Chromatographic method

บทที่ 12

วิธีโครมาโทกราฟี

Chromatographic Method

หลักการ (Principle)

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการแยกสารโดยให้องค์ประกอบที่ถูกแยกกระจายอยู่ระหว่างเฟส 2 เฟส (phase) ที่แตกต่างกัน เฟสหนึ่งเป็นเฟสที่อยู่นิ่งเรียกว่า stationary phase อีกเฟสหนึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ได้เรียกว่า mobile phase เมื่อมวลของสารที่ต้องการแยกเกิดการแบ่งส่วนกันระหว่าง stationary phase กับ mobile phase ที่เป็นของเหลวทั้งสองชนิดโดยมีตัวช่วยสนับสนุนที่เป็นของแข็ง (solid support) จะเรียกขบวนการนี้ว่า partition chromatography ถ้ามวลของสารที่ถูกแยกสามารถถูกดูดซับด้วยเฟสอีกเฟสหนึ่งที่เป็นของแข็งเรียกขบวนการนี้ว่า adsorption chromatography จะเห็นได้ว่าวิธีการโครมาโทกราฟีเป็นการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น การแบ่งส่วน (partition) และการดูดซับ (adsorption) ของสารระหว่างเฟสทั้งสองซึ่งแตกต่างไปจากการแยกโดยวิธีการตกตะกอนที่อาศัยการเกิดปฏิกิริยาเคมี วิธีการโครมาโทกราฟีถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Michael Tswett ในปี ค.ศ. 1906 ในการแยกสารมีสี (pigment) ในพืชโดยให้สารมีสีละลายในปิโตรเลียมแล้วผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุแคลเซียมคาร์บอเนตพบว่าสารมีสีที่ถูกดูดซับได้ดีจะเป็นแถบสีที่อยู่บนสุดของคอลัมน์และสารที่ถูกดูดซับได้เลวกว่าจะเป็นแถบสีที่ต่ำลงมา เมื่อผ่านปิโตรเลียมลงในคอลัมน์เรื่อยๆ พบว่าแถบสีแต่ละแถบสามารถเคลื่อนที่ต่ำลงมาได้ซึ่ง Tswett ได้เรียกวิธีการนี้ว่า **โครมาโทกราฟี** และชื่อนี้ก็ถูกใช้มาโดยตลอดถึงแม้ว่าจะได้มีการพัฒนาวิธีการนี้ต่อมาอีกหลายแบบ

วิธีการของโครมาโทกราฟีได้พัฒนาต่อมาเรื่อยๆ จนสามารถจัดแบ่งประเภทของวิธีการวิเคราะห์ได้หลายแบบตามชนิดของเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ โดยปกติเฟสที่อยู่กับที่อาจเป็นได้ทั้งของแข็งหรือของเหลวส่วนเฟสเคลื่อนที่จะเป็นของเหลวหรือก๊าซ ดังนั้นวิธีการของโครมาโทกราฟีจึงแบ่งได้เป็น 4 วิธีคือ

1. **Liquid-Solid Chromatography** เป็นวิธีที่ใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว เช่น การแยกสารมีสีของพืชโดยผ่านลงในคอลัมน์ที่มีตัวดูดซับเช่น $CaCO_3$ บรรจุอยู่แล้วใช้ปิโตรเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ได้

2. **Gas-Solid Chromatography** หรือเรียกย่อๆ ว่า GSC วิธีนี้ใช้ก๊าซเป็นเฟสเคลื่อนที่ในการพาสารตัวอย่างที่เป็นก๊าซและถูกดูดซับไว้ด้วยของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ออกจากคอลัมน์สู่ตัวตรวจวัด

3. **Liquid-Liquid Chromatography** การแยกโดยวิธีนี้ทำได้ทั้งในรูปของคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจลเป็นตัวซับพอทที่มีของเหลวฉาบอยู่ และแผ่นราบ (plane) เช่น paper chromatography และ Thin Layer chromatography

4. **Gas-Liquid Chromatography** มีชื่อย่อว่า GLC วิธีการนี้ต้องอาศัยเครื่องมือในการวัดสารตัวอย่างที่ถูกแยกออกมาเช่นเดียวกับวิธีของ GSC สำหรับเฟสที่อยู่กับที่ซึ่งเป็นของเหลวสามารถบรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้โดยใช้ของแข็งเป็นตัวซับพอท (Solid support) หรือฉาบอยู่บนผนังของ capillary column

นอกจากวิธีที่จัดแบ่งแล้วนี้วิธีการโครมาโทกราฟียังได้มีการพัฒนาต่อมาอีกจนพบวิธี การแยกสารที่เรียกว่า Electrochromatography หรือ Electrophoresis และ ion exchange chromatography

การเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก

สารที่ต้องการแยกต้องไม่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นตัวพาบางทีเรียกว่า eluent ความเร็วของการเคลื่อนที่ของสารสามารถวัดได้ในเทอม R (retention ratio หรือ retardation factor) สารแต่ละตัวจะมีค่า R ไม่เท่ากัน

$$R = \frac{t_m}{t_m + t_s} \qquad \text{——— } 12.1$$

t_m คือ เวลาที่โมเลกุลของสารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

t_s คือ เวลาที่โมเลกุลของสารอยู่ในเฟสอยู่กับที่

ในกรณีที่ค่า R = 0.25 หมายความว่า สารใช้เวลา 25 เปอร์เซนต์อยู่ในเฟสเคลื่อนที่ หรือสามารถเดินทางไปกับ eluent ได้ 25 เปอร์เซนต์ ให้สังเกตว่าถ้าค่า R = 1.0 แสดงว่าสารนั้นเคลื่อนที่ไปกับ eluent ได้ด้วยความเร็วเท่าๆ กัน

อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่กระจายอยู่ในเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ได้ของสารแต่ละชนิดจะเป็นค่าคงที่ที่เรียกว่า partition coefficient (K)

$$K = \frac{C_s}{C_m} \qquad \text{——— } 12.2$$

C_s = ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในเฟสอยู่กับที่

C_m = ความเข้มข้นของสารที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่

$$\left(\begin{array}{c}\text{อัตราส่วนของเวลา}\\ \text{ที่สารกระจายใน}\\ \text{แต่ละเฟส}\end{array}\right) = \left(\begin{array}{c}\text{อัตราส่วนของ}\\ \text{ปริมาณของสารใน}\\ \text{แต่ละเฟส}\end{array}\right) = \left(\begin{array}{c}\text{partition coefficient x อัตราส่วน}\\ \text{ของปริมาตรของแต่ละเฟส}\end{array}\right)$$

$$\frac{t_s}{t_m} = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} \qquad \text{——— } 12.3$$

จากสมการที่ 12.1

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

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

$$= \frac{V_m}{V_m + K.V_s} \qquad \text{——— } 12.4$$

สมการที่ 12.4 เป็นสมการที่แสดง retention ratio ในเทอมของ partition coefficient และ column parameter การพิจารณาการแยกสารจากค่า retention ratio ในทางปฏิบัติทำได้ยากมากเพราะว่าค่า partition coefficient ในโครมาโทกราฟีหาได้ยาก ไม่เหมือนกับการสกัดแบบแบทช (Batch extraction) ดังนั้นการแยกต้องสมมุติว่าคอลัมน์ ประกอบด้วยจำนวนชั้นของการแยกหลายๆ ชั้น เป็น theoretical plate แต่ละ plate สามารถแยกได้ 1 ครั้ง (batch separation) ค่า partition coefficient สามารถเกิดขึ้นได้ในแต่ละชั้นของการแยก ดังนั้นการพิจารณาการแยกสารควรศึกษาจากค่า R_f – factor ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของระยะทางการเคลื่อนที่ของสารต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของ eluent กล่าวคือ

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

ตัวถูกละลาย หมายถึง สารที่ต้องการแยกและละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้

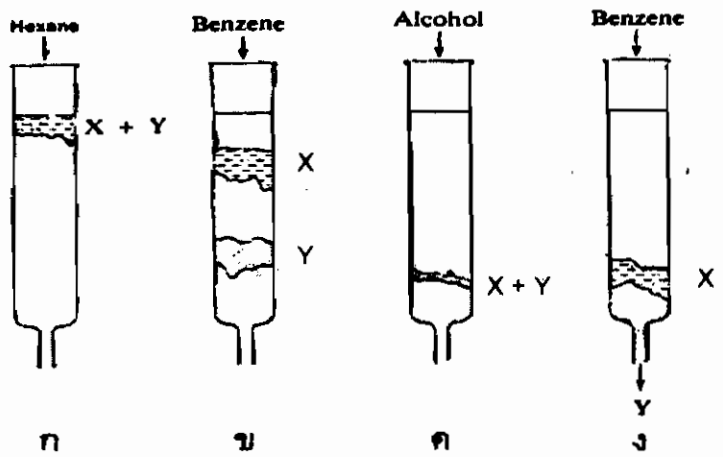
ตัวทำละลาย หมายถึง เฟสเคลื่อนที่ หรือ eluent โดยปกติเคลื่อนที่เร็วกว่าตัวถูกละลาย

ในการทดลองที่ควบคุมสภาวะของการทดลองให้คงที่และเหมือนกันพบว่าค่า R_f จะคงที่สำหรับตัวถูกละลายชนิดหนึ่งๆ ซึ่งการวัดค่า R_f ของสารสามารถบอกได้ว่าสารนั้นคือสารใดในแง่ของคุณภาพวิเคราะห์เบื้องต้น

การทดลองที่ 12.1 การแยก Cis และ Trans อะโซเบนซีน

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

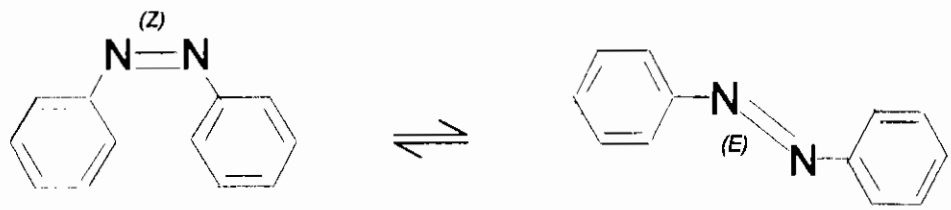
การแยกสาร 2 ตัวผสมกันโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีจะกระทำได้เมื่อโมเลกุลของสารสองตัวนั้นมีความสามารถในการถูกดูดซับไว้ที่ของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ได้แตกต่างกันถ้าสารสองชนิดเป็นสารอินทรีย์ที่มีความเป็นโพลาร์เล็กน้อยเช่น โมเลกุล X และ Y ที่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายนอนโพลาร์เช่น เฮกเซน สาร X และ Y สามารถถูกดูดซับไว้ที่ของแข็งที่เป็นโพลาร์ ดังรูปที่ 12.1 (ก) เมื่อผ่านตัวทำละลายเฮกเซนลงในคอลัมน์ต่อไปอีกเท่าไรก็ตาม X และ Y จะไม่เคลื่อนที่ เพราะโมกุลของ X และ Y จะถูกดูดซับไว้ได้อย่างเหนียวแน่น ถ้าเปลี่ยนตัว eluent มาเป็นเบนซีน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์มากกว่าเฮกเซน ผ่านลงในคอลัมน์ พบว่า X และ Y สามารถเคลื่อนที่ผ่านลงในคอลัมน์ได้ เนื่องจาก X และ Y มีความสามารถในการถูกดูดซับและการละลายในตัวทำละลายได้แตกต่างกัน ดังนั้นสารทั้งสองจึงเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยความเร็วที่แตกต่างกันทำให้แยก X และ Y ออกจากกันได้ ดังรูปที่ 12.1 (ข) ถ้าเปลี่ยนตัว eluent ให้เป็นโพลาร์มากขึ้น เช่น แอลกอฮอล์ ทั้ง X และ Y จะเคลื่อนที่ในคอลัมน์ลงมาพร้อมกันอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 12.1 (ค)



รูปที่ 12.1 การใช้ eluent ชนิดต่างๆ

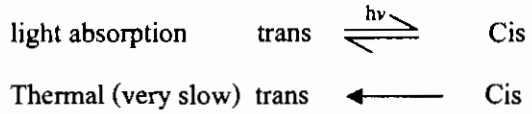
สรุปได้ว่าวิธีการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีกระทำได้โดยใช้ตัวทำละลาย (solvent) ละลายสารผสมที่ต้องการแยก เมื่อใส่สารผสมลงในคอลัมน์แล้วจะต้องเกิดการดูดซับได้ดี คือตัวทำละลายจะต้องไม่ช่วยพาสารผสมนั้นเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ หลังจากนั้นเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ให้มีคุณสมบัติที่พาสารที่ถูกดูดซับไว้ในคอลัมน์เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ลงมาได้ ตัวทำละลายนี้เรียกว่า eluent ขบวนการที่ตัวถูกละลายสามารถเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ลงมาได้เรียกว่า การอีลูท (elution) ดังรูปที่ 12.1 (ง) นั่นคือสิ่งที่สำคัญที่สุดก็คือการศึกษาคุณสมบัติของสารต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นตัวดูดซับ (absorbent) ตัวทำละลาย และตัวอีลูท (eluent) การแยกสารเคมีที่เราสนใจจะทำได้สมบูรณ์หรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว

อะโซเบนซีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วย 2 ไอโซเมอร์ คือ cis และ trans ดังนี้



cis-azobenzene trans-azobenzene

ทั้ง cis และ trans-isomer มีจุดหลอมเหลวต่ำและมีค่าไดโพลโมเมนต์(dipolemoment) สูง สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายโพลาร์ cis-form ไม่ค่อยเสถียร ส่วน trans-form เสถียรกว่าโดยปกติ ของแข็งอะโซเบนซีนจะอยู่ในรูปของ trans-form เมื่อผ่านแสงที่อะโซเบนซีนสามารถดูดกลืนพลังงาน(hν)ได้ จากนั้นจะเปลี่ยนจาก trans-form เป็น cis-form ดังนี้



เมื่อปฏิกิริยาถึงสมดุลสารละลายจะประกอบด้วยอะโซเบนซีนชนิด cis-form ประมาณ 15 ถึง40% (ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้)

สมดุลของปฏิกิริยาคงที่ได้นานดังนั้นจึงสามารถแยก cis-form และ trans-form ออกจากกันโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตัวดูดซับ (absorbent) ที่ใช้ควรเป็นโพลาร์ เช่น อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3) และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย cis-form จะเป็นโพลาร์มากกว่า ดังนั้นจึงถูกดูดซับได้ดีกว่า แต่ถ้าใช้คอลัมน์เป็นผงถ่านและเมทานอลเป็นตัวทำละลาย trans-form จะถูกดูดซับได้ดีกว่า

จุดประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิด liquid – solid Chromatography

2. แยกอะโซเบนซีนที่อยู่ในรูปของ cis ออกจาก trans

3. หาค่าคงที่ของสมดุลระหว่าง cis และ trans isomer

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- แท่งแก้วคอลัมน์ขนาด 0.5 x 12 นิ้ว (อาจใช้บิวเร็ตขนาด 50 มล. แทนก็ได้)
- ใยแก้ว (glasss wool)

- บีกเกอร์	ขนาด	250 มล.	4 ใบ
- กระบอกตวง	ขนาด	10 และ 100 มล.	2 อัน
- ขวดวัดปริมาตร	ขนาด	100 มล.	3 ใบ
- เครื่องมือโพลาโรกราฟี			1ชุด
- ขวดรูปกรวย	ขนาด	125 มล.	3 ใบ

สารละลายและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

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

<u>วิธีทดลอง</u>

1.ใช้ใยแก้วอุดที่ปลายคอลัมน์ ใส่ปิโตรเลียมอีเทอร์ไว้ให้สูงประมาณ 8 นิ้ว

2. นำอะลูมิเนียมออกไซด์กวนให้แขวนลอยในปิโตรเลียมอีเทอร์แล้วค่อยๆ เทลงในคอลัมน์อย่างช้าๆ บรรจุอะลูมิเนียมออกไซด์ในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 4-5 นิ้ว ปิดส่วนบนของคอลัมน์ด้วยใยแก้วเช่นกัน ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษไม่ให้ปิโตรเลียมอีเทอร์ในคอลัมน์แห้ง ระดับของปิโตรเลียมอีเทอร์ต้องอยู่สูงกว่าอะลูมิเนียมออกไซด์เล็กน้อยตลอดเวลาที่ทำการทดลอง (ป้องกันไม่เกิดฟองอากาศ)

3. ปิเปตสารละลายอะโซเบนซีนในปิโตรเลียมอีเทอร์มา 5 มล. ใส่ลงในคอลัมน์ ปล่อยให้ตัวทำละลายในคอลัมน์มีอัตราไหลผ่านคอลัมน์อย่างช้าๆ ประมาณ 10 หยดต่อนาที จนเกือบถึงใยแก้ว (ต้องระวังไม่ให้แห้ง)

4. ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ผ่านลงไปในคอลัมน์เรื่อยๆ จะปรากฏอะโซเบนซีนแยกเป็น 2 แถบอย่างรวดเร็ว วัดระยะของ trans-azobenzene ที่เคลื่อนที่ไปเมื่อผ่านปริมาตรของปิโตรเลียมอีเทอร์ไปจำนวน 20 มล. (ให้วัดระยะทางเป็นมล. ของ trans-azobenzene ที่เคลื่อนที่ได้ ถ้าใช้บิวเร็ตเป็นคอลัมน์ให้อ่านเป็นปริมาตรจากบิวเร็ตได้ทันที) คำนวณหาค่า R_f ของ trans-azobenzene

5. ถ้าต้องการให้ trans-azobenzene เคลื่อนที่ได้เร็วให้เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 20% เอธิลอีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์ บันทึกการเคลื่อนที่ของ trans-azobenzeze ในตัวทำละลายนี้แล้วเปรียบเทียบกับตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์

6.ให้อีลูท trans-azobenzene ออกจากคอลัมน์ให้หมดด้วยเอธิลอีเทอร์ในปิโตรเลียมอีเทอร์และเก็บสารละลายที่ถูกอีลูทได้นี้ทั้งหมดในขวดรูปกรวย

7. ทำการอีลูท cis-form โดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์มากขึ้น คือ 5% เมทานอลในปิโตรเลียมอีเทอร์ เก็บสารละลายที่เป็น cis-form ทั้งหมดในขวดรูปกรวย

8. ทำการระเหยตัวทำละลายที่เก็บได้ในข้อ 6 และ 7 โดยใช้การกลั่นแบบลดความดัน

9. ใช้แอลกอฮอล์จำนวนน้อยๆ ละลายสารที่เหลือจากการระเหย ถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล. แล้วเจือจางด้วย 0.2 M NaOH กับน้ำกลั่น จนพอดีขีด และให้มีความเข้มข้นของ NaOH ประมาณ 0.1 M

10. นำสารละลายแต่ละส่วนมาทำโพลาโรแกรมทันทีที่เตรียมเสร็จ สมมติว่าทั้ง cis และ trans-isomer มีค่า diffusion coefficient เท่ากัน จงคำนวณหาค่าคงที่ของสมดุลระหว่าง cis และ trans-isomer

การทดลองที่ 12.2 การแยกองค์ประกอบของน้ำหมึกสีดำโดยวิธี paper chromatography

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

paper chromatography เป็นเทคนิคและวิธีการหนึ่งของ liquid-liquid chromatography โดยอาศัยหลักการแบ่งส่วนซึ่งเรียกว่า partition chromatography ที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Martin และ synge โดยกระดาษกรอง (Filter paper) จะทำหน้าที่เป็นตัวซัพพอท ส่วนน้ำในกระดาษทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เรียกว่าสารละลายดีเวลลอป (developing solution) สารละลายดีเวลลอปจะเคลื่อนที่ผ่านกระดาษพร้อมกับพาตัวถูกละลายที่จุด (spot) ไว้บนกระดาษเคลื่อนที่ไปด้วย ถ้ามีตัวถูกละลายหลายตัว จะเคลื่อนที่ได้ด้วยความเร็วต่างกัน ตามค่า R_f value ของตัวถูกละลาย เพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลายดีเวลลอป จะต้องจุ่มกระดาษในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด เมื่อให้เวลาในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายและตัวถูกละลายเพียงพอแล้ว ให้ทำเครื่องหมายที่ตัวทำละลายดีเวลลอปเคลื่อนที่มาถึงระยะสุดท้าย ต่อจากนั้นระเหยตัวทำละลายดีเวลลอปออกจากกระดาษจนแห้ง ตัวถูกละลายจะไม่ระเหยออกไปด้วย แต่ยังคงอยู่บนกระดาษซึ่งอาจสังเกตไม่เห็น ต้องใช้รีเอเจนต์อีกตัวหนึ่งฉีดพ่นบนกระดาษ รีเอเจนต์นี้จะทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายแล้วปรากฏเป็นสีขึ้น ทำให้เห็นตำแหน่งของตัวถูกละลายที่เคลื่อนที่ไป เมื่อวัดระยะทางที่ตัวทำละลายดีเวลลอปเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่บนกระดาษก็สามารถคำนวณหาค่า R_f ได้

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

ค่า R_f สามารถช่วยบอกได้ว่าสารนั้นคือสารใดได้เพราะสารแต่ละตัวมีค่า R_f ไม่เท่ากัน สำหรับวิธีของ paper chromatography สามารถใช้แยกสารผสมของกรดอะมิโน น้ำตาล โปรตีน และสารอนินทรีย์ต่างๆ ฯลฯ ได้เป็นอย่างดี

จุดประสงค์ของการทดลอง

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

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

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

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำหมึกสีดำ
- เมทานอล
- เอทานอล
- 0.1 M HCl
- NH_3 เข้มข้น

วิธีทดลอง

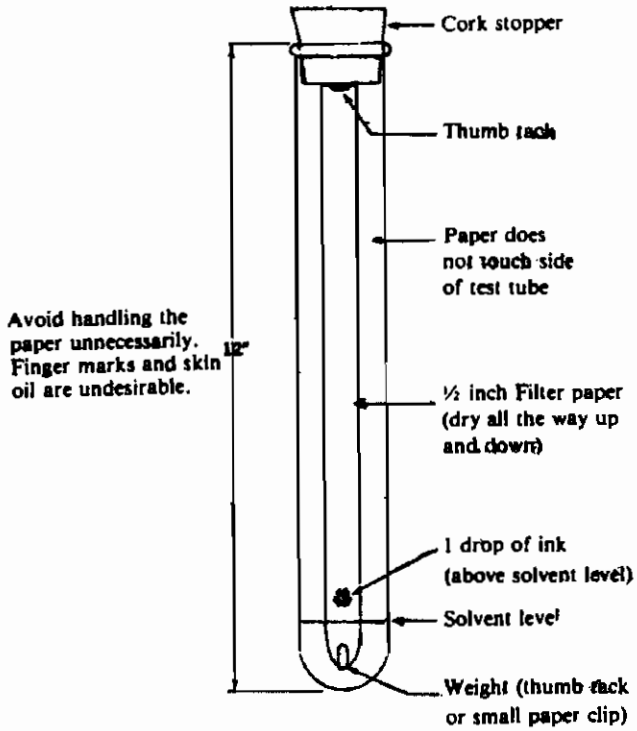
1. หยดน้ำหมึกสีดำลงบนกระดาษกรองให้เหนือปลายสุดของกระดาษมาครึ่งนิ้วโดยทำเครื่องหมายไว้ด้วย

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

3. ให้ถ่วงน้ำหนักกระดาษกรองด้วยคลิปติดกระดาษ เพื่อให้กระดาษกรองเรียบและตรง

4. ยึดกระดาษกรองให้ติดกับจุกคอร์กด้วยเข็มหมุดติดกระดาษ

5. ใส่กระดาษกรองลงในหลอดทดลองให้ระดับของตัวทำละลายดีเวลลอปอยู่ต่ำกว่าจุดของหมึกสีดำ ดังรูปที่ 12.2



รูปที่ 12.2 รูปแสดงการทำ paper chromatography

6. ปล่อยให้ขบวนการโครมาโทกราฟีดำเนินไปเรื่อยๆ จนกระทั่งตัวทำละลายดีเวลลอปเคลื่อนที่เกือบถึงจุกคอร์ก เหลืออีกประมาณ 1 นิ้ว หยุดการทดลอง

7. นำกระดาษกรองออกจากหลอดทดลองปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งจะปรากฏสีจุดต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของหมึกสีดำ เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ทำได้จากการใช้ตัวทำละลายดีเวลลอปแต่ละชนิด

8. หาค่า R_f ของสารแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของน้ำหมึก

การทดลองที่ 12.3 การแยกสารประกอบไฮโดรคาร์บอนด้วยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ก๊าซโครมาโทกราฟี เป็นวิธีการแยกสารผสมที่สามารถระเหยกลายเป็นไอผ่านไปในคอลัมน์ที่มีเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งเรียกว่า Gas solid chromatography (GSC) ถ้าเป็นของเหลวเรียกว่า Gas liquid chromatography (GLC) การทดลองนิยมใช้วิธีการของ GLC มากกว่า ส่วนประกอบของเครื่องมือในการทำการทดลองโดยวิธีก๊าซ-โครมาโทกราฟีแสดงไว้ในรูปที่ 12.3 ก๊าซที่เป็นเฟสเคลื่อนที่หรือตัวพา (carrier) จะถูกปล่อยออกจากถังที่ควบคุมความดันได้ด้วยมาตรวัดความดัน (gauge) สารตัวอย่างในตอนเริ่มต้นเป็นของเหลวจะถูกฉีดเข้าไปในเครื่อง GC แล้วทำให้กลายเป็นไอ จากนั้นจะถูกแยกโดยก๊าซตัวพาผ่านมาเข้าดีเทคเตอร์ซึ่งจะส่งสัญญาณเป็นกระแสไฟฟ้าให้มิเตอร์อ่านค่าได้ ถ้าปริมาณสารที่ออกมาเข้าดีเทคเตอร์น้อยมิเตอร์จะอ่านค่าได้น้อย ถ้ามากจะอ่านค่าได้มาก นอกจากนี้อาจต่อเข้ากับเครื่องบันทึก (recorder) ก็ได้ เครื่องบันทึกจะบันทึกภาพออกมาเป็น peak ซึ่งเป็นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่างพื้นที่พีกและดีเทคเตอร์ response กับเวลา กราฟที่ได้นี้เรียกว่าโครมาโทแกรม (Chromatogram) ดังแสดงในรูปที่ 12.4 ความสูงของ peak ที่ได้จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสาร

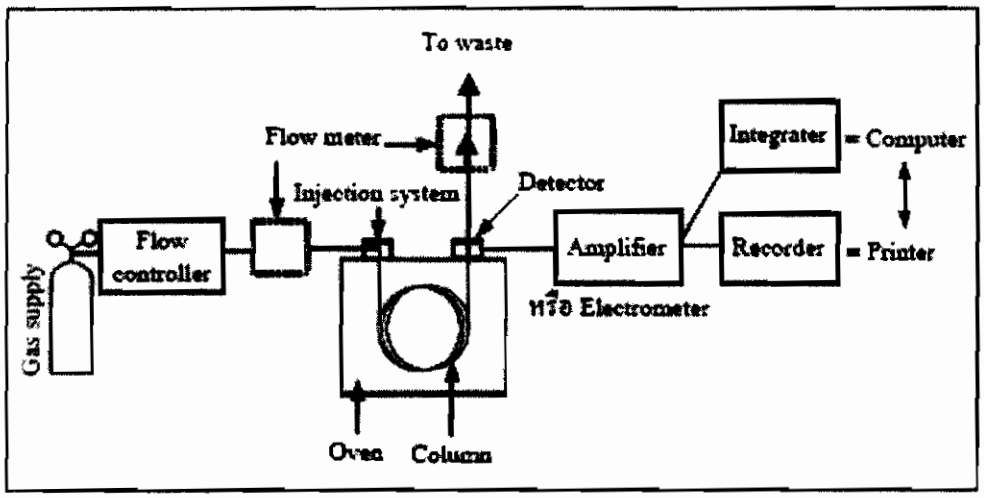
การแยกสารจะทำได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) และ Resolution ประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถอธิบายได้ในเทอมของ Height equivalent to a theoretical plate (HETP) ซึ่งคำนวณได้จากค่าความยาวของคอลัมน์ (L) หารด้วยจำนวนของ theoretical plate (N)

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

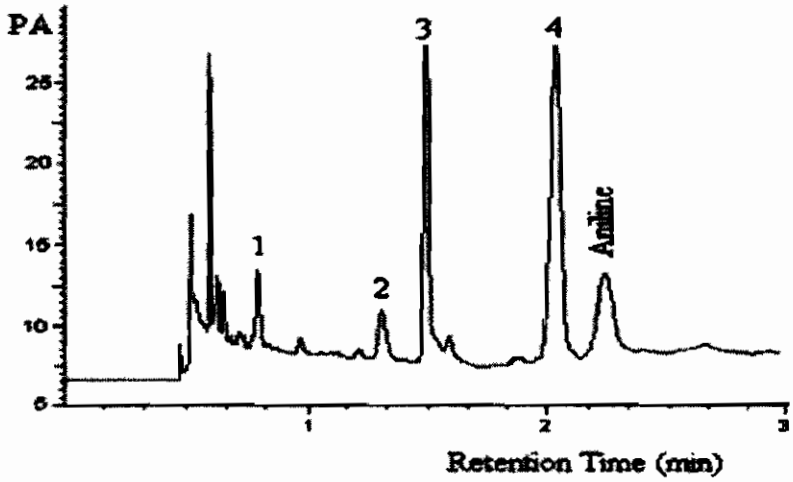
ซึ่ง $$N = 16\left(\frac{t}{W}\right)^2$$

t = retention time คือเวลาการเคลื่อนที่ของสารจาก injection port ผ่านคอลัมน์มาถึง detector

W = ความกว้างของฐาน (peak)



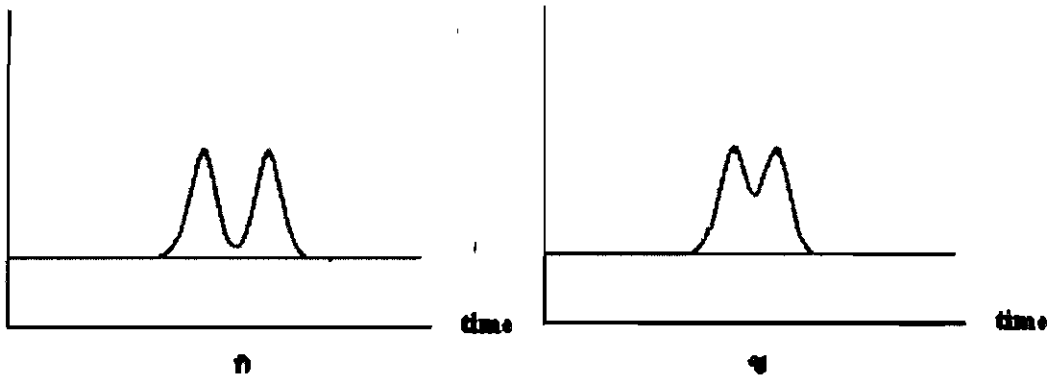
รูปที่ 12.3 ส่วนประกอบของเครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟี



Peaks: (1) hexane; (2) ethanol; (3) toluene; (4) methyl ethyl ketone.

รูปที่ 12.4 โครมาโทแกรม

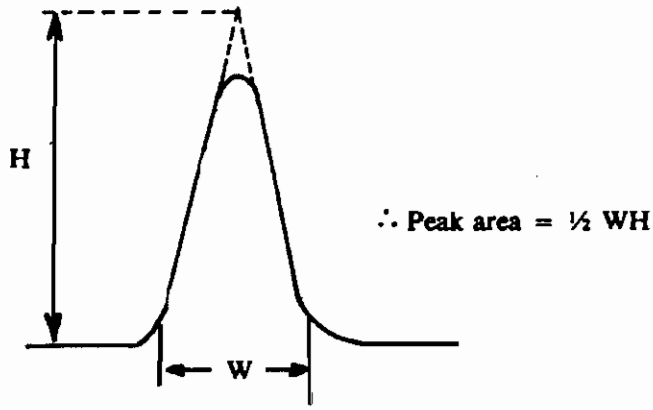
คอลัมน์ที่ดีนั้นค่า N ต้องมีค่าสูงมากซึ่งจะทำให้ peak ที่ได้แคบที่สุดเมื่อใช้เวลา Retention time นานที่สุด เนื่องจาก N ควรมีค่ามาก จึงสรุปได้ว่าคอลัมน์ที่ดีควรมีค่า HETP น้อยที่สุดถ้ามีสารผสมที่ต้องการแยกออกจากกัน การแยกนอกจากขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของคอลัมน์แล้วยังขึ้นอยู่กับสภาวะของการทำการทดลอง (operating condition) เช่น อุณหภูมิ และความเร็วของก๊าซตัวพา (carrier gas) การทดลองที่ให้ resolution ที่ดีจะทำให้ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 12.5 (ก) การทดลองที่ให้ resolution ไม่ดีจะทำให้ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 12.5 (ข)



รูปที่ 12.5 แสดง resolution ของโครมาโทแกรม

วิธีการของก๊าซโครมาโทกราฟี สามารถใช้วิเคราะห์ทางคุณภาพ (Qualitative) และทางการหาปริมาณ (Quatitative) การวิเคราะห์ทางคุณภาพสามารถทำได้โดยทำโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทราบว่าสารนั้นๆ คือสารใด จากนั้นนำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ว่าคือสารอะไรทำโครมาโทแกรมโดยใช้สภาวะของการทดลองแบบเดียวกันทุกอย่าง (identical condition) โดยการวัด retention time ของสารตัวอย่างแล้วเทียบกับสารมาตรฐาน ก็สามารถบอกได้ว่าสารนั้นคือสารใด เพราะสารชนิดเดียวกันเมื่อทำโครมาโทแกรมแล้วจะให้ค่า retention time ที่เท่ากัน วิธีการนี้ต้องใช้กับสารตัวอย่างที่พอจะทราบมาบ้างแล้วว่าเป็นสารพวกใด จึงจะทำให้ทำโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานได้ถูกต้อง เช่น ทราบมาว่าสารตัวอย่างเป็นพวกแอลกอฮอล์แต่ไม่ทราบว่ามีคาร์บอนกี่ตัว เราก็เลือกทำโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนต่างๆ กัน เมื่อเทียบค่า Retention timeของสารมาตรฐานก็สามารถบอกได้ว่าสารตัวอย่างเป็นแอลกอฮอล์ชนิดใด เป็นต้น ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสามารถทำได้โดยการทำโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่

ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จากการวัด peak height หรือ peak area ของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานจะทำให้หาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ ในการทดลองที่สามารถควบคุมสภาวะของการทดลองได้คงที่ในการทำโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกับสารตัวอย่างและประสิทธิภาพของคอลัมน์ให้ resolution ที่ดีมาก เราสามารถใช้ peak height สำหรับการเทียบหาปริมาณของสารตัวอย่างได้ แต่ในการทดลองทั่วไปการควบคุมสภาวะของการทดลองให้เหมือนกันทุกอย่างทำได้ยาก ดังนั้นการหาปริมาณควรหาจาก peak area พื้นที่ของ peak จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นเช่นเดียวกับ peak height การหา peak area สามารถคำนวณได้แบบเดียวกับการคำนวณพื้นที่สามเหลี่ยม



จุดประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการใช้เครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟี สำหรับการทดลองเรื่อง gas-liquid chromatography (GLC)

2. วิเคราะห์ว่าสารตัวอย่างที่ได้รับคือสารใด

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟี 1 ชุด

2. เข็มฉีดสารตัวอย่างขนาดไมโครลิตร

สารที่ใช้ในการทดลอง

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

วิธีการทดลอง

1. เปิดเครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟีทิ้งไว้ก่อนอย่างน้อย 30 นาที

2. ผ่านก๊าซตัวพาไนโตรเจนไปในคอลัมน์ก่อนฉีดสารตัวอย่าง

3.ใช้เข็มฉีดดูดสาร toluene มา 5 μl

4. ฉีดสาร toluene ลงในคอลัมน์ การฉีดต้องจับเข็มให้แน่นด้วยมือทั้งสองข้าง ใช้มือซ้ายจับที่ก้านเข็ม และมือขวากดที่ฉีดให้สารตัวอย่างเข้าไปในคอลัมน์ ต้องระวังก้านฉีดกระเด็นหลุด เพราะความดันภายในคอลัมน์สูง และระวังปลายเข็มชนกับขอบโลหะของคอลัมน์ทำให้เข็มคดงอได้

5. ทำเครื่องหมายลงบนกราฟในตำแหน่งที่ฉีดสารลงในคอลัมน์ พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม

6. ทำโครมาโทแกรมของ p-Xylene และ methyl acetate ด้วยวิธีเดียวกันกับ toluene ในข้อ 3-5

7. นำสารตัวอย่างที่อาจารย์ผู้ควบคุมแจกให้ทำการหาโครมาโทแกรมเช่นเดียวกันกับข้อ 3-5

8. เมื่อทำการทดลองเสร็จสิ้นแล้วต้องรอให้อุณหภูมิของคอลัมน์ injection port และ detector ลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องเสียก่อน จากนั้นจึงปิดเครื่อง

9.ให้ใช้อะซิโตนทำความสะอาดเข็มฉีดสารตัวอย่าง โดยดูดเอาอะซิโตนเข้าออกจากเข็มฉีดสารตัวอย่าง 2-3 ครั้ง แล้วเอาก้านออก ทิ้งไว้ให้แห้ง

10. จากโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างวัดค่า retention time เทียบกับของ toluene , p-Xylene และ methyl acetate เพื่อหาว่าสารตัวอย่างที่ได้รับคือสารชนิดใด

การทดลองที่ 12.4 การหาปริมาณเอธิลแอลกอฮอล์ในสุราโดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

เช่นเดียวกับการทดลองที่ 12.3

จุดประสงค์ของการทดลอง

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

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

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

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

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

<u>วิธีทดลอง</u>

1. เปิดเครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟีเพื่ออุ่นไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง

2. ตั้งเงื่อนไขเครื่องมือดังนี้ (ตั้งเมื่อพร้อมที่จะฉีดสาร)

ก๊าซตัวพา : flowrate = 0.5

ก๊าซเชื้อเพลิง : H_2 , flowrate = 4.0

: Air , flowrate = 4.0

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 68°C

อุณหภูมิของ injector : 130°C

อุณหภูมิของ detector : 150°C

3. เตรียมสารละลายของเอธิลแอลกอฮอล์ในน้ำให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันโดยปิเปตเอธิลแอลกอฮอล์มา 0 , 1.0 , 3.0 , 5.0 , 7.0 , 9.0 และ 10.0 มล. ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ตามลำดับ แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีด

4. ฉีดสารต่อไปนี้จำนวน 1.0 μl เข้าไปในเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี ตามลำดับโดยต้องกดปุ่ม " reverse" ของเครื่อง recorder ไปพร้อมๆ กับการฉีดสารตัวอย่าง

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

ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์จากพีกของสารแต่ละตัว และสังเกตลักษณะพีกของแต่ละสาร

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

6. ฉีดสารตัวอย่างสุรา 1.0 μl แล้วบันทึกโครมาโทแกรม พิจารณาเทียบรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างกับรีเทนชันไทม์ของสารทั้ง 5 ชนิด สรุปให้ได้ว่าแอลกอฮอล์ในสารตัวอย่างสุราคือแอลกอฮอล์ชนิดใด

7. ฉีดสารละลายของเอธิลแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันจากการเตรียมในข้อ 3 แล้วบันทึกโครมาโทแกรม

8. นำสุรายี่ห้อต่างๆ ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี แล้วบันทึกโครมาโทแกรม

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการทดลองข้อ 7 ให้นำมาวัดความสูงของพีกแล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซนต์ของเอธิลแอลกอฮอล์เทียบกับความสูงของพีก

2. จากความสูงของพีกสุราชนิดต่างๆ ให้หาเปอร์เซนต์ของเอธิลแอลกอฮอล์ในสุราจากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้

3. จากโครมาโทแกรมของสารผสมทั้ง 5 ชนิด ที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 5 ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์และความกว้างของพีก เพื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพของคอลัมน์ซึ่งอธิบายได้ในเทอมของ HETP (H)

$$H = L/N$$

$$N = (4\, t_R / W)^2$$

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

4. จากโครมาโทแกรมของสารผสมทั้ง 5 ชนิด ที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 5 ให้วัดค่ารีเทนชันไทม์และความกว้างของพีก เพื่อนำมาคำนวณหากำลังแยก (resolution) ของคอลัมน์โดยเทียบกับพีกที่ 1 จากสูตร

$$R = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W1 + W2)$$

<u>คำถาม</u>

1. ท่านคิดว่าการวิเคราะห์วิธีก๊าซโครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาความแรง (degree) ของสุราได้ดีหรือไม่ จงอธิบาย

2.เหตุใดจึงต้องใช้คอลัมน์ 10% carbowax ในการทดลองนี้ จะใช้คอลัมน์ชนิดอื่นได้หรือไม่

3. ค่า t_R ใช้บอกเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกจากกันได้ดีเพียงใด

4. อุณหภูมิที่ใช้ในการทำก๊าซโครมาโทกราฟีควรมีค่าสูงขนาดใด