ภาคผนวก

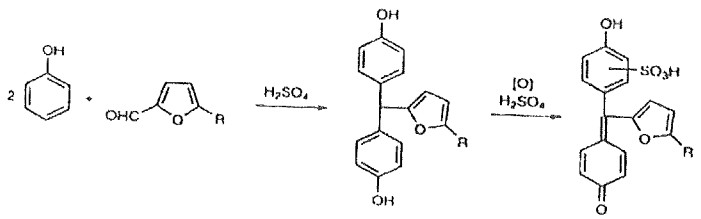
ภาคผนวก 1

การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol – sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีการนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ใน ช่วง 1 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮ เดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้

1.1 หลักการของปฏิกริยา (Schrerz and Bonn, 1998)

น้ำตาล monosaccharide, disaccharide, oligosaccharide และ polysaccharide ทำปฏิกริยากับฟีนอลและกรดซัลฟูริคเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสารที่มีความสามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 480 – 490 นาโนเมตร สำหรับกลไกปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และน้ำตาล polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเทอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกริยาขจัดน้ำออก ที่แทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triaylmethane dyes)



รูปที่ ผ.1 ปฏิกริยาระหว่างฟีนอลและคาร์โบไฮเดรต(ฟรุคโตส) ในกรดซัลฟิวริคเข้มข้นได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่มีสีส้มของสาร triaylmethane dyes (Schrerz and Bonn, 1998)

1.2 สารเคมี

1) สารละลายฟีนอล 5 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกฟีนอล 5 กรัมใน

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2) กรดซัลฟูริคเข้มข้น

3) สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

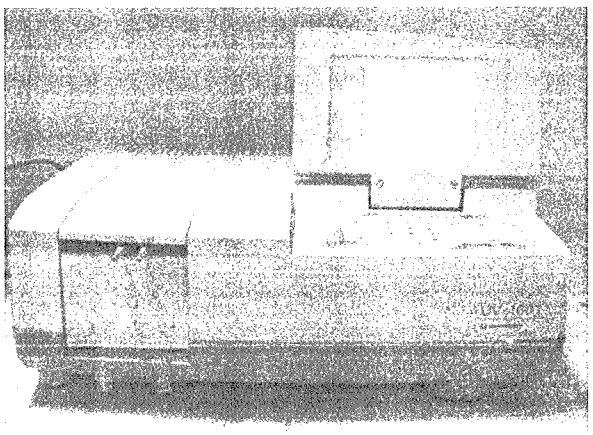
1.3 วิธีวิเคราะห์

1) ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำกับสารไร้ตัวอย่าง (blank) ด้วยโดยการใช้น้ำกลั่นปริมาณเท่ากันแทนตัวอย่าง

2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน

3) เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้น ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

4) นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ ผ.2 เครื่อง UV – Vis spectrophotometer ที่ใช้ในการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของสารละลาย

1.4 ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

1) ค่าที่ได้ไม่แน่นอน แก้ไขโดยพยายามควบคุมการทดลองให้เหมือนๆ กันทุกครั้ง ซึ่ง

ต้องไปปรับวิธีการตามความเหมาะสม และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำควรทำการทดลองซ้ำ และควรมีการทำชุดสารละลายมาตรฐานควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

2) กรดเข้มข้นละลายน้ำแล้วคายความร้อน จะมีอุณหภูมิสูง และมีฤทธิ์กัดกร่อนควรทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง

1.5 การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัม/ลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสง } (OD_{490}) \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \frac{1}{\text{การเจือจาง}}$$

โดย ความชัน = ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

และการเจือจาง = ค่าเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

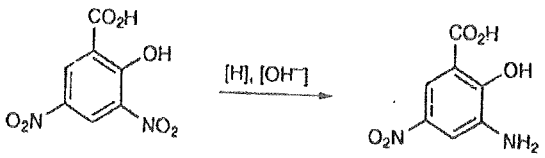
ภาคผนวก 2

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง 5 – 500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

2.1 หลักการทางปฏิกริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด่างที่มีกรดไนโตรซาลิไซลิก ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนรูปไปเป็นสารที่มีสีเข้มขึ้น ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 – 550 นาโนเมตร ปฏิกริยานี้จะไม่หยุดจนกว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์หมด เชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเป็นสีของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid



รูปที่ ผ.3 ปฏิกริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์และสาร 3,5-dinitrosalicylic acid ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเข้มของ 3- amino-5-nitrosalicylic acid (Scherz and Bonn, 1998)

2.2 สารเคมี

1) 2 N NaOH 50 มิลลิลิตร (เตรียมโดยละลาย NaOH ปริมาณ 4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

2) DNS solution เตรียมโดยละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 2.5 กรัม ใน 50 มิลลิลิตร ของ 2 N NaOH เติม sodium potassium tartrate (Rochelle salt) ลงไป 75 กรัม และคนจนกระทั่งสารละลายทั้งหมด จึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ได้นานหลายสัปดาห์

2.3 วิธีวิเคราะห์

1) ดูดตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองสำหรับหลอดที่ไม่มีสารตัวอย่าง (blank) ใช้น้ำกลั่น

2) เติม DNS solution ลงไปในแต่ละหลอด ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที

4) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง

5) เติมน้ำให้ครบ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6) นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

2.4 ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในการวิเคราะห์และแนวทางแก้ไข

1) ได้ค่าการดูดกลืนแสงไม่แน่นอนในการวัดแต่ละครั้ง อาจจะเกิดจากความร้อนที่ให้ไม่สม่ำเสมอ แก้ไขโดยการใช้เวลามากเกินพอจุดสมดุล และเพื่อให้ได้ค่าที่แม่นยำมากขึ้นควรทำชุดน้ำตาลความเข้มข้นมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

2) ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Mn, Co และ Ca จะเพิ่มปฏิกริยาในการวิเคราะห์นี้ได้

3) วิธีการนี้ไม่เหมาะกับสารตัวอย่างที่มีความเป็นกรดมาก

ภาคผนวก 3

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธีแก๊สโครโมโตกราฟี

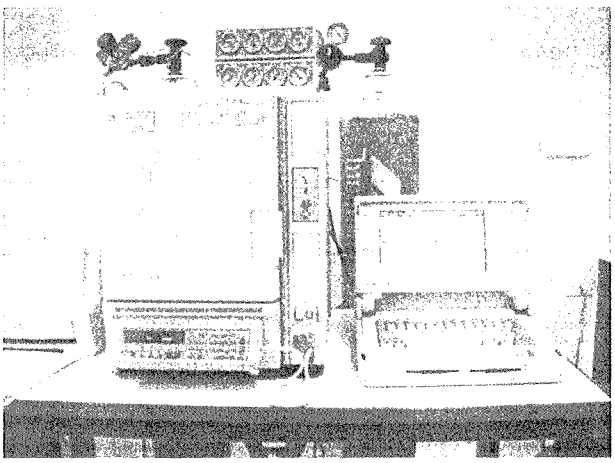
(Gas Chromatography method)

3.1 หลักการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นมักวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี แก๊สโครมาโตกราฟีประกอบด้วยคอลัมน์ ที่สามารถดูดซับเอทานอลหรือแอลกอฮอล์อื่นๆได้ ภายใต้อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สนำพา (ไนโตรเจน) ที่เหมาะสม กล่องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ตั้งค่าไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส และอัตราไหลของก๊าซนำพาตั้งไว้ที่ 30 มิลลิเมตรต่อนาที

สารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์ด้วยไมโครไซริง (microsyringe) อย่างรวดเร็ว ตัวอย่างจะระเหยกลายเป็นไอทันที และถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งในคอลัมน์นี้แอลกอฮอล์จะถูกแยกออกจากองค์ประกอบอื่นๆ เมื่อระเหยออกจากคอลัมน์จะเข้าสู่เครื่องตรวจวัด จากนั้นเครื่องตรวจวัดจะส่งสัญญาณไปที่เครื่องบันทึกข้อมูล ซึ่งแสดงข้อมูลที่ได้ออกมาเป็นพีค (peak) โดยพื้นที่ใต้พีคนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป

เนื่องจากเป็นการยากที่จะฉีดสารตัวอย่างปริมาตรน้อยๆได้ถูกต้องและแม่นยำ และพื้นที่ใต้พีคจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรที่ฉีดเข้าไปด้วย ดังนั้นจึงมักมีการผสมสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปในตัวอย่างด้วย เมื่อสารมาตรฐานที่เติมลงไปมีความเข้มข้นคงที่และเท่ากันทุกตัวอย่าง ดังนั้นการหาค่าความเข้มข้นของเอทานอลจะใช้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเอทานอล และสารละลายมาตรฐาน ด้วยวิธีการนี้การวิเคราะห์จึงไม่ขึ้นกับปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป



รูปที่ ผ.4 เครื่อง Gas chromatography ในการวิเคราะห์เอทานอล

3.2 วิธีการ

1) นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 rpm เก็บส่วนใส (supernatant)ไว้วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

2) นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้มา 200 ไมโครลิตร เติม n-propanol ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน (internal standard) ลงไปด้วยปริมาตรที่แน่นอน 200 ไมโครลิตร

3) ฉีดสารตัวอย่างที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

4) หลังจากฉีดตัวอย่างเข้าไปแล้วประมาณ 15 นาที เครื่องอินทิเกรเตอร์ (integrator) จะแสดงพีคของเอทานอลออกมาก่อนตามด้วยพีคของ n-propanol โดยเวลาชะ (retention time) ของเอทานอลและ n-propanol มีค่าประมาณ 5.5 และ 10.7 นาที ตามลำดับ เครื่องอินทิเกรเตอร์จะคำนวณพื้นที่ใต้พีคออกมาให้โดยอัตโนมัติ จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนพื้นที่ใต้ยอดเอทานอลต่อ n-propanol แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)

5) ในแต่ละตัวอย่างทำซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นเอทานอล

6) ก่อนจะฉีดตัวอย่างต่อไปควรรอประมาณ 15 นาที หลังจากที่พีคที่สองออกมาแล้ว เพื่อเป็นการไล่สารที่อาจตกค้างอยู่ในคอลัมน์ออกให้หมด

ภาคผนวก 4

การวัดการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Microscopic count โดยใช้ Heamacytometer

4.1 บทนำ

Heamacytometer เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือดแดงแต่ได้นับมาประยุกต์ในการนับจำนวนจุลิทรีย์และสปอร์ของรา เครื่องมือนี้เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบยกสูงจากบริเวณขีดเมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกปิดสไลด์ ในบริเวณที่ขีดคิดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้ มีขีดแบ่งเป็นช่องเล็กอีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ ผ.5) ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 (0.05x0.05x0.1) ลูกบาศก์มิลลิลิตร เครื่องมือนี้จะมีกระจกปิดสไลด์ซึ่งมีขนาดและความหนาเฉพาะ ไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่นแทน เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์กับกระจกผิดไปได้ และเมื่อใช้กระจกที่หนา จะเป็นอุปสรรคต่อการโฟกัสกล้อง

4.2 ข้อกำหนดของความถูกต้องแม่นยำ

ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ควรเจือจางให้อยู่ในระดับที่สามารถตรวจนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องใหญ่ (16 ช่องเล็กภายใน) ได้ในระหว่าง 10 – 50 เซลล์ ทำการนับในช่องใหญ่นี้เป็นจำนวน 5 ช่อง (บริเวณหัวมุม 4 ช่อง และตรงกลาง 1 ช่อง) แล้วนำค่ามาเฉลี่ย

4.3 การตรวจนับ

1) ล้างเครื่องมือให้สะอาด เช็ดให้แห้ง

2) ปิดทับบริเวณสีเหลี่ยมซึ่งมีช่องแบ่งด้วยกระจกปิดสไลด์

3) ใช้ปิเปตและลูกยางดูดตัวอย่าง แตะปลายปิเปตด้านแหลมที่มีช่องว่างระหว่างสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ ค่อยปล่อยตัวอย่างให้ซึมเข้าไปในบริเวณช่อง ซึ่งกำหนดปริมาตรดังกล่าวไว้ข้างต้น

4) ตรวจนับโดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 40 เท่า

5) นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็ก ควรตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 5 ช่องใหญ่ (16 ช่องเล็ก) โดยจำนวนเซลล์ในแต่ละช่องควรมีค่าอยู่ระหว่าง 10 – 50 เซลล์

4.4 การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

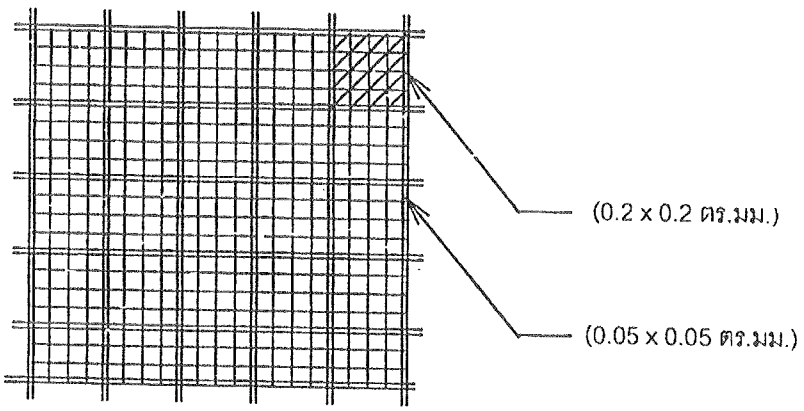
รวมจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้จากแต่ละช่องใหญ่ จะได้ X เซลล์ต่อช่อง (ควรได้ 10 – 50 เซลล์)

คำนวณจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ได้ดังนี้

การตรวจนับจาก 5 ช่องใหญ่ (มี 16 ช่องเล็กภายใน)

ตัวอย่าง ที่มีปริมาตร 1/5 มิลลิลิตร (กว้าง) x 1/5 มิลลิลิตร (ยาว) x 1/10 มิลลิลิตร (สูง) x 5 (ช่อง) ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = X เซลล์

= X x 5 x (10^4) x dilution factor (ค่าที่เจือจางเชื้อ) เซลล์ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ผ.5 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์ (บริเวณแรงเงาเป็นบริเวณ 1 ช่องใหญ่ ที่มี 16 ช่องเล็กภายใน)

ภาคผนวก 5

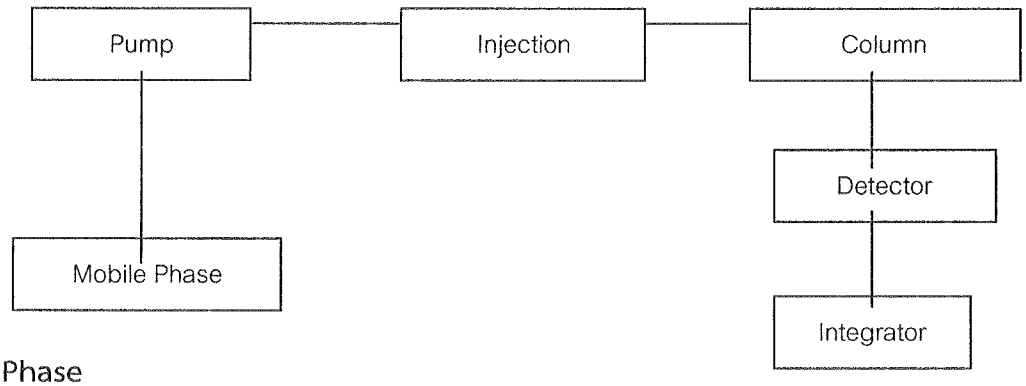
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส โดยใช้โครมาโตกราฟี่ของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

5.1 หลักการทำงานของเครื่อง HPLC

HPLC เป็นโครมาโตกราฟี่ของเหลว (Liqiud chromatography) ชนิดหนึ่งที่พัฒนามาจากโครมาโตกราฟี่ของเหลวแบบธรรมดาซึ่งใช้คอลัมน์ขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1 -10 เซนติเมตร ยาว 10 – 100 เซนติเมตร ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยเฟสนิ่งขนาดใหญ่ (220 – 250 ไมครอน) เมื่อนำมาแยกสารผสมต้องชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ซึ่งเฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ตามแรงโน้มถ่วงของโลกทำให้การแยกไม่สมบูรณ์คือมีรีโซลูชั่นต่ำ การปริมาณวิเคราะห์จึงทำให้ผลที่ได้ไม่แน่นอน และใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานมากดังนั้นจำมีการปรับปรุงโดยการออกแบบ packing material ให้มีประสิทธิภาพสูงและใช้ความดันถึง 5000 psi เพื่อให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นจึงทำให้ HPLC มีประสิทธิภาพสูงขึ้นผลมีความถูกต้องสูง มีความไวสูง และสามารถให้รีโซลูชั่นดีมากในสภาพที่เหมาะสม

ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่อง HPLC

ส่วนประกอบสำคัญดังนี้



Mobile Phase

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ 60 % Methanol ซึ่งมีหน้าที่แยกสารละลายตัวอย่าง เฟสเคลื่อนที่ที่ดีต้องมีอัตราส่วนผสมของสารที่ใช้เป็นเฟสอยู่นิ่ง ที่ไม่มีตะกอนและไม่มีฟองอากาศละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ทั้งสิ้นดังนั้นเฟสเคลื่อนที่จะต้องถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอนทุกครั้งก่อนใช้งานเพื่อกำจัดตะกอน มิฉะนั้นจะทำให้เกิดการอุดตันในระบบได้ซึ่งมีผลทำให้ความดันสูงผิดปกติ และเป็นอันตรายต่อคอลัมน์

Pump

ปั๊มคือหัวใจสำคัญของโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง ปั๊มที่ใช้ในระบบนี้ต้องทำจากวัสดุที่ทนต่อสารเคมีและการกัดกร่อนได้ดี โดยปกติปั๊มมักทำจากเหล็กกล้าและสนิมส่วนซีลที่ใช้ในข้อต่อต่างๆ ต้องทำจากเทฟลอน ลูกสูบและลูกบอลที่ตำแหน่งอินเล็ตเซควาล์วและเอ้าท์เล็ตเซควาล์ว ทำด้วยแซฟไฟร์ โดยทั่วไปแรงดันสูงสุดที่ปั๊มทำงานได้อยู่ที่ 5000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ปั๊มโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูงนี้ต้องปราศจากการเต้นหรือมีพัลซแดมเพอร์ ติดอยู่กับตัวปั๊มเพื่อให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่สม่ำเสมอตลอดเวลาการวิเคราะห์และไม่ส่งผลให้เกิดสัญญาณรบกวนต่อตัวตรวจวัด อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ปั๊มสามารถควบคุมได้มีค่าตั้งแต่ 0.01 – 10.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับใช้ในงานวิเคราะห์หรืออาจสูงถึง 100 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ปั๊มที่โครมาโทรกราฟีแบบของเหลวและแรงดันสูงนั้นถ้าตัวปั๊มสามารถควบคุมการไหลของเฟสเครื่อนที่เพียงชนิดเดียว จะเรียกว่า ไอโซเคติก ในขณะที่ถ้าตัวปั๊มสามารถควบคุมการไหลของโมบายเฟสได้ครั้งละมากกว่า 1 ชนิด จะเรียกว่า เรเดียนปั๊ม ปั๊มชนิดนี้มีราคาสูงกว่า ไอโซเคติกปั๊มและมีประโยชน์ในกรณีที่ต้องการแยกสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันมากๆออกจากกัน

Injecter

การนำสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เป็นสิ่งที่ต้องพิจารณาเป็นพิเศษเนื่องจากการนำสารละลายตัวอย่างเข้าที่ตำแหน่งคอลัมน์ไม่คงที่จะเป็นสาเหตุทำให้สารละลายตัวอย่างเกิดการกระจายตัวที่ตำแหน่งอินเจคเตอร์และส่งผลให้เกิดการกระจายตัวของแถบและสูญเสียอำนาจในการแยกในโครมาโทรแกรมอินเจคเตอร์ที่ใช้ในระบบโครมาโทรกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูงมีอยู่ 2 แบบ ด้วยกัน คือแบบออนคอลัมน์อินเจคชัน และแบบอินเจคชันวาวล์

Column

คอลัมน์เป็นหัวใจสำคัญของโครมาโตกราฟี คอลัมน์แต่ละชนิดมีความสามารถมีในการแยกสารชนิดต่างๆออกจากกันได้แต่ไม่มีคอลัมน์อันใดอันหนึ่งที่สามารถแยกสารทุกชนิดได้ในเวลาเดียวกันดังนั้นการแยกสารละลายตัวอย่างที่ผู้วิเคราะห์ต้องการวิเคราะห์ให้ได้ผลการวิเคราะห์ออกมาดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์และวิธีการบรรจุสำหรับวัสดุที่บรรจุลงในคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูงนั้น มีทั้งชนิดรูปร่างไม่แน่นอนและชนิดเม็ดทรงกลมวัสดุบรรจุชนิดเม็ดทรงกลมขนาดเล็กที่มีชั้นรูพรุนขนาดสั้นประกอบด้วยของแข็งแกนกลางที่ไม่มีรูพรุนซึ่งปกติจะเป็นซิลิกาและมีชั้นรูพรุนบางเคลือบผิวนอกไว้ ขนาดของชั้นรูพรุนบางนี้มีขนาด 1 / 30 ถึง 1 / 40 ของเส้นผ่านศูนย์กลางของแกนกลางของของแข็ง ชั้นรูพรุนบางที่เคลือบผิวนอกแกนกลางของของแข็งอาจเป็นซิลิกา อลูมินา หรือเรซินแบบไอออน

เอกซ์เชง วัสดุบรรจุชนิดนี้สามารถบรรจุแบบแห้งเข้าในคอลัมน์ได้เลยโดยไม่ต้องทำให้วัสดุเปียกก่อนที่จะบรรจุ ข้อเสียของวัสดุนี้คือพื้นผิวของชั้นรูพรุนบางที่เคลือบผิวนอกแกนกลางของของแข็งมีปริมาณน้อยซึ่งทำให้มีความจุต่ำดังนั้นคอลัมน์ชนิดนี้มักเกิดการรับภาระเกินพิกัดได้ง่าย

Detector

โดยทั่วไปตัวตรวจวัดที่ดีควรมีคุณสมบัติในการตอบสนองเร็วมีความไวในการตรวจวัดสูง มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่ตรวจวัด มีความตอบสนองที่เหมือนกันเมื่อวัดสารชนิดเดียวกันในแต่ละครั้ง มีการตอบสนองที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารนั้นๆการตอบสนองไม่ควรขึ้นกับชนิดของเฟสเคลื่อนที่หรือผลจากอุณหภูมิหรืออัตรเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่ทำลายตัวทำละลายและไม่ทำให้เกิดการกระจายตัวของแถบนอกจากนี้ตัวตรวจต้องมีความสะดวกในการใช้งานและราคาไม่แพงนัก