



วารสาร ไทยไกลวิทยพันธ์

ปีที่ 3 ฉบับเดือนกันยายน พ.ศ. 2549 (หน้า 1-23)

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ (on-line)



เทคนิคการคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์ (Hyphenated Techniques of the Pharmaceutical Analytical Instruments)

รศ.ดร.อรอุมา ภูประเสริฐ และผศ.ร.ต.อ.(ญ) มัลลย์ สติรพันธุ์

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

รหัส 1-000-SPU-000-0609-01

จำนวน 3.0 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง: 1 กันยายน พ.ศ. 2549

วันที่หมดอายุ: 1 กันยายน พ.ศ. 2551

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงเทคนิคการนำเครื่องมือวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์ตั้งแต่ 2 เครื่อง หรือ 2 ชนิดขึ้นไปมาคู่ต่อกัน โดยผ่านส่วนต่อประสานที่เหมาะสม
2. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงการนำเทคนิคการคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ

บทคัดย่อ

การคู่ต่อของเครื่องมือวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์ตั้งแต่ 2 เครื่องขึ้นไป อาจจะเป็นการคู่ต่อระหว่างเครื่องมือทางโครมาโทกราฟีด้วยกัน หรือเครื่องมือทางโครมาโทกราฟีกับเครื่องมือที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมี ซึ่งจะทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลสะดวกและรวดเร็ว บทความนี้นำเสนอเทคนิคคู่ต่อของเครื่องมือวิเคราะห์ชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน และการนำเทคนิคการคู่ต่อไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชศาสตร์

คำสำคัญ

การคู่ต่อ โครมาโทกราฟี สเปกโตรเมตรี การแยก การทำให้บริสุทธิ์ การอธิบายโครงสร้าง

บทนำ

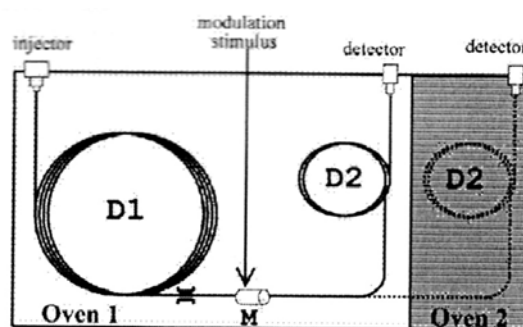
Hyphenated techniques เป็นการเชื่อมต่อ (coupling) ของเครื่องมือทางเภสัชวิเคราะห์ตั้งแต่ 2 เครื่อง หรือ 2 ชนิดขึ้นไป อาจจะเป็นเครื่องมือทางโครมาโทกราฟี (เช่น โครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส (GC) และโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)) เป็นต้น กับเครื่องมือทางโครมาโทกราฟีด้วยกัน เช่น GCXGC หรือ เครื่องมือทางโครมาโทกราฟีกับเครื่องมือที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมี (เช่น สเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวล (MS)) เป็นต้น เรียกว่า GC-MS การเชื่อมต่อของเครื่องมือในลักษณะนี้อาศัยส่วนต่อประสาน (interface) ที่เหมาะสมทำให้สารที่ออกจากเครื่องมือวิเคราะห์ชนิดที่หนึ่งสามารถผ่านเข้าสู่เครื่องมือวิเคราะห์ชนิดที่สอง เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมได้อย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นวิเคราะห์หาปริมาณของสาร การแยกสาร การเพิ่มความบริสุทธิ์ของสาร และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ (structure elucidation) ที่อยู่ในส่วนผสมต่างๆ เช่น ของเหลวทางชีวภาพ หรือสารสกัดจากพืช รวมทั้งการศึกษาทางอนุกรมวิธาน และเคมีอนุกรมวิธาน¹ ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณ การอธิบายโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบต่างๆ ในของผสมหรือสารสกัดที่ซับซ้อนเป็นไปอย่างง่ายดายและรวดเร็ว สามารถตรวจหาสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว หรืออธิบายโครงสร้างของสารใหม่ได้โดยไม่จำเป็นต้องแยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ก่อนด้วยขั้นตอนที่ซับซ้อนดังในอดีต

ในที่นี้จะกล่าวถึงเทคนิคการเชื่อมต่อที่พัฒนาขึ้นใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

1. การเชื่อมต่อระหว่าง GCxGC
2. การเชื่อมต่อระหว่าง GC-MS
3. การเชื่อมต่อระหว่าง GC-FTIR
4. การเชื่อมต่อระหว่าง LC-MS
5. การเชื่อมต่อระหว่าง MS-MS
6. การเชื่อมต่อระหว่าง CE-MS
7. การเชื่อมต่อระหว่าง LC-NMR
8. การเชื่อมต่อระหว่าง SPE-NMR
9. การเชื่อมต่อระหว่าง CE-NMR
10. การเชื่อมต่อระหว่าง FIA-NMR

โดยจะเน้นที่การเชื่อมต่อระหว่าง GCxGC GC-MS GC-FTIR LC-MS MS-MS CE-MS และ LC-NMR ซึ่งเป็นการเชื่อมต่อเครื่องมือที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

1. การคู่ต่อระหว่าง GC กับ GC (Gas Chromatography-Gas Chromatography, GCxGC)²⁻⁴



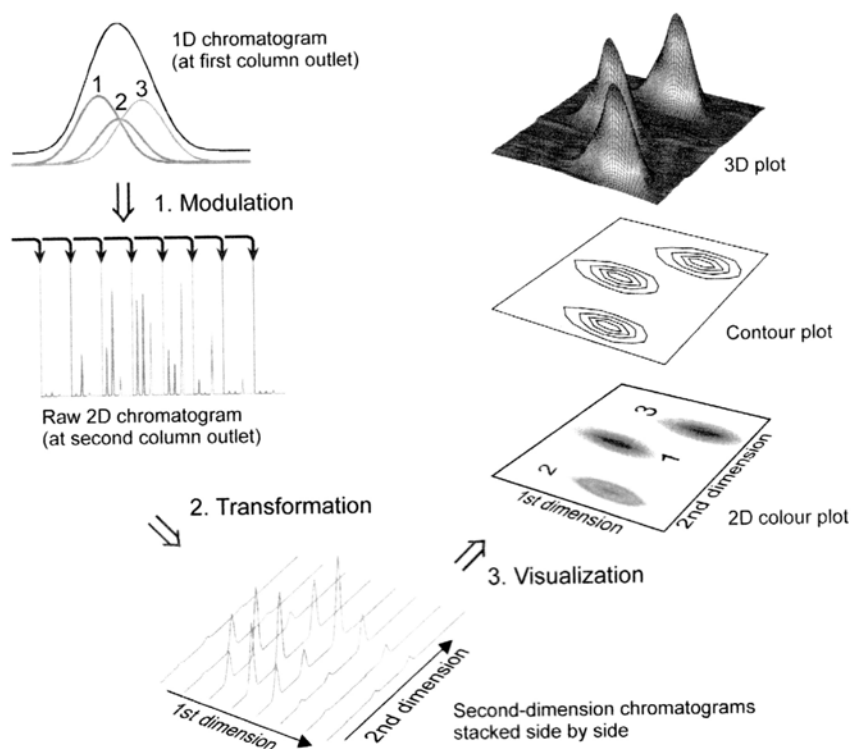
รูปที่ 1 การคู่ต่อระหว่าง GC กับ GC²

การคู่ต่อ GC เข้าด้วยกัน หรือที่เรียกว่า โครมาโทกราฟีชนิดแก๊สแบบสองมิติ (two-dimensional gas chromatography, GCxGC) เป็นการเชื่อมคอลัมน์มิติที่หนึ่งกับคอลัมน์มิติที่สองด้วยมอดูเลเตอร์โดยที่คอลัมน์ทั้งสองอยู่ในตู้อบเดียวกันหรือแยกตู้อบก็ได้² (รูปที่ 1) การคู่ต่อแบบนี้เริ่มมีการพัฒนาในทศวรรษ 1990 สำหรับการวิเคราะห์สารปริมาณน้อยในตัวอย่างที่มีความซับซ้อน เป็นการเพิ่มความสามารถในการแยกสารด้วยเครื่อง GC และให้ข้อมูลเกี่ยวกับการคงอยู่ (retention data) ของทุกองค์ประกอบในตัวอย่าง 2 ชุดซึ่งใช้สำหรับการพิสูจน์เอกลักษณ์ ทำให้สามารถจัดกลุ่มของสารตามโครงสร้างที่สัมพันธ์กัน ตามลำดับการถูกชะ (eluted) โครมาโทกราฟีชนิดแก๊สแบบสองมิติสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ การพิสูจน์เอกลักษณ์ทั้งด้วยสเปกตรัมชนิดมวลและดัชนีการคงอยู่ (retention index, RI) การวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของกลุ่มสารในตัวอย่างที่มีความซับซ้อน³

ในยุคแรกของการพัฒนาเทคนิคนี้เริ่มต้นที่การวิเคราะห์ทางด้านปิโตรเคมี และการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีของเปลือกโลก ตัวอย่างเหล่านี้จะมีสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกันผสมอยู่ด้วยกันเป็นจำนวนมาก เช่น กลุ่มอัลเคน (พาราฟิน) กลุ่มอัลเคนที่มีโครงสร้างวงแหวน (แนพทาลิน) และกลุ่มที่มีวงแหวนอะโรมาติก 1 วง 2 วง และ 3 วง ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิดปนกันอยู่ ในระยะต่อมาได้มีการประยุกต์เข้ากับการวิเคราะห์ควันบุหรี่ สารแต่งกลิ่นในอาหาร น้ำหอม และสารกลุ่มโพลีฮาโลจีเนตไบเฟนิล ส่วนการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม การคู่ต่อแบบนี้มีประโยชน์ในการวิเคราะห์เมแทบอลิต์ของยาในตัวอย่างชีวภาพ (biological samples) ที่ไม่สามารถแยกด้วยเครื่อง GC ปกติได้⁴

หลักการแปรผลโครมาโทแกรมที่ได้จาก GCxGC (รูปที่ 2) คือ นำส่วนสกัด (fraction) ที่แยกได้จากคอลัมน์แรกซึ่งยังมีความบริสุทธิ์ไม่เพียงพอ ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ที่สองเพื่อทำการแยกส่วนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น คอลัมน์แรกทำหน้าที่เป็นมิติที่หนึ่งมักเป็นคอลัมน์แบบแคปิลารีที่มีความยาว 15-30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 250-320 ไมโครเมตร ภูมิภาคคงที่ประเภทไม่

มีข้าว ซึ่งจะแยกสารประกอบตามจุดเดือด ต่อด้วยมอดูเลเตอร์ระหว่างคอลัมน์แรกและคอลัมน์ที่สอง ทำหน้าที่รวบรวมสารที่ถูกชะจากคอลัมน์แรกให้เป็นแถบแคบๆ แล้วฉีดเข้าสู่คอลัมน์ที่สอง คอลัมน์ที่สองจะใช้คอลัมน์ที่ยาวเพียง 1-2 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 50-100 ไมโครเมตร วัตถุประสงค์ที่ประเภทมีข้าว การแยกในมิติที่หนึ่งใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง ส่วนมิติที่สองใช้เวลาเพียงไม่กี่วินาที มอดูเลเตอร์จัดเป็นหัวใจสำคัญของโครมาโทกราฟีชนิดแก๊สแบบสองมิติ ปัจจุบันมีหลายชนิด ทั้งชนิดที่ใช้ความร้อนไล่ให้สารที่ถูกชะออกจากมอดูเลเตอร์อย่างรวดเร็ว ทำให้สารประกอบถูกบีบให้เป็นโซนแคบๆ หรือการใช้แบบดักจับเยือกแข็งให้สารที่ถูกชะรวบรวมเป็นแถบแคบๆ แล้วจึงใช้ความร้อนไล่ออกไป มอดูเลเตอร์แบบใหม่ที่สุดคือแบบหัวฉีดซึ่งมีการทำให้คอลัมน์เย็นที่จุดเยือกแข็ง แล้วปล่อยสารออกไปด้วยการเป่าแก๊สร้อน ดีเทคเตอร์ที่ใช้ต้องเป็นชนิดที่สามารถรับและแปรสัญญาณได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากสารที่ถูกแยกและชะออกจากคอลัมน์จะมีปริมาณค่อนข้างน้อยและผ่านออกไปอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ส่วนสกัดต่อมาก็จะมาถึงดีเทคเตอร์ในเวลาใกล้เคียงกัน ถ้าดีเทคเตอร์ตรวจจับช้าจะทำให้รับข้อมูลไม่ทันหรือได้ข้อมูลที่ไม่ครบถ้วน ปัจจุบันดีเทคเตอร์ที่นำมาใช้กับ GCxGC คือ flame ionization detector (FID) หรือ micro electron-capture detector (μ ECD) ส่วนการใช้ดีเทคเตอร์เป็นเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวลนิยมใช้เครื่องวิเคราะห์มวลเป็น time of flight เนื่องจากสามารถเก็บสเปกตรัมได้มากกว่า 50 สเปกตรัมต่อวินาที^{3,5-7}

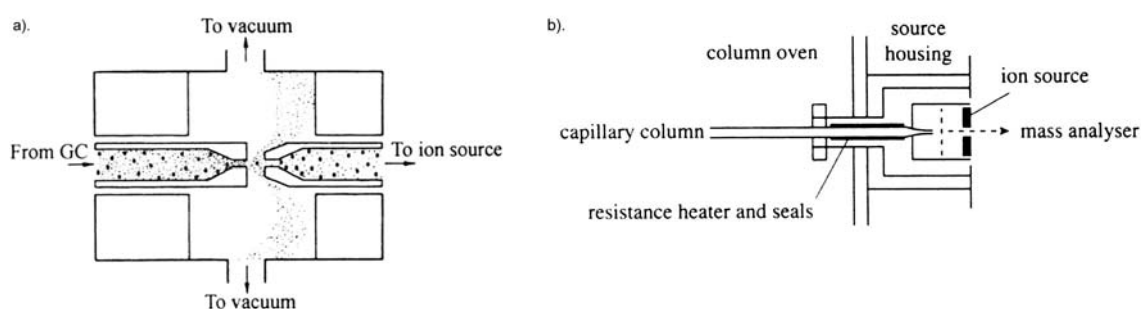


รูปที่ 2 การแปรผลโครมาโทแกรมที่ได้จาก GCxGC³

2. การเชื่อมต่อระหว่าง GC กับ MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)⁸⁻¹⁰

การต่อ GC เข้ากับ MS เป็นการนำข้อดีของเครื่องมือทั้งสองชนิดมาเสริมกัน โดยโครมาโทกราฟีชนิดแก๊สจะทำหน้าที่ในการแยกสาร ส่วนสเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวลจะทำหน้าที่ในการหาปริมาณและพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบในสารผสม เป็นการเชื่อมต่อที่เหมาะสมเนื่องจากสารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์และออกจาก GC จะอยู่ในสภาวะแก๊สซึ่งเหมาะกับการวิเคราะห์ด้วยสเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวล นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การต่อ head space หรือ head space – solid phase microextraction เพิ่มเข้ากับส่วนหัวฉีดของโครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส ทำให้สามารถประยุกต์ใช้กับสารประกอบที่ไม่ทนความร้อนและมีปริมาณน้อยๆ ได้ดียิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตาม GC-MS ยังคงไว้ซึ่งข้อด้อยของเครื่องมือทั้งสองอยู่ นั่นคือ สารที่นำมาวิเคราะห์จะต้องระเหยได้ จึงมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง การใช้ MS จะต้องมีการปรับและเทียบมาตรฐานเครื่องด้วย PFTBA (perfluoro-*t*-butylamine) ก่อนจึงจะใช้ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ข้อมูลที่ได้จะเกี่ยวข้องกับเวลา ความเข้มข้น และสเปกตรัมมวลขององค์ประกอบต่างๆ ทำให้ต้องใช้คอมพิวเตอร์ที่มีหน่วยความจำมากในการประมวลผลและเก็บข้อมูล



รูปที่ 3 การเชื่อมต่อระหว่าง GC กับ MS แบบ a.) jet separator b.) direct connection¹¹

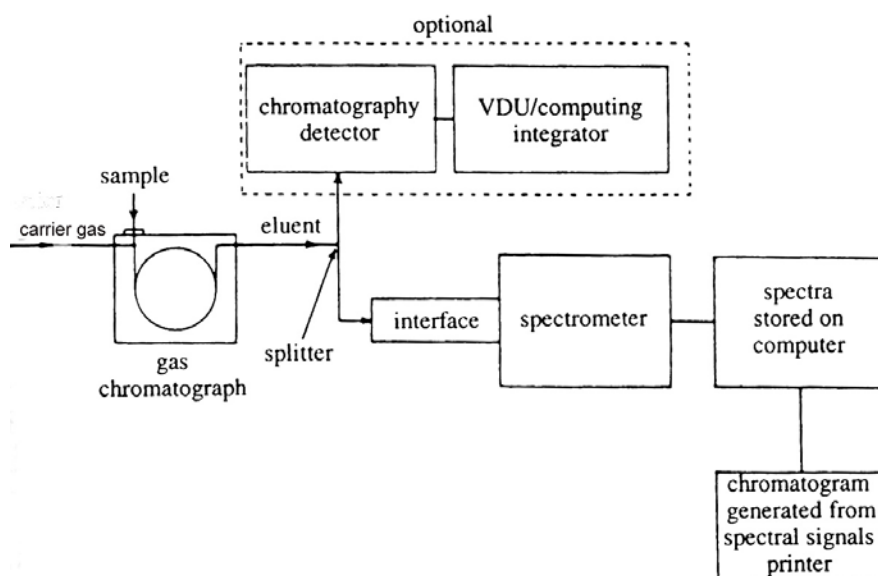
GC-MS เป็นเทคนิคแรกสุดสำหรับการคู่ต่อโครมาโทกราฟีกับสเปกโตรโกปีชนิดมวล ถ้าการวิเคราะห์ใช้คอลัมน์อัดแน่น (packed column) ซึ่งมีอัตราการไหลของแก๊สพา (carrier gas) ประมาณ 20 มิลลิเมตรต่อนาที จะใช้ส่วนต่อประสานที่เรียกว่า jet separator (รูปที่ 3a) เพื่อไม่ให้เครื่อง MS สูญเสียสภาวะสุญญากาศ โดยตัวอย่างจะถูกชะออกมาทางหัวฉีด (jet) และผ่านเข้าสู่ช่องแคบๆ โมเลกุลของสารตัวอย่างซึ่งหนักกว่าแก๊สพาจะมีโมเมนตัมเพิ่มขึ้น ทำให้โมเลกุลสารตัวอย่างร้อยละ 50 หรือมากกว่านั้นวิ่งตรงเข้าสู่แกนดักโมเลกุล (skimmer) ส่วนโมเลกุลแก๊สพาซึ่งเบากว่าจะหักเหและถูกสูบลออกไป ส่วนการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์แคปิลารีซึ่งมีอัตราการไหลของแก๊สพาเพียง 0.5-2 มิลลิเมตรต่อนาที สามารถต่อตรงเข้าสู่แหล่งกำเนิดไอออนของเครื่อง MS ได้โดยตรง (รูปที่ 3b)

สารประกอบที่นำมาวิเคราะห์ด้วย GC-MS มักมีมวลโมเลกุลไม่เกิน 700 amu. (เนื่องจากสารประกอบนั้นจะต้องระเหยได้) GC-MS สามารถให้ข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ได้หลายประเภท ประเภทแรก ได้แก่ โครมาโทแกรม ซึ่งอาจเป็นการพล็อตระหว่างปริมาณของมวลทั้งหมดที่ผ่านเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์กับเวลา เรียกว่า Total Ion Chromatogram (TIC) หรือ การนับเฉพาะไอออนที่มีมวลต่อประจุค่าหนึ่งๆ เท่านั้นกับเวลา เรียกว่า Selected Ion Monitoring (SIM) ขีดจำกัดการวิเคราะห์ของ TIC และ SIM อยู่ที่ 1-10 นาโนกรัม และ 1-10 พิโคกรัม ตามลำดับ เนื่องจากการพล็อตแบบ SIM มีสัญญาณรบกวนน้อยกว่า ข้อมูลประเภทที่สอง คือ สเปกตรัมมวลของแต่ละพีค บนโครมาโทแกรม สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ หารสูตรโมเลกุล สูตรโครงสร้าง และมวลโมเลกุลได้ ข้อมูลสุดท้ายคือ เวลาที่คงอยู่ (retention time) สามารถนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์ประกอบสเปกตรัมมวลได้

แหล่งกำเนิดไอออนสำหรับ GC-MS ที่นิยมใช้กันมี 2 แบบ คือ Electron Impact (EI) ซึ่งให้สารตัวอย่างชนกับอิเล็กตรอน ทำให้โมเลกุลไอออนของสารตัวอย่างมีพลังงานการสั่นสะเทือนและการหมุนหลงเหลืออยู่มาก โมเลกุลจะแตกออกเป็นไอออนย่อยจำนวนมาก สเปกตรัมมวลจึงมีรายละเอียดค่อนข้างมาก EI เป็นแหล่งกำเนิดไอออนที่ให้สเปกตรัมมวลที่สามารถทำการสืบค้นในฐานข้อมูลได้ สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และการพิสูจน์โครงสร้างของสาร แหล่งกำเนิดไอออนอีกแบบหนึ่งคือ Chemical Ionization (CI) ซึ่งให้สารตัวอย่างชนกับไอออนของแก๊สรีเอเจนต์ พลังงานในโมเลกุลเหลือไม่มาก ไม่ค่อยมีการแตกไอออนย่อย รายละเอียดบนสเปกตรัมมวลจึงน้อยกว่าแบบแรก แต่นิยมใช้สำหรับการหามวลโมเลกุล

เครื่องวิเคราะห์มวล (mass analyzer) สำหรับ GC-MS มีหลายชนิด เพื่อวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์ที่ต่างกัน โดยปกติเครื่องวิเคราะห์มวลมักเป็นแบบ quadrupole mass filter เมื่อใช้คู่กับแหล่งกำเนิดไอออนแบบ EI จะสามารถให้สเปกตรัมมวลที่สามารถสืบค้นจากฐานข้อมูลที่มีจำหน่ายโดยทั่วไป แต่ถ้าต้องการ tandem MS จะต้องต่อเครื่องวิเคราะห์มวลแบบ triple quadrupole ซึ่งค่อนข้างซับซ้อน และมีขนาดเครื่องใหญ่มาก เครื่องวิเคราะห์มวลอีกประเภทที่นิยมคือ ion trap ซึ่งมีความแตกต่างกันโดยดักจับไอออนทุกตัวไว้ แล้วจึงปล่อยไอออนตามลำดับของมวลต่อประจุเข้าสู่ดีเทคเตอร์ สเปกตรัมชนิดมวลที่ได้จะแตกต่างจาก quadrupole และเป็นสเปกตรัมที่ได้ภายใต้สภาวะของเครื่องที่ทำการวิเคราะห์นั้นๆ ไม่สามารถนำมาเทียบกันระหว่างเครื่องแต่ละเครื่องได้ อย่างไรก็ตามขีดจำกัดของการวิเคราะห์เมื่อใช้โครมาโทแกรมแบบ TIC จะใกล้เคียงกับแบบ SIM เนื่องจากมีการดักไอออนไว้ในเครื่องวิเคราะห์มวลนานกว่า นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาให้สามารถวิเคราะห์มวลได้มากกว่า 1000 amu. และสามารถทำให้เป็นแบบ tandem MS โดยไม่ต้องมีเครื่องวิเคราะห์มวลหลายเครื่องต่อกัน เครื่องวิเคราะห์มวลแบบอื่น ได้แก่ magnetic sector ซึ่งเป็นเครื่องวิเคราะห์มวลแบบแรกที่มีการคู่ต่อกับเครื่อง GC สามารถทำให้เป็นเครื่องที่มีความสามารถสูงในการแยกไอออนที่มีมวลต่างกันเพียงเล็กน้อย (high resolution) แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่ขนาดทะเทาะ ราคาแพง ใช้เวลาในการตอบสนองนาน และความไวของเครื่องต่ำ

ปัจจุบันเครื่อง GC นิยมต่อดีเทคเตอร์แบบ dual detector system (รูปที่ 4) โดยการต่อคอลัมน์เข้ากับดีเทคเตอร์ 2 ชนิด เครื่องหนึ่งจะเป็นดีเทคเตอร์ทั่วไปของ GC โดยนิยมต่อกับ Flame ionization detector (FID) ซึ่งเป็นดีเทคเตอร์ที่สามารถใช้กับสารประกอบทั่วไป ส่วนดีเทคเตอร์อีกเครื่องจะเป็นดีเทคเตอร์ที่สามารถให้ข้อมูลเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารประกอบ เช่น หมู่ฟังก์ชัน หรือหมู่แทนที่ เช่น MS detector หรือ FTIR detector การต่อดีเทคเตอร์ระบบนี้ทำได้หลายแบบ อาจทำได้โดยการแบ่งสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์เป็น 2 ส่วนเข้าสู่ดีเทคเตอร์แต่ละตัว ในคอลัมน์แบบแคปิลารีสามารถทำได้โดยใช้ตัวต่อรูปตัว T อาจต้องมีการใช้แก๊สช่วยเพื่อรักษาอัตราการไหลของตัวอย่างเข้าสู่ดีเทคเตอร์ อีกวิธีหนึ่งคือการใช้คอลัมน์ 2 ตัวที่มีวิวัฒนาการที่เหมือนกันทุกประการ ปลายแต่ละคอลัมน์ต่อกับดีเทคเตอร์แต่ละตัว แต่การจะเลือกคอลัมน์ที่มีวิวัฒนาการที่มีคุณสมบัติเหมือนกันทุกประการค่อนข้างยาก และต้องทำการตรวจสอบคุณสมบัติบ่อยๆ เพื่อให้ผลการแยกสารเหมือนกัน นอกจากนั้นยังอาจต่อดีเทคเตอร์แบบเรียงลำดับ โดยนำดีเทคเตอร์ 2 เครื่องมาต่อกัน แต่ข้อจำกัดของการต่อแบบนี้คือ ดีเทคเตอร์ตัวแรกจะต้องไม่ทำลายโครงสร้างของโมเลกุลสารตัวอย่าง เช่น ECD หรือ FTIR เป็นต้น⁹



รูปที่ 4 ไดอะแกรม ของ Dual detector system¹¹

GC-MS นิยมนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยได้ เช่น สารแต่งกลิ่น กรดไขมัน ตัวทำละลายที่หลงเหลืออยู่ สารหอมระเหยในพืช นอกจากนั้นยังนำมาประยุกต์ในทางนิติวิทยาศาสตร์ เช่น การวิเคราะห์สารเสพติด หรือการใช้สารโมโนในนักกีฬา

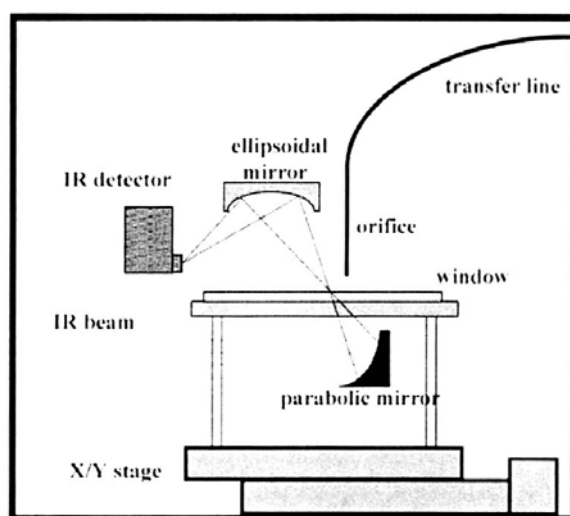
3. การคู่ต่อระหว่าง GC กับ FTIR (Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectrometer, GC-FTIR)¹⁰⁻¹²

FTIR ได้รับความนิยมค่อนข้างน้อยในการเป็นดีเทคเตอร์ของ GC ถึงแม้จะจัดว่าเป็นดี-เทคเตอร์ที่สามารถบ่งบอกทั้งในด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยพิจารณาจากสเปกตรัมและการวิเคราะห์ปริมาณจากการดูดกลืนแสงเป็นไปตามกฎของเบียร์ FTIR มีข้อเสียคือมีความไวต่ำ ดังนั้นจึงมักใช้เป็นตัวเสริมกับดีเทคเตอร์ชนิดอื่น เช่น ใช้เป็นตัวเสริมกับ GC-MS ในการแยกความแตกต่างของไอโซเมอร์ และการทำนายสูตรโครงสร้างของสารประกอบที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันมาก ในงานวิจัยด้านนิติวิทยาศาสตร์ สิ่งแวดล้อม และการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรม รวมทั้งการหาสูตรโครงสร้างขององค์ประกอบและสารเติมแต่งในอาหาร

การคู่ต่อระหว่าง FTIR กับ GC จะต้องพัฒนาในเรื่องความเร็วของการสแกนสเปกตรัมและปริมาณสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วย FTIR เนื่องจากบ่อยครั้งที่ต้องใช้เวลาในการบันทึกสเปกตรัมอินฟราเรดยาวนานกว่าความกว้างของพีคในโครมาโทแกรมของ GC ในขณะที่เดียวกันปริมาณสารที่สามารถตรวจหาได้ด้วย IR ก็เกินความจุของคอลัมน์ การคู่ต่อระหว่างเครื่อง GC กับ FTIR มี 2 ชนิด คือ แบบที่ 1 เมื่อต้องการตรวจหาสเปกตรัมอย่างรวดเร็วจะต่อโดยตรงกับเซลล์ลักษณะเป็นท่อที่ทำให้ร้อน และแบบที่ 2 เมื่อต้องการทำให้สารตัวอย่างเข้มข้นขึ้นจะใช้ตัวกลางจับสารที่ถูกชะจาก GC

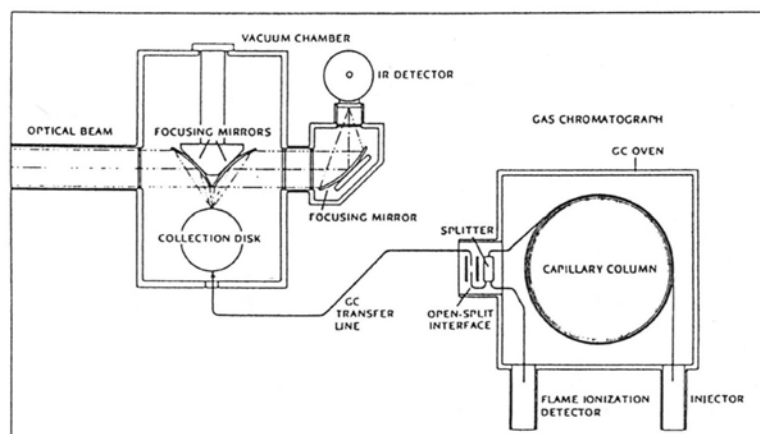
ส่วนต่อประสานแบบต่อตรงส่วนใหญ่จะสแกนสารผ่านคอลัมน์เข้าสู่เซลล์ที่มีลักษณะเป็นท่อที่ถูกทำให้ร้อน เรียกว่า ไลท์ไปป์ (light pipe) ซึ่งทำจากหลอดแก้วบางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.3-1 มิลลิเมตร ยาว 5-10 เซนติเมตร ขนาดท่อนี้เหมาะสมกับปริมาตรของพีคของสารที่ถูกชะจากแคปิลารีคอลัมน์ โดยที่ปลายทั้งสองด้านทำจากวัสดุที่ยอมให้แสงอินฟราเรดผ่านได้หมด ส่วนต้นของไลท์ไปป์จะต่อกับส่วนปลายของคอลัมน์ด้วยทรานสเฟอร์ไลน์ (transfer line) อุณหภูมิของตัวเซลล์และทรานสเฟอร์ไลน์ตั้งไว้ที่ 300 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการควบแน่น ด้านในของท่อเคลือบด้วยทอง สเปกตรัมที่ได้จากส่วนต่อประสานแบบนี้มีลักษณะเหมือนกับสเปกตรัมจากสารในสถานะแก๊ส ดังนั้นสามารถนำไปเปรียบเทียบกับสเปกตรัมอ้างอิงของสารในสถานะแก๊สได้

ส่วนต่อประสานแบบที่สอง ใช้เทคนิคของการดักจับสารตัวอย่าง ทำให้สารตัวอย่างหยุดนิ่งและเข้มข้นขึ้นในลักษณะของจุดเล็กๆ เมื่อโฟกัสลำแสงอินฟราเรดให้ผ่านจุดดังกล่าวจะทำให้มีความไวเพิ่มขึ้น ทำให้มีอัตราส่วนสัญญาณต่อสิ่งรบกวน (S/N) ดีขึ้น การดักจับตัวอย่างทำได้ 2 วิธี คือ ไดรอกทีดีโพสิชัน (direct deposition, DD) หรือ ไครโอแตรปป์ (cryotrapping) และ แมทริกซ์ไอโซเลชัน (matrix isolation, MI)



รูปที่ 5 การคู่ต่อระหว่าง GC-FTIR แบบ DD¹²

การดักจับแบบ DD (รูปที่ 5) จะทำให้ตัวอย่างที่ถูกชะจาก GC ตกผลึกบนแผ่นตัวกลางที่เคลื่อนที่ได้และยอมให้แสงอินฟราเรดผ่านหมดที่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลว (80K) ท่อทรานสเฟอร์ไลน์จากปลายคอลัมน์ของ GC จะต่อกับรูเปิด (orifice) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75-100 ไมโครเมตร ซึ่งอยู่เหนือพื้นผิวตัวกลางประมาณ 30 ไมโครเมตร เมื่อสารถูกชะออกมาจะตกผลึกบนตัวกลางทันทีโดยมีความกว้างประมาณ 100 ไมโครเมตร จากนั้นตัวกลางจึงค่อยๆเคลื่อนที่ให้ลำแสงอินฟราเรดผ่านจุดตัวอย่างนั้น การเคลื่อนที่ของแผ่นตัวกลางจะถูกควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ และสามารถรองรับสารที่ถูกชะจาก GC ได้นานถึง 60-100 ชั่วโมง เมื่อสแกนจุดตัวอย่างหนึ่งเรียบร้อยแล้วจะเปลี่ยนไปสแกนจุดตัวอย่างอื่นต่อไป การสแกนสามารถทำได้ครบเท่าที่ยังคงควบคุมสภาวะความเย็นเอาไว้ สเปกตรัมที่ได้จากการสแกนจะมีลักษณะเหมือนสเปกตรัมของตัวอย่างของแข็งทั่วไปที่สแกนร่วมกับโปแตสเซียมโบรไมด์ทำให้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์จากสเปกตรัมอ้างอิงในฐานข้อมูลที่มีขายในท้องตลาดได้



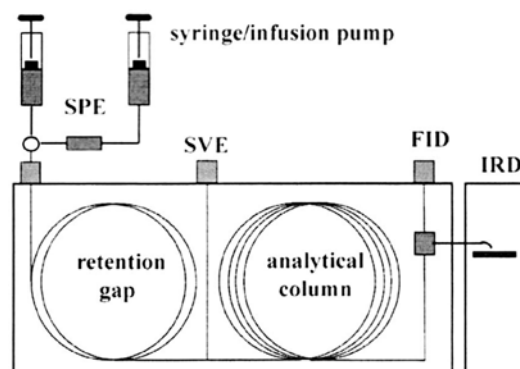
รูปที่ 6 การคู่ต่อระหว่าง GC-FTIR แบบ MI¹²

การดักจับแบบ MI (รูปที่ 6) เป็นการใช้ความเย็นดักจับสารตัวอย่างเช่นกัน แต่มีการเพิ่มแก๊สเฉื่อย (นิยมใช้อาร์กอน) 1-2 เปอร์เซ็นต์เข้าไปในแก๊สพา สารที่ถูกชะจาก GC จะถูกสเปย์บนแผ่นตัวกลางซึ่งเคลือบด้วยทองและคอปเปอร์หุ้ม ที่อุณหภูมิประมาณ 10 เคลวิน ตัวอย่างจะถูกกักอยู่ภายในกรงโครงสร้างของโมเลกุลอาร์กอน เส้นผ่านศูนย์กลางจุดตัวอย่างประมาณ 200-300 ไมโครเมตร แผ่นตัวกลางสามารถเก็บตัวอย่างได้หลายจุดสำหรับการฉีดตัวอย่างต่างๆเป็นเวลาหลายชั่วโมงตรงเท่าที่คงสภาวะความเย็นไว้เหมือนเทคนิค DD แต่สเปกตรัมที่ได้จากเทคนิคนี้อาจมีลักษณะต่างจากสเปกตรัมจากเทคนิคเก่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งโมเลกุลที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 200 จะมีพีคที่แคบกว่าปกติ ดังนั้นในการพิสูจน์เอกลักษณ์จะต้องทำสเปกตรัมอ้างอิงขึ้นมาเอง

เทคนิคทั้งแบบ DD และ MI จะต้องป้องกันการรบกวนจากคาร์บอนไดออกไซด์และไอน้ำในอากาศโดยการทำให้เป็นสภาวะสุญญากาศ เนื่องจากโมเลกุลคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำมีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด นอกจากนั้นโมเลกุลของสารตัวอย่างที่ถูกชะออกก็มีปริมาณค่อนข้างน้อย จึงถูกรบกวนจากโมเลกุลทั้งสองได้

การใช้ FTIR ร่วมกับดีเทคเตอร์ประเภทอื่นทำได้โดยแยกตัวอย่างจากคอลัมน์เข้าสู่ดีเทคเตอร์แต่ละตัว หรือสามารถใช้การคู่ต่อแบบไลต์ไปวัดการดูดกลืนแสง แล้วส่งต่อตัวอย่างไปยังดีเทคเตอร์อีกตัวหนึ่ง เนื่องจาก FTIR ไม่มีผลทำลายโครงสร้างของสารตัวอย่าง (non-destructive detector) หรืออาจแยกตั้งแต่หัวฉีดเข้าสู่คอลัมน์ 2 คอลัมน์และผ่านเข้าสู่ดีเทคเตอร์ 2 ตัว

ความไวในการวิเคราะห์สำหรับ GC/FTIR ขึ้นกับชนิดของส่วนต่อประสาน และการดูดกลืนแสงของสารประกอบ จากการเชื่อมต่อทั้ง 3 แบบ พบว่าเทคนิค DD จะมีความไวดีที่สุด ดังตัวอย่างการฉีดสารละลายคาเฟอีนเข้าเครื่อง GC ด้วยหัวฉีดแบบสปลิท พบว่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ของ light pipe MI และ DD ประมาณ 10 นาโนกรัม, 100 และ 35 พิโคกรัม ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการต่อประสานแบบไลต์ไปเป็นชนิดที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากวิเคราะห์ได้รวดเร็วและระบบทนทาน ส่วนเทคนิคการดักจับจะใช้เมื่อต้องการดีเทคเตอร์ที่มีความไวสูง แต่อุปกรณ์สำหรับการต่อประสานแบบนี้มีราคาแพง การเพิ่มประสิทธิภาพของการแยกและการตรวจพบสารอาจทำได้โดยการทำให้ตัวอย่างสะอาดขึ้นและมีความเข้มข้นมากขึ้นจากการใช้ headspace purge and trap solid-phase extraction (SPE) และ solid-phase microextraction (SPME) หรือเตรียมเป็นอนุพันธ์เพื่อเพิ่มการระเหยของสารตัวอย่างและเพิ่มความสามารถในการตรวจพบโดยการเติมหมู่อะตอมที่มีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดสูงๆ นอกจาก นั้นยังอาจเพิ่มปริมาตรของการฉีดด้วยหัวฉีดแบบ on-column และดักจับตัวอย่างผ่าน solid-phase extraction cartridge ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การฉีดสารตัวอย่างแบบ large-volume GC/FTIR ผ่านระบบ cold on-column โดยที่
SPE = solid-phase extraction cartridge; SVE= solvent vapour exit; FID = flame-ionization detector; IRD = infrared detector (DD)¹²

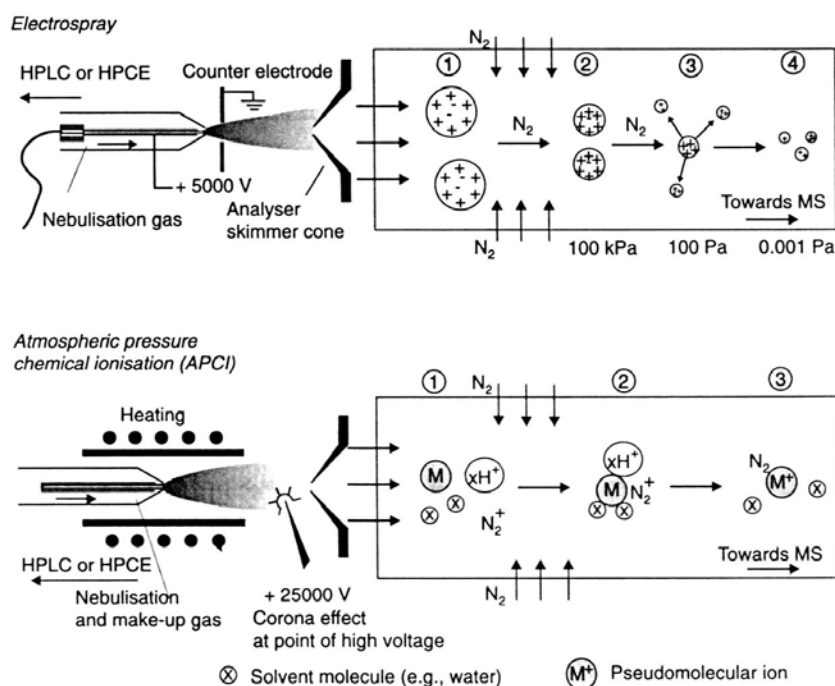
การพัฒนาดีเทคเตอร์ FTIR ในอนาคตจะมุ่งด้านการเพิ่มขีดความสามารถในการตรวจพบเป็นหลัก โดยการพัฒนาแหล่งกำเนิดแสง การปรับปรุงให้เป็นดีเทคเตอร์ที่มีความไวสูง รวมทั้งการพัฒนาเทคโนโลยีด้านคอมพิวเตอร์ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการประมวลผลข้อมูลให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

4. การคู่ต่อระหว่าง LC กับ MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)

เทคนิคที่สำคัญในการคู่ต่อระหว่างเครื่อง LC กับ MS คือการพัฒนาส่วนต่อประสานระหว่างเครื่องมือทั้ง 2 ชนิดที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายจากเครื่อง HPLC ให้เป็นไอออนในสถานะแก๊สที่เหมาะสมสำหรับผ่านเข้าสู่เครื่องวิเคราะห์มวล ซึ่งส่วนต่อประสานที่นิยมใช้ในเครื่อง LC-MS (รูปที่ 8) ในปัจจุบันอาศัยเทคนิค 2 ชนิด คือ electrospray (ES) และ atmospheric pressure chemical ionization (APCI)¹ ซึ่งจัดเป็นการเตรียมไอออนแบบนุ่มนวล (soft ionization) ไม่ทำให้สารแตกกระจาย (fragmentation) มากนัก

ในส่วนต่อประสานแบบ ES^{9,11,13-14} สารที่ต้องการวิเคราะห์ถูกชะออกมาจากเครื่อง LC ด้วยอัตราการไหลของตัวทำละลายที่ 1-20 ไมโครลิตรต่อนาที ผ่านปลายเข็มที่ทำให้เป็นละอองภายใต้ความดันบรรยากาศปกติ ผ่านความต่างศักย์ขนาดสูง (3-5 กิโลโวลต์) และมีแคโทดรีดิวซ์อยู่ห่างประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร สนามไฟฟ้าจะทำให้เกิดการสะสมประจุบวกอย่างมากที่บริเวณผิวของละอองตัวอย่าง จากนั้นละอองตัวอย่างที่มีประจุบวกจะถูกทำให้ร้อนหรือชนกับแก๊สแห้ง (ไนโตรเจน) ภายในบริเวณที่ทำให้เป็นสุญญากาศ ทำให้ตัวทำละลายระเหยออกไป ขณะเดียวกันประจุบวกที่อยู่กันอย่างหนาแน่นในละอองตัวอย่างนั้น จะมีแรงผลักรันทำให้แตกออกเป็นละอองย่อยลงไปอีก สารตัวอย่างจะถึงโปรตอนหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตัวออกมาจากตัวทำละลาย ทำให้เกิดไอออนบวกของตัวอย่างในสถานะแก๊ส

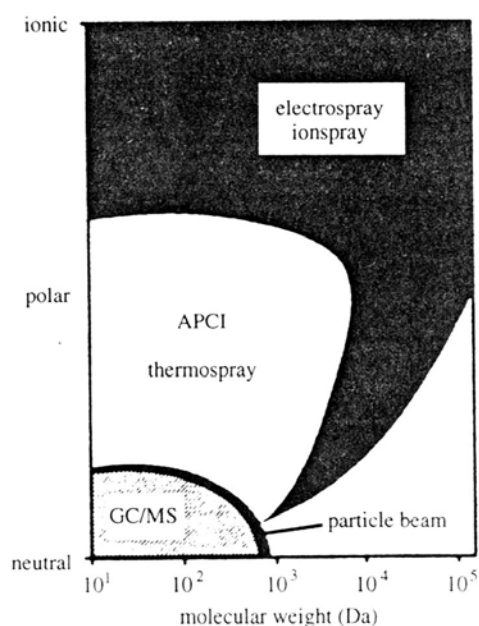
ถ้าตัวอย่างสามารถรับโปรตอนได้มากกว่า 1 ตัว ก็ทำให้มวลนั้นมีประจุมากกว่าหนึ่ง (ประมาณ 1000 amu. ต่อหนึ่งประจุ) เช่นโมเลกุลโปรตีนที่มีมวล 10000 amu. และมีประจุ +10 จะเกิดพีกที่ตำแหน่ง $m/z = 1000$ (เมื่อ m คือมวล และ z คือประจุ) บนสเปกตรัมชนิดมวล^{9,13} อาจเพิ่มประสิทธิภาพการเกิดไอออนโดยการเติมอิเล็กโทรไลต์ในตัวทำละลาย เช่น ไอออนแอมโมเนียม ไอออนโซเดียม ไอออนโปแตสเซียม หรือโปรตอน ไอออนที่ได้จึงมักอยู่ในรูปของ protonated molecule ($[M+nH]^+$) deprotonated molecule ($[M-H]^-$) หรือเป็น adduct เช่น $[M+Na]^+$ ที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลของสารได้ แต่ไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีได้ เนื่องจากไอออนไม่เกิดการแตกกระจาย



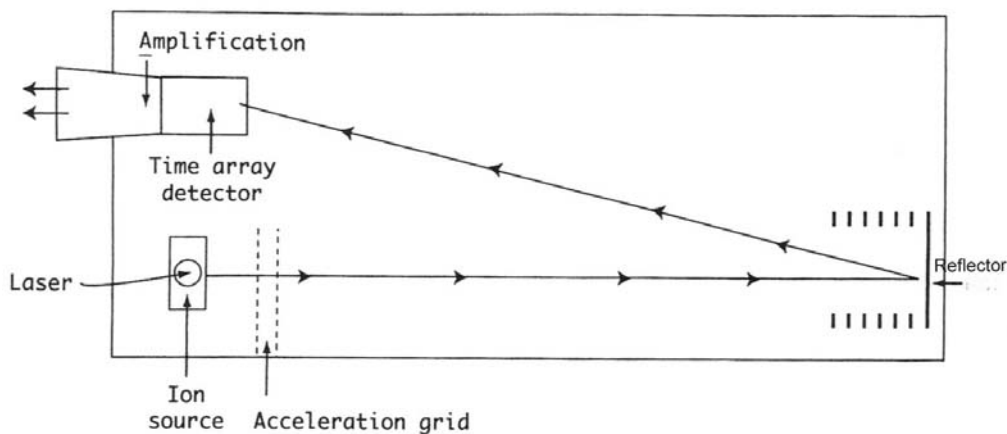
รูปที่ 8 ส่วนต่อประสานของ LC-MS¹³

ในส่วนต่อประสานแบบ APCI^{11,13-14} ตัวทำละลายจะถูกพ่นให้เป็นละอองโดยอาศัยแก๊สไนโตรเจน (nebulizing gas) แล้วให้ความร้อนในหลอดควอทซ์ (ประมาณ 120 องศาเซลเซียส) เข้าไประเหยตัวทำละลาย ในขณะที่มีการปล่อยประจุแบบโคโรนาให้อิเล็กตรอนไปไอออนไนซ์ (ionize) โมเลกุลของตัวทำละลาย เพื่อไปชนกับโมเลกุลของสารตัวอย่างต่อไป เกิดเป็นไอออนโมเลกุลจากการถ่ายเทโปรตอน ภายใต้ความดันบรรยากาศ ไอออนตัวอย่างจะถูกส่งต่อเข้าเครื่องวิเคราะห์มวลต่อไปภายใต้สุญญากาศ ในขณะที่โมเลกุลตัวทำละลายจะถูกปั๊มออกไป ส่วนต่อประสานแบบนี้ใช้ได้กับวัสดุภาคเคลื่อนที่มีอัตราการไหลถึง 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร/นาที และสามารถใช้กับตัวอย่างที่มีปริมาณต่ำเพียง 50-100 พิโคกรัม¹¹ เหมาะสำหรับวิเคราะห์สารที่มีขั้วต่ำ หรือสามารถระเหยได้

ข้อดีของการใช้ส่วนต่อประสานซึ่งเป็นการเตรียมไอออนแบบนุ่มนวลทั้งสองชนิดนี้คือการเกิดไอออนที่มีหลายประจุ (ประจุ(z)อาจมากกว่า 30) ทำให้วิเคราะห์โมเลกุลที่อาจมีมวลมากกว่า 10^5 ดาลตันได้ รวมถึงโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ และพอลิเมอร์อื่นๆ เป็นต้น การเลือกใช้ส่วนต่อประสานที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับมวลและความมีขั้วของสารประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 9^{11,13}



รูปที่ 9 การประยุกต์ใช้ส่วนต่อประสานใน LC-MS¹¹

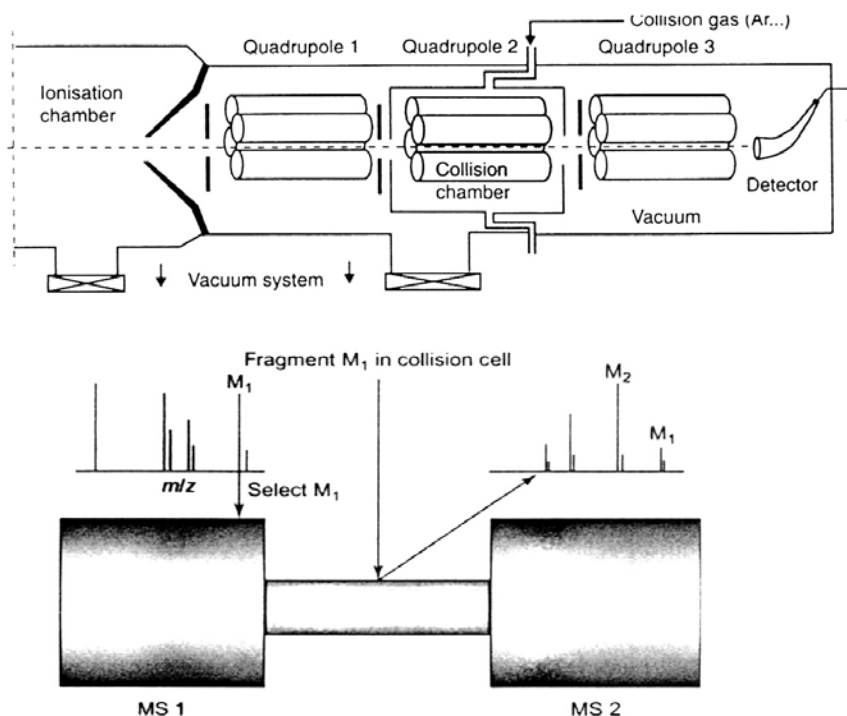


รูปที่ 10 Reflectron TOF⁸

เครื่องวิเคราะห์มวลแบบหนึ่งที่นิยมใช้กับการวิเคราะห์สารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูง เช่น โปรตีน เปปไทด์ และโพลีนิวคลีโอไทด์ คือ Time of flight (TOF) มีหลักการ คือ เมื่อไอออนผ่านการเร่งด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้า ไอออนที่มีมวลมากจะใช้เวลาในการเดินทางผ่านท่อตรงยาวประมาณ 1 เมตรที่ไม่มีสนามใดๆ ไปยังดีเทคเตอร์ เหมาะกับการใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดไอออนแบบ MALDI หรือ ESI (LC/MALDI หรือ ESI-TOF/MS) ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องมือที่เรียกว่า Reflectron TOF (รูปที่ 10) เพื่อลดการแปรปรวนของพลังงานจลน์ของไอออนที่เข้าสู่ TOF ลดความกว้างของพีกในสเปกตรัมมวล โดยการเพิ่มกระจกเพื่อสะท้อนไอออน ทำให้ท่อตรงมีความยาวเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้การวิเคราะห์มวลมีความถูกต้องยิ่งขึ้น^{9,14}

นอกจากนี้หากต้องการให้เกิดการแตกกระจายของไอออนที่สนใจอาจใช้เทคนิคที่เรียกว่า Collision-Induced Decomposition (CID) ซึ่งให้ไอออนกระทบกับแก๊สฮีเลียม แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นกับ LC-MS คือการที่มีไอออนหลายตัวผ่านเข้าสู่เครื่อง MS ทำให้เกิดการแตกเป็นไอออนย่อยของไอออนตั้งต้นหลายชนิด ดังนั้นหากต้องการให้เกิดการแตกกระจายเฉพาะไอออนที่สนใจ ต้องมีการแยกไอออนนั้นออกไปก่อนโดยการผ่าน quadrupole

5. การคู่ต่อระหว่าง MS กับ MS (Mass Spectrometer-Mass Spectrometer, Tandem MS หรือ MS/MS)⁸⁻⁹



รูปที่ 11 MS-MS แบบ Triple quadrupole^{9,13}

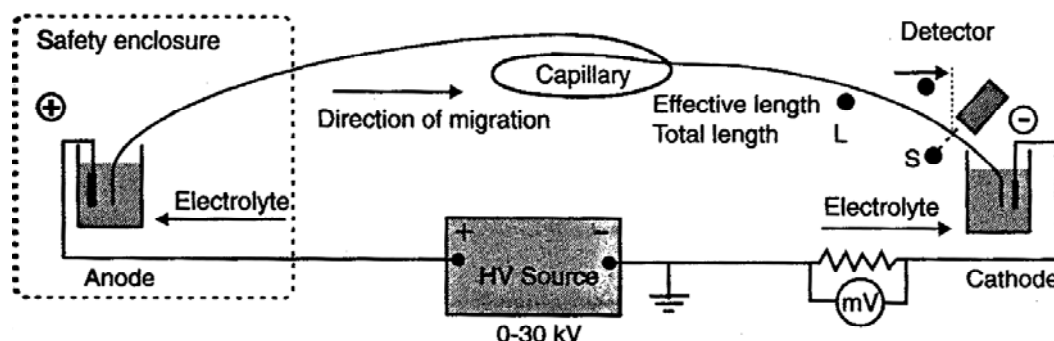
เป็นเทคนิคที่เริ่มใช้ในช่วงทศวรรษ 1970 โดยนำเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวลมาคู่ต่อกัน เครื่องแรกจะทำหน้าแยกไอออนโมเลกุล(molecular ion)ที่ต้องการออกมาจากของผสม หลังจากนั้นจะถูกส่งต่อเข้าสู่เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวลเครื่องที่สอง ทำให้เกิดการแตกไอออนย่อยและได้สเปกตรัมมวลออกมา Tandem MS สามารถสแกนที่ละมวลในกรณีตัวอย่างนั้นมีสารประกอบหลายชนิดปนกันอยู่ ชนิดแรกสุดที่มีการพัฒนาขึ้นเป็นแบบ triple quadrupole (รูปที่ 11) ปัจจุบันมีการใช้ ion trap เป็นเครื่องวิเคราะห์มวลซึ่งมีราคาต่ำกว่า และสามารถทำให้ไอออนโมเลกุลแตกย่อยอีกหลายครั้งเรียกว่าเป็น MSⁿ โดยไม่ต้องนำเครื่องมาต่อกันหลายๆเครื่อง การคู่ต่อแบบ Tandem MS นี้มีประสิทธิภาพดีมากเนื่องจากสามารถแยกสารออกจากกันได้โดยอาศัยมวล ซึ่งทำได้รวดเร็วกว่าการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี เนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาผ่านคอลัมน์ และไม่ต้องใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสิ่งรบกวนในการวิเคราะห์ Tandem MS สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของตัวอย่างที่มีความซับซ้อนทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ เช่น การวิเคราะห์หาตัวยาและเมแทบอไลต์ในตัวอย่างชีวภาพ

สำหรับเครื่องแบบ triple quadrupole ซึ่งเป็นต้นแบบของ Tandem MS เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ชนิดมวลเครื่องที่หนึ่งมักใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบ Chemical ionization หรือเทคนิคแบบนุ่มนวลอื่นๆ เพื่อให้ได้ไอออนโมเลกุล (M⁺) หรือ ไอออนโมเลกุลในรูป protonated molecule (M+H)⁺ ไอออนที่ถูกเลือกหรือไอออนทั้งหมดจะถูกส่งเข้า MS เครื่องที่สองซึ่งใช้เป็นที่ให้ไอออนชนกับแก๊สเฉื่อยเกิดเป็นไอออนย่อย เรียก MS เครื่องที่สองนี้ว่า Collision cell ซึ่งถูกควบคุมด้วยความถี่วิทยุเพียงอย่างเดียว เรียกการเกิดไอออนแบบนี้ว่า Collision-induced decomposition หลังจากนั้นไอออนย่อยจะเข้าสู่เครื่องที่สามเพื่อทำการวิเคราะห์มวลต่อไป การชนกันระหว่างไอออนกับแก๊สเฉื่อยมี 2 แบบ คือ แบบที่ใช้พลังงานสูง ทำโดยการเร่งไอออนให้มีพลังงานจลน์สูงก่อนการชน ในกรณีนี้มักใช้ฮีเลียมเป็นตัวชน และการแตกเป็นไอออนย่อยแต่ละครั้งจะให้ผลที่เหมือนเดิม เนื่องจากสามารถควบคุมพลังงานจลน์ของไอออนได้ การชนอีกแบบหนึ่ง คือ การชนกันแบบพลังงานต่ำ เป็นพลังงานจลน์ซึ่งมีอยู่ภายในไอออนที่ถูกวิเคราะห์ การแตกเป็นไอออนย่อยควบคุมยากเนื่องจากพลังงานจลน์ของไอออนมีความแปรปรวน แก๊สเฉื่อยที่ใช้ในกรณีนี้อาจใช้อาร์กอนหรือซีนอนก็ได้ การแตกเป็นไอออนย่อยแบบนี้จะขึ้นกับชนิดของแก๊ส อุณหภูมิ และความดัน

การแตกย่อยด้วยแสง (Photodissociation) จะใช้แสงเลเซอร์ และให้ผลการแตกเป็นไอออนย่อยที่เหมือนเดิม (reproducible) เหมาะกับ Tandem MS แบบ ion trap ซึ่งไอออนถูกดักเก็บและถูกฉายรังสีได้

นอกจากนี้ ยังมีการคู่ต่อระหว่างเครื่อง magnetic sector (with electrostatic) กับ quadrupole ด้วย แต่ไม่เป็นที่แพร่หลายนัก เนื่องจากเครื่องจะมีราคาแพงมากและมีขนาดใหญ่เทอะทะ

6. การคู่ต่อระหว่าง CE กับ MS (Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, CE-MS)



รูปที่ 12 โดอะแกรมมาตรฐานของเครื่องแคปิลารีโซนอิเล็กโตรโฟเรซิส¹³

แคปิลารีโซนอิเล็กโตรโฟเรซิส (CE) เป็นการใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าในการแยกโมเลกุลที่มีประจุภายในคอลัมน์แคปิลารีที่บรรจุบัฟเฟอร์ หรือเจลที่มีบัฟเฟอร์ โดยการให้ความต่างศักย์ขนาดสูงที่ปลายของคอลัมน์ การแยกสารด้วย CE จะใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่น้อยกว่า GC และ LC อย่างมาก และมีประสิทธิภาพในการแยกสารที่ดีมาก สารประกอบที่มีประจุจะเคลื่อนไปยังอิเล็กโตรดที่มีประจุตรงกันข้ามด้วยอัตราเร็วที่ขึ้นอยู่กับขนาดและประจุบนโมเลกุล เมื่อสารตัวอย่างออกจาก CE จะมีลักษณะเป็นแถบบางๆ ของสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงผ่านเข้าสู่ส่วนต่อประสานแบบ ES ก่อนเข้าเครื่อง MS ส่วน MS นั้นนิยมใช้เครื่องวิเคราะห์มวลแบบ TOF ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารประกอบที่มีมวลสูงมากได้ ถ้าสามารถเก็บตัวอย่างจากคอลัมน์ไว้บนฟิล์มจะสามารถต่อกับเครื่อง MS ชนิด Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF MS) ซึ่งนิยมใช้มากในปัจจุบัน การวิเคราะห์ด้วย CE จะใช้ตัวอย่างน้อยกว่า ใช้บัฟเฟอร์น้อยกว่า และมีความสามารถในการแยกที่ดีกว่าการวิเคราะห์ด้วย HPLC แต่เครื่องมักจะมีราคาแพงกว่า นอกจากนี้ ถึงแม้ MS จะเป็นดีเทคเตอร์ซึ่งใช้กับตัวอย่างได้หลายชนิด แต่ส่วนต่อประสานระหว่าง CE-MS ก็เป็นตัวจำกัดการประยุกต์ในการวิเคราะห์

แคปิลารีโซนอิเล็กโตรโฟเรซิส (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) (รูปที่ 12) เป็นชนิดที่ง่ายและมีการใช้มากที่สุดในปัจจุบัน ตัวคอลัมน์แคปิลารียาวประมาณ 20-80 เซนติเมตร ภายในแคปิลารีจะบรรจุด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ สารประกอบที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนผ่านไป ด้วยอัตราเร็วต่างกัน และปลายทั้งสองข้างของคอลัมน์จุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้าอาจให้สูงถึง 30 กิโลโวลต์ ความเฉพาะเจาะจงขึ้นกับการเลือกบัฟเฟอร์ พีเอช และความแรงไอออน CZE-MS มีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์โมเลกุลที่มีประจุสูง เช่น การศึกษาลำดับของโปรตีนโดยการ วิเคราะห์ส่วนผสมของเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อยโปรตีน

ด้วยเอ็นเอ็มอาร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในการวิเคราะห์โมเลกุลขนาดเล็กที่มีประจุ เช่น อัลคาลอยด์ อย่างไรก็ตาม CE ยังมีข้อจำกัดในเรื่องปัญหาของส่วนหัวฉีดซึ่งไม่ได้ฉีดด้วยโซลิ่งแบบโครมาโทกราฟี ความจำเป็นที่ต้องใช้ความต่างศักย์ที่สูงมาก บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง และการนำตัวอย่างที่ถูกชะเข้าสู่ส่วนต่อประสาน^{8-9,15}

7. การคู่ต่อระหว่าง LC กับ NMR (Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, LC-NMR)

สเปกโตรเมตรีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, NMR) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการดูดกลืนพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้าของนิวเคลียส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอะตอมของโปรตอน (^1H , proton NMR) หรืออะตอมของคาร์บอน-13 (^{13}C , carbon NMR)¹⁶ โดยที่อะตอมของโปรตอนและคาร์บอนที่อยู่ในโครงสร้างจะเกิดการเรโซแนนซ์ในสนามแม่เหล็กและปรากฏเป็นสัญญาณบนสเปกตรัมของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR spectrum) ที่เรียกว่า ค่าเคมีคัลชิฟ (chemical shift) และจากค่าเคมีคัลชิฟนี้ทำให้สามารถทำนายโครงสร้างทางเคมีของสาร หรือใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับสเปกตรัม (ทั้งของโปรตอนและ/หรือคาร์บอน) กับสารที่เคยมีรายงานไว้แล้ว นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ไม่ทำให้เกิดการสูญเสียสาร และหากใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมก็สามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษต่อไปได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับเมแทบอลิซึมของยาและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีปริมาณสารจำกัด

LC-NMR จัดเป็นการคู่ต่อเครื่องมือสำคัญทั้งทางด้านการวิเคราะห์และการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารเข้าด้วยกัน นับเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์มากในการศึกษาเกี่ยวกับพหุวัฏศาสตร์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพราะสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีของสารชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในสารสกัดซึ่งมีลักษณะเป็นของผสมได้ แต่เนื่องจาก NMR เป็นเครื่องมือที่มีความไวต่ำ ต้องใช้สารในการวิเคราะห์ในปริมาณที่มากกว่าเครื่องมืออื่นๆ การนำ NMR มาใช้ในเทคนิคการคู่ต่อจึงต้องใช้ NMR ที่มีความแรงของสนามแม่เหล็กไฟฟ้าค่อนข้างสูงตั้งแต่ 500 เมกะเฮิรตซ์ขึ้นไป เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และใช้ปริมาณสารในการวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับการผ่านคอลัมน์ของ HPLC นอกจากนี้การลดการรบกวนของสัญญาณบนสเปกตรัมของนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ที่เกิดจากวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ใน HPLC โดยไม่ให้มีผลต่อสัญญาณของสารที่ต้องการศึกษาก็เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงโดยเฉพาะกับ HPLC ที่ใช้ระบบเกรเดียนต์ที่ต้องลดการรบกวนจากสัญญาณที่เกิดจากตัวทำละลายมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งค่าเคมีคัลชิฟของตัวทำละลายแต่ละชนิดย่อมเปลี่ยนแปลงไปตามองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่นั้น และค่าเคมีคัลชิฟของสารที่ต้องการวิเคราะห์จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของตัว

ทำละลายที่ใช้ด้วย ดังนั้นการลดการรบกวนของสัญญาณจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ จึงมีผลต่อสัญญาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์แตกต่างกัน^{1,17}



รูปที่ 13 แผนภาพแสดงหลักการของ LC-NMR และ LC-NMR-MS (ดัดแปลงจาก¹⁸)

ใน LC-NMR เมื่อสารตัวอย่างผ่านเข้าสู่คอลัมน์ของ HPLC แล้วจะผ่านดีเทคเตอร์ เช่น ดีเทคเตอร์แบบอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet Detector) ก่อนเข้าสู่เครื่อง NMR แต่ถ้าเป็น LC-NMR-MS นั้น หลังจากผ่านดีเทคเตอร์แล้วสารตัวอย่างจะถูกแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งผ่านเข้าสู่ NMR และอีกส่วนหนึ่ง (ในปริมาณที่น้อยกว่า) ผ่านเข้าสู่ MS ซึ่งทำหน้าที่เหมือนเป็น ดีเทคเตอร์อีกตัวหนึ่ง (รูปที่ 13) การรวบรวมข้อมูลจาก LC-NMR สามารถทำได้ 2 วิธี คือ แบบ "on-flow" และแบบ "stop-flow" โดยทั้ง 2 วิธีสารที่ต้องการวิเคราะห์จะผ่านออกจาก คอลัมน์ของ LC เข้าสู่ microflow probe ของเครื่อง NMR ในปริมาณที่น้อยมากประมาณ 60 ไมโครลิตร เมื่อเทียบกับปริมาณของสาร 500-600 ไมโครลิตรในการใช้เครื่อง NMR ตามปกติ โดยในระบบที่เป็น "on-flow" จะปรากฏสเปกตรัมของโปรตอนของสารตลอดเวลาที่ทำการแยก สารผ่าน LC เข้าสู่ NMR (อาจกล่าวได้ว่าใช้ NMR เป็น real-time detector) ในขณะที่ระบบ "stop-flow" นั้นขั้นตอนการแยกสารใน LC จะถูกพักไว้เมื่อมีสารที่สนใจผ่านเข้าสู่ NMR เพื่อให้ เครื่อง NMR สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางด้าน NMR แบบต่างๆ ที่นอกเหนือจากสเปกตรัมของ โปรตอน รวมทั้งข้อมูลของ NMR แบบสองมิติ เช่น COSY HMQC หรือ HMBC ซึ่งต้องใช้เวลา ในการเก็บข้อมูลนานขึ้น ทั้งนี้สำหรับสารที่มีมวลโมเลกุลไม่เกิน 400 a.m.u ระบบ "on-flow" จะ วิเคราะห์หาปริมาณสารต่ำสุดได้ 3 ไมโครกรัม ส่วนระบบ "stop-flow" ได้ที่ 100 นาโนกรัม อย่างไรก็ตามการรวบรวมข้อมูลทั้ง 2 วิธีนี้มีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถแสดงสเปกตรัมของ คาร์บอนในขณะที่ทำการแยกสารได้

เนื่องจากข้อจำกัดเกี่ยวกับความไวของ NMR และปัญหาเกี่ยวกับการลดการรบกวน ของสัญญาณจากระบบเกรเดียนต์ของภูมิภาคเคลื่อนที่ ประกอบกับราคาที่ยังค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ LC-MS ทำให้ LC-NMR และ LC-NMR-MS เหมาะสำหรับงานวิเคราะห์ที่มีความซับซ้อน กับสารตัวอย่างที่มีราคาแพงที่ไม่สามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธีอื่นได้¹⁸ ดังนั้นการใช้ LC-NMR จะมีประโยชน์มากในการศึกษาทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เช่น การอธิบายโครงสร้างทางเคมี ของสารที่อยู่ในสารสกัดจากพืชโดยไม่จำเป็นต้องทำการแยกสารแต่ละตัวให้เป็นสารบริสุทธิ์ก่อน เนื่องจากสารสกัดมีความซับซ้อนและในบางครั้งมีปริมาณไม่มากนัก นอกจากนี้ยังใช้ในกรณี อื่นๆ ที่สารตัวอย่างมีปริมาณน้อย เช่น การศึกษาทางด้านองค์ประกอบทางเคมีของพืชเพื่อการ

จัดอนุกรมวิธาน (Chemotaxonomy) และการศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของยาในร่างกาย เป็นต้น

ปัจจุบันมีความพยายามในการปรับปรุงการทำงานของ LC-NMR ให้มีลักษณะเป็น ultrahigh-throughput โดยการใช้ capillary flow NMR probe ที่ต่อออกมาจากเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ (autosampler) ของ HPLC ทำให้สามารถผ่านสารเข้าไปใน NMR ได้ทุก 30 วินาที โดยใช้อัตราไหลต่อเนื่อง 30 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งเครื่อง NMR จะสามารถแสดงผลอย่างต่อเนื่องและเสร็จสิ้นภายใน 50 นาที วิธีนี้มีข้อดีตรงที่ใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อย มีความไวสูง รวดเร็ว และสเปกตรัมที่ได้มีคุณภาพดีเนื่องจากสามารถกำจัดสัญญาณรบกวนจากตัวทำละลาย แต่ก็ยังมีข้อเสียที่เกิดจากการฉีดสารตัวอย่างติดต่อกันหลายตัวอย่างในเวลาจำกัด¹⁹

8. การคู่ต่อระหว่าง SPE กับ NMR (Solid Phase Extraction-Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, SPE-NMR)¹⁸

SPE-NMR จัดเป็นประเภทหนึ่งของ LC-NMR โดยที่เมื่อสารตัวอย่างผ่านเข้าสู่ HPLC แล้ว HPLC จะทำหน้าที่ในการแยกสาร จากนั้นแถบสารบริสุทธิ์แต่ละแถบที่ผ่านออกมาจะถูกนำเข้าสู่ SPE ซึ่งจะจับเฉพาะตัวถูกละลาย (column trapping) ไว้ ซึ่งตัวถูกละลายนี้จะถูกชะออกด้วยตัวทำละลายที่มีความสามารถในการละลายมากกว่าเดิม และอาจเป็นตัวทำละลายที่ใช้กับ NMR ได้ (deuterated solvent) ซึ่งจะนำสารเข้าสู่ NMR ได้โดยตรง วิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์เมแทบอลิต์ของยาที่เกิดขึ้นในร่างกาย และการศึกษาทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

9. การคู่ต่อระหว่าง CE กับ NMR (Capillary Electrophoresis-Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, CE-NMR)

CE เป็นเครื่องมือที่มีความสามารถในการแยกสารปริมาณน้อยมาก การเลือกใช้ ดีเทคเตอร์ที่สามารถตรวจวัดสารปริมาณน้อยได้จึงมีความสำคัญ ที่ผ่านมามีการพัฒนา NMR เพื่อใช้เป็นดีเทคเตอร์ของ HPLC แต่ก็ต้องใช้สารในปริมาณ 25-200 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรที่เกินความสามารถของ CE จึงมีการปรับปรุงให้ NMR สามารถตรวจวัดสารในปริมาณที่น้อยลง ในระดับประมาณ 5 นาโนลิตร และมีขีดจำกัดของการตรวจพบในระดับนาโนกรัม โดยใช้เวลาในการรับสัญญาณจากเครื่อง NMR ไม่ถึง 1 นาที²⁰

10. การคู่ต่อระหว่าง FIA กับ NMR (Flow Injection Analysis-Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry, FIA-NMR)¹⁸

เป็นการนำสารตัวอย่างในรูปของเหลวผ่านเข้าสู่ NMR โดยไม่ต้องทำการแยกสารก่อน เทคนิคนี้แบ่งออกเป็น 2 วิธี ตามลักษณะการนำสารตัวอย่างเข้าสู่ NMR ได้แก่ FIA-NMR และ DI-NMR

FIA-NMR เป็นการฉีดสารตัวอย่าง (ในรูป plug) เข้าสู่กระแสของของเหลวที่ไหลสู่ NMR ซึ่งอาจเรียกว่า "column-less LC-NMR"

DI-NMR (Direct Injection NMR) เป็นการฉีดสารละลายของสารตัวอย่างเข้าสู่ NMR โดยตรง เนื่องจากการไม่มีการใช้ตัวทำละลายอื่น จึงสามารถนำสารตัวอย่างกลับออกมาได้ ในบางครั้งอาจดึงสารตัวอย่างออกมาจากบริเวณที่ฉีดสารเข้าไปได้โดยตรง ในการฉีดสารนั้นสามารถใช้เครื่องฉีดสารอัตโนมัติซึ่งบรรจุสารไว้ในหลุมทดสอบ (เช่น 96-well plate) หรือ vial ได้ โดยไม่ต้องใช้หลอด NMR แบบเดิม และสามารถวิเคราะห์สารปริมาณ 150-350 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1-50 มิลลิโมลได้ โดยใช้เวลาตั้งแต่ 2 ถึง 7 นาที ขึ้นอยู่กับความหนืดของตัวทำละลาย ความเข้มข้น และปริมาตรของสารตัวอย่าง

DI-NMR ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทาง combinatorial chemistry²¹⁻²² การคัดกรองสารในการศึกษาเกี่ยวกับ protein binding การศึกษาเมแทบอลิซึมของเหลวทางชีวภาพ และการตรวจหาไลโปโปรตีนในพลาสมา เป็นต้น

บทสรุป

ที่กล่าวมาข้างต้นเป็นเทคนิคการนำเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการแยกสารหรือเพิ่มความบริสุทธิ์ของสาร และเครื่องมือที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีของสารมาคู่ต่อกันตั้งแต่ 2 เครื่อง (ชนิด) ขึ้นไป โดยผ่านส่วนต่อประสานที่เหมาะสม ทำให้การแยกสารและการพิสูจน์โครงสร้างของสารในสารตัวอย่างที่ซับซ้อนเป็นไปด้วยความรวดเร็ว มีความถูกต้องเที่ยงตรง ซึ่งขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้เครื่องมือให้เหมาะสมกับปริมาณและคุณสมบัติของสาร

การใช้ GCXGC มีประโยชน์อย่างมากเมื่อสารตัวอย่างมีความซับซ้อนจนไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดแก๊สมิติเดียว เช่น ในตัวอย่างเดียวกันที่มีสารประกอบกลุ่มเดียวกัน หรือมีโครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกันมาก ดีเทคเตอร์ที่นำมาใช้ต้องเป็นดีเทคเตอร์ซึ่งสามารถตอบสนองต่อสารที่ถูกชะออกมาได้อย่างรวดเร็ว ในอนาคตน่าจะเป็นเครื่องมือซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ (Volatile organic compound, VOC) และสามารถใช้เป็นลายบ่งชี้ (fingerprint) ของสารประกอบจากการแยกในสองมิติ

GC-MS และ GC-FTIR เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อย่างมากในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ การคู่ต่อ MS-MS ที่ใช้เป็นดีเทคเตอร์ก็ทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เครื่อง GC-FTIR ยังมีปัญหาในด้านความเสถียรและประสิทธิภาพในการใช้งาน ซึ่งยังต้องการการพัฒนาต่อไป การใช้งานในปัจจุบันยังน้อยอยู่ มักใช้เพื่อเป็นข้อมูลเสริมด้านคุณภาพวิเคราะห์จากเครื่อง GC-MS

การใช้ CE ซึ่งนิยมใช้กับการวิเคราะห์สารที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ เช่น โปรตีน การศึกษาการเรียงลำดับกรดอะมิโนในโปรตีน ลายบ่งชี้ของดีเอ็นเอ เมื่อต่อกับ MS ที่เหมาะสม เช่น

TOF ก็ทำให้การวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและสะดวกรวดเร็วมากขึ้น แต่ยังคงต้องมีการพัฒนาเครื่องมือและการประยุกต์ใช้ต่อไป

การใช้ LC-NMR LC-NMR-MS และ SPE-NMR เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องมีการแยกสารตัวอย่างก่อน ซึ่ง LC-NMR ค่อนข้างใช้เวลานานและยุ่งยากหากต้องการทำให้เป็นอัตโนมัติ ในขณะที่ DI-NMR และ FIA-NMR สามารถทำให้เป็นระบบอัตโนมัติได้ง่ายกว่าและมักจะเร็วกว่า เหมาะกับงานที่ทำเป็นประจำ DI-NMR มีความไวสูงเนื่องจากสารตัวอย่างไม่ถูกเจือจางและสามารถนำสารกลับมาใช้ใหม่ได้ดี แต่มีข้อเสียตรงที่ต้องมีการกำหนดปริมาตรสารที่ฉีดได้ขั้นต่ำ ส่วน FIA-NMR และ LC-NMR ไม่มีการกำหนดปริมาตรสารขั้นต่ำ FIA-NMR สามารถรองรับปริมาตรสารที่ฉีดเข้าไปได้มากกว่า DI-NMR ทั้ง FIA-NMR และ DI-NMR สามารถรองรับความเข้มข้นของสารในช่วงที่กว้างกว่า LC-NMR FIA-NMR และ DI-NMR ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณในสภาวะที่กว้างกว่า LC-NMR เมื่อใช้ FIA-NMR LC-NMR และ SPE-NMR จะสามารถกรองสารตัวอย่างแบบอัตโนมัติได้ ในขณะที่ DI-NMR ไม่สามารถทำได้

เอกสารอ้างอิง

1. Kite GC, Veitch NC, Grayer RJ, et al. The use of hyphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. *Biochemical Systematics and Ecology* 2003; 31: 813-43.
2. Marriot P and Shellie R, Principles and applications of comprehensive two-dimension gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 2002; 21(nos.9+10):573-583.
3. Dalluge J, Beens J and Brinkman UA. Comprehensive two-dimensional gas chromatography : a powerful and versatile analytical tool. *Journal of Chromatography A* 2003; 1000:69-108.
4. Guttman A, Varoglu M, and Khandurina J. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. *Drug Discovery Today* 2004; 9(3): 136-44.
5. Kueh AJ, Marriott PJ, Wynne PM. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography to drugs analysis in doping control. *Journal of Chromatography A* 2003; 1000:109-124.
6. Song SM, Marriott P and Wynne P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-quadrupole mass spectrometric analysis of drugs. *Journal of Chromatography A* 2004; 1058: 223-232.
7. Song SM, Marriott P, Kotsos A, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) for drug screening and confirmation. *Forensic science international* 2004; 143: 87-101.

8. McMaster M and McMaster C. GC/MS A practical user's guide, New York, Wiley-VCH, 1998.
9. Galichet LY, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceutical, Body Fluids and Postmortem Material, 3rd ed., London, Pharmaceutical Press, 2004.
10. Skoog DA and Leary JJ. Principles of instrument analysis, 4th ed., Fort Worth, Saunders College Publishing, 1992.
11. Fifield FW and Kealey D. Principle and practice of analytical chemistry, 5th ed., Oxford, Blackwell Science, 2000.
12. Visser T. FT-IR Detection in gas chromatography. Trends in Analytical Chemistry 2002; 21(nos9+10):627-636.
13. Rouessac F and Rouessac A. Chemical analysis: Modern instrumentation methods and techniques, Chichester, John Wiley & Sons, 2000.
14. Barker J, Mass Spectrometry : Analytical Chemistry by Open Learning, 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons, 1999.
15. Chamberlain J. Linking capillary electrophoresis and mass spectrometry. The Pharmaceutical Journal 2005; 274:458
16. อรุณา ภู่วะเสริฐ การประยุกต์ใช้นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ในการพิสูจน์โครงสร้างของอินทรีย์สาร นครปฐม โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร 2547.
17. Dalvit C, Shapiro G, Böhlen J-M, et al. Technical aspects of an efficient multiple solvent suppression pulse sequence. Magnetic Resonance in Chemistry 1999; 37:7-14.
18. Keifer PA. Flow NMR Applications in combinatorial chemistry. Current Opinion in Chemical Biology 2003; 7:388-394.
19. Bailey NJC, and Marshall IR. Development of ultrahigh-throughput NMR spectroscopic analysis utilizing capillary flow NMR technology. Analytical Chemistry 2005; 77:3947-3953.
20. Wu N, Peck TL, Webb AG, et al. Nanoliter volume sample for ¹H NMR: application to on-line detection in capillary electrophoresis. Journal of the American Chemical Society 1994; 116:7929-7930.
21. Keifer PA, Smallcombe SH, Williams EH, et al. Direct-injection NMR (DI-NMR): a flow NMR technique for the analysis of combinatorial chemistry libraries. Journal of Combinatorial Chemistry 2000; 2:151-171.

22. Kalelkar S, Dow ER, Grimes J, et al. Automated analysis of proton NMR spectra from combinatorial rapid parallel synthesis using self-organizing maps. *Journal of Combinatorial Chemistry* 2002; 4:622-629.