

การเลือกตัวตรวจวัด (detector) คอลัมน์ (stationary phase)  
และตัวพา (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์ด้วย HPLC

กฤตยา เพชรผิ้ง

นักวิจัยชำนาญการ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. ม.เกษตรศาสตร์

HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) เป็นเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของสารต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล สารกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช ปริมาณธาตุอาหารในตัวอย่างดิน น้ำ พืช อาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยทั่วไป ซึ่ง HPLC ซึ่งเป็นเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านเครื่องมือ วิธีการ และองค์ประกอบ ทำให้การเลือกตัวตรวจวัด (Detector) คอลัมน์ (Stationary phase) และ mobile phase ให้เหมาะสมกับชนิดและประเภทของตัวอย่างวิเคราะห์ เพื่อให้ทำการวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้ผลการทดลองที่ถูกต้องแม่นยำ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ แต่ปัจจัยที่มีส่วนสำคัญเป็นอย่างมากต่อการตัดสินใจคือ คุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์

คุณสมบัติของสาร	
ขนาดโมเลกุล	<ul style="list-style-type: none"><li>• ขนาดรูพรุนของ packing material ในคอลัมน์ HPLC โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 100 Å หากตัวอย่างมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่ารูพรุนจะทำให้เกิดโอกาสการอุดตันในคอลัมน์ได้</li><li>• ตัวอย่างของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ได้แก่ โปรตีน polysaccharide</li></ul>
ความเป็นขั้ว	<ul style="list-style-type: none"><li>• คอลัมน์ของ HPLC ส่วนใหญ่แยกโดยอาศัยความเป็นขั้ว และคอลัมน์ที่ใช้กันมากคือ C18 ซึ่งเป็น Stationary phase แบบไม่มีขั้ว ทำให้หากสารที่มีขั้วมาก ๆ จะไม่สามารถแยกได้โดยใช้คอลัมน์ C18 ได้</li><li>• ข้อควรระวังคือหากสารที่ต้องการวิเคราะห์มีความไม่เป็นขั้วมากๆ จะเกิดอันตรกิริยากับคอลัมน์ และไม่สามารถถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้</li></ul>
สมบัติการละลาย	<ul style="list-style-type: none"><li>• หากไม่ทราบความเป็นขั้วของสาร สามารถคาดเดาได้จากการละลาย เช่น หากละลายได้ดีในน้ำ สารนั้นก็จะเป็นสารมีขั้ว แต่ถ้าหากสารนั้นละลายได้ดีใน Benzene สารนั้นก็จะไม่มีขั้ว เป็นต้น</li></ul>
ความเป็นประจุ	<ul style="list-style-type: none"><li>• ตัวตรวจวัดสารที่เป็นประจุได้คือ Conductivity detector หากสารที่วิเคราะห์มีประจุ ก็สามารถใช้ Conductivity detector เป็นตัวตรวจวัดได้</li></ul>

คุณสมบัติของสาร	
Amphoteric ability	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Amphoteric ability หรือ Zwitterion คือการที่โมเลกุลของสารมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงประจุเป็น บวก ลบ หรือเป็นกลางได้ตาม pH ของตัวทำละลาย ตัวอย่างของสารประเภทนี้ได้แก่ กรดอะมิโน</li> </ul>
การดูดกลืนคลื่นแสง	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ตัวตรวจวัดสารที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้คือ UV-Visible detector และ Photodiode array detector</li> </ul>
ดัชนีการหักเหแสง	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ตัวตรวจวัดที่ใช้ตรวจวัดสารด้วยการหักเหแสง คือ Refractive index detector ซึ่งใช้หลักการของความแตกต่างของดัชนีการหักเหแสงสารที่ต้องการตรวจวัดกับดัชนีการหักเหแสงของ mobile phase</li> <li>● หากดัชนีหักเหแสงของ น้ำ = 1.33 methanol = 1.33 และ glycerin = 1.49 แสดงว่าหากใช้น้ำเป็น mobile phase จะสามารถตรวจวัด glycerin ได้ แต่ไม่สามารถตรวจวัด methanol ได้ ดังนั้นหากต้องการตรวจวัด methanol ด้วย Refractive index detector จะต้องเปลี่ยน mobile phase เป็นสารอื่นที่มีค่าดัชนีหักเหแสงที่ต่างไป</li> </ul>
ความสามารถในการเรืองแสง	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ตัวตรวจวัดสารที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้คือ Fluorescent detector</li> </ul>