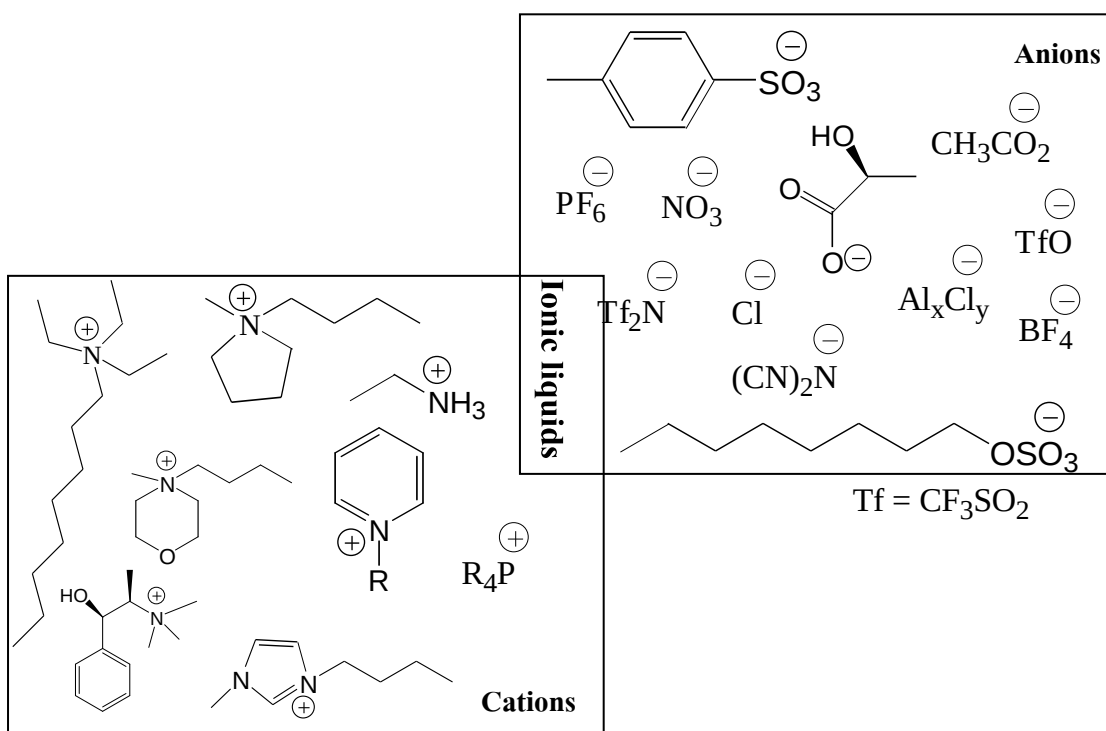


บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไอออนิก ลิควิด(Ionic liquid)

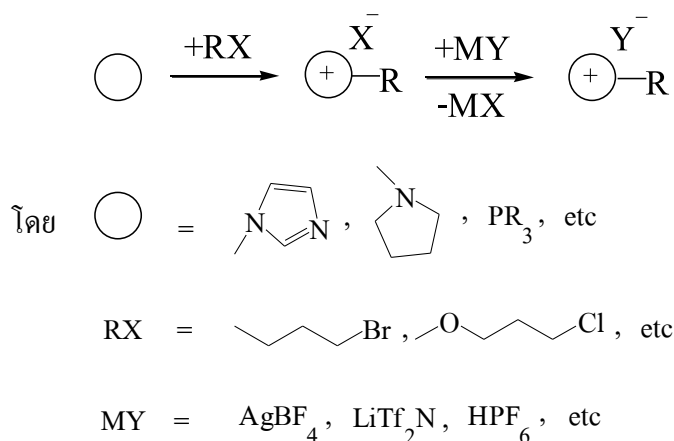
ไอออนิก ลิควิด เป็นเกลือกึ่งอินทรีย์(Semi-organic salts) ซึ่งมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า 100°C หรือต่ำกว่า เอทิลแอมมิเนียมไนเตรท($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$) เป็นไอออนิกตัวแรกที่ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1914 ซึ่งมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่า 12°C ตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างไอออนบวก(Cation) และไอออนลบ(Anion) ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด

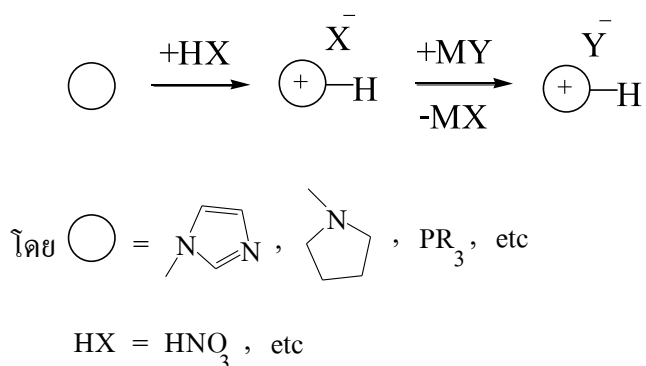
วิธีการเตรียมไอออนิก ลิควิด มี 2 วิธี

1. นำเอมีน(Amine) หรือสารประกอบฟอสฟอรัสมาทำปฏิกิริยาอัลคิลเลชัน(Alkylation) กับฮาโลอัลเคน(Haloalkane) เกิดเป็นเกลือเฮไลด์(Halide salts) หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาเมทาทีซิส(Metathesis) กับโลหะหมู่ 1A (Group 1A metal), แอมโมเนียม(Ammonium) หรือ เกลือของเงิน(Silver salt) ได้เป็นไอออนิก ลิควิด ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิกลิควิดวิธีที่ 1

2. นำเอมีน(Amine) หรือสารประกอบฟอสฟอรัสมาทำปฏิกิริยาการสะเทินด้วยกรด-เบส(Acid-base neutralization)ได้เป็นไอออนิก ลิควิด ดังแสดงในรูปที่ 2.3



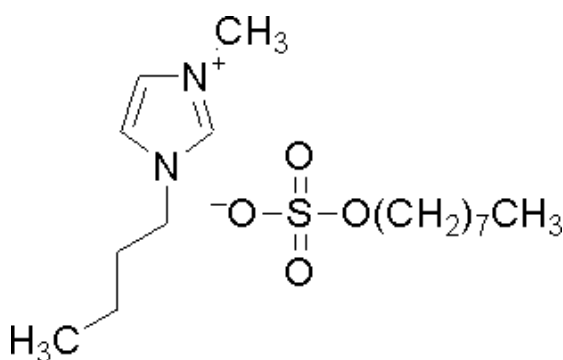
รูปที่ 2.3 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไอออนิกลิควิดวิธีที่ 2

ไอออนิก ลิควิด ได้รับการรับรองว่าเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เป็นตัวทำละลายที่ดีทั้งในสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ มีสภาพขั้วสูง ไม่เกิดการโคออดิเนต(Non-coordinating) ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ระเหย(Nonvolatile) สามารถใช้ในระบบที่เป็นสูญญากาศสูงได้ ทนต่อความร้อนสูง มีช่วงที่เป็นของเหลวกว้าง ไม่ไวไฟ(Nonflammable) ไม่สามารถวัดความดันไอได้ ไอออนิก ลิควิด ได้ชื่อว่าเป็นตัวทำละลายผู้ออกแบบ(Designer solvent) หมายความว่าคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิด สามารถปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมกับความต้องการในการใช้งานได้ เช่น จุดหลอมเหลว ความหนืด ความหนาแน่น และความสามารถในการละลายสามารถปรับเปลี่ยนโดยการเปลี่ยนไอออนที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของไอออนิก ลิควิด ตัวอย่างเช่น จุดหลอมเหลวของ 1-อัลคิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม เฮกซะฟลูออโรโบเรต(1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluoroborate)และเฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต

(Hexafluorophosphate) ขึ้นอยู่กับความยาวของหมู่อัลคิล(Alkyl group) และความสามารถในการละลายน้ำของ 1-อัลคิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมเตตระฟลูออโรโบเรต(1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) พบว่าสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อหมู่อัลคิลมีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 6 อะตอม แต่เมื่อมีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 6 หรือมากกว่าก็จะไม่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งพฤติกรรมนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการสกัดด้วยตัวทำละลายหรือในการแยกผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสามารถปรับเปลี่ยนเพื่อให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่ายขึ้น จากคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิดดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีการนำไอออนิก ลิควิด มาประยุกต์ใช้ในงานด้านเคมีต่าง ๆ มากมาย เช่น การสังเคราะห์(Synthesis), กระตะไลซิส(Catalysis), เคมีไฟฟ้า(Electrochemistry), แก๊สโครมาโทกราฟี(Gas chromatography), แคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis, CE) และลิควิด โครมาโทกราฟี(Liquids chromatography)

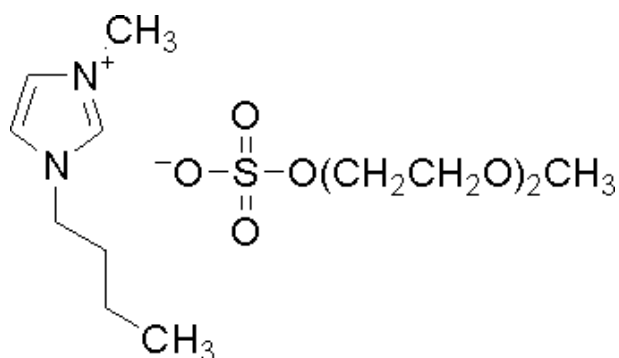
ไอออนิก ลิควิด ที่นำมาศึกษาคุณสมบัติเพื่อใช้เป็นตัวชะในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง ในงานวิจัยนี้ มี 3 ชนิด ได้แก่ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate) 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรต (1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate)

1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium octyl sulfate) สูตรโมเลกุล $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 348.50 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.4



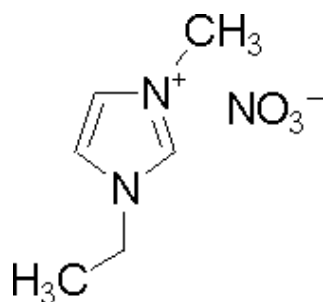
รูปที่ 2.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต

1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต (1-butyl-3-methylimidazolium 2-(2-methoxy ethoxy) ethyl sulfate) หรือ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไดเอทิลีน ไกลคอล โมโนเมทิล อีเธอร์ ซัลเฟต (1-Butyl-3-methylimidazolium (diethylene glycol monomethyl ether) sulfate) สูตรโมเลกุล $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 338.42 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 แสดงสูตรโครงสร้างของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี)เอทิล ซัลเฟต

1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรต (1-ethyl-3-methylimidazolium nitrate) สูตรโมเลกุล $C_6H_{11}N_3O_3$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 173.17 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.6

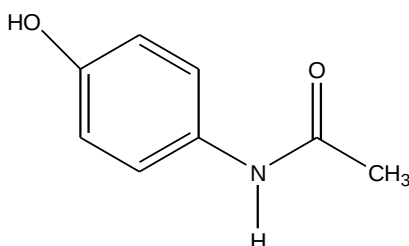


รูปที่ 2.6 แสดงสูตรโครงสร้างของ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ไนเตรต

2.2 พาราเซตามอล (Paracetamol)

พาราเซตามอลมีชื่อทางเคมีหลายชื่อ ได้แก่ *N*-acetyl-*p*-aminophenol acetaminophen *p*-acetamidophenol *p*-hydroxyacetanilide *p*-acetylaminophenol ชื่อสามัญ พาราเซตามอล คุณสมบัติทางเคมี เป็นของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น จุดหลอมเหลว 168°C ละลายได้เล็กน้อยในน้ำและอีเธอร์ ละลายในแอลกอฮอล์ มวลโมเลกุลเท่ากับ 151.17 ค่า pKa 9.5 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่

2.7



รูปที่ 2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของพาราเซตามอล

พาราเซตามอล เป็นยาลดไข้ แก้ปวด ที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุด ใช้ลดไข้และแก้ปวด เช่น ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ปวดประจำเดือน เป็นต้น ยาตัวนี้ถือว่ามีความปลอดภัย ไม่ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหารเหมือนแอสไพริน ยาชนิดนี้มีขายอยู่ในท้องตลาดทั้งชนิดเม็ดสำหรับผู้ใหญ่ และชนิดน้ำเชื่อมสำหรับเด็ก ในผู้ใหญ่แนะนำให้ใช้ ยาพาราเซตามอลขนาด 500 mg 1-2 เม็ด ทุกๆ 4-6 ชั่วโมง แต่ไม่ควรกินยาเกิน 8 เม็ดต่อวัน สำหรับเด็กเนื่องจากยาที่มีจำหน่ายมีหลายขนาดตามอายุ จึงควรใช้ยาตามขนาดที่แจ้งอยู่ในฉลากยา แต่ทั้งนี้ขนาดที่แนะนำให้ใช้ในเด็กจะเป็น 10-15 mg ต่อน้ำหนักตัวเด็ก 1 kg แต่อย่างไรก็ตามหากไม่แน่ใจในขนาดยาที่ใช้ หรือเด็กอายุน้อยกว่า 3 ปี ก็ควรปรึกษาแพทย์ หรือเภสัชกรก่อนใช้ยา และหากใช้ยาแล้วอาการไม่ดีขึ้นหรือใช้ไม่ลด ก็ควรพบแพทย์ ข้อควรระวังก็คือ ถ้าใช้ยาเกินขนาดมากๆ เช่น 20 เม็ด ก็จะเป็นพิษต่อดับ หรือดับวายถึงตายได้

กลไกการเกิดพิษ

ในขนาดรักษาพาราเซตามอลกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเมตาโบไลซ์ที่ตับด้วยกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) กลายเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ แล้วถูกขับออกจากร่างกาย อีก 5 เปอร์เซ็นต์ถูกเมตาโบไลซ์ โดยเอนไซม์ไซโทโครม พี-450(cytochrome P-450) ได้เป็นเมตาโบไลต์ที่มีพิษ แต่จะถูกกำจัดโดย กลูตาไธโอน(glutathione) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์(reducing agent)จะจับกับสารพิษนี้และขับออกทางปัสสาวะ แต่ในภาวะที่ได้รับพาราเซตามอลเกินขนาด เมตาโบไลต์ที่มีพิษนี้จะมีปริมาณมากเกินความสามารถของกลูตาไธโอนที่จะกำจัดได้ จึงเกิดความเป็นพิษต่ออวัยวะต่างๆของร่างกาย เช่น ตับ และ ไต มีการศึกษาพบว่าร่างกายคนเรามีกลูตาไธโอนที่จะทำลายพาราเซตามอลที่รับประทานเข้าไปไม่เกิน 7.5 g หรือ 150 mg/kg ในคนปกติ ค่าครึ่งชีวิตของพาราเซตามอล ประมาณ 4 ชั่วโมง แต่ในภาวะที่ได้รับยาเกินขนาด ค่าครึ่งชีวิตอาจยาวเป็น 12 ชั่วโมงได้ ปกติพาราเซตามอลจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วแต่ในภาวะเป็นพิษการดูดซึมจะลดลงอย่างน้อยกว่า 4 ชั่วโมง โดยเฉพาะถ้ารับประทานยาอื่นร่วมด้วย[10]

ผู้ที่ควรระวังในการใช้ยานี้

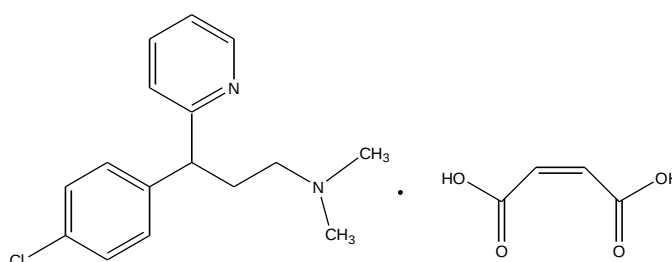
ผู้ที่ขาดเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟส ดีไฮโดรจีเนส (Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, G-6-PD) ผู้ที่เป็นโรคตับ หรือกำลังรับประทานยาที่มีผลต่อดับ ผู้ป่วยโรคต่อหื่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง ต่อมลูกหมากโต ไม่ควรใช้ยานี้ เด็กและสตรีมีครรภ์ ควรปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกรก่อนใช้ยานี้ ผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคไต มีแผลในกระเพาะหรือลำไส้ ควรปรึกษาแพทย์หรือเภสัชกรก่อนใช้ยานี้

ผลข้างเคียง

ยานี้อาจทำให้เกิดอาการง่วงนอน มึนงง ตาพร่า มองภาพไม่ชัด ร้อนวูบวาบที่หน้า มีผื่นแดงตามผิวหนัง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก หัวใจเต้นเร็ว กล้ามเนื้ออ่อนแรง หนักตากด คัดจมูก[11]

2.3 คลอเฟนิรามีน มาลีเอท (Chlorpheniramine maleate)

ชื่อทางเคมี ได้แก่ คลอโพรพีนไพริดาซีน มาลีเอท (Chlorprophenpyridamine maleate) 1-พารา-คลอโรฟีนิล-1-2-ไพริดีล-3-ไดเมทิลอะมิโนโพรเพน มาลีเอท (1-(p-chlorophenyl)-1-(2-pyridyl)3-dimethylaminopropane maleate) คุณสมบัติทางเคมี เป็นของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น จุดหลอมเหลว 130-135 °C ละลายได้เล็กน้อยในอีเธอร์ ละลายได้ในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และน้ำ มวลโมเลกุลเท่ากับ 390.9 ค่า pKa 9.1 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.8 [12]



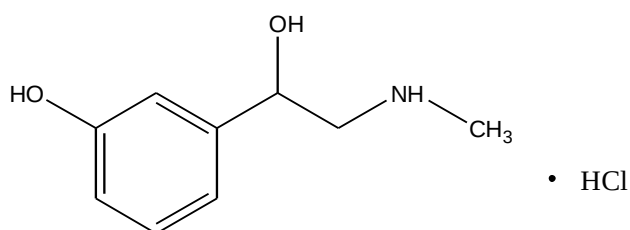
รูปที่ 2.8 แสดงสูตร โครงสร้างของคลอเฟนิรามีน มาลีเอท

คลอเฟนิรามีน มาลีเอท เป็นยาแอนติฮิสตามีน (antihistamine) ใช้รักษาอาการแพ้ เช่น แพ้อากาศ (ในโรคหวัด หืด หลอดลม และ โพรงจมูกอักเสบ) ใช้ลดน้ำมูกใสๆ และบรรเทาอาการแพ้ต่างๆ เช่น เยื่อจมูกอักเสบจากการขยายตัวของหลอดเลือด อาการคัดจมูกน้ำมูกไหลเนื่องจากหวัด ผื่น แพ้ตามผิวหนังเนื่องมาจากแพ้ยา แพ้อาหารทะเล แพ้ละอองเกสรหญ้า และดอกไม้ หรืออาการคัน มีจำหน่ายทั้งชนิดเม็ด และชนิดน้ำ รับประทานตามขนาดที่ระบุไว้ โดยปกติครั้งละ 1 เม็ด วันละ 2-3 ครั้ง ข้อควรระวังคือ ยานี้มักทำให้ง่วงนอน มึนงง หากต้องขับรถ หรือทำงาน

เกี่ยวกับเครื่องจักร ควรระมัดระวังเป็นอย่างยิ่ง อาจมีอาการปากคอแห้ง ใจสั่น และอาจทำให้เสมหะเหนียว ขับออกยาก จึงไม่ควรใช้ในผู้ป่วยที่มีอาการไอมีเสมหะร่วมด้วย ผู้ป่วยต้อหินไม่ควรใช้ นอกจากนี้หากน้ำมูกข้น หรือมีสีเหลือง เจ็บคอ ไม่ควรใช้ยานี้ [13]

2.4 ฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์ (Phenylephrine HCl)

คุณสมบัติทางเคมี เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวประมาณ 143°C ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ และน้ำ มวลโมเลกุลเท่ากับ 203.7 ค่า pKa 8.9 มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.9

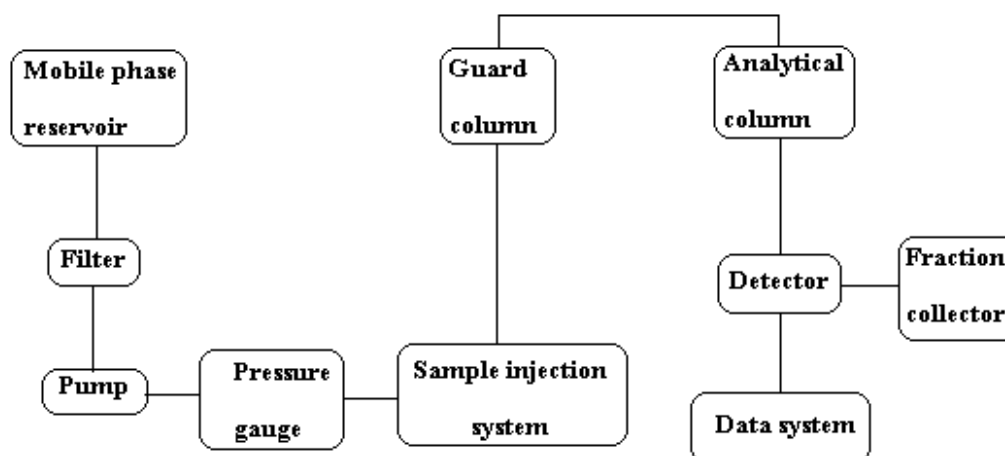


รูปที่ 2.9 แสดงสูตรโครงสร้างของฟีนิลเอฟพรีน ไฮโดรคลอไรด์

เป็นยาที่บรรเทาอาการคัดจมูก[14]

2.5 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(High Performance Liquid Chromatograph; HPLC)

เป็นเครื่องมือที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการวิเคราะห์และแยกสารเกือบทุกชนิด เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีเป็นเครื่องมือที่มีความไว(Sensitivity) สูง สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างรวดเร็วแม่นยำและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะสารที่ไม่ระเหยและไม่คงตัวต่อความร้อน ส่วนประกอบที่สำคัญของ เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี แสดงในรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

2.5.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่(Mobile phase reservoir)

โดยทั่วไปภาชนะที่ใช้บรรจุเฟสเคลื่อนที่ หรือตัวทำละลาย มักทำด้วยแก้วหรือสแตนเลสสตีล(Stainless steel)ใช้บรรจุตัวทำละลายได้อย่างน้อย 500 mL นอกจากนี้ยังมีเครื่องกรองที่ช่วยกรองฝุ่นละอองหรือสิ่งสกปรกก่อนเข้าสู่ปั๊ม เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้ในงานโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงต้องปราศจากฟองอากาศซึ่งอาจเข้าไปรบกวนการทำงานหรือความเสียหายแก่ปั๊มหรือตัวตรวจวัด(Detector)จึงมีเครื่องมือที่ใช้ขจัดฟองอากาศ (Degasser) วิธีที่สะดวกและนิยมใช้คือ การกรองตัวทำละลายที่ต้องการใช้ผ่านมิลลิพอร์ ฟิวเตอร์ (Millipore filter) ภายใต้สุญญากาศ วิธีนี้จะช่วยขจัดอนุภาคซึ่งแขวนลอยอยู่

2.5.2 ปั๊ม(Pump)

เนื่องจากการแยกสารในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงต้องอาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทานดังกล่าว ปั๊มที่ใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงถึงประมาณ 6000 Psi และมีอัตราการไหล(Flow rate) อยู่ในระหว่าง 0.1 –10 mL.min⁻¹

2.5.3 ระบบการฉีดสารตัวอย่าง(Sample injection system)

ความแม่นยำในการวัดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงขึ้นกับความเที่ยงของการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ การฉีดสารปริมาณมากเกินไปทำให้เกิดฟลักกว้าง ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้จึงควรใช้ให้น้อยที่สุด(ประมาณ 0.2-500 µL)และการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จะต้องไม่ทำให้ความดันของระบบลดลง

2.5.4 คอลัมน์(Column)

คอลัมน์จัดเป็นหัวใจของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีในการแยกสาร คอลัมน์ซึ่งใช้ในโครมาโทกราฟีแบบของเหลวมักเป็นท่อเรียบทำด้วยสแตนเลส สติล อาจมีส่วนน้อยที่ใช้ท่อแก้วอย่างหนาซึ่งจะทนต่อความดันได้น้อยกว่า 600 Psi ส่วนปลายมีลักษณะเป็นตาข่ายเล็กๆ ทำด้วยสแตนเลส สติลเพื่อป้องกันการรั่วของวัสดุที่เป็นเฟสอยู่กับที่

การ์ดคอลัมน์(Guard column)

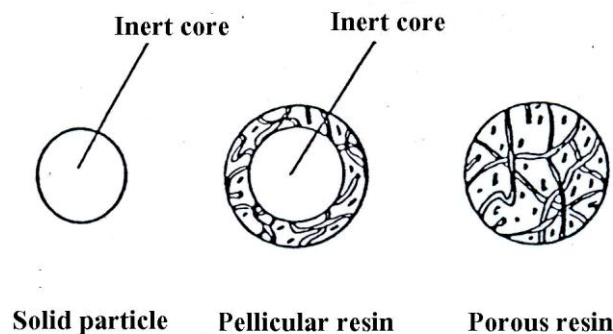
การ์ดคอลัมน์นิยมใช้ต่อก่อนเข้าคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์(analytical column) เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์เนื่องจากการ์ดคอลัมน์จะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลาย นอกจากนี้การ์ดคอลัมน์ยังใช้ในการทำให้เฟสเคลื่อนที่อึดด้วยเฟสอยู่กับที่เพื่อลดการสูญเสียของตัวทำละลายในคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ ส่วนประกอบของวัสดุบรรจุของการ์ดคอลัมน์จะคล้ายคลึงกับคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าและราคาไม่แพงมากนัก

คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์(Analytical column)

คอลัมน์ที่ใช้กันส่วนใหญ่มีความยาว 10 – 30 cm อาจเพิ่มความยาวของคอลัมน์ได้ โดยใช้คอลัมน์มากกว่าหนึ่งคอลัมน์ในคราวเดียวกัน เส้นผ่าศูนย์กลางภายในคอลัมน์ มีขนาด 4 – 10 mm วัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ มีขนาดอนุภาค 3 , 5 และ 10 μm คอลัมน์ที่ใช้ในงานทั่วไปมักมีความยาว 25 cm เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 mm และขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุ 5 μm คอลัมน์ชนิดนี้มี 40,000 – 60,000 plate/m ปัจจุบันได้มีการพัฒนาคอลัมน์ชนิดความเร็วสูง และคอลัมน์ประสิทธิภาพสูง ซึ่งมีขนาดเล็กลงมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเพียง 1 – 4.6 mm และขนาดอนุภาคของวัสดุบรรจุ 3 หรือ 5 μm มีความยาวเพียง 3 – 7.5 cm แต่มี 100,000 plate/m นอกจากนี้คอลัมน์ชนิดนี้ยังมีความเร็วสูงขึ้นและสิ้นเปลืองตัวทำละลายน้อยลง ซึ่งประการหลังมีความสำคัญมากเนื่องจากตัวละลายที่ใช้ในเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีต้องมีความบริสุทธิ์สูง จึงมีราคาค่อนข้างแพง

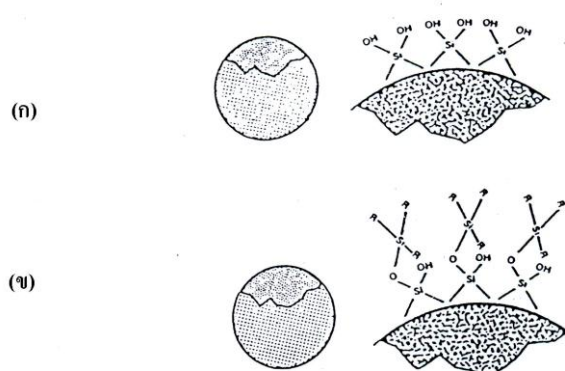
ชนิดของเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)

การคงไว้(Retention)ของสารในเฟสอยู่กับที่ ซึ่งมีผลต่อการแยกของสารจะเป็นไปตามหลักของ “like attracts like” ลักษณะของเฟสอยู่กับที่ ที่ใช้กันมีสามชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ชนิดแรก(solid particle) เป็นวัสดุแข็ง สารอื่นไม่สามารถซึมผ่านผิวนอกได้ มีพื้นที่ผิวน้อยจึงใช้กับสารจำนวนน้อย ชนิดที่สอง (pellicular resin) มีพื้นที่ผิวมากกว่าใช้กับสารจำนวนมากกว่าและแยกได้ดีกว่า ชนิดที่สาม (porous resin) มีลักษณะเป็นรูพรุน ให้ประสิทธิภาพในการแยกสูงแต่อาจใช้เวลามากขึ้น

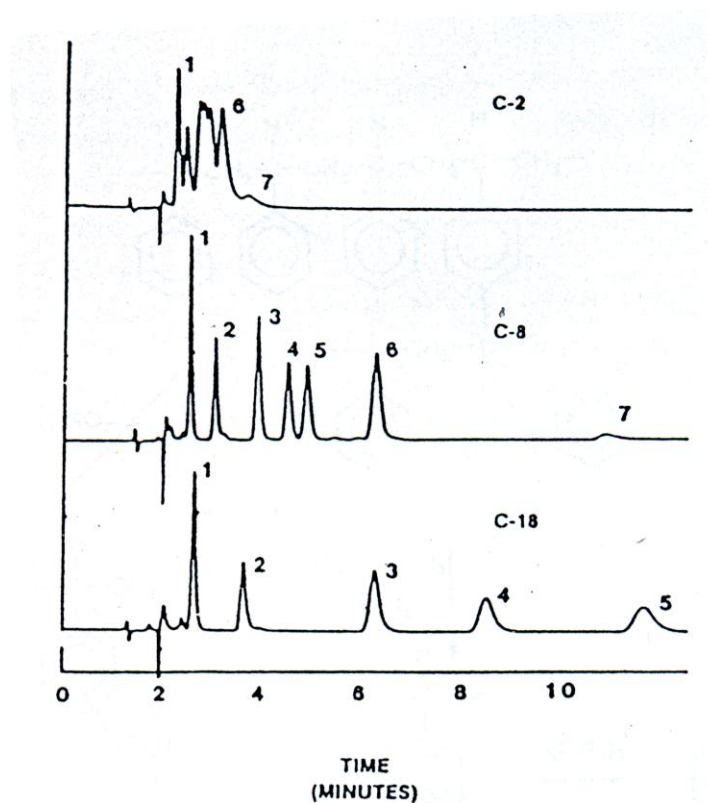


รูปที่ 2.11 วัสดุที่บรรจุใน HPLC column

วัสดุที่นิยมใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ คือซิลิกาเจล(silica gel) มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2.12(ก) ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล($\text{Si} - \text{OH}$) มีสภาพขั้วสูง(polarity)สูง ในสมัยแรกๆ นิยมใช้ซิลิกาเจลชนิดธรรมดาที่ไม่มีการดัดแปลง แต่เนื่องจากซิลิกาเจลชนิดนี้มีข้อเสียหลายประการ เช่น ไม่มีความเที่ยง จึงดัดแปลงเป็นชนิดบอนด์เฟส(bonded phase)จัดเป็นเฟสอยู่กับที่ชนิดพาร์ทิชัน(partition type stationary phase) ซึ่งมีความเที่ยงสูงกว่าโดยทำการบดบังหมู่ไฮดรอกซิลด้วยหมู่ที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลได้ สภาพขั้วของบอนด์เฟสจะขึ้นกับหมู่ R ในกรณีที่หมู่ R เป็นหมู่ที่ไม่มีขั้ว เช่น อัลเคน(alkane) ได้แก่ C_2 , C_3 , C_6 , C_8 และ C_{18} การจับกับสารที่สนใจจะขึ้นกับจำนวนและชนิดของหมู่อัลเคนที่ใช้ ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.13 หมู่อัลเคนที่นิยมใช้ คือ C_{18} (Octadecylsilane, ODS) ข้อควรระวังในการใช้ ซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ คือสามารถละลายได้ใน pH ที่เป็นด่าง ดังนั้นจึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ pH มากกว่า 7.5

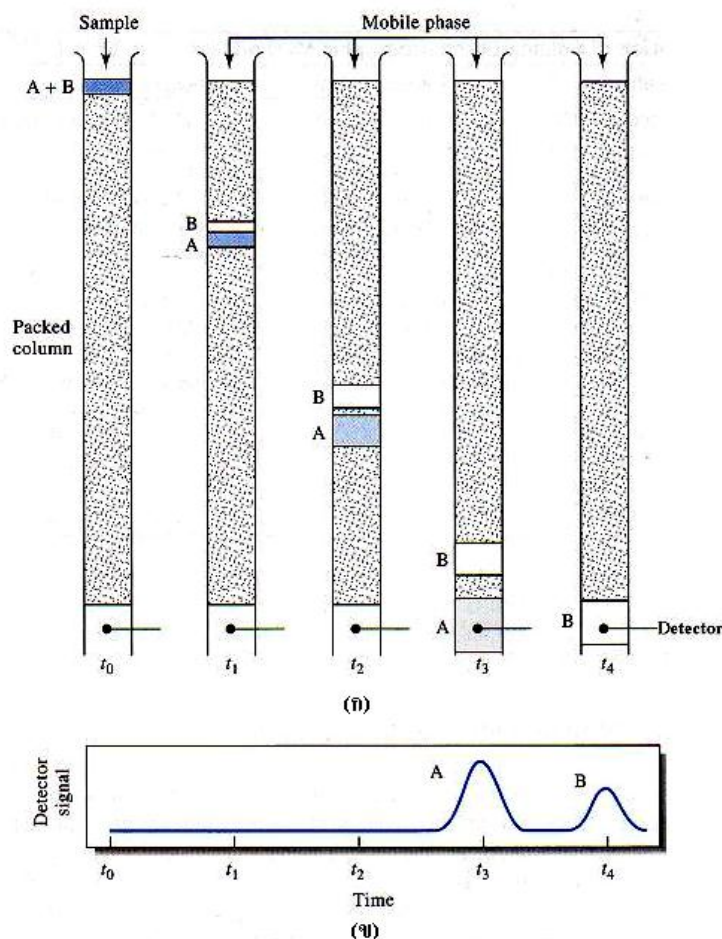


รูปที่ 2.12 ลักษณะของซิลิกาเจล ชนิด (ก) ชนิดธรรมดาที่ไม่มีการดัดแปลง(unmodified) และ(ข) ชนิดบอนด์เฟส(bonded phase)



รูปที่ 2.13 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของหมู่อัลเคนและการคงไว้ของสาร(Solute retention)

กระบวนการแยกสารโดยวิธีลิควิดโครมาโทกราฟี มีขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.14(ก) ตัวอย่างการแยกสารละลายผสมของสาร 2 ชนิด คือสาร A และ สาร B ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จุดเริ่มต้น (t_0) เป็นการใส่หรือฉีดสารละลายตัวอย่างไปบนส่วนต้นของคอลัมน์ จะเห็นแถบแคบๆเมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์จะทำหน้าที่พาโมเลกุลของสารตัวอย่างเคลื่อนไปตามความยาวของคอลัมน์ และมีการแยกออกจากกันบางส่วน (t_1 และ t_2) หากเติมหรือให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ไปเรื่อยๆ โมเลกุลของสาร A และ B จะแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์ (t_3 และ t_4) และถ้าต่อส่วนปลายของคอลัมน์เข้ากับเครื่องตรวจวัด สาร A และ B จะถูกตรวจวัดและถูกบันทึกเป็นพีคบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.14(ข)

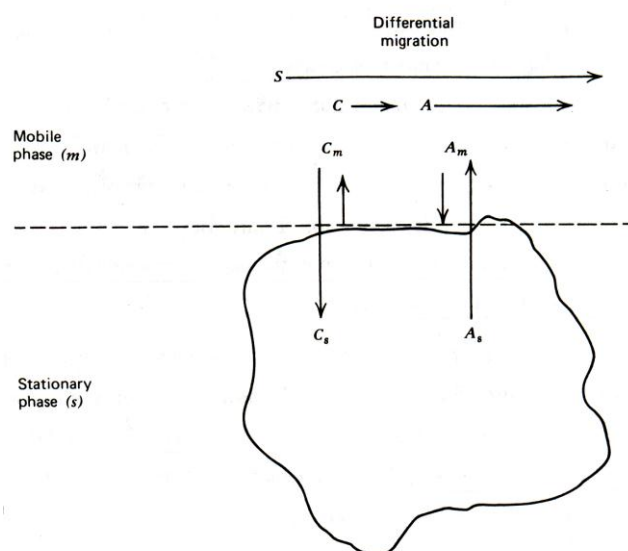


รูปที่ 2.14 (ก) แสดงกระบวนการแยกของสาร A และ B โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

(ข) โครมาโทแกรมที่ได้จากการแยก

การที่สารแต่ละชนิดจะแยกออกจากกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.14 เกิดจาก

1. ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่หรือการกระจายตัวของสารชนิดต่างๆ ในสารตัวอย่าง ในเทคนิคโครมาโทกราฟี หมายถึง อัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของสารแต่ละชนิดที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ ซึ่งเกิดจากการสมดุลของการกระจายตัวของสารชนิดต่างๆ ระหว่างสองเฟส การที่สารจะกระจายไปในเฟสใดเฟสหนึ่งได้ดีกว่านั้นขึ้นอยู่กับแรงหน่วงเหนี่ยวของโมเลกุลของสารกับเฟสทั้งสอง ถ้าแรงหน่วงเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของสารกับเฟสอยู่กับที่แรงกว่าสารนั้นจะถูกแยกออกมาทีหลัง ตรงกันข้ามกับสารที่มีแรงหน่วงเหนี่ยวกับเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าจะถูกแยกออกมาก่อน กลไกของการหน่วงเหนี่ยวให้สารตัวอย่างถูกจับไว้ในเฟสใดเฟสหนึ่งนั้นเป็นผลจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสารตัวอย่างกับโมเลกุลของสารในแต่ละเฟสนั้น



รูปที่ 2.15 แสดง Differential migration

รูปที่ 2.15 แสดงความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสาร A และสาร B กำหนดให้ S เป็นโมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่ ลูกศรแสดงทิศทางของการเคลื่อนที่ จากรูปที่จุดสมดุลของการกระจายตัว โมเลกุลส่วนใหญ่ของสาร C จะอยู่ในเฟสอยู่กับที่ และส่วนน้อยจะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งตรงกันข้ามกับสาร A โมเลกุลส่วนใหญ่ของสาร A จะอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ เพราะฉะนั้นสาร C จะเคลื่อนผ่านคอลัมน์หรือถูกชะล้างพาออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าสาร A ตัวแปรที่มีผลต่อการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสทั้งสองคือ องค์กรประกอบของเฟสเคลื่อนที่ องค์กรประกอบของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง การปรับเปลี่ยนอัตราการเคลื่อนที่ของสารเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น ควรปรับตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในแต่ละการทดลอง ถ้าผลที่ได้ไม่เป็นที่พอใจ จึงปรับเปลี่ยนตัวแปรอื่นๆ ต่อไป

2. การแพร่กระจายของโมเลกุลของสารชนิดเดียวกันในเฟสอยู่กับที่ทำให้เกิดฟีกที่แคบหรือกว้างในการแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี การใส่หรือฉีดสารหลายตัวอย่างลงบนคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่ ไม่สามารถควบคุมให้ทุกๆ โมเลกุลของสารชนิดเดียวกันอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน โมเลกุลของสารจะกระจายไปในคอลัมน์ โดยอยู่ในลักษณะแคบๆ และในขณะที่โมเลกุลของสารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ แคบแคบๆ นี้จะค่อยๆ ขยายกว้างขึ้น เนื่องจากอัตราการกระจายตัวหรืออัตราการเคลื่อนที่ที่ไม่เท่ากันของโมเลกุลของสารชนิดเดียวกัน คือ บางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า ซึ่งความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารชนิดเดียวกันนี้ ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของการสมดุลของการกระจายตัวของสารแต่ละชนิดดังที่กล่าวมาแล้ว แต่เกิดจากกระบวนการทางกายภาพ ที่เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดฟีกกว้าง

2.5.5 Pulse damper

ใช้กับ reciprocating pump ต่ออยู่ระหว่างปั๊ม และ sample injector ทำด้วยท่อ สแตนเลส สตีล เนื่องจากข้อเสียของ reciprocating pump คือ เกิดการไหลเป็นพัลส์ทำให้เกิดสัญญาณรบกวนที่เบสไลน์ และมีผลต่อการทำงานของเครื่องตรวจวัด pulse damper ช่วยลดข้อเสียนี้ลงได้

2.5.6 Column thermostat

ใช้ในกรณี เช่น ต้องการแยกด้วยการแลกเปลี่ยนไอออน(ion – exchange), การคัดขนาด (size – exclusion) หรือ รีเวิร์สเฟสคอลัมน์(reverse – phase column) ที่อุณหภูมิสูงและต้องการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ลักษณะของ column thermostat ใน HPLC จะคล้ายกับใน GC คือ ประกอบด้วยพัดลมที่มีความเร็วสูง และ thermostat ซึ่งควบคุมด้วยระบบไฟฟ้า หรือในบางกรณี คอลัมน์จะถูกควบคุมโดยตัวให้ความร้อนหรือโดยการไหลเวียนของของเหลวที่บรรจุอยู่ในอ่างซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้

2.5.7 เครื่องตรวจวัด (Detector)

หลังจากสารตัวอย่างถูกแยกผ่านคอลัมน์ออกมาแล้ว จะต้องผ่านเครื่องตรวจวัดปริมาณ ซึ่งจะต้องมีความไวสูง และวัดได้อย่างต่อเนื่อง

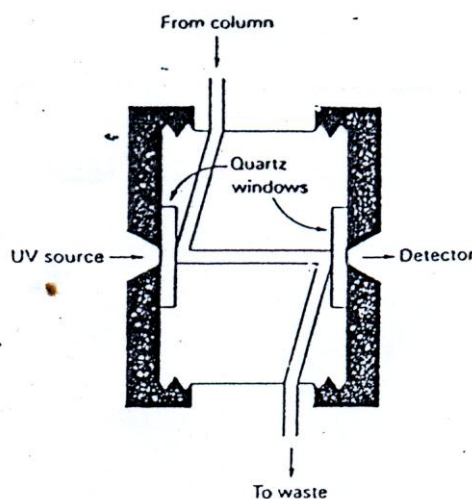
คุณสมบัติที่ต้องการสำหรับเครื่องตรวจวัดของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีมีดังนี้

1. มีความไวเพียงพอ เครื่องตรวจวัดของเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่ใช้ในปัจจุบันมีความไวอยู่ในช่วง 10^{-8} ถึง 10^{-15} g ของสารที่วิเคราะห์ต่อวินาที
2. สัญญาณตอบรับมีความเที่ยงที่ดีและไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และอุณหภูมิ
3. เชื้อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
4. ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับเป็นเส้นตรงในช่วงกว้าง
5. ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
6. เซลล์ของดีเทคเตอร์ ควรมีปริมาตรตาย(dead volume) น้อยๆ เพื่อลดปัญหาฟีกกว้าง

เครื่องตรวจวัดสำหรับเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

1. Ultraviolet – visible absorbance detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากในเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี หลักการทำงานอาศัยการดูดกลืนของสารตัวอย่าง โดยจะประกอบด้วย flow – through cell ซึ่งรูปร่างเหมือนตัวอักษร “Z” cell ดังแสดงในรูปที่ 2.16 ดังกล่าวออกแบบให้มีปริมาตรน้อยที่สุด (1-10 μL) และยาว 2 – 10 mm ปกติเซลล์ดังกล่าวจะทนความดันได้ประมาณ 600 PSI



รูปที่ 2.16 Ultraviolet detector cell สำหรับเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

เครื่องตรวจวัดนี้อาจเป็นชนิดลำแสงเดี่ยว หรือชนิดลำแสงคู่

เครื่องตรวจวัดชนิดนี้มีข้อดี คือไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ของเฟสเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เครื่องตรวจวัดชนิดนี้ แบ่งเป็นชนิดย่อยๆ ได้ ดังนี้

1.1 Fixed – wavelength detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่วัดการดูดกลืนแสงได้ในบางช่วงคลื่น แบ่งเป็น

(1) Single wavelength detectors นิยมใช้หลอดปรอทชนิดความดันต่ำ ซึ่งจะเหมาะกับการวัดการดูดกลืนแสงที่ 254 nm เครื่องตรวจวัดชนิดนี้เป็นที่นิยมมากในสมัยก่อน เนื่องจากราคาถูกและใช้ได้กับสารเคมีอินทรีย์ทั่วไป

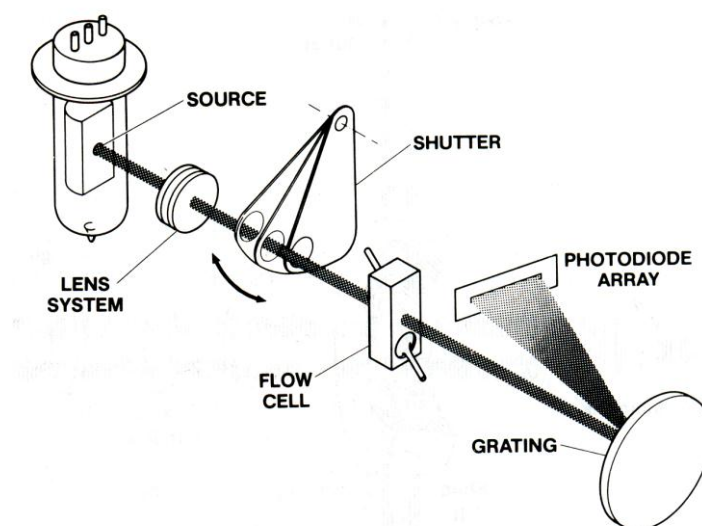
(2) Multi – wavelength detectors ใช้หลอดปรอทร่วมกับแหล่งกำเนิดแสงอื่น เช่น หลอดสังกะสี (206 nm) และหลอดตะกั่วทำให้เลือกวัดการดูดกลืนแสงได้หลายช่วงความยาวคลื่น

1.2 Variable – wavelength detectors

เป็นเครื่องตรวจวัดที่สามารถเลือกวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการในช่วงอัลตราไวโอเลต และวิสิเบิลเครื่องตรวจวัดนี้ประกอบด้วย หลอดควิเทอริยมและใช้เกรตติงโมโนโครมาเตอร์เพื่อให้เลือกความยาวคลื่นที่ต้องการได้ ในช่วง 190 – 400 nm หรืออาจใช้หลอดควิเทอริยมร่วมกับหลอดทั้งสแตนเพื่อให้เลือกความยาวคลื่นที่ต้องการได้ในช่วง 190 – 900 nm

1.3 Diode array detectors

ประกอบด้วย photodiode array spectrophotometers หลายตัว (256– 1024 ตัว) แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะผ่าน flow cell ไปยัง polychromator เช่น เกรตติงซึ่งจะกระจายแสงไปยังแผงของ photodiodes แต่ละ diode จะวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นหนึ่งๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 Photodiode array ที่ใช้ใน HPLC detectors

เครื่องตรวจวัดนี้สามารถสแกนยูวี-วิสิเบิล สเปกตรัม(UV – Vis spectrum) ได้รวดเร็วมาก (ประมาณ 10 msec ต่อ 1 สเปกตรัม) และสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็น 3 มิติ ซึ่งแสดงค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่นและเวลา โดยสามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานได้ เนื่องจากข้อมูลต่างๆ เก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ได้

การพัฒนาวิธีการแยก(Developing a separation)

การพัฒนาวิธีทางโครมาโทกราฟี เพื่อให้มีการแยกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาน้อย ดังนั้นเพื่อที่จะอธิบายและหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสารจึงจำเป็นต้องเข้าใจพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบวนการแยกทางโครมาโทกราฟี

พารามิเตอร์พื้นฐาน ได้แก่

1. Partition ratio (Partition Coefficient, K) เป็นค่าคงที่ที่อธิบายถึงการสมดุลของการกระจายตัวของสารตัวอย่างไประหว่างเฟสทั้งสองคือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ค่า K หาได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่กับความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่ ภายหลังกระจายตัวไประหว่างเฟสทั้งสองหรืออัตราส่วนของเวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่กับเวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ดังนี้

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

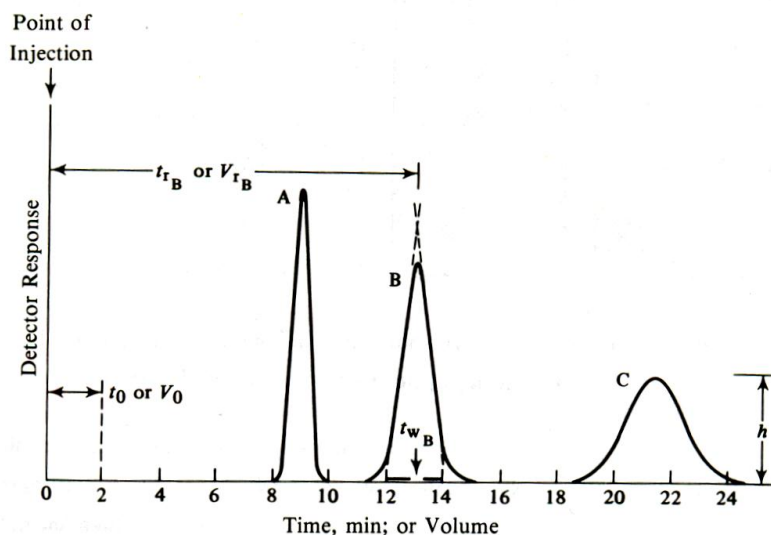
หรือ

$$K = \frac{t_s}{t_m}$$

เมื่อ	C_s	=	ความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่
	C_m	=	ความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่
	t_s	=	เวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่
	t_m	=	เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

สารแต่ละชนิดจะมีค่า K คงที่เฉพาะในแต่ละสภาวะของการทดลองเท่านั้น ค่า K แปรผันตามอุณหภูมิของการทดลองและส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่ขึ้นกับจำนวนสารที่นำมาทำการตรวจวิเคราะห์ สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ แต่การที่จะวัดค่า K จากโครมาโทแกรมโดยตรงนี้ทำได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร มีพารามิเตอร์ตัวอื่นที่สามารถวัดค่าจากโครมาโทแกรมโดยตรงได้ง่ายกว่าและสามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้ เช่น เวลาการคงไว้(retention time), เวลาการคงไว้สัมพัทธ์(relative retention time) เป็นต้น

2. เวลาการคงไว้(Retention time, t_R) เป็นระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาหรือชะล้างสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ คือเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนกระทั่งถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีคบนโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2.18



รูปที่ 2.18 แสดงโครมาโทแกรมของการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

เวลาการคงไว้(t_R) เป็นพารามิเตอร์ที่วัดหรือหาค่าได้จากโครมาโทแกรมสามารถใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแต่เนื่องจากมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่งของสภาวะการทดลอง เช่น อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่หรือความดันที่ทำให้ค่าเวลาการคงไว้ไม่คงที่ มีผลทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์ผิดพลาดได้ จึงนิยมใช้พารามิเตอร์ตัวอื่น เช่น เวลาการคงไว้สัมพัทธ์ ซึ่งให้ผลถูกต้องกว่า

3. Corrected retention time (t'_R) คือระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดของพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีคของสารตัวอย่างบนโครมาโทแกรม หรือระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสอยู่กับที่ ดังแสดงในรูป 2.18

$$t'_R = t_R - t_0$$

t_0 = เวลาที่สารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่(unretained compound) เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือเวลาที่โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่(mobile phase) เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่หรือคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง

4. Retention Volume (V_R) เป็นปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งที่เริ่มฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์จนถึงตำแหน่งจุดยอดของพีคของสาร หาได้จากความสัมพันธ์ของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate, F) กับเวลาการคงไว้(t_R) ดังนี้

$$V_R = Ft_R$$

V_R	=	retention volume
F	=	อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate, ml/min)
t_R	=	เวลาการคงไว้ของสารตัวอย่าง

5. Corrected retention volume (V'_R) ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งจุดยอดของพีคของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่จนถึงตำแหน่งจุดยอดของสารตัวอย่าง หาค่าได้จาก

$$V'_R = V_R - V_0 = Ft_0$$

V_0 = ปริมาตรตาย(dead volume) หรือ ปริมาตรว่าง(void volume) หรือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือผ่านคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังอีกปลายด้านหนึ่ง

6. แฟกเตอร์ความจุ(Capacity factor, k') เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยใช้การชะแบบไอโซครีติก ค่า k' นี้หาได้จาก corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ (t'_R)หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ (t_0) ดังนี้

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k' เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า k' คือ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k' ของสารควรอยู่ระหว่าง 2-5 ทั้งนี้เพราะเวลาที่ใช้และการแยกสมดุลกันดี และค่า k' ที่เหมาะสมของการแยกสารที่ซับซ้อนควรมีค่าระหว่าง $1 \leq k' \leq 16$ ในการปฏิบัติควรหาค่า k' ของพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างน้อย 1 พีค คือพีคแรกเพื่อให้แน่ใจว่าพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์แยกออกจากพีคของตัวทำละลายหรือพีคของสารปนเปื้อน ซึ่งมักจะถูกชะออกมาใกล้หรือที่เดียวกับ t_0 พีคของสารที่ทำการวิเคราะห์ไม่ควรมีค่า k' สูงเกิน 10-15 เพราะจะใช้เวลานานและทำให้พีคที่ได้กว้างและการแยกไม่ดี ทำให้การตรวจวัดลำบาก ค่า k' บอกให้ทราบถึงเวลาที่สารถูกชะออกมาจากคอลัมน์ บอกลักษณะของพีคกว้างหรือแคบ การตรวจวัดยากหรือง่าย ความแรงของเฟสเคลื่อนที่แรงหรือ

อ่อน ดังแสดงในตารางที่ 2.1 จากข้อมูลนี้สามารถนำมาปรับค่า k' ให้เหมาะสมเพื่อให้การแยกสารได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบค่า k'

ข้อมูล	k' ต่ำ	k' สูง
เวลาที่สารถูกพาออกจากคอลัมน์	น้อย	มาก
ลักษณะของพีค	แหลมสูง	กว้างเตี้ย
การตรวจวัด	ง่าย	ยาก
ความแรงของเฟสเคลื่อนที่	แรง	อ่อน

การปรับหรือควบคุมค่า k'

ในกรณีที่ค่า k' ที่ได้จากการทดลองไม่เหมาะสม อาจสูงไปหรือต่ำไปทำให้การแยกไม่ดี มีวิธีการปรับหรือควบคุมค่า k' หรือเวลาของการชะเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้นหรือดีที่สุดได้ดังนี้

6.1 ปรับเปลี่ยนสัดส่วนผสมหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับเปลี่ยนสัดส่วนหรือความแรงของตัวทำละลายหรือเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย ในทางปฏิบัติการเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่างเป็นหลักและการเลือกความแรงของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมทำได้โดยการแยกสารที่ต้องการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ 1-2 ครั้ง แล้วดูค่า k' ที่ได้ หลังจากนั้นจึงปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ให้แรงขึ้นหรืออ่อนลงเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น วิธีที่ง่ายและสะดวกในการปรับความแรง คือปรับความเข้มข้นของตัวทำละลาย, pH, ความมีขี้ว โดยไม่เปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีหรือชนิดของตัวทำละลายที่เป็นส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยทั่วไปมักจะใช้ตัวทำละลายผสมที่ให้ค่า $1 \leq k' \leq 10$ เพื่อให้การแยกเกิดขึ้น และเวลาในการแยกไม่นานเกินไป ถ้าต้องการเปลี่ยนค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงน้อย ในทางตรงข้ามถ้าต้องการลดค่า k' ให้ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีความแรงมาก

6.2 เพิ่มหรือลดปริมาณของเฟสอยู่กับที่

ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดจำเพาะ(size exclusion chromatography)ทำได้โดยการเพิ่ม หรือลดปริมาตรของรูพรุน และพื้นที่ผิวของสารบรรจุในคอลัมน์ ในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบกระจาย(partition chromatography) ทำโดยการเพิ่มหรือลดปริมาณเฟสของเหลวบนสารช่วยพุงและในกรณีที่เป็นโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน(ion-exchange chromatography) ทำโดยเพิ่มหรือลดความหนาแน่นประจุ หรือ ความแรงไอออนบนสารบรรจุ

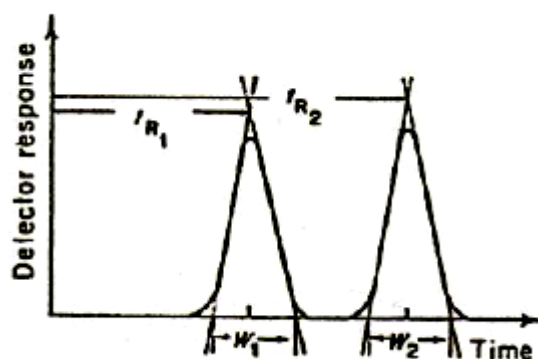
6.3 ปรับเปลี่ยนปัจจัยที่มีผลต่อค่า K

อุณหภูมิและอัตราความเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อความผันแปรของค่า K ดังนั้นจึงมีผลต่อค่า k' ด้วย

7. ค่าซีเล็คติวิตี(selectivity factor, α) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีกของสารสองชนิดที่อยู่แยกออกจากกันดีเพียงใด การแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่าเวลาการคงไว้หรือค่า k' เท่านั้น โดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีก และค่านี้เกี่ยวข้องกับ relative partition coefficient ของสารสองชนิด หาได้จากอัตราส่วนของ partition coefficient หรืออัตราส่วนของแฟกเตอร์ความจุของสารสองชนิดที่มีพีกติดกัน ดังนี้

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

α	=	ค่าซีเล็คติวิตี
k'_1	=	ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกแรก
k'_2	=	ค่าแฟกเตอร์ความจุของพีกที่สอง
t'_{R1}	=	corrected retention time ของพีกแรก
t'_{R2}	=	corrected retention time ของพีกที่สอง



รูปที่ 2.19 แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสารสองชนิด

ค่าซีเล็คติวิตี(α) เป็นค่าที่มีความสำคัญมาก คือเป็นตัวบอกให้ทราบว่าคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่นั้นอยู่ในสถานะที่มีการทำงานดีเพียงใด ค่านี้ขึ้นกับองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ พื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิ ในการแยกสาร α จะต้องมามีค่ามากกว่า 1 จึงจะมีการแยกเกิดขึ้น ถ้า $\alpha = 1$ แสดงว่าพีกทั้งสองทับกัน เนื่องจากพีกทั้งสองมีเวลาการคงไว้เท่ากัน ค่า α เหมาะสมคืออยู่ในช่วง 1.5 - 4.0

การควบคุมหรือปรับเปลี่ยนค่าซีเล็คติวิตี(α)

เพื่อให้สารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันได้ดีขึ้นเท่านั้น ทำโดยวิธีต่างๆดังนี้

7.1 ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นการปรับความแรงของเฟสเคลื่อนที่ โดยการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่คือเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลาย

7.2 เปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่ วิธีนี้นิยมใช้กับการแยกสารที่มีการแตกตัวเป็นไอออน เช่นพวกกรดหรือเบส การปรับเปลี่ยน pH ของเฟสเคลื่อนที่มักจะทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลง แต่ค่า k' เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ส่วนมากใช้ในวิธีการแลกเปลี่ยนไอออน(ion-exchange), ไอออนแพร์ (ion-pair)

7.3 เปลี่ยนเฟสอยู่กับที่ ทำโดยการเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์วิธีนี้ไม่สะดวก เสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าการปรับเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่ จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม แต่ให้ผลดีมาก ถ้ามีการเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่เฟสเคลื่อนที่ก็ต้องมีการปรับเปลี่ยนให้มีความแรงพอที่จะทำให้ได้ค่า k' ที่เหมาะสม

7.4 เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้ค่า k' ลดลง ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ จำเป็นต้องลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อเป็นการชดเชยให้ค่า k' อยู่ในช่วงที่เหมาะสม การเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า α เพียงเล็กน้อย

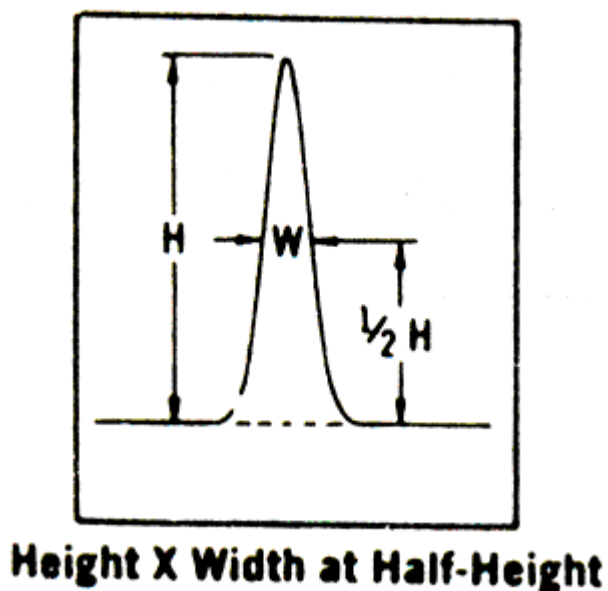
7.5 ใช้ปฏิกิริยาพิเศษทางเคมี ปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือคอมเพล็กซ์เซชัน(complexation) โดยการเติมซิลเวอร์ไนเตรท(silver nitrate) ลงในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งซิลเวอร์ไอออนนี้จะปฏิกิริยาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ t_R และ α ทำให้การแยกดีขึ้น

8. ประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของพีคที่ถูกชะออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีคแต่ละพีคที่ถูกชะออกมาจะต้องมีฐานที่แคบและแยกออกจากกันได้ ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (number of theoretical plates, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์(Height equivalent to a theoretical plate, H หรือ HETP)

จำนวนเพลทของคอลัมน์ (N) เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ว่า คอลัมน์นั้นมีการบรรจุดีเพียงใด พิจารณาจากความกว้างของพีคขณะเคลื่อนผ่านคอลัมน์ โดยเปรียบเทียบความกว้างของพีคกับเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์ สามารถคำนวณได้จากโครมาโทแกรมดังนี้

$$N = a \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

N	=	จำนวนเพลท (number of theoretical plates)
t_R	=	เวลาการคงไว้ของสาร
W	=	ความกว้างของพีคที่ตำแหน่งของความสูงที่กำหนด
a	=	ค่าคงที่ขึ้นกับวิธีการวัดความกว้างของพีค ตามตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.20 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณจำนวนเพลทของคอลัมน์ (N)

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าคงที่ a จากการวัดความกว้างของพีคโดยวิธีต่างๆ

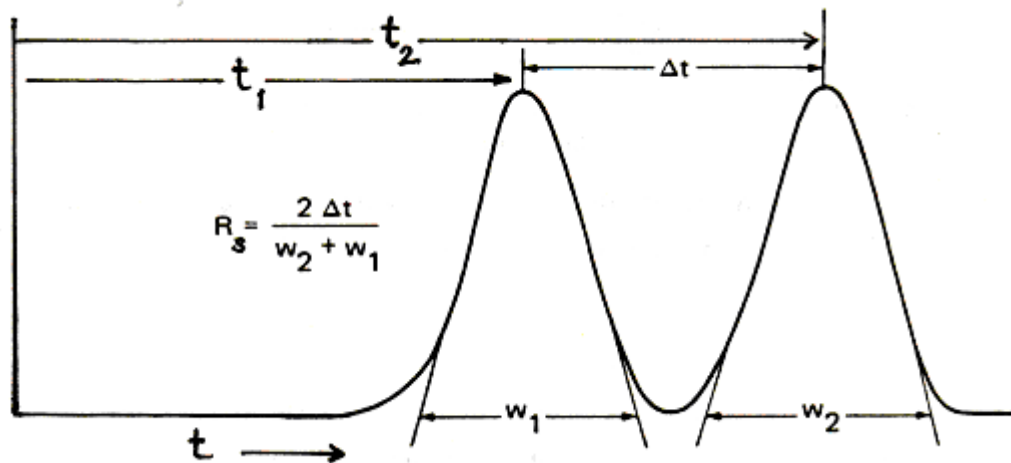
วิธี	a
ความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง	5.54
ความกว้างของพีคที่ 4.4 % ของความสูง(5σ)	25
Tangent	16

9. ค่าความสามารถในการแยก(Resolution, R_s)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีคทั้งสอง จำนวนได้จากระยะห่างกันระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุดของพีคทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีคทั้งสอง ดังแสดงในรูปที่ 2.21

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} = \frac{2\Delta t_R}{W_1 + W_2}$$

R_s	=	ค่าความสามารถในการแยก(Resolution)
t_{R1} และ t_{R2}	=	เวลาการคงไว้ของพีคที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
W_1 และ W_2	=	ความกว้างของพีคที่ 1 และ 2 ตามลำดับ
Δt_R	=	ระยะห่างระหว่างจุดสูงสุดของพีคทั้งสอง



รูปที่ 2.21 แสดงโครมาโทแกรมสำหรับคำนวณค่าการแยก(Resolution, R_s)

ถ้าพิกสมมาตร R_s มีค่าเท่ากับ 1.5 แสดงว่าการแยกของพิกทั้งสองลงถึงเบสไลน์จะมีการทับกันเพียงประมาณ 0.3% ถือเป็นการแยกอย่างสมบูรณ์ ถ้า R_s มีค่าเท่ากับ 1.0 พิกทั้งสองจะทับกันบางส่วนคือประมาณ 2% และการแยกนี้สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้า R_s มีค่าเท่ากับ 0.75 พิกทั้งสองจะทับกันมาก ไม่สามารถใช้งานด้านวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ถ้า R_s มีค่าสูงเกินไป พิกทั้งสองจะห่างกันมาก ทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลายโดยไม่จำเป็น ดังนั้นการแยกควรปรับสภาวะของการแยกเพื่อให้ได้ค่า R_s ที่เหมาะสม

จะเห็นว่าค่าความสามารถในการแยกเกี่ยวข้องกับเวลาการคงไว้และความกว้างของพิก คือ เวลาการคงไว้เกี่ยวข้องกับ แฟกเตอร์ความจุ(k') และค่าซีเล็คติวิตี (α) ส่วนความกว้างของพิกเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์(N) ค่า R_s จะเพิ่มเมื่อ Δt เพิ่ม และความกว้างของพิกต้องลดลง จากความสัมพันธ์ของค่าความสามารถในการแยกกับพารามิเตอร์ดังกล่าวสามารถเขียนเป็นสมการความสัมพันธ์ได้ดังนี้

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (1) \quad (2) \quad (3)$$

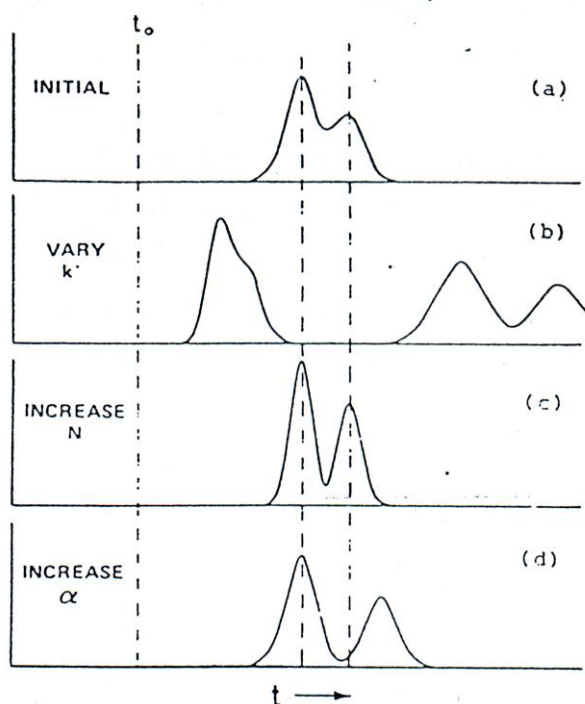
จากสมการสามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุดและใช้เวลาน้อย ได้สามวิธี คือการปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ(k'), ค่าซีเล็คติวิตี(α) และ จำนวนเพลท(N) ในการทำงานจะต้องพิจารณาว่า ควรปรับพารามิเตอร์ตัวใดก่อน-หลังเพื่อให้การแยกดี

ขึ้น สิ่งที่ยากและสะดวกคือ ควรปรับค่าแฟกเตอร์ความจุ และ ค่าซีเล็คติวิตีก่อน ถ้าการแยกยังไม่ดี จึงปรับค่าจำนวนเพลท ซึ่งไม่สะดวกและเสียค่าใช้จ่ายสูง

จากสมการ เทอมที่ 1 ประสิทธิภาพของคอลัมน์(Efficiency) เกี่ยวข้องกับอิทธิพลทางไคเนติก(kinetic effect) ที่มีผลต่อความกว้างของพีคคือ $\sqrt{N}$ เทอมที่ 2 ค่าซีเล็คติวิตี (selectivity) และเทอมที่ 3 ค่าแฟกเตอร์ความจุ(capacity) เกี่ยวกับเทอร์โมไดนามิกส์ของสารที่ทำการแยก คือ ขึ้นกับค่าการกระจายตัวของสาร (distribution coefficient, K) และปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ พารามิเตอร์ในเทอมที่ 2 คือ ค่าซีเล็คติวิตี(selectivity, α) เกี่ยวข้องเฉพาะกับคุณสมบัติของสารทั้งสองชนิดเท่านั้น ส่วนพารามิเตอร์ในเทอมที่ 3 คือ ค่าแฟกเตอร์ความจุ (capacity, k') เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทั้งของสารและคอลัมน์

การปรับค่าประสิทธิภาพของคอลัมน์(column efficiency, N) การปรับค่า N เพื่อให้ความสามารถในการแยกดีขึ้นนั้นเป็นทางเลือกสุดท้ายเพราะเสียค่าใช้จ่ายสูงและไม่สะดวก การเพิ่มค่า N ทำโดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ ทำให้พีคแคบลง โดยทั่วๆ ไปมักจะลดค่า H (height equivalent of a theoretical plate) ซึ่งค่า H นี้มีความสัมพันธ์กับค่า N คือค่า H ต่ำ ค่า N จะสูง การลดค่า H ทำโดยการเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ลดขนาดของอนุภาคของสารบรรจุในคอลัมน์ ลดความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ (เพื่อเพิ่มอัตราการกระจายตัวของสารในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีคแคบลง) และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์

ตัวอย่างแสดงผลของการปรับค่า k' , α และ N ที่มีต่อ resolution ดังในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 โครมาโทแกรมแสดงผลของการปรับค่า k' , α และ N ที่มีต่อ resolution (R_s)

จากรูปที่ 2.22 สามารถอธิบายผลของการปรับค่า k' , α และ N ที่มีต่อความสามารถในการแยกได้ดังนี้ เช่น การแยกสารสองชนิด ด้วยรีเวิร์สเฟสคอลัมน์ ใช้ส่วนผสมของน้ำและเมทานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่ เริ่มด้วยใช้เมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 50:50 สารทั้งสองจะแยกดังในรูป (a) ถ้า k' ที่ได้อยู่ในช่วง $0.5 < k' < 2$ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการปรับค่า k' ก่อน เพราะสะดวก ถ้าต้องการลดค่า k' จะต้องเพิ่มความแรงของเฟสเคลื่อนที่ คือเพิ่มสัดส่วนของเมทานอลต่อน้ำเป็น 70:30 ผลการแยกไม่ดี พิกัดทับกันดังในรูป (b) ด้านซ้าย เพราะฉะนั้นต้องเพิ่มค่า k' เพื่อให้การแยกดีขึ้น โดยลดความแรงของเฟสเคลื่อนที่ เป็น 35:65 การแยกดีขึ้น แต่ความสูงของพีกลดลงมาก และใช้เวลานาน ดังในรูป (b) ด้านขวา รูป (c) เป็นการปรับค่า N โดยการเพิ่มจำนวนเพลท เช่นความยาวของคอลัมน์จาก 10 เซนติเมตร เป็น 15 เซนติเมตร ผลของการแยกพิกัดเบลง ความสูงเพิ่มขึ้น เวลาไม่เปลี่ยนไปจากเริ่มแรก (โดยทั่วไปการเพิ่มค่า N หรือความยาวของคอลัมน์ เวลาจะเปลี่ยน แต่ในกรณีนี้เข้าใจว่าอัตราส่วนของน้ำหนักของสารตัวอย่างต่ออนุภาคของคอลัมน์ ไม่เปลี่ยนแปลง) รูป (d) เป็นการปรับค่า α โดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่จากเมทานอลเป็นอะซิโตรไนท์ เช่นใช้ 40% อะซิโตรไนท์ในน้ำ ผลการแยกดีขึ้นเวลาการคงไว้และความสูงของพีกละเปลี่ยนไม่มากนัก

การตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability)

เป็นการตรวจสอบให้แน่ใจว่าระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ซึ่งการตรวจสอบนี้ เป็นการตรวจสอบเกี่ยวกับเครื่องมือ ระบบไฟฟ้า วิธีการและสภาวะของการทดลอง พารามิเตอร์ที่ใช้เพื่อทำการตรวจสอบ ได้แก่ ความเที่ยง หาได้จากค่า Relative Standard Deviation (S_R) และ ค่าการแยก หาได้จากจำนวนเพลททางทฤษฎี(Plate count or column efficiency, N) เทลลิง แฟกเตอร์(tailing factor, T) และค่าความสามารถในการแยก (Resolution, R_S)

ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์(Relative standard deviation, S_R) เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องมือ ทำโดยการนิศสารละลายของสารมาตรฐาน ที่ใช้ในการวิเคราะห์ซ้ำๆ กัน ในกรณีที่กำหนด ค่า S_R ไม่เกิน 2% ต้องคำนวณจากข้อมูลที่ได้จากการนิศสาร 5 ครั้ง และถ้ากำหนดค่า S_R เกิน 2% ต้องคำนวณจากข้อมูลที่ได้จากการนิศ 6 ครั้ง

ค่า S_R คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ได้จากสูตร

$$S_R (\%) = \frac{100}{\bar{X}} \left[\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$\begin{aligned}
 X_i &= \text{ค่าการตอบสนอง(Response) อาจเป็นความสูงของพีค(Peak height) พื้นที่ของพีค(Peak area) หรือ เวลาในการคงไว้ (Retention time) ของการฉีดสารแต่ละครั้ง} \\
 N &= \text{จำนวนครั้งในการฉีดสาร} \\
 \overline{X} &= \text{ค่าเฉลี่ยของการตอบสนอง}
 \end{aligned}$$

ค่า S_R ขึ้นกับความแม่นยำของเครื่องมือ ไม่สามารถที่จะแก้ไขให้ดีขึ้นด้วยการปรับสภาวะของการทดลอง

จำนวนเพลททางทฤษฎี(Plate count or column efficiency, N)

เป็นการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มักจะใช้ค่านี้ตรวจสอบระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability) ในกรณีที่ทำการวิเคราะห์สารชนิดเดียวเป็นการบอกถึงความแหลมของพีค ค่านี้มีความสำคัญในกรณีที่ทำการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ

ค่า N หาได้จากสูตร

$$N = 16 \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

ค่าความสามารถในการแยก(Resolution, R_s)

เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคสองพีคที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีคทั้งสอง ค่านี้บอกถึงประสิทธิภาพของระบบการแยกเพื่อให้แน่ใจว่า สารมาตรฐานภายในแยกออกจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ การแยกที่สมบูรณ์ มีค่า $R_s = 1.5$ แต่ค่า $R_s = 1$ ก็สามารถใช้สำหรับงานวิเคราะห์ได้ ในการวิเคราะห์ยาตาม USP มักจะกำหนดด้วยค่าที่ใช้ในการหาค่า R_s

ค่า R_s หาได้จากสูตร

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_2 + W_1}$$

เทลลิง แฟกเตอร์(Tailing Factor, T)

เป็นค่าที่วัดหรือบอกถึงความสมมาตรของพีค ถ้าพีคสมมาตร ค่า T มีค่า = 1 ถ้าค่า T มีค่ามากกว่า 1 พีคจะไม่สมมาตร คือพีคเป็นหางทำให้การตรวจวัดและผลการวิเคราะห์ไม่น่าเชื่อถือ ถ้า $T > 2.0$ แสดงว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพต่ำ

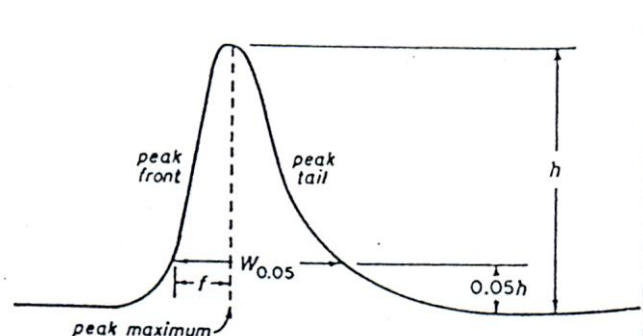
ค่า T หาได้จากสูตร

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

T = เทลลิง แฟกเตอร์(tailing factor)

$W_{0.05}$ = ความกว้างของพีกที่ความสูง 5% จากเบสไลน์

f = ระยะทางระหว่างจุดสูงสุดของพีกไปยังส่วนลาดของพีก
ด้านหน้า คำนวณที่ 5 % ของความสูงจากเบสไลน์



รูปที่ 2.23 แสดงความไม่สมมาตรของพีก(asymmetrical peak)

การตรวจสอบเหล่านี้ หาได้จากการรวบรวมข้อมูลจากการนิรสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายของสารอื่นๆ ที่กำหนด หรือหาค่าระบบที่ใช้วิเคราะห์(System suitability) ได้จากสารที่ทำการวิเคราะห์ บางครั้งในการวิเคราะห์อาจไม่ได้ค่าระบบที่ใช้วิเคราะห์ตามที่กำหนด ซึ่งสามารถที่จะปรับปรุงแก้ไขค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้ เช่นค่า T หาโดยการเปลี่ยนส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น

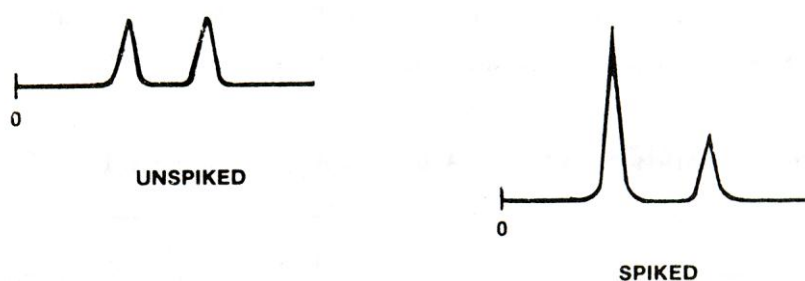
การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ(Qualitative Analysis)

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารเพื่อตรวจเอกลักษณ์ วัดปริมาณและสามารถแยกเก็บสารแต่ละชนิดที่แยกออกมาได้ การตรวจเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำได้โดยเปรียบเทียบค่าเวลาการคงไว้กับสารมาตรฐานโดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์โดยมีสภาวะต่างๆ เหมือนกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เป็นต้น สารที่ให้ค่าเวลาการคงไว้ต่างกันภายใต้การวิเคราะห์สภาวะเดียวกัน แสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน อย่างไรก็ตาม สารที่ให้ค่าเวลาการคงไว้เท่ากันอาจเป็นสารต่างชนิดกันก็ได้ จะต้องวิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อเพิ่มความมั่นใจ โดยวิธีการดังนี้

1. ทำการวิเคราะห์ใหม่โดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์ หรือ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่
2. ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างเดิมโดยใช้เทคนิคอื่น
3. นำส่วนที่แยกได้จาก HPLC ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่น

เทคนิคที่ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสาร

1. เปรียบเทียบเวลาการคงไว้รายละเอียดดังกล่าวมาแล้วข้างต้น
2. เปรียบเทียบปริมาตรการคงไว้ ถ้าสารตัวอย่างให้ปริมาตรการคงไว้ต่างจากสารมาตรฐานเมื่อทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกัน ก็แสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน แต่ถ้าปริมาตรการคงไว้เท่ากัน สารตัวอย่างก็อาจเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน
3. เปรียบเทียบเวลาการคงไว้สัมพันธ์กับสารมาตรฐานชนิดอื่นที่ให้ค่าเวลาการคงไว้ไม่ตรงกัน เช่น ต้องการตรวจเอกลักษณ์ของสารตัวอย่างว่าเป็นโคเคอินหรือไม่ ก็อาจใช้ โคดีอินเป็นสารมาตรฐานชนิดที่สอง โดยเติมโคเคอินลงในสารมาตรฐานโคเคอินและลงในสารตัวอย่างด้วย จืดสารผสมทั้งสองเข้า HPLC สารผสมละ 1 – 2 ครั้ง เปรียบเทียบอัตราส่วนเวลาการคงไว้ของโคเคอินกับโคเคอิน และของสารตัวอย่างกับโคเคอิน ถ้าอัตราส่วนทั้งสองต่างกัน แสดงว่าสารตัวอย่างไม่ใช่โคเคอิน แต่ถ้าเท่ากันสารตัวอย่างอาจเป็นโคเคอินต้องเพิ่มความมั่นใจโดยวิธีต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น
4. การเติม(Spiking) ในกรณีนี้วิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วแยกได้ 2 พีก ถ้าทราบว่าสารตัวอย่างเป็นสารผสมของ A และ B แต่อยากทราบว่าพีกใดเป็นของ A พีก ใดเป็นของ B ก็ทำได้ โดยเติมสารมาตรฐาน A หรือ B ลงไป เช่น ถ้าเติมสาร A ลงไป พีกที่มีพื้นฐานมากหรือสูงขึ้นก็แสดงว่าเป็นพีกของสาร A ดังรูป 2.24



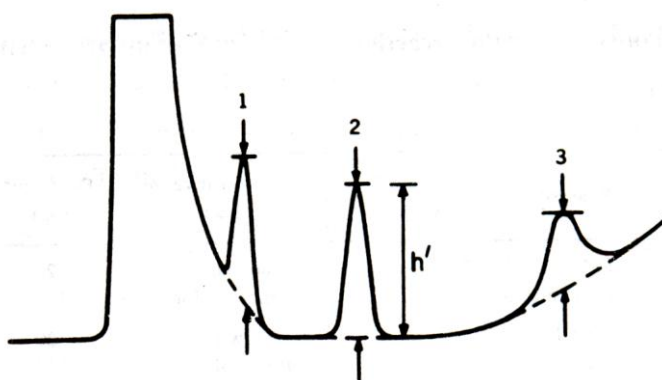
รูปที่ 2.24 แสดงการวิเคราะห์พีกด้วยเทคนิคการเติม(spiking)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ(Quantitative Analysis)

หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็นพีคต่างๆ ปริมาณของสารในแต่ละพีคก็สามารถคำนวณได้ดังนี้

1. โดยวัดความสูงของพีค เทียบกับความสูงของพีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป เนื่องจากความสูงของพีคจะแปรตามปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเครื่องตรวจวัด

ความสูงของพีค(H) วัดระยะจากเบสไลน์ถึงจุดสูงสุดของพีค ดังแสดงที่พีคที่ 2 ในรูปที่ 2.25 การวัด H ทำได้ง่ายและสะดวกโดยใช้ไม้บรรทัดหรือนับช่องตารางในกระดาษ หรือได้จากคอมพิวเตอร์ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัด กรณีที่ เบสไลน์ครีฟสามารถแก้ไขโดยลากเส้นเบสไลน์จากจุดที่เริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดของพีค ดังแสดงที่พีค 1 และ 3 ในรูปที่ 2.25 อย่างไรก็ดี ถ้าต้องการให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มีความเที่ยงดี เบสไลน์ควรอยู่ในแนวราบ ดังแสดงที่พีค 2



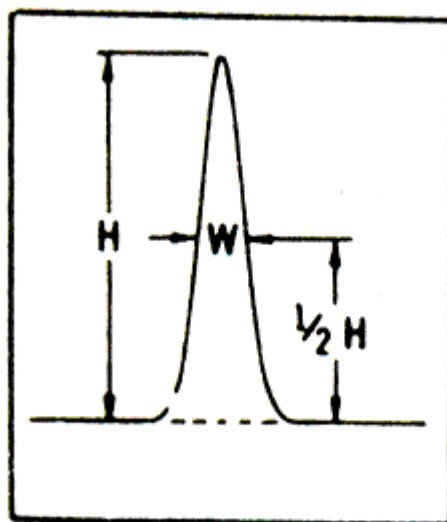
รูปที่ 2.25 การวัดความสูงของพีค

เมื่อใช้วิธีนี้ต้องควบคุมไม่ให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนเนื่องจากจะมีผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างของพีค ซึ่งทำให้ความสูงของพีคเปลี่ยนไป นอกจากนี้วิธีนี้ห้ามใช้กับพีคที่มีหางพีคที่มีลักษณะกว้าง เพราะจะทำให้ที่คำนวณได้ไม่ถูกต้อง

2. โดยวัดพื้นที่พีค ของสารตัวอย่างกับพื้นที่พีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป วิธีนี้ให้ผลแม่นยำกว่าวิธีแรก

การหาพื้นที่พีคทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. คำนวณจากความสูงของพีค(H) ความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง (W) วิธีนี้เหมาะสำหรับพีคที่มีรูปร่างใกล้เคียงกับการกระจายแบบเกาส์เซียนดังแสดงในรูปที่ 2.26



Height X Width at Half-Height

รูปที่ 2.26 การคำนวณพื้นที่ของพีค โดยใช้ความสูงของพีค(H) คูณกับความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง(W)

2. ตัดพีคแล้วชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด เทียบกับน้ำหนักของพีคของสารมาตรฐาน วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้
3. ใช้เครื่องคอมพิวเตอร์คำนวณ วิธีนี้ให้ผลแม่นยำกว่า 2 วิธีข้างต้น และประหยัดเวลา แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสำหรับเครื่องมือดังกล่าว

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่าง

เมื่อผู้วิเคราะห์ทราบความสูงหรือพื้นที่พีคของสารมาตรฐานแล้ว ต้องนำมาทำกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่าง เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวอย่างมีดังนี้

1. Internal standard technique

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยเติมสารที่ต่างชนิดกับสารตัวอย่าง(internal standard) ลงไปในสารตัวอย่างและสารมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากันก่อนนำไปฉีด ปริมาณที่ใช้ควรให้พีคที่มีขนาดใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานภายใน(Internal standard) ต้องมีคุณสมบัติดังนี้

- (1) ไม่ใช่สารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง
- (2) เป็นสารบริสุทธิ์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง
- (3) ให้พีคที่ไม่ซ้อนกับพีคจากสารตัวอย่างและมีเวลาการคงไว้ไม่มากเกินไป

(4) เป็นสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง และสามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดเดียวกัน

เทคนิคนี้มีข้อดีที่สารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างไม่จำเป็นที่จะต้องถูกชะออกมาหมดทุกตัว เพียงแต่สารที่ต้องการจะวิเคราะห์และสารมาตรฐานภายในที่เติมลงไปถูกชะออกมาหมดก็พอแล้ว

2. External standard technique

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยฉีดสารละลายสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กันโดยปริมาตรต้องเท่ากันและแม่นยำ วัดพื้นที่ใต้พีค และนำพื้นที่ใต้พีคที่กล่าวมาพลอตกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานจากนั้นฉีดสารตัวอย่างปริมาตรที่เท่ากับที่ฉีดสารมาตรฐาน วัดพื้นที่ใต้พีคนำมา หาค่าที่กราฟมาตรฐานทราบปริมาณในสารตัวอย่าง

วิธีนี้ไม่ถูกต้องเท่า Internal standard technique และจะให้ผลดีต่อเมื่อมีปัจจัยดังนี้

- (1) ปริมาตรสารมาตรฐาน และสารตัวอย่างที่ฉีดในแต่ละครั้งต้องเท่ากันและต้อง แม่นยำ
- (2) เวลาการคงไว้ของสารแต่ละตัวมีค่าคงที่
- (3) การทำงานของคอลัมน์ และการตอบสนองของดีเทคเตอร์ต้องคงที่ตลอดการวิเคราะห์
- (4) การหาค่าพื้นที่ใต้พีคของสารตัวอย่างต้องใช้กราฟมาตรฐานช่วงที่เป็นเส้นตรง

วิธีนี้สะดวกกว่า Internal standard technique ตรงที่ไม่ต้องหาสารมาตรฐานภายในซึ่งการหาชนิดที่เหมาะสมทำได้ยากถ้ามีพีคหลายพีคในสารตัวอย่าง

3. Area percent technique

วิธีนี้ไม่ต้องทำกราฟมาตรฐานใช้ในกรณีที่ต้องการทราบอัตราส่วนของสารแต่ละอย่างในของผสม เช่น ในการวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนในสารตัวอย่างในธรรมชาติเทียบกับองค์ประกอบหลักหรือ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทางปิโตรเคมี ซึ่งมีไฮโดรคาร์บอนหลายชนิด วิธีนี้จะใช้ในกรณีดังนี้

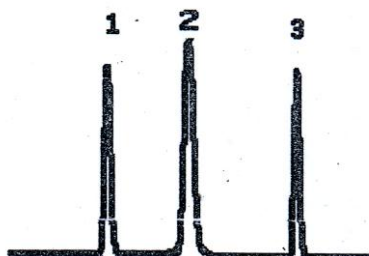
- (1) สารแต่ละอย่างในของผสมตอบสนองเครื่องตรวจวัดเท่าๆ กัน
- (2) สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบมีจำนวนจำกัด

การวิเคราะห์วิธีนี้ทำโดยฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC วัดพื้นที่ของแต่ละพีค นำผลรวมของทั้งหมดมาใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในสารตัวอย่าง

4. Standard addition technique แบ่งเป็น 2 วิธี

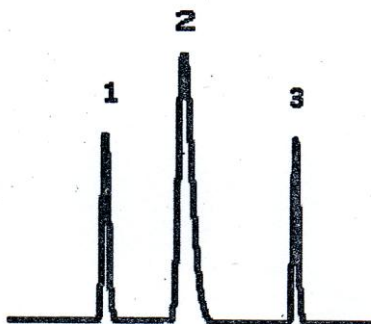
4.1 เป็นเทคนิคระหว่าง internal standard กับ External standard จะใช้ต่อเมื่อเครื่องตอบสนองเป็นเส้นตรง ใช้วิเคราะห์เมื่อสารตัวอย่างมีเพียง 2-3 ตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

(1) นำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์



รูปที่ 2.27 (a) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง

(2) นำสารตัวอย่างมาเติมสารมาตรฐานตัวที่ต้องการวิเคราะห์โดยทราบปริมาณที่แน่นอน แล้วนำไปวิเคราะห์



รูปที่ 2.27 (b) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน

เช่น ถ้าต้องการหาปริมาณของพีค 2 และ 3 ก็ให้เติมสารมาตรฐานของตัวที่ 2 และ 3 ลงไป

$$X_a = \frac{\text{Height of } -2a}{\text{Height of } -1a}$$

$$X_b = \frac{\text{Height of } -2b}{\text{Height of } -1b}$$

$$X_b - X_a = X_{added}$$

โดยความสูงจะสัมพันธ์กับความเข้มข้น

$$\frac{X_a}{X_{added}} = \frac{[C_2]_a}{[C_2]_{added}}$$

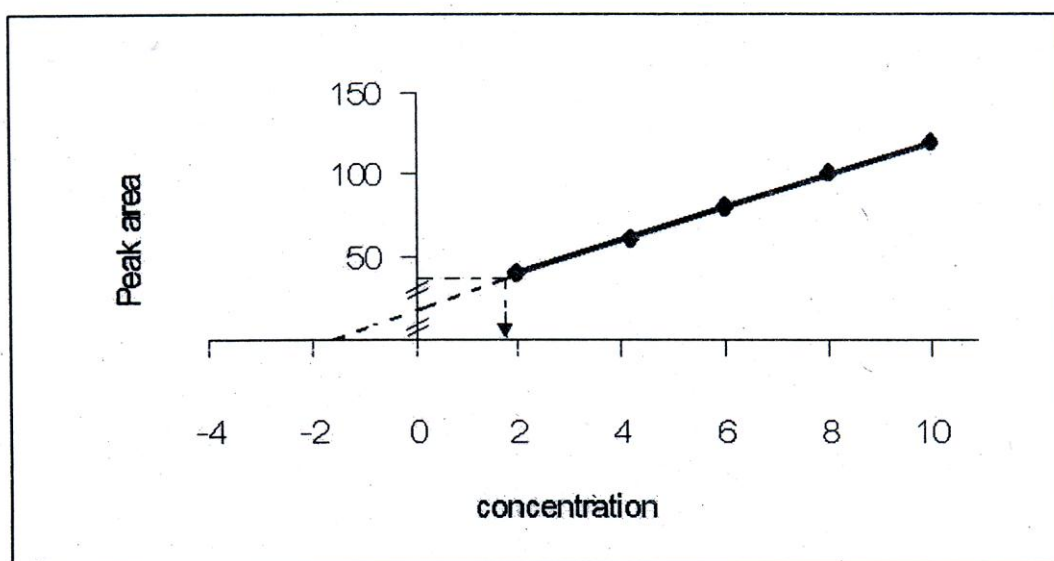
$$[C_2]_a = \left[\frac{X_a}{X_{added}} \right] \times [C_2]_{added}$$

ในทำนองเดียวกัน unknown 3 ก็สามารถหาได้เช่นกัน จะเห็นว่าวิธีการนี้ สารตัวที่ 1 ทำหน้าที่คล้ายสารมาตรฐานภายใน

4.2 Standard addition calibration curve ใช้สารมาตรฐานของ unknown เดียวมาหลายๆ ความเข้มข้น แล้วทุกๆ ความเข้มข้นเติม unknown ลงไปปริมาณที่เท่ากัน เมื่อนำไปวิเคราะห์แล้ว ให้พลอตกราฟระหว่างพื้นที่พีคกับปริมาณสารมาตรฐาน จากนั้นหาปริมาณ unknown ได้ 2 วิธี คือ

4.2.1 ลากเส้นตรงต่อจากเคอร์ฟมาตัดแกน -x ขนาดที่อ่านได้ที่แกน -x คือ ปริมาณของ unknown (คิดค่าเป็นบวก)

4.2.2 จากจุดตัดแกน y ให้นำค่าที่เท่ากันทบขึ้นไปทางด้านบนของแกน y แล้ว ลากมาตัดกับเส้นเคอร์ฟมาตรฐาน จากนั้นอ่านค่าที่ได้บนแกน x



รูปที่ 2.28 การหาปริมาณ unknown โดยวิธี Standard addition calibration curve

การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ ปัญหาที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับเฟสเคลื่อนที่คือ การมีสารปนเปื้อน สารที่เติมในตัวทำละลาย(additive) มีฝุ่นผง หรือการละลายของอากาศ

สิ่งสำคัญในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่คือจะต้องพิจารณาถึงคุณภาพของตัวทำละลายและของเกลืออินทรีย์ที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์จะต้องปราศจากสารปนเปื้อน เพราะสารปนเปื้อนเหล่านี้จะไปติดตรงส่วนต้นของคอลัมน์หรือบนพื้นผิวของคอลัมน์ ทำให้เบสไลน์ไม่เรียบ เกิดฟีกที่ไม่ต้องการ และ เวลาการคงไว้ของสารเปลี่ยนไป หรือในกรณีที่ต้องการเก็บสารละลายที่ถูกพาออกมาไปทำการวิเคราะห์วิธีอื่น จะต้องแยกสารปนเปื้อนออก มิฉะนั้นจะทำให้ตัวกรองในปั๊มและท่อต่างๆ ตันได้

ปัญหาหลักที่เกิดใน HPLC คือฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่ ฟองอากาศอาจเข้าไปในปั๊มในเซลล์ของเครื่องตรวจวัด หรือส่วนอื่นๆ ของเครื่อง ถ้าเข้าไปในปั๊มจะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ และถ้าเป็นฟองขนาดใหญ่ จะทำให้เฟสเคลื่อนที่หยุดไหล ถ้าฟองอากาศเข้าไปในเซลล์ของเครื่องตรวจวัด ทำให้ เบสไลน์ไม่เรียบ หรืออาจให้ค่าการดูดกลืนรังสีสูง ในกรณีที่ใช้เครื่องตรวจวัดแบบยูวีออกซิเจนที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ จะรบกวนการตรวจวัดค่าดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นสั้นเนื่องจากออกซิเจนดูดกลืนรังสีได้ดีในช่วงความยาวคลื่นต่ำกว่า 200 nm การขจัดฟองอากาศทำได้โดยการไล่ด้วยสูญญากาศ(vacuum), เครื่องอัลตราโซนิก, กรองด้วยเมมเบรน หรือผ่านก๊าซเฉื่อย เช่น ฮีเลียม เป็นต้น ในทางปฏิบัติเมื่อบรรจุเฟสเคลื่อนที่ลงในภาชนะบรรจุจะสัมผัสกับอากาศอีก ดังนั้นในกรณีที่ฟองอากาศหรือออกซิเจนในเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ห้มัก จะต้องทำการไล่อากาศทุกชั่วโมงหรือผ่านก๊าซฮีเลียมซ้ำๆ ไปในเฟสเคลื่อนที่ขณะทำการวิเคราะห์ ข้อควรระวังในการไล่อากาศคือต้องไม่ทำให้ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยน

ตัวทำละลายชนิดรีเอเจนท์เกรด(reagent grade) จะมีสารปนเปื้อนในหลายระดับ ซึ่งไม่เหมาะที่จะใช้กับงาน HPLC ในระยะยาว สารปนเปื้อนบางอย่างอาจมาจากการเติมสารแอนติออกซิเดนต์(antioxidants) ดังนั้นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ควรเป็นเกรด HPLC

น้ำกลั่นหรือน้ำ ปราศจากไอออนมักจะมีสารอินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ด้วย เมื่อใช้ในระยะยาวจะมีปัญหาเกิดขึ้นกับคอลัมน์ชนิดรีเวิร์สเฟสเพราะเฟสอยู่กับที่เป็นพวกไม่มีขั้วจะจับสารอินทรีย์เหล่านี้ไว้บนพื้นผิว ทำให้ลักษณะของเฟสอยู่กับที่เปลี่ยนไป และบางครั้งทำให้เกิดฟีกที่ไม่ต้องการ การทำน้ำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นหรือโดยการกรองผ่าน Millipore system ซึ่งประกอบด้วย carbon filters, mixed – bed, ion – exchange และกระดาษกรองขนาด 0.2 μm ตามลำดับ วิธีนี้เป็นการแยกของสารปนเปื้อนชนิดอินทรีย์ อนินทรีย์ และอนุภาคออกจากน้ำ

สารปนเปื้อนในตัวทำละลายอื่นๆ นอกจากน้ำมักจะมีผลต่อการแยกและการตรวจวัดหรือทั้งสองอย่าง ตัวทำละลายประเภท คลอริเนตไฮโดรคาร์บอน(chlorinated hydrocarbon) เช่น ไดคลอโรมีเทน(dichloromethane) และ ไตรคลอโรมีเทน(trichloromethane) มักจะเติมเมทานอลหรือ เอทานอลเป็นตัวกลางป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งอัลกอฮอล์นี้จะเพิ่มความมีขั้ว

ให้กับเฟสเคลื่อนที่ ทำให้ เวลาการคงไว้ของสารลดลงและความเข้มข้นของ อัลกอฮอลล์ที่เดิมนี้ มักจะไม่เท่ากันในแต่ละครั้ง ดังนั้นทำให้ผลวิเคราะห์ไม่คงที่ ซึ่งสามารถแยกตัวกลางออกโดยการ กรองผ่านคอลัมน์อะลูมินาหรือสกัดออกด้วยน้ำแล้วทำให้ปราศจากน้ำก่อนนำไปใช้ ส่วนตัวทำ ละลาย คลอริเนตไฮโดรคาร์บอนที่ไม่เติมตัวกลางจะมีการสลายตัว อย่างช้าๆ เกิดกรดไฮโดร- คลอริก ซึ่งจะทำลายท่อสแตนเลสต่างๆของเครื่อง และอัตราการสลายตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับ ตัวทำละลายอื่น

ในกรณีที่ใช้ ยูวี ดีเทคเตอร์ จะต้องพิจารณาค่าการดูดกลืนรังสีในช่วงยูวีของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งค่าการดูดกลืนรังสีจะเพิ่มขึ้น เมื่อความยาวคลื่นลดลง โดยพิจารณาจากค่า UV cut-off ของตัว ทำละลาย ที่เป็นตัวบอกให้ทราบว่า ที่ความยาวคลื่นต่ำกว่านี้ ตัวทำละลายจะให้ค่าการดูดกลืนรังสี เท่ากับ 1 หรือสูงกว่า 1 AU เมื่อใช้เซลล์ขนาด 1 cm ตัวทำละลายพวกอะลิฟาติก ไฮโดรคาร์บอน จะมี UV cut-off ที่ความยาวคลื่นประมาณ 210 nm ตัวทำละลายชนิดมีขั้วที่ดีที่สุดสำหรับใช้ ในช่วงความยาวคลื่นต่ำ ได้แก่ เมทานอล และ อะซิโตนไนโกล์ ซึ่งมี UV cut off ที่ 205 และ 190 nm ตามลำดับ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาคคุณสมบัติอย่างอื่นของตัวทำละลาย เช่น ความหนืด, ค่า ดัชนีการหักเหของแสง, ค่าความดันไอ, จุดวาบไฟ กลิ่นและความเป็นพิษ

การผสมตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำโดยการแยกกันตวงปริมาตรของตัวทำ ละลายแต่ละชนิด แล้วมาผสมรวมกัน เนื่องจากเมื่อผสมกันแล้วปริมาตรจะเปลี่ยนไป เช่น ถ้าผสม เมทานอล 50 mL กับน้ำ 50 mL ปริมาตรรวมจะได้เพียง 96 mL ซึ่งเป็นส่วนผสมในอัตรา 1 : 1 แต่ถ้าเตรียมเฟสเคลื่อนที่ โดยการตวงปริมาตรของตัวทำละลายเมทานอลลงในขวดตวง แล้วปรับ ปริมาตรด้วยน้ำ เฟสเคลื่อนที่ที่ได้จะไม่ใช้ส่วนผสมในอัตรา 1 : 1 การไล่อากาศของเฟสเคลื่อนที่ ที่มีตัวทำละลายที่ระเหยได้ อาจทำให้ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนไป ดังนั้นเมื่อใช้ ดีเทค- เตอร์ชนิดวัดดัชนีการหักเหของแสง จะต้องทำการตรวจสอบและควบคุมส่วนผสมของเฟส เคลื่อนที่ให้คงที่

การวัด pH ของเฟสเคลื่อนที่ ให้วัดค่า pH ที่แท้จริงของสารละลายที่เป็นน้ำ การเตรียม เฟสเคลื่อนที่มักจะละลายพวกเกลือของบัฟเฟอร์ในน้ำตามความเข้มข้นที่ต้องการ ปรับ pH แล้ว ผสมให้เข้ากันกับตัวทำละลายอินทรีย์ในสัดส่วนปริมาตร : ปริมาตร

ถ้าวัด pH ในสารละลายผสมของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ เรียกว่า “appearance pH” ซึ่ง ค่านี้อาจเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์เพิ่มขึ้น

การรักษาคอลัมน์ที่ใช้ใน HPLC

อายุการใช้งานของคอลัมน์จะยาวนานขึ้นถ้ารู้จักวิธีใช้และรักษา คือ

1. ไม่ควรใช้ตัวทำละลายที่กัดกร่อน เลือก pH ของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เกลือและตัวทำละลายที่ใช้จะต้องมีความบริสุทธิ์สูง
2. ไม่ควรเปลี่ยนอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่หรือความดันอย่างรวดเร็ว โดยต้องค่อยๆ เพิ่มจากน้อยไปหามาก
3. ไม่ควรปล่อยให้เฟสเคลื่อนที่ที่มีพวกเกลืออินทรีย์เหลือค้างอยู่ในคอลัมน์ ต้องล้างออกด้วยน้ำเพื่อป้องกันการตกตะกอน การเกิดเชื้อรา หรือแบคทีเรียในคอลัมน์
4. ไม่ควรทำคอลัมน์ตก หรือกระเทือนอย่างแรง หรือเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์อย่างรวดเร็ว
5. ควรให้เฟสเคลื่อนที่ไหลไปตามทิศทางของการบรรจุคือตามลูกศร และไม่ควรล้างคอลัมน์ในทิศทางกลับการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เพราะจะทำให้คอลัมน์เสียได้
6. ในกรณีที่เก็บคอลัมน์โดยทำให้ชุ่มด้วยเมทานอลเมื่อจะใช้บัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะต้องล้างคอลัมน์ด้วยน้ำก่อน จึงจะใช้บัฟเฟอร์
7. สารละลายตัวอย่างที่จะฉีดเข้าคอลัมน์จะต้องกรองให้ใสก่อนฉีด

การเก็บรักษาคอลัมน์

ในกรณีที่เก็บคอลัมน์ไว้นานๆ จะต้องล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และต้องให้ปลายคอลัมน์ทั้งสองด้านเปียกชุ่มด้วยตัวทำละลาย เพื่อป้องกันคอลัมน์แห้ง ไม่ควรเก็บคอลัมน์ที่ทำให้ชุ่มด้วยน้ำ เพราะจะทำให้เกิดเชื้อรา ควรเก็บใน 50 % ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อป้องกันเชื้อรา ไม่ควรเก็บคอลัมน์โดยทำให้เปียกชุ่มด้วยบัฟเฟอร์ เพราะจะตกตะกอนทำให้เกิดการอุดตันในคอลัมน์ ส่วนมากบริษัทที่จำหน่ายคอลัมน์มักจะให้ข้อแนะนำในการเก็บรักษาคอลัมน์ซึ่งแนวทางการเก็บคอลัมน์ในตัวทำละลายที่เหมาะสมดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการเก็บคอลัมน์

ชนิดของคอลัมน์	ตัวทำละลายที่ใช้เก็บ
Reversed Phase	Acetonitrile, Methanol or Methanol / Water mixtures
Normal Phase	Hexane
Ion Exchange	50% Methanol / Water
Non aqueous SEC	Normal Eluent
Aqueous SEC	0.01 M Sodium Azide

การเตรียมและทำความสะอาดสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย HPLC มาจากหลายแหล่ง และสารตัวอย่างส่วนมากไม่ใช่สารบริสุทธิ์มันจะมีสารปนเปื้อนต่างๆ กัน เช่น สารตัวอย่างยามีพวกสารช่วยที่มีการละลายแตกต่างกัน สารตัวอย่างจากของเหลวในร่างกาย มีพวกโปรตีน เกลือ และพวกสารอินทรีย์ ที่มีสภาพขี้ตัวต่างๆ กัน จึงจำเป็นต้องแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสิ่งปนเปื้อนต่างๆ

การเตรียมสารตัวอย่าง เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ไม่มีสารรบกวนและมีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะตรวจวัดได้ เหตุผลที่ต้องเตรียมสารตัวอย่างเนื่องจาก

1. สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายที่มีความแรงกว่าเฟสเคลื่อนที่ ทำให้การแยกไม่ดี หรืออาจทำลายคอลัมน์
2. การวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ จำเป็นต้องเตรียมให้มีความเข้มข้นพอเหมาะที่จะตรวจวัดได้
3. ตัวอย่างที่ซับซ้อน เช่น สารตัวอย่างจากของเหลวในร่างกาย มักจะมีโปรตีน และสารอินทรีย์ต้องแยกสารเหล่านี้ออกก่อน เพื่อป้องกันฟีกของสารเหล่านี้ทับกับฟีกของสารที่ต้องการวิเคราะห์
4. ในสารตัวอย่าง อาจมีสารที่ทำลายคอลัมน์ต้องแยกออกก่อน เพื่อให้อายุการใช้งานของคอลัมน์นานขึ้น

วิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ควรละลายตัวอย่างในเฟสเคลื่อนที่ ถ้าใช้ตัวทำละลายอื่นที่ไม่ใช่เฟสเคลื่อนที่ จะต้องทดสอบว่าเมื่อนิดสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์แล้ว จะไม่ตกตะกอนในเฟสเคลื่อนที่ ทำการทดสอบโดยการนิตสารละลายตัวอย่างในปริมาตรเท่าที่จะนิตเข้าคอลัมน์ลงในเฟสเคลื่อนที่ที่บรรจุหลอดแก้ว สังเกตดูว่ามีตะกอนเกิดหรือไม่ ถ้ามีการตกตะกอนไม่สามารถนิตสารละลายตัวอย่างนั้นเข้าคอลัมน์เพราะจะทำให้เกิดการอุดตันตรงส่วนต้นของคอลัมน์ต้องเปลี่ยนตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่างมีความแรงมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ควรนิตปริมาตรน้อยๆ มิฉะนั้นจะทำให้การแยกไม่ดี อาจเกิดฟีกที่มีไหล และจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอื่นละลายตัวอย่าง ควรเลือกตัวทำละลายที่มีความแรงอ่อนกว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับสารตัวอย่างที่เจือจางและสามารถนิตปริมาตรมากได้[15],[16]

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. Trevor M. Letcher และคณะ [17] ได้หาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ (Activity coefficients at infinite dilution, γ_{13}^∞ ; เมื่อ 1 คือตัวถูกละลาย และ 3 คือตัวทำละลาย) ของตัวถูกละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้วใน 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม-2-(2-เมทอกซี เอทอกซี) เอทิล ซัลเฟต โดยใช้เทคนิคแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี ได้มีการตรวจสอบอันตรกิริยาที่บริเวณรอยต่อของของเหลวกับแก๊สระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเหลวที่เป็นตัวทำละลายบนคอลัมน์ ได้มีการหาค่าการคงไว้จากตัวถูกละลายและแก๊สตัวพาเพื่อใช้ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ ในงานวิจัยนี้ได้มีการหาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ของอัลเคน(Alkane), อัลคีน(Alk-1-enes), อัลไคน์(Alk-1-yne) ไสโคลอัลเคน(Cycloalkanes), อะโรมาติก ไฮโดรคาร์บอน(Aromatic hydrocarbon) คาร์บอนเตตระคลอไรด์(Carbon tetrachloride) และเมทานอล(Methanol) ในไอออนิก ลิควิด ที่อุณหภูมิ 298.15, 303.15 และ 308.15 K ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ทำมาก่อนหน้านี้ แต่ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ใช้ไอออนิก ลิควิด 4 ชนิด ได้แก่ 1-เมทิล-3-ออกทิลอิมิดาโซเลียมคลอไรด์(1-methyl-3-octylimidazolium chloride), 1-เฮกซิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม เตตระฟลูออโรโบเรต(1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate), 1-เฮกซิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม เฮกซะฟลูออโรฟอสเฟต(1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate) และ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมบิส(ไตรฟลูออโรเมทิลซัลโฟนิล)อิมิด[1-ethyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl)imide] ผลที่ได้ถูกใช้ในการทำนายศักยภาพของตัวทำละลายสำหรับการแยกเฮกเซน(Hexane)และเบนซีน(Benzene)จากค่าจำเพาะที่คำนวณได้ ค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้จากระบบอื่น เพื่อให้เข้าใจถึงอิทธิพลของไอออนบวกและไอออนลบที่มีต่ออันตรกิริยาของตัวทำละลายและตัวถูกละลาย ค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ที่ได้จากอุณหภูมิต่างๆถูกใช้ในการคำนวณค่า molar excess enthalpies ที่ความเจือจางอนันต์ ($\Delta H_1^{E^\infty}$)

2. Fabrice Mutelet และคณะ [18] ได้หาค่าสัมประสิทธิ์แอกติวิตีที่ความเจือจางอนันต์ของสารประกอบอินทรีย์ 29 ชนิด ในไอออนิก ลิควิด ที่เป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง 2 ชนิด โดยใช้เทคนิคอินเวอร์สแก๊สโครมาโทกราฟี(Inverse gas chromatography) โดยวัดที่อุณหภูมิ 323.15 และ 343.15 K จากผลการทดลองพบว่าตัวถูกละลายส่วนใหญ่ถูกคงไว้โดยการแบ่งส่วน(Partition)และมีส่วนน้อยที่เกิดการดูดซับ(Adsorption)บน 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต และนอร์มอล อัลเคน ถูกคงไว้โดยการดูดซับบน 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียมโทซิลเลท

3. Zsombor Miskolczy และคณะ [19] ได้ศึกษาคุณสมบัติของไอออนิก ลิควิดที่ประกอบด้วย นอร์มอล ออกทิล ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้าและค่าความขุ่น จากการทดลองพบว่า 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ประพฤติตัวเป็นสารลดแรงตึงผิว(Surfactant) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.031 M ส่วน 1-เมทิล-3-ออกทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ไม่แสดงพฤติกรรมดังกล่าว

มิดาโซเลียม คลอไรด์ ให้สารละลายที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ แต่จะสามารถละลายน้ำได้มากขึ้นเมื่อเติมโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate) มากกว่า 2 เท่า เนื่องจากการสร้างไมเซลล์แบบผสมขึ้น ไอออนิก ลิควิดที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10 mM สามารถลดความมีขั้วของส่วนหางของไมเซลล์ของโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟตได้

4. A. Vicent Orchilles และคณะ [20] ได้วัดค่าความหนาแน่นของสารละลาย 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำและ 1-โพรพานอล ที่อุณหภูมิระหว่าง 278.15 จนถึง 328.15 K จากค่าความหนาแน่นที่หาได้ถูกใช้ในการคำนวณหาค่า molar volumes (V_ϕ) และค่า molar volume ที่ความเจือจางอนันต์ (V_ϕ^0) จากการทดลองพบว่าค่า V_ϕ^0 ของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ในน้ำมีค่าสูงกว่าใน 1-โพรพานอล และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่ในทางกลับกันค่า V_ϕ^0 ของ 1-บิวทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ออกทิล ซัลเฟต ใน 1-โพรพานอล ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

5. Enrique G. Yanes และคณะ [21] ได้นำ 1-เอทิล-3-เมทิลอิมิดาโซเลียม ในเตรท มาเป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์ในการแยกสารประกอบโพลีฟีนอลจากสารสกัดจากเมล็ดองุ่นโดยใช้เทคนิคแคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งกลไกการแยกนั้นเกี่ยวกับอิมิดาโซเลียมแคทไอออนและโพลีฟีนอล

6. A.Garcia และคณะ [22] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล, ฟินิล-เอเฟดริน และคลอเฟนิรามีน ในยาแก้หวัดโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอล [Poly(ethylene glycol)] ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.46 cm ยาว 15 cm ขนาดอนุภาค 5 μm ใช้ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20 mM pH 7.0 และอะซิโตน-ไคล์ ในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 mL.min⁻¹ และใช้ระบบการชะล้างแบบไอโซครติกใช้ยูวี-ดีเทคเตอร์ โดยที่ฟินิลเอเฟดรินและคลอเฟนิรามีน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 nm ส่วนพาราเซตามอลตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 310 nm

7. A.Marin และคณะ [23] ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอล, ฟินิล-เอเฟดริน และคลอเฟนิรามีน ในยาแก้หวัดที่เป็นแคปซูล โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงและเทคนิคแคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิส และเปรียบเทียบผลที่ได้จาก 2 เทคนิค ในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงนั้นจะใช้คอลัมน์ชนิดโพลีเอทิลีน ไกลคอล ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.46 cm ยาว 15 cm ขนาดอนุภาค 5 μm ใช้ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20 mM pH 7.0 และอะซิโตน-ไคล์ ในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 mL.min⁻¹ และใช้ระบบการชะล้างแบบไอโซครติก ใช้ยูวี-ดีเทคเตอร์ โดยที่ฟินิล-เอเฟดรินและคลอเฟนิรามีน ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 nm ส่วนพาราเซตามอลตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 305 nm ส่วนเทคนิคแคปิลลารี อิเล็กโทรโฟรีซิสใช้ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 40 mM pH 6.20 กับโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ที่ 30 kV ในหลอดซิลิกาแคปิลลารีที่ไม่มีการเคลือบ

