บทที่ 13
ลิควิดโครมาโทกราฟี
(Liquid Chromatography)

ในปี ค.ศ. 1906 Michael Tswett นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซียได้ค้นพบวิธีการทางโครมาโทกราฟี เมื่อเขาพยายามที่จะแยกสีจากพวกใบของพืช โดยผ่านสารละลายที่ได้จากการสกัดใบไม้ลงไปในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) สีแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบของใบไม้จะเคลื่อนผ่านไปตามคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน และผลสุดท้ายจะแยกออกจากกัน เกิดเป็นแถบสีแตกต่างกันเป็นชั้น ๆ ดังนั้น คำว่า "chromatography" ซึ่งมาจากคำว่า "chroma" ซึ่งหมายถึงสี รวมกับคำว่า "graphy" ซึ่งแปลว่า การเขียน

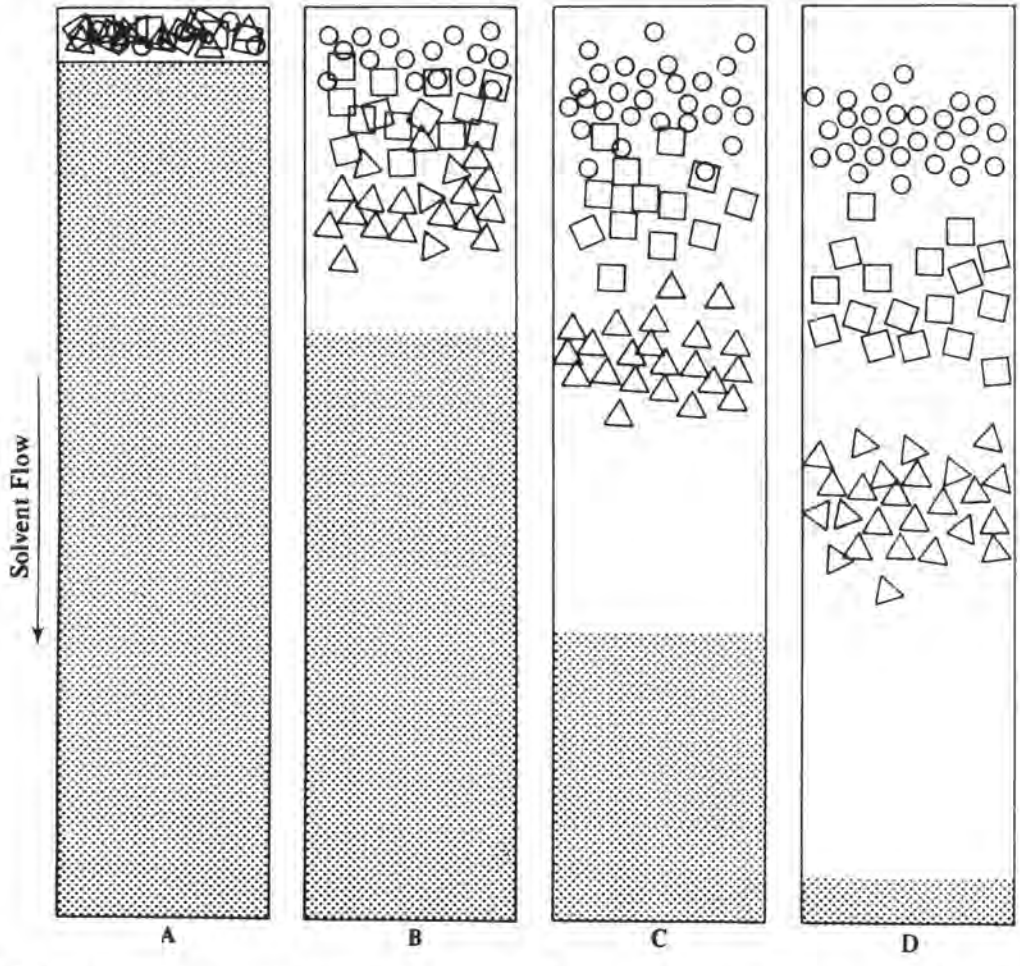
ในปี ค.ศ. 1941 ได้มีการพัฒนาวิธีการทางโครมาโทกราฟีที่สำคัญขึ้นมาวิธีหนึ่งคือ Liquid-Liquid (Partition) Chromatography โดย Martin และ Synge แทนที่จะใช้ตัวดูดซับเป็นของแข็ง เขาได้ใช้ลิควิดเฟสเคลือบบนผิวของตัวดูดซับ และลิควิดเฟสนี้จะต้องไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับเฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) สารประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่างจะเกิดการพาร์ทิชัน (partition) ระหว่างเฟสทั้งสอง จากผลงานนี้ Martin และ Synge ได้รับรางวัลโนเบล (Nobel prize) สาขาเคมี ในปี ค.ศ. 1952

ในระยะเริ่มต้นของคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) การแยกสารที่มีปริมาณน้อยนั้นทำได้ยาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาทาง Paper Chromatography ซึ่งบางครั้งเรียกรวมว่า Planar Technique การแยกสารประกอบนั้นทำได้โดยใช้แผ่นกระดาษกรอง ซึ่งกลไกของการแยกจะเป็นแบบ partition ข้อดีของวิธีการนี้ส่งผลให้มีการพัฒนาเป็น Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งการแยกสารจะทำบนแผ่นบางของตัวดูดซับ (adsorbent) เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือวัสดุที่แข็งอย่างอื่น ๆ เช่น พลาสติก TLC ได้รับความนิยมมาก หลังจากงานของ Stahl ในปี ค.ศ. 1958 ซึ่งได้ทำการพัฒนาวิธีการและวัสดุที่ใช้ให้มีมาตรฐาน สำหรับการแยกสารซึ่งเป็นพวกสารประกอบที่มีประจุโดยวิธีทาง Paper Chromatography (PC) และ TLC ให้ดีขึ้นนั้น ทำได้โดยการผ่านสนามไฟฟ้าคร่อมบนกระดาษหรือแผ่น TLC วิธีการนี้เราเรียกว่า paper และ thin layer electrophoresis ตามลำดับ

ในปัจจุบันนี้ได้มีวิธีการแยกแบบใหม่ซึ่งเป็นที่สนใจกันมาก คือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเช่นเดียวกับ Gas Chromatography

13.1 หลักการขั้นพื้นฐานของลิควิดโครมาโทกราฟี (Basic Principles of Liquid Chromatography)

หลักการขั้นพื้นฐานของลิควิดโครมาโทกราฟี อาจทำให้เข้าใจได้ง่ายขึ้นโดยการพิจารณาถึงการแยกสารละลายผสมที่ประกอบด้วยสารสามชนิดด้วยกันในคอลัมน์ปิด (closed column) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก ๆ ที่มีรูพรุนเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดยาวเล็ก ๆ เรียกว่า คอลัมน์



รูปที่ 13.1 แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด โดยสมมติให้สาร A เป็น △, สาร B เป็น □, สาร C เป็น ○ พื้นที่ที่เป็นจุด ๆ แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะล้าง

จากรูปที่ 13.1 แสดงให้เห็นถึงกระบวนการทางโครมาโตกราฟี สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนบนของคอลัมน์ดังรูปที่ 13.1A เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์ สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับ (desorption) บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ผลที่ตามมาคือสารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลง และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ

(affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อมันผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ

$$X_m \rightleftharpoons X_s \qquad \text{---------(13.1)}$$

X_m ใน mobile phase X_s ใน stationary phase

ค่า distribution coefficient สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการข้างบน คือ

$$K_x = [X]_s/[X]_m = \text{คงที่} \qquad \text{---------(13.2)}$$

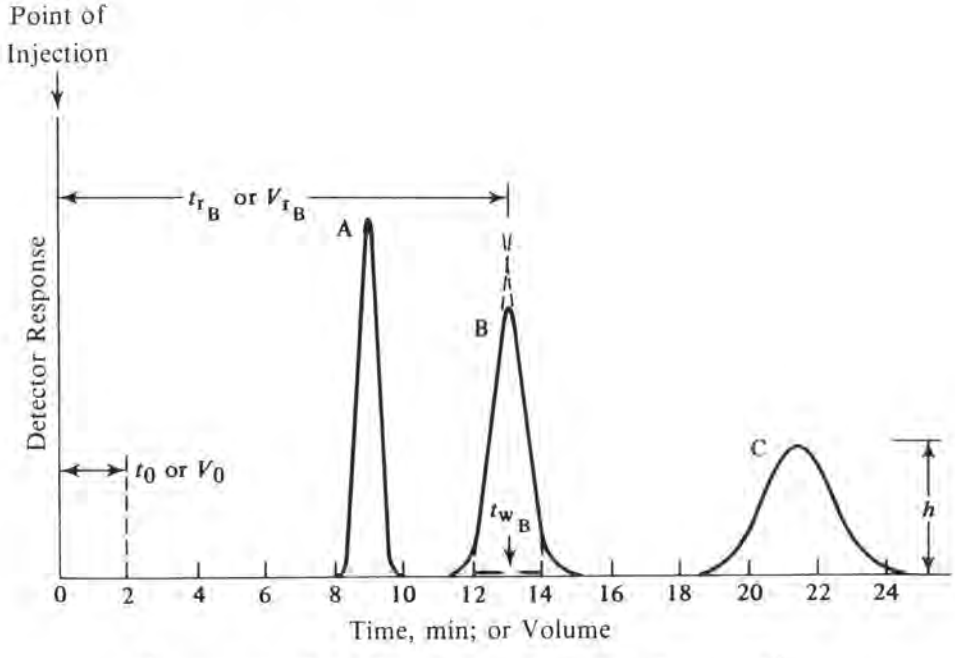
K_x = distribution coefficient ของสาร X

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

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

ถ้า K_x มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบที่จะละลายในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น สารประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า ถ้า K_x มีค่าน้อย สารประกอบนี้ก็จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว

ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบจะมีผลทำให้เกิดการแยกสารประกอบนั้นในคอลัมน์ ใน elution chromatography สารประกอบซึ่งถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป ถ้าเราทำการวัดความเข้มข้นของสารประกอบแต่ละชนิดที่ผ่านออกมา



รูปที่ 13.2 แสดงโครมาโทแกรมของการแยก 3 ชนิด จากรูปที่ 13.1

จากคอลัมน์ และนำค่านี้ไปเขียนกราฟ (plot) กับปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ กราฟที่ได้คือ โครมาโทแกรม ระยะแรกของการศึกษาทางลิควิดโครมาโทกราฟีนั้น จะเก็บปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่แล้วนำมาวัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายได้โดยใช้วิธีที่เหมาะสม เช่น ใช้วิธีทางสเปกโทรโฟโตเมตรี แต่ปัจจุบันนี้สามารถที่จะวัดส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่องโดยใช้ดีเทคเตอร์ (detector) ซึ่งอาจเป็นการวัดสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของตัวถูกละลายหรือของเฟสเคลื่อนที่ รูปที่ 13.2 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมของสารละลายซึ่งประกอบด้วยสารประกอบ 3 ชนิด

ลิควิดโครมาโทกราฟีที่ใช้ในการแยกสารนั้น สามารถจำแนกออกได้อย่างกว้าง ๆ ตามกลไกของการแยกโดยอาศัยเฟสเป็นตัวกำหนด มีดังต่อไปนี้

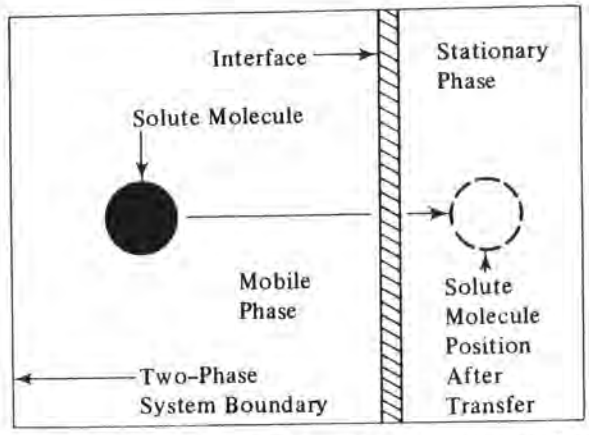
1. Adsorption Chromatography
2. Liquid-Liquid (Partition) Chromatography
3. Ion Exchange Chromatography
4. Size Exclusion Chromatography

13.1.1 **Adsorption Chromatography**

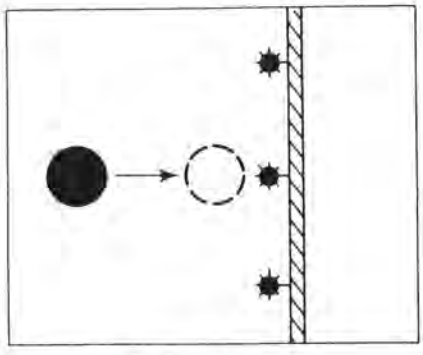
Adsorption Chromatography นั้นคือ Liquid-Solid Chromatography หลักการของการแยกสารนั้นอาศัยการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ที่ต่างกันระหว่างสารกับตำแหน่งซึ่ง active บนผิวของตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ ตัวดูดซับนั้นอาจจะถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์หรือเคลือบอยู่บนเพลท หรือซึมเข้าไปในส่วนของกระดาษที่มีรูพรุน ตัวดูดซับโดยทั่วไปแล้วจะเป็นของแข็งที่มีรูพรุนและมีพื้นที่ผิวมาก เช่น ผง silica gel, alumina หรือถ่าน (charcoal) ตำแหน่งที่ active เช่น silanol group ที่อยู่บนผิวของ silica gel โดยทั่วไปแล้ว สามารถเกิดอันตรกิริยาได้กับสารประกอบที่มีฟังค์ชันนัลกรุ๊ปที่มีขั้ว (polar functional group) ส่วนของ non-polar ที่อยู่ในโมเลกุลนั้นจะมีอิทธิพลต่อการแยกสารน้อยมาก ดังนั้น Liquid-Solid Chromatography (LSC) จึงมีความเหมาะสมมากสำหรับการแยกสารประกอบที่มีขั้ว (polar) เช่น การแยกสารประกอบพวก alcohol ออกจาก aromatic hydrocarbon ดังแสดงในรูปที่ 13.3B

13.1.2 **Partition Chromatography**

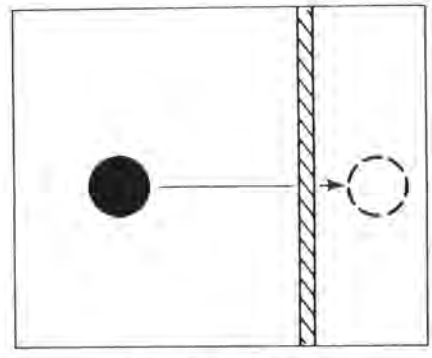
ใน Partition Chromatography ดังแสดงในรูปที่ 13.3C ซึ่งบางครั้งจะเรียกว่า "Liquid-Liquid Chromatography" ก็ได้ หลักการแยกสารโดยวิธีนี้นั้นอาศัยหลักการที่ว่า โมเลกุลของสารประกอบจะกระจายตัวของมันเองระหว่างเฟสทั้งสองที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน คือเฟสที่อยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน เฟสที่อยู่กับที่จะกระจายเป็นฟิล์มบาง ๆ บนผิวของ inert support ซึ่งในที่นี้อาจจะใช้อนุภาคซึ่งเป็นของแข็งที่มีรูพรุนหรือไม่มีรูพรุนก็ได้ หรืออาจจะใช้เป็นพวกกระดาษที่มีรูพรุนเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เฟสทั้งสองละลายซึ่งกันและกัน ดังนั้น เฟสทั้งสองจะต้องเลือกจากของเหลวที่มีสภาพขั้ว (polarity) แตกต่างกันมาก ๆ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีขั้ว (polar) จะต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่ไม่มีขั้ว (non-polar) สารประกอบที่มีขั้วจะถูกยึด (retain) อยู่กับเฟสอยู่กับที่อย่างแน่น เทคนิคนี้คือ normal phase chromatography แต่ถ้าเฟสอยู่กับที่มีสภาพที่ไม่มีขั้ว เฟสเคลื่อนที่จะต้องมีขั้ว สารประกอบที่มีขั้วจะชอบเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบดังกล่าวจะถูกชะล้าง



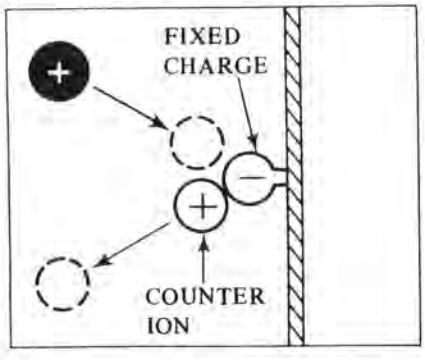
A. Transfer of Solute to a Generalized Stationary Phase



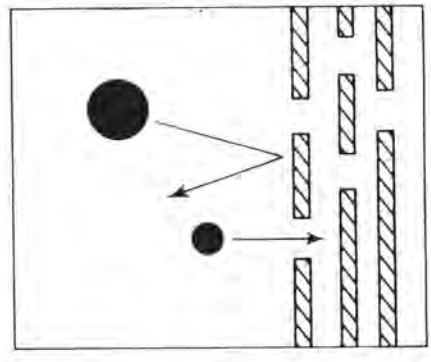
B. Liquid-Solid



C. Liquid-Liquid



D. Ion-Exchange



E. Exclusion

รูปที่ 13.3 แสดงวิธีการต่าง ๆ 4 แบบ ของลิควิดโครมาโทกราฟี

ออกมาอย่างรวดเร็ว และเทคนิคนี้ก็คือ reverse-phase chromatography (RPC) ซึ่งเหมาะในการนำมาใช้แยกสารประกอบพวก homologs และ isomers

ในปัจจุบันนี้อนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ (packing) ที่นิยมใช้ใน LLC อย่างกว้างขวาง จะเป็นการนำเอาเฟสอยู่กับที่ไปทำให้เกิดพันธะทางเคมีกับวัสดุหรืออนุภาคที่ใช้เป็นตัว support ซึ่งอนุภาคชนิดนี้เรียกว่า "Bonded-Phase" มากกว่าการใช้ของเหลวเคลือบบนผิวของ inert support วิธีการนี้เรียกว่า Bonded-Phase Chromatography (BPC) สำหรับกลไกในการแยกยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตาม กลไกที่ใช้ในการแยกสารโดยวิธีการนี้จะประกอบไปด้วยการดูดซับ และการ partition ซึ่งจะขึ้นอยู่กับเงื่อนไขของการทดลอง วิธีการแยกสารโดย BPC นี้นิยมใช้กันมากใน HPLC

13.1.3 Ion-Exchange Chromatography

Ion-exchange Chromatography ดังแสดงในรูปที่ 13.3D หลักการของการแยกสารจะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของไอออนในสารละลายกับไอออนที่มีประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่ที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ ion exchanger ประกอบด้วยของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งปกติแล้วจะเป็นพวกเรซิน (resin) ที่มี ionic group ต่ออยู่ด้วยพันธะทางเคมี เฟสเคลื่อนที่ปกติแล้วจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งประกอบด้วย counter ion ที่มีประจุตรงกันข้ามกับ group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่บรรจุอยู่ นั่นก็คือ ไอออนในเฟสเคลื่อนที่จะมีประจุเหมือนกับไอออนที่ต้องการแยก ซึ่งไอออนดังกล่าวนี้จะรวมกับ group ที่อยู่บนผิวของเรซินในลักษณะเป็น ion pair เพื่อทำให้ประจุทั้งหมดอยู่ในสภาวะสมดุล การแข่งขันกันระหว่างไอออนในสารละลายกับ counter ion เพื่อเข้าครอบครองตำแหน่งที่มีประจุบนผิวของเรซินจะมีผลทำให้เกิดการยึดเกาะขึ้น ion exchange chromatography จะถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในวิชาอินทรีย์เคมี เพื่อใช้แยกพวกไอออนของโลหะ และยังใช้ประโยชน์ในการแยกสารประกอบทางชีวภาพ (biological sample) ที่ละลายในน้ำได้อีกด้วย เช่น แยกพวกโปรตีน (protein) และกรดอะมิโน (amino acids) เป็นต้น

13.1.4 Size Exclusion Chromatography

Size Exclusion Chromatography กลไกของการแยกด้วยเทคนิคนี้ดังแสดงในรูปที่ 13.3E และแบ่งออกได้เป็น

1) Gel Permeation Chromatography (GPC)

2) Gel Filtration Chromatography (GFC)

เฟสอยู่กับที่ควรจะมีความเฉื่อยทางเคมี กลไกการแยกสารโดย size exclusion chromatography นั้นจะเกี่ยวข้องกับการที่สารจะถูกเลือกให้แพร่ผ่านรูพรุนของ packings ที่มีลักษณะเป็น network 3 มิติ และ packings นี้อาจจะเป็นพวก gel หรือของแข็งที่มีรูพรุน ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ การที่สารจะถูกยึดเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์นานหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล เมื่อเทียบกับขนาดของรูของอนุภาคที่ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ โมเลกุลเล็กสามารถที่จะแพร่ผ่านเข้าไปในรูที่เล็ก โมเลกุลที่มีขนาดกึ่งกลางไม่ใหญ่มากนักจะแพร่ผ่านได้เฉพาะบางส่วนของรูที่อยู่ในอนุภาคเท่านั้น และจะถูกกีดกันจากรูที่เล็กมาก ๆ สำหรับโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่มากจะถูกกีดกันออกไป และไม่สามารถแพร่เข้าไปในรูได้ ดังนั้น โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่

จะเดินทางเร็วมาก และจะออกมาจากคอลัมน์เป็นพวกแรก ดังนั้น size exclusion chromatography จะมีประโยชน์มากสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น polymer และ biopolymers ออกจากโมเลกุลเล็ก ๆ

13.2 ทฤษฎีสัมพันธ์กับภาคปฏิบัติ (Theory Related to Practice)

การพิจารณาทางทฤษฎีจะเป็นเครื่องชี้แนะที่มีประโยชน์อย่างมากในทางปฏิบัติ จุดมุ่งหมายของโครมาโทกราฟีคือการแยกสารในระยะเวลาพอสมควร และอาจนำไปสู่การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณได้อีกด้วย

13.2.1 Retention

การแยกจะประสบผลสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ ดังนั้น จากนิยามของ distribution coefficient (K_x) ก็คือ การวัดลำดับของสาร X ที่จะถูกยึดหรือทำให้เคลื่อนที่ได้ช้าลง ในทางปฏิบัติแล้ว ค่า capacity factor (k') จะเป็นค่าที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้มากกว่า และสามารถที่จะหาได้โดยตรงจากโครมาโทแกรม ซึ่งสมการของค่า k' เป็นดังนี้

$$k' = \frac{\text{จำนวนโมลทั้งหมดของสาร} \times \text{ในเฟสคงที่}}{\text{จำนวนโมลทั้งหมดของสาร} \times \text{ในเฟสเคลื่อนที่}}$$

$$= \frac{V_s [X]_s}{V_m [X]_m} = \frac{V_s}{V_m} K_x \qquad \text{----------(13.3)}$$

เมื่อ V_s = ปริมาตรของเฟสคงที่ในคอลัมน์

V_m = ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์

$[X]_s$ = ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสคงที่

$[X]_m$ = ความเข้มข้นของสาร X ในเฟสเคลื่อนที่

K_x = ค่าคงที่คือ distribution coefficient ของสาร X

สมการพื้นฐานสำหรับกระบวนการโครมาโทกราฟีที่แสดงความสัมพันธ์ของค่า retention volume (V_r) กับค่าอื่น ๆ คือ

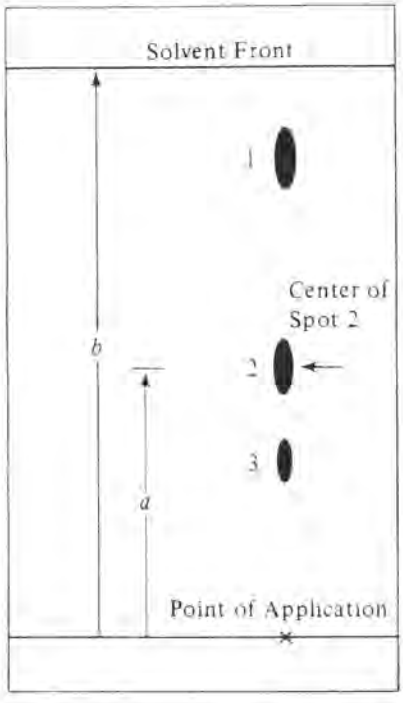
$$V_r = V_m(1 + k'_x) = V_m + V_s K_x \qquad \text{----------(13.4)}$$

ค่า V_r หาได้จากโครมาโทแกรม เนื่องจาก $V_r = Ft_r$ ในที่นี้ F คืออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mL/min), t_r คือ peak retention time และ V_m ก็คือ void volume (dead volume หรือ interstitial volume) โดยที่ t_o คือเวลาที่โมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกฉีดเข้าไปหรือสำหรับสารที่ไม่ถูกยึดเกาะเดินทางผ่านไปในคอลัมน์ และ V_m ก็คือปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์ในช่วงเวลาที่กำหนดให้ จากการแทนค่า

V_m และ V_r ในสมการข้างบน และเมื่อจัดสมการใหม่ จะได้สมการที่มีประโยชน์มากสำหรับใช้หาค่า capacity factor

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o} \qquad \text{----------(13.5)}$$

ใน TLC และ PC ลำดับของการยึดเหนี่ยวสาร คือ ค่า R_f-value ซึ่งค่านี้ให้นิยามว่าเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ รูปที่ 13.4 แสดงวิธีการคำนวณหาค่า R_f – value โดยปกติแล้วการคำนวณหาระยะทางให้วัดจากจุดกึ่งกลางของจุด



รูปที่ 13.4 แสดงถึงการหาค่า R_f จาก paper หรือ thin-layer chromatogram ค่า R_f ของสาร 2 มีค่า $= \frac{a}{b}$

13.2.2 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Column Efficiency)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถพิจารณาได้จากอัตราการขยายตัวของแถบ (band) ให้กว้างขึ้น เมื่อแถบนี้หรือตัวถูกละลายนี้เคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ หรือเคลื่อนที่ไปตาม plate หรือกระดาษดังแสดงในรูปที่ 13.1 โมเลกุลทุกตัวจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน การกระจายของโมเลกุลจะอยู่ในลักษณะเป็นรูป gaussian จุดกึ่งกลางของแถบนั้นก็คือ k′-value ของสารแต่ละชนิด ซึ่งหมายถึงอัตราเร็วโดยเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลนั้น และถ้าเกิดการเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ยเล็กน้อยจะเป็นผลเนื่องมาจาก nonequilibrium effect ระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ของสารประกอบนั้น ซึ่งเรียกว่า "resistance to mass transfer" การไหลของโมเลกุลในระยะทางที่แตกต่างกันจะมีสาเหตุมาจากลักษณะของอนุภาคที่ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ และอีกสาเหตุหนึ่งคือการแพร่ในแนวการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ค่าที่ใช้ในการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือจำนวน theoretical plates (N) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากโครมาโทแกรมโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$N = 16 (t_r/W)^2$$

$$= 5.54 (t_r/W_{1/2})^2$$

เมื่อ t_r = retention time

W = ความกว้างของฐานพีก (หน่วยเดียวกันกับ t_r)

$W_{1/2}$ = ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

ความกว้างของฐานพีกหาได้จากการลากเส้นสัมผัสมาตัดเส้น base line ระยะทางระหว่างจุดที่ตัดทั้งสองก็คือความกว้างของฐานพีก theoretical plate model ได้มาจากทฤษฎีของการกลั่นโดยตั้งสมมติฐานว่าคอลัมน์ได้จากการนำเอา plates มาประกอบกันเข้า แต่ละ plate จะเกิดสมดุลของการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นค่า N ยิ่งมีค่ามาก ประสิทธิภาพในการแยกก็จะดีตามไปด้วย

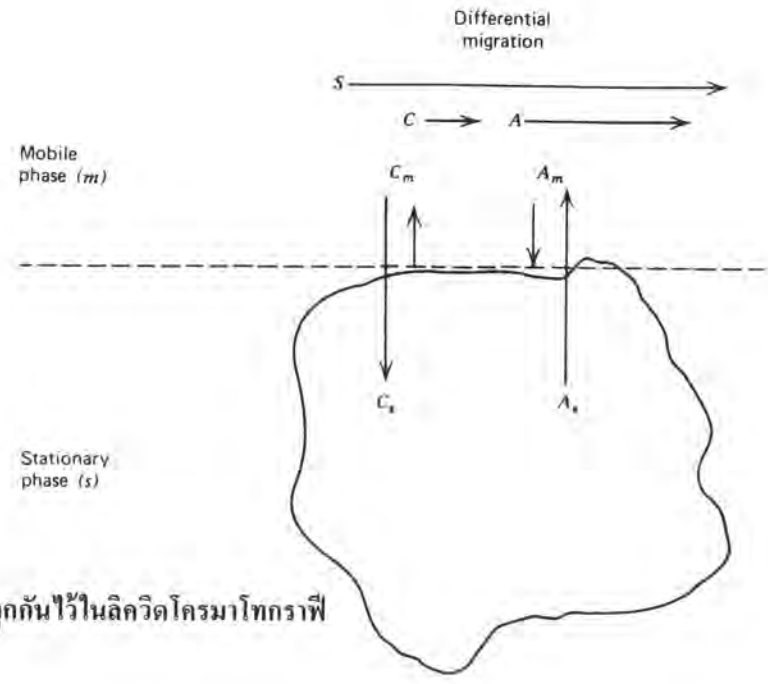
พารามิเตอร์ (parameter) ที่มีประโยชน์อีกตัวที่ใช้ในการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ คือ height equivalent to a theoretical plates (HETP) สมการต่อไปนี้เป็นการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า H (HETP) กับค่าอื่น

$$H = L/N$$

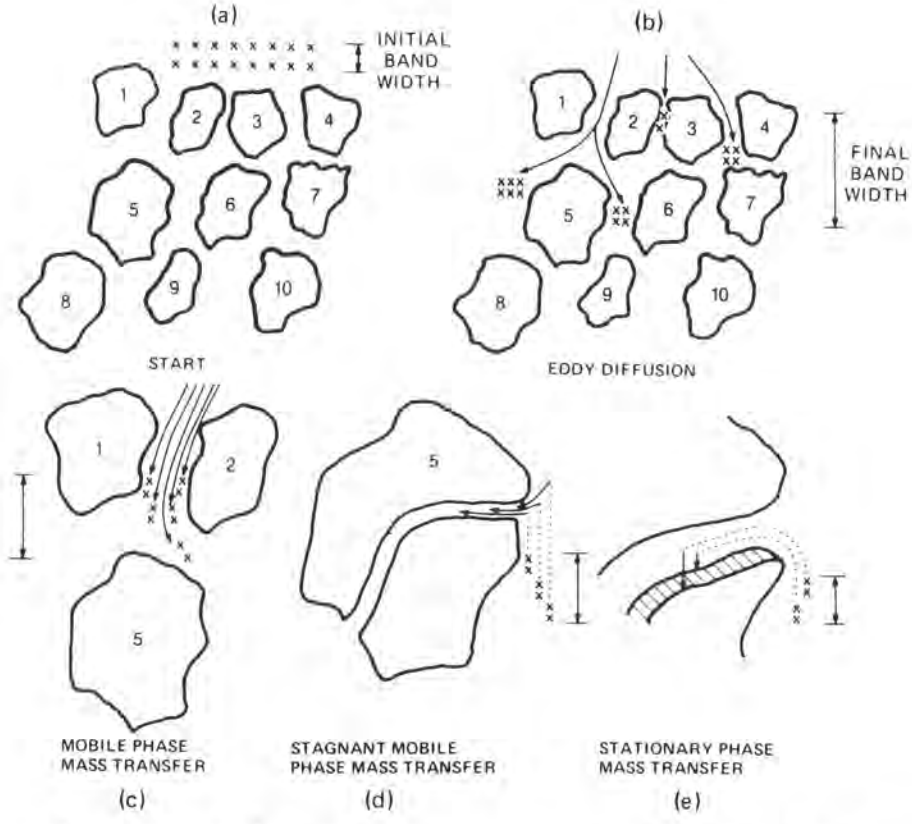
เมื่อ L = ความยาวของคอลัมน์

ดังนั้น คอลัมน์ที่มีค่า H ต่ำ จะดีกว่าคอลัมน์ที่มีค่า H สูง โดยปกติแล้ว GC ค่า H จะต่ำกว่า 1–3 มม. และใน HPLC ค่า H จะต่ำกว่าค่า H ใน GC ประมาณ 1–2 เท่า

เหตุที่ทำให้แถบของโครมาโทแกรมแผ่กว้างขึ้นไปมีผลต่อ H การกระจายของโมเลกุลของสารตามแนวของคอลัมน์ ดังเช่นสาร A ในรูปที่ 13.1A โมเลกุล A จะเริ่มจากเส้นแคบที่ส่วนบนของคอลัมน์ ขณะที่โมเลกุลเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์เส้นที่แคบมีการขยายกว้างขึ้น จนกระทั่งได้รูป 13.1D โมเลกุล A จะขยายกว้างขึ้นกว่าเดิม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะอัตราการเคลื่อนที่โดยเฉลี่ยของโมเลกุล A แต่ละตัวจะไม่เท่ากัน ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล A ไม่ได้เป็นผลมาจากความแตกต่างของ equilibrium distribution ดังรูปที่ 13.5 อย่างไรก็ตาม การกระจายของโมเลกุลตามแนวคอลัมน์น่าจะมาจากสาเหตุทางกายภาพหรือ rate processes ดังแสดงในรูปที่ 13.6 ในรูปที่ 13.6(a) แสดงถึงภาพตัดขวางของส่วนบนของคอลัมน์โดยสารตัวอย่าง เขียนแทนด้วย xx ที่ส่วนบนของคอลัมน์ ภายหลังจากการฉีดสารเข้าไปในคอลัมน์ที่จุดนี้โมเลกุลจะอยู่ในลักษณะเป็นเส้นแคบ ในรูปที่ 13.6(b) แสดงถึงผลที่เกิดจากการกระจายของแถบโมเลกุลเรียกว่า "Eddy Diffusion" หรือ "Multiple Flow Path" ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของกระแสการไหลของตัวทำละลายในคอลัมน์ ผลที่เกิดขึ้นคือโมเลกุลของสารประกอบจะเลือกทางเดินที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับว่ามัน



รูปที่ 13.5 แสดงหลักการที่สารถูกกันไว้ในลิควิดโครมาโทกราฟี



รูปที่ 13.6 แสดงสิ่งที่สนับสนุนต่อการกระจายของโมเลกุลในลิควิดโครมาโทกราฟี

จะเคลื่อนที่ไปกับการไหลของตัวทำละลายในทิศทางไหนทางไหล (flow path) ที่แตกต่างกันนี้แสดงในรูปที่ 13.6 (b) เป็นลูกศรที่อยู่ในระหว่างอนุภาค ของเหลวจะเคลื่อนที่ได้เร็วในทางไหลที่กว้าง และจะเคลื่อนที่ได้ช้าในทางไหลที่แคบ ดังนั้น ทางไหลระหว่างอนุภาค 1 และ 2 หรือ 5 และ 6 จะกว้าง ความเร็วของตัวทำละลายที่ไหลจะสูง และโมเลกุลที่เคลื่อนที่ทางนี้จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางยาวภายในเวลาที่กำหนดให้ โมเลกุลที่เคลื่อนที่ในทางไหลที่แคบระหว่างอนุภาค 2 และ 3 จะเคลื่อนที่ได้ช้า ทำให้โมเลกุลเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ระยะทางสั้น ในเวลาที่กำหนดให้ เพราะฉะนั้น ผลของ Eddy Diffusion ซึ่งแสดงในรูป (b) พบว่า การกระจายของโมเลกุลจากตอนเริ่มต้นซึ่งเป็นเส้นแคบ ดังแสดงในรูป (a) จะกว้างขึ้น และการกระจายของโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อมีการไหลของตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ดำเนินต่อไป

อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกระจายของโมเลกุล ดังแสดงในรูป (c) คือ mobile phase mass transfer ในกรณีนี้อัตราการไหลของตัวทำละลายที่ผ่านไปรอบ ๆ อนุภาคจะแตกต่างกัน ในรูป (c) แสดงการไหลระหว่างอนุภาค 1 และ 2 ของเหลวที่อยู่ใกล้อนุภาคจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า หรืออาจจะไม่เคลื่อนที่เลย ขณะที่ของเหลวอยู่ตรงกลางจะเคลื่อนได้เร็ว ผลที่ตามมาคือ โมเลกุลที่อยู่ใกล้อนุภาคจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่าโมเลกุลที่อยู่ตรงกลาง ซึ่งจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลกว่า ปรากฏการณ์เช่นนี้จะเหมือนกับการกระจายของโมเลกุลตามแนวคอลัมน์

รูปที่ 13.6(d) แสดงถึงส่วนที่ช่วยทำให้โมเลกุลเกิดการกระจาย คือ stagnant mobile phase mass transfer ในกรณีที่อนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์เป็นอนุภาคที่มีรูพรุน เฟสที่อยู่ในรูนั้นจะไม่มีการเคลื่อนที่ ในรูป (d) แสดงให้เห็นรูเดียวในอนุภาค 5 โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่เข้าออกจากรูนี้ได้ด้วยการแพร่ โมเลกุลที่แพร่เข้าไปในรูจะเคลื่อนที่ได้ช้าและได้ระยะทางสั้น ยิ่งแพร่เข้าไปในรูลึก ๆ ยิ่งช้าขึ้น ส่วนโมเลกุลที่แพร่ออกจากรูสู่คอลัมน์จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางไกลกว่า ผลของปรากฏการณ์นี้คือ โมเลกุลจะเคลื่อนที่ลงมาตามคอลัมน์ได้ระยะทางที่สั้น โมเลกุลของสารก็เกิดการกระจายมากขึ้น

รูปสุดท้ายคือรูป (e) แสดงถึงผลของ stationary phase mass transfer หลังจากโมเลกุลแพร่เข้าไปในรูพรุนแล้วซึม (penetrate) เข้าไปในเฟสคงที่ และถ้าเข้าไปลึกมากทำให้ใช้เวลานานอยู่ในเฟสคงที่ และจะเคลื่อนที่ลงมาตามคอลัมน์ได้ระยะทางสั้นเหมือนกับในกรณีของ (d) โมเลกุลที่ใช้เวลาเคลื่อนที่เข้าและออกจากเฟสคงที่ไม่นานนักจะสามารถกลับเข้าสู่เฟสเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น และจะเคลื่อนที่ลงมาตามคอลัมน์ได้ไกลกว่า

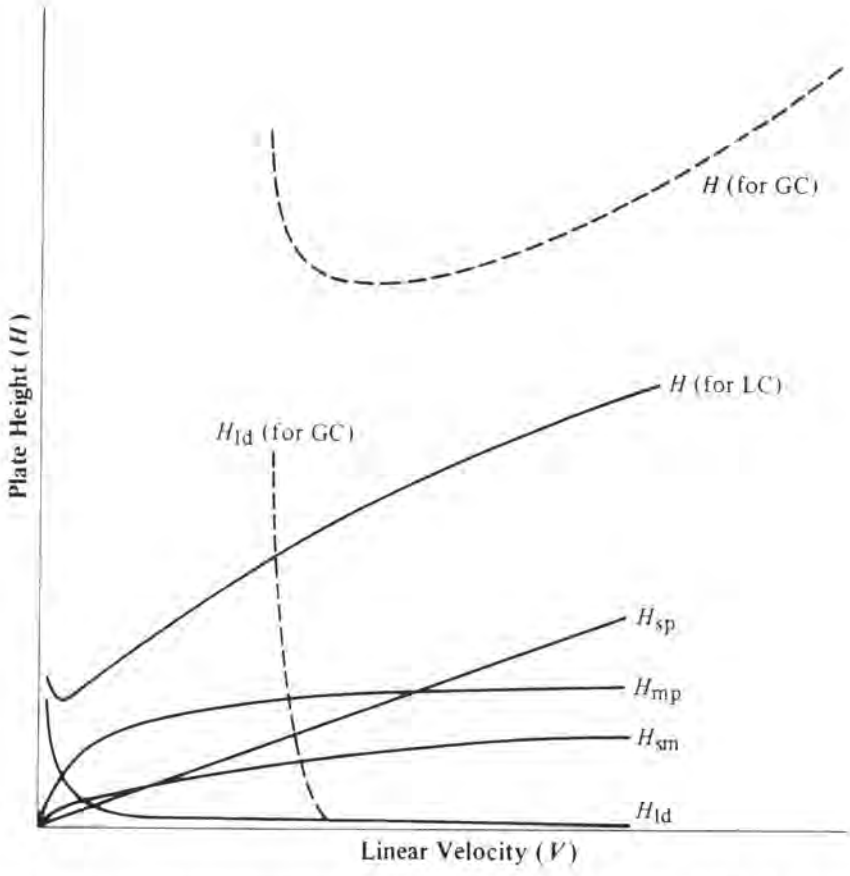
เพราะฉะนั้น สาเหตุที่ทำให้เกิดแถบกว้างขึ้น และที่มีผลถึงค่า H ดังแสดงในรูปที่ 13.7 และสามารถอธิบายได้โดยสมการทางคณิตศาสตร์ ดังต่อไปนี้

$$H = \Sigma H_i$$

$$= \frac{1}{(1/H_{ed} + 1/H_{mp})} + H_{ld} + H_{sm} + H_{sp} \qquad \text{---------(13.6)}$$

เมื่อ $H_{ed} = C_e d_o$ (eddy diffusion)

$H_{mp} = C_m d_p^2 \, v/D_m$ (mobile phase mass transfer)



รูปที่ 13.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเร็วของการไหล ขึ้นอยู่กับค่า H และค่าต่าง ๆ ที่มีผลต่อ H (สมการ 13.6)

H_{ld} = $C_d D_m/_v$ (longitudinal diffusion)

H_{sm} = $C_{sm} d_p^2 v/D_m$ (stagnant to mobile phase mass transfer)

H_{sp} = $C_s d_f^2 v/D_s$ (stationary phase mass transfer)

d_p = เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค

D_m = สัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

D_s = สัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสคงที่

v = ความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่

d_f = ความหนาของฟิล์ม (film) ของเฟสคงที่

C_e, C_m, C_d, C_{sm} และ C_s = plate height coefficients

ค่า H_{sp} ใน LC มีค่าน้อยมาก ยกเว้นในกรณีของ ion-exchange resin หรือการเคลือบเฟสคงที่หนามาก ดังนั้น ค่า H_{sp} จึงไม่นำมาคิดในสมการ (13.6)

จากสมการ 13.6 สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้ คือ

H จะมีค่าน้อยเมื่อค่า d_p และค่า v มีค่าน้อย

H จะมีค่าน้อยสำหรับตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำ

H จะมีค่าน้อยสำหรับการแยกที่อุณหภูมิสูง

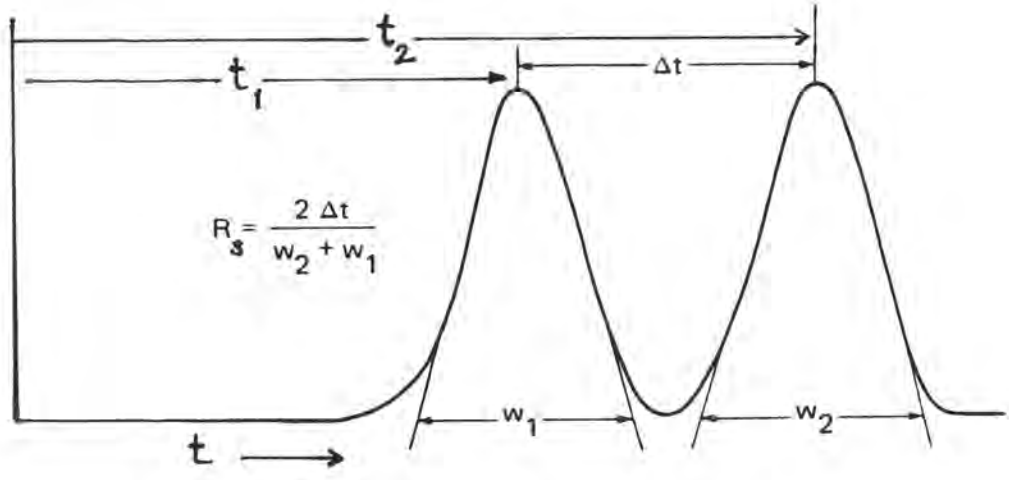
H จะมีค่าน้อยสำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก

เพราะฉะนั้น การปรับปรุงเพื่อให้การแยกสารดีขึ้นนั้นสามารถทำได้ โดยใช้อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ให้มีขนาดเล็ก ใช้อัตราการไหลของตัวทำละลายช้าลง ใช้ตัวทำละลายที่ไม่หนืด แยกสารที่อุณหภูมิสูง และใช้คอลัมน์ที่ยาว

13.2.3 การแยกและเวลาใช้แยก (Resolution and Separation Time)

เป้าหมายของ L.C. คือ สามารถทำการแยกสารละลายของผสมได้และเพื่อให้บรรลุเป้าหมายนั้นควรจะต้องสามารถวัดในเชิงปริมาณของการแยกให้ได้ หรือการแยก (resolution) จะต้องประสบผลสำเร็จ

นิยามของการแยก (R_s) แถบ (band) 2 แถบ ที่อยู่ใกล้กัน คือ ระยะห่างกันของแถบทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของแถบทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 13.8 นั่นคือ



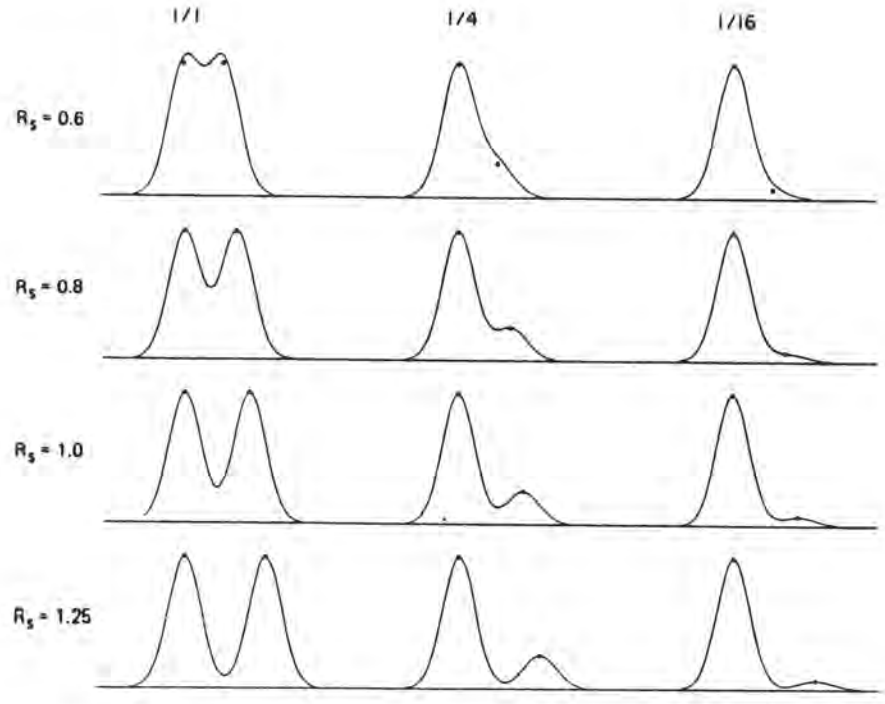
รูปที่ 13.8 แสดงการแยก (resolution) ใน LC

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} \qquad \text{---------(13.7)}$$

เมื่อ t_1 และ t_2 คือ ค่า t_r ของ band 1 และ band 2

w_1 และ w_2 คือ ความกว้างของ band 1 และ band 2

ถ้า $R_s = 1$ หมายความว่า bands ทั้งสองแยกออกจากกันประมาณ 98% เหลืออีก 2% นั้นเป็นส่วนที่ bands ทั้งสองทับกัน ค่า R_s ยิ่งมีค่ามากเท่าใดแสดงว่าการแยกยิ่งดีขึ้นเท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 13.9



รูปที่ 13.9 แสดงการแยกที่ขึ้นอยู่กับค่า R_s และอัตราส่วนของความสูงของพีก

สำหรับค่า R_s ที่กำหนดให้การซ้อนกันของ bands ทั้งสองเป็นเรื่องสำคัญมาก เมื่อ bands ทั้งสองแตกต่างกันมาก คือ band หนึ่งใหญ่ อีก band หนึ่งเล็ก ดังรูปที่ 13.9 ค่า R_s นี้ได้ถูกนำมาใช้ในการให้ความหมายของการแยก ในการควบคุมการแยกควรจะต้องเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงค่า R_s กับพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการทดลอง เช่น ค่า k′ และ N อย่างไรก็ตาม เราทราบแล้วว่าค่า R_s มีความสัมพันธ์กับค่า k′, N และ α ดังสมการ 13.8

$$R_s = (1/4)(\alpha - 1)\sqrt{N}\left[\frac{k'}{1 + k'}\right] \qquad \text{---------(13.8)}$$

(i) (ii) (iii)

สมการนี้เป็นสมการพื้นฐานใน LC ซึ่งใช้ในการควบคุมการแยก โดยการเปลี่ยนแปลงค่าต่าง ๆ คือ α, N และ k′ ซึ่งจะมีผลทำให้การแยกสารดีขึ้น สมการนี้ประกอบด้วยเทอมที่สำคัญ 3 เทอม คือ เทอม (i) – (iii) ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน ดังได้กล่าวมาแล้วว่าค่า R_s ยิ่งมากการแยกก็ยิ่งดี ดังนั้น ถ้าพิจารณาจากเทอม (i) ค่า R_s จะมีค่ามาก ค่า α จะต้องมีค่ามากด้วย ซึ่งการเพิ่มค่า α ทำได้โดยการเปลี่ยนส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่หรือแลกเปลี่ยนเฟสคงที่ เทอม (ii) เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ ซึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดคือค่า N ถ้าจะให้ค่า R_s เพิ่มขึ้นจะต้องเปลี่ยนความยาวของคอลัมน์ และความเร็วของเฟสเคลื่อนที่ (v) ส่วนเทอม (iii) คือ R_s การเปลี่ยนแปลงค่า k′ นี้ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength)

ซึ่งจะทำให้ค่า k′ เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ โดยทั่วไปค่าที่เหมาะสมที่สุดของ k′ ใน LC จะอยู่ในช่วง 2–10 ในบางกรณีที่ค่า $t_1 << t_2$ และค่า α มีค่ามาก สมการ 13.8 จะแตกต่างไปจากเดิมเล็กน้อย เป็นสมการ 13.9

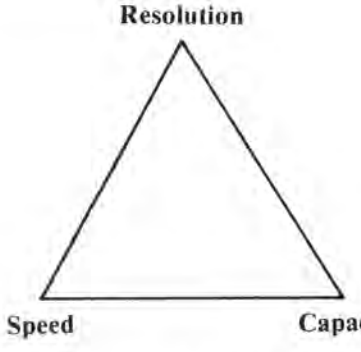
$$R_s = (1/4)\left[\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right]\sqrt{N}\left[\frac{k'}{1 + k'}\right] \qquad \text{---------(13.9)}$$

13.2.4 ความจุสารของเฟสคงที่ (Sample Capacity)

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient) และจากสมมติฐานที่ว่าสัมประสิทธิ์การกระจายจะแปรเปลี่ยนเป็นแบบเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง นั่นคือ จะเป็น linear sorption isotherm อย่างไรก็ตาม บางครั้งจะพบว่าเป็น non-linear isotherms เช่นกัน โดยเฉพาะในกรณีการใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการแยกทางโครมาโทกราฟี ความจุสารตัวอย่างของเฟสคงที่มีความสำคัญที่ควรจะนำมาพิจารณาในทางปฏิบัติ ความจุสารตัวอย่างจะสอดคล้องกับปริมาณของสารตัวอย่างที่ถูกดูดซับไว้บนเฟสคงที่ก่อนที่จะเกิดการ overload การใช้ปริมาณของสารมากเกินกว่าความจุสาร จะเป็นผลทำให้เกิดรูปร่างของพีกไม่สมมาตร การเปลี่ยนแปลง retention time และทำให้การแยกไม่ดี ความจุสารตัวอย่างโดยทั่วไปแสดงเป็นปริมาณสารตัวอย่างคิดเป็น mg ต่อกรัมของเฟสคงที่ ซึ่งจะเป็นสัดส่วนกับค่า V_s คือ ปริมาตรของเฟสคงที่ สำหรับตัวดูดซับที่มีรูพรุนใน LSC ความจุสารตัวอย่างจะอยู่ช่วง 2–5 mg/g ความจุสารตัวอย่างมีความสำคัญอย่างมากใน preparative LC เพราะว่าเทคนิคนี้ให้ผลการแยกเป็นที่น่าสนใจ

การประนีประนอมทางโครมาโทกราฟี (Chromatographic Compromise)

ความสัมพันธ์ระหว่างความจุสารตัวอย่าง อัตราเร็ว และการแยก ซึ่งแสดงได้ด้วยรูปสามเหลี่ยม ดังรูปที่ 13.10



รูปที่ 13.10 แสดงความสัมพันธ์ของ Resolution, Speed และ Capacity

ในระบบ LC การปรับปรุงสิ่งใดสิ่งหนึ่งสามารถทำได้โดยต้องเสียสองสิ่งไป หรือการปรับปรุงสองสิ่งให้ดีขึ้นก็อาจทำได้ แต่ต้องเสียสิ่งหนึ่งไป ดังนั้น นักโครมาโทกราฟีจะต้องประนีประนอมเสมอ ในการวิเคราะห์ด้วย LC สิ่งที่ต้องการก็คือ การแยกและอัตราเร็วของการแยก ส่วนความจุสารตัวอย่างจะไม่ค่อยมีความสำคัญ ตราบใดที่การแยกสารตัวอย่างได้ปริมาณพอตรวจสอบได้ ในด้าน preparative LC จุดประสงค์ใหญ่คือความจุสารตัวอย่างที่จะทำให้การแยกเป็นไปตามที่ต้องการ ส่วนอัตราเร็วเป็นเรื่องไม่ค่อยสำคัญเท่าใดนัก

13.3 เทคนิคและเครื่องมือที่ใช้ทางลิควิดโครมาโทกราฟี

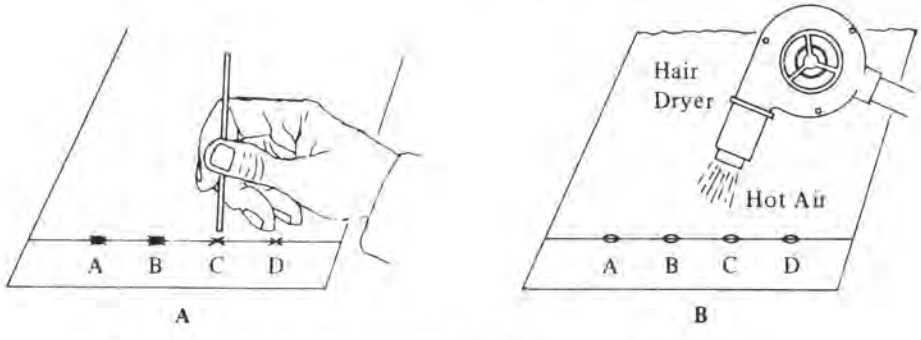
เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองทาง LC นั้น อาจจะเริ่มด้วยเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ง่าย ๆ ไปจนถึงเครื่องมือที่ซับซ้อนและราคาแพง เทคนิคที่นับว่าทำได้ง่ายที่สุด คือ paper chromatography (PC) อุปกรณ์ที่ต้องใช้คือ กระดาษกรอง ขวดปากกว้างที่มีฝาปิด และตัวทำละลายที่จำเป็นเท่านั้น ส่วน HPLC ต้องการปั๊มความดันสูง และอาจมีเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ สำหรับทำโปรแกรม ต้องมีคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคเล็ก ๆ และเครื่องตรวจวัดที่มีสภาพไวสูง

13.3.1 Paper Chromatography (PC)

เทคนิคขั้นพื้นฐานของ PC นั้นง่ายมาก กระดาษกรองซึ่งเป็นพวกเซลลูโลส เช่น กระดาษกรองวัตแมน (Whatman) เบอร์ 1 เพื่อใช้เป็นตัวกลางในการแยกสำหรับ PC มิติเดียว (one dimensional PC) กระดาษกรองจะถูกตัดให้มีขนาดกว้าง 5 ซม. ยาว 20 ซม. แต่สำหรับ PC 2 มิติ (two dimensional PC) จะใช้กระดาษกรองขนาด 20 × 20 ซม. กระดาษกรองที่ใช้จะมีรูพรุนต่าง ๆ กัน (มีทั้งละเอียด ปานกลาง และหยาบ) ความพรุนของกระดาษจะเป็นตัวกำหนดการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย (developing solvent) กระดาษที่มีความพรุนน้อยหรือละเอียดมาก จะทำให้การเคลื่อนที่ของตัวทำละลายช้า แต่จะทำให้เกิดการแยกที่ดี ถ้ากระดาษที่ใช้หนาจะทำให้ความจุสารตัวอย่างเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเหมาะในการใช้งานด้าน preparative

1) **การเตรียม (preparation)** ก่อนที่จะนำกระดาษกรองมาใช้ควรจะต้องเก็บไว้ในสภาวะที่มีการควบคุมความชื้น เนื่องจากกลไกในการแยกด้วยเทคนิคนี้ ส่วนใหญ่จะเป็นเรื่องที่เกี่ยวกับการละลาย (partition) ระหว่างน้ำที่อยู่ในกระดาษกรองและเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น ปริมาณของน้ำในเซลลูโลสจะเป็นตัวกำหนดลักษณะการแยกของกระดาษกรอง กระดาษกรองอาจจะถูกชุบด้วยเฟสคงที่ตัวอื่น แล้วทำให้แห้ง

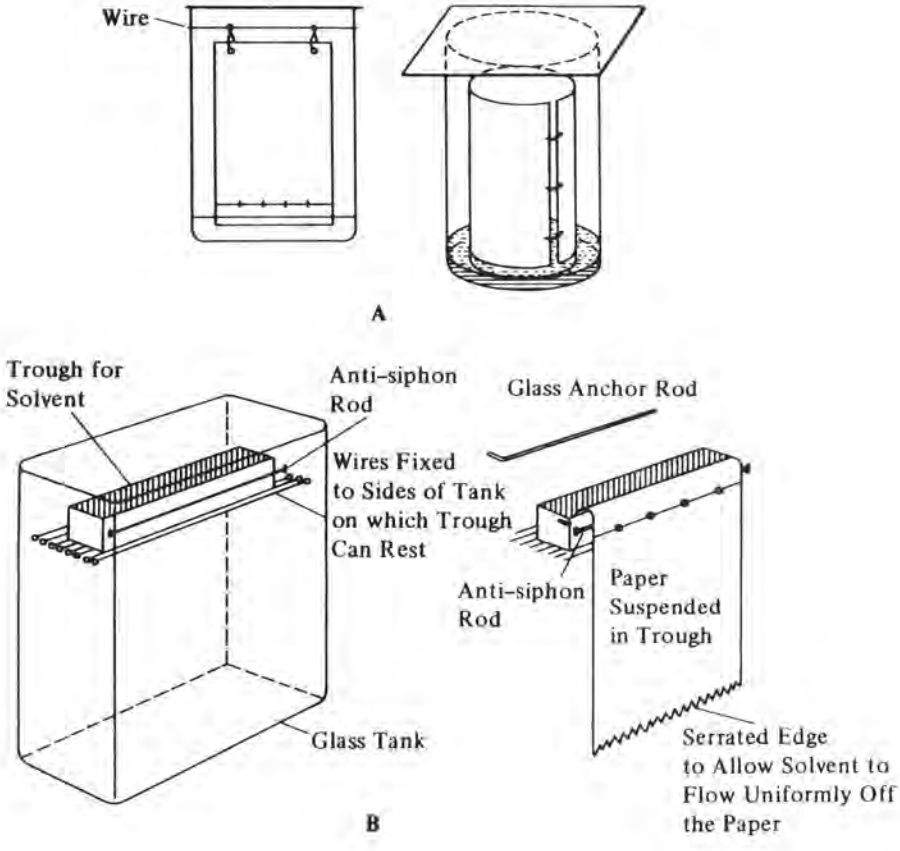
สารตัวอย่างจะละลายในตัวทำละลายที่ระเหยได้ ต่อจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างนี้ไปใส่ให้จุด (spot) บนกระดาษกรอง โดยใช้หลอดฉีดยา (syringe) หรือไมโครปิเปตต์เพื่อลดการกระจายของแถบ (band) ขนาดของจุดควรจะต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มม. ปริมาณของสารตัวอย่างโดยปกติควรอยู่ในช่วง 10–50 ไมโครกรัม และปริมาณสารทั้งหมดไม่ควรใช้เกิน 500 ไมโครกรัม การที่จุดมีขนาดใหญ่และปริมาณของสารมากเกินไป จะมีผลทำให้การแยกไม่ดี รูปที่ 13.11 เป็นลักษณะที่ถูกต้องในการเตรียม



รูปที่ 13.11 แสดงวิธีการเอาสารตัวอย่างใส่ใน PC (หรือ TLC)
A. วิธีการนำตัวอย่างใส่ลงไป B. วิธีการทำให้ spot สารแห้ง

สารตัวอย่างให้อยู่บนกระดาษกรอง ตัวทำละลายจะทำให้ระเหยออกไปด้วยเครื่องเป่าลมร้อน ถ้าสารตัวอย่างมีความเจือจางมากเกินไป อาจจะใช้สารตัวอย่างหยดลงไปหลายหยดก็ได้ เพื่อเป็นการเพิ่มความเข้มข้น การระเหยตัวทำละลายจะต้องทำทุกครั้งเมื่อหยดสารตัวอย่างลงไป สำหรับ preparative LC สารตัวอย่างจะถูกนำไปหยดบนกระดาษกรองตามแนวขวางด้านล่างของกระดาษกรองหลาย ๆ จุด หลังจากนั้นกระดาษกรองที่มีสารตัวอย่างก็พร้อมที่จะนำไปแยกต่อไป

2) **การดำเนินการ (operation)** การแยกจะเกิดขึ้นในภาชนะที่ทำด้วยแก้วมีฝาปิดมิดชิด ดังแสดงในรูปที่ 13.12 ภายในภาชนะนั้น กระดาษจะถูกวางไว้ในลักษณะที่สอดคล้องกับการไหลของตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายอาจเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแนวของกระดาษ (ascending PC) หรือเคลื่อนที่ลงมาตามแนวของกระดาษ (decending PC) หรือเคลื่อนที่ตามแนวระนาบ ภาชนะที่ใช้จะต้องปิดแน่นไม่ให้อากาศเข้า เพื่อทำให้แน่ใจว่ากระดาษและไอของตัวทำละลายอยู่ในสภาวะสมดุลกัน เพื่อที่จะให้ค่า R_f มีค่าคงที่เหมือนกันทุกครั้ง โดยปกติแล้ว กระดาษที่ใช้จะต้องทำให้อยู่ในสภาวะสมดุลกับไอของตัวทำละลายก่อนเป็นเวลา



รูปที่ 13.12 แสดงลักษณะของภาชนะหรือถังที่ใช้ develop สำหรับ PC

A เป็นแบบ ascending development

B เป็นแบบ decending development

1–3 ซม. ก่อนที่จะเริ่มการ development สำหรับ ascending PC การ development เริ่มต้นจากการนำเอาด้านที่ใส่สารตัวอย่างจุ่มลงไปในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งการเคลื่อนที่จะเป็นไปตามแนวของเส้นใยในกระดาษ โดยอาศัย capillary action สำหรับ decending PC จะให้ปลายกระดาษข้างที่ใส่สารตัวอย่างจุ่มลงไปในราง (trough) ซึ่งอยู่ใกล้กับส่วนบนของภาชนะ และในรางนี้ใส่ตัวทำละลายไว้ การเคลื่อนที่ของตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ลงมาตามแนวของกระดาษกรอง โดยอาศัย capillary action และแรงโน้มถ่วง การเคลื่อนที่แบบนี้จะเร็วกว่าการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายแบบ ascending method ด้วยเหตุนี้ decending PC จึงเป็นที่นิยมมากกว่า

ใน ascending PC กระดาษจะถูกแขวนด้วยที่หนีบ (clip) หรือขอแขวนบนเส้นลวด หรืออาจม้วนให้มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก ดังรูป 13.12A ใน decending PC ปลายของกระดาษจะยึดติดกับแท่งแก้ว ใน horizontal (หรือ radial) method จะใช้กระดาษกรองที่มีลักษณะกลมแล้วใส่สารตัวอย่างลงไปที่จุดศูนย์กลางของกระดาษ หลังจากทำให้แห้งแล้ว ให้ตัวทำละลายผ่านเข้าไปตรงจุดกึ่งกลางนั้น ตัวทำละลายจะกระจายเป็นรูปวงกลมและพาสารตัวอย่างไปด้วยก็จะทำให้เกิดการแยกขึ้น ข้อได้เปรียบของวิธีนี้ก็คือความง่ายและประหยัดในการใช้กระดาษกรองและตัวทำละลาย

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ใน development นั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารที่ต้องการแยก สารตัวอย่างควรจะละลายได้บ้างในตัวทำละลาย ถ้ามันละลายได้มาก ๆ ค่าสัมประสิทธิ์ของการละลายของมันจะมีค่าน้อย นั่นคือ มันชอบที่จะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ และจะเคลื่อนที่ไปพร้อม ๆ กับตัวทำละลาย ทำให้การแยกได้ผลไม่ดี

เวลาของการ development ควรจะนานพอสมควร เพื่อให้สารที่สนใจเกิดการแยกได้ดี อัตราการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความพรุนของกระดาษ ความตึงผิว ความหนืด การระเหยของตัวทำละลาย และอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง ค่า R_f ที่เหมาะสมสำหรับการแยกที่ดีจะมีค่าประมาณ 0.4 ถึง 0.8 และเวลาที่ใช้ในการแยกโดยทั่วไปใน PC สมัยใหม่จะอยู่ในช่วง 2–4 ชั่วโมง

3) **การตรวจหา** หลังจากเสร็จการแยกแล้ว ทำเครื่องหมายหรือขีดเส้นไว้เพื่อให้ทราบระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปก่อนที่จะนำไปทำให้แห้ง จากนั้นสารที่ถูกแยกออกจากกันจะถูกตรวจหาโดยวิธีต่าง ๆ กัน ซึ่งอาจใช้วิธีทางเคมีหรือวิธีทางกายภาพก็ได้ ถ้าหากสารที่แยกเป็นสารมีสี การตรวจหาก็จะไม่มีปัญหา อย่างไรก็ตาม สารเคมีส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่มีสี ดังนั้น การตรวจหาสารประเภทนี้คงจะใช้วิธีพ่นหรือจุ่มกระดาษลงในสารละลายเคมี เพื่อให้เกิดสีขึ้น ตัวอย่างเช่น กรดอะมิโน (ไม่มีสี) สามารถตรวจหาได้ง่ายโดยทำให้เกิดสีม่วงน้ำเงินด้วยการพ่นด้วยสารละลาย 2% นินไฮดริน สารประกอบอินทรีย์ที่ไม่อิ่มตัวสามารถตรวจหาได้ง่ายจากการทำให้เกิดฟลูออเรสเซนซ์ด้วยการนำไปส่องด้วยแสงยูวี (UV-lamp) หรือถ้าเป็น labeled compounds (สารกัมมันตรังสี) สามารถตรวจหาได้ด้วยเครื่องวัดรังสี

การตรวจหาสารประกอบโดยใช้ค่า R_f นั้น บางครั้งสารมาตรฐานซึ่งมีสมบัติทางเคมีคล้ายสารตัวอย่างจะถูกนำมาทดลองพร้อม ๆ กับสารตัวอย่าง และสามารถที่จะเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ได้ ในกรณีนี้ค่า R_x จะมีความหมายถึง

$$R_x = \frac{\text{ระยะทางที่สารประกอบเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่}} \qquad \text{.....(13.10)}$$

การตรวจหาสารโดยวิธีนี้มีประโยชน์มาก โดยเฉพาะเมื่อใช้กับวิธี decending PC ตัวทำละลายจะถูกทำให้ไหลผ่านปลายด้านหนึ่งของกระดาษกรองเพื่อทำให้ระยะทางที่เคลื่อนที่ของสารนั้นเพิ่มขึ้น

ใน PC 2 มิติ (two dimentional PC) สารตัวอย่างเพียงตัวอย่างเดียวจะถูกนำไปหยดให้เป็นจุดที่มุมของกระดาษกรอง เมื่อทำให้แห้งแล้วนำไป develop เมื่อ develop เสร็จแล้วนำออกมาจากถังทำให้แห้ง หมุนกระดาษกรองนั้นเป็นมุม 90 องศา แล้วนำไป develop อีกครั้งหนึ่งในตัวทำละลายชนิดที่สอง วิธีนี้จะช่วยเพิ่มระยะทางการเคลื่อนที่ แต่ที่สำคัญคือจะช่วยแยกสารที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เพราะว่าตัวทำละลายที่สองจะมีคุณลักษณะที่แตกต่างไปจากตัวแรก

13.3.2 ธินแลย์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography, TLC)

TLC มีลักษณะคล้ายกับ PC แต่แทนที่จะใช้กระดาษกรอง กลับมาใช้แผ่นกระจกหรืออะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก เป็นแบบ open bed ซึ่งมีขนาดไม่เหมือนกับของ PC โดยเคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุนและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดประมาณ 5–40 ไมโครเมตร (μm) เฟสคงที่ที่นิยมใช้กันมากคือ silica gel, alumina, cellulose, polyamides และ ion-exchange resins การที่จะทำให้เฟสคงที่ยึดกับแผ่นและมี mechanical strength ดี จะต้องเติมตัวยึด (binder) เช่น เติม $CaSO_4$ เข้าไป 5–10% โดยน้ำหนัก

1) **การเตรียม (preparation)** การเตรียมแผ่น TLC สามารถทำได้โดยใช้ผงที่ใช้เคลือบแผ่นกระจกใส่น้ำหรือตัวทำละลายให้เป็น slurry แล้วนำไปเคลือบบนแผ่น TLC ให้มีลักษณะเหมือนกันทั่วทั้งแผ่น โดยใช้เครื่องมือพิเศษคือ moving spreader สารละลายที่เป็น slurry จะผ่านลงมายังแผ่น TLC เคลือบเป็นฟิล์มบาง ๆ ความหนาสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยปรับเครื่องให้ทำความหนาตามต้องการ ซึ่งโดยทั่วไปที่ใช้ในทางวิเคราะห์ ความหนาจะอยู่ในช่วง 0.2–0.3 มม. แต่ถ้าเป็นงานทาง preparative TLC ความหนาจะอยู่ในช่วง 2–10 มม. หลังจากเคลือบแผ่น TLC แล้วนำไปทำให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปอบให้แห้งอีกครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิ 110°C ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ แผ่น TLC ที่เคลือบเรียบร้อยแล้วมีขายในท้องตลาดซึ่งมีราคาค่อนข้างแพงแต่ได้รับความสะดวก และแผ่น TLC นั้นมีลักษณะเหมือนกันมากกว่า

แผ่น TLC สมัยใหม่จะเคลือบด้วย reversed bonded phase ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์ค่อนข้างมาก โดยทั่วไป แผ่น TLC พวกนี้จะเกิดสมดุลเร็ว จึงอาจไม่ต้องทำให้สมดุลก่อนใช้เหมือนซิลิกาเจล จึงสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาข้อมูลเฟสเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะนำไปใช้ใน reverse-phase HPLC ได้

2) **การดำเนินงาน (operation)** หลังจากการ activation ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงระยะเวลาสั้นแล้ว จากนั้นก็จะเอาสารตัวอย่างใส่ลงไปให้เป็นจุดบนแผ่น TLC การ development จะเป็นขั้นตอนต่อไป และวิธีการก็จะเหมือนกับในกรณีของ PC โดยปกติแล้วปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้จะอยู่ในช่วง 10–100 μg ต่อจุดสำหรับงานทางด้านการวิเคราะห์ แต่ถ้าเป็นทาง preparative TLC ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้อาจมากถึง 100 mg เมื่อใช้กับแผ่น TLC ขนาด 20 × 20 ซม. แต่ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของจุดควรจะอยู่ระหว่าง 2–5 มม. การ development สามารถทำได้ทั้งแบบ ascending หรือ decending และแบบ 1 มิติ หรือหลายมิติ เนื่องจากความแตกต่างใน capillary action และ solvent heat of absorption ทำให้การใช้เวลาในการ development ของ TLC เร็วกว่า PC มาก โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 20–30 นาที

สำหรับระยะทาง 10 ซม. ซึ่งทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับเฟสเคลื่อนที่และขนาดของอนุภาคของตัวดูดซับ (adsorbent) อย่างไรก็ตาม การใช้กระดาษกรองที่มีรูพรุนมาก การ development ที่สภาวะเหมือนกัน เวลาที่ใช้อาจถึง 2 ชั่วโมง จุดที่เกิดจากการหยดสารละลายลงบนแผ่น TLC ยังคงเป็นจุดเล็ก แต่ถ้าเป็นกระดาษกรอง จุดที่เกิดจากการหยดสารลงไปจะกระจายออกไป ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของกระดาษเป็นแบบเส้นใย ดังนั้น การแยกโดย TLC จะดีกว่าและสามารถแยกสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยได้ และการตรวจหาได้ดีกว่า PC

3) **การตรวจหา (detection)** เนื่องจากสารที่เคลือบบนแผ่น TLC เป็นพวก silica และ alumina ซึ่งเฉื่อย (inert) มากกว่ากระดาษ ดังนั้น สารละลายที่ไวต่อปฏิกิริยามากสามารถนำมาใช้ในการบอกตำแหน่งของสารที่แยกออกจากกันได้ กรดซัลฟูริกเข้มข้นสามารถนำมาใช้พ่นให้เป็นฝอยลงบนแผ่น silica ได้ และทำให้สารอินทรีย์เกิดเป็นสีดำ (charred) ซึ่งมองเห็นได้ชัดหลังจากให้ความร้อนกับแผ่น นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารเคมีที่ทำให้เกิดสี เช่น ไอโอดีน ได้อีกด้วย หรืออาจใช้วิธีส่องแผ่น TLC ด้วยแสงยูวี สารที่ให้ฟลูออเรสเซนซ์จะมองเห็นได้ หรือบางครั้งอาจผสมสารฟลูออเรสเซนซ์เข้าไปกับสารเคลือบแผ่น TLC และเมื่อส่องด้วยแสงยูวีจะเห็นสารเป็นจุดสีดำบนพื้นของฟลูออเรสเซนซ์ อย่างนี้เรียกว่าเกิด quenching effect

การที่จะทำค่า R_f ให้ได้เท่ากันทุกครั้งใน TLC นั้นยากกว่าใน PC เพราะว่า TLC มีตัวแปรจากการทดลองมาก ค่า R_f จะขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. ธรรมชาติของตัวดูดซับ ได้แก่ ธรรมชาติทางเคมี, ขนาดของอนุภาค พื้นที่ผิว และตัวยึด (binder) เป็นต้น

2. ธรรมชาติของเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของมัน ความถูกต้องของการผสมปริมาณความชื้นและการระเหย เป็นต้น

3. activity ของตัวดูดซับ ความหนา และความสม่ำเสมอของมัน

4. อุณหภูมิของเครื่องมือ

5. ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้

6. สมดุลความดันไอ (vapor-pressure equilibrium) ระหว่างแผ่น TLC กับบรรยากาศในถังที่ใช้

4) **ลักษณะการวิเคราะห์หาปริมาณด้วย TLC และ PC** ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารด้วยเทคนิค TLC หรือ PC นั้น ถ้าจะให้ได้ผลที่มีความแม่นและเที่ยง จะต้องให้ความระมัดระวังเป็นอย่างมาก และต้องทำให้ chromatographic conditions มีมาตรฐาน การจุด (spot) สารตัวอย่างและสารมาตรฐานลงบนกระดาษหรือแผ่น TLC จะต้องมีขนาดและความเข้มข้นเท่า ๆ กัน การเตรียมตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่รวมถึงภาชนะ จะต้องอยู่ในสมดุล และอื่น ๆ ทั้งหมดนี้ควรจะต้องอยู่ในลักษณะที่เหมือนกัน การใช้สารละลายเพื่อบอกตำแหน่งของจุดที่แยกได้จะต้องเหมือนกัน การใช้สารละลายเพื่อบอกตำแหน่งของจุดที่แยกได้สามารถวัดได้โดยตรงจากแผ่นกระดาษ หรือแผ่น TLC หรือสามารถแยกเอาสารออกมาวัดด้วยวิธีการอย่างอื่น เทคนิคที่ใช้ในการวัดมีดังต่อไปนี้

1. ใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ของจุดด้วยตา สารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว นำไปวิเคราะห์บนแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน พื้นที่สัมพัทธ์ของทั้งสาร-

ตัวอย่างและสารมาตรฐานจะถูกประเมินออกมาด้วยตาเปล่า ซึ่งจะให้ความถูกต้อง 5—10%

2. การวัดสมบัติทางกายภาพของจุดสี โดยวัดค่าความเข้มของการสะท้อนแสง หรือฟลูออเรสเซนซ์ หรือการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง scanning photodensitometer แล้วบันทึกด้วย recorder ซึ่งจะให้ความถูกต้อง 3—5%

3. การวัดกัมมันตรังสี สำหรับสารกัมมันตรังสีสามารถวัดได้ด้วยเครื่องวัดกัมมันตรังสี หรือใช้เครื่องวัดอัตโนมัติ

4. การวัดพื้นที่ของจุด พื้นที่ของจุดนั้นจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณของสาร พื้นที่ของจุดสามารถหาได้โดยใช้กระดาษกราฟที่ไสแล้วนับจำนวนสี่เหลี่ยมที่ครอบคลุมพื้นที่ของจุดนั้น สำหรับสารมาตรฐานก็ทำเช่นเดียวกัน และสามารถทำ calibration curve ได้โดยเขียนกราฟระหว่างพื้นที่กับปริมาณสารต่าง ๆ กัน

5. ใช้วิธีการเอาสารออกจากแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC ถ้าเป็น TLC อาจใช้วิธีแยกเอา absorbent นั้นออกมาจากแผ่น TLC โดยนำมาสกัดหรือชะล้างสารออกมาจาก absorbent ถ้าเป็น PC สามารถทำการสกัดหรือชะสารออกจากกระดาษได้เลย แล้วนำไปวัดด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น ใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ หรือโพลาโรกราฟ เป็นต้น

13.3.3 คอลัมน์ลิควิด โครมาโทกราฟี (Column Liquid Chromatography)

การใช้คอลัมน์เปิด (open column) ยังเป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่ทว่าเวลาที่ใช้ในการแยกสารผสมนั้นค่อนข้างมาก ดังนั้น ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทาง LC ขึ้นมาเรียกว่า High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือบางครั้งเรียกว่า High Speed Liquid Chromatography ข้อดีของเทคนิคนี้ก็คือ สามารถแยกสารผสมได้ในเวลาที่รวดเร็ว resolution และ sensitivity ดี สะดวก และง่ายต่อการทำปริมาณวิเคราะห์ เพราะฉะนั้นจึงได้มีการพยายามที่จะใช้เทคนิคนี้เป็นวิธีมาตรฐานของการแยกสาร สำหรับกลไกของการแยกสารทั้งวิธีเดิมและวิธีสมัยใหม่ (HPLC) ยังคงเหมือนกัน ที่แตกต่างกันก็คือเครื่องมือและเทคนิคทางปฏิบัติเท่านั้น

เมื่อบรรจุอนุภาคลงในคอลัมน์ จะทำให้การไหลของตัวทำละลายยากขึ้น และถ้าคอลัมน์ยาวขึ้นและอนุภาคที่บรรจุเล็กลง การไหลของตัวทำละลายก็ยิ่งยากขึ้น ถ้าพยายามบังคับให้ตัวทำละลายไหลผ่านคอลัมน์จะทำให้เกิด "back pressure" ขึ้น ความสัมพันธ์ของ back pressure (ΔP) กับตัวแปรทางโครมาโทกราฟ สามารถเขียนได้เป็น

$$\Delta P = \frac{\phi \eta L v}{d_p^2} \qquad \text{----------(13.11)}$$

เมื่อ ΔP = column back pressure

ϕ = dimensional structural constant มีค่าประมาณ 600 sec^2/cm สำหรับ packed beds (column resistance factor)

η = ความหนืดของเฟสเคลื่อนที่

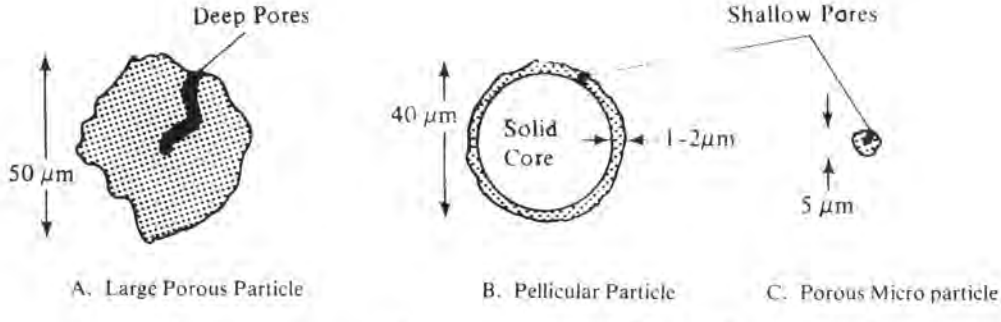
L = ความยาวของคอลัมน์

v = ความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่

d_p = เส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของอนุภาค

13.4 ไฮ เพอร์ฟอร์มานซ์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

ความแตกต่างระหว่าง classical LC กับ HPLC ดูได้จากรูปที่ 13.13 และรูปที่ 13.14 สำหรับ classical LC จะใช้อนุภาคที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ โดยทั่วไปแล้วค่า $d_p = 100 - 250\ \mu m$ (รูปที่ 13.13A) ซึ่งจะบรรจุในคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1–5 ซม. (รูปที่ 13.14A) ความดันที่ต้องการทำให้ตัวทำละลายไหลผ่านระหว่างอนุภาคจะน้อยมาก โดยตามปกติภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายที่ต่อเข้ากับคอลัมน์จะทำหน้าที่เป็นแหล่งที่ทำให้ความดันคงที่ โดยให้ภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายอยู่เหนือผิวของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์เล็กน้อย ความดันจะลดลงอยู่ในช่วง 0.1–1 บรรยากาศ อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่จะช้ามาก ซึ่งอาจมีค่า 0.1 mL/min หรือน้อยกว่านี้ ดังนั้น เวลาที่ใช้ในการแยกจะนานมาก การทำให้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นนั้นสามารถทำได้โดยใช้ปั๊ม จากสมการ (13.6) สามารถนำมาใช้อธิบายได้ว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์จะต่ำลงและการแยกจะไม่ดี ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของ mass transfer นั่นคือ ค่า H_{sm} หรือ H_{sp} จะมีค่ามาก และช่องว่างระหว่างอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์จะกว้าง ทำให้ค่า H_{ed} และ H_{mp} มีค่ามาก ถ้านำเอาค่า H ไปเขียนกราฟกับความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่สำหรับคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคชนิดนี้แล้วกราฟที่ได้จะมีความชันมาก ดังนั้น การใช้คอลัมน์ชนิดนี้จะต้องใช้ที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ เนื่องจากว่ามันมีพื้นที่ผิวมาก หรือมีความจุของตำแหน่งแลกเปลี่ยนไอออนสูง จึงทำให้คอลัมน์จะมีความจุของสารตัวอย่างสูง ซึ่งมีความสำคัญในการใช้ preparative LC เท่านั้น

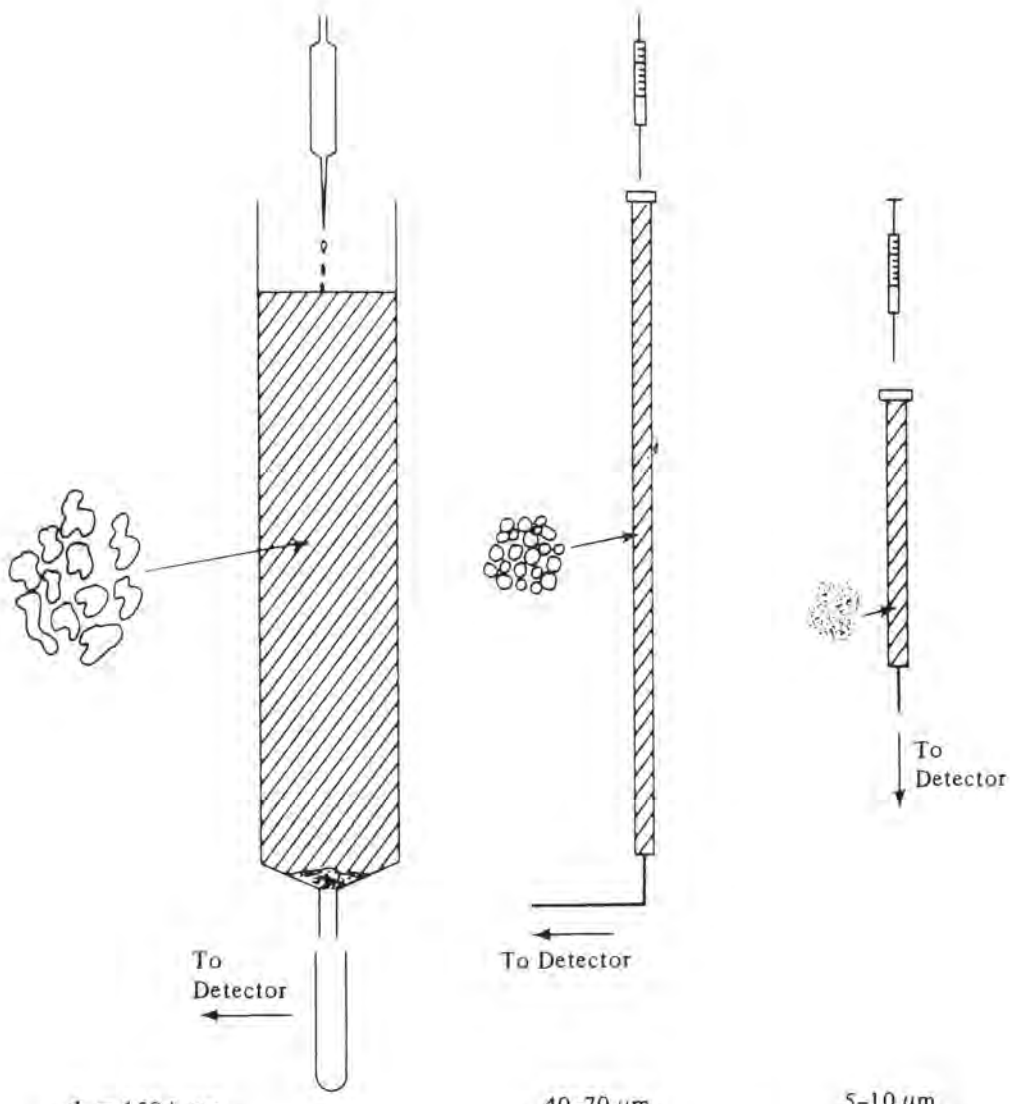


รูปที่ 13.13 แสดงแบบต่าง ๆ ของอนุภาคที่ใช้ในลิควิดโครมาโทกราฟี

A = อนุภาคที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ ($d_p = 50 - 250\ \mu m$)

B = pellicular particle ($d_p = 37 - 50\ \mu m$)

C = porous microparticle ($d_p = 5 - 10\ \mu m$)



รูปที่ 13.14 แสดงการเปรียบเทียบคอลัมน์ที่ใช้ในลิควิดโครมาโทกราฟี

A = classical open-column chromatography ที่บรรจุด้วยอนุภาคที่มีรูพรุนขนาดใหญ่

B = HPLC ที่ใช้ pellicular packing

C = HPLC ที่ใช้ microparticulate packing

แม้ว่าการเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์จะทำได้โดยการลดขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ซึ่งระยะแรก ๆ ของการพัฒนาคอลัมน์โครมาโทกราฟี เมื่อวัสดุที่ใช้บรรจุในคอลัมน์มีขนาดของอนุภาคในช่วง 30–75 μm การบรรจุลงในคอลัมน์ที่แคบ ผลก็คือทำให้เกิด back pressure สูงมากกว่า classical LC column (รูปที่ 13.14B) ดังนั้น การที่จะช่วยทำให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้จะต้องใช้พวก high pressure pump ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของ HPLC สำหรับ analytical HPLC อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะอยู่ในช่วง 0.5–5.0 mL/ นาที pressure drop จะสูงถึง 300 บรรยากาศ และประสิทธิภาพของคอลัมน์จะเพิ่มขึ้นเป็น 10–100 เท่า เมื่อเทียบกับ classical LC และเวลาที่ใช้ในการแยกจะสั้นลง

การปรับปรุงนี้เป็นผลมาจากการพัฒนา pellicular packing ในปี ค.ศ. 1960 ตัวบรรจุสารทรงกลมนี้ประกอบด้วยของแข็งที่ไม่มีรูพรุนเป็นแกน โดยทั่วไปจะใช้ glass bead ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยประมาณ 40 μm และเคลือบด้วยแผ่นฟิล์มบาง ๆ ชั้นนอก และมีลักษณะเป็นรูพรุน ดังรูปที่ 13.13B ความหนาชั้นนอกเท่ากับ 1–3 μm ซึ่งอาจเป็นพวก silica gel, alumina, resin หรือ polyamide ก็ได้ เนื่องจากตัวแกนเป็นของแข็งที่แน่น การบรรจุพวก pellicular particle ในคอลัมน์ทำได้ง่าย เมื่อเปรียบเทียบอนุภาคที่มีรูพรุนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากัน stationary phase mass transfer ที่เกิดกับ pellicular packing จะถูกปรับปรุงให้ดีขึ้นมาก อย่างไรก็ตาม V_s ของชั้นที่เคลือบอยู่จะบางลงมาก ซึ่งผลที่ตามมาก็คือ ความจุของสารตัวอย่างจะลดลงตามไปด้วย ดังนั้น pellicular packing จะไม่ค่อยมีประโยชน์สำหรับงานด้าน preparative LC ในปี ค.ศ. 1980 อนุภาคที่ใช้บรรจุอยู่ในคอลัมน์ที่ปรากฏขึ้นมาใหม่คือ microparticulate ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน และยังนำมาใช้เป็นวัสดุที่บรรจุใน guard column เพื่อให้ทำหน้าที่กรองสิ่งเจือปนออกจากสารละลายตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ที่จะผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ ทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์ยาวขึ้น

การลดขนาดของอนุภาค (d_p) ให้ต่ำกว่า 30 μm ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์เพิ่มขึ้น ผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับการใช้ ion exchange ได้ยอมรับในข้อดีหรือข้อได้เปรียบของการใช้อนุภาคที่มีขนาดเล็ก เช่น ขนาด 10 μm นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาการบรรจุอนุภาคเข้าในคอลัมน์ในสภาวะของสารละลายที่เป็น slurry โดยใช้ระบบความดันสูง (7,000 psi) และมีการนำเอา microparticles ที่มีขนาดในช่วง 5–15 μm (ดังรูปที่ 13.12C) มาใช้ในการเตรียม HPLC column ที่มีประสิทธิภาพสูง การเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยการปรับปรุง stationary phase และ mobile phase mass transfer term จากสมการ (13.6) จะทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกสารและค่า H จะมีค่าต่ำกว่า classical LC ที่ใช้เป็นประจำมาก นอกจากนั้นพวกอนุภาค microparticles จะมีรูพรุนมาก ไม่เหมือนกับ pellicular packing ความจุของสารตัวอย่างจะลดไปด้วย ข้อเสียอย่างอื่นก็ยังมี เช่น ราคาแพง และการบรรจุอนุภาคชนิดนี้เข้าคอลัมน์ก็ต้องใช้วิธีพิเศษ

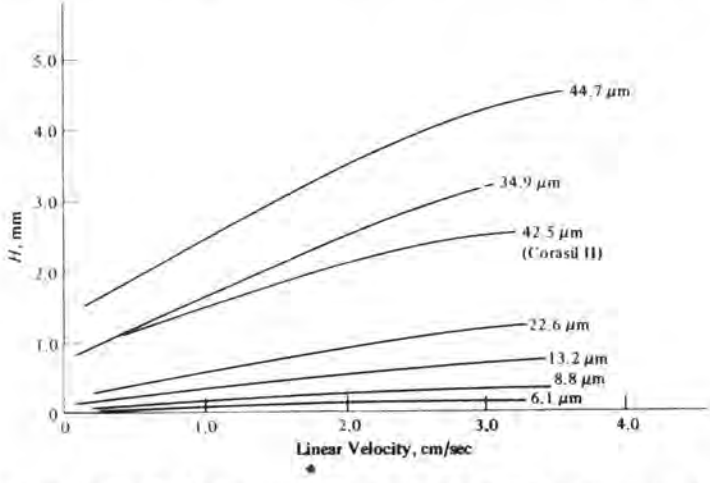
เนื่องจากประสิทธิภาพของ microparticulate columns จะสูงมาก ที่ดีที่สุด H จะมีค่าอยู่ในช่วง 0.01–0.03 มม. ดังนั้น ความยาวของคอลัมน์ที่ต้องการใช้ในงานวิเคราะห์ทาง HPLC จึงสั้นและอยู่ในช่วง 15–25 ซม. ดังรูป 13.14C การใช้อนุภาคขนาด 5 μm จะทำให้ back pressure ของคอลัมน์สูงเมื่อเทียบกับการใช้อนุภาคที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ หรือการใช้ pellicular particles อย่างไรก็ตาม คอลัมน์ที่สั้นแม้จะบรรจุด้วยอนุภาคขนาด 5 μm ก็จะทำให้เกิด back pressure แต่น้อยกว่า 200 บรรยากาศ เมื่อใช้อัตราการไหลของเฟส

เคลื่อนที่ที่ไม่หนืดเท่ากับ 1–2 mL/ นาที แต่ในการแยกสารบางชนิดที่แยกได้ยาก อาจต้องใช้คอลัมน์ที่มีจำนวน theoretical plates ประมาณ 10,000 และคอลัมน์ยาวประมาณ 50–100 ซม. ที่บรรจุด้วยอนุภาคเล็ก ๆ และใช้ high pressure pump เพื่อให้ตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ ดังสมการที่ 13.11 การใช้อัตราการไหลของตัวทำละลายสูง หรือใช้เฟสเคลื่อนที่มีความหนืดจะไปเพิ่ม back pressure ของคอลัมน์ ในกรณีเหล่านี้จะเกิด pressure drop ขึ้นประมาณ 200–300 บรรยากาศ

อิทธิพลทั้งหมดของการลดขนาดของอนุภาคที่มีต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 13.15 ซึ่งเป็นการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า H กับ v สำหรับอนุภาค silica gel ที่มีขนาดตั้งแต่ของ silica gels 6 ขนาดด้วยกัน สารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบคือ N, N'-diethyl-p-phenyl azoaniline และเฟสเคลื่อนที่เป็นชนิดเดียวกันหมดทุกคอลัมน์ คอลัมน์ทุกอันบรรจุด้วยเทคนิค high pressure slurry จากรูปจะเห็นว่า ค่า H จะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อขนาดของอนุภาคเล็กลงจนถึงขนาด 6.1 μm เมื่อเปรียบเทียบกับ corasil ซึ่งเป็น pellicular silica ที่มี d_p 42.5 μm จะเห็นว่า silica ที่มีรูพรุน d_p ต่ำกว่า 20 μm จะให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีกว่าคอลัมน์ที่บรรจุด้วย 40 μm pellicular packing ความสัมพันธ์ระหว่าง H กับ d_p ของ LC และ TLC ทุกวิธี จะมีลักษณะดังกล่าวนี้

13.5 LC Columns

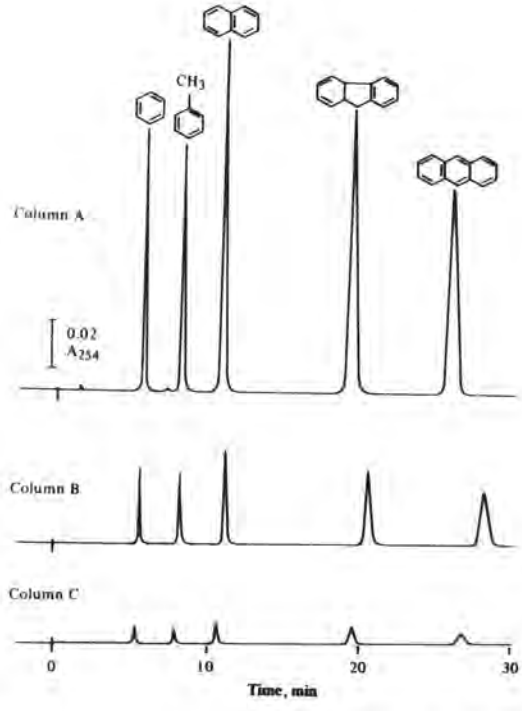
ใน open-column chromatography ตัวคอลัมน์จะทำด้วยแก้ว หรือโลหะ หรือท่อพลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 13.14A ในการทำให้อนุภาคอยู่ในคอลัมน์ จะใช้ใยแก้วหรือแผ่นโลหะที่มีรูพรุนปิดทางด้านหนึ่งของ



รูปที่ 13.15 แสดงความสัมพันธ์ของความเร็วกับ plate height (H) ของ porous silica gels ขนาดต่าง ๆ กัน
สารตัวอย่างเป็น N, N'-diethyl-p-phenyl azoaniline
เฟสเคลื่อนที่เป็น hexane/methylene chloride/isopropanol
อัตราส่วนโดยปริมาตร 90/9.9/0.125 corasil II ใช้ d_p 37–50 μm

คอลัมน์ไว้ จากนั้นจะเทอนุภาคที่เป็นของแข็งลงไปในคอลัมน์จนเต็ม ข้อสำคัญจะต้องบรรจุอนุภาคเหล่านั้นให้แน่นและปราศจากช่องว่าง แรงโน้มถ่วงจะช่วยทำให้ตัวทำละลายไหลผ่านคอลัมน์ได้ แต่ถ้าอนุภาคที่บรรจุอยู่มีขนาดเล็กกว่า 100 μm จำเป็นต้องใช้ปั๊มช่วยทำให้ตัวทำละลายไหลผ่านคอลัมน์ คอลัมน์ที่ทำด้วยแก้วจะเหมาะกับงานที่ใช้ความดันต่ำ ๆ หรือพวกคอลัมน์เปิด ส่วนคอลัมน์ที่ทำด้วยโลหะ เช่น เหล็กไร้สนิม จะเหมาะกับงานที่ต้องใช้ความดันสูง ๆ เช่น สูงกว่า 70 บรรยากาศ นอกจากนี้ยังมีคอลัมน์ที่ภายในทำด้วยแก้วภายนอกเป็นโลหะ และพวกคอลัมน์เล็ก ๆ ที่ทำด้วย fused silica ซึ่งเหมาะสำหรับงานบางประเภทที่ต้องการพื้นผิวเฉื่อย (inert) มาก ๆ อุณหภูมิของคอลัมน์สามารถควบคุมได้โดยการติดตั้งคอลัมน์ไว้ในส่วนที่เป็นตู้อบ หรือ thermal contact block หรือใช้ water jacket

ในปัจจุบันนี้คอลัมน์ที่จะใช้กับ HPLC มีแนวโน้มที่จะเล็กลง ผลของการใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเล็กลง ดังแสดงในรูปที่ 13.16 ข้อดีของการใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเล็กซึ่งเรียกว่า Microbore Column มีดังต่อไปนี้



รูปที่ 13.16 แสดงความแตกต่างของความสามารถในการตรวจหาของ microbore กับ LC column สารตัวอย่างเป็นแอนทราซีน 4 μg ใน 1 μL เฟสเคลื่อนที่เป็น 55% acetonitrile/water ใช้ UV-detector (254 nm) column เป็น SP-C_{18} – 5 ยาว 15 ซม.

Column A : 1 mm i.d. และ 50 μL/min flow rate

Column B : 2.1 mm และ 200 μL/min

Column C : 4.6 mm และ 1,000 μL/min

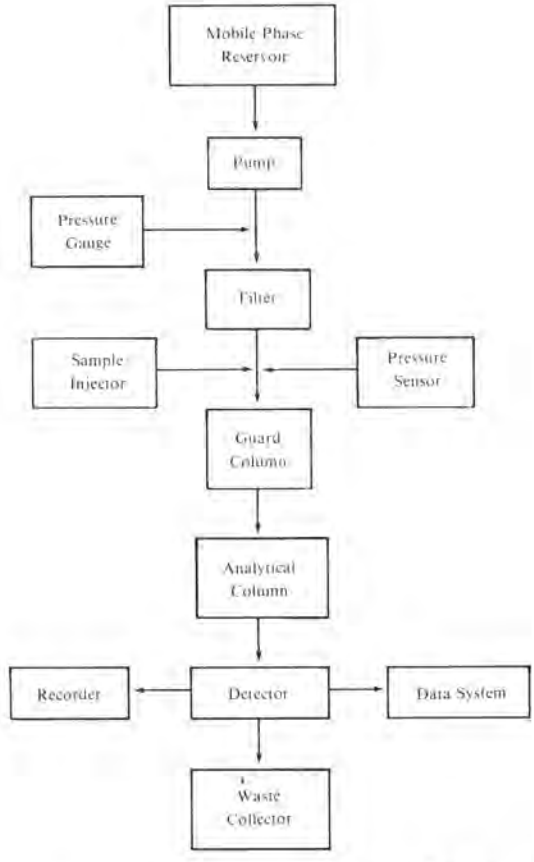
1) ลักษณะของพีกที่ได้ในโครมาโทแกรมจะมีฐานพีกแคบ (narrow peak width) และเป็นการเพิ่มความสูงของพีก ทั้งนี้คอลัมน์จะต้องไม่ overloaded ซึ่งเท่ากับเป็นการเพิ่มความไวของการตรวจหา แม้สารจะมีน้อยก็สามารถทำการวิเคราะห์ได้ ตัวอย่างเช่น เมื่อเปรียบเทียบความสูงของพีกที่ได้จากสารแนพทาลีนที่ใช้คอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1 และ 4.6 มม. ความยาวของคอลัมน์เท่ากัน ปรากฏว่าคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเล็กให้ความสูงของพีกเป็น 20 เท่าของคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า

2) ประหยัดตัวทำละลายที่ใช้ ทั้งนี้เพราะการปรับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่จะต้องสอดคล้องกับพื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์ที่ใช้ (ดูสมการที่ 13.11)

3) เครื่องตรวจหา (detector) บางชนิดมีความสามารถเพิ่มขึ้น เพราะการใช้อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ และปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้น้อย เช่น electrochemical detector เป็นต้น

13.6 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC (HPLC-System)

รูปที่ 13.17 แสดงแผนภาพโดยทั่วไปของเครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญและหน้าที่ของมันดังต่อไปนี้



รูปที่ 13.17 แสดงแผนภาพส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในปัจจุบัน

13.6.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir) เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในทางวิเคราะห์ ขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้ควรมีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ ในปัจจุบัน ขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น แก๊สออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้น ยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ การไล่แก๊สที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvents) และมีบางบริษัทที่ผลิตเครื่อง HPLC สามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่แก๊สก่อนได้

13.6.2 ระบบของปั๊ม (pumping system) ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่านี้จะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็ก ๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป ปั๊มชนิดนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1) mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

2) pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

หลักการเลือก pumping system เพื่อใช้กับ HPLC นั้น ควรพิจารณาจากสมบัติต่อไปนี้

ก. ปั๊มและส่วนประกอบควรจะต้องทำด้วยวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทั้งนี้รวมทั้งท่อ fittings และ flow cells ด้วย เป็นต้น เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง inert polymers เช่น polytetrafluoroethylene (PTFE), ruby และ saphire

ข. ควรจะต้องสามารถปั๊มเฟสเคลื่อนที่ที่มีปริมาตรมาก ๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการขัดข้อง

ค. สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000–6,000 psi เพื่อปั๊มให้เฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านคอลัมน์ขนาดเล็ก ยาวขนาด 30 ซม. ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ และอย่างน้อยต้องให้ความดันได้ถึงขนาด 500 psi

ง. สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 mL/ นาที เป็นอย่างน้อยและคงที่

จ. ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต้องไม่เกิน 1–2%

ฉ. ควรจะมีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

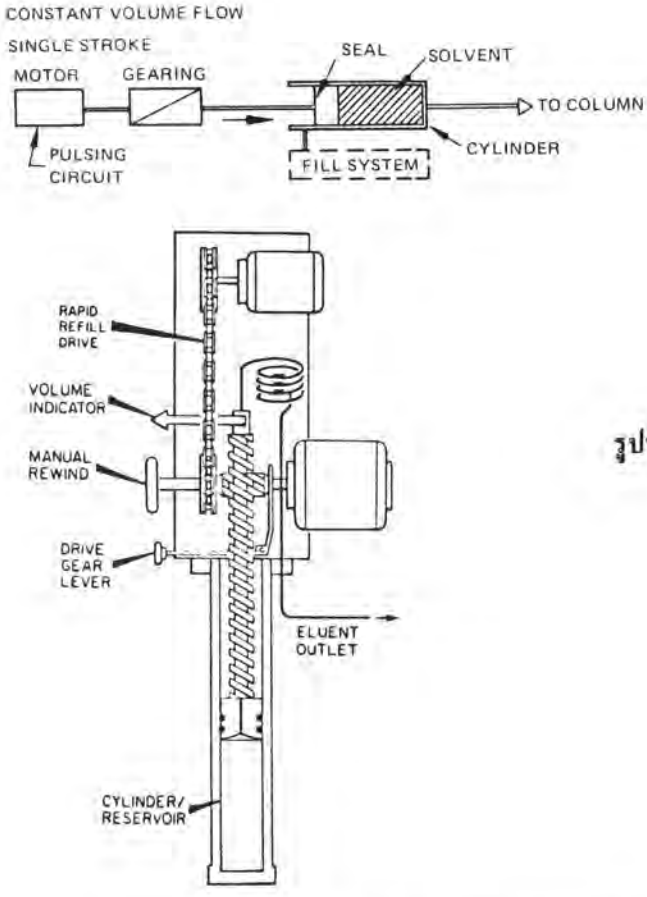
ช. ต้องไม่มีพัลส์ (pulse) หรือมีตัวที่ใช้ลดพัลส์ (pulse damper) หรือไม่ทำให้เกิด detector noise

1) *Mechanical Pumps หรือ Constant-Flow Pumps* ปั๊มประเภทนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

(1) *Syringe pump หรือ constant displacement pump* ดังแสดงในรูปที่ 13.18 ปั๊มชนิดนี้มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ (cylinder) ซึ่งจะบรรจุตัวทำละลายไว้แล้ว มีก้านสูบ (plunger) ซึ่งจะเคลื่อนที่เป็นแบบสกรู (screw) ผ่านกล่องเกียร์ (gear box) โดยมี stepping motor เป็นตัวควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่โดยจะไปทำให้ก้านสูบเคลื่อนที่เร็วขึ้นหรือช้าลง

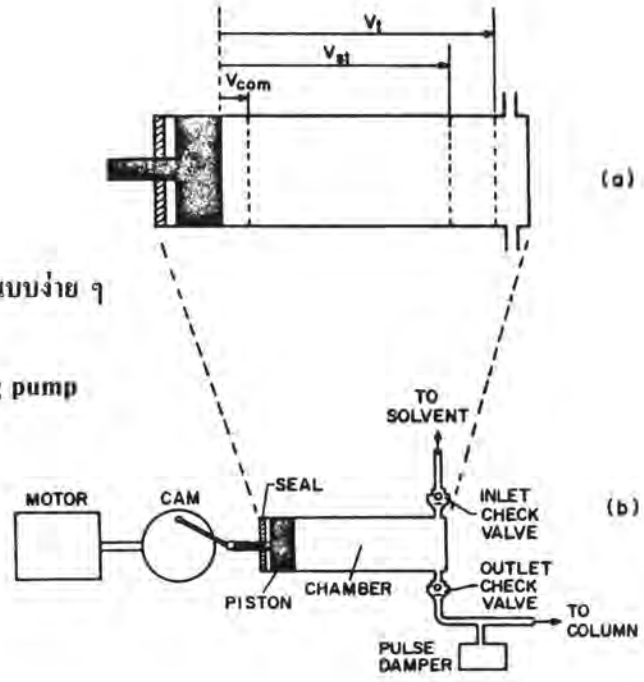
ข้อดี (advantages) ของปั๊มชนิดนี้ คือ เป็นปั๊มที่สามารถให้ความดันที่ค่อนข้างสูง (3,000–7,000 psi) ไม่มีพัลส์ (pulse free) การบำรุงรักษาก็ไม่ต้องทำบ่อย ๆ เพราะไม่มี check valve เกียร์ก็ทำง่าย ๆ และแข็งแรง reservoir มีขนาด 250–500 mL ดังนั้น ในงานประจำ pump cycles จะทำงานเพียง 1–2 ครั้งต่อวัน ช่วยลดการสึกหรอของ seal ได้

ข้อเสีย (disadvantages) คือ ปั๊มชนิดนี้มีข้อจำกัดของปริมาตร reservoir เมื่อใช้หมดแล้วจะต้องหยุดปั๊มเพื่อทำการเติมตัวทำละลายอีก การเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวทำละลายทำได้ช้า อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่อาจจะเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อยเมื่อใช้ความดันสูง ๆ แต่ก็ถือว่าไม่สำคัญ ไม่เหมือนกับเวลาใช้ของเหลวที่หนืด

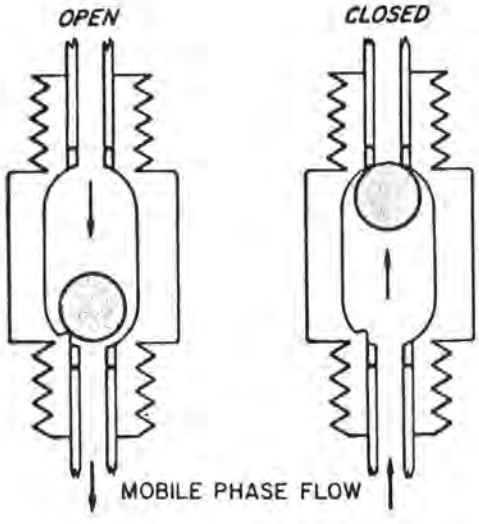


รูปที่ 13.18 แสดงลักษณะของ Syringe Pump

(2) *ปั๊มแบบชักลูกสูบ (reciprocating pumps)* ปั๊มชนิดนี้ดังแสดงในรูปที่ 13.19 ซึ่งเป็น reciprocating pump แบบง่าย ๆ ปั๊มชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก ก้านสูบของปั๊มจะเคลื่อนที่เข้าออกตลอดเวลาการทำงาน เมื่อลูกสูบเคลื่อนเข้าจะเป็นการดันเฟสเคลื่อนที่ให้เข้าสู่คอลัมน์ และเมื่อเคลื่อนออกจะดึงเอาเฟสเคลื่อนที่จาก reservoir เข้าสู่ลูกสูบผ่าน check valve (ดูรูปที่ 13.20) การควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กระทำได้โดยการปรับอัตราเร็วของการชักลูกสูบผ่านมอเตอร์และคอมพิวเตอร์



รูปที่ 13.19 แสดง Reciprocating Pump แบบง่าย ๆ
(a) เป็น pump chamber
(b) single head reciprocating pump



รูปที่ 13.20 แสดงการทำงานของ Check Valve

ข้อดีของ reciprocating pump : มีดังนี้

1. มีปริมาตรภายในต่ำ ทำให้การเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ได้ง่าย

2. การส่งเฟสเคลื่อนที่จะอยู่ในลักษณะต่อเนื่อง ซึ่งทำให้ไม่มีข้อจำกัดขนาดของภาชนะหรือขวดที่ใส่ตัวทำละลาย

3. ให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่ดี โดยไม่ต้องคำนึงถึง back pressure ของคอลัมน์

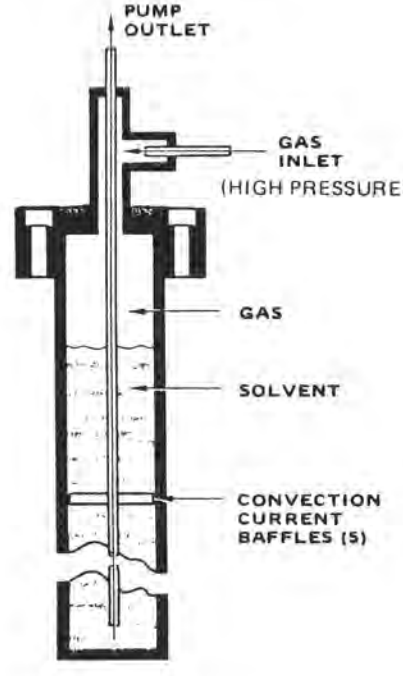
ข้อเสียของ reciprocating pump

การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่เข้าออกจากปั๊มจะเกิดพัลส์ (pulse) ขึ้น ทำให้ความไวของดีเทคเตอร์บางชนิดมีข้อจำกัด เนื่องจาก noise ทำให้ต้องมี pulse damper ซึ่งก็จะไปเพิ่มปริมาตรของระบบระหว่างปั๊มกับคอลัมน์ขึ้นอีก ทำให้เกิดความยุ่งยากในการเปลี่ยนตัวทำละลาย โดยจะต้องบรรจุตัวทำละลายเข้าไปในส่วนนี้ด้วย ดังนั้น ในกรณีที่ทำ gradient elution จะเกิดผลเสียได้

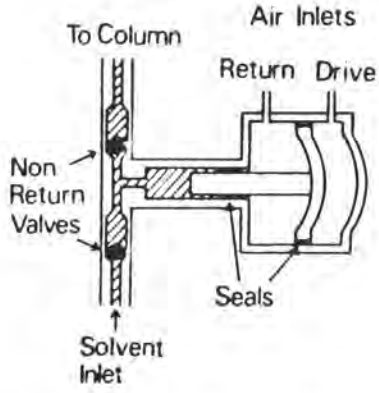
2) *Pneumatic Pumps*

ปั๊มชนิดนี้เป็นปั๊มที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางอีกชนิดหนึ่งใน LC สมัยใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 13.21 ซึ่งเป็นปั๊มชนิดง่าย ความดันของแก๊สจะกระทำต่อภาชนะที่ยืดหยุ่นได้ ซึ่งภายในบรรจุด้วยเฟสเคลื่อนที่ เครื่อง LC ที่ใช้ปั๊มชนิดนี้จะช่วยลดปัญหาเนื่องจากการละลายของแก๊สที่ความดันสูง และการเกิดฟองอากาศหรือต่อภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ ปั๊มชนิดนี้สามารถให้ความดันได้สูงสุดประมาณ 3,000 psi ซึ่งขีดจำกัดของมันขึ้นอยู่กับความดันของแก๊สที่ใช้ โดยทั่วไปแล้ว direct-pressure pump ที่ใช้กันในท้องตลาดมีความสามารถในการให้ความดันได้สูงสุดประมาณ 1,500 psi ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของการใช้งานของแก๊สที่ถูกอัดที่ความกดดันสูง

นอกจากนี้ ปั๊มที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่ง คือ pneumatic amplifier pump ดังแสดงในรูปที่ 13.22 หลักการทำงานของปั๊มนี้อาศัยความดันของแก๊สไปขับเคลื่อนลูกสูบ (piston) อย่างไรก็ตาม pressure amplification ได้จากการใช้พื้นที่ของแก๊สลูกสูบที่มากไปกระตุ้นลูกสูบของเหลวที่มีพื้นที่น้อย เหมือนกับ air-actuated syringe ดังนั้น ความดันของแก๊สที่เข้ามาจะค่อนข้างต่ำ แต่สามารถทำให้เกิดความดันที่สูงกับของเหลวได้โดยที่ของเหลวและแก๊สไม่ต้องสัมผัสกัน ทำให้ตัดปัญหาเกี่ยวกับฟองแก๊สได้ด้วย



รูปที่ 13.21 แสดงลักษณะของ Pneumatic Pump



รูปที่ 13.22 แสดงลักษณะของ Pneumatic Amplifier Pump

ข้อดี ของปั๊มนี้ คือ สามารถใช้ได้ดีที่ความดันค่อนข้างสูง การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่จะอยู่ในลักษณะที่ปราศจากพัลส์ อัตราการไหลเฟสเคลื่อนที่ค่อนข้างคงที่และให้ noise ต่ำมาก ข้อดีอีกอย่างหนึ่งก็คือ การโปรแกรมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ทำได้ง่ายมาก โดยเพียงแต่เปลี่ยนความดันของแก๊สที่ใช้

ข้อเสีย ของปั๊มชนิดนี้คือ มีขีดจำกัดของปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ก่อนที่จะมีการบรรจุ (refill) อีกครั้งหนึ่ง และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะคงที่เมื่อ pressure drop ของเครื่อง LC มีค่าคงที่

13.7 อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน (Pressure Monitoring Devices)

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับตรวจวัดความดันซึ่งอยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ความดันนี้จะเป็นสิ่งที่บอกว่ามีการอุดตันหรือไม่ หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ นอกจากนี้ การทราบความดันของเครื่องจะช่วยทำให้การปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ เป็นไปอย่างเหมาะสมที่สุด

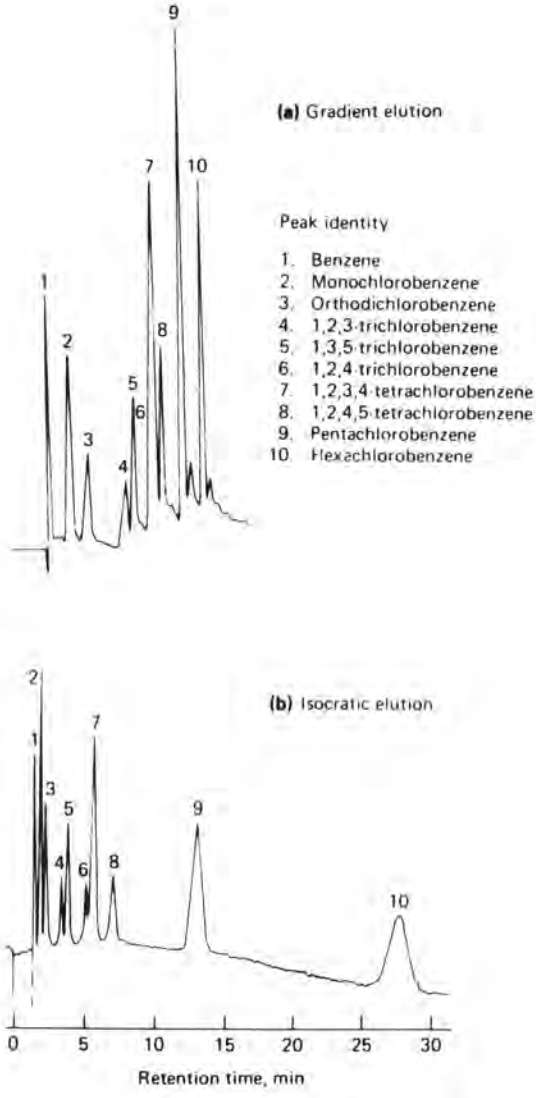
อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน ปัจจุบันมีอยู่ 2 ชนิด คือ

1) Pressure transducer หรือ strain guage อุปกรณ์ชนิดนี้ราคาค่อนข้างแพง แต่ให้ความถูกต้องดี และสามารถติดตั้งร่วมกับอุปกรณ์ที่ใช้เตือนเมื่อความดันต่ำเกินไปหรือสูงเกินไป หรือติดตั้งร่วมกับเครื่องตัดการทำงานของปั๊ม

2) Bourdon tube หรือ diaphragm guage อุปกรณ์นี้ราคาค่อนข้างถูก การทำงานก็ให้ความถูกต้องต่ำ และไม่สามารถติดตั้งร่วมกับอุปกรณ์ที่ใช้ป้องกันการทำงานผิดปกติของปั๊มได้

13.8 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำ Gradient Elution

โดยทั่วไป การแยกสารผสมที่ซับซ้อนและมีค่า k' แตกต่างกันมาก ๆ มักจะมีปัญหาเสมอ วิธีที่สะดวกที่สุดในการแก้ปัญหา คือ การใช้ gradient elution ใน LC การทำ gradient elution ก็เหมือนกับการทำ temperature programming ใน GC ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงค่า k' จะทำได้โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบ



รูปที่ 13.23 แสดงการเปรียบเทียบของ isocratic และ gradient elution ซึ่งสารตัวอย่างเป็น aromatic hydrocarbon, column 100 × 0.21 cm Permaphase ODS

UV detector 245 nm, 5 μL of chlorinated benzenes in propanol
(a) gradient elution 40/60 methanol-water to methanol at 8%
(b) isocratic : 50/50 methanol-water

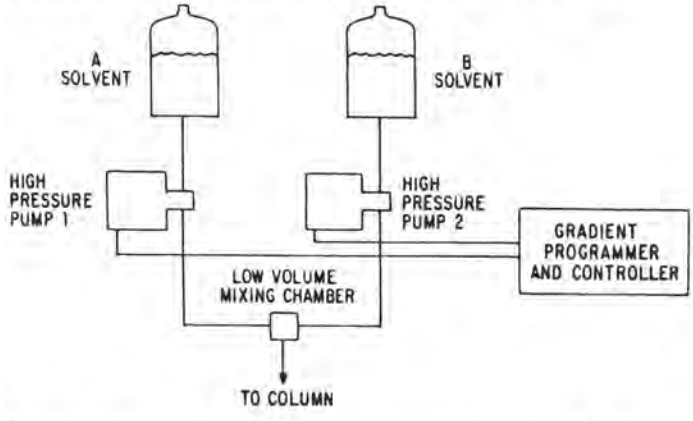
ของเฟสเคลื่อนที่ pH, ionic strength ของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งดีกว่าเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ รูปที่ 13.23 แสดงการแยกสารตัวอย่างอย่างเดียวกันด้วยวิธีทำ gradient elution รูป (a) เป็นแบบ isocratic elution (b) เป็นแบบ gradient elution ซึ่งจะเห็นได้ว่าช่วงแรกทำให้การแยกดีและใช้เวลาสั้นกว่า และให้ความไวที่ดีขึ้น แม้แต่สารบางตัวที่แยกไม่ออกด้วยวิธีการแบบ isocratic elution แต่เมื่อใช้ gradient elution ก็สามารถแยกออกได้

อุปกรณ์ที่ใช้กับ gradient elution ใน LC นั้น แบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

1) **แบบ low pressure gradient** เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันของบรรยากาศ และต่อจากนั้นก็จะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

2) **แบบ high pressure gradient** เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนจะเข้าสู่คอลัมน์

การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างที่ทำ gradient elution นั้นสามารถทำได้โดยการตั้งโปรแกรมเป็นแบบเส้นตรง (linear) หรือเส้นโค้ง หรือให้เป็นแบบขั้น (stepwise) การทำ gradient elution บางครั้งอาจไม่เหมาะกับเครื่องตรวจหาบางชนิด (ดูเรื่องเครื่องตรวจหา)



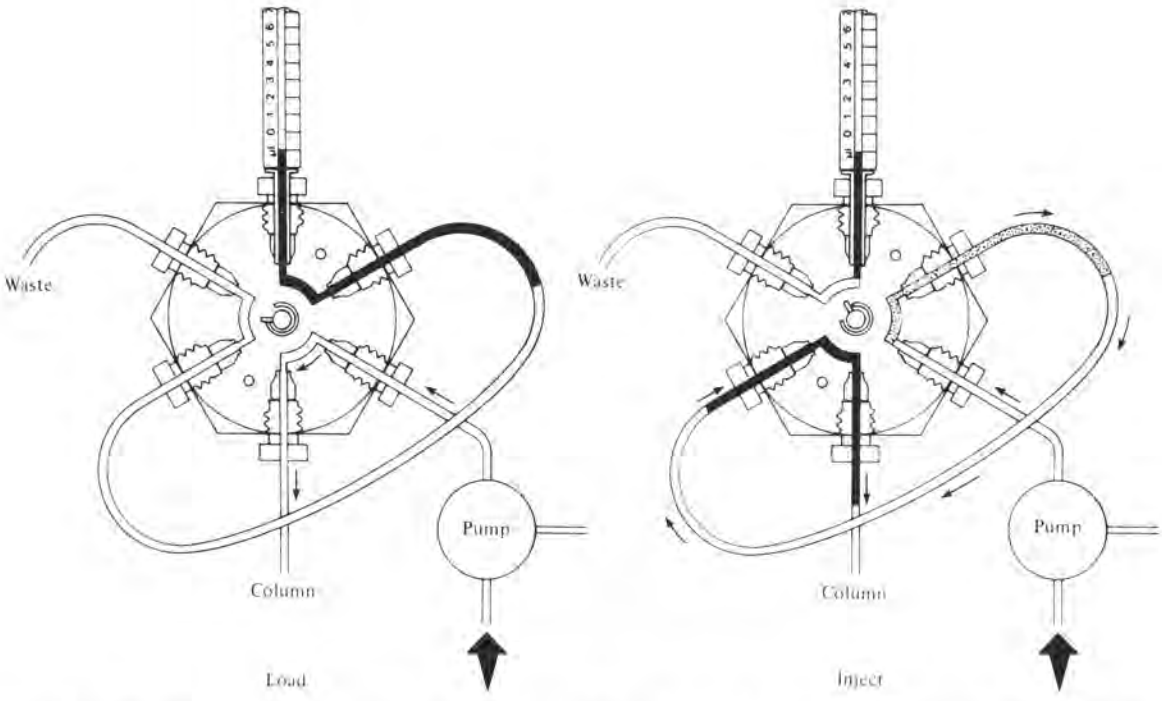
รูปที่ 13.24 แสดง high pressure gradient mixing ด้วยโปรแกรมที่ควบคุมปั๊มทั้งสองตัว

13.9 Sample Introduction Devices

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยัง LC คอลัมน์นั้นมีความสำคัญค่อนข้างมากต่อการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ ดังนั้น วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้จะมีมากมายหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้คือใช้ microsampling valve ส่วนวิธีที่ง่ายที่สุดคือใช้วิธีฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum ด้วย microsyringe และควรต้องระมัดระวังเนื่องจากความดันภายในสูง

13.10 Microsampling Valve

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปใน LC คอลัมน์ โดยใช้ microsampling valve ดังที่แสดงในรูปที่ 13.25 สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้ microsampling valve ที่ใช้อยู่ใน



รูปที่ 13.25 แสดง six-port rotary sample injection value สำหรับ HPLC ลูกศรแสดงทางเดินของการไหลของตัวทำละลาย

ปัจจุบันสามารถนำมาใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 μL จนกระทั่งถึงหลายมิลลิลิตร valve ซึ่งมีท่ออยู่ภายนอกยอมให้ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปได้ในปริมาณมาก นอกจากนั้น valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5,000–6,000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล

13.11 เครื่องตรวจวัด (Detector)

สิ่งที่ต้องการสำหรับเครื่องตรวจวัดใน LC สมัยใหม่ คือ ความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถทำการตรวจวัดสิ่งที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น เครื่องตรวจวัดในอุดมคติของ LC สมัยใหม่ควรจะมีลักษณะดังต่อไปนี้ คือ

1) มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้

2) ให้สัญญาณตอบรับ (response) ได้กับสารทุกชนิด

3) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่

4) เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน

5) ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพเชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง

6) ไม่ทำลายสารตัวอย่าง

7) ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับ peak ที่ต้องการตรวจสอบ

เครื่องตรวจวัดของ LC ในปัจจุบันจะมีคุณสมบัติไม่ครบตามที่กล่าวมาข้างต้น เครื่องตรวจวัดใน LC สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

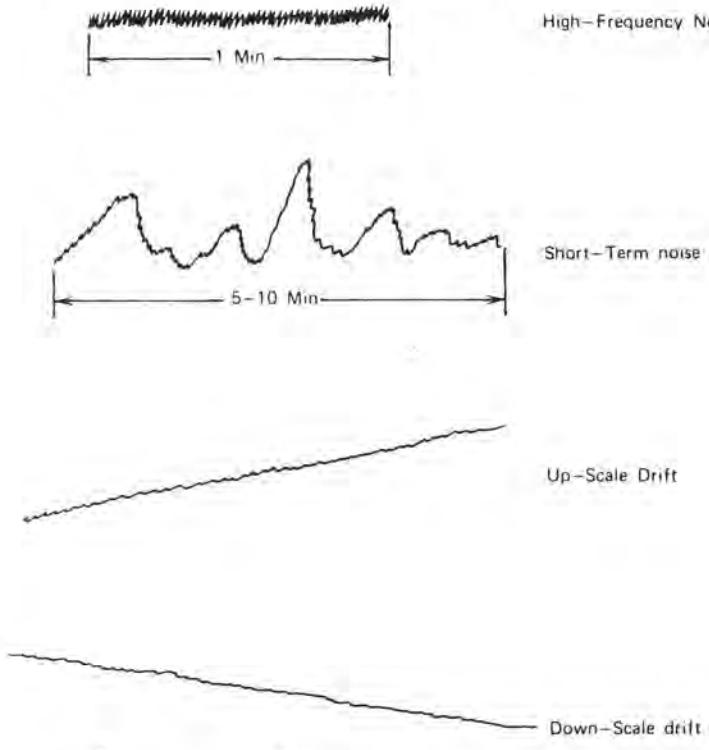
1) bulk property หรือ general detectors

2) solute property หรือ selective detectors

Bulk property detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index และ conductivity detectors สำหรับ **solute property detectors** เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-VIS, fluorescence หรือ electrochemical detectors เป็นต้น

ในการเลือกเครื่องตรวจวัดสำหรับงานบางชนิดนั้น ต้องการข้อมูลเกี่ยวกับรายละเอียด (specification) ของอุปกรณ์นี้ ซึ่งบางครั้งข้อมูลเหล่านี้จะหาได้จากบริษัทผู้ผลิต ผู้ขาย ดังนั้น พารามิเตอร์ที่สำคัญของเครื่องตรวจวัดที่จะนำมาใช้ในการพิจารณาเมื่อต้องการประเมินอุปกรณ์ชนิดนี้จะมีหลายพารามิเตอร์ด้วยกัน คือ

1) **สัญญาณรบกวน (noise)** ของเครื่องตรวจวัดซึ่งควรจะทราบ สัญญาณรบกวนนี้อาจจะมาจากอุปกรณ์ไฟฟ้า (instrument electronics) , การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ, การเพิ่มขึ้น-ลงของ line voltage, การเปลี่ยนแปลงสัญญาณจากเครื่องตรวจวัด, การเปลี่ยนแปลงของการไหล, pulse จาก pump เป็นต้น



รูปที่ 13.26 แสดงลักษณะของ detector noise และ drift

2) **การเบี่ยงเบนของเครื่องตรวจวัด (detector drift)** ซึ่งจะเป็นการเคลื่อนที่ของ base line ขึ้นหรือลง ดังแสดงในรูปที่ 13.26 ทั้งนี้เนื่องจากสัญญาณรบกวนจากคลื่นความถี่สูง (high frequency noise) ซึ่งจะปรากฏเป็นฝอย (frizz) บนส่วนของ base line และ short term noise ซึ่งจะปรากฏคล้ายกับ peak และเป็นเนินขึ้น ๆ ลง ๆ บนส่วนของ base line นอกจากนั้นยังมี up scale drift และ down-scale drift อีกด้วย

3) **Absolute Sensitivity** ของเครื่องตรวจวัด คือการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ทางกายภาพเพื่อต้องการทำให้ปากกาของเครื่องบันทึกผล (recorder) เกิดการหันเห (deflection) เต็มสเกลที่ความไวสูงสุด โดยกำหนดให้สัญญาณรบกวน (noise) มีค่าค่าหนึ่ง

4) **Detection Limit** คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวถูกละลายที่ควรจะตรวจวัดได้ โดยทั่วไปทางโครมาโทกราฟีนิยมใช้ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (minimum detectable quantity, MDQ) ซึ่งก็คือความเข้มข้นต่ำสุดของตัวถูกละลายที่ทำให้ peak มีความสูงเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวน (noise) ในโครมาโทแกรม ข้อที่น่าสังเกตก็คือ ความไวของตัวถูกละลายอาจจะขึ้นอยู่กับระบบของโครมาโทกราฟี เช่น ความสามารถในการตรวจสอบสารของ general detector บางชนิด เช่น differential refractometer จะแปรเปลี่ยนกับชนิดของเฟสเคลื่อนที่สำหรับสารตัวอย่างที่กำหนดให้

5) สำหรับเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นเครื่องมือในการหาปริมาณได้ดีนั้น สัญญาณที่ให้ออกมาควรจะเป็นสภาพเส้นตรงกับความเข้มข้นของตัวถูกละลายในช่วงของความเข้มข้นที่กว้างมากที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ และสิ่งนี้จะเป็นประโยชน์มากในกรณีที่ต้องการหาปริมาณสารที่มีน้อย ๆ เพียงตัวเดียวในสารตัวอย่าง

พารามิเตอร์ตัวอื่น ๆ ของเครื่องตรวจวัดนอกเหนือที่กล่าวมาข้างต้นและควรจะนำมาพิจารณาด้วย เช่น ปริมาตรของเครื่องตรวจวัดและรูปร่าง ตลอดจนการกระจายของแถบเนื่องมาจากท่อที่ใช้

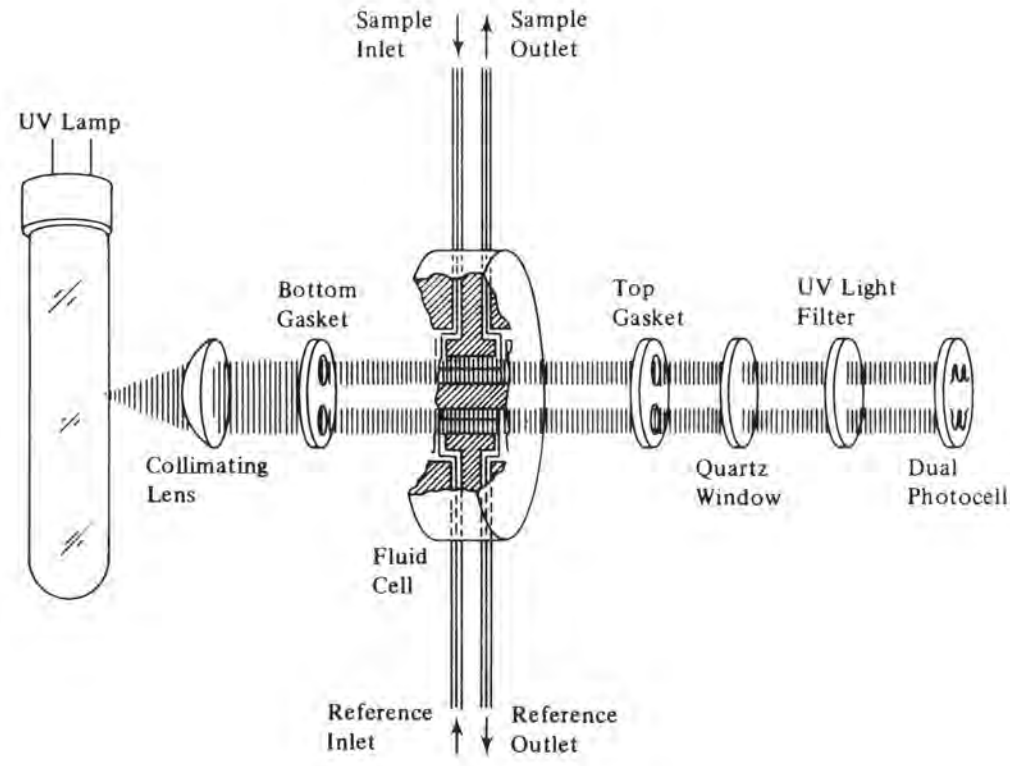
การออกแบบเซลล์ให้มีปริมาตรเล็กที่สุดเพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการของเครื่องตรวจหา พีกที่กว้างขึ้นเนื่องจากปริมาตรของเซลล์ในเครื่องตรวจหาซึ่งมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะกรณีของสารที่ถูก elute ออกมาตอนแรก ($k' < 2$) เมื่อใช้คอลัมน์ที่มีปริมาตรต่ำ และมีประสิทธิภาพสูง การลดการขยายกว้างของพีกสำหรับสารที่ถูก elute ออกมาก่อน ปริมาตรของเซลล์ภายในเครื่องตรวจหาควรจะมีค่าเป็น $\frac{1}{5}$ หรือน้อยกว่า $\frac{1}{10}$ ของปริมาตรของพีกที่สนใจ จากการศึกษาในปัจจุบันนี้ทราบว่า เซลล์ที่มีขนาดมาตรฐานที่ใช้ในเครื่องตรวจวัดโดยทั่วไปจะมีขนาดเท่ากับ 8 μL

1. **ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors)**

หลักการทำงานของเครื่องตรวจหาชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง เครื่องชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางใน HPLC เพราะเครื่องตรวจนี้มีลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

ในปัจจุบัน ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ ที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1) Fixed-wavelength UV detector
2) Variable UV-VIS detector
3) Photodiode-array detector

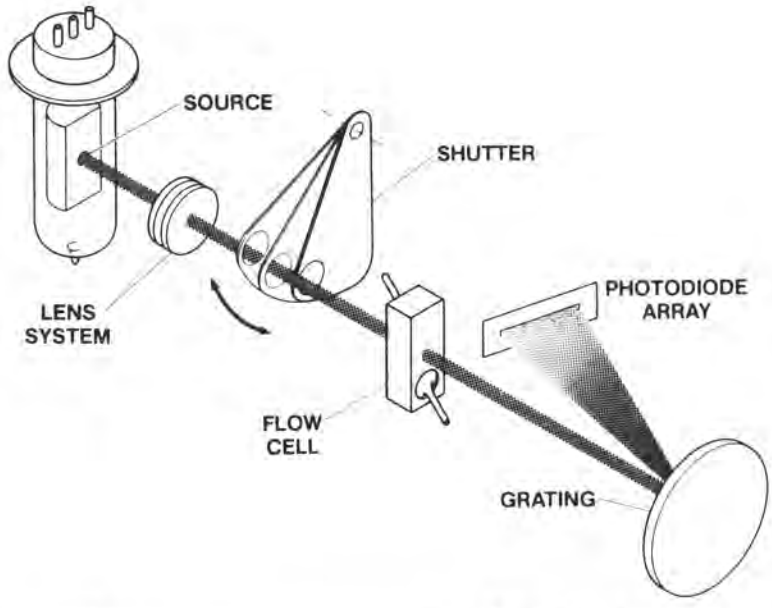


รูปที่ 13.27 แสดงแผนภาพของยูวี ดีเทคเตอร์

1) *Fixed-wavelenght UV detector* ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ประกอบด้วย flow-through cell และแหล่งกำเนิดแสง (light source) ที่ใช้เป็นแบบหลอดที่ทำด้วยปรอทที่ความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่เปล่งออกมาที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยทำให้เป็นลำแสงด้วยเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ แล้วให้แสงนี้ผ่านเซลล์ของสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจะผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์ แล้วจึงจะผ่านไปยังโฟโตเซลล์ (photo cell) หรือโฟโตไดโอด 2 ตัว โดยทั่วไป flow-through cell จะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. และยาว 10 มม. และมีปริมาตร 8 μL ดังแสดงในรูปที่ 13.27

นอกจาก mercury lamp แล้ว อาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่นที่ใช้ได้กับ fixed-wavelength detector ได้แก่ Zn lamp (206 nm) และ Cd-lamp (214 nm) สำหรับ D_2 lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200–400 nm) และบางช่วงของวิสิเบิล ดีเทคเตอร์ที่ใช้ฟิลเตอร์กรองแสง หรือใช้โมโนโครเมเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้องการ จะใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp

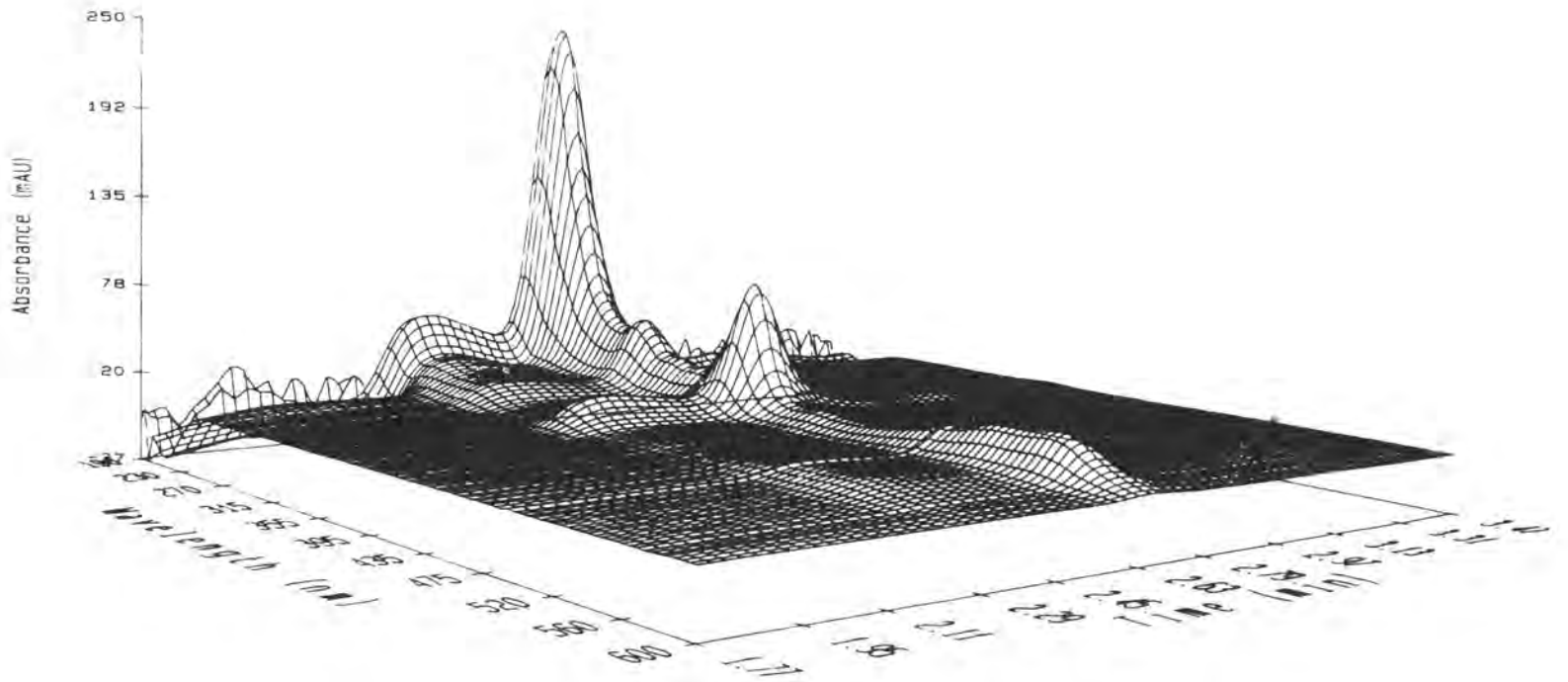
2) *Variable UV-VIS detector* ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ค่อนข้างจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็น LC detector ซึ่งประกอบด้วย D_2 และ W lamps หลอดทั้งสองนี้สามารถใช้วัดแสงได้ในช่วง 190–800 nm นอกจากนี้ยังมีโมโนโครเมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้ ดังนั้น เครื่องดีเทคเตอร์นี้จึงมีประโยชน์มาก สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป เพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่าง



รูปที่ 13.28 แสดง photodiode array ที่ใช้ใน LC ดีเทคเตอร์

ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และเหมาะสมมากในการนำมาใช้กับ gradient elution และตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ที่นำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะไม่ดูดกลืนแสงยูวี เช่น อะซีโตไนไตรด์ สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 190 nm ดังนั้น จึงไม่มีข้อจำกัดที่จะเลือกตัวทำละลายมาใช้กับเครื่องยูวีดีเทคเตอร์ เครื่องยูวีดีเทคเตอร์นี้มีประโยชน์มาก ในการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย ๆ ได้ โดยที่ตัวทำละลายหรือสารประกอบที่ปนอยู่ไม่ดูดกลืนแสงยูวี จึงไม่รบกวนการวิเคราะห์นี้

3) *Photodiode array detector (PDA)* ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดว่าเป็น solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลาย ๆ ความยาวคลื่นในขณะเดียวกัน มีลักษณะดังรูปที่ 13.28 ระบบทางเดินของแสงจะแตกต่างจากยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์โดยทั่วไป (ดูบทที่ 3) กล่าวคือ ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง "Reverse Optics" คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow-through cell ก่อนที่จะไปยังโมโนโครเมเตอร์หรือเกรตติง เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ แล้วจะไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอด เนื่องจากเครื่องดีเทคเตอร์นี้สามารถ scan UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมาก (ประมาณ 10 m sec. ต่อ 1 สเปกตรัม) ดังนั้น การนำเอาเครื่องดีเทคเตอร์นี้มาใช้กับ HPLC จะทำให้ทราบข้อมูลของพีกต่าง ๆ ในยูวีสเปกตรัมที่อยู่ในโครมาโทแกรมได้อย่างดี และข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ยังสามารถเก็บเข้าไว้ในคอมพิวเตอร์ ซึ่งสามารถนำออกมาใช้เมื่อไรก็ได้ ในการตรวจหาสารประกอบที่อยู่ในสารตัวอย่างว่าเป็นอะไรนั้น อาจนำไปเปรียบเทียบกับสารประกอบที่คิดว่าน่าจะเป็นไปได้ แล้วยังสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่แสดงค่าแอบซอร์แบนซ์ ความยาวคลื่นและกับเวลา ดังแสดงในรูปที่ 13.29 นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมยังใช้ตรวจหาสารเจือปนได้อีกด้วย



รูปที่ 13.29 แสดงลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากการเขียน 3 มิติ (absorbance vs wavelength vs time) ของการแยก hydroxylcobalamine (พีก 1 ประมาณ 2.5 นาที) cyanocobalamine (พีก 2, ประมาณ 3 นาที)

2. **เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลรีแฟรกโตมิเตอร์ (Differential Refractometers)**

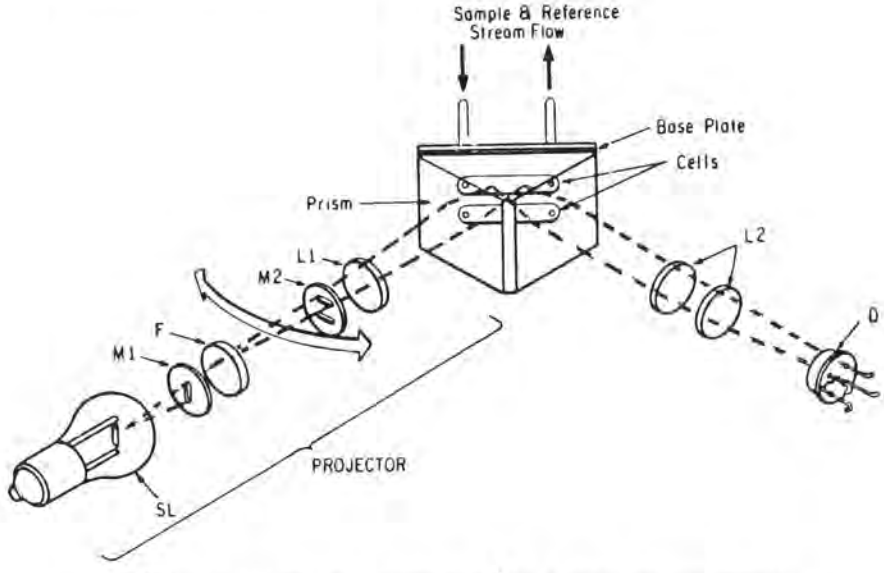
เป็นเครื่องที่ได้รับความนิยมมากใน HPLC รองลงมาจากเครื่องยูวี ดีเทคเตอร์ ซึ่งใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดรรชนีหักเห (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่อง ระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ เนื่องจากดีเทคเตอร์ชนิดนี้จัดอยู่ในแบบ bulk property หรือ general detector ดังนั้น มันจึงให้สัญญาณกับตัวทำละลายได้ทั้งหมด ตราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดรรชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

เครื่องวัด RI ที่ผลิตออกมาสู่ตลาด ที่สำคัญ ๆ มีอยู่ 3 ชนิด คือ

1) Fresnel Refractometer
2) Deflection Refractometer
3) Interferometric Refractometer

1) *เครื่อง Fresnel Refractometer*

ลักษณะและการทำงานของดีเทคเตอร์นี้ ดังแสดงในรูปที่ 13.30



รูปที่ 13.30 แสดงแผนภาพของเครื่อง fresnel refractometer

หลักการและการทำงานของเครื่องดีเทคเตอร์นี้อยู่บนฐานของ Fresnel's law reflection ซึ่งกล่าวว่า ปริมาณของแสงที่สะท้อน (reflected) ออกมาที่แก้วและของเหลวที่ประกบกันอยู่จะแปรเปลี่ยนตามมุมของแสงที่ตกกระทบและค่าดรรชนีหักเหของของเหลวและของแก้วนั้น เพื่อให้ได้สภาพไวของเครื่องสูงสุด และเป็น linearity นั้นต้องให้มุมตกกระทบของแสงบนแก้วที่ประกบอยู่กับของเหลวเป็นมุมน้อยกว่ามุมวิกฤติเล็กน้อย การลดความไม่แน่นอนของสัญญาณที่เกิดจากสัญญาณรบกวนและอุณหภูมิให้มีน้อยที่สุดนั้น ทำได้ด้วยการวัดเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าดรรชนีหักเหของสารตัวอย่างกับของสารละลายเปรียบเทียบ (reference) อยู่ตลอดเวลา จากรูปที่ 13.30 แสงจากแหล่งกำเนิดแสง (SL) จะผ่านไปยัง source mask-M1, เครื่องกรองแสง

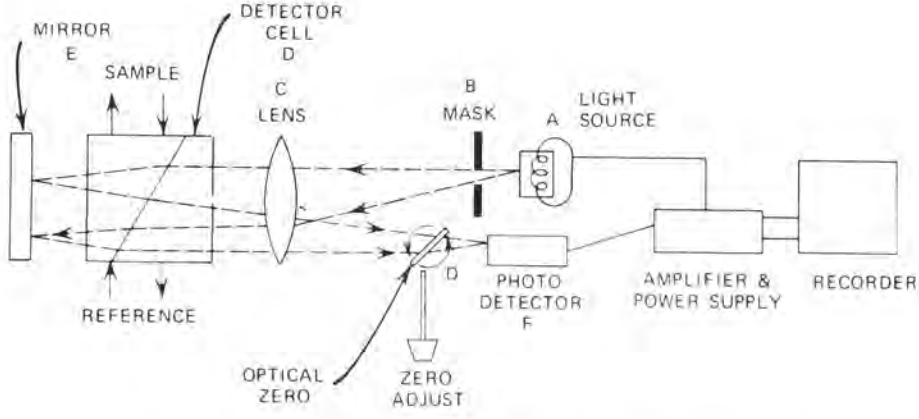
อินฟราเรด F และ aperture mask M2 แสงจะถูกทำให้รวมกันด้วยเลนส์ L1 mask M2 จะทำหน้าที่แยกลำแสงออกเป็น 2 ลำแสง จากนั้นแสงจะผ่านต่อไปยังเซลล์ปริซึม และตกกระทบบนแก้วที่สัมผัสกับของเหลว เซลล์ที่บรรจุสารตัวอย่างและสารละลายเปรียบเทียบทำด้วยเทฟลอนซึ่งถูกประกบอยู่ระหว่างแผ่นเหล็กไร้สนิมและเซลล์ปริซึม อุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นเป็นโปรเจกเตอร์จะแยกออกจากส่วนอื่น ๆ ทั้งนี้เพื่อทำให้สามารถปรับมุมของแสงที่ตกกระทบบน flow cell ได้ตามที่ต้องการ เมื่อแสงผ่านแก้วและของเหลวที่อยู่ใน flow cell แล้วแสงนั้นก็จะตกกระทบบนผิวของแผ่นเหล็กไร้สนิมแล้วสะท้อนกลับมาผ่านเลนส์ L2 ซึ่งทำหน้าที่บังคับให้แสงนั้นไปตกบนโฟโตดีเทคเตอร์

เซลล์ที่ใช้ใน fresnel RI detector มีขนาดเล็กมาก (ประมาณ 3 μL) และทำให้สะอาดได้ด้วยการผ่านเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น ดีเทคเตอร์นี้จึงมีความเหมาะสมอย่างมากที่ใช้ใน HPLC แต่ดีเทคเตอร์ก็มีขีดจำกัดของช่วงที่เป็นเส้นตรง และการใช้ปริซึมที่แตกต่างกัน 2 ชนิดเพื่อให้ครอบคลุมค่าดรรชนีหักเห ตั้งแต่ 1.33–1.63 ซึ่งก็ไม่ถือว่าเป็นข้อเสียแต่อย่างใด

2) *เครื่อง Deflection Refractometer*

เป็นดีเทคเตอร์ที่ธรรมดาที่สุดของ RI ดีเทคเตอร์ ดังแสดงในรูปที่ 13.31 แสงจากแหล่งกำเนิดแสง A จะถูกจำกัดด้วยการผ่านเครื่องกั้นแสง (mask) B แล้วแสงที่ออกมาจะถูกรวมให้เป็นลำแสง โดยผ่านเลนส์ C และจะผ่านต่อไปยังเซลล์ของเครื่องดีเทคเตอร์ D ในเซลล์นี้จะมีที่สำหรับใส่สารตัวอย่างและสารละลายเปรียบเทียบแยกออกจากกันด้วยแผ่นแก้วที่ตัดทะแยงมุม เมื่อส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในเซลล์ที่ใส่สารตัวอย่างเปลี่ยนไป ค่าดรรชนีหักเหก็จะเปลี่ยนแปลงไปด้วย ทำให้แสงที่ออกมากระทบกระจก E เกิดการเบน (deflection) ไป แล้วทำให้แสงที่ไปตกกระทบบนโฟโตดีเทคเตอร์ F เกิดการเบนไปด้วยค่าดรรชนีหักเหที่แตกต่างกันจากการที่แสงผ่านสารตัวอย่างและสารละลายเปรียบเทียบจะออกมาเป็นสัญญาณไฟฟ้าจากดีเทคเตอร์ D แล้วเข้าเครื่องขยาย (amplifier) และส่งต่อไปยัง recorder เพื่อบันทึกโครมาโทแกรม

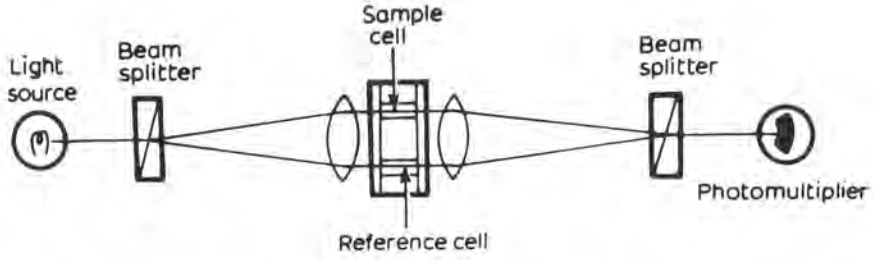
เครื่องดีเทคเตอร์แบบนี้มีข้อดีที่ช่วงของ RI ที่เป็นเส้นตรงนั้นกว้าง และจะใช้เซลล์เพียงอันเดียวเท่านั้นตลอดช่วงของการวัด RI



รูปที่ 13.31 แสดงแผนภาพของเครื่อง deflection refractometer

3) *เครื่อง Interferometric Refractometer*

เป็นดีเทคเตอร์ที่ใช้หลักการของ shearing interferometer ในการวัด ดังแสดงในรูปที่ 13.32 ลำแสงจากแหล่งกำเนิดแสง (เช่น 546 nm) จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ลำแสงด้วย beam splitter แล้วถูกโฟกัสด้วยเลนส์ให้ลำแสงผ่านสารตัวอย่างและผ่านสารละลายเปรียบเทียบ ซึ่งปกติจะใส่ไว้ในเซลล์ขนาด 5 μL กว้าง 3.2 มม. หลังจากนั้นลำแสงจะถูกนำมารวมกันด้วยเลนส์ และ beam splitter ชุดที่สอง เพื่อให้แสงตกลงบน interferometer detector ค่าดรรชนีหักเหที่ต่างกันของสารตัวอย่างและของสารละลายเปรียบเทียบทำให้เกิดความแตกต่างของระยะทางที่แสงผ่าน ซึ่งวัดได้ด้วย interferometer เป็นเศษส่วนของความยาวคลื่นแสง (fraction of the wavelength)



รูปที่ 13.32 แสดงแผนภาพของ Shearing Interferometric Refractometer

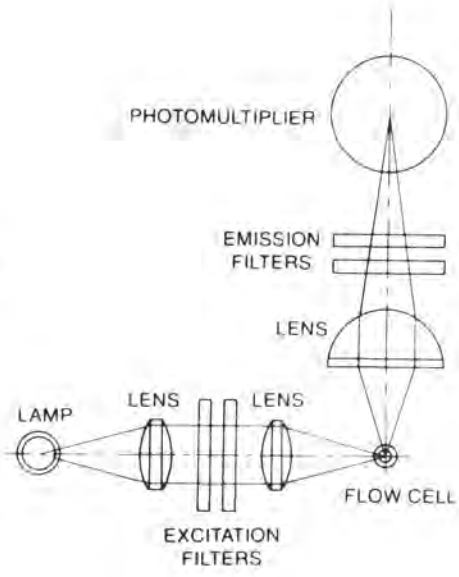
ลักษณะเฉพาะของเครื่องดีเทคเตอร์ประเภทนี้สามารถใช้ได้กับตัวถูกละลายได้แทบทุกชนิด แต่มีสภาพไวต่ำไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาสารที่มีปริมาณน้อย ๆ ดีเทคเตอร์นี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ จึงจำเป็นจะต้องควบคุมให้อุณหภูมิของ flow cell คงที่ แต่ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหล เป็นเครื่องที่ใช้ง่าย เชื่อถือได้ ไม่มีการทำลายสาร แต่ไม่เหมาะที่จะใช้กับ gradient elution สำหรับการเพิ่มสภาพไวของดีเทคเตอร์นี้ สามารถทำได้โดยพิจารณาจากการเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ให้มีค่า RI ต่างจากสารตัวอย่างที่สนใจให้มากที่สุด ถึงแม้ว่าเครื่องดีเทคเตอร์นี้จะมีขีดจำกัดบ้างในบางกรณี เช่น การใช้กับ gradient elution ไม่ได้ก็ตาม แต่ก็ยังเป็นที่นิยมใช้กันมากใน HPLC โดยเฉพาะใช้เป็นดีเทคเตอร์สำหรับ Gel Chromatography

4) *ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent Detector)*

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้จะมีสภาพไวสูงและเฉพาะ (selective) เนื่องจากมันมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี ดังแสดงในรูปที่ 13.33 แสงยูวีจากแหล่งกำเนิดให้ผ่านเครื่องกรองแสง หรือโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามที่ต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมาซึ่งมีความยาวคลื่นเฉพาะจะผ่านไปยังฟิลเตอร์หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นจึงให้แสงผ่านเข้าไปยังดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีประโยชน์มากเมื่อนำมาใช้ตรวจหาสาร ในสารตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ต่าง ๆ ที่มีปริมาณน้อย ๆ เป็นต้น

รูปที่ 13.33 แสดงแผนภาพของเครื่อง filter fluorometer



5) *เครื่อง Conductivity Detector*

ดีเทคเตอร์ชนิดนี้ได้นำมาใช้ในการตรวจหาตัวถูกละลายที่มีประจุในเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ดีเทคเตอร์นี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก ดังนั้นเวลาใช้งานจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ดีตลอดเวลา เฟสเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์เข้าสู่ conductivity cell เพื่อวัดค่า specific conductivity อย่างต่อเนื่อง ดีเทคเตอร์นี้จะให้ conductivity ที่เป็นเส้นตรงในช่วงของความเข้มข้นที่กว้าง ดีเทคเตอร์นี้เหมาะที่จะใช้กับระบบ isocratic elution มากกว่าใช้ในระบบ gradient elution เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient ทำให้ baseline เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ จึงทำให้มีข้อจำกัดอยู่บ้าง

นอกจากดีเทคเตอร์ทั้ง 6 ชนิด ซึ่งใช้กันมากใน HPLC แล้ว ยังมีดีเทคเตอร์ชนิดอื่น ๆ อีก เช่น infrared photometers, electrochemical detectors, radioactivity detectors จากตารางที่ 13.1 แสดงผลสรุปของลักษณะเฉพาะโดยทั่วไปของดีเทคเตอร์ที่ได้รับความนิยมมากในเครื่อง HPLC

13.12 การใช้ประโยชน์ของ Adsorption Chromatography

การเลือกเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่ถูกต้องสำหรับแยกของผสมนั้น บางครั้งเป็นเรื่องยาก ก่อนอื่นจะขอกล่าวถึงสมบัติของเฟสคงที่ชนิดต่าง ๆ เสียก่อน เพราะเฟสคงที่อาจบอกความแตกต่างของ LC วิธีหนึ่งกับวิธีอื่น ๆ ได้

13.12.1 อิทธิพลของเฟสคงที่ใน LSC : adsorption chromatography หรือ liquid solid chromatography (LSC) เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่เก่าแก่วิธีหนึ่งและนิยมใช้มากสำหรับ TLC หรือคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้มีการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองใน HPLC ตัวดูดซับ (adsorbent) เป็นของแข็งที่มีรูพรุนซึ่งพื้นที่ผิวของมันจะอยู่ในช่วง 50–1,000 ตารางเมตร/ กรัม

ตารางที่ 13.1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะที่สำคัญของ L.C. detectors ที่ใช้กันเป็นส่วนมาก

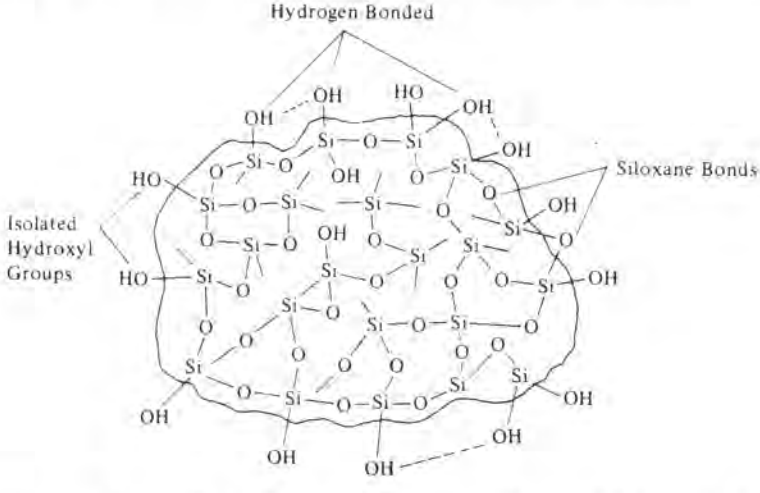
Parameter (units)	UV (Absorbance)	RI (RI units)	Radioactivity	Electrochemical (μ amp)	Infrared (absorbance)	Fluorometer	Conductivity (μMho)
Type	Selective	General	Selective	Selective	Selective	Selective	Selective
Useful with gradients	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No
Upper limit of linear dynamic range	2-3	10^{-3}	N.A.[a]	2×10^{-5}	1	N.A.	1000
Linear range (max)	10^5	10^4	Large	10^6	10^4	$\sim 10^3$	2×10^4
Sensitivity at ±1% noise, full-scale	0.002	2×10^{-6}	N.A.	2×10^{-9}	0.01	0.005	0.05
Sensitivity to favorable sample	2×10^{-10} g/ml	1×10^{-7} g/ml	50 cpm ^{14}C/ml	10^{-12} g/ml	10^{-6} g/ml	10^{-11} g/ml	10^{-8} g/ml
Inherent flow sensitivity[b]	No	No	No	Yes	No	No	Yes
Temperature sensitivity	Low	10^{-4}°C	Negligible	1.5%/°C	Low	Low	2%/°C

[a] N.A., not available.
[b] Because of sensitivity to temperature changes, some detectors *appear* to be flow sensitive.

ตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน TLC คือ silica, alumina, diatomaceous earth, kieselguhr และ polyamides สำหรับ silica นิยมใช้ใน HPLC รองลงมา คือ alumina และ silica gel ก็มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง จัดเป็นวัสดุพื้นฐานสำหรับพวก bonded phase และนำเอาอนุภาคชนิดนี้ที่เตรียมได้ไปใช้กับ LC ขนาดของตัวดูดซับจะมีหลายขนาดแล้วแต่ความต้องการของโครมาโทกราฟีชนิดต่าง ๆ ซึ่งหาซื้อได้ตามท้องตลาด สำหรับ TLC ขนาดของอนุภาคที่ใช้มากคือ 20–40 μm อย่างไรก็ตาม ถ้าเป็นคอลัมน์โครมาโทกราฟี ขนาดของอนุภาคจะอยู่ระหว่าง 100–150 μm และ HPLC จะใช้ขนาดของอนุภาคเล็กขนาด 3–10 μm

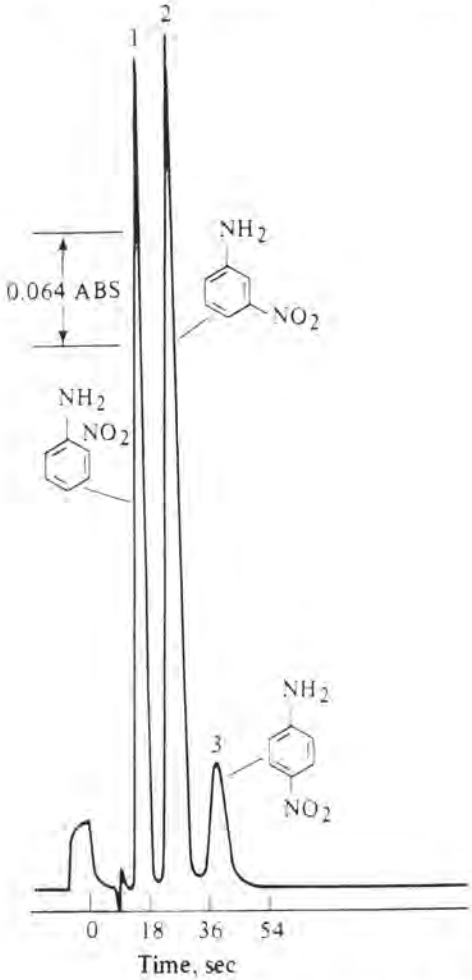
เพื่อแสดงให้เห็นถึงลักษณะของตัวดูดซับที่ใช้ในการแยกสารประกอบ จะต้องพิจารณาจากลักษณะที่ผิวของตัวดูดซับ เช่น silica gel ลักษณะโครงสร้างของมันมีลักษณะดังรูปที่ 13.34 silanol group มีสมบัติเป็นกรดเล็กน้อย และมีบทบาทที่สำคัญมากในการแยกสาร สำหรับ siloxane bonds (Si-O-Si-) มีอิทธิพลต่อการแยกสารน้อย หรือแทบไม่มีเลย silanol group (-Si-OH) เชื่อว่าเป็นกลุ่มที่มีระดับความเป็นกรดแตกต่างกันไป ส่วนที่เป็นกรดมากจะอยู่ใกล้กับอะตอมของซิลิกอนซึ่งจะเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของมัน และ silanol group นี้จะมีผลที่ไม่พึงปรารถนาในทางโครมาโทกราฟี เช่น การเกิด peak tailing เกิดการจับทางเคมี (chemisorption) การเติมตัวทำละลายที่มีขั้วลงไปในเฟสเคลื่อนที่ เช่น น้ำ หรือแอลกอฮอล์ จะช่วยลด activity (deactivate) ของกลุ่มนี้ลง

การเกิดอันตรกิริยาระหว่างกลุ่มที่อยู่บนผิวของตัวดูดซับกับตัวถูกละลายมีหลายประเภทด้วยกัน ทั้งที่เป็นแบบไม่เฉพาะ (เช่น เกิดการกระจายหรือเป็นแบบแรง Van der Waal) จนถึงเป็นแบบเฉพาะ (specific) เช่น เกิดอันตรกิริยาเกี่ยวกับขั้วคู่ถาวร (permanent dipoles) หรืออันตรกิริยาเกี่ยวกับการให้และรับอิเล็กตรอน (electron donor-acceptor interact ions) เช่น การเกิดพันธะไฮโดรเจน การหน่วงเหนี่ยวให้ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ช้าลงโดย silica gel หรือ alumina ส่วนใหญ่จะเกิดจากอันตรกิริยากับหมู่ฟังก์ชันนัลที่มีขั้วของตัวถูกละลาย ดังนั้น สารประกอบที่มีสมบัติทางเคมีต่างกัน เช่น สารไฮโดรคาร์บอนและแอลกอฮอล์



รูปที่ 13.34 แสดงลักษณะโครงสร้างของ silica gel ซึ่งแสดงให้เห็นพันธะต่าง ๆ และ silanol groups

จะถูกแยกออกจากกันได้ง่ายมากด้วย LSC พวกที่เกิดอันตรกิริยาเล็กน้อยก็จะทำให้แยกได้ยาก นอกจากจะมีหมู่ฟังก์ชันนัลเข้าไปต่อในโมเลกุลโดยอยู่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ กันก็จะสามารถแยกออกจากกันได้ พวกไอโซเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันนัลหลายหมู่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างดีด้วย LSC สำหรับ ortho-isomer ซึ่งมี intramolecular hydrogen bonds ทำให้มี intermolecular interaction กับผิวของเฟสคงที่น้อยลง จึงถูก eluted ออกมาก่อน ต่อมาจะเป็นพวก meta-isomer ส่วน para-isomer จะออกทีหลังเพราะเกิดอันตรกิริยาได้ดีกว่า เช่น การแยกไอโซเมอร์ 3 ชนิด ของไนโทรแอนิลีนด้วย HPLC ดังแสดงในรูปที่ 13.35



รูปที่ 13.35 แสดงการแยกไนโทรแอนิลีนด้วย LSC บน 10μm อะลูมินา คอลัมน์เป็น micropak A1-10 15 ซม. × 2.4 มม. เฟสเคลื่อนที่เป็น 40% CH_2Cl_2 ในเฮกเซน flow rate 100 mL/hr sample size 1 μg of each isomer detector : 254 nm UV absorption

13.12.2 อิทธิพลของเฟสเคลื่อนที่ใน LSC : เมื่อทำ Gradient Elution

จริง ๆ แล้ว อันตรกิริยาที่เกิดใน LSC จะเกี่ยวข้องกับการแข่งขัน (competition) ระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลาย (X) กับโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่ (S) เพื่อเข้าครองตำแหน่งดูดซับ สมดุลที่เกิดขึ้นแสดงได้ดังสมการ

$$X_m + n\,S_{ads} \rightleftharpoons X_{ads} + n\,S_m \qquad (13.12)$$

เมื่อ X_m = โมเลกุลของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

X_{ads} = โมเลกุลของตัวถูกละลายในสถานะที่ถูกดูดซับ

S_{ads} = โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งถูกดูดซับที่ผิวของตัวดูดซับ

S_m = โมเลกุลของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่

n = จำนวนโมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกดูดซับถูกแทนที่ด้วยการดูดซับ 1 โมเลกุลของ X

ถ้าเป็นการดูดซับของเฟสเคลื่อนที่ที่ดีกว่าจะมีผลทำให้การดูดซับของตัวถูกละลายลดลง ตัวทำละลายจะแบ่งออกเป็นชนิดต่าง ๆ เพื่อให้สอดคล้องกับความสามารถในการดูดซับของมัน ในการแบ่งนี้ จะพิจารณาได้จาก eluotropic series ดังแสดงในตารางที่ 13.2 ซึ่งเป็น eluotropic series สำหรับตัวดูดซับอะลูมินา แต่การจัดแบ่งนี้สามารถนำไปใช้กับตัวดูดซับที่มีขั้วตัวอื่น ๆ เช่น silica gel ได้เช่นเดียวกัน

Eluotropic Series สามารถนำไปใช้หาตัวทำละลายที่มีความแรง (strength) เหมาะสมที่สุดสำหรับการแยกสารแต่ละชนิดในการทำ isocratic elution สมมติว่าตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีความแรงสูงเกินไป ทำให้ค่า k' สำหรับตัวถูกละลายมีค่าน้อย ตัวทำละลายที่มีความแรงน้อยกว่าจะถูกนำมาใช้แทน ในทำนองเดียวกันถ้าตัวทำละลายเริ่มแรกในเฟสเคลื่อนที่มีความแรงน้อย (ค่า k' จะมาก) ดังนั้นตัวทำละลายที่มีความแรงสูงจะถูกนำมาใช้แทน การทดลองในลักษณะนี้ก็เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด บางครั้งอาจจะทำได้เร็วมากโดยใช้ TLC มากกว่าใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 13.2 แสดง Eluotropic Series สำหรับอะลูมินา

ตัวทำละลาย	Solvent-Strength Parameter (ϵ°)
n-Pentane	0.00
Isooctane	0.01
Cyclohexane	0.04
Carbon tetrachloride	0.18
Xylene	0.26
Toluene	0.29
Benzene	0.32
Ethyl ether	0.38
Chloroform	0.40
Methylene chloride	0.42
Tetrahydrofuran	0.45
Acetone	0.56
Methyl acetate	0.60
Aniline	0.62
Acetonitrile	0.65
i-Propanol, n-propanol	0.82
Ethanol	0.88
Methanol	0.95
Ethylene glycol	1.11
Acetic acid	มาก

Source : L.R. Snyder J. Chromatogr., 16, 55 (1964)

ในบางกรณี การใช้ตัวทำละลายเพียงตัวเดียวเป็นเฟสเคลื่อนที่อาจจะไม่เหมาะสมในการแยกสาร ทั้งนี้เนื่องจากว่าพารามิเตอร์ความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength parameter ϵ°) ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด มาผสมกันเพื่อปรับให้ ϵ° มีค่าที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารชนิดนั้น ๆ ตัวอย่างเช่น ตัวทำละลาย isooctane ($\epsilon^\circ = 0.01$) และ methylene chloride ($\epsilon^\circ = 0.42$) เมื่อนำมาผสมกันในสัดส่วนที่เหมาะสมจะทำให้ค่าความแรงของตัวทำละลายเหมือนกับ carbon tetrachloride ($\epsilon^\circ = 0.18$) นอกจากนี้ การปรับปรุงให้ selectivity ใน LSC ให้ดีขึ้นจะต้องอาศัยผลของตัวทำละลายตัวที่สอง ซึ่งผล (effects) นั้นทำให้สารละลายผสมมีค่า ϵ° เท่ากัน แต่ทั้งนี้เนื่องมาจากอันตรกิริยา solvation ชนิดต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจน สภาพความเป็นกรดของเบส (basicity) และอื่น ๆ ล้วนเป็นผลในการแปรเปลี่ยนค่า relative retention หรือ selectivity การใช้ตัวทำละลาย 3 และ 4 ชนิดผสมกันเป็นเฟสเคลื่อนที่จะไปเพิ่ม selectivity และ retention effects

13.13 การใช้และประโยชน์ของ Partition Chromatography

Partition หรือ Liquid-Liquid Chromatography (LLC) มีลักษณะคล้าย ๆ กับการสกัดด้วยตัวทำละลาย จริง ๆ แล้วข้อมูลที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายสามารถนำไปใช้ในการทำนาย partition coefficient ของ LLC ได้ ความสามารถในการแยกสารและเวลาที่ใช้ในการแยกสารของ LLC จะดีกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายมาก ดังนั้น LLC จะเหมาะมากกว่าในการใช้แยกสารของผสมเชิงซ้อน

การเลือกเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ใน LLC

หลักในการเลือกเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่นั้น ให้พิจารณาจากการที่เฟสทั้งสองไม่ควรละลายซึ่งกันและกัน เพราะมิฉะนั้นสมบัติของตัวทำละลายที่ใช้ในเฟสทั้งสองต้องแตกต่างกัน ตัวอย่างจากตารางที่ 13.2 อาจจะเลือกน้ำเป็นเฟสคงที่ และเลือกเพนเทนให้เป็นเฟสเคลื่อนที่ใน normal LLC อย่างไรก็ตาม น้ำสามารถละลายในเพนเทนได้ในปริมาณที่แน่นอน ถ้าใช้เพนเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่และปล่อยให้ไหลผ่านตัว support ที่ถูกเคลือบด้วยน้ำเป็นเวลานานพอสมควรเพนเทนก็จะละลายเอาน้ำออกไปอย่างช้า ๆ และผลสุดท้ายจะไปเปลี่ยนธรรมชาติของกลไกของการแยกนั้น ด้วยเหตุนี้ เฟสเคลื่อนที่จะต้องอิ่มตัวเสียก่อนด้วยเฟสคงที่ก่อนที่จะนำไปใช้ในคอลัมน์ การทำให้มันอิ่มตัวก่อนนั้นทำได้หลายวิธี คือ อาจจะใช้วิธีคนเฟสทั้งสองเข้าด้วยกันจนกระทั่งเข้าสู่สภาวะสมดุล แต่ใน LC วิธีที่สะดวกนั้นจะใช้ precolumn ต่ออยู่ก่อน injector และคอลัมน์ที่ใช้แยก precolumn ที่ใช้จะประกอบด้วยอนุภาคที่มีพื้นที่ผิวมาก ๆ เช่น silica gel เคลือบด้วยเฟสคงที่ที่ใช้ในคอลัมน์ในปริมาณที่สูง (30–40% โดยน้ำหนัก) เมื่อตัวทำละลายไหลผ่าน precolumn ตัวทำละลายจะถูกทำให้อิ่มตัวด้วยเฟสคงที่ และจะไม่ละลายเอาเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์ออกไป การใช้คอลัมน์ชนิดดังกล่าวไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน แต่จะมุ่งมาใช้ bonded phase คอลัมน์ที่เสถียรมากกว่า

ในทางปฏิบัติ การเพิ่ม solvent strength เพื่อทำให้สารประกอบที่มีค่า k สูงถูกชะล้างออกมาเร็วขึ้นนั้นจะเป็นผลทำให้เฟสคงที่ถูกละลายออกมาจาก support เมื่อ solvent strength มีค่าสูงพอที่จะละลายเฟสคงที่ออกมาได้ การทำให้เฟสเคลื่อนที่อิ่มตัวก่อนที่จะผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะไม่สามารถแก้ปัญหานี้ได้ นั่นคือเทคนิคนี้ไม่สามารถนำมาใช้ใน gradient elution ได้

13.14 การใช้และประโยชน์ของ Bonded Phases Chromatography

LLC ที่ใช้กันทั่วไปเป็นแบบธรรมดา มีขีดจำกัดมาก ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ได้โดยใช้ bonded phase คอลัมน์ ปัจจุบันนี้ bonded phase chromatography (BPC) มีบทบาทที่สำคัญมากใน HPLC อนุภาคเล็ก ๆ ของ silica gel จะถูกนำมาใช้เป็นวัสดุพื้นฐานในการเตรียมหรือสังเคราะห์พวก bonded phase จากรูปที่ 13.34 จะพบว่า silica gel มี silanol group มากมายบนผิวของมัน ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยา silanization ได้กับสารประกอบพวก organochloro หรือ organoalkoxy-silane เพื่อให้เกิดพันธะทางเคมีแบบ siloxane ที่เสถียร พันธะ siloxane (= Si-O-Si-C) จะเสถียรแทบทุกสภาวะที่ใช้ใน LC แต่จะไม่เหมาะเมื่อใช้ที่ pH ต่ำ (< 2) และ pH สูง ๆ (> 7.5) การเตรียม siloxane จากปฏิกิริยาที่สภาวะไม่มีน้ำ (anhydrous conditions) จะได้ monomeric phase หรือเกิด polymerization ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมความชื้นเพื่อให้ได้ polymeric phase สำหรับ monomeric phase โดยทั่วไปจะให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า เนื่องจากสมดุลระหว่างตัวถูกละลายและเฟสคงที่นั้นจะเกิดได้เร็ว อย่างไรก็ตาม polymeric phase จะให้ความจุของสารตัวอย่างสูง เฟสทั้งสองที่กล่าวมานี้สามารถใช้ gradient elution ได้ ซึ่งนับว่าเป็นข้อดีของ BPC

BPC แบ่งออกได้เป็น 2 เทคนิค ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพขั้วสัมพัทธ์ (relative polarity) ของเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ คือ

Normal-Phase BPC

Reverse-Phase BPC

13.14.1 Normal-Phase BPC จะใช้เมื่อเฟสคงที่มีสภาพมีขั้ว (เช่น aminopropyl) มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ (เช่น hexane) ในบางกรณี การชะล้างตัวถูกละลายจะมีลักษณะคล้ายกับ LSC ที่ใช้ silica gel เป็นคอลัมน์ สารประกอบที่ไม่มีขั้ว (non-polar compounds) ชอบที่จะละลายเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดังนั้นสารพวกนี้จะผ่านออกมาจากคอลัมน์เป็นลำดับแรก ๆ และสารประกอบที่มีขั้วจะถูกหน่วงเหนี่ยวให้อยู่ในคอลัมน์ได้นาน เนื่องจากเกิดอันตรกิริยากับเฟสคงที่ซึ่งมีสภาพมีขั้ว ทำให้มันถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ทีหลัง

13.14.2 Reversed-Phase BPC จะใช้เมื่อเฟสคงที่เป็นพวกไม่มีขั้ว (non-polar) เช่น octadecyl silane และเฟสเคลื่อนที่เป็นพวกมีขั้ว (polar) เช่น น้ำ เมทานอล อะซิโตไนไทรล์ เป็นต้น ลำดับของการชะล้างตัวถูกละลายจะมีลักษณะตรงกันข้ามกับที่เกิดขึ้นใน normal-phase BPC ดังนั้น สารประกอบที่มีขั้วจะถูกชะล้างออกมาก่อน เนื่องจากมันชอบที่จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ ส่วนสารประกอบที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดอยู่ในคอลัมน์ทำให้ถูกชะล้างออกมาทีหลัง เทคนิคนี้จะเหมาะสมอย่างมากกับสารประกอบที่ไม่ละลาย หรือละลายได้เล็กน้อยในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่น ๆ ที่ละลายในน้ำได้ดี เนื่องจากสารประกอบอินทรีย์เป็นจำนวนมากมีพฤติกรรมของการละลายในลักษณะนี้ ดังนั้น BPC จึงเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้อย่างมากใน HPLC

Normal-Phase BPC

โดยการเปลี่ยนสภาพของฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่มีขั้วของ organic side chain จะทำให้ selectivity แตกต่างกันไปจาก silica gel ตารางที่ 13.3 เป็นรายชื่อของฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่มีขั้วซึ่งเกิดพันธะทางเคมีกับ silanol

ตารางที่ 13.3 แสดง Polar Bonded Phase Structures

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

group ของ silica gel เป็นพันธะ siloxane อนุภาคชนิดนี้ใช้ในงาน normal BPC และสามารถหาซื้อได้ทั่วไป เมื่อเปรียบเทียบกับ silica gel จะพบว่าอนุภาคที่มีขั้วชนิดนี้จะมีข้อดีที่มันจะเข้าสู่สมดุล เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายได้ทันทีซึ่งจะเป็นประโยชน์มากต่อการใช้ packing ชนิดนี้กับพวก gradient elution นอกจากนี้มันยังทำให้ไม่เกิด peak tailing ทั้งนี้เนื่องจาก silanol group ที่เป็นกรดจะถูกแทนที่ด้วยฟังก์ชันนัลกรุ๊ปพวกอื่นที่มีสภาพมีขั้วน้อยลง เช่น cyano หรือ amino

ถึงแม้ว่า normal-phase BPC สามารถใช้แทน LSC ที่มี silica gel เป็นคอลัมน์ในการวิเคราะห์สารหลายประเภทได้ ตัวอย่างเช่น การแยกสารประกอบ polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) ซึ่งมี alkyl side chain แตกต่างกันให้ออกจากกัน และลักษณะนี้จะมีความสำคัญมากในการนำเทคนิคนี้มาตรวจวิเคราะห์หาสาร PAH ในน้ำมันเชื้อเพลิง และสามารถนำเอาวิธีการนี้มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสาร PAH ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งที่มีปริมาณน้อย ๆ ในอากาศและน้ำเสีย นอกจากนี้ normal-phase BPC ยังมีความเหมาะสมมากในการนำมาแยกสารประเภทอื่น ๆ อีก เช่น การแยก alkanes และไขมัน (lipids) และแยกพวกน้ำตาล (saccharides) steroids และไวตามินที่ละลายในไขมัน เช่น ไวตามิน A, D และ E normal-phase BPC จะเหมาะกับการแยกสารประกอบที่ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย

Reverse-Phase (RP) BPC

เทคนิคทาง RP-BPC นี้อาศัยสมบัติของเฟสคงที่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยทั่วไป เฟสคงที่นั้นจะมีหมู่ octadecyl หรือ octyl silane functional group และเฟสเคลื่อนที่ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล หรืออะซีโตไนไทรล์ ตารางที่ 13.4 แสดงรายชื่อของ packing ชนิดที่นิยมใช้กันในงาน RP และหาซื้อได้ทั่วไป

ตารางที่ 13.4 แสดง Siloxane Bonded-Phase Packings ที่ได้รับความนิยมในงาน reversed-phase

$-n-C_{18}H_{37}$	
$-n-C_8H_{17}$	
$-n-C_6H_{13}$	
$-(CH_2)_3C\equiv N$	

ความนิยมของ RP-BPC นั้นเนื่องมาจากสาเหตุต่อไปนี้

1. สามารถนำมาใช้แยกพวก nonionic, ionic และสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ บางครั้งสามารถแยกสารประเภทนี้พร้อม ๆ กันได้โดยใช้คอลัมน์และเฟสเคลื่อนที่อย่างเดียวกัน

2. Bonded-phase คอลัมน์ค่อนข้างเสถียร แต่ควรจะต้องระวังเกี่ยวกับการควบคุม pH ของเฟสเคลื่อนที่

3. เฟสเคลื่อนที่ที่นิยมใช้ เช่น น้ำมีราคาถูกและหาได้ง่าย

4. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างนิยมใช้กันมาก คือ เมทานอล ซึ่งราคาไม่แพงนักและมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง

5. สามารถทำนายลำดับของการที่สารจะถูกชะ (elute) ออกมาจากคอลัมน์ได้ เพราะว่า retention time จะเพิ่มขึ้นตามสมบัติของสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ

6. สมดุลที่เกิดขึ้นในคอลัมน์จะเร็ว ทำให้เหมาะแก่การนำเอาไปใช้ใน gradient elution

เนื่องจาก RP-BPC นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงมีการแบ่งวิธีการนี้ออกเป็นวิธีการย่อย ๆ อีกโดยขึ้นอยู่กับกลไกที่ใช้ในการแยก ดังแสดงในตารางที่ 13.5 การควบคุมการแตกตัวของสารเป็นเทคนิคทั่วไปที่นิยมใช้ในการเปลี่ยนแปลงลักษณะการยึดสารในคอลัมน์ เช่น การแยกสารประกอบที่แตกตัวได้น้อย และ

ตารางที่ 13.5 แสดง Reversed-Phase BPC Techniques

เทคนิค	ประโยชน์	เฟสเคลื่อนที่หลัก
ปกติหรือใช้ประจำ	ทั่วไป	(A) น้ำรวมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำ
ควบคุมการเกิด Ionization	สารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้	(B) เช่นเดียวกับ (A) แต่เพิ่ม buffer salt
Ion suppression	weak acids หรือ bases	(C) เช่นเดียวกับ (A) แต่เพิ่มกรดหรือเบสสำหรับ weak acids เช่นเดียวกับ (A) เพิ่มกรด (เช่น กรด H_3PO_4 หรือ $HClO_4$), สำหรับ weak base เช่นเดียวกับ (A) แต่เพิ่มเบส (เช่น CO_3^{2-} dil NH_3)
Ion pair	strong หรือ weak acids และ bases; cations และ anions	(D) สำหรับ cations เช่นเดียวกับ (B) แต่เพิ่ม alkyl sulphonate หรือ sulphate (เช่น sodium heptanes-sulphonate; สำหรับ anions ใช้เช่นเดียวกับ (B) แต่เพิ่ม tetraalkyl ammonium salt (เช่น tetrabutyl ammonium chloride)
Complexation	metals, chelates stereoisomers	(E) เช่นเดียวกับ (B) เพิ่ม metal chelates, chirol reagents, silver ion (สำหรับ olefins), ligands
Non aqueous reversed phase (NARP)	very non polar compounds (เช่น ไขมัน triglycerides, long-chain fatty acids)	(F) Acetonitrile หรือ methanol เพิ่ม tetrahydrofuran หรือ methylene chloride

ในการควบคุมการแตกตัวของสารทำได้โดยการใช้ buffer salts ในการเปลี่ยนแปลง pH ของเฟสเคลื่อนที่ นอกจากนี้ ion suppression ก็เป็นวิธีย่อยอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการแตกตัวของสารที่แตกตัวได้น้อย เช่น กรดอ่อน (acetic acids) ใช้กรดแก่ (strong acids) ที่มีความเข้มข้นต่ำ (1–2% โดยปริมาตร) เติมลงไปในเฟสเคลื่อนที่เพื่อทำให้กรดอ่อนอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว ผลที่ได้ก็คือได้ลักษณะของพีกดีขึ้นเช่นเดียวกัน วิธีการนี้สามารถนำมาใช้กับด่างอ่อน (weak base) ได้โดยการเติมแอมโมเนียมคาร์บอเนต หรือแอมโมเนียเจือจางมาก ๆ

Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography (RP-IPC)

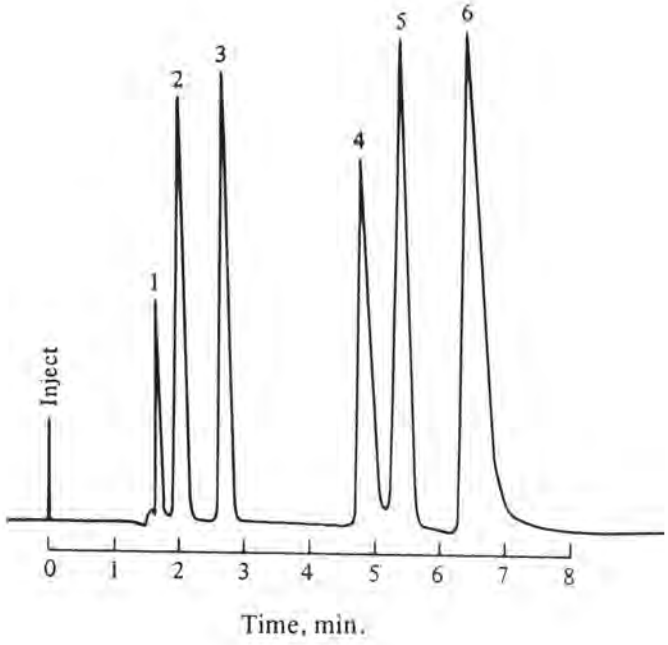
เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการแยกสารประกอบไอออนิกหรือสารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ดี วิธีการ คือ จะทำให้สารที่แตกตัวหรือไอออนเกิดการรวมตัวเป็นสารที่เป็นกลาง ไม่มีประจุในสารละลาย โดยใช้ counter ions ที่มีฟังก์ชันนัลกรุ๊ปมีประจุตรงข้ามกับสารที่จะวิเคราะห์ ตัวอย่างเช่น ในการวิเคราะห์สารประกอบพวก sulphonic acid dyes ซึ่งจะอยู่ในสภาพเป็นไอออนหมดในสารละลายแทบทุก pH ถ้านำสารละลายนี้ผ่านเข้าไปใน reversed-phase คอลัมน์ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของผสมของเมทานอลกับน้ำ พีกที่ได้ในโครมาโทรแกรมจะมีรูปร่างหรือลักษณะไม่ดี เช่น เกิด tailing พฤติกรรมนี้เนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่มีประจุและ acidic silanol group ที่ยังเหลืออยู่บนผิวของ silica gel ดังนั้น ในการเติมสารประกอบ tetraalkyl ammonium ลงไปในเฟสเคลื่อนที่จะทำให้เกิดการรวมกันของไอออนสองชนิดที่มีประจุต่างกัน เป็นสารใหม่มีลักษณะเป็นกลางจึงทำให้รูปร่างและลักษณะของพีกดีขึ้นมาก

กลไกจริง ๆ ของ RP-IPC ค่อนข้างจะซับซ้อนมากกว่าการเกิดอันตรกิริยาของสารมีประจุอย่างธรรมดา ในกรณีนี้อาจเป็นไปได้ที่จะเกิดการรวมตัวกันของไอออนในสารละลายก่อน หรืออาจจะเกิดเป็น ion-exchanger บนผิวของเฟสคงที่ แต่ว่ากลไกของการแยกแบบแรกน่าจะเชื่อถือได้มากกว่า อย่างไรก็ตาม เทคนิค RP-IPC กลายเป็นคู่แข่งที่สำคัญของ ion-exchanger chromatography ในการแยกสารประกอบที่เป็นไอออน ตัวอย่างเช่น การแยกสารประกอบพวก antihistamines และ decongestants ดังแสดงในรูปที่ 13.36 ในการแยกนี้ ได้เติม pentane-sulphonic acid ลงไปในเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้เกิดอันตรกิริยากับฟังก์ชันนัลกรุ๊ปของยาพวกนี้ที่มีไนโทรเจนเป็นองค์ประกอบ ผลของการแยกจึงอาศัยพื้นฐานของการเกิดอันตรกิริยาของไอออน

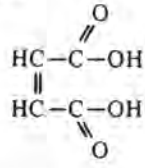
การใช้วิธีการทำให้เกิดสารเชิงซ้อน (complexation) ด้วยการเติมสารประกอบอื่น ๆ ลงไปในเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้สมดุลเคมีที่เฉพาะนี้ควบคุมให้เกิดการแยกและมีความเฉพาะ (selectivity) ได้ ตัวอย่างเช่น สาร Olefins สามารถเกิด chargetransfer complexs ได้กับ silver ion (Ag^+) ที่เติมลงไปในเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำอยู่ด้วย ดังนั้น สารประกอบที่มีพันธะคู่ (double bond) จะมีค่า retention times ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลให้การแยกสารประเภทนี้ออกจากสารอื่นได้ดีขึ้น

13.15 Ion-Exchange Chromatography

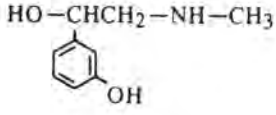
โดยทั่วไปแล้ว เทคนิคนี้ใช้สำหรับแยกสารประกอบที่มีประจุ สารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ เช่น สารอินทรีย์ที่เป็นกรดหรือเบส และสารประกอบที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับ ionic groups ได้ เช่นพวก



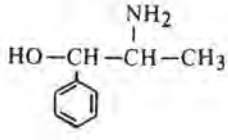
1. Maleic acid



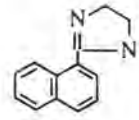
2. Phenylephrine



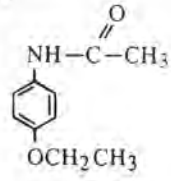
3. Phenylpropanolamine



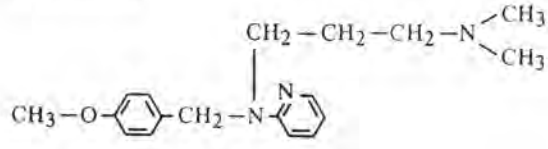
4. Naphazoline



5. Phenacetin



6. Pyrilamine



รูปที่ 13.36 แสดงการแยก antihistamines และ decongestants ต่าง ๆ ด้วยเทคนิค reverse-phase ion-pair chromatography

chelates หรือ ligands ใน ion-exchange chromatography เฟสคงที่จะมี side-chain ที่ประกอบด้วยฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่มีประจุ เฟสเคลื่อนที่ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย counter ion ซึ่งก็คือไอออนที่มีประจุตรงข้ามกันกับ ionic group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่ใช้เป็น ion-exchanger และ counter ion นี้จะอยู่ในสภาวะที่สมดุลกับประจุที่อยู่บน resin ในลักษณะของ ion pair การที่มีไอออนที่มีประจุเหมือนกันกับประจุของ counter ion จะทำให้เกิดสมดุลขึ้น ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{cation exchange} : X^+ + R^-Y^+ \rightleftharpoons Y^+ + R^-X^+ \qquad \text{----------(13.13)}$$

$$\text{anion exchange} : X^- + R^+Y^- \rightleftharpoons Y^- + R^+X^- \qquad \text{----------(13.14)}$$

เมื่อ X = ไอออนตัวอย่าง

Y = ไอออนในเฟสเคลื่อนที่ (counter ion)

R = ส่วนที่เป็นไอออนบน exchanger

ในกรณีนี้จะเกิดการแข่งขันกันขึ้นระหว่างไอออนในสารตัวอย่างกับ counter ion เพื่อแย่งชิงตำแหน่งของไอออนที่อยู่บน resin ซึ่งคล้ายกับการแข่งขันเพื่อแย่งตำแหน่งดูดซับระหว่างตัวถูกละลายกับตัวทำละลายใน LSC

13.15.1 เฟสคงที่ (Stationary Phase)

เฟสคงที่ที่ใช้ใน ion exchange อาจเป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นของแข็งซึ่งได้มาจากธรรมชาติ เช่น sodium aluminosilicate และ clays เช่น montmorillonite หรือที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น Zirconium phosphate นอกจากนั้นยังมีพวก resin ซึ่งได้จากการสังเคราะห์โดยวิธี copolymerization ของสาร styrene และ divinyl benzene ปริมาณของ divinyl benzene ที่ใช้ในการสังเคราะห์จะเป็นตัวควบคุม % cross-linking ใน resin ถ้า cross-linking ใน resin มีมากจะไปลดการละลายของ poly-styrene และช่วยทำให้โครงสร้างของมันแข็งขึ้น ซึ่งเหมาะแก่การนำมาใช้ที่ความดันสูง เช่น HPLC อย่างไรก็ตาม การเพิ่ม cross-linking ใน resin มีผลในการลดความพรุน (porosity) ใน resin ให้น้อยลง ซึ่งไปมีผลทำให้ mass transfer ที่เกิดขึ้นไม่ดีพอ แต่ขณะเดียวกันถ้าใช้ cross-linking ใน resin ต่ำ resin นั้นจะบวมได้ เนื่องจากดูดซับเอาเฟสเคลื่อนที่เข้าไป ปริมาณของ cross-linking แสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์ divinyl benzene ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 2–12% ค่าเฉลี่ยโดยทั่วไปจะอยู่ในราว 8%

คอลัมน์ที่บรรจุด้วยพวก resin จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าคอลัมน์ที่บรรจุด้วย ion exchanger ที่มีแกน (core) เป็น silica อย่างที่ใช้ใน LC ด้วยเหตุผลนี้ group ที่มีประจุจะต่อเป็นพันธะเคมีเข้ากับอนุภาคเล็ก ๆ ของ silica gel และ ion exchanger ชนิดนี้จะแสดงลักษณะเฉพาะที่ดีของ mass transfer และสามารถใช้ได้ที่อุณหภูมิห้อง คอลัมน์ที่บรรจุด้วย resin ส่วนใหญ่จะใช้ที่อุณหภูมิสูง เช่น ที่อุณหภูมิ 60–80°C เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้ดีขึ้น อีกประการหนึ่ง resin คอลัมน์ยังใช้ได้กับ pH ในช่วงกว้าง (เช่น 0–14 ในหลาย ๆ กรณี) กว่า silica (pH 1 – 7.5) และมีอายุการใช้งานมากกว่า แม้จะใช้งานแล้ว ก็สามารถนำมาใช้ได้อีก

โดยปกติแล้ว ionic group จะถูกเติมเข้าไปใน resin โดยใช้ปฏิกิริยาเคมีแล้วทำให้เกิด cross-linking ทั้ง cation และ anion resin ยังแบ่งออกเป็น strong และ weak อีกด้วย ซึ่งขึ้นอยู่กับความแรง

ของกรดและด่างของฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่อยู่บน resin นั้น strong cation exchanger โดยทั่วไปจะมี sulphonic group ($-SO_3H$) ซึ่งเตรียมได้โดยใช้วิธี sulphonation resin ส่วน weak cation-exchanger จะมี carbonyl group ($-COOH$) สำหรับ strong anion exchange จะมี tetraalkyl ammonium group เช่น $(-CH_2-N(CH_3)_3^+Cl^-$ และ weak anion exchanger จะมี $-NH_3^+ Cl^-$ หรือ $-NHR_2^+ Cl^-$

ตัวแปรอีกตัวหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมของเฟสคงที่ใน ion exchanger คือ ขนาดของรูพรุนบนผิวของอนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ โดยเฉพาะเมื่อต้องการนำไปใช้แยกสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น โปรตีน และ oligonucleotides อนุภาคที่ใช้บรรจุคอลัมน์เพื่อแยกสารประกอบประเภทนี้ควรจะมีรูขนาดใหญ่ เพื่อทำให้โมเลกุลของสารเหล่านั้นสามารถแพร่เข้าไปในอนุภาคแล้วเกิดอันตรกิริยากับ ionic group ได้ สำหรับ silica based packing ที่ใช้ในงานนี้ควรจะมีรูขนาดกว้าง 300–500 Å เพื่อใช้ในการแยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่

13.15.2 Exchange Capacity

จำนวนและความแรงของกลุ่มของไอออนที่อยู่บนผิวของอนุภาคของแข็งที่ใช้บรรจุในคอลัมน์จะเป็นตัวกำหนดความจุของการแลกเปลี่ยน (exchange capacity) เนื่องจากความจุของการแลกเปลี่ยนไอออนจะมีผลต่อการชะ (elute) ของตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ ดังนั้น ion exchanger ที่มีความจุสูงจะนิยมใช้ในการแยกสารละลายผสมที่ซับซ้อน เนื่องจากการเพิ่มการยึดเหนี่ยวของสารในคอลัมน์จะทำให้การแยกนั้นดีขึ้น สำหรับความจุ resin ที่เป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน พบว่าขึ้นอยู่กับ pH โดยทั่วไปแล้ว resin จะมีความจุสูงสุดอยู่ในช่วงที่แคบ และขึ้นอยู่กับค่า pK ของฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่อยู่บน resin นั้น resin ที่เป็นกรดหรือเบสแก่จะมีความจุสูงสุดในช่วงกว้างและมีประโยชน์ต่อการใช้ในงานทั่ว ๆ ไปกว้างขวางกว่า ion exchanger ที่อ่อน (weak) ซึ่งจะถูกนำมาใช้ในการแยกพวกเบสแก่ กรดแก่ หรือสารประกอบที่มีฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่เป็นไอออนหลายกรุ๊ป โดยสารประกอบประเภทนี้จะยึดเกาะดิดได้อย่างเหนียวแน่นกับ ion exchanger ที่แก่ (strong) เพราะฉะนั้น weak ion exchanger จึงถูกนำมาใช้ในการแยกสารประกอบประเภทโปรตีน เปปไทด์ และพวก sulphonate สำหรับ resin ที่มีรูพรุนและถูกจัดอยู่ในประเภท strong resin จะมีความจุของมันอยู่ในช่วง 3–10 meq/g สำหรับพวก ion exchanger ที่ใช้ silica gel เป็นแกน จะมีความจุของต่ำกว่า 5–10 เท่า ส่วน resin ที่แก่และจัดอยู่ในประเภท pellicular จะมีความจุต่ำกว่ามาก คือ 5–10 μeq/g

13.15.3 อิทธิพลที่เกี่ยวกับ Distribution Coefficients และ Selectivity

Ion Exchange Chromatography เกี่ยวข้องกับตัวแปรมากกว่า LC เทคนิคอื่น ๆ ค่า distribution coefficient และ selectivities เป็นฟังก์ชันของ pH ประจุและขนาดรัศมีของตัวถูกละลาย ความพรุนของ resin ionic strength และชนิดของบัฟเฟอร์ ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ และอื่น ๆ จำนวนตัวแปรของการทดลองทำให้ ion exchange chromatography เป็นเทคนิคที่ใช้ได้กว้างขวาง เนื่องจากตัวแปรแต่ละตัวสามารถนำมาใช้ในการปรับให้การแยกนั้นดีขึ้น แต่ข้อยุ่งยากก็มีเนื่องจากเวลาที่ต้องการทำให้การแยกดีมีขีดจำกัด เมื่อนำเอา polystyrene-divinyl benzene resin มาใช้ การดูดซับพวก organic ions (โดยเฉพาะพวก aromatic) จะเป็นแบบ ionic force กับกลุ่มที่มีประจุบน resin และเป็นการเกิดอันตรกิริยากับองค์ประกอบของ resin ตัวอย่างเช่น phenol จะถูกยึดได้อย่างแข็งแรงใน anion exchange ทั้งที่การ

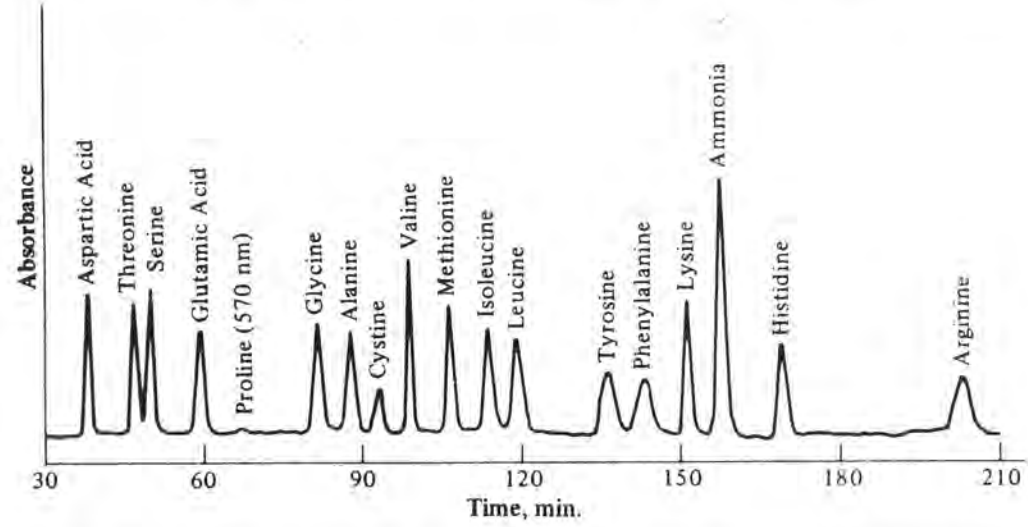
แตกตัวของ phenol นั้นเกิดได้น้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายมีผลต่อ matrix ของ resin ที่ใช้ นอกจากนั้น พวกสารประกอบที่ไม่มีประจุสามารถที่จะแยกได้โดยใช้ resin ทั้งนี้เนื่องจากว่ากลไกในการแยกอาจเป็นแบบ partition ในกรณีเหล่านี้ การใช้บัฟเฟอร์จะช่วยลดการละลายของสารประกอบในเฟสเคลื่อนที่ จึงเป็นการเพิ่มสัมพรรคภาพ (affinity) ระหว่างสารประกอบกับ resin ซึ่งวิธีการนี้บางครั้งเรียกว่า "salting-out" chromatography และนำมาใช้ในการแยกแอลกอฮอล์ได้ตามลำดับของขนาดโมเลกุลหรือน้ำหนักโมเลกุล

สารประกอบที่มีประจุเป็นกลางซึ่งเกิดสารเชิงซ้อนกับไอออนได้สามารถใช้กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนแยกออกจากกันได้ ตัวอย่างที่รู้จักกันดี คือ การแยกน้ำตาลโดยการผ่านขั้นตอนการรวมตัวของน้ำตาลกับ borate buffer ที่ใช้ในการชะสารประเภทนี้ การแยก ligands สามารถทำได้โดยการผ่านขั้นตอนของการเกิดอันตรกิริยาระหว่าง ligands กับไอออนที่ถูกดูดซับบน resin นั้น

การนำเอาผงเซลลูโลสมาผ่านขั้นตอนทางเคมีเพื่อทำให้มันมี ion exchange group จะได้มีประโยชน์สำหรับทำ TLC และ column chromatography เนื่องจากโครงสร้างของมันไม่แข็ง (lack rigidity) การนำมาใช้จึงมีขีดจำกัดสำหรับทำคอลัมน์ที่ใช้ความดันต่ำ แผ่นเซลลูโลสที่ผ่านขั้นตอนการปรับปรุงทางเคมีเพื่อให้มี ion exchange group จะหาซื้อได้ทั่วไป และสามารถนำมาใช้เป็น ion exchange ได้ใน paper chromatography

13.15.4 การใช้ Ion Exchange Chromatography

เทคนิค ion exchange chromatography นี้ ส่วนมากจะใช้ในอนินทรียเคมีและชีวเคมี ในทางชีวเคมีมักจะเกี่ยวข้องกับการแยกสารที่มีขั้วที่ละลายน้ำได้ เช่น โปรตีนและกรดอะมิโน ไอออนของโลหะสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ cation exchanger โดยอาศัยลักษณะเฉพาะของอัตราส่วนของประจุต่อรัศมีของ hydrated ions ภายใต้สภาวะที่ใช้เปรียบเทียบกัน พวกไอออนที่มีประจุมากจะถูกยึดไว้ในคอลัมน์ได้ดีกว่าพวกไอออนที่มีประจุน้อย ในกรณีการแยกไอออนที่มีประจุเท่ากัน สัมพรรคภาพของไอออนจะลดลง



รูปที่ 13.37 แสดงการแยกกรดอะมิโนโดยเทคนิคทาง ion-exchange chromatography

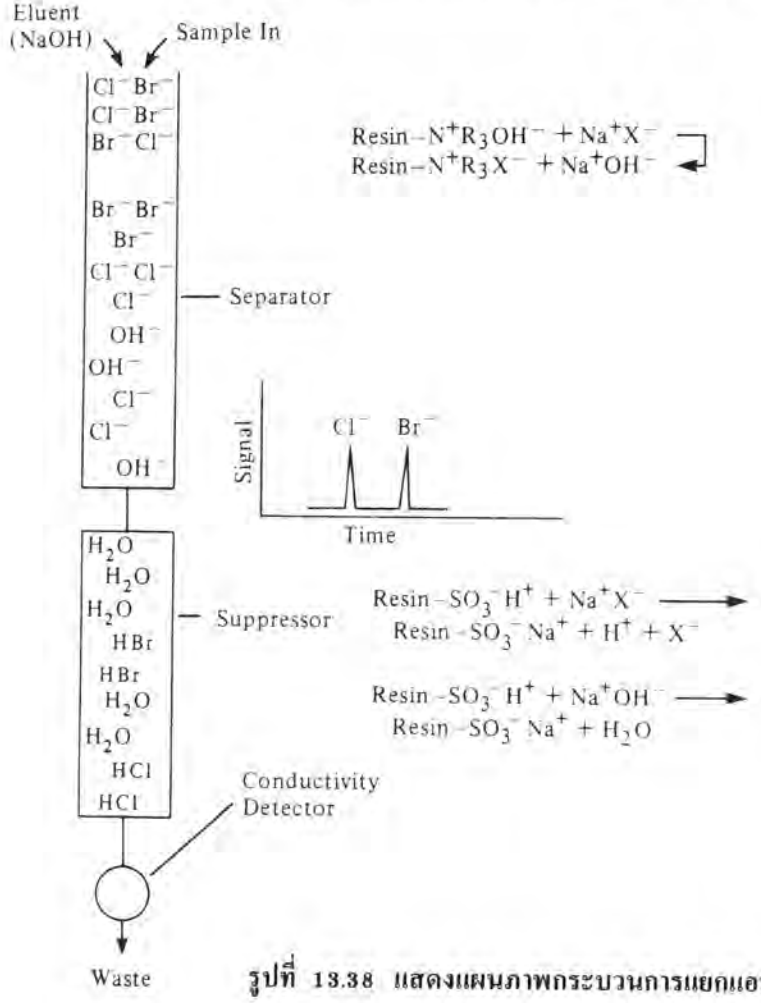
ตามขนาดของ hydrated ion ที่เพิ่มขึ้น

ในการใช้ ion exchanger chromatography นั้น ได้มีการพัฒนาไปอย่างมากในการแยกสารผสมที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน เช่น แยก fission products จาก atomic reactors หรือแยกสารผสมทาง biochemical field เพื่อหาโครงสร้างของโปรตีนและ nucleic acids เป็นต้น รูปที่ 13.37 แสดงการแยกกรดอะมิโนโดยใช้ flow-through colorimetric detector

Resin เป็น durrum DC-1A ซึ่งเป็น sulphonated polystyrene-divinyl benzene cation exchanger มี $d_p = 8\ \mu m$ 10^{-9} mole mixture flow rate 70 mL/hr

13.16 ไอออนโครมาโทกราฟี (Ion Chromatography, IC)

IC ก็คือ ion exchange เทคนิคนั่นเอง โดยใช้คอลัมน์ที่มีความจุต่ำกับดีเทคเตอร์ชนิด conductivity เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารอนินทรีย์และสารอินทรีย์ที่มีประจุ โดยทั่วไป การวิเคราะห์สารประเภทนี้ที่มีปริมาณน้อย ๆ ในทางปฏิบัติแล้วมักนิยมใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์หาแอนไอออนที่มีปริมาณ



รูปที่ 13.38 แสดงแผนภาพกระบวนการแยกแอนไอออน

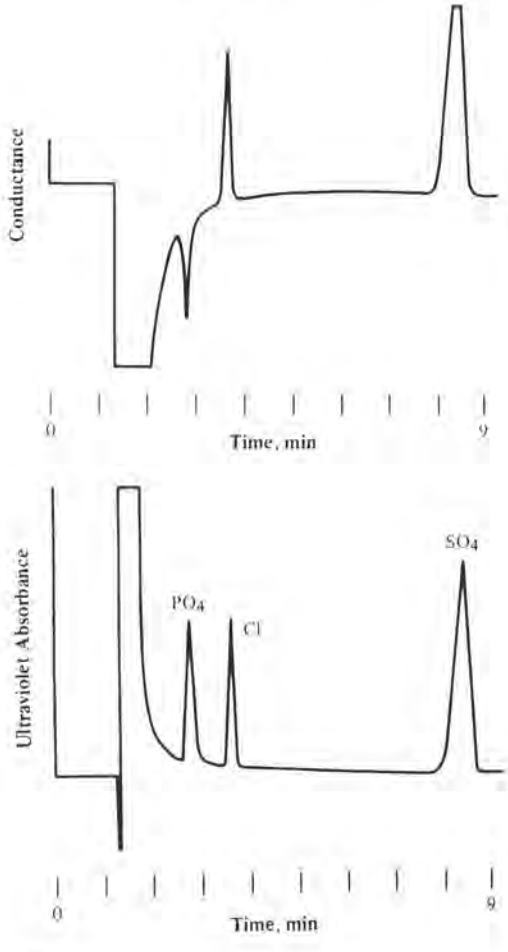
ต่ำ ๆ ในสารละลาย การใช้คอลัมน์ที่มีความจุต่ำจะเหมาะกับการใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ เป็นเฟสเคลื่อนที่ จริง ๆ แล้ว ในทางปฏิบัติจะมี IC อยู่สองชนิด คือ

1. suppressed หรือ dual column IC

2. non suppressed หรือ single column IC

ในทางปฏิบัติแล้ว เทคนิคที่ใช้คอลัมน์ 2 ชนิดต่อกันแบบอนุกรมจะมีลักษณะดังรูปที่ 13.38 ซึ่งเป็นการแยกคลอไรด์ออกจากโบรไมด์ด้วยเทคนิคทางไอออนโครมาโทกราฟี คอลัมน์บน (separator) ทำหน้าที่แยก Cl^- และ Br^- คอลัมน์ล่าง (suppressor) เป็น strong acid resin ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน H^+ กับ cations อื่น ๆ เพื่อทำให้ conductivity สูง ๆ หมดไป เมื่อใช้สารละลาย NaOH เจือจางเป็นตัวชะ conductivity ขั้นสุดท้ายจริง ๆ เป็นของ H^+Br^- และ H^+Cl^- เท่านั้น

เทคนิคนี้จะใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นบัฟเฟอร์ที่มีสภาพเป็นเบส เช่น เกลือของกรดอ่อน เพื่อให้ทำหน้าที่แยกแอนไอออนใน separator column หลังจากนั้นเฟสเคลื่อนที่จะผ่านไปยัง suppressed column ซึ่งเป็น cation exchange ที่มีความจุสูง คอลัมน์นี้จะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนซึ่งเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นกรดอ่อนที่มี conductivity ต่ำ ในขณะเดียวกัน แอนไอออนของสารตัวอย่างซึ่งเป็นคลอไรด์และโบรไมด์ไอออน



รูปที่ 13.39 แสดงการแยกไอออนในปุ๋ยด้วยเทคนิค IC รูปบน conductivity ดีเทคเตอร์ รูปล่างใช้ยูวีดีเทคเตอร์

จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตัวที่มี conductivity สูง คือเป็นกรดที่แตกตัวเป็นไอออนได้ดีด้วย suppressed column ข้อดีของเทคนิคที่ใช้ 2 คอลัมน์นี้ คือ conductivity ของเฟสเคลื่อนที่จะลดน้อยลง ทำให้สามารถวัดแอนไอออนในสารละลายตัวอย่างในตัวกลางที่นำไฟฟ้าต่ำได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มสภาพไวของการวิเคราะห์ไอออนให้ดีขึ้นอีกด้วย ข้อเสียของเทคนิคนี้ก็คือ จะต้องมีการ regenerate suppressed column เป็นครั้งคราว และบางทีก็มีส่วนทำให้พีกกว้างขึ้น

ใน non suppressed IC เทคนิค คอลัมน์ที่ใช้มีเพียงคอลัมน์เดียว และเฟสเคลื่อนที่จะผ่าน separation column คือ anion column แล้วเข้าสู่ conductivity detector โดยตรงเลย ข้อดีของเทคนิคนี้ก็คือ ง่ายและประสิทธิภาพในการแยกดี ข้อเสียของเทคนิคนี้คือ ความยากในการวัดไอออนที่มีปริมาณน้อย ๆ ในสารตัวอย่างที่อยู่ในตัวกลาง ซึ่งนำไฟฟ้าได้ดีและมีข้อจำกัดในการเลือกเฟสเคลื่อนที่ด้วย

ไอออนโครมาโทกราฟีนี้ได้มีผู้นำไปใช้ในการวิเคราะห์สารต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น การวิเคราะห์แคตไอออนและแอนไอออนปริมาณน้อย ๆ ในน้ำบาดาล วิเคราะห์ของเหลวในร่างกายมนุษย์ เป็นต้น ดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย ๆ อาจเป็นสเปกโทรสโกปิกเทคนิค เช่น ใช้ AAS หรือ ICPS รูปที่ 13.39 แสดงตัวอย่างของการใช้ไอออนโครมาโทกราฟีวิเคราะห์ปุ๋ย โดยใช้เทคนิค non suppressed IC ฟอสเฟตไอออนจะให้ negative peak เมื่อใช้ conductivity ดีเทคเตอร์ ทั้งนี้เนื่องจากการเกิด protonation ของฟอสเฟตไอออนเป็นผลทำให้การนำไฟฟ้าต่ำกว่าเฟสเคลื่อนที่มาก ๆ

13.17 Size Exclusion Chromatography

Size Exclusion Chromatography บางครั้งเรียกว่า Gel Permeation Chromatography หรือ Gel-Filtration Chromatography เทคนิคนี้ส่วนใหญ่จะใช้เป็นวิธีแยกและตรวจหาสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง คอลัมน์ที่ใช้จะบรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดของรูพรุน (pores) ต่าง ๆ กัน มีทั้งที่เป็นเจล (gel) อ่อนนุ่ม ค่อนข้างแข็ง หรืออาจจะแข็งมาก เจลที่อ่อนหรือค่อนข้างแข็งจะเปลี่ยนขนาดของรูบนอนุภาคได้ โดยขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น เจลที่อ่อนนุ่มเป็น polydextran หรือ agarose ซึ่งสามารถจะบวม (swell) ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นหลายเท่าตัวของขนาดเมื่ออยู่ในสภาพที่แห้ง สำหรับเจลที่ค่อนข้างแข็ง (semirigid gel) เช่น polyvinyl acetate หรือ polystyrene จะบวมหรือมีขนาดใหญ่กว่าเดิมประมาณ 1.1—1.8 เท่า วัสดุที่แข็ง เช่น แก้วที่มีรูพรุน หรือเม็ดซิลิกาที่มีรูพรุน จะมีขนาดของรูคงที่ และจะไม่บวมเมื่อถูกกับตัวทำละลาย

13.17.1 การพิจารณาทั่วไป (General Considerations)

เพื่อให้เข้าใจว่า size exclusion เทคนิคต่างจากเทคนิคอื่น ๆ ของโครมาโทกราฟีอย่างไร ก่อนอื่นขอให้พิจารณาจากสมการต่อไปนี้เสียก่อนเป็นอันดับแรก

$$V_r = V_m (1 + k_x) = V_m + V_s K_x$$

เมื่อ V_m และ V_s คือ void volume และ total pore volume ตามลำดับ ค่า distribution coefficient K_x ขึ้นอยู่กับน้ำหนัก

โมเลกุลของสารตัวอย่างและขนาดของรูที่อยู่บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สมดุลที่เกิดขึ้นใน exclusion chromatography จะอธิบายได้โดยพิจารณาจากสมการต่อไปนี้คือ

$$X_m \rightleftharpoons X_s$$

$$K_x = \frac{[X]_s}{[X]_m}$$

ในกระบวนการซึมผ่าน และสมมติว่าโมเลกุลเล็กของตัวถูกละลายจะสามารถผ่านเข้าไปได้ทุกรูที่อยู่ในอนุภาค นั่นก็คือ

$$[X]_s = [X]_m$$

ดังนั้น $K_x = 1$

ถ้ารูที่อยู่ในอนุภาคนั้นไม่เหมาะกับโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่แล้ว

$$[X]_s = 0$$

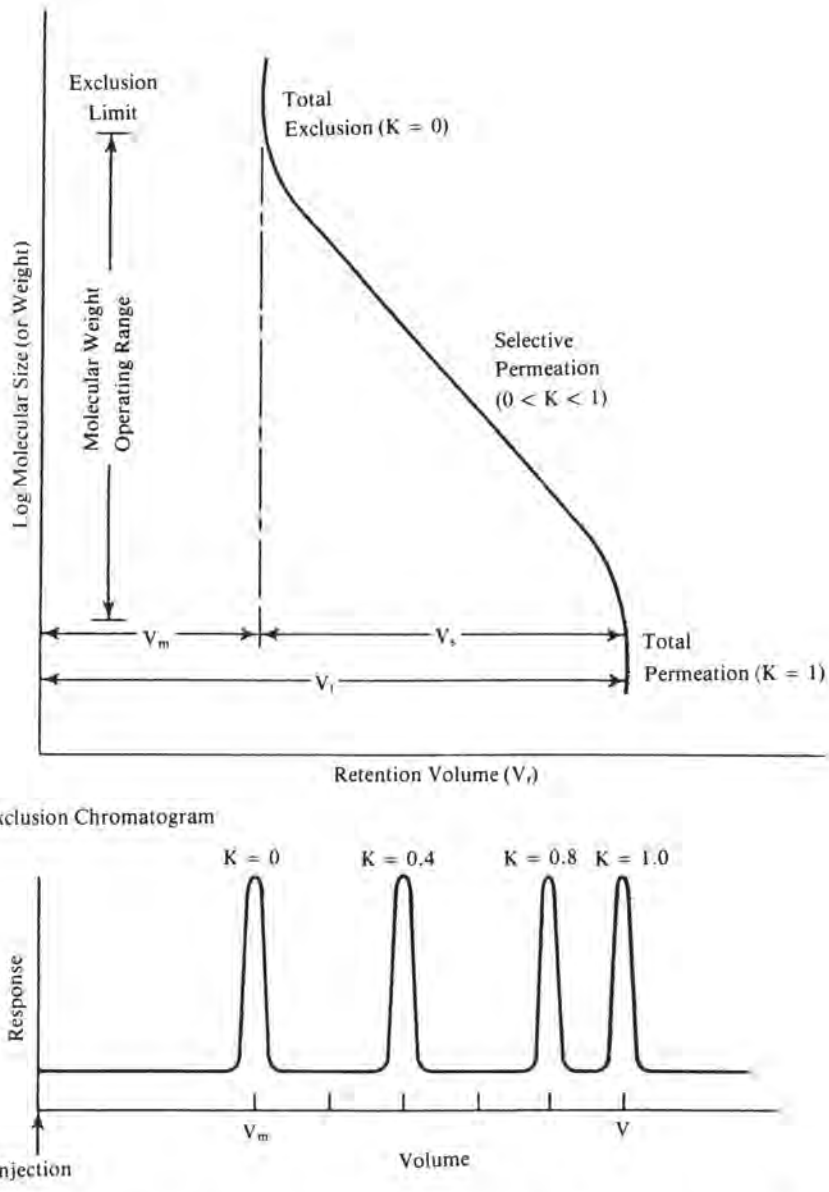
$$K_x = 0$$

ถ้าโมเลกุลที่มีขนาดกลางสามารถผ่านเข้าไปได้ในบางส่วนของรูที่อยู่ในอนุภาคแล้ว ดังนั้น

$$0 < K_x < 1$$

ซึ่งจะพบว่าเทคนิคนี้จะไม่เหมือนกับเทคนิคอื่นใน LC โดยที่โมเลกุลทั้งหมดของสารตัวอย่างจะถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยที่มี retention volume อยู่ระหว่าง excluded volume V_m และ total permeation volume V_t ซึ่ง V_t จริง ๆ แล้วก็คือ V_r ถ้า $K_x > 1$ กลไกของการเกิดการดูดซับจะเป็นอย่างอื่นที่กระบวนการไม่เป็น exclusion

การเลือกขนาดของรูของตัว packing ขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลของตัวถูกละลายที่ต้องการแยก มีบ่อยครั้งที่สารตัวอย่างที่ต้องการแยกประกอบด้วยตัวถูกละลายมีขนาดต่าง ๆ กัน (นั่นคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน) และ packing มีรูเพียงขนาดเดียว จึงไม่สามารถจะแยกทุกตัวถูกละลายในสารตัวอย่างนั้นได้ เนื่องจากโมเลกุลบางตัวที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของอนุภาคจะถูกชะออกไป และปรากฏออกมาเป็นพีกแรกและพีกเดียวในโครมาโทแกรม และพีกนี้จะมี retention volume เท่ากับ V_m ส่วนโมเลกุลตัวอื่น ๆ ที่มีขนาดเล็กกว่ารูของอนุภาคก็จะแพร่ผ่านเข้าไปในอนุภาคและจะปรากฏออกมาที่ retention volume ต่าง ๆ กัน calibration curve จะเป็น curve ที่ได้จากการ plot log (MW) กับ retention volume (V_r) ดังแสดงในรูปที่ 13.40 packing ที่มีขนาดของรูโดยเฉลี่ยแตกต่างกันก็จะมี calibration curve ที่เฉพาะตัวของมัน ลักษณะของ slope จะเป็นตัวควบคุมการกระจายของขนาดรูในอนุภาคที่ใช้บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ถ้าการกระจายของขนาดของรูในอนุภาคกว้าง ลักษณะของ slope ของ curve จะชัน ดังนั้นคอลัมน์นี้จะใช้ได้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่กว้าง และคอลัมน์นี้จะใช้แยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันได้ไม่ดี แต่ถ้าการกระจายของรูของอนุภาคแคบลง slope จะมีลักษณะราบกว่า (flatter) นั่นหมายความว่า คอลัมน์สามารถใช้ได้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในช่องแคบ แม้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ใกล้เคียงกันก็สามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้น

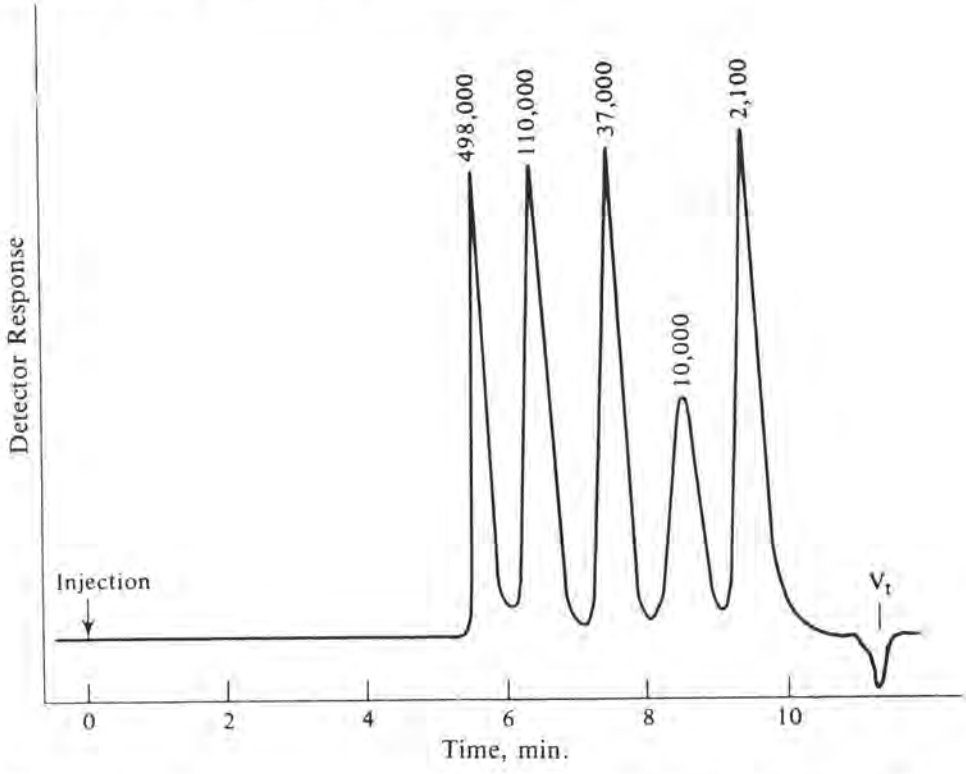


รูปที่ 13.40 แสดงลักษณะของ Calibration Curve และโครมาโทแกรมของ size exclusion chromatography

13.17.2 การใช้ Size Exclusion Chromatography

ใน exclusion chromatography คอลัมน์ที่ใช้งานกับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน สามารถนำมาใช้แยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างที่มีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลที่กว้างได้ คอลัมน์จะถูกนิยามในลักษณะของน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดที่สามารถใช้ได้ (exclusion limit) บางครั้งอาจจะต้องใช้คอลัมน์ถึง 8 คอลัมน์ ซึ่งแต่ละคอลัมน์สามารถใช้ได้ในช่วงของน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันมาต่อกันเข้าเป็นอนุกรม

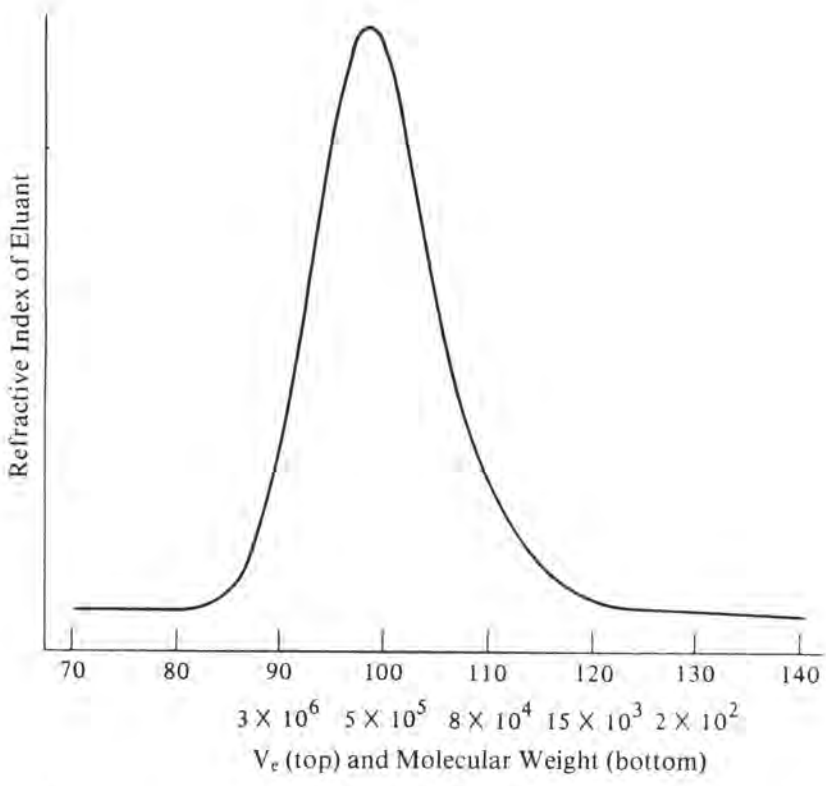
และโดยการใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำลายอินทรีย์จะทำให้ได้ calibration curve ที่มีลักษณะเฉพาะตัวของมัน สารละลายมาตรฐานของ polystyrene ซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุลที่อยู่ในช่วงแคบ สามารถนำมาใช้ในการสร้าง calibration curve เช่นเดียวกับการนำเอาสาร dextrans ที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ หรือใช้ polyethylene oxides มาใช้เป็นสารมาตรฐานและใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ รูปที่ 13.41 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้จาก size exclusion chromatography



รูปที่ 13.41 แสดงลักษณะของ high speed size exclusion chromatogram ของ polystyrene ตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน คอลัมน์เป็น Toyo Soda TSK G 4000 H8 gel mobile phase เป็น Tetrahydrofuran flow rate ใช้ 1.7 mL/min

จากรูปแสดงให้เห็นถึงการใช้ HPLC ในการแยกสารมาตรฐาน polystyrene โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคของ cross-linked polystyrene ขนาด 10 ไมครอน และอนุภาคที่ใช้มีขนาดของรูโดยเฉลี่ยเท่ากับ 260 Å สำหรับเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ tetrahydrofuran (THF) การใช้เฟสเคลื่อนที่ในเทคนิคนี้จะต่างไปจากเทคนิคอื่น ๆ คือ เฟสเคลื่อนที่จะเป็นตัวที่ใช้ละลายสารตัวอย่าง และพาสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เท่านั้น จะไม่มีการเกิดอันตรกิริยากับอนุภาคที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ จากรูปที่ 13.42 จะพบว่าพอลิเมอร์จะถูกชะออกจากคอลัมน์ตามลำดับการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งจะกลับกันกับที่เกิดขึ้นเมื่อใช้เทคนิค LC อื่น ๆ

Size Exclusion Chromatography นอกจากจะใช้ในการแยกสารตัวอย่างแล้ว ยังใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของพอลิเมอร์ได้อีกด้วย ในบางครั้ง การแยกพอลิเมอร์ไม่สามารถกระทำได้



รูปที่ 13.42 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมของพอลิเมอร์ตัวอย่าง (polyvinyl chloride) ด้วยเทคนิค exclusion chromatography

ทั้งนี้เนื่องจากพอลิเมอร์นั้นประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่มีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลอย่างต่อเนื่อง เพราะฉะนั้น โครมาโทแกรมที่ได้จะมีลักษณะเป็นพีกเดียว ดังแสดงในรูปที่ 13.42 จากโครมาโทแกรมนี้ ข้อมูลที่ได้ก็คือ น้ำหนักโมเลกุลและการกระจายน้ำหนักโมเลกุล จากข้อมูลเหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กับสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ เช่น ความแข็ง ความทนแรงดึง และความเสถียร เป็นต้น ดังนั้น การทำให้เกิดพอลิเมอไรเซชันสามารถกำหนดสภาวะที่เหมาะสมที่สุดได้

นอกจากนั้น size exclusion chromatography ยังนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการแยกสารประกอบพวกชีวภาพ (biological compounds) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ๆ และละลายน้ำได้ เช่น โปรตีน นิวคลิอิกแอซิด เอนไซม์ และพอลิแซคคาไรด์ เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำเอา soft gels ของ cross-linked polydextran ชนิดต่าง ๆ เช่น sephadex มาใช้ประโยชน์มาก คือ ใช้เป็นอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ แต่เนื่องจาก soft gels ที่ใช้มีขีดจำกัดซึ่งไม่สามารถใช้กับความดันสูง ๆ ได้ ดังนั้น เจลแข็งที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และมีขนาดของรูบนอนุภาคแน่นอน สามารถทนต่อความดันสูง ๆ ได้ จึงถูกนำมาใช้ในงานประจำในห้องปฏิบัติการ และที่นิยมใช้กันคือ packing ที่ทำจาก silica ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 5 และ 10 μm เนื่องจาก silica gel มี acidic group หรือ silanol group อยู่ที่พื้นผิวของมัน สามารถเกิดอันตรกิริยากับไอออนหรือสารประกอบทางชีวภาพ ซึ่งมี functional group ที่สามารถไอออไนส์เป็นไอออนได้ ดังนั้น การนำเอา silanol group

ที่อยู่บนผิวของ silica gel มาทำให้เกิดพันธะเคมีกับเฟสที่ชอบน้ำ (hydrophilic phase) และ functional group ที่มีสภาพขั้วปานกลาง (moderately polar) เช่น พวก diol มาใช้เป็นเฟสคงที่ จะพบว่า group นี้มีลักษณะเป็นสารอินทรีย์มากเกินไป อันจะเป็นผลทำให้เกิดอันตรกิริยาที่ไม่ปรารถนาขึ้นกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของโมเลกุลทางชีวภาพ เช่น โปรตีน หรือพวก polynucleotides ดังจะเห็นได้จากรูปที่ 13.42

13.18 การเลือกใช้และการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ทาง LC

จากที่ได้กล่าวมาแล้วถึงวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง LC 4 แบบด้วยกัน คือ partition, size exclusion, adsorption และ ion exchange chromatography แล้วนั้น การจะเลือกเทคนิคใดใช้ในการแยกสารตัวอย่างนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องพิจารณาดังต่อไปนี้

1) ธรรมชาติของสารตัวอย่าง
2) วิธีที่ต้องการนำมาใช้แยกสารตัวอย่าง
3) ความสะดวกในการทดลอง
4) ประสบการณ์กับวิธีที่ใช้แยกสารตัวอย่าง
5) และสิ่งอื่นที่อาจต้องพิจารณา

13.18.1 ธรรมชาติของสารตัวอย่าง

โดยทั่วไปแล้วธรรมชาติของสารตัวอย่างที่ทราบ เช่น สมบัติทางกายภาพและทางเคมี เป็นต้น จะเป็นสิ่งที่ใช้ชี้แนะว่าวิธีของ LC ที่เหมาะสมควรจะเลือกใช้ในการแยกสารตัวอย่างนั้นเป็นเช่นไร คำตอบจากคำถามบางอย่าง เช่น สารตัวอย่างมีขนาดโมเลกุลเล็กหรือใหญ่ ละลายน้ำได้หรือไม่ หรือละลายในน้ำมัน เป็นสารไอออนิกหรือไม่ หรือเป็นสารมีขั้วหรือไม่มีขั้ว สารตัวอย่างนั้นเสถียรหรือไม่ สิ่งเหล่านี้จะช่วยทำให้สามารถหาข้อสรุปที่จะใช้เลือกวิธี LC ได้อย่างเหมาะสม เช่น adsorption chromatography เหมาะในการนำมาใช้กับสารตัวอย่างที่ละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว หรือเป็นสารผสมที่ประกอบด้วยสารที่ไม่มีขั้ว ion exchange และ partition chromatography จะเหมาะสมมากกับสารประกอบที่ละลายน้ำได้ สำหรับ size exclusion chromatography เหมาะแก่การแยกสารตัวอย่างทั้งสองประเภท คือ ประเภทที่ละลายน้ำได้ และละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วได้ ซึ่งทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับอนุภาคที่ใช้บรรจุอยู่ในคอลัมน์และตัวทำละลายที่ใช้ จากที่กล่าวมานี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องชี้แนะขั้นต้นในการเลือกใช้วิธี LC

ดังนั้น ก่อนที่จะตัดสินใจเลือกวิธี LC เพื่อใช้ในการแยกสารตัวอย่าง ควรจะต้องมีข้อมูลของสารตัวอย่างดังต่อไปนี้ คือ

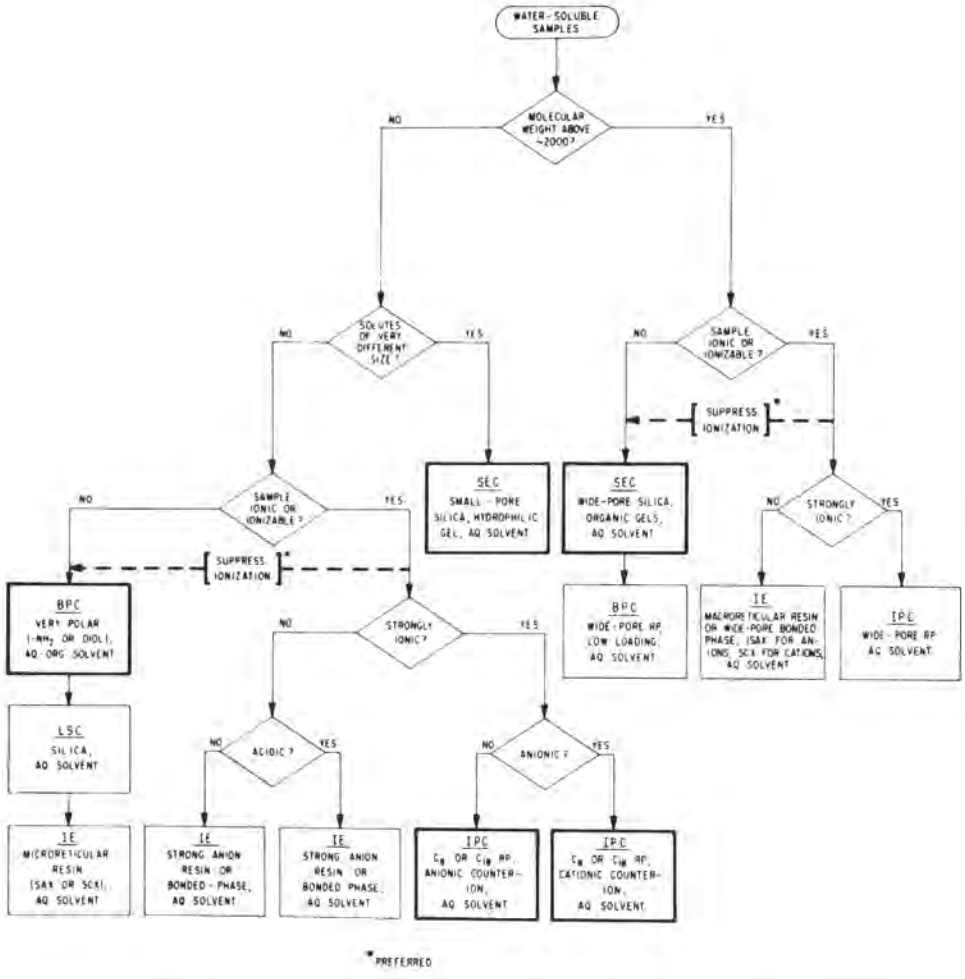
1) การละลายของสารตัวอย่าง พิจารณาดูว่าสารตัวอย่างนั้น ๆ จะละลายได้ในตัวทำละลายอะไรบ้าง
2) ขนาดของโมเลกุลใหญ่หรือเล็ก หรือน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือต่ำ
3) สารตัวอย่างมีสภาพมีขั้ว (polarity) อย่างไร

นอกจากนี้ การมีข้อมูลเกี่ยวกับยูวี-สเปกตรัม เพื่อช่วยในการเลือกดีเทคเตอร์และความยาวคลื่นที่จะใช้ในการวัดปริมาณของสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ เป็นต้น

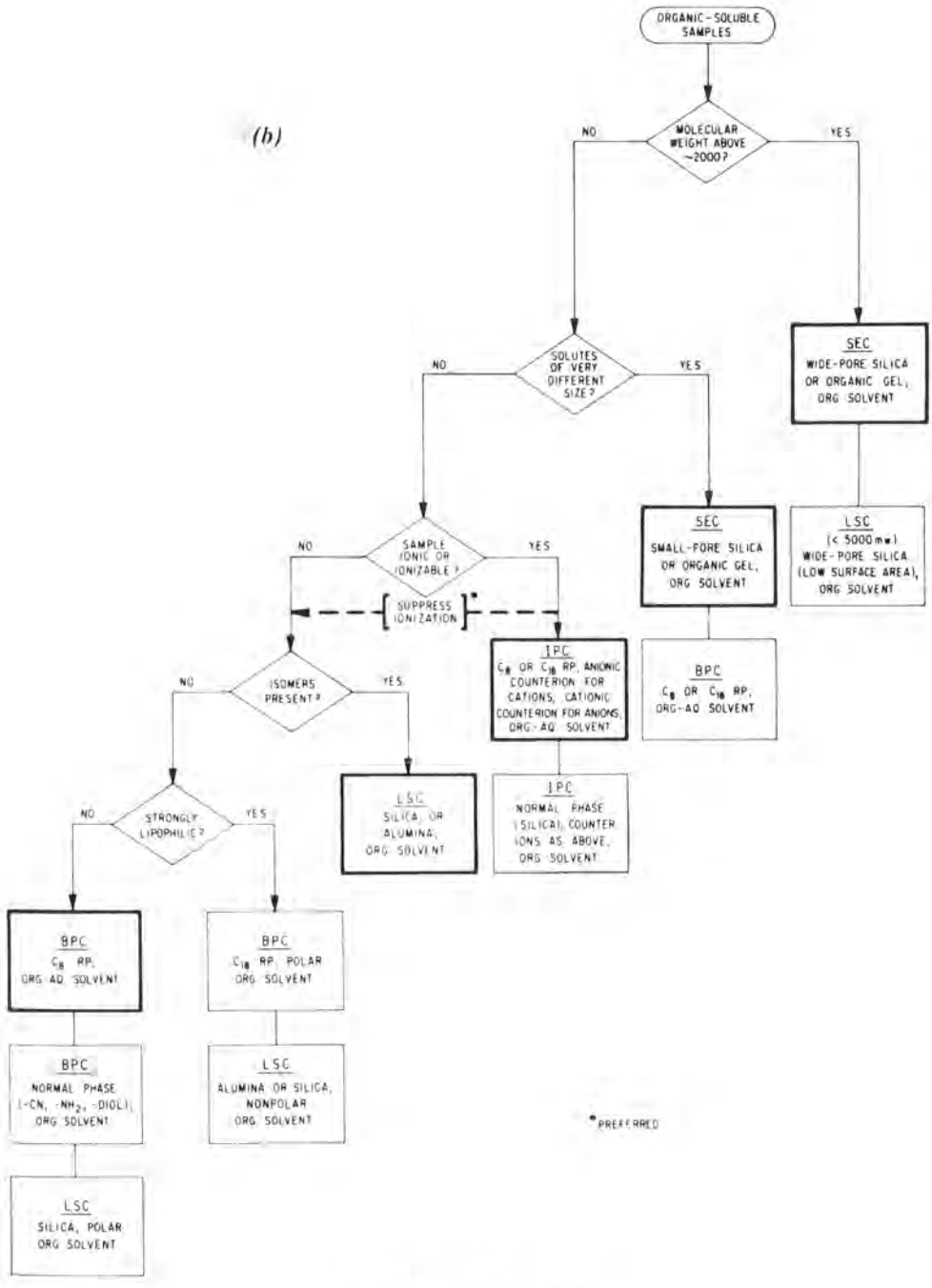
จากข้อมูลข้างบนนี้จะทำให้สามารถพิจารณาเลือกใช้วิธี LC ที่เหมาะสมในการแยกสารตัวอย่างได้ ดังแสดงในรูปที่ 13.43 นี้เป็นแผนภาพสำหรับใช้เลือกวิธี LC วิธีที่อยู่ในกรอบเส้นทึบนั้นเป็นวิธีที่ชอบใช้กันโดยทั่วไป

การเลือกวิธี LC ที่เฉพาะนั้น สมบัติที่สำคัญที่สุดของสารตัวอย่างก็คือ การละลายของสารตัวอย่างในน้ำต่อในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจะนำไปสู่การพิจารณาวิธีการแยก 2 วิธี ดังรูปที่ 13.43a กับรูปที่ 13.43b ถ้าไม่ทราบการละลายของสารตัวอย่าง ควรจะต้องทดลองหาดูเสียก่อนว่าสารตัวอย่างละลายได้ดีในตัวทำละลายใดระหว่างน้ำกับเฮพเทนหรือคลอโรฟอร์ม โครงสร้างของสารที่คิดว่าจะเป็น

(a)



รูปที่ 13.43 (a) และ (b) แสดงแผนภูมิข้อแนะนำการเลือกวิธีที่ใช้แยกสารด้วยเทคนิคทาง LC


(b)
ORGANIC-SOLUBLE SAMPLES
MOLECULAR WEIGHT ABOVE ~2000?
NO
YES
SEC
WIDE-PORE SILICA OR ORGANIC GEL, ORG SOLVENT
SOLUTES OF VERY DIFFERENT SIZE?
NO
YES
LSC
(< 5000 mw)
WIDE-PORE SILICA (LOW SURFACE AREA), ORG SOLVENT
SEC
SMALL-PORE SILICA OR ORGANIC GEL, ORG SOLVENT
SAMPLE IONIC OR IONIZABLE?
NO
YES
SUPPRESS IONIZATION*
BPC
C8 OR C18 RP, ORG-AQ SOLVENT
IPC
C8 OR C18 RP, ANIONIC COUNTERION FOR CATIONS, CATIONIC COUNTERION FOR ANIONS, ORG-AQ SOLVENT
ISOMERS PRESENT?
NO
YES
IPC
NORMAL PHASE (SILICA), COUNTER IONS AS ABOVE, ORG SOLVENT
LSC
SILICA OR ALUMINA, ORG SOLVENT
STRONGLY LIPOPHILIC?
NO
YES
BPC
C8 RP, ORG-AQ SOLVENT
BPC
C18 RP, POLAR ORG SOLVENT
BPC
NORMAL PHASE (-CN, -NH2, -DIOL), ORG SOLVENT
LSC
ALUMINA OR SILICA, NONPOLAR ORG SOLVENT
LSC
SILICA, POLAR ORG SOLVENT
*PREFERRED

รูปที่ 13.43 (b) ต่อ

องค์ประกอบของสารตัวอย่างอาจช่วยในการพิจารณาด้วยว่าน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์อย่างไหนจะละลายได้ดีกว่ากัน

ตัวอย่างเช่น สารตัวอย่างประกอบด้วยสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 2,000 วิธีการที่จะใช้ในการแยกสารตัวอย่างนี้มีให้เลือกหลายวิธีด้วยกัน เช่น ถ้าสารตัวอย่างนั้นละลายได้ในน้ำ วิธีที่จะเลือกใช้ในการแยกจึงมีอยู่ 3 วิธีด้วยกัน คือ gel filtration จะเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับสารประกอบที่เป็นกลาง และสารตัวอย่างที่ประกอบไปด้วยสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันมาก ๆ เช่น glucose, oligo saccharides หรือพวก carbohydrates ถ้าสารตัวอย่างละลายน้ำและแตกตัวได้ วิธีที่ดีที่สุดที่จะนำมาแยกสารดังกล่าวนี้ คือ ใช้ ion exchange chromatography สำหรับสารประกอบที่เป็นเบส เช่น aromatic amines จะแยกออกจากกันได้โดยใช้ cation exchanger ในกรณีที่สารประกอบเป็นกรด เช่น carboxylic acids จะแยกออกจากกันได้โดยใช้ anion exchanger สำหรับสารประกอบที่ละลายน้ำได้ โดยเฉพาะสารที่ไม่มีประจุหรือมีประจุเล็กน้อย แต่มีฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่แตกต่างกัน เช่น สารพวกฟีนอล และอนุพันธ์ของมัน วิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ในการแยกสารตัวอย่างนี้คือใช้ partition chromatography

ถ้าสารตัวอย่างประกอบด้วยสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 2,000 และสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่ใช่น้ำ (non-aqueous solvent) วิธี LC ที่สามารถเลือกมาใช้แยกสารนั้นก็มีหลายวิธี คือ ถ้าสารตัวอย่างมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันมาก ๆ สามารถเลือกวิธี gel permeation มาใช้แยกสารได้ แต่ถ้าสารตัวอย่างประกอบด้วยโมเลกุลที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน เช่น ในการแยกสารพวกที่เป็น isomers หรือสารประกอบชนิดต่าง ๆ กัน วิธีที่นิยมใช้แยกคือวิธี adsorption chromatography ตัวดูดซับที่ใช้อาจมีหลายชนิด ซึ่งควรจะพิจารณาว่าจะใช้ตัวดูดซับชนิดใดในการแยกสารตัวอย่างแต่ละประเภท liquid-partition chromatography เป็นวิธีที่ดีที่สุดที่ใช้ในการแยกสารประกอบที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 2,000 และถ้าสารตัวอย่างประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด เช่น พวก homologs และสารประกอบที่ไม่เสถียร สำหรับการแยกสารประกอบที่มีขั้วจะใช้วิธี LLC ซึ่งมีเฟสคงที่ที่มีขั้ว และเฟสเคลื่อนที่ไม่มีขั้ว แต่ถ้าเป็นสารประกอบที่ไม่มีขั้วก็จะใช้ reversed phase chromatography

13.18.2 ความสะดวกในการทำการทดลอง

เนื่องจากจะต้องอาศัยความชำนาญค่อนข้างพอสมควร รวมทั้งความชำนาญในการเตรียมและดูแลรักษาคอลัมน์และเครื่องมือที่ใช้ ความสะดวกเป็นปัจจัยอีกอันหนึ่ง ซึ่งมีผลต่อการพิจารณาเลือกวิธีที่จะใช้ในการแยกสารตัวอย่าง ซึ่งมีดังต่อไปนี้

ความง่ายของการบรรจุอนุภาคในคอลัมน์

ประสิทธิภาพของคอลัมน์

ความเสถียรของคอลัมน์

ความง่ายในการกำหนดเงื่อนไขหรือสภาวะของการทดลอง

ปัจจุบัน คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารตัวอย่าง ไม่ว่าจะเป็นวิธีใดก็ตาม สามารถหาซื้อได้จากบริษัทผู้ผลิตต่าง ๆ ดังนั้น ปัจจัยเกี่ยวกับความง่ายในการบรรจุอนุภาคในคอลัมน์ ประสิทธิภาพและความเสถียรของคอลัมน์จะไม่นำมาพิจารณา เพราะว่าสามารถจะเลือกซื้อคอลัมน์ได้ตามที่ต้องการ

สำหรับความง่ายของการกำหนดเงื่อนไขและสภาวะของการทดลองเพื่อใช้ในการแยกสารตัวอย่างนั้น มีความสำคัญมากในการเลือกวิธี LC สำหรับ size exclusion chromatography เป็นเทคนิคที่ค่อนข้างจะน่าสนใจ เนื่องจากการควบคุมอัตราการเคลื่อนที่ของแถบสารสามารถทำได้ง่าย ก่อนหน้าที่จะมีการแยกสารนั้นโดยใช้ size exclusion chromatography สารประกอบทุกตัวที่อยู่ในสารตัวอย่างจะถูกชะออกมาโดยใช้เวลาค่อนข้างสั้น และแตกต่างจากวิธี LC อื่น ๆ วิธีอื่น ๆ อาจจะต้องใช้ gradient elution สำหรับแยกสารตัวอย่างซึ่งประกอบด้วยสารประกอบที่มีค่า capacity factor (k′) ที่อยู่ในช่วงกว้างมาก การเลือกสภาวะของการทดลองจะยากมาก สำหรับ LLC ในบางกรณีอาจจะต้องใช้ paper chromatography หรือ TLC ในการหาสภาวะและเงื่อนไขสำหรับการแยกสารตัวอย่างที่สนใจนั้น

13.18.3 ประสบการณ์เกี่ยวกับวิธีการวิเคราะห์

จากประสบการณ์ที่ใช้ LC เป็นประจำเป็นสิ่งที่ให้ประโยชน์ต่อการเลือกใช้วิธีในการแก้ปัญหาการแยกสารตัวอย่าง จริง ๆ แล้ว การแก้ปัญหาของการแยกสารอาจจะทำได้โดยวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่การแยกสารอาจจะทำได้มากกว่าหนึ่งวิธีขึ้นไป ดังนั้น การแยกสารก็จะต้องทำได้โดยวิธี LC วิธีใดวิธีหนึ่งใน 4 วิธี ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

13.19 การพัฒนาวิธีการแยกสารที่เฉพาะ

ปัญหาการแยกสารในแต่ละวิธีของ LC ต้องการวิธีการทดลองที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้น มันจึงเป็นไปไม่ได้ที่จะสร้างกฎเกณฑ์ที่แน่นอนสำหรับการพัฒนาสภาวะของการทดลองในการแยกสาร อย่างไรก็ตาม การแยกสารก็มีขั้นตอนทั่วไปที่ใช้ในการพัฒนาวิธีการแยกแต่ละวิธี รูปที่ 13.44 แสดงการพัฒนาการแยกด้วย LC ที่ใช้วิธีการที่มีระบบในการแก้ปัญหาการแยกสารโดย LC ภายหลังจากการสุ่มตัวอย่างของการวิเคราะห์แล้ว ต้องการการตัดสินใจเกี่ยวกับ

1) การเลือกวิธีของ LC

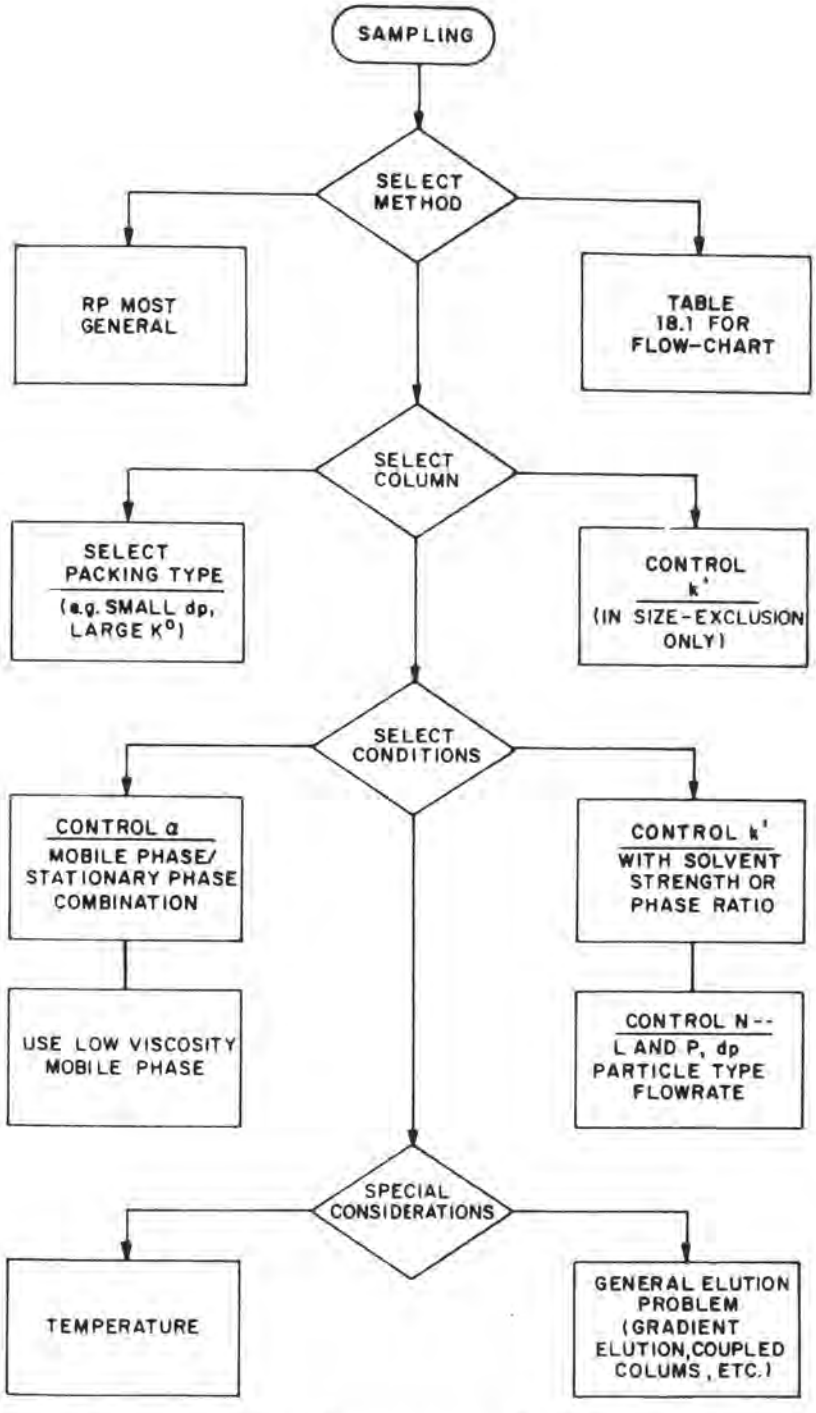
2) การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม

3) การกำหนดสภาวะของการทดลองที่เหมาะสม

4) การพิจารณาการใช้เทคนิคบางเทคนิคในการแก้ปัญหาการแยกให้ดีขึ้น เช่น ปัญหาทั่ว ๆ ไปของการชะ (elution) เป็นต้น

เพื่อให้เห็นการแก้ปัญหาการแยกสารได้ชัดเจนขึ้น ในที่นี้จะพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษา ซึ่งก็คือการพัฒนาวิธีการหาปริมาณที่รวดเร็วและแม่นและเที่ยงของการแยกสารผสมในสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยสารสองชนิด ที่ค่อนข้างมีขั้วและมีลักษณะคล้ายกันมาก สารประกอบทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันคือ สารประกอบชนิดหนึ่ง (A) จะมีคลอรีนอะตอมเป็นองค์ประกอบ และสารประกอบอีกชนิดหนึ่ง (B) จะมีโบรมีนอะตอมเป็นองค์ประกอบ สารประกอบ A มีอยู่ 1/100 ของสารประกอบ B

วิธีที่ถูกนำมาพิจารณาก่อนเพื่อใช้แยกสารทั้งสองชนิดออกจากกัน คือ liquid partition และ adsorption chromatography ส่วน gel permeation chromatography จะไม่นำมาพิจารณา ทั้งนี้



รูปที่ 13.44 แสดงวิธีการพัฒนาการแยกสารด้วยวิธี LC อย่างมีระบบ

เนื่องจากว่าสารทั้งสองชนิดนี้มีขนาดใกล้เคียงกันมาก นอกจากนั้น วิธีที่ต้องการจะต้องแยกสารทั้งสองออกจากกันได้ดี ควรจะเป็นวิธีที่ให้ค่า R_s = 1.25 ทั้งนี้เนื่องจากว่าความเข้มข้นของสารทั้งสองต่างกันมากในสารผสม และจะไม่นำเอาวิธี ion exchange chromatography มาพิจารณาในการแยกสารทั้งสองนี้เช่นกัน เพราะสารทั้งสองไม่ค่อยละลายในน้ำ

ความพยายามเริ่มต้นที่ต้องการแยกสารทั้งสองตัวนี้ คือ การใช้วิธี liquid partition chromatography โดยใช้ bonded phase การเลือก packing นี้ขึ้นอยู่กับเหตุผล 3 ประการ คือ

1) คอลัมน์นี้ได้ติดตั้งไว้เรียบร้อยแล้วในเครื่อง LC

2) การที่ใช้ bonded phase ก็เพราะมันสะดวก

3) สามารถหาซื้อคอลัมน์ที่บรรจุด้วย bonded phase packing ได้ง่าย

ต่อจากนั้นก็เป็นการเลือกเฟสเคลื่อนที่สำหรับ bonded phase คอลัมน์ซึ่งก็ได้มาจากการทดลองดู และจากการทดลองพบว่า เฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วย 1.5% THF และ hexane ให้ค่า k′ ที่ดีที่สุด แต่ทว่าสารประกอบ A และ B ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ($R_s < 0.4$) เพราะว่าค่า separation factor (α) มีค่าเท่ากับ 1 จากความพยายามที่จะเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายที่มีขั้วเป็นตัวทำละลาย hexane เพื่อทำให้ค่า separation factor เพิ่มขึ้น เช่น ใช้ 5% $CHCl_3$/hexane และ 1% methanol/hexane ปรากฏว่ามันไม่ทำให้การแยกดีขึ้นเลย ถึงแม้ว่าสารจะถูกชะออกมาโดยที่มีค่า k′ ที่ดีที่สุด การเลือก $CHCl_3$ และ MeOH สำหรับการทดลองหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมเนื่องจากพารามิเตอร์ของการละลาย ตัวทำละลายทั้งสองนี้จะแตกต่างกับ THF ซึ่งใช้เป็นตัวผสมลงใน hexane ตอนแรก

เมื่อการทดลองครั้งแรกล้มเหลว จึงได้มีการศึกษาทดลองกับ bonded phase ที่ประกอบฟังก์ชันนัลกรุ๊ปต่าง ๆ กัน เช่น $-CN$, $-NH_2$ ฯลฯ เป็นต้น เพื่อที่จะหาเฟสคงที่ซึ่งสามารถแยกสาร 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ สิ่งที่พยายามมาทั้งหมดนั้นไม่ประสบผลสำเร็จในการแยกสาร 2 ตัวนี้ ปรากฏว่าสารประกอบทั้ง 2 ชนิดนี้มีสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกันมาก จึงไม่สามารถที่จะแยกออกจากกันได้โดยวิธี liquid partition chromatography เพราะฉะนั้น วิธี adsorption chromatography อาจจะเป็นวิธีที่เหมาะสม สำหรับการแยกสารประกอบทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับฟังก์ชันนัลกรุ๊ป

การหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับวิธี LC นั้น สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคของ TLC จะพบว่าการใช้ MeOH/$CHCl_3$ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อาจจะทำให้การแยกสารได้ดี ดังนั้น การใช้ 1% MeOH ใน $CHCl_3$ เป็นเฟสเคลื่อนที่จะทำให้สารทั้งสองแยกออกจากกันได้บ้าง เมื่อใช้ silica gel คอลัมน์ และจากการลดอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ลง เป็นผลทำให้การแยกดีขึ้น แต่ยังไม่ดีเท่าที่ต้องการ การจะทำให้การแยกเพิ่มขึ้นนั้น ต้องเป็นผลมาจากการปรับปรุงประสิทธิภาพของคอลัมน์ ความพยายามในการทำให้การแยกเพิ่มขึ้นจะต้องทำให้ค่า k′ มีค่ามากที่สุด โดยการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ หรือความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีขั้วในตัวทำละลายหลักในเฟสเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนแปลงค่า α ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวทำละลายที่มีขั้ว นอกจากนั้น จะต้องเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N) อีกด้วย ซึ่งทำได้โดยการลดอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ อย่างไรก็ตาม จากความพยายามที่ได้ทำการศึกษามาทั้งหมดนี้ ปรากฏว่าค่า R_s มีค่าเป็น 1.0 และการแยกยังไม่เพียงพอสำหรับการนำไปใช้งานที่ต้องการ

ดังนั้น จึงได้เปลี่ยนมาใช้ Porasil-A โดยใช้ตัวทำละลายคู่ที่ใช้กับ Corasil-II ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่มี silica gel เคลือบอยู่บนผิว อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง และการแยกก็ไม่ดีขึ้น แม้จะใช้ MeOH/$CHCl_3$ เป็นเฟสเคลื่อนที่ แรกคิดว่ามันมีความเหมาะสมในการแยกสาร แต่ตัวดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์ที่ถูกทดสอบ ไม่มีจำนวน plates ที่พอเพียงที่จะใช้ในการแยกสาร ในการที่จะทำให้สารสองชนิดแยกออกจากกันนั้น สิ่งที่ต้องการก็คือคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูง และประกอบด้วยจำนวน plates มาก ๆ ซึ่งคอลัมน์นั้นก็คือ Zorbax-Sil และเฟสเคลื่อนที่ก็คงเหมือนเดิมคือ MeOH/$CHCl_3$ ในสภาวะการทดลองใหม่นี้ จะทำให้ได้ค่า R_s = 1.25 สำหรับสารประกอบ A และ B ที่ต้องการแยก และสามารถพัฒนาวิธีการหาปริมาณของสารทั้งสองชนิดนี้ในตัวอย่างได้ ดังแสดงในตารางที่ 13.6

ตารางที่ 13.6 แสดงระบบที่ใช้ในการแยกสาร A และสาร B โดย adsorption LC

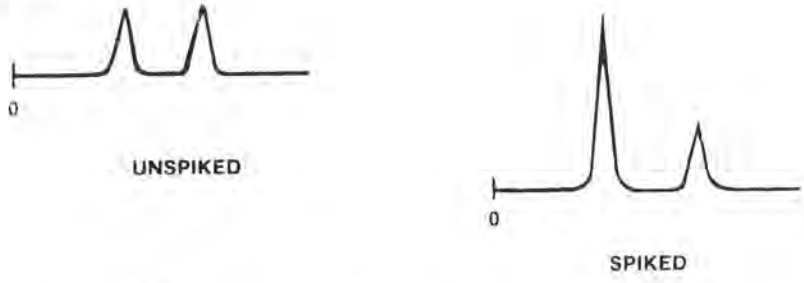
Attempt Number	Adsorbent Column	Mobile Phase	k'	Flow Rate (ml/min)	Parameter Changed	R_s
1	Corasil® -II[a]	1% methanol in $CHCl_3$	1.8	1.5	– –	0.5
2	Corasil® -II	1% methanol in $CHCl_3$	1.8	0.75	N	0.7
3	Corasil® -II	0.5% methanol in $CHCl_3$	3.6	0.75	k	0.8
4	Corasil® -II	0.5% methanol in $CHCl_3$	3.6	0.30	N	1.0
5	Corasil® -II	0.2% methanol in $CHCl_3$	11	1.3	k	0.8
6	Corasil® -II	0.2% methanol in $CHCl_3$	11	0.67	N	1.0
7	Corasil® -II	Acetonitrile	0.4	0.75	α	< 0.4
8	Corasil® -II	1% dioxane in $CHCl_3$	4.7	0.75	α	0.8
9	Porasil® -A[b]	1% methanol in $CHCl_3$	4.3	0.3	k, N	< 0.4
10	Zorbax® -SIL[c]	0.5% methanol in $CHCl_3$	12.2	1.2	N	1.25

[a] 37 – 50 μ; 1 m × 2.1 mm, i.d.; at k = 3.6, and velocity 1.1 cm/sec, H = 1.3 mm.
[b] 37 – 75 μ; 0.5 m × 2.1 mm, i.d.; at k = 4.3 and velocity 1.9 cm/sec, H = 4.4 mm.
[c] 8 – 9 μ; 0.25 m × 3.2 mm, i.d.; at k = 12.2 and velocity 0.5 cm/sec, H = 0.12 mm.

13.20 การทำคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis)

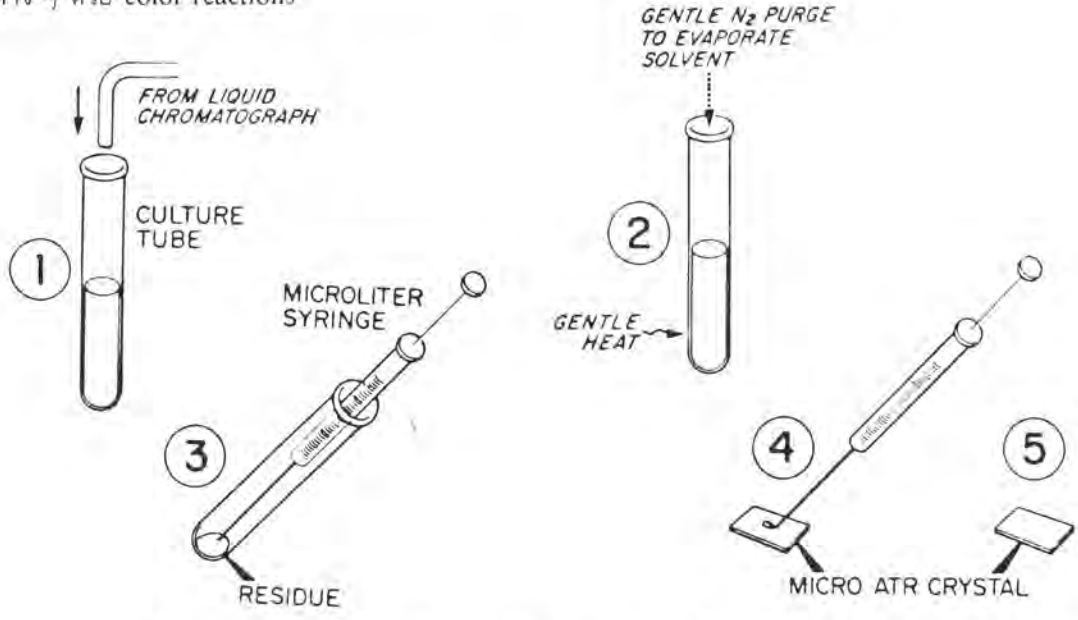
จุดประสงค์ที่สำคัญของการทำโครมาโทกราฟีก็เพื่อจะวิเคราะห์สารตัวอย่างว่าเป็นสารอะไร มีกี่ชนิด และเป็นสารใดบ้าง โดยทั่วไปในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC นั้น มักจะใช้วิธีเปรียบเทียบค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน โดยเริ่มต้นด้วยการวิเคราะห์สารตัวอย่างเสียก่อนจนได้การแยกที่ดี แล้วจึงใช้สารมาตรฐานวิเคราะห์ที่สภาวะเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบนี้อาจจะเป็นเพียงการให้ข้อมูลขั้นแรกเท่านั้น เพราะสารต่างชนิดกันอาจจะให้ค่า retention time เท่ากันได้ ดังนั้น อาจจะต้องวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่งโดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่างกัน นั่นคือ ใช้คอลัมน์ใหม่ ตัวทำละลาย และอัตราเร็วของการไหลใหม่ หรือมิฉะนั้นก็ใช้ LC เทคนิคอื่นเป็นการ cross-check เช่น ใช้ LSC, reverse-phase BPC หรืออาจใช้เทคนิคอื่น เช่น GC หรือ TLC เพื่อเปรียบเทียบจะทำให้การวิเคราะห์ค่อนข้างแน่ใจขึ้น

อีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันในการ identify peak ในโครมาโทแกรม คือใช้เทคนิคที่เรียกว่า "spiking" ซึ่งเป็นเทคนิคที่เหมาะในการที่จะบอกว่าพีกไหนเป็นของสารใดในของผสมที่ทราบชนิดต่าง ๆ ของสารแล้ว แต่ไม่ทราบตำแหน่งของพีก เช่น มีของผสมวิตามิน B_1 กับ B_6 เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC ได้พีก 2 พีก ถ้าอยากทราบว่าพีกไหนเป็นของ B_1 หรือ B_6 ใช้เทคนิค spiking จะบอกได้อย่างชัดเจน โดยเติมวิตามิน B_1 หรือ B_6 ลงไปในสารตัวอย่าง เช่น เติม B_1 ลงไป ถ้าโครมาโทแกรมที่ได้พีกใดมีพื้นที่มากขึ้นหรือสูงขึ้นก็แสดงว่าพีกนั้นเป็นของ B_1 ดังรูปที่ 13.45



รูปที่ 13.45 แสดงการวิเคราะห์พีกด้วยเทคนิค spiking

เทคนิคอื่น ๆ ที่สามารถช่วยทำให้การวิเคราะห์นั้นถูกต้องแม่นยำขึ้น โดยนำสารละลายที่ได้จากการแยกเป็นส่วน ๆ จาก LC ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น ๆ เช่น MS, IR, NMR, UV Spectrophotometry หรือ color reactions เป็นต้น รูปที่ 13.46 แสดงการวิเคราะห์สารละลายส่วนหนึ่งที่แยกได้จาก LC แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR Spectrophotometry ต่อ และตารางที่ 13.7 แสดงตัวอย่างการทดสอบสารต่าง ๆ ด้วย color reactions



รูปที่ 13.46 แสดงวิธีการเตรียมสารตัวอย่างจาก LC เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR

ตารางที่ 13.7 แสดงตัวอย่างของ color reactions ที่นำไปใช้สำหรับการตรวจหาฟังก์ชันนัลกรุ๊ปในสารตัวอย่าง

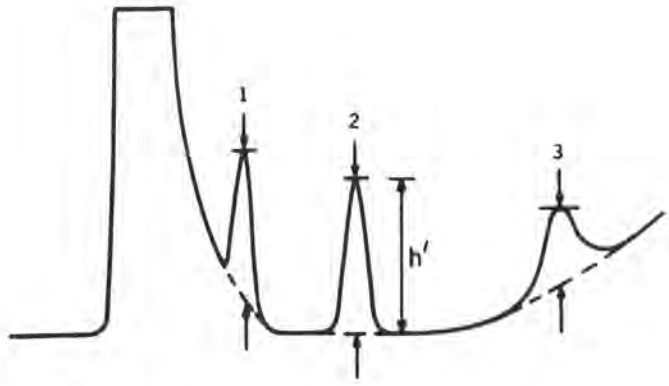
Type of compound	Reagent	Positive reaction	Det. limit (μg)	Compounds tested
Alcohols	$K_2Cr_2O_7 - HNO_3$	Blue color	20	C_1-C_8
	Ceric nitrate	Amber color	100	C_1-C_8
Aldehydes	2,4-DNP	Yellow ppt	20	C_1-C_6
	Schiff's	Pink color	50	C_1-C_6
Ketones	2,4-DNP	Yellow ppt	20	C_3-C_8 (methyl ketones)
Esters	Ferric hydroxamate	Red color	40	C_1-C_5 (acetates)
Mercaptans	Sodium nitroprusside	Red color	50	C_1-C_9
	Isatin	Green color	100	C_1-C_9
	$Pb(OAc)_2$	Yellow ppt	100	C_1-C_9
Sulfides	Sodium nitroprusside	Red color	50	C_2-C_{12}
Disulfides	Sodium nitroprusside	Red color	50	C_2-C_6
	Isatin	Green color	100	C_2-C_6
Amines	Hinsberg	Orange color	100	C_1-C_4
	Sodium nitroprusside	Red color, 1°	50	C_1-C_4
		Blue color, 2°		Diethyl and diamyl
Nitriles	Ferric hydroxamate-propylene glycol	Red color	40	C_2-C_5
Aromatics	$HCHO-H_2SO_4$	Red-wine color	20	ϕH-ϕC_4
Aliphatic, unsaturated	$HCHO-H_2SO_4$	Red wine color	40	C_2-C_8
Alkyl halide	Alc. $AgNO_3$	White ppt	20	C_1-C_5

13.21 การทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis)

หลังจากได้ทำการวิเคราะห์โดยคุณภาพแล้ว ถ้าต้องการจะทำปริมาณวิเคราะห์ด้วย จำเป็นที่จะต้องมีอุปกรณ์ที่สามารถอ่านค่าบางอย่างได้เพื่อนำไปทำปริมาณวิเคราะห์ นั่นคือ เครื่อง LC จะต้องมี recorder หรือ integrator เพื่อใช้คำนวณพื้นที่ของพีก หรือความสูงของพีก

13.21.1 ความสูงของพีก (Peak Height)

ความสูงของพีก (h) ที่ได้จากสัญญาณไฟฟ้าของดีเทคเตอร์นั้น มีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ จึงสามารถนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้ วิธีนี้นับว่าเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและทำได้รวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียหลายอย่าง คือ ความสูงของพีกจะแปรเปลี่ยนได้ค่อนข้างมาก ถ้าเทียบกับการใช้พื้นที่ของพีก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพีกดกสเกล ทำให้วัดไม่ได้



รูปที่ 13.47 แสดงการวัดความสูงของพีกจาก base lines

13.21.2 การวัดพื้นที่ของพีก (Peak Area Measurement)

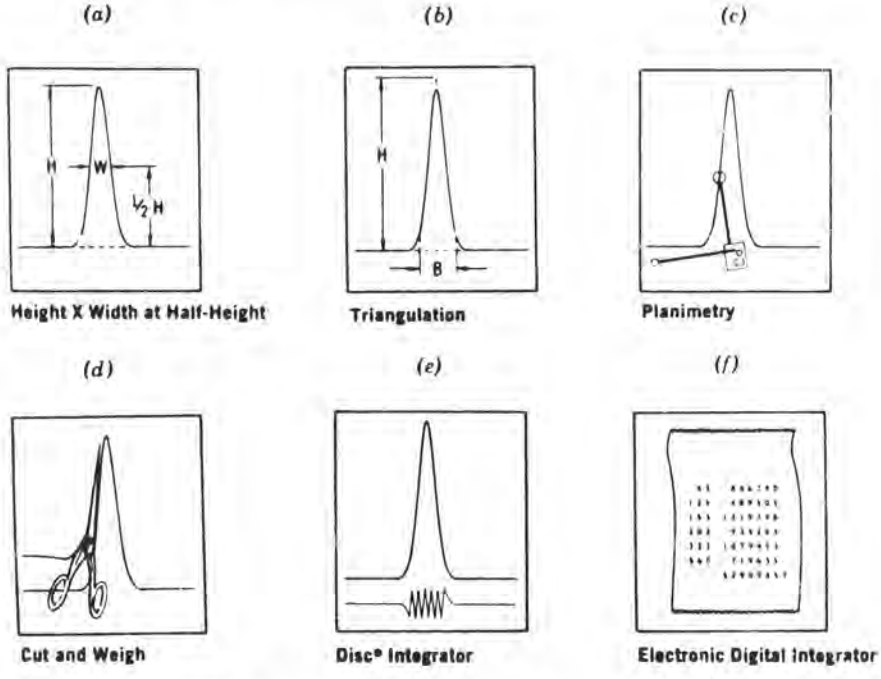
การใช้พื้นที่พีกเพื่อนำไปหาปริมาณของสารตัวอย่างนั้น ได้จากการอาศัยความจริงที่ว่าปริมาณของสารหรือความเข้มข้นของสารจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับพื้นที่พีก ดังสมการ

$$C_i = f_i A_i \qquad (13.15)$$

C = ความเข้มข้น

A = พื้นที่ของพีก

f = detector response factors



รูปที่ 13.48 แสดงเทคนิคต่าง ๆ ของการวัดพื้นที่พีก

ปัญหาในการวัดพื้นที่พีกนั้นอยู่ที่ว่า พีกเป็น Gaussian shape ทำให้ยากในการวัด นอกจากจะใช้ integrator อย่างไรก็ตาม การหาพื้นที่พีกสามารถทำได้หลายวิธี ดังในรูปที่ 13.48

ในแต่ละเทคนิคจะให้ค่าความเที่ยงต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13.8

ตารางที่ 13.8 แสดงการเปรียบเทียบค่าความเที่ยงของการวัดพื้นที่พีก

เทคนิค	ความเที่ยง %
Planimetry (c)	4.06
Triangular ($\frac{1}{2}$ × H × B) (b)	4.06
,, ,, (H × W) (a)	2.58
Cut and Weigh (d)	1.74
Disc Integrator (e)	1.29
Digital Integrator (f)	0.44
Computer	0.22

โดยสรุป วิธีที่นิยมใช้มี 3 วิธี คือ

1) ใช้วิธีวัดความสูงของพีกซึ่งสามารถทำได้เร็ว ง่าย และให้ความถูกต้องดี

2) ในปัจจุบันนี้เครื่อง LC ส่วนมากจะมี integrator หรือคอมพิวเตอร์ร่วมอยู่ด้วยเสมอ จึงใช้วิธีนี้เป็นวิธีคำนวณหาพื้นที่พีกซึ่งจะให้ความถูกต้องดีกว่า สะดวก และง่ายต่อการคำนวณ

3) ใช้วิธีคำนวณธรรมดา โดยคำนวณจากความสูงของพีกคูณด้วยความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง คือ $A = H \times W$

13.22 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการหาปริมาณของสารตัวอย่าง

เมื่อผู้วิเคราะห์ได้โครมาโทแกรมแล้วต้องการหาปริมาณของสารเหล่านั้น จึงจำเป็นต้องทราบความสูงของพีกหรือพื้นที่ของพีก ผู้วิเคราะห์จะใช้แบบไหนนั้นขึ้นอยู่กับความต้องการ ความถูกต้องแม่นยำของผู้วิเคราะห์ดังได้กล่าวมาแล้ว ในการวิเคราะห์โดยทั่วไป วิธีที่จะใช้ในการคำนวณหรือหาปริมาณของสาร คือ การทำ calibration curve ซึ่งใช้วิธีต่าง ๆ กัน คือ

1. Normalization method
2. Internal standard method
3. External standard method
4. Standard addition method

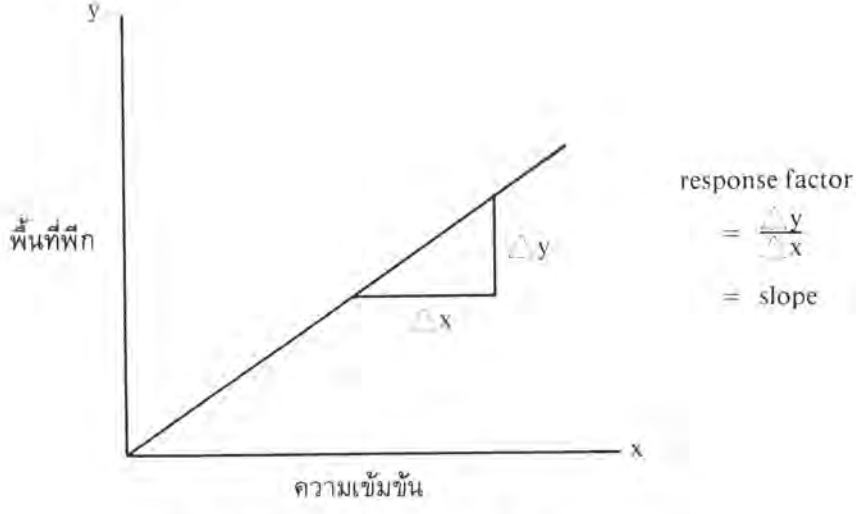
13.22.1 Normalization Method

การทำ normalization มีอยู่ด้วยกัน 2 แบบ คือ

1) **การหา area normalization แบบทั่วไป** ซึ่งจะใช้วิธีนี้ได้สารที่ทำการวิเคราะห์นั้นจะต้องมีค่า detector response คล้ายกัน และสารต่าง ๆ ที่ผสมกันอยู่ในสารตัวอย่างจะต้องถูกชะ (elute) ออกมาหมด 100% เช่น มีสารผสม A, B, C และ D จากพื้นที่พีก สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารแต่ละชนิดได้โดยการคำนวณ หรือจาก calibration curve ดังรูปที่ 13.49

$$\%\ A = \frac{\text{พื้นที่พีกของ A}}{\text{ผลรวมของพื้นที่พีก (A + B + C + D)}} \times 100$$

2) **การหา area normalization** โดยใช้ response factors ของ detector ของสารแต่ละชนิดมา correct ให้พื้นที่พีกเหล่านั้นอยู่ในสภาวะเดียวกัน (คือให้มี detector response เท่ากัน เหมือนแบบที่ 1) การหาค่า response factors ของสารแต่ละชนิดสามารถหาได้จาก calibration curve โดยใช้สารที่ทราบปริมาณ (น.น.) แน่นอน 3 ความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย LC หาพื้นที่พีก แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่พีก จะได้กราฟเป็นเส้นตรง slope ของ curve นี้ $(\frac{y}{x})$ คือ response factor ของสารนั้น ดังแสดงในรูปที่ 13.49



รูปที่ 13.49 แสดงลักษณะของ calibration curve

corrected area ของสารแต่ละชนิดสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\frac{\text{พื้นที่พีกของสาร A}}{\text{response factor ของสาร A}} = \text{corrected area ของสาร A}$$

detector response factors (R) สามารถอธิบายได้ด้วยความสัมพันธ์ข้างล่างนี้

$$C_i = R_iA_i \qquad \text{----------(13.16)}$$

C = ความเข้มข้น

R = ดีเทคเตอร์ response factors

A = พื้นที่พีก

วิธีที่ง่ายที่สุดในการหาค่า factors นี้สามารถทำได้โดยทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่มีสารต่าง ๆ ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากันผสมกันอยู่ เช่น มีสาร 3 ชนิดผสมกันอยู่ เมื่อวิเคราะห์ออกมาได้พื้นที่พีกเป็น A_1, A_2 และ A_3 ตามลำดับ

$$\therefore \quad C_1 = R_1A_1$$

$$C_2 = R_2A_2$$

$$C_3 = R_3A_3$$

แต่สารทั้งสามมีความเข้มข้นเท่ากัน $C_1 = C_2 = C_3$

$$\therefore \quad R_1A_1 = R_3A_3$$

$$R_2A_2 = R_3A_3$$

$$\frac{R_1}{R_3} = \frac{A_3}{A_1}$$

$$\frac{R_2}{R_3} = \frac{A_3}{A_2}$$

ถ้าให้สารตัวที่ 3 เป็น "norm" โดยกำหนดให้มีค่า $R_3 = 1.00$ ดังนั้น ค่า relative response factors ของสารแต่ละชนิดสามารถคำนวณได้โดย

$$R_1 = \frac{A_3}{A_1}$$

$$R_2 = \frac{A_3}{A_2}$$

$$R_3 = \frac{A_3}{A_3} = 1.00$$

เพราะฉะนั้น เมื่อมีสารตัวอย่างที่มีสารต่าง ๆ ผสมกันอยู่ 3 ชนิด ก็จะสามารถหาความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดได้ โดยวัด peak area ของสารแต่ละชนิด สมมติว่าได้เป็น A_1^*, A_2^* และ A_3^* ตามลำดับ จากนั้นจะต้องหาค่า response factors ของแต่ละสารเสียก่อน

$$A_1^*R_1 + A_2^*R_2 + \ldots A_i^*R_i + \ldots A_n^*R_n = \sum_{i=1}^{n} A_i^* R_i$$

$$C_i\ \% \quad = \quad \frac{A_i^* R_i}{\sum_{i=1}^{n} A_i^* R_i} \times 100$$

ตัวอย่าง ในการหาปริมาณของแอสไพริน คาเฟอีน และฟีนาเซตินในยาเม็ดแก้ปวด สามารถทำได้ดังนี้

(ก) หาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์โดย

เลือกใช้คอลัมน์	25 ซม. × 2.6 มม. ODS (C_{18}) bonded phase
เฟสเคลื่อนที่เป็น	30/ 70 acetonitrile/H_2O
อัตราการไหล	1 mL/min
อุณหภูมิของคอลัมน์	70°C
ดีเทคเตอร์	UV 254 nm

(ข) เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารทั้งสามชนิดนี้ โดยใช้สารแต่ละชนิด 20 mg นำไปละลายในเมทานอล (HPLC grade หรือ pure grade) แล้วทำให้เป็นสารละลาย 100 mL

ดังนั้นสารละลายนี้จะมีความเข้มข้น = 20 mg/100 mL

= 0.2 mg/mL

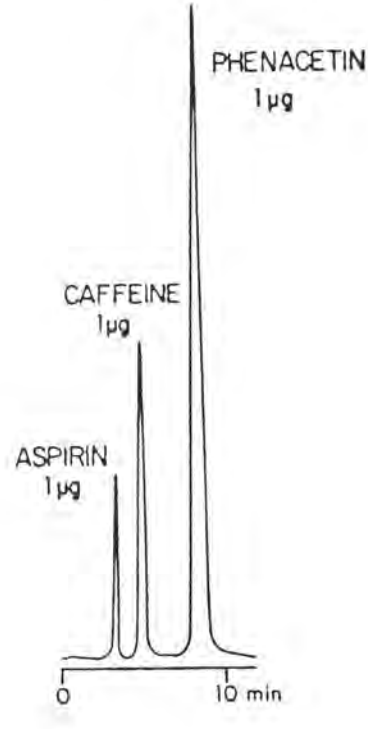
= 0.2 μg/μL

(ค) ฉีดสารละลายมาตรฐาน 5 μL เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 13.50 ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้งเพื่อหาพื้นที่พีกเฉลี่ย จะได้ดังนี้

แอสไพริน = 238 หน่วย

คาเฟอีน = 660 ,,

ฟีนาเซติน = 1,190 ,,



รูปที่ 13.50 แสดงลักษณะของโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน จำนวน 5 μL หรือมีสารแต่ละชนิดอยู่ 1 μg เพื่อหาค่า response factor

(ง) หาค่า response factors (R) โดยให้สารตัวใดตัวหนึ่งเป็น norm คือมีค่า R = 1.00

$\therefore$ แอสไพรินมีค่า $R = \frac{1,190}{238} = 5.00$

คาเฟอีนมีค่า $R = \frac{1,190}{660} = 1.8$

(จ) เตรียมสารตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์โดยนำยามา 1 เม็ด บดให้ละเอียด นำไปละลายในเมทานอล แล้วถ่ายใส่ขวดมาตรฐาน ทำให้เป็นสารละลาย 100 mL เขย่าเพื่อให้ตัวอย่างละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ส่วนที่ไม่ละลายตกตะกอน

(ฉ) ใช้ syringe ดูดสารละลายตัวอย่างมา 5 μL ฉีดเข้าไปในเครื่อง HPLC ซึ่งใช้สภาวะเดียวกันกับที่หา response factors แล้วหาพื้นที่พีกของแต่ละสารเพื่อนำไปหาปริมาณต่อไป โดย

ให้พื้นที่พีกของแอสไพรินวัดได้ 90 หน่วย

" " คาเฟอีน 265 หน่วย

" " ฟีนาเซติน 460 หน่วย

เมื่อ correct ด้วยค่า response factors จะได้ดังนี้

แอสไพริน $90 \times 5.0 = 450$

คาเฟอีน $265 \times 1.8 = 477$

ฟีนาเซติน $460 \times 1.0 = 460$

พื้นที่รวม $= 1,387$

$\therefore$ ความเข้มข้นของแอสไพริน $= \frac{450}{1,387} \times 100 = 32.4\%$

" " คาเฟอีน $= \frac{477}{1,387} \times 100 = 34.4\%$

" " ฟีนาเซติน $= \frac{460}{1,387} \times 100 = 33.2\%$

เมื่อหาค่า response factors ได้แล้ว จะทำให้ง่ายต่อการหาปริมาณต่อไปในสารตัวอย่างอื่น ๆ ถ้าหากใช้สภาวะเดียวกัน

13.22.2 Internal Standard Method

สิ่งที่สำคัญที่จะต้องพิจารณาในการเลือกใช้เทคนิคนี้ คือ

1) สารที่จะใช้เป็น internal standard จะต้องเป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบ หรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง

2) สารที่เป็น internal standard จะต้องแยกออกจากสารตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ (completely resolved)

3) Internal standard จะต้องเป็นสารบริสุทธิ์

4) Internal standard จะต้องเป็นสารที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างนั้น

5) Internal standard ที่เติมลงไปนั้น ควรจะมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารที่ต้องการหาปริมาณ

6) Internal standard ที่ใช้ควรจะต้องเป็น linear relations ในช่วงของความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งทางที่ดีควรจะตรวจสอบดูเสียก่อน โดยลองทำ calibration curve ดูสัก 3–4 จุด

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ ใช้วิธีเติมสารมาตรฐานที่เป็นสารต่างชนิดกับสารตัวอย่าง ซึ่งเรียกว่า internal standard ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงไปในสารตัวอย่างเพื่อใช้เปรียบเทียบ การเติม internal standard ลงไปนี้ ต้องคำนึงถึงความเข้มข้นและปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย เพราะจะต้องใช้ความสูงของพีกหรือพื้นที่พีกไปเปรียบเทียบกัน เทคนิคนี้ดีตรงที่ว่า สารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างไม่จำเป็นที่จะต้องถูกชะออกมาหมดทุกตัว เพียงแต่สารที่สนใจจะวิเคราะห์และ internal standard ที่เติมลงไปถูกชะออกมาหมดก็พอแล้ว

Internal Standard Methods ที่นิยมใช้กันมี 3 วิธี คือ

(1) ใช้วิธีที่เรียกว่า classical method โดยชั่งสารมาตรฐาน (standard) แล้วผสมกับสารตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแล้ว

(2) ใช้วิธีที่เรียกว่า stock solution method วิธีนี้ใช้ได้ดีเมื่อสารตัวอย่างนั้นทำการวิเคราะห์บ่อย ๆ สารมาตรฐานจึงเตรียมไว้สำหรับใช้หลายครั้งเรียกว่า stock solution เมื่อทำการวิเคราะห์ก็สามารถปิเปตออกมาผสมกับสารละลายตัวอย่างได้เลย หรืออาจใช้เป็นสารละลายทำให้เจือจาง

(3) ใช้วิธีที่เรียกว่า calibration plot method คือ ใช้สารละลายมาตรฐานหลาย ๆ ความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์ เมื่อหา corrected area ได้ก็นำมาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์กับความเข้มข้นเพื่อใช้หาปริมาณของสารในสารตัวอย่างต่อไป

(1) *Classical Method* การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ก็คล้าย ๆ กับวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว เช่น ถ้าเรามีสาร 2 ชนิด ผสมกันอยู่ในสารตัวอย่างในปริมาณแตกต่างกัน คือ

$$C_2 = R_2A_2$$

$$C_1 = R_1A_1$$

ถ้าสารตัวที่ 2 เป็น internal standard ดังนั้น $R_2 = 1.00$

$$\therefore \quad \frac{C_2}{C_1} = \frac{R_2A_2}{R_1A_1}$$

เมื่อเขียนใหม่ให้ $C_2 = C_{st}$ (st = standard)

$$C_1 = C_i \quad (i = \text{สารที่สนใจวิเคราะห์})$$

$$\therefore \quad \frac{C_{st}}{C_i} R_i = \frac{A_{st}}{A_i} \qquad \text{----------(13.17)}$$

ถ้าต้องการจะหาค่า relative response factor ของสาร i

ให้วิเคราะห์สารตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น C_{st} และ C_i เมื่อได้พื้นที่พีกก็จะสามารถคำนวณหาค่า R_i ได้จากสูตร

$$R_i = \frac{C_i}{C_{st}} \cdot \frac{A_{st}}{A_i} \qquad \text{---------(13.18)}$$

เมื่อทราบค่า R_i ต้องการหาค่า C_i

$$C_i = \frac{A_i}{A_{st}} \cdot C_{st} \cdot R_i \qquad \text{---------(13.19)}$$

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ วิธีทำที่ทำให้เกิดความสะดวกก็คือ ใช้ปริมาณของสารเท่ากัน ดีเทคเตอร์ใช้เหมือนกัน จะช่วยลดความผิดพลาดที่อาจเนื่องมาจากดีเทคเตอร์ไม่เป็น linear ได้

ตัวอย่าง ในการหาปริมาณของโคเคน (cocaine) ในสารตัวอย่าง โดยใช้โคเดอีน (codeine) เป็น internal standard

ตามวิธี classical method เพื่อใช้ทำการวิเคราะห์

(1) หาสภาวะต่าง ๆ เพื่อใช้ทำการวิเคราะห์

คอลัมน์ใช้ 25 ซม. × 2.6 มม. Sil-x-1 fluoroether bonded phase

เฟสเคลื่อนที่ใช้ 90/10 acetonitrile/H_2O และมี 0.3% H_3PO_4

อัตราการไหล 2 mL/min

ดีเทคเตอร์ UV ที่ 210 nm

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่งโคเดอีนมา 12.0 mg และโคเคนมา 11.3 mg ละลายน้ำแล้วทำให้เป็นสารละลาย 100 mL ในขวดมาตรฐาน

(3) ใช้สารละลายครั้งละ 2 μL ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วหาค่าเฉลี่ยพื้นที่พีกได้ดังนี้

พื้นที่พีกโคเดอีน 1,009 หน่วย

พื้นที่พีกโคเคน 635 ,,

(4) หาค่า relative response factor ของโคเคน

$$R = \frac{11.3}{12.0} \times \frac{1,009}{635} = 1.50$$

(5) เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่าง 59.8 mg และ internal standard โคเดอีน 11.0 mg แล้วละลายน้ำทำให้เป็นสารละลาย 100 mL

(6) นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ครั้งละ 2 μL ที่สภาวะเดียวกับการหาค่า response factor วัดพื้นที่พีกได้

โคเดอีน 990 หน่วย

โคเคน 1,031 ,,

$\therefore$ ปริมาณของโคเคนในตัวอย่าง $= \frac{1,031}{990} \times 11.0 \times 1.50$

$$= 17.18 \text{ mg}$$

$$\therefore \quad \text{ความเข้มข้นของโคเดนในตัวอย่าง} = \frac{17.18}{59.8} \times 100$$

$$= 28.73\%$$

(2) *Stock Solution Method* ในวิธีนี้ stock solution ซึ่งประกอบด้วย internal standard และส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สนใจจะถูกวิเคราะห์ โดยใช้สภาวะเดียวกันกับสารละลายตัวอย่างที่เติม internal standard ให้มีความเข้มข้นเท่ากันกับ stock solution ความเข้มข้นของสารที่สนใจสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$C_i\% = \frac{A_{si} \text{ (stock)}}{A_i \text{ (stock)}} \cdot \frac{A_i \text{ (anal)}}{A_{si} \text{ (anal)}} \cdot C_i\% \text{ (stock)}$$

subscript i หมายถึง สารที่เป็นองค์ประกอบที่สนใจ

st หมายถึง internal standard

anal หมายถึง สารละลายตัวอย่าง

stock หมายถึง stock solution

เมื่อทราบน้ำหนักของสารตัวอย่างและปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง ดังนั้น ความเข้มข้นของสารที่น่าสนใจในสารตัวอย่างสามารถคำนวณได้

(3) *Internal Standard Plot Method* สำหรับวิธีการอันนี้ใช้วิธีเตรียม standard mixtures หลาย ๆ ความเข้มข้น โดยประกอบด้วย internal standard เท่ากันหมด แต่จะมีปริมาณของสารที่สนใจแตกต่างกัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วหาพื้นที่พีก จะเห็นว่าอัตราส่วนของพื้นที่พีก (A_i/A_s) จะมีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนของน้ำหนักในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง และคอลัมน์จะต้องไม่ over load กราฟที่เขียนขึ้นนี้สามารถนำไปใช้หาปริมาณของสารตัวอย่างได้ เมื่อใช้ internal standard ที่มีปริมาณเท่ากันเติมลงไปในสารละลายตัวอย่างแต่ละชนิด แล้วนำของผสมเหล่านั้นไปวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน อัตราส่วนของพื้นที่พีกสามารถคำนวณหาได้แล้วนำไปอ่านจากกราฟ แต่ความเข้มข้นของ internal standard นั้นทราบแล้ว จึงสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ ดังแสดงในตัวอย่าง

ตัวอย่าง สารตัวอย่างซึ่งเป็นของผสมของ dimethyl phthalate (DMP) และ diethyl diphenyl urea (EPU) จะหาปริมาณโดยใช้ acetanilide (ACA) เป็น internal standard การวิเคราะห์สามารถทำได้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

(1) หาสภาวะที่จะใช้ทำการวิเคราะห์เสียก่อน

คอลัมน์ใช้	25 ซม. x 2.6 มม. Silica A
เฟสเคลื่อนที่เป็น	dichloromethane ซึ่งมี isopropanol 0.1 – 0.5%
อัตราการไหล	2 mL/min

อุณหภูมิของคอลัมน์ อุณหภูมิห้อง

ดีเทคเตอร์ UV ที่ 254 nm

(2) สร้าง calibration curve

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 3 ขวด โดยใช้สารแต่ละชนิดดังตารางข้างล่างนี้

	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ขวดที่ 3
Dimethyl phthalate	0.050 g	0.125 g	0.200 g
Diethyl diphenyl urea	0.030 g	0.065 g	0.100 g
Acetanilide (st)	0.100 g	0.100 g	0.100 g

นำสารที่ชั่งได้ไปละลายในเฟสเคลื่อนที่แล้วทำให้เป็น 100 mL แล้วใช้สารละลายเหล่านี้ 1.0 μL ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วหาพื้นที่พีกจะได้ดังตารางข้างล่างนี้

	พื้นที่จากขวด 1	พื้นที่จากขวด 2	พื้นที่จากขวด 3
Dimethyl phthalate	151	387	622
Diethyl diphenyl urea	470	1,035	1,553
Acetanilide (st)	1,685	1,660	1,668

จากการคำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่พีกเพื่อนำไปเขียนกราฟ

	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ขวดที่ 3
$\frac{\text{พ.ท. DMP}}{\text{พ.ท. ACA}}$	$\frac{151}{1,685} = 0.90$	$\frac{387}{1,660} = 0.233$	$\frac{622}{1,668} = 0.373$
$\frac{\text{wt. DMP}}{\text{wt. ACA}}$	$\frac{0.050}{0.100} = 0.50$	$\frac{0.125}{0.100} = 1.250$	$\frac{0.200}{0.100} = 2.00$
$\frac{\text{พ.ท. EPU}}{\text{พ.ท. ACA}}$	$\frac{470}{1,685} = 0.297$	$\frac{1,035}{1,660} = 0.624$	$\frac{1,553}{1,668} = 0.931$
$\frac{\text{wt. EPU}}{\text{wt. ACA}}$	$\frac{0.030}{0.100} = 0.30$	$\frac{0.065}{0.100} = 0.650$	$\frac{0.100}{0.100} = 1.00$

(3) การวิเคราะห์สารตัวอย่าง ใช้สารตัวอย่างจำนวนหนึ่ง เติม internal standard acetanilide ลงไป 0.100 g แล้วละลายด้วยตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ทำให้เป็น 100 mL วิธีที่สะดวก ใช้วิธีเติม stock solution ลงไปทำให้เป็น 100 mL

นำสารละลาย 1.0 μL ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วหาพื้นที่พีกของสารตัวอย่างและของ internal standard คำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่พีกเพื่อนำไปอ่านกราฟ แล้วคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างต่อไป

สารตัวอย่างใช้	0.500 g
เติม ACA	0.100 g
พ.ท. พีก DMP	511 หน่วย
พ.ท. พีก EPU	881 ,,
พ.ท. พีก ACA	1,671 ,,

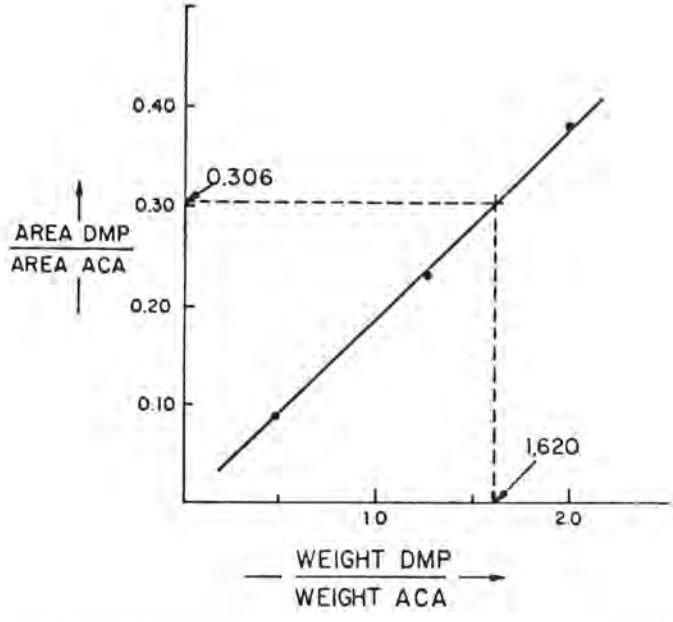
$$\therefore \quad \frac{\text{DMP}}{\text{ACA}} = \frac{511}{1671} = 0.306$$

$$\frac{\text{EPU}}{\text{ACA}} = \frac{881}{1{,}671} = 0.527$$

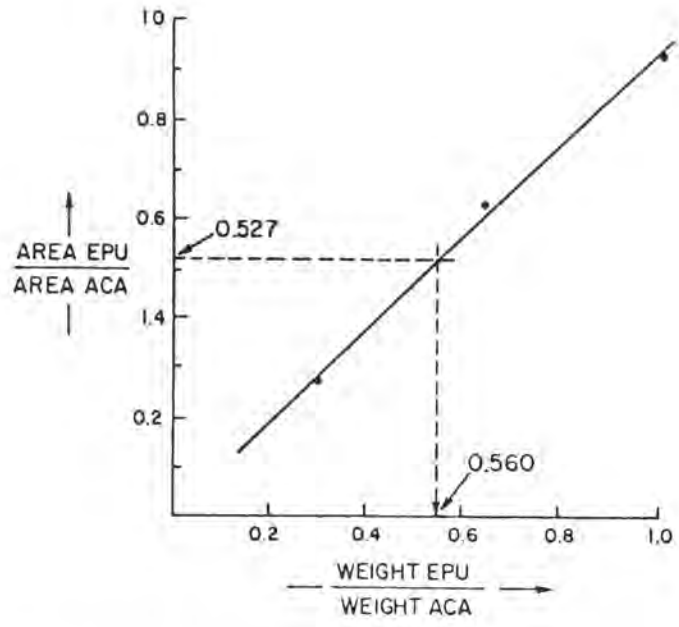
เมื่อนำอัตราส่วน 0.306 ไปอ่านจากกราฟรูปที่ 13.51 จะได้อัตราส่วนโดยน้ำหนักเป็น 1.62

$$\therefore \quad \frac{\text{wt. DMP}}{\text{wt. ACA}} = 1.62$$

แต่ wt. ACA ใช้ 0.100 g wt. DMP = $1.62 \times 0.100 = 0.162$ g สารตัวอย่างใช้ 0.500 g



รูปที่ 13.51 แสดง calibration plot ของ dimethyl phthalate (DMP) acetanilide (ACA) เป็น internal standard



รูปที่ 13.52 แสดง calibration plot ของ diethyl diphenyl urea (EPU) และใช้ acetanilide (ACA) เป็น internal standard

$$\therefore \quad \%\ \text{DMP} \quad = \quad \frac{0.162 \times 100}{0.500} \quad = \quad 32.4\%$$

เมื่อนำอัตราส่วน 0.527 ไปอ่านจากกราฟรูปที่ 13.52 จะได้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของ $\frac{\text{EPU}}{\text{ACA}} = 0.56$

เนื่องจากใช้ ACA หนัก 0.100 g

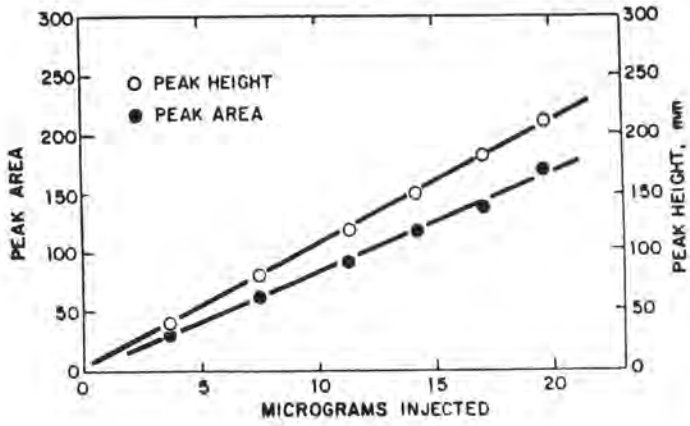
$$\therefore \quad \text{น้ำหนักของ EPU} = 0.56 \times 0.100 = 0.056\ \text{g}$$

สารตัวอย่างใช้ 0.500 g

$$\therefore \quad \%\ \text{EPU} \quad = \quad \frac{0.056 \times 100}{0.500} \quad = \quad 11.2\%$$

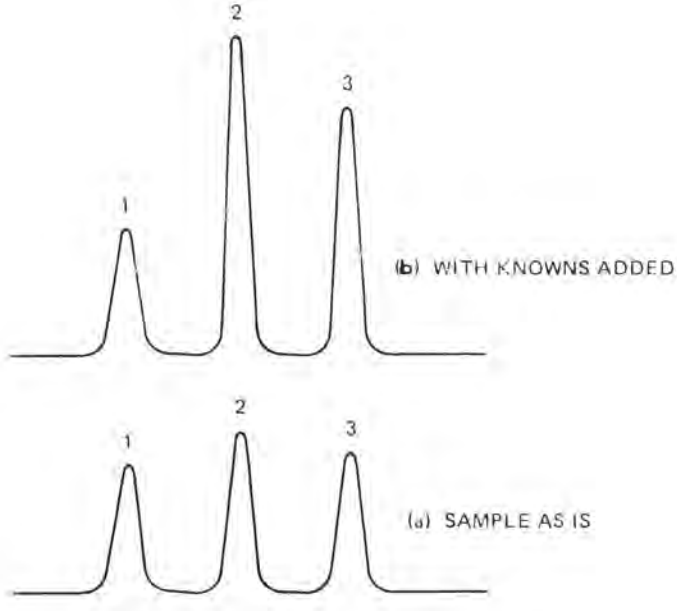
(4) *External Standard Methods* เทคนิคนี้ไม่ค่อยยุ่งยากเท่า internal standard method และขึ้นอยู่กับผู้ใช้ที่ต้องการความถูกต้องมากน้อยเพียงใด

วิธีวิเคราะห์ใช้การทำ calibration curve จากสารมาตรฐานที่ใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันกับความสูงของพีกหรือพื้นที่พีก การหาปริมาณของสารตัวอย่างนั้น ทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะเดียวกันกับสารมาตรฐาน ความสูงของพีกหรือพื้นที่พีกนำไปอ่านจาก calibration plot ได้เลย ลักษณะของ calibration plot มีลักษณะดังรูปที่ 13.53



รูปที่ 13.53 แสดง External Standard Calibration Plot

(5) *Standard Addition Method* เทคนิคนี้อาจถือได้ว่าเป็นเทคนิครวมกันของ internal และ external standard methods โดยทั่วไป เทคนิคนี้จะใช้เมื่อดีเทคเตอร์ให้ response เป็น non-linear และมักจะใช้วิเคราะห์เมื่อสารตัวอย่างมีเพียง 2–3 ชนิดปนกันเท่านั้น โดยครั้งแรกวิเคราะห์สารตัวอย่างก่อนแล้วนำสารตัวอย่างนั้นมาเติมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไป แล้ววิเคราะห์ใหม่ ดังแสดงใน



รูปที่ 13.54 (a) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างซึ่งมีสาร 3 ชนิด
(b) เป็นโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างเมื่อเติมสารมาตรฐานตัวที่ 2 และ 3 ลงไป

รูปที่ 13.54(a) เป็นโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างซึ่งมี 3 พีก และต้องการจะหาเพียง 2 พีกหลังเท่านั้น เมื่อเติมสารตัวที่ 2 และสารตัวที่ 3 ลงไปโดยรู้ปริมาณแน่นอน แล้วนำไปวิเคราะห์ใหม่ได้โครมาโทแกรมตามรูป (b)

$$\therefore \quad X_a = \frac{\text{ความสูงของ 2 a}}{\text{ความสูงของ 1 a}} \qquad \text{----------(13.20)}$$

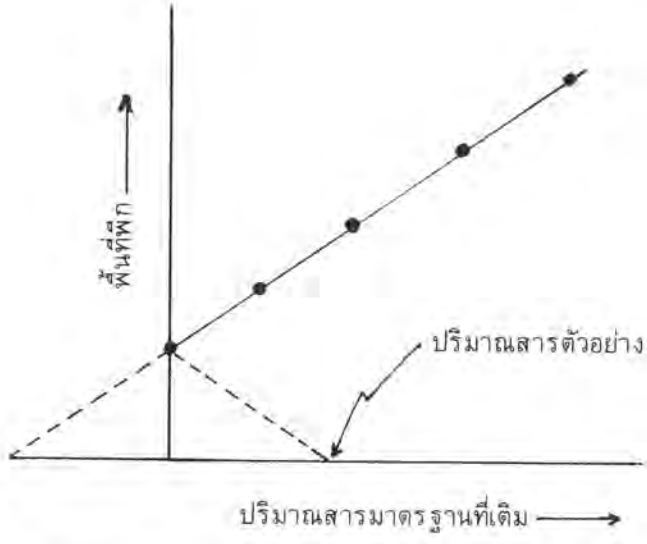
$$X_b = \frac{\text{ความสูงของ 2 b}}{\text{ความสูงของ 1 b}} \qquad \text{----------(13.21)}$$

$$\therefore \quad X_b - X_a = X_{added} \qquad \text{----------(13.22)}$$

$$\frac{(Y_{added})(X_a)}{X_{added}} = Y_{unknown} \qquad \text{----------(13.23)}$$

จากสมการนี้เราจะสามารถคำนวณหาปริมาณของสาร Y ได้

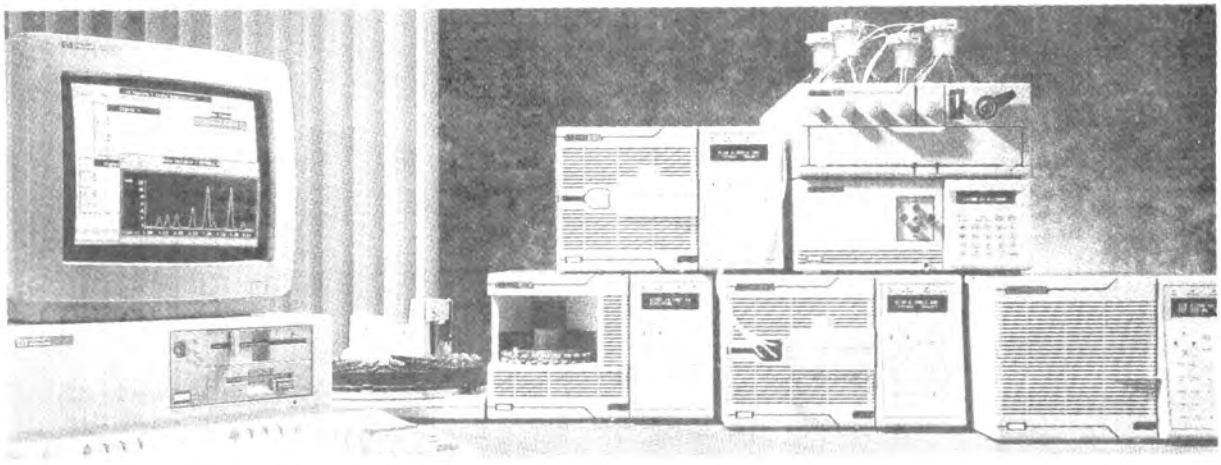
หรืออาจใช้วิธีทำ standard addition calibration curve โดยเติมสารมาตรฐานที่มีปริมาณต่าง ๆ กันลงไปในสารตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์ใหม่ วัดพื้นที่พีกแล้วเขียนกราฟกับปริมาณของสารมาตรฐานที่เติมจะได้กราฟดังรูปที่ 13.55 จุดตัดแกน X คือปริมาณของสารตัวอย่าง



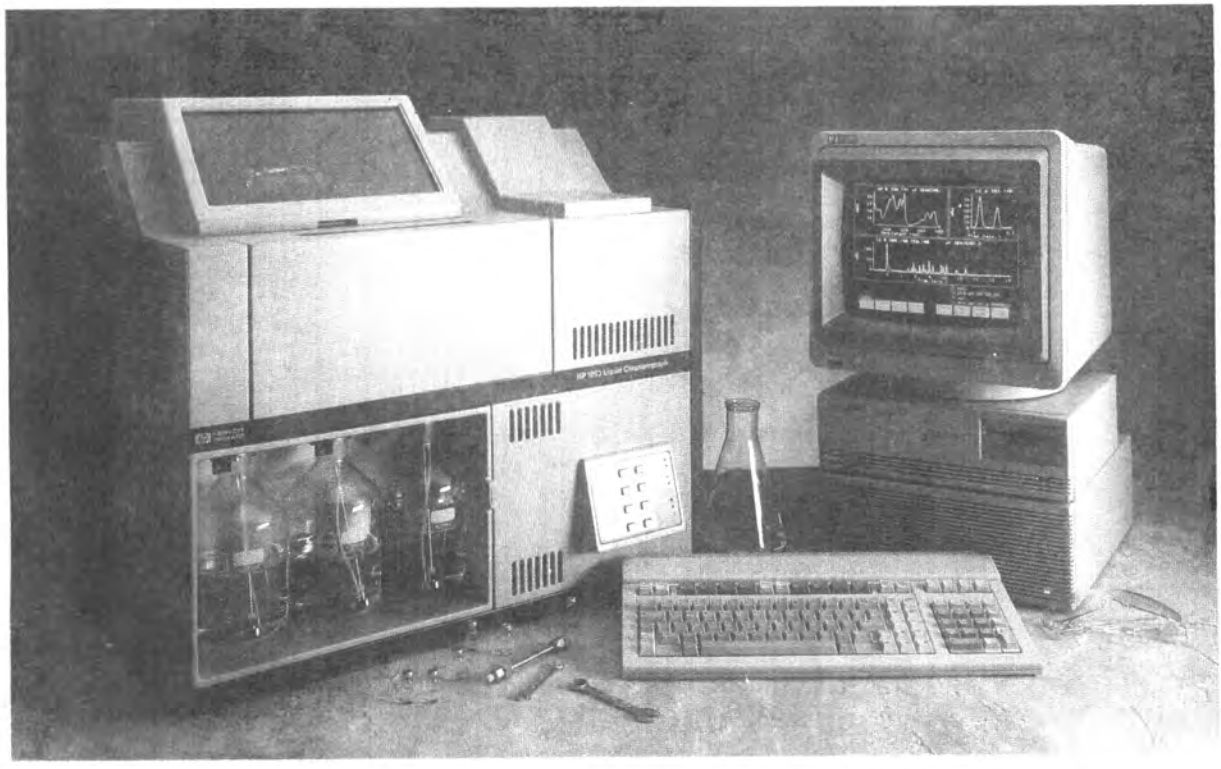
รูปที่ 13.55 แสดง standard addition calibration curve

ต่อไปนี้เป็นเครื่อง HPLC ที่ผลิตออกมาใช้เพื่อการศึกษาและวิจัยของบริษัทที่มีชื่อเสียงและเป็นที่ยอมรับกันทั่วโลก

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟ หรือ HPLC ผลิตโดยบริษัท Hewlett Packard

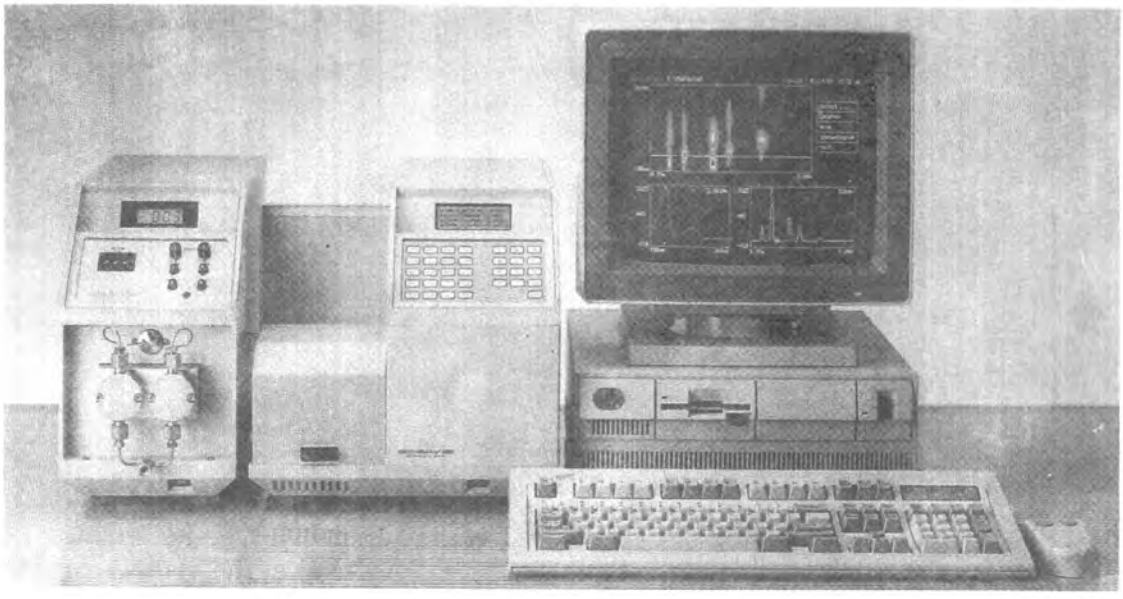


เครื่อง Liquid Chromatograph หรือ HPLC, model HP 1050 series สามารถเลือกใช้ดีเทคเตอร์ต่าง ๆ ได้ หรืออาจต่อเข้ากับ Diode Array Detector ก็ได้ โดยมี Chem station ควบคุมระบบต่าง ๆ และการประมวลผล

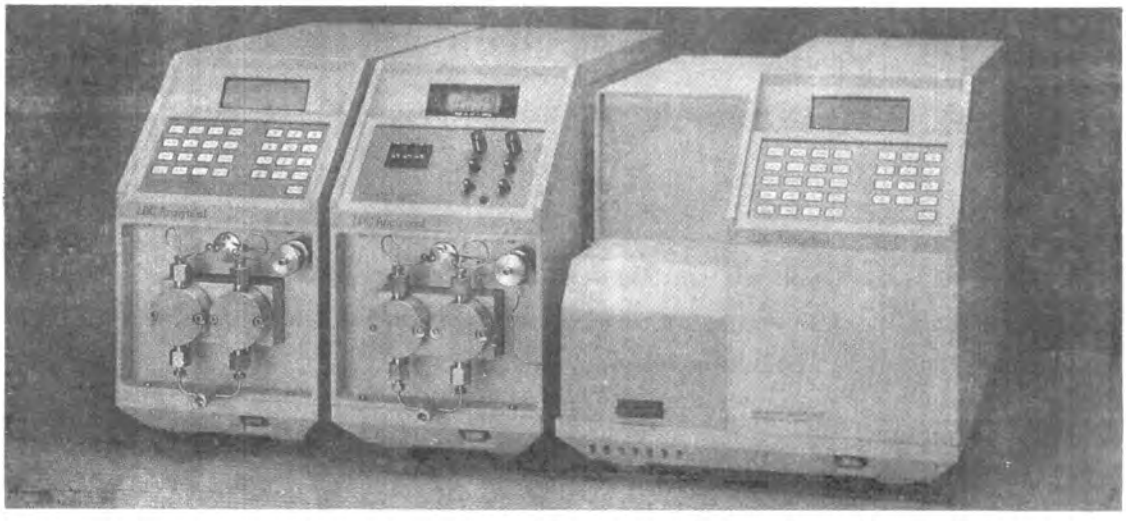


เครื่อง Liquid Chromatograph, model HP 1090 M ต่อเข้ากับ LC Chem Station ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารที่มีมวลมาก ๆ และใช้หาปริมาณของกรดอะมิโนได้ดี

เครื่อง HPLC ที่ผลิตโดยบริษัท LDC Analytical



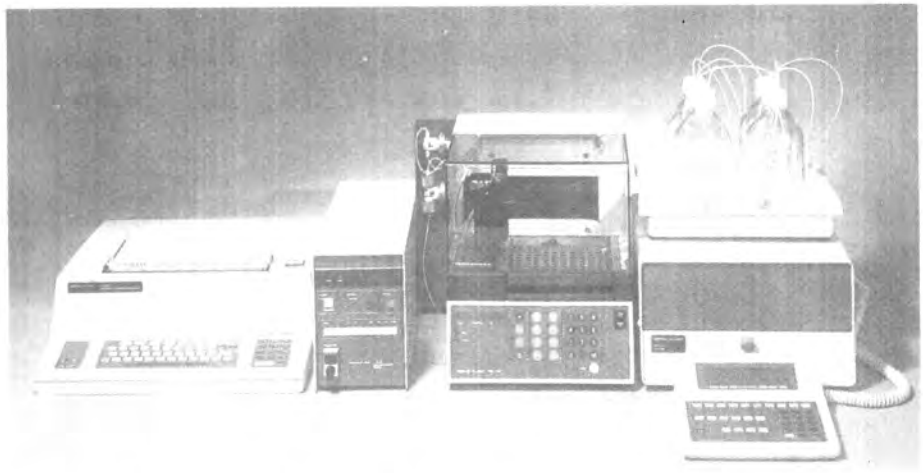
เครื่อง HPLC, model Spectro Monitor 5000 Photo diode Array Detector เป็นเครื่องที่มีสภาพไวมากพอที่จะวิเคราะห์สารปริมาณน้อย ๆ ได้ถึงระดับ picogram โดยใช้ UV-Photodiode array detector ซึ่งมี diode 70 ตัว (5 nm per diode) ในช่วงความยาวคลื่น 190–360 nm. เครื่องนี้ใช้ 2 microprocessors สำหรับควบคุมเครื่องและประเมินผลการวิเคราะห์



แสดง consta Metric 3500 programmable isocratic pump, consta Metric 3200 solvent delivery system, และ Spectro Monitor 5000 ควบคุม flow rate ได้ 0.01–10.0 mL/min out put pressure 100 – 6000 psi ทำ gradient configuration ได้ทั้ง linear และ exponential

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟ (LC) หรือ High Performance Liquid Chromatographs ผลิตโดยบริษัท Perkin Elmer

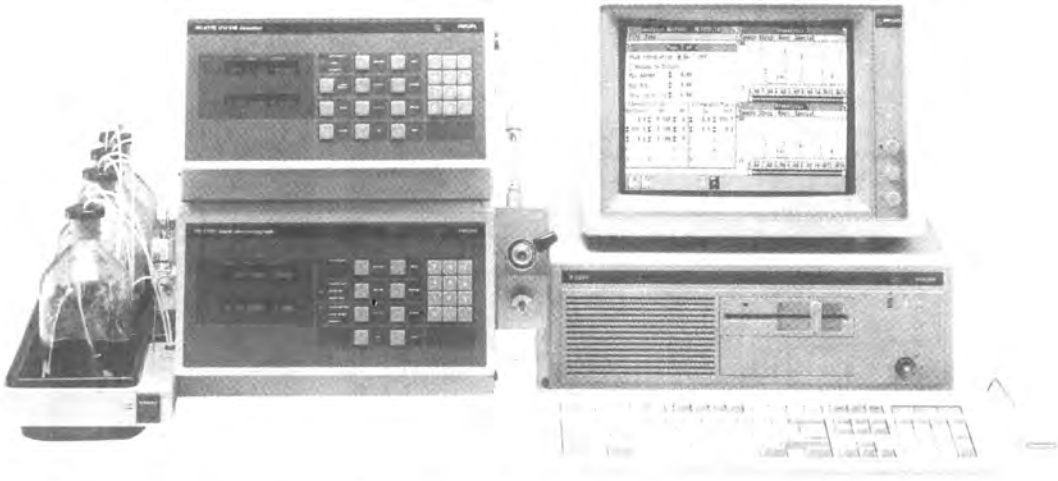
เครื่อง liquid Chromatograph ประกอบด้วย Series 410 LC Pump LC-235 Diode array detector ISS-100 Auto Sampler และ LC 1 – 100 Integrator เป็นเครื่องที่ให้สภาพไวสูง การควบคุมใช้ key board แต่ละส่วน



เครื่อง Liquid Chromatograph ประกอบด้วย Series 410 pump ISS-100 Autosampler, LC-90 Variable wavelength, UV detector และ LCI-100 Integrator เครื่องนี้สามารถใช้ได้ 4-solvent system flow rate 0.01 – 10 mL/min มี programable methods ถึง 12 methods

เครื่อง Avanced LC Sample Processor ISS-200 ที่ให้ความถูกต้องและความเที่ยงสูง สามารถใช้ทำ automated calibration, dilution routines, internal standard · addition และ automated precolumn derivatization ได้ถึง 4 reagents

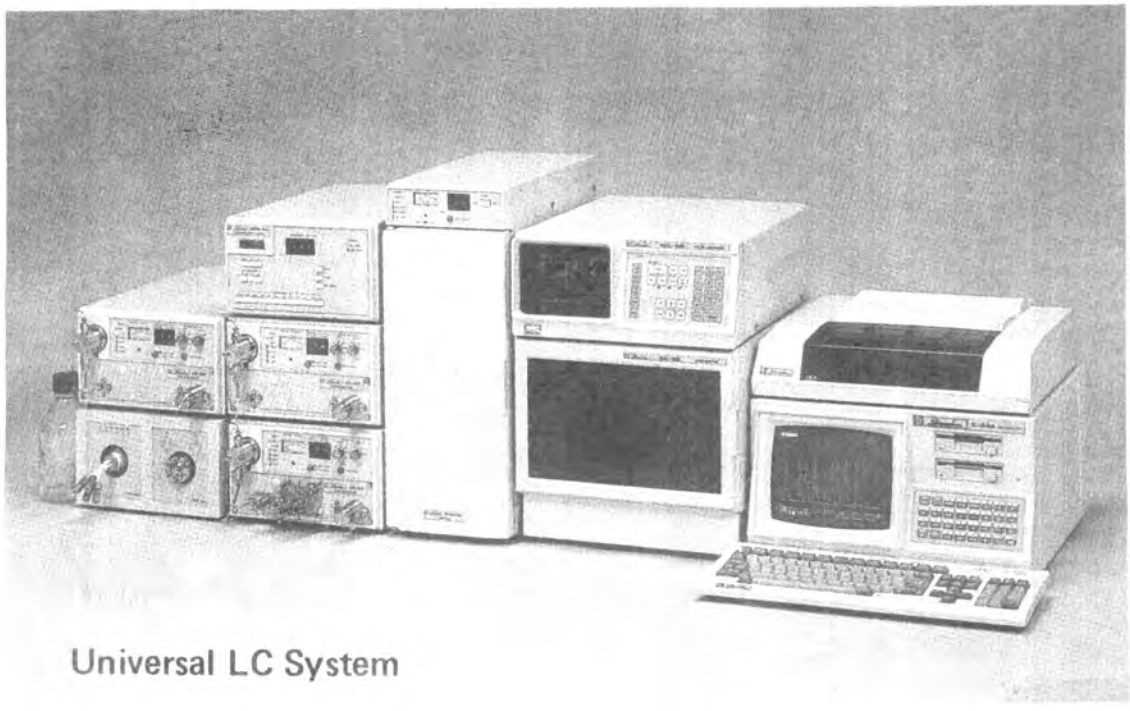
เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟหรือ HPLC ที่ผลิตโดยบริษัทฟิลิปส์ (Philips)



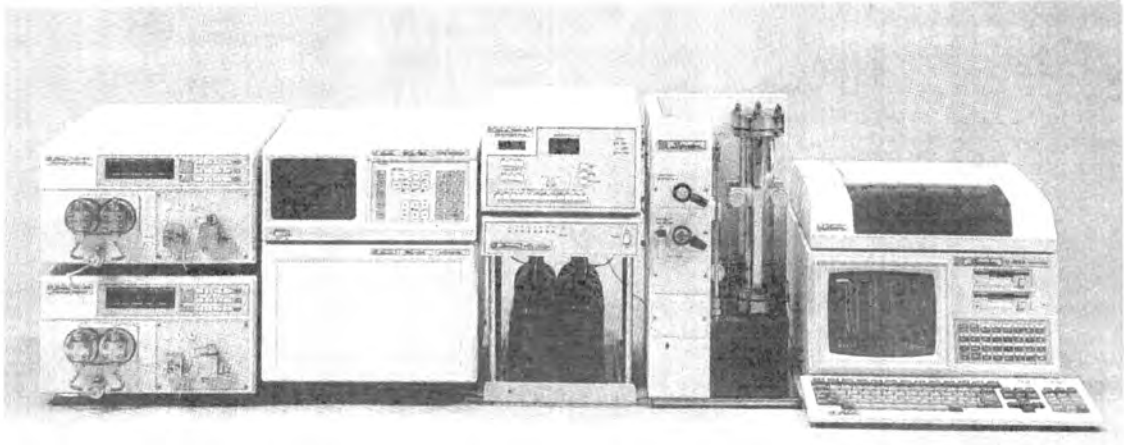
เครื่อง Liquid Chromatograph หรือ HPLC ชนิดที่ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ เช่น ใช้ modular pump PU 4100 M, modular UV/VIS system PU 4110 และ Chromatography data station PU 6000 สำหรับดีเทคเตอร์และปั๊มอาจเลือกเป็นอย่างอื่นได้

เครื่อง Liquid Chromatograph หรือ HPLC ที่ใช้ Diode array system PU 6003 ซึ่งมี software ที่สามารถทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างดี

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟที่ผลิตโดยบริษัท Shimadzu Corporation



เครื่อง Liquid Chromatograph (HPLC System), model LC-6A system ใช้ได้กับงานทั่วไป ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่นำมาต่อเข้าด้วยกัน ปั๊มสามารถควบคุมความดันและ flow rate ได้ 0.1–5 mL/min detectors อาจเลือกใช้ SPD-6A หรือ SPD-6AV หรือ Photodiode Array UV-VIS spectrophotometric Detector และอื่น ๆ เครื่องนี้สามารถทำ Automated Ternary Gradient Elution ได้

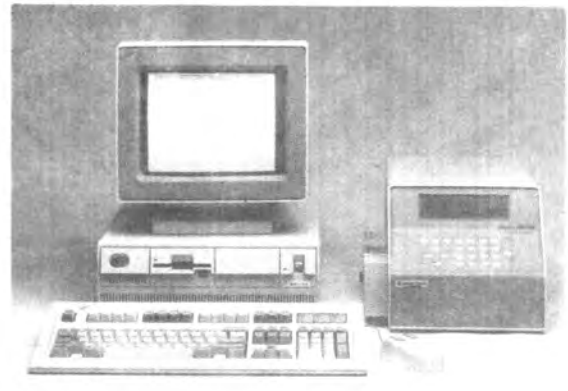


เครื่อง Liquid Chromatograph System ที่ใช้การแยกสารและเตรียมสารที่มีปริมาณมาก ซึ่งสามารถใช้ flow rate ได้ถึง 150 mL/min

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟที่ผลิตโดยบริษัทสเปกตราฟิสิกส์ (Spectra-Physics)

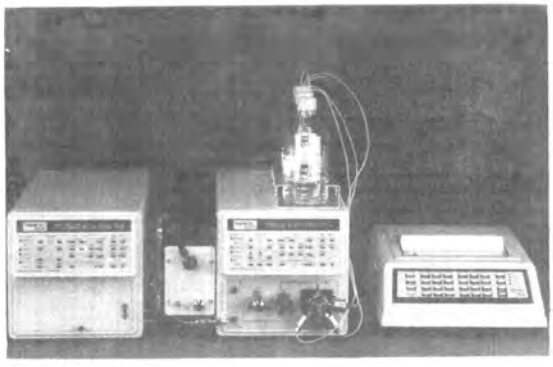
เครื่อง Chromatography Spectra-Physics Workstation ซึ่งสามารถทำได้ทั้ง isocratic และ gradient elutions โดยใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมและประมวลผล สามารถเลือกใช้ดีเทคเตอร์ต่าง ๆ ได้ และสามารถต่อเข้ากับ autosamplers ซึ่งรับประกัน 5 ปี

เครื่อง Autosampler สำหรับ LC สามารถใส่ได้ 80 ตัวอย่าง ปริมาตรของสารตัวอย่างใช้ 1–1.5 μL ให้ความเที่ยงดีกว่า 1%



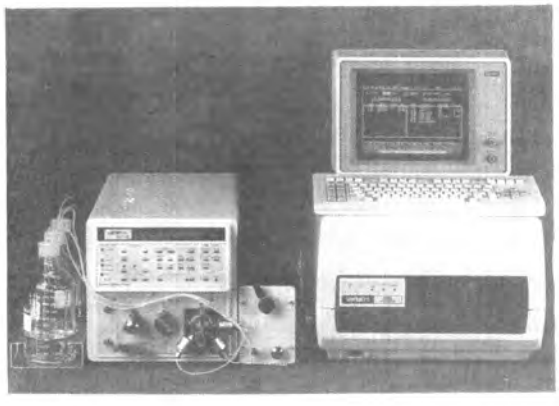
เครื่อง Spectra FOCUS สำหรับ UV-VIS detection system ใช้ระบบแสงพิเศษซึ่งเป็น low inertia scanning (LIS) และเป็น multi-wavelength diode array detection

เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟ ผลิตโดยบริษัท Varian (Varian LC Star System)

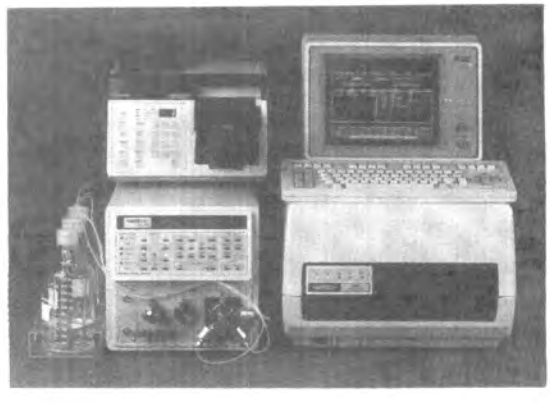


LC Star System ที่ประกอบด้วย Star 9010 Pump, Star 9050 UV/VIS Detector และ integrator

LC Star System ที่ประกอบด้วย Star 9010 Pump, Star 9050 UV/VIS Detector และ Star 9095 Auto-Sampler



LC Star System ที่ประกอบด้วย Star 9010 Pump และ Polychrom Diode Array Detector

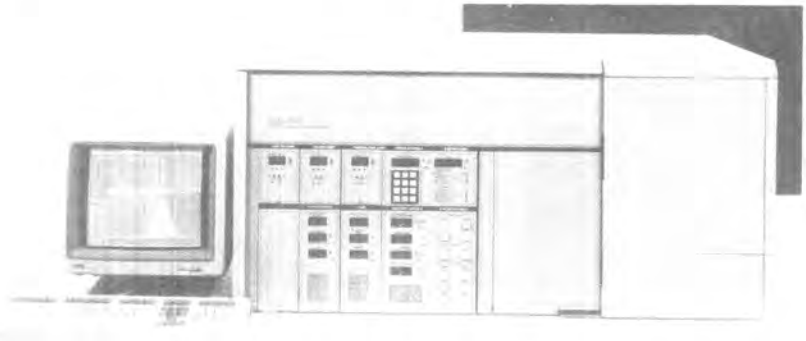


LC Star System ที่ประกอบด้วย Star 9010 Pump, 9065 Polychrom Diode Array Detector และ Advanced Automated Sample Processor (AASP)

เครื่อง HPLC และ HPLC ที่นำไปใช้ในการวิเคราะห์เฉพาะด้าน ซึ่งผลิตโดยบริษัท Waters

เครื่อง HPLC model Waters 484 ซึ่งประกอบด้วย gradient system และ NEC APC IV Powermate Computer สำหรับการควบคุมและประมวลผล detector สามารถเลือกใช้ได้ เครื่องนี้ออกแบบมาเพื่อใช้ในงานวิจัยและห้องปฏิบัติการวิจัย

เครื่อง Water Pico Tag Amino Acid Analysis System ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ทั้ง primary และ secondary amino acids, physiologic และ hydrolysate ที่ให้การแยก ความเที่ยง และสภาพไวสูง ทำการวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว



เครื่อง Gel Permeation Chromatograph, model Waters 150C, พร้อม 860 Networking Computer System ซึ่งสามารถปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ถึง 150°C ใช้ในการวิเคราะห์พอลิเมอร์ สามารถต่อเข้ากับ automatic injector

บรรณานุกรม

1. L.R. Snyder and J.J. Kirkland. "Introduction to Modern Liquid Chromatography" Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. N.Y. 1979.
2. R.W. Yost, L.S. Ettre and R.D. Conlon. "Practical Liquid Chromatography, An Introduction" Perkin-Elmer, 1980.
3. E.L. Johnson and R. Stevenson. "Basic Liquid Chromatography" Varian Associate, Inc., 1978.
4. S.B. Schram. "The LDC Basic Book on Liquid Chromatography" Milton Roy Company, 1980.
5. G.D. Christian and J.E. O'Reilly, "Instrumental Analysis" 2nd Edition, Allyn and Bacon, Inc., Boston, 1986.
6. R.D. Braun, "Introduction to Instrumental Analysis" Mc Graw-Hill Book Co., N.Y. 1987.
7. D.A. Skoog, "Principles of Instrumental Analysis" 3rd Edition, Saunders College Publishing, 1985.
8. R.J. Hamilton and P.A. Sewell, "Introduction to High Performance Liquid Chromatography" Chapman and Hall Ltd., London, 1977.