารที่ inject เข้าในเครื่อง HPLC

5. คำนวนความเข้มข้นของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน หน่วยเป็นกรัม/ ลิตร