

การตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยวิธีโครมาโตกราฟี

วิวัฒนาการเรื่องยุทธการณ*

โครมาโตกราฟี (Chromatography) คือวิธีการแยกสารสองชนิดหรือมากกว่าโดยอาศัยคุณสมบัติการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันในระบบที่ประกอบไปด้วย 2 เฟส คือเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสคงที่ส่วนใหญ่จะเป็นของแข็งหรืออาจจะเป็นตัวทำละลายที่ฉาบอยู่บนสารที่เป็นของแข็ง ซึ่งเป็นสารที่สามารถดูดซับหรือให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ในเฟสเคลื่อนที่ไหลผ่านแล้วเกิดการแยกของสารที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ได้ เฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นได้ทั้งสารละลายหรือแก๊สขึ้นอยู่กับชนิดของโครมาโตกราฟีนั้น

โครมาโตกราฟีแบ่งออกได้เป็นชนิดต่างๆ หลายชนิด ถ้าแบ่งตามกลไกการไหลผ่านของสารที่ต้องการแยก จะแบ่งได้เป็น 4 ชนิดดังนี้

1. Adsorption chromatography
2. Partition chromatography
3. Ion exchange chromatography
4. Size exclusion chromatography

* คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ถ้าแบ่งตามคุณสมบัติทางกายภาพของเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ จะแบ่งได้เป็น 4 ชนิดดังนี้

1. Liquid-solid chromatography
2. Liquid-liquid chromatography
3. Gas-solid chromatography
4. Gas-liquid chromatography

ถ้าแบ่งตามลักษณะของเครื่องมือที่บรรจุสารที่ทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่ไว้ จะแบ่งได้เป็น 3 ชนิดดังนี้

1. Thin-layer chromatography (planar chromatography)
2. Column chromatography
3. Capillary chromatography

การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีนี้มีประโยชน์มากในงานวิเคราะห์สารต่างๆ มากมายรวมทั้งสารพิษและยาต่างๆ โดยทั่วไปแล้วเรามักจะคุ้นเคยกับชื่อชนิดของโครมาโตกราฟีเหล่านี้คือ

- Paper chromatography (PC)
- Thin-layer chromatography (TLC)
- High performance liquid chromatography (HPLC)
- Gas chromatography (GC)

ซึ่งแต่ละชนิดได้ผสมผสานเอาคุณลักษณะของโครมาโตกราฟฟีหลายข้อที่กล่าวไว้ข้างบนเข้าด้วยกัน เริ่มด้วยการใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ง่ายๆ เช่น paper chromatography จนถึงเครื่องมือที่ซับซ้อนมีราคาแพงเช่น HPLC และ GC

สารพิษในสิ่งแวดล้อมมีมากมายหลายร้อยชนิด การเลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์หาชนิดหรือปริมาณของสารพิษนั้นๆ จำเป็นต้องรู้คุณสมบัติหรือสถานะภาพของสารพิษนั้นก่อนเพื่อการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น สารระเหย ได้แก่ chloroform ether และ alcohol โครมาโตกราฟฟีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารพวกนี้คือ gas chromatography (GC) เช่นเดียวกับสารพวกแก๊สพิษ เช่น carbonmonoxide และ sulfur dioxide ก็ใช้ GC ในการวิเคราะห์ แต่ถ้าเป็นสารพิษจากเชื้อราเช่น อะฟลาท็อกซิน high performance liquid chromatography (HPLC) จะเหมาะสมกว่า และถ้าเป็นสารกำจัดแมลงจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารกำจัดแมลงนั้น คือถ้าเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและกลุ่มออร์แกโนคลอรีนจะนิยมใช้ GC ในการวิเคราะห์มากกว่า HPLC เป็นต้น ดังนั้นก่อนการเลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีจำเป็นต้องทราบพอสังเขปว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสารประเภทไหน สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอะไร พร้อมกับ

ต้องมีความรู้ด้วยว่า โครมาโตกราฟฟีแต่ละชนิดนั้นมีคุณสมบัติในการแยกสารอย่างไร ประเภทไหน เพื่อให้การวิเคราะห์นั้นเร็วและได้ผลเป็นที่เชื่อถือได้ ต่อไปจะอธิบายถึงหลักการของโครมาโตกราฟฟีที่ใช้กันโดยแพร่หลายคือ PC, TLC, HPLC และ GC พร้อมทั้งข้อดีข้อเสียเพื่อเป็นแนวทางสำหรับการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารพิษที่ต้องการวิเคราะห์

Paper & Thin-layer chromatography (PC & TLC)

Paper chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารเริ่มแรก ซึ่งได้พัฒนาขึ้นมาเป็นวิธี thin-layer chromatography มีหลักการและวิธีการที่คล้ายคลึงกันต่างกันตรงเฟสคงที่ โดย PC จะใช้กระดาษกรอง ส่วน TLC จะใช้แผ่นกระจก หรืออะลูมิเนียม หรือพลาสติกเคลือบด้วยผงของแข็งที่มีรูพรุนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-40 ไมโครเมตรเป็นเฟสคงที่ ที่นิยมใช้กันมากคือ silica gel, alumina, cellulose หรือ ion-exchange resins โดยอาศัย CaSO_4 เป็น binder ทำให้เฟสคงที่ยึดติดแน่นได้ดีกับแผ่นที่ใช้ มีการนำวิธีนี้ไปใช้ในงานวิเคราะห์สารต่างๆ อย่างกว้างขวาง มีข้อดีคือ

1. เป็นวิธีที่เร็ว และง่าย
2. ใช้อุปกรณ์ไม่มาก ราคาถูก

3. สามารถวิเคราะห์สารหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน แต่ความไวและความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ยังต่ำกว่าวิธี HPLC และ GC

ปัจจุบันนี้ได้มีการพัฒนาวิธีการ TLC ขึ้นมาจนสามารถที่จะใช้วัดปริมาณของสารได้พร้อมไปกับการพิสูจน์ว่าสารนั้นเป็นสารอะไร โดยมีสารมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ

เฟสเคลื่อนที่	เฟสคงที่	เหมาะสำหรับการแยกสารจำพวก
1. Chloroform:acetone (9:1)	Silica gel	Organophosphate insecticides
2. Hexane:acetone (4:1)	Silica gel	Organochlorine insecticides
3. Ethyl acetate:methanol: strong ammonia solution (85:10:5)	Silica gel	Amphetamine Opiates

เราสามารถเลือกเฟสเคลื่อนที่หรือปรับอัตราส่วนของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้เอง โดยเริ่มต้นด้วยตัวทำละลายที่เป็น non-polar ก่อน แล้วค่อยๆ เพิ่ม polarity โดยเติมตัวทำละลายที่ polar มากขึ้น จนสามารถแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน บางครั้งอาจต้องเพิ่มกรดหรือด่างลงไปในส่วนผสมด้วยเพื่อให้ได้ spot ของสารที่ต้องการแยกเป็นจุดดวงชัดเจน ไม่มีรอยเป็นหางหรือที่เรียกว่า tailing

สารที่ถูกแยกแล้วบนแผ่น PC หรือ TLC ถ้าเป็นสารที่มีสีในตัวเอง ก็จะ

เฟสเคลื่อนที่ ของ PC และ TLC เป็นของเหลวหรือตัวทำละลาย ซึ่งอาจจะเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกัน ส่วนใหญ่มักจะไม่เกินสามชนิด การเลือกใช้ก็จะขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการแยกและชนิดของเฟสคงที่ และไม่ควรเป็นตัวทำละลายที่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังตัวอย่างในตารางข้างล่าง

มองเห็นได้ แต่ส่วนใหญ่จะต้องอาศัยสารอื่นโดยทำปฏิกิริยาให้เกิดสารมีสีที่มองเห็นได้ โดยการพ่นสารละลายที่ทำให้เกิดสีลงไปบนแผ่น PC หรือ TLC การพ่นต้องพ่นให้เป็นฝอยกระจายอย่างทั่วถึงลงบนแผ่น ยกตัวอย่างสารละลายเหล่านี้เช่น

Acidified iodoplatinate solution:

จะทำให้เห็นแผ่น PC หรือ TLC เป็นสีชมพูอ่อน ถ้ามีสารจำพวก tertiary amines หรือ quaternary ammonium compounds จะเห็นเป็น spot สีม่วง ม่วงน้ำเงิน หรือม่วงน้ำตาล ขึ้นอยู่กับสารแต่ละชนิดนั้นๆ นิยมใช้

กับสารในกลุ่มสารเสพติดเช่น morphine heroin และ codeine

Silver nitrate ที่ละลายใน acetone: จะทำให้พื้นแผ่น PC หรือ TLC เป็นสีดำ หลังจากนำ plate ที่พ่นแล้วไปอังแสงแดด หรือแสงอุวี่ แต่ spot สารที่แยกได้จะเป็นสี เทาบนพื้นสีดำถ้ามีสารที่มี chlorine เป็น องค์ประกอบอยู่ เช่นสารกำจัดแมลงใน กลุ่มออร์แกโนคลอรีน

Acidic palladium chloride: ใช้กับ สารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟส จะเห็นเป็น spot สีเหลือง เหลืองน้ำตาล หรือสีน้ำตาล บนพื้นขาว

การใช้วิธี TLC มีข้อเสียคือให้ผล ที่ไม่ค่อยแม่นยำ ค่า Rf หรือค่าอัตราส่วน ระหว่างระยะทางของสารที่เคลื่อนที่ไปบน แผ่น TLC กับระยะทางที่เฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่ไปจนสูงสุด จะคลาดเคลื่อนได้ถ้า เปลี่ยนมือผู้วิเคราะห์ การวัดปริมาณของ สารบนแผ่น TLC นอกจากจะใช้ความเข้ม ขันของสารมาตรฐานเป็นค่าเปรียบเทียบกับ แล้วอาจจะอาศัยเครื่องมือวัดที่เรียกว่า

densitometer ช่วยจะทำให้ได้ค่าที่แม่นยำ มากขึ้น

นอกจากนี้การปรับปรุงเฟสคงที่ โดยการเติมสารที่เรืองแสงเข้าไปด้วยจะ ช่วยการอ่านได้ผลดี และเพิ่มความไวใน การวิเคราะห์มากขึ้น

High performance thin layer chromatography (HPTLC)

ในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมาได้มีการ พัฒนาปรับเปลี่ยนเฟสคงที่ เทคนิคการ spot สารบน plate และวิธีการวัดปริมาณ สารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC ทำให้เพิ่มประ สติภาพในการแยกสารได้มากขึ้น เร็วขึ้น มีความไวและได้ผลแม่นยำขึ้น และไม่ถึง กับต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก เหมือน HPLC เรียกวิธีการนี้ว่า high performance thin layer chromatography (HPTLC) ตารางข้างล่างแสดงความแตก ต่างและข้อได้เปรียบหรือข้อดีของ HPTLC ที่มีมากกว่า TLC

Parameter	Conventional TLC	HPTLC
Sample volume	1-5 uL	0.1-0.2 uL
Starting spot diameter	3-6 mm	1-1.5 mm
Diameter of separated spots	6-15 mm	2-5 mm
Solvent migration distance	10-15 cm	3-6 cm
Separation time	30-200 min	3-20 min
Plate height	30 um	12 um

Parameter	Conventional TLC	HPTLC
Effective theoretical plates	<600	<5000
Separation number	10	10-20
Particle size (average)	20 μm	5 μm
Particle size distribution	10-60 μm	Tight
Adsorbent layer thickness	100-250 μm	200 μm
Detection limit, absorption	1-5 ng	0.1-0.5 ng
Detection limit, fluorescence	50-100 pg	5-10 pg
Sample tracks per plate	10	36

(คัดลอกจากตารางที่ 1 ในเอกสารอ้างอิงหมายเลข 2)

High performance liquid chromatography (HPLC)

เป็น column liquid chromatography ที่ปรับปรุงขึ้นเป็นระบบที่สมบูรณ์ ประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญดังต่อไปนี้

1. Pump
2. Injector
3. Column
4. Detector
5. Recorder

Pump: เป็นส่วนที่ใช้ในการดูดสารละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลผ่านจากคอลัมน์ไปยัง detector สามารถตั้ง ปรับ หรือควบคุมอัตราการไหลผ่านของเฟสเคลื่อนที่ได้ ซึ่งจะไหลผ่านท่อเล็กๆ มีอุปกรณ์ตรวจวัดและควบคุมความดันที่เกิดขึ้นจากความ

ต้านทานการไหลผ่านของสารละลายด้วยปั๊มที่ใช้ใน HPLC จะทนต่อความดันสูงได้มากถึง 4000 - 6000 psi บางครั้งจึงเรียกวิธีนี้ว่า high pressure liquid chromatography โดยทั่วไปอัตราการไหลผ่านของเฟสเคลื่อนที่ที่จะอยู่ในช่วง 1-3 mL/นาที

ถ้าเลือกเฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมของสารละลาย ป้อนระบบ gradient elution สามารถควบคุมสัดส่วนของสารละลายสองชนิดในสารผสมให้ไหลผ่านคอลัมน์ได้ในปริมาณที่ต้องการ และในเวลาใกล้เคียงกัน ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างเพียงตัวอย่างเดียว เช่นกำหนดให้การไหลของสารละลาย A และ B ไหลผ่านในสองนาทีแรก เป็นอัตราส่วน 50:50 ในนาทีต่อไปให้เพิ่มขึ้นเป็น 60:40 และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงอัตราส่วนที่ต้องการในเวลาสิบนาทีอย่างนี้เป็นต้น ซึ่งเป็นวิธีที่จะช่วยในการแยกสาร

หลายตัวที่มี polarity ต่างกันในตัวอย่าง เคียวได้ดีขึ้น เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการ วิเคราะห์

Injector: เป็นส่วนที่ใช้นำตัวอย่าง ที่ ต้องการวิเคราะห์ ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ ปัจจุบันนิยมใช้แบบ valve injector ซึ่งจะมี ลิ้นเปิดปิดหลายทาง เมื่อใช้เข็มฉีดตัวอย่าง เข้าไปสารตัวอย่างจะถูกเก็บไว้ที่ sample loop ต่อเมื่อเปลี่ยนตำแหน่งของ injector จาก load ไปเป็น inject สารตัวอย่างใน sample loop จะถูกดันโดยเฟสเคลื่อนที่ให้ ไหลผ่านคอลัมน์ ปัจจุบันมีการใช้เครื่อง ฉีดอัตโนมัติหรือเรียกว่า autoinjector ช่วย ทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้จำนวนมาก ในระยะเวลาที่กำหนดไว้โดยไม่ต้องเสีย เวลานั่งคุมเครื่อง

Column: เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของ HPLC โดยทั่วไปสารที่ใช้ บรรจุในคอลัมน์จะเป็น silica gel ทำหน้าที่ เป็นเฟสคงที่ บรรจุในท่อซึ่งส่วนใหญ่เป็น stainless steel มีความยาวตั้งแต่ 4-25 ซม กว้างตั้งแต่ 4-10 มม ขึ้นอยู่กับว่าจะใช้งาน ในรูปแบบไหน ถ้าใช้กับงานวิเคราะห์ คอลัมน์ก็จะยาวแต่ผอม ถ้าใช้กับงาน เตรียมสารให้บริสุทธิ์คอลัมน์ก็จะสั้นแต่ อ้วน

เฟสคงที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์มี ความสำคัญมาก ปัจจุบันมีการเตรียมเฟส คงที่ให้มีคุณสมบัติในการแยกสารได้ดีขึ้น โดยใช้ silica gel เป็นวัสดุพื้นฐานทำ

ปฏิกิริยากับสารประกอบพวก chlorosilane หรือ alkoxysilane เกิดปฏิกิริยา silanization ขึ้น ซึ่ง siloxane ที่เกิดขึ้นจะ ทำให้เฟสคงที่ค่อนข้างคงทนต่อสภาวะ ความเป็นกรดหรือด่างของเฟสเคลื่อนที่ที่ ไหลผ่าน เรียกชนิดของโครมาโตกราฟฟีนี้ ว่า Bonded phase chromatography (BPC) ซึ่งแบ่งออกเป็นสองประเภทตามสภาพการ ละลายของเฟสเคลื่อนที่ได้ดังนี้

1. Normal phase BPC

2. Reverse phase BPC

Normal phase BPC: เฟสคงที่จะมี polarity สูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารที่ polar มากจะถูกหน่วงเหนี่ยวให้อยู่ใน คอลัมน์ได้นานกว่าสารที่ polar น้อย ทำให้ สารที่ polar น้อยออกจากคอลัมน์เร็วกว่า สารที่ polar มาก เหมาะสำหรับการ วิเคราะห์สารที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้ คีในไขมัน เช่นสารประกอบประเภท polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่มีปะปนทั่วไปใน อากาศและน้ำเสีย

Reverse phase BPC: โครมาโต กราฟฟี ประเภทนี้ จะตรงกันข้ามกับ normal phase BPC เฟสคงที่จะมี polarity ต่ำกว่าเฟสเคลื่อนที่ สารที่ polar มากจะ ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่ polar น้อย โครมาโตกราฟฟีประเภทนี้นิยมใช้ กันอย่างกว้างขวางมาก เหมาะสำหรับการ แยกสารประกอบที่ละลายได้ดีเล็กน้อยในน้ำ

แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอื่นที่เข้ากับน้ำหรือละลายในน้ำได้เป็นต้นว่า methanol หรือ acetonitrile ซึ่งสารพิษที่เป็นสารประกอบอินทรีย์จำนวนมากจะมีคุณสมบัติในการละลายลักษณะนี้ จึงเป็นวิธีวิเคราะห์ที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน

Siloxane bonded phase packing ที่นิยมใช้กันมากคือ $-n-C_{18}H_{17}$ หรือที่เรียกกันว่า C_{18} reverse phase BPC เฟสเคลื่อนที่นิยมใช้คือ น้ำ เมทานอล และ acetonitrile

นอกจาก bonded phase HPLC แล้ว เฟสคงที่ในคอลัมน์ยังมีชนิดอื่นอีกที่ทำให้กลไกการแยกต่างกันไป ทำให้แบ่งประเภทของโครมาโตกราฟฟีออกเป็น 4 ชนิดคือ

1. Adsorption chromatography: เฟสคงที่มักจะเป็นของแข็งซึ่งมี polarity มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นสารละลาย การแยกสารอาศัยคุณสมบัติการดูดซับสารของเฟสคงที่ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารในเฟสเคลื่อนที่ ที่นิยมใช้กันมากคือ silica gel หรือ alumina

2. Partition chromatography: เฟสคงที่จะเป็นสารละลายที่ ฉาบอยู่บนของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุณอยู่ หรือถูกปรับสภาพความคงทนต่อกรดด่างทำให้เป็น bonded phase chromatography โดยที่เฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่จะต้องไม่ละลาย

ซึ่งกันและกัน การแยกสารอาศัยคุณสมบัติการละลายที่แตกต่างกันระหว่างสองเฟสกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

3. Ion exchange chromatography: เฟสคงที่จะเป็นของแข็งที่บนพื้นผิวจะมีประจุบวกหรือประจุลบอยู่ และในเฟสเคลื่อนที่ จะมี สารซึ่งมีประจุตรงกันข้าม หรือเรียกว่า counter ion การแยกสารอาศัยคุณสมบัติการแย่งกันจับเฟสคงที่ระหว่างประจุที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่และสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ เหมาะสำหรับการแยกสารประกอบที่มีประจุ

4. Size exclusion chromatography: เฟสคงที่ในคอลัมน์จะเป็นของแข็งที่มีรูพรุนต่างๆ กัน การเลือกขนาดของรูพรุนขึ้นอยู่กับขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ การแยกสารอาศัยหลักการที่โมเลกุลสารมีขนาดต่างกัน สารที่มีโมเลกุลใหญ่จะผ่านออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่มีโมเลกุลเล็กซึ่งจะต้องอาศัยเวลาในการไหลผ่านรูพรุนของสารที่เป็นเฟสคงที่ วิธีนี้จะมีประโยชน์สำหรับการหาขนาดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ด้วย

เฟสคงที่อาจจะเป็นสารที่ไม่ใช่ของแข็งจริงๆ แต่เป็นสารอ่อนนุ่มที่มีลักษณะเป็น gel จึงเรียกวิธีนี้ว่า gel permeable chromatography หรือ gel filtration chromatography

การเลือกใช้นิพจน์ของคอลัมน์ขึ้นอยู่กับการเลือกหรือคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและทางเคมี ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

Detector: เป็นส่วนที่สำคัญมากอีกส่วนหนึ่งของเครื่อง HPLC เพื่อตรวจสอบสารโดยวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณ มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด แต่ชนิดที่มีการใช้กันมากมีอยู่ 3 ชนิดดังนี้

1. Ultraviolet visible detector (UV-VIS detector): เป็นเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะสารมากกว่า 90% ดูดกลืนแสงได้ เครื่องวัดแบบเก่าจะเป็นแบบ fixed wavelength วัดได้ด้วยความยาวคลื่นเดียว ปัจจุบันนิยมใช้แบบ variable UV-VIS detector สามารถเปลี่ยนความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 200-800 nm เครื่องวัดแบบใหม่จะเป็นแบบ photodiode array โดยที่ระบบทางเดินแสงจะเป็นแบบย้อนแสง (reverse optic) สามารถ scan UV-VIS spectrum ได้รวดเร็วมากและในการวิเคราะห์สามารถเปรียบเทียบสเปกตรัมที่เป็นสามมิติได้ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์

2. Refractive index detector (RI detector): เป็นเครื่องตรวจวัดความแตกต่างของดัชนีหักเหของตัวถูกทำลายหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์กับเฟสเคลื่อนที่เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจวัดต่ำกว่า UV-VIS detector มาก แต่เป็นเครื่องที่ใช้

ตรวจวัดสารที่ถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้เกือบทุกชนิด ปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะต้องมีมากพอสมควร จึงไม่เหมาะกับการตรวจวัดสารที่มีปริมาณน้อย เครื่องตรวจวัดจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก

3. Fluorescence detector: เป็นเครื่องตรวจวัดที่มีความไวสูงกว่าเครื่อง UV และ RI มากถึง 1,000 เท่า ใช้กับสารประกอบที่เรืองแสงได้เอง หรือทำให้มันเรืองแสงโดยวิธี derivatization ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์กับสารที่เรืองแสงได้ก่อนการวัดด้วย fluorescence detector

Recorder: เป็นส่วนที่เก็บผลการวิเคราะห์ ปัจจุบันนิยมใช้เป็นแบบควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถเก็บข้อมูลไว้และเรียกข้อมูลกลับคืนมาวิเคราะห์ได้อีก ซึ่งทำให้การวิเคราะห์สะดวก ประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพมาก รวมถึงการนำเสนอผลวิเคราะห์ที่แน่นอนด้วย

Gas chromatography (GC)

Gas chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นแก๊สได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส เฟสคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว ถ้าเป็นของแข็งเรียกเทคนิคนี้ว่า gas

solid chromatography ถ้าเป็นของเหลว เรียกว่า gas liquid chromatography

Gas solid chromatography: เฟสคงที่ที่บรรจุไว้ในคอลัมน์ มักจะเป็น activated charcoal, silica gel หรือ alumina ใช้แยกสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่มีโมเลกุลเล็ก ๆ เท่านั้น

Gas liquid chromatography: เฟสคงที่เป็นของเหลวที่ฉาบของแข็งอยู่ เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นแก๊สได้ที่อุณหภูมิที่กำหนด

Gas chromatography ประกอบไปด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญดังต่อไปนี้

1. Carrier gas / flow controller
2. Injector / vaporizer
3. Column / column oven
4. Detector / detector heater
5. Recorder / data system

Carrier gas: ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ แก๊สที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- เป็นแก๊สเฉื่อย ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างและเฟสคงที่
- เป็นแก๊สที่มีการแพร่ต่ำและมีมวลโมเลกุลต่ำ
- มีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีความชื้น และไม่มีออกซิเจน
- หาซื้อได้ง่าย ราคาไม่แพง
- เป็นแก๊สที่เหมาะสมสำหรับใช้กับ

เครื่องตรวจวัดหรือ detector ได้

แก๊สที่ นิยมใช้ กันมากที่สุด คือ ไนโตรเจน ฮีเลียม หรือไฮโดรเจน ที่ถึงแก๊สจะต่อเครื่องวัดความดันไว้ด้วย

flow controller: เป็นเครื่องควบคุมความดันและอัตราการไหลของแก๊ส เนื่องจากอัตราการไหลผ่านของแก๊สจะมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพการแยกสาร เครื่องนี้จะมีปุ่มปรับให้ carrier gas เข้าสู่เครื่อง GC ในอัตราความเร็วหรือมีความดันแก๊สตามที่ต้องการ โดยส่วนมากจะมีค่าประมาณ 40 psi

Injector: หรือเป็นส่วนที่เรียกว่า injection port หรือ vaporizer เป็นส่วนที่ทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์ในรูปสารละลายถูกเปลี่ยนไปเป็นไอทันที โดยที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน โดยทั่วไป อุณหภูมิของ injection port จะอยู่ระหว่าง 250-300°C ถ้าสารที่ต้องการวิเคราะห์สลายตัวที่อุณหภูมิสูงควรหลีกเลี่ยงการใช้ GC

ถ้าตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เป็นแก๊ส จะฉีดเข้าเครื่องโดยใช้เข็มพิเศษที่เรียกว่า gas tight syringe หรือใช้ gas sampling valve จะช่วยป้องกันไม่ให้มีการสูญเสียสารที่ต้องการวิเคราะห์ ไปในระหว่างการฉีดสารเข้าเครื่อง

ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวส่วนใหญ่จะใช้ microsyringe ฉีดผ่าน silicone

septum ของ injection port เพื่อถูกเปลี่ยนไปเป็นไอก่อนเข้าสู่คอลัมน์

ถ้าตัวอย่างเป็นของแข็ง ควรนำไปละลายก่อนด้วยตัวทำละลายก่อนฉีดเข้าเครื่อง หรือใช้เทคนิค pyrolysis เปลี่ยนสารที่เป็นของแข็งให้กลายเป็นไอก่อนโดยอาศัย pyrolysis equipment เสาสารที่อุณหภูมิสูงมากถึง 1000°C

เทคนิคการนำสารจาก injection port ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ของ GC มีหลายวิธี ได้แก่

1. Head space injection
2. Split injection
3. Splitless injection
4. On-column injection

การเลือกใช้แต่ละเทคนิคขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค head space กับการวิเคราะห์สารระเหย และใช้เทคนิค splitless กับการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย

Column: เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดของ GC เช่นเดียวกับ HPLC ทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Packed column
2. Capillary column

Packed column: ภายในบรรจุไว้ด้วยของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นสารค้ำจุนให้เฟสคงที่ที่เป็นของเหลวมาอยู่ อาจจะทำ

ด้วยแก้ว อลูมิเนียม หรือทองแดง ยาวประมาณ 1-3 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-9 มม คอลัมน์ชนิดนี้สามารถเตรียมใช้ได้เลย

Capillary column: เป็นคอลัมน์แบบท่อเปิด เป็นหลอดมีรูกลวงเล็กๆ ภายในเคลือบไว้ด้วยเฟสคงที่ที่เป็นของเหลวทำด้วยแก้วหรือ quartz (fused silica) รัศมีภายในประมาณ 0.3-0.6 มม ยาวประมาณ 25-100 เมตร คอลัมน์ที่มีความยาวมากทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสูง

การเลือกเฟสคงที่หรือ liquid phase สำหรับวิเคราะห์สารด้วย GC ผู้วิเคราะห์ จะต้องทราบก่อนว่าสารที่ต้องการวิเคราะห์มีองค์ประกอบเป็นสารประเภทไหน โครงสร้างเป็นอย่างไร รวมทั้งจุดเดือดของสารว่าอยู่ในช่วงไหน โดยทั่วไปแล้ว liquid phase ควรจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับสารที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์ เป็นต้นว่ามี polarity ใกล้เคียงกันจะทำให้มีประสิทธิภาพการแยกดี ถ้า liquid phase เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ การแยกสารจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของจุดเดือดของสารในตัวอย่าง

คอลัมน์จะจัดวางอยู่ในตู้อบหรือ column oven ซึ่งควบคุมอุณหภูมิได้ หรือสามารถปรับอัตราการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิให้เพิ่มขึ้นอย่างเป็นขั้นตอนภายในระยะเวลาที่ต้องการได้ โดยเลือก

อุณหภูมิให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

Detector: เครื่องตรวจวัดที่ใช้ใน GC มีหลายชนิด ที่นิยมใช้กันมากมีอยู่ 4 ชนิดคือ

1. Thermal conductivity detector (TCD): เป็นเครื่องวัดที่อาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของสภาพนำความร้อนระหว่าง carrier gas และ สารที่ต้องการวิเคราะห์ที่เป็นแก๊ส เมื่อเคลื่อนผ่าน detector สัญญาณความแตกต่างนี้จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสัญญาณไฟฟ้าผ่านเข้าสู่เครื่องวัดหรือ recorder

Carrier gas ที่มีสภาพนำความร้อนสูงจะเพิ่มประสิทธิภาพการแยก ได้แก่แก๊สไฮโดรเจน แต่เนื่องจากเป็นแก๊สที่อันตรายทำให้เกิดการระเบิดได้จึงไม่นิยมใช้ นิยมใช้แก๊สฮีเลียมแทน

TCD เหมาะสำหรับการแยกสารประกอบประเภท non-oxidize เช่น น้ำ CO_2 CS_2 และ CCl_4 เป็นต้น

2. Flame ionization detector (FID): เป็นเครื่องวัดที่นิยมใช้กันมาก มีความไวสูง อาศัยคุณสมบัติของสารเมื่อถูกเผาจะแตกตัวเป็นสารที่มีประจุ อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะวิ่งเข้าสู่อิเล็กโทรดที่อยู่ตรงกลางเปลวไฟ ทำให้ได้สัญญาณไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเปลวไฟที่ใช้ได้จากการจุดระหว่าง

แก๊สไฮโดรเจนและอากาศ FID เหมาะสำหรับการแยกสารอินทรีย์เกือบทุกชนิด

3. Nitrogen phosphorus detector (NPD): เป็นเครื่องวัดที่มีความไวมากต่อสารที่มี ไนโตรเจน หรือ ฟอสฟอรัส เป็นองค์ประกอบ อาศัยคุณสมบัติการแตกตัวของสารประกอบไนโตรเจนและฟอสฟอรัสโดยเกลือของโลหะอัลคาไล ได้แก่เกลือของ potassium หรือเกลือของ rubidium เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีไนโตรเจนหรือฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบเช่น สารเสพติด และสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต

4. Electron capture detector (ECD): อาศัยคุณสมบัติของเครื่องวัดที่ประกอบด้วยสารกัมมันตภาพรังสีที่สลายตัวให้รังสีเบต้า ซึ่งได้แก่ Ni^{63} หรือ H^3 เมื่อ carrier gas ผ่านรังสีเบต้าจะแตกตัวได้อิเล็กตรอน โมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะจับอิเล็กตรอนไว้ทำให้วัดกระแสไฟฟ้าได้น้อยลง เป็นเครื่องวัดที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงมาก เหมาะสำหรับการแยกสารที่มี halogen เป็นองค์ประกอบ เช่น สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีน และสารกำจัดวัชพืชบางชนิด เช่นเดียวกับคอลัมน์ของ GC และการฉีดสารเข้าเครื่อง GC Detector จะต้องมีส่วน detector heater ด้วย เพื่อควบคุม

อุณหภูมิของเครื่องวัดไม่ให้สารที่แยกได้
เปลี่ยนสภาพไปก่อนที่จะถูกปล่อยออกไป

Recorder: เป็นส่วนบันทึกผลที่
ปัจจุบันได้พัฒนาขึ้นมากเช่นเดียวกับส่วน
บันทึกผลที่ใช้กับเครื่อง HPLC การใช้
คอมพิวเตอร์โปรแกรมสำหรับ GC อาจใช้
ร่วมกับโปรแกรมบันทึกผลจากเครื่อง
HPLC ได้ ผลที่ออกมาจะเป็น chroma-
togram ของสารต่างๆ สามารถเปรียบเทียบ
ชนิดและปริมาณของสารได้ โดยใช้สาร
มาตรฐานที่ทราบแน่นอนว่าเป็นสารอะไร
เป็นตัวเปรียบเทียบและคำนวณหาปริมาณ

GC เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิ
ภาพในการแยกสารสูงมาก ถ้าเรารู้จักเลือก
ใช้ คอลัมน์ และเครื่องวัดที่ถูกต้องและ
เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์นั้นๆ
ในทำนองเดียวกับการใช้เครื่อง HPLC ซึ่ง
เป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์อย่างยิ่ง โดยเฉพาะการวิเคราะห์สารพิษที่ปนเปื้อนใน
สิ่งแวดล้อม ทั้งที่อยู่ในอากาศ น้ำหรือ
อาหาร และ/หรือในของเสียต่างๆ รวมทั้ง
สารพิษที่เล็ดลอดเข้าสู่ร่างกายจะโดยตั้งใจ
หรือไม่ ตั้งใจก็ ตามจนเกิดเป็นพิษขึ้น
สามารถวิเคราะห์ถึงชนิดและปริมาณของ
สารพิษนั้นในร่างกายได้โดยการเปรียบ

เทียบกับสารมาตรฐาน แม้ว่าสารนั้นจะมี
ปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม

เอกสารอ้างอิง

1. Moffat AC, Jackson JV, Moss MS
and Widdop B. Clarke's isolation and
identification of drugs. 2nd edition
The Pharmaceutical Press London
1986.
2. Borman SA. HPTLC: Taking off.
Anal Chem, 1982;54(7):790A-4A.
3. แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม.
Principles and techniques of
instrumental analysis. ห้างหุ้นส่วน
จำกัดชวนพิมพ์ กรุงเทพฯ 2534.
4. สุนันท์ รังษิกาญจน์ส่อง. High
performance liquid chromatography.
คู่มือการวิเคราะห์ ศูนย์เครื่องมือวิจัย
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลง
กรณ์มหาวิทยาลัย 2534.
5. สุนีย์ พนิชวรสิทธิ์. Gas chromato-
graphy. คู่มือการวิเคราะห์ ศูนย์เครื่อง
มือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2534.