บทที่ 9
ก๊าซโครมาโตกราฟี
(Gas Chromatography)

ก๊าซโครมาโตกราฟี (GC) เป็นเทคนิคหนึ่งของการวิเคราะห์ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะมีความสามารถแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้ และยังให้ผลที่เที่ยงตรงรวดเร็วกว่าลิควิดโครมาโตกราฟี ก๊าซโครมาโตกราฟี มีเทคนิคในการวิเคราะห์ 2 วิธี คือ การใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็ง เรียกว่า "gas-solid chromatography" (GSC) และการใช้เฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลว เรียกว่า "gas-liquid chromatography" (GLC) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้มีเฟสที่เคลื่อนที่ได้เป็นก๊าซ เทคนิคทั้งสองได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ โดยที่เทคนิคของ GLC เป็นที่นิยมกันมากกว่า ก๊าซโครมาโตกราฟีใช้ได้กับสารที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ ณ อุณหภูมิของคอลัมน์เท่านั้น ดังนั้นวิธีการของก๊าซโครมาโตกราฟีจึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารประกอบอินทรีย์เท่านั้น เพราะสารประกอบอินทรีย์สามารถกลายเป็นไอได้ง่าย จะไม่ใช้วิธีก๊าซโครมาโตกราฟีสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบอนินทรีย์ เพราะสารประกอบอนินทรีย์ไม่สามารถกลายเป็นไอได้ในอุณหภูมิปกติ (ที่ทำการทดลอง) ของคอลัมน์ วิธีก๊าซโครมาโตกราฟีสามารถใช้ในการวิเคราะห์ ได้ทั้งทางคุณภาพและทางปริมาณ

ทฤษฎีทั่วไปของโครมาโตกราฟี

ไม่มีรายละเอียดสำหรับทฤษฎีของก๊าซโครมาโตกราฟีโดยเฉพาะ แต่เราสามารถพิจารณาทฤษฎีของก๊าซโครมาโตกราฟีได้เหมือนกับทฤษฎีทั่ว ๆ ไปของโครมาโตกราฟี

ทฤษฎีทั่วไปของโครมาโตกราฟีที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้ จะเป็นพื้นฐานที่อธิบายได้กับโครมาโตกราฟีทุกชนิด ผู้ตั้งทฤษฎีทั่วไปของโครมาโตกราฟีคนแรกคือ A.J.P. Martin และ R.L.M. Synge โดยการพิจารณาส่วนที่เล็กที่สุดของคอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี ซึ่งประกอบด้วยเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างถูกผ่านไปในคอลัมน์จะกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง การกระจายขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์ของการกระจาย เมื่อการกระจายถึงสมดุล ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในแต่ละเฟส จะเป็นไปตามกฎของการกระจาย คือ

$$K_d = \frac{C_s}{C_m} \qquad \text{.....(9.1)}$$

C_s คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสที่อยู่กับที่

C_m คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ได้

ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (K_d) จะมีความสัมพันธ์กันกับความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างตามเฟสที่เคลื่อนที่ได้ขณะทำการดีเวลอป (development) เมื่อค่า K_d เพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยของอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างจะลดลง คือ ปริมาณสารตัวอย่างชอบอยู่ในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าที่จะกระจายไปอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ได้ แสดงว่าถ้ามีสารตัวอย่างหลายชนิดที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายแตกต่างกัน จะมีความเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารตัวอย่างนั้น ๆ ออกจากกันได้ การพิจารณาอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง สามารถพิจารณาได้จากระยะเวลาที่โมเลกุลของสารตัวอย่างใช้อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่หรือเฟสที่อยู่กับที่ ดังนั้น คือ ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่กับเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสที่เคลื่อนที่ได้ แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างมีค่าน้อย หรือ K_d มีค่ามาก แต่ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่กับเฟสที่อยู่กับที่น้อยกว่าเฟสที่เคลื่อนที่ได้ แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างมีค่ามาก ซึ่งเศษส่วนของเวลาที่สารตัวอย่าง หรือตัวถูกละลายใช้อยู่ในแต่ละเฟส จะสัมพันธ์โดยตรงกับเศษส่วนของจำนวนโมเลกุลของตัวถูกละลายในแต่ละเฟส

$$\text{เศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่} = \frac{\text{จำนวนโมเลกุลที่อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่}}{\text{จำนวนโมเลกุลทั้งหมด}}$$

$$= \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s}$$

นำ C_mV_m หารทั้งเศษและส่วนจะได้

เศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ $= \dfrac{1}{1+\dfrac{C_sV_s}{C_mV_m}}$

$$= \frac{1}{1+K_d\dfrac{V_s}{V_m}}$$

$$= \frac{1}{1+k'} \qquad \text{..... (9.2)}$$

เมื่อ k' คือ $K_d\dfrac{V_s}{V_m}$ ซึ่งเป็นตัวแปรตัวใหม่ที่เรียกว่าคาพาซิตีแฟคเตอร์ (Capacity factor) มีความหมายถึงอัตราส่วนของจำนวนโมลของสารตัวอย่างในเฟสที่อยู่กับที่ต่อจำนวนโมลของสารตัวอย่างในเฟสที่เคลื่อนที่

$$k' = K_d\frac{V_s}{V_m}$$

$$= \frac{C_sV_s}{C_mV_m} \qquad \text{..... (9.3)}$$

จากสมการที่ 9.2 ซึ่งคือเศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายใช้อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเราคูณด้วยความเร็วที่เป็นเส้นตรง u (linear velocity) ของเฟสที่เคลื่อนที่หรือตัวพา จะได้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกละลายหรือสารตัวอย่าง

$$\text{rate of travel} = u\frac{1}{1+k'} \qquad \text{..... (9.4)}$$

หรือ

$$= u\frac{1}{1+K_d\dfrac{V_s}{V_m}} \qquad \text{..... (9.5)}$$

จากสมการที่ 9.4 หรือ 9.5 แสดงได้ว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่เฉลี่ยของโมเลกุลของสารตัวอย่าง จะมีค่าเท่ากับเท่าไรนั้นขึ้นอยู่กับ

ก. ความเร็วของตัวพาหรือเฟสที่เคลื่อนที่

ข. อัตราส่วนของปริมาตรของเฟสทั้งสอง

ค. ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย

ในการทดลองโครมาโตกราฟี สารตัวอย่างจะประกอบด้วยตัวถูกละลายหลายชนิด

ดังนั้น เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ โมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวจะเริ่มต้นเคลื่อนที่พร้อมกันในเวลาเดียวกัน แต่ตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้เกิดเทคนิคของการทำโครมาโตกราฟีได้ 2 วิธี คือ

1. กำหนดเวลาแน่นอน

2. กำหนดระยะทางให้แน่นอน

1. กำหนดเวลาแน่นอน โดยการกำหนดเวลาให้แน่นอนในการแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟี เนื่องจากตัวถูกละลายแต่ละตัวเคลื่อนที่ได้ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจะทำให้เกิดเป็นแบนด์หรือโซนของตัวถูกละลายแต่ละตัวแยกออกจากกัน ตัวอย่างโครมาโตกราฟีที่ใช้เทคนิคนี้ได้แก่ paper chromatography และ thin layer chromatography

2. กำหนดระยะทางให้แน่นอน ตัวอย่างการทดลองโดยใช้เทคนิคนี้ คือ การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยกำหนดระยะทางเป็นความยาว 1 คอลัมน์ ตัวถูกละลายแต่ละตัวเดินทางจากส่วนบนของคอลัมน์มายังส่วนล่างสุด หรือออกจากคอลัมน์จะใช้เวลาเดินทางแตกต่างกัน ตัวถูกละลายที่ถูกปล่อยออกจากคอลัมน์ จะถูกตรวจพบได้ด้วยตัวดีเทคเตอร์ (detector) เมื่อสร้างกราฟระหว่างผลที่ได้จากการตรวจพบด้วยดีเทคเตอร์ (detector response) กับเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ จะได้กราฟที่เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) เวลาที่ตัวถูกละลายใช้เดินทางจากส่วนบนของคอลัมน์ จนถึงออกจากคอลัมน์เรียกว่า รีเทนชันไทม์ (Retention time) และขนาดของโครมาโตแกรมจะขึ้นอยู่กับปริมาณสาร

รีเทนชันไทม์ (Retention Time), t_R คือ เวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ได้เท่ากับ 1 คอลัมน์ ซึ่งมีค่าเท่ากับความยาวของคอลัมน์หารด้วยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลาย ในโครมาโตแกรมสามารถหาค่า t_R ได้จากการวัดระยะทางตั้งแต่เริ่มใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์จนถึงส่วนยอดของพีก

$$t_R = \frac{\text{length of column (L)}}{\text{rate of travel}} \qquad \ldots\ldots (9.6)$$

แทนค่าสมการที่ 9.4 ลงในสมการที่ 9.6

$$t_R = \frac{L}{u}(1 + k') \qquad \ldots\ldots (9.7)$$

ให้ t_m คือ เวลาที่โมเลกุลของตัวพาเดินทางได้ 1 คอลัมน์ ซึ่งมีค่าเท่ากับความยาว

ของคอลัมน์ หารด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของเฟสที่เคลื่อนที่ (u) นั่นคือ $t_m = \frac{L}{u}$ ในกรณีที่เฟสเคลื่อนที่คือก๊าซ สามารถวัดค่า t_m ได้จากพีกของอากาศ เมื่ออากาศไม่เป็นตัวหน่วงในคอลัมน์ (ดูรูปที่ 9.3)

$$\therefore \quad t_R = t_m(1 + k') \qquad \text{..... (9.8)}$$

หรือ $$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

สมการที่ 9.8 เป็นสมการพื้นฐานของโครมาโตกราฟีทุกชนิด โดยปกติจะนำไปใช้กันมากในก๊าซโครมาโตกราฟี

สมการที่มีประโยชน์อีกสมการหนึ่งคือ สมการของอัตราส่วนของรีเทนชัน (retention ratio), r ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของเวลาที่โมเลกุลของตัวพาเดินทางได้ 1 คอลัมน์ (t_m) ต่อรีเทนชันไทม์ (t_R)

$$r = \frac{t_m}{t_R} \qquad \text{..... (9.9)}$$

แทนค่าสมการที่ (9.8) ลงใน (9.9)

$$r = \frac{t_m}{t_m(1 + k')}$$

$$= \frac{1}{1 + k'}$$

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

$$= \frac{V_m}{V_m + K_d V_s} \qquad \text{..... (9.10)}$$

รีเทนชันโวลูม (Retention volume), V_R คือ ปริมาตรของเฟสที่เคลื่อนที่ได้ หรือตัวพาที่ต้องการใช้สำหรับการอีลูทสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ รีเทนชันโวลูมมีความสัมพันธ์กับรีเทนชันไทม์ คือ มีค่าเท่ากับเวลาที่ใช้ทั้งหมด หรือรีเทนชันไทม์คูณด้วยอัตราการไหลของตัวพา (ปริมาตร/เวลา)

$$\text{volume} = \text{time} \times \text{flow rate}$$

$$V_R = t_R F \qquad \text{..... (9.11)}$$

แทนค่าสมการที่ 9.8 ลงในสมการที่ 9.11

$$V_R = t_m(1+k')F \quad \text{..... (9.12)}$$

สำหรับปริมาตรของตัวพาที่ใช้เวลาในการเดินทางได้ 1 คอลัมน์ (t_m) มีค่าเท่ากับ V_m จะมีความสัมพันธ์กันดังนี้ คือ

$$V_m = t_m F \quad \text{..... (9.13)}$$

ปริมาตร V_m ตามปกติถูกเรียกว่า dead volume หรือ interstitial หรือ void volume

แทนค่าสมการที่ 9.13 $\left(t_m = \frac{V_m}{F}\right)$ ลงในสมการที่ 9.12

$$V_R = \frac{V_m}{F}(1+k')F$$

$$= V_m(1+k')$$

ในเมื่อ $k' = K_d \frac{V_s}{V_m}$

$$\therefore V_R = V_m\left(1+K_d\frac{V_s}{V_m}\right)$$

$$= V_m + K_d V_s \quad \text{..... (9.14)}$$

สมการที่ 9.14 จะเป็นสมการพื้นฐานของรีเทนชันที่ใช้กับโครมาโตกราฟีทุกชนิดเช่นกัน ถ้าเฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็ง เราสามารถเปลี่ยน V_s ให้เป็นพื้นที่ผิวที่เกิดการดูดซับหรือเป็น ion exchange capacity ก็ได้แล้วแต่ความเหมาะสม

ตามปกติวิธีการโครมาโตกราฟีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางคุณภาพ (Qualitative analysis) ที่นิยมกันคือ วิธีการเปรียบเทียบรีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูม ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน ที่ทำการทดลองภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน สารชนิดเดียวกันเมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกันทุกอย่าง จะให้ค่ารีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูมเท่ากัน ซึ่งเป็นค่าที่สามารถแสดงเอกลักษณ์ หรือพิสูจน์ (identify) สารนั้น ๆ ได้ แต่เนื่องจากสภาวะของการทดลองขึ้นอยู่กับแฟคเตอร์หลายชนิด คือ ชนิดของเฟสที่อยู่กับที่ เฟสที่เคลื่อนที่ อุณหภูมิและอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่หรืออื่น ๆ ทำให้ไม่สามารถแสดงรายละเอียดของค่า V_R และ t_R ของสารตัวอย่างแต่ละตัว ที่สภาวะต่าง ๆ ได้หมดทุกสภาวะ ดังนั้น จึงไม่สะดวกที่จะใช้ค่านี้ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพ หรือพิสูจน์สารต่าง ๆ

ค่าที่สามารถใช้ในการพิสูจน์สารได้ถูกต้องและสะดวกกว่าคือ ค่ารีเลทิฟรีเทนชัน (relative retention), α หรือ selectivity factor ซึ่งคืออัตราส่วนของรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นรีเทนชันไทม์ ที่มีการแก้ไขให้ถูกต้อง โดยหักเวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวพาที่มีอยู่ในคอลัมน์ออกจากคอลัมน์แล้ว

$$\alpha = \frac{t_R - t_m}{t_{R\bullet} - t_m} = \frac{t'_R}{t'_{R\bullet}} \qquad \ldots\ldots (9.15)$$

$t_{R\bullet}$ คือ รีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐาน (สารมาตรฐานและสารตัวอย่างไม่ใช่สารชนิดเดียวกัน)

เราสามารถทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าสารตัวอย่างนั้นคืออะไรได้โดยใช้สารตัวอย่าง ผสมกับสารมาตรฐานแล้วผ่านลงในคอลัมน์ จากนั้นหาค่ารีเลทีฟรีเทนชัน (α) เปรียบเทียบกับค่ารีเลทีฟรีเทนชัน ของสารที่ทราบว่าคืออะไรต่อสารมาตรฐานตัวเดียวกัน ถ้าได้ค่าเท่ากันแสดงว่าสารตัวอย่างก็คือชนิดเดียวกับตัวที่ทราบ วิธีการพิสูจน์สารแบบนี้ต้องใช้ค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารทั้งสองชนิดที่ได้จากการใช้เฟสที่อยู่กับที่ และเฟสที่เคลื่อนที่ได้เป็นชนิดเดียวกันเท่านั้น จึงจะเปรียบเทียบกันได้ วิธีการนี้ไม่ต้องยุ่งยากในการควบคุมสภาวะของการทดลองอันอื่น ๆ ดังนั้น จึงเป็นการสะดวกที่จะแสดงค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารที่ทราบว่าคืออะไรต่อสารมาตรฐานต่าง ๆ ไว้ได้มากมาย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสำหรับการวิเคราะห์ทางคุณภาพ

เนื่องจากค่ารีเทนชันโวลูม ที่มีอัตราของการไหลของตัวพาคงที่ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับรีเทนชันไทม์ นั่นคือ

$$\alpha = \frac{V_R - V_m}{V_{R\bullet} - V_m} \qquad \ldots\ldots (9.16)$$

จากสมการที่ 9.14 แทนค่าลงในสมการที่ 9.16

$$\alpha = \frac{(V_m + K_d V_s) - V_m}{(V_m + K_{d\bullet} V_s) - V_m}$$

$$\therefore \alpha = \frac{K_d}{K_{d\bullet}} \qquad \ldots\ldots (9.17)$$

$V_{R\bullet}$, $K_{d\bullet}$ คือ ค่าของสารมาตรฐาน

ในการทำ ion-exchange chromatography ค่ารีเลทีฟรีเทนชัน ที่แสดงในสมการที่ 9.17 บางทีเรียกว่า แฟคเตอร์ของการแยก (separation factor)

ตัวอย่างที่ 9.1 ในการทำโครมาโตแกรมของสารผสมที่ประกอบด้วยเบนซีน (Benzene) แอนทราซีน (anthracene) และอากาศ (ซึ่งไม่เป็นตัวหน่วงของคอลัมน์ ค่ารีเทนชันไทม์ของสารแต่ละตัวมีค่าดังแสดงในตาราง สมมติว่าคอลัมน์มีลักษณะเป็นหลอดทรงกลมที่มีความยาว 50 cm มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1.00 cm มีอัตราการไหลของตัวพา 30 cm^3/นาที จงคำนวณหาค่า k′ ของเบนซีน, V_m, V_s (สมมติว่าปริมาตรรวมของคอลัมน์มีค่าเท่ากับ $V_m + V_s$) และ K_d ของเบนซีน และคำนวณหาค่ารีเลทีฟรีเทนชันของแอนทราซีนเทียบกับเบนซีน

สารประกอบ	t (min)
เบนซีน	3.24
แอนทราซีน	5.73
อากาศ	0.25

วิธีทำ จากสมการที่ 9.8 สามารถใช้ในการคำนวณหาค่า k′ ได้ เพราะว่าอากาศไม่เป็นตัวหน่วงในคอลัมน์ จะได้ $t_m = 0.25$

$$t_R = t_m(1 + k')$$

$$3.24 = 0.25(1 + k')$$

$$0.25\,k' = 3.24 - 0.25$$

$$k' = 12$$

ค่า V_m สามารถคำนวณได้จากสมการ 9.13 เมื่อทราบอัตราการไหลของตัวพา

$$V_m = t_m F$$

$$= (30\ cm^3/min)\ (0.25\ min)$$

$$= 7.5\ \ cm^3$$

ปริมาตรของคอลัมน์ทั้งหมด คำนวณได้จากความยาวของคอลัมน์และรัศมีของคอลัมน์

$$V = (\pi r^2)\ (L)$$

$$= \frac{22}{7} \times \left(\frac{1}{2}\right)^2 \times 50\ \ (cm)^2 \cdot cm$$

$$= 39.3\ \ cm^3$$

จากโจทย์ ปริมาตรรวมทั้งหมดของคอลัมน์ มีค่าเท่ากับ $V_m + V_s$

$$\therefore \quad 39.3 = V_m + V_s$$

$$= 7.5 + V_s$$

$$\therefore \quad V_s = 31.8 \ cm^3$$

จากสมการ $\quad k' = K_d \frac{V_s}{V_m}$

$$\therefore \quad K_d = 12 \times \frac{7.5}{31.8} = 2.8$$

ค่ารีเลทีฟรีเทนชันของแอนทราซิน เมื่อเทียบกับเบนซีน คำนวณได้จากสมการที่ 9.15

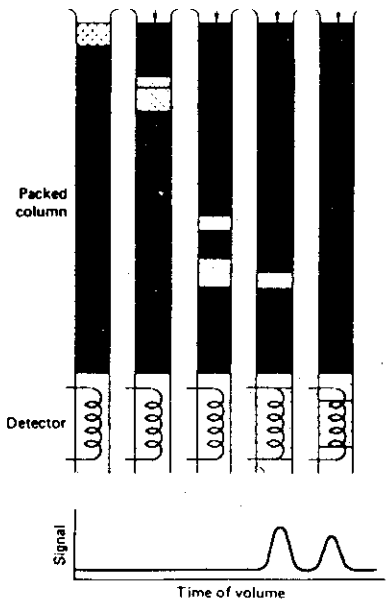
$$\alpha = \frac{t_R - t_m}{t_{R'} - t_m}$$

$$= \frac{5.73 - 0.25}{3.24 - 0.25} = 1.83$$

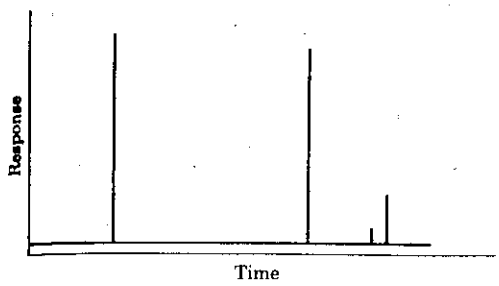
ทฤษฎีการอีลูทในโครมาโตกราฟี (Theories of Elution Chromatography)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ละลายในเฟสที่เคลื่อนที่ใส่ลงในส่วนบนของคอลัมน์ จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสที่อยู่กับที่กับเฟสที่เคลื่อนที่ เมื่อเราเติมเฟสที่เคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์อีก คือ เติมตัวอีลูท (eluent) มันจะผลักดันด้วยแรงขับ (driving force) ให้เฟสที่เคลื่อนที่ที่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ สารตัวอย่างที่ถูกพาลงมาจะมาพบกับเฟสที่อยู่กับที่ส่วนใหม่ ก็จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสทั้งสองอีก เมื่อเติมตัวอีลูทต่อไปอีกเรื่อย ๆ ก็จะทำให้สารตัวอย่างถูกพาลงมาส่วนล่างของคอลัมน์อีก จนในที่สุดออกจากคอลัมน์ เพราะว่าการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากการพาของเฟสที่เคลื่อนที่หรือตัวอีลูทเท่านั้น ฉะนั้น อัตราเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จึงขึ้นอยู่กับเศษส่วนของเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่ (สมการที่ 9.2) ถ้าสารตัวอย่างที่นำมาใส่ในคอลัมน์ มีตัวถูกละลายมากกว่าชนิดหนึ่ง และตัวถูกละลายมีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายหรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วนต่างกัน พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายนั้นต่างกัน ทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายทั้งสองชนิดออกจากกันได้ดังแสดงในรูปที่ 9.1 ถ้าโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติเหมือนกัน และการเคลื่อนที่ของโมเลกุล

ของตัวถูกละลายสามารถเคลื่อนที่ได้เท่ากันหมด เราจะได้โครมาโตแกรมที่เป็นอุดมคติ โซนของแต่ละตัวของตัวถูกละลายที่เรียกว่า แบนด์ หรือพีก จะไม่เกิดการกระจาย ดังแสดงในรูปที่ 9.2

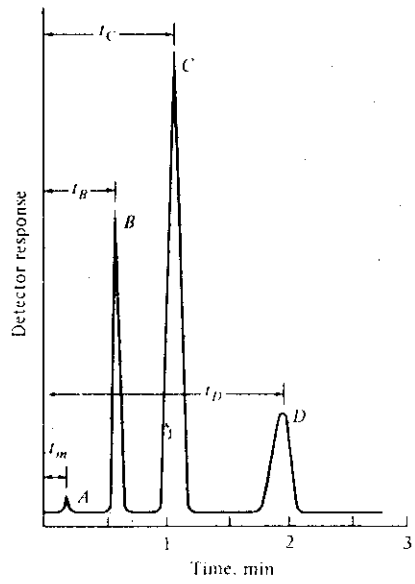


รูปที่ 9.1 แผนผังแสดงการอีลูทสารผสมของตัวถูกละลาย 2 ชนิดในวิธีโครมาโตกราฟี



รูปที่ 9.2 โครมาโตแกรมของสารตัวอย่างที่มีความประพฤติเป็นอุดมคติ (Ideal behavior)

แต่เนื่องจากโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติไม่เหมือนกัน บางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า ทำให้โครมาโตแกรมที่ได้เป็นแบนด์หรือพีกที่มีความกว้าง (band broadening) ดังแสดงในรูปที่ 9.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการอีลูทสารแต่ละชนิดออกมาเรียกว่า รีเทนชันไทม์



รูปที่ 9.3 โครมาโตแกรมในการทำก๊าซโครมาโตกราฟี สารตัวอย่างที่ประกอบด้วย air (peak A) heptane (peak B), octane (peak C) และ nonane (peak D) อากาศไม่เป็นตัวหน่วงในคอลัมน์ จึงสามารถใช้เป็น peak สำหรับวัด t_m ได้ การวัดค่ารีเทนชันไทม์สามารถใช้ส่วนบนสุดของโครมาโตแกรมดังแสดงในรูป (t_B, t_C และ t_D คือ รีเทนชันไทม์ (t_R) ของพีก B, C และ D ตามลำดับ)

ลักษณะของแบนด์หรือพีกที่ได้จะกว้างหรือแคบมากน้อยแค่ไหน ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบหลายอย่าง คือ

1. การใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์

2. การแพร่กระจายของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ (longitudinal diffusion)

3. การไหลของโมเลกุลของสารตัวอย่างในคอลัมน์ มีทิศทางที่แตกต่างกัน และได้ระยะทางที่ต่างกัน เพราะขนาดและรูปร่างของเฟสที่อยู่กับที่ในคอลัมน์แตกต่างกัน (Eddy diffusion)

4. โมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่และเฟสที่อยู่กับที่ได้ (non equilibrium mass transfer)

มันเป็นไปไม่ได้ที่จะใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ โดยพร้อมกันหมดทุกโมเลกุล การใส่สารตัวอย่างที่กระจายเป็นวงกว้างจะมีผลให้ได้แบนด์ที่กว้าง เมื่อแบนด์ของสารตัวอย่างที่ใส่ลงไปมีความกว้างมาก ก็จะมีผลทำให้การแยกได้แบนด์ที่กว้าง หรือแยกออกจากกันได้ไม่ดีเท่าที่ควร ด้วยเหตุผลนี้เวลาใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ หรือหยดสารตัวอย่างลงบนกระดาษ หรือเพลตในการทำ paper chromatography หรือ thin layer chromatography ต้องพยายามทำให้เป็นวงที่เล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้

สำหรับการควบคุมขนาดขององค์ประกอบ 3 ข้อหลัง สามารถทำได้โดยควบคุมอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ ขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์หรือเฟสที่อยู่กับที่และขนาดของคอลัมน์ แบนด์จะมีความกว้างมากขึ้น ถ้ามีการกระจายเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากสารตัวอย่าง อยู่ในคอลัมน์เป็นเวลานานเกินไป การที่จะทำให้สารตัวอย่างไม่อยู่ในคอลัมน์นานเกินไป สามารถทำได้โดยเพิ่มอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ ก็จะมีผลให้การแยกของสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นไม่ดี พีก (peak) ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ดังนั้น จึงเป็นความจำเป็นที่ต้องควบคุมให้อัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ ก็จะมีผลให้การแยกของสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นสารผสมออกจากกันได้ ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้น ระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่และเฟสที่อยู่กับที่ได้ พบว่ามันจะใช้เวลาอยู่กับเฟสหนึ่งมากกว่าอีกเฟสหนึ่งได้มากกว่าที่มันควรจะเป็น ซึ่งมีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้าง เมื่อเพิ่มอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ จะมีผลทำให้มีเวลาน้อย ที่จะทำให้สารตัวอย่างเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง เมื่อขาดการเกิดสมดุลขึ้น ก็มีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้างนั่นเอง สรุปได้ว่าในกรณีที่เกิดการแพร่กระจายของสารตัวอย่างขึ้น จะทำให้แบนด์ที่ได้กว้าง การทำให้การแพร่กระจายลดลงสามารถทำได้โดยเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ให้เร็วขึ้น จะมีผลทำให้สารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่

และเฟสที่อยู่กับที่ได้เพราะมีเวลาน้อย ก็จะเป็นสาเหตุทำให้แบนด์กว้างขึ้น แสดงว่าการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่สามารถทำให้แบนด์กว้างก็ได้ แคบก็ได้ ขึ้นอยู่กับว่าองค์ประกอบใดมีผลมากกว่ากัน ถ้าสมดุลระหว่างเฟสทั้งสองเกิดขึ้นได้รวดเร็วมาก การเพิ่มอัตราการไหลก็จะทำให้แบนด์ที่ได้แคบ เพราะสามารถขจัดผลของการเกิดการแพร่กระจาย ถ้าสมดุลเกิดขึ้นช้า การเพิ่มอัตราเร็วของการไหลเพื่อขจัดผลของการแพร่กระจาย ไม่สามารถทำให้แบนด์แคบลงได้ ดังนั้น การควบคุมอัตราเร็วของการไหลของเฟสที่เคลื่อนที่ได้ จึงเป็นสิ่งสำคัญมากในการทำโครมาโตกราฟี ต้องมีการทดลองค้นคว้าและวิจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถทำให้ได้แบนด์ที่ดีและสามารถแยกได้

ทฤษฎีเพลตของโครมาโตกราฟี (Plate Theory of Chromatography)

ถ้าพิจารณาให้ลึกซึ้ง จะพบว่าวิธีการของโครมาโตกราฟีก็เหมือนกระบวนการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ โดยการใช้เครื่องมือ craig หลาย ๆ ชุด วิธีการแยกจะเกิดขึ้นได้ เนื่องจากมีตัวทำละลายตัวหนึ่งอยู่กับที่ และตัวทำละลายอีกตัวหนึ่งเคลื่อน ๆ จาก craig อันที่ 1 ไปยังอันที่ 2 จากอันที่ 2 ไปอันที่ 3 เช่นนี้เรื่อย ๆ ซึ่งการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายนี้เกิดขึ้นได้เมื่อเราทำการถ่ายเทมัน เราจะถ่ายเทมันต่อเมื่อการกระจายของตัวถูกละลายถึงสมดุลแล้ว ถ้าเรานึกวาดภาพให้เครื่องมือ craig แต่ละชุดมีขนาดเล็กมาก จนสามารถบรรจุอยู่ใน 1 คอลัมน์ พบว่าการผ่านของตัวทำละลาย ที่เคลื่อนที่ได้จาก craig อันเล็ก ๆ อันที่ 1 ไปยังอันที่ 2 และอันที่ 2 ไปยังอันที่ 3 ต่อไปเรื่อย ๆ นั้น จะมีลักษณะที่เกิดการถ่ายเทขึ้นเองอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีผลทำให้การถ่ายเทของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองใน craig อันเล็ก ๆ นั้น เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นวิธีการของโครมาโตกราฟีจึงแตกต่างจากวิธีการของเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ คือ การกระจายของตัวถูกละลาย ระหว่างเฟสทั้งสองในโครมาโตกราฟี จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ไม่เคยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือถึงสมดุล และวิธีการของเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ มีข้อจำกัดที่ตัวทำละลาย 2 ชนิด ต้องไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่วิธีการโครมาโตกราฟีไม่มีข้อจำกัดในกรณีนี้

Martin และ Synge เป็นผู้คิดได้ว่า กระบวนการของโครมาโตกราฟีนั้นเหมือนกับกระบวนการของเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ และการกลั่นลำดับส่วน ในคอลัมน์ของโครมาโตกราฟีจะประกอบด้วยส่วนย่อย ๆ ซึ่งเปรียบเสมือน craig อันเล็ก ๆ หลาย ๆ อัน ที่เรียกว่า theore-

tical plate ซึ่งในแต่ละเพลตสามารถเกิดการกระจายของตัวถูกละลายขึ้นได้ ในกระบวนการสกัดด้วยเครื่องมือ craig เราสามารถคำนวณการกระจายของสารตัวอย่างใน craig แต่ละอันเมื่อทำการสกัด n ครั้งได้ ในทำนองเดียวกันก็สามารถหาการกระจายของสารตัวอย่างในแต่ละเพลตตลอดคอลัมน์ของวิธีโครมาโตกราฟีได้ เพราะ theoretical plate แต่ละอันในโครมาโตกราฟีเปรียบได้กับ craig แต่ละอันในการทำเคาน์เตอร์เดอร์เรนท์ นั่นคือ การกระจายของตัวถูกละลายใน theoretical plate แต่ละอันสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 8.68 เช่นกัน

$$f(n, r) = \frac{n!}{r!\,(n-r)!}\, x^{(n-r)}\, y^{r} \qquad \ldots\ldots (9.18)$$

ในโครมาโตกราฟี n และ r จะมีค่ามาก ๆ เพราะว่าต้องใช้เฟสที่เคลื่อนผ่านส่งไปในคอลัมน์จำนวนมากเพื่ออีลูทสารตัวอย่าง ดังนั้น $n >> r$ นั่นคือ

$$x^{(x-r)} \simeq x^{n} = (1-y)^{n} = e^{-ny} \qquad \ldots\ldots (9.19)$$

เมื่อ x คือเศษส่วนของตัวถูกละลายที่อยู่ในเฟสที่อยู่กับที่

y คือเศษส่วนของตัวถูกละลายที่อยู่ในเฟสที่เคลื่อนที่

ในกรณีที่ $n >> r$ จะได้ $\frac{n!}{(n-r)!} \simeq n^{r}$ ..... (9.20)

แทนค่าสมการที่ 9.19 และ 9.20 ลงในสมการที่ 9.18 จะได้

$$f(n, r) = \frac{(ny)^{r}\, e^{-ny}}{r!} \qquad \ldots\ldots (9.21)$$

โดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ และใช้วิธีการประมาณค่าของ Stirling (Stirling's approximation) จะได้

$$r! = \frac{\sqrt{2\pi r}\cdot r^{r}}{e^{r}} \qquad \ldots\ldots (9.22)$$

แทนค่าสมการ (9.22) ลงในสมการ (9.21)

$$f(n, r) = \frac{(ny)^{r}\, e^{-ny}\, e^{r}}{\sqrt{2\pi r}\cdot r^{r}} \quad \text{เมื่อ } n >> r \qquad \ldots\ldots (9.23)$$

สมการที่ 9.23 คือสมการที่แสดงการกระจายของสารตัวอย่างในเพลตต่าง ๆ เราสามารถคำนวณเศษส่วนของสารตัวอย่างที่มีอยู่ในเพลตที่มีมากที่สุด หรือเพลตที่เป็น

ส่วนยอดของพีกได้จากสมการที่ 8.71

$$r_{max} = ny$$

ให้แทนค่าลงในสมการที่ 9.23

$$f_{(n,\ r_{max})} = \frac{(r_{max})^r e^{-r_{max}} e^r}{\sqrt{2\pi r} \cdot r^r}$$

ในสมการที่ 9.23 เมื่อเป็นเศษส่วนของสารตัวอย่างในเพลตที่มีมากที่สุด แสดงว่า r คือ r_{max}

$$\therefore \quad f_{(n,\ r_{max})} = \frac{(r_{max})^{r_{max}} e^{-r_{max}} e^{r_{max}}}{\sqrt{2\pi r_{max}} \cdot r^{r_{max}}}$$

$$f_{(n,\ r_{max})} = \frac{1}{\sqrt{2\pi r_{max}}} \qquad \text{..... (9.24)}$$

ถ้าพิจารณาให้ส่วนยอดของพีก (r_{max}) อยู่ที่ปลายสุดของคอลัมน์ที่มีจำนวนเพลตทั้งหมดเท่ากับ N แสดงว่า $r_{max} = N$ และสารตัวอย่างที่ใส่เข้าไปในคอลัมน์มีค่าเท่ากับ m โมล แสดงว่าปริมาณของสารตัวอย่างที่อยู่ที่ r_{max} หรือที่เพลตที่ N จะมีค่าเท่ากับ $f(n, N) \times m$

ให้ Q(n, N) คือปริมาณของสารตัวอย่างที่อยู่ที่เพลตที่ N

$$\therefore \quad Q(n, N) = f(n, N) \times m = \frac{m}{\sqrt{2\pi N}} \qquad \text{..... (9.25)}$$

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่มีเพลตอยู่ทั้งหมด N เพลต ในเวลา t_R แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่คือ $\frac{N}{t_R}$ สมการที่ (9.25) แสดงการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างที่มีมากที่สุดที่เพลตที่ N เมื่อต้องการหาอัตราเร็วสูงสุดที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (S_{max}) จะได้

$$S_{max} = Q_{(n,\ N)} \left(\frac{\text{moles}}{\text{plates}}\right) \frac{N}{t_R} \left(\frac{\text{plates}}{\text{unit time}}\right)$$

$$= \frac{Q_{(n,\ N)} \cdot N}{t_R} \left(\frac{\text{moles}}{\text{unit time}}\right)$$

$$\therefore \quad S_{max} = \frac{mN}{\sqrt{2\pi N} \cdot t_R} \qquad \text{..... (9.26)}$$

$$N = \frac{2\pi S_{max}^2 t_R^2}{m^2} \qquad \text{..... (9.27)}$$

N หมายถึงจำนวน plate ที่มีอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งตามความเป็นจริงแล้วเราไม่สามารถทราบได้หรือนับได้ว่าในคอลัมน์แต่ละอันจะมีเพลตอยู่เท่าใด ดังนั้น N จึงเป็นจำนวนเพลตที่คำนวณได้ตามทฤษฎีซึ่งเรียกว่า Theoretical plate

ปริมาณสารตัวอย่าง m ที่ใส่ลงในคอลัมน์จะแปรผันโดยตรงกับพื้นที่ของพีก (PEAK) สมมติให้โครมาโตกราฟิกพีกที่ได้มีความสูงเท่ากับ h และมีความกว้างเท่ากับ W

$$m \propto \frac{hW}{2}$$

$$m = \frac{khW}{2} \qquad \text{..... (9.28)}$$

k คือค่าคงที่ที่ทำให้พื้นที่ของพีกมีค่าเท่ากับปริมาณของสารตัวอย่างที่ใส่ในคอลัมน์ ซึ่งเป็นค่าคงที่ตัวเดียวกับค่าคงที่ที่ทำให้อัตราเร็วสูงสุดที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เท่ากับความสูง

$$S_{max} \propto h$$

$$S_{max} = kh \qquad \text{..... (9.29)}$$

แทนค่าสมการ 9.28 และ 9.29 ลงในสมการที่ 9.27

$$N = \frac{2\pi(kh)^2 t_R^2}{\left(\frac{khW}{2}\right)^2}$$

$$= 8\pi\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \qquad \text{..... (9.30)}$$

การคำนวณตามสมการที่ 9.30 เป็นการคำนวณโดยพิจารณาพีกที่ได้เป็นรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว แต่ตามความเป็นจริงแล้วพีกที่ได้มีลักษณะเป็นเคอร์ฟที่มีการกระจายแบบ Gaussian curve ดังนั้นถ้าพิจารณาให้ถูกต้อง การคำนวณตามสมการที่ (9.30) จะมีค่าดังนี้คือ

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = \left(\frac{4t_R}{W}\right)^2 \qquad \text{..... (9.31)}$$

W คือความกว้างของพีกที่สามารถวัดได้ดังแสดงในรูป 9.4 การวัดค่า W ต้องใช้วิธีการประมาณค่าอาจทำให้คลาดเคลื่อนได้ วิธีที่ดีควรวัดความกว้างของพีกที่มีความสูง

เป็นครึ่งหนึ่งของความสูงทั้งหมด คือค่า $W_{\frac{1}{2}}$ จะได้พื้นที่สามเหลี่ยมมีค่าเท่ากับ $hW_{\frac{1}{2}}$ นั่นคือ จากสมการที่ 9.28 จะได้

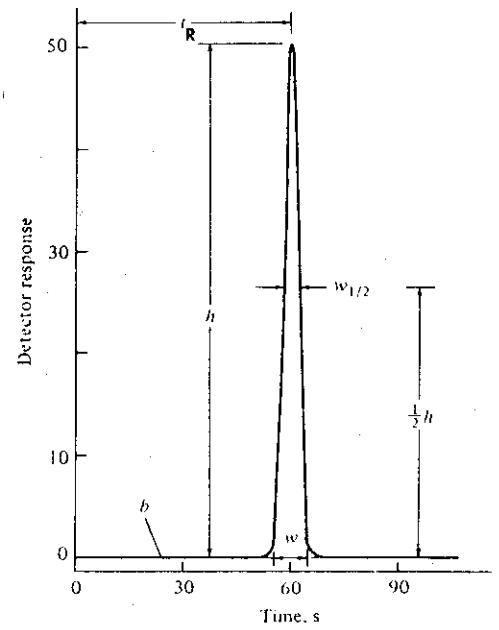
$$m = khW_{\frac{1}{2}}$$

$$\therefore \quad N = 2\pi\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \qquad \text{..... (9.32)}$$

ด้วยเหตุผลเดียวกับสมการที่ (9.31) จะได้

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \qquad \text{..... (9.33)}$$

สมการที่ (9.31) และ (9.33) ใช้เป็นสมการสำหรับคำนวณหาจำนวนเพลต (N) ที่มีอยู่ในคอลัมน์ ค่า W, $W_{\frac{1}{2}}$ จะต้องมีหน่วยเดียวกับ t_R ตามปกตินิยมใช้สมการที่ 9.33 ในการคำนวณมากกว่า เพราะไม่ต้องเสียเวลาในการประมาณค่า เพื่อสร้างกราฟให้เป็นรูปสามเหลี่ยมในการหาค่า W



รูปที่ 9.4 โครมาโตแกรมของ Heptane ที่ได้จากคอลัมน์ที่มีความยาว 50 cm, b คือ base line, h คือความสูงของพีก, W คือความกว้างของพีก, $W_{\frac{1}{2}}$ คือความกว้างของพีกที่มีความสูงเท่ากับ $\frac{1}{2}$h, t_R คือ รีเทนชันไทม์

จำนวนเพลต N จะมีผลต่อลักษณะของพีก ถ้า N มีจำนวนมาก ๆ จะได้พีกที่มีลักษณะแคบและคมชัด การเพิ่ม N ให้มากขึ้นมิได้หมายความว่าต้องเพิ่มความยาวของคอลัมน์ เพราะถ้าความยาวของคอลัมน์เพิ่มขึ้นจะทำให้ t_R เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้พีกกว้างเหมือนเดิม การเพิ่ม N ให้มากขึ้น หมายความว่าต้องเพิ่มให้มากขึ้นใน 1 หน่วยของความยาวของคอลัมน์ที่เท่าเดิม แสดงว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Efficiency) จะขึ้นอยู่กับจำนวนเพลต N (Thoretical plate) ถ้าค่า N เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพของคอลัมน์จะเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากการเปรียบเทียบค่า N ที่เพิ่มขึ้นต้องเปรียบเทียบกับคอลัมน์ที่มีความยาวเท่ากัน ดังนั้นการพิจารณาประสิทธิภาพของคอลัมน์จากจำนวนเพลต N จึงไม่สะดวก เทอมที่ใช้ประโยชน์ได้มากกว่าในการพิจารณาถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์คือเทอม Height equivalent of a thoretical plate (HETP) ให้สัญลักษณ์ย่อคือ H ซึ่งหมายถึงความยาวของคอลัมน์ต่อจำนวนเพลต N เรียกสั้น ๆ ว่า plate height

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{..... (9.34)}$$

คอลัมน์ที่ดีนั้นต้องมีค่า HETP น้อย นั่นคือ N ควรมีค่ามากที่สุด และคอลัมน์ควรสั้นที่สุด เพื่อให้ H มีค่าน้อย เนื่องจาก N จะมีค่าได้มาก เมื่อความกว้างของพีกมีค่าน้อย (ตามสมการที่ 9.31 และ 9.33) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะดีเมื่อพีกที่ได้มีความกว้างน้อยหรือแคบ ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะลดลงเมื่อความกว้างของพีกมากขึ้น ซึ่งจะมีผลถึงการแยกสารผสมด้วย ถ้าประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีก็ทำให้การแยกสามารถเกิดขึ้นได้ดี เมื่อแทนค่าสมการที่ (9.31) ลงใน (9.34) จะได้

$$H = L\left(\frac{W}{4t_R}\right)^2 \qquad \text{..... (9.35)}$$

ตัวอย่างที่ 9.2 จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎี (Theoretical plate) และ height equivalent of a theoretical plate สำหรับคอลัมน์ที่มีความยาว 50.0 cm ซึ่งให้โครมาโตรแกรม ดังแสดงในรูป 9.4

วิธีทำ จะใช้สมการที่ 9.31 หรือ 9.33 ในการคำนวณหาค่า N ก็ได้ ถ้าใช้สมการที่ 9.31 ตามรูป จะวัดความกว้างของพีกได้ 8.3 วินาที และวัดรีเทนชันไทม์ได้ 59 วินาที

$$\therefore \quad N = \left(\frac{4\times 59}{8.3}\right)^2$$

$$= 8.0\times 10^2$$

จากสมการที่ 9.34

$$H = \frac{L}{N} = \frac{50}{8.0\times 10^2} = 6.3\times 10^{-2} \text{ cm/plate}$$

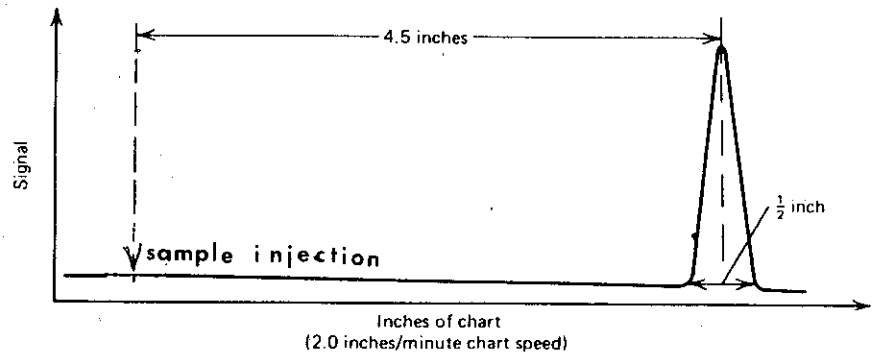
ถ้าใช้สมการที่ 9.33 ในการคำนวณหาค่า N ตามรูปจะวัดค่า $W_{\frac{1}{2}}$ ได้เท่ากับ 4.9 วินาที

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 = 5.54\times\left(\frac{59}{4.9}\right)^2$$

$$= 8.0\times 10^2$$

(ซึ่งได้ค่าเท่ากับการคำนวณตามสมการที่ 9.31)

ตัวอย่างที่ 9.3 ในการทำก๊าซโครมาโตกราฟีของสารตัวอย่าง n-butanol ได้โครมาโตรแกรมดังแสดงในรูปข้างล่างนี้ โดยใช้คอลัมน์ของ Carbowax ที่มีความยาว 4 ฟุต จงคำนวณหาค่าจำนวนเพลตตามทฤษฎี (N) ในคอลัมน์ และ HETP ของคอลัมน์ในเทอม cm/plate



วิธีทำ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของกระดาษ = 2.0 นิ้วต่อนาที

วัดค่า t_R จากโครมาโตแกรมได้ = 4.5 นิ้ว

$$\therefore \quad t_R = \frac{4.5}{2.0}\ \frac{\text{inch}}{\text{inch/min}} = 2.25 \text{ min}$$

วัดค่า W จากโครมาโตแกรมได้ = $\frac{1}{2}$ นิ้ว

$$\therefore \quad W = \frac{0.5}{2.0}\ \frac{\text{inch}}{\text{inch/min}} = 0.25 \quad \text{min}$$

จากสมการที่ 9.31

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

$$= 16\left(\frac{2.25}{0.25}\right)^2$$

$$\simeq 1300 \quad \text{theoretical plates}$$

เนื่องจากระยะทางของกระดาษที่วัดได้จะแปรผันโดยตรงกับเวลาที่ใช้ในการอีลูทสารตัวอย่าง ดังนั้นการคำนวณจึงไม่ต้องแปลงรีเทนชันไทม์ให้อยู่ในหน่วยของนาทีก็ได้ จะได้คำตอบอันเดียวกัน

$$N = 16\left(\frac{4.50}{0.5}\right)^2$$

$$\simeq 1300 \quad \text{theoretical plates}$$

จากสมการที่ 9.34 $H = \frac{L}{N}$

L = ความยาวของคอลัมน์ = (4 ft)(12 inch/ft)(2.54 cm/inch) = 122 cm

$$H = \frac{122}{1300}\ \frac{\text{cm}}{\text{plates}} = 0.094 \quad \text{cm/plate}$$

ในทางปฏิบัติสิ่งที่สำคัญไม่ได้อยู่ที่ประสิทธิภาพของคอลัมน์เพียงอย่างเดียว สิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำโครมาโตรกราฟี คือการแยกองค์ประกอบสองชนิดหรือมากกว่าออกจากกัน คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพดีย่อมให้พีกของสารตัวอย่างแยกออกจากกันได้ชัดเจน

การแยก (RESOLUTION) คือการวัดอาณาเขตของพีก 2 พีกที่ซ้อนกัน ปริมาณการแยกระหว่างพีก 2 พีก คือความแตกต่างระหว่างรีเทนชันไทม์ระหว่างพีกทั้งสองกับผลรวมของครึ่งหนึ่งของความกว้างของพีกทั้งสอง พบว่าถ้ารีเทนชันไทม์ของพีกทั้งสองแตกต่างกันมาก การแยกจะเกิดได้ดีแต่ถ้าความกว้างของพีกมีค่ามาก การแยกเกิดขึ้นได้ไม่ดี สำหรับพีกที่สมมาตรคือมีรูปร่างเป็น normal gaussian shape และพีกทั้งสองมีขนาดเท่ากัน ค่าการแยกจะมีค่าตามสมการที่ 9.36 ดังนี้คือ

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{W_1}{2} + \frac{W_2}{2}} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \qquad \ldots\ldots (9.36)$$

เมื่อ t_{R_1} และ t_{R_2} คือรีเทนชันไทม์ของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ($t_{R_2} > t_{R_1}$)

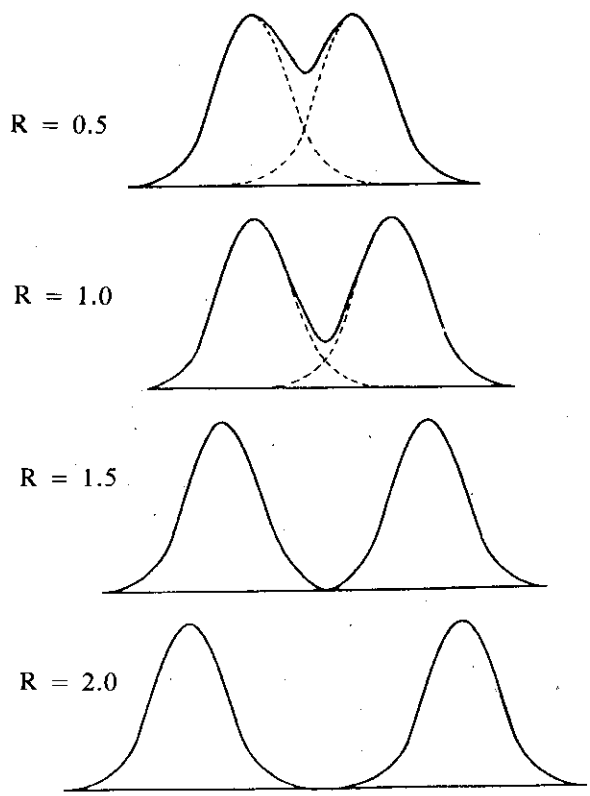
W_1 และ W_2 คือความกว้างของฐานพีกทั้งสอง

สำหรับพีกที่สมมาตรและมีค่าการแยกเท่ากับ 1 จะมีพื้นที่พีกที่ซ้อนกันเพียง 2% ซึ่งเพียงพอสำหรับงานวิเคราะห์ทางปริมาณ ถ้าการแยกมีค่าเท่ากับ 1.5 พีก สามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์ ลักษณะของการแยกดังแสดงในรูปที่ 9.5

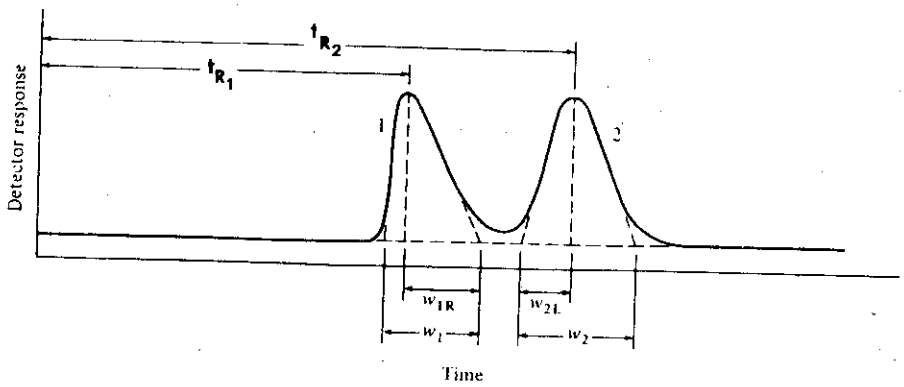
สมการที่ (9.36) เป็นสมการที่ใช้กับพีกที่มีลักษณะสมมาตรในกรณีที่พีกไม่สมมาตรควรใช้สมการที่ (9.37) คือ

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{1R} + W_{2L}} \qquad \text{..... (9.37)}$$

สำหรับสมการที่ 9.36 และสมการที่ 9.37 สามารถใช้ค่ารีเทนชันโวลูมแทนค่ารีเทนชันไทม์ได้ ค่า W_{1R} และ W_{2L} สามารถวัดได้จากพีกของโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูป 9.6 สำหรับหน่วยของ W_{1R} และ W_{2L} ต้องใช้ให้สอดคล้องตามค่ารีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูม



รูปที่ 9.5 แสดงวิธีการแยกของโครมาโตกราฟิกพีกที่มีค่า R ต่าง ๆ กัน

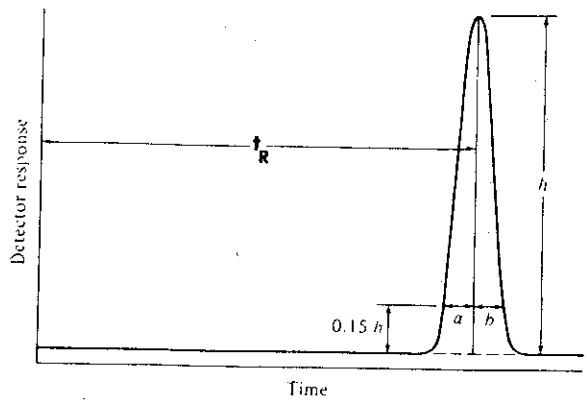


รูปที่ 9.6 แสดงการหาค่า W_{1R} และ W_{2L} จากโครมาโตกราฟิกพีกที่ไม่สมมาตร

ตามปกติพีกที่ได้จะไม่สมมาตรมักจะมีหาง (peak tailing) ดังแสดงในรูป 9.6 พีกที่ 1 มีหาง ซึ่งจะมีผลทำให้การแยกไม่ดี การพิจารณาว่าพีกสมมาตรหรือไม่พิจารณาได้จาก Asymmetry factor (a_f)

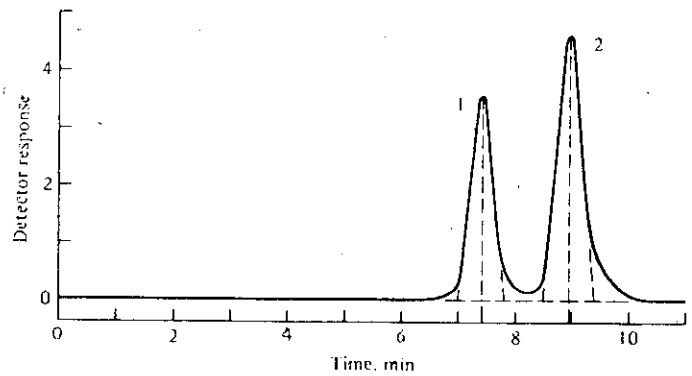
$$a_f = \frac{W_{0.15R}}{W_{0.15L}} \qquad \text{..... (9.38)}$$

โดยใช้ความกว้างของพีกที่มีความสูงเท่ากับ 0.15h ด้านขวาหารด้วยด้านซ้าย ดังแสดงในรูป 9.7



รูปที่ 9.7 โครมาโตกราฟิกพีกแสดงการวัดค่าความกว้างของพีกด้านซ้ายและขวาที่มีความสูง 0.15h a = $W_{0.15L}$ และ b = $W_{0.15R}$ ในกรณีที่ asymmetry factor มีค่า = 1 แสดงว่าพีกนั้นสมมาตร

ตัวอย่างที่ 9.4 จงหาค่าการแยก (RESOLUTION) ระหว่างพีกของ acetylsalicylic acid กับพีกของ Salicylic acid ในการทำลิควิดโครมาโตกราฟี ซึ่งได้พีกดังแสดงในรูปข้างล่างนี้ ท่านคิดว่าการแยกนี้เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณหรือไม่



วิธีทำ จากกราฟวัดค่ารีเทนชันไทม์ของพีกที่ 1 ได้ 7.42 นาที และพีกที่ 2 ได้ 8.92 นาที ความกว้างของพีกทั้งสองวัดได้เท่ากับ 0.87 และ 0.91 นาที ตามลำดับ

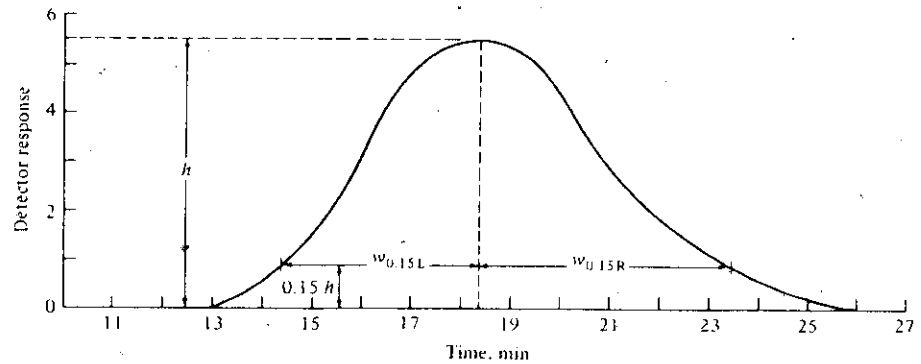
จากสมการที่ (9.36)

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

$$= \frac{2(8.92 - 7.42)}{0.87 + 0.91} = 1.69$$

เพราะว่าการแยกมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าโครมาโตแกรมที่ได้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้

ตัวอย่างที่ 9.5 จงคำนวณหา asymmetry factor ของโครมาโตกราฟิกพีกของรูปข้างล่างนี้



วิธีทำ จากสมการที่ (9.38)

$$a_f = \frac{W_{0.15R}}{W_{0.15L}}$$

ตามรูปวัดค่า $W_{0.15R}$ ได้เท่ากับ 5.20 นาที และ $W_{0.15L}$ ได้เท่ากับ 3.90 นาที

$$\therefore \quad a_f = \frac{5.20 \ \text{min}}{3.90 \ \text{min}} = 1.33$$

เมื่อพิจารณาสมการการแยก (สมการที่ 9.36) จะเห็นได้ชัดว่าการแยกจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างค่า t_{R_1} และ t_{R_2} (Δt_R) กับความกว้างของพีก นั่นคือ การปรับปรุงการแยกให้ดีขึ้นสามารถทำได้ดังนี้คือ

1. เพิ่มค่า Δt_R ($t_{R_2} - t_{R_1}$) ซึ่งทำได้ดังนี้
   - ก. เพิ่มความยาวของคอลัมน์ (L)
   - ข. โดยการลดอุณหภูมิและเลือกเฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่ให้เหมาะสม
   - ค. เพิ่มปริมาณของเฟสที่อยู่กับที่
2. ทำความกว้างของแบนด์หรือพีกให้น้อยลง
   - ก. บรรจุเฟสที่อยู่กับที่ในคอลัมน์ให้แน่น
   - ข. เพิ่มพื้นที่ผิวของเฟสที่อยู่กับที่ คือใช้ที่มีขนาดเล็ก
   - ค. ให้การไหลของเฟสที่เคลื่อนที่มีอัตราเร็วที่เหมาะสม
   - ง. ลดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์
   - จ. ลดปริมาณของสารตัวอย่าง

สิ่งที่น่าสนใจในการคำนวณอีกอันหนึ่งก็คือ คำนวณหาจำนวนเพลตที่ต้องการสำหรับทำให้การแยกของเราเกิดขึ้นได้ดี หรือเป็นไปได้ในทางการวิเคราะห์ของปริมาณในเมื่อทราบว่าค่า R ที่เหมาะสม ควรมีค่าเท่ากับเท่าไร

จากสมการที่ 9.36 $R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$

ถ้าพีกทั้งสองมีค่าความกว้างของพีกโดยประมาณเท่ากัน คือ

$$W_1 \simeq W_2$$

จะได้ $$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{2W_2} = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_2} \qquad \ldots\ldots (9.39)$$

เนื่องจากความกว้างของพีกมีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์หรือจำนวนเพลตตามสมการที่ (9.31)

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

ถ้าได้จำนวนเพลตที่คำนวณได้นี้คิดจากพีกที่ 2

$$\therefore \quad W_2 = \frac{4t_{R_2}}{\sqrt{N}} \qquad \text{..... (9.40)}$$

นั่นคือ เราสามารถหาการแยกที่สัมพันธ์กับจำนวนเพลตได้โดยแทนค่า (9.40) ลงในสมการ (9.39)

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{t_{R_2}} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} \qquad \text{..... (9.41)}$$

$$\frac{4R}{\sqrt{N}} = \frac{(t_{R_2} - t_m) - (t_{R_1} - t_m)}{t_{R_2}}$$

นำ $t_{R_1} - t_m$ หารทั้งเศษและส่วนจะได้

$$\frac{4R}{\sqrt{N}} = \frac{\frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_1} - t_m} - 1}{t_{R_2}/(t_{R_1} - t_m)}$$

จากสมการที่ 9.15 พิจารณาได้ว่า

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_1} - t_m}$$

$$\therefore \quad \frac{4R}{\sqrt{N}} = \frac{\alpha - 1}{t_{R_2}/(t_{R_1} - t_m)}$$

$$= \frac{\alpha - 1}{t_{R_2}/(t_{R_1} - t_m)} \times \frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_2} - t_m}$$

$$= \frac{\alpha - 1}{\alpha}\left(\frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_2}}\right)$$

จากสมการที่ 9.8 แทนค่าลงในสมการข้างบนจะได้

$$\frac{4R}{\sqrt{N}} = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{t_m(1 + k_2') - t_m}{t_m(1 + k_2')}\right)$$

$$= \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{t_m k_2'}{t_m(1+k_2')}\right)$$

$$= \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2'}{1+k_2'}\right)$$

นั่นคือ $$N_{req} = 16R^2\left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2\left(\frac{1+k_2'}{k_2'}\right)^2 \quad \text{..... (9.42)}$$

เมื่อ $$k_2' = \frac{t_{R_2}-t_m}{t_m}$$

N คือจำนวนเพลตที่ต้องการจึงให้สัญลักษณ์เป็น N_{req}

ตัวอย่างที่ 9.6 สารตัวอย่างประกอบด้วยสารประกอบ 2 ชนิด ถูกแยกออกจากกันโดยใช้คอลัมน์ยาว 10 ฟุต ข้อมูลที่ได้ในการทำโครมาโตแกรม ด้วยวิธีการก๊าซโครมาโตกราฟีมีดังนี้

t_{R_2} = 19.0 นาที

t_{R_1} = 16.0 นาที

t_{air} = 1.0 นาที

W_1 = 1.0 นาที

จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎีที่ต้องใช้เพื่อทำให้การแยกมีค่าเท่ากับ 1.5 และคอลัมน์ควรมีความยาวอย่างน้อยที่สุดเท่าไร จึงสามารถบรรจุจำนวนเพลตตามทฤษฎีที่ต้องการไว้ได้

วิธีทำ จากสมการที่ 9.15

$$\alpha = \frac{t_{R_2}-t_m}{t_{R_1}-t_m}$$

$$= \frac{19.0-1.0}{16.0-1.0} = \frac{18.0}{15.0} = \frac{6}{5}$$

t_m ในก๊าซโครมาโตกราฟีคือ t_{air}

จากสมการที่ 9.8

$$k_2' = \frac{t_{R_2}-t_m}{t_m}$$

$$= \frac{19.0 - 1.0}{1.0} = 18$$

แทนค่า α และ k_2' ลงในสมการที่ 9.42

$$N_{req} = 16(1.5)^2\left(\frac{6/5}{(6/5)-1}\right)^2\left(\frac{18+1}{18}\right)^2$$

$$= 1444 \text{ theoretical plates}$$

จำนวนเพลตที่ใช้ในการแยกต้องมีค่าเท่ากับ 1444 เพลต

ในการทำโครมาโตแกรมทราบว่าสารประกอบตัวที่ 1 มีความกว้างของพีกเท่ากับ 1.0 นาที และรีเทนชันไทม์เท่ากับ 16.0 แสดงว่าเราสามารถคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎี (theoretical plate) ที่มีอยู่ในคอลัมน์ยาว 10 ฟุตได้ ตามสมการที่ 9.31

$$N = 16\left(\frac{t_{R_1}}{W_1}\right)^2$$

$$= 16\left(\frac{16.0}{1.0}\right)^2$$

$$= 4096 \text{ theoretical plates}$$

แสดงว่า คอลัมน์ที่นำมาใช้งานมี Height equivalent of a theoretical plate (H) ดังนี้

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

$$= \frac{10}{4096} = 0.0024 \text{ ft/plate}$$

นั่นคือ ความยาวของคอลัมน์ที่ต้องมี H = 0.0024 ft/plate และสามารถบรรจุเพลตตามทฤษฎีได้เท่ากับ 1444 เพลต ควรมีค่าเท่ากับ

$$L = H \times N = (0.0024)(1444) = 3.5 \text{ ฟุต}$$

คอลัมน์ควรมีความยาวอย่างน้อย 3.5 ฟุต จึงจะบรรจุจำนวน plate ตามที่ต้องการได้เพื่อความแน่นอนในการปฏิบัติควรใช้คอลัมน์ยาว 4 ฟุต

ตัวอย่างที่ 9.7 สารประกอบ A และ B มีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 16.40 และ 17.63 นาที ตามลำดับ เมื่อใช้คอลัมน์ยาว 30.0 cm โดยเวลาที่ใช้สำหรับอากาศ (พีกอากาศ) มีค่าเท่ากับ-

1.30 นาที ความกว้างของพีก A และ B มีค่าเท่ากับ 1.11 และ 1.21 mm จงคำนวณหา

ก. การแยกของคอลัมน์ (Column resolution)

ข. จำนวนเฉลี่ยของเพลตตามทฤษฎีในคอลัมน์

ค. Plate height (HETP)

ง. ความยาวของคอลัมน์ที่ต้องการเพื่อทำให้การแยกมีค่าเท่ากับ 1.5

จ. เวลาที่ต้องใช้ในการอีลูทสารประกอบ B ออกจากคอลัมน์ที่ยาวกว่า

วิธีทำ ก. จากสมการที่ 9.36

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

$$= \frac{2(17.63 - 16.40)}{(1.11 + 1.21)}$$

$\therefore$ การแยกของคอลัมน์ = 1.06

ข. จากสมการที่ 9.31

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

สำหรับสารประกอบ A

$$N = 16\left(\frac{16.40}{1.11}\right)^2$$

$$= 3493$$

สำหรับสารประกอบ B

$$N = 16\left(\frac{17.63}{1.21}\right)^2$$

$$= 3397$$

$\therefore$ จำนวนเฉลี่ยของเพลตตามทฤษฎี $(N_{av}) = \frac{3493 + 3397}{2} = 3445$

ค. จากสมการที่ 9.34

$$H = \frac{L}{N} = \frac{30.0}{3445} = 8.708 \times 10^{-3}$$

$\therefore$ plate height $= 8.71 \times 10^{-3}$ cm/plate