บทที่ 2

ทฤษฎี

(Theory)

2.1 ไอออนโครมาโทกราฟี (Ion Chromatography , IC)

ไอออนโครมาโทกราฟเป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวิเคราะห์ไอออน ทั้งแคตไอออนและแอนไอออน ซึ่งอาจเป็นไอออนของสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ หรืออยู่รวมกันเป็นของผสมก็ได้ โดยการ inject เพียงครั้งเดียว การแยกสาร ใช้คอลัมน์ชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) และ ตรวจวัดปริมาณไอออนโดยใช้เครื่องวัดคอนดักติวิตีดีเทกเตอร์ ในปัจจุบันนี้สามารถใช้เครื่องวัดชนิดอื่น เช่น อัลตราไวโอเลตสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ อิเลคโทรเคมีคัลดีเทกเตอร์ Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer และ Refractive index detector เป็นต้น

การพัฒนาเครื่องมือไอออนโครมาโทกราฟ นับว่าเป็นการแก้ปัญหาหลาย ๆ อย่างของงานการวิเคราะห์ไอออนในระบบที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย (aqueous systems) ทั้งนี้เนื่องมาจากวิธีการวิเคราะห์ไอออนตามแบบดั้งเดิมนั้นมีปัญหาหลายประการกล่าวคือ

1. ต้องเลือกใช้รีเอเจนต์ที่เฉพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ไอออนแต่ละชนิด ทำให้ต้องสิ้นเปลือง และต้องเตรียมรีเอเจนต์เป็นจำนวนมาก

2. เกิดการแทรกสอดเนื่องจากสารบางชนิดที่ปนมากับตัวอย่าง (sample matrix) ทำให้ผลการวิเคราะห์อาจผิดพลาดได้ หรืออาจจะต้องเสียเวลาในการกำจัดสิ่งแทรกสอดเหล่านั้น

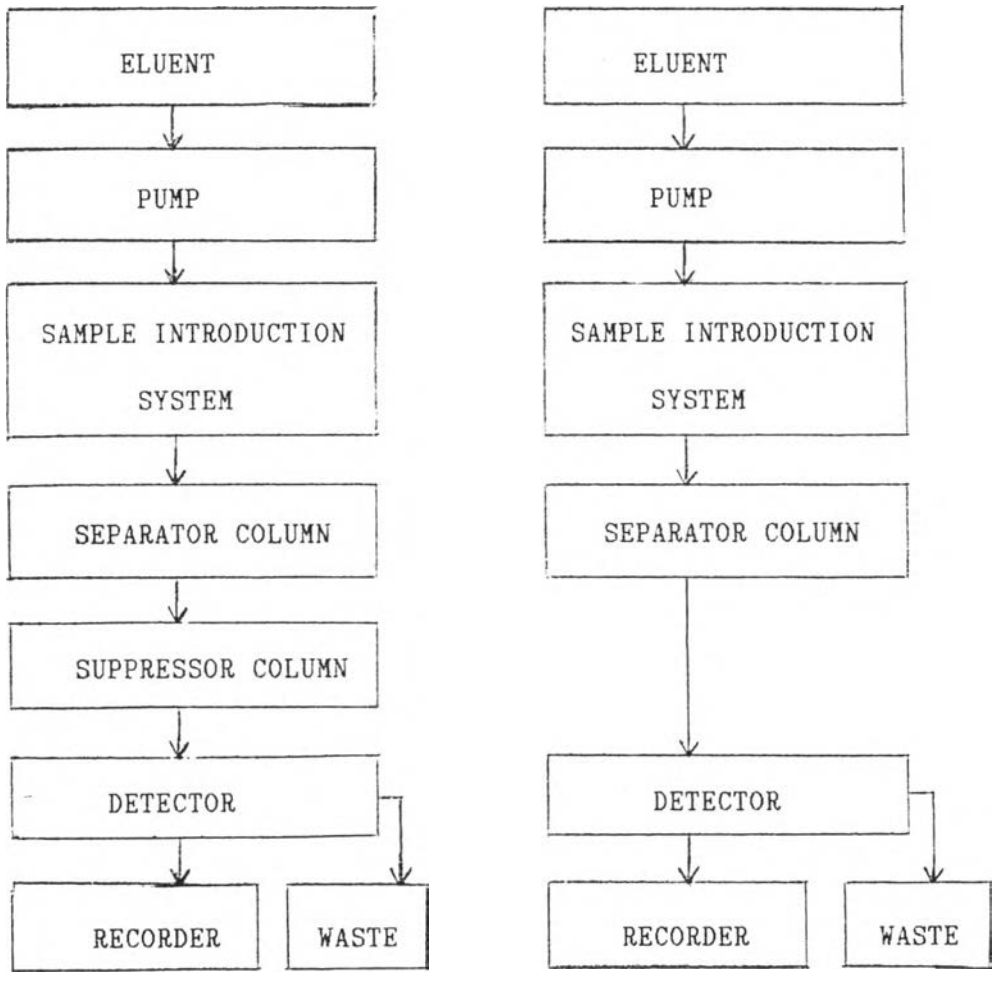
3. เกิดการแทรกสอดเนื่องจาก การมีไอออนหลายชนิดที่มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกันอยู่รวมในตัวอย่างเดียวกัน

019167

4. การวิเคราะห์ไอออนปริมาณต่ำในตัวอย่างไม่ได้ เนื่องจากบางวิธีนั้นค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ค่อนข้างสูง จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ไอออนในปริมาณต่ำมาก ๆ ได้

5. การวิเคราะห์แต่ละครั้ง สามารถวิเคราะห์ไอออนได้เพียงชนิดเดียว ถ้าต้องการวิเคราะห์ไอออนหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกัน ต้องเสียเวลาในการวิเคราะห์หลายครั้ง

6. เครื่องมือชนิดเดียวไม่สามารถวิเคราะห์ไอออนที่สนใจจะศึกษาได้ทุกชนิด ดังนั้นในการวิเคราะห์ อาจจะต้องใช้เครื่องมือหลายชนิด ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

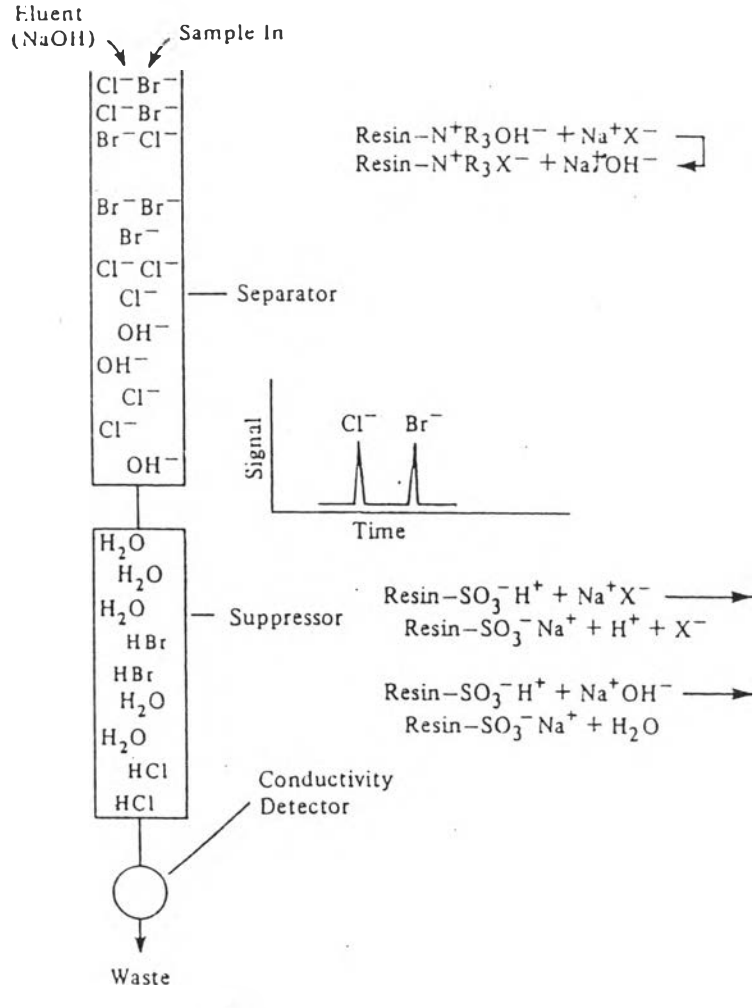


(2.1 a) (2.1 b)

รูปที่ 2.1 a,b แสดงแผนภาพเครื่องไอออนโครมาโทกราฟชนิดมีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ และชนิดไม่มีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์

ไอออนโครมาโทกราฟีแบ่งตามลักษณะการทำงานได้ 2 แบบ คือ ไอออนโครมาโท-กราฟี ชนิดมีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ (suppress-type ion chromatography) และ ไอออนโครมาโทกราฟีชนิดไม่มีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ (non-suppress type or single column ion chromatography) เครื่องมือพื้นฐานสามารถแสดงด้วยรูปที่ 2.1 a, b

2.1.1 ไอออนโครมาโทกราฟี ชนิดมีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ เครื่องมือพื้นฐานแสดงในรูปที่ 2.1 (a) และรูปที่ 2.2 แสดงกระบวนการแยกแอนไอออน



รูปที่ 2.2 แสดงแผนภาพกระบวนการแยกแอนไอออน

หลักการทำงานของเทคนิคนี้คือ ไอออนจะถูกแยกโดยคอลัมน์แยกแล้วผ่านเข้าสู่ซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ ซึ่งจะเปลี่ยนแอนไอออนที่วิเคราะห์เป็นกรดที่มีสภาพนำไฟฟ้าจำเพาะ (specific conductivity) สูงขึ้น และเปลี่ยนตัวชะเป็นน้ำ หรือกรดอ่อนที่มีสภาพนำไฟฟ้าจำเพาะต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ดังนั้นสารที่เข้าสู่ดีเทกเตอร์จึงมีสภาพนำไฟฟ้าแตกต่างกันมากระหว่างตัวชะและสารที่วิเคราะห์ เป็นการเพิ่มสภาพไวของระบบขึ้น ทำให้ขีดจำกัดของการตรวจวัด (detection limit) ต่ำถึงระดับนาโนกรัม (ng) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีข้อเสีย หลายประการคือ

1. การเพิ่มซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ (suppressor column) ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกลดลงเนื่องจากการกระจายของแถบไอออนกว้างมากขึ้น (band broadening)

2. ซัพเพรสเซอร์คอลัมน์มีอายุการใช้งานสั้นมาก ประมาณ 5-10 ชม. จากนั้นต้องนำมาปรับสภาพใหม่ (regenerate) จึงจะสามารถใช้งานได้อีก ทำให้งานไม่ต่อเนื่อง เสียเวลา และ เสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น แต่ในปัจจุบันซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ที่ใช้กับเครื่องไอออนโครมาโทกราฟ ได้มีการพัฒนาให้สามารถใช้ได้นาน และสะดวกขึ้น

3. มีข้อจำกัดในการเลือกตัวชะ กรณีการวิเคราะห์แอนไอออนตัวชะจะต้องเป็นสารละลายเบสเท่านั้น เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เป็นต้น

4. ใช้ในการวิเคราะห์แอนไอออนของกรดอ่อนได้ไม่ดี เช่น กรดอินทรีย์ เนื่องจากเมื่อไอออนเหล่านั้นผ่านซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ จะเปลี่ยนเป็นกรดซึ่งมีค่าสภาพนำไฟฟ้าต่ำ ทำให้สัญญาณที่ได้ต่ำ

2.1.2 ไอออนโครมาโทกราฟีชนิดไม่มีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ เครื่องมือพื้นฐานแสดงในรูปที่ 2.1 (b) การพัฒนาเครื่องมืออาศัยพื้นฐานแบบแรกแตกต่างกันในส่วนที่ใช้คอลัมน์แยกเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงต้องเลือกสารตัวชะที่มีสภาพนำไฟฟ้าจำเพาะต่ำ ส่วนมากจะใช้กรดอินทรีย์ชนิดอะโรมาติก

<u>การพัฒนาเทคนิคนี้มีหลักสำคัญ 2 ประการคือ</u>

ประการที่ 1 เลือกคอลัมน์ที่มีความจุ (capacity) ต่ำ

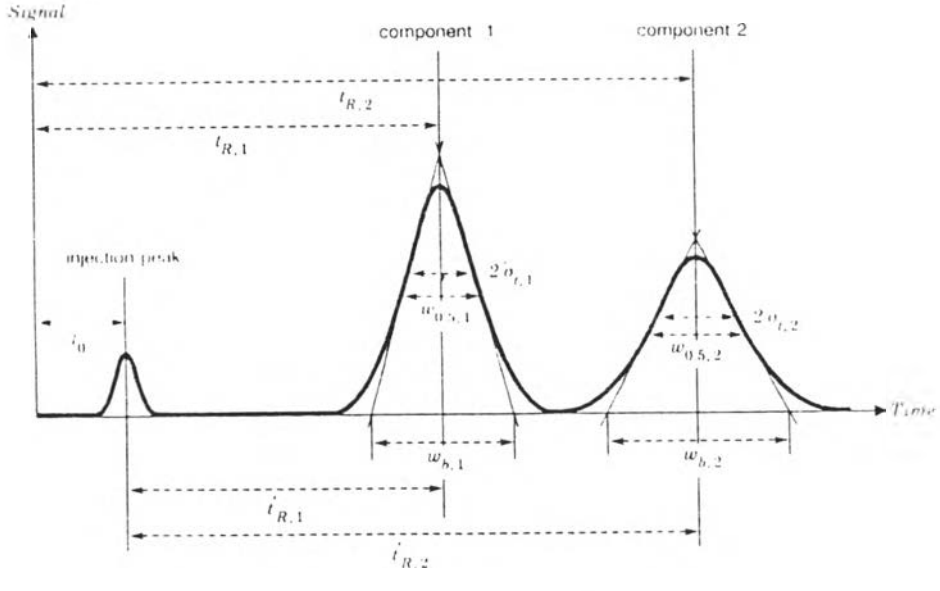
ประการที่ 2 เลือกตัวชะที่มีสภาพนำไฟฟ้าจำเพาะต่ำ ความเข้มข้นควรจะต้องต่ำในระ

ดับมิลลิโมลาร์ด้วย

2.2 ทฤษฎีสัมพันธ์กับภาคปฏิบัติ (Theory related to practice)

การพิจารณาทางทฤษฎี จะเป็นแนวทางที่เป็นประโยชน์ทางปฏิบัติเป็นอย่างมาก จุดมุ่งหมายของไอออนโครมาโทกราฟี คือ การแยกไอออนหลายชนิดที่อยู่รวมกันออกจากกันได้ในระยะเวลาพอสมควร แล้วตรวจวัดสัญญาณเพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และปริมาณด้วยวิธีที่เหมาะสม

2.2.1 รีเทนชันไทม์ (retention time, t_r) หมายถึงระยะเวลาที่ไอออนอยู่ในระบบการแยกจนกระทั่งเคลื่อนผ่านออกมายังดีเทกเตอร์เป็นนาที การแยกจะประสบผลสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อไอออนหลายชนิดที่วิเคราะห์มีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ ดังนั้นจากนิยามของสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient, K_x) คือการวัดลำดับของสาร x ที่ถูกยึด หรือทำให้เคลื่อนที่ช้าลง พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ของผสม 1 และ 2 โดยเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

t_o คือ เวลาของโมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกฉีดเข้าไปหรือของสารที่ไม่ถูกยึดเกาะเดินทางผ่านในระบบการแยก

t_r คือ เวลาของสารที่ inject เดินทางผ่านในระบบการแยก

t'_r คือ เวลาของสารที่ inject เดินทางผ่านคอลัมน์

นอกจากนี้ยังสามารถแสดงการเคลื่อนที่ของสารในระบบการแยก โดยใช้ค่ารีเทนชันโวลุม (retention volumn , V_r) ค่า V_r หาได้จากโครมาโทแกรม โดยที่

$$V_r = F t_r$$

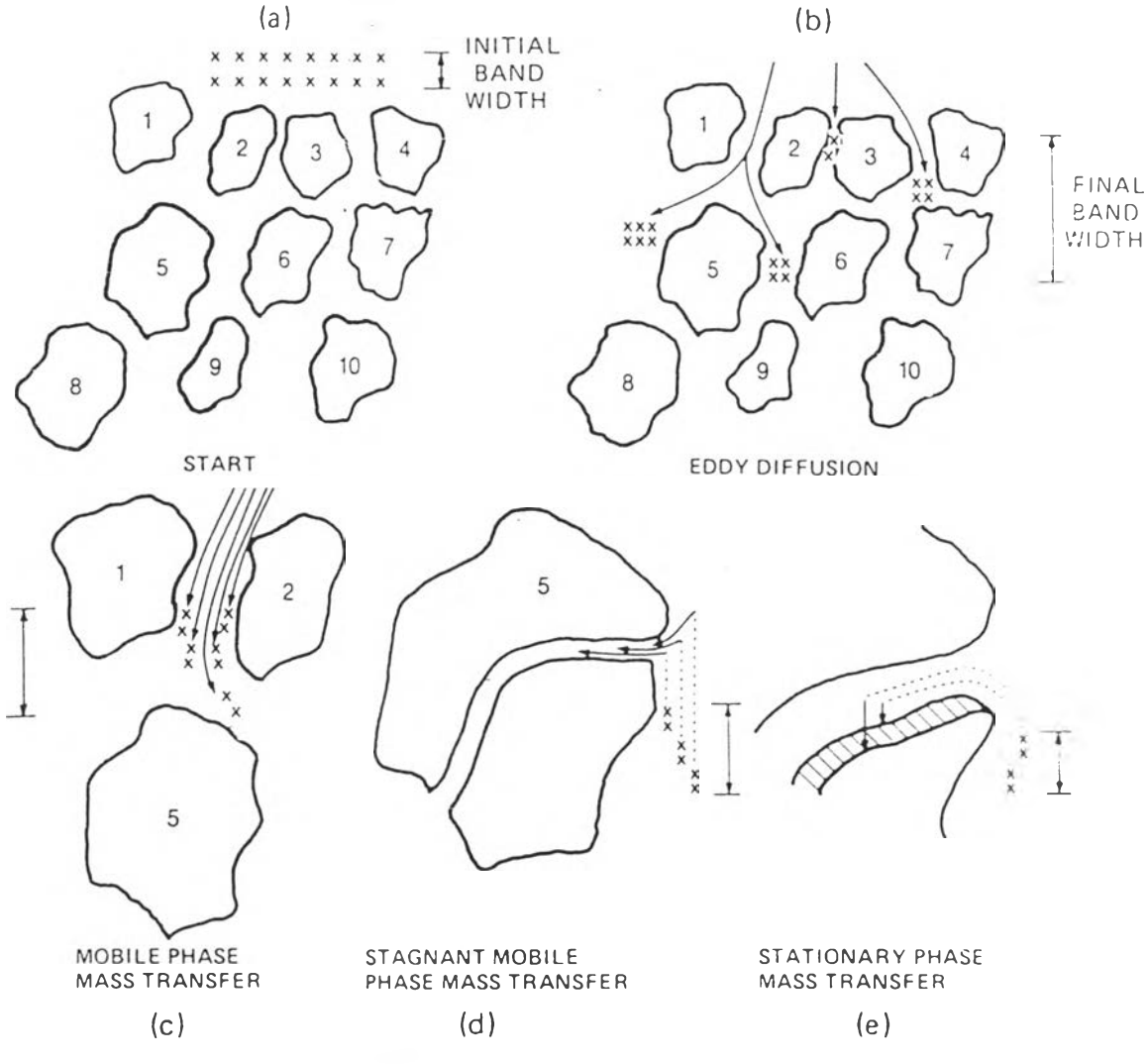
F คือ อัตราการไหลของสารละลายตัวชะ (mL/min)

2.2.2 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) ประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถพิจารณาได้จากอัตราการขยายกว้างของแถบไอออน (band broadening) เมื่อแถบนี้เคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ โดยปกติการกระจายตัวของไอออนที่ประกอบเป็นแถบนั้นจะอยู่ในลักษณะเป็นรูป gaussian จุดกึ่งกลางของแถบนั้นก็คือ k-value ของไอออนแต่ละชนิด ซึ่งหมายถึงอัตราเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของไอออนนั้น และถ้าเกิดการเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ยเล็กน้อยจะเป็นผลเนื่องจาก nonequilibrium effect ของสารประกอบนั้นกับสารที่บรรจุในคอลัมน์และสารละลายตัวชะ เรียกว่า "resistance to mass transfer"

การเกิดขยายกว้างของแถบไอออนในขณะที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์มีหลายสาเหตุ ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วย rate process ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ดังนี้

พิจารณาไอออน x รูปที่ 2.4 (a) แสดงถึงภาพตัดขวางของส่วนบนของคอลัมน์โดยใช้สัญลักษณ์ x แทนแถบสารตัวอย่างที่เริ่มฉีดเข้าไปสู่ส่วนบนของคอลัมน์ ที่จุดนี้แถบสารจะแคบมากเมื่อถูกสารละลายตัวชะพาผ่านเข้าสู่คอลัมน์ก็จะเกิดการกระจายของแถบสาร ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (b) เรียกว่า "Eddy diffusion" หรือ "multiple flow path" ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของกระแสการไหลของสารละลายตัวชะในคอลัมน์ ทำให้ไอออนแต่ละตัว เลือกทางเดินที่แตกต่างกัน ซึ่งจะขึ้นอยู่กับว่ามันจะเคลื่อนที่ไปกับการไหลของสารละลายตัวชะในทิศ

ทางใด ทางไหล (flow path) ที่แตกต่างกันดังแสดงด้วยลูกศร ในรูปที่ 2.4(b) นั้นเกิดขึ้นเนื่องจากขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์แตกต่างกัน สารละลายจะเคลื่อนที่ได้เร็วในทางที่กว้าง และจะเคลื่อนที่ได้ช้าในทางที่แคบ เช่นทางไหลระหว่างอนุภาค 1 และ 2 หรือ 5 และ 6 กว้าง ความเร็วของสารละลายที่ไหลจะสูงไอออนที่เคลื่อนที่ทางนี้จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางยาวภายในเวลาที่กำหนดให้ ส่วนไอออนที่เคลื่อนที่ทางช่องระหว่างอนุภาค 2 และ 3 จะเคลื่อนที่ได้ช้าทำให้เคลื่อนที่ได้ระยะทางที่สั้นกว่าในเวลาที่เท่ากัน ดังนั้น จึงเกิดการกระจายของแถบไอออนกว้างขึ้น และจะกว้างเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อมีการไหลผ่านคอลัมน์ที่ยาวมากขึ้น



รูปที่ 2.4 แสดงสิ่งที่สนับสนุนต่อการกระจายของโมเลกุลในลิควิดโครมาโทกราฟี

ทยสิ่งสถาบัน กลางวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกระจายของแถบไอออน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (c) เรียกว่า mobile phase mass transfer ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากอัตราการไหลของสารละลายรอบๆ อนุภาคจะแตกต่างกัน จากรูป 2.4 (c) การไหลของของเหลวระหว่างอนุภาค 1 และ 2 ของเหลวที่อยู่ใกล้อนุภาค จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าของเหลวที่อยู่ด้านใน หรือ ตรงกลางช่อง ทำให้ไอออนที่อยู่ใกล้อนุภาค จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่สั้นกว่าไอออนที่อยู่ตรงกลางช่องในเวลาที่เท่ากัน ซึ่งทำให้เกิดการกระจายของแถบไอออนตามแนวคอลัมน์

อีกสาเหตุหนึ่งเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้อนุภาคที่มีรูพรุนบรรจุในคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (d) ไอออนของสารจะเคลื่อนที่เข้าออกจากรูนี้ได้ด้วยการแพร่ไอออนที่เคลื่อนที่เข้าไปในรูได้จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่า และยิ่งแพร่เข้าไปในรูที่ลึกมาก จะยิ่งเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นมากขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ไปตามแนวคอลัมน์ได้ระยะทางไม่เท่ากันในเวลาที่เท่ากัน เป็นสาเหตุของการกระจายของแถบไอออนอีกสาเหตุหนึ่งเรียกว่า stagnant mobile phase mass transfer

สาเหตุสุดท้าย เรียกว่า stationary phase mass transfer เกิดขึ้นเนื่องจากไอออนของสารที่แพร่เข้าไปในรูพรุนแล้วเกิดการซึมผ่าน (penetrate) เข้าไปในเฟสคงที่ ถ้าเข้าไปลึกมากก็จะเสียเวลาอยู่ในเฟสคงที่นาน ส่วนไอออนที่ใช้เวลาในเฟสคงที่ไม่นานจะสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า จะเคลื่อนที่ลงมาตามคอลัมน์ได้ระยะทางที่ไกลกว่าจึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกระจายของแถบไอออน

ค่าที่ใช้ในการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวน theoretical plates (N) ซึ่งสามารถคำนวนได้จากโครมาโทแกรม โดยใช้สมการต่อไปนี้

$$N = 16\,(t_r/w)^2 \qquad (2.1)$$

$$= 5.54\,(t_r/w_{1/2})^2$$

โดยที่ w = ความกว้างของฐานพีก

$w_{1/2}$ = ความกว้างของพีกที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

ความกว้างของฐานพีกหาได้จากการลากเส้นสัมผัสมาตัดเส้น baseline ระยะทางจากจุดตัดทั้งสอง คือ ความกว้างของฐานพีก ส่วน theoretical plates model ได้มาจากทฤษฎีของการกลั่นโดยตั้งสมมุติฐานว่า คอลัมน์ได้จากการนำเอา เพลตเล็ก ๆ มาประกอบกันเข้า แต่ละเพลตจะเกิดสมดุลของการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นค่า N ยิ่งมีค่ามาก ประสิทธิภาพ ในการแยกจะดีตามไปด้วย

พารามิเตอร์ที่มีประโยชน์อีกตัวหนึ่งที่ใช้ในการวัดประสิทธิภาพของคอลัมน์ คือ height equivalent to a theoretical plates (HETP หรือ H)ซึ่งหมายถึง ความยาวของคอลัมน์ต่อจำนวนเพลต ดังแสดงในสมการ

$$H = L/N$$

เมื่อ L = ความยาวของคอลัมน์

คอลัมน์ที่มีค่า H ต่ำ จะมีประสิทธิภาพในการแยกดีกว่าคอลัมน์ที่มีค่า H สูง

นอกจากนี้พฤติกรรมที่เกิดขึ้นเสมอในคอลัมน์ที่ใช้แยกสารคือ การกระจายของแถบสารหรือไอออนก็ยังมีผลถึงค่า H ดังแสดงในรูปที่ 2.5 และสามารถอธิบายได้โดยสมการทางคณิตศาสตร์ ดังต่อไปนี้

$$H = \Sigma H_i$$

$$= 1/(1/H_{ed} + 1/H_{mp}) + H_{ld} + H_{sm} + H_{sp} \quad (2.2)$$

เมื่อ $H_{ed} = C_e d_o$ (eddy diffusion)

$H_{mp} = C_m d_p^2 v/D_m$ (mobile-phase mass transfer)

$H_{ld} = C_d D_{m/v}$ (longitudinal diffusion)

$H_{sm} = C_{sm} d_p^2 v/D_m$ (stagnant-to-mobile-phase mass transfer)

$H_{sp} = C_s d_f^2 v/D_s$ (stationary-phase mass transfer)

d_p = เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค

D_m = สัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

D_s = สัมประสิทธิ์การแพร่ของตัวถูกละลายในเฟสคงที่

v = ความเร็วเชิงเส้นของเฟสเคลื่อนที่

d_f = ความหนาของฟิลม์ (film) ของเฟสเคลื่อนที่

C_e, C_m, C_d, C_{sm} และ C_s = plate height coefficeints

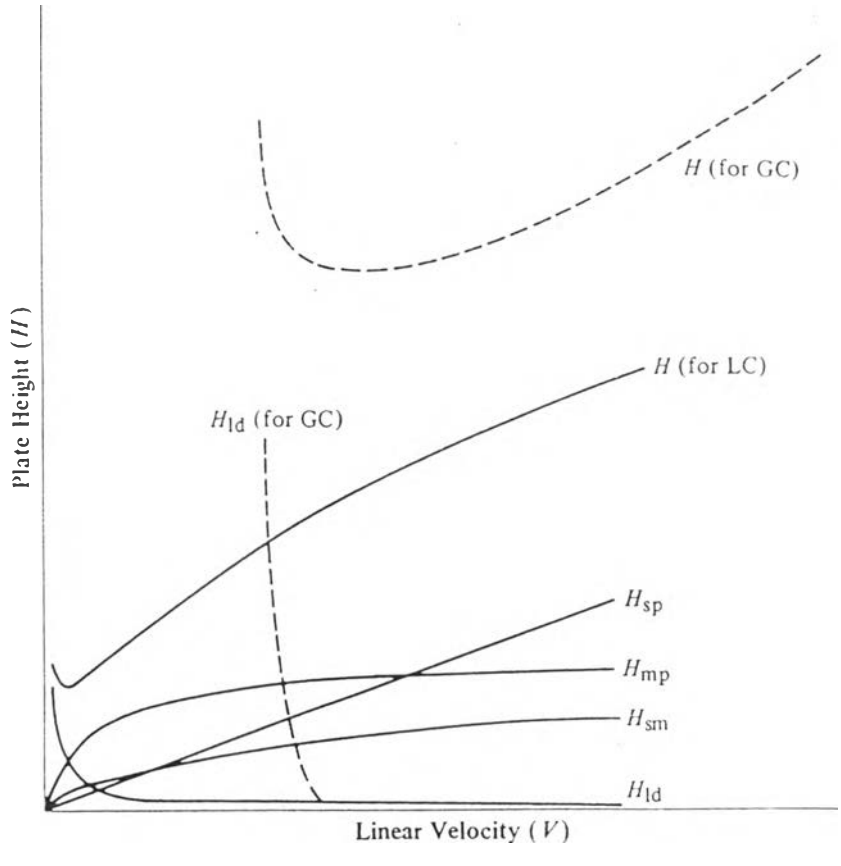
จากสมการที่ 2.2 สามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

H จะมีค่าน้อยเมื่อค่า d_p และ V มีค่าน้อย

H จะมีค่าน้อยสำหรับ สารละลายตัวชะที่มีความหนืดต่ำ

H จะมีค่าน้อยสำหรับการแยกที่อุณหภูมิสูง

H จะมีค่าน้อยสำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก



รูปที่ 2.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเร็วของการไหล ขึ้นอยู่กับค่า H และค่าต่างๆ ที่มีผลต่อ H

เพราะฉะนั้นการปรับปรุงเพื่อให้การแยกสารดีขึ้นสามารถทำได้ โดยใช้อนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ให้มีขนาดเล็ก ใช้อัตราการไหลของสารละลายตัวชะช้าลง ใช้ตัวทำละลายที่ไม่หนืด และใช้คอลัมน์ที่ยาว

2.2.3 Capacity factor,k เป็นค่าที่ใช้ในการพิจารณาการเคลื่อนที่ของสารออกจากคอลัมน์ โดยสามารถหาได้จากโครมาโทแกรมโดยตรง ดังแสดงในสมการ

$$k = (t_r - t_o)/t_o = (t_r/t_o - 1)$$

ถ้า k มีค่าน้อยเกินไปแสดงว่าไอออนนั้นเคลื่อนออกจากระบบเร็วมาก อาจจะออกรวมมากับพีกของสารละลายตัวชะ ถ้า k มีค่ามากเกินไป แสดงว่า สารนั้นเคลื่อนออกจากคอลัมน์ช้ามาก มีผลให้พีกกว้าง (peak broadening) การแยกไม่ดี สภาพไวในการวิเคราะห์ต่ำและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ควรมีค่า k อยู่ในช่วง 1-5

2.2.4 Selectivity, α เป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการแยกไอออนสองชนิดที่แสดงพีกในโครมาโทแกรมเดียวกัน และไอออนสองชนิดจะแยกกันได้เมื่อค่า k แตกต่างกัน แสดงโดยค่า α บางครั้งอาจเรียกค่านี้ว่า separation factor ดังสมการ

$$\alpha = k_2/k_1 \qquad (k_2 > k_1)$$

2.2.5 การแยก (resolution , R_s) เป็นค่าที่แสดงถึงคุณภาพของการแยกไอออนสองชนิดที่มีพีกติดกัน ค่าของการแยกหาได้จากสมการ

$$R_s = 2(t_{r_2} - t_{r_1})/(W_{b_1} + W_{b_2})$$

W_{b_1} , W_{b_2} คือความกว้างของฐานพีก

ถ้า R_s = 0.5 แสดงว่าพีกแยกได้เฉพาะยอดพีก ค่า R_s ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ คือ R_s =1.5 ถ้า R_s มีค่ามากว่านี้มีผลดีในเรื่องการหาปริมาณ แต่อาจจะไม่เหมาะสมในการแยกสารหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งหนึ่ง เพราะทำให้เวลาในการวิเคราะห์นานเกินไป

รูปที่ 2.6 แสดงการแยกของพีกที่ค่า R_s ต่าง ๆ และอัตราส่วนความสูงของพีกแตกต่างกัน

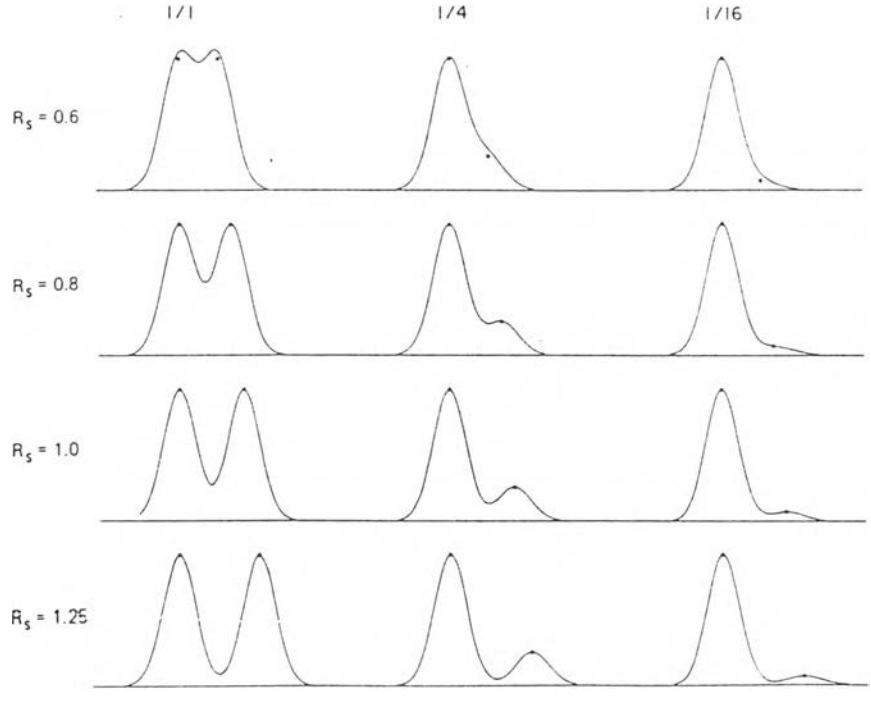
นอกจากนี้ ค่า R_s ยังสามารถหาได้จากพารามิเตอร์อื่น ๆ เช่น ค่า k_2 α และจำนวนเพลต ดังแสดงในสมการ

$$R_s = (\sqrt{N}/4) \times (\alpha - 1)/\alpha \times k_2/(1+k_2)$$

เมื่อ k_2 คือ capacity factor ของพีกหลัง

จากสมการข้างต้น ถ้าพิจารณาการเพิ่มค่าการแยก สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

2.2.5.1 เปลี่ยนแปลงค่า k ของไอออน ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงความแรง (strength) ของสารละลายตัวชะ เช่น โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ความเป็นกรดด่าง และปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามต้องระวังเรื่องข้อจำกัดของคอลัมน์ และดีเทกเตอร์ด้วย



รูปที่ 2.6 แสดงการแยกที่ขึ้นอยู่กับค่า R_s และอัตราส่วนของความสูงของพีก

2.2.5.2 การเพิ่มจำนวนเพลทของคอลัมน์ทำได้โดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ ลดขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์ และการลดอัตราการไหล แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือทำให้เวลาในการวิเคราะห์นาน และพีกกว้างขึ้น จึงมักไม่นิยมใช้ประกอบกับการใช้ วิธีนี้อาจจะต้องเปลี่ยนคอลัมน์ ทำให้สิ้นเปลือง

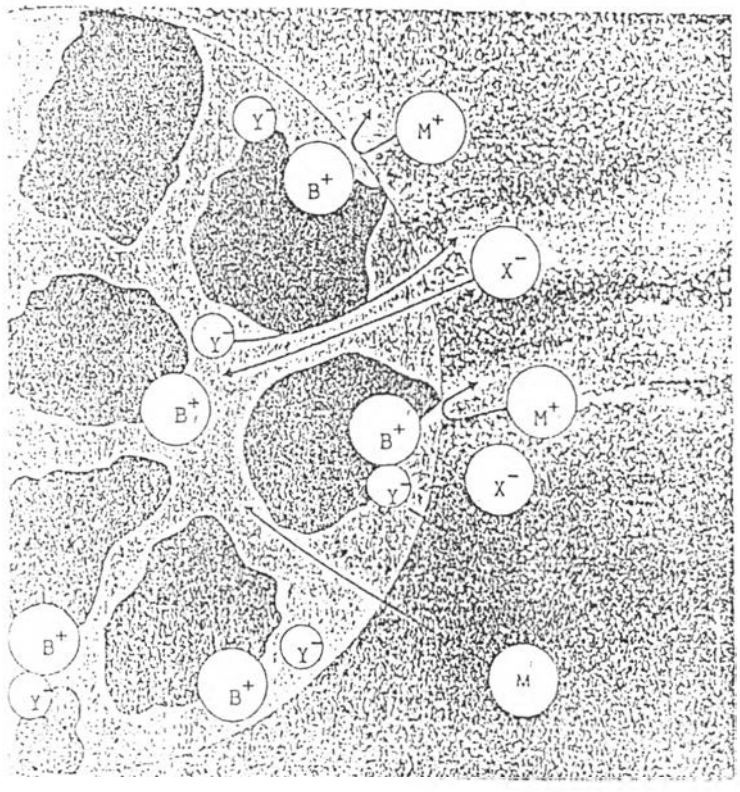
2.2.5.3 เพิ่ม selectivity ซึ่งทำได้โดยเปลี่ยนหรือเลือกใช้คอลัมน์ให้เหมาะสม หรือโดยการเปลี่ยนองค์ประกอบของสารละลายตัวชะ

การเลือกวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มค่า R_s นั้นไม่สามารถทำได้ทุกวิธีเนื่องจาก ต้องพิจารณาถึงความเหมาะสม วัตถุดิบที่มี เช่น คอลัมน์ สารเคมี และตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น

2.2.6 ความจุสารของเฟสคงที่ (Capacity , C) หมายถึง ความสามารถของเฟสคงที่ ที่จะรับไอออนในสารตัวอย่าง ซึ่งจะแสดงปริมาณสารตัวอย่างคิดเป็นมิลลิอิควิวาเลนซ์/กรัมของเฟสคงที่ (meq/g) โดยทั่วไปในเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีแบบไม่มีซัพเพรสเซอร์ คอลัมน์จะมีค่าความจุอยู่ในช่วง 0.007 - 1.0 meq/g ค่าความจุของเฟสคงที่จะมีความสำคัญในงานวิเคราะห์มาก เนื่องจากจะได้เลือกใช้ปริมาณสารตัวอย่างให้เหมาะสมเพื่อป้องกันการเกด overload ซึ่งเกิดจากการใช้สารตัวอย่างมากเกินความจุของคอลัมน์ จะเป็นผลทำให้เกิดรูปร่างของพีกไม่สมมาตร การเปลี่ยนแปลงรีเทนชันไทม์ และทำให้การแยกไม่ดี

2.3 การแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange)

การแลกเปลี่ยนไอออนเกิดจากการแข่งขัน (competible) กัน ระหว่างไอออนที่วิเคราะห์กับไอออนของสารละลายตัวชะ (counter ion) เพื่อจับกับประจุบนคอลัมน์ ตัวอย่างเช่น ในการวิเคราะห์แอนไอออน สามารถแสดงการแลกเปลี่ยนไอออนดังแสดงในรูปที่ 2.7 และเขียนเป็นสมการได้ดังนี้



รูปที่ 2.7 แสดงการแลกเปลี่ยนไอออนของการวิเคราะห์แอนไอออน (X^-)

$$B^+Y^- + X^- \rightleftharpoons B^+X^- + Y^-$$

$$K_{xy} = \frac{[B^+X^-][Y^-]}{[B^+Y^-][X^-]}$$

K_{xy} = ค่าสมดุลย์คงที่ (equilibrium constant or selectivity coefficient)

X^- = แอนไอออนที่วิเคราะห์

Y^- = แอนไอออนจากตัวชะ

B^+ = ประจุบนคอลัมน์

ค่า K_{xy} ขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายอย่าง ซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของแอนไอออน เช่นขนาดไอออนที่มีน้ำล้อมรอบ (hydrate size) จำนวนประจุบนไอออน

(charge number) และคุณสมบัติความเป็น hydrophobic เนื่องจากสารที่จับกับคอลัมน์ต้องอยู่ในสภาพไอออนเท่านั้น ดังนั้นถ้าสารที่วิเคราะห์เป็นกรดอ่อน การเกิดไอออนจะขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของการแตกตัว (Dissociation constant , K_a)

$$HX \rightleftharpoons H^+ + X^-$$

$$K_a = \frac{[H^+][X^-]}{[HX]}$$

การเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์จะช้าหรือเร็วพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient)

$$D_x = \frac{[B^+X^-]}{[X^-]+[HX]}$$

$$= K_{xy} \times \frac{[B^+Y^-]}{[Y^-]} \times \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}}$$

จากสมการค่า D_x เกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายอย่าง ในทางปฏิบัติ การปรับ pH การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวชะจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่ารีเทนชันไทม์ของไอออนมาก

2.4 การแยกสาร (separation)

การที่ สารหรือไอออนเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ แล้วเกิดการแยกขึ้น เนื่องจากสารแต่ละตัวเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แตกต่างกัน (differential migration) ทำให้สารแต่ละชนิดผ่านออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน รายงานผลเป็นค่ารีเทนชันไทม์ของสารนั้น กระบวนการแยกที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องจาก ความสัมพันธ์ของสารที่วิเคราะห์กับสารที่บรรจุในคอลัมน์หรือเฟสคงที่ (stationary phase) และสารละลายตัวชะหรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในเทคนิค

ไอออนโครมาโทกราฟี คอลัมน์ที่ใช้แยกสารเป็นชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange column) โดยที่สารที่บรรจุในคอลัมน์เป็นเรซิน (resin) หรือ ซิลิกา (silica) ที่มีหมู่ฟังก์ชันนัล เป็นประจุบวกหรือลบเพื่อทำหน้าที่แลกเปลี่ยนไอออน ซึ่งหมู่ฟังก์ชันนัลที่ใช้มีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตาราง 2.1 แสดงไอออนเอกซ์เชนจ์ชนิดต่าง ๆ ของสารที่ใช้แลกเปลี่ยน และสารเคมีที่ใช้เตรียมเป็นหมู่ฟังชันนัล

Classification	Active Group
Cation-Exchange Resins	
Strong acid	Sulfonic acid
Weak acid	Carboxylic acid
Weak acid	Phosphonic acid
Anion-Exchange Resins	
Strong base	Quaternary ammonium
Weak base	Secondary amine
Weak base	Tertiary amine (aromatic matrix)
Weak base	Tertiary amine (aliphatic matrix)

สารละลายตัวชะเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ของกรดอินทรีย์ น้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสม การแยกที่มีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับการเลือกสารละลายตัวชะคอลัมน์ และสภาวะการทดลองที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาได้จาก ค่ารีเทนชันไทม์ของไอออนแต่ละชนิด ค่าการแยก (resolution) และ selectivity ซึ่งได้กล่าวรายละเอียดมาแล้วข้างต้น

2.5 ระบบของไอออนโครมาโทกราฟี (I C system)

องค์ประกอบของระบบไอออนโครมาโทกราฟีที่สำคัญที่ควรจะต้องทราบ เนื่องจากเป็นส่วนที่มีบทบาทต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ คือ

2.5.1 สารละลายตัวชะ (eluents) และภาชนะบรรจุสารละลาย (mobile phase reservoir) การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคลิคควิดโครมาโทกราฟีให้ได้ประสิทธิภาพสูงนั้น

การเลือกสารละลายตัวชะให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์นับว่ามีความสำคัญมาก นอกจากนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหาต่อเครื่องมือในระบบต่าง ๆ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงอีกด้วยก็คือ การเลือกสารเคมี และตัวทำละลายเพื่อเตรียมสารละลาย การเตรียมสารละลาย การเลือกภาชนะบรรจุ (solvent reservoir) และการเปลี่ยนสารละลายตัวชะ (changing of eluent) เป็นต้น

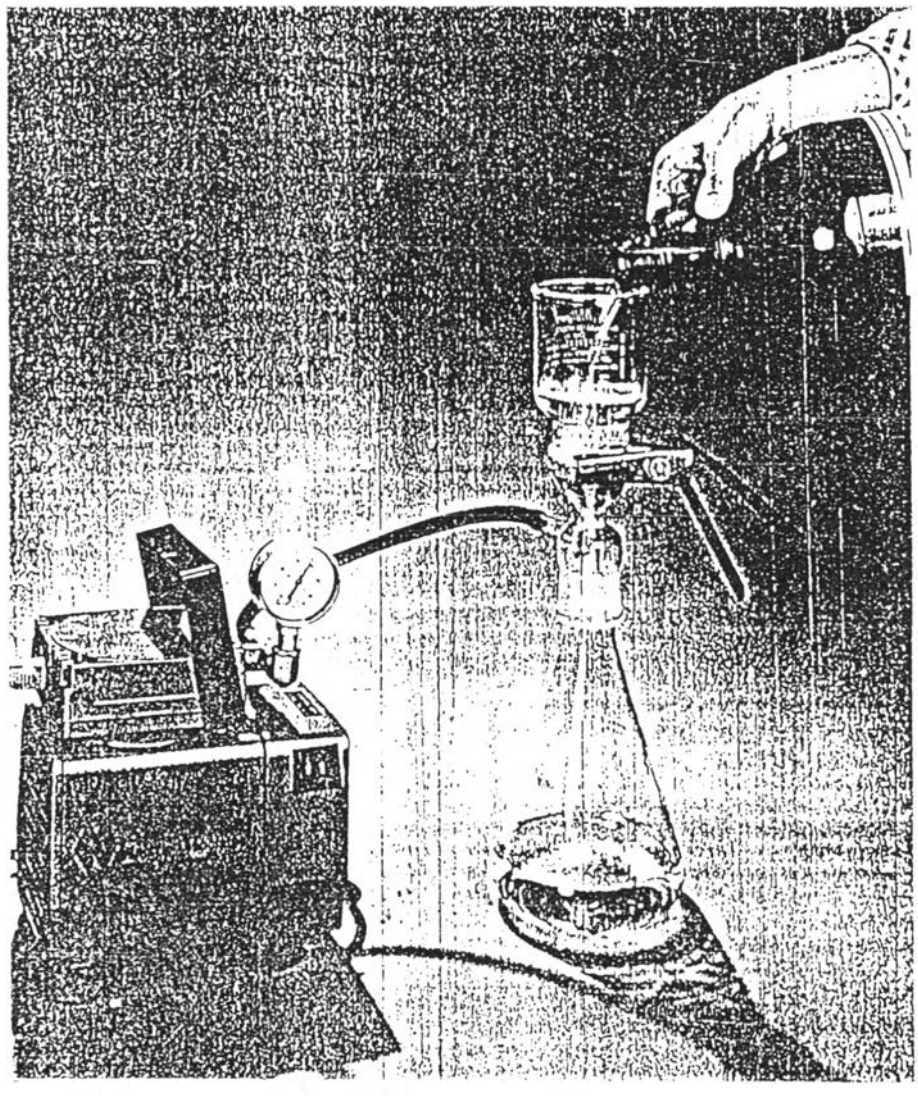
2.5.1.1 การเลือกสารเคมีและตัวทำละลาย สารละลายตัวชะจะต้องเตรียมจากสารเคมีที่มีความบริสุทธิ์สูง อย่างน้อยต้องเป็น analytical grade ไม่มีสารเจือปนประเภทเดียวกับสารที่วิเคราะห์ สามารถละลายในตัวทำละลายได้ดี ซึ่งตัวทำละลายอาจจะเป็นน้ำ หรือน้ำผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน นอกจากนี้ สารละลายตัวชะจะต้องละลายสารตัวอย่างได้ดีด้วย

น้ำที่ใช้ในการเตรียมสารละลายจะต้องมีความบริสุทธิ์สูง ควรใช้น้ำที่ผ่านการกำจัดไอออน (deionized) และกำจัดสารอินทรีย์อื่น ๆ ตลอดจนอนุภาคเล็ก ๆ โดยกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร น้ำที่ออกจากเครื่องกรองจะต้องมีความต้านทาน 1-2 เมกกะโอม และควรนำมาใช้งานทันที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก และการเกิดเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ถังที่เก็บน้ำในเครื่องกรองก็ต้องล้างเสมอ เพื่อกำจัดพวกตะใคร่น้ำ และเชื้อรา

ตัวทำละลายอินทรีย์ จะต้องเลือกสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น HPLC เกรด หรือสเปคโตรเกรด หรือ analytical grade เกรด

2.5.1.2 การเตรียมสารละลายตัวชะ สารละลายตัวชะก่อนนำไปใช้จะต้องผ่านการกรอง (filtering) และกำจัดแก๊ส (degassing) ก่อน เพื่อป้องกันปัญหาซึ่งจะเกิดกับระบบ และคอลัมน์

การกรอง สารละลายที่เตรียมแล้วจะต้องกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยใช้ชุดกรองเฉพาะของ millipore ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงเครื่องมือที่ใช้กรองสารละลายตัวชะ

การกรองสารละลายเป็นการกำจัดอนุภาคเล็ก ๆ ที่ปนมาในตัวทำละลาย สารเคมี ภาชนะบรรจุ และฝุ่นละอองในอากาศ เพื่อป้องกันการอุดตันในคอลัมน์ sample valve และใน pump head ซึ่งสิ่งเหล่านี้นับเป็นสาเหตุของการเกิดปัญหาอย่างมากมายในระบบ เช่นทำให้ back pressure สูง เกิดการเปลี่ยนแปลงค่ารีเทนชันโวลุม (V_r) ความจุของคอลัมน์ (C) และทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์สั้น นอกจากนี้การอุดตันใน pump head ยังทำให้อัตราการไหลไม่คงที่ และเกิดเป็นรอยชุดบริเวณผิวด้านใน ทำให้เครื่องสูบรั่วได้

การกำจัดแก๊สในสารละลาย มีความจำเป็นมาก เนื่องจาก ถ้าสารละลายตัวชะมีแก๊สละลายอยู่จะทำให้เกิดปัญหามากมายกล่าว คือ

(1) ถ้ามีแก๊สละลายอยู่ในสารละลาย อาจเป็นสาเหตุของการเกิดฟองอากาศ

(bubbles) ในเครื่องสูบ คอลัมน์ และดีเทกเตอร์ ซึ่งทำให้เกิดปัญหาในการวิเคราะห์มาก เช่น เกิด baseline noise รูปร่างของ peak ผิดปกติ baseline drift เป็นต้น

(2) ถ้ามีแก๊สออกซิเจนละลายอยู่ในสารละลาย เป็นสาเหตุของการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันในสารละลายตัวชะ ในคอลัมน์ และในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์

(3) สารละลายตัวชะที่เตรียมโดยการผสมน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ จะมีฟองแก๊สเกิดขึ้นอย่างมากมาย จะทำให้เป็นสาเหตุของการเกิดฟองแก๊สในระบบอย่างมาก

วิธีการกำจัดแก๊สในสารละลายมีหลายวิธีดังนี้

(1) การทำให้ภาชนะที่มีสารละลายบรรจุอยู่นั้นอยู่ในสภาพไร้อากาศ โดยการดูดอากาศออกเป็นเวลา 2-3 นาที โดยที่ขณะที่ดูดอากาศนั้นจะต้องมีการคนสารละลาย เพื่อให้แก๊สที่ละลายอยู่ออกมาให้หมด

(2) การไล่อากาศโดยพ่นด้วยแก๊สเฉื่อย เช่น ฮีเลียม (He) ไนโตรเจน (N_2) โดยพ่นแก๊สลงในสารละลายอย่างแรง 2-3 นาที แล้วลดความแรงลง ขณะทำการวิเคราะห์ต้องปล่อยแก๊สนี้อยู่เหนือสารละลาย เพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนในอากาศ หรือในที่ว่างเหนือสารละลาย ละลายกลับลงไปอีก ซึ่งการไล่อากาศโดยวิธีนี้นับว่ามีข้อดีมากในเรื่องนี้ แต่มีข้อเสียคือสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก เนื่องจากแก๊สที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมีราคาแพง

(3) ใช้อ่างที่ใช้ระบบเสียงอัลตราโซนิกส์ โดยเติมน้ำลงในอ่างพอประมาณ วางภาชนะที่บรรจุสารละลายตัวชะเปิดฝา เปิดเครื่องประมาณ 10-15 นาที รีบปิดฝาภาชนะแล้วนำไปใช้ทันที

(4) ใช้ automatically vacuum-degasses

การกำจัดแก๊สในสารละลายนั้นจะเลือกวิธีใดก็ตามขึ้นอยู่กับประเภทของสารละลายที่ใช้และความเหมาะสมของเครื่องมือที่มีอยู่แต่จะต้องระวังไม่ให้ความเข้มข้นและองค์ประกอบของสารละลายเปลี่ยนแปลง

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง หรือวิเคราะห์ครั้งหนึ่ง ควรเตรียม กรอง และไล่อากาศเพียงครั้งเดียว และใช้ตลอดการทดลองนั้น ถ้าเหลือก็ควรเททิ้ง ไม่ควรเก็บไว้ล้างคืนเพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น และองค์ประกอบ ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง รีเทนชันไทม์ การแยก ความสูงของพีก และความเที่ยง

2.5.1.3 ภาชนะบรรจุสารละลายตัวชะ ภาชนะที่ใช้บรรจุสารละลายตัวชะ มีหลายแบบและหลายขนาด ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงาน ต้องเลือกขนาดของขวดให้สามารถบรรจุสารละลายได้พอตลอดการวิเคราะห์ครั้งหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากการเติมสารละลายตัวชะลงในภาชนะเดิมขณะทำการวิเคราะห์ ทำให้เกิดฟองอากาศและองค์ประกอบของสารละลายอาจจะไม่เหมือนเดิม ทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ปริมาตรของภาชนะที่ใช้โดยทั่วไป คือ 250 , 500 , 1,000 และ 2,000 mL สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาในการเลือกภาชนะคือ

(1) ภาชนะที่ใช้จะต้องมีปากแคบ เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย และป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งมลทินภายนอก ปากขวดจะต้องปิดด้วยวัสดุที่เหมาะสม เช่น จุกปิดเป็นพลาสติกที่ทนสารเคมี มีรูให้ท่อนำสารละลาย และท่อนำแก๊ส(ถ้ามี)ผ่านได้พอดี หรืออาจจะใช้แผ่นอลูมิเนียม (aluminium foil) ก็ได้ เพราะสามารถปิดให้พอดีกับปากขวด และเจาะรูให้พอดีกับท่อนำสารละลายได้ง่าย

(2) วัสดุที่ใช้ทำภาชนะควรเลือกให้เหมาะสมกับสารละลายที่ใช้ และงานที่ทำ เช่น ภาชนะพลาสติกจะมีข้อเสียคือ สารพวก plasticizer สามารถละลายหลุดออกมาและรบกวนการทดลองได้ ภาชนะแก้วถ้าใช้ที่ pH สูงกว่า 8 จะทำให้ไอออนของโลหะละลายหลุดออกมาได้ นอกจากนี้ภาชนะที่เลือกใช้ได้ คือ โลหะสเตนเลส ซึ่งมีข้อเสียคือ มองสารละลายภายในไม่เห็น ในการวิเคราะห์ไอออนโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH สูง เป็นตัวชะ จึงควรใช้ภาชนะบรรจุสารละลายตัวชะเป็นพลาสติก

(3) ในกรณีที่แก๊สออกซิเจนเป็นปัญหาต่อการวิเคราะห์ จะต้องมีท่อนำแก๊สเฉื่อย เช่น ฮีเลียม หรือไนโตรเจน เป่าลงปนที่ท่อในขวดเหนือสารละลายตลอดเวลา

(4) ท่อนำสารละลายและท่อนำแก๊สควรเป็น Teflon เนื่องจากสามารถโค้งต่อเข้าสู่เครื่องสูบได้ง่าย และสามารถมองเห็นสารละลายภายในได้ ถ้ากรณีมีฟองแก๊สภายใน และจะทำให้มองเห็น แก้ไขได้ทันท่วงที

(5) ภาชนะบรรจุสารละลายต้องวางไว้ในระดับสูงกว่าเครื่องสูบเสมอ

(6) ปลายท่อนำสารละลายต้องมีตัวกรองขนาด 20-30 ไมโครเมตร จุ่มอยู่ในสารละลายเพื่อกรองอนุภาคที่อาจจะติดมากับสารละลาย และที่กรองนี้ จะต้องจมอยู่ใต้สารละลายตลอดเวลาการทดลอง

(7) เขียนรายละเอียดเกี่ยวกับสารละลายที่เตรียม ไว้ข้างภาชนะให้ชัดเจน เช่น ชื่อ สารละลาย ความเข้มข้น pH วันที่เตรียม

2.5.1.4 การเปลี่ยนสารละลายตัวชะ ในกรณีที่ต้องการเปลี่ยนสารละลายตัวชะเมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ครั้งหนึ่งต้องพิจารณาถึง สารละลายใหม่ที่จะใช้ว่าสามารถละลายได้ในสารละลายเดิมหรือเปล่า ถ้าไม่ได้จะต้องใช้สารละลายที่เป็นตัวกลาง (intermediate) ล้างเสียก่อน แล้วจึงตามด้วยสารละลายใหม่ที่จะใช้ ตัวอย่าง เช่น ในการวิเคราะห์ไอออนโดยใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี สารละลายตัวชะเป็นบัฟเฟอร์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะต้องเก็บคอลัมน์ใน น้ำ/เมทานอล หรือ น้ำ/อะซีโตไนไทรล์ ดังนั้น จะต้องล้างคอลัมน์ด้วยน้ำก่อน แล้วจึงเก็บในสารละลายดังกล่าว ดังนั้นน้ำจึงจัดเป็น intermediate.

ในการเปลี่ยนสารละลายทุกครั้งจะต้องลดอัตราการไหลของสารละลาย จนถึงศูนย์ก่อนจึงนำท่อสารละลายออกจากขวดสารละลายเดิม การลดอัตราการไหลของสารละลายจะต้องค่อยๆ ลดลงช้า ๆ เพื่อให้การเปลี่ยนแปลงความดันในคอลัมน์ช้า และการเพิ่มก็ทำเช่นเดียวกัน

2.5.2 เครื่องสูบ (pump) เครื่องสูบที่ใช้ในเครื่องไอออนโครมาโทกราฟ มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันกับเครื่องสูบที่ใช้ในเครื่อง HPLC ทั่ว ๆไป นั่นคือ จะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้

1. ทำจากวัสดุที่ทนการกัดกร่อนจากสารเคมีที่ใช้ทำสารละลายตัวชะเช่น เหล็กกล้าไร้สนิม (stainless steel) และ polytetrafluorethylene (Teflon)

2. การทำงานจะต้องเป็นแบบไม่มีพัลส์ (pulse-free) หรือมีเครื่องขจัดพัลส์ (pulse damper)

3. สามารถควบคุมอัตราการไหลให้คงที่ และสามารถทำซ้ำได้ (constants and reproducibility)

4. สามารถทำงานได้ในช่วงความดันสูง

5. สามารถปรับและตั้งอัตราการไหลได้

6. มีสัญญาณเตือนเมื่อความดันสูงเกินที่กำหนด (safety pressure limit)

7. สามารถทำงานได้ในช่วงอัตราการไหลต่ำ และกว้าง(0.1-9.9 mL/min)

เครื่องสูบที่ใช้ใน HPLC แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

I17152513

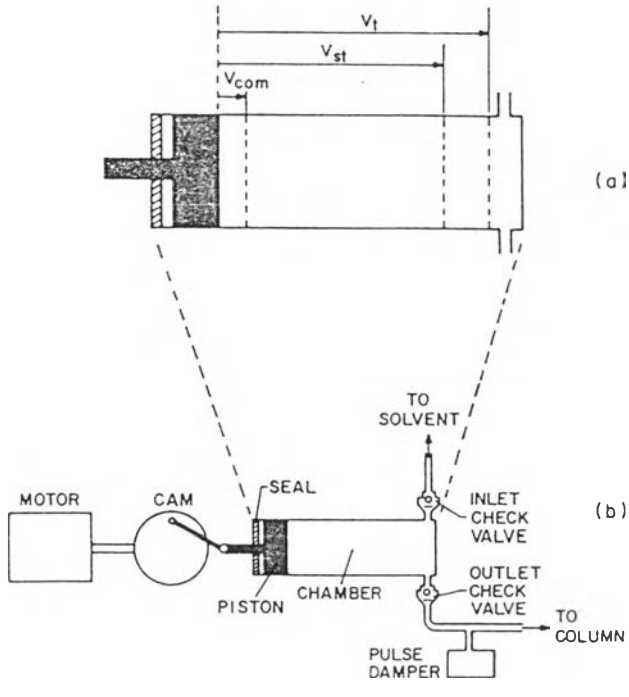
2.5.2.1 เครื่องสูบชนิดที่ควบคุมปริมาตรหรือ อัตราการไหลให้คงที่ (constant volume or flow) ซึ่งเครื่องสูบชนิดนี้มี 2 แบบ คือ syringe type และ reciprocating pump และ ทั้ง 2 แบบ มีระบบการทำงานแบบ mechanically driven systems เครื่องสูบแบบนี้จะมีข้อดีคือ มีท่อต่อกับภาชนะบรรจุสารละลายตัวชะภายนอก และสามารถเปลี่ยนภาชนะได้ตามความเหมาะสม และความต้องการใช้งาน และ การควบคุมอัตราการไหลให้คงที่นั้นทำให้สามารถใช้งานได้เหมาะสมกับดีเทกเตอร์หลายชนิด และทำให้เวลาในการเคลื่อนที่ของสารออกจากคอลัมน์คงที่ แต่มีข้อเสีย คือ ทำให้เกิดสัญญาณรบกวน (noise) ที่ดีเทกเตอร์ เนื่องจากระบบการทำงาน

2.5.2.2 เครื่องสูบที่ควบคุมความดันให้คงที่ (constant pressure) การควบคุมความดันจะใช้แก๊ส ซึ่งมี 2 แบบ คือ แบบที่ให้แก๊สสัมผัสกับสารละลายตัวชะโดยตรง (direct pressure pumps) และ แบบที่ให้แก๊สไปดันลูกสูบ หรือ diaphragm ซึ่งส่วนนี้จะไปดันสารละลายตัวชะอีกต่อหนึ่ง เครื่องสูบแบบนี้มีข้อจำกัดในการใช้งานมาก กล่าวคือ ขนาดของภาชนะบรรจุสารละลายตัวชะจำกัด การใช้แก๊สเป็นตัวดันสามารถ ใช้ความดันได้ค่าหนึ่งเท่านั้น ถ้ามากจะมีปัญหาเรื่องแก๊สละลายในสารละลายตัวชะ ดังนั้นจึงใช้งานได้ในช่วงความดันต่ำ (ประมาณ 2,500 psi) ส่วนแบบ pneumatic pump นั้น ถึงแม้จะใช้งานได้ในช่วงความดันที่สูงกว่า แต่ก็มีข้อจำกัดในเรื่องการเติมสารละลายตัวชะ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดปัญหาหลายประการ เช่นอาจจะทำให้เกิดพัลส์ได้ องค์ประกอบของสารละลายไม่แน่นอน และทำให้ความดันเปลี่ยนแปลง สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย แต่อย่างไรก็ตาม เครื่องสูบแบบนี้มีข้อดี คือเป็นเครื่องสูบที่ระบบไม่ทำให้เกิดพัลส์ (pulse-free)

ในที่นี้จะขอกล่าวรายละเอียดเฉพาะเครื่องสูบแบบ reciprocating เท่านั้น เนื่องจากเป็นเครื่องสูบที่นำมาใช้มากในระบบ HPLC สมัยใหม่ และใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

<u>Reciprocating Pump</u> เป็นเครื่องสูบชนิดที่ควบคุมอัตราการไหลให้คงที่มีหลายแบบ คือ แบบลูกสูบเดียว (single piston) ลูกสูบคู่ (dual piston) และ แบบมี diaphragm (reciprocating diaphragm pump) การทำงานเกิดจากการเคลื่อนที่เข้าออกของลูกสูบเพื่อดูดสารละลายจากภาชนะ และดันสารละลายเข้าสู่คอลัมน์ โดยมี check valve เป็นตัวปิด-เปิด ทางเข้าออกของสารละลาย

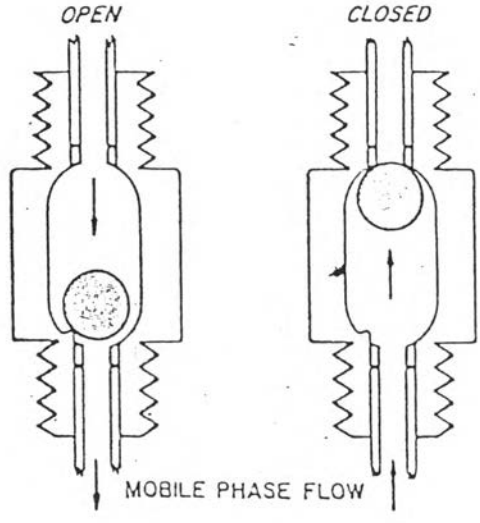
Single Piston Reciprocating Pump รูปของเครื่องสูบชนิดนี้แสดงในรูปที่ 2.9 ลูกสูบด้านหนึ่งจะสัมผัสกับสารละลายตัวชะโดยตรง อีกด้านหนึ่งต่อกับ cam ซึ่งทำให้หมุนโดยใช้มอเตอร์ไฟฟ้า เมื่อ cam หมุน ทำให้ลูกสูบเคลื่อนที่เข้าออกทำให้มีการดัน check valve สลับกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.10 ทำให้สารละลายถูกดูดจากภาชนะ และส่งเข้าสู่คอลัมน์สลับกัน ดังนั้นสัญญาณที่ออกมาจึงมีลักษณะเป็นพัลส์ ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดสัญญาณรบกวนที่ดีเทกเตอร์ได้ วัสดุที่ใช้ทำลูกสูบด้านที่สัมผัสกับสารละลายตัวชะ จะต้องเป็นวัสดุที่ทนต่อสารเคมี และไม่เกาะติดกับสิ่งสกปรกได้ง่าย เช่น sapphire , borosilicate glass หรือเหล็กไร้สนิมที่ขัดเงาอย่างดี



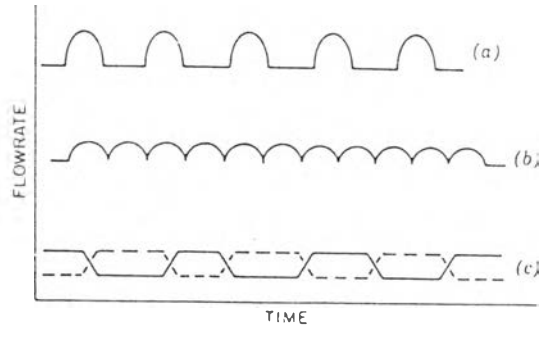
รูปที่ 2.9 แสดง Reciprocating pump แบบง่าย ๆ

(a) เป็น pump chamber

(b) single head reciprocasting pump



รูปที่ 2.10 แสดงการทำงานของ check valve



รูปที่ 2.11 แสดงสัญญาณที่ออกจากปั๊ม reciprocating ชนิด single head (a) dual head circular cam (b) และ dual head sinusoidal cam (c)

เนื่องจาก เครื่องสูบแบบนี้สัญญาณที่ออกมามีพัลส์มาก จึงจำเป็นจะต้องมีเครื่องชจัดพัลส์ด้วยเสมอ จึงจะทำงานได้

Dual Reciprocating Piston Pump เป็นเครื่องสูบซึ่งพัฒนามาจากแบบแรก เพื่อลดปัญหาการเกิดพัลส์ โดยมีลูกสูบ 2 ตัวสลับกันทำงาน ทำให้พัลส์ที่เกิดจากลูกสูบแต่ละตัวถูกหักล้างกันพอดี ดังแสดงในรูป 2.11 ดังนั้นเครื่องสูบแบบนี้จึงไม่จำเป็นจะต้องมีเครื่องชจัด

พัลส์ แต่เครื่องสูบชนิดนี้ราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ มากกว่าแบบแรก และการดูแลรักษาต้องระวังมากในเรื่องความสะอาด การรั่ว เนื่องจากจะมีอากาศเกิดขึ้นได้เป็น 2 เท่า ของแบบแรก

Reciprocating Diaphragm Pump เครื่องสูบชนิดนี้จะแตกต่างจาก 2 แบบแรก คือ ลูกสูบจะไม่สัมผัสกับสารละลายตัวชะ แต่จะดันผ่าน diaphragm จึงสามารถทำงานได้ในความเร็วสูง แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นคือ อัตราการไหลจะเปี่ยงเบน เนื่องจากการยืดหยุ่นของ diaphragm ที่ความดันสูง

เครื่องมือ HPLC สมัยใหม่ รวมทั้ง IC ด้วย มักจะใช้เครื่องสูบชนิด Dual Reciprocating Pump

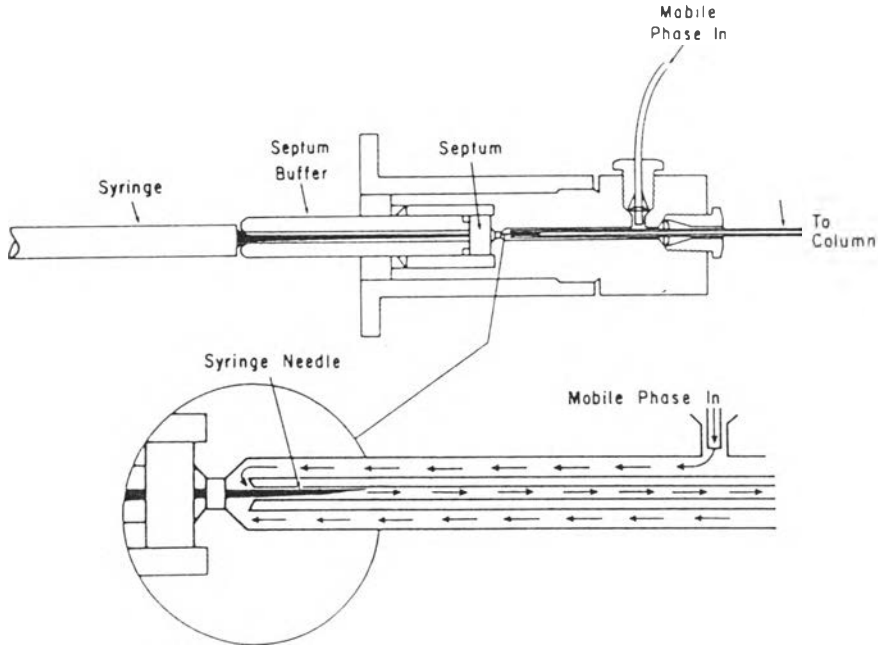
2.5.3 Sample Introduction System การฉีด (inject) สารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์นั้น จะต้องทำให้มีปริมาตรคงที่ ถูกต้อง และทำให้ได้แถบที่แคบ (narrow band) ระบบการนำสารเข้าสู่คอลัมน์ใน IC ทำได้เช่นเดียวกันกับใน HPLC ซึ่งสามารถทำได้ 3 แบบ ดังนี้

2.5.3.1 การนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ โดยใช้ไมโครไซรินจ์ (syringe injector) เป็นการนำสารละลายตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง โดยใช้ไซรินจ์ที่มีแรงดันอย่างต่ำ 1,500 psi ซึ่งไซรินจ์จะผ่าน septum หรือไม่ผ่าน septum ก็ได้ แต่วิธีการจะแตกต่างกันเล็กน้อย ในกรณีที่ฉีดโดยให้ไซรินจ์ผ่าน septum จะต้องเลือก septum ที่เหมาะสม เช่นทำจาก silicon , neoprene และ fluoro elastomers ถ้าในการฉีดสารโดยไซรินจ์ทำที่ความดันสูงกว่า 1500 psi จำเป็นจะต้องใช้วิธี stop-flow injection กล่าวคือ ต้องทำให้สารละลายตัวชะหยุดไหลโดยการปิดเครื่องสูบ หรือลดให้อัตราการไหลเป็นศูนย์ การฉีดสารวิธีนี้จะมีข้อเสียคือ เศษอนุภาคเล็ก ๆ อาจจะหลุดออกมาจาก septum ในขณะฉีด ทำให้เป็นสาเหตุของการอุดตันในไซรินจ์และคอลัมน์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดความดันสูงกว่าปกติและทำให้รูปร่างของ peak ไม่สมมาตร (unsymmetrical peak) และทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง นอกจากนี้การใช้ septum มักไม่ค่อยทำที่อุณหภูมิสูง

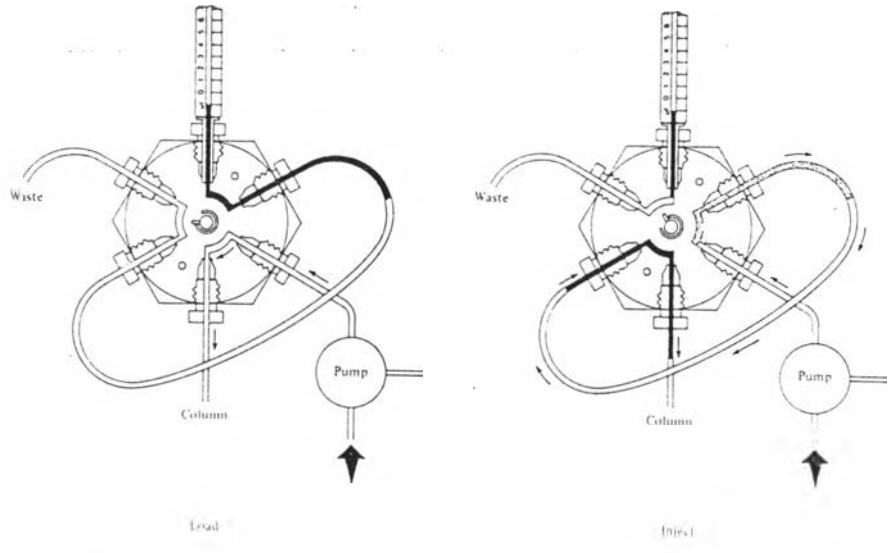
การฉีดสารละลายตัวอย่างโดยใช้ไมโครไซรินจ์ แบบไม่ผ่าน septum การฉีดสารวิธีนี้มีข้อดี คือ ไม่ค่อยมีการรั่วของสารละลายตัวอย่าง เมื่อฉีดสาร ที่ความดันสูง สามารถฉีดสารที่

ความดันสูงได้ เปลี่ยนแปลงปริมาณได้ และใช้กับสารเคมีได้หลายชนิด โดยไม่มีปัญหาในเรื่องการกัดกร่อน และเรื่องการอุดตัน เนื่องจากเศษชิ้นส่วนของ septum แต่มีข้อเสียคือ มีข้อจำกัดเรื่อง ช่วงของของตัวอย่างที่ใช้ ความเที่ยง และการทำแบบอัตโนมัติ รูปที่ 2.12 แสดงการฉีดสารละลายโดยใช้ไมโครไซรินจ์

2.5.3.2 การใช้ Sampling Valve เป็นวิธีการที่ใช้อย่างกว้างขวางในระบบ HPLC วิธีการฉีดสาร จะใช้ไมโครไซรินจ์ ฉีดสารตัวอย่างโดยไม่ผ่าน septum สารละลายตัวอย่างจะถูกเก็บไว้ใน valve loop ที่มีปริมาตรแน่นอน เมื่อต้องการให้สารเข้าสู่คอลัมน์ ก็หมุน valve ให้สารละลายตัวชะผ่าน loop พาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ รูปที่ 2.13 แสดง sampling valve แบบ six port ของบริษัท Rheodyne



รูปที่ 2.12 แสดงการฉีดสารตัวอย่างโดยใช้ซีรินจ์

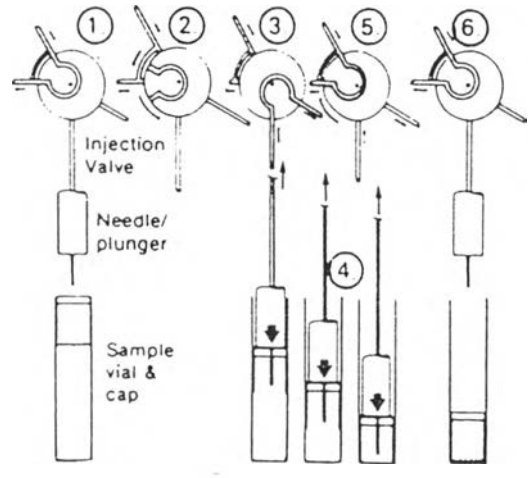


รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะของ six - port microsampling valve

ข้อดีของการใช้ sampling valve คือ

- สามารถฉีดสารตัวอย่างในช่วงปริมาตรที่กว้าง เนื่องจาก สามารถเปลี่ยนปริมาตรของ valve-loop ได้ในช่วง 10-500 ไมโครลิตร
- การฉีดสารมีความเที่ยงดี
- สามารถฉีดสารได้ในสภาวะที่ความดันสูงถึง 7000 psi โดยไม่ต้องหยุดเครื่องสูบสารละลาย
- ไม่มี septum ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการอุดตันในคอลัมน์
- สามารถทำระบบการฉีดสารอัตโนมัติได้

2.5.3.3 Automatic Injectors เป็นการออกแบบ injectors เพื่อให้เหมาะสมกับงานที่ทำต่อเนื่องเป็นเวลานาน มีจำนวนตัวอย่างเป็นจำนวนมาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างเท่า ๆ กัน การทำงานเริ่มจาก injection valve จะหมุนมาอยู่ในตำแหน่ง load โดยการทำงานของ motor ขณะเดียวกัน สารละลายตัวชะจะไหลเข้าสู่คอลัมน์โดยไม่ผ่าน loop เมื่ออยู่ในตำแหน่ง load เข็มก็จะเคลื่อนลงไปใน vial และดูดตัวอย่างเข้าสู่ sample loop จากนั้น valve จะหมุนมาอยู่ในตำแหน่ง inject ทำให้สารละลายตัวชะไหลพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ และขวดตัวอย่างต่อไปจะเคลื่อนเข้ามารอการ inject อีกครั้ง



รูปที่ 2.14 แสดงการทำงานของ automatic injectors

2.5.4 คอลัมน์ (column) คอลัมน์ที่ใช้ในเครื่องไอออนโครมาโทกราฟ ทำจากเหล็กไร้สนิมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ความยาวมีหลายขนาด เช่น 5, 10 25 และ 50 เซนติเมตร

สารที่บรรจุในคอลัมน์ (column packing) การวิเคราะห์ไอออนโดยใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีนั้นการแยกไอออน อาศัยหลักการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนในสารละลาย กับไอออนที่เกาะติดอยู่กับสารที่บรรจุในคอลัมน์ ที่เรียกว่าเฟสคงที่ ซึ่งเฟสคงที่จะเป็นของแข็งที่ไม่ละลายในสารละลายตัวชะ เทคนิคนี้เรียกว่าไอออนเอกซ์เชนจ์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ค้นพบมานานแล้ว ตัวอย่างเช่น การนำสารจากธรรมชาติมากรองน้ำให้สะอาดโดยใช้ดิน (clays) และ ซีโอไลท์ (zeolite) อย่างไรก็ตามสารนี้จะไม่ได้นำมาใช้งานด้านอื่นมากนักเนื่องจากมีข้อจำกัดหลายประการ

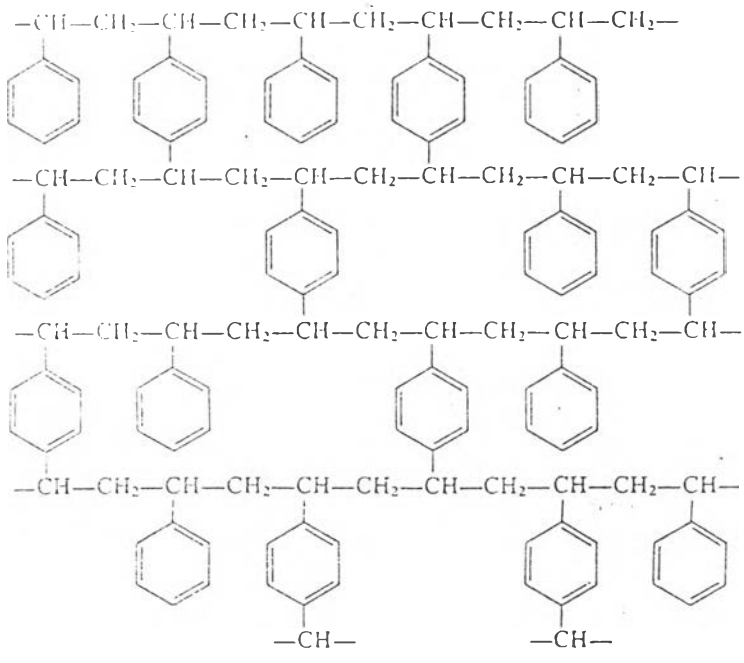
ต่อมาในราวศตวรรษที่ 20 ได้มีการสังเคราะห์เรซินขึ้นหลายชนิด ทำให้เทคนิคไอออนเอกซ์เชนจ์ถูกนำมาใช้งานอย่างกว้างขวางมากขึ้น เรซินที่สังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกได้

จากปฏิกิริยาคอนเดนเซชันของ formaldehyde กับสารประกอบ multihydroxybenzene และต่อมามีการสังเคราะห์เรซินชนิดอื่นอีกมากมาย เช่น

- styrene-divinylbenzene (S-DVB)
- polymethacrylate
- methacrylate-divinylbenzene
- acrylate-divinylbenzene

เรซินที่นำมาใช้ในเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีมากที่สุด คือ S-DVB ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดยปฏิกริยาการเกิดพอลิเมอร์ (polymerisation) ของ styrene กับ divinylbenzene เรซินที่ได้เป็นของแข็ง มีลักษณะเป็นเม็ดกลม และมีสมบัติเป็น hydrophobic การควบคุมให้ได้เรซินที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกัน โดยควบคุมสภาวะ (condition) ของการเกิดปฏิกริยา เช่น อุณหภูมิ และความเร็วในการคนให้ผสมกัน (mixing speed) เป็นต้น เรซินที่ได้มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.13 ส่วนปริมาณของ divinyl benzene ที่ใช้ในการสังเคราะห์จะเป็นตัวควบคุมเปอร์เซนต์ cross-linking ในเรซิน ถ้า cross-linked ต่ำ ทำให้มีรูพรุนมาก มีความสามารถในการดูดน้ำได้มาก ทำให้อัตราการบวมน้ำสูง ในทางตรงกันข้าม ถ้า cross -linked สูง จะมีอัตราการบวมน้ำต่ำ และเรซินที่ได้มีโครงสร้างแข็งแรงทนต่อแรงอัดได้สูง ซึ่งเหมาะกับงานที่ต้องใช้ความดันสูง เช่น ใช้บรรจุคอลัมน์ใน HPLC แต่มีข้อเสีย คือ การที่มีรูพรุนน้อยทำให้ mass transfer ที่เกิดขึ้นไม่ดีพอ

การเตรียมเรซินที่ได้ ให้เป็นเรซินสำหรับแลกเปลี่ยนไอออนนั้น ต้องเติมสารที่มีประจุ (ionic group) ลงบนเรซิน โดยให้ทำปฏิกิริยาเคมี กับสารเคมีตามความต้องการ สารเคมีที่เติมลงไปมีหลายชนิด ซึ่งสามารถแบ่งประเภท ตามความแรงของกรด-เบส ที่เติม ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยปกติ S-DVB เรซินที่สังเคราะห์ขึ้นใช้งาน แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ gel-type S-DVB และ macroporous หรือ macroreticular S-DVB



รูป 2.15 แสดงโครงสร้างของพอลิเมอร์ชนิด Styrene -divinylbenzene

gel-type S-DVB เป็นเรซินที่นำมาใช้เตรียมเป็นไอออนเอกซ์เชนจ์แบบธรรมดา (conventional) เรซินแบบนี้เตรียมให้มี DVB อยู่ในช่วง 2-16 เปอร์เซนต์ โดยแบ่งเป็นพวก low cross-linked และพวก high cross-linked

low cross-linked resins มี DVB ประมาณ 2-4 เปอร์เซนต์ เรซินแบบนี้มีสภาพเป็นวุ้น (gelatin) เสียสภาพได้ง่าย ไม่ทนต่อแรงอัด

high cross-linked resins มี DVB ประมาณ 10-16 เปอร์เซนต์ เรซินแบบนี้มีความแข็งทนแรงอัดได้สูง การนำมาใช้งานมักเตรียมให้มี DVB ประมาณ 8-16 เปอร์เซ็นต์

เรซินชนิดนี้นำมาเตรียมเป็นไอออนเอกซ์เชนจ์เรซินเพื่อใช้งานใน HPLC แบบธรรมดา และในไอออนโครมาโทกราฟ แบบมีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์

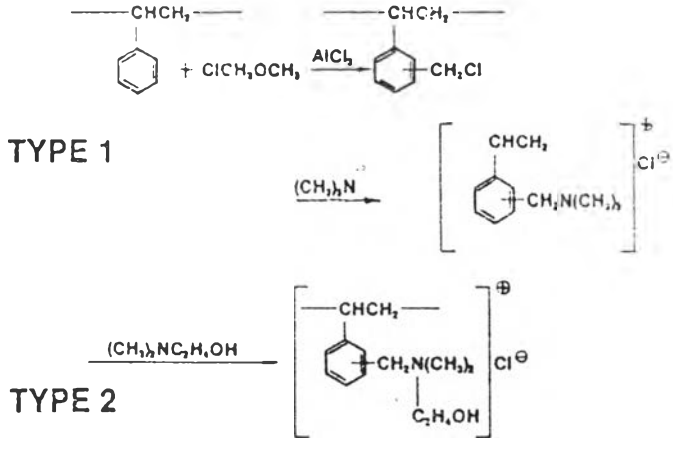
macroporous S-DVB เรซินแบบนี้เตรียมให้มี DVB ประมาณ 15-50 เปอร์เซนต์ จึงมีความทนทานมากไม่เสียสภาพที่ความดันสูง และไม่เกิดการบวมน้ำ เนื่องจากการเติม

DVB ในปริมาณสูง ทำให้รูพรุนในโครงสร้างมีน้อยมาก จึงจำเป็นต้องเติมสารที่ทำให้เกิดรู เรียกว่า pore-forming agent หรือ poragens เช่น สารละลายผสมของ isoamyl alcohol toluene เป็นต้น การเลือก poragens ให้เหมาะสม ใช้ในปริมาณที่พอเหมาะ รวมทั้งการควบคุมสภาวะของปฏิกริยาการเกิดพอลิเมอร์ จะทำให้เรซินที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกัน มีรูขนาดใกล้เคียงกัน และปริมาตรเหมาะสม เรซินชนิดนี้นำมาเตรียมเป็นไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน เพื่อใช้งานในคอลัมน์ของไอออนโครมาโทกราฟแบบไม่มีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์

ตัวอย่างการเตรียมแคตไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน และแอนไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน บางชนิด จะได้กล่าวในรายละเอียดดังต่อไปนี้

การเตรียมแคตไอออนเอกซ์เชนจ์เรซินชนิดแรงโดยการเติมหมู่ซัลโฟนิก ($-SO^-_3H^+$) ลงบนเรซินเตรียมโดยการเติม S-DVB เรซินลงในกรดซัลฟิวริกที่ร้อน หรือเติมลงในกรดคลอโรซัลโฟนิกหรือสารอื่นที่สามารถทำให้เกิดหมู่ซัลโฟนิก ($-SO_3H$) เกาะติดที่วงแหวนเบนซิน เรียกวิธีการนี้ว่า การเกิดปฏิกริยาซัลโฟเนชัน

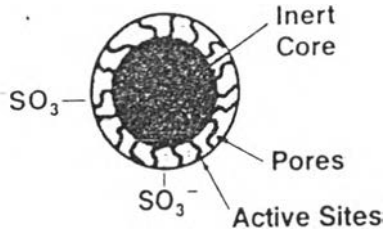
การเตรียมแอนไอออนเอกซ์เชนจ์เรซินชนิดแรง โดยการเติมหมู่ quaternary amine $(CH_3)_3N^+$, $(CH_3)_2N^+C_2H_4$ ลงบนเรซิน มีขั้นตอนการเตรียมคือ นำเรซินมาทำปฏิกิริยาอะมิโนไลซีส ปฏิกิริยาแสดงดังสมการ



เรซินที่นำมาใช้ในคอลัมน์แยกของเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีนั้น จะต้องมีคุณสมบัติดังนี้คือ แยกไอออนได้เร็ว มีประสิทธิภาพในการแยกสูง ภายใต้ความดันต่ำ และมีอายุการใช้งานนาน ดังนั้น จึงมีการเตรียมเรซินอีกชนิดหนึ่งขึ้นมาใช้ในงานนี้โดยเฉพาะ เรียกว่า pellicular resins ซึ่งเตรียมโดยใช้ S-DVB เรซิน มีวิธีเตรียมโดยละเอียดดังนี้

Pellicular resins เรซินชนิดนี้มีหมู่ไอออน ที่ทำหน้าที่ แลกเปลี่ยนไอออนเคลือบบาง ๆ อยู่ที่ผิวของเรซินหรือ เม็ดแก้วกลม (glass bead) ทำให้ปริมาตรภายในที่ไอออนจะกระจายเข้าไปลดลงมาก เป็นการลด mass transfer ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกดี และไอออนผ่านออกจากคอลัมน์ได้เร็ว pellicular resins แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นแคตไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน เรียกว่า surface-sulfonated S-DVB และชนิดที่เป็นแอนไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน เรียกว่า pellicular aminated resins

Surface Sulfonated เป็นเรซินชนิดแคตไอออนเอกซเชนจ์ แสดงในรูปที่ 2.16



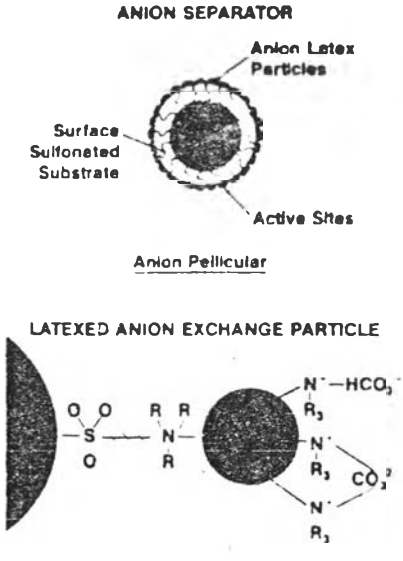
รูปที่ 2.16 แสดงโครงสร้างของเรซินชนิด surface sulfonated

Surface Sulfonated

แกนกลางเป็นเม็ดเรซินกลมขนาดประมาณ 15-20 ไมโครเมตร เคลือบด้วยหมู่ซัลโฟนิก เป็นผิวบาง ๆ อยู่รอบนอก ความหนาประมาณหลายร้อยอังสตรอม เมื่อผ่านสารละลายตัวชะเข้าไปของเหลวจะไหลผ่านเข้า-ออกบริเวณผิวสารที่เคลือบนี้ แต่เนื่องจากผิวนี้บางมาก การเคลื่อนเข้า-ออกของของเหลวจึงเร็วมาก ทำให้ mass transfer ดี และการแยกเร็ว มีประสิทธิภาพสูง ในขณะเดียวกัน แกนกลางก็จะมีความทนสูง เนื่องจากสามารถใช้เรซินที่มี DVB เปอร์เซนต์สูงได้ โดยไม่ต้องคำนึงถึงรูพรุน ทำให้ไม่บวมน้ำ และทนแรงอัดได้สูง นอกจากนี้ไอออนที่เคลือบด้านนอกนั้นบางมาก ทำให้ปริมาณของประจุต่อน้ำหนักของเรซินต่ำ หรือความ

จุของคอลัมน์ต่ำนั่นเอง มีผลให้สามารถใช้งานกับสารละลายตัวชะที่มีความเข้มข้นต่ำและวิเคราะห์ไอออนความเข้มข้นต่ำๆ ได้ดี surface sulfonated resin นำไปใช้อย่างแพร่หลายในคอลัมน์ที่ใช้แยกแคตไอออน และใช้เป็นตัวพื้นฐานหรือแกนในการเตรียมแอนไอออนเอกซเชนจ์เรซินชนิด aminated latex

Pellicular aminated resins เป็นเรซินชนิดแอนไอออนเอ็กซ์เชนจ์ แสดงในรูปที่ 2.17

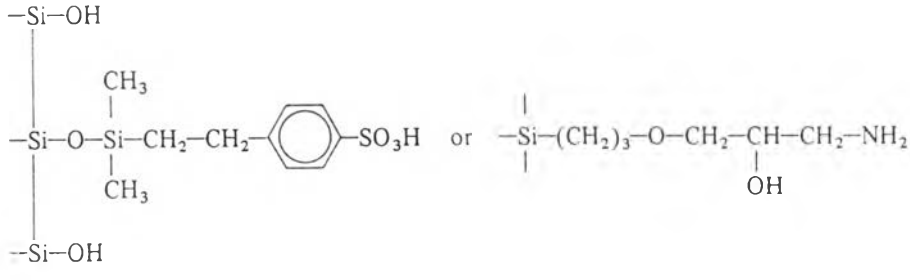


รูปที่ 2.17 แสดงโครงสร้างของเรซินชนิด pellicular aminated

มี surface sulfonated resin เป็นแกน แล้วเคลือบด้วย aminated latex ขบวนการเตรียมเรียกว่า agglomeration แกน และ latex จับกันด้วยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าของประจุลบบนแกน กับประจุบวกบน latex และนอกจากนี้ การเกาะติดเกิดจากแรงดึงดูดอย่างอื่น เช่น จาก Vander Waals อัตราส่วนของแกนกับ latex สำคัญมากเพราะมีผลต่อความจุของคอลัมน์ โดยมากถ้าใช้แกนขนาด 25 ไมโครเมตร latex จะมีขนาด 0.1-0.2 ไมโครเมตร ถ้าใช้แกนขนาด 15 ไมโครเมตร latex จะมีขนาด 0.02 ไมโครเมตร

การใช้เรซินชนิดนี้บรรจุในคอลัมน์ที่มีข้อดีหลายประการคือทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์สูงความจุต่ำ ใช้งานกับสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ และใช้กับไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำได้ด้วย จึงเหมาะที่จะใช้ในคอลัมน์ชนิดไม่มีซัพเพรสเซอร์

นอกจากที่กล่าวมาแล้ว ในแอนไอออนโครมาโทกราฟี ยังสามารถใช้ silica based คอลัมน์เป็นคอลัมน์แยกได้เช่นเดียวกัน silica มีโครงสร้างดังแสดงข้างล่าง



การใช้ silica-based คอลัมน์ มีข้อดีคือ มีความเสถียรเชิงกลสูง กล่าวคือ สามารถทนต่อแรงอัดได้สูง และไม่เกิดการบวมน้ำ ดังนั้น จึงสามารถเตรียมให้มีขนาดเล็ก ๆ และใช้กับความดันสูงได้ ซึ่งทำให้การแยกเร็วและมีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อเสีย และข้อจำกัดหลายประการ ทำให้ไม่นิยมใช้กันมากนักกล่าวคือ มีความเสถียรทางเคมีต่ำ กล่าวคือ ที่ pH มากกว่า 8 จะทำให้ silica ละลายออกมา ทำให้คอลัมน์เสียสภาพ และที่ pH ต่ำกว่า 8 ก็อาจมีปัญหาเนื่องจากการเกิดพันธะทางเคมีระหว่างผิวของ silica กับ สารเคมีต่าง ๆ ได้ง่าย ทำให้อายุการใช้งานสั้น

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติของเรซินชนิดต่าง ๆ ที่ใช้บรรจุคอลัมน์แยก ในเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี ซึ่งผู้ใช้สามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสม กับงานที่ทำ

Parameter	Resin			
	Pellicular S-DVB	Macroporous S-DVB	Silica-Based	Gel-Type S-DVB
Use	Anion and cation separation	Anion separation	Anion separation	Exclusion and partition separation of organic species and suppressor columns
Degree of swelling	Small	None	None	Large
Capacity (meq/g)	0.01-0.02	0.007-0.07	0.02-0.1	3-5
Particle size (μm)	15-20	25-35	10-15	37-45 15-20
Useful pH range	0.5-13	0.5-13	2-7	0-14

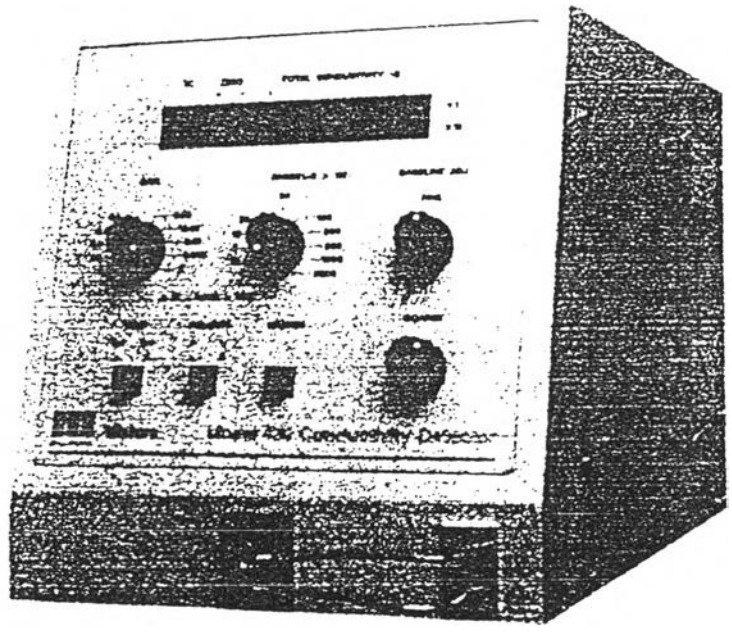
ในกรณีที่ใช้เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีแบบมีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ ซัพเพรสเซอร์คอลัมน์จะบรรจุเรซินที่มีประจุตรงกันข้ามกันในคอลัมน์แยกเสมอ การเรียกชื่อก็ตรงกันข้ามกับการจับไอออนข้างใน เช่น ต้องการวิเคราะห์แอนไอออน คอลัมน์แยก ที่ใช้เรียกว่า แอนไอออนเอกซเชนจ์คอลัมน์ สารที่บรรจุข้างในจะเป็นพวก quaternary amine ($N^+(R)_3OH^-$) ซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ที่ใช้เรียกว่า แอนไอออนซัพเพรสเซอร์ สารที่บรรจุภายในเป็นพวกซัลโฟนิก ($-SO_3^-H^+$) เป็นต้น ซัพเพรสเซอร์คอลัมน์มีหลายชนิด เช่น gel-type S-DVB , Hollow - fiber membrane เป็นต้น ซึ่งจะไม่ขอกล่าวรายละเอียดในที่นี้

2.5.5 ดีเทกเตอร์ (detector) เครื่องมือไอออนโครมาโทกราฟ ที่พัฒนาขึ้นมาในช่วงแรกนั้น ใช้คอนดักติวิตีดีเทกเตอร์ ทั้งแบบที่มีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ และแบบไม่มีซัพเพรสเซอร์คอลัมน์ ทั้งนี้เนื่องจากไอออนทุกชนิดในสารละลายน้ำสามารถนำไฟฟ้าได้ จึงสามารถตรวจวัดไอออนที่วิเคราะห์ได้ทุกชนิด ถึงแม้ว่าในเวลาต่อมา เทคนิคไอออนโครมาโทกราฟีจะพัฒนาให้สามารถใช้ได้กับดีเทกเตอร์ชนิดอื่นอีกมากมายดังกล่าวแล้วข้างต้นก็ตาม แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึงหลักการเกี่ยวกับ คอนดักติวิตีดีเทกเตอร์เพียงชนิดเดียว

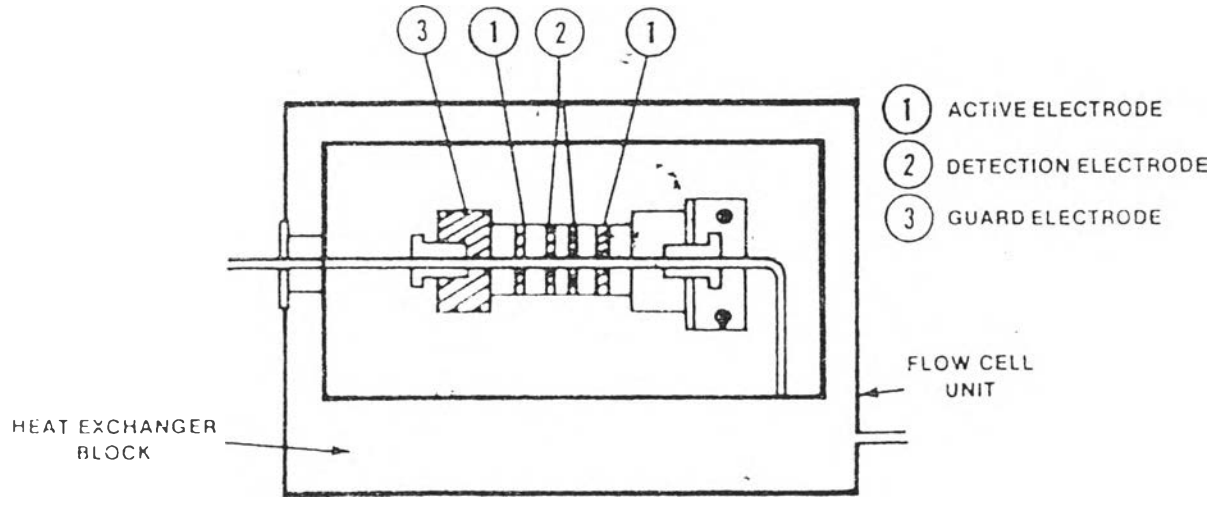
<u>คอนดักติวิตีเทกเตอร์</u> (conductivity detector) เครื่องมือแสดงในรูปที่ 2.18 ภายในประกอบด้วยโฟลเซลล์ (flow cell) ซึ่งแสดงในรูปที่ 2.19 ประกอบด้วย ขั้ววัด ขั้วอ้างอิง และขั้วป้องกัน ส่วนของโฟลเซลล์จะต้องมีเครื่องป้องกันการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (heat exchanger block) ทั้งนี้ เนื่องจากดีเทกเตอร์ชนิดนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก

สัญญาณ (signal) ที่ได้เป็นผลต่างของค่าความนำไฟฟ้าของสารละลายตัวชะ ซึ่งแสดงผลเป็น baseline กับ ค่าความนำไฟฟ้าของไอออน ซึ่งแสดงผลเป็นพีก ดังนั้นการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ ต้องพยายามเพิ่มค่าแตกต่างนี้ให้มากที่สุด ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี คือ

- ใช้ซันเพรสเซอร์คอลัมน์
- ใช้สารละลายตัวชะที่มีความเข้มข้นต่ำ และมีค่า การนำไฟฟ้าจำเพาะต่ำ
- ใช้ดีเทกเตอร์ที่ออกแบบพิเศษ โดยให้สามารถลดสัญญาณของสารละลายตัวชะได้ กล่าวคือ สามารถปรับ baseline ให้เป็นศูนย์ได้ (electronic suppressor)



<u>รูปที่ 2.18</u> แสดงเครื่องคอนดักติวิตีดีเทกเตอร์ของบริษัท Waters model 430



รูป 2.19 แสดง flow cell ของเครื่องคอนดักติวิตีดีเทกเตอร์ model 430

ในการศึกษาวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี แบบไม่มีซัพเพรสเซอร์ คอลัมน์ โดยใช้เครื่องมือ HPLC และคอนดักติวิตีดีเทกเตอร์แบบธรรมดา จึงเลือกวิธีเพิ่มความไวในการวิเคราะห์โดยการเลือก สารละลายตัวชะที่เหมาะสม คือมีค่าความนำไฟฟ้าจำเพาะต่ำ เตรียมให้มีความเข้มข้นต่ำ และเลือกใช้กับคอลัมน์ที่มีความจุ (capacity) ต่ำ

ความนำไฟฟ้า (condunctance , L) ค่าความนำไฟฟ้าของสารละลาย คือ ค่ากระแสที่วัดได้จากการเคลื่อนที่ของแคตไอออนไปยังแคโทด และแอนไอออนไปยังแอโนดเมื่อมีแรงเคลื่อนไฟฟ้าเท่ากับ 1 หน่วย กระแสที่เกิดขึ้นนี้เป็นไปตามกฎของโอห์ม คือ

$$i = E/R \qquad (2.3)$$

เมื่อ $E = 1$

$$i = 1/R \qquad (2.4)$$

ค่า i ที่วัดได้เมื่อ $E = 1$ คือ ค่าความนำไฟฟ้า (L)

$$L = 1/R \qquad (2.5)$$

ถ้าในสารละลายมีส่วนประกอบที่เป็นเนื้อเดียวกันตลอดอย่างสม่ำเสมอ ความต้านทานความนำไฟฟ้าจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความยาวเป็นเซนติเมตร (l) และเป็นสัดส่วนผกผันกับพื้นที่หน้าตัด

(A) ของตัวนำไฟฟ้านั้น

$$R \propto l/A$$

$$R = \rho\, l/A \qquad 2.6$$

เมื่อ ρ คือ ค่าความต้านทานจำเพาะของสารละลาย (specific resistance หรือ resistivity) มีหน่วยเป็น โอห์ม-ซม. ซึ่งหมายถึง ความต้านทานของสารที่มีความยาว (l) เท่ากับ 1 เซนติเมตร และมีพื้นที่หน้าตัด (A) เท่ากับ 1 ตารางเซนติเมตร

ถ้า k เป็นค่าความนำไฟฟ้าจำเพาะของสารละลาย (specific conduetance) หรือ conductivity มีหน่วยเป็นโมห์/เซนติเมตร และมีค่าเท่ากับ= $1/\rho$ จะได้ว่า

$$L = 1/R$$

$$= (1/\rho)/(A/l)$$

$$= k\,(A/l) \qquad 2.7$$

ความยาวของตัวนำไฟฟ้าต่อพื้นที่หน้าตัดของตัวนำไฟฟ้า หมายถึง ระยะห่างของขั้ววัดและพื้นที่หน้าตัดของขั้วนั้น สำหรับเซลล์แต่ละเซลล์จะเป็นค่าคงที่ เรียกว่า ค่าคงที่ของเซลล์ (cell constant ,)

$$o = l/A \qquad 2.8$$

$$L = k/o \qquad 2.9$$

จากสมการที่ 2.9 จะได้ว่า ค่าความนำไฟฟ้าของสารละลายจะขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของเซลล์ และค่าความนำไฟฟ้าจำเพาะของไอออนในสารละลายนั้น ค่าการนำไฟฟ้าจำเพาะของสารแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารหรือไอออน ความเข้มข้น ส่วนประกอบของสารละลาย (medium) และนอกจากนี้ ค่านี้ยังมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก ทั้งนี้เนื่องจากเป็นค่าที่วัดได้จากการเคลื่อนที่ของไอออนในสารละลายไปสู่ขั้ววัด ถ้าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของไอออนจะเปลี่ยนแปลงด้วย ดังนั้นในการวัดค่าความนำไฟฟ้าจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ หรือบันทึกอุณหภูมิขณะวัด เพื่อจะได้รายงานผลที่ถูกต้อง

ถ้ามีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ส่วนประกอบของสารละลายคงที่ ดังนั้น ค่าความน่าไฟฟ้าจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของไอออนในสารละลายนั้น สามารถนำหลักการนี้มาหาปริมาณไอออนในสารละลายได้ โดยการวัดปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมจากสารละลายมาตรฐานโดยใช้สภาวะเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง

2.5.6 เครื่องบันทึกและรายงานผล (recorder/integrator) การรายงานผลจะแสดงความสัมพันธ์ของสัญญาณที่ได้จากการวัดค่าความน่าไฟฟ้า กับ เวลาเป็นนาที เรียกว่า โครมาโทแกรมดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 2.3 ในโครมาโทแกรมหนึ่งจะประกอบด้วยสัญญาณที่ได้จากการวัดค่าความน่าไฟฟ้าของสารละลายตัวชะ ซึ่งจะให้ผลเป็นเส้นตรงสม่ำเสมอ เรียกว่า baseline กับสัญญาณที่ได้จากการวัดค่าความน่าไฟฟ้าของสารละลายตัวอย่าง ซึ่งจะมีลักษณะเป็นยอดแหลม เรียกว่า พีก (peak) ลักษณะของพีกอาจจะสูงหรือต่ำกว่า baseline ขึ้นอยู่กับผลต่างของค่าความน่าไฟฟ้าของสารละลายตัวชะ และสารละลายตัวอย่าง ไอออนแต่ละชนิดจะให้พีกที่เวลาต่างกัน เรียกว่า รีเทนชันไทม์ (retention time,t_r) ความสูงของพีกจะสัมพันธ์กับปริมาณของไอออนในสารละลายตัวอย่างนั้น

ในกรณีที่ใช้ recorder จะต้องวัด t_r วัดความสูงของพีก และพื้นที่พีกเอง แล้วนำมาคำนวณเปลี่ยนเป็นความเข้มข้น แต่ถ้าใช้ integrator เครื่องจะบันทึก และรายงานผลในรายการต่าง ๆ เช่น t_r , ความสูงของพีก พื้นที่พีก และเปอร์เซนต์ของแต่ละพีก โดยคิดจากการให้ผลรวมของทุกพีกเป็นร้อยเปอร์เซนต์ เป็นต้น

2.6. การทำคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis)

จุดมุ่งหมายของเทคนิคโครมาโทกราฟีนั้น คือ การแยกและหาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่าง แต่การที่จะหาปริมาณได้จะต้องทราบก่อนว่าในสารละลายตัวอย่างนั้น มีสารอะไรเป็นองค์ประกอบดังนั้นการทำคุณภาพวิเคราะห์เพื่อให้ทราบว่าในตัวอย่างนั้นมีสารอะไรบ้าง จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก เทคนิคการทำคุณภาพวิเคราะห์ในไอออนโครมาโทกราฟีมีหลายวิธีดังนี้

2.6.1. โดยการเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์โดยวิเคราะห์ตัวอย่าง และ สารมาตรฐานในสภาวะการทดลองเดียวกัน ถ้ามีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากันก็พอจะสัณนิษฐานว่าน่าจะเป็นสารตัวเดียวกัน แต่จะต้องมีวิธีอื่นมายืนยันอีกมากจึงจะยอมรับได้ เช่น เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารตัวชะ เปลี่ยนคอลัมน์ เปลี่ยนแปลงอัตราการไหล เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วิธีเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์นี้ ยังเหมาะสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบแล้วว่ามีองค์ประกอบอะไรบ้างอย่างแน่นอน แล้วใช้สารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบว่า พีกไหนเป็นสารอะไร เช่น ในกรณีที่ตัวอย่างผ่านการเตรียมโดยวิธีที่เหมาะสม และกำจัดสิ่งรบกวนอื่น ๆ ออกแล้ว เหลือเฉพาะสารที่สนใจบางตัว

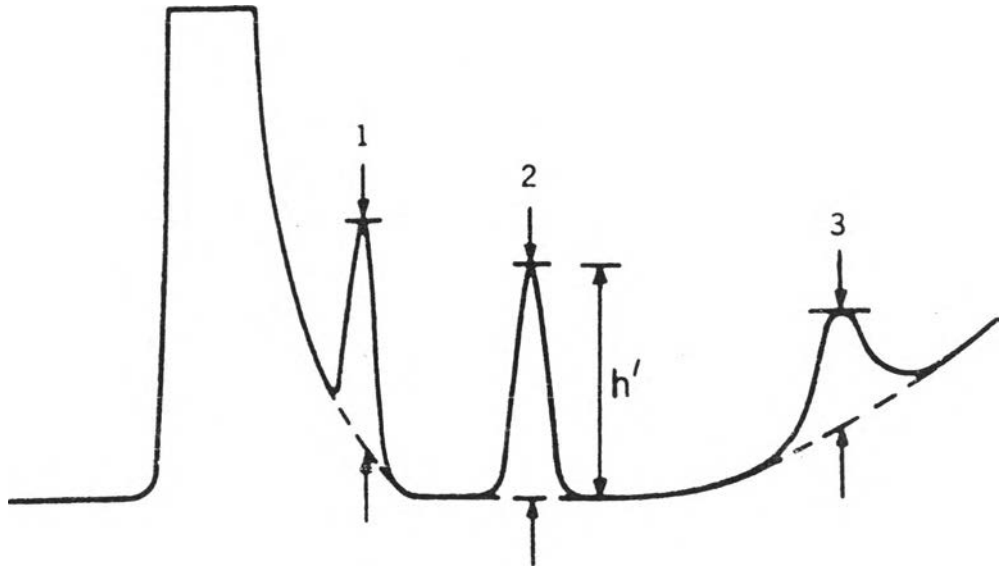
2.6.2 โดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (spiking) เป็นเทคนิคที่เหมาะในการที่จะบอกว่าพีกไหนเป็นของสารใดในของผสมที่ทราบชนิดต่างๆ ของสารแล้ว แต่ไม่ทราบตำแหน่งพีก วิธีนี้เพียงวิธีเดียวก็ไม่สามารถยืนยันอย่างแน่นอนได้เช่นเดียวกันกับวิธีแรก นั่นคือจะต้องใช้วิธีอื่นด้วยดังกล่าวแล้ว แต่วิธีนี้มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีแรกคือ การวิเคราะห์ตัวอย่างกับสารมาตรฐาน ทำพร้อมกันดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเรื่องการเกิดพีก shift เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความดัน และ ความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นในการวิเคราะห์แบบวิธีแรก เนื่องจากการวิเคราะห์สารมาตรฐานและตัวอย่างทำไม่พร้อมกัน

2.7. การทำปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis)

การหาปริมาณไอออนในตัวอย่างนั้น สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีจำเป็นจะต้องใช้ค่าความสูงของพีก หรือ พื้นที่พีก หรืออาจจะใช้ทั้งสองอย่างเปรียบเทียบกัน การหาความสูงของพีก และพื้นที่พีก สามารถทำได้ดังนี้

1. ความสูงของพีก (Peak Height , h) เนื่องจากความสูงของพีก ที่ได้จากสัญญาณไฟฟ้าของดีเทกเตอร์จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ จึงสามารถนำมาคำนวณหาปริมาณของสารได้การใช้ความสูงของพีกในการหาปริมาณ มีข้อดีหลายประการคือ ทำได้ง่าย และรวดเร็ว และในกรณีที่พีกซ้อนทับกัน หรือมีสัญญาณรบกวนที่ baseline การใช้ความสูงของพีกจะดีกว่าวิธีที่ใช้พื้นที่พีก ข้อเสียของการใช้วิธีนี้คือ เหมาะสำหรับการหาปริมาณสาร

ในช่วงต่ำและปานกลาง ของ linear range และ linear range ของสารที่ออกมาก่อนจะแคบกว่า สารที่ออกทีหลัง นอกจากนี้ความสูงของพีกจะแปรเปลี่ยนค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับการใช้พื้นที่พีก การวัดความสูงของพีก แสดงในรูปที่ 2.20



รูป 2.20 แสดงการวัดความสูงของพีกจาก base lines

2. พื้นที่ของพีก (Peak Area , A) การใช้พื้นที่พีกเพื่อนำไปหาปริมาณของสารตัวอย่างนั้นได้จากหลักที่ว่าปริมาณของสาร หรือความเข้มข้นของสาร จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับพื้นที่พีก ดังสมการ

$$C_i = f_i A$$

C = ความเข้มข้น

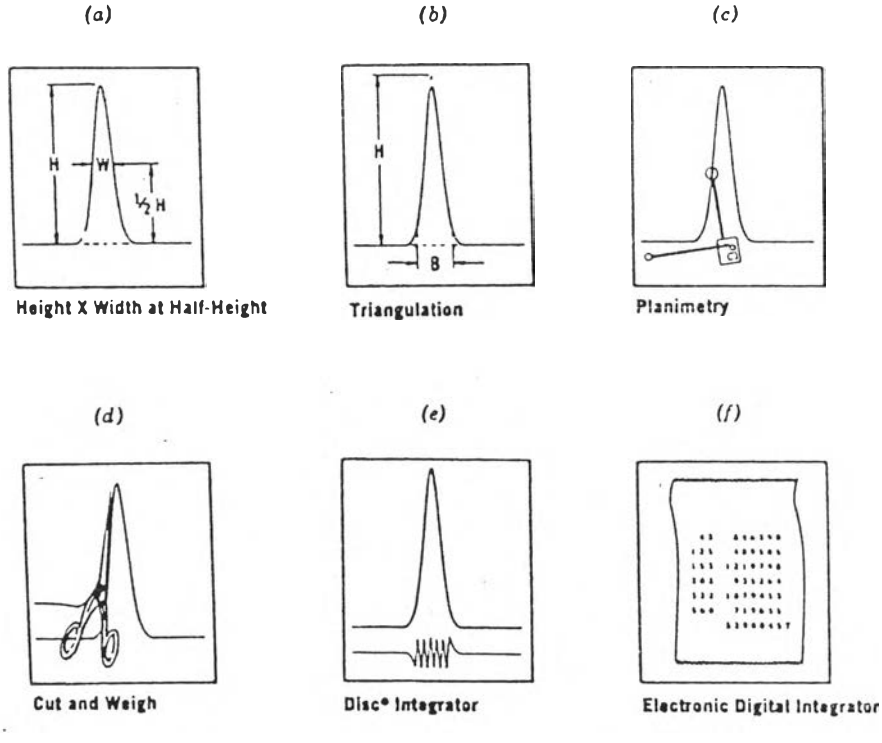
A = พื้นที่ของพีก

f = detector response factor

การหาพื้นที่พีกทำได้หลายวิธี ดังแสดงในรูปที่ 2.21 ในแต่ละเทคนิคจะมีค่าความเที่ยงต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.23

การใช้พื้นที่พีกในการหาปริมาณนั้นให้ผลดีในช่วงความเข้มข้นปานกลางถึง ความเข้มข้นสูงของ linear range มีข้อเสียคือ มักจะให้ผลไม่ดีในกรณีที่เกิดพีกซ้อนกัน หรือมีสัญญาณรบกวนที่ baseline

ในการหาปริมาณสารในตัวอย่างนั้นจะต้องทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสูงของพีก หรือพื้นที่พีก ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้



รูปที่ 2.21 แสดงเทคนิคต่างๆ ของการวัดพื้นที่พีก

ตารางที่ 2.3 แสดงการเปรียบเทียบค่าความเที่ยงของการวัดพื้นที่พีก

เทคนิค	ความเที่ยง %
Planimetry (c)	4.06
Triangular (1/2 x H x B) (b)	4.06
Triangular (H x W) (a)	2.58
cut and weight (d)	1.74
Disc integrator (e)	1.29
Digital integrator (f)	0.44
computer	0.22

2.7.1 Normalization Method สามารถทำได้ 2 แบบ คือ

2.7.1.1 การหา area normalization แบบทั่วไป ทำโดยการวัดพื้นที่พีกของสารทุกตัวในสารละลายตัวอย่างรวมกัน แล้วคิดเทียบให้เป็น 100 เปอร์เซนต์ และคำนวณว่าพื้นที่แต่ละพีกคิดเป็นกี่เปอร์เซนต์เช่น ในตัวอย่างประกอบด้วยสาร A ,B, C และ D

$$\% A = \frac{\text{พื้นที่พีกของ A}}{\text{ผลรวมพื้นที่พีก A,B,C และ D}} \times 100$$

การหาปริมาณแบบนี้ใช้ได้ดี เมื่อสารแต่ละชนิดในตัวอย่างมี detector response ใกล้เคียงกัน การชะสารที่วิเคราะห์ออกจากคอลัมน์หมดทุกชนิดที่มีในตัวอย่าง และแต่ละชนิดสามารถชะออกมาได้หมด ข้อเสียของการหาปริมาณวิธีนี้คือ จะได้ค่าที่ไม่ถูกต้อง ถ้าไม่เป็นไปตามข้อที่กล่าวข้างต้น นอกจากนี้ค่าที่ได้ไม่ใช่ปริมาณที่แท้จริงของสาร แต่เป็นเพียงเปอร์เซนต์ในองค์ประกอบนั้น

นอกจากนี้ในกรณีที่มีสารอื่นในปริมาณต่ำ หรือมีค่า detector response ต่ำมาก ทำให้ตรวจวัดพีกไม่ได้ การคำนวณแบบนี้ก็จะผิดพลาดไปมาก เนื่องจากไม่ได้รวมพีกดังกล่าวด้วย

2.7.1.2 การหา area normalization โดยใช้ Correction factor การหาปริมาณสารในตัวอย่างโดยวิธี area normalization ดังกล่าวข้างต้นแล้วนั้น มักมีข้อผิดพลาด เนื่องจากสาเหตุหลายประการดังกล่าวแล้ว แต่สาเหตุหนึ่งเกิดเนื่องจากสารแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง ให้ค่าตอบสนองต่อดีเทกเตอร์ (detector responses) แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องหาแฟกเตอร์แก้ค่า เพื่อทำให้การคำนวณหาเปอร์เซนต์องค์ประกอบของสารในตัวอย่างได้ถูกต้องยิ่งขึ้น การหาแฟกเตอร์ มีวิธีการดังนี้

ก่อนอื่นจะต้องทราบว่าในตัวอย่างที่วิเคราะห์ มีสารอะไรบ้างเป็นองค์ประกอบ แล้วเตรียมสารละลายผสมให้มีองค์ประกอบเหมือนสารตัวอย่าง แต่ทราบน้ำหนักองค์ประกอบแต่ละชนิด ฉีดสารโดยใช้สภาวะการทดลองเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างหาพื้นที่พีก แล้วคำนวณ correction factor ดังตารางต่อไปนี้

สารที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายผสม	น้ำหนักในสารละลายผสม (W)	พื้นที่พีก (A)	A/W	Correction factor (F)
a	0.435	4.0	9.19	1.00
b	0.653	6.5	9.95	1.08
c	0.864	7.6	8.79	0.96
d	0.864	8.1	9.38	1.02
e	1.760	15.0	8.52	0.93

โดยที่ correction factor ของสารแต่ละชนิดหาได้จากการสมมติให้สารชนิดใดชนิดหนึ่งในสารละลายผสมเป็นตัวเปรียบเทียบและมีค่า correction factor เป็น 1 ในที่นี้

ให้สาร a เป็นตัวเปรียบเทียบ การหาค่า correction factor ของสารชนิดอื่น คำนวณได้จาก สมการ

$$F_i = \frac{(A_i/W_i)}{(A_r/W_r)}$$

F_i = correction factor ของสาร i

A_i = พื้นที่พีกของสาร i

W_i = น้ำหนักของสาร i

A_r = พื้นที่พีกของสารที่ใช้เปรียบเทียบ

W_r = น้ำหนักของสารที่ใช้เปรียบเทียบ

การหาเปอร์เซนต์ของสารในตัวอย่าง ใช้สมการดังนี้

$$\% C_i = \frac{A_i/F_i}{\Sigma A_i/F} \times 100$$

C_i = ปริมาณของสารชนิดหนึ่ง (i) ที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง

A_i = พื้นที่พีกของสาร i ในตัวอย่าง

ΣA_i = ผลรวมของพื้นที่พีกของสารทุกชนิดในตัวอย่าง

F = factor ซึ่งหาได้จากการรวมผลคูณของ correction factor ของสารแต่ละชนิดกับพื้นที่พีกของสารชนิดนั้น โดยคำนวณจากโครมาโทแกรมมาตรฐาน ดังนี้ $\Sigma F_i A_i$

2.7.2 Internal Standard Method การวิเคราะห์โดยเทคนิค ใช้วิธีเติมสารมาตรฐานที่เป็นสารต่างชนิดกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่าง เรียกสารชนิดนี้ว่า internal standard สารที่เติมลงไปต้องทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และให้มีความเข้มข้นที่ให้พีกมีขนาดใกล้เคียงกับสารที่วิเคราะห์เพื่อให้ได้การเปรียบเทียบที่ถูกต้อง สิ่งที่จะต้องพิจารณาและระมัดระวังในการเลือกใช้เทคนิคนี้ คือ

1. สารที่จะใช้เป็น internal standard จะต้องเป็นสารที่ไม่เป็นองค์ประกอบ หรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง

2. สารที่เป็น internal standard จะต้องแยกออกจากสารตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์

3. internal standard จะต้องเป็นสารบริสุทธิ์

4. internal standard จะต้องเป็นสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารที่วิเคราะห์ และไม่ทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่างนั้น

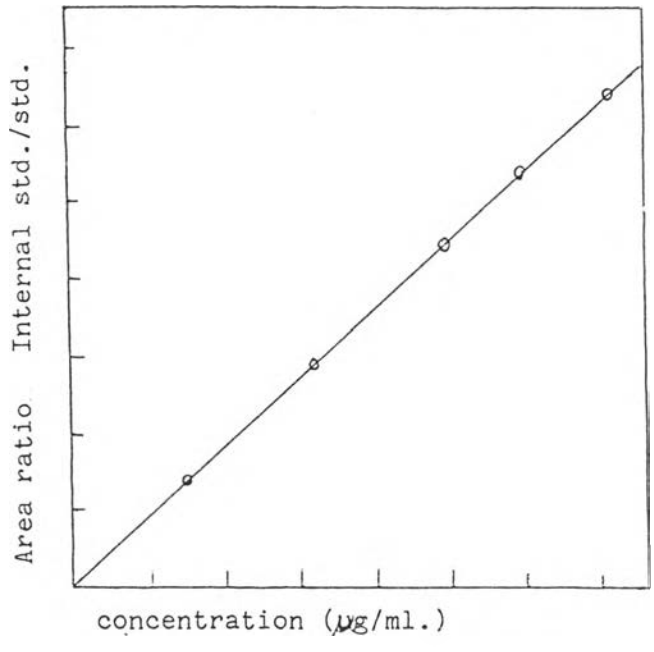
5. internal standard ที่เติมลงไป ควรจะมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารที่ต้องการหาปริมาณ

6. internal standard ที่ใช้ ควรจะต้องเป็น linear relations ในช่วงของความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยลองทำกราฟมาตรฐานในความเข้มข้นช่วงดังกล่าว 3-4 จุด

7. internal standard จะต้องมีพีกในตำแหน่งใกล้เคียงกับสารที่วิเคราะห์ ซึ่งดูจากค่ารีเทนชันไทม์ หรือถ้าวิเคราะห์สารหลายชนิดในตัวอย่าง internal standard ควรจะมีค่ารีเทนชันไทม์อยู่ระหว่างพีกต่าง ๆ ของสารในตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี internal standard นั้นทำได้โดยการเติม internal standard ความเข้มข้นเท่ากันลงในชุดของสารละลายมาตรฐานผสมของสารที่ต้องการวิเคราะห์หลาย ๆ ความเข้มข้น เมื่อนำไปวิเคราะห์แล้วหาพื้นที่พีกก็จะได้อัตราส่วนของพื้นที่พีก internal standard กับพื้นที่พีกของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (Ai/As) เขียน กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับอัตราส่วนของพื้นที่พีก เรียกว่ากราฟมาตรฐาน (standard curve) เมื่อวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างที่เติม internal standard ปริมาณเท่ากัน ในสภาวะการทดลองเดียวกัน แล้วหาอัตราส่วนของพื้นที่

พีก ก็จะสามารถหาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่างได้ โดยการอ่านจากค่ากราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 2.22



รูปที่ 2.22 แสดง Internal Standard Calibration plot

ข้อดีของการวิเคราะห์โดยวิธีนี้คือ สามารถลดปัญหาที่เกิดจาก การเตรียมสารตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ หรือการหา recovery yields

2.7.3 External Standard Method การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี external standard นั้นทำได้โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างในสภาวะการทดลองเดียวกัน บันทึกความสูงของพีก หรือพื้นที่พีก ถ้าใช้สารละลายมาตรฐานเพียงความเข้มข้นเดียว เรียกว่า one-point calibration สามารถหาความเข้มข้นของสารในตัวอย่างได้ ดังสมการ

$$C_s = \frac{S_s \times C_{st}}{S_{st}}$$

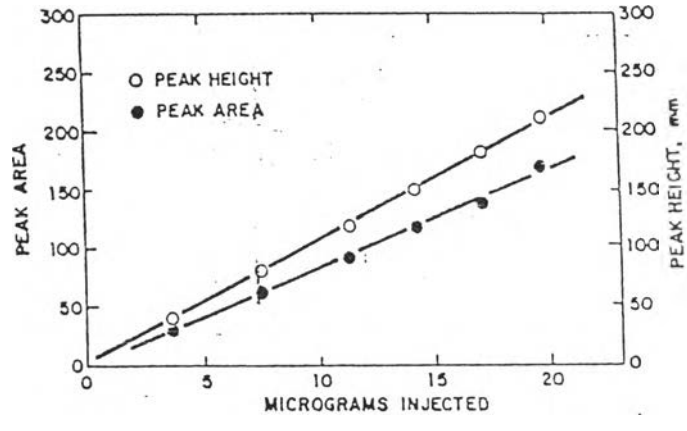
C_s = ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

C_{st} = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

S_s = สัญญาณของสารตัวอย่าง

S_{st} = สัญญาณของสารมาตรฐาน

ถ้าใช้สารละลายมาตรฐานหลาย ๆ ความเข้มข้น ก็สามารถนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟเรียกว่ากราฟมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 2.23



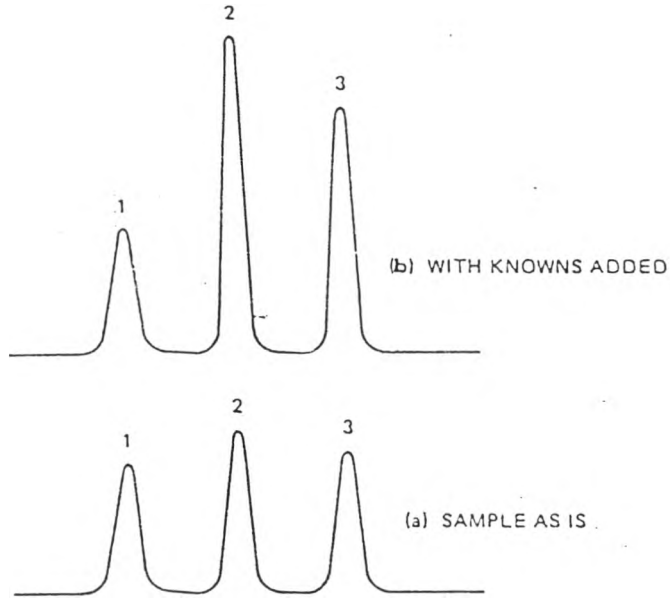
รูปที่ 2.23 แสดง External Standard Calibration Plot

และ สามารถนำสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์สารในตัวอย่าง มาเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานได้โดยตรง

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนี้ นิยมใช้กันมากเนื่องจากง่ายและสะดวกและให้ความถูกต้องพอสมควร การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และ กราฟมาตรฐานจะต้องทำทุกครั้งที่เริ่มการทดลองใหม่ และความเข้มข้นของสารในตัวอย่างจะต้องอยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานเท่านั้น

2.7.4 Standard Addition Method การวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี standard addition ทำโดยการวิเคราะห์สารตัวอย่างก่อน แล้วนำสารตัวอย่างนั้นมาเติมสาร

มาตรฐาน ที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไป แล้วทำการวิเคราะห์ใหม่ โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 (a) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างซึ่งมีสาร 3 ชนิด

(b) แสดงโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างเมื่อเติมสารมาตรฐานตัวที่ 2 และ 3 ลงไป

และคำนวณหาปริมาณสารในสารละลายตัวอย่างโดยความสัมพันธ์ดังสมการ

$$C_s = \frac{S_s \times \Delta C}{\Delta S}$$

C_s = ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง

S_s = สัญญาณของสารในตัวอย่าง

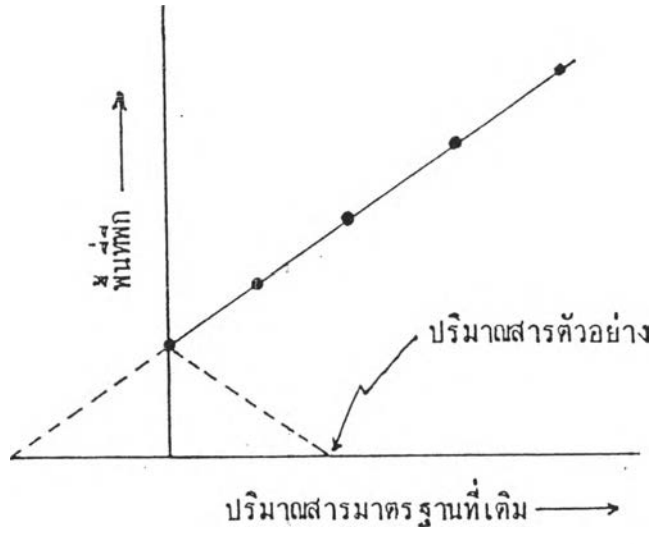
ΔC = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

ΔS = ผลต่างของสัญญาณที่ได้จากสารตัวอย่าง และสารตัวอย่างที่เติมสาร มาตรฐาน

โดยที่สัญญาณ หมายถึง ความสูงของพีกหรือพื้นที่พีก.

การเติมสารละลายมาตรฐานเพียงค่าความเข้มข้นเดียวเรียกว่า one standard addition ถ้ามีการทำ standard addition หลาย ๆ ชุด (3-5 ชุด) ก็สามารถนำผลที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน และวิเคราะห์ผลโดยใช้กราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐานโดยวิธี standard addition ทำโดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างหลาย ๆ ส่วน ประมาณ 3-5 ส่วน เติมสารละลายมาตรฐานของสารที่ต้องการวิเคราะห์ลงในสารละลายตัวอย่างแต่ละส่วนให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำไปวิเคราะห์เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับความสูงพีก หรือพื้นที่พีก ดังแสดงในรูปที่ 2.25 จุดตัดบนแกน x เป็นปริมาณของสารตัวอย่าง



รูปที่ 2.25 แสดง Standard addition calibration curve

การวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีข้อดีหลายประการ กล่าวคือ แก้ปัญหาหรืออาจจะเกิดจาก sample matrix ซึ่งอาจจะมีผลให้รีเทนชันไทม์ หรือ สัญญาณที่ได้ของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐานแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้ในกรณีที่สารตัวอย่างมีสารนั้นในปริมาณค่อนข้างต่ำ เช่น ต่ำกว่า detection limited หรือ ต่ำกว่า linear range การทำ standard addition จะเป็นการเพิ่มปริมาณสารในตัวอย่างทำให้

สามารถวิเคราะห์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก และยังลดการผิดพลาดที่อาจจะเกิดจาก การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความดัน และสภาวะอื่น ๆ เมื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างมากต้องใช้เวลานาน ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิคนี้เปรียบเสมือนกับการทำกราฟมาตรฐานสำหรับทุกตัวอย่าง

ข้อเสียของการใช้เทคนิคนี้ คือเสียเวลาในการวิเคราะห์มากกว่าปกติตามเหตุผลที่กล่าวแล้วข้างต้นคือ เนื่องจากต้องเตรียมกราฟมาตรฐานเท่ากับจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ผลที่ตามมาคือต้องใช้สารตัวอย่างมาก สารมาตรฐานมาก ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย