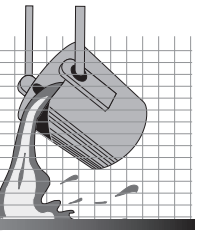
อารีย์ คชฤทธิ์
ปัทมา นพรัตน์

เทคนิคโครมาโทกราฟฟี ของเหลวประสิทธิภาพสูง



Ultra Performance Liquid Chromatography, (UPLC)

Ultra performance liquid chromatography (UPLC) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสารที่พัฒนาต่อมาจากเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดยการออกแบบเครื่องมือให้สามารถทำงานได้ที่ความดันสูงและใช้คอลัมน์ (column) ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก ทำให้ประสิทธิภาพของการแยก (resolution, R_s) ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์มีฐานพีคกว้าง ทำให้การแยกของสารที่มีค่ารีเทนชั่นไทม์ (retention time, t_r) ใกล้กันมากๆ แยกได้ไม่ดีเท่าที่ควร ความไว (sensitivity) ต่ำ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างนาน จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค UPLC เพื่อเพิ่มสมรรถนะในการแยกและวิเคราะห์สารให้ดีขึ้น ความไว และประสิทธิภาพในการแยกสูงขึ้น รวมทั้งลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการลดข้อจำกัดของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายๆ ประเภท

ทฤษฎีการแยกทางโครมาโทกราฟฟี

จากทฤษฎีพื้นฐานของการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟี เกิดจากการที่สารเกิด differential sorption ระหว่างเฟสนิ่ง และเฟสเคลื่อนที่ ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการแยกประกอบด้วย ประสิทธิภาพของคอลัมน์ ความจำเพาะของเฟสนิ่ง ขนาดอนุภาคของเฟสนิ่ง และองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ อธิบายได้จากความสัมพันธ์ของความสูงของเพลท (plate high,H) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ ตามสมการ (1) ความสูงของเพลท จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความยาวของคอลัมน์ (L) และสัมพันธ์ผกผันกับจำนวนเพลทตามทฤษฎี (number of theoretical plate ,N) คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูงจะมีค่าความสูงของเพลทต่ำ

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{.....(1)}$$

จำนวนเพลทตามทฤษฎี ขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ และขนาดของอนุภาค (dp) ที่บรรจุในคอลัมน์ดังแสดงในสมการ (2)

$$N\alpha = \frac{L}{dp} \qquad \text{.....(2)}$$

จากสมการ (1) และ (2) จะเห็นว่า การลดขนาดอนุภาคของเฟสนิ่ง ที่บรรจุในคอลัมน์ให้มีขนาดเล็กลง ทำให้ จำนวนเพลทตามทฤษฎีเพิ่มขึ้น มีผลให้ค่า ความสูงของเพลทลดลง ดังนั้นประสิทธิภาพของคอลัมน์จึงสูงขึ้น

เทคนิค UPLC ได้พัฒนาคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้มีขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ มีขนาดเล็กกว่า 2 ไมโครเมตร และได้ออกแบบเครื่องมือให้สามารถวิเคราะห์ได้ที่ความดันสูงถึง 15,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในการวิเคราะห์โดยใช้เฟสนิ่งที่มีขนาดอนุภาคที่เล็กนี้ สามารถใช้คอลัมน์ที่สั้นลงได้โดยไม่ทำให้ประสิทธิภาพของการแยกลดลง ซึ่งการใช้คอลัมน์ที่สั้นลงนี้ทำให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ และปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ลดลงด้วย

ความไวของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟี อธิบายได้จากความสัมพันธ์ของจำนวนเพลทตามทฤษฎีกับความกว้างของฐานพีค (w) ดังแสดงในสมการที่ 3 จะเห็นว่าเมื่อจำนวนเพลทตามทฤษฎี สูงขึ้น พีคที่ได้จากการวิเคราะห์มีความกว้างของฐานพีคแคบลง ความสูงของพีคเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความไวของการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นด้วย

$$N\alpha = \frac{1}{w^2} \quad \text{.....(3)}$$

การเพิ่มขึ้นของ ค่าการแยก สามารถอธิบายด้วยความสัมพันธ์ ดังแสดงในสมการที่ (4) ค่าการแยกขึ้นอยู่กับเทอมที่สำคัญ 3 เทอมคือ (i)-(iii) ซึ่งเป็นอิสระต่อกัน

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{K}{K+1}\right) \quad \text{.....(4)}$$

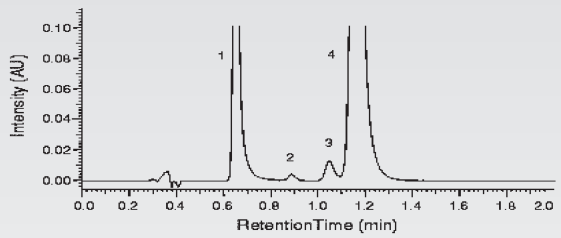
(i) (ii) (iii)

(i) เป็นเทอมที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ซึ่งพารามิเตอร์ที่ใช้ในการวัดคือค่าจำนวนเพลทตามทฤษฎีโดยจะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อขนาดอนุภาคของเฟสนิ่งเล็กลง มีผลทำให้ประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์สูงขึ้น

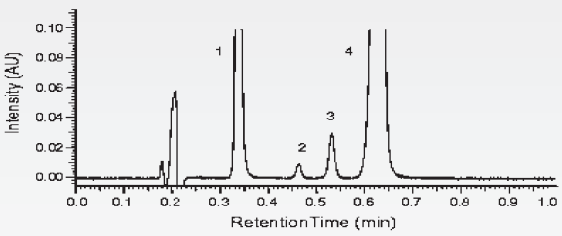
(ii) แสดงด้วยค่า α ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ โดยค่าการแยกจะเพิ่มขึ้นเมื่อ α มีค่าสูงขึ้น

(iii) แสดงด้วยค่า k ที่ เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงตามค่าความแรงของตัวทำละลาย (solvent strength)

เปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้จากเทคนิค HPLC และ UPLC



ภาพที่ 1 วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC



ภาพที่ 2 วิเคราะห์โดยเทคนิค UPLC

ภาพที่ 1 และ 2 เป็นโครมาโทแกรมผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารกลุ่ม Rapidocaine ซึ่งประกอบด้วย 1. methylparabene ; 2. 2, 6 dimethylanilene ; 3. propylparaben ; 4. lidocaine hydrochloride โดยใช้ เทคนิค HPLC และ UPLC ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงสภาวะการแยกสารกลุ่ม Rapidocaine โดยเทคนิค HPLC และ UPLC

พารามิเตอร์	เทคนิค HPLC	เทคนิค UPLC
คอลัมน์	XTerra RP_{18} 50 x 4.6 mm, 3.5 μm	Acquity shield BEH RP_{18} 50 x 2.1 mm ,1.7μm
เฟสเคลื่อนที่	phosphate buffer pH 7 : ACN (50 : 50)	phosphate buffer pH 7.2 : ACN (50 :50)
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	1430 μL/min	610 μL/min
อุณหภูมิคอลัมน์	30°C	25°C
เครื่องตรวจวัดชนิดยูวี-วิสิเบิลดีเทกเตอร์	230 nm	230 nm
ปริมาตรตัวอย่าง	7 μL	1.4 μL

เมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และ UPLC จะเห็นว่าลักษณะของพีคที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC ซึ่งมีขนาดอนุภาคที่บรรจุในเฟสนิ่งเล็กกว่า ประสิทธิภาพการแยกดีขึ้น พีคที่ได้มีฐานที่แคบลงและพีคสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าความไวของการวิเคราะห์ที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (method detection limit, MDL) ด้วยเทคนิคนี้ต่ำลง

จากผลการวิเคราะห์พบว่าเทคนิค UPLC ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีค่าการแยกดีกว่า ความไวสูงกว่าและใช้เวลาน้อยกว่า เมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ดังนั้นในอุตสาหกรรมหลายประเภทได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งมีสารหลายชนิดในกลุ่มเดียวกัน ทำให้สามารถแยกได้ดีขึ้น เช่น อุตสาหกรรมยา การวิเคราะห์ยารักษาโรคกลุ่ม Beta Blocker ซึ่งประกอบด้วย Oxprenolol, Metoprolol, Acebutolol, Atenolol, Propranolol, Pindolol, และ Alprenolol จะแยก Propranolol และ Alprenolol ออกจากกันได้ไม่ดีด้วยเทคนิค HPLC แต่จะแยกได้ดีเมื่อใช้เทคนิค UPLC และความไวในการวิเคราะห์สูงกว่าถึง 3 เท่า นอกจากนี้ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณ สารในกลุ่ม Flavonoids

ซึ่งเป็นสารที่ให้สีในพืช จำนวน 15 ชนิดพร้อมกัน โดยใช้เวลาเพียง 12 นาที

สำหรับอุตสาหกรรมอาหารมีการพัฒนาเทคนิค UPLC มาใช้ในการวิเคราะห์สารหลายประเภท เช่น การวิเคราะห์สีสังเคราะห์ชนิด Sudan Red I-IV ในตัวอย่างไข่แดง ซึ่งเป็นสีห้ามใช้ในอาหาร นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิค UPLC/MS ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของยาฆ่าแมลงในผลไม้ ในทางนิติเวชนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารในกลุ่ม amphetamine ซึ่งเป็นสารเสพติดในตัวอย่างเลือดโดยสามารถแยกสารในกลุ่มนี้ได้ 9 ชนิด ในเวลาน้อยกว่า 3 นาที โดยมีค่าการแยกและความไวสูง ในทางสิ่งแวดล้อมได้ใช้ร่วมกับเทคนิคการเตรียมตัวอย่างด้วย Solid phase extraction ในการวิเคราะห์สารตกค้างบนผิวน้ำ[1]

เห็นได้ว่าเทคนิค UPLC เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำ ผสมรวมกันหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกัน ให้ค่าการแยก และความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ครั้งละหลายตัวอย่าง เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น และประหยัดตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ เพราะการปรับอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่จะต้องสอดคล้องกับพื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์ เมื่อคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สั้น และมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลง ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ ลดลงด้วย

ในสภาวะปัจจุบันที่มีการแข่งขันสูง ความเร็ว ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์และต้นทุนการผลิต จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องนำมาพิจารณาในการพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพ และขอบเขตของการทำงานวิเคราะห์ ดังนั้นเทคนิค UPLC จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับห้องปฏิบัติการ ที่จะนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้งาน ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการจะต้องวางแผนในการเลือกเทคนิคการวิเคราะห์ตั้งแต่เริ่มต้นเพื่อจะได้จัดหาเครื่องมือให้เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

Barbara Kasprzyk-Hordern, Richard M. Dinsdale and Alan J. Guwy The effect of suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple calasses of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry **Talenta,** August, 2007, vol. 74 p. 1299 - 1312.

Davy Guillarme, et al. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis : application to short columns packed with small particle. Part I : Isocratic separation, **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** , December, 2007, vol. 66, p. 475 - 482.

Davy Guillarme, et al. Recent Developments in Liquid Chromatography - Impact on Qualitative and Quantitative performance **J. of Chromatography A,** May, 2007, vol. 1149, p. 20 - 29.

Du Zhenxia, Sun Shuqi Determination of Sudan Red I-IV in Duck Egg Yolk Using Ultra Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry **Chin J Chromatography,** May, 2007, vol. 25, p. 705 - 71.

Luigino G., et al. A demonstration of the use of ultra-performance liquid chromatography- mass spectrometry [UPLC/MS] in the determination of amphetamine-type substances and Ketamine for forensic and toxicology analysis **J of chromatography B,** March, 2006, vol. 836 p. 111 - 115.

Stephen A. C., Pierre Tchelitcheff UPLC/MS for the identification of β - blockers **J. of pharmaceutics and Biopharmaceutics**, January, 2006, vol. 40, p. 571 - 580.

Swartz, Michael E. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) : introduction separation science redefined in supplement to LCGC [**Online**] May 2005. [cited 18 March 2008] Available from Internet : http:// www. Chromatographyonline.com.

X.J. Chen, et al. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid Chromatography **J. of pharmaceutics and Biopharmaceutics**, september, 2007, vol. 46, p. 226 - 235.

Yang, Ying , and Craig, C. Assay transfer from HPLC to UPLC for higher analysis throughput. separation science redefined [**Online**] May 2005 [cited 18 March 2008] Available from Internet : http://www. Chromatographyonline.com

Yolanda Pico, et al Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-Quadrupole time-of- fight mass spectrometry Imazlil as case study of Quantification **J of Chromatography A**, september, 2007, vol, 1176, p. 123 - 134.

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพมหานคร : ชวนพิมพ์, 2534. หน้า. 714 - 738.