

คู่มือการใช้งานและการบำรุงรักษา
เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

PS.151-1/47



ผู้ดูแล นางนันทน์ภัส ธิติศักดิ์สกุล

หน่วยปฏิบัติการและบริการวิชาการ ด้านคุณภาพผลิตภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณ วิเคราะห์ (Quantitative analysis) ที่แยกสารผสมออกจากกันโดยใช้คุณสมบัติการเคลื่อนที่ของสาร ประกอบระหว่างสารตัวกลาง 2 เฟสคือ เฟสคงที่ (Stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาของสารประกอบนั้น โดยมี High Pressure Pump ทำหน้าที่ผลักดันตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าทางช่อง ฉีดสาร (Injector) ผ่านเข้าสู่ Column ที่บรรจุอนุภาคเฟสคงที่ สารที่มีอันตรกิริยาได้ดีกับเฟส เคลื่อนที่ก็จะสามารถเคลื่อนที่แยกออกจาก Column ได้เร็ว ส่วนสารที่มีอันตรกิริยาได้ดีกับเฟส คงที่จะถูกยึดติดใน Column และเคลื่อนที่ออกมาได้ช้า ทำให้เกิดการแยกของสารประกอบที่ เคลื่อนที่ออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน เมื่อผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (Detector) ซึ่งจะทำหน้าที่วัดออกมา ในรูปสัญญาณไฟฟ้าแปรตามเวลาและปริมาณของสาร แล้วส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ (Recorder) และแสดงผลออกมาในรูปโครมาโตแกรม (Chromatogram)

ส่วนประกอบหลักของ HPLC Agilent 1100

1. Solvent cabinet เป็นตู้วางภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ภาชนะที่ใช้ควร เป็นขวดแก้วที่ไม่ทำปฏิกิริยาทางเคมีใดๆ กับเฟสเคลื่อนที่ กรณีที่มีการใช้น้ำเป็น mobile phase ควร บรรจุในขวดแก้วสีชาเพื่อลดความเข้มแสงที่จะทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเจริญเติบโตได้
2. Vacuum degasser ทำหน้าที่ในการกำจัดฟองอากาศออกจาก solvent ที่จะเข้าสู่ระบบ HPLC
3. Quaternary pump ทำหน้าที่ดึง mobile phase เข้าสู่ระบบ HPLC ด้วยอัตราเร็วและ ปริมาตรที่กำหนดอย่างแม่นยำ
4. Autosampler ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ column
5. Column compartment หรือ stationary phase ทำหน้าที่ในการแยกสารที่สนใจ
6. Detector ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารทดสอบที่ได้จากกระบวนการแยก detector ที่ใช้ใน HPLC เช่น Refractive index, Conductivity detector, UV-Vis, Fluorescence, Electrochemical detector เป็นต้น สำหรับ HPLC Agilent 1100 เป็นชนิด UV-Vis ชนิด DAD
7. Recorder and data processor ทำหน้าที่ประมวลผลและบันทึกผลข้อมูลการวิเคราะห์ซึ่ง ถูกควบคุมโดย soft ware HP Chemstation



รูปที่ 1 องค์ประกอบของ HPLC Agilent 1100

ขั้นตอนการใช้ HPLC

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้เป็น Mobile Phase

สารละลายที่ใช้เป็น Mobile Phase ควรเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เข้ากับสารละลายตัวอย่างได้ดี มีความหนืดต่ำ และควรกรอง Mobile Phase ด้วย Membrane Filter ขนาด 0.45 ไมครอน อย่างน้อย 2 ครั้งเพื่อกำจัดอนุภาคแขวนลอยต่างๆ และ Degas ด้วย Ultra sonic bath เป็นเวลา 15-30 นาที เพื่อขับไล่ฟองอากาศ และ สำหรับ Mobile Phase ที่ใช้น้ำเป็นองค์ประกอบ คุณภาพน้ำที่ยอมรับให้มีการใช้งานคือน้ำที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยระบบกรอง Milli-Q (Ultra pure) ส่วนสาร Organic Solvent ควรเป็นชนิด HPLC Grade Solvent

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ตัวอย่างที่จะผ่านเข้าสู่ระบบ HPLC ควรมีวิธีการเตรียมที่เหมาะสมสามารถกำจัดตะกอนฝุ่นผงหรือมลทินต่างๆออกไป เช่น การกรอง การตกตะกอน การสกัด (Liquid-liquid, Solid-phase หรือ Supercritical Fluid extraction) หรือการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (Centrifuge) เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่สะอาดเพียงพอ

3. วิธีการใช้เครื่อง LC1100 และ ChemStation Software

3.1 ข้อควรระวังในการใช้ HPLC

- a) ขวดบรรจุ solvent จะต้องวางอยู่ใน solvent cabinet เสมอในขณะที่เปิดใช้งาน HPLC
- b) ก่อนการใช้งาน quaternary pump ต้องทำการ flush vacuum degasser ไม่ต่ำกว่า 2 เท่าของ volumes (30 ml) โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่ได้ใช้ pump เป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง หรือกรณีมีการเปลี่ยนชนิดของ mobile phase

c) ระบบปั๊ม (Pumping System) ความดันของปั๊มไม่ควรเกิน 400 Bar ในขณะที่ Run Chromatogram กรณีที่ความดันลดลงจนเกือบ 0 Bar แสดงว่าอาจมีการรั่วในระบบ หรือถ้าเกิน 400 Bar แสดงว่ามีสิ่งอุดตันในระบบ ให้ตรวจสอบและแก้ไข

d) Injector Unit ในการฉีดสารตัวอย่างไม่ควรฉีดปริมาณเกินขีดจำกัดของ Column ซึ่งจะ ทำให้ประสิทธิภาพ Column ลดลง

e) ก่อนการต่อ column เข้าสู่ระบบควรทำการล้าง line และ injector loop ด้วย mobile phase ซึ่งเป็นการแทนที่ solvent เก่าแล้วยังเป็นการชะล้างสารปนเปื้อนต่างๆ ออกไปด้วย การต่อ Column หรืออุปกรณ์ต่างๆจะต้องไม่ขัน Ferrule แน่นจนเกินไป ซึ่งจะทำให้ส่วน Connection ถูกทำลายได้

f) หลังการใช้งานควรทำการล้างระบบและคอลัมน์เพื่อขจัดสารที่ตกค้างใน Column ในกรณีที่ Mobile Phase ใช้สารละลาย Buffer ที่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ ควรใช้น้ำ 100 % ทำการล้าง ก่อนค่อยๆปรับอัตราส่วนเป็น Organic Solvent เช่น Methanol หรือ Acetonitrile

3.2 การเปิดเครื่องมือและซอฟต์แวร์

a) เปิดสวิทช์ Stabilizer จากนั้นเปิดสวิทช์เครื่อง Computer เป็นอันดับต่อมา และรอจน หน้าจอคอมพิวเตอร์ ปรากฏหน้าจอของ desk top

b) เปิดสวิทช์เครื่อง HPLC ที่อยู่ด้านล่างซ้ายของเครื่องทั้งห้า module คือ degasser, pump, autosample, column compartment และ detector รอจนเครื่องทำการ Initialize เสร็จสมบูรณ์ ไฟที่ ด้านล่างขวามือของทุก module จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเขียว

c) รอจนเครื่อง HPLC ปรากฏสัญญาณไฟด้านบนขวาจากสีเหลืองเป็นเขียวหรือไฟดับ และหน้าจอคอมพิวเตอร์ปรากฏข้อความ “Local Area connection is now connected” ที่มุมขวาล่าง

d) เปิด ChemStation software โดยดับเบิลคลิกที่ Icon Instrument online เพื่อเข้าสู่หน้าต่าง Method and Run Control

3.3 การ Priming ระบบ HPLC

a) บรรจุเฟสเคลื่อนที่ลงในขวดบรรจุ แล้ววางบน solvent cabinet

b) หมุนปุ่ม Purge valve ทวนเข็มนาฬิกา 1-2 รอบ

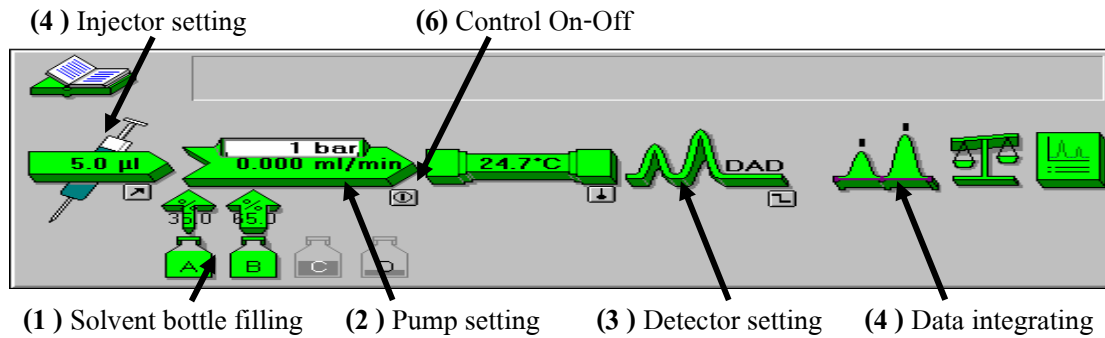
c) เปิดเครื่อง HPLC และซอฟต์แวร์ ChemStation คลิกที่ Icon Instrument online เพื่อเข้าสู่ หน้าต่าง Method and Run Control ที่รูปขวด (1) click แล้วเลือก Solvent bottle filling เพื่อเลือกขวด mobile ที่ใช้ จากนั้นเติมปริมาตรของตัวทำละลาย และเติมค่าขนาดบรรจุของขวดตัวละลาย

d) Pump setting ให้ Click เลือกที่รูปลูกศร หรือ menu Setup Pump เข้าสู่หน้าจอ เลือกขวด และ line ที่ต้องการใช้งาน (A, B, C, D) ป้อนค่าเป็น % 100 volume

e) ปรับ Flow rate เป็น 5 ml/min แล้ว Click ที่ ⊕ เพื่อเปิด pump

f) ทำการ Prime จนแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศในระบบ

f) ปิด Purge valve



3.4 การตั้งค่าควบคุมการทำงานของ pump

a) ที่หน้าต่าง Method and Run Control เลือกเมนู Instrument หรือคลิกรูป  เลือก


Setup Pump

b) ตั้งค่าพารามิเตอร์ให้เหมาะสมกับงานที่วิเคราะห์

- Flow : อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ มีช่วง 0.0-5.00 ml/min มีอัตราการเพิ่มทีละ 0.001 และมีขีดความดันสูงสุดที่ 400 bar (ค่า flow rate ที่ใช้ต้องไม่ทำให้เกินค่าขีดความดันสูงสุด)
- Stop time : เป็นการกำหนดเวลาที่ต้องการให้หยุดวิเคราะห์ต่อ 1 เซ็มที่ถัด มีค่าได้ตั้งแต่ 0.0 จนถึงไม่จำกัด
- Post time : เป็นการตั้งช่วงเวลาที่น้อยที่สุดระหว่าง stop time กับการวิเคราะห์ครั้งใหม่
- Pressure limits : max ตั้งค่าไว้ที่แรงดันสูงสุดที่ใบรับประกันคอลัมน์ระบุไว้ (400 bar) min คือ 0 bar
- Solvent : ใช้กำหนดส่วนประกอบของ solvent โดย % solvent แต่ละ channel A ถึง D สามารถกำหนดค่าได้ตั้งแต่ 0-100% หรือ on/off channel
- Time table : Insert ใช้สำหรับการ run แบบ gradient , Append ใช้เพิ่มแถว, Display ตั้งค่าระดับปริมาณเฟสเคลื่อนที่โดย คลิกเมาส์ปุ่มขวาที่รูปขวดใส่เฟสเคลื่อนที่ จากนั้นตั้งระดับปริมาตรที่ต้องการ หากระดับปริมาตรเฟสเคลื่อนที่ในโปรแกรมต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่ตั้งไว้ เครื่องจะหยุดการทำงานโดยอัตโนมัติ

c) Click ที่ \oplus เพื่อเปิด pump

3.5 การตั้งค่าควบคุมส่วนวัดสัญญาณ (detector) ชนิด DAD

a) ที่หน้าต่าง Method and Run Control เลือกเมนู Instrument หรือคลิกรูป  เพื่อเลือก Setup DAD Signal จะปรากฏหน้าจอให้เปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่างๆ


b) ตั้งค่าพารามิเตอร์ให้เหมาะสมกับงานที่วิเคราะห์

- ตั้งค่าความยาวคลื่นที่ต้องการ (..... nm) โดยสามารถตั้งค่าได้แบบ single wavelength หรือ multi-wave length ที่ตั้งค่าได้ห้าสัญญาณ (A, B, C, D, E) รวมถึงสัญญาณอ้างอิง เพื่อชดเชยค่า Baseline ที่อาจเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการวิเคราะห์แบบ gradient
- Store Spectrum : ใช้กำหนดจุดที่ต้องการบันทึก Spectrum (all or none)
- Range to กำหนดช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการบันทึกเป็นสเปกตรัม
- Step กำหนดระยะความยาวคลื่นที่ต้องการบันทึกเป็นสเปกตรัม
- Stop time กำหนดเวลาให้หยุดการวิเคราะห์
- Post time : กำหนดเวลาที่ดีเทคเตอร์เข้าสู่สภาวะเตรียมพร้อม ก่อนเริ่มต้นวิเคราะห์ครั้งต่อไป
- Time table สำหรับตั้ง โปรแกรมเวลาการวิเคราะห์
- ค่าอื่นๆ ไม่ต้องเปลี่ยนแปลง กด O.K.


c) ทำการเปิด lamp โดยคลิกที่รูปแล้วกด Yes หรือคลิกขวาที่รูป detector เลือก control เลือก Lamp UV on และ Visible on

ข้อแนะนำ : ควรเปิด lamp ก่อนใช้งานจริง 15 -30 นาที

3.6 การตั้งค่าควบคุมส่วนฉีดสารตัวอย่าง

- a) หน้าต่าง Method and Run Control เลือกเมนู Instrument หรือ Click  เลือก Setup Injector จะปรากฏหน้าจอให้เปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่างๆ
- Standard Injection : ใช้สำหรับการฉีดแบบตามลำดับอย่างง่าย
 - Injection with Needle Wash : เป็นการสั่งให้มีการล้างเข็มก่อนที่เข็มจะเคลื่อนกลับไป needle port โดยกำหนดตำแหน่งของ wash vial และ wash vial ไม่ต้องปิดฝา
 - Use Injector Program ใช้สำหรับการทำ Sample Pretreatment โดยใส่ค่า Stop time
- b) ส่วนอื่นไม่ต้องเปลี่ยนแปลง กด OK

3.7 การตั้งค่าควบคุมอุณหภูมิในส่วนติดตั้งคอลัมน์

- a) หน้าต่าง Method and Run Control เลือกเมนู Instrument หรือคลิกรูป  เลือก Setup Thermostat จะปรากฏหน้าจอให้เปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่างๆ แล้วกด OK
- Temperature : ตั้งค่าอุณหภูมิที่ต้องการ หากไม่ตั้งค่าให้เลือก Not controlled
 - Stop time : กำหนดเวลาที่ให้หยุดการวิเคราะห์
 - Post time : กำหนดเวลาที่ให้ดีเทคเตอร์เข้าสู่สภาวะเตรียมพร้อมก่อนเริ่มวิเคราะห์ครั้งต่อไป

- Time table : สำหรับตั้งโปรแกรมเวลา **ข้อแนะนำ :** ต้องปิดฝาส่วนควบคุมอุณหภูมิ
คอยล์นี้ขณะทำการวิเคราะห์

3.8 การสร้าง method เพื่อควบคุมระบบ HPLC

- ที่หน้าต่าง Method and Run Control ไปที่เมนู Method เลือก New Method
- ไปที่เมนู Method เลือก Edit Entire Method เข้าสู่หน้าจอ Edit method ให้คลิกเลือกทุกหัวข้อ
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Method Information ให้พิมพ์คอมเมนต์ที่ต้องการ
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Setup Pump ให้ตั้งค่าตัวแปรต่างๆเหมือนในข้อ 3.4
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Detector ให้ตั้งค่าตัวแปรต่างๆเหมือนในข้อ 3.5
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Signal Detail ไม่ต้องตั้งค่าใดๆ
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Edit Integration Events ไม่ต้องตั้งค่าใดๆ
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Specify Report ไม่ต้องตั้งค่าใดๆ
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Instrument Curve เลือกหัวข้อที่ต้องการให้ปรากฏบนหน้าจอ
 - กด O.K. จะปรากฏหน้าจอ Run Time Checklist สังเกตว่าควรมีการเลือกหัวข้อ Data Acquisition และ Standard Data Analysis กด O.K. จะปรากฏหน้าจอต่าง Method and Run Control ตามเดิม
- ไปที่เมนู Method เลือก save method as ใส่ชื่อ แล้วกด save
- การเรียก method เดิม ที่มีอยู่ขึ้นมาเพื่อใช้งาน ให้ไปที่หน้าต่าง Method and Run Control ไปที่เมนู Method เลือก Load Method เพื่อเรียกชื่อ method เดิมที่ต้องการ


3.9 การสั่ง Run chromatogram แบบ Sequence Run

- เข้าสู่ sequence menu เลือก sequence parameter ใส่ข้อมูลต่างๆ แล้วกด O.K.
 - Operator name : ใส่ชื่อผู้วิเคราะห์
 - Data file : วิธีตั้งชื่อไฟล์ เลือกได้ทั้งแบบ Prefix(ตั้งชื่อเอง)/counter (Software จะนับต่อเนื่อง)
 - Part of Methods to Run : เลือก According to runtime checklist
- ที่ sequence menu เลือก sequence table เพื่อจัดลำดับในการจัดลำดับการฉีดสาร
 - Sample info : ใช้บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่าง
 - Line : ใช้บอกลำดับในการฉีดสารตัวอย่าง
 - Location : เป็นเลขตำแหน่งที่ขวดสารวางอยู่
 - Sample name : ระบุชื่อสารตัวอย่าง
 - Method name : ชื่อ method ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- Inj/Vial : จำนวนครั้งที่จะฉีดสำหรับขวดนั้น
- Sample type : ชนิดของตัวอย่างที่ใช้
- c) กด O.K. และรอจนเครื่องขึ้นสีเขียวที่ status bar
- d) คลิกที่เมนู sequence เลือก save sequence as... ใส่ชื่อ sequence แล้วกด save
- e) Run sequence โดยกด icon รูป vial 3 ขวด และกด start

ข้อแนะนำ : ในกรณีที่ใช้ Reverse หลังจากจบ sequence แล้วล้างระบบด้วยน้ำ DI 30 นาที แล้ว ตามด้วย 70% Methanol ประมาณ 30 นาที

3.10 การวิเคราะห์ผลการทดลอง (Data Analysis)

- a) กดที่ drop down list  เลือกหน้าต่าง 2 Data Analysis
- b) คลิกที่เมนู file เลือก Load signal หรือ คลิกที่รูปภาพ 1 กราฟจะปรากฏหน้าจอ load signal
- c) เลือก data จาก folder และ subdirectory ที่เก็บข้อมูลไว้ เลือกไฟล์ที่ต้องการ กด O.K.
- d) การ overlay โครมาโทแกรม
 - ทำข้อ 8.1-8.3 ก่อน จากนั้นคลิกที่รูป กราฟ 2 กราฟ จะปรากฏหน้าจอ load signal
 - เลือก data จาก folder และ subdirectory ที่เก็บข้อมูลไว้ เลือกไฟล์ที่ต้องการ overlay กด O.K.
 - หากต้องการเรียกไฟล์อื่นๆ ขึ้นมา overlay มากกว่านี้ ให้ทำซ้ำ ข้อ 8.4

3) การแก้ไขสเกลของโครมาโทแกรม

- ไปที่เมนู Graphic เลือก Signal Options เลือกตั้งค่าตัวแปรในหัวข้อ Ranges

6. การ Integrate โครมาโทแกรม

- ทำ manual integration โดย เลือกหน้าต่าง Data Analysis เปิดไฟล์โครมาโทแกรมที่ต้องการ เลือก Integrate จากปุ่มที่มีเครื่องหมาย อินทิกรัล

หมายเหตุ : การอินทิเกรตแบบ Manual จะไม่ถูกเซฟไว้ หากเลือกโครมาโทแกรมขึ้นมาใหม่อีกครั้ง ค่าพื้นที่พีคจะยังไม่ถูกอินทิเกรต

3.11 การรายงานผล (Report)

1. เลือกหน้าต่าง Data Analysis
2. โหลด signal โครมาโทแกรมขึ้นมา โดยเลือกใน Data จาก folder และ subdirectory ที่เก็บข้อมูลไว้ เลือกไฟล์ที่ต้องการ กด O.K.
3. คลิกที่ Report เลือก Specify Report สามารถเลือก Report Style แบบต่างๆ กด O.K.
4. คลิกที่ icon เครื่องพิมพ์ หรือ ไปที่เมนู Report เลือก Print Report

3.12 การปิดเครื่อง HPLC 1100

- a) ทำการ off ที่ instrument แต่ละส่วน โดย
 - คลิกที่รูปปลุกศร เลือก control off pump
 - คลิกที่รูปดีเทคเตอร์ เลือก Control จากนั้น set lamp off
 - คลิกที่รูปคอลัมน์ เลือก Control จากนั้น column thermostat off
- b) เข้าเมนู file กด Exit เพื่อออกจากโปรแกรม
- c) ปิดเครื่อง HPLC ทีละ module
- d) Shut down คอมพิวเตอร์ ปิด Printer
- e) ปิด Stabilizer

คู่มือการใช้งานและการบำรุงรักษา
เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

PS.151-1/47

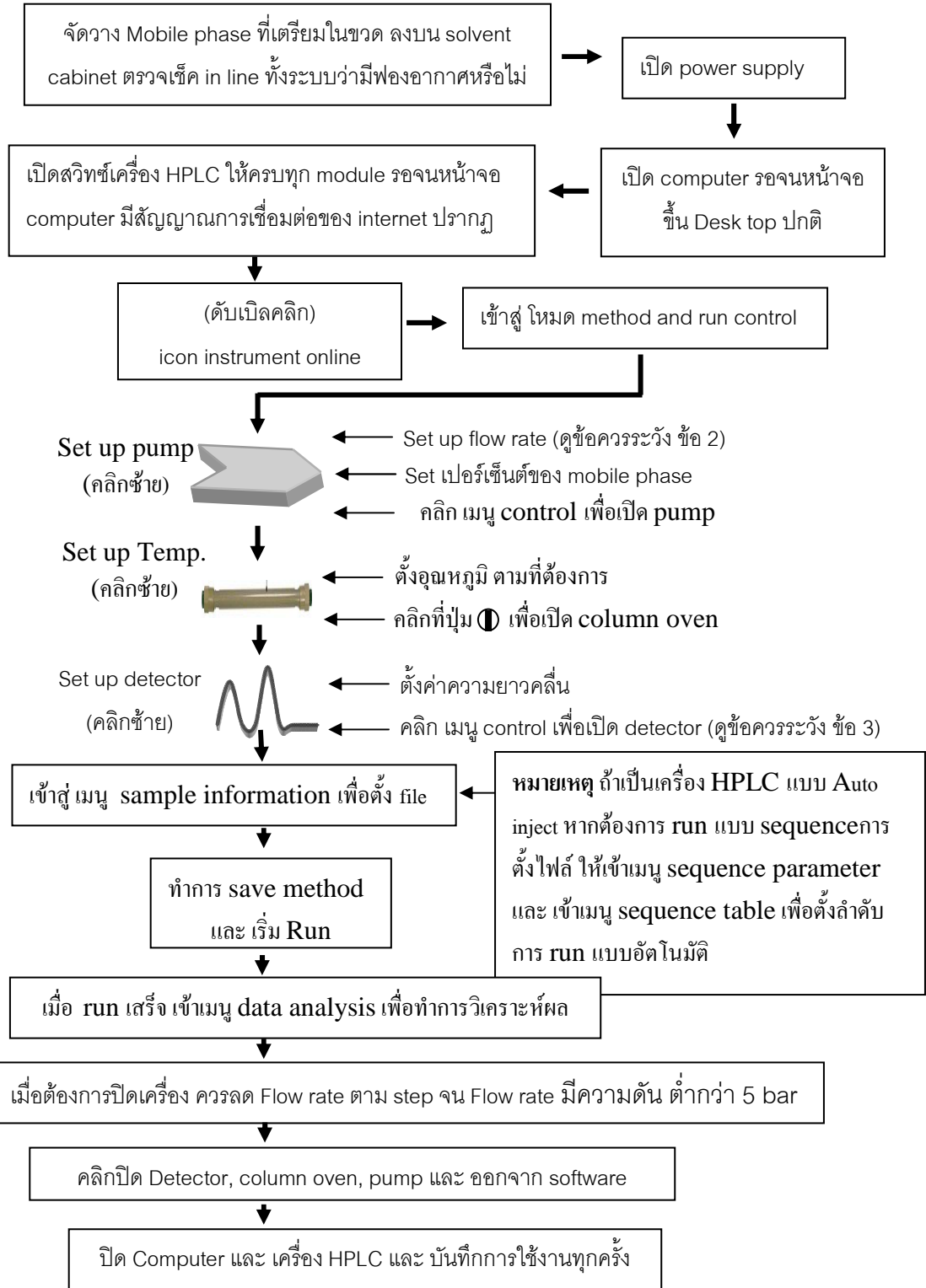


ผู้ดูแล นางนันทน์ภัส ธิติศักดิ์สกุล

หน่วยปฏิบัติการและบริการวิชาการ ด้านคุณภาพผลิตภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เครื่องมือ	HPLC PS.151-1/47
ผู้ดูแลเครื่องมือ	นางนันทน์ภัท ธิติศักดิ์สกุล

ขั้นตอนการใช้งานเบื้องต้น



ข้อควรระวังในการใช้งาน	<ol style="list-style-type: none">1. สำหรับผู้ที่ใช้งานครั้งแรก ควรได้รับการอบรม หรืออยู่ในความดูแลจากเจ้าหน้าที่ ที่ดูแลเครื่องมืออื่นๆ2. การเพิ่มหรือลด Flow rate ควรทำแบบเป็น step เช่น จาก 0.2 ml/min → 0.4 ml/min → 0.6 ml/min → 0.8 ml/min → 1.0 ml/min เพื่อยืดอายุการใช้งานของ Pump3. ควรเปิด Detector เพื่อทำการ warm lamp ก่อนการใช้งาน 15 นาที เมื่อเลิกใช้งาน ควรปิด Detector เพื่อยืดอายุการใช้งานของ UV lamp
-------------------------------	--