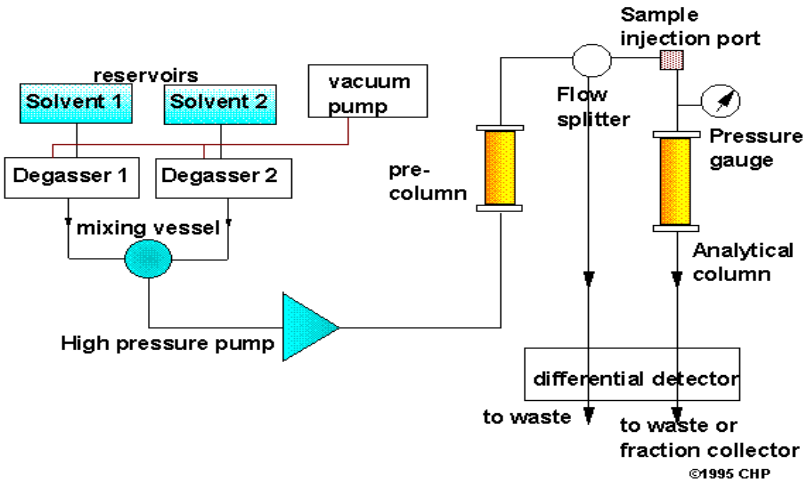
เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นริษรา ด่อนแผ้ว**

องค์ประกอบที่สำคัญของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



รูปที่ 1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในปัจจุบัน

(ที่มา: http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(High Performance Liquid Chromatography : HPLC) [1]

หลักการ

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว (distribution of partition) ของสารตัวอย่างในระหว่างสองวัฏภาค คือวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นแก๊ส (gas) หรือของเหลวกับอีกวัฏภาคหนึ่ง คือ วัฏภาคนิ่ง (stationary phase) อาจเป็นของเหลว หรือของแข็งที่ล้อมรอบวัสดุช่วยพยุง (inert support material)ที่บรรจุในคอลัมน์หรือเคลือบแผ่นกระจก (TLC)หรือเคลือบบนกระดาษ (paper chromatography) วัฏภาคนิ่งทำหน้าที่ในการแยกสาร หรือองค์ประกอบของสารตัวอย่างออกจากกัน ขึ้นกับความจำเพาะเจาะจงของสารตัวอย่างที่มีต่อวัฏภาคนิ่ง วัฏภาคเคลื่อนที่ทำหน้าที่ในการชะล้างหรือพาสารเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งขณะที่วัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่ง องค์ประกอบหรือสารชนิดต่างๆ ในสารตัวอย่างจะมีการเคลื่อนที่ผ่านเข้าและออกระหว่างวัฏภาคทั้งสองหลายๆ ครั้ง หรือมีการหน่วงเหนี่ยว (retention) ไว้ในวัฏภาคนิ่ง ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีขององค์ประกอบ หรือสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารตัวอย่างที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อวัฏภาคทั้งสองจากความแตกต่างนี้ ทำให้สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งในอัตราความเร็วที่แตกต่างกันทำให้มีการแยกเกิดขึ้น ระยะเวลาที่แต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่ง (retention time) หรือตำแหน่งของพีคที่ปรากฏบนโครมาโทแกรมสามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และพื้นที่ใต้พีค หรือความสูงของพีคใช้ประโยชน์ด้านวิเคราะห์เชิงปริมาณ

หลักการเบื้องต้นในการเลือกชนิดของโครมาโทกราฟี

(Principle of Chromatography Type Selection) [2]

หลักการเบื้องต้นโดยทั่วไปในการเลือกชนิดของโครมาโทกราฟี มีดังนี้คือ

คุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Sample Properties for Analysis)

ผู้วิเคราะห์ต้องทราบคุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์ก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้งเช่น ถ้าสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มีคุณสมบัติเป็นกลาง การเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีควรเลือกชนิดรีเวอร์สเฟส (reverse phase) หรือ โพลาร์บญอนดิดเฟส (polar bonded phase)ในขณะที่ถ้าสารละลายตัวอย่างมีคุณสมบัติเป็นกรดหรือด่างอาจเลือกใช้โครมาโทกราฟีชนิดรีเวอร์สเฟสหรือไอออนแพร์ (ion - pair) หรือ โพลาร์บอนดิดเฟสดังตารางที่ 1 ในกรณีสารละลายตัวอย่างเป็นกลุ่มพอลิเมอร์สังเคราะห์การเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีควรเลือกชนิดรีเวอร์สเฟสหรือไฮโดรโฟบิค-อินเตอร์แอคชัน (hydrophobic - interaction) หรือไอออนเอ็กซ์แชง (ion - exchange) หรือ

ไซซ์เอ็กซ์คลูชัน (size exclusion) สำหรับไครัลไอโซเมอร์ (chiral isomer) ควรเลือกชนิดโครมาโทกราฟีชนิดรีเวอร์สเฟส ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Dolan และ Snyder,1989)[3]

คุณสมบัติของสารละลายตัวอย่าง	ชนิดของโครมาโทกราฟี
กลาง	รีเวอร์สเฟสหรือ โพลาร์บอนดิดเฟส
กรดหรือด่าง	รีเวอร์สเฟสหรือ ไอออนแพร์หรือโพลาร์บอนดิดเฟส
พอลิเมอร์สังเคราะห์	ไซซ์เอ็กซ์คลูชัน
โปรตีน	รีเวอร์สเฟสหรือ ไฮโดร โฟบิคอินเตอร์แอคชันหรือ ไอออนเอ็กซ์แชงหรือไซซ์เอ็กซ์คลูชัน
ไครัล ไอโซเมอร์	รีเวอร์สเฟสหรือนอร์มัลเฟส

การหาสภาวะที่เหมาะสมของโครมาโทกราฟี (Determination of Chromatography Optimum Condition)

หลังจากเลือกชนิดโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงได้แล้ว ผู้วิเคราะห์ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับโครมาโทกราฟีที่ได้เลือกมากับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ดังในตารางที่ 2

หลักการโดยทั่วไปในการใช้วัฏภาคไหลกับโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงชนิดรีเวอร์สเฟส คือ

1) ใช้วัฏภาคไหลแอซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) 100 %
2) ถ้าได้ค่าแฟกเตอร์ความจุ (capacity factor, k') สูงให้เปลี่ยนเป็นโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดนอร์มัลเฟส แต่ถ้าได้ค่าแฟกเตอร์ความจุต่ำให้ปรับด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ค่าแฟกเตอร์ความจุอยู่ระหว่าง 1 ถึง 20 แล้วบันทึกค่าแอซีโตไนไตรล์ที่ใช้ไว้
3) กรณีสารละลายตัวอย่างสามารถแยกออกจากกันได้ แต่ได้พีคที่มีหาง (tailing peak) ให้เติมไตรเอทิลลามีนแอซีเซต (triethylamine acetate) 30 มิลลิโมลาร์ (mM) ลงไปในวัฏภาคไหล ส่วนในกรณีสารละลายตัวอย่างไม่สามารถแยกออกจากกันได้ให้เปลี่ยนจากแอซีโตไนไตรล์ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็นเมทานอล (methanol) ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ โดยให้มีค่าความแรงของสารละลายเท่าเดิม
4) ถ้าสารละลายตัวอย่างยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้ให้เปลี่ยนวัฏภาคไหลจากเมทานอลในน้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็นเมทานอลในแอซีโตไนไตรล์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เมื่อสังเกตเห็นว่าพีคเริ่มแยกออกจากกันให้เปลี่ยนสัดส่วนเมทานอลในแอซีโตไนไตรล์ใหม่จนสาละลายตัวอย่างแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์

5) ถ้าสารละลายตัวอย่างไม่สามารถแยกออกจากกันได้ให้เปลี่ยนวัฏภาคไหลจากเมทานอลในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ในข้อ3) เป็นเททระไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran,THF) ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์โดยให้มีค่าความแรงของสารละลายเท่าเดิม เมื่อสังเกตเห็นว่าพีคเริ่มแยกออกจากกันให้เปลี่ยนวัฏภาคการไหลจากเททระไฮโดรฟูแรนในน้ำกลั่นบริสุทธิ์เป็นเททระไฮโดรฟูแรนในเมทานอลในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร

6) ถ้าสารละลายตัวอย่างไม่สามารถแยกออกจากกันได้ให้เปลี่ยนวัฏภาคไหลเป็นแอซีโตไนไตรล์ในเททระไฮโดรฟูแรนต่อน้ำกลั่นบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

7) ถ้าสารละลายตัวอย่างไม่สามารถแยกออกจากกันได้ให้เปลี่ยนวัฏภาคไหลเป็นแอซีโตไนไตรล์ในเมทานอลต่อเททระไฮโดรฟูแรนต่อน้ำกลั่นบริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยปริมาตร

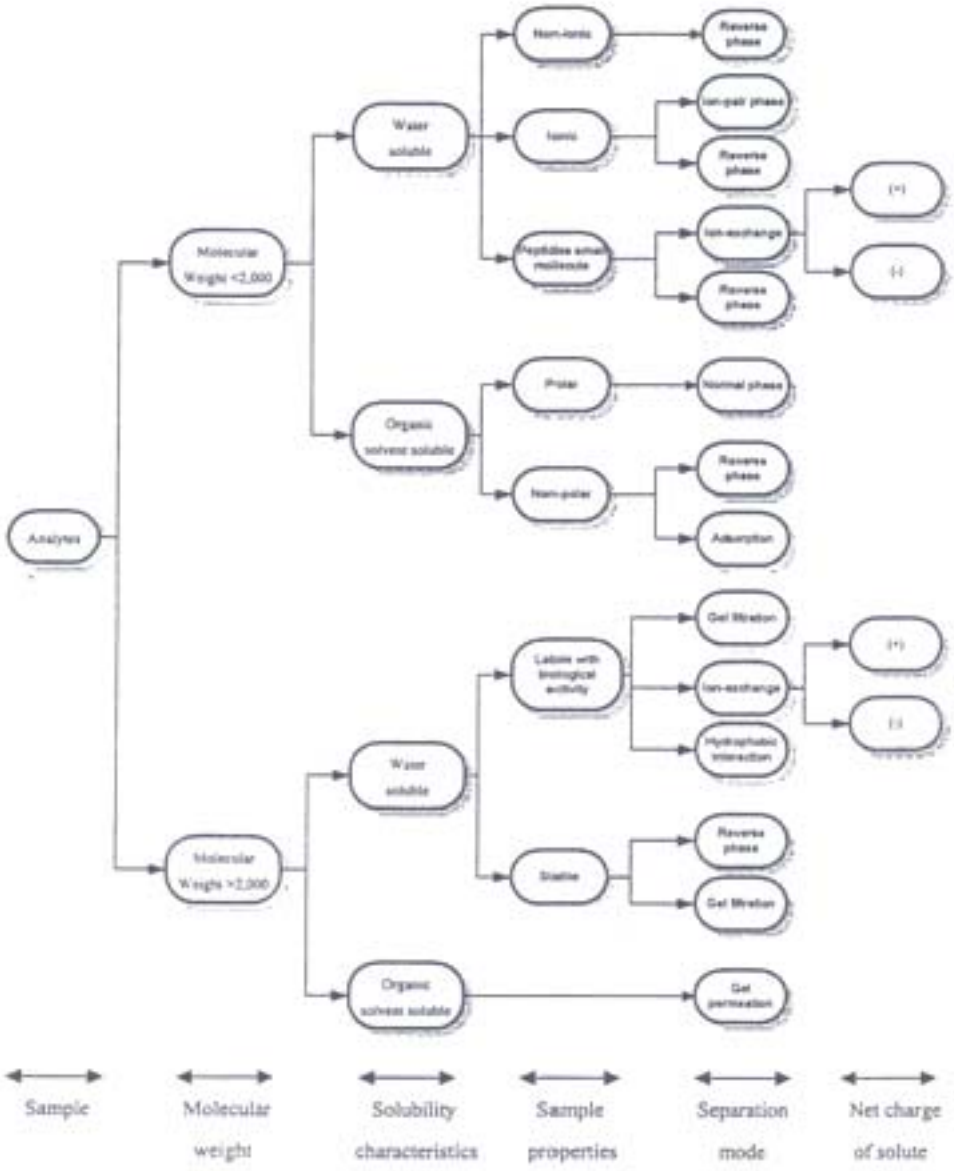
8) ถ้าสารละลายตัวอย่างไม่สามารถแยกออกจากกันได้ให้เปลี่ยนเป็นโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดอื่นแทนรีเวอร์สเฟส

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับโครมาโทกราฟีที่เลือกวัฏภาคการไหล (Snyderและ Kirkland,1979)[5]

วิธี	คอลัมน์	วัฏภาคไหล	สภาวะที่เลือก
รีเวอร์สเฟส	C_{18}, C_8 ฟีนิล (phenyl) ไตรเมทิล ไซลิล (trimethyl silyl) ไซยาโน (cyano)	น้ำ/สารละลายอินทรีย์	เลือกสารที่เป็นกลางหรือ ไม่แตกตัวซึ่งละลายได้ในน้ำหรือในสารผสมอินทรีย์ในน้ำ
ไอออนแพร์	ไซยาโน (cyano)	น้ำ/สารละลายอินทรีย์บัฟเฟอร์ควบคุมพิเศษ	เลือกสารที่สามารถแตกตัวได้โดยเฉพาะด่างหรือแคตไอออน (cation) เมื่อใช้รีเวอร์สเฟสและไอออนแพร์ไม่ได้ผล สามารถนำมาเป็นทางเลือกในการแยกสารละลายตัวอย่างได้ ซึ่งใช้สำหรับสารละลายตัวอย่างได้ ซึ่งสำหรับสารละลายตัวอย่างที่ไม่ละลายในน้ำหรือสารผสมอินทรีย์ในน้ำ

ในทางปฏิบัติผู้วิเคราะห์สามารถเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีและสภาวะในการวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างได้จากผู้ที่เคยทำการทดลองมาแล้วแต่ถ้าผู้วิเคราะห์ไม่สามารถเลือกสภาวะในการวิเคราะห์

ได้รูปที่ 2 สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างได้



รูปที่ 2 แนวทางในการเลือกโครมาโทกราฟีของสารละลายตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ (Matissek และ Wittkowski,1993)[4]

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่าการได้โครมาโทแกรมที่ดี ซึ่งสามารถแยกสารละลายตัวอย่างออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ดังนั้นผู้วิเคราะห์ควรศึกษารายละเอียดดังต่อไปนี้ให้เหมาะสมกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกก่อนตัดสินใจเลือกซื้อคอลัมน์และลงมือทำการทดลอง เช่น ชนิดของวัฏภาคนิ่งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารละลาย

ตัวอย่างที่ต้องการแยก เลือกความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ที่ใช้ให้เหมาะสมกับงานวิเคราะห์ เลือกชนิดของวัฏภาคไหลที่ใช้ให้เหมาะสมกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการแยก เลือกอัตราการไหลของวัฏภาคไหลให้เหมาะสมกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการแยก เลือกขนาดและความยาวของท่อเหล็กกล้าไร้สนิมที่ต่อในระบบโครมาโทกราฟีให้เหมาะสม เลือกควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสารละลายตัวอย่าง เลือกชนิดของตัวตรวจวัดที่ใช้ให้เหมาะสมกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณของสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในคอลัมน์ให้เหมาะสมกับงานวิเคราะห์เป็นต้น

การเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีเป็นหัวใจสำคัญที่ทำให้งานวิเคราะห์ที่ได้ประสบผลสำเร็จและมีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้นเพื่อได้โครมาโทแกรมที่มีอำนาจการแยกที่สมบูรณ์อย่างไรก็ตามไม่ใช่เรื่องง่ายที่จะได้โครมาโทแกรมดังกล่าวแต่ก็มีแนวทางที่ผู้วิเคราะห์สามารถใช้เป็นหลักเบื้องต้นในการเลือกชนิดของโครมาโทกราฟีเพื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่จะให้ได้โครมาโทแกรมที่ดีขึ้น ซึ่งข้าพเจ้าคิดว่าข้อมูลที่ข้าพเจ้ารวบรวมขึ้นมานี้อาจจะเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลในการเลือกวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ท่านจะทำการวิเคราะห์ไม่มากก็น้อย

***นางสาวนริษรา ค่อนแผ้ว*
เจ้าหน้าที่ปฏิบัติการช่างเทคนิคเคมี - สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

เอกสารอ้างอิง

(1) แม้น อมรสิทธิ์และอมร เพชรสม. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์,2534.

(2) พัฒนา เหล่าไพบูลย์. **โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง: หลักการและการประยุกต์ใช้.** คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น,2547

(3) Dolan, J. W. and Snyder, L. R. (1989) **Troubleshooting LC systems**. New Jersey : Humana Press.

(4) Matissek, R. and Wittkowski, R. (1993) **High Performance liquid Chhromatography in Food Control and Research**. Lancaster : Technomic Publishing.

(5) Snyder, L. R. and Kirkland, J. J. (1979) **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2nd edn. New York : John Wiley & Sons, Inc.