บทที่ 1

บทนำ ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

Introduction to

Chromatographic theory

บทที่ 1

บทนำ ทฤษฎีโครมาโทกราฟี

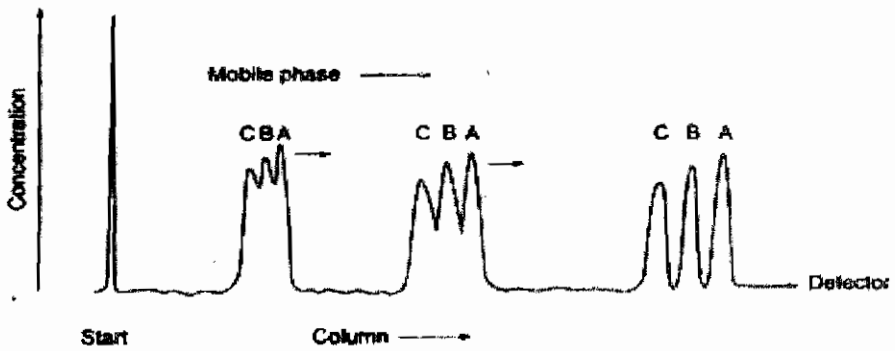
Introduction to Chromatographic theory

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการแยกสาร เมื่อโมเลกุลของตัวถูกละลายในสารตัวอย่างผสมผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะถูกพาออกจากคอลัมน์ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่จะเกิดการกระจายตัว (distribute) ระหว่างเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ไปพร้อมๆ กัน อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่ต่อความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ เป็นค่าคงที่ที่เรียกว่า อัตราส่วนของการกระจาย (distribution ratio,K)

$$A_M \longleftrightarrow A_S$$

$$K_A = \frac{[A]_S}{[A]_M}$$

ถ้ามีตัวถูกละลายหลายชนิดที่มีค่า K ต่างกัน จะมีผลทำให้เกิดการแยกขึ้น ตัวถูกละลายที่มีค่า K มาก หมายถึง มีความเข้มข้นในเฟสอยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ จึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่าตัวถูกละลายที่มีค่า K น้อยกว่า ตัวอย่างเช่น เมื่อใส่สารผสมของสารสามชนิด คือ A, B และ C ลงในคอลัมน์โครมาโทกราฟี กระบวนการแยกเริ่มเกิดขึ้นเนื่องจากมีการกระจายของสาร A, B และ C ระหว่างเฟสทั้งสองไม่เท่ากัน การแยกจะเริ่มเกิดขึ้นได้อย่างชัดเจนเมื่อเวลาที่ใช้ในการเดินทางของสารในคอลัมน์มากขึ้น ดังรูปที่ 1.1 ซึ่งแสดงได้ว่า $K_A < K_B < K_C$



รูปที่ 1.1 การแยกสารผสม 3 ชนิด A, B, และ C

เมื่อ $K_A < K_B < K_C$

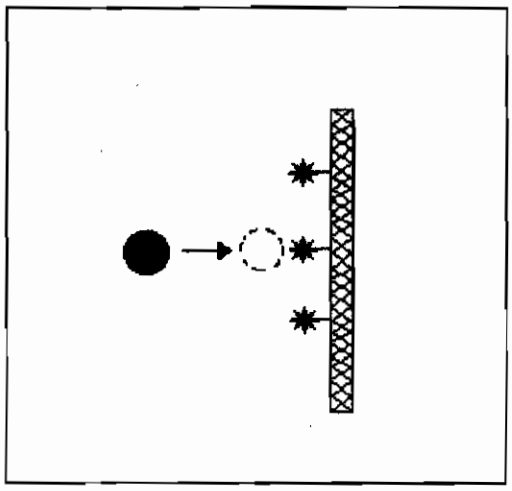
1. กลไกการแยก (Separation Mechanism)

การกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองขึ้นอยู่กับอันตรกิริยา (interaction) ที่เกิดขึ้นระหว่าง ตัวถูกละลายกับเฟสอยู่กับที่ซึ่งทำให้เกิดการแยกขึ้น กลไกการแยก (Separation Mechanism) สามารถแบ่งตามชนิดของอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นได้ดังนี้

- การดูดซับ (Adsorption)
- การแบ่งส่วน (Partition)
- การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange)
- การร่อนขนาด (Size exclusion)
- การเกิดสัมพรรคภาพ (Affinity)

1.1 การดูดซับ (Adsorption)

ตัวดูดซับทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ โมเลกุลของตัวอย่างจะถูกดูดซับที่ผิวของเฟสอยู่กับที่ ดังรูปที่1.2 และในขณะเดียวกันเฟสเคลื่อนที่ก็จะแข่งขันในการดึงโมเลกุลของตัวอย่างมาละลายในเฟสเคลื่อนที่ ตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะถูกดูดซับด้วยตัวดูดซับได้แตกต่างกันจึงทำให้เกิดการแยกขึ้น และถ้าตัวดูดซับมีพื้นที่ผิวมากก็มีความสามารถดูดซับได้ดี

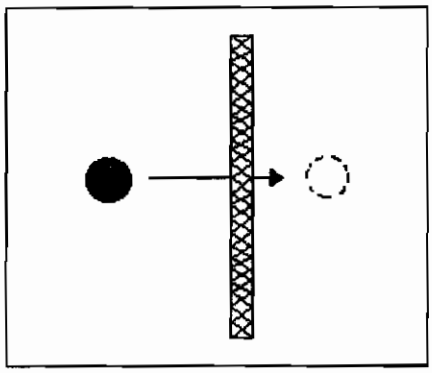


รูปที่ 1.2 การดูดซับ (Adsorption)

1.2 การแบ่งส่วน (Partition)

เป็นการแบ่งส่วนจำนวนโมเลกุลของตัวอย่างระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ที่เป็นของเหลวเช่นเดียวกันกับเฟสเคลื่อนที่ แต่มีคุณสมบัติที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน (immissible) ของเหลวในเฟสอยู่กับที่จะมีลักษณะเป็นฟิล์มบางๆ ฉาบบนของแข็งช่วยยึดจับ (solid support) ซึ่งเป็นอนุภาคของแข็งที่มีรูพรุนหรือไม่มีก็ได้ ดังรูปที่ 1.3

ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวที่มีขั้ว (polar) เฟสเคลื่อนที่ต้องเลือกไม่มีขั้ว จะมีผลทำให้ตัวถูกละลายที่มีขั้วถูกยึดไว้ในเฟสอยู่กับที่ได้แน่นและนาน ทำให้ตัวถูกละลายมีค่า t_R นานกว่าตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้ว เทคนิคนี้เรียกว่า **Normal phase chromatography** ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวที่ไม่มีขั้ว (non polar) เฟสเคลื่อนที่ต้องเลือกตัวทำละลายที่มีขั้ว ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะถูกยึดไว้ในเฟสอยู่กับที่ได้แน่นและนาน ทำให้มีค่า t_R นานกว่าตัวถูกละลายที่มีขั้ว เรียกเทคนิคนี้ว่า **Reverse phase chromatography**

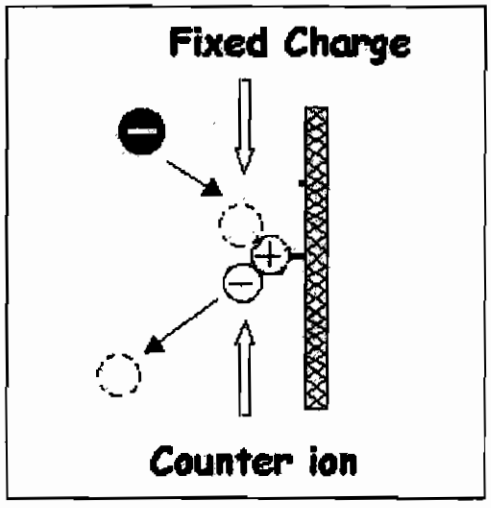


รูปที่ 1.3 การแบ่งส่วน (Partition)

1.3 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange)

เฟสอยู่กับที่เป็นอนุภาคที่มีประจุที่ผิว สามารถดึงดูดไอออนที่มีประจุตรงข้ามไว้ได้ เรียกไอออนนี้ว่า counter ion ซึ่งสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนกับไอออนอื่นที่มีความสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุได้สูงกว่า ดังรูปที่ 1.4

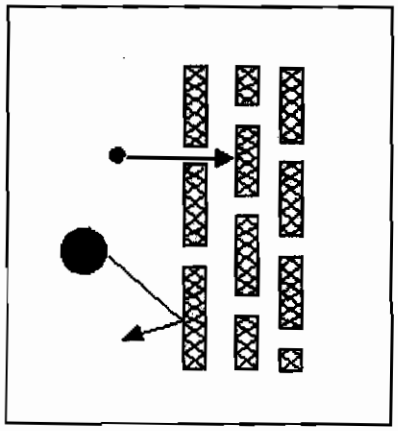
เฟสอยู่กับที่เป็นพวกพอลิเมอร์เรซินที่มีรูพรุนและมี ionic group ต่อด้วย chemical bond ที่ aromatic nucleus ของพอลิเมอร์ (กล่าวรายละเอียดไว้ในบทที่ 4)



รูปที่ 1.4 การแลกเปลี่ยน (Ion exchange)

1.4 การร่อนขนาด (Size exclusion)

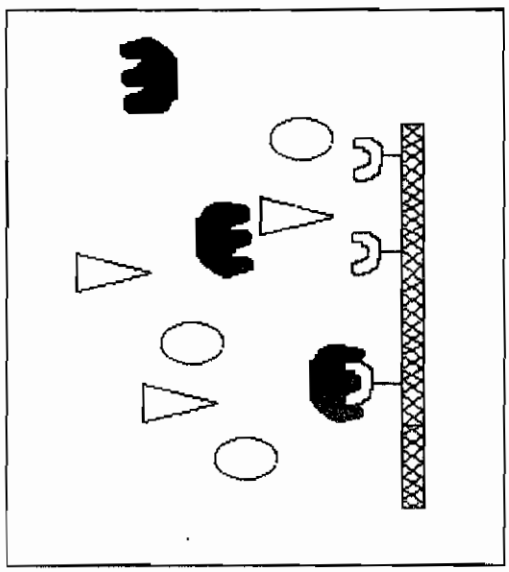
เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเนื่องจากตัวถูกละลายมีขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน ถูกร่อนขนาดด้วยรูพรุนของเฟสอยู่กับที่ที่มีลักษณะเป็นเจล โมเลกุลขนาดเล็กสามารถลอดผ่านรูพรุนของเจลได้ จะออกจากคอลัมน์หลังโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่ผ่านเข้ารูพรุน เทคนิคนี้จึงทำให้เกิดการแยกตัวถูกละลายตามขนาดของโมเลกุลดังรูปที่ 1.5 โมเลกุลขนาดใหญ่จะมีค่า t_R น้อยกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก



รูปที่ 1.5 การร่อนขนาด (Size exclusion)

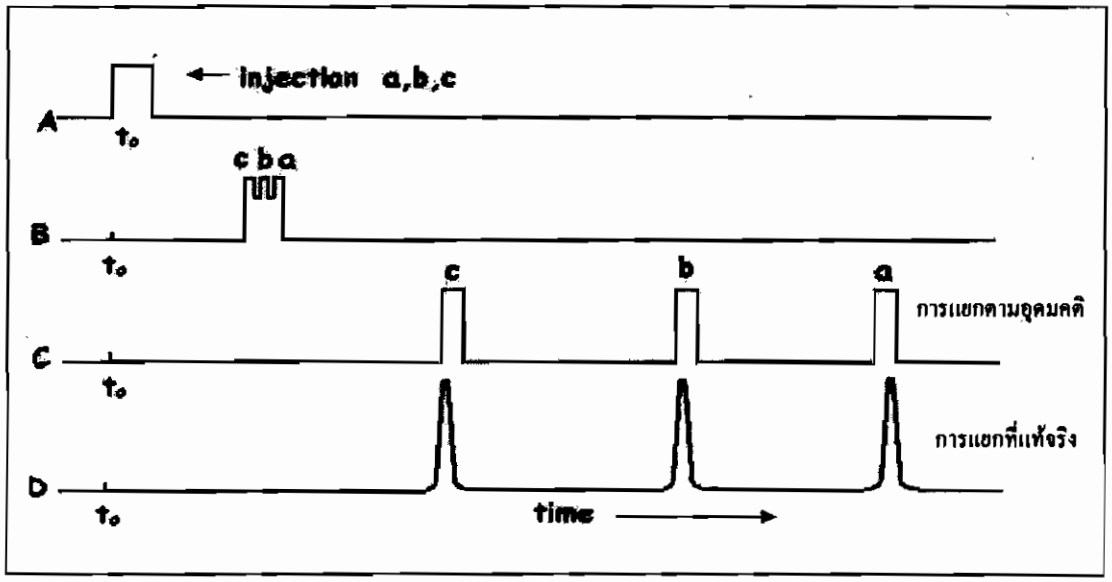
1.5 การสัมพรรคภาค (Affinity)

เป็นกลไกของการ Lock and Key คือ จับแล้วปล่อย ดังรูปที่ 1.6 หลักการของการทำ affinity chromatography คือการทำให้ enzyme หรือ antigen เกิด bonded phase กับ support particle แล้วผ่านสารตัวอย่างที่เป็น antibody ลงในคอลัมน์จะเกิดกระบวนการล็อค (lock) จากนั้นทำการปรับเปลี่ยน pH หรือ ionic strength ของเฟสเคลื่อนที่เพื่อทำให้ antigen กับ antibody เกิดปฏิกิริยาผันกลับคือการปล่อย (key) และถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้ ในขณะที่ antigen ยังคงมี chemically bonded phase อยู่กับ support particle และสามารถใช้งานต่อได้อีก



รูปที่ 1.6 การสัมพรรคภาค (Affinity)

ในการแยกสารตามอุดมคติ ตัวถูกละลายแต่ละชนิดควรเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เป็นแบนด์ (band) ที่แคบตามขนาดตัวอย่างที่ใส่ลงในคอลัมน์ดังรูปที่ 1.7 (A,B และ C) แต่ในความเป็นจริงยังมีกลไกของการแพร่กระจาย (dispersion) เกิดขึ้นในคอลัมน์อีก มีผลทำให้แบนด์ที่ได้กว้างขึ้นที่ฐาน (band broadening) ตามรูปที่ 1.7 (D) ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า พีก หรือโครมาโทแกรม (chromatogram)



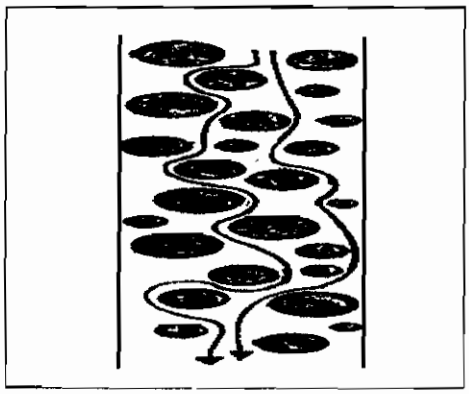
รูปที่ 1.7 เปรียบเทียบการแยกในอุดมคติกับการแยกที่เกิดขึ้นจริง

2. กลไกการแพร่กระจาย (Dispersion Mechanism)

การแพร่กระจาย เป็นกลไกที่ทำให้เกิด band broadening ในโครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วย

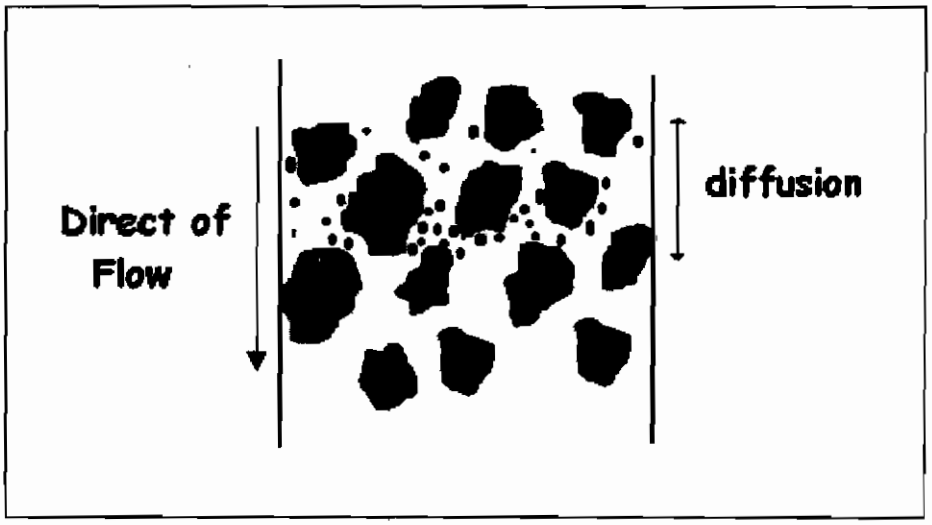
2.1 Eddy diffusion หรือ multiple path effect เป็นผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของตัวอย่างเดินทางผ่านอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ ที่ได้ระยะทางที่แตกต่างกัน เนื่องจากขนาดของอนุภาคไม่เท่ากัน

เมื่อการเดินทางของโมเลกุลแต่ละตัวใช้เวลาที่แตกต่างกันดังรูปที่ 1.8 จึงมีผลทำให้พีกของโครมาโทแกรมเกิดเป็นแบนด์กว้าง การแก้การกระจายแบบ Eddy ทำได้โดยใช้ขนาดของเฟสอยู่กับที่ให้สม่ำเสมอและบรรจุให้แน่น



รูปที่ 1.8 ผลของการเกิด Eddy Diffusion ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างเดินทางได้ระยะทางไม่เท่ากัน

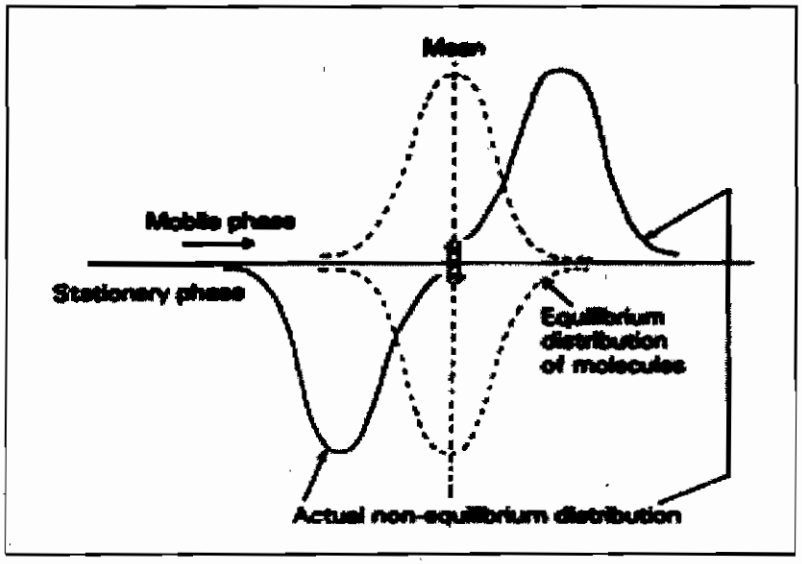
2.2 Longitudinal diffusion เป็นการกระจายของตัวถูกละลายจากความเข้มข้นสูงสู่ความเข้มข้นต่ำ เมื่อใส่ตัวอย่างลงส่วนบนของคอลัมน์แล้วมีเฟสเคลื่อนที่พาตัวถูกละลายเคลื่อนที่ ในขณะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่นั้นจะพบว่าเกิดการแพร่กระจายจากความเข้มข้นสูงสู่ความเข้มข้นต่ำด้วย ดังรูปที่ 1.9 ทำให้เกิดแถบของตัวถูกละลายในคอลัมน์กว้าง มีผลทำให้ได้แบนด์ที่มีฐานกว้าง (band broadening)



รูปที่ 1.9 การเกิด Longitudinal Diffusion

การแพร่กระจายขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในคอลัมน์ ถ้ามีเวลานานจะเกิดการแพร่กระจายได้มาก ตัวถูกละลายจะอยู่ในคอลัมน์นานเมื่อเฟสเคลื่อนที่ไหลช้านั่นเอง สรุปได้ว่า Longitudinal diffusion จะมีค่ามากเมื่อเฟสเคลื่อนที่ไหลช้า

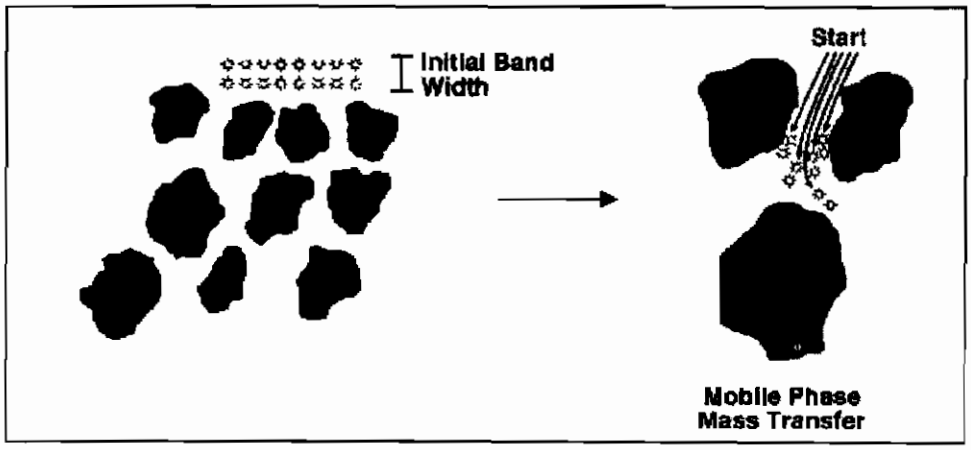
2.3 Mass transfer effect เป็นผลที่เกิดจากการเดินทางของโมเลกุลตัวอย่างผ่านเฟสอยู่กับที่โดยการพาของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งในกระบวนการนี้จะเกิดสมดุลการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองขึ้น มีผลทำให้เกิดการแยกในโครมาโทกราฟี การกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ในแต่ละเพลตทางทฤษฎียังไม่ถึงสมดุลก็ต้องถูกถ่ายเทไปยังเพลตต่อๆ ไป ผลที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า non equilibrium mass transfer effect ซึ่งมีผลทำให้เกิดแบนด์กว้าง (band broadening) ดังรูปที่ 1.10 แสดงให้เห็นว่าการกระจายของตัวถูกละลายที่ไม่ถึงสมดุลจะทำให้มีช่วงของตัวถูกละลายในคอลัมน์ระหว่างเฟสทั้งสองกว้างกว่าเมื่อการกระจายถึงสมดุล



รูปที่ 1.10 ผลของการเกิด non equilibrium mass transfer effect

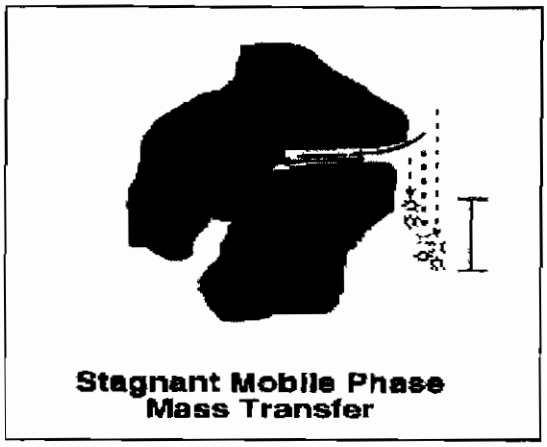
นอกจากนี้บางโมเลกุลของตัวถูกละลายยังถูกยับยั้งให้เคลื่อนที่ได้ช้าด้วยเฟสอยู่กับที่ ทำให้ตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ไม่พร้อมกัน เรียกผลนี้ว่า resistance to mass transfer effect ซึ่งเกิดขึ้นได้ 3 แบบ คือ

2.3.1 Mobile phase mass transfer เกิดเนื่องจากอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านรอบๆอนุภาคของเฟสอยู่กับที่ได้แตกต่างกัน ของเหลวที่อยู่ใกล้อนุภาคของเฟสอยู่กับที่จะไหลได้ช้ากว่าที่อยู่ไกลกว่า ดังนั้นการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายจึงต่างกัน ดังรูปที่ 1.11



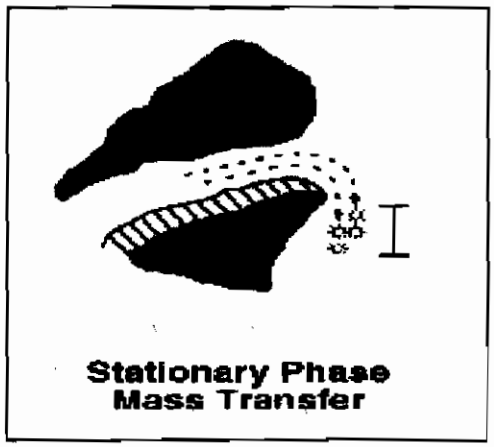
รูปที่ 1.11 Mobile phase mass transfer

2.3.2 Stagnant mobile phase mass transfer ถ้าเฟสอยู่กับที่เป็นอนุภาคที่มีรูพรุน เฟสเคลื่อนที่เมื่อเข้าไปอยู่ในรูพรุนจะไม่เคลื่อนที่ โมเลกุลของตัวถูกละลายจะเคลื่อนที่เข้าสู่รูพรุนด้วยการแพร่ โมเลกุลที่แพร่เข้าไปในรูพรุนได้ลึกก็จะออกจากคอลัมน์ได้ช้า ทำให้โมเลกุลของตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ได้ไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดแบนด์กว้างขึ้นในโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 1.12



รูปที่ 1.12 Stagnant Mobile phase mass transfer

2.3.3 Stationary phase mass transfer เมื่อโมเลกุลของตัวถูกละลายแพร่เข้าไปในรูพรุนแล้วซึม (penetrate) เข้าไปในเฟสอยู่กับที่ ถ้าเข้าไปลึกก็จะเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้า การเคลื่อนที่ของโมเลกุลแต่ละตัวจึงใช้เวลาไม่เท่ากันมีผลทำให้เกิดเป็นแบนด์กว้างขึ้นในโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 1.13



รูปที่ 1.13 Stationary phase mass transfer

จากผลของการเกิด mass transfer effect ทั้ง non equilibrium mass transfer effect และ resistance mass transfer effect แสดงให้เห็นได้ว่าทั้งสอง effect จะมีค่าน้อยเมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ได้ช้าซึ่งตรงข้ามกับ Longitudinal diffusion

3. การแบ่งชนิดของวิธีโครมาโทกราฟี (Classification of chromatographic method)

การแบ่งชนิดของวิธีโครมาโทกราฟี สามารถจัดแบ่งได้หลายวิธี ดังนี้

3.1 แบ่งตามคุณสมบัติทางกายภาพ คือ การแบ่งตามลักษณะรูปแบบของวิธีโครมาโทกราฟีที่ทำ

3.1.1 Plane chromatography ได้แก่ PC , TLC

3.1.2 Column chromatography ได้แก่ GC, LC

3.1.3 Electro chromatography ได้แก่ วิธี paper electrophoresis , gel electrophoresis และ capillary electrophoresis

3.2 แบ่งตามเฟสเคลื่อนที่ เฟสเคลื่อนที่มี 3 ชนิด คือ แก๊ส ของเหลว และของไหล จึงทำให้เกิดวิธีโครมาโทกราฟี ชนิดต่างๆ ดังนี้ คือ

3.2.1 การใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส ทำให้เกิดวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่า **Gas chromatography (GC)**

3.2.2 การใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ทำให้เกิดวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่า **Liquid chromatography (HPLC)**

3.2.3 การใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของไหลวิกฤติยิ่งยวด ทำให้เกิดวิธีวิเคราะห์ที่เรียกว่า **Supercritical fluid chromatography (SFC)**

3.3 แบ่งตามกลไกของการแยกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์ (Separation mechanism)

ทำให้เกิดโครมาโทกราฟีชนิดต่างๆ ดังนี้

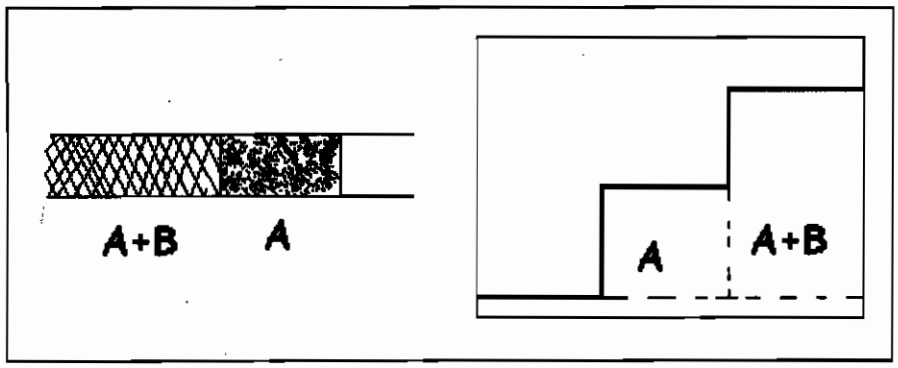
- Adsorption chromatography
- Partition chromatography
- Ion exchange chromatography
- Size exclusion chromatography
- Affinity chromatography

โดยมีกลไกของการแยกเกิดขึ้นดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 1

3.4 แบ่งตามรูปแบบของการพัฒนาการแยก (development)

3.4.1 Frontal Analysis

เทคนิคนี้ใช้สารตัวอย่างปริมาณที่มากกว่าความจุของเฟสอยู่กับที่ เมื่อใส่สารผสมของตัวอย่างลงในคอลัมน์อย่างต่อเนื่องจนเฟสที่อยู่กับที่อิ่มตัว องค์ประกอบที่มีแรงยึดเหนี่ยวกับเฟสอยู่กับที่น้อยกว่าจะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อน โดยมีองค์ประกอบที่ยึดเหนี่ยวได้ดีกว่าเข้าแทนที่ในขณะที่ใส่ตัวอย่าง ดังรูปที่ 1.14



รูปที่ 1.14 Frontal Analysis

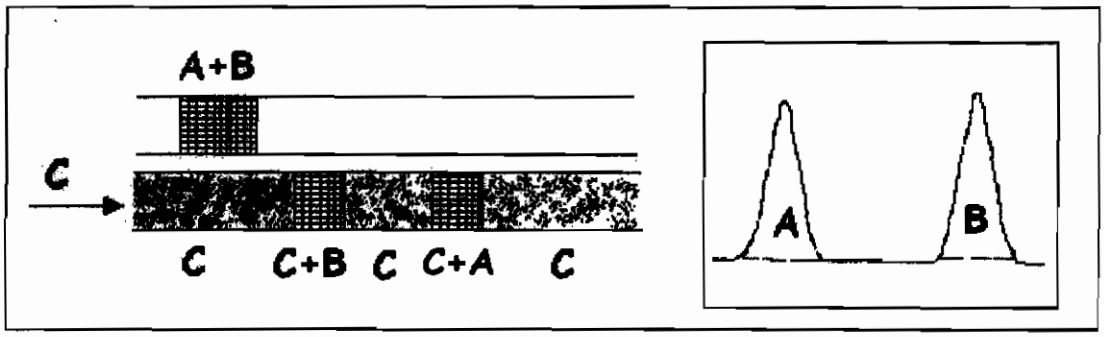
3.4.2 Elution development

เทคนิคนี้จะใส่ตัวอย่างผสมจำนวนน้อยลงบนคอลัมน์ แล้วใช้ตัวชะที่เหมาะสมไล่องค์ประกอบในตัวอย่างออกมาตามลำดับ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ทั่วไปในการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟี ดังรูปที่ 1.15

เทคนิคในการชะ มี 2 รูปแบบ คือ

3.4.2.1 Isocratic elution คือใช้ตัวชะชนิดเดียวกันและมีเงื่อนไขคงที่ตลอดการทดลอง

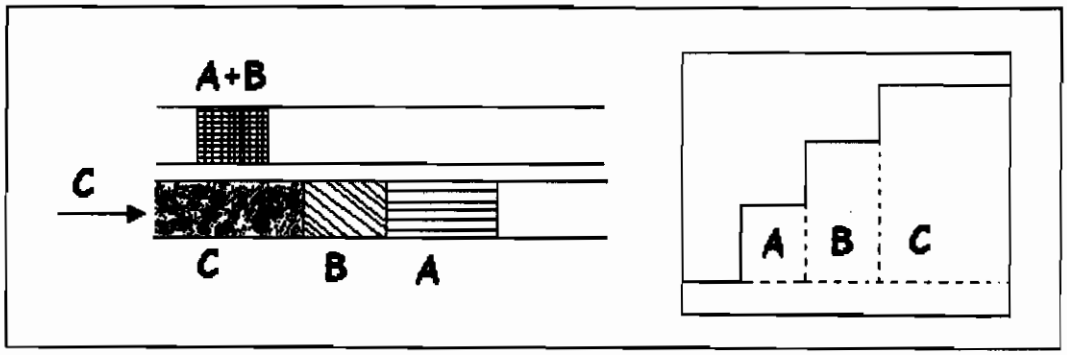
3.4.2.2 Gradient elution คือใช้ตัวชะที่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบอย่างต่อเนื่องตลอดการชะ



รูปที่ 1.15 Elution development โดย A&B คือตัวอย่างผสม และ C คือ เฟสเคลื่อนที่

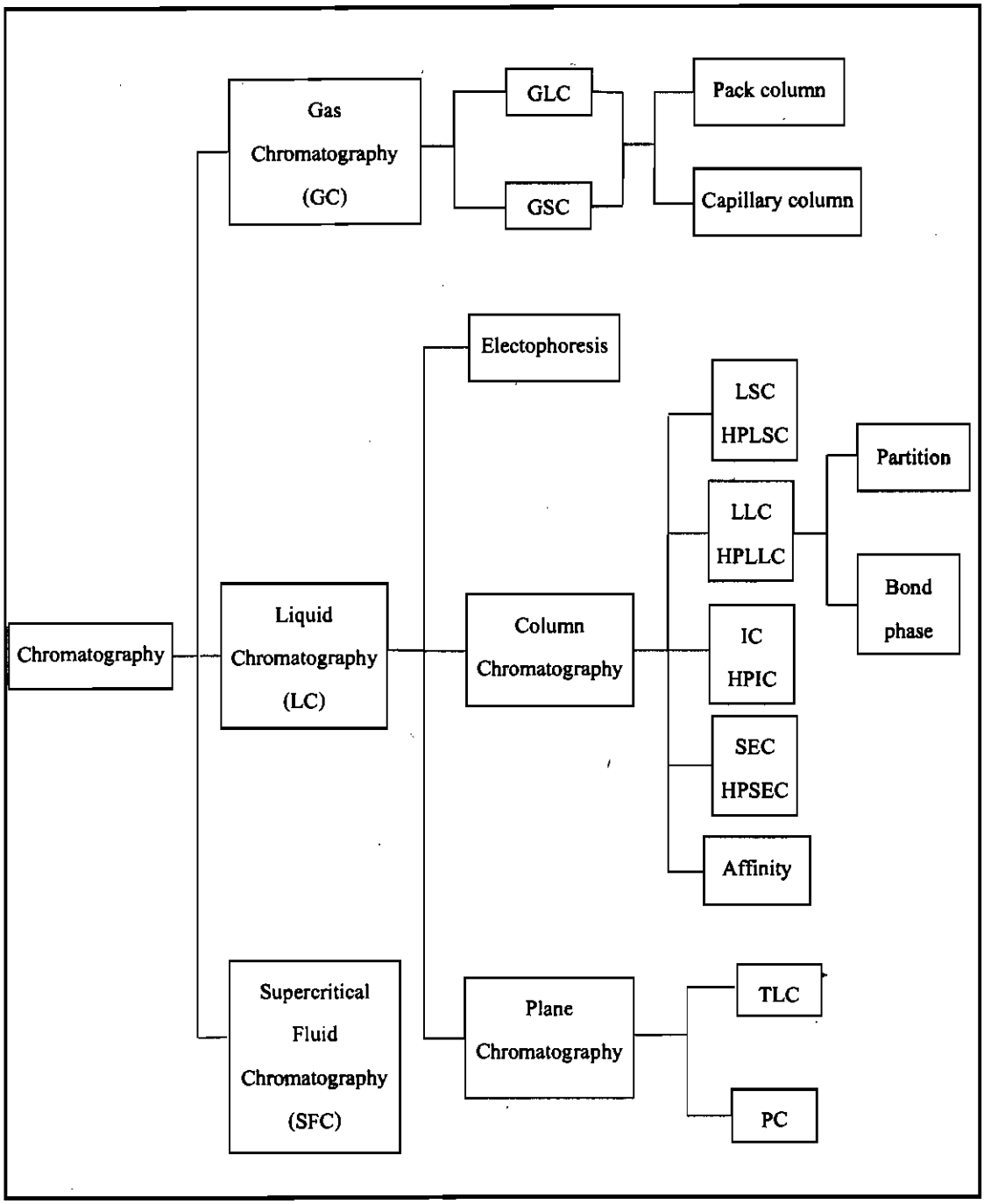
3.4.3 Displacement Development

สารตัวอย่างที่สนใจจะถูกแทนที่ด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่ถูกยึดเหนี่ยวได้มากกว่า ดัง รูปที่ 1.16



รูปที่ 1.16 Displacement Development

จากรูปแบบต่างๆ ในการแบ่งวิธีของโครมาโทกราฟี ทำให้สามารถสรุปเป็น flow chart ในการจำแนกวิธีโครมาโทกราฟีได้ดังแสดงในรูปที่ 1.17

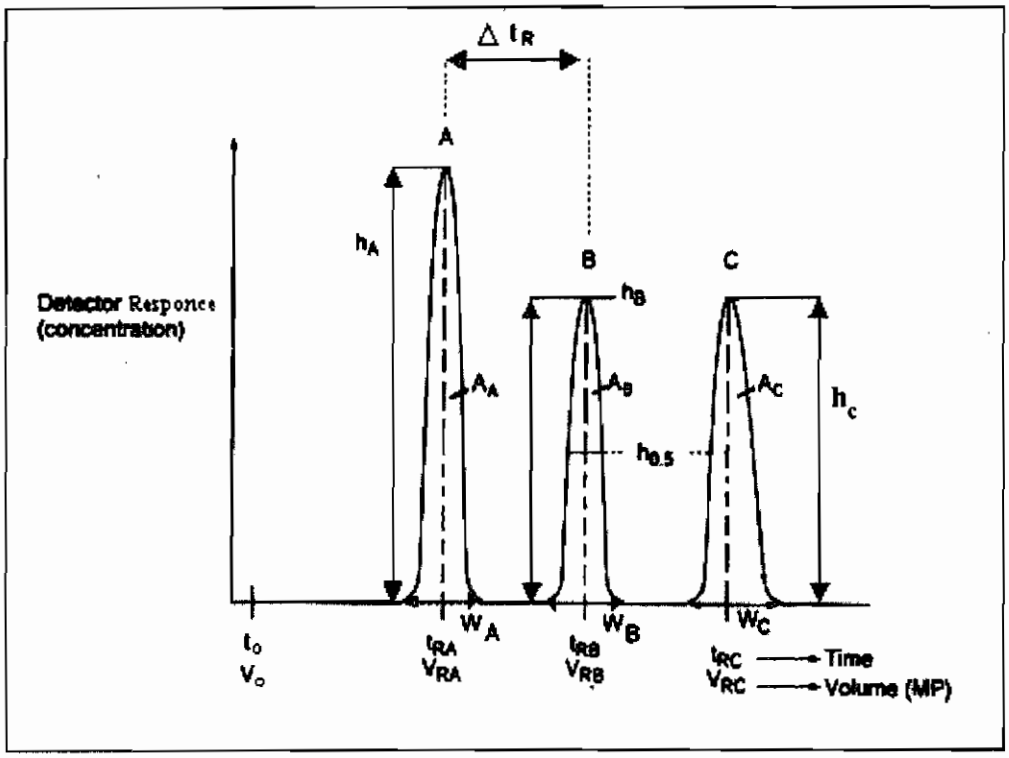


รูปที่ 1.17 แสดงการจำแนกการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟี

4. พารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในโครมาโทกราฟี

(Parameters in Chromatography)

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟี คือ โครมาโทแกรม (chromatogram) ซึ่งเป็นการพลอตกราฟระหว่างค่าการตอบสนองของเครื่องตรวจวัด กับ เวลาหรือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทำให้สารตัวอย่างเดินทางออกจากคอลัมน์ ดังรูปที่ 1.18



รูปที่ 1.18 แสดงพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในโครมาโทแกรม

4.1 Retention time (t_R) และ Retention volume (V_R)

4.1.1 รีเทนชันไทม์ (Retention time,t_R) หมายถึง เวลาที่ตัวถูกละลายใช้ไปในการเดินทางออกจากคอลัมน์ นับจากเวลาเริ่มต้นใส่ตัวถูกละลายลงบนคอลัมน์ ตัวถูกละลายที่ถูกหน่วงเหนี่ยวได้ดีในคอลัมน์จะมีรีเทนชันไทม์นาน

เวลาที่ใช้ไปสำหรับองค์ประกอบที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์เดินทาง 1 ความยาวคอลัมน์ หรือ เวลาที่เฟสเคลื่อนที่ใช้เดินทางได้ 1 ความยาวคอลัมน์ เรียกว่า t_0 หรือ t_m

4.1.2 รีเทนชันโวลูม (Retention volume ,V_R) คือ ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ไปสำหรับทำให้ตัวถูกละลายเดินทางออกจากคอลัมน์ มีความสัมพันธ์กับ รีเทนชันไทม์ คือ

$$V_R = t_R F \qquad \text{——————} \quad (1.1)$$

เมื่อ F คือ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (Flow rate)

V_0 หรือ V_m (Void volume หรือ Dead volume) คือ ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ในความยาวหนึ่งคอลัมน์

นั่นคือ
$$V_0 = t_0 F \qquad \text{——————} \quad (1.2)$$
$$V_m = t_m F \qquad \text{——————} \quad (1.3)$$

t_0 หรือ t_m สามารถวัดได้โดยใช้สารที่แตกต่างจากองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่และไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์มาหาโครมาโทแกรม

ปัจจัยที่มีผลต่อค่ารีเทนชัน

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายออกจากคอลัมน์ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของโมเลกุลของตัวถูกละลายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการกระจาย (distribution) อันจะมีผลต่อไปยังค่ารีเทนชัน คือ

- ส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่
- ชนิดของเฟสอยู่กับที่

- แรงระหว่างโมเลกุล (inter molecular force) ของตัวถูกละลายระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่
- อุณหภูมิ

ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_d (distribution ratio) กับค่ารีเทนชันโวลูม ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ (V_m) และปริมาตรของเฟสอยู่กับที่ (V_s) เป็นดังนี้

$$V_R = V_m + K_d V_s \qquad \text{———— (1.4)}$$

4.2 ปัจจัยความจุ (capacity factor , k')

หมายถึง เวลาที่ตัวถูกละลายใช้อยู่ในเฟสอยู่กับที่ หรือถูกหน่วงในคอลัมน์ ให้นิยามได้เป็นค่า adjust retention time ($t_R - t_0$) หารด้วย t_0

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad \text{———— (1.5)}$$

ตัวอย่างเช่น ถ้า $k' = 1$ หมายถึงว่า มีตัวถูกละลายใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่ 50 % และใช้เวลาอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ 50% ถ้า $k' = 2$ หมายถึงว่า มีตัวถูกละลายใช้เวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่ 66.6 % และใช้เวลาอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ 33.3% เป็นต้น

การใช้เวลาของตัวถูกทำละลายอยู่ในเฟสแต่ละเฟสขึ้นอยู่กับ อัตราส่วนการกระจาย (K_d) ดังนั้นค่าปัจจัยความจุยังมีความหมายได้อีก คือ

$$k' = K_d \times \frac{V_s}{V_m} \qquad \text{———— (1.6)}$$

คอลัมน์ที่มีค่า k' สูง แสดงว่าถูกยึดเหนี่ยวในคอลัมน์ได้ดี การปรับปรุงค่า k' ของตัวถูกละลายจะช่วยทำให้การแยกดีขึ้น ตามปกติ k' ของตัวถูกละลายในการทำโครมาโทกราฟีจะอยู่ในช่วง 1-10

4.3 ความจำเพาะเจาะจง (selectivity,α)

ความจำเพาะเจาะจงเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของเฟสอยู่กับที่ในการดูดซับหรือละลายตัวอย่างสองชนิด ถ้าตัวอย่าง 2 ชนิด ถูกดูดซับได้เท่ากันก็จะไม่มีความแตกต่างในการแยกเกิดขึ้น ดังนั้นค่าความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นการบอกความแตกต่างของค่ารีเทนชันของพีก 2 พีก ซึ่งทำให้บอกได้ว่าระบบโครมาโทกราฟีมีประสิทธิภาพอย่างไรในการแยกตัวอย่างทั้งสองออกจากกัน สมการที่ใช้แสดงค่าความจำเพาะเจาะจง คือ

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} = \frac{V_{R_2} - V_0}{V_{R_1} - V_0} = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad \text{———— (1.7)}$$

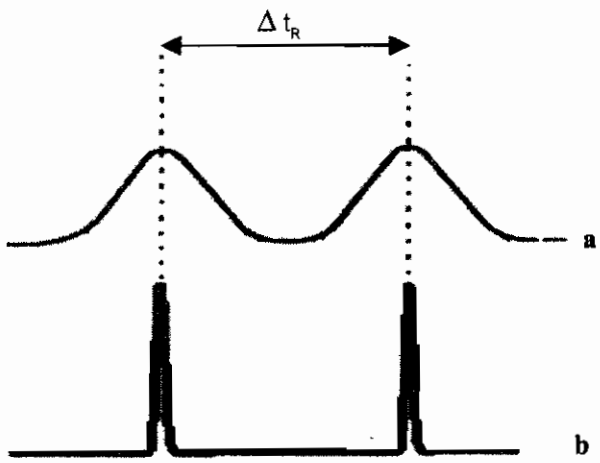
ถ้าสารตัวอย่างสองตัวไม่สามารถแยกออกจากกันได้ $t_{R1} = t_{R2}$ จะมีผลทำให้ได้ค่า $\alpha = 1$

เมื่อ $t'_R = t_R - t_0$ = adjust retention

นั่นคือ $$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \qquad \text{———— (1.8)}$$

4.4 การแยก (Resolution)

สิ่งสำคัญในการทำโครมาโทกราฟี คือ การแยกสารผสมออกจากกัน ลักษณะของโครมาโทแกรมที่แสดงถึงการแยกออกจากกันอย่างสมบูรณ์นั้นอยู่ที่ระยะห่างของพีก (Δt_R) และความกว้างของพีกสารผสมสองชนิดเมื่อแยกออกจากกันแล้วมีค่า(Δt_R) พีกเท่ากัน แต่ความกว้างของพีกไม่เท่ากัน จะทำให้ค่าการแยกแตกต่างกัน ดังรูปที่ 1.19

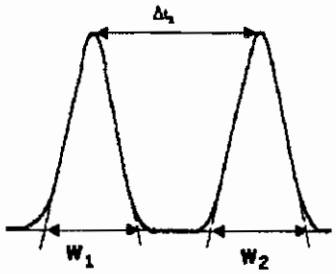


$$R_{s(a)} < R_{s(b)}$$

รูปที่ 1.19 โครมาโทแกรมที่มี t_R เท่ากัน แต่ค่าการแยกต่างกัน

จากรูปที่ 1.19 จะเห็นได้ว่าสารทั้งสองสามารถแยกออกจากกันได้ แต่รูป b จะมีค่าการแยกมากกว่ารูป a ค่าการแยกสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$R_S = \frac{2\,\Delta t_R}{w_2 + w_1} \qquad \text{———— (1.9)}$$



ตามปกติค่าการแยก (R_s) มีค่าเท่ากับ 1.0 ก็เพียงพอสำหรับการแยกทั่วๆ ไป ถ้าสารตัวอย่างไม่เข้มข้นมากนัก แต่ถ้าสารตัวอย่างเข้มข้นมาก ค่า R_S ควรมีค่ามากกว่านี้จึงจะทำให้การวิเคราะห์ทางปริมาณได้ผลถูกต้อง ถ้าการแยกเท่ากับ 1.5 หมายความว่า พีกแยกออกจากกันได้เท่ากับ 99.7% โดย

ใช้วิธีแบ่งพื้นที่พีกจากจุดแยกแล้วลากเส้นตั้งฉากกับเส้นฐาน ถ้า R_s ที่มีค่าเท่ากับ 1.0 มีความหมายว่าพีกทั้งสองแยกออกจากกันได้ 98 % ขณะที่อีก 2% คือพื้นที่ส่วนที่รวมกับอีกพีกหนึ่ง

นอกจากนี้ อัตราส่วนของขนาดพีกของสารสองชนิดที่แยกออกจากกันก็จะมีผลต่อการแยก ดังรูปที่ 1.20

การแยกของสารผสมจะขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ

- ค่ารีเทนชัน ในเชิงปัจจัยความจุ (capacity factor, k')
- ความจำเพาะเจาะจง (Selectivity factor,α)
- ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency) ซึ่งอธิบายได้ในเทอม N (theoretical plate)

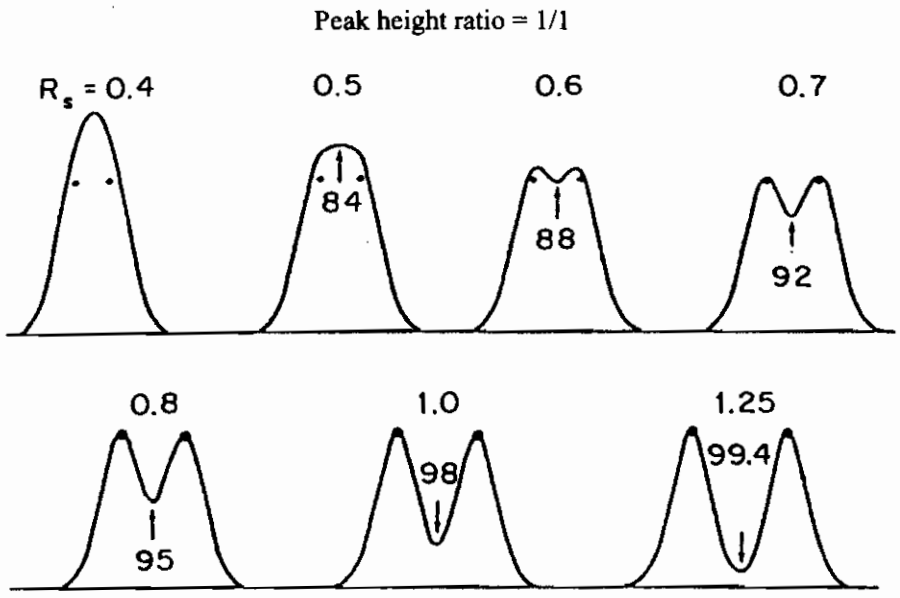
R_S มีความสัมพันธ์กับปัจจัยทั้งสามดังนี้

$$R_S = \left(\frac{N^{\frac{1}{2}}}{4}\right)\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_2}{1+k'_2}\right) \qquad \text{——————} (1.10)$$

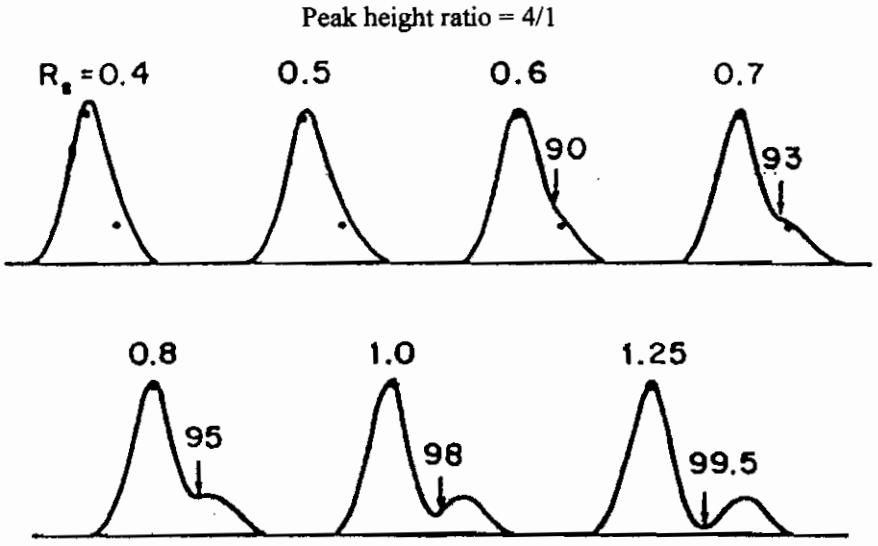
การปรับปรุงให้การแยกดีขึ้น คือการปรับปรุงให้มีค่า Δt_R มากขึ้นและความกว้างของพีกลดลง ซึ่งทำได้ดังนี้

1. เพิ่มความยาวของคอลัมน์
2. บรรจุเฟสที่อยู่กับที่ในคอลัมน์ให้แน่น
3. ใช้เฟสอยู่กับที่ให้มีขนาดเล็กลง
4. ลดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์
5. ใช้อัตราการไหลให้เหมาะสม
6. ลดปริมาณสารตัวอย่าง

Effects of peak size ratios on resolution

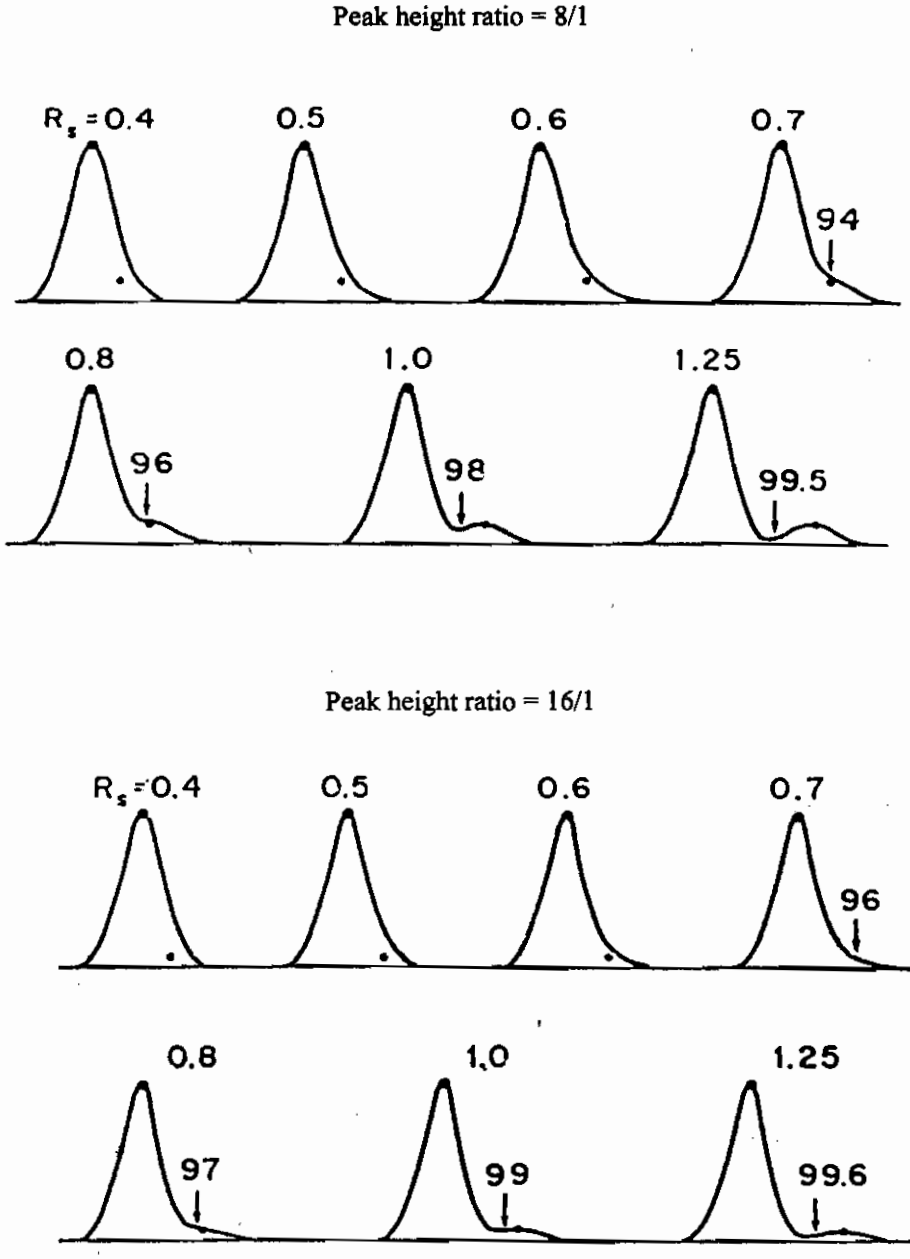


(i) a peak height ratio of 1/1 and R_s valve of 0.4-1.25



(ii) a peak height ratio of 4 /1 and R_s valve of 0.4-1.25

รูปที่ 1.20 เปรียบเทียบการแยกของพีก 2 พีก ที่มีอัตราส่วนของขนาดพีกที่แตกต่างกัน

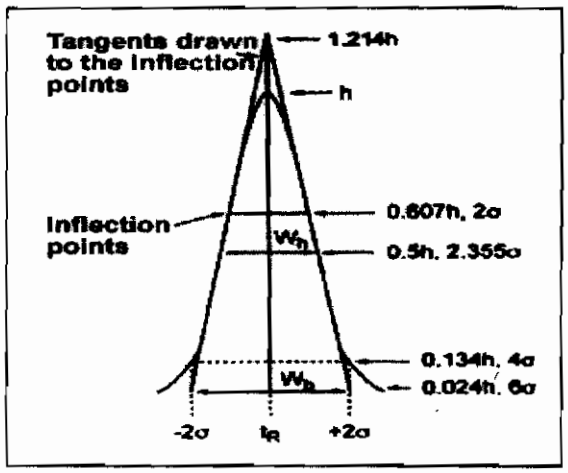


รูปที่ 1.20 (ต่อ) เปรียบเทียบการแยกของพีก 2 พีกที่มีอัตราส่วนของขนาดพีกที่แตกต่างกัน

ค่ารีเทนชันและความจำเพาะเจาะจงจะเป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ สำหรับประสิทธิภาพของคอลัมน์เป็นการวัดการกระจายของพีก คอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพดีจะให้พีกที่แคบและสมมาตรกว่าคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพไม่ดี

4.5 ประสิทธิภาพของคอลัมน์ (column efficiency)

จำนวนเพลตตามทฤษฎี (Theoretical plate ; N) เป็นเทอมที่สามารถใช้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ ดามปกติพีกที่ปรากฏในโครมาโทแกรมมีลักษณะของการกระจายเป็นแบบ Gaussian curve ดังรูปที่ 1.21 ซึ่ง σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Gaussian curve ที่อธิบายการกระจายของโมเลกุลของตัวอย่างในพีก



รูปที่ 1.21 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมซึ่งมีการกระจายแบบ Gaussian curve (Gaussian distibution)

ถ้าโมเลกุลของตัวอย่างมีการกระจายมากพีกที่ได้จะกว้าง คือ คอลัมน์มีประสิทธิภาพน้อย ดังนั้น

$$\sigma^2 \ \alpha \ \frac{1}{N} \qquad \text{———— (1.11)}$$

$$\sigma \ \alpha \ \frac{1}{\sqrt{N}} \quad \text{หรือ} \quad \sqrt{N} \ \alpha \ \frac{1}{\sigma} \qquad \text{———— (1.12)}$$

นอกจากนี้ความกว้างขวางของพีกขึ้นอยู่กับเวลาที่โมเลกุลของตัวอย่างใช้เดินทาง นั่นคือ

$$\sigma \quad \alpha \quad t_R \times \frac{1}{\sqrt{N}} \quad \text{หรือ} \quad \sqrt{N} \quad \alpha \quad \frac{t_R}{\sigma} \qquad \text{——— (1.13)}$$

ในทางปฏิบัติพบว่าค่า praportional factor = 1

$$\therefore \quad N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \qquad \text{——— (1.14)}$$

จากรูปที่ 1.21 ความกว้างของฐานพีกจะวัดได้จากการลากเส้นสัมผัสขอบของพีกให้เกิดเป็นรูปสามเหลี่ยม ซึ่งแสดงได้ว่า ความกว้างของฐานพีกมีค่าเท่ากับ 4σ ($\sigma = W_b / 4$)

$$\therefore \quad N = \left(\frac{t_R}{W_b / 4}\right)^2 \qquad \text{——— (1.15)}$$

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \qquad \text{——— (1.16)}$$

ในกรณีที่ความกว้างของฐานพีก (W_b) วัดได้ยาก สามารถวัดความกว้างของพีกที่มีความสูงเป็นครึ่งหนึ่ง (0.5h) ซึ่งจะมีค่าเท่ากับ 2.35σ

$$\therefore \quad N = \left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}} / 2.35}\right)^2 \qquad \text{——— (1.17)}$$

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \qquad \text{———— (1.18)}$$

จากสมการที่ 1.16 และ 1.18 แสดงให้เห็นว่า N เป็นเทอมประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่หาได้จากการปฏิบัติ อย่างไรก็ตามเทอมประสิทธิภาพของคอลัมน์ยังสามารถแสดงได้ในเทอม effective column efficiency (N_{eff}) ดังนี้

$$N_{eff} = \left(\frac{t_R'}{W_b}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_R'}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \qquad \text{———— (1.19)}$$

$(t_R' = t_R - t_0)$

จำนวนเพลตตามทฤษฎี (N) ในคอลัมน์แปรผันโดยตรงกับความยาวคอลัมน์ ถ้ามีจำนวนเพลต N ที่เกิดสมดุลในคอลัมน์ที่ยาว L จะได้ความสูงของเพลตตามทฤษฎี (Height equivalent to a theoretical plate, H) ดังนี้

$$H = \frac{L}{N} \qquad \text{———— (1.20)}$$

และจากสมการที่ (1.11) $N = \frac{1}{\sigma^2}$

ดังนั้น $H = \sigma^2 L$ ———— (1.21)

ในปี ค.ศ.1952 Martin และ Synge เป็นคนแรกที่อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ในเทอมของ H โดยทฤษฎีที่ใช้อธิบาย เรียกว่า **ทฤษฎีเพลต (Plate theory)** ในทฤษฎีนี้ใช้สมมติฐานที่ว่าในคอลัมน์ประกอบด้วยเพลตหลายๆ เพลตซ้อนกันอยู่ ในแต่ละเพลตจะมีสมดุลของตัวถูกละลายเกิดขึ้นระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ และเกิดการเคลื่อนที่จากเพลตที่ 1 ไปยังเพลตที่ 2 และ

2 และเพลตที่ 2 ไปยังเพลตที่ 3 ต่อไปเรื่อยๆ คล้ายกับการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์ (counter current extraction) และการกลั่นลำดับส่วน แต่แตกต่างกันคือ ในการสกัดแบบเคาน์เตอร์เคอร์เรนท์นั้นการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือถึงสมดุลก่อนเคลื่อนย้ายไปยังเพลตต่อๆ ไป ส่วนในวิธีการของโครมาโทกราฟีนั้น ในแต่ละเพลตจะมีการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟสทั้งสองได้ไม่สมบูรณ์เพราะมีการผ่านเฟสเคลื่อนที่ตลอดเวลา มีผลทำให้เกิด band broadening ถ้าตัวถูกละลายสามารถเกิดสมดุลขึ้นได้อย่างรวดเร็ว แบนด์ที่ได้ก็จะแคบ โดยหลักการของการสกัด ประสิทธิภาพของการแยกจะดีเมื่อทำการสกัดหลายครั้ง ในโครมาโทกราฟีก็เช่นเดียวกัน ถ้ามีจำนวนเพลตตามทฤษฎีบรรจุในคอลัมน์ได้มาก ประสิทธิภาพของคอลัมน์ก็จะดี การบรรจุเพลตตามทฤษฎี ในคอลัมน์ได้มากแสดงว่าความสูงของเพลตต้องมีค่าน้อย (H = L/N) ดังนั้นจึงสามารถอธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์ได้ในเทอมของความสูงของเพลต ตามทฤษฎี (H) โดย H ยิ่งมีค่าน้อยประสิทธิภาพของคอลัมน์ยิ่งมาก ซึ่ง H จะมีค่าน้อยได้เมื่อ

- ขนาดของอนุภาคเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ
- เฟสเคลื่อนที่ต้องมีความหนืดต่ำ
- อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ
- อุณหภูมิในการแยกสูง

ในปี ค .ศ.1956 Van Deemter และคณะ ได้เสนอทฤษฎีอัตรา (Rate theory) ที่สามารถอธิบายการเกิดแบนด์กว้างในกระบวนการอีลูท โดยมีสาเหตุที่สำคัญ 3 ประการ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการอีลูท ที่ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างมีความประพฤติไม่เหมือนกัน คือ กลไกของการเกิดการแพร่กระจาย ซึ่งมี 3 กลไก คือ

- Eddy diffusion
- Longitudinal diffusion
- Mass transfer effect

(ซึ่งกล่าวรายละเอียดไว้ในหัวข้อที่ 2 dispersion mechanism)

Van Deemter ได้อธิบายไว้เป็นสมการทางคณิตศาสตร์ คือ

$$H = A + B/u + Cu \qquad \text{———— (1.22)}$$

เทอม A

แทนผลเนื่องจาก eddy diffusion ซึ่งเกิดจากการแพร่ของโมเลกุลของตัวอย่างไปตามเฟสอยู่กับที่ ถ้าขนาดของเฟสอยู่กับที่ไม่สม่ำเสมอ การเดินทางของโมเลกุลของตัวอย่างจะได้ระยะทางไม่เท่ากัน จึงทำให้เกิดแบนด์ที่กว้าง ผลนี้ไม่ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

$$A = \lambda d \qquad \text{———— (1.23)}$$

d = ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเฟสอยู่กับที่ (diameter of the stationary phase particles)

λ = ค่าคงที่ที่ขึ้นอยู่กับความเหมือนกันของเฟสอยู่กับที่และความเป็นระเบียบในการบรรจุ (Uniformity and column geometry)

เทอม B

แทนผลเนื่องจาก longitudinal diffusion ปกติการแพร่กระจายจะเกิดขึ้นได้ทุกทิศทาง สำหรับการแพร่กระจายแบบ longitudinal diffusion เป็นการแพร่กระจายจากความเข้มข้นสูงไปสู่ความเข้มข้นต่ำตามความยาวของคอลัมน์ในทิศทางที่เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่

$$B = 2\gamma D_M \qquad \text{———— (1.24)}$$

γ คือ diffusion factor ขึ้นอยู่กับการบรรจุเฟสอยู่กับที่ ถ้าเป็น packed column จะมีค่าประมาณ 0.7 ส่วน capillary column ใน GC จะมีค่าประมาณ 1.0

D_M คือ การแพร่กระจายของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่

ตามสมการ Van Deemter เทอม B จะมีค่ามากเมื่อการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าต่ำ (u น้อย ทำให้เทอม B/u มีค่ามาก) และเทอม B ใน GC จะมีค่ามากกว่าใน LC เพราะแก๊สมีอัตราการฟุ้งกระจายได้มากกว่าของเหลว อย่างน้อย 10^4 เท่า

<u>เทอม C</u>

แทนผลเนื่องจาก mass transfer effect ซึ่งเกิดขึ้นได้ในลักษณะ non equilibrium mass transfer และ resistance to mass transfer การเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายจากเพลตหนึ่งไปยังอีกเพลตหนึ่งในคอลัมน์เกิดจากการพาของเฟสเคลื่อนที่ และในขณะเดียวกันก็เกิดการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่ โมเลกุลของตัวถูกละลายทุกตัวจะใช้เวลาในการอยู่ในแต่ละเฟสไม่เท่ากัน ถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีมาก จะมีผลทำให้เทอม C มีค่ามาก ซึ่งโมเลกุลของตัวถูกละลายจะถูกพาออกจากคอลัมน์ก่อน โดยที่การแพร่กระจายยังไม่ถึงสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง มีผลให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ต่ำ ถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ต่ำ โมเลกุลของตัวถูกละลายก็จะมีเวลาเพียงพอในการเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสอง มีผลทำให้เทอม C มีค่าน้อย ประสิทธิภาพของคอลัมน์จึงมีค่าสูง จะเห็นได้ว่าเทอม C ขึ้นอยู่กับเฟสทั้งสอง ซึ่งแต่ละเฟสมีความสัมพันธ์กับค่าความหนาของฟิล์มและการแพร่กระจายดังนี้

C_s คือเทอมที่เกี่ยวข้องกับเฟสอยู่กับที่ ขึ้นอยู่กับความหนาของฟิล์มเฟสอยู่กับที่ และ diffusion coefficient ของตัวถูกละลายกับเฟสอยู่กับที่

$$C_s = d_f^2 / D_s \qquad \text{———— (1.25)}$$

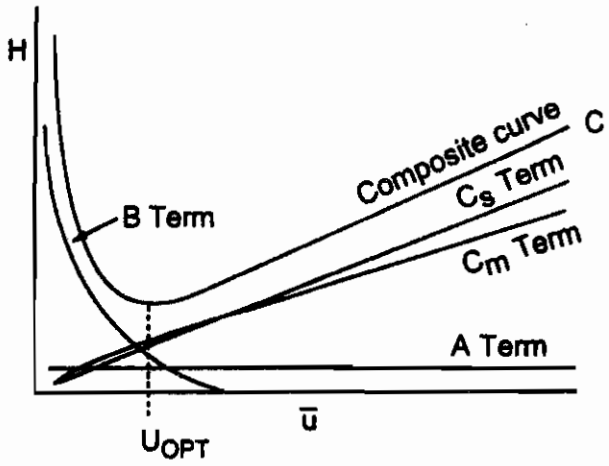
d_f = ความหนาของฟิล์มเฟสอยู่กับที่

D_s = diffusion coefficient ของตัวถูกละลายในเฟสอยู่กับที่

C_M คือเทอมที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของโมเลกุลของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ ขึ้นอยู่กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเฟสอยู่กับที่ (d_p) และ diffusion coefficient ของตัวถูกละลายกับเฟสเคลื่อนที่ (D_M)

$$C_M = d_p^2 / D_M \qquad \text{———— (1.26)}$$

จากสมการของ Van Deemter แสดงให้เห็นได้ชัดเจนว่า ถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (u) มีค่าน้อยมีผลให้เทอม B มีค่ามาก เนื่องจาก H มีค่ามาก ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้น u ควรมีค่ามาก เพื่อให้เทอม B มีค่าน้อย แต่ในทางกลับกัน ถ้าเทอม u มีค่ามากจะมีผลทำให้เทอม C มีค่ามาก ซึ่งมีผลทำให้เทอม H มีค่ามาก ประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้น u ควรมีค่าน้อยเพื่อให้เทอม C มีค่าน้อย ซึ่งเป็นผลที่ขัดแย้งกับเทอม B จะเห็นได้ว่า u ที่น้อยเกินไป ประสิทธิภาพของคอลัมน์ไม่ดี และถ้า u มากเกินไป ประสิทธิภาพของคอลัมน์ก็ไม่ดีเช่นกัน ดังนั้น u ที่เหมาะสมจึงมีเพียงค่าเดียว ซึ่งหาได้จากการพลอตกราฟระหว่าง H กับ u ดังรูปที่ 1.22



รูปที่ 1.22 Van Deemter plot ระหว่าง H กับ u

A term คือ eddy diffusion

B term คือ longitudinal diffusion

C term คือ mass transfer effect ประกอบด้วย C_s term และ C_m term

อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม (u_{opt}) จะมีผลทำให้ H มีค่าต่ำสุด (H_{min}) คือ

$dH/du = 0$

จากสมการที่ 1.22 $$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

$$\frac{dH}{du} = \frac{-B}{u_{opt}^2} + C = 0 \qquad \text{——— (1.27)}$$

นั่นคือ $$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}} \qquad \text{——— (1.28)}$$

แทนค่า u_{opt} ลงในสมการ (1.26)

$$H_{min} = A + \frac{B}{\sqrt{\frac{B}{C}}} + C\sqrt{\frac{B}{C}} \qquad \text{——— (1.29)}$$

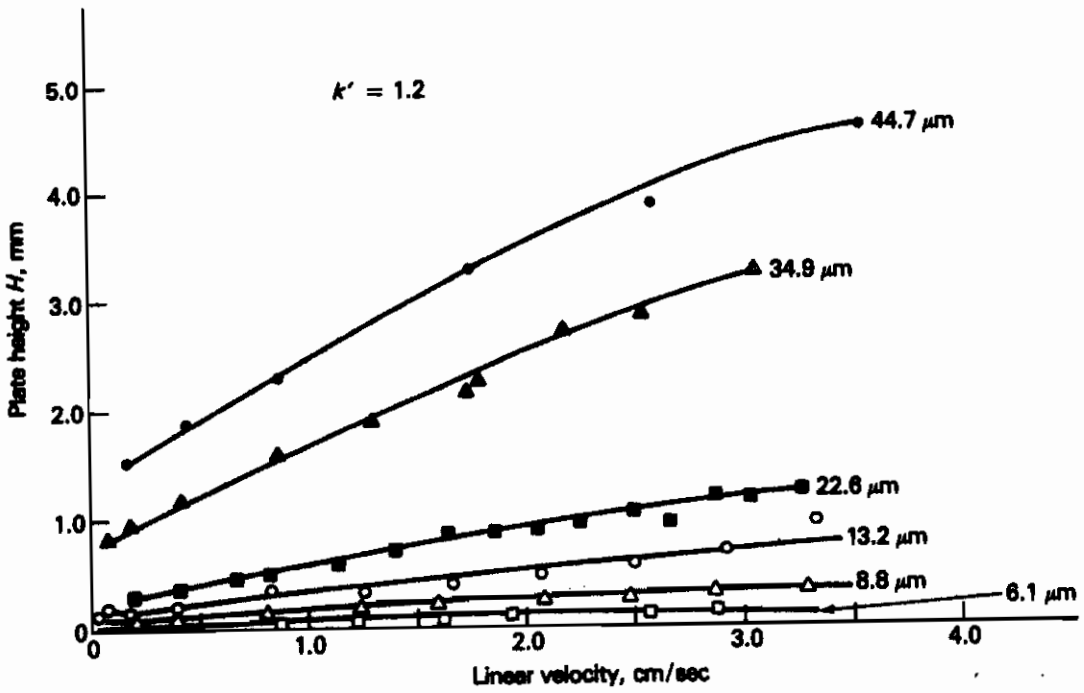
$$= A + 2\sqrt{BC} \qquad \text{——— (1.30)}$$

ดังที่กล่าวแล้วว่าใน LC เทอม B จะมีความสำคัญน้อยกว่าใน GC
ดังนั้น LC จะได้

$$H \cong A + Cu \qquad \text{——— (1.31)}$$

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง u กับ H พบว่าในการเพิ่ม u สำหรับอนุภาคขนาดเล็กๆของเฟสอยู่กับที่ ไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง ดังรูปที่ 1.23

การใช้อนุภาคเล็กมีผลทำให้ประสิทธิภาพดี คือ H มีค่าน้อย ซึ่งใช้ในระบบของ HPLC แต่การใช้อนุภาคเล็กๆจะมีผลทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้ามาก เพื่อให้เฟสเคลื่อนที่เกิดการไหลในคอลัมน์และมีการแยกเกิดขึ้นจึงต้องใช้แรงดันเข้าบังคับการไหล ดังนั้นในการทำ HPLC จึงต้องมีปั๊มสำหรับอัดแรงดันของเฟสเคลื่อนที่เป็นส่วนประกอบของเครื่องมือนั่นเอง



รูปที่ 1.23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง linear velocity (u) ของเฟสเคลื่อนที่ กับค่า H จะเห็นได้ว่าขนาดอนุภาคเล็กๆ เมื่อเพิ่ม u ไม่มีผลให้ H เพิ่ม

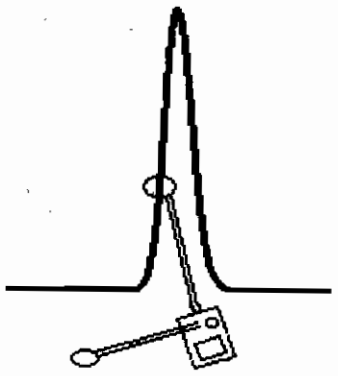
5. การวิเคราะห์เชิงปริมาณในโครมาโทกราฟี

(Quantification in Chromatography)

วิธีการของโครมาโทกราฟีนอกจากใช้ในการแยกสาร (separation) และพิสูจน์ชนิดของสาร (identification หรือ Qualification) แล้วยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ด้วย ข้อมูลของโครมาโทแกรมที่ได้ เช่น พื้นที่พีก ความสูงของพีกจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสาร พื้นที่พีกของโครมาโทแกรมได้จากการอินทิเกรตสัญญาณที่ได้จากเครื่องวัด เมื่อสารตัวอย่างเริ่มถูกอีลูทออกจากคอลัมน์จนถึงอีลูทออกมาหมด เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในการวัดขนาดของสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างและวิธีการของโครมาโทกราฟีที่ใช้ เช่น ใน HPLC จะใช้ UV detector ใน GC ใช้ flame ionization detector หรือ electron capture detector และใน IC ใช้ conductivity detector เป็นต้น

เทคนิคในการนำข้อมูลจากโครมาโทแกรมที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารตัวอย่าง สามารถทำได้ต่อไปนี้

1. Planimetry ใช้เครื่องมือที่เรียกว่า planimeter วัดขนาดพื้นที่ของรูปโครมาโทแกรม



2. Triangular แบบวัดความกว้างของฐานพีก (w_b)
พื้นที่พีก = ½ x W_b x h

3. Triangular แบบวัดความกว้างของพีกที่มีความสูงเป็นครึ่งหนึ่ง ($w_{1/2}$)
พื้นที่พีก = $W_{½}$ x h

4. Cut and Weigh ใช้วิธีตัดโครมาโทแกรมแล้วชั่งน้ำหนัก

5. Disc Integrator เป็นเครื่องมือนับขนาดพื้นที่พีกโดยรวม แบบลากเส้นบนกระดาษกราฟ

6. Digital Integrator เป็นการนับพื้นที่พีกโดยใช้เครื่องมือทางอิเล็กทรอนิกส์

7. Computer โดยการใช้คอมพิวเตอร์นับขนาดของพีก

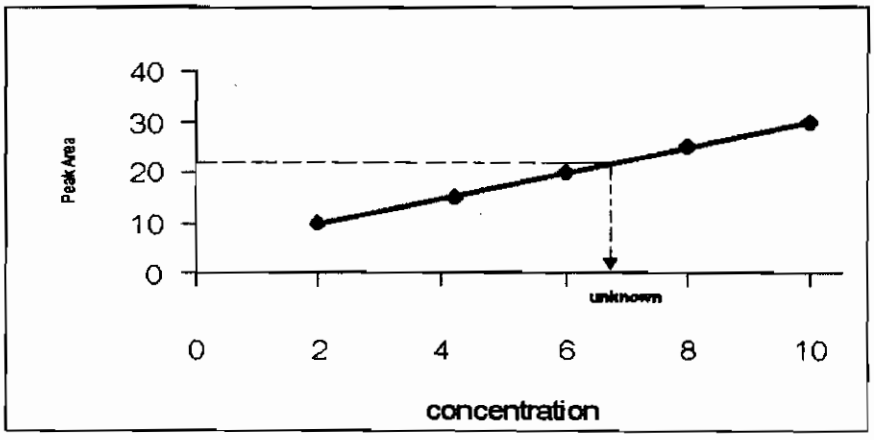
เมื่อเปรียบเทียบความเที่ยงของวิธีการวัดขนาดของโครมาแกรมตามเทคนิคทั้ง 7 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ พบว่า ร้อยละของความเที่ยงของแต่ละวิธีมีดังนี้

เทคนิค	ความเที่ยง (%)
1. Planimetry	4.06
2. Triangular (½ x W_b x h)	4.06
3. Triangular ($W_{½}$ x h)	2.58
4. Cut and Weigh	1.74
5. Disc Integrator	1.26
6. Digital Integrator	0.44
7. Computer	0.22

เมื่อได้ขนาดของโครมาโทแกรมตามเทคนิคที่ใช้วัดขนาดแล้ว สามารถนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีการต่างๆดังนี้

5.1 External standard method

เป็นวิธีการทำ calibration curve จากสารมาตรฐานในสภาวะเดียวกับสารตัวอย่าง มีหลักการอยู่ว่าขนาดพื้นที่พีกของตัวอย่างต้องอยู่ระหว่างพื้นที่พีกที่น้อยที่สุดกับมากที่สุดของสารมาตรฐาน



รูปที่ 1.24 Calibration curve และการหาปริมาณสารตัวอย่าง

5.2 Internal standard method

ในการเลือกใช้เทคนิคนี้ต้องพิจารณาคุณสมบัติของ Internal standard ดังนี้

1. ต้องไม่เป็นองค์ประกอบหรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง
2. ต้องแยกจากตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์
3. ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่ในตัวอย่าง
4. ต้องบริสุทธิ์มาก
5. เมื่อนำมาใช้ต้องมีปริมาณใกล้เคียงกับสารตัวอย่างที่ต้องการหา
6. ในช่วงความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์ Internal standard ต้องเป็น linear relation

เทคนิคในการวิเคราะห์มี 3 วิธี คือ

5.2.1 Classical method มีวิธีการดังนี้

ใช้สารมาตรฐานของตัวอย่าง + Internal standard แล้ว run chromatogram

$$C_S = R_S A_S \qquad \text{———— (1.32)}$$

$$C_i = R_i A_i \qquad \text{———— (1.33)}$$

A_i = สารมาตรฐานของตัวอย่างที่ทราบปริมาณ

A_S = Internal standard ที่ทราบปริมาณ

(1.32)/(1.33) จะได้

$$\frac{C_S}{C_i} = \frac{R_S}{R_i} \times \frac{A_S}{A_i} \qquad \text{———— (1.34)}$$

ให้ $R = R_S/R_i$ นั่นคือ

$$R = \frac{C_S}{C_i} \times \frac{A_i}{A_S} \qquad \text{———— (1.35)}$$

เมื่อทราบ C_S, C_i, A_S และ A_i สามารถหา R ได้ จากนั้นให้นำสารตัวอย่าง + Internal standard ตัวเดิมแล้ว run chromatogram (Internal standard ไม่จำเป็นต้องมีปริมาณเท่าเดิม แต่ต้องทราบปริมาณที่แน่นอน)

$$\frac{C_S}{C_{iu}} = R \times \frac{A_S}{A_{iu}} \qquad \text{———— (1.36)}$$

$$C_S = C_{iu} \times R \times \frac{A_S}{A_{iu}} \qquad \text{———— (1.37)}$$

$$C_{iu} = \frac{C_S \times A_{iu}}{R \times A_S} \qquad \text{———— (1.38)}$$

5.2.2 Stock solution method ใช้กับสารตัวอย่างที่ต้องมีการวิเคราะห์หาปริมาณบ่อยๆจึงต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานขึ้นมาเพื่อใช้หลายๆ ครั้งเป็น stock solution โดย stock solution จะประกอบด้วย Internal standard + สารมาตรฐานของตัวอย่าง และเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณรวมกับ Internal standard ที่มีปริมาณเหมือน stock solution แล้ว run chromatogram ของสารละลายทั้งสอง สามารถคำนวณหาปริมาณของตัวอย่างได้ดังนี้

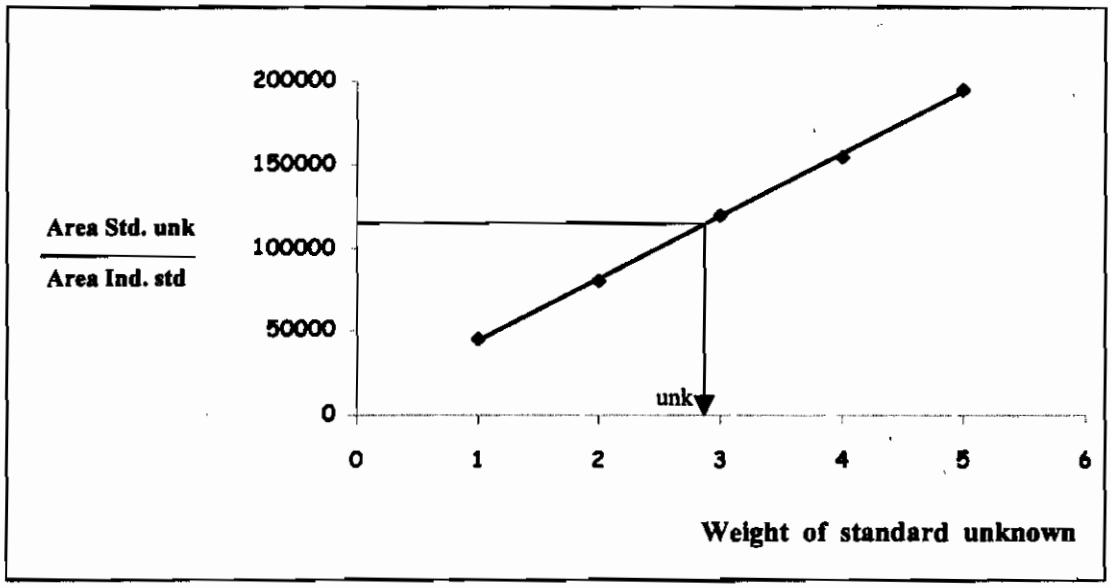
$$C_{iu} = \left(\frac{A_{s(stock)}}{A_{i(stock)}}\right) \times \left(\frac{A_{i(u)}}{A_{s(u)}}\right) \times C_{i(stock)} \qquad \text{———— (1.39)}$$

i = สารที่สนใจต้องการวิเคราะห์ (Analyte)

s = Internal standard

u = unknown solution

5.2.3 Internal standard plot method เตรียมสารละลายมาตรฐานของสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หลายๆ ความเข้มข้น และทุกๆ ความเข้มข้นเติม Internal standard ลงไปปริมาณเท่าๆ กัน พร้อมกับเติมลงในสารละลาย unknown ด้วย เมื่อ run chromatogram แล้วให้นำอัตราส่วนของพื้นที่พีกของ Internal standard /standard unknown หรือ standard unknown / Internal standard มาพลอตกราฟเทียบกับปริมาณของ standard unknown จากนั้นนำพื้นที่พีกของ Internal standard / unknown หรือ unknown/ Internal standard มาอ่านปริมาณจากกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ถ้า Internal standard ที่เติมลงใน standard unknown แต่ละขวดไม่เท่ากัน การพลอตกราฟให้ใช้แกน X เป็นค่า wt. Std unk / wt. Int std

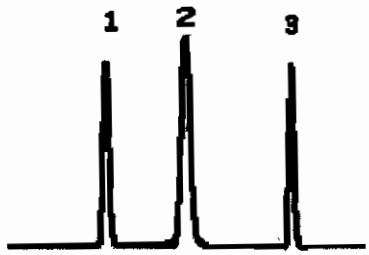


รูปที่ 1.25 กราฟมาตรฐานของ Internal standard plot

5.3 Standard addition method แบ่งเป็น 2 วิธี

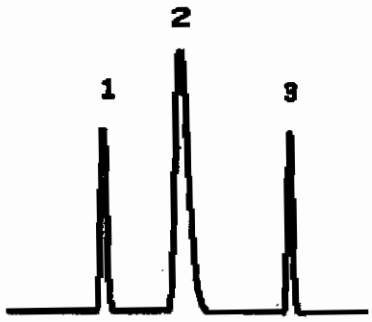
5.3.1 เป็นเทคนิคระหว่าง Internal standard กับ External standard จะใช้ต่อเมื่อดีเทคเตอร์ตอบสนองเป็นเส้นตรง ใช้วิเคราะห์เมื่อสารตัวอย่างมีเพียง 2-3 ตัวอย่าง โดยมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ดังนี้

(1) นำสารตัวอย่างมา run chromatogram



รูป a

(2) นำสารตัวอย่างมาเติมสารมาตรฐานตัวที่ต้องการวิเคราะห์โดยทราบปริมาณแน่นอน แล้ว run chromatogram



รูป b

เช่น ถ้าต้องการหาปริมาณของพีก 2 และ 3 ก็ให้เติม standard ของตัวที่ 2 และ 3 ลงไป

$$X_a = \frac{\text{ความสูงของ 2a}}{\text{ความสูงของ 1a}} \qquad \text{——————} \quad (1.40)$$

$$X_b = \frac{\text{ความสูงของ 2b}}{\text{ความสูงของ 1b}} \qquad \text{——————} \quad (1.41)$$

$$X_b - X_a = X_{added} \qquad \text{——————} \quad (1.42)$$

โดยความสูงจะสัมพันธ์กับความเข้มข้น

$$\frac{X_a}{X_{added}} = \frac{[C_2]_a}{[C_2]_{added}} \qquad \text{——— (1.43)}$$

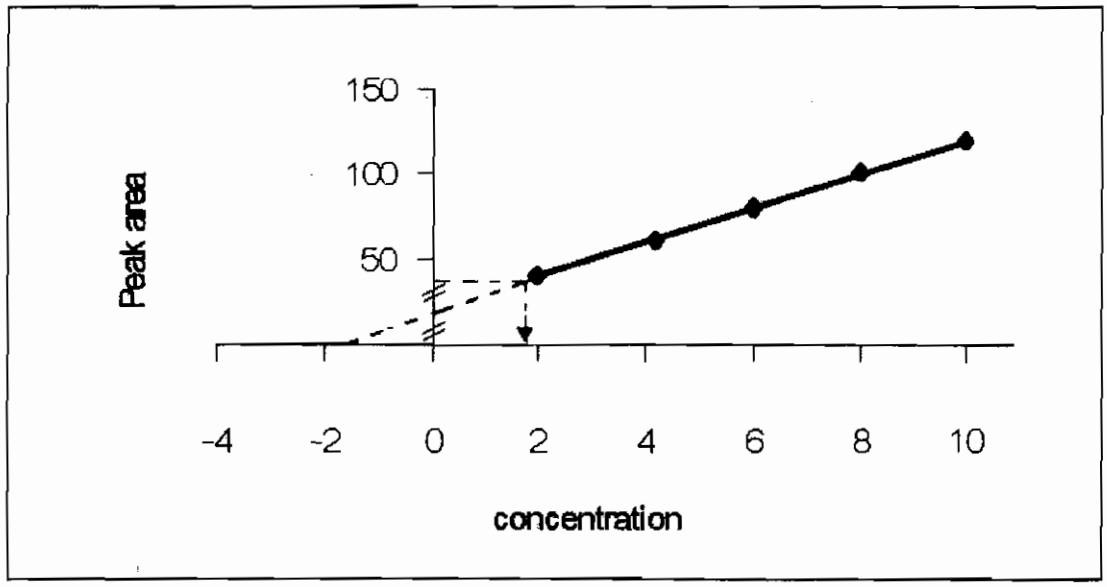
$$[C_2]_a = \left(\frac{X_a}{X_{added}}\right) \times [C_2]_{added} \qquad \text{——— (1.44)}$$

ในทำนองเดียวกัน Unknown 3 ก็สามารถหาได้เช่นกัน จะเห็นว่าวิธีการนี้ สารตัวที่ 1 ทำหน้าที่คล้าย เป็น Internal standard

5.3.2 Standard addition calibration curve ใช้สารมาตรฐานของ Unknown เตรียมหลายๆ ความเข้มข้น แล้วทุกๆ ความเข้มข้นเติม Unknown ลงไปปริมาณที่เท่ากัน เมื่อ run chromatogram แล้วให้พลอตกราฟระหว่างพื้นที่พีกกับปริมาณสารมาตรฐาน จากนั้นหาปริมาณ Unknown ได้ 2 วิธีคือ

— ลากเส้นตรงต่อจากเดอร์ฟมาตัดแกน – x ขนาดที่อ่านได้ที่แกน – x คือ ปริมาณของ Unknown (คิดค่าเป็นบวก)

— จากจุดตัดแกน y ให้นำค่าที่เท่ากันทบขึ้นไปทางด้านบนของแกน y แล้ว ลากมาตัดกับเส้นเดอร์ฟมาตราฐาน จากนั้นอ่านค่าที่ได้บนแกน x

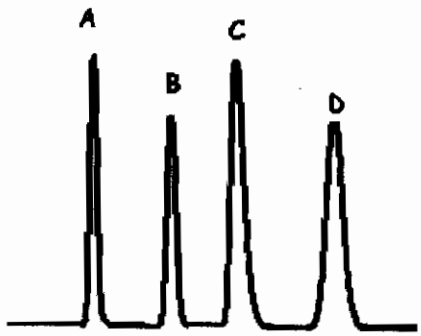


รูปที่ 1.26 การหาปริมาณ Unknown โดยวิธี standard addition calibration curve

5.4 Normalization method คือวิธีการหาปริมาณของสารที่สนใจในรูปของร้อยละในปริมาณรวมของสารประกอบทุกชนิดที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง

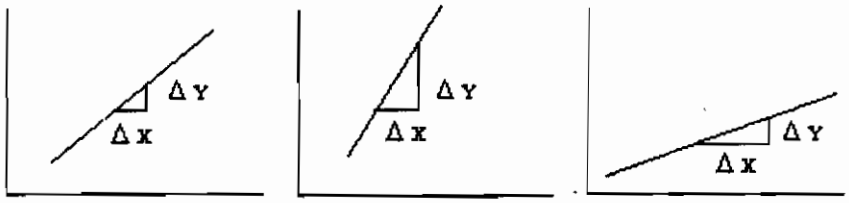
$$\%A = \frac{\text{พื้นที่พีก A}}{\text{พื้นที่รวมของทุกพีก}} \times 100 \qquad \text{———— (1.45)}$$

พื้นที่รวมของทุกพีก = A + B + C + D



วิธีการนี้ดีเทคเตอร์ ต้องไวต่อสารทุกตัวเหมือนกัน ถ้า ดีเทคเตอร์ ไวต่อสารทุกตัวไม่เหมือนกัน ต้องหา response factor ดังนี้

Response factor หาได้จากการเตรียมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารแต่ละตัว (A, B, C, D) ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน อย่างน้อย 3 ตัว เพื่อสร้าง calibration curve



สาร A สาร B สาร C

$$\text{Response factor} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \qquad \text{——— (1.46)}$$

เมื่อนำ unknown มา run chromatogram สามารถหาพื้นที่พีกที่ถูกต้องได้จาก

$$\text{พื้นที่พีก A ที่ถูกต้อง } (A^*) = \frac{\text{พื้นที่พีก A ที่วัดได้}}{\text{Response factor ของ A}} \qquad \text{——— (1.47)}$$

สารทุกตัวทั้ง A, B, C, D ต้องหาพื้นที่พีกที่ถูกต้องเป็น A* B* C* และ D*

$$\%A = \frac{\text{พื้นที่พีก } A^*}{\text{พื้นที่รวมของพีก}} \times 100 \qquad \text{——— (1.48)}$$

$$\text{พื้นที่รวมของพีก} = A^* + B^* + C^* + D^*$$

ยังมีอีกวิธีหนึ่งในการแก้ค่าที่ผิดพลาดเนื่องจาก ดีเทคเตอร์ ไวต่อสารแต่ละตัวไม่เท่ากัน โดยการหา Correction factor ดังนี้

ขั้นที่ 1 เตรียมสารมาตรฐานของ A, B, C และ Dให้มีปริมาณที่เท่าๆ กัน เมื่อ run chromatogram จะได้ $C \alpha A$

$$C = RA$$

เมื่อพื้นที่พีกของสารทั้ง 4 ตัว คือ A_1, A_2, A_3, และ A_4 จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นดังนี้

$$C_1 = R_1A_1$$

$$C_2 = R_2A_2$$

$$C_3 = R_3A_3$$

$$C_4 = R_4A_4$$

ในเมื่อเตรียมให้ความเข้มข้นของสารทุกตัวเท่ากัน คือ $C_1 = C_2 = C_3 = C_4$

ดังนั้น $R_1A_1 = R_2A_2 = R_3A_3 = R_4A_4$

พิจารณาให้สารตัวใดตัวหนึ่งเป็น " Norm" คือ มี $R = 1$ เช่น พิจารณาตัวที่ 4 เพราะฉะนั้น $R_4 = 1$ เมื่อนำ R_4A_4 ไปหารค่าทุกค่า จะได้

$$R_1 = A_4/A_1$$

$$R_2 = A_4/A_2$$

$$R_3 = A_4/A_3$$

$$R_4 = A_4/A_4 = 1$$

ขั้นที่ 2 run chromatogram ของสารตัวอย่างผสมจะได้พีกของ Unknown เป็น A_1^* , A_2^* , A_3^* , A_4^* นำเอาพื้นที่พีกของสารแต่ละตัวคูณกับ Correction factor ของพีกนั้น แล้วหาพื้นที่พีกรวมทั้งหมด

$$\text{Total area} = \sum_{i=1}^{n} A_i^* R_i = A_1^* R_1 + A_2^* R_2 + A_3^* R_3 + A_4^* R_4 + \ldots + A_n^* R_n$$

$$\% C_i = \frac{A_i^* R_i}{\sum_{i=1}^{n} A_i^* R_i} \times 100 \qquad \text{———— (1.49)}$$

ตัวอย่าง ในการแยก แอสไพริน ฟีนาเซติน และคาเฟอีน ได้ผลดังนี้

ตัวอย่าง	Std. ปริมาณเท่ากัน 1 μg		สารตัวอย่าง		%
	Integrator counts	Correction factor	Integrator counts	Correct Integrator count	
Aspirin	238	1190/238 =5.0	90	90x5.0 =450	(450/1387)x100=32.4
Phenacetin	1190	1190/1190=1.0	460	460x1.0=460	(460/1387)x100=33.2
Caffeine	660	1190/660 =1.8	265	265x1.8=477	(477/1387)x100=34.4
				รวม=1387	

*** ให้ Phenacetin เป็น "Norm" R = 1 ***