ภาคผนวก ง.

Solid Phase Extraction (SPE)

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง

Solid Phase Extraction (SPE)

การเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากสิ่งสกปรกในตัวอย่างสามารถทำให้คอลัมน์และระบบอุดตันได้ จึงต้องมีการเตรียมตัวอย่างที่ดีและถูกต้อง

การเตรียมตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลามาก ประมาณได้เป็น 60-70% ของเวลาทั้งหมดที่นักเคมีใช้ไปกับการวิเคราะห์ นอกเหนือจากเวลาที่ต้องเสียไปแล้ว เรายังสูญเสียตัวทำละลายไปอีกด้วย จากการประเมินทั่วไปพบว่าเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างที่ใช้กันมากที่สุดคือ Liquid-Liquid Extraction (LLE) LLE มีข้อเสียที่อาจเกิด emulsion กรณีใช้กับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อ การที่ต้องใช้เครื่องแก้วมากมายทำให้เป็นการเพิ่มสิ่งสกปรกต่างๆ ที่จะมารบกวนการวิเคราะห์ให้มากขึ้น ผลที่ได้ก็อาจไม่ถูกต้อง solvent ที่ใช้มีราคาและใช้ในปริมาณมาก ดังนั้นเราควรลดประมาณการใช้ลงและควรคำนึงถึงการทิ้งตัวทำละลายเหล่านั้นหลังการใช้งานว่ามีผลต่อสิ่งแวดล้อมอย่างไรด้วย

Solid Phase Extraction (SPE) เป็นเทคนิคการเตรียมตัวอย่างที่สามารถนำมาใช้แทน LLE โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก วิธีของ SPE มีหลักการคล้ายกับ LLE ตรงที่ใช้หลักการ partition เหมือนกัน โดยที่ SPE ไม่ได้เกิดระหว่างของเหลวกับของเหลวเหมือนกับของ LLE แต่จะเกิดระหว่างของแข็ง (คือ absorbent ที่อยู่ในแท่ง SPE) กับของเหลวหรือตัวทำละลาย

1. ข้อได้เปรียบของการใช้ SPE ในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค LLE

1. ลดปริมาณตัวทำละลายที่จำเป็นต้องใช้
2. ประหยัดเวลา
3. ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้น้อยลงหรือเหลือขั้นตอนเดียว
4. สามารถใช้กับระบบการเตรียมตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้
5. เลือกใช้ได้กับตัวทำละลายหลายชนิด

ดังนั้นจะเห็นว่า SPE เป็นเทคนิคที่ปัจจุบันนิยมใช้กันมากที่สุดในการเตรียมตัวอย่างการใช้ SPE ไม่เพียงแต่ทำความสะอาดตัวอย่างขจัดสารที่รบกวนการวิเคราะห์ออกเท่านั้น แต่ยังเป็นการช่วยอายุการใช้งานของคอลัมน์ ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงได้นำเอา SPE มาใช้ในการสกัดน้ำนม

2. ขั้นตอนการสกัดด้วย SPE

Condition : เป็นการเตรียม sorbent หรือ packing ที่บรรจุอยู่ในแท่ง SPE ให้พร้อมรองรับสารตัวอย่าง

Load : เป็นการใส่ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ sorbent

Rinse : เป็นการขจัดเอาสารที่จับกับ sorbent ได้น้อยหรือจับอยู่ที่ส่วนผิวของ sorbent ออก

Elusion : เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับ absorbent ออกเพื่อนำไป วิเคราะห์ต่อไป

Solid Phase Extraction เป็นวิธีที่เตรียมสารตัวอย่างสำหรับ HPLC วิธีหนึ่งที่ใช้หลักการ partition เหมือนกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย แต่ต่างกันที่ใช้ของแข็งเป็นตัวจับสารที่เราสนใจ โดยของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในแท่ง SPE เรียกว่า Sep-Pak

3. ข้อดีของการใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ HPLC มีดังนี้

- ประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากใช้สารละลายและอุปกรณ์น้อย
- ให้ค่า Recovery สูง เพราะมีการถ่ายเทสารน้อยครั้ง
- ประหยัดเวลา เพราะมีขั้นตอนการเตรียมน้อย
- มีความปลอดภัยสูง ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรง
- ให้ความแม่นยำสูงเมื่อทำปริมาณวิเคราะห์ ไม่เกิดการปนเปื้อนจากสารอื่น
- สารไม่เปลี่ยนสภาวะ สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทันที
- ลดอันตรายจากสารตัวอย่างที่ระเหยได้ง่าย ลดปัญหาเครื่องแก้วแตก

ตารางที่ ง1 แนะนำการเลือกใช้ Sep-Pak Cartridges

Sorbent หรือ Packing Material	**คุณสมบัติที่ผิว**	**การวิเคราะห์ที่ใช้**
C_{18}	Hydrophobic bonded silica	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ยาและ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลือง และปัสสาวะ - สารอินทรีย์ปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำเสีย - กรดอินทรีย์ ในพวกเครื่องดื่มและไวน์

ตาราง ง1 (ต่อ)

Sorbent หรือ Packing Material	**คุณสมบัติที่ผิว**	**การวิเคราะห์ที่ใช้**
C_8	Hydrophobic non-polar bonded	- แยกสาร Hydrophobic ออกจากสารละลาย aqueous - ใช้เมื่อต้องการให้สาร retain น้อยลงกว่า C_{18} - ยาและ metabolite ของยา ในเลือด น้ำเหลือง และปัสสาวะ - Peptide ในตัวอย่างเลือด น้ำเหลือง และของเหลวในร่างกาย
Silica	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสารสารละลายที่มี polarity ต่ำถึงปานกลางออกจากสารละลาย non-aqueous - ไวตามิน A D E K - ยาฆ่าแมลง - ไขมันชนิดต่างๆ - สารสกัดจากธรรมชาติ pigment จากพืช - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Florisil	Hydrophilic Polar (Slightly basic)	- แยกสารสารละลายที่มี polarity ต่ำถึงปานกลางออกจากสารละลาย non-aqueous - วิธีตาม AOAC และ EPA - ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช ในอาหารและอาหารสัตว์ - ตัวอย่างที่มีไขมันสูง - สาร Polychlorinated biphenyls ใน Transformer oil

ตาราง ง1 (ต่อ)

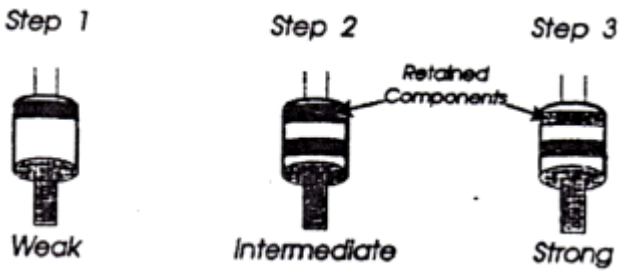
Sorbent หรือ Packing Material	**คุณสมบัติที่ผิว**	**การวิเคราะห์ที่ใช้**
Alumina A	Hydrophilic Polar (Acidic)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - มีสมบัติเป็น Cation exchanger เล็กน้อย - แยกน้ำตาล คาเฟอีนในเครื่องดื่มประเภทโคลา - ไวตามินในอาหารและอาหารสัตว์ - ยาปฏิชีวนะ - สารผสมในอาหารและอาหารสัตว์
Alumina N	Hydrophilic Polar (Neutral)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - ยาฆ่าวัชพืช - ปิโตรเลียมและน้ำมัน - สารผสมในอาหาร - สารอินทรีย์สังเคราะห์
Alumina B	Hydrophilic Polar (Basic)	- แยกสาร Hydrophilic ออกจากสารละลาย non-aqueous - มีสมบัติเป็น Cation exchanger เล็กน้อย - ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช น้ำเสีย - พวก Steroid ต่างๆ
Accell plus CM	Hydrophilic Polar (Acidic) Cation exchanger	- แยกสาร Ion ที่มีประจุบวก ในสารละลาย aqueous หรือ non-aqueous - สกัดโปรตีน เอนไซม์ และ Immunoglobulin ต่างๆ ที่มีสภาวะเป็นด่างอ่อน - สารอินทรีย์สังเคราะห์ - แยก Peptide ขนาดต่างๆ

ตาราง ง1 (ต่อ)

Sorbent หรือ Packing Material	คุณสมบัติที่ผิว	การวิเคราะห์ที่ใช้
Aminopropyl NH2	Hydrophilic moderately polar (Slightly basic)	- ใช้เป็น weak anion exchanger - ยาและ metabolite ของยา - อุตสาหกรรมปิโตรเลียม และ lube oil - Saccharides -สารพวก Phenol และ pigment พวก Phenolic
Diol	Hydrophobic moderately non-polar neutral phase	- วิเคราะห์สารที่ละลายใน aqueous หรือ organic - ธาตุที่มีปริมาณน้อยในน้ำ - ยาปฏิชีวนะในเครื่องสำอาง - แยก Peptide และโปรตีนต่างๆ

4. ขั้นตอนการใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่าง

1. นำสารตัวอย่างผ่าน Sep-Pak โดยสารตัวอย่างละลายใน weak solvent (ตัวทำละลายที่ทำให้สารีที่สนใจจับกับ Sep-Pak ได้ โดยไม่พาสารที่สนใจหลุดออกมาด้วย) โดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่างที่เราสนใจและชนิดของ Sep-Pak ตามหลักการของ Chromatography
2. ใช้สารละลายที่เป็นIntermediate solvent ผ่าน Sep-Pak เพื่อชะสารที่ไม่ต้องการออกจาก Sep-Pak หรือเพื่อต้องทำการแยกชนิดของสารที่สนใจออกมา
3. ใช้สารละลายที่เป็น Strong solvent เพื่อชะสารที่เราสนใจออกขาก Sep-Pak หรือ เพื่อไล่สารที่ตกค้างใน Sep-Pak ออก

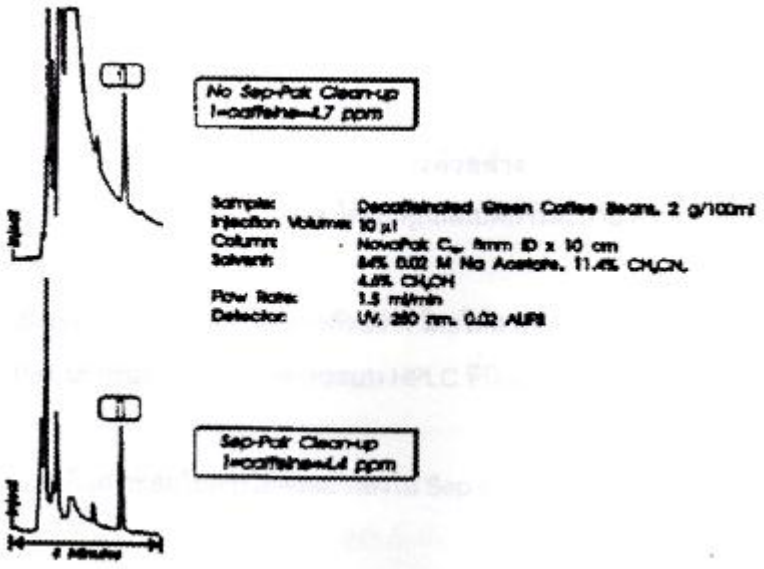


รูปที่ ง1 แสดงขั้นตอนการใช้ Sep-Pak C_{18} Cartridge ในการเตรียมสารตัวอย่าง

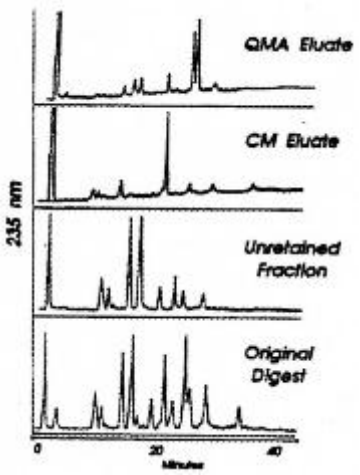
5. หลักการใช้งานทั่วไปของ Sep-Pak Cartridge

การทำความสะอาดตัวอย่าง เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดในการกำจัดสิ่งเจือปนที่ไม่ต้องการออกจากตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการคำนวณทางด้านปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย

การเตรียมสารตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อน อาทิเช่น ตัวอย่างประเภทที่มีโปรตีนสูง ได้แก่ตัวอย่างประเภทเนื้อเยื่อต่าง ๆ ซึ่งก่อนที่จะนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak ต้องมีการปรับสภาพของตัวอย่างให้เหมาะสมเสียก่อน โดยทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในรูปของสารละลายโดยการนำไปย่อย เป็นต้น สารที่ได้หลังจากการย่อยมักจะประกอบไปด้วยสารประกอบหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต่างกัน ถ้านำมาฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC โดยไม่ผ่าน Sep-Pak อาจเกิดปัญหาของการแยกของพีคไม่ชัดเจน



รูปที่ ง2 แสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างก่อน และหลังผ่าน Sep-Pak



รูปที่ ง3 โครมาโทแกรมแสดงสารประกอบที่ได้จากการนำตัวอย่างผ่าน Sep-Pak เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่าน Sep-Pak

การเตรียมสารตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำ ได้แก่ ตัวอย่างทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การวิเคราะห์หา Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ เป็นต้น วิธีนี้ทำโดยนำน้ำตัวอย่างปริมาณมาก (ประมาณ 500-1000 มิลลิลิตร) ผ่าน Sep-Pak โดยใช้ระบบปั๊มสุญญากาศทำการปั๊มด้วยอัตราที่เหมาะสมเพื่อเก็บสารตัวอย่างให้อยู่ใน Sep-Pak หลังจากนั้นจึงทำการชะสารตัวอย่างออกจาก Sep-Pak

6. การเลือกใช้ Sep-Pak ในการเตรียมสารตัวอย่าง

การเลือกโดยพิจารณาจากคุณสมบัติของสารตัวอย่าง

- ตรวจสอบคุณสมบัติของสารตัวอย่างทั้งหมด ได้แก่ คุณสมบัติการละลาย ความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว ความเสถียรของสารตัวอย่าง เป็นต้น
- เลือกชนิดของ Sep-Pak ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่าง โดยให้สารที่สนใจสามารถจับกับ Packing ที่บรรจุใน Sep-Pak ได้ หรืออาจพิจารณาจากระบบ HPLC ที่มีอยู่ เช่น Reverse Phase หรือ Normal Phase
- เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการใส่ตัวอย่างลงใน Sep-Pak และเลือกตัวทำละลายที่ใช้ชะสารออกจาก Sep-Pak

การเลือกจาก Waters Sep-Pak Cartridge Application Bibliography

Waters Sep-Pak Cartridge Application Bibliography เป็นหนังสือที่รวบรวมเกี่ยวกับ Application ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้ Sep-Pak สำหรับเตรียมสาร ภายในหนังสือจะแสดงชื่อสารที่ต้องการ

วิเคราะห์ ประเภทของตัวอย่าง ชนิดของ Sep-Pak ที่ใช้ ตลอดจนเอกสารอ้างอิงจากวารสารที่ได้รับการตีพิมพ์ในทางวิชาการซึ่งมีมากกว่า 2000 เรื่อง หนังสือเล่มนี้สามารถขอดูได้จากบริษัทหรือแจกให้ในกรณีซื้อ Sep-Pak ในปริมาณมาก

Sep-Pak นี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยในการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC เป็นเรื่องที่ง่ายขึ้นเพราะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ประหยัดและปลอดภัยในการทำงาน สามารถนำไปใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังจะช่วยให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

7. การเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายจะมีผลต่อการเตรียมตัวอย่างในแง่ที่ว่าจะได้ตัวอย่างออกมาสะอาดแค่ไหน และได้ค่า recovery เป็นอย่างไร ถ้าเราเลือกตัวทำละลายได้เหมาะสมสำหรับ rinse หรือ elute ตัวอย่างตัวอย่างก็จะสะอาด และได้ค่า recovery ดี การเลือกสามารถทำได้ง่ายด้วยการทดลองใช้ solvent ที่มี strength ต่างๆ กัน เหมือนกับหลักการเลือกตัวทำละลายและคอลัมน์ ในระบบ HPLC เราจะ load สารที่เราสนใจลงไปบน sorbent สารที่เราสนใจควรมีความเข้มข้นพอเหมาะต่อไป เราจะเลือกใช้ตัวทำละลายเป็นชุดๆ ที่ทราบปริมาตร แล้วค่อยๆเพิ่ม strength ขึ้นเรื่อยๆ แล้วเก็บแต่ละส่วนมาตรวจสอบว่า สารที่เราสนใจถูก elute ออกมาเท่าใด

8. อัตราการไหล (Flow rate)

การที่จะปรับสภาพของ sorbent ให้เรียบร้อยก่อน load ตัวอย่าง การ load ตัวอย่างและกระบวนการ elute จะต้องทำที่อัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาจากตัวอย่างไม่ถูกกักหรือ retain อย่างสมบูรณ์ หรือไม่ถึง equilibrium โดยทั่วไปแล้ว เราสามารถปรับสภาพ cartridge ได้โดยใช้อัตราการไหลสูงถึง 25 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนการ load ตัวอย่างและการ elute นั้นจะดีที่สุดเมื่อเราใช้อัตราการไหลไม่เกิน 10 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ก็เป็นไปได้ที่ว่าค่า recovery อาจจะยอมรับได้เมื่อเราใช้อัตราการไหลสูงถึง 20 มิลลิลิตรต่อนาที (ซึ่งควรตรวจสอบโดยใช้ standard เสียก่อน) กรณีใช้ sorbent ซึ่งเป็นพวก ion exchange จะแนะนำให้ใช้อัตราการไหลต่ำกว่า เช่น 1-2 มิลลิลิตรต่อนาที Sep-Pak บางชนิดเช่น Sep-Pak light จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าแบบอื่น ก็ให้ลดอัตราการไหลลง 3 เท่า

เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง

1. หลักการ

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกปั๊มผ่านคอลัมน์แยกสารที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว ถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (Injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของเฟสเคลื่อนที่ คือล้างตัวอย่างในขณะที่ไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยา ขององค์ประกอบกับเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีดจนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ซึ่งเป็นช่วงเวลาส่วนใหญ่ของการเคลื่อนที่ เป็นช่วงเวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (Characteristic time) ของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ดีต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมของการแยกนั้น สารบางชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจใช้เวลาในการแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยกคือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่า ก็จะใช้อยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าและในทางตรงกันข้าม สารใดที่มีอันตรกิริยาหรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยนั่นเอง

เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase)

ลักษณะของเฟสอยู่กับที่จะทำการบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ใน LC หรือ HPLC วัสดุเหล่านี้สามารถจัดประเภทได้เป็น rigid gels, semi-rigid gels และ soft gels เฟสอยู่กับที่ที่นิยมคือ C_{18} alkyl group ซึ่งจะเกิดพันธะที่พื้นผิว silica (silica surface) ส่วนใหญ่นิยมใช้ silica gel เป็นเฟสอยู่กับที่ ใน open-column chromatography ดั้งเดิม และ TLC ส่วนใหญ่มักจะใช้ reverse-phase chemically-bonded packing ในการวิเคราะห์ ใน HPLC ส่วนใหญ่ใช้ใน biological sciences การวิเคราะห์โดยมากเป็น water-soluble หรือ solute-stationary phase mobile phase interactions สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ทั้งคู่

silica gel มีพื้นที่ของการใช้ที่มันที่เข้ากันได้อย่างยอดเยี่ยม อย่างไรก็ดีส่วนมากมันได้รับการสนับสนุน adsorbent เพื่อใช้ในการเตรียมหรือการแยก ง่ายต่อการนำกลับมาใช้ โดยการกลั่นเป็นข้อได้เปรียบของ silica gel และ other normal-phase เป็น packing ที่นิยมมากกว่า เพื่อการแยกของสารประกอบเป็นกลุ่ม และเพื่อการแยกของ isomers reversed-phase packing บนที่มีส่วนเกี่ยวข้องอื่นๆ น่าจะเป็นที่นิยม

เพื่อการแยกของ homologues และเพื่อสารประกอบซึ่งคงสภาพเดิมอย่างแข็งแกร่ง หรือเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า silica gel

การเลือก Stationary phase ควรจะเน้นที่ข้อแตกต่างของการแยกที่อยู่ในสารประกอบ ความแตกต่างในคุณสมบัติ และเลขขั้วของหมู่ function, normal phase packing มีความแตกต่างกับ GC คือ GC ทำที่อุณหภูมิสูง เฟสอยู่กับที่อาจเพิ่ม back ground อย่างต่อเนื่องที่ detector ซึ่งไม่พบใน HPLC นอกจาก PH ของเฟสเคลื่อนที่ทำให้เฟสอยู่กับที่มีประสิทธิภาพเสื่อมลง กรณีทำให้เพิ่ม back ground และลด chromatographic performance

เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

HPLC ต้องการเฟสเคลื่อนที่ซึ่ง analyte สามารถละลายได้ การแยกของ HPLC ส่วนใหญ่ใช้ชนิด Reversed phase chromatography คือเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วมากกว่าเฟสอยู่กับที่ในระบบนี้ analyte ที่มีขั้วมากกว่า จะ elute รวดเร็วกว่า analyte ที่มีขั้วน้อยกว่า

การการเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยตัวทำละลายเดี่ยวและตัวทำละลายผสมซึ่งมีประสิทธิภาพในการแยกอาจไม่เพียงพอ แต่เฟสเคลื่อนที่สามารถใช้ในขอบเขตที่กว้าง แม้จะมีปัญหาอยู่เมื่อของผสมประกอบด้วย analyte ที่มีขั้วสูง ซึ่งจะใช้เวลานาน ส่วนใน non-polar analyte ให้ผลในทางตรงกันข้าม ในกรณีนี้การแยกจะประสบความสำเร็จโดยใช้เพียงการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างการวิเคราะห์

เฟสเคลื่อนที่ที่ทำให้เกิดการแยกโดยองค์ประกอบคงที่ เรียกว่า isocratic elution เมื่อองค์ประกอบเฟสเคลื่อนที่ถูกเปลี่ยนเรียกว่า gradient

บัฟเฟอร์ก็สามารถใช้ได้แต่ส่วนใหญ่ใช้เป็นสารจำพวก inorganic และ involatile material เช่น potassium phosphate หรือ sodium phosphate

สารละลายบัฟเฟอร์

สำหรับ mobile phase ที่เป็น buffer solution ในการเตรียมต้องระวังหลายๆ เรื่อง เช่น

- การเลือกชนิดของเกลือให้เหมาะสมกับช่วงของ pH ที่จะใช้และต้องเลือกชนิดของเกลือที่จะไม่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการวิเคราะห์จนมีปัญหากับ Baseline, Noise หรือ linear range
- ในการเตรียมต้องระวังเรื่อง ionic strange และ buffer capacity ด้วย

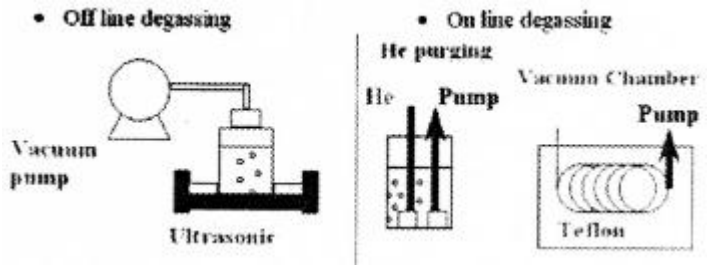
- สารละลายเมื่อเตรียมเสร็จแล้วต้องทำการกรอง (0.45 ไมครอน) ก่อนนำมาใช้ ในการใช้ยังต้องหลีกเลี่ยงที่จะไม่ทิ้งบัฟเฟอร์ ไว้ในระบบของ HPLC เพื่อป้องกันการเกิด crystallization และอาจเป็นสาเหตุของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงกับปั๊ม คอลัมน์ และ flow-line

เมื่อทำการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

สำหรับการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่จะต้องคำนึงความสามารถในการละลายและต้องเป็นการเปลี่ยนแบบค่อยเป็นค่อยไป ในการเปลี่ยนความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่เพื่อให้สามารถเปลี่ยนเฟสได้อย่างสมบูรณ์และไม่ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างซึ่งจะเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ และต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนระหว่างเฟสเคลื่อนที่เดิมและเฟสเคลื่อนที่ใหม่ในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

Degassing

ปริมาณของอากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อ stability ของ detector baseline และ detector sensitivity การ degassing ในระบบ HPLC สามารถเลือกได้ 2 แบบคือ



รูปที่ ง4 แสดงระบบของ Degassing

ปัญหาที่เกิดจากการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่

การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่และการมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

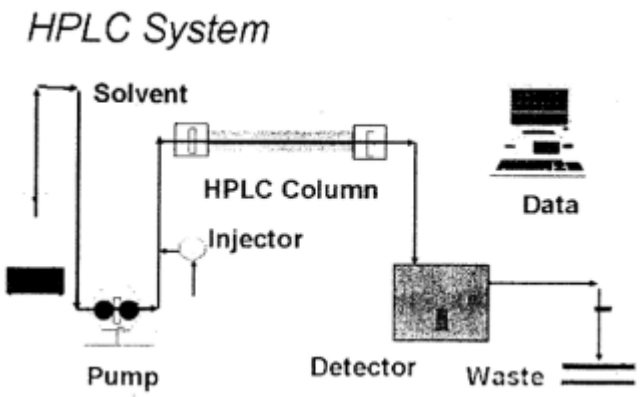
• การเกิดฟองอากาศในเฟสเคลื่อนที่

ปัญหาที่เกิดตามมาคือฟองอากาศจะเป็นสาเหตุให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่คงที่ทำให้ retention time และพื้นที่พีคของสารไม่คงที่ และถ้ามีฟองอากาศในคอลัมน์จะทำให้ได้พีคที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ และถ้ามีการสะสมของฟองอากาศที่ตัวตรวจวัดก็จะเป็นสาเหตุของการเกิด Noise และ Baseline

• การมีอากาศในเฟสเคลื่อนที่โดยไม่เป็นฟอง

ปัญหาที่เกิดอาจมาจากการที่ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ทำการ oxidized ตัวอย่างหรือสารที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ในปริมาณมากจะทำให้ sensitivity ของ fluorescence detector ลดลงและอาจเป็นสาเหตุของการเกิด noise

2. องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



รูปที่ ง5 แสดงองค์ประกอบของเครื่อง HPLC

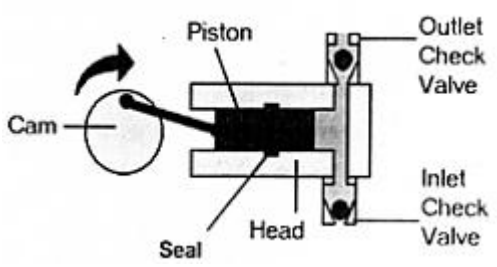
ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในทางวิเคราะห์ ขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้ควรมีขนาดความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน preparative HPLC ความจุของขวดควรมากกว่านี้ ในปัจจุบันขวดที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ออกซิเจน

จุดประสงค์ของการไล่อากาศในเฟสเคลื่อนที่คือต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจไปทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว และมีบางบริษัทที่ผลิตเครื่อง HPLC สามารถใช้ได้กับระบบที่ไม่ต้องไล่ก๊าซออกก่อน

ปั๊ม (Pump)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลจะมากเมื่อใช้อนุภาคขนาดเล็กๆ และคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันสูงเพื่อดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไปหรือใช้เพื่ออัดของเหลวที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ด้วยความดัน



รูปที่ ง6 แสดงภาคตัดขวางของเครื่องปั๊ม

Sample Introduction (Injector)

ถึงแม้ว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่ดีที่สุดก็ตาม แต่ถ้าการฉีดสารตัวอย่าง เข้าสู่เครื่อง HPLC นั้นไม่มีความระมัดระวังก็จะทำให้การแยกสารนั้นไม่ได้ผลดี ตามหลักการแล้วควรฉีดสารด้วยปริมาณน้อยๆ ตรงบริเวณกึ่งกลางของหัวคอลัมน์และต้องคอยระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขณะฉีดสารเพื่อจะให้เกิดประสิทธิภาพการแยกเกิดขึ้นสมบูรณ์

ชนิดของ injector ที่แตกต่างกัน สามารถใช้ด้วยกันได้และเลือกให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ single type ของ injector ถูกใช้ใน HPLC ซึ่งต่างจาก GC Loop injector (บางทีก็เรียก valve injector) เป็นการนำตัวอย่างที่เป็นของเหลวเข้าสู่ liquid stream และทำให้มีปริมาณที่เหมาะสมในการนำตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ โดยใช้ conventional syring เมื่อ loop เติมเฟสเคลื่อนที่แล้วนั้นจะถูกปั๊มเข้าไปด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสม จากนั้นผ่านวาล์วเข้าไปสู่คอลัมน์ ที่เก็บคอลัมน์อยู่ในภาวะสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่และรักษาระบบการทำงานของโครมาโทกราฟีเมื่อจะ injection rotating switch จะถูกเคลื่อนและ flow ถูกพาเข้าไปใน loop ทำให้มีระดับความสูงเท่ากันในคอลัมน์

พารามิเตอร์ 2 ตัวที่สำคัญคือ ความถูกต้อง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) โดยความถูกต้องของการหาปริมาณวิเคราะห์ขึ้นกับขนาดของ loop โดยปกติจะเติม loop ได้เต็มสมบูรณ์โดยใน conventional syring ให้ปริมาตรที่มากกว่าความจุ loop (ของเหลวที่มากเกินพอจะเป็นของเสียไปที่ waste)

ซึ่งฟองอากาศจะไม่ถูกนำเข้าไปในตัวอย่างและสิ่งสำคัญคือ ต้องแน่ใจว่าไม่มี ฟองอากาศเข้าไปแทนตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้ได้ความแม่นยำและถูกต้องที่สุด

การทำปริมาณวิเคราะห์ทำโดยใช้วิธี internal standard ควรถูกเลือกใช้ และถ้าตัวอย่างไม่เพียงพอ สามารถเติมที่ loop ได้ loop ที่ไม่ถูกเทียบมาตรฐาน(calibrate) จะมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีผลต่อความแม่นยำของการวัด loop ที่เหมือนกัน ถูกใช้ในการทำกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณและสำหรับการหาตัวไม่ทราบค่า ความถูกต้องของการวัด ถ้า injector คำนึงถึงอื่นน้อยกว่าการมีอากาศเข้าสู่ injector อาจทาง liquid flow ซึ่งเป็นผลให้ได้สัญญาณที่ไม่เสถียรจาก mass spectrometer

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ด้วยเทคนิค HPLC มีด้วยกัน 3 วิธีคือ

1) **Septum injector**

วิธีการนำสารเข้าเครื่องนี้จะคล้ายกับใน GC มาก แต่เข็มฉีดในGC จะใช้กับความดันเพียง 100 บาร์ ในกรณีที่ความดันสูงๆ จะนำมาใช้ฉีดสารไม่ได้ จึงได้มีการสร้างเข็มฉีดที่ใช้กับความดันสูงๆ ถึง 600 บาร์ขึ้นมา และบางทีอาจเป็นวิธีที่ง่ายที่สุดจากวิธีทั้งหมด คือการออกแบบที่ไม่แน่นอนทำให้มันง่ายที่จะสร้างสำหรับใช้ในห้องทดลองโดยใช้วัสดุอย่างง่ายๆ ในการสร้าง

ข้อดีของการฉีดสารแบบ Septum คือ

- ฉีดในปริมาตรที่เราต้องการได้
- ปริมาณน้อยๆก็สามารถฉีดสารได้
- วิธีการฉีดสารง่าย และราคาถูก
- เป็นการฉีดสารเข้าสู้คอลัมน์โดยตรง จนทำให้สัมผัสกับเฟสอยู่กับที่โดยตรง

ความแม่นยำในการนำสารตัวอย่างเข้าจะดีขึ้น ถ้าประกอบด้วย on-column injector แต่มีข้อเสียของการใส่วัตถุนั้นโดนที่มันจะไปรบกวนการส่งผ่านของสารตัวอย่างตรงบริเวณศูนย์กลาง ปัญหานี้แก้ไขได้โดยการใช้ capillary tube นำสารเข้าบริเวณส่วนหัวของคอลัมน์

2) **Sampling valve**

ระบบฉีดสารประเภทนี้ถือว่าเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางในเทคนิค HPLC เนื่องจากสารมารถนำมาใช้ในความดันและอุณหภูมิสูงได้ รวดเร็วและสามารถทำซ้ำได้ สามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ ได้แล้วยังมีความผิดพลาดน้อยกว่า 0.1 % และสามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์แบบอัตโนมัติได้อย่างง่ายดาย

3) **Automatic valve**

การฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยวิธีนี้นั้นจะใช้งานสะดวกมาก เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมาก หรือเมื่อต้องการฉีดสารตัวอย่างที่เหมือนกันซ้ำๆ Automatic injector มีประโยชน์หลายอย่าง ซึ่งอาจทำงานได้ด้วยตัวมันเองหรือควบคุมโดย LC computer การนำตัวอย่างเข้าสู่ระบบอาจทำได้โดยการ

ผลักดันโดนใช้แรงลม ตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิลิตร อาจถูกบรรจุลงในที่ใส่สารที่ถูกปิดอย่างมิดชิด ซึ่งในบางระบบนั้นจะมีความซับซ้อนมาก และมันยังอาจควบคุมการฉีดที่มีปริมาณของตัวอย่างที่ไม่คงที่ได้ในช่วงระยะเวลาที่แน่นอนและเป็นลำดับ

คอลัมน์ (Column)

เป็นส่วนประกอบที่มีราคาน้อยที่สุด แต่ถือว่าเป็นหัวใจของระบบ คอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปมีความยาว 25-30 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4-5 มิลลิเมตร และบรรจุด้วยสารบรรจุขนาดอนุภาค 10 ไมโครเมตร ในปัจจุบันมีแนวโน้มว่าจะใช้คอลัมน์ที่มีความยาวและขนาดของอนุภาคน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถผลิตสารบรรจุที่มีขนาดเล็กลงมา 3-5 ไมโครเมตรและใช้เทคนิคการบรรจุสารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นมานั้นเอง ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่อหน่วยความยาวคอลัมน์ดีขึ้น

ข้อควรระวังในการใช้คอลัมน์

- อย่าใช้คอลัมน์ที่มีความดันมากเกินไป
- ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH มากหรือน้อยจนเกินไป ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH ในช่วง 3.5-6.5
- ห้ามเก็บคอลัมน์ไว้ในบัฟเฟอร์หรือในสารละลายที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบเพราะอาจทำให้เกิดตะกอนได้และไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีตะกอนหรือขุ่น ควรกรองเฟสเคลื่อนที่เสมอ
- ระวังไม่คอลัมน์ถูกกระแทก
- ไม่เก็บคอลัมน์ไว้ที่อุณหภูมิสูง
- ถ้าคอลัมน์ใกล้เสื่อมสภาพให้ล้างด้วย 1% กรดอะซิติก

ตัวตรวจวัด (Detector)

ตัวตรวจวัดที่ได้นำมาใช้มากที่สุดใน HPLC ได้แก่ Ultraviolet absorbance (UV) และ Refractive index (RI) ตัวตรวจวัดชนิด UV มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ตัวตรวจวัดชนิดนี้มีทั้งความยาวคลื่นเดียว (มักจะใช้ที่ 254 นาโนเมตร Mercury arc lamp) และแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Variable wavelength) ในช่วง 190-600 นาโนเมตร ซึ่งตัวตรวจวัดใน HPLC ปั๊มรุ่น P1000 Isocratic pumps ตัวตรวจวัด UV รุ่น 1000 ของบริษัท Shimazu (รุ่นที่ใช้ในการทดลอง) เป็นแบบที่เปลี่ยนความยาวคลื่นได้ (Deuterium arc lamp) การดูดกลืนแสงนี้เป็นคุณสมบัติของโมเลกุล ดังนั้นแต่ละสารประกอบจึงมีการดูดกลืนแสงที่จำเพาะของตัวเอง ตัวตรวจวัดชนิด UV จัดเป็นชนิดที่มีความไวสูง สามารถตรวจวัดสามารถแยกประเภทในปริมาณต่ำถึงระดับนาโนกรัม

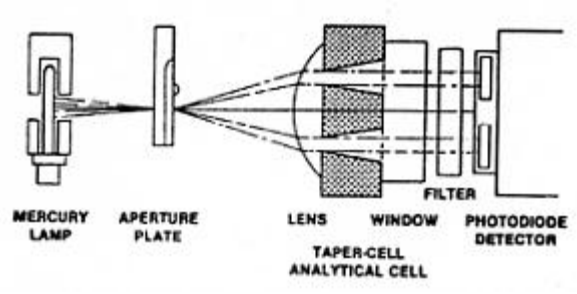
ตารางที่ ง2 แสดงคุณสมบัติของตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ

ชนิด	ความไว (กรัม/มล.)	ผลของอุณหภูมิ	ผลของอัตราการไหล	หมายเหตุ
UV absorption	$5x10^{-5}$	น้อย	ไม่มีผล	นิยมใช้วัดในช่วง 254-280 nm
IR absorption	10^{-6}	น้อย	ไม่มีผล	-
Fluorometry	10^{-10}	น้อย	ไม่มีผล	-
Refractive index	$5x10^{-7}$	-	ไม่มีผล	วัดความแตกต่างดัชนีหักเหของสารตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่
Conductivity	10^{-8}	$\pm 1\ ^{\circ}C$	มีผล	-
Flame ionization	10^{-8}	ไม่มีผล	มีผล	สารตัวอย่างถูกเผาให้เป็นไอออนและถูกจับโดยแอโนดเพลท
Mass spectrometry	10^{-10}	ไม่มีผล	ไม่มีผล	วิเคราะห์สารได้ถึง 0.2-1.0 nanogram

ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบันเป็น การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต เนื่องจากสารส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยหมู่ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวได้ดี เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ตัวตรวจวัด UV Detector เป็นหลัก ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดเพิ่มดังนี้

หลักการทำงานของเครื่องวัดชนิดนี้อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง ในปัจจุบัน UV-Visible ตัวตรวจวัดที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

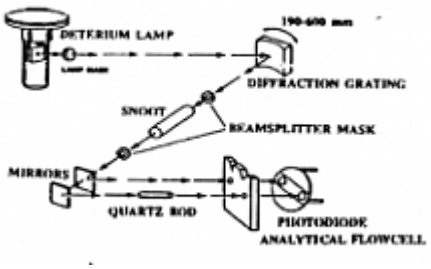
1. Fixed-wavelength UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้ ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้เป็นหลอดที่ทำด้วยปรอทความดันต่ำ ซึ่งจะให้แสงที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยแสงผ่าน aperture plate ตรงไปยังเลนส์ ที่ทำด้วยควอทซ์ ซึ่งจะทำให้แสงผ่านเข้าไปในเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่าง ต่อจากนั้นแสงจะผ่านกระจกควอทซ์และแผ่นกรองซึ่งจะแยกความยาวคลื่นที่เราสนใจ ก่อนที่แสงนั้นจะถึงโฟโตไดโอด โฟโตไดโอดจะทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแสงทั้งเซลล์อ้างอิงและเซลล์ของสารตัวอย่างเป็นสัญญาณไฟฟ้าและผ่านเข้าไปในส่วนของการขยายสัญญาณ



รูปที่ ง7 Fixed-wavelength UV detector

ข้อจำกัดของตัวตรวจวัดประเภทนี้จะไม่สามารถตรวจวัดสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่ำกว่า 254 นาโนเมตร เพราะมีสารประกอบสำคัญหลายชนิดใช้ความยาวคลื่นในช่วง 195-225 นาโนเมตร นอกจาก mercury lamp แล้วอาจใช้แหล่งกำเนิดแสงอย่างอื่น เช่น Zn lamp (206 nm) Cd lamp (214 nm) เป็นต้น สำหรับ D_2 lamp จะเปล่งแสงออกมาอย่างต่อเนื่องในช่วงยูวี (200-400 nm) และบางช่วงของ visible เมื่อต้องการความยาวคลื่นใดๆ ก็จะใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงให้ได้ความยาวคลื่นที่ต้อง

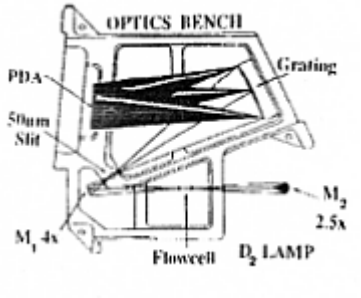
2. Variable UV detector ตัวตรวจวัดชนิดนี้จะแตกต่างจากตัวตรวจวัดประเภทแรกคือใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็น D_2 lamp และใช้โมโนโครโมเตอร์แยกแสงและเลือกตามต้องการได้ จึงสามารถตรวจวัดสารตัวอย่างได่ทั่วไปเพราะสามารถเลือกความยาวคลื่นที่สารตัวอย่างดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด



รูปที่ ง8 Variable UV detector

3. Photodiode array detector (PDA) ตัวตรวจวัดประเภทนี้จัดว่าเป็น solid state detector ซึ่งประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน มีลักษณะดังรูป ระบบทางเดินของแสงจะต่างจาก UV visible detector ทั่วๆ ไปคือระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบ reverse optics จากรูปแสงจากแหล่งกำเนิดหรือหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow through cell ก่อนที่จะไปยังโม

โนโครโมเตอร์หรือเกตติง เมื่อแสงตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกไปเป็นความยาวคลื่นต่างๆแล้วไปตกกระทบกับแผงของโฟโตไดโอดดังรูป



รูปที่ ง9 Photodiode array detector

PDA (996) เป็นตัวตรวจวัดที่จะช่วยให้ข้อมูลทางโครมาโทกราฟีมีความเด่นชัดและผลลัพธ์เป็นที่น่าเชื่อมากขึ้น เนื่องจาก มีการใช้เทคโนโลยี Taper beam และระบบการเก็บข้อมูลในคอมพิวเตอร์ซึ่งมี Milennium 2010 เป็น software ควบคุมการทำงานและการเก็บข้อมูลรวมทั้งการประมวลผลในรูปแบบ 3D graphic spectral contrast peak purity เป็นต้น จากการใช้เทคโนโลยีของ taper beam ช่วยขจัด refractive index effect ซึ่งจะเป็นการเพิ่ม sensitivity ในส่วนของ spectral contrast เราสามารถเก็บข้อมูลมาเปรียบเทียบโดยใช้สเปกตรัมมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งทำให้ทำ compound confirmation ได้

ส่วนประมวลผล (Data system)

ส่วนประมวลผลข้อมูล คือส่วนที่เปลี่ยนแปลงสัญญาณอนาลอกเป็นดิจิตอล

ส่วนทิ้งของเสีย (Waste)

ส่วนทิ้งของเสีย

3. ข้อปฏิบัติในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์

มีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

- การเตรียมเฟสเคลื่อนที่น้ำที่นำมาใช้ในการเตรียม ควรเลือกใช้ที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ 3 ครั้ง และปราศจากไอออนชนิดต่างๆ สำหรับสารเคมีที่ใช้เช่นเมทานอลควรใช้เกรด HPLC grade เมื่อผสมเฟสเคลื่อนที่เสร็จแล้วต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน

สำหรับ membrane filter ก็ต้องเลือกให้ถูกว่าชนิดใดใช้กรองเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นส่วนผสมได้ ชนิดใดกรองตัวตัวทำละลายอินทรีย์ หลังจากกรองแล้วนำเฟสเคลื่อนที่ไปทำการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่นก๊าซออกซิเจน เพื่อต้องการกำจัดก๊าซออกซิเจนซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่เฟสอยู่กับที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้นยังเป็นการลดโอกาสที่ทำให้เกิดฟองอากาศ (bubble) ในเครื่องตรวจวัดขณะทำการทดลองอยู่ การไล่ก๊าซที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvent) กำจัดก๊าซที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย (degas) อาจใช้การ sonicate ในเครื่อง ultrasonic ประมาณ 15 นาที หรือผ่านก๊าซฮีเลียม 15 นาที

- เมื่อเตรียมสารตัวอย่างเสร็จแล้วก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการอุดตันที่หัวคอลัมน์ ซึ่งทำให้ความดันระบบสูงกว่าปกติ
- ก่อนฉีดสารตัวอย่าง ต้องรอคอลัมน์ถึงสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่ก่อน โดยดูจาก baseline บนเครื่องบันทึกผลที่ต่อกับตัวตรวจวัด
- ก่อนฉีดสารตัวอย่างควรตรวจสอบรอยรั่วตามข้อต่างๆ รวมทั้งที่ eng fitting ของคอลัมน์ด้วย ซึ่งโดยมากมักรั่วเล็กน้อย และตรวจสอบได้ก็ต่อเมื่อใช้มือแตะจะรู้สึกเย็นเนื่องจากตัวทำละลายระเหยไป ถ้ามีรอยรั่วเกิดขึ้นมักจะทำให้ระดับ baseline ยกขึ้น มีอากาศเข้าไปในระบบและอาจมีผลกระทบต่อค่าความสูง และพื้นที่ของพีค ทำให้ผลการหาปริมาณแต่ละครั้งไม่เท่ากัน
- ไม่ควรขันข้อต่อของคอลัมน์แน่นเกินไป เพราะจะทำให้เกลียวของ fitting เป็นรอยจนรั่วได้ ซึ่งแม้จะขันต่อไปอีกก็ไม่สามารถหยุดรอยรั่วได้ เมื่อมีรอยรั่วเกิดขึ้นควรขันเพิ่มอีกเพียงเล็กน้อย และถ้ายังรั่วอยู่ควรถอดออกมาทั้งหมดแล้วจึงใส่กลับเข้าไปใหม่
- การเลือกคอลัมน์และตัวตรวจวัด เลือกชนิดคอลัมน์ให้เหมาะสมกับงาน ในกรณีที่เริ่มใช้คอลัมน์โดยไม่รั่วประวัติของคอลัมน์นั้นเลย ให้ล้างคอลัมน์(ไม่ต้องต่อเข้าตัวตรวจวัด) ก่อนตามวิธีที่เหมาะสม ส่วนตรวจวัดควรเลือกให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์
- การใช้คอลัมน์ในงาน HPLC ควรหลีกเลี่ยง หรือป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดัน อุณหภูมิและสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่โดยกะทันหัน เนื่องจากจะทำให้การจัดตัวของอนุภาคสารที่บรรจุ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดช่องว่างในคอลัมน์ ควรเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเป็นขั้นๆ ขั้นละ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันอย่างกะทันหัน (pressure shock) ควรให้เวลาหลายๆ นาทีในการให้คอลัมน์อยู่ที่ความดันปกติของการทำงาน และปล่อยให้ความดันค่อยๆ ลดลงมา เมื่อต้องการให้ปั๊มเลิกทำงาน การใช้ guard column สามารถช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจาก

จะมีแผ่นกรองที่มีขนาดรูอนุภาคประมาณ 0.5 ไมครอน ทำหน้าที่กรองอนุภาคที่อาจหลุดมาจากขั้นตอนการกรองตัวอย่าง และขณะเดียวกันก็เป็นการกรองเฟสเคลื่อนที่ซ้ำอีกครั้ง

- เพื่อยืดการใช้งานของคอลัมน์ ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH สูงหรือต่ำมาก ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH อยู่ในช่วง 3.5-6.5
- ตรวจดูอัตราการไหลคงที่หรือไม่ โดยสังเกตจากความดัน ถ้าคงที่จึงเริ่มวิเคราะห์ได้ ถ้าไม่คงที่อาจมีปัญหาที่การ degas ไม่ดีพอ ต้องทำการ degas ใหม่
- เมื่อฉีดสารตัวอย่างที่มีการเติมสารปนเปื้อนลงไป ควรล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมประมาณ 200-300 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราการไหลต่ำๆ
- ไม่ควรเก็บคอลัมน์ไว้ในที่ชื้นหรืออุณหภูมิที่ทำให้คอลัมน์และอนุภาคเกิดการขยายและหดตัวกลับไปกลับมา เพราะจะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในคอลัมน์ ดังนั้นควรเก็บอุณหภูมิระหว่าง 15-30 ^{o}C และเก็บในสภาพเปียก เช่น เก็บคอลัมน์ประเภท Liquid solid chromatography ด้วยตัวทำละลายที่แห้ง หรือเก็บคอลัมน์ประเภท reverse phase ในตัวทำละลายอินทรีย์ 100% เป็นต้น