ตอนที่ 1
ทฤษฎีและพารามิเตอร์พื้นฐานทางโครมาโทกราฟี

เค้าโครงเรื่อง

1.1 บทนำ

1.2 กระบวนการทางโครมาโทกราฟี

1.3 ภาพของการแยกในระบบโครมาโทกราฟี

1.4 การจำแนกวิธีการแยกโครมาโทกราฟีของเหลว

1.4.1. การจำแนกโดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่

1.4.2. การจำแนกโดยอาศัยเทคนิคของรูปแบบการทำโครมาโทกราฟี

1.4.3. การจำแนกโดยอาศัยรูปแบบของการพัฒนาการแยก

1.4.4. การจำแนกโดยอาศัยกลไกการหน่วงเหนี่ยว

1.5 พีค โครมาโทแกรมและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง

1.5.1. พีค (Peak)

1.5.2. โครมาโทแกรม (Chromatogram)

1.6. พารามิเตอร์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการแยก

1.6.1. Retention Time และ Retention Volume

1.6.2. ปัจจัยความจุ (Capacity Factor)

1.6.3. ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity)

1.6.4. ขนาดของการแยก (Resolution)

1.7. การขยายแถบของการแยกและประสิทธิภาพของคอลัมน์

1.7.1. บทนำ

1.7.2. ทฤษฎีที่ใช้อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์

1.7.3. พารามิเตอร์ใน Van Deemter Equation

1.8. การปรับความเหมาะสมของการแยก

1.8.1. ค่าการหน่วงเหนี่ยว

1.8.2. ค่าความจำเพาะเจาะจง

1.8.3. ประสิทธิภาพของคอลัมน์

สาระสำคัญ

1. วิธี Liquid Chromatography อาจจำแนกออกโดยอาศัยกลไกที่สารถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์หรือกลไกในการแยกสารออกมา การจำแนกโดยอาศัยกลไกการหน่วงเหนี่ยวได้รับความสนใจมากที่สุด แบ่งออกได้เป็น 5 ชนิดหลักคือ Adsorption, Partition, Ion-Exchange, Affinity และ Size-exclusion

2. การจำแนกโดยอาศัยการกระบวนการแยกสารออกจากคอลัมน์ มี 3 วิธี Elution Development, Displacement Development และ Frontal Analys

Isocratic Elution เป็นการแยกสารออกจากคอลัมน์ที่นิยมที่สุด

Gradient Elution จะมีประโยชน์โดยเฉพาะใน Reversed Phase Chr สำหรับแยกตัวถูกละลายที่มีค่า k' อยู่ในช่วงกว้าง

3. Chromatography ถูกวัดและอธิบายในเทอมของ Capacity, Efficiency, Selectivity และ Resolution

สำหรับผลการแยกที่ดีที่สุด ประสิทธิภาพของระบบจะถูกปรับให้เหมาะสมเพื่อลดการขยายของแถบการแยก และคอลัมน์ควรจะมีความจุ เพื่อหน่วงเหนี่ยวสารที่สนใจและความจำเพาะเจาะจงเพียงพอที่จะแยกองค์ประกอบเหล่านั้นออกจากกัน

ปัจจัยความจุของคอลัมน์ (k') เป็นหน้าที่พื้นฐานของสารที่บรรจุในคอลัมน์ แต่สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบและความแรงของตัวถูกละลาย คอลัมน์ที่มีค่าปัจจัยความจุมากกว่าจะมีความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวสารได้นานกว่า แต่เวลาวิเคราะห์จะยาวขึ้น k' ที่มีค่าระหว่าง 2-5 จะให้ขนาดการแยกและเวลาที่ใช้เหมาะสม

ความจำเพาะเจาะจงของคอลัมน์ (α)เป็นหน้าที่ของสารที่บรรจุในคอลัมน์ แต่สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ หรือชนิดของเฟสเคลื่อนที่ ค่า α จะอยู่ในช่วง 1- ∞ มีค่าเท่า

กับ 1 เมื่อค่า retention times ของ 2 พีคมีค่าเท่ากัน และเท่ากับ ∞ เมื่อพีคแรกถูกชะออกมาในช่วง void volume

ขนาดของการแยก (R) จะขึ้นอยู่กับ k' α และ N ของระบบ โดยทั่วไป $R > 0.8$ เป็นที่ต้องการสำหรับการหาปริมาณอย่างถูกต้องของพีค 2 พีค วิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการเปลี่ยนแปลงค่า R คือการเปลี่ยนค่า k' หรือ α ของคอลัมน์

4. ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N) คือตัวเลขที่ใช้อธิบายการขยายของพีค (band broadening) ซึ่งจะเป็นฟังก์ชันของการหน่วงเหนี่ยว และขึ้นอยู่กับระบบโครมาโทกราฟีทั้งหมด วิธีการที่ใช้มากที่สุดในการคำนวณค่า N คือ tangent method

5. มี 2 ทฤษฎีที่ใช้อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ คือ Plate theory และ Rate Theory

ใน Plate Theory จะสมมุติว่าเกิดสมดุลทันทีทันใดของตัวถูกละลายระหว่างเฟส 2 เฟส และไม่ได้พิจารณาถึงผลของการฟุ้งกระจายที่มีต่อการขยายของแถบการแยก

ส่วนใน Rate Theory จะหลีกเลี่ยงสมมุติฐานของการเกิดสมดุลทันทีทันใด แต่จะกล่าวถึงปัจจัยการกระจายที่ทำให้เกิดการขยายของแถบการแยกในคอลัมน์ ได้แก่ Eddy diffusion , Longitudinal diffusion และ Resistance to Mass transfer ระหว่างเฟสทั้งสอง เงื่อนไขการทดลองที่ต้องการเพื่อให้ได้รับระบบที่มีประสทธิภาพสูงสุดสามารถหาได้โดยการพล็อตสมการ van Deemter

วัตถุประสงค์

เมื่อศึกษาบทเรียนนี้จบแล้ว นักศึกษาควรมีความสามารถต่อไปนี้

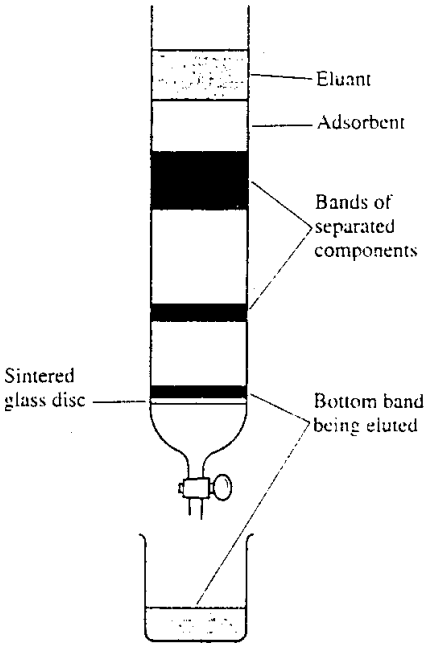
1. อธิบายความหมายของเทอมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการแยกทางด้านโครมาโทกราฟี
2. ใช้เทอมสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Partition Coefficient, K_D) ในการอธิบายสมดุลของการแยกทางด้านโครมาโทกราฟี
3. อธิบายการจำแนกเทคนิคต่าง ๆ ทางด้านโครมาโทกราฟีโดยอาศัยวิธีการต่าง ๆ
4. อธิบายเกี่ยวกับโครมาโทแกรมและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง เพื่อการวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพและปริมาณ
5. อธิบายความหมายของ Retention ในเทอมต่าง ๆ และการประยุกต์ใช้อย่างเหมาะสม
6. อธิบายการแยก (Resolution) ที่สัมพันธ์กับค่า Retention Selectivity และ Efficiency พร้อมสูตรในการคำนวณค่าต่าง ๆ
7. อธิบาย Plate Theory และ Rete Theory ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของกระบวนการแยกทางด้านโครมาโทกราฟี
8. สามารถอธิบายผลการแยกที่ได้รับด้วยพารามิเตอร์พื้นฐานทางด้านโครมาโทกราฟี
9. สามารถใช้สมการ van Deemter ในการอธิบายประสิทธิภาพของการแยกสารทางด้านโครมาโทรกราฟี
10. สามารถอธิบายปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการแยกและการแก้ไขปัญหาทางด้านโครมาโทกราฟีอย่างหลักเกณฑ์

ตอนที่ 1 ทฤษฎีและพารามิเตอร์พื้นฐานทางโครมาโทกราฟี

1.1 บทนำ

โครมาโทกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคในการแยกองค์ประกอบต่างๆในของผสมที่อยู่ในสภาวะสมดุลระหว่างเฟส 2 เฟสออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัว

เทคนิคนี้คิดค้นครั้งแรกโดย นักพฤษศาสตร์ชาวรัสเซีย ชื่อ Mikahail Tswett ในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 ได้ทำการแยกองค์ประกอบที่มีสีในพืช โดยผ่านสารละลายที่สกัดได้จากพืชลงในคอลัมน์แก้วที่บรรจุด้วยผงชอล์ก ($CaCO_3$) องค์ประกอบต่างๆในสารละลายถูกแยก สามารถมองเห็นเป็นแถบสีต่างๆในคอลัมน์ จึงตั้งชื่อโดยใช้ภาษากรีกว่า "chroma" (สี) และ "graphien" (เขียน)



รูปที่ 1.1. การแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี

กิจกรรม 1.1
ศึกษาเพิ่มเติมบทเรียนด้วยตนเองจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยสอนเคมีวิเคราะห์เรื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (Computer Assisted Instruction in High Performance Liquid Chromatography, CAI) ที่ฝ่ายวารสารและเอกสารและฝ่ายบริการช่วยค้นคว้าและวิจัย อาคาร 2 ชั้นหนึ่ง และชั้นลอย สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยติดต่อกับบรรณารักษ์ผู้ให้บริการ

เหตุการณ์สำคัญต่างๆทางด้านโครมาโทกราฟี

1903	**Michail Tswett**	**แยกเม็ดสีในพืชโดยใช้คอลัมน์บรรจุด้วยชอล์ก**
1938	**Maria Shraiber, Nikolair Izmailove**	**ออกเอกสารครั้งแรกเกี่ยวกับทินแลร์เยอร์โครมาโทกราฟี**
1947	**Martin and Synge**	**เสนอทฤษฎีโครมาโทกราฟีและได้รับรางวัล Noble Prize(1951)**
1958	**Stein and Moore**	**วิเคราะห์กรดอะมิโนโดยระบบอัตโนมัติและได้รับรางวัล Noble Prize(1972)**
1959	**Porath and Plodin**	**การแยกโดยเทคนิคการขจัดขนาดด้วย Cross linked Dextrans**
1969	**วารสาร Gas Chromatography เปลี่ยนชื่อเป็นวารสารโครมาโทกราฟี**	
1972	**Majors and Kirkland**	**บรรจุคอลัมน์ด้วยอนุภาคขนาดเล็ก (microparticulate)**
1977	**นำระบบ microprocessor มาควบคุมการทำงานของปั๊ม**	
1978	**นำอนุภาคขนาด 3 micron มาบรรจุในคอลัมน์**	
1983	**มีการนำ microbore column มาใช้**	

เทคนิคโครมาโทกราฟีได้ถูกนำมาใช้สำหรับการแยก การตรวจสอบ และวัดปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของสารผสมต่างๆ โดยอาศัยหลักการกระจายตัวระหว่างเฟส 2 เฟส โดยเฟสหนึ่งอยู่กับที่และอีกเฟสหนึ่งเคลื่อนที่ ในปัจจุบันเป็นเทคนิคที่มีบทบาทสำคัญมาก ไม่ว่าจะเป็นงานวิเคราะห์ทางด้านการวิจัย พัฒนา ตลอดจนงานทางด้านการประกันคุณภาพในห้องปฏิบัติการต่างๆ

กิจกรรม 1.2
หาความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับประวัติศาสตร์ทางด้านโครมาโทกราฟีจากระบบ Internet โดยเปิดที่ http:/ www.yahoo.com (ใช้กุญแจคำ : Liquid Chromatography)

1.2. กระบวนการทางโครมาโทกราฟี

ในระบบโครมาโทกราฟี โมเลกุลของตัวถูกละลาย หรือสารที่สนใจจะกระจายตัวอยู่ระหว่างเฟส 2 เฟส ซึ่งไม่ละลายซึ่งกันและกัน โดยเฟสหนึ่งจะเคลื่อนที่ เรียกว่า "**mobile phase**" เป็นของเหลว และของไหล และอีกเฟสหนึ่งอยู่กับที่ เรียกว่า "**stationary phase**" เป็นของแข็งหรือของเหลว

อัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายแต่ละชนิด จะกำหนดโดยค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Distribution Coefficient, K_D) ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ได้ดังนี้

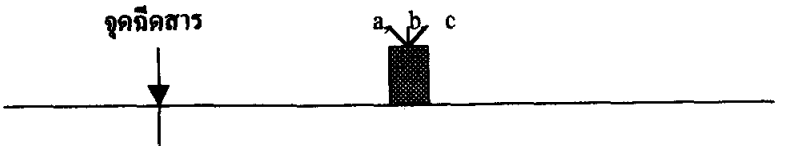
$$K_D = \frac{\text{ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที}}{\text{ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่}} = \frac{Cs}{Cm}$$

ตัวถูกละลายที่กระจายตัวได้มากในเฟสเคลื่อนที่ จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า
ส่วนตัวถูกละลายที่กระจายตัวในเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่า จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า

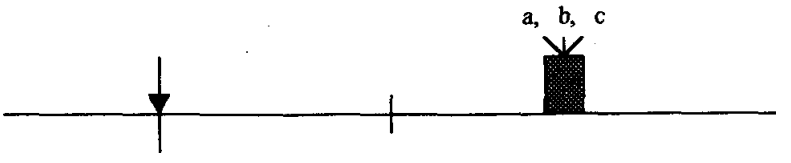
ดังนั้น ขนาดการแยกจะขึ้นอยู่กับสมบัติทางเคมี และกายภาพของตัวถูกละลาย เฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่

เมื่อเราใส่ของผสมที่มี 3 องค์ประกอบ (A,B,C) ลงส่วนบนของคอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลว องค์ประกอบต่างๆเหล่านี้จะผ่านไปในคอลัมน์ และออกไปสู่ตัวตรวจวัด และเครื่องบันทึกสัญญาณตามลำดับ ในขณะที่องค์ประกอบต่างๆเคลื่อนที่ตามคอลัมน์ แต่ละองค์ประกอบจะเกิดอันตรกริยากับเฟสอยู่กับที่ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น

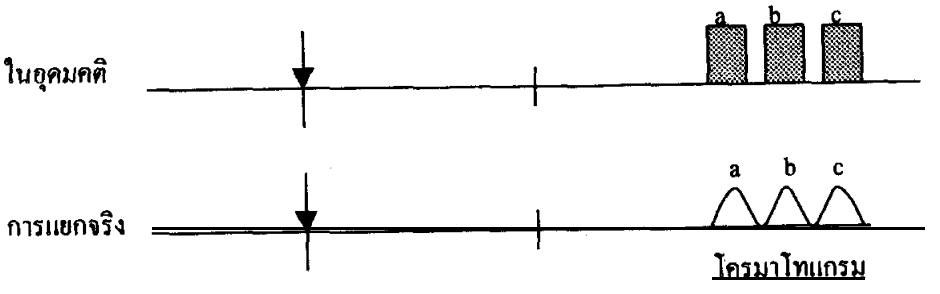
กรณีที่ 1 เมื่อองค์ประกอบทั้ง 3 ไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่เลย



กรณีที่ 2 เมื่อองค์ประกอบทั้ง 3 เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่เท่ากัน ทำให้เกิดการหน่วงเหนี่ยว แต่ไม่มีการแยกเกิดขึ้น



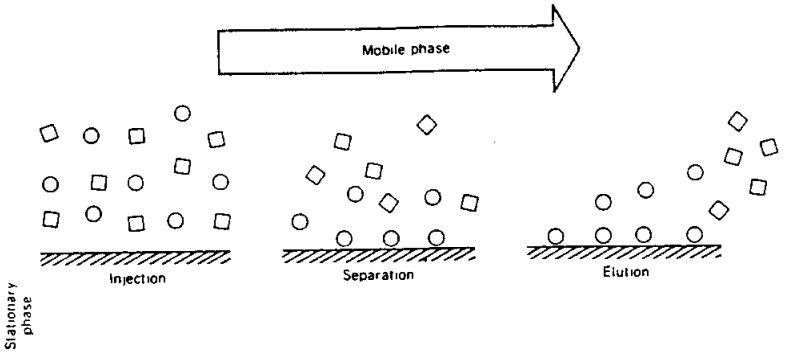
กรณีที่ 3 เมื่อองค์ประกอบทั้ง 3 เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่กับที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดการหน่วงเหนี่ยว และมีการแยกเกิดขึ้น



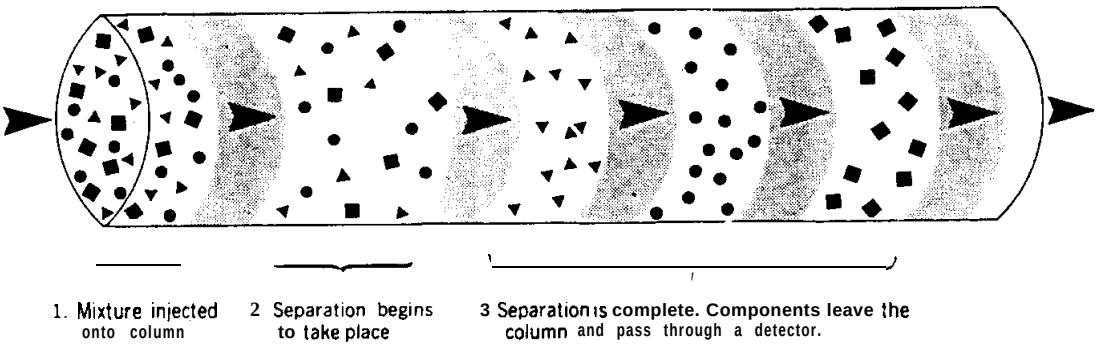
ในการแยกจริง การกระบวนการขยายของแถบ (Band broadening) ทำให้ความเข้มข้นขององค์ประกอบต่างๆในเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยน

1.3. ภาพของการแยกในระบบโครมาโทกราฟี

หลักการแยกจะเกี่ยวข้องกับเฟส 2 เฟสคือเฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่ สารที่สนใจจะเกิดอันตรกิริยากับเฟสทั้งสองแตกต่างกัน



กระบวนการในโครมาโทกราฟีของเหลว แสดงการแยกบนผิวของเฟสอยู่กับที่แบบแผ่น



กระบวนการในโครมาโทกราฟีของเหลว แสดงการแยกในเฟสอยู่กับที่แบบคอลัมน์

รูปที่ 1.2 แสดงการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่สนใจ

กิจกรรม 1.3
ศึกษาภาพเคลื่อนไหวเพิ่มเติมจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยสอนเคมีวิเคราะห์ เรื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (Computer Assisted Instruction in High Performance Liquid Chromatography, CAI) ที่ฝ่ายวารสารและเอกสารและฝ่ายบริการช่วยค้นคว้าและวิจัย อาคาร 2 ชั้นหนึ่งและชั้นลอย สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยติดต่อกับบรรณารักษ์ผู้ให้บริการ

1.4 การจำแนกวิธีการแยกโดยโครมาโทกราฟีของเหลว

การจำแนกสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 วิธีคือ

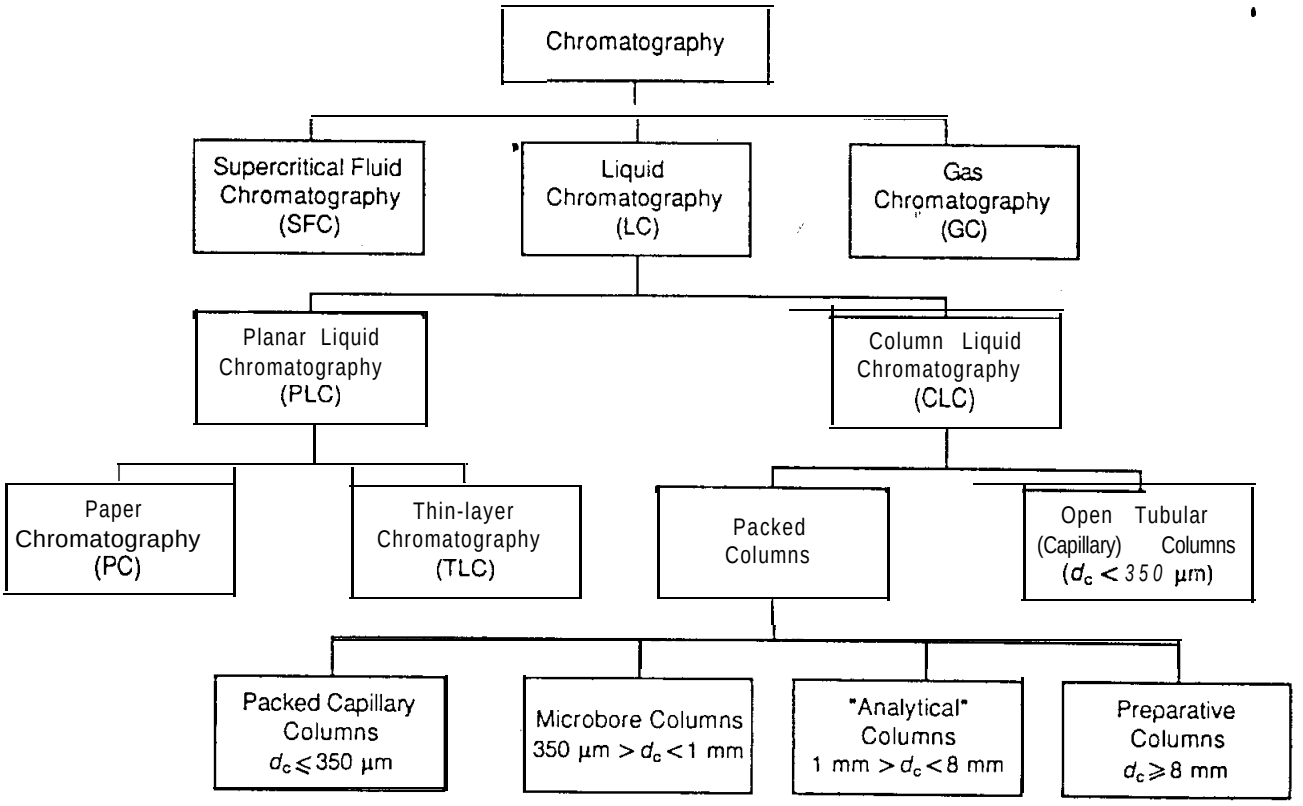
1.4.1. การจำแนกโดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่ แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทคือ

1.4.1.1. Supercritical Fluid Chromatography (SFC) เฟสเคลื่อนที่เป็นของไหลวิกฤติยิ่งยวด

1.4.1.2. Liquid Chromatography (LC) เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว

1.4.1.3. Gas Chromatography (CC) เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส

สามารถแสดงแผนผังการแยกเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่ได้ดังนี้



รูปที่ 1.3. แสดงการจำแนกการจำแนกโดยอาศัยเฟสเคลื่อนที่

กิจกรรม 1.4

ให้ศึกษาเพิ่มเติมจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยสอนเคมีวิเคราะห์ เรื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (Computer Assisted Instruction in High Performance Liquid Chromatography, CAI) ที่ฝ่ายวารสารและเอกสารและฝ่ายบริการช่วยค้นคว้าและวิจัย อาคาร 2 ชั้นหนึ่ง และชั้นลอย สำนักหอสมุดกลางมหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยติดต่อกับบรรณารักษ์ผู้ให้บริการ

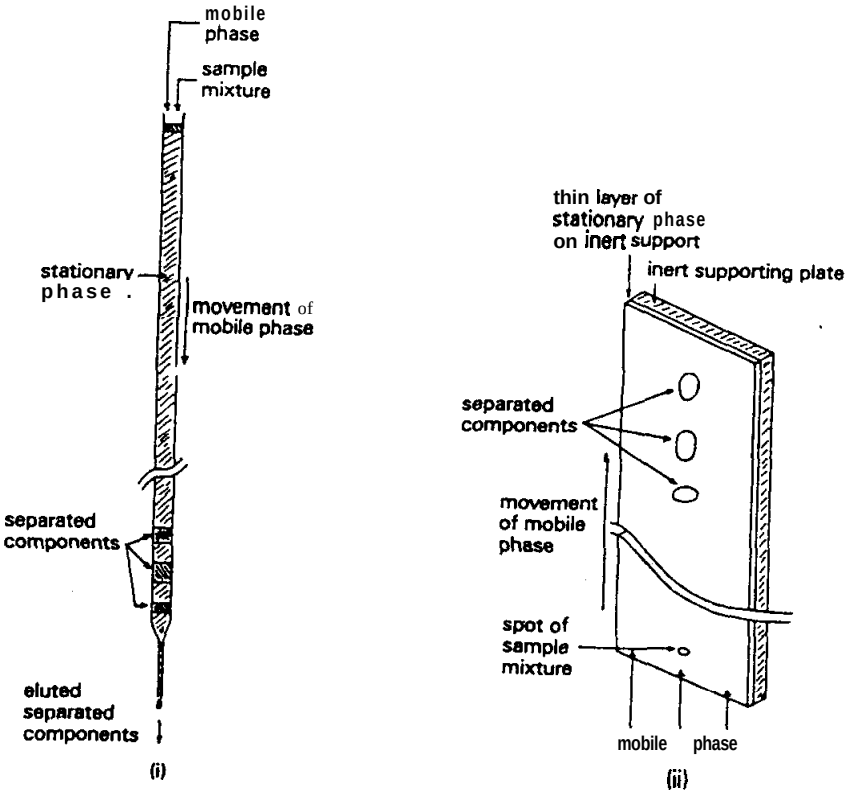
1.4.2. การจำแนกโดยอาศัยเทคนิคของรูปแบบการทำโครมาโทกราฟี

1.4.2.1. โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column Chromatography)

ระบบการแยกจะเกิดขึ้นในคอลัมน์ที่บรรจุเฟสอยู่กับที่ โดยผ่านเฟสเคลื่อนที่เข้าไป

1.4.2.2. โครมาโทกราฟีแบบแผ่น (Planar Chromatography)

ระบบการแยกจะเกิดขึ้นบนแผ่นที่อาจจะเป็นกระดาษ หรือแก้ว หรือแผ่นโลหะที่เคลือบด้วยเฟสอยู่กับที่ โดยเฟสเคลื่อนที่ผ่านไปตามแผ่น



รูปที่ 1.4. การจำแนกโดยอาศัยเทคนิคของรูปแบบการทำโครมาโทกราฟี
(i) โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (ii) โครมาโทกราฟีแบบแผ่น

1.4.3. การจำแนกโดยอาศัยรูปแบบของการพัฒนาการแยก (Development)

1.4.3.1. Frontal Analysis

ในเทคนิคนี้สารตัวอย่างปริมาณมากจะถูกใส่ลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง จนเกิดความจุของเฟสอยู่กับที่ องค์ประกอบที่มีแรงยึดเหนี่ยวมากที่สุดในตัวอย่างจะแทนที่องค์ประกอบที่มีแรงยึดเหนี่ยวน้อยที่สุด เมื่อเฟสอยู่กับที่อิ่มตัว องค์ประกอบต่างๆจะถูกชะออกมาตามลำดับ

1.4.3.2. Elution Development

ในเทคนิคนี้ สารตัวอย่างจะถูกใส่บนส่วนบนของคอลัมน์ จากนั้นค่อยๆใส่เฟสเคลื่อนที่ตามลงไป ซึ่งจะสามารถทำได้ใน 2 ลักษณะคือ

1) **Isocratic Elution**

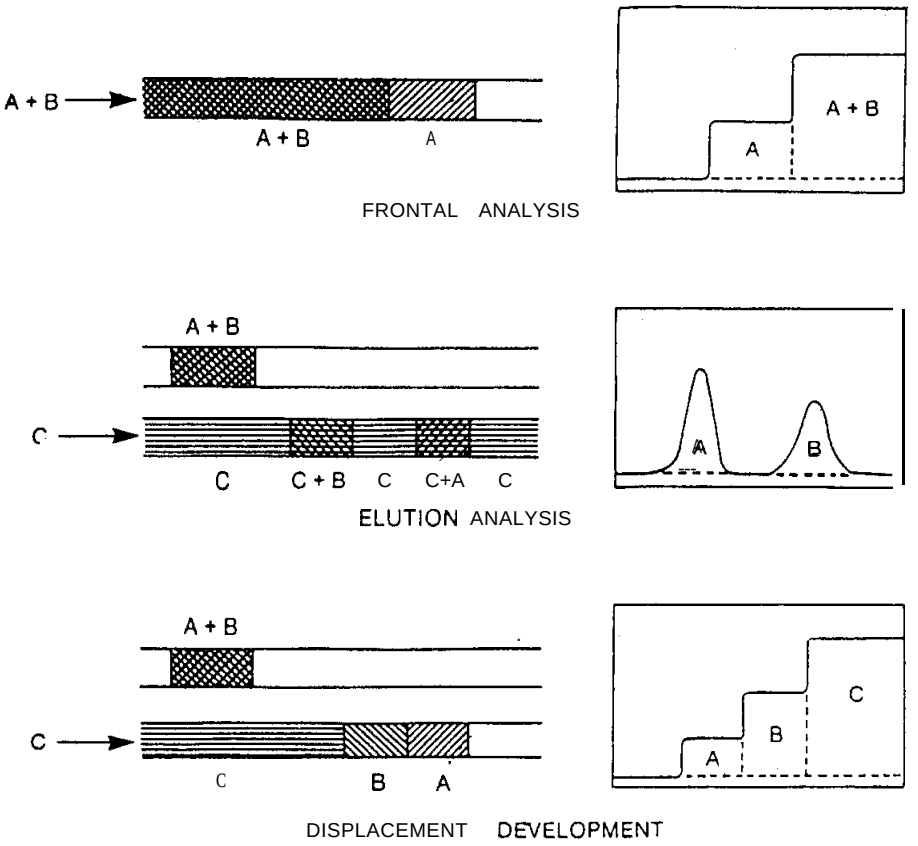
เป็นเทอมที่ใช้เมื่อสารตัวอย่างในคอลัมน์ ถูกชะออกด้วยเงื่อนไขของเฟสเคลื่อนที่ที่มีองค์ประกอบคงที่ เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุด

2) **Gradient Elution**

เป็นเทอมที่ใช้เมื่อสารตัวอย่างในคอลัมน์ ถูกชะออกด้วยเงื่อนไขของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้องค์ประกอบในตัวอย่างที่แรงดึงดูดต่างกันในช่วงกว้างออกมาในเวลาที่เหมาะสม

1.4.3.3. Displacement Development

สารที่สนใจจะถูกแทนที่ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่มีแรงกระทำกับเฟสอยู่กับที่มากกว่า เหมาะกับงานเตรียมสารตัวอย่าง



รูปที่ 1.5 ไดอะแกรมแสดงการพัฒนา (การชะสาร)ในรูปแบบต่างๆ แสดงให้เห็นถึงผลต่อการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบต่างๆในสารตัวอย่าง และผลของแถบการแยกที่ได้รับ

A และ B **แทนองค์ประกอบในตัวอย่าง**

C **แทนตัวแทนที่ (Eluent)**

1.4.4. การจำแนกโดยอาศัยกลไกของการหน่วงเหนี่ยว

1.4.4.1. การดูดซับ (Adsorption Chromatography)

1.4.4.2. การแบ่งส่วน (Partition Chromatography)

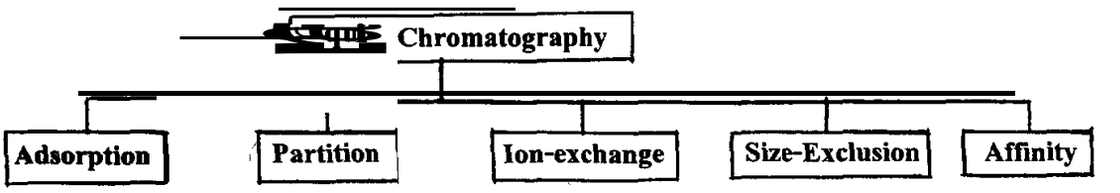
1.4.4.3. การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion- Exchange Chromatography)

1.4.4.4. การขจัดขนาด (Sixe Exclusion Chromatography)

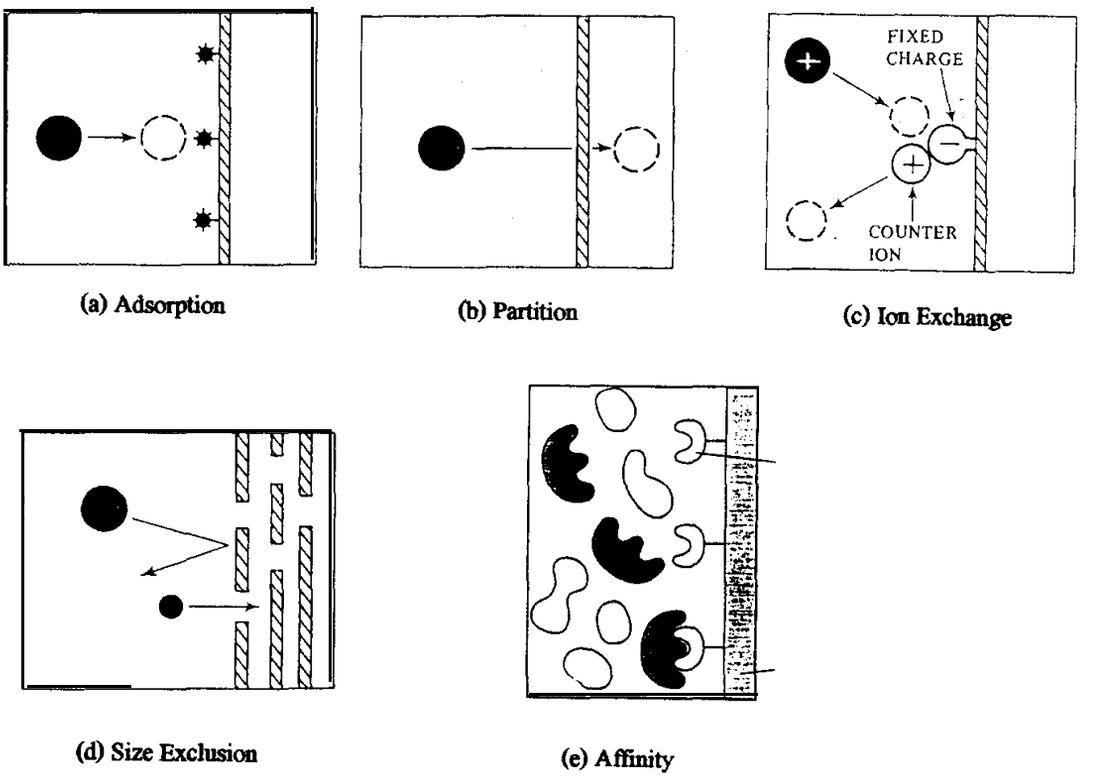
1.4.4.5. ค่าสัมพรรคภาพ (Affinity Chromatography)

กิจกรรม 1.5

ให้นักศึกษาศึกษาการแยกทางโครมาโทกราฟีโดยอาศัยกลไกการหน่วงเหนี่ยวเพิ่มเติมได้จากบทเรียนด้วยตนเองโดยศึกษาจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยสอนเคมีวิเคราะห์เรื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (Computer Assisted Instruction in High Performance Liquid Chromatography, CAI) ที่ฝ่ายวารสารและเอกสารและฝ่ายบริการช่วยค้นคว้าและวิจัย อาคาร 2 ชั้นหนึ่ง และชั้นลอย สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง โดยติดต่อกับบรรณารักษ์ผู้ให้บริการ



การแข่งขันระหว่างของเหลวเฟสเคลื่อนที่และตัวดูดซับ	การแข่งขันระหว่างของเหลวเฟสเคลื่อนที่และของเหลวเฟสอยู่กับที่	การแข่งขันระหว่างของเหลวเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ที่เป็นไอออน	การร่อนขนาดโมเลกุล	กลไก lock and key



(a) Adsorption (b) Partition (c) Ion Exchange

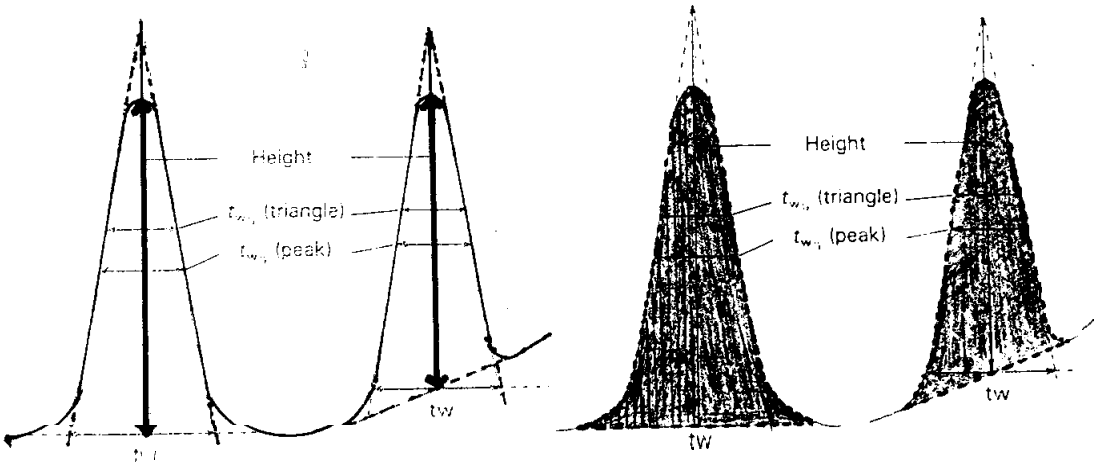
(d) Size Exclusion (e) Affinity

รูปที่ 1.6. ไดอะแกรมแสดงการจำแนกวิธีโครมาโทกราฟีโดยอาศัยกลไกของการหน่วงเหนี่ยว

1.5. พีค โครมาโทแกรมและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง

1.5.1. พีค (Peak)

เมื่อตัวถูกละลายเคลื่อนที่ไปกับเฟสอยู่กับที่ แถบของตัวถูกละลายจะขยายขึ้น เมื่อแถบการแยกนั้นเข้าสู่ตัวตรวจวัด จะมีการกระจายในลักษณะปกติ ในเครื่องบันทึก แต่ละองค์ประกอบที่ออกมาจะมองเป็นในรูปที่แตกต่างไปจากเส้นฐาน เรียกว่า " พีค" สำหรับสารประกอบหนึ่งๆ พื้นที่ หรือความสูงของพีคจะสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้น



(a) Peak Height **(b) Pnek Area**

รูปที่ 1.7 An

1.5.1.1. ความสูงของพีค (Peak height, h) (a)

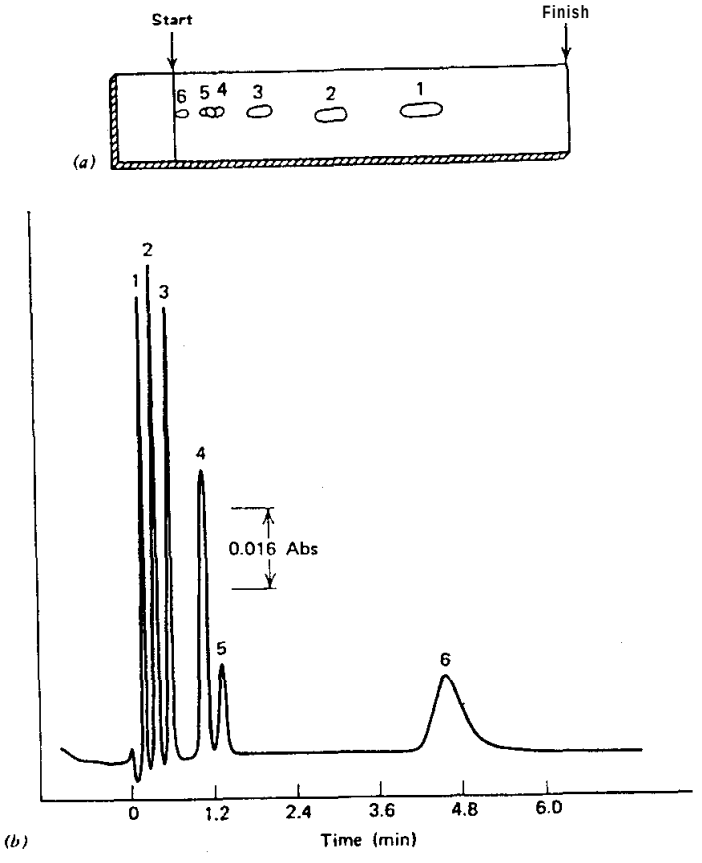
การวัดจากเส้นฐานจนถึงจุดยอดของพีค ใช้สำหรับการหาปริมาณสารที่สนใจ

1.5.1.2. พื้นที่ของพีค (Peak Area, A) (b)

พื้นที่ที่ล้อมรอบด้วยเส้นรอบพีคกับเส้นที่ฐาน

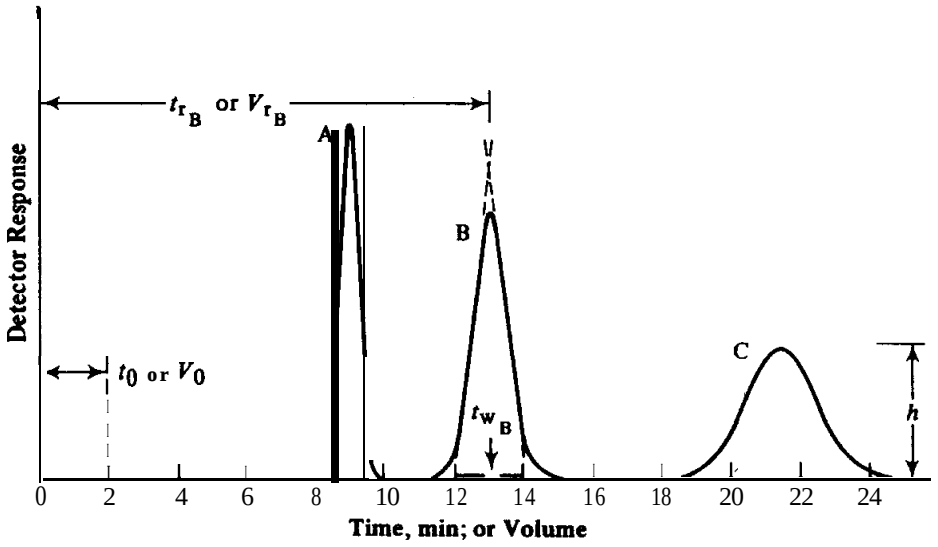
1.5.2. โครมาโทแกรม (Chromatogram)

อนุกรมของพีคจากองค์ประกอบในสารผสมตัวอย่างที่ถูกแยกออกมา เรียกว่า "โครมาโทแกรม" ในเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โครมาโทแกรมเป็นการพล็อตการตอบสนองของตัวตรวจวัดที่เป็นฟังก์ชันกับเวลา หรือปริมาตร การตอบสนองโดยปกติจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้น ส่วนในโครมาโทกราฟีชนิดแผ่น โครมาโทแกรมคือผิวหน้าของตัวดูดซับที่พัฒนาแล้วของแถบ หรือจุดที่แยกจากกัน



รูปที่ 1.8 โครมาโทแกรม (a) ชนิดแผ่น และ (b) ชนิดคอลัมน์

1.6. พารามิเตอร์พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการแยก



รูปที่ 1.9. พีคแสดงค่าพารามิเตอร์พื้นฐานต่างๆ

1.6.1. Retention

เป็นการวัดอันตรกิริยาสัมพัทธ์ของตัวถูกละลายเทียบกับเฟสเคลื่อนที่ ที่เคลื่อนที่ไปบนเฟสอยู่กับที่ สามารถวัดและแสดงได้หลายวิธี

ถ้าออกมาในรูปของ เวลา เรียกว่า Retention time (t_0, t_m หรือ t_R)

ถ้าออกมาในรูปของปริมาตร เรียกว่า Retention Volume (V_0, V_m หรือ V_R)

หรือในค่าปัจจัยของความจุ (capacity factor, k')

	Retention time	Retention Volume	Capacity factor
สำหรับสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยว หรือเฟสเคลื่อนที่	t_0 หรือ t_m	V_0 หรือ V_m	$K' = (t_R - t_m) / t_m$
สำหรับสารที่สนใจ	t_R	V_R	$k' = (V_R - V_m) / V_m$

t_0 หรือ t_m (holdup time หรือ dead time) คือเวลาที่สารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวเลยเดินทางไปถึงจุดสูงสุดของพีค

t_R (retention time) คือเวลาที่ตัวถูกละลายเดินทางจากจุดเริ่มฉีดสารไปถึงจุดสูงสุดของพีค

V_0 หรือ V_m (Void Volume หรือ dead volume) คือปริมาตรของตัวทำละลายจากจุดเริ่มฉีดสารไปจนถึงจุดสูงสุดของพีค เท่ากับปริมาตรของคอลัมน์ที่ไม่ถูกครอบครองด้วยสารที่บรรจุอยู่

V_R (retention Volume) คือปริมาตรของสารละลายจากจุดเริ่มฉีดสารไปจนถึงจุดสูงสุดของพีค

ค่า "t_0" ไม่ใช่ค่า retention time พีคที่ถูกชะออกมาที่ t_0 จะหมายถึงพีคที่ถูกชะออกมาที่ V_0 เพราะว่าค่า t_0 x อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะมีค่าเท่ากับ V_0

ในการวัดค่า t_0 โดยการฉีดตัวทำละลายที่แตกต่างจากองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ ที่ไม่ถูกเหนี่วนำในคอลัมนที่ใช้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวทำละลายที่แรงมากๆ เช่นใช้สารประกอบไอออนิกใน reverse phase column

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time และ retention volume

$$V_0 = t_0 \times F \text{ หรือ } V_m = t_m \times F$$

เมื่อ F (Flow rate) คืออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ความสัมพันธ์รวมระหว่างค่า k' , t_R และ K จะได้สมการพื้นฐานของการหน่วงเหนี่ยวคือ

$$V_R = V_m + KV_s$$

เมื่อ K คือค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว

V_m คือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่

และ V_s คือปริมาตรของเฟสอยู่กับที่

ค่า retention จะถูกควบคุมโดยองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่

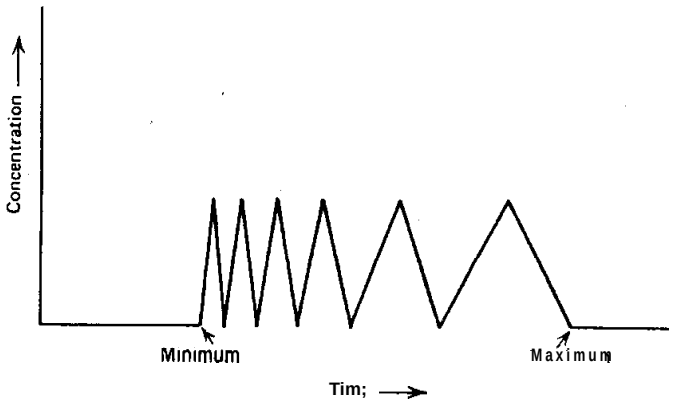
ตัวทำละลายที่ให้ค่า retention ต่ำ เรียกว่า Strong Solvent

ตัวทำละลายที่ให้ค่า retention สูง เรียกว่า Weak Solvent

1.6.2. ปัจจัยความจุ (Capacity factors, k')

ค่า retention ยังสามารถแสดงได้ในรูปของ ปัจจัยความจุ (k') ดังกล่าวมาแล้ว ค่าปัจจัยความจุของคอลัมน์หนึ่งๆ เป็นการวัดความแข็งแรงของอันตรกิริยาของสารตัวอย่างกับสารที่บรรจุในคอลัมน์โดยตรง หรือเป็นการวัดเวลาที่องค์ประกอบในสารตัวอย่างอยู่กับเฟสอยู่กับที่

สำหรับการแยกโดยโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีประสิทธิภาพ คอลัมน์จะต้องมีความจุเพียงพอที่จะหน่วงเหนี่ยวสารตัวอย่าง และสามารถที่จะแยกองค์ประกอบต่างๆในคอลัมน์ได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 1.10. การแยกทางทฤษฎีที่ใช้อธิบายแนวคิดของความจุของพีค

ค่าปัจจัยความจุ (k') ของคอลัมน์ กำหนดโดยสมการ

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} = \frac{(V_R - V_0)}{V_0}$$

ค่า $t_R - t_0 = t_R'$ (adjusted retention time หรือ corrected retention time)

ค่า $V_R - V_0 = V_R'$ (adjusted retention volume หรือ corrected retention volume)

คอลัมน์ที่มีค่า k' สูงจะสามารถยึดเหนี่ยวสารได้ดีกว่า ซึ่งจะช่วยปรับปรุงการแยก แต่จะใช้เวลานานขึ้น โดยปกติ

k' =1 หมายความว่าตัวถูกละลายจะใช้เวลา 50% ของทั้งหมดในคอลัมน์ในเฟสของเหลว และแอีก 50% ของเวลาทั้งหมดถูกดูดซับหรือละลายในเฟสอยู่กับที่

2 < k' < 5 จะเป็นค่าที่ให้ความสมดุลระหว่างเวลาวิเคราะห์และการแยกที่ดี

สำหรับตัวถูกละลายส่วนมากในการแยกโดยโครมาโทกราฟีของเหลว ค่า k' ควรจะอยู่ในช่วง 1- 10 เป็นที่ยอมรับได้

กิจกรรม 1.6

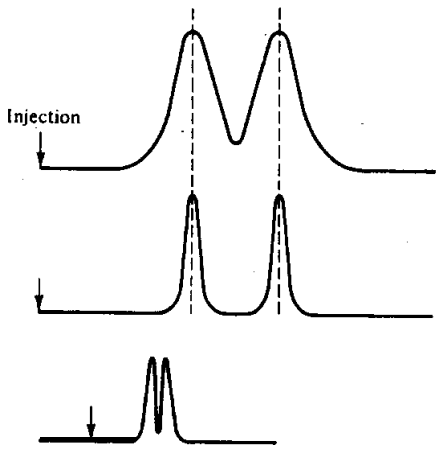
ให้นักศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า Capacity factor (k') และ Retention time (t_R)

1.6.3. ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity, α)

เป็นการวัดระยะห่างระหว่างพีคที่อยู่ติดกัน ค่าความจำเพาะเจาะจงของระบบเป็นการบอกความแตกต่างของ retention times (Volumes) ระหว่างพีค 2 พีค จะบอกถึงว่าระบบโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพอย่างไรที่จะแยกองค์ประกอบทั้งสองออกจากกัน

Selectivity ยังหมายถึง ความแตกต่างของการดูดซับหรือการละลาย เป็นการวัดความสามารถของเฟสอยู่กับที่ ในการบอกความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบ 2 ชนิด

ถ้าหาองค์ประกอบทั้ง 2 มีการละลายเท่ากันในเฟสอยู่กับที่ ก็จะไม่มีความแตกต่างระหว่างองค์ประกอบทั้งสอง ดังนั้นจะไม่มีการแยกเกิดขึ้น



รูปที่ 1.11. การแยกของพีค

สมการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้แสดง ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity, α) กำหนดว่าคือ

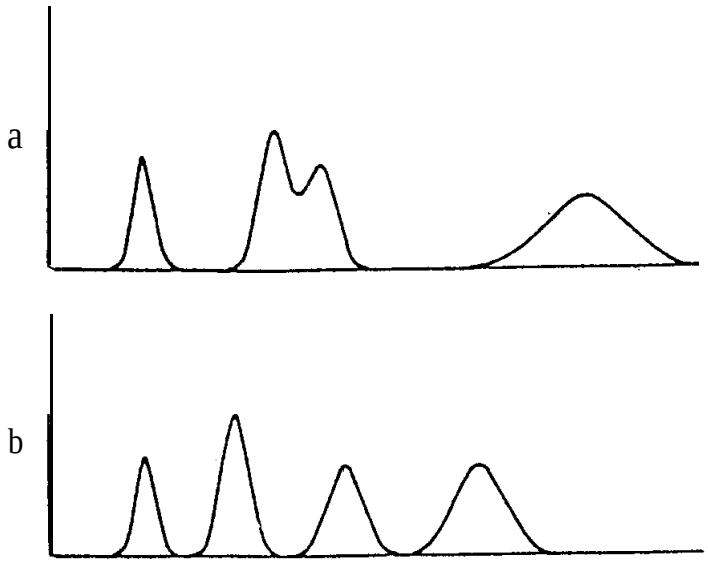
$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{V_2 - V_0}{V, - V_0} = \frac{k'_2}{k;}$$

ค่า a $= 1$ นั่นคือ $t_2 = t_1$

a $= \infty$ องค์ประกอบที่ 1 ถูกชะออกมาใน voidvolume

ในเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ค่าความจำเพาะเจาะจงของคอลัมน์หนึ่งๆ หากไม่เพียงพอที่อุณหภูมิใดๆ วิธีการเดียวที่จะใช้ในการปรับปรุงคือการเปลี่ยนเฟสของเหลวของเฟสอยู่กับที่ต่างๆ โดยใช้ McRenolds number เป็นแนวทางได้ ทั้งนี้เนื่องจากแก๊สตัวพา ที่ใช้ใน GC เป็นแก๊สเฉื่อย และไม่มีส่วนร่วมในกลไกการแยก สำหรับในโครมาโทกราฟีของเหลว ตัวทำละลายไม่ใช่สารเฉื่อย และมีบท

บาทสำคัญต่อการแยกอย่างยิ่ง ดังนั้นค่าความจำเพาะเจาะจงในโครมาโทกราฟีของเหลวสามารถปรับได้โดยการเลือกเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ โดยไม่ต้องทำการเปลี่ยนคอลัมน์



รูปที่ 1.12. ผลของความจำเพาะเจาะจงของการเปลี่ยนองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่
(a) DCM : pentane (23:77) และ (b) DCM:pentane (5:95)

คุณสมบัติของตัวทำละลาย หรือเฟสเคลื่อนที่ ที่เกี่ยวข้องกับการแยก

เนื่องจากตัวทำละลาย หรือเฟสเคลื่อนที่ เป็นองค์ประกอบที่มีบทบาทในการกำหนดค่าความจำเพาะเจาะจงของการแยก โดยเฉพาะกรณีที่ใช้ตัวทำละลายมากกว่า 1 ชนิด

1. **ความหนืด** สำหรับตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำ ต้องการความดันต่ำกว่าเพื่อให้ได้อัตราการไหลที่ต้องการ
2. **จุดเดือด** สำหรับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ จะมีประโยชน์ในแง่การแยกเอาตัวทำละลายออกจากสารที่สนใจหลังจากการแยก
3. **ความเหมาะสมกับตัวตรวจวัด**
   ตัวทำละลายที่เลือกไม่ควรรบกวนการทำงานของตัวตรวจวัด

ตรวจวัด สำหรับตัวตรวจวัด UV ตัวทำละลายควรจะให้ค่าการดูดกลืนต่ำในช่วงความยาวคลื่นที่เลือก สำหรับตัวตรวจวัดค่าดัชนีหักเห ค่าดัชนีหักเหของตัวทำละลายไม่ควรใกล้เคียงกับของสารตัวอย่าง

5. **ความปลอดภัย** ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่ำจะได้รับความนิยมมากกว่า ในแง่ความปลอดภัยและการกำจัด ตัวทำละลายที่มีกลิ่นควรจะหลีกเลี่ยง

เฟสเคลื่อนโดยทั่วไปจะนิยมใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด หรือมากกว่ามาผสมกัน ซึ่งองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่จะมีผลต่อ ค่า Retention และ ค่า selectivity

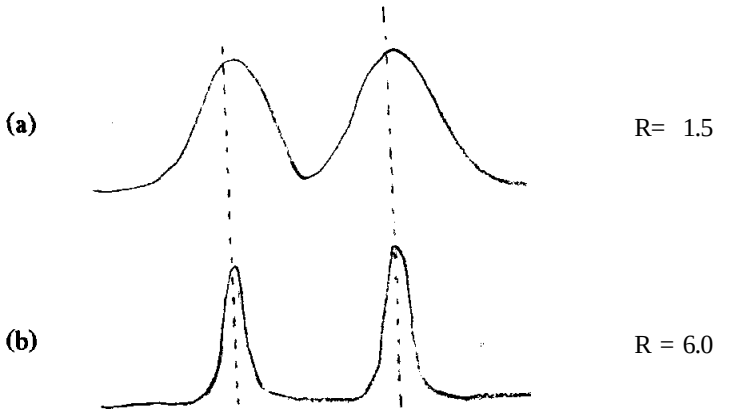
ค่า Retention จะควบคุมโดยอัตราส่วนในการผสมตัวทำละลายที่แรง และอ่อน

ค่า Selectivity จะควบคุมโดยการเปลี่ยนชนิดขององค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ การปรับค่าความจำเพาะเจาะจง สามารถทำได้ง่ายๆ โดย การเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายที่แรง เช่น เปลี่ยนจาก methanol เป็น acetonitrile ในระบบ Reverse Phase

1.6.4. ขนาดของการแยก (Resolution, R)

เมื่อ 2 องค์ประกอบซึ่งแทนด้วยพีค 2 พีคในโครมาโทแกรม จะสามารถอธิบายการแยกด้วยเทอม "Resolution"

Resolution (R) หมายถึงขนาดของการแยก เป็นการวัดความสามารถโดยรวมของระบบโครมาโทกราฟีที่จะแยกคู่ของตัวถูกละลายออกจากกันได้ดีเพียงไร

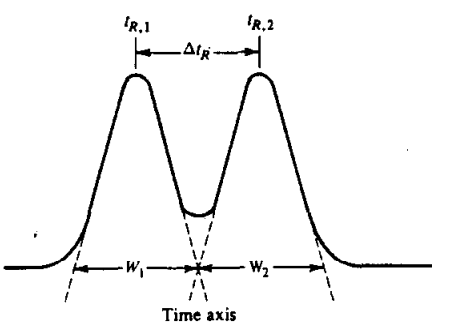


รูปที่ 1.13 เปรียบเทียบขนาดการแยกของพีค 2 พีค

วัตถุประสงค์หลักของโครมาโทกราฟี คือการแยกองค์ประกอบต่างๆในของผสม เทอม Resolution ใช้อธิบายในแง่ปริมาณว่าบรรลุวัตถุประสงค์หรือไม่ ค่า R กำหนดว่าคือ ความแตกต่างของค่า Retention time หารด้วยค่าเฉลี่ยของความกว้างของพีค ค่าขนาดการแยกที่ต้องการ จะขึ้นอยู่กับความสูงสัมพัทธ์ของพีค และความถูกต้องที่ต้องการ

สมการที่ใช้ในการคำนวณค่า R ในทางทฤษฎีคือ

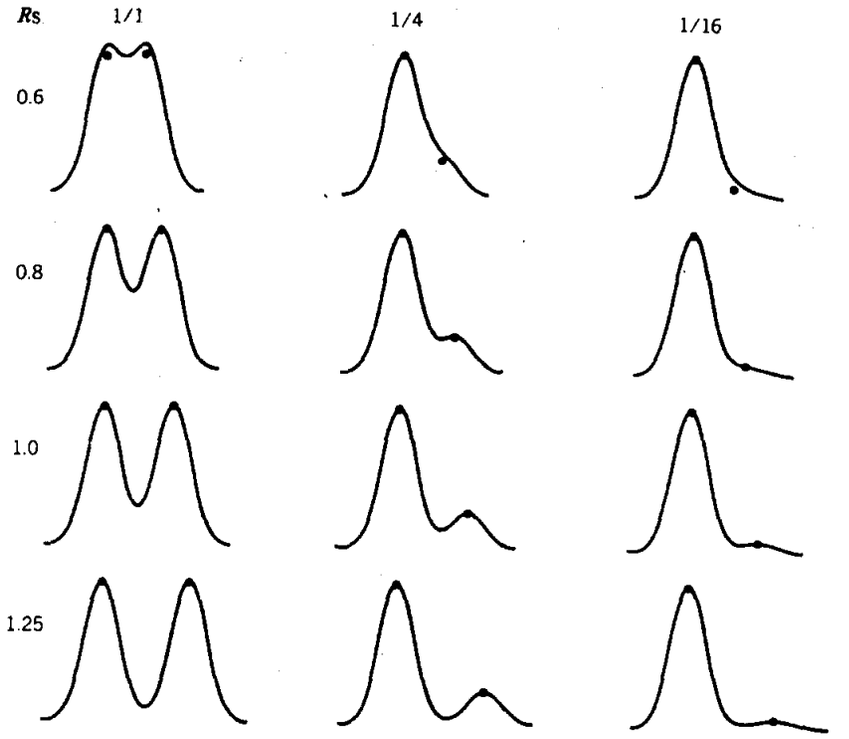
$$R = \frac{\Delta t_R}{4\sigma} = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{0.5\,(w_1 + w_2)}$$



R =1 .0 พีค 2 พีคนีการแยก 98% ที่เส้นฐาน หมายความว่าถ้าลากเส้นตั้งฉากระหว่างร่องระหว่างพีค 2 พีคกับเส้นฐาน จะมีพื้นที่ของพีคทั้งสองซ้อนทับกันเพียง 2%

R = 1.5 ได้รับการแยกที่เส้นฐานของพีค 2 พีค จะมีพื้นที่ของพีคทั้งสองซ้อนทับกันเพียง 0.3 %

R > 2 เหมาะกับการแยกที่ยุ่งยาก



รูปที่ 1.14. เปรียบเทียบการแยกของพีค 2 พีค ที่มีความสูงเท่ากันและไม่เท่ากันที่มีขนาดแยกต่างๆ

ขนาดการแยกขององค์ประกอบในของผสม จะขึ้นอยู่กับ3 ปัจจัยคือ Retention (k'), Selectivity (α), และ Efficiency (N)

ดังนั้น R ซึ่งเป็นเทอมที่ใช้อธิบายขนาดของการแยก ระหว่างแถบของพีค 2 พีคที่อยู่ติดกัน ซึ่งจะเป็นผลสุทธิของค่า α, N และ k' ของคอลัมน์ สมการ Resolution คือ

$$R = \left(\frac{N^{1/2}}{4}\right)\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'}{1 + k'}\right)$$

ประสิทธิภาพ ความจำเพาะเจาะ การหน่วงเหนี่ยว

วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดของการเปลี่ยนขนาดของการแยก คือการเปลี่ยนความจำเพาะเจาะจง (α)หรือความจุ (k')ของคอลัมน์ ผลจากการเพิ่มค่า N โดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ หรืออัตราการไหลจะไม่มีผลมากนัก

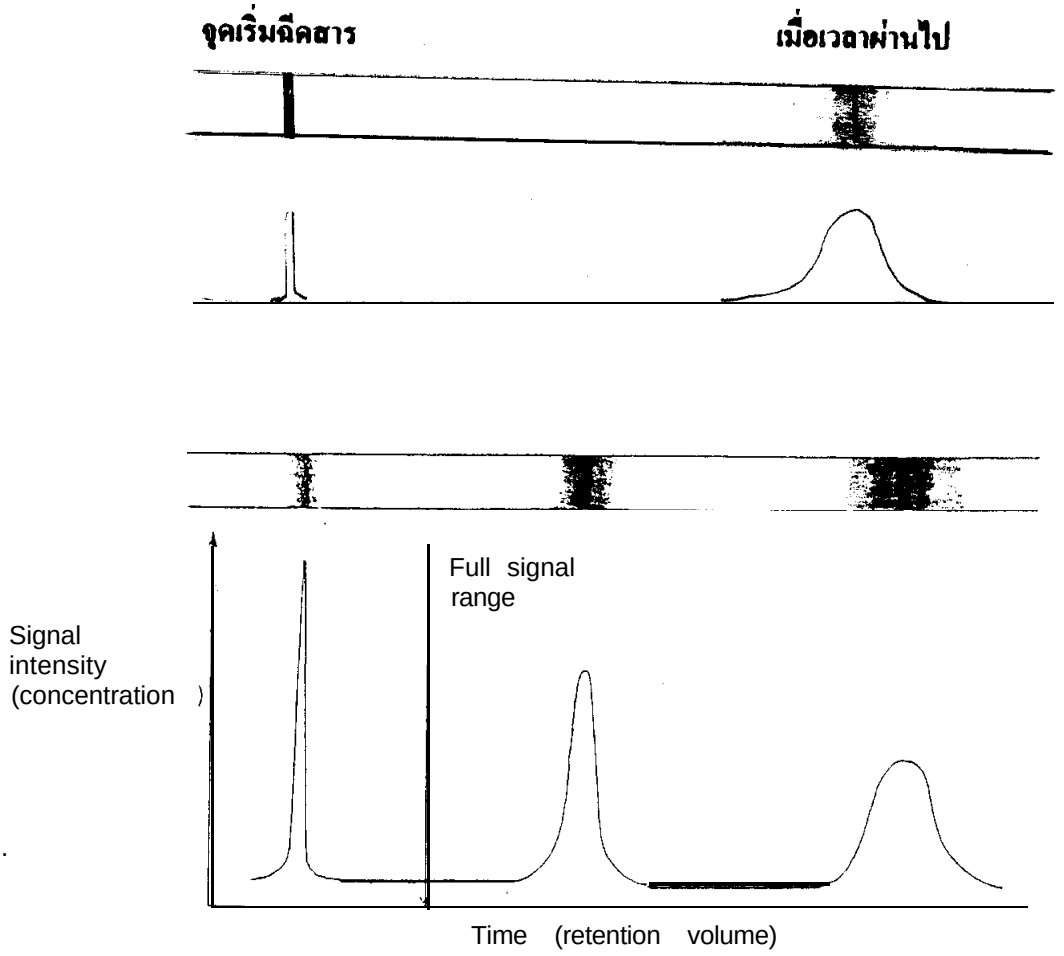
กิจกรรม 1.7
ทบทวนเทอมและพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางด้านโครมาโทกราฟีเพิ่มเติมจากตอนที่ 5 อภิธานศัพท์

1.7 การขยายแถบของการแยกและประสิทธิภาพของคอลัมน์

(Band broadening and Column efficiency)

1.7.1. บทนำ

เมื่อเริ่มใส่สารตัวตัวอย่างลงบนส่วนบนสุดของคอลัมน์ ความกว้างของแถบสารตัวอย่างจะแคบ จนกระทั่งองค์ประกอบต่างๆถูกชะออกมาที่ปลายสุดของคอลัมน์ แถบของสารจะขยายกว้างขึ้น ปรากฏการณ์เช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจากว่า ในขณะที่ของผสมในสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบต่างๆจะเกิดอันตรกิริยาและถูกยึดเหนี่ยวด้วยเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกัน อันตรกิริยานี้ พร้อมกับเส้นทางในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ต่างๆ ทำให้แถบของสารขยายขึ้น เรียกกระบวนการนี้ว่า "**Band Broadening**" ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดขนาดที่สารสององค์ประกอบจะแยกออกจากกัน ซึ่งควรจะลดให้มีค่าต่ำสุด



รูปที่ 1.15. แสดงให้เห็นถึง การขยายของแถบของสารเมื่อผ่านเข้าไปในคอลัมน์

1.7.2. ทฤษฎีที่ใช้อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์

ประสิทธิภาพของคอลัมน์ คือตัวเลขที่ใช้อธิบายความกว้างของแถบ ซึ่งจะเป็นฟังก์ชันกับค่า retention time และอธิบายในเทอมของจำนวนเพลททางทฤษฎี (number of a theoretical plate, N)

ประสิทธิภาพของคอลัมน์ จะขึ้นอยู่กับความยาวของคอลัมน์ และขนาดของอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ทฤษฎีที่ถูกนำมาใช้ในการอธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ มีอยู่ด้วยกัน 2 ทฤษฎีคือ

1. **ทฤษฎีเพลท (Plate Theory)** ซึ่งเสนอโดย Martin และ Synge ได้ให้วิธีการที่ง่ายและสะดวกที่จะวัดสมรรถนะและประสิทธิภาพของคอลัมน์

2. **ทฤษฎีอัตรา (Rate Theory)** ซึ่งเสนอโดย van Deemter และคณะ ได้ให้วิธีการที่จะวัดปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการขยายของแถบการแยกและการปรับความเหมาะสมของประสิทธิภาพ

1.7.2.1 ทฤษฎีเพลท (Plate Theory)

สมมุติฐานที่สำคัญของทฤษฎีนี้คือ มีสภาวะสมดุลเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องของตัวถูกละลายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ข้อบกพร่องของทฤษฎีนี้คือไม่ได้พิจารณาถึงผลของการขยายแถบในการแยก และอิทธิพลของตัวแปรต่างๆเช่น

ขนาดของอนุภาค

ปริมาณของเฟสอยู่กับที่

ความหนืดของตัวชะสาร

และอัตราการไหลที่มีผลต่อสมรรถนะของคอลัมน์

ในทฤษฎีนี้จะพิจารณาว่าคอลัมน์โครมาโทกราฟีประกอบด้วยชั้นบางๆ หรือเพลทจำนวนมาก ในแต่ละเพลทจะมีตัวถูกละลายอยู่ในสภาวะสมดุลระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้น จำนวนเพลททางทฤษฎี (N)ยิ่งมีค่ามาก คอลัมน์ก็ยิ่งจะมีประสิทธิภาพมาก การเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายไปตามคอลัมน์จะถูกพิจารณาว่า เป็นการเคลื่อนย้ายเป็นขั้นๆจากเพลททางทฤษฎีหนึ่งไปยังเพลทต่อๆไป เหมือนการกลั่นลำดับส่วน ถ้าเพลททางทฤษฎียิ่งบางมาก จำนวนเพลทยิ่งมีค่ามาก

สำหรับคอลัมน์ที่มีความยาวค่าหนึ่งๆ ซึ่งแสดงโดยความสัมพันธ์ดังนี้

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

L คือความบยาวของคอลัมน์ (mm)

N คือจำนวนเพลททางทฤษฎี

ดังนั้น H คือความสูงทางทฤษฎีของเพลทหนึ่งเพลท (Height Equivalent to a Theoretical Plate, HETP, H) H ยิ่งมีค่าน้อย ประสิทธิภาพคอลัมน์จะมีค่ามาก

โดยทั่วไป H จะมีค่าน้อย เมื่อ

1. ขนาดของอนุภาคเล็กและบรรจุสม่ำเสมอ
2. อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ
3. ความหนืดของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ
4. อุณหภูมิการแยกสูงขึ้น
5. ขนาดของอนุภาคของโมเลกุลตัวถูกละลายเล็ก

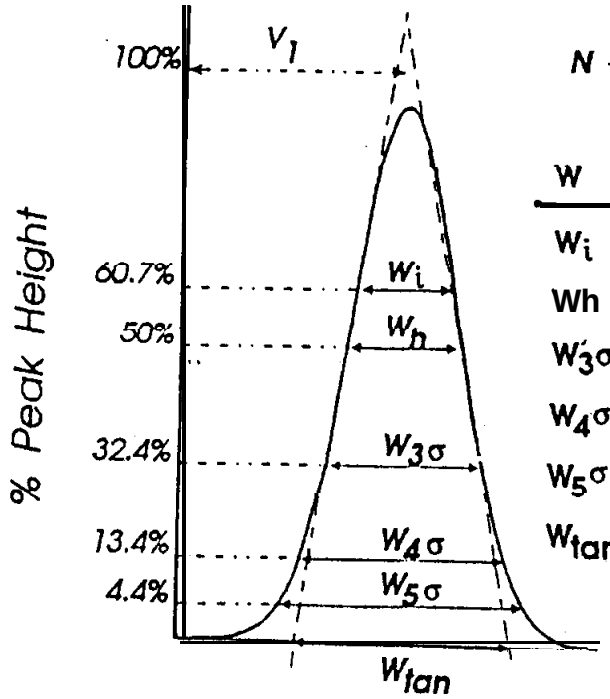
ประสิทธิภาพ (N) จะอธิบายในเทอมของค่า retention time (t_R) ของตัวถูกละลาย โดยจะวัดที่จุดยอดของพีค และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (σ) ของปริมาณตัวถูกละลายที่ถูกวัดออกมาในรูปความกว้างของพีค

$$N = \frac{t_R}{\sigma^2}$$

ค่า σ สำหรับพีคที่มีการกระจายปกติ (Gaussian peak) มีค่าเท่ากับ

$$\sigma = \frac{w_{50}}{2.345} = \frac{w_T}{4.} = \frac{w_{4.4}}{5}$$

W คือความกว้างของพีคที่ระดับความสูงต่างๆ ดังรูป



$$N = \sigma\left(\frac{V_1}{W}\right)^2$$

W	σ	Method
W_i	4	Inflection
Wh	5.54	1/2 Peak Height
$W_{3\sigma}$	9	3
$W_{4\sigma}$	16	4
$W_{5\sigma}$	25	5
W_{tan}	16	Tangent

รูปที่ 1.16. วิธีต่างๆสำหรับประมาณค่า σ และ ตารางค่า 5σ

ค่า N สามารถคำนวณได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับตำแหน่งความกว้างของพีค วิธีที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากง่ายที่สุดคือการคำนวณค่า N โดยวิธี Tangent Method วิธี 5σ method จะให้ความไวสูงสุดสำหรับพีคที่มีหาง และวิธี peak at half height

1. Peak Half Height : $N = 5.54\ (t_R/W_{50})^2$
2. Tangent Method : $N = 16\ (t_R/W_T)^2$
3. 5σ method : $N = 25\ (t_R/W_{4.4})^2$

ประสิทธิภาพสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ทางกายภาพของคอลัมน์ เช่น ความยาว เส้นผ่าศูนย์กลาง และสารที่ใช้ผลิตคอลัมน์ และยังขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ หรือความเร็วของเฟสเคลื่อนที่

ตารางที่ 1.1. แนวทางและปัญหาของการปรับปรุงประสิทธิภาพ

แนวทาง	ปัญหา
1. ลดอัตราการไหล	เพิ่มเวลาของการวิเคราะห์
2. การเพิ่มความยาวของคอลัมน์	เพิ่มเวลาของการวิเคราะห์และความดันเพิ่ม
3. ลดขนาดของอนุภาค	ต้องการความดันเพิ่มขึ้น

1.7.2.2. ทฤษฎีอัตรา (Rate Theory)

ทฤษฎีอัตราและการขยายของแถบการแยก (Rate Theory and Band Broadening) จะมี 3 กลไกหลักๆที่จะพาตัวถูกละลายผ่านเข้าไปในคอลัมน์

1. การเคลื่อนที่โดยการพาของเฟสเคลื่อนที่ ในขณะที่ไหลผ่านอนุภาคต่างๆเข้าไปในคอลัมน์
2. การเคลื่อนที่โดยการฟุ้งกระจายผ่านเข้าไปในแอ่งที่อยู่กับที่ของของเหลวในสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์
3. การเคลื่อนที่โดยการฟุ้งกระจายผ่านในอนุภาคที่มีรูพรุน

ในทฤษฎีจะพิจารณาว่า ปัจจัยการฟุ้งกระจายเป็นสาเหตุให้เกิดการขยายของแถบการแยกในคอลัมน์ และจะหลีกเลี่ยงสมมุติฐานที่ว่าเกิดสมดุลอย่างต่อเนื่องดังที่กล่าวในทฤษฎีเพลท.

ในรูปแบบทั่วๆไป **สมการ van Deemter** แสดงโดย

$$H = A + ; + C\mu$$

เมื่อ	H	แทนประสิทธิภาพของคอลัมน์
	μ	แทนความเร็วเชิงเส้นเฉลี่ยของเฟสเคลื่อนที่
เทอม A		แทนผลการกระจายของแถบเนื่องมาจาก **Eddy Diffusion**
เทอม B		แทนผลการกระจายของแถบเนื่องมาจาก **Longitudinal Diffusion**
เทอม C		แทนผลการกระจายของแถบเนื่องมาจาก **Resistant to Mass Transfer**

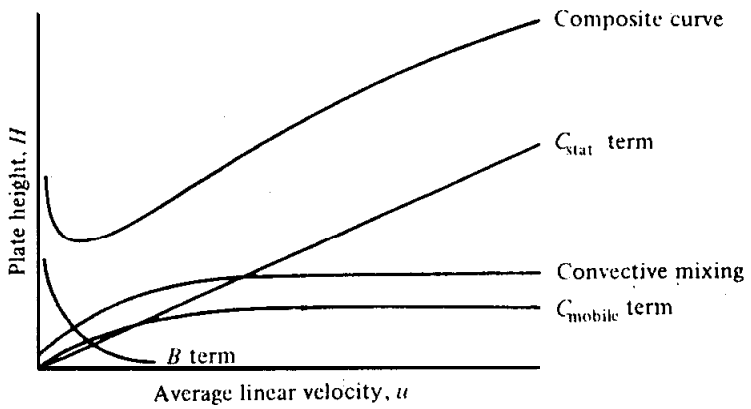
ในเทอม C ไม่ได้จำกัดเฉพาะการถ่ายเทอนุภาคตัวถูกละลายผ่านแอ่งของเหลวในเฟสอยู่กับที่เท่านั้น อาจจะยังเกิดเมื่อตัวถูกละลายที่ผ่านโดยเฟสเคลื่อนที่โดยการพาระหว่างอนุภาค ดังนั้นเพื่อให้การพิจารณาประสิทธิภาพของคอลัมน์ถูกต้องยิ่งขึ้น จึงมีการปรับปรุงสมการ van Deemter ใหม่คือ

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C_s\mu + C_m\mu$$

ในสมการนี้ เทอม C จะแทนผลที่ทำให้การกระจายของแถบเนื่องมาจากการต้านทานต่อการถ่ายเทมวลในเฟสอยู่กับที่ และในเฟสเคลื่อนที่ตามลำดับ

เนื่องจาก H แทนความแปรปรวนของคอลัมน์ หรือการขยายของแถบ H ควรจะทำให้มีค่าต่ำสุด

วิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการหาเงื่อนไขการทดลองที่ให้ค่าการฟุ้งกระจายมีค่าต่ำสุด และประสิทธิภาพสูงสุด โดยการพล็อตสมการ van Deemter



รูปที่ 1.17. การพล็อตสมการ van Deemter ที่แสดงถึงค่าคงที่ต่างๆ

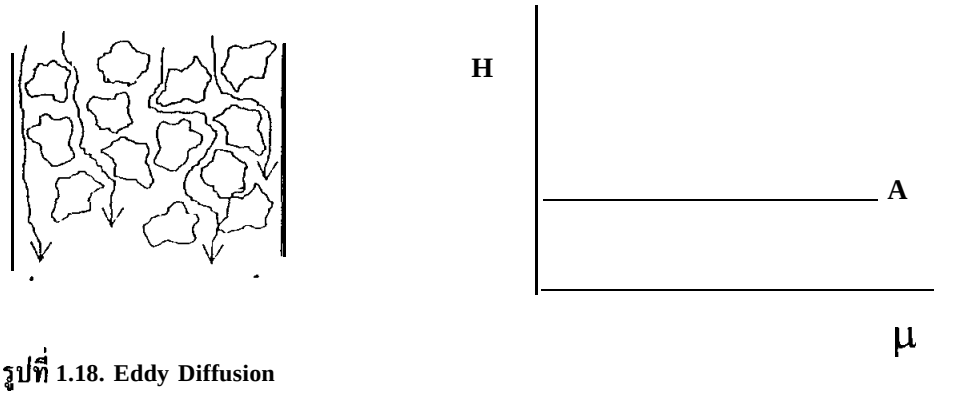
เป็นกราฟที่พล็อตระหว่างความสูงของเพลท (H) กับค่าเฉลี่ยของความเร็วเชิงเส้น (μ)ของเฟสเคลื่อนที่ ข้อมูลต่างๆหาได้จากการทดลองโดยการวัดค่า retention time, holdup time และความกว้างของพีคเพื่อพิจารณาค่า H ที่อัตราการไหลต่างๆ

จากรูปที่ 1.17. ที่อัตราการไหลที่เหมาะสม ประสิทธิภาพโดยรวมจะขึ้นอยู่กับเทอม B เมื่ออัตราการไหลสูงขึ้น ประสิทธิภาพจะลดลงเนื่องจากเทอม C มีค่ามากขึ้น ส่วนเทอม A จะไม่ขึ้นกับอัตราการไหล

ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพจะลดลงเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้น แต่ในทางปฏิบัติจะใช้อัตราการไหลที่สูงเพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ดังนั้นอาจจะใช้การพล็อตเพื่อหาเงื่อนไขที่เหมาะสมที่สุดเพื่อลดเวลาของการวิเคราะห์ที่ให้ค่า H ที่ยอมรับได้

1.7.3. พารามิเตอร์ต่างๆใน van Deemter Equation

1.7.3.1. Eddy Diffusion หรือ เทอม A

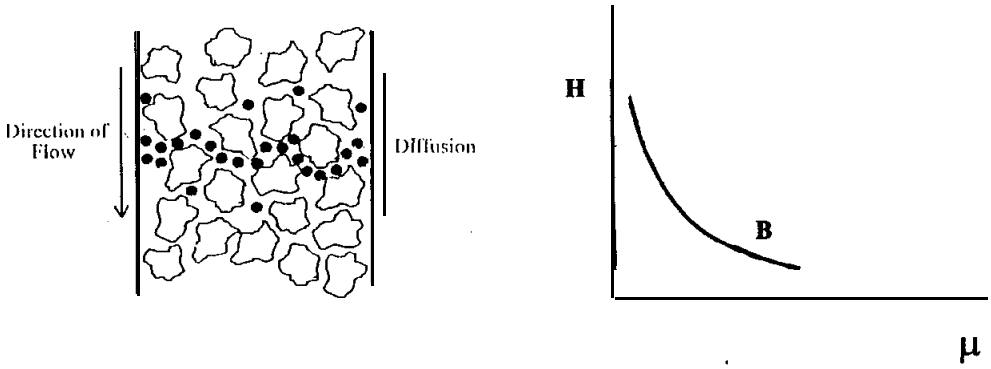


รูปที่ 1.18. Eddy Diffusion

เมื่อโมเลกุลตัวถูกละลายผ่านไปตามคอลัมน์ โมเลกุลต่างๆจะเคลื่อนที่ไปตามเส้นทางต่างๆรอบๆอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ (สาธิต) ในแต่ละเส้นทางจะมีความยาวแตกต่างกัน ดังนั้นโมเลกุลตัวถูกละลายของสปีชีร์เดียวกันจะเคลื่อนที่ไปตามเส้นทางต่างๆกัน และจะออกจากคอลัมน์ในเวลาต่าง

กัน จัดเป็นรูปแบบหนึ่งของการฟุ้งกระจายเรียกว่า Eddy Diffusion ซึ่งจะแทนโดยเทอม A ในสมการ van Deemter จะเห็นว่ากระบวนการนี้เกิดเนื่องจากเฟสอยู่กับที่เท่านั้น การลดการขยายของแถบการแยก สามารถทำได้โดยการบรรจุคอลัมน์ด้วยอนุภาคที่มีขนาดคงที่อย่างสม่ำเสมอ

1.7.3.2. Longitudinal Diffusion หรือ เทอม B

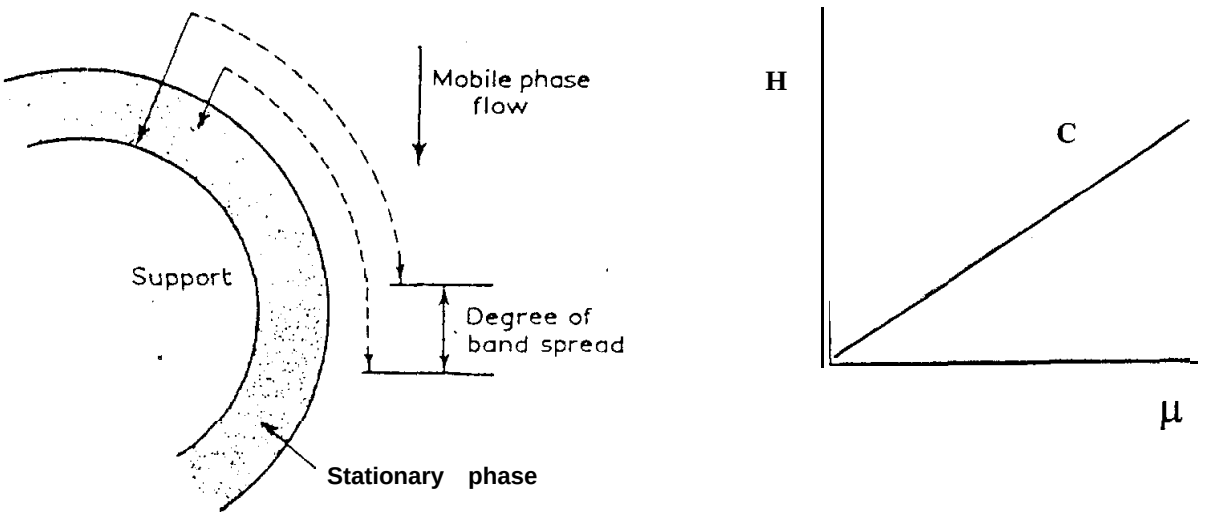


รูปที่ 1.19. Longitudinal Diffusion

ในทางทฤษฎี ของผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปในคอลัมน์ในลักษณะแถบแคบๆขององค์ประกอบเดี่ยวๆที่แยกจากกันโดยแถบของเฟสเคลื่อนที่ หรือก็คือบริเวณที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงแยกโดยบริเวณที่มีความเข้มข้นของตัวทำละลายสูง ผลก็คือเกิดความแตกต่างของความเข้มข้น จะเกิดการฟุ้งกระจายของโมเลกุลขึ้น จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ จัดเป็นรูปแบบหนึ่งของการฟุ้งกระจายเรียกว่า Longitudinal Diffusion ซึ่งแทนด้วยเทอม B ในเทอม van Deemter

จะเป็นกระบวนการที่สัมพันธ์กับเฟสเคลื่อนที่เท่านั้น และไม่ขึ้นกับเฟสอยู่กับที่ การฟุ้งกระจายจะเกิดในทุกทิศทุกทาง โมเลกุลที่ผิวหน้าของแถบจะเคลื่อนที่ไปสู่แถบต่อไป โมเลกุลที่อยู่ท้ายแถบจะเคลื่อนที่ไปสู่แถบก่อนหน้านี้ จะลดได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

1.7.3.3. Resistace to Mass transfer หรือ เทอม C



รูปที่ 1.20. Stationary - phase mass transfer

ในทฤษฎีเพลท ได้ตั้งสมมุติฐานว่า การถ่ายเทโมเลกุลตัวถูกละลายต่างๆระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่จะเป็นไปโดยทันทีทันใด ในทฤษฎีนี้ก็ยอมรับว่า มีการถ่ายเทมวลในอัตราที่จำกัด ยิ่งไปกว่านั้น โมเลกุลของสารสปีชีร์เดียวกันจะใช้เวลาต่างกันในเฟสทั้งสอง การต้านทานต่อการถ่ายเทมวล แสดงด้วยเทอม C ในสมการ van Deemter

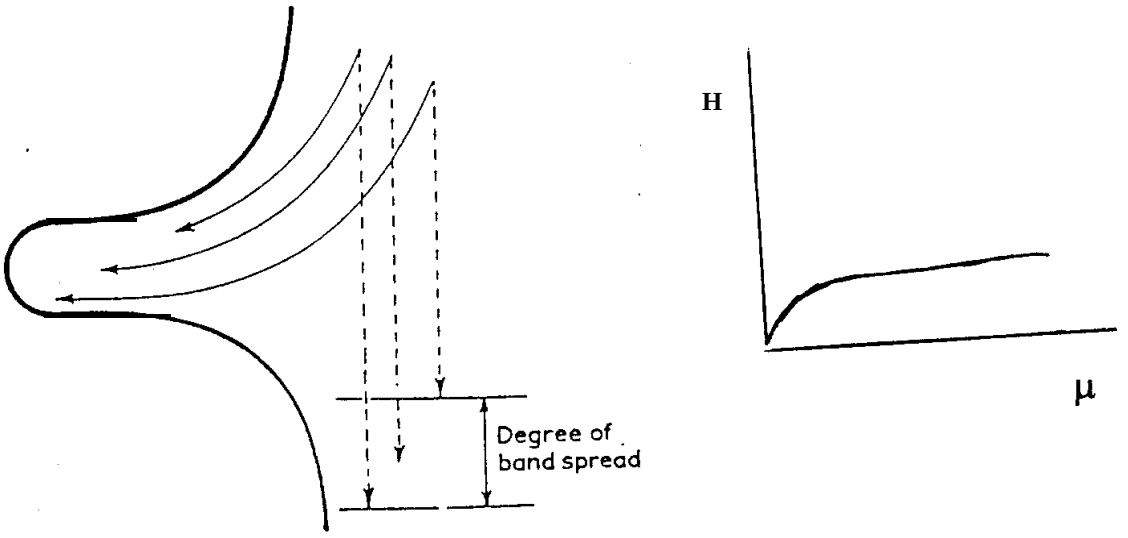
ถ้าหากเวลาที่ใช้สำหรับการถ่ายเทมวลมีค่ามากกว่า เวลาที่โมเลกุลตัวถูกละลายไหลข้ามผิวหน้าของสารที่บรรจุในคอลัมน์ โมเลกุลบางส่วนจะถูกพาโดยเฟสเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ก่อนการฟุ้งกระจายของโมเลกุลอื่นๆที่เข้าๆออกๆจากศูนย์กลางของอนุภาคจะเกิดสมบูรณ์ ดังนั้นการเพิ่มอัตราการไหลจะลดขนาดและความจุของการแยก

ในสถานการณ์อุดมคติ ควรจะให้เฟสเคลื่อนที่มีอัตราการไหลต่ำ เพื่อให้โมเลกุลของสารตัวอย่างมีเวลาเพียงพอในการเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อเทอมนี้คือขนาดของอนุภาค (ขนาดเล็กกว่าจะดีกว่า เนื่องจากโมเลกุลไม่ใช้เวลานานเกินไป) ความหนาของฟิลม์ของเฟสอยู่กับที่ และความหนืดของตัวทำละลาย เช่น acetonitrile จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า methanol ถึง 40%

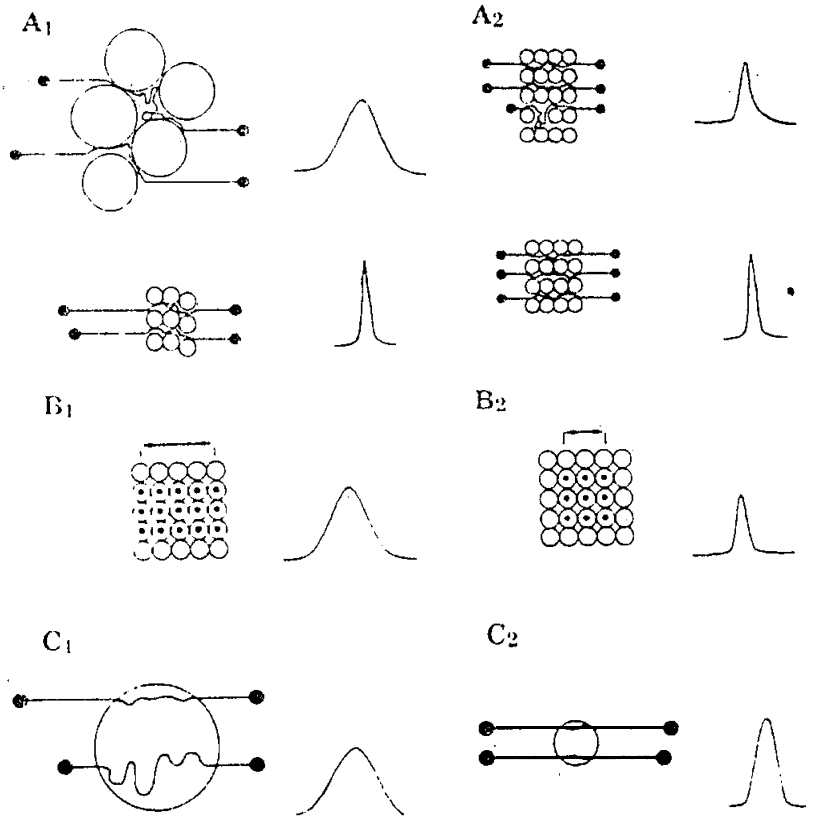
เฟสเคลื่อนที่ที่อยู่กับที่ (Stagnent Mobile Phase)

การเคลื่อนย้ายในเฟสเคลื่อนที่ที่อยู่กับที่ จัดเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกระจายของพีค ซึ่งจะรวมอยู่ในเทอม C ของสมการ van Deemter



รูปที่ 1.21. **Stagnant-mobile phase mass transfer**

เฟสเคลื่อนที่ที่ติดอยู่ในช่องว่างระหว่างอนุภาคกับอนุภาค หรืออยู่ในรูภายในอนุภาค จะทำให้อนุภาคตัวถูกละลายฟุ้งกระจายสู่แอ่งของเหลวในรู นั่นคือถูกดักจับไว้ จะลดได้โดยใช้คอลัมน์ที่สั้นบรรจุด้วยอนุภาคที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กและคงที่



รูปที่ 1.22. แสดงผลของเทอมทั้งสามในสมการ van Deemter ที่ส่งผลต่อการขยายของแถบการแยกและผลที่ได้

เทอม A : ขนาดและการบรรจุ

เทอม B : อัตราการไหล

เทอม C : อัตราการไหล และขนาดของอนุภาค

กิจกรรม 1.8

ให้นักศึกษาทบทวนความสัมพันธ์ของเทอมต่าง ๆ ในสมการ van Deemter กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ และสามารถบอกได้ว่าแต่ละเทอมเกี่ยวข้องกับการขยายของแถบการแยกของสารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปในระบบโครมาโทกราฟีได้อย่างไร

1.8. การปรับความเหมาะสมของการแยกโดย LC

1.8.1. ค่าการหน่วงเหนี่ยว (k')

ในขั้นตอนแรกของการปรับความเหมาะสมการแยกโดย LC คือต้องได้รับการหน่วงเหนี่ยงเพียงพอการพิจารณาสมการ Resolution แสดงให้เห็นว่า ขนาดของการแยกเพิ่มขึ้นน้อยมาก เมื่อค่า k' มีค่ามากกว่า 10 หรืออาจกล่าวว่า การเพิ่มการหน่วงเหนี่ยวจาก k'=1 เป็น k'=10 จะเพิ่มการแยกอย่างมากใน Isocratic Separation

ค่า retention (k' นั่นเอง) จะมีค่าเพิ่มสำหรับคอลัมน์หนึ่งๆ โดยการลดความแรงของตัวทำละลาย สำหรับคอลัมน์ที่กำหนด ตัวทำละลายที่แรงจะหมายถึง ตัวทำละลายที่สามารถพาเอาองค์ประกอบผ่านคอลัมน์ได้รวดเร็ว ส่วนตัวทำละลายที่อ่อน จะหมายถึงตัวทำละลายที่สามารถพาเอาองค์ประกอบออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ของผสมระหว่างตัวทำละลายที่แรงและอ่อน จะถูกใช้ในการปรับความแรงของตัวทำละลาย ซึ่งจะมีผลต่อค่าการหน่วงเหนี่ยว ถ้าหากค่าการหน่วงเหนี่ยวสูง หรือต่ำมากๆ ในคอลัมน์ ไม่ว่าความแรงของตัวทำละลายจะเป็นอย่างไร จำเป็นจะต้องเปลี่ยนคอลัมน์ที่ใช้แยก

ดังนั้นเพื่อปรับความเหมาะสมของค่าปัจจัยความจุ (k') ทำได้โดย

1. ปรับความแรงของตัวทำละลาย
2. ปรับเฟสอยู่กับที่

1.8.2. ค่าความจำเพาะเจาะจง (selectivity, α)

เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่มีบทบาทอย่างมากในโครมาโทกราฟีของเหลว ความจำเพาะเจาะจงสามารถเปลี่ยนแปลงได้หลายวิธี นอกเหนือจากการเปลี่ยนคอลัมน์ เหมือนดังที่ทำใน GC ยกตัวอย่างเช่น การใช้ตัวทำละลายที่อ่อนและแรง จะมีผลต่อความจำเพาะเจาะจง acetonitrile และน้ำ ถูกนำมา

ใช้มากในการแยกระบบ Reverse phase อย่างไรก็ดี สำหรับของผสมและสารประกอบบางอย่าง ที่ต้องใช้ methanol เติมลงไป หรือแทนที่ acetonitrile เพื่อให้ได้รับความจำเพาะเจาะจงที่เหมาะสม

ในการเติมตัวทำละลายที่ใช้ปรับลงไปในปริมาณน้อยๆ สามารถใช้เปลี่ยนแปลงความจำเพาะเจาะจง ยกตัวอย่างเช่น การเติม THF ปริมาณเล็กน้อยลงใน Reverse Phase จะมีผลต่อสมบัติของเฟสอยู่กับที่ ซึ่งจะมีผลต่อความจำเพาะเจาะจง ถ้าหากทำการแยกสารประกอบไอออนิก หรือสารประกอบที่แตกตัวได้ ดังนั้นตัวปรับที่มีผลต่อค่า pH จะเปลี่ยนแปลงความจำเพาะเจาะจง อุณหภูมิจะมีผลต่อความจำเพาะเจาะจง และสามารถใช้ในการเปลี่ยนแปลงค่าความจำเพาะเจาะจง

ดังนั้นเพื่อปรับปรุงความเหมาะสมของค่าความจำเพาะเจาะจง ทำได้โดย

1. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่
2. การใช้สารเติมแต่ง (ตัวปรับ)ในเฟสเคลื่อนที่
3. การเปลี่ยนแปลงค่า pH
4. การเปลี่ยนแปลงเฟสอยู่กับที่
5. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

1.8.3. ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Effkiency, N)

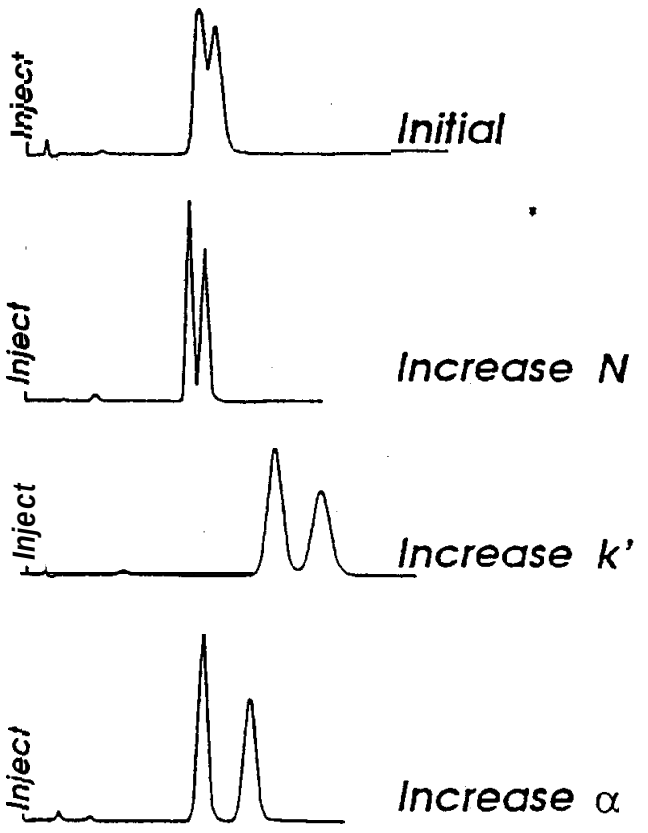
ค่าการหน่วงและความจำเพาะเจาะจง สามารถปรับได้ง่ายๆ การเพิ่มประสิทธิภาพของคอลัมน์ ในกรณีส่วนมากต้องมีการเปลี่ยนฮาร์ดแวร์ ประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถเพิ่มได้โดยการใช้ตัวทำละลายที่มีความหนืดลดลง และเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์ เพื่อปรับปรุงการถ่ายเทมวล แต่ผลเหล่านี้มีค่าน้อยมาก ในทำนองเดียวกัน อัตราการไหลของตัวทำละลายสามารถลดได้ แต่จะไปเพิ่มเวลาในการแยก ซึ่งจะปรับปรุงน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับขนาดของอนุภาคที่เล็กลง

วิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพ คือการใช้คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าคอลัมน์ที่มีอยู่เป็นคอลัมน์เก่า และไม่มีประสิทธิภาพเท่ากับเมื่อยังใหม่ คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูงโดยปกติจะบรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ

คอลัมน์ที่มีขนาดยาวขึ้น อาจจะใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพของคอลัมน์ แต่วิธีการที่ดีกว่าคือการนำเอาคอลัมน์ขนาดสั้น 2 คอลัมน์หรือมากกว่ามาต่อกันแบบอนุกรม เมื่อเทียบกับคอลัมน์ยาว 1 คอลัมน์ที่มีความยาวเท่ากัน คอลัมน์ที่มีขนาดยาวโดยทั่วๆไป จะบรรจุได้ดีเท่าๆกับคอลัมน์ที่มีขนาดสั้น แต่จะไม่ให้ประสิทธิภาพรวมเท่ากับคอลัมน์ขนาดสั้นรวมกัน

ดังนั้นเพื่อปรับปรุงความเหมาะสมของประสิทธิภาพของคอลัมน์ (N) ทำได้โดย

1. ลดอัตราการไหล
2. การใช้คอลัมน์ 2 คอลัมน์หรือมากกว่าต่อเป็นอนุกรม
3. ใช้ตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำ
4. เพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์
5. ลดขนาดของอนุภาค



รูปที่ 1.23. ผลของการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆที่มีต่อการแยก

วัตถุประสงค์หลักในการพัฒนาวิธีการ HPLC เพื่อการแยกกันอย่างเพียงพอสำหรับองค์ประกอบที่สนใจ หลังเลือกคอลัมน์แล้ว องค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ให้ค่าการหน่วงเหนี่ยวที่ต้องการ ถ้าหากว่าขนาดการแยกไม่เพียงพอ จะต้องทำการเปลี่ยนทางกายภาพ ตารางที่ 1.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงที่สามารถทำได้ ตามลำดับของความยุ่งยาก

ตารางที่ 1.2. การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ของการวิเคราะห์ที่มีผลต่อค่า R

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ	ผลที่มีต่อขนาดของการแยก
1. ลดอัตราการไหล	เพิ่มค่า N น้อยมาก
2. ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ชะ	เปลี่ยนแปลงค่าความจำเพาะเจาะจง
3. ใช้คอลัมน์ที่ยาวขึ้น	เพิ่มค่า N
4. ใช้อนุภาคที่มีขนาดเล็กลง	เพิ่มค่า N
5. รูปแบบการแยก	เปลี่ยนแปลงค่าความจำเพาะเจาะจง

วิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดของการเปลี่ยนขนาดของการแยก คือการเปลี่ยนความจำเพาะเจาะจง (α)หรือความจุ (k')ของคอลัมน์ ผลจากการเพิ่มค่า N โดยการเพิ่มความยาวของคอลัมน์ หรืออัตราการไหลจะไม่มีผลมากนัก

แบบฝึกหัด

1. ในเทคนิค HPLC เมื่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เปลี่ยน จะไม่มีผลต่อพารามิเตอร์ต่างๆต่อไปนี้คือ

fl. ค่า Retention time

ข. ค่า capacity factor (k')

ค. ค่า HETP

9. ค่า Resolution

2. ถ้าหากขนาดของอนุภาคเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์ใหญ่ขึ้น แต่อัตราการไหลมีค่าคงที่ ข้อใดต่อไปนี้เป็นจริง

ก. ความดันลดลง

ข. ค่า retention ลดลง

ค. พีคมีขนาดแคบลง

ง. ค่า resolution ลดลง

3. ถ้าความยาวของคอลัมน์เพิ่มขึ้น แต่อัตราการไหลมีค่าคงที่ ข้อใดต่อไปนี้เป็นจริง

ก. ความจำเพาะเจาะจงเพิ่มขึ้น

ข. ค่า retention เพิ่มขึ้น

ค. ค่า N เพิ่ม

ง. ความดันเพิ่ม

4. ปัจจัยในข้อใดต่อไปนี้ ที่ลดประสิทธิภาพของการแยก

ก. เซลล์มีปริมาตรมาก

ข. อัตราการไหลสูง

ค. อนุภาคมีขนาดใหญ่

ง. dead volume มีขนาดใหญ่

จ. ตัวทำละลายของตัวอย่างแรงเกินไป

5. เทอมใดในสมการ van Deemter Equation ที่ไม่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ก. A

ข. B

ค. C

ง. H

6. ปัจจัยในข้อใดต่อไปนี้ ไม่มีผลต่อความจำเพาะเจาะจงของการแยก

ก. การกระจายของขนาดของอนุภาค

ข. หมู่ฟังก์ชันที่ผิวหน้า

ค. หมู่ซิลานอลที่หลงเหลืออยู่

ง. อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุล

7. สารประกอบ 2 ชนิดมีค่า retention times เท่ากับ 10 และ 7.5 mins ตามลำดับบนคอลัมน์ HPLC ที่สารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวเลยจะถูกชะออกมาที่เวลา 2.5 mins จงคำนวณค่าความจำเพาะเจาะจง (α) สำหรับสารประกอบทั้งสองนั้น

ก. 1.33

ข. 0.75

ค. 0.67

ง. 1.5

8. เมื่อทำการทดสอบคอลัมน์ HPLC ยาว 250 cm และพบว่ามีประสิทธิภาพ 60,000 เพลท ต่อเมตร จงคำนวณหาค่า HETP

ก. 1.67×10^{-5} m

ข. 4.17×10^{-6} m

ค. 6×10^{-5} m

ง. 4.17×10^{-3} m

เฉลยแบบฝึกหัด พร้อมคำอธิบาย

1. **คำตอบ**

ก. ผิด

คำอธิบาย เนื่องจากค่า Retention Volume (retention time x flow rate) มีค่าคงที่ เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล จะเปลี่ยนแปลงค่า Retention time

ข. ถูก

คำอธิบาย k' เป็นค่าคงที่ ซึ่งขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์การกระจายตัว และปริมาณของเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ในคอลัมน์

ค. ผิด

คำอธิบาย ค่า HETP สืบเนื่องมาจากค่า N ซึ่งเป็นฟังก์ชันกับอัตราการไหล

ง. ผิด

คำอธิบาย การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล จะเปลี่ยนแปลงค่า N ในสมการ resolution

2. คำตอบ

ก. ถูก

คำอธิบาย เมื่ออัตราการไหลคงที่ ความดันจะเป็นสัดส่วนผกผันกับขนาดของอนุภาคยกกำลังสอง

ข. ผิด

คำอธิบาย ค่า retention time ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหล

ค. ผิด

คำอธิบาย อนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จะทำให้คอลัมน์มีประสิทธิ์ภาพลดลง พีคจะกว้างขึ้น

ง. ถูก

คำอธิบาย ขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้น จะลดปัจจัยประสิทธิภาพในสมการ resolution

3 . **คำตอบ**

ก. ผิด

คำอธิบาย ค่า k' และความจำเพาะเจาะจงไม่ขึ้นกับความยาวของคอลัมน์

ข. ถูก

คำอธิบาย ค่า retention เป็นสัดส่วนตรงกับความยาวของคอลัมน์ เมื่ออัตราการไหลคงที่

ค. ถูก

คำอธิบาย ค่า N เป็นสัดส่วนตรงกับความยาวของคอลัมน์ เมื่ออัตราการไหลคงที่

ง. ถูก

คำอธิบาย ค่าความดันเพิ่ม เป็นสัดส่วนตรงกับความยาวของคอลัมน์ เมื่ออัตราการไหลคงที่

4 . **คำตอบ**

ก. ถูกต้อง

คำอธิบาย การกระจายและการพาในเซลล์ สามารถทำให้แถบของพีคกว้างขึ้นได้

ข. ถูกต้อง

คำอธิบาย ตลอดช่วงที่มีประโยชน์ของอัตราการไหล HETP เพิ่มในลักษณะเชิงเส้นกับอัตราการไหล

ค. ถูกต้อง

คำอธิบาย อนุภาคที่มีขนาดใหญ่จะลดประสิทธิภาพของคอลัมน์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้แถบของพีคกว้างขึ้น

ง. ถูกต้อง

คำอธิบาย ปริมาตรที่เนื่องมาจากท่อเชื่อมต่อต่างๆ ตัวตรอง ตัวยึด ซึ่งเป็นสาเหตุให้แถบของพีคกว้างขึ้น

จ. ถูกต้อง

คำอธิบาย ถ้าตัวอย่างละลายในตัวทำละลายที่มีความแรงสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ ทำให้พีคอ้วนขึ้นและผิดรูปร่างไป

5. **คำตอบ**

ก. **ถูกต้อง**

คำอธิบาย เทอม A ไม่ขึ้นกับอัตราการไหล

ข. **ผิด**

คำอธิบาย อัตราการไหลเพิ่ม เทอม B มีค่าลดลง

ค. **ผิด**

คำอธิบาย อัตราการไหลเพิ่ม เทอม C มีค่าเพิ่มขึ้น

ง. **ผิด**

คำอธิบาย เป็นผลรวมของ 3 เทอมด้วยกัน

6. **คำตอบ**

ก. **ถูกต้อง**

คำอธิบาย ความจำเพาะเจาะจง จะขึ้นอยู่กับเทอร์โมไดนามิกส์ของอันตรกิริยาของตัวถูกละลายภายในระบบโครมาโทกราฟี ซึ่งถูกกำหนดโดยชนิด และขนาดของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลกับหมู่ฟังก์ชันที่ผิวหน้าของเฟสอยู่กับที่ ส่วนการกระจายของขนาดของอนุภาคจะมีผลต่อจลนศาสตร์ของอันตรกิริยาของตัวถูกละลายกับเฟสอยู่กับที่ ซึ่งจะมีผลต่อรูปร่างของพีค (แสดงในรูปของประสิทธิภาพ)

ข. **ผิด**

คำอธิบาย มีผลเนื่องจากอันตรกิริยาทุติยภูมิ เช่นจากหมู่ซิลานอลที่หลงเหลืออยู่

ค. **ผิด**

คำอธิบาย อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลในเฟสเคลื่อนที่

ง. **ผิด**

คำอธิบาย สามารถมีผลอย่างมากต่อค่าความจำเพาะเจาะจง

7. **คำตอบ**

ก. **ผิด**

คำอธิบาย ดูคำตอบข้อ ง.

n. **ผิด**

คำอธิบาย ดูคำตอบข้อ ง.

ข. **ผิด**

คำอธิบาย ดูคำตอบข้อ ง.

ง. **ถูกต้อง**

คำอธิบาย $\alpha = k_2/k_1$, $k_2 = (t_{r2}-t_0)/t_0 = (10-2.5)/2.5 = 3$

และ $k_1 = (t_{r1}-t_0)/t_0 = (7.5-2.5)/2.5 = 2$

ดังนั้น $a = 3/2 = 1.5$

8. **คำตอบ**

ก. **ถูกต้อง**

คำอธิบาย H = L/n คอลัมน์มีค่า 60,000 เพลท ต่อเมตร และยาว 0.25 m

ดังนั้น N = 60,000 x 0.25 = **15,000**

ดังนั้น $H = 0.25 / 15{,}000 = 1.67 \times 10^{-5}$ m

ข. **ผิด**

คำอธิบาย ดูคำตอบข้อ ก.

A. **ผิด**

คำอธิบาย ดูคำตอบข้อ ก.

ง. **ผิด**

คำอธิบาย ดูคำตอบข้อ ก.