

# แหล่งความไม่แน่นอนของการวัด ที่เกิดจากการทำงานของเครื่องมือ HPLC

อุภาพร สุขม่วง / อุบล งามเลิศ

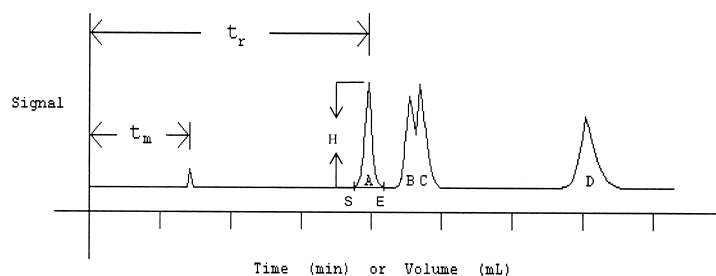
ผลการวัดที่มีความน่าเชื่อถือต้องประกอบด้วยค่าที่วัดได้ และค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังนั้นในการวิเคราะห์ทดสอบเชิงปริมาณ นอกจากผู้ทดสอบจะต้องมีความรู้ความเข้าใจหลักการวิเคราะห์ มีทักษะเป็นอย่างดีเพื่อให้ได้ผลการวัดที่ถูกต้องแล้ว ต้องศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อผลการวัด เพื่อให้สามารถหาแหล่งของความไม่แน่นอนของการวัดได้อย่างครบถ้วน

ความไม่แน่นอนของการวัดในเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ ความเที่ยงของการวัดแสดงด้วยค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความไม่แน่นอนของความเอนเอียงได้จากการวัดวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) และปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการวัด เช่น ความไม่แน่นอนจากกระบวนการเตรียมตัวอย่าง และความไม่แน่นอนจากการทำงานของเครื่อง HPLC ในบทความนี้จะกล่าวถึงเฉพาะแหล่งของความไม่แน่นอนของการวัดเนื่องจากการทำงานของเครื่อง HPLC เพื่อให้ผู้ทดสอบได้ตระหนักถึงความสำคัญของปัจจัยดังกล่าว โดยเฉพาะในขั้นตอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษาผลกระทบจากการทำงานของเครื่อง HPLC อย่างเป็นระบบโดยการทดสอบความคงทนของวิธี (ruggedness test)

หลักการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้เครื่องมือ HPLC คือ การแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte)

ชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันในตัวอย่าง ซึ่งเตรียมเป็นสารละลายให้มีความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ในช่วงที่เหมาะสม ฉีดสารละลายตัวอย่างผ่านช่องฉีดสาร (sample valve) ปริมาตรตามที่กำหนด เช่น 20  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{L}$  เป็นต้น สารตัวอย่างจะถูกนำพาด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ผ่านคอลัมน์ (column) ที่มีเฟสนิ่ง (stationary phase) ทำหน้าที่แยกสารที่วิเคราะห์ สารแต่ละชนิดผ่านเข้าดีเทคเตอร์ (detector) อย่างต่อเนื่องตามลำดับเพื่อการตรวจวัด แสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของเวลา (แกนนอน) และสัญญาณ (แกนตั้ง) เรียกว่าโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 1

ข้อมูลจากโครมาโทแกรมประกอบด้วย รีเทนชันไทม์ ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับยืนยันชนิดของสารโดยเปรียบเทียบรีเทนชันไทม์ของสารที่วิเคราะห์กับรีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐานที่วัดในสภาวะเดียวกัน พีกคือบริเวณที่มีสัญญาณสูงกว่าเส้นฐาน พื้นที่พีกคือผลรวมของสัญญาณตั้งแต่จุดเริ่มต้น (S) ถึงจุดสิ้นสุด (E) ความสูงพีก (H) คือ ระยะตั้งแต่วางพีกถึงยอดพีก พื้นที่พีกและความสูงพีกเป็นข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยนำพื้นที่พีกหรือความสูงพีกของสารที่วิเคราะห์ ไปหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายมาตรฐานของสารที่วิเคราะห์ 3-5 ระดับความเข้มข้น ดังนั้นหากพื้นที่พีก หรือความสูงพีกไม่คงที่ ทำให้เกิดความไม่แน่นอนของการวัด



รูปที่ 1 แสดงโครมาโทแกรม ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีสาร A, B, C และ D ด้วยเทคนิค HPLC  $t_r$  คือรีเทนชันไทม์ เป็นเวลาของสารที่วิเคราะห์เคลื่อนที่ในระบบจากจุดเริ่มต้นจนถึงดีเทคเตอร์  $t_m$  คือเวลาของสารที่ไม่ถูกจับโดยเฟสนิ่งเคลื่อนที่ในระบบจากจุดเริ่มต้นจนถึงดีเทคเตอร์

- ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความเที่ยงของรีเทนชันไทม์ ได้แก่

- ความไม่คงที่ของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เกิดจากการทำงานไม่คงที่ของเครื่องสูบล้าง (pump) ซึ่งเป็นคุณลักษณะของเครื่องมือ หรือการเสื่อมสภาพของเครื่องมือหลังจากใช้งานนานๆ

- อุณหภูมิของคอลัมน์ไม่คงที่ เกิดจากอุณหภูมิห้องทำงานไม่คงที่ แก้ไขโดยการใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิในส่วนของคอลัมน์

- องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เกิดจากการทำงานไม่คงที่ของเครื่องสูบล้างระบบ gradient

- ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อพื้นที่พีค และความสูงพีค ได้แก่ การตอบสนองของเครื่องตรวจวัด ( $S_c$ ) ปริมาณของสารที่ฉีดเข้าระบบ ( $w$ ) และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ( $F$ ) มีความสัมพันธ์ตามสมการ

$$A = \frac{S_c W}{F}$$

ดังนั้นหากปัจจัยต่างมีความไม่คงที่ มีผลทำให้พื้นที่พีค และความสูงของพีคมีความไม่คงที่ด้วย นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลกระทบโดยตรงแล้ว ยังมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบทางอ้อม ได้แก่ การเลื่อนไหลของเส้นฐาน (baseline drift) อุณหภูมิของคอลัมน์ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ลักษณะรูปร่างของพีค ความเที่ยงของเครื่องมือทั้งระบบ และสัญญาณรบกวน

- ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณของสารที่นำเข้าระบบ คือ ระบบฉีดสารที่ทำงานไม่คงที่ เกิดจากคุณลักษณะของเครื่องมือ และปริมาตรของสารละลายที่ฉีด ตัวทำละลายที่ระเหยง่าย มีผลต่อความไม่คงที่ของปริมาณสารที่นำเข้าระบบเช่นกัน ปัจจัยเหล่านี้ทำให้พื้นที่พีคไม่คงที่

- ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการวัดสัญญาณจากดีเทคเตอร์ ชนิด Refractive index detectors และ Fluorescence detectors ได้แก่ องค์ประกอบและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิของสารละลาย ส่วนปัจจัยที่มีผลกระทบต่อ UV- Visible detectors คือ แก๊สที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ จะทำให้ baseline เลื่อนไหล แก๊สออกซิเจนทำให้ background สูง และความยาวคลื่นไม่คงที่ทำให้พื้นที่พีคไม่คงที่ ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง จึงต้องมีการกำจัดแก๊สที่ละลายโดยวิธีที่เหมาะสม และตรวจสอบความเที่ยงของความยาวคลื่นของเครื่องมือ เพื่อจะได้นำไปศึกษาผลกระทบต่อผลการวัดต่อไป

ในการศึกษาผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ต่อความไม่แน่นอนของการวัด ผู้ทดสอบควรศึกษาข้อมูลจากข้อกำหนดคุณลักษณะของเครื่องมือ เช่น ความเที่ยงของเครื่องสูบล้าง ความเที่ยงของความยาวคลื่นของดีเทคเตอร์ ความคลาดเคลื่อนในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ ความแปรปรวนของอุณหภูมิห้องที่ทำการวิเคราะห์ เพื่อให้ทราบถึงความไม่คงที่ที่อาจเกิดขึ้นในสภาวะการทำงานปกติ แล้วจึงทดสอบสารตัวอย่างในสภาวะการทำงานปกติ และในสภาวะที่ตั้งใจเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ที่ต้องการศึกษาให้เท่ากับหรือมากกว่าความไม่คงที่ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น เปรียบเทียบกับผลการทดสอบจากสองสภาวะ หากความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญให้คำนวณค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น หากการทดสอบมีนัยสำคัญต้องควบคุม และป้องกันไม่ให้เกิดขึ้นขณะทำการทดสอบ

ตัวอย่างเช่น การทดสอบหาปริมาณ วิตามินเอ ในตัวอย่างนมสำหรับทารก ได้มีการศึกษาผลกระทบจากการทำงานของเครื่องมือ HPLC โดยการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสภาวะปกติที่ใช้ในการทดสอบตัวอย่าง และสภาวะที่ต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลง

พารามิเตอร์	สภาวะปกติ	สภาวะที่เปลี่ยนแปลง
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.8 mL/ min	1.2 mL/ min
ส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ (methanol/ H <sub>2</sub> O)	90/ 10	95/ 5
ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง	15 $\mu$ L	25 $\mu$ L
ความยาวคลื่นของยูวี-วิสิเบิลดีเทคเตอร์	320 nm	330 nm
อุณหภูมิของคอลัมน์	30°C	Oven off

จากการทดลองพบว่าพารามิเตอร์ดังกล่าวมีผลกระทบทำให้เกิดค่าความไม่แน่นอนของการวัด ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** แสดงค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ในการทดสอบ

พารามิเตอร์	ค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (mg/ kg)
อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	0.000383
ส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ (methanol/ H <sub>2</sub> O)	0.00256
ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง	0.00153
ความยาวคลื่นของยูวี-วิสิเบิลดีเทกเตอร์	0.0103
อุณหภูมิของคอลัมน์	0.00656

ปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบต่อผลการวัด เป็นแหล่งทำให้เกิดค่าความไม่แน่นอนของการวัดทั้งสิ้น ดังนั้นผู้ทดสอบต้องคำนึงถึงปัจจัยดังกล่าว และควบคุมปัจจัยเหล่านั้นให้มีผลกระทบน้อยที่สุด หรือไม่มีนัยสำคัญต่อผลการวัด ในกรณีที่เป็นปัจจัยที่เกิดจากการทำงานของเครื่องมือ ที่ขึ้นอยู่กับคุณลักษณะเฉพาะของเครื่องมือนั้น ได้แก่ อัตราการไหลและองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าระบบ ความยาวคลื่นของดีเทกเตอร์ และ อุณหภูมิคอลัมน์ ทั้งนี้ หากไม่มีข้อมูลค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากปัจจัยดังกล่าวข้างต้นในวิธีทดสอบที่ใช้ ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องทำการศึกษาทดลอง เพื่อประมาณค่าความไม่แน่นอนที่เกิดจากความไม่คงที่ของระบบการทำงานของเครื่องมือ

HPLC โดยการทดสอบความคงทนของวิธี ผู้ทดสอบจะเป็นผู้พิจารณาว่าความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นมีนัยสำคัญและจำเป็นต้องนำไปประมาณค่าความไม่แน่นอนรวมของการวัดทั้งหมดต่อไปหรือไม่ ทำให้มั่นใจได้ว่าได้ใช้ข้อมูลครบถ้วนในการรายงานผล

กรมวิทยาศาสตร์บริการ ได้จัดหลักสูตรฝึกอบรมเกี่ยวกับ เทคนิคการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของผลการวัด และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เพื่อส่งเสริมความรู้ แก่ นักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ เพื่อให้สามารถทดสอบและรายงานผลได้อย่างน่าเชื่อถือ ผู้สนใจสามารถหาข้อมูลเพิ่มเติมได้โดยการเข้ารับการศึกษาอบรมในหลักสูตรที่เกี่ยวข้องและ จากเอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

Barwick, V.J. Review of source of uncertainty in gas chromatography and high performance liquid chromatography. **VAM Project 3.2.2 Evaluating confidence in analytical measurement.** August 1998.

Barwick, V J. and Ellison, S.L R. Protocol for uncertainty evaluation from validation data. **VAM Project 3.2.1 Development and harmonisation of measurement.** January

D.A.Skoog, F.J. Holler and Nieman, T.A. **Principle of instrumental analysis.** Florida : Saunders College Publishing, 1998.