



Size Exclusion Chromatography: เทคนิคแห่งการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ เต็มสิริ หวังทวีทรัพย์*

Size Exclusion Chromatography: A technique of molecular weight determination of polymer Temsiri Wangtaveesab*

ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ จ.ปทุมธานี 12120

National Metal and Materials Technology Center (MTEC), Pathumthani 12120, Thailand

*Corresponding Author. E-mail address: temsirw@mtec.or.th

Received 16 November 2009; accepted 2 March 2011

บทคัดย่อ

Size Exclusion Chromatography (SEC) เป็นเทคนิคที่รู้จักกันดีว่ามีความสามารถในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยและค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ท่ามกลางเทคนิคอื่นที่มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ระบบ SEC ในยุคเริ่มต้นมีส่วนตรวจวัดหรือดีเทคเตอร์เป็นแบบชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ได้แก่ รีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ และอัลตราไวโอเล็ต ดีเทคเตอร์ เป็นต้น ดีเทคเตอร์ประเภทนี้สามารถตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ตามปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกของพอลิเมอร์นั้นๆ กล่าวคือไม่สามารถตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลออกมาได้โดยตรง จึงต้องเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลกับสารมาตรฐานที่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลแน่นอน น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จึงเป็นน้ำหนักโมเลกุลแบบสัมพัทธ์ ในภายหลังมีการนำเอาดีเทคเตอร์ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ เครื่องวัดการกระเจิงแสงหรือวิสโคมิเตอร์ มาต่อเข้ากับระบบ SEC แบบเดิม จึงทำให้ระบบ SEC พัฒนาขึ้นจากเดิมและสามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงได้ในที่สุด ระบบ SEC ในปัจจุบันจึงมีบทบาทในงานวิจัยอย่างแพร่หลายทั้งในวงการอุตสาหกรรมและแวดวงการศึกษา บทความนี้กล่าวถึงเรื่องราวของเทคนิค SEC ตั้งแต่ประวัติความเป็นมา หลักการของเทคนิค รวมไปถึงการพัฒนาแบบดีเทคเตอร์

คำสำคัญ: โซลเอนซ์คัลชันโครมาโตกราฟี น้ำหนักโมเลกุล ดีเทคเตอร์

Abstract

Among various molecular weight determination techniques, Size Exclusion Chromatography (SEC) is well-known as a most versatile technique for acquiring both molecular weight average and the molecular weight distribution (MWD) of polymer. At the beginning, a concentration-sensitive detector, typically refractive index (RI) or ultraviolet (UV), was widely employed in SEC system. These detectors detect polymer molecules eluting out of column according to their hydrodynamic volume and require a calibration with a number of known molecular weight standards to obtain a relative molecular weight. Later on, a molecular weight-sensitive detector; light scattering or viscometer, was developed to combine with the conventional detection system and that enabled SEC technique to determine an absolute molecular weight. The development of detection system has driven the SEC technique nowadays as a common tool for polymer research within industry and academia. This paper will give an overview of SEC technique, including history, principle of the technique and detector development.

Keywords: Size Exclusion Chromatography, molecular weight, detector

บทนำ

Size Exclusion Chromatography (SEC) หรือที่รู้จักกันในหมู่นักพอลิเมอร์ในชื่อ GPC เป็นหนึ่งในวิธีทางโครมาโตกราฟีสำหรับใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (average-molecular weight) และค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight distribution) ของพอลิเมอร์หรือสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ท่ามกลางเทคนิคในการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลที่มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันที่ปลายโซ่ (end-group analysis) การเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง (ultra-centrifugation) การวัดการกระเจิงของแสง (light

scattering) และการวัดความหนืดของสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ (dilute solution viscometry) เป็นต้น นับว่า SEC เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายที่สุด เพราะนอกจากสามารถให้ข้อมูลทางด้านน้ำหนักโมเลกุลแล้วยังให้ข้อมูลทางด้านการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งในขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์ รวมไปถึงการพัฒนาสมบัติของพอลิเมอร์ให้ตรงตามความต้องการ นอกจากนี้ ยังมีความสามารถในการวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างสะดวกและรวดเร็วกว่าเทคนิคอื่นๆ ดังกล่าวมาข้างต้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ยาวนาน มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ หรือไม่มีวิธีการยุ่งยากด้วยข้อดีเหล่านี้ทำให้เทคนิค SEC ยังคงได้รับความนิยมมา

ถึงปัจจุบันและกลายมามีบทบาทแทนที่เทคนิคในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลอื่น ๆ ที่นับวันจะลบทบทหายไปทุกที

ประวัติความเป็นมา

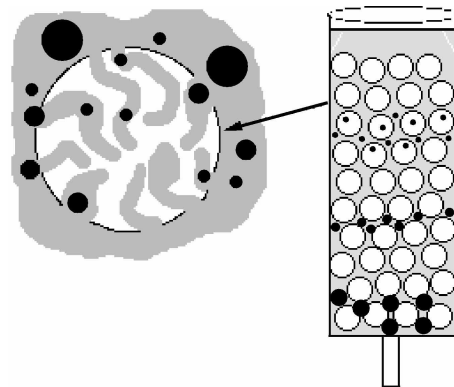
เดิมเทคนิค SEC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารสำหรับกลุ่มพอลิเมอร์ทางชีวภาพ จนกระทั่งในช่วงกลางทศวรรษ 1950 เลธและรูทเวน (Lathé & Ruthven, 1955; Lathé & Ruthven, 1956) ได้พัฒนาคอลัมน์ที่ทำจากแป้งข้าวโพดขึ้นมาสำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขึ้นเป็นครั้งแรก แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลได้สูงมากนัก ต่อมาในปี ค.ศ. 1959 โพรธาและฟลอดีน (Porath & Flodin, 1959) ผลิตคอลัมน์ซึ่งทำจากเจลพอลิเดกซ์แทรน สำหรับใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในกลุ่มโปรตีนและพอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ และมีการจัดจำหน่ายภายใต้ชื่อ “เซฟาเดกซ์ (Sephadex®)” ซึ่งนับเป็นครั้งแรกที่มีการจำหน่ายคอลัมน์ทางการค้า คอลัมน์นี้ได้รับความนิยมในหมู่นักวิทยาศาสตร์ทางชีวภาพเป็นอันมาก จนถึงกับตั้งชื่อเรียกเป็นเทคนิคใหม่ว่า Gel Filtration Chromatography (GFC) หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 1964 จอห์น มัวร์ (Moore, 1964) นักวิจัยของบริษัท Dow Chemical ผลิตคอลัมน์สไตราเจล (Styragel®) จากคลอสลิงค์พอลิสไตรีน (crosslinked polystyrene) สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ และยังเป็นคอลัมน์แรกที่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างได้สูงถึงช่วงหลายล้านดาลตัน พร้อมกันนั้นมัวร์ได้ร่วมมือกับนักวิจัยอีกหลายท่านพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลเครื่องแรกขึ้นมาอย่างเป็นระบบ ประกอบด้วย ส่วนปั๊ม ส่วนควบคุมความร้อนของคอลัมน์ และส่วนตรวจวัดชนิดรีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ ทำให้เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลลดลงเหลือเพียง 1.5 ชม. จากเดิมที่เทคนิคอื่นต้องใช้เวลาจนถึง 3-4 สัปดาห์ พวกเขาได้ตั้งชื่อเรียกเครื่องมือนี้ว่า Gel Permeation Chromatography (GPC) ต่อมาในปีทศวรรษ 1970 เทคนิค SEC เริ่มเป็นที่รู้จักและยอมรับกันในวงการวิทยาศาสตร์ว่าเป็นเทคนิคอันใหม่ที่มีสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ และโดยเฉพาะค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งเป็นค่าที่หาวิธีวิเคราะห์ได้ยากในสมัยนั้น (Bly, 1970)

ที่กล่าวมาข้างต้น คือจุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SEC และยังเป็นที่มาของชื่อเทคนิคในปัจจุบันที่มีหลายชื่อด้วยกัน GFC จะนิยมเรียกกันในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ละลายได้ในระบบน้ำ (aqueous solvent) สำหรับชื่อ GPC นิยมใช้เรียกกันในกลุ่มการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ส่วนชื่อ SEC เป็นชื่อที่ถูกตั้งขึ้นในภายหลังเพื่อให้สอดคล้องกับหลักการทางเทคนิค ซึ่งจะขอใช้ SEC แทนชื่อเทคนิคโดยรวมในบทความต่อไป

หลักการโดยทั่วไปของเทคนิค SEC

ประกอบด้วยการแยกโมเลกุลของสารละลายตัวอย่าง

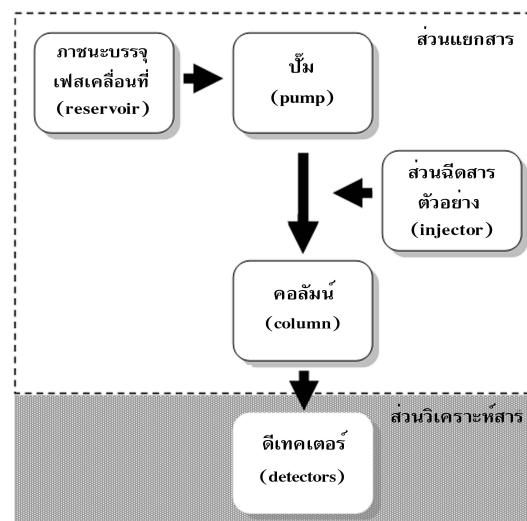
พอลิเมอร์ที่อาจมีองค์ประกอบของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลหลายช่วงผสมกันอยู่ เมื่อสารละลายตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปในกระแสน้ำตัวทำละลาย โมเลกุลของสารละลายจะเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ซึ่งบรรจุอนุภาคขนาดเล็กที่มีรูพรุน (โดยทั่วไปประมาณ 5-10 μm) องค์ประกอบที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าขนาดของรูพรุนจะไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปในรูได้ จึงออกมาจากคอลัมน์เร็วสุด ในขณะที่องค์ประกอบที่มีโมเลกุลขนาดกลาง อาจมีบางส่วนผ่านเข้าไปในรูได้ จึงไหลออกจากคอลัมน์ตามมา สำหรับสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เช่น มอนอเมอร์ (monomer) จะสามารถผ่านเข้าไปในรูได้จึงใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นานที่สุดและออกมาจากคอลัมน์ทีหลังสุด (รูปที่ 1) จะเห็นได้ว่าหลักการแยกสารนี้เกิดขึ้นภายใต้ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโมเลกุลในตัวทำละลายหรือปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic volume) กับเวลาที่โมเลกุลใช้เคลื่อนที่ในคอลัมน์ ซึ่งจากกลไกการแยกสารตามขนาดดังกล่าวนี้เองที่ทำให้เทคนิค SEC สามารถหาค่าการกระจายตัวของพอลิเมอร์ได้



รูปที่ 1 แสดงหลักการแยกสารตามขนาดโมเลกุลภายในคอลัมน์ของเทคนิค SEC (ปรับปรุงภาพจาก www.sci.sdsu.edu)

ส่วนประกอบหลักของเทคนิค SEC

สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนหลัก ประกอบด้วย ส่วนแยกสารและส่วนวิเคราะห์สาร



รูปที่ 2 องค์ประกอบโดยทั่วไปของเครื่อง SEC

ส่วนแยกสาร

ส่วนแยกสารของระบบ SEC (รูปที่ 2) มีความคล้ายคลึงกับระบบแยกสารของเทคนิค HPLC ทั่วไปแตกต่างกันเฉพาะส่วนของคอลัมน์เท่านั้น กล่าวคือ ประกอบด้วยปั๊มซึ่งทำหน้าที่ดูดตัวทำละลายหรือที่เรียกว่า “เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)” จากภาชนะบรรจุ และส่งผ่านเข้าไปที่คอลัมน์ โดยปั๊มจะทำหน้าที่ควบคุมอัตราการไหลให้มีความสม่ำเสมอเพื่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ผล สารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดตรงบริเวณส่วนฉีดสารตัวอย่าง และส่งต่อไปยังคอลัมน์ หรือเฟสคงที่ (stationary phase) โดยกระแสของตัวทำละลาย เมื่อเกิดการแยกชั้นภายในคอลัมน์ โมเลกุลของสารตัวอย่างจะถูกส่งต่อไปยังส่วนวิเคราะห์ผลที่ประกอบด้วยดีเทคเตอร์อย่างน้อย 1 ชนิดเพื่อประมวลผลต่อไป

งานวิจัยและพัฒนาในช่วงแรกของเทคนิค SEC หลังจากเริ่มเป็นที่ได้รับความนิยมจนมีการผลิตเครื่องมือขายอย่างเป็นทางการแล้ว จะเกี่ยวข้องกับส่วนแยกสารนี้เสียเป็นส่วนใหญ่ (Buytenhuys & Van Der Maeden, 1978; Hirayama et al., 1987; Hjertén & Eriksson, 1984; Kirkland, 1976; Yau et al., 1978) งานวิจัยเหล่านี้มุ่งเน้นไปที่การพัฒนาประสิทธิภาพของการแยกและพัฒนาคอลัมน์ให้สามารถวิเคราะห์พอลิเมอร์ได้หลากหลายชนิดมากขึ้น จวบจนกระทั่ง 2-3 ทศวรรษให้หลังมานี้ทิศทางของงานวิจัยหันเหมาซึ่งส่วนวิเคราะห์ผล เพราะความต้องการในด้านความถูกต้องแม่นยำของผลการวิเคราะห์นั้นหนักโมเลกุลมีมากขึ้น

ส่วนวิเคราะห์สารหรือดีเทคเตอร์

หลังจากสารเกิดการแยกและไหลผ่านออกจากคอลัมน์แล้ว ดีเทคเตอร์จะทำหน้าที่ตรวจจับสารที่ไหลออกมา ในปัจจุบันมีดีเทคเตอร์อยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น (concentration-sensitive detector) และชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight-sensitive detector)

ดีเทคเตอร์

ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น เป็นดีเทคเตอร์ที่ใช้กันในยุคแรกของ SEC ได้แก่ รีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ (refractive index detector, RI) และอัลตราไวโอเล็ต ดีเทคเตอร์ (ultra-violet detector, UV) เป็นต้น ดีเทคเตอร์ประเภทนี้ทำหน้าที่เพียงตรวจจับสารที่ไหลออกจากคอลัมน์เท่านั้น กล่าวคือไม่สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลออกมาได้โดยตรง ดังนั้น จึงต้องมีการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลแน่นอน (calibration)

รีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ (RI)

เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า รีแฟกโตมิเตอร์ (refractometer) เป็นอุปกรณ์สำหรับตรวจวัดการหักเหของแสงเมื่อแสงเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางหนึ่งไปสู่อีกตัวกลางหนึ่ง ดังนั้นจึงอาศัยการวัดความแตกต่างของค่าดัชนีหักเหของแสงระหว่างสารละลาย

พอลิเมอร์กับตัวทำละลายในการตรวจวัดสารละลายตัวอย่างที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ หลักการทำงานของดีเทคเตอร์ชนิดนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลาย จึงทำให้เป็นดีเทคเตอร์ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ดีเทคเตอร์ประเภทนี้มีข้อดี คือ สามารถให้สัญญาณตอบรับได้กับตัวอย่างพอลิเมอร์แทบทุกชนิด มีความแม่นยำ และง่ายต่อการใช้งานจึงเป็นดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้กับระบบ SEC มากที่สุด

อัลตราไวโอเล็ต ดีเทคเตอร์ (UV)

ดีเทคเตอร์ประเภทนี้วัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีของสารที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ ดังนั้นจึงอาศัยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง โดยค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's law) ดังสมการ 1) จึงทำให้เป็นดีเทคเตอร์ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น

$$A = abc \quad \dots 1)$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร

a = แอ็บซอร์ปติวิตี (absorptivity) หรือค่าคงที่ของการดูดกลืนแสงของสาร

b = ระยะทางที่แสงส่องผ่านสารตัวอย่าง

c = ความเข้มข้น

ดีเทคเตอร์ประเภทนี้มีข้อดี คือมีความไว (sensitivity) สูงในการวิเคราะห์ แต่ก็มีข้อจำกัดคือจะสามารถตรวจวัดได้กับสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงยูวีได้เท่านั้น

ความถูกต้องในการวิเคราะห์ผลของดีเทคเตอร์ทั้งสองชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้สารมาตรฐานให้มีโครงสร้างโมเลกุลเหมือนหรือคล้ายกันกับสารตัวอย่างมากที่สุด เนื่องจากกลไกการแยกสารภายในคอลัมน์ขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลในตัวทำละลายไม่ใช่น้ำหนักโมเลกุล โดยทั่วไปสายโซ่พอลิเมอร์ที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายจะมีขนาดโมเลกุลเฉพาะตามแต่ชนิดของพอลิเมอร์ในตัวทำละลายใดๆ นั้นหมายความว่าแม้จะเป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวกัน แต่ถ้าละลายในตัวทำละลายต่างชนิดก็อาจมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง ถ้าเป็นพอลิเมอร์คนละชนิดกัน ถึงแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันก็อาจมีขนาดโมเลกุลแตกต่างกันได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจึงจำเป็นต้องสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกกับน้ำหนักโมเลกุล หรือที่เรียกว่า คอนเวนชันนอล คาลิเบรชัน (conventional calibration) โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอน และใช้กราฟนี้ในการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จึงเป็นน้ำหนักโมเลกุลในเชิงเปรียบเทียบไม่ใช่ น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง มีหลายงานวิจัย (Christensen et al., 2001; Huang et al., 2004; Poché et al., 1998) แสดงการศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่วัดจากระบบ SEC นี้กับเทคนิคในการวัดน้ำหนักโมเลกุลอื่น พบว่า หากใช้สารมาตรฐานที่มีโครงสร้างโมเลกุลแตก

ต่างจากสารที่ต้องการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จะคลาดเคลื่อนจากค่าที่แท้จริง อาจต่ำหรือสูงกว่าขึ้นอยู่กับปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกของพอลิเมอร์นั้น ๆ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นในการรายงานผลการวิเคราะห์ต้องอ้างอิงถึงชนิดของสารมาตรฐานที่ใช้น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จึงเป็นแบบ “น้ำหนักโมเลกุลสัมพัทธ์ (relative molecular weight)”

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงกลายเป็นจุดอ่อนของเทคนิคนี้ เนื่องจากสารมาตรฐานที่ขายกันอยู่ตามท้องตลาดมีเพียงไม่กี่ชนิด จึงไม่ครอบคลุมต่อการวิเคราะห์พอลิเมอร์ทุกประเภทได้ จากข้อจำกัดข้างต้นดังกล่าว จึงมีการพัฒนาระบบเทคนิคที่ขึ้นมากในภายหลังโดยนำเอาเทคนิคในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลอื่น ๆ มาประยุกต์เข้ากับระบบ SEC เดิม ได้แก่ วิสโคมิเตอร์ (viscometer, VIS) และเครื่องวัดการกระเจิงของแสง (light scattering, LS) ซึ่งเทคนิคทั้งสองชนิดจัดว่าเป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล และสามารถวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุลออกมาได้โดยตรง น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จึงเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง (absolute molecular weight)

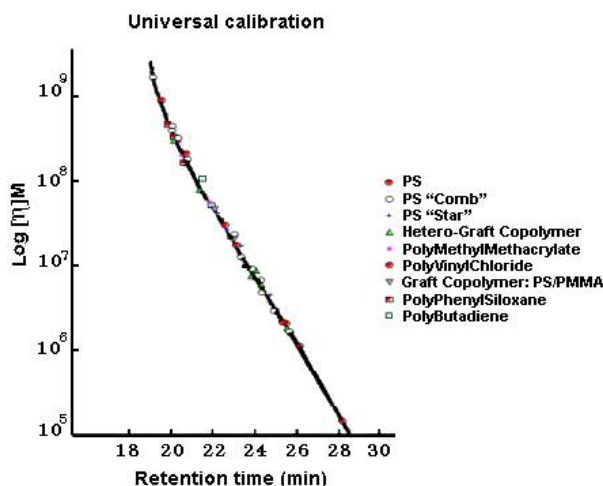
เทคนิคชนิดวัดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล
วิสโคมิเตอร์ (VIS)

บีนอยส์ และคณะ (Grubisic et al., 1967) ค้นพบว่า

การแยกสารของโมเลกุลพอลิเมอร์ภายในคอลัมน์ขึ้นอยู่กับปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิก (V_h) ของพอลิเมอร์ที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายใด ๆ ซึ่งปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกมีความสัมพันธ์กับความหนืดแท้จริง (intrinsic viscosity, $[\eta]$) และน้ำหนักโมเลกุลตามสมการความหนืดของสารละลายของไอน์สไตน์ (Einstein's viscosity equation) ดังสมการที่ 2) (Young & Lovell, 1991)

$$V_h \propto [\eta]M \quad \dots 2)$$

จากการค้นพบดังกล่าวพวกเขาจึงลองสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง $\log [\eta]M$ กับเวลาที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์ ซึ่งพบว่าพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลต่างกันล้วนอยู่บนเส้นกราฟเดียวกัน (รูปที่ 3) กราฟนี้จึงได้ชื่อว่า ยูนิเวอร์ซอล คาลิเบรชัน (Universal calibration) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวทำให้การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีนี้ สามารถตัดปัญหาเรื่องขนาดหรือปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกที่ไม่เท่ากันของพอลิเมอร์ต่างชนิดในตัวทำละลายใด ๆ ลงได้ น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จึงเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง อย่างไรก็ตาม ระบบนี้ยังคงต้องใช้ร่วมกับรีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ และต้องใช้สารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลในการสร้างยูนิเวอร์ซอล คาลิเบรชัน (universal calibration) เพื่อการวิเคราะห์ผล



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานยูนิเวอร์ซอล (ที่มา: Wu, 1995)

นอกจากนี้ ความหนืดแท้จริงยังมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลดังสมการของมาร์ค-ฮูวิก (Mark-Houwink) ดังสมการที่ 3) (Sperling, 1992)

$$[\eta] = KM^a \quad \dots 3)$$

เมื่อ K และ a คือค่าสัมประสิทธิ์ของฮูวิก (Mark-Houwink constants) ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ ตัวทำละลาย และอุณหภูมิ

จากสมการ 3) สามารถทำนายคอนฟอร์เมชันของโมเลกุลพอลิเมอร์หรือรูปแบบการจัดเรียงของสายโซ่พอลิเมอร์ในตัวทำละลายใด ๆ (polymer chain conformation) โดยดูได้จากค่า a ถ้าค่า a อยู่ระหว่าง 0.5-0.8 แสดงว่า

พอลิเมอร์นั้นมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเป็นแบบ random coil และถ้าค่า a เข้าใกล้ 0, 1 และ 2 แสดงว่าพอลิเมอร์นั้นมีคอนฟอร์เมชันเป็นแบบ hard sphere, semicoil และ rigid rod ตามลำดับ และยังสามารถใช้ศึกษาอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างพอลิเมอร์กับตัวทำละลาย (polymer-solvent interaction) เช่น ถ้าค่า a เข้าใกล้ 0.8 แสดงว่าพอลิเมอร์ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่ดี ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์แผ่ขยายตัวอยู่ในตัวทำละลายนั้น

นอกจากนี้วิสโคมิเตอร์ยังสามารถให้ข้อมูลทางด้านรัศมีไฮโดรไดนามิก (hydrodynamic radius, R_h) ปริมาณโซ่กิ่ง และสามารถทำนายโครงสร้าง (structure) ของ

พอลิเมอร์ว่ามีโครงสร้างเป็นแบบเส้นตรง (linear) หรือโซ่กิ่ง (branch) ได้อีกด้วย

เครื่องวัดการกระเจิงของแสง (LS)

เดิมเป็นเทคนิคที่อาศัยข้อมูลของการกระเจิงแสงจากสารละลายพอลิเมอร์ ในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงของพอลิเมอร์มาก่อนหน้าที่เทคนิค SEC จะถือกำเนิดขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่สามารถให้ข้อมูลทางด้านการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างพอลิเมอร์กับตัวทำละลายและคาร์ลิมิไจเรชัน (radius of gyration) ของโมเลกุลพอลิเมอร์ในตัวทำละลายได้อีกด้วย แต่เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความยุ่งยากในวิธีการวิเคราะห์ เพราะจะต้องเตรียมตัวอย่างหลายความเข้มข้น และตัวอย่างจะต้องสะอาดปราศจากอนุภาคของสารปนเปื้อน จึงทำให้เทคนิคนี้ไม่ได้รับความนิยมในการตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลแบบลักษณะงานประจำเท่าใดนัก จนกระทั่งในช่วงทศวรรษ 1970 (Wu, 1995) จึงเริ่มมีการนำเอาเทคนิควัดการกระเจิงแสงมาใช้เป็นดีเทคเตอร์ร่วมกับระบบ SEC-RI การรวมกันของทั้งสองเทคนิคช่วยให้ข้อจำกัดของทั้งสองเทคนิคหมดไป กล่าวคือเทคนิค SEC สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลได้โดยไม่ต้องใช้สารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ในขณะที่เดียวกันก็ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ของเทคนิควัดการกระเจิงแสงแบบเดิมลงเพราะสารละลายตัวอย่างที่ผ่านออกจากคอลัมน์ จะถูกตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย ณ เวลาหรือปริมาตรใดๆ ตลอดช่วงของการวิเคราะห์โดย RI ดีเทคเตอร์ ข้อมูลที่ได้จึงเปรียบเสมือนกับการเตรียมตัวอย่างหลายๆ ความเข้มข้นนั่นเอง

ทฤษฎีและหลักการของ SEC-LS

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้เครื่องวัดการกระเจิงของแสงเป็นดีเทคเตอร์ จะอาศัยการวัดความเข้มแสงที่กระเจิงออกจากสารละลายพอลิเมอร์ เพื่อหาค่า Rayleigh scattering factor (R_θ) ณ มุมที่แสงเกิดการกระเจิง ณ ปริมาตรใดๆ ที่สารละลายถูกชะออกจากคอลัมน์ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยดังสมการที่ 4) (Young & Lovell, 1991)

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2 C + \dots \quad \dots 4)$$

โดยที่ $K = 2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda^4$
 $R_\theta = k (I_\theta / I_0)$

และ $1/P(\theta) = 1 + (16\pi^2 n_0^2 \sin^2(\theta/2) / 3\lambda^2) \langle s^2 \rangle$

เมื่อ K คือ ค่าคงที่เชิงแสง (optical constant) ซึ่งจะมีค่าคงที่สำหรับตัวทำละลายพอลิเมอร์และความยาวคลื่นของแสงชนิดหนึ่งๆ

C คือ ความเข้มข้น ณ ปริมาตรใดๆ ของสารละลายที่ถูกชะออกมา (เป็นค่าที่ได้จากดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อความเข้มข้น ได้แก่ รีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ดีเทคเตอร์ เป็นต้น)

θ คือ มุมใดๆ ที่แสงเกิดการกระเจิง

A_2 คือ virial coefficient อันดับที่ 2 เป็นค่าที่บอก

อันตรกิริยาระหว่างพอลิเมอร์และตัวทำละลาย

$P(\theta)$ คือ ค่า particle scattering factor แสดงพฤติกรรมของการกระเจิงแสงของตัวอย่าง เมื่อมุมของการกระเจิงเท่ากับ 0 องศา ค่านี้จะเข้าใกล้ 1 เนื่องจากไม่เกิดการแทรกสอด (interference) ของแสงที่กระเจิงออกมาจากพอลิเมอร์โมเลกุลเดียวกัน

M_w คือ น้ำหนักโมเลกุล ณ ปริมาตรใดๆ ของสารละลายพอลิเมอร์ที่ถูกชะออกมา

n_0 คือ ค่าการหักเหแสงของตัวกลางหรือตัวทำละลายที่ใช้ละลายพอลิเมอร์

dn/dc คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงของดัชนีการหักเหของแสงต่อความเข้มข้น

N_A คือ เลขอวกาโดร (6.023×10^{23})

λ คือ ความยาวคลื่นของแสงเลเซอร์ ซึ่งวัดในระบบสุญญากาศ

k คือ ค่าคงที่ของเครื่องมือวิเคราะห์

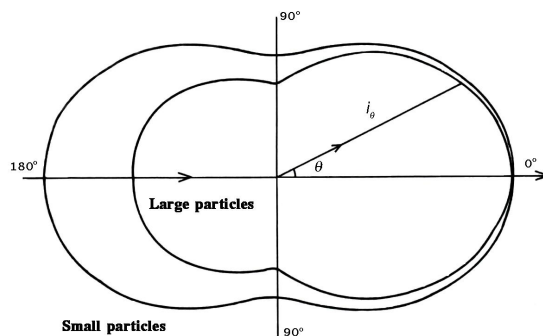
I_θ คือ ความเข้มแสงที่กระเจิงออกจากสารละลายพอลิเมอร์ที่มุมใด ๆ

I_0 คือ ความเข้มแสงของเลเซอร์

$\langle s^2 \rangle$ คือ ค่าเฉลี่ยความเบี่ยงเบนกำลังสองของรัศมีไจเรชันของอนุภาค

โดยทั่วไปการเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEC จะใช้ความเข้มข้นเจือจางมาก และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเข้าใกล้ 0 พจน์ $2A_2 C$ จึงสามารถละทิ้งได้ ดังสมการ 5)

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} \quad \dots 5)$$



รูปที่ 4 แสดงผลของความแตกต่างของขนาดโมเลกุลที่มีต่อความเข้มของแสงกระเจิงที่มุมต่างๆ (ที่มา: Young & Lovell, 1991)

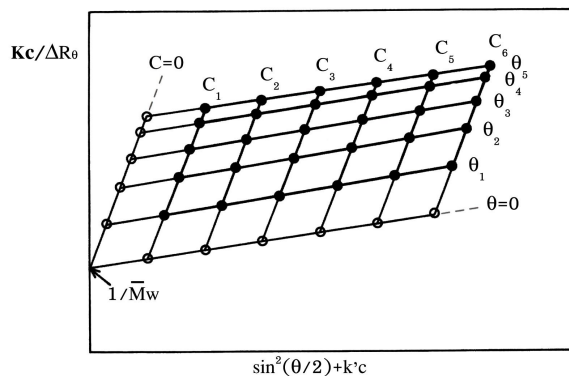
จากรูปที่ 4 ความเข้มแสงที่กระเจิงจะขึ้นกับขนาดโมเลกุล สำหรับสารโมเลกุลเล็ก แสงที่กระเจิงออกจากโมเลกุลเดียวกันจะไม่เกิดปรากฏการณ์การแทรกสอด $P(\theta)$ จึงเท่ากับ 1 เสมอไม่ว่าจะวัดที่มุมใดๆ แต่สำหรับพอลิเมอร์ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ ความเข้มแสงที่กระเจิงจากมุมต่างๆ มีค่าไม่เท่ากัน เนื่องจากอาจเกิดการแทรกสอดของแสงที่กระเจิงออกมาจากพอลิเมอร์โมเลกุลเดียวกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อมุมของการกระเจิงแสงเข้าใกล้ศูนย์ ($\theta \rightarrow 0$) เทอม $P(\theta)$ จะเท่ากับ 1 ซึ่ง ณ มุม 0 องศาจะไม่

เกิดการแทรกสอดของแสงที่กระเจิงออกมาจากโมเลกุลเดียวกัน ดังนั้น หากวัดค่าความเข้มแสงของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางที่มุมเข้าใกล้ 0 จะสามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ดังสมการ 6)

$$\left(\frac{KC}{R_0} \right)_{c \rightarrow 0} = \frac{1}{M_w} \quad \dots 6)$$

แต่เนื่องจากในทางปฏิบัติไม่สามารถวัดความเข้มแสงที่กระเจิงจากมุมเข้าใกล้ 0 ได้ เพราะเป็นมุมเดียวกับแสงจากแหล่งกำเนิด ความเข้มของแสงจะแรงมากจนสามารถทำลายโฟโตไดโอดได้ จึงมีความพยายามคิดค้นเทคนิคต่าง ๆ จนพัฒนามาเป็นดีเทคเตอร์ชนิดวัดการกระเจิงแสงหลายชนิดได้แก่

ดีเทคเตอร์ชนิดวัดการกระเจิงแสงแบบหลายมุม (multi angle laser light scattering, MALLS)



รูปที่ 5 แสดงการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยการทำ Zimm plot ซึ่งจุดที่บนแกนค่าที่ได้จากการทดลอง จุดโปร่งแทนค่าที่ได้จากการ extrapolate (ที่มา: Young & Lovell, 1991)

อาศัยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง KC/R_θ กับ θ (ตามสมการ 4) แล้ววัดความเข้มของแสงกระเจิงของสารละลายพอลิเมอร์เจือจางหลายความเข้มข้น ที่มุมต่าง ๆ จากนั้นประมาณค่าความเข้มแสงออกนอกช่วงกราฟไปยังตารางที่ 1 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบของดีเทคเตอร์ชนิดการกระเจิงแสงทั้ง 4 ชนิด

พารามิเตอร์	LALLS	MALLS	RALLS	TALLS
มุมในการวิเคราะห์	มุมเดียว (ระหว่างมุม 3-7°)	หลายมุม	มุมเดียว (มุม 90°)	สองมุม (มุม 3-7° กับ 90° และมุม 15° กับ 90°)
น้ำหนักโมเลกุล	*	*	*	*
2 nd virial coefficient (A_2)	*	*	*	*
รัศมีไจเรชัน (R_g)		*		*
บริษัทผู้ผลิต	Viscotek Corp.	● Brookhaven Instruments Corp. ● Wyatt Technology Corp.	Viscotek Corp.	● Precision Detectors, Inc. ● Viscotek Corp.
เอกสารอ้างอิง	1. Christensen et al., 2001 2. Dayal & Mehta, 1994 3. Takagi, 1990 4. Wittgren & Porsch, 2002 5. Wu, 1995 6. Wyatt, 1993	1. Christensen et al., 2001 2. Dayal & Mehta, 1994 3. Wittgren & Porsch, 2002 4. Wu, 1995 5. Wyatt, 1993	1. Christensen et al., 2001 2. Wu, 1995	1. Mourey & Coll, 2003 2. Wu, 1995

หมายเหตุ. * คือ สามารถวิเคราะห์ได้

จุดที่มีความเข้มข้นและมุมเท่ากับ 0 จะสามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้จากจุดตัดแกน y (รูปที่ 5) เรียกวิธีการนี้ว่า “ซิมมพลอต (zimm plot)” และจากกราฟนี้ยังสามารถหาค่ารัศมีไจเรชัน (R_g) ได้จากความชันของเส้นกราฟความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับศูนย์ และค่า A_2 ได้จากความชันของเส้นกราฟของมุมที่ 0 องศา (Zimm, 1948)

ดีเทคเตอร์ชนิดวัดการกระเจิงแสงที่มุมต่ำ (low angle laser light scattering, LALLS)

เป็นดีเทคเตอร์ที่วัดการกระเจิงแสงเพียงมุมเดียว โดยอาศัยเหตุผลทางด้านต้นทุนที่ไม่สามารถวัดความเข้มแสงกระเจิงที่มุม 0 องศา เนื่องจากความเข้มแสงจะแรงมากจนสามารถทำลายโฟโตไดโอดได้ ดังนั้นจึงมีผู้ผลิตบางรายออกแบบดีเทคเตอร์ให้สามารถตรวจวัดความเข้มแสงที่มุมต่ำในช่วงมุม 3-7 องศา ซึ่ง ณ มุมดังกล่าว ค่า $P(\theta)$ จะเข้าใกล้ 1 อย่างไรก็ตามดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีข้อจำกัดคือไม่สามารถวัดค่า R_g ได้ เพราะ R_g เป็นค่าที่ได้จากข้อมูลของการวัดหลายๆ มุม

ดีเทคเตอร์ชนิดวัดการกระเจิงแสงที่มุม 90° (right angle laser light scattering, RALLS)

ใช้การวางโฟโตไดโอดในมุม 90° ซึ่งเป็นมุมที่มีสัญญาณรบกวนเนื่องจากอนุภาคฝุ่นและอื่น ๆ น้อยที่สุดหลักการนี้ใช้ได้ดีกับการวัดสารโมเลกุลขนาดเล็ก (small molecule dimension) ที่มีขนาดน้อยกว่า 10 นาโนเมตร เนื่องจากความเข้มของแสงจะกระเจิงเท่ากันในทุกๆ มุม ดีเทคเตอร์ชนิดนี้มีข้อจำกัดเหมือนกับ LALLS คือ ให้ข้อมูลเฉพาะน้ำหนักโมเลกุล แต่ไม่สามารถให้ข้อมูลของ R_g ได้

ดีเทคเตอร์ชนิดวัดการกระเจิงแสงสองมุม (two-angle laser light scattering, TALLS)

เป็นดีเทคเตอร์ที่ใช้ข้อมูลจากการวัดมุม 2 มุม ซึ่งอาจเป็นการนำดีเทคเตอร์ชนิด LALLS มาต่อรวมเข้ากับ RALLS (หรือบางผู้ผลิตอาจใช้มุม 15° และ 90°) ทำให้ผลตรวจวัดมีความแม่นยำมากขึ้น และจากการรวมข้อมูลจาก 2 มุม ทำให้ดีเทคเตอร์ชนิดนี้สามารถวัดค่า R_g ได้

จากที่กล่าวมาทั้งสิ้น สามารถสรุปภาพรวมเปรียบเทียบความแตกต่างของดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลง

ความเข้มข้นและดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุล

ตัวแปร	ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น	ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล
ดีเทคเตอร์	รีแฟลกทีฟ อินเด็กซ์ ดีเทคเตอร์ (RI), อัลตราไวโอเลต ดีเทคเตอร์ (UV) เป็นต้น	วิสโคมิเตอร์ (VIS) และเครื่องวัดการกระเจิงของแสง (LS)
การเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับสารมาตรฐาน	ต้องการ	ต้องการ (สำหรับ VIS) ไม่ต้องการ (สำหรับ LS)
น้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้	น้ำหนักโมเลกุลแบบสัมพัทธ์	น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง

ระบบ SEC ในปัจจุบัน

หลังจากดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลถูกพัฒนาขึ้น ระบบ SEC ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันจึงมีความหลากหลายขึ้นขึ้นอยู่กับชนิดของดีเทคเตอร์ที่ต่อเข้ากับระบบ ที่พบเห็นโดยทั่วไป ได้แก่

- ระบบ SEC ที่ต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ได้แก่ ระบบ SEC-RI และ SEC-UV

- ระบบ SEC ที่ต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ ระบบ SEC-VIS-RI ระบบ SEC-LS-RI และระบบ SEC-VIS-LS-RI เป็นต้น

มีงานวิจัยศึกษาเปรียบเทียบความแม่นยำของผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากระบบ SEC หลายชนิด

Dayal และ Mehta (Dayal & Mehta, 1994) ทำการทดลองเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากเครื่องวัดการกระเจิงแสงกับผลที่ได้จากระบบ SEC ที่ต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ระบบ SEC-RI ระบบ SEC-VIS-RI และระบบ SEC-LS-RI (ทั้งระบบ SEC-MALLS-RI และ SEC-LALLS-RI) โดยใช้พอลิสไตรีนเป็นสารตัวอย่าง ซึ่งพบว่า การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEC ให้ผลแม่นยำเทียบเท่ากับผลที่ได้จากเทคนิคการกระเจิงแสง โดยระบบ SEC ที่ใช้ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลทั้งระบบ SEC-VIS-RI และระบบ SEC-LS-RI ให้ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดการกระเจิงแสงโดยตรง และเมื่อทำการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิสไตรีนด้วยระบบ SEC-RI (โดยใช้พอลิสไตรีนเป็นสารมาตรฐาน) พบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับระบบ SEC-VIS-RI และระบบ SEC-LS-RI แสดงถึงความแม่นยำของข้อมูลจากการใช้ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น ซึ่งยืนยันได้ว่าหากใช้สารมาตรฐานเป็นชนิดเดียวกันกับสารตัวอย่าง ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ได้จะใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริง และยังพบว่าการใช้ LS ต่างชนิด ได้แก่ MALLS และ LALLS ของระบบ SEC-LS-RI ต่างก็ให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย

แวน ดิจก์และสมิท (Van Dijk & Smit, 2000) ใช้ระบบ SEC-MALLS-UV-RI ศึกษาผลของความแรงไอออน (ionic strength) ของตัวทำละลายที่มีต่อการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยทั่วไปโมเลกุลของโปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีประจุ ดังนั้นการปรับเปลี่ยนพีเอช (pH) และความแรงไอออนของตัวทำละลาย จึงมีผลต่อขนาดโมเลกุลของโปรตีนในตัวทำละลาย มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Potschka, 1988; Wen et al., 1996) พบว่าความแรงไอออนของตัวทำละลายมีผลต่อการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยระบบ SEC-RI/UV เพราะขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันจะส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนไหลออกจากคอลัมน์ช้าหรือเร็วกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งในงานวิจัยของดิจก์และสมิท พบว่า การใช้ดีเทคเตอร์ที่สามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง (MALLS) ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวได้ ดังจะเห็นได้จากผลวิเคราะห์ของการวัดน้ำหนักโมเลกุลของสารละลายโปรตีน (เบต้า-แลคโตโกลบูลิน) ที่ใกล้เคียงกัน แม้ว่าพีเอชที่สภาวะพีเอชแตกต่างกันคือ 5.2 และ 7.0 โดยพบว่าน้ำหนักโมเลกุลมีค่าเท่ากับ $39,300 \pm 800$ และ $40,500 \pm 1,100$ กรัม/โมล ตามลำดับ นอกจากนี้ พวกเขายังค้นพบว่าดีเทคเตอร์ชนิด MALLS มีความสามารถในการตรวจจับการเกิดตกตะกอนของโปรตีน ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยอัลตราไวโอเลตดีเทคเตอร์

ซินัลและคณะ (Chenal et al., 2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันของพอลิเปปไทด์ เมื่อมีการติดแคลเซียมลงบนโมเลกุลโดยใช้ระบบ SEC-VIS-LS-RI เปรียบเทียบกับ SEC-RI พบว่า พอลิเปปไทด์ที่มีการติดแคลเซียมลงบนโมเลกุลมีการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันไปจากเดิมทำให้ปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกของพอลิเปปไทด์ที่มีการติดแคลเซียม แตกต่างจากพอลิเปปไทด์ที่ไม่ได้ติดแคลเซียม แต่ค่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างทั้งคู่ที่วิเคราะห์ด้วยระบบ SEC-VIS-LS-RI ยังคงเท่าเดิม ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยระบบ SEC-RI แล้วพบว่า ปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกที่ไม่เท่ากันของทั้งสองตัวอย่างส่งผลให้พีคออกที่เวลาต่างกัน โดยน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของตัวอย่างที่ติดและไม่ติดแคลเซียมเท่ากับ 73 และ 600 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ดังตารางที่ 3) จากผลการ

ทดลองของคินัล และคณะ สามารถสรุปได้ว่า ระบบ SEC ที่ต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล มีประสิทธิภาพในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันและปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกของตัวอย่างพอลิเมอร์ ซึ่งระบบ SEC-RI กลไกการแยกจะขึ้นอยู่กับ

ปริมาตรเชิงไฮโดรไดนามิกเพียงอย่างเดียว จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันได้ ทำให้ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยระบบ SEC-RI อาจเกิดความผิดพลาดได้

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEC จากงานวิจัยของคินัล และคณะ

พารามิเตอร์	หน่วย	apo-RD ¹	holo-RD ²
ปริมาตรที่สารถูกชะออกจากคอลัมน์	มล.	10.4	13.8
ค่าการเปลี่ยนแปลงของดัชนีการหักเหของแสงต่อความเข้มข้น (dn/dc)	ลบ.ซม./กรัม	0.184	0.184
ค่าความหนืดที่แท้จริง ($[\eta]$)	เดซิลิตร/กรัม	0.35	0.055
น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (ได้จากระบบ SEC-VIS-LS-RI)	กก./โมล	73.6	73.2
น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (ได้จากระบบ SEC-RI)	กก./โมล	600	73

หมายเหตุ. 1 คือ พอลิเปปไทด์ที่ไม่ได้ติดแคลเซียมลงบนโมเลกุล

2 คือ พอลิเปปไทด์ที่มีการติดแคลเซียมลงบนโมเลกุล

ที่มา: Chenal et al., 2009

จากตัวอย่างงานวิจัยข้างต้น ถึงแม้ว่า ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นจะมีข้อจำกัดในด้านการศึกษาคอนฟอร์เมชัน ซึ่งอาจมีผลต่อความถูกต้องของน้ำหนักโมเลกุล อีกทั้งการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจะต้องมีค่าเข้าใกล้ค่าที่แท้จริงก็ต่อเมื่อใช้สารมาตรฐานเป็นชนิดเดียวกันกับสารตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นก็มีข้อดีในด้านสามารถวิเคราะห์ผลได้ง่าย รวดเร็ว มีความแม่นยำ และมีวิธีการไม่ยุ่งยากในการวิเคราะห์ และที่สำคัญเหตุผลในด้าน

ราคาที่ดีกว่าดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลหลายเท่าตัว จึงทำให้ยังคงได้รับความนิยมใช้วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลแบบสัมพันธ์กับงานประเภทตรวจสอบคุณภาพที่ต้องวิเคราะห์เป็นประจำและมีปริมาณมาก ๆ ดังนั้น การเลือกใช้ดีเทคเตอร์ประเภทใดนั้นจึงขึ้นอยู่กับลักษณะข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์เป็นสำคัญและสามารถแสดงข้อมูลที่ได้จากดีเทคเตอร์ชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องวัดการกระเจิงแสงและวิสโคมิเตอร์ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงขีดความสามารถของเทคนิค SEC ที่ต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับการวัดการกระเจิงแสงและวิสโคมิเตอร์

ข้อมูล	SEC-RI	SEC-VIS-RI	SEC-LS-RI	SEC-VIS-LS-RI	LS	Viscometer
• น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n)	*	*	*	*		
• น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w)	*	*	*	*	*	
• น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (M_v)		*		*		*
• ค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (MWD)	*	*	*	*		
• รัศมีไจเรชัน (R_g)			*	*	*	
• รัศมีไฮโดรไดนามิก (R_h)		*		*	*	*
• virial coefficient (A_2)			*	*	*	
• การทำนายโครงสร้างจาก Mark-Houwink parameters (K and a)		*		*		*
• ความหนืดแท้จริง ($[\eta]$)		*		*		*
• การวิเคราะห์ไฮโดรเจล		*		*		*
• น้ำหนักโมเลกุลแบบสัมพันธ์	*					
• น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง		*	*	*	*	*
เอกสารอ้างอิง	1. Dayal & Mehta, 1994 2. Huang et al., 2004	1. Dayal & Mehta, 1994 2. Huang et al., 2004	1. Christensen et al., 2001 2. Dayal & Mehta, 1994 3. Huang et al., 2004 4. Laguna et al., 2001	1. Beer et al., 1999 2. Coelho et al., 2006 3. Huang et al., 2004 4. Keary, 2001 5. Liu et al., 2006	1. Christensen et al., 2001 2. Wyatt, 1993	1. Christensen et al., 2001

หมายเหตุ. * คือ สามารถวิเคราะห์ได้

บทสรุป

เป็นเวลากว่า 5 ทศวรรษแล้วที่เทคนิค SEC ยังคงได้รับความไว้วางใจในการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ ซึ่งปฏิเสธไม่ได้ว่า เป็นผลสืบเนื่องมาจากการพัฒนาอย่างต่อเนื่องของเทคนิค SEC นั้นเอง เทคนิค SEC-RI โดดเด่นในแง่ของความสะดวกและรวดเร็วในการวิเคราะห์ อีกทั้งความสามารถในการหาค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้อย่างง่ายดายภายในเทคนิคเดียว อย่างไรก็ตาม SEC-RI ยังมีข้อด้อยในด้านไม่สามารถวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงให้กับพอลิเมอร์ทุกประเภทได้ ซึ่งต่อมาในภายหลังมีการพัฒนาระบบดีเทคเตอร์ชนิดไวต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลขึ้นทำให้ระบบ SEC สามารถวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงได้ และยังสามารถให้ข้อมูลทางด้านการจัดเรียงตัวของสายโซ่พอลิเมอร์ในตัวทำละลายใดๆ รวมไปถึงข้อมูลของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างพอลิเมอร์กับตัวทำละลายได้อีกด้วย ระบบ SEC ในปัจจุบันจึงสามารถให้ข้อมูลที่มากกว่าน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งผู้ใช้งานสามารถเลือกใช้ดีเทคเตอร์ให้เหมาะสมกับลักษณะงานหรือข้อมูลที่ต้องการ

เอกสารอ้างอิง

- Beer, M. U., Wood, P. J., & Weisz, J. (1999). A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. *Carbohydrate Polymers*, 39, 377-380.
- Bly, D. (1970). Gel permeation chromatography. *Science*, 168, 527-533.
- Buytenhuys, F. A., & Van Der Maeden, F. P. B. (1978). Gel permeation chromatography on unmodified silica using aqueous solvents. *Journal of Chromatography A*, 149, 489-500.
- Christensen, B. E., Ulset, A. S., Beer, M. U., Knuckles, B. E., Williams, D. L., Fishman, M. L., et al. (2001). Macromolecular characterization of three barley β -glucan standards by size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscometry: An inter-laboratory study. *Carbohydrate Polymers*, 45, 11-22.
- Coelho, F. J., Gonçalves, M. F. O., Miranda, D., & Gil, M. H. (2006). Characterization of suspension poly(vinyl chloride) resins and narrow polystyrene standards by size exclusion chromatography with multiple detectors: Online right angle laser-light scattering and differential viscometric detectors. *European Polymer Journal*, 42, 751-763.
- Dayal, U., & Mehta, S. K. (1994). Studies on molecular weight determination using refractive index and multi-angle laser light scattering detectors in size exclusion chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 17, 303-316.
- Grubisic, Z., Rempp, P., & Benoit, H. (1967). A universal calibration for gel permeation chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, 5, 753-759.
- Hirayama, C., Ihara, H., Shiba, M., Nakamura, M., Motozato, Y., & Kunitake, T. (1987). Macroporous glucomannan spheres for the size-exclusion separation of aqueous macromolecules. *Journal of Chromatography A*, 409, 175-181.
- Hjertén, S., & Eriksson, K. (1984). High-performance molecular sieve chromatography of proteins on agarose columns: The relation between concentration and porosity of the gel. *Analytical Biochemistry*, 137, 313-317.
- Huang, Y., Peng, H., Lam, W. Y., Xu, Z., Leung, S. M., Mays, W., et al. (2004). Linear or branched structure? Probing molecular architectures of fullerene-styrene copolymers by size exclusion chromatographs with online right-angle laser-light scattering and differential viscometric detectors. *Polymer*, 45, 4811-4817.
- Keary, C. M. (2001). Characterization of METHOCEL cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors. *Carbohydrate Polymers*, 45, 293-303.
- Kirkland, J. J. (1976). Porous silica microspheres for high-performance size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 125, 231-250.
- Laguna, M. T. R., Medrano, R., Plana, M. P., & Tarazona, M. P. (2001). Polymer characterization by size-exclusion chromatography with multiple detection. *Journal of Chromatography A*, 919, 13-19.

- Lathe, G. H., & Ruthven, C. R. (1955). The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water. *Biochemical Journal*, 60, xxxiv.
- Lathe, G. H., & Ruthven, C. R. (1956). The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochemical Journal*, 62, 665–674.
- Liu, X. M., Gao, W., Maziarz, E. P., Salamone, J. C., Duex, J., & Xia, E. (2006). Detailed characterization of cationic hydroxyethylcellulose derivatives using aqueous size-exclusion chromatography with on-line triple detection. *Journal of Chromatography A*, 1104, 145–153.
- Moore, J. C. (1964). Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science Part A*, 2, 835–843.
- Mourey, T. H., & Coll, H. (2003). Size-exclusion chromatography with two-angle laser light-scattering (SEC-TALLS) of high molecular weight and branched polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 56, 65–72.
- Oliva, A., Llabrés, M., & Fariéa, J. B. (2009). Estimation of uncertainty in size-exclusion chromatography with a double detection system (light-scattering and refractive index). *Talanta*, 78, 781–789.
- Poché, D. S., Ribes, A. J., & Tipton, D. L. (1998). Characterization of MethocelTM: Correlation of static light-scattering data to GPC molar mass data based on pullulan standards. *Journal of Applied Polymer Science*, 70, 2197–2210.
- Porath, J., & Flodin, P. (1959). Gel filtration: A method for desalting and group separation. *Nature*, 183, 1657–1659.
- Potschka, M. (1988). Size-exclusion chromatography of polyelectrolytes: Experimental evidence for a general mechanism. *Journal of Chromatography A*, 441, 239–260.
- Sperling, L. H. (1992). Introduction to physical polymer science (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Takagi, T. (1990). Application of low-angle laser light scattering detection in the field of biochemistry. *Journal of Chromatography*, 506, 409–416.
- Van Dijk, J. A. P. P., & Smit, J. A. M. (2000). Size-exclusion chromatography-multiangle laser light scattering analysis of β -lactoglobulin and bovine serum albumin in aqueous solution with added salt. *Journal of Chromatography A*, 867, 105–112.
- Wen, J., Arakawa, T., & Philo, J. S. (1996). Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Analytical Biochemistry*, 240, 155–166.
- Wittgren, B., & Porsch, B. (2002). Molar mass distribution of hydroxypropyl cellulose by size exclusion chromatography with dual light scattering and refractometric detection. *Carbohydrate Polymers*, 49, 457–469.
- Wu, C. H. (Eds.). (1995). Handbook of size exclusion chromatography (2nd ed.). New York: Marcel Dekker.
- Wyatt, P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*, 272, 1–40.
- Yau, W. W., Ginnard, C. R., & Kirkland, J. J. (1978). Broad-range linear calibration in high-performance size exclusion chromatography using column packings with bimodal pores. *Journal of Chromatography A*, 149, 465–487.
- Young, R. J. & Lovell, P. A. (1991). *Introduction to polymer* (2nd ed.). London: Chapman & Hall.
- Zimm, B. H. (1948). The scattering of light and the radical distribution function of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 16, 1093–1099.