

ภาคผนวก ง

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์

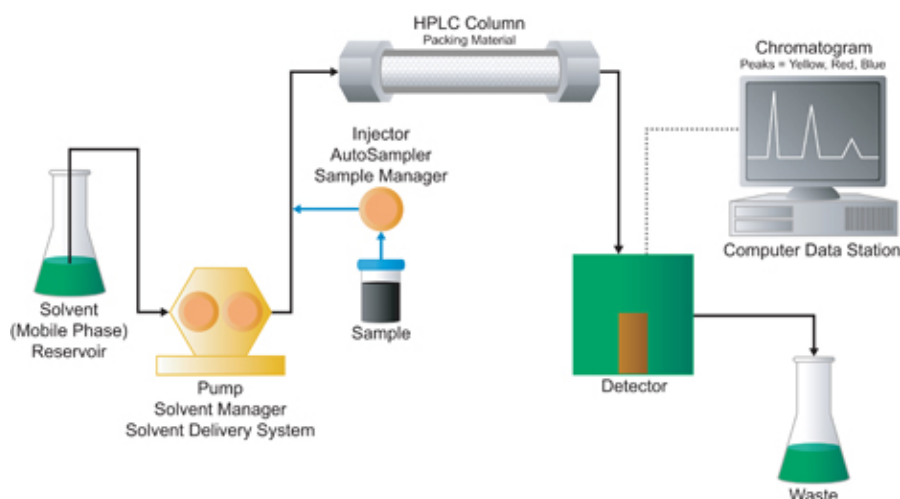
เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

เทคนิค HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ทั้งในรูปโมเลกุลและไอออน สามารถวิเคราะห์สารโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยสารที่วิเคราะห์ต้องสามารถละลายได้ในสารละลายตัวชะ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางด้านต่างๆ เช่น ด้านผลิตภัณฑ์ยา ด้านชีวเคมี ผลิตภัณฑ์อาหาร เคมีภัณฑ์ ด้านสิ่งแวดล้อม สารพิษตกค้าง สารเสพติด และด้านการตรวจทางคลินิก เป็นต้น

หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือที่นิยมเรียกกันว่า HPLC เป็นวิธีที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ผสมกันได้พร้อมกัน ในการวิเคราะห์ต้องสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์สารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เข้าเครื่องตรวจวัดตามลำดับดังภาพผนวก 8

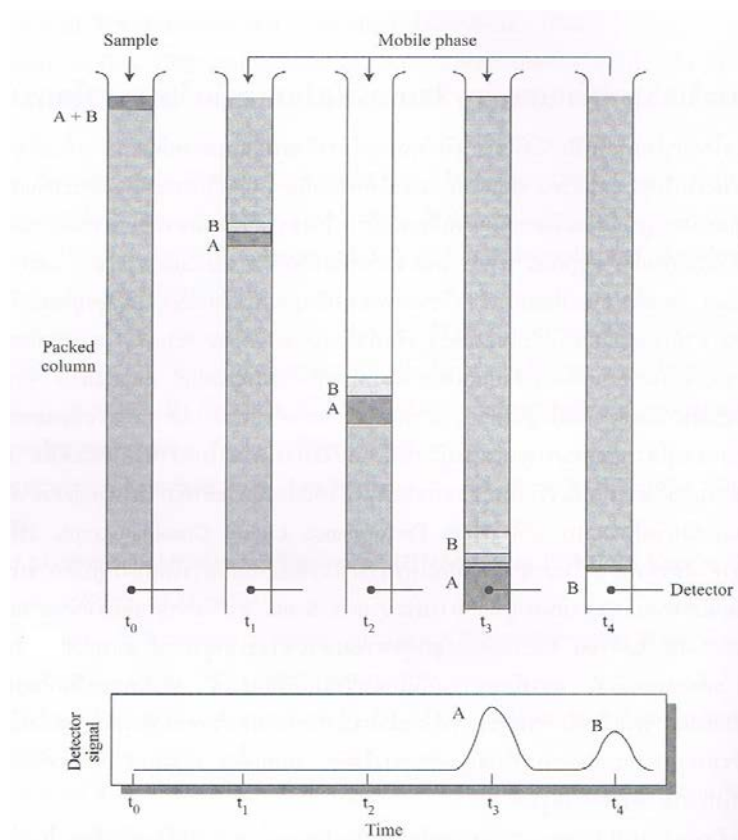


ภาพผนวก 8 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

ที่มา: จีรนนท์ (2555)

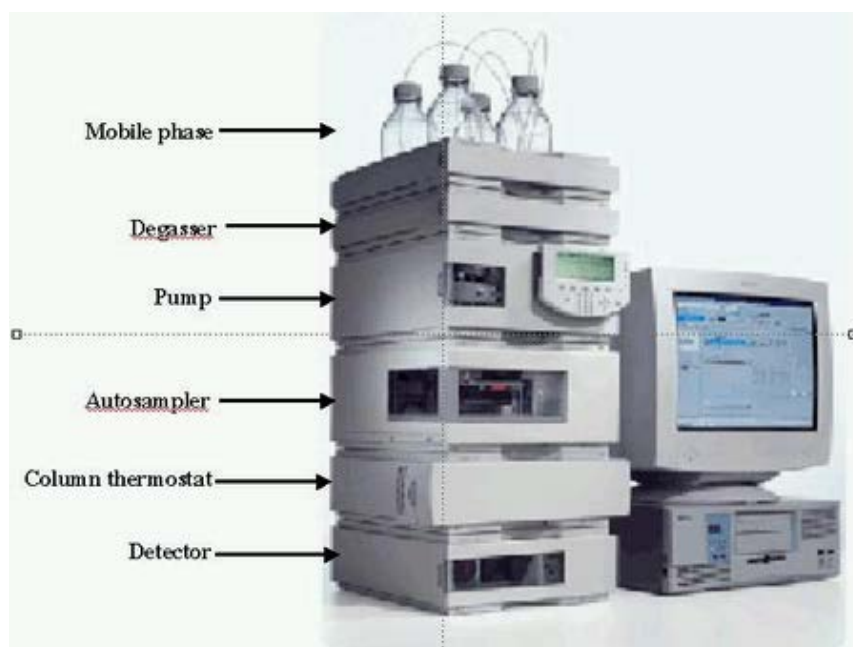
สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้หากเกิด differential sorption ระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสนิ่ง (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยเฟสที่นิ่งเป็นของแข็งหรือของเหลวเคลือบอยู่บนของแข็งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลวเรียกว่า สารละลายตัวชะ

(eluent) สารผสมเคลื่อนที่ผ่านเฟสหนึ่งโดยการนำพาของเฟสเคลื่อนที่ด้วยเส้นทางที่แตกต่างกัน (differential migration) ซึ่งเป็นผลจากการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดที่อยู่ในตัวอย่างบนเฟสหนึ่งแตกต่างกันทำให้สารแต่ละชนิดแยกจากกันได้ (ภาพผนวก 9) การใช้เครื่อง HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้ในปริมาณต่ำระดับไมโครกรัมถึงนาโนกรัม สำหรับการวิเคราะห์สารแต่ละชนิดต้องเลือกใช้คอลัมน์ สารละลายตัวชะ และดีเทกเตอร์ให้เหมาะสม ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่องมีปริมาตรต่ำระดับไมโครลิตร พร้อมทั้งสามารถประมวลผลข้อมูลโดยคอมพิวเตอร์ทำให้ได้ข้อมูลครบถ้วน สำหรับการหาปริมาณ การควบคุมคุณภาพ การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบและอาจรวมถึงการประเมินความเหมาะสมของวิธีทดสอบ (แม่นั และคณะ, 2553)



ภาพผนวก 9 การเคลื่อนที่ของสาร 2 ชนิดในเฟสหนึ่งและออกจากเฟสหนึ่งในเวลาที่ต่างกัน
ที่มา : Skoog *et al.* (1998)

อุปกรณ์สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
 เครื่อง HPLC มีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้ (ภาพผนวก 10)



ภาพผนวก 10 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC
 ที่มา: จิรนนท์ (2555)

1. เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือคอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

2. ดีแกสเซอร์ (degasser)

ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector

3. ปั๊ม (pump)

ปั๊มจะทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาด

อนุภาคเล็กมากจึงทำให้เกิดความต้านทานในการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

4. อินเจกเตอร์ (injector)

ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC สำหรับ HPLC รุ่น Agilent 1100 เป็นระบบฉีดแบบอัตโนมัติ

5. คอลัมน์ (column)

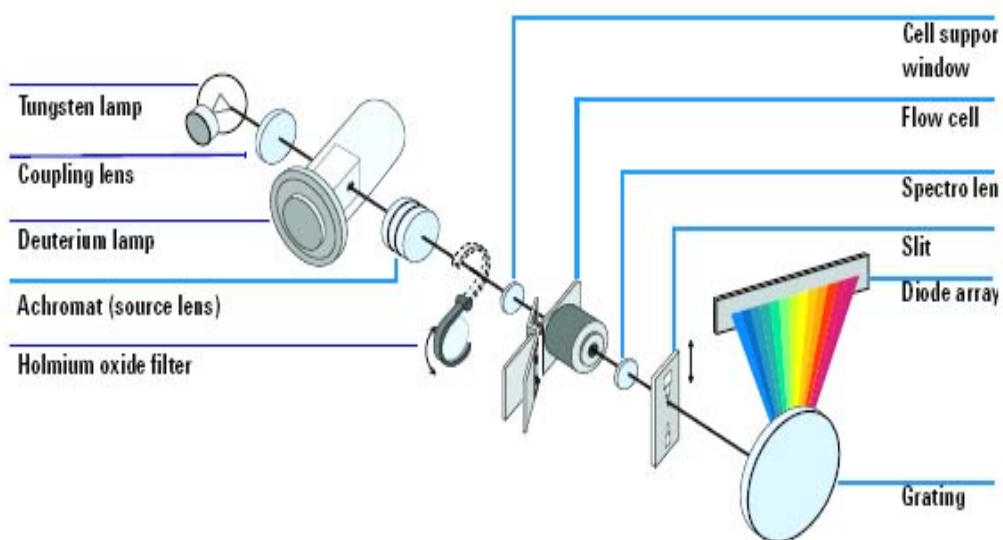
คอลัมน์หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase แต่สำหรับ HPLC รุ่น Agilent 1100 มีอุปกรณ์เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์จึงเรียกว่า column thermostat สิ่งสำคัญที่สุดอย่างหนึ่งที่ทำให้ผลการวิเคราะห์ออกมาดีหรือไม่คือคอลัมน์ที่ใช้ในการแยกสาร ปัจจุบันวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์เพื่อการแยก (packing materials) ยังมีการพัฒนาไปเรื่อยๆ เพื่อให้ได้คอลัมน์ที่เหมาะสมกับงานต่างๆ ได้ดีที่สุด ความรู้เรื่องการพัฒนา packing materials จะช่วยให้นักวิเคราะห์เลือกใช้ชนิดของคอลัมน์ได้เหมาะสมกับงาน

6. ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector)

ตัวตรวจวัดสัญญาณทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ detector ชนิดไหนได้ดี การทำงานของตัววัดสัญญาณในเทคนิค HPLC นั้น มีหลักการคือเมื่อเฟสเคลื่อนที่ผ่านสารตัวอย่าง หรือจะสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์จะเข้าสู่ตัว detector output ที่อ่านได้จากตัว detector แล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟ (electrical signal) ซึ่งจะแปรตามคุณสมบัติบางประการของเฟสที่เคลื่อนที่หรือของสารตัวอย่างได้

diode array detector (DAD) เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกันและวัดได้ตั้งแต่ 190-850 นาโนเมตร ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง reverse optics คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสง light source จะผ่านไปยัง flow cell ก่อนที่จะผ่านไปยัง monochromator คือ slit และ grating เมื่อแสงตกกระทบบน grating แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของ diode array ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม diode array detector สามารถเก็บข้อมูล

spectrum ของฟลักต่างๆ ของโครมาโทแกรมได้ด้วย ตัวอย่างที่เหมาะสมกับ detector นี้ต้องเป็นตัวอย่างที่สามารถดูดกลืนแสงได้ (ภาพผนวก 11)



ภาพผนวก 11 เครื่องตรวจวัดสัญญาณชนิด diode array detector (DAD)
ที่มา: NMSU (2006)