ปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ 2

High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

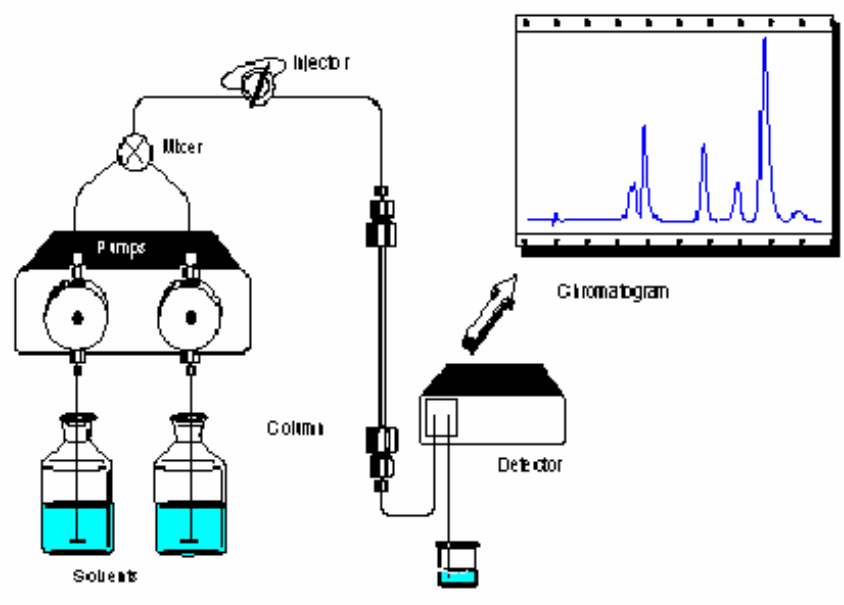
วัตถุประสงค์

เพื่อเรียนรู้หลักการทำงานของเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) และวิธีการหาปริมาณ Caffeine ในตัวอย่างโดยใช้เทคนิค HPLC

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

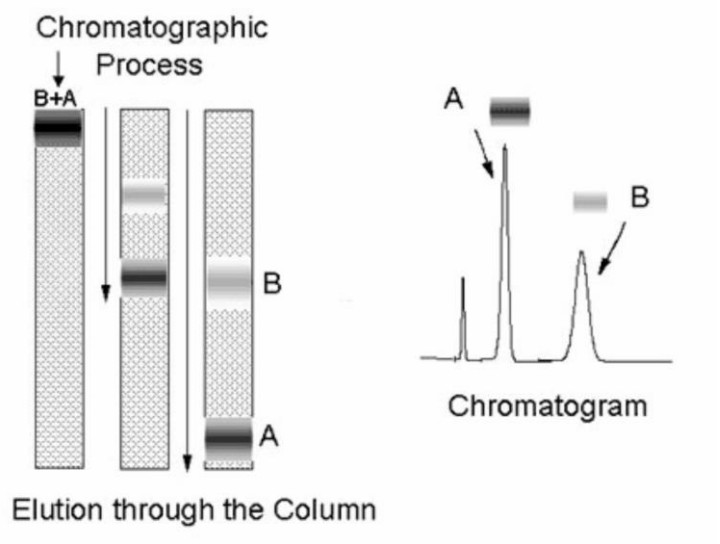
HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเฟสที่อยู่กับที่สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่าโครมาโตแกรม

HPLC แยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (High Pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) พาสารตัวอย่างฉีดเข้าช่องฉีดสาร (Injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ (Column) เมื่อสารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (Detector)



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา : http://www_waters_com-WatersDivision-images-products-hplc_primer_fig_d_jpg



ภาพที่ 2 ลักษณะของ chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

ที่มา : http://www_waters_com-WatersDivision-images-products-hplc_primer_fig_d_jpg

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

1. Mobile phase / Solvent : ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสที่อยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์

2. Pump : ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC

3. Injector / Autosampler : ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC

4. Column : ภายในบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่ กับ เฟสที่อยู่กับที่

5. Detector : เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก

HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

การพิจารณาเลือกใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์จะต้องคำนึงถึง

1. ธรรมชาติของสารตัวอย่าง เช่น สมบัติทางการภาพและทางเคมี เช่น ความสามารถใน การละลายของสารตัวอย่าง ขนาดโมเลกุลของสาร มวลโมเลกุลของสาร สารตัวอย่างมีขั้ว หรือไม่มีขั้ว เป็นต้น
2. ตัวอย่างต้องละลายได้ในเฟสที่เคลื่อนที่
3. กรองตัวอย่างก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
4. เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ต้องเป็น HPLC เกรดเท่านั้น

5. ตัวอย่างที่มีสารรบกวน (Interference) จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อกำจัด Interference นั้นก่อนฉีดเข้าเครื่อง

6. ต้องคำนึงถึงการเข้ากันได้ดีของเฟสเคลื่อนที่ในกรณีที่มีการใช้เฟสเคลื่อนที่มากกว่า 1 ชนิดในการแยก

ตารางที่ 1 ชนิดของสารที่ต้องการแยก วิธีการแยก เฟสที่อยู่กับที่ และ เฟสเคลื่อนที่ที่ควรเลือกใช้

Type of compounds separated	Mode	Stationary phase	Mobile phase
Naterals, Weak acid, Weak bases	Reversed-Phase	C-18, C-8, C-4, C-2	Water/Organic solvent
Ionics, Bases, Acids	Ion-Pair	C-18, C8	Water/Organic Ion-Pair reagent
Compound insoluble in Water, Organic Compounds	Normal-Phase	Silica, amino, Cyano Diol	Organic
Ionics, Inorganic ions	Ion Exchange	Anion or Cation exchange resin	Aqueous/Buffer counter ions
High Molecular compound, Polymer	Size Exclusion	Silica, stylene-Divinylbenzene	Gel filtration water/ Gel filtration Organic

เครื่อง HPLC ประกอบไปด้วย

detector : .....
Injection volume : .....
Column: .....
Mobile phase : .....

สารเคมีที่ใช้

1. Caffeine
2. methanol (HPLC grade)

เตรียม สารละลายมาตรฐาน Caffeine stock solution ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ mobile phase เป็นตัวทำละลาย เก็บสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ใน ขวดสีชา

การหาปริมาณ Caffeine โดยใช้เครื่อง HPLC

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Caffeine ความเข้มข้น 100, 200, และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย เพื่อสร้าง Calibration curve
1. กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Millipore filter ขนาด 45 ไมครอน
2. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
3. นำตัวอย่าง Caffeine กรองผ่าน Millipore filter ขนาด 45 ไมครอน
4. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
5. คำนวณหาความเข้มข้นของของตัวอย่าง Caffeine โดยเทียบพื้นที่ใต้ peak และหาความเข้มข้นจาก calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน

ตัวอย่างการสร้างกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น	peak Area
100	25000
200	50100
300	76000