บทที่ 3
ทฤษฎีโครมาโตกราฟี
(Theories of Chromatography)

ทฤษฎีทั่วไปของโครมาโตกราฟี

ผู้ตั้งทฤษฎีทั่วไปของโครมาโตกราฟีคนแรกคือ A.J.P. Martin และ R.L.M. Synge โดยการพิจารณาส่วนที่เล็กที่สุดในคอลัมน์ที่ใช้ทำโครมาโตกราฟีที่เรียกว่าเพลต (plate) ตามปกติคอลัมน์จะประกอบด้วยเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ เมื่อโมเลกุลของสารตัวอย่างผ่านไปในคอลัมน์จะกระจายระหว่างเฟสทั้งสอง การกระจายขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์ของการกระจาย เมื่อการกระจายถึงสมดุล ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในแต่ละเฟสจะเป็นไปตามกฎของการกระจาย (Distribution's Law) คือ

$$K_d = \frac{C_S}{C_m} \qquad \text{.....(3.1)}$$

C_S คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

C_m คือ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (K_d) จะมีความสัมพันธ์กันกับความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างตามเฟสเคลื่อนที่ขณะทำการดีเวลอป (development) เมื่อค่า K_d เพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยของอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างจะลดลง คือ ปริมาณสารตัวอย่างชอบอยู่ในเฟสอยู่กับที่มากกว่าที่จะกระจายไปอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ แสดงว่าถ้ามีสารตัวอย่างหลายชนิดที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายแตกต่างกัน จะมีความเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารตัวอย่างนั้นๆ ออกจากกันได้ การพิจารณาอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง สามารถพิจารณาได้จากระยะเวลาที่โมเลกุลของสารตัวอย่างใช้อยู่ในเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ ดังนี้ คือ ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่กับเฟสอยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างมีค่าน้อย หรือ K_d มีค่ามาก แต่ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างใช้เวลาอยู่กับเฟสอยู่กับที่น้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่ แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างมีค่ามาก (K_d มีค่าน้อย) ซึ่งเศษส่วนของเวลาที่

เศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ = $\frac{\text{จำนวนโมเลกุลที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่}}{\text{จำนวนโมเลกุลทั้งหมด}}$

$$= \frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_S V_S}$$

นำ $C_m V_m$ หารทั้งเศษและส่วนจะได้

เศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ = $\frac{1}{1 + \frac{C_S V_S}{C_m V_m}}$

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

$$= \frac{1}{1 + k'} \qquad \text{.....(3.2)}$$

เมื่อ k' คือ $K_d \frac{V_S}{V_m}$ ซึ่งเป็นตัวแปรตัวใหม่ที่เรียกว่าคาพาซิตีแฟคเตอร์ (Capacity factor) มีความหมายถึงอัตราส่วนของจำนวนโมลของสารตัวอย่างในเฟสอยู่กับที่ต่อจำนวนโมลของสารตัวอย่างในเฟสเคลื่อนที่

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

$$= \frac{C_S V_S}{C_m V_m} \qquad \text{.....(3.3)}$$

จากสมการที่ 3.2 ซึ่งคือเศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายใช้อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเราคูณด้วยความเร็วที่เป็นเส้นตรง u (linear velocity) ของเฟสเคลื่อนที่หรือตัวพา จะได้อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกละลายหรือสารตัวอย่าง

$$\text{rate of travel} = u \frac{1}{1 + k'} \qquad \text{.....(3.4)}$$

หรือ $$= u\frac{1}{1+K_d\frac{V_S}{V_m}} \qquad \text{.....(3.5)}$$

จากสมการที่ 3.4 หรือ 3.5 แสดงได้ว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่เฉลี่ยของโมเลกุลของสารตัวอย่าง จะมีค่าเท่ากับเท่าไรนั้นขึ้นอยู่กับ

ก. ความเร็วของตัวพาหรือเฟสเคลื่อนที่

ข. อัตราส่วนของปริมาตรของเฟสทั้งสอง

ค. ค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (K_d)

ในการทดลองโครมาโตกราฟี สารตัวอย่างจะประกอบด้วยตัวถูกละลายหลายชนิด ดังนั้น เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ โมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวจะเริ่มต้นเคลื่อนที่พร้อมกันในเวลาเดียวกัน แต่ถ้าตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้เกิดเทคนิคของการทำโครมาโตกราฟีได้ 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 กำหนดเวลาแน่นอน

วิธีที่ 2 กำหนดระยะทางให้แน่นอน

สำหรับวิธีที่ 1. กำหนดเวลาแน่นอน ทำได้โดยการกำหนดเวลาให้แน่นอนในการแยกโดยวิธีโครมาโตกราฟี เนื่องจากตัวถูกละลายแต่ละตัวเคลื่อนที่ได้ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจะทำให้เกิดเป็นแถบ (band) หรือโซนของตัวถูกละลายแต่ละตัวแยกออกจากกัน ตัวอย่างโครมาโตกราฟีที่ใช้เทคนิคนี้ได้แก่ paper chromatography และ thin layer chromatography

2. กำหนดระยะทางแน่นอน ตัวอย่างการทดลองโดยใช้เทคนิคนี้ คือ การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยกำหนดระยะทางเป็นความยาว 1 คอลัมน์ ตัวถูกละลายแต่ละตัวเดินทางจากส่วนบนของคอลัมน์มายังส่วนล่างสุด หรือหลุดผ่านออกจากคอลัมน์จะใช้เวลาเดินทางแตกต่างกัน ขณะที่ตัวถูกละลายที่ถูกปล่อยออกจากคอลัมน์ จะถูกตรวจพบได้ด้วยตัวดีเทคเตอร์ (detector) เมื่อสร้างกราฟระหว่างผลที่ได้จากการตรวจพบด้วยดีเทคเตอร์ (detector response) กับเวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ จะได้กราฟที่เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) เวลาที่ตัวถูกละลายใช้เดินทางจากส่วนบนของคอลัมน์

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

$$t_R = \frac{\text{length of column (L)}}{\text{rate of travel}} \quad \text{.....(3.6)}$$

แทนค่าสมการที่ 3.4 ลงในสมการที่ 3.6

$$t_R = \frac{L}{u}(1+k') \quad \text{.....(3.7)}$$

ให้ t_m คือ เวลาที่โมเลกุลของตัวพาเดินทางได้ 1 คอลัมน์ ซึ่งมีค่าเท่ากับความยาวของคอลัมน์หารด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ (u) นั่นคือ $t_m = \frac{L}{u}$ ในกรณีที่เฟสเคลื่อนที่คือก๊าซ สามารถวัดค่า t_m ได้จากพีกของอากาศ เมื่ออากาศไม่เป็นตัวหน่วงในคอลัมน์ (ดูรูปที่ 3.3)

$$\therefore \quad t_R = t_m(1+k') \quad \text{.....(3.8)}$$

หรือ

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

สมการที่ 2.8 เป็นสมการพื้นฐานของโครมาโตกราฟีทุกชนิด โดยปกติจะนำไปใช้กันมากในก๊าซโครมาโตกราฟี

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

$$r = \frac{t_m}{t_R} \quad \text{.....(3.9)}$$

แทนค่าสมการที่ (3.8) ลงใน (3.9)

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

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

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

$$= \frac{V_m}{V_m + K_d V_S} \qquad \text{.....(3.10)}$$

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

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

$$V_R = t_R F \qquad \text{.....(3.11)}$$

แทนค่าสมการที่ 3.8 ลงในสมการที่ 3.11

$$V_R = t_m(1+k')F \qquad \text{.....(3.12)}$$

สำหรับปริมาตรของตัวพาที่ใช้เวลาในการเดินทางได้ 1 คอลัมน์ (t_m) มีค่าเท่ากับ V_m จะมีค่าสัมพันธ์กันดังนี้ คือ

$$V_m = t_m F \qquad \text{.....(3.13)}$$

ปริมาตร V_m ตามปกติถูกเรียกว่า dead volume หรือ interstitial หรือ void volume แทนค่าสมการที่ 3.13 ($t_m = \frac{V_m}{F}$) ลงในสมการที่ 3.12

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

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

ในเมื่อ $k' = K_d \frac{V_S}{V_m}$

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

$$= V_m + K_d V_S \qquad \text{.....(3.14)}$$

สมการที่ 3.14 เป็นสมการพื้นฐานของรีเทนชันที่ใช้กับโครมาโตกราฟีทุกชนิดเช่นกัน ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง สามารถเปลี่ยน V_S ให้เป็นพื้นที่ผิวที่เกิดการดูดซับหรือเป็น ion exchange capacity ได้แล้วแต่ความเหมาะสม

รีเลทีฟรีเทนชัน (Relative retention)

ตามปกติวิธีการโครมาโตกราฟีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ทางคุณภาพ (Qualitative analysis) ที่นิยมกันคือ วิธีการเปรียบเทียบรีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูม ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน ที่ทำการทดลองภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน สารชนิดเดียวกันเมื่อทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกันทั้งหมด จะให้ค่ารีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูมเท่ากัน ซึ่งเป็นค่าที่สามารถแสดงเอกลักษณ์ หรือพิสูจน์ (identify) สารนั้นๆ ได้ แต่เนื่องจากสภาวะของการทดลองขึ้นอยู่กับแฟคเตอร์หลายชนิด คือ ชนิดของเฟสอยู่กับที่ เฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่หรืออื่นๆ ทำให้ไม่สามารถแสดงรายละเอียดของค่า V_R และ t_R ของสารตัวอย่างแต่ละตัว ที่สภาวะต่างๆ ได้หมดทุกสภาวะ ดังนั้น จึงไม่สะดวกที่จะใช้ค่านี้ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพ หรือพิสูจน์สารต่างๆ ค่าที่สามารถใช้ในการพิสูจน์สารได้ถูกต้องและสะดวกกว่าคือ ค่า relative retention, α หรือ selectivity factor ซึ่งคืออัตราส่วนของรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างต่อสารมาตรฐาน ซึ่งเป็นรีเทนชันไทม์ที่มีการแก้ไขให้ถูกต้อง โดยหักเวลาที่ใช้ในการทำให้ตัวพาออกจากคอลัมน์แล้ว

$$\alpha = \frac{t_R - t_m}{t_{R^*} - t_m} = \frac{t'_R}{t'_{R^*}} \qquad \text{.....(3.15)}$$

t_{R^*} คือ รีเทนชันไทม์ของสารมาตรฐาน (สารมาตรฐานและสารตัวอย่างไม่ใช่สารชนิดเดียวกัน)

เราสามารถทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าสารตัวอย่างคืออะไรได้โดยใช้สารตัวอย่างผสมกับสารมาตรฐานแล้วผ่านลงในคอลัมน์ จากนั้นหาค่ารีเลทีฟรีเทนชัน (α) เปรียบเทียบกับค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารที่ทราบว่าคืออะไรต่อสารมาตรฐานตัวเดียวกัน ถ้าได้ค่าเท่ากันแสดงว่าสารตัวอย่างคือชนิดเดียวกับตัวที่ทราบ วิธีการพิสูจน์สารแบบนี้ต้องใช้ค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารทั้งสองชนิดที่ได้จากการใช้เฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่เป็นชนิดเดียวกันเท่านั้น จึงจะเปรียบเทียบกันได้ วิธีการนี้ไม่ต้องยุ่งยากในการควบคุมสภาวะของการทดลองสภาวะอื่นๆ ดังนั้น จึงเป็นการสะดวกที่จะแสดงค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารที่ทราบว่าคืออะไรต่อสารมาตรฐานต่างๆ ไว้ได้มากมาย เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสำหรับการวิเคราะห์ทางคุณภาพ

เนื่องจากค่ารีเทนชันโวลูม ที่มีอัตราการไหลของตัวพาคงที่ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับรีเทนชันไทม์ นั่นคือ

$$\alpha = \frac{V_R - V_m}{V_{R^*} - V_m} \qquad \text{.....(3.16)}$$

จากสมการที่ 3.14 แทนค่าลงในสมการที่ 3.16

$$\alpha = \frac{(V_m + K_d V_S) - V_m}{(V_m + K_{d^*} V_S) - V_m}$$

$$\therefore \alpha = \frac{K_d}{K_{d^*}} \qquad \text{.....(3.17)}$$

V_{R^*} , K_{d^*} คือ ค่าของสารมาตรฐาน

ในการทำ ion-exchange chromatography ค่ารีเลทีฟรีเทนชัน ที่แสดงในสมการ 3.17 บางครั้งเรียกว่า แฟคเตอร์ของการแยก (separation factor)

ตัวอย่างที่ 3.1 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

$V_m + V_S)$ K_d

สารประกอบ	t (min)
เบนซีน	3.24
แอนทราซีน	5.73
อากาศ	0.25

วิธีทำ จากสมการที่ 3.9 สามารถใช้ในการคำนวณหาค่า k' ได้ เพราะว่าอากาศไม่เป็นตัวหน่วงในคอลัมน์ จะได้ $t_m = 0.25$

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

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

$$0.25k' = 3.24 - 0.25$$

$$k' = 12$$

ค่า V_m สามารถคำนวณได้จากสมการ 3.13 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 $V_m + V_S$

$$\therefore\ 39.3 = V_m + V_S$$

$$= 7.5 + V_S$$

$$\therefore\ V_S = 31.8\ cm^3$$

จากสมการ $$k' = K_d \frac{V_S}{V_m}$$

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

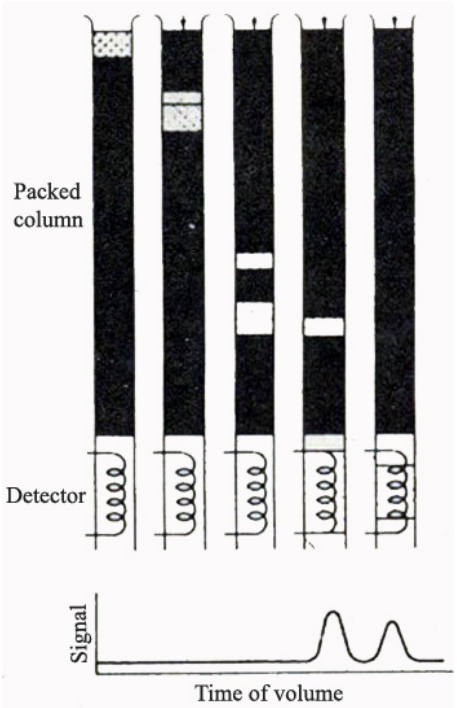
ค่ารีเลทีฟรีเทนชันของแอนทราซิน เมื่อเทียบกับเบนซีน คำนวณได้จากสมการที่ 3.15

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

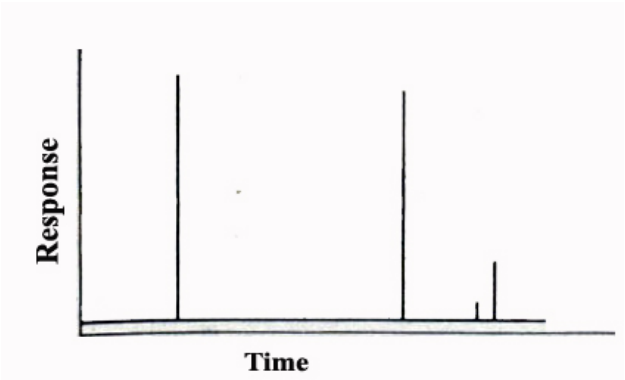
$$= \frac{5.73 - 0.25}{3.24 - 0.25} = 1.83$$

ทฤษฎีการอีลูทในโครมาโตกราฟี (Theories of Elution Chromatography)

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ใส่ลงในส่วนบนของคอลัมน์ จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่ เมื่อเราเติมเฟสเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์อีก คือเติมตัวอีลูท (eluent) มันจะผลักดันด้วยแรงขับ (driving force) ให้เฟสเคลื่อนที่ที่มีสารตัวอย่างละลายอยู่เคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ สารตัวอย่างที่ถูกพาลงมาจะมาพบกับเฟสอยู่กับที่ส่วนใหม่ จะเกิดการแบ่งส่วนระหว่างเฟสทั้งสองอีก เมื่อเติมตัวอีลูทต่อไปอีกเรื่อยๆ จะทำให้สารตัวอย่างถูกพาลงมาส่วนล่างของคอลัมน์ จนในที่สุดออกจากคอลัมน์ เพราะว่าการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากการพาของเฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูทเท่านั้น ฉะนั้นอัตราเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จึงขึ้นอยู่กับเศษส่วนของเวลาที่สารตัวอย่างอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ (สมการที่ 3.2) ถ้าสารตัวอย่างที่นำมาใส่ในคอลัมน์ มีตัวถูกละลายมากกว่าหนึ่งชนิด และตัวถูกละลายมีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายหรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วนต่างกัน พบว่าความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายนั้นต่างกัน ทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายทั้งสองชนิดออกจากกันได้ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ถ้าโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติเหมือนกัน และการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของตัวถูกละลายสามารถ

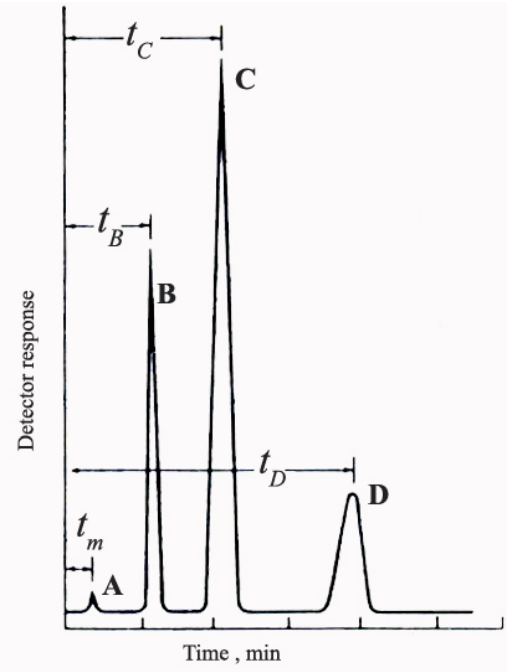


รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงการอีลูทสารผสมของตัวถูกละลาย 2 ชนิด ในวิธีโครมาโตกราฟี



รูปที่ 3.2 โครมาโตแกรมของสารตัวอย่างที่มีความประพฤติเป็นอุดมคติ (Ideal behavior)

แต่เนื่องจากโมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวมีความประพฤติไม่เหมือนกัน บางโมเลกุลเคลื่อนที่เร็ว บางโมเลกุลเคลื่อนที่ช้า ทำให้โครมาโตแกรมที่ได้เป็นแบนด์หรือพีกที่มีความกว้าง (band broadening) ดังแสดงในรูปที่ 3.3 ระยะเวลาที่ใช้ในการอีลูทสารแต่ละชนิดออกมาเรียกว่า รีเทนชันไทม์



รูปที่ 3.3 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 คือรีเทนชันไทม์ ของพีก B , C และ D ตามลำดับ)

ลักษณะของแบนด์หรือพีกที่ได้จะกว้างหรือแคบมากน้อยแค่ไหน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง คือ

1. การใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์

2. การแพร่กระจายของสารตัวอย่างในคอลัมน์ จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงสู่บริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ (longitudinal diffusion)

3. การไหลของโมเลกุลของสารตัวอย่างในคอลัมน์ มีทิศทางที่แตกต่างกัน และได้ระยะทางที่ต่างกัน เพราะขนาดและรูปร่างของเฟสอยู่กับที่ในคอลัมน์แตกต่างกัน (Eddy diffusion)

4. โมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้นระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ได้ (non equilibrium mass transfer)

เป็นไปไม่ได้ที่จะใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ พร้อมกันหมดทุกโมเลกุล การใส่สารตัวอย่างที่กระจายเป็นวงกว้างจะมีผลให้ได้แบนด์ที่กว้าง เมื่อแบนด์ของสารตัวอย่างที่ใส่ลงไปมีความกว้างมาก จะมีผลทำให้การแยกสารออกจากกันได้ไม่ดีเท่าที่ควร ด้วยเหตุผลนี้เวลาใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์ หรือหยดสารตัวอย่างลงบนกระดาษ หรือเพลตในการทำ paper chromatography หรือ thin layer chromatography ต้องพยายามทำให้เป็นวงที่เล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้

สำหรับการควบคุมขนาดของปัจจัยข้อ 2, 3 และ 4 สามารถทำได้โดยควบคุมอัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ขนาดของสารที่บรรจุในคอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่และขนาดของคอลัมน์ แบนด์จะมีความกว้างมากขึ้นถ้ามีการกระจายเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากสารตัวอย่างอยู่ในคอลัมน์เป็นเวลานานเกินไป การที่จะทำให้สารตัวอย่างไม่อยู่ในคอลัมน์นานเกินไป สามารถทำได้โดยเพิ่มอัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะมีผลให้การแยกสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นไม่ดี พีก (peak) ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ดังนั้น จึงเป็นความจำเป็นที่ต้องควบคุมอัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมที่จะทำให้การแยกของสารตัวอย่างผสมเกิดขึ้นได้ ถ้าโมเลกุลของสารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลขึ้นระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ได้ พบว่าตัวอย่างจะใช้เวลาอยู่กับเฟสหนึ่งมากกว่าอีกเฟสหนึ่งได้มากกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งมีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้าง เมื่อเพิ่มอัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จะมีผลทำให้มีเวลาน้อยที่จะทำให้สารตัวอย่างเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง เมื่อขาดการเกิดสมดุลขึ้น จะมีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้างนั่นเอง สรุปได้ว่าในกรณีที่เกิดการแพร่กระจายของสารตัวอย่างขึ้น จะทำให้แบนด์ที่ได้กว้าง การทำให้การแพร่กระจายลดลงสามารถทำได้โดยเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้เร็วขึ้น จะมีผลทำให้สารตัวอย่างไม่สามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ได้เพราะมีเวลาน้อย จะเป็นสาเหตุทำให้แบนด์กว้างขึ้น แสดงว่าการเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

ทฤษฎีเพลตของโครมาโตกราฟี (Plate Theory of Chromatography)

ถ้าพิจารณาให้ลึกซึ้ง จะพบว่าวิธีการของโครมาโตกราฟีจะเหมือนกระบวนการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ โดยการใช้เครื่องมือ craig หลายๆ ชุด วิธีการแยกจะเกิดขึ้นได้เนื่องจากมีตัวทำละลายตัวหนึ่งอยู่กับที่ และตัวทำละลายอีกตัวหนึ่งเคลื่อนที่จาก craig อันที่ 1 ไปยังอันที่ 2 จากอันที่ 2 ไปอันที่ 3 เช่นนี้เรื่อยๆ ซึ่งการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายนี้เกิดขึ้นได้เมื่อทำการถ่ายเท การถ่ายเทจะเกิดขึ้นเมื่อการกระจายของตัวถูกละลายถึงสมดุลแล้ว ถ้านึกวาดภาพให้เครื่องมือ craig แต่ละชุดมีขนาดเล็กมาก จนสามารถบรรจุอยู่ใน 1 คอลัมน์ พบว่าการผ่านของตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ได้จาก craig อันเล็กๆ อันที่ 1 ไปยังอันที่ 2 และอันที่ 2 ไปยังอันที่ 3 ต่อไปเรื่อยๆ นั้น จะมีลักษณะที่เกิดการถ่ายเทขึ้นเองอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีผลทำให้การถ่ายเทของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองใน craig อันเล็กๆ นั้นเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นวิธีการของโครมาโตกราฟีจึงแตกต่างจากวิธีการของเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ คือ การกระจายของตัวถูกละลาย ระหว่างเฟสทั้งสองในโครมาโตกราฟีจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ไม่เคยเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือถึงสมดุลและวิธีการของเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ มีข้อจำกัดที่ตัวทำละลาย 2 ชนิด ต้องไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

Martin และ Synge เป็นผู้คิดได้ว่า กระบวนการของโครมาโตกราฟีนั้นเหมือนกับกระบวนการของเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ และการกลั่นลำดับส่วน ในคอลัมน์ของโครมาโตกราฟีจะประกอบด้วยส่วนย่อยๆ ซึ่งเปรียบเสมือน craig อันเล็กๆ หลายๆ อัน ที่เรียกว่า theoretical plate ซึ่งในแต่ละเพลตสามารถเกิดการกระจายของตัวถูกละลายขึ้นได้ ในกระบวนการสกัดด้วยเครื่องมือ craig เราสามารถคำนวณการกระจายของสารตัวอย่างใน craig แต่ละอันเมื่อทำการสกัด n ครั้งได้ ในทำนองเดียวกันก็สามารถหาการกระจายของสารตัวอย่างในแต่ละเพลตตลอดคอลัมน์ของวิธีโครมาโตกราฟีได้ เพราะ theoretical plate แต่ละอันในโครมาโต-

$$f(n\ ,\ r) \quad = \quad \frac{n!}{r!(n-r)!} x^{(n-r)} y^{r} \qquad \text{.....(3.18)}$$

ในโครมาโตกราฟี n และ r จะมีค่ามากๆ เพราะว่าต้องใช้เฟสเคลื่อนที่ผ่านส่งไปในคอลัมน์จำนวนมากเพื่ออีลูทสารตัวอย่าง ดังนั้น n >> r นั่นคือ

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

.....(3.19)

เมื่อ x คือเศษส่วนของตัวถูกละลายที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

y คือเศษส่วนของตัวถูกละลายที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

ในกรณีที่ n >> r จะได้ $\frac{n!}{(n-r)!} \quad \simeq \quad n^{r}$ .....(3.20)

แทนค่าสมการที่ 3.19 และ 3.20 ลงในสมการที่ 3.18 จะได้

$$f(n\ ,\ r) \quad = \quad \frac{(ny)^{r} e^{-ny}}{r!} \qquad \text{.....(3.21)}$$

โดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ และใช้วิธีการประมาณค่าของ Stirling (Stirling's approximation) จะได้

$$r! \quad = \quad \frac{\sqrt{2\pi r} \cdot r^{r}}{e^{r}} \qquad \text{.....(3.22)}$$

แทนค่าสมการ (3.22) ลงในสมการ (3.21)

$$f(n\ ,\ r) \quad = \quad \frac{(ny)^{r} e^{-ny} e^{r}}{\sqrt{2\pi r} \cdot r^{r}} \quad \text{เมื่อ } n >> r \quad \text{.....(3.23)}$$

สมการที่ 3.23 คือสมการที่แสดงการกระจายของสารตัวอย่างในเฟสต่างๆ สามารถคำนวณเศษส่วนของสารตัวอย่างที่มีอยู่ในเพลตที่มีมากที่สุด หรือเพลตที่เป็นส่วนยอดของพีกได้จากสมการที่ 2.71

$$r_{max} \quad = \quad ny$$

ให้แทนค่าลงในสมการที่ 3.23

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

ในสมการที่ 3.23 เมื่อเป็นเศษส่วนของสารตัวอย่างในเพลตที่มีมากที่สุด แสดงว่า r คือ r_{max}

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

$$f_{(n,\, r_{max})} = \frac{1}{\sqrt{2\pi r_{max}}} \qquad \text{.....(3.24)}$$

ถ้าพิจารณาให้ส่วนยอดของพีก (r_{max}) อยู่ที่ปลายสุดของคอลัมน์ที่มีจำนวนเพลตทั้งหมดเท่ากับ N แสดงว่า r_{max} = N และสารตัวอย่างที่ใส่เข้าไปในคอลัมน์มีค่าเท่ากับ m โมลแสดงว่าปริมาณของสารตัวอย่างที่อยู่ที่ r_{max} หรือเพลตที่ N จะมีค่าเท่ากับ f(n, N) x m

ให้ Q(n, N) คือปริมาณของสารตัวอย่างที่อยู่ที่เพลตที่ N

$$\therefore \; Q(n, N) = f(n, N) \times m = \frac{m}{\sqrt{2\pi N}} \qquad \text{.....(3.25)}$$

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่มีเพลตอยู่ทั้งหมด N เพลต ในเวลา t_R แสดงว่าอัตราเร็วของการเคลื่อนที่คือ $\frac{N}{t_R}$ สมการที่ (3.25) แสดงการคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างที่มีมากที่สุดที่เพลตที่ N เมื่อต้องการหาอัตราเร็วสูงสุดที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ (S_{max}) จะได้

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

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

$$\therefore \; S_{max} = \frac{mN}{\sqrt{2\pi N} \cdot t_R} \qquad \text{.....(3.26)}$$

$$N = \frac{2\pi S_{max}^2 t_R^2}{m^2} \qquad \text{.....(3.27)}$$

N หมายถึงจำนวน plate ที่มีอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งตามความเป็นจริงแล้วไม่สามารถทราบได้หรือนับได้ว่าในคอลัมน์แต่ละอันจะมีเพลตอยู่เท่าใด ดังนั้น N จึงเป็นจำนวนเพลตที่คำนวณได้ตามทฤษฎีซึ่งเรียกว่า Theoretical plate

ปริมาณสารตัวอย่าง m ที่ใส่ลงในคอลัมน์จะแปรผันโดยตรงกับพื้นที่ของพีก (peak) สมมติให้โครมาโตกราฟิกพีกที่ได้มีความสูงเท่ากับ h และมีความกว้างเท่ากับ W

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

$$m = \frac{khW}{2} \qquad \text{.....(3.28)}$$

k คือค่าคงที่ที่ทำให้พื้นที่พีกมีค่าเท่ากับปริมาณของสารตัวอย่างที่ใส่ในคอลัมน์ ซึ่งเป็นค่าคงที่ตัวเดียวกับค่าคงที่ที่ทำให้อัตราเร็วสูงสุดที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เท่ากับความสูง

$$S_{max} \propto h$$

$$S_{max} = kh \qquad \text{.....(3.29)}$$

แทนค่าสมการ 3.28 และ 3.29 ลงในสมการที่ 3.27

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

$$= 8\pi\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \qquad \text{.....(3.30)}$$

การคำนวณตามสมการที่ 3.30 เป็นการคำนวณโดยพิจารณาพีกที่ได้เป็นรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว แต่ตามความเป็นจริงแล้วพีกที่ได้มีลักษณะเป็นเคอร์ฟที่มีการกระจายแบบ Gaussian curve ดังนั้นถ้าพิจารณาให้ถูกต้อง การคำนวณตามสมการที่ (3.30) จะมีค่าดังนี้คือ

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = \left(\frac{4t_R}{W}\right)^2 \quad \text{.....(3.31)}$$

W คือความกว้างของพีกที่สามารถวัดได้ดังแสดงในรูป 3.4 การวัดค่า W ต้องใช้วิธีการประมาณค่าอาจทำให้คลาดเคลื่อนได้ วิธีที่ดีควรวัดความกว้างของพีกที่มีความสูงเป็นครึ่งหนึ่งของความสูงทั้งหมด คือค่า $W_{\frac{1}{2}}$ จะได้พื้นที่สามเหลี่ยมมีค่าเท่ากับ $hW_{\frac{1}{2}}$ นั่นคือจากสมการที่ 3.28 จะได้

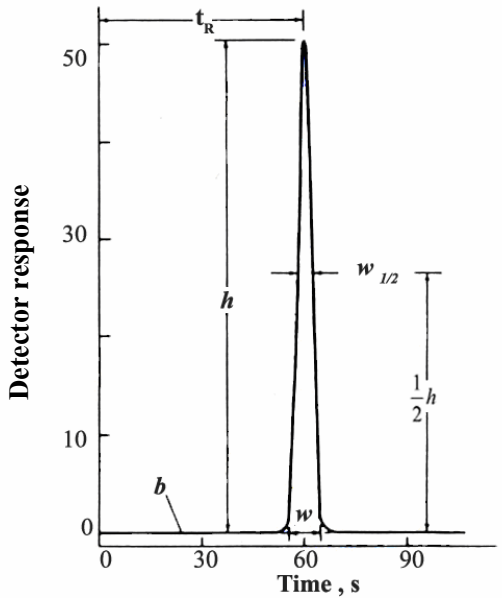
$$m = hW_{\frac{1}{2}}$$

$$\therefore \quad N = 2\pi\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \quad \text{.....(3.32)}$$

ด้วยเหตุผลเดียวกับสมการที่ (3.31) จะได้

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \quad \text{.....(3.33)}$$

สมการที่ (3.31) และ (3.33) ใช้เป็นสมการสำหรับคำนวณหาจำนวนเพลต (N) ที่มีอยู่ในคอลัมน์ ค่า W , $W_{\frac{1}{2}}$ จะต้องมีหน่วยเดียวกับ t_R ตามปกตินิยมใช้สมการที่ 3.33 ในการคำนวณมากกว่า เพราะไม่ต้องเสียเวลาในการประมาณค่า เพื่อสร้างกราฟให้เป็นรูปสามเหลี่ยมในการหาค่า W



รูปที่ 3.4 โครมาโตแกรมของ Heptane ที่ได้จากคอลัมน์ที่มีความยาว 50 cm, b คือ base line, h คือความสูงของพีก , w คือความกว้างของพีก , $W_{\frac{1}{2}}$ คือความกว้างของพีกที่มีความสูงเท่ากับ $\frac{1}{2}h$, t_R คือรีเทนชันไทม์

จำนวนเพลต N จะมีผลต่อลักษณะของพีก ถ้า N มีจำนวนมากๆ จะได้พีกที่มีลักษณะแคบและคมชัด การเพิ่ม N ให้มากขึ้นมิได้หมายความว่าต้องเพิ่มความยาวของคอลัมน์ เพราะถ้าความยาวของคอลัมน์เพิ่มขึ้นจะทำให้ t_R เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้พีกกว้างเหมือนเดิม การเพิ่ม N ให้มากขึ้น หมายความว่าต้องเพิ่มให้มากขึ้นใน 1 หน่วยของความยาวของคอลัมน์ที่เท่าเดิม แสดงว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์ (Efficiency) ขึ้นอยู่กับจำนวนเพลต N (Thoretical plate) ถ้าค่า N เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพของคอลัมน์จะเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากการเปรียบเทียบค่า N ที่เพิ่มขึ้นต้องเปรียบเทียบกับคอลัมน์ที่มีความยาวเท่ากับ ดังนั้นการพิจารณาประสิทธิภาพของคอลัมน์จากจำนวนเพลต N จึงไม่สะดวก เทอมที่ใช้ประโยชน์ได้มากกว่าในการพิจารณาถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์คือเทอม Height equivalent of a theoretical plate (HETP) ให้สัญลักษณ์ย่อคือ H ซึ่งหมายถึงความยาวของคอลัมน์ต่อจำนวนเพลต N เรียกสั้นๆ ว่า plate height

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{.....(3.34)}$$

คอลัมน์ที่ดีนั้นต้องมีค่า HETP น้อย นั่นคือ N ควรมีค่ามากที่สุด และคอลัมน์ควรสั้นที่สุด เพื่อให้ H มีค่าน้อย เนื่องจาก N จะมีค่าได้มาก เมื่อความกว้างของพีกมีค่าน้อย (ตามสมการที่ 3.31 และ 3.33) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะดีเมื่อพีกที่ได้มีความกว้างน้อยหรือแคบ ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะลดลงเมื่อความกว้างของพีกมากขึ้น ซึ่งจะมีผลถึงการแยกสารผสมด้วย ถ้าประสิทธิภาพของคอลัมน์ดีก็ทำให้การแยกสามารถเกิดขึ้นได้ดี เมื่อแทนค่าสมการที่ (3.31) ลงใน (3.34) จะได้

$$H = L\left(\frac{W}{4t_R}\right)^2 \qquad .....(3.35)$$

ตัวอย่างที่ 3.2 จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎี (Theoretical plate) และ height equivalent of a theoretical plate สำหรับคอลัมน์ที่มีความยาว 50.0 cm ซึ่งให้โครมาโตรแกรม ดังแสดงในรูป 3.4

วิธีทำ จะใช้สมการที่ 3.31 หรือ 3.33 ในการคำนวณหาค่า N ก็ได้ ถ้าใช้สมการที่ 3.31 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 3.34

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

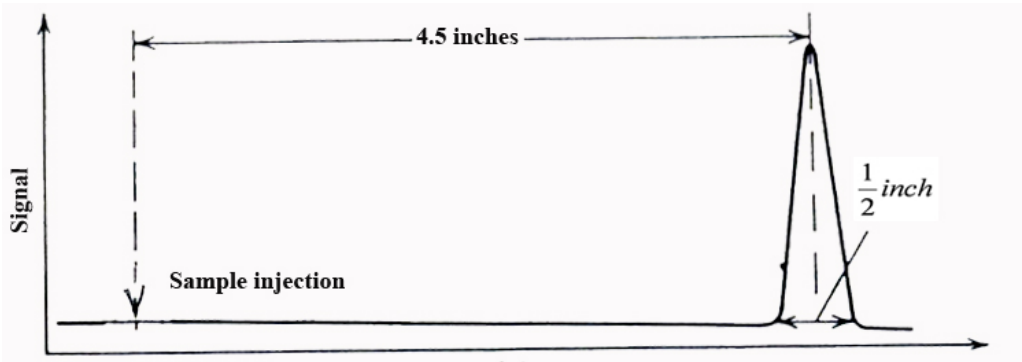
ถ้าใช้สมการที่ 3.33 ในการคำนวณหาค่า N ตามรูปจะวัดค่า $W_{\frac{1}{2}}$ ได้เท่ากับ 4.9 วินาที

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

$$= 8.0 \times 10^2$$

(ซึ่งได้ค่าเท่ากับการคำนวณตามสมการที่ 3.31)

ตัวอย่างที่ 3.3 ในการทำก๊าซโครมาโตกราฟีของสารตัวอย่าง n-butanol ได้โครมาโตรแกรมดังแสดงในรูปข้างล่างนี้ โดยใช้คอลัมน์ของ Carbowax ที่มีความยาว 4 ฟุต จงคำนวณหาค่าจำนวนเพลตตามทฤษฎี (N) ในคอลัมน์ และ HETP ของคอลัมน์ในเทอม cm/plate



inches of chart

(2.0 inches/minute chart speed)

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

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

จากสมการที่ 3.31

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

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

$$= 1300 \text{ theoretical plates}$$

เนื่องจากระยะทางของกระดาษที่วัดได้จะแปรผันโดยตรงกับเวลาที่ใช้ในการอีลูทสารตัวอย่าง ดังนั้นการคำนวณจึงไม่ต้องแปลงรีเทนชันไทม์ให้อยู่ในหน่วยของนาทีก็ได้ จะได้คำตอบอันเดียวกัน

$$N = 16\left(\frac{4.5}{0.5}\right)^2$$

$$= 1300 \text{ theoretical plates}$$

จากสมการที่ 3.34 $H = \frac{L}{N}$

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

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

ในทางปฏิบัติสิ่งที่สำคัญไม่ได้อยู่ที่ประสิทธิภาพของคอลัมน์เพียงอย่างเดียว สิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำโครมาโตรกราฟี คือการแยกองค์ประกอบสองชนิดหรือมากกว่าออกจากกัน คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพดีย่อมให้พีกของสารตัวอย่างแยกออกจากกันได้ชัดเจน

การแยก (Resolution) คือการวัดอาณาเขตของพีก 2 พีกที่ซ้อนกัน ปริมาณการแยกระหว่างพีก 2 พีก คือความแตกต่างระหว่างรีเทนชันไทม์ระหว่างพีกทั้งสองกับผลรวมของครึ่งหนึ่งของความกว้างของพีกทั้งสอง พบว่าถ้ารีเทนชันไทม์ของพีกทั้งสองแตกต่างกันมาก การแยกจะเกิดได้ดี แต่ถ้าความกว้างของพีกมีค่ามาก การแยกเกิดขึ้นได้ไม่ดี สำหรับพีกที่สมมาตรคือมีรูปร่างเป็น normal gaussian shape และพีกทั้งสองมีขนาดเท่ากัน ค่าการแยกจะมีค่าตามสมการที่ 3.36 ดังนี้คือ

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{W_1}{2} + \frac{W_2}{2}} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2} \qquad \text{.....(3.36)}$$

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

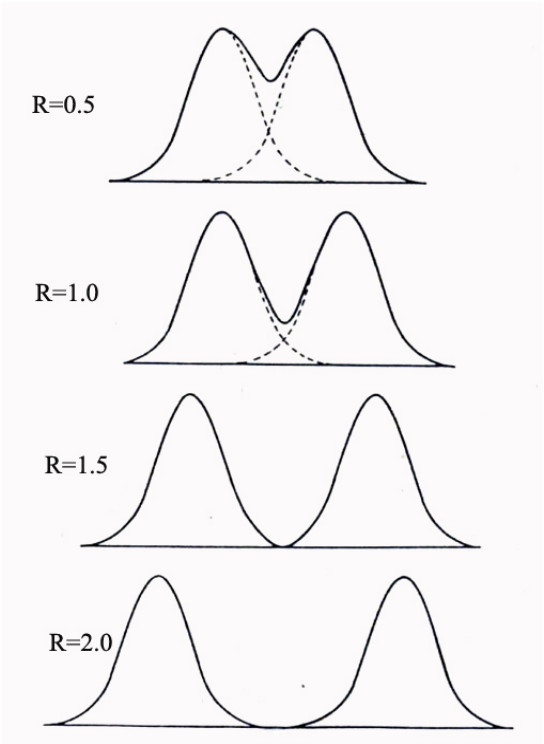
W_1 และ W_2 คือความกว้างของฐานพีกทั้งสอง

สำหรับพีกที่สมมาตรและมีค่าการแยกเท่ากับ 1 จะมีพื้นที่พีกที่ซ้อนกันเพียง 2% ซึ่งเพียงพอสำหรับงานวิเคราะห์ทางปริมาณ ถ้าการแยกมีค่าเท่ากับ 1.5 พีก สามารถแยกออกจากกันได้สมบูรณ์ ลักษณะของการแยกดังแสดงในรูปที่ 3.5

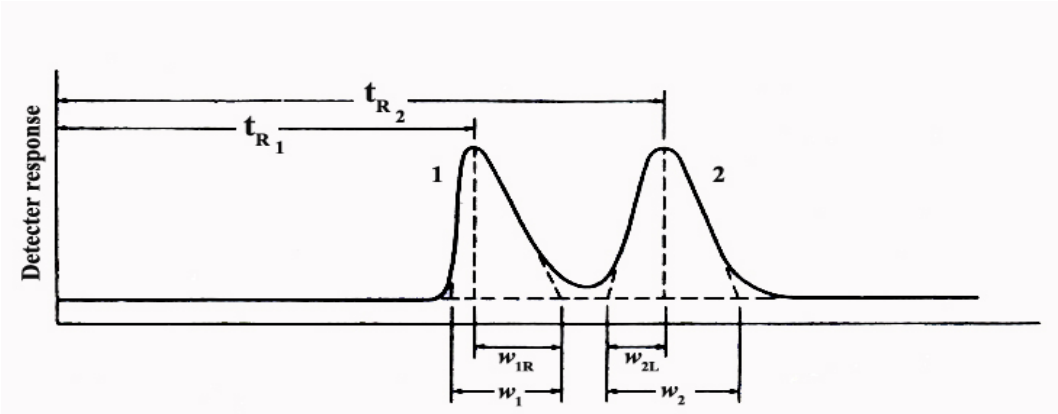
สมการที่ (3.36) เป็นสมการที่ใช้กับพีกที่มีลักษณะสมมาตรในกรณีที่พีกไม่สมมาตร ควรใช้สมการที่ (3.37) คือ

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_{1R} + W_{2L}} \qquad \text{.....(3.37)}$$

สำหรับสมการที่ 3.36 และสมการที่ 3.37 สามารถใช้ค่ารีเทนชันโวลูมแทนค่ารีเทนชันไทม์ได้ ค่า W_{1R} และ W_{2L} สามารถวัดได้จากพีกของโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 3.6 สำหรับหน่วยของ W_{1R} และ W_{2L} ต้องใช้ให้สอดคล้องตามค่ารีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูม



รูปที่ 3.5 แสดงวิธีการแยกของโครมาโตกราฟีพีกที่มีค่า R ต่างๆ กัน

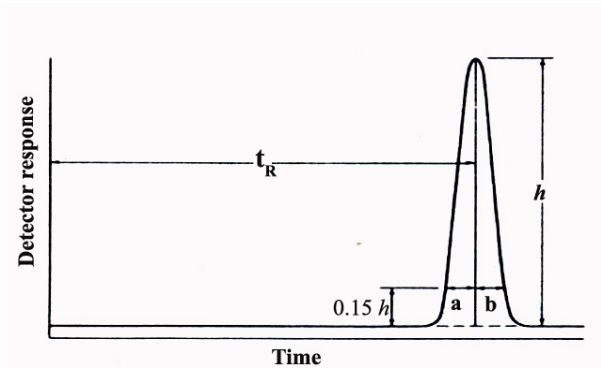


รูปที่ 3.6 แสดงการหาค่า W_{1R} และ W_{2L} จากโครมาโตกราฟิกพีกที่ไม่สมมาตร

ตามปกติพีกที่ได้จะไม่สามาตร มีหาง (peak tailing) ดังแสดงในรูป 3.6 พีกที่ 1 มีหาง ซึ่งจะมีผลทำให้การแยกไม่ดี การพิจารณาว่าพีกสมมาตรหรือไม่พิจารณาได้จาก Asymmetry factor (a_f)

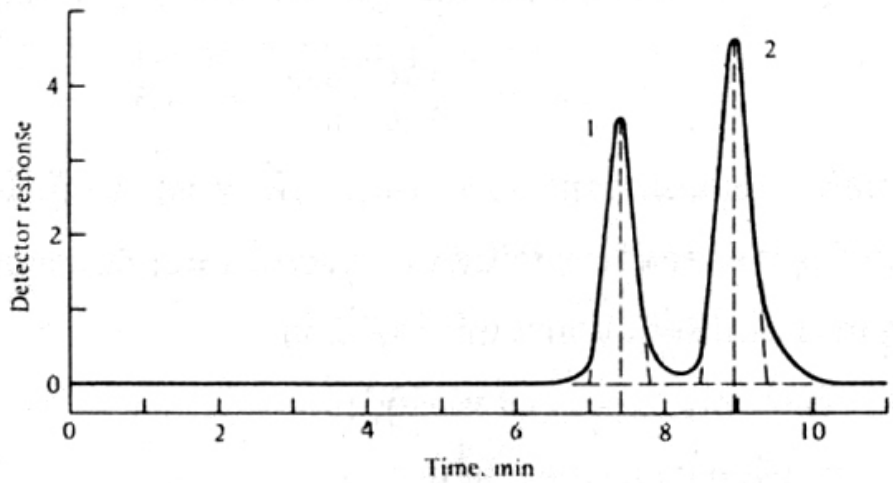
$$a_f = \frac{W_{0.15R}}{W_{0.15L}} \qquad \text{.....(3.38)}$$

โดยใช้ความกว้างของพีกที่มีความสูงเท่ากับ 0.15h ด้านขวาหารด้วยด้านซ้าย ดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 โครมาโตกราฟิกพีกแสดงการวัดค่าความกว้างของพีกด้านซ้ายและขวาที่มีความสูง 0.15h a = $W_{0.15L}$ และ b = $W_{0.15R}$ ในกรณีที่ asymmetry factor มีค่า = 1 แสดงว่าพีกนั้นสมมาตร

ตัวอย่างที่ 3.4 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

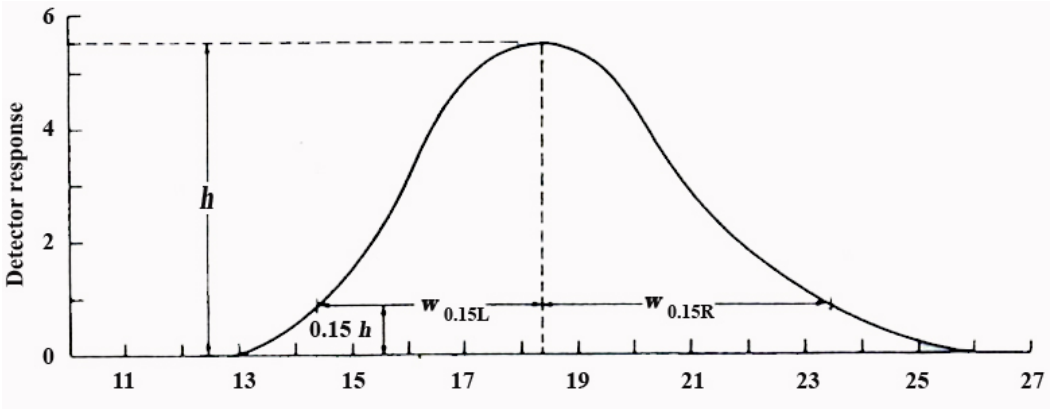
จากสมการที่ (3.36)

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

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

เพราะว่าการแยกมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าโครมาโตแกรมที่ได้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้

ตัวอย่างที่ 3.5 จงคำนวณหา asymmetry factor ของโครมาโตกราฟิกพีกของรูปข้างล่างนี้



วิธีทำ จากสมการที่ (3.38)

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

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

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

เมื่อพิจารณาสมการการแยก (สมการที่ 3.36) จะเห็นได้ชัดว่าการแยกจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างค่า t_{R_1} และ t_{R_2} (Δt_R) กับความกว้างของพีก นั่นคือการปรับปรุงการแยกให้ดีขึ้นสามารถทำได้ดังนี้คือ

1. เพิ่มค่า Δt_R ($t_{R_2} - t_{R_1}$) ซึ่งทำได้ดังนี้
   - ก. เพิ่มความยาวของคอลัมน์ (L)
   - ข. โดยการลดอุณหภูมิและเลือกเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสม
   - ค. เพิ่มปริมาณของเฟสอยู่กับที่
2. ทำความกว้างของแบนด์หรือพีกให้น้อยลง
   - ก. บรรจุเฟสอยู่กับที่หรือพีกให้น้อยลง

ข. เพิ่มพื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ คือใช้ที่มีขนาดเล็ก

ค. ให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่มีอัตราเร็วที่เหมาะสม

ง. ลดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์

จ. ลดปริมาณของสารตัวอย่าง

สิ่งที่น่าสนใจในการคำนวณอีกแบบหนึ่งก็คือ คำนวณหาจำนวนเพลตที่ต้องการสำหรับทำให้การแยกเกิดขึ้นได้ดี หรือเป็นไปได้ในทางการวิเคราะห์ปริมาณ ในเมื่อทราบว่าค่า R ที่เหมาะสม ควรมีค่าเท่ากับเท่าไร

จากสมการที่ 3.36 $$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

ถ้าพีกทั้งสองมีค่าความกว้างของพีกโดยประมาณเท่ากัน คือ

$$W_1 \cong W_2$$

จะได้ $$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{2W_2} = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_2} \qquad \text{.....(3.39)}$$

เนื่องจากความกว้างของพีกมีความสัมพันธ์ต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์หรือจำนวนเพลตตามสมการที่ (3.31)

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

ถ้าจำนวนเพลตที่คำนวณได้นี้คิดจากพีกที่ 2

$$\therefore \quad W_2 = \frac{4t_{R_2}}{\sqrt{N}} \qquad \text{.....(3.40)}$$

นั่นคือ เราสามารถหาการแยกที่สัมพันธ์กับจำนวนเพลตได้โดยแทนค่า (3.40) ลงในสมการ (3.39)

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{t_{R_2}} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} \qquad \text{.....(3.41)}$$

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

นำ $t_{R_1} - t_m$ หารทั้งเศษและส่วนจะได้

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

จากสมการที่ 3.15 พิจารณาได้ว่า

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

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

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

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

จากสมการที่ 3.8 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 $N_{req} = 16R^2\left(\frac{\alpha}{\alpha-1}\right)^2\left(\frac{1+k'_2}{k'_2}\right)^2$ .....(3.42)

เมื่อ $k'_2 = \frac{t_{R_2} - t_m}{t_m}$

N คือจำนวนเพลตที่ต้องการจึงให้สัญลักษณ์เป็น N_{req}

ตัวอย่างที่ 3.6 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 3.15

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

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

t_m ในก๊าซโครมาโตกราฟีคือ t_{air}

จากสมการที่ 3.8

$$k'_2 = \frac{t_{R_2} - t_m}{t_m}$$

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

แทนค่า α และ k_2' ลงในสมการที่ 3.42

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

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

จำนวนเพลตที่ใช้ในการแยกต้องมีค่าเท่ากับ 1444 เพลต

ในการทำโครมาโตแกรมทราบว่าสารประกอบตัวที่ 1 มีความกว้างของพีกเท่ากับ 1.0 นาที และรีเทนชันไทม์เท่ากับ 16.0 แสดงว่าสามารถคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎี (theoretical plates) ที่มีอยู่ในคอลัมน์ยาว 10 ฟุตได้ ตามสมการที่ 3.31

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

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

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

แสดงว่า คอลัมน์ที่นำมาใช้งานมี Height equivalent of theoretical plates (H) ดังนี้

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

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

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

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

คอลัมน์ควรมีความยาวอย่างน้อย 3.5 ฟุต จึงจะบรรจุจำนวน plate ตามที่ต้องการได้เพื่อความแน่นอนในการปฏิบัติควรใช้คอลัมน์ยาว 4 ฟุต

ตัวอย่างที่ 3.7 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. เวลาที่ใช้ในการอีลูทสารประกอบ B ออกจากคอลัมน์ที่ยาวกว่า

วิธีทำ ก. จากสมการที่ 3.36

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

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

$\therefore$ การแยกของคอลัมน์ = 1.06

ข. จากสมการที่ 3.31

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

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 3.34

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

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

ง. สรุปได้ว่าเมื่อใช้คอลัมน์ที่มีความยาว 30 ซม. มีการแยกเท่ากับ 1.06 จะมีจำนวนเพลตเฉลี่ยเท่ากับ 3445 เพลต ซึ่งจำนวนเพลตและการแยกสัมพันธ์ตามสมการที่ 3.42

$$N_{req_1} = 16R_1^2\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2\left(\frac{1 + k_2'}{k_2'}\right)^2 \quad \text{.....(1)}$$

เมื่อใช้คอลัมน์อันที่ 2 ที่มีความยาวต่างออกไปจากอันที่ 1 จะได้

$$N_{req_2} = 16R_2^2\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2\left(\frac{1 + k_2'}{k_2'}\right)^2 \quad \text{.....(2)}$$

เนื่องจากค่า k_2' และ α ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความยาวของคอลัมน์และจำนวนเพลต นั่นคือสมการที่ (1) หารด้วยสมการที่ (2) จะได้

$$\frac{N_{req_1}}{N_{req_2}} = \frac{R_1^2}{R_2^2} \quad \text{.....(3)}$$

แทนค่า N_{req_1} = 3445, R_1 = 1.06 , R_2 = 1.5 ลงในสมการที่ (3)

$$\frac{3445}{N_{req_2}} = \frac{(1.06)^2}{(1.5)^2}$$

$$N_{req_2} = (3445 \text{ x } 2.25) / 1.124$$

$$= \quad 6.90 \times 10^3$$

แสดงว่า ถ้าต้องการให้คอลัมน์มีการแยก 1.5 ต้องใช้คอลัมน์ที่มีเพลตตามทฤษฎี = 6.90×10^3 เพลต ซึ่งมีความยาวดังนี้

$$L = HN$$

$$= 8.71 \times 10^{-3} \times 6.90 \times 10^3$$

$\therefore$ คอลัมน์ที่ใช้จะต้องยาว = 60.1 cm จึงจะทำให้การแยกมีค่าเท่ากับ 1.5

จ. สมการที่ 3.7

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

และสมการที่ 3.34 $H = \frac{L}{N}$ หรือ $L = HN$

$$\therefore \quad t_R = \frac{HN}{u}(1+k')$$

เมื่อพิจารณารีเทนชันไทม์ของสารประกอบ B ซึ่งเป็นตัวที่ถูกอีลูทออกมาทีหลังจะได้

$$t_{R_2} = \frac{HN}{u}(1+k')$$

เมื่อใช้คอลัมน์อันที่ 1 ซึ่งมีความยาว 30.0 cm รีเทนชันไทม์ที่วัดได้คือ $(t_{R_2})_1$ เมื่อมีจำนวนเพลตในคอลัมน์เท่ากับ N_{req_1}

$$\therefore \quad (t_{R_2})_1 = \frac{HN_{req_1}}{u}(1+k'_2) \qquad \text{.....(4)}$$

เมื่อใช้คอลัมน์อันที่สองซึ่งมีความยาว 60.1 cm รีเทนชันไทม์ที่วัดได้คือ $(t_{R_2})_2$

$$(t_{R_2})_2 = \frac{HN_{req_2}}{u}(1+k'_2) \qquad \text{.....(5)}$$

เนื่องจากอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คงที่สำหรับการใช้คอลัมน์ทั้งสองและ k'_2 ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความยาวของคอลัมน์ เมื่อนำสมการที่ (4) หารด้วยสมการที่ (5) จะได้

$$\frac{(t_{R_2})_1}{(t_{R_2})_2} = \frac{N_{req_1}}{N_{req_2}} \qquad \text{.....(6)}$$

สมการที่ (6) เท่ากับสมการที่ (3)

$$\therefore \frac{(t_{R_2})_1}{(t_{R_2})_2} = \frac{R_1^2}{R_2^2}$$

เมื่อ $(t_{R_2})_1 = 17.63$, $R_1 = 1.06$, $R_2 = 1.5$

$$\therefore (t_{R_2})_2 = 17.63 \times \frac{(1.5)^2}{(1.06)^2}$$

$$= 35.3 \text{ min}$$

นั่นคือ รีเทนชันไทม์ของสารประกอบ B เมื่อใช้คอลัมน์ที่ยาว 60.1 ซม. จะมีค่าเท่ากับ 35.3 นาที

ตารางที่ 3.1 ตารางสรุปเทอมสำคัญต่างๆ ในโครมาโตกราฟี

ชื่อ	**สัญลักษณ์**	**สามารถหาได้จาก**
รีเทนชันไทม์ของเฟสเคลื่อนที่	t_m	พีกของอากาศในโครมาโตแกรม ดูรูป 3.3
รีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่าง - ถ้าเป็นสารผสมของ A และ B ให้กำหนดเป็นรีเทนชันไทม์ของสารนั้นๆ	t_R t_{R_A} และ t_{R_B} หรือ $(t_R)_A$ และ $(t_R)_B$	โครมาโตแกรม ดูรูปที่ 3.3
ความกว้างของพีก - ถ้าเป็นสารผสมของ A และ B ให้กำหนดเป็นความกว้างของสารนั้นๆ	W W_A และ W_B	โครมาโตแกรม ดูรูปที่ 3.4
ความยาวของคอลัมน์	L	วัดได้โดยตรงจากคอลัมน์

อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	F	วัดได้โดยตรง
ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่	V_m	$t_m \times F$

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชื่อ	สัญลักษณ์	สามารถหาได้จาก
ปริมาตรของเฟสอยู่กับที่	V_S	ปริมาตรของคอลัมน์ที่ใช้บรรจุ
ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่	C_S, C_m	วิเคราะห์จากข้อมูลที่ได้

ตารางที่ 3.2 ตารางสรุปสูตรในการคำนวณหาค่าเทอมต่างๆ ในโครมาโตกราฟี

ชื่อ	สูตรในการคำนวณ	ความสัมพันธ์กับค่าอื่น ๆ
อัตราเร็วในการไหลของเฟสเคลื่อนที่	$u = \frac{L}{t_m}$	
ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่	$V_m = t_m \times F$	
คาพาซิตี้แฟคเตอร์ (Capacity factor)	$k' = \frac{(t_R - t_m)}{t_m}$	$k' = K_d \frac{V_S}{V_m}$
สัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วน (Partition Coefficient) หรือสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (Distribution Coefficient)	$K_d = k' \frac{V_m}{V_S}$	$K_d = \frac{C_S}{C_m}$
รีเลทีฟรีเทนชัน	$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_m}{t_{R_1} - t_m}$	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_{d_2}}{K_{d_1}}$

การแยก (Resolution)	$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$	$R = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_2}{1 + k'_2}\right)$

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชื่อ	สูตรในการคำนวณ	ความสัมพันธ์กับค่าอื่น ๆ
จำนวนเพลต (Theoretical plate)	$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$	$N_{req} = \frac{L}{H}$ $= 16R^2\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2\left(\frac{1 + k'_2}{k'_2}\right)$
รีเทนชันไทม์	$\frac{(t_{R_A})_1}{(t_{R_A})_2} = \frac{R_1^2}{R_2^2}$	(สาร A ชนิดเดียวกันใช้คอลัมน์เหมือนกัน แต่มีความยาวต่างกันคือ คอลัมน์อันที่ 1 และอันที่ 2)

แบบฝึกหัดบทที่ 3

1. จงนิยามความหมายของคำต่อไปนี้
   a) Retention time
   b) Retention Volume
   c) Relative retention (α)
   d) Capacity factor
   e) Resolution
   f) Asymmetry factor
2. จงอธิบายความหมายของ theoretical plate และ Height equivalent of a theoretical plate
3. ข้อมูลต่อไปนี้ ได้จากการทำก๊าซโครมาโตกราฟี

   t_R = 5.0 นาที , t_{air} = 1.0 นาที

   V_S = ปริมาตรของเฟสที่อยู่กับที่ = 20 cm^3

   F = 50 cm^3 / min.

   จงคำนวณหา a) k'
   b) V_m
   c) K_d
   d) V_R
4. จงคำนวณหาค่า H และ N ของคอลัมน์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ didodecylphthalate ซึ่งได้ค่ารีเทนชันไทม์ เท่ากับ 9.59 นาที และพีกมีความกว้าง 1.20 นาที
5. จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎีของคอลัมน์ ซึ่งให้รีเทนชันไทม์สารตัวอย่าง 7.66 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 47 วินาที
6. จงหาค่า H ของคอลัมน์ที่ยาว 2.00 เมตร เพื่อให้พีกที่มีรีเทนชันไทม์ 10.0 นาที มีความกว้างของพีก 30 วินาที

7. สารประกอบจำพวก chlorinated dydrocarbon คือ 1, 1, 1-trichloroethane ถูกนำมาทำก๊าซโครมาโตกราฟี ปรากฏว่าวัดค่ารีเทนชันไทม์ได้เท่ากับ 137 วินาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 10 วินาที จงคำนวณหาค่า HETP ของคอลัมน์ในหน่วยเซนติเมตร เมื่อคอลัมน์มีความยาว 5 ฟุต **ตอบ** 0.0507 cm.

8. ข้อมูลต่อไปนี้สำหรับทำก๊าซโครมาโตกราฟี คือ

Length of column	22.6 cm.
Flow rate	0.287 cm^3 / min.
V_m	1.26 cm^3
V_s	0.148 cm^3

โครมาโตแกรมของสารผสม A, B และ C มีข้อมูลดังนี้

	T_R (min)	ความกว้างของพีก (min)
พีกอากาศ	4.2	—
A	6.4	0.45
B	14.4	1.07
C	15.4	1.16
D	20.7	1.45

จงคำนวณ

a) จำนวนเพลตที่ใช้สำหรับแต่ละพีก

b) HETP ของคอลัมน์

9. จากโจทย์ข้อ 8 จงคำนวณเกี่ยวกับสาร B และ C

a) การแยก (resolution)

b) รีเลทีฟรีเทนชัน หรือ selectivity factor (α)

c) ความยาวของคอลัมน์ที่ต้องการให้การแยก มีค่าเท่ากับ 1.5

d) เวลาที่ต้องใช้ในการแยก B ออกจาก C เมื่อมีการแยก 1.5

10. จากโจทย์ข้อ 8 จงคำนวณเกี่ยวกับ C และ D ในคำถามแบบเดียวกับข้อ 9

11. ข้อมูลต่อไปนี้ได้จากการทำก๊าซโครมาโตกราฟีของคอลัมน์ที่ยาว 40 ซม.

สารประกอบ	t_R (min)	W (min)
Air	2.5	—
Methylcyclohexane	10.7	1.3
Methylcyclohexene	11.6	1.4
Toluene	14.0	1.8

จงคำนวณ

a) ค่าเฉลี่ยของจำนวนเพลตตามทฤษฎีจากข้อมูล

b) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ในข้อ a

c) ค่าเฉลี่ย HETP ของคอลัมน์

- methylcyclohexene กับ methylcyclohexane
- methylcyclohexene กับ toluene
- methylcyclohexane กับ toluene

12. จงคำนวณหา asymmetry factor ของโครมาโตกราฟี พีกที่มีความกว้างของพีกที่ 15% ของความสูงเท่ากับ 0.41 นาที ทางข้างซ้ายของรีเทนชันไทม์ และ 0.83 นาที ทางข้างขวาของรีเทนชันไทม์

13. จงคำนวณหา asymmetry factor ของโครมาโตกราฟี พีกที่มี $W_{0.15L.}$ = 28 วินาที และ $W_{0.15R}$ = 43 นาที