วิธีโครมาโตกราฟี
Chromatographic method

บทที่ 12
วิธีโครมาโตกราฟี
(Chromatographic Method)

หลักการ (Principle)

โครมาโตกราฟีเป็นวิธีการแยกสารโดยให้องค์ประกอบที่ถูกแยกกระจายอยู่ระหว่างเฟส (phase) 2 เฟสที่แตกต่างกัน เฟสหนึ่งเป็นเฟสที่อยู่นิ่งเรียกว่า stationary phase อีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ได้เรียกว่า mobile phase เมื่อมวลของสารที่ต้องการแยกเกิดการแบ่งส่วนกันระหว่าง stationary phase กับ mobile phase ที่เป็นของเหลวทั้งสองชนิดโดยมีตัวช่วยสนับสนุนที่เป็นของแข็ง (solid support) จะเรียกขบวนการนี้ว่า partition chromatography ถ้ามวลของสารที่ถูกแยกสามารถถูกดูดซับด้วยเฟสอีกเฟสหนึ่งที่เป็นของแข็งเรียกขบวนการนี้ว่า adsorption chromatography จะเห็นได้ว่าวิธีการโครมาโตกราฟีเป็นการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพเช่น การแบ่งส่วน partition และ การดูดซับ (adsorption) ของสารระหว่างเฟสทั้งสองซึ่งแตกต่างไปจากการแยกโดยวิธีตกตะกอนที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมี วิธีการโครมาโตกราฟีถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Michael Tswett ในปี ค.ศ. 1906 ในการแยกสารมีสี (pigment)ในพืชโดยให้สารมีสีละลายในปิโตรเลียมแล้วผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่าสารมีสีที่ถูกดูดซับได้ดีจะเป็นแถบสีอยู่บนสุดของคอลัมน์และสารที่ถูกดูดซับได้เลวกว่าจะเป็นแถบสีต่ำลงมา เมื่อผ่านปิโตรเลียมลงในคอลัมน์เรื่อย ๆ พบว่าแถบสีแต่ละแถบสามารถเคลื่อนที่ต่ำลงมาได้ซึ่ง Tswett ได้เรียกวิธีการนี้ว่า **โครมาโตกราฟี** และชื่อนี้ก็ได้ถูกใช้มาโดยตลอดถึงแม้ว่าจะได้มีการพัฒนาวิธีการนี้ต่อมาอีกหลายแบบ

วิธีการของโครมาโตกราฟีได้พัฒนาต่อมาเรื่อย ๆ จนสามารถจัดแบ่งประเภทของวิธีการวิเคราะห์ได้หลายแบบตามชนิดของเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ได้ โดยปกติเฟสที่อยู่กับที่อาจเป็นได้ทั้งของแข็งหรือของเหลวส่วนเฟสที่เคลื่อนที่ได้จะเป็นของเหลวหรือกาซ ดังนั้นวิธีการของโครมาโตกราฟีจึงแบ่งได้เป็น 4 วิธี คือ

1. **Liquid-Solid Chromatography** เช่นการแยกสารมีสีผ่านคอลัมน์ที่มีตัวดูดซับเช่น $CaCO_3$ บรรจุอยู่โดยใช้ปิโตรเลียมเป็นเฟสที่เคลื่อนที่ได้

2. Gas-Solid Chromatography หรือเรียกย่อ ๆ ว่า GSC วิธีการนี้ใช้กาซเป็นตัวเคลื่อนที่เพื่อหาเอาสารตัวอย่างที่เป็นกาซและถูกดูดซับไว้ด้วยของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์แล้วใช้เครื่องมือวัดปริมาณสารที่ถูกพาออกมา (elute)

3. Liquid - Liquid chromatography การแยกโดยวิธีนี้ทำได้ทั้งในรูปของคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจลเป็นตัวซัพพอทและแผ่นราบ (plane) เช่น paper chromatography และ Thin Layer chromatography

4. Gas - Liquid chromatography มีชื่อย่อว่า GLC วิธีการนี้ต้องอาศัยเครื่องมือในการวัดสารตัวอย่างที่ถูกแยกออกมาเช่นเดียวกับวิธีของ GSC สำหรับเฟสที่อยู่กับที่ซึ่งเป็นของเหลวบรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้โดยใช้ของแข็งเป็นตัวซัพพอท (Solid support)

นอกจากวิธีที่จัดแบ่งแล้วนี้วิธีการโครมาโตกราฟียังได้มีการพัฒนาต่อมาอีกจนพบวิธีการแยกสารที่เรียกว่า Electrochromatography or Electrophoresis และ ion exchange chromatography

การเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก

สารที่ต้องการแยกต้องไม่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเฟสที่เคลื่อนที่ซึ่งเป็นตัวพาบางทีเรียกว่า eluent ความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารสามารถวัดได้ในเทอม R (คือ retention ratio หรือ retardation factor สารแต่ละตัวจะมีค่า R ไม่เท่ากัน

$$R = \frac{t_m}{t_m + t_s} \qquad .....(12.1)$$

t_m คือ เวลาที่โมเลกุลของสารอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่
t_s คือ เวลาที่โมเลกุลของสารอยู่ในเฟสที่อยู่กับที่

ในกรณีที่ค่า R = 0.25 หมายความว่าสารใช้เวลา 25 เปอร์เซนต์อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่หรือสามารถเดินทางไปกับ eluentได้ 25 เปอร์เซนต์ ให้สังเกตว่าถ้าค่า R = 1.0 แสดงว่าสารนั้นเคลื่อนที่ไปกับ eluent ได้ด้วยความเร็วเท่า ๆ กัน

อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่กระจายอยู่ในเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ได้ของสารแต่ละชนิดจะเป็นค่าคงที่ที่เรียกว่า partition coefficient (K)

$$K = \frac{C_s}{C_m} \qquad .....(12.2)$$

C_s = ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในเฟสที่อยู่กับที่

C_m = ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่

[อัตราส่วนของเวลาที่สารกระจายในแต่ละเฟส] = [อัตราส่วนของปริมาณของสารในแต่ละเฟส] = [partition coefficient X อัตราส่วนของปริมาตรของแต่ละเฟส]

$$\frac{t_s}{t_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} \qquad .....(12.3)$$

จากสมการ 12.1

$$R = \frac{1}{1 + \frac{t_s}{t_m}}$$

$$= \frac{1}{1 + K \frac{V_s}{V_m}}$$

$$= \frac{V_m}{V_m + K V_s} \qquad .....(12.4)$$

สมการที่ 12.4 เป็นสมการที่แสดง retention ratio ในเทอมของค่า partition coefficient และ column parameter การพิจารณาการแยกสารจากค่า Retention ratio ในทางปฏิบัติทำได้ยากมากเพราะว่าค่า partition coefficient หาได้ยาก เนื่องจากการแยกต้องสมมุติว่าคอลัมน์ประกอบด้วยจำนวนชั้นของการแยกหลาย ๆ ชั้นเป็น *theoretical plate* แต่ละ plate สามารถแยกได้ 1 ครั้ง (batch separation)

ค่า partition coefficient สามารถเกิดขึ้นได้ในแต่ละชั้นของการแยก ดังนั้นการพิจารณาการแยกสารควรศึกษาจากค่า R_f - factor ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของระยะทางการเคลื่อนที่ของสารต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของ eluent

กล่าวคือ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลาย}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย}}$$

ตัวถูกละลายหมายถึงสารที่ต้องการแยกและละลายในเฟสที่เคลื่อนที่ได้

ตัวทำละลายหมายถึงเฟสที่เคลื่อนที่ได้หรือ eluent โดยปกติเคลื่อนที่เร็วกว่าตัวถูกละลาย

ในการทดลองที่ควบคุมสภาวะของการทดลองให้คงที่และเหมือนกันพบว่าค่า R_f จะคงที่สำหรับตัวถูกละลายชนิดหนึ่ง ๆ ซึ่งการวัดค่า R_f ของสารสามารถบอกได้ว่าสารนั้นคือสารใดในแง่ของคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้น

การทดลองที่ 12.1

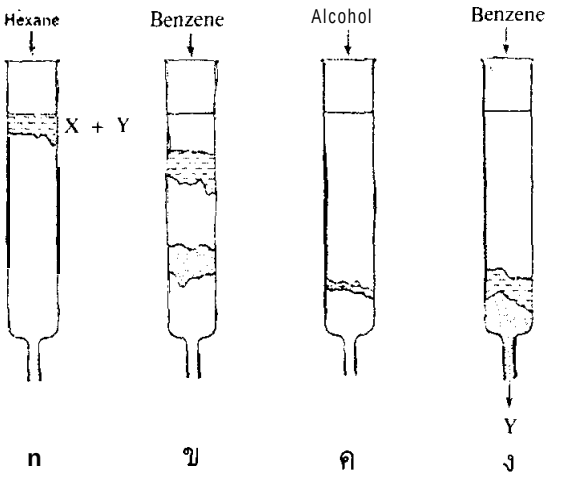
การแยก Cis และ transอะโซเบนซิน

จุดประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด liquid - Solid Chromatography
2. แยกอะโซเบนซินที่อยู่ในรูปของ Cis ออกจาก trans
3. หาค่าคงที่ของสมดุลระหว่าง Cis และ trans isomer

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

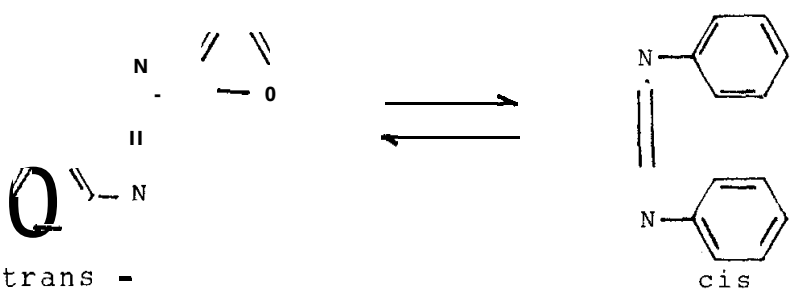
การแยกสาร 2 ตัวผสมกันอยู่โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีจะกระทำได้เมื่อโมเลกุลของสารสองตัวนั้นมีความสามารถในการถูกดูดซับไว้ที่ของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้แตกต่างกัน ถ้าสารสองชนิดนั้นเป็นสารอินทรีย์ที่มีความเป็นโพลาร์เล็กน้อย เช่น โมเลกุล X และ Y ที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายนอนโพลาร์ เช่น เฮกเซน, สาร X และ Y สามารถถูกดูดซับไว้ที่ของแข็งที่เป็นโพลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 12.1 (ก) เมื่อผ่านตัวทำละลายเฮกเซนลงไปในคอลัมน์ต่อไปอีกเท่าไรก็ตาม X และ Y จะไม่เคลื่อนที่ เพราะว่าโมเลกุลของ X และ Y จะถูกดูดซับไว้ได้อย่างเหนียวแน่น ถ้าเปลี่ยนตัว eluent มาเป็นเบนซิน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์มากกว่าเฮกเซนผ่านลงในคอลัมน์พบว่า X และ Y สามารถเคลื่อนที่ผ่านลงในคอลัมน์ได้ เนื่องจาก X และ Y มีความสามารถในการถูกดูดซับและการละลายในตัวทำละลายได้แตกต่างกัน ดังนั้นสารทั้งสองจึงเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยความเร็วที่แตกต่างกันทำให้แยก X และ Y ออกจากกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 12.1 (ข) ถ้าเปลี่ยนตัว eluent ให้เป็นโพลาร์มากขึ้น เช่น แอลกอฮอล์ทั้ง X และ Y จะเคลื่อนที่ในคอลัมน์ลงมาพร้อมกันอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 12.1 (ค)



รูปที่ 12.1 การใช้ eluent ชนิดต่าง ๆ

สรุปได้ว่าวิธีการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีกระทำได้โดยใช้ตัวทำละลาย ละลายสารผสมที่ต้องการแยกเมื่อใส่สารละลายผสมลงในคอลัมน์แล้วจะต้องเกิดการดูดซับได้ดี คือตัวทำละลายจะต้องไม่ช่วยพาให้สารผสมนั้นเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ หลังจากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ให้มีคุณสมบัติที่สามารถพาสารที่ถูกดูดซับไว้ในคอลัมน์เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ลงมาได้ ตัวทำละลายนี้เรียกว่า eluent ขบวนการที่ตัวถูกละลายสามารถเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เรียกว่าการอีลูท (elution) ดังแสดงในรูปที่ 12.1 (ง) นั่นคือสิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือการศึกษาคุณสมบัติของสารต่าง ๆ ที่นำมาใช้เป็นตัวดูดซับ (absorbent), ตัวทำละลาย และตัวอีลูท (eluent) การแยกสารเคมีที่เราสนใจจะทำได้สมบูรณ์หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว

อะโซเบนซิน เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วย 2 ไอโซเมอร์ คือ cis และ trans ดังนี้



ทั้ง cis- และ trans-isomer มีจุดหลอมเหลวต่ำและมีค่าไดโพลโมเมนต์ (dipolemoment) สูง สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายโพลาร์ cis-form ไม่ค่อยเสถียร ส่วน trans-form เสถียรกว่า โดยปกติของแข็งอะโซเบนซินจะอยู่ในรูปของ trans-form เมื่อผ่านแสงที่อะโซเบนซินสามารถดูดกลืนพลังงาน (hν) ได้ มันจะเปลี่ยนจาก trans-form เป็น cis-form ดังนี้

$$\text{light absorption trans} \underset{}{\overset{h\nu}{\rightleftharpoons}} \text{Cis}$$

$$\text{Thermal (very slow) trans} \longleftarrow \text{Cis}$$

เมื่อปฏิกิริยาถึงสมดุลสารละลายจะประกอบด้วยอะโซเบนซินชนิด cis-form ประมาณ 15 ถึง 40% (ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้)

สมดุลของปฏิกิริยาคงที่ได้นานดังนั้นจึงสามารถแยก cis-form และ trans-form ออกจากกันโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวดูดซับ (absorbent) ที่ใช้ควรเป็นโพลาร์ เช่น อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3) และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย cis-form จะเป็นโพลาร์มากกว่าดังนั้นจึงถูกดูดซับได้ดีกว่า แต่ถ้าใช้คอลัมน์เป็นผงถ่านและเมธานอลเป็นตัวทำละลาย trans-form จะถูกดูดซับได้ดีกว่า

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- แท่งแก้วคอลัมน์ขนาด 0.5 × 12″ (อาจใช้บิวเร็ตขนาด 50 มล. แทนก็ได้)
- ใยแก้ว (glass wool)
- บีคเกอร์ขนาด 250 มล. 4 ใบ
- กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มล. 2 อัน
- ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. 3 ใบ
- เครื่องมือโพลาโรกราฟี 1 ชุด
- ขวดรูปกรวยขนาด 125 มล. 3 ใบ

สารละลายและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- อลูมิเนียมออกไซด์ ขนาด 100 เมช (mesh)
- ปิโตรเลียมอีเทอร์
- อะโซเบนซินในปิโตรเลียมอีเทอร์ (เข้มข้น 3 - 4 กรัม/ลิตร)
- เอธิลอีเทอร์
- เมธานอล
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 M จำนวน 250 มล.

วิธีทดลอง

1) ใช้ใยแก้วอุดที่ปลายคอลัมน์ใส่ปิโตเลียมอีเทอร์ไว้ให้สูงประมาณ 8 นิ้ว

2) นำอะลูมิเนียมออกไซด์กวนให้แขวนลอยในปิโตรเลียมอีเทอร์แล้วค่อย ๆ เทลงในคอลัมน์อย่างช้า ๆ บรรจุอะลูมิเนียมออกไซด์ในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 4 - 5 นิ้ว ปิดส่วนบนของคอลัมน์ด้วยใยแก้วเช่นกัน ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษไม่ให้ปิโตรเลียมอีเทอร์ในคอลัมน์แห้ง ระดับของปิโตรเลียมอีเทอร์ต้องอยู่สูงกว่าอะลูมิเนียมออกไซด์เล็กน้อยตลอดเวลาที่ทำการทดลอง (ป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศ)

3) ปิเปตสารละลายอะโซเบนซินในปิโตรเลียมอีเทอร์มา 5 มล. ใส่ลงในคอลัมน์ ปล่อยให้ตัวทำละลายในคอลัมน์มีอัตราไหลผ่านคอลัมน์อย่างช้า ๆ ประมาณ 10 หยดต่อนาที จนเกือบถึงใยแก้ว (ต้องระวังไม่ให้แห้ง)

4) ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ผ่านลงไปในคอลัมน์เรื่อย ๆ จะปรากฏอะโซเบนซินแยกเป็น 2 แถบ อย่างรวดเร็ว วัดระยะทางของ trans-azobenzene ที่เคลื่อนที่ไปเมื่อผ่านปริมาตรของปิโตรเลียมอีเทอร์ไปจำนวน 20 มล. (ให้วัดระยะทางเป็น มล. ของ trans-azobenzene ที่เคลื่อนที่ได้ ถ้าใช้บิวเร็ตเป็นคอลัมน์ ให้อ่านเป็นปริมาตรจากบิวเร็ตได้ทันที) คำนวณหาค่า R_f ของ trans-azobenzene

5) ถ้าต้องการให้ trans-azobenzene เคลื่อนที่เร็วขึ้นให้เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 20% เอธิลอีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์ บันทึกการเคลื่อนที่ของ trans-azobenzene ในตัวทำละลายนี้แล้วเปรียบเทียบกับตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์

6) ให้อีลูท trans-azobenzene ออกจากคอลัมน์ให้หมดด้วยเอธิลอีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์ และเก็บสารละลายที่อีลูทได้นี้ทั้งหมดในขวดรูปกรวย

7) ทำการอีลูท cis-form โดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์มากขึ้น คือ 5% เมธานอลในปิโตรเลียมอีเทอร์ เก็บสารละลายที่เป็น cis-form ทั้งหมดในขวดรูปกรวย

8) ทำการระเหยตัวทำละลายที่เก็บได้ในข้อ 6 และ 7 โดยใช้การกลั่นแบบลดความดัน

9) ให้แอลกอฮอล์จำนวนน้อย ๆ ละลายสารที่เหลือจากการระเหยถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล. แล้วเจือจางด้วย 0.2 M NaOH กับน้ำกลั่น จนพอดีขีด และให้มีความเข้มข้นของ NaOH ประมาณ 0.1M

10) นำสารละลายแต่ละส่วนมาทำโพลาโรแกรมทันทีที่เตรียมเสร็จ สมมุติว่าทั้ง cis- และ trans-isomer มีค่า diffusion coefficient เท่านั้น จงคำนวณหาค่าคงที่ของสมดุลระหว่าง cis- และ trans - isomer

การทดลองที่ 12.2

การแยกองค์ประกอบของน้ำหมึกสีดำโดยวิธีการของ paper chromatography

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

Paper chromatography เป็นเทคนิคและวิธีการหนึ่งของ liquid-liquid chromatography โดยอาศัยหลักของการแบ่งส่วนซึ่งเรียกว่า partition chromatography ที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Martin และ synge กระดาษกรอง (Filter paper) จะทำหน้าที่เป็นตัวซัพพอท น้ำในกระดาษทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำทำหน้าที่เป็นเฟสที่เคลื่อนที่ซึ่งเรียกว่าสารละลายดีเวลลอป (developing solution) สารละลายดีเวลลอปจะเคลื่อนที่ผ่านกระดาษพร้อมกับพาตัวถูกละลายที่จุด (spot) ไว้บนกระดาษเคลื่อนที่ไปด้วย ถ้ามีตัวถูกละลายหลายตัวจะเคลื่อนที่ได้ด้วยความเร็วต่างกัน ตามค่า R_f value ของตัวถูกละลาย เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลายดีเวลลอป จะต้องจุ่มกระดาษในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด เมื่อให้เวลาในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายและตัวถูกละลายเพียงพอแล้ว ให้ทำเครื่องหมายที่ตัวทำละลายดีเวลลอปเคลื่อนที่มาถึงระยะสุดท้าย ต่อจากนั้นระเหยตัวทำละลายดีเวลลอปออกจากกระดาษจนแห้งตัวถูกละลายจะไม่ระเหยไปด้วย แต่ยังคงอยู่บนกระดาษซึ่งอาจสังเกตไม่เห็นต้องใช้รีเอเจนต์อีกตัวหนึ่งฉีดพ่นบนกระดาษ รีเอเจนต์นี้จะทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายแล้วปรากฏเป็นสีขึ้น ทำให้เห็นตำแหน่งของตัวถูกละลายที่เคลื่อนที่ไป เมื่อวัดระยะทางที่ตัวทำละลายดีเวลลอปเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวถูกละลาย เคลื่อนที่บนกระดาษก็สามารถคำนวณหาค่า R_f ได้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ค่า R_f สามารถช่วยบอกได้ว่าสารนั้นคือสารใดได้เพราะสารแต่ละตัวมีค่า R_f ไม่เท่ากัน สำหรับวิธีของ paper chromatography สามารถใช้แยกสารผสมของกรดอะมิโน, น้ำตาล, โปรตีน และสารอนินทรีย์ต่าง ๆ ฯลฯ ได้เป็นอย่างดี

จุดประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการของ paper chromatography
2. แยกส่วนประกอบของน้ำหมึกสีดำ (black ink)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- หลอดแก้วทดลองยาว 12 นิ้ว
- ขวดฉีดพ่นสารละลาย 1 ใบ
- เข็มหมุดติดกระดาษ, คลิปติดกระดาษ
- กระดาษกรองเป็นแผ่นขนาด ½ × 11"

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำหมึกสีดำ
- เมธานอล
- เอธานอล
- HCl 0.1 M
- NH_3 เข้มข้น

วิธีทดลอง

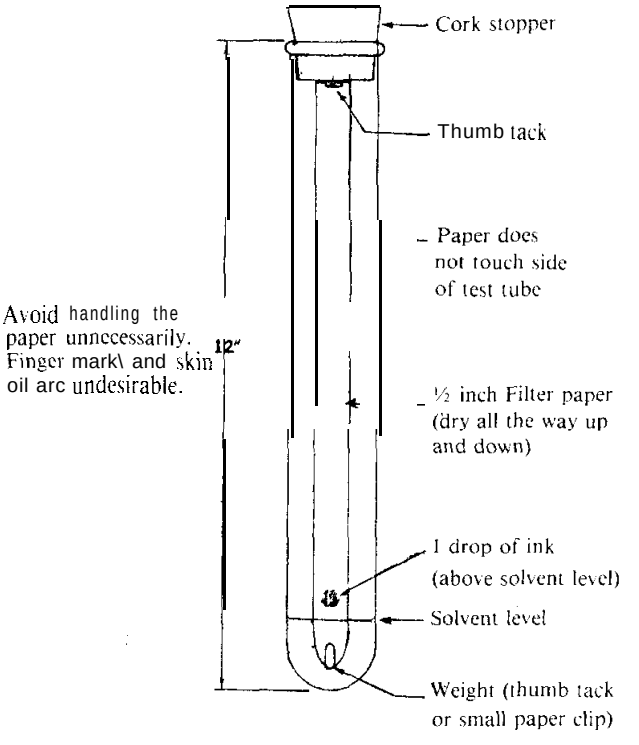
1. หยดน้ำหมึกสีดำลงบนกระดาษกรองให้เหนือปลายสุดของกระดาษมาครึ่งนิ้วโดยทำเครื่องหมายไว้ด้วย

2. ในหลอดทดลองให้บรรจุตัวทำละลายดีเวลลอปไว้ 10 มล, ตัวทำละลายดีเวลลอปได้แก่ เมธิลแอลกอฮอล, แอมโมเนียเข้มข้น, เอธานอล, 50 : 50 น้ำ : เมธานอล และ 0.1 M HCl ให้ทำการทดลองกับตัวทำละลายดีเวลลอปนี้ทุกตัว

3. ให้ถ่วงน้ำหนักกระดาษกรองด้วยคลิปติดกระดาษ เพื่อให้กระดาษกรองเรียบและตรง

4. ยึดกระดาษกรองให้ติดกับจุกคอร์กด้วยเข็มหมุดติดกระดาษ

5. ใส่กระดาษกรองลงในหลอดทดลองให้ระดับของตัวทำละลายดีเวลลอปอยู่ต่ำกว่าจุดของหมึกสีดำ ดังแสดงในรูปที่ 12.2



รูปที่ 12.2 รูปแสดงก ารทำ ***paper*** *chromatography*

6. ปล่อยให้ขบวนการโครมาโตกราฟีดำเนินไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งตัวทำละลายดีเวลลอปเคลื่อนที่เกือบถึงจุกคอร์ก เหลืออีกประมาณ 1 นิ้ว หยุดการทดลอง

7. นำเอากระดาษกรองออกจากหลอดทดลองปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง จะปรากฏจุดสีต่าง ๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของหมึกสีดำ เปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ทำได้จากการใช้ตัวทำละลายดีเวลลอปแต่ละชนิด

8. หาค่า R_f

การทดลองที่ 12.3

การแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีกาซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography)

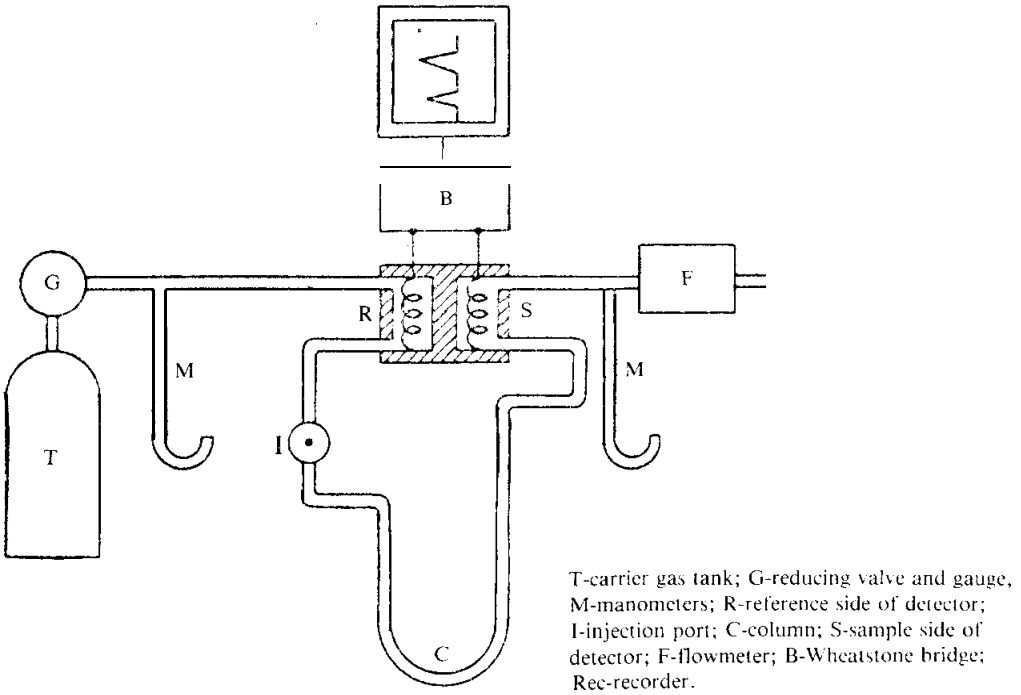
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

กาซโครมาโตกราฟี เป็นวิธีการแยกสารผสมที่สามารถระเหยกลายเป็นไอผ่านไปในคอลัมน์ที่มีเฟสอยู่กับที่ที่เป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งเรียกว่า Gas solid chromatography (GSC) ถ้าเป็นของเหลวเรียกว่า Gas liquid chromatography (GLC) การทดลองนิยมใช้วิธีการของ GLC มากกว่า ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องมือในการทำการทดลองโดยวิธีกาซโครมาโตกราฟีแสดงไว้ในรูปที่ 12.3 กาซซึ่งเป็นเฟสที่เคลื่อนที่หรือตัวพา (carrier) จะถูกปล่อยออกจากถังที่ควบคุมความดันได้ด้วยมาตรวัดความดัน (gauge) สารตัวอย่างในตอนเริ่มต้นเป็นของเหลวจะถูกฉีดเข้าไปในเครื่องมือแล้วถูกแยกโดยกาซผ่านมาเข้า detector ซึ่งจะส่งสัญญาณเป็นกระแสไฟฟ้าให้มิเตอร์อ่านค่าได้ ถ้าปริมาณสารที่ออกมาเข้า detector น้อย มิเตอร์จะอ่านค่าได้น้อย ถ้ามากจะอ่านค่าได้มาก นอกจากนี้อาจต่อเข้ากับเครื่องบันทึก (recorder) ก็ได้ เครื่องบันทึกจะบันทึกภาพออกมาเป็น peak ซึ่งเป็นกราฟที่เขียนระหว่าง detector response กับเวลา กราฟที่ได้นี้เรียกว่าโครมาโตแกรม (Chromatogram) ดังแสดงในรูปที่ 12.4 ความสูงของ peak ที่ได้จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสาร

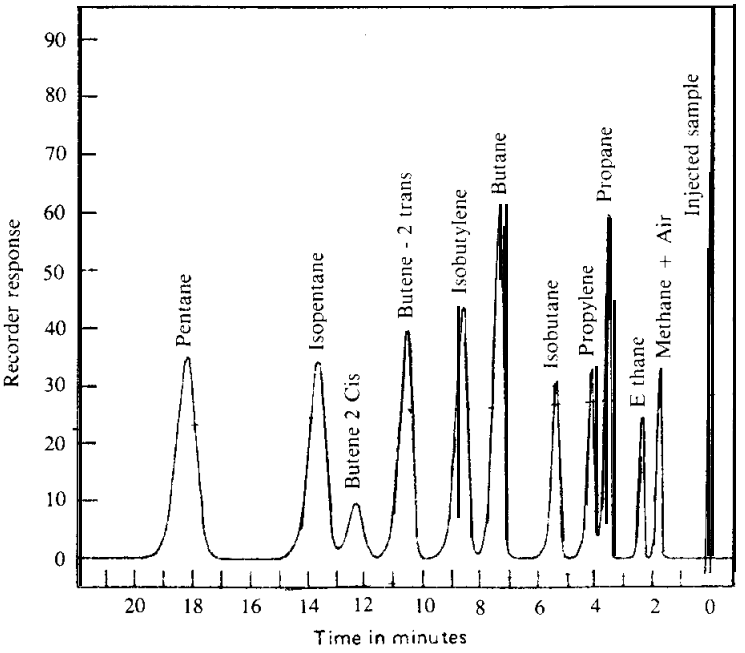
การแยกสารจะทำได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) และ Resolution ประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถอธิบายได้ในเทอมของ Height equivalent to a theoretical plate (HETP) ซึ่งคำนวณได้จากค่าความยาวของคอลัมน์ (L) หารด้วยจำนวนของ theoretical plate (N)

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

ซึ่ง $$N = 16 \left[\frac{t}{W}\right]^2$$



รูปที่ 12.3 ส่วนประกอบของเครื่องมือกาซโครมาโตกราฟี

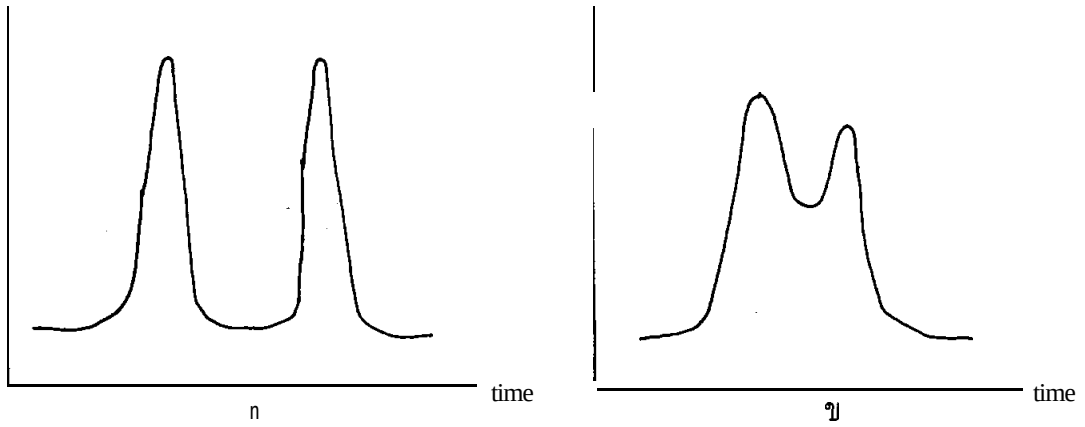


รูปที่ 12.4 โครมาโตแกรม

t = retention time คือเวลาการเคลื่อนที่ของสารจาก injection port ผ่านคอลัมน์มาถึง detector

W = ความกว้างของฐาน (peak)

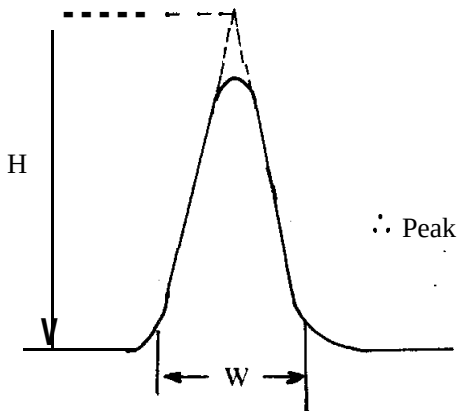
คอลัมน์ที่ดีนั้นค่า N ต้องมีค่าสูงมาก ซึ่งจะทำให้ peak ที่ได้แคบที่สุดเมื่อใช้เวลา Retention time นานที่สุด เนื่องจาก N ควรมีค่ามากจึงสรุปได้ว่าคอลัมน์ที่ดีควรมีค่า HETP น้อยที่สุด ถ้ามีสารผสมที่ต้องการแยกออกจากกัน การแยกนอกจากนั้นขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของคอลัมน์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับสภาวะของการทำการทดลอง (operating condition) เช่น อุณหภูมิ และความเร็วของกาซนำพา (carrier gas) การทดลองที่ให้ resolution ที่ดีจะทำให้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูที่ 12.5 (ก) การทดลองที่ให้ resolution ไม่ดีทำให้ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 12.5 (ข)



รูปที่ 12.5 แสดง resolution ของโครมาโตแกรม

วิธีการของกาซโครมาโตกราฟี สามารถใช้วิเคราะห์ทางคุณภาพ (Qualitative) และทางการหาปริมาณ (Quantitative) การวิเคราะห์ทางคุณภาพสามารถทำได้โดยทำโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทราบว่าสารนั้น ๆ คือสารใด จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ว่าคือสารอะไร ทำโครมาโตแกรมโดยใช้สภาวะของการทดลองแบบเดียวกันทุกอย่าง (identical condition) โดยการวัด retention time ของสารตัวอย่างแล้วเทียบกับสารมาตรฐาน ก็สามารถบอกได้ว่าสารนั้นคือสารใด เพราะสารชนิดเดียวกันเมื่อทำโครมาโตแกรมแล้วจะให้ค่า retention time ที่เท่ากัน วิธีการนี้ต้องใช้กับสารตัวอย่างที่พอจะทราบมาบ้างแล้วว่าเป็นสารพวกใด จึงจะทำ

ให้ทำโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานได้ถูกต้อง เช่น ทราบมาว่าสารตัวอย่างเป็นพวกแอลกอฮอล์ แต่ไม่ทราบว่ามีคาร์บอนกี่ตัวเราก็เลือกทำโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนต่าง ๆ กัน เมื่อเทียบค่า Retention time ของสารมาตรฐานก็สามารถบอกได้ว่าสารตัวอย่างเป็นแอลกอฮอลชนิดใดเป็นต้น ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสามารถทำได้โดยการทำโครมาโต-แกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จากการวัด peak height หรือ peak area ของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานจะทำให้หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ ในการทดลองที่สามารถควบคุมสภาวะของการทดลองได้คงที่ในการทำโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกับสารตัวอย่างและประสิทธิภาพของคอลัมน์ให้ resolution ที่ดีมาก เราสามารถใช้ peak height สำหรับการเทียบหาปริมาณของสารตัวอย่างได้ แต่ในการทดลองทั่วไปการควบคุมสภาวะของการทดลองให้เหมือนกันทุกอย่างทำได้ยาก ดังนั้นการหาปริมาณควรหาจาก peak area พื้นที่ของ peak จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นเช่นเดียวกับ peak height การหา peak area สามารถคำนวณได้แบบเดียวกับการคำนวณพื้นที่สามเหลี่ยม



∴ Peak area = ½ WH

จุดประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการใช้เครื่องมือกาซโครมาโตกราฟี สำหรับการทดลองเรื่อง gas-liquid chromatography (GLC)

2. วิเคราะห์ว่าสารตัวอย่างที่ได้รับคือสารใด

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือกาซโครมาโตกราฟี 1 ชุด
2. เข็มฉีดสารตัวอย่างขนาดไมโครลิตร

สารที่ใช้ในการทดลอง

1. toluene
2. p-Xylene
3. methyl acetate
4. สารตัวอย่างที่เป็นตัวใดตัวหนึ่งของสารที่ใช้เป็นมาตรฐาน

วิธีทดลอง

1. เปิดเครื่องมือก๊าซโครมาโตกราฟีทิ้งไว้ก่อนทำการทดลองอย่างน้อย 30 นาที
2. ผ่านกาซนำพาไนโตรเจนไปในคอลัมน์ก่อนฉีดสารตัวอย่าง
3. ใช้เข็มฉีดดูดสาร toluene มา 0.05 มล.
4. ฉีดสาร toluene ลงในคอลัมน์ การฉีดต้องจับเข็มให้แน่นด้วยมือทั้งสองข้าง ใช้มือซ้ายจับที่ก้านเข็ม และมือขวากดที่ฉีดให้สารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ ต้องระวังก้านฉีดกระเด็นหลุด เพราะความดันภายในคอลัมน์สูง และระวังปลายเข็มชนกับขอบโลหะของคอลัมน์ทำให้เข็มคดงอได้ด้วย
5. ทำเครื่องหมายลงบนกราฟในตำแหน่งที่ฉีดสารลงในคอลัมน์ พร้อมกับบันทึกโครมาโตแกรม
6. ทำโครมาโตแกรมของ p-Xylene และ methyl acdtate ด้วยวิธีเดียวกันกับ toluene ในข้อ 3 - 5
7. นำสารตัวอย่างที่อาจารย์ผู้ควบคุมแจกให้ทำการหาโครมาโตแกรมเช่นเดียวกันกับข้อ 3-5
8. เมื่อทำการทดลองเสร็จแล้วต้องรอให้อุณหภูมิของคอลัมน์ injection port และ detector ลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องเสียก่อน จากนั้นจึงปิดเครื่องมือ

9. ให้ใช้อะซิโตนทำความสะอาดเข็มฉีดสารตัวอย่าง โดยดูดเอาอะซิโตนเข้าออกจากเข็มฉีดสารตัวอย่าง 2 - 3 ครั้ง แล้วเอาก้านฉีดออกทิ้งไว้ให้แห้ง

10. จากโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างวัดค่า retention time เทียบกับของ toluene, p-Xylene และ methylacetate เพื่อหาว่าสารตัวอย่างที่ได้รับนั้นคือสารชนิดใด

การทดลองที่ 12.4 การหาปริมาณเอธิลแอลกอฮอล์ในสุราโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

จุดประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์
2. เพื่อหาชนิดของแอลกอฮอล์ในสุรา
3. เพื่อหาปริมาณของแอลกอฮอล์ในสุรา
4. เพื่อหาความสามารถในการแยกของคอลัมน์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ขวดวัดปริมาตร
2. ปิเปต
3. Syringe ขนาด 10 μl
4. เครื่องมือก๊าซโครมาโตกราฟี "Bendix"
5. คอลัมน์ 10% **Carbowax** ยาว 20 เมตร (66.67 ฟุต)
6. Flame ionization detector

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. แอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ : MeOH, EtOH, 1-propanol, n-butanol, 3 pentanol, ฯลฯ
2. สุราตัวอย่างชนิดต่าง ๆ
3. ก๊าซตัวพา N_2
4. ก๊าซเชื้อเพลิง H_2 + อากาศ

วิธีทดลอง

1. เปิดเครื่องมือก๊าซโครมาโตกราฟีเพื่ออุ่นไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
2. ตั้งเงื่อนไขของเครื่องมือดังนี้ (ตั้งเมื่อพร้อมที่จะฉีดสาร)

ก๊าซตัวพา : flowrate = 0.5

ก๊าซเชื้อเพลิง : H_2, flowrate = 4.0

: Air, flowrate = 4.0

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 68°C

อุณหภูมิของ injector : 130°C

อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ : 150°C

3. เตรียมสารละลายของเอธิลแอลกอฮอล์ในน้ำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยปิเปตเอธิลแอลกอฮอล์มา 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 และ 10.0 มล. ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรของ 10 มล. ตามลำดับ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีด

4. ฉีดสารต่อไปนี้จำนวน 1.0 μl เข้าไปในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ตามลำดับ โดยต้องกดปุ่ม "reverse" ของเครื่อง recorder ไปพร้อม ๆ กับการฉีดสารตัวอย่าง

- Methyl alcohol
- Ethyl alcohol
- 1-propanol
- n-butanol
- 3-pentanol

ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์จากพีกของสารแต่ละตัว และสังเกตลักษณะพีกของแต่ละสาร

5. ฉีดสารผสมของสารทั้ง 5 ชนิด ในข้อ 4 ขนาด 1.0 μl แล้วบันทึกโครมาโตแกรม ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์จากพีกที่ได้ของสารแต่ละตัว และสังเกตลักษณะพีกที่เกิดขึ้นเทียบกับข้อ 4

6. ฉีดสารตัวอย่างสุรา 1.0 μl แล้วบันทึกโครมาโตแกรม พิจารณาเทียบรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างกับรีเทนชันไทม์ของสารทั้งห้าชนิด สรุปให้ได้ว่าแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างสุรา คือ แอลกอฮอล์ชนิดใด

7. ฉีดสารละลายของเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันจากการเตรียมในข้อ 3 แล้วบันทึกโครมาโตแกรม

8. นำสุรายี่ห้อต่าง ๆ ฉีดเข้าเครื่องก๊าซ แล้วบันทึกโครมาโตแกรม

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. จากสารละลายมาตรฐานของเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จากวิธีทดลองข้อ 3 ให้นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเอธิลแอลกอฮอล์

2. จากโครมาโตแกรมที่ได้จากการทดลองข้อ 7 ให้นำมาวัดความสูงของพีก แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซ็นต์ของเอธิลแอลกอฮอล์เทียบกับความสูงของพีก

3. จากความสูงของพีกสุราชนิดต่าง ๆ ให้หาเปอร์เซ็นต์ของเอธิลแอลกอฮอล์ในสุราจากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้

4. จากโครมาโตแกรมของสารผสมทั้ง 5 ชนิด ที่ได้จากการทดลองในข้อ 5 ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์และความกว้างของพีก เพื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของคอลัมน์ ซึ่งอธิบายได้ในเทอมของ HETP (H)

$$H = \frac{L}{N}$$

$$N = \left(\frac{4t_R}{W}\right)^2$$

เมื่อหาจำนวนเพลต N จาก t_R และ W ของสารแต่ละชนิดได้แล้ว ให้นำมาหาจำนวนเพลต N เฉลี่ยของคอลัมน์ จากนั้นจึงหาค่า H เมื่อทราบความยาวของคอลัมน์เท่ากับ 20.0 เมตร

5. จากโครมาโตแกรมของสารผสมทั้ง 5 ชนิด ที่ได้จากการทดลองในข้อ 5 ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์และความกว้างของพีก เพื่อนำมาคำนวณหากำลังแยก (resolution) ของคอลัมน์โดยเทียบกับพีกที่ 1 จากสูตร

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_1 + w_2}$$

คำถาม

1. ท่านคิดว่าการวิเคราะห์วิธีก๊าซโครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาความแรง (degree) ของเหล้าได้ดีหรือไม่ จงอธิบาย
2. เหตุใดจึงต้องใช้คอลัมน์ 10% carbowax ในการทดลองนี้ จะใช้คอลัมน์ชนิดอื่นได้หรือไม่
3. ค่า t_R ใช้บอกเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกจากกันได้ดีเพียงใด
4. อุณหภูมิที่ใช้ในการทำก๊าซโครมาโตกราฟีควรมีค่าสูงขนาดใด