บทที่ 9
การวิเคราะห์สารด้วยโครมาโตกราฟี
(Analysis of Samples by Chromatography)

เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบต่างๆ โดยเคลื่อนที่ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งเทคนิคนี้ค้นพบโดย นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซีย Michael Tswett ปี 1906 ซึ่งไม่มีวิธีการ separationใดๆจะเหมาะเท่า Chromatography ในด้านประสิทธิภาพ เทคนิคง่ายๆ, application.

ระบบ chromatography จะเป็นระบบแบบอุดมคติ (Ideal) หรือไม่เป็นอุดมคติ (Non-ideal) ก็ได้ ทฤษฎีทาง chromatography อาศัยพื้นฐานของ continuous model จะต้องตั้งสมมติฐานคือ

1.ความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ใน stationary phase และ mobile phase จะเข้าสู่สมดุลอย่างรวดเร็ว

2.การแพร่กระจายของตัวถูกละลายใน mobile phase ตลอด column จะต้องมีน้อยมาก

3.สารที่บรรจุใน column หรือ liquid phase ที่ coat บน mobile phase ต้องสม่ำเสมอ

Chromatography มี 4 ชนิด

1. Partiation (Displacement) chromatography

หลักการคือ โมเลกุลของสารประกอบจะกระจายตัวของมันเองระหว่าง phase ทั้งสองที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งขั้ว (polarity) ของ stationary phase และ mobile phase จะต่างกันมาก และ stationary phase เป็น inert absorbent ซึ่งเคลือบด้วย high polarity liquid ซึ่งจะเกาะติดกับผิวแน่น โมเลกุลของสารที่ต้องการแยก (A+B) จะถูก load บน Column ที่ pack ด้วย inert absorbent ซึ่ง A, B จะอยู่ใน mobile phase ซึ่งบางส่วนของ A, B จะละลายใน stationary phase เมื่อ load solvent (S) ลงไป ถ้า B ถูก absorbed มากกว่า A จะช้ากว่า A

และถูก eluted ด้วย solvent ก็จะค่อยๆ ออกจากคอลัมน์ ทั้ง stationary phase และ mobile phase จะต้องเลือกจากสารที่มีสภาพขั้วต่างกันมากๆ (polarity) **โมเลกุลที่มีขั้วก็จะละลายอยู่ในเฟสที่มีขั้ว โมเลกุลที่ไม่มีขั้วก็จะละลายอยู่ในเฟสที่ไม่มีขั้ว** ทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้ เช่น paper chromatography ซึ่ง stationary phase มีขั้ว (polar) โดยโมเลกุลของน้ำซึ่งมีขั้วสูงเคลือบอยู่บนกระดาษ ซึ่งเป็นสารเฉื่อย ส่วน mobile phase เป็นของเหลวไม่มีขั้ว (non polar) ดังนั้นสารประกอบที่ต้องการแยกจะถูกไล่ออกมาเร็วที่สุด

2. Size-Exclusion chromatography (Gel filtration)

หลักการคือ สารที่จะถูกแยกจะเลือกผ่านวัฏภาคอยู่กับที่(stationary phase) ซึ่งมีรูพรุนและขนาดต่างกันถูกบรรจุรวมกันเพื่อคัดเลือกสารโมเลกุลที่ไหลผ่านจากวัฏภาคอยู่กับที่ในเวลาต่างกันซึ่งมีโมเลกุลที่ต้องการแยกจะถูก load เข้าไปใน column โมเลกุลที่มีขนาดเล็กสามารถผ่านรูพรุนของผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ ส่วนโมเลกุลขนาดกึ่งกลางจะผ่านผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ขนากกลางไม่สามารถผ่านผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ขนาดเล็ก โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ก็ผ่านไปเลยไม่ไหลเข้ารูใด โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะออกจาก column ก่อน ส่วนโมเลกุลกลางและเล็กก็จะผ่านออกจากคอลัมน์ช้ากว่า การแยกด้วย Gel filtration นี้นิยมใช้แยกสารที่มีโมเลกุลใหญ่

ปริมาตรของสารละลายที่ elute โมเลกุลใหญ่ออกจาก column คือ void volume (V_0)

ปริมาตรของสารละลายที่ elute โมเลกุลเล็กซึ่งปริมาตรต้องมากกว่า V_0 ซึ่งเรียกว่า total permeation volume (V_t)

$V_i = V_t - V_0$

กฎการ separation วิธีนี้คือ compound ที่มีขนาดต่างกัน 10% สามารถแยกใน column เดียวกันได้ วิธีนี้นิยมใช้แยกไขมัน, waxes หรือ ยาฆ่าแมลงออกจากอาหารได้

Size Exclution Chromatography แบ่งได้เป็น 2 ชนิด

1.Gel Filtration Chromatography

Stationary phase : เป็นพวก hydrophilic (กลุ่มที่ชอบน้ำ)

Mobile phase : เป็นพวก H_2O

ประโยชน์ : แยกสารพวกโปรตีนออกจาก amino acid และพวก peptide มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

2. Gel Permeation Chromatography

Stationary phase : เป็นพวก hydrophobic

Mobile phase : เป็นตัวทำละลายอินทรีย์

ประโยชน์ : ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของสารพวก polymer ขนาดใหญ่และสารธรรมชาติ (natural products)

3. Adsorption Chromatography (Liquid-solid Chromatography) เทคนิคนี้ใช้แยกสารประกอบอินทรีย์ที่อาศัยหลักการดูดซับหรือการเกิดอันตรกริยา (interaction) ระหว่างสารกับตัวดูดซับ (absorbent) ซึ่งเป็น stationary phase ซึ่งตัวดูดซับอาจจะถูกบรรจุในคอลัมน์หรือเคลือบบนแผ่นผิว โดยหลักการที่ว่า solute และ solvent จะแข่งขันกันการจับกับตำแหน่งบนผิวของ stationary phase ซึ่งทั่วไปจะใช้ silica gel, alumina หรือถ่าน เป็นของแข็งที่มีรูพรุน และจากการที่ stationary phase ทำหน้าที่เป็น absorber ที่ดายตัว (rigid) ทั้งโครงสร้างและตำแหน่งของขั้ว จึงทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะที่จะใช้แยกสารที่เป็น polar group หรือสารละลายพวกน้ำเนื่องจากน้ำจะถูกดึงดูด (absorp) ที่ stationary phase ได้เร็วมาก

4. Ion-Exchange Chromatography

เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลที่มีประจุหรือโมเลกุลที่มีความสามารถในการแตกตัวให้ประจุออกจากกัน โดย gel matrix ที่มีประจุตรงกันข้ามซึ่งอยู่ที่ผิวของ stationary phase และ ion ใน mobile phase จะมีประจุเหมือนกับ ion ที่ต้องการแยก และ ion นี้จะรวมกับ group ที่อยู่บนผิวของ gel matrix ในลักษณะ ion pair เพื่อให้ประจุสู่สมดุลย์ และสามารถถูกแทนที่ด้วยโมเลกุลอื่นที่มีความสามารถในการจับกับเรซินได้ดีกว่าเข้ามาแข่งขันแย่งจับ ถ้าไอออนของสารตัวอย่างในสารละลายมีประจุที่แรงกว่า counter ion ก็จะเข้าไปแทนที่ counter ion โดยจับกับ ionic group ของอนุภาคเกิด ion-pair แทน

Stationary phase เป็นของแข็งที่มีหมู่ที่มีประจุที่ต่อกันด้วยพันธะทางเคมีที่เรียกว่า Ion exchange resin หรือตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchanger)

Mobile phase ใช้สารละลาย buffer มี counter ion ที่มีประจุตรงข้ามกับ ionic charge ของอนุภาค

ตัวแลกเปลี่ยนอิออน (Ion-exchanger)

1.เป็นสารพวกเรซินสังเคราะห์ (Synthetic resin) หรือ polysaccharide เช่น Cellulose, detran, agarose สารเหล่านี้มีรูพรุนซึ่งจะเป็นผลดีในการเพิ่มพื้นที่ผิวของแลกเปลี่ยนประจุ

2. เป็นสารที่ไม่ละลาย (insoluble matrix) และเป็นสารเฉื่อย

3. การนำเรซินมาปรับแต่งโครงสร้างให้เกิด covalent bond กับ Functional group เรียกว่า Ligand

เรซินแบ่งเป็น 2 กลุ่ม

1. แคทอิออนเอกซ์เชนจ์เรซิน (Cation exchange resin)

เป็นเรซินชนิดแลกปลี่ยนประจุบวก (+) ได้แก่ sulfonic group (SO_3^{2-}), Carboxyl group ทำหน้าที่เป็นหมู่ที่มีประจุลบ

ตัวแลกเปลี่ยนอิออนที่นิบมใช้ในกลุ่มนี้ได้แก่ Carboxymethyl cellulose)

2. แอนอิออนเอกซ์เชนจ์เรซิน (Anion exchange resin หรือ Anion exchanger)

เป็นเรซินชนิดแลกปลี่ยนประจุลบ (-) ซึ่ง Counter ion จะต้องมีประจุลบ (anion, -) เรซินในกลุ่มนี้ได้แก่พวกอนุพันธ์ของแอมโมเนีย เช่น DEAE cellulose (Diethylaminoethyl cellulose) quaternary amino group, aromatic or aliphatic amino group) ซึ่งทำให้ตัวแลกเปลี่ยนไอออนเป็นพวก weakly basic anion exchanger

การปรับสภาพเรซินและการรักษา (Regenerate resin and Storage)

- ล้าง Cathion exchange resin ด้วยกรด
- ล้าง Anion exchange resin ด้วยด่าง
- ทำให้แห้ง
- การใส่สารป้องกันจุลินทรีย์ ต้องเป็นสารที่ไม่แตกตัวเป็นอิออน

ข้อจำกัดของ ion-exchange chromatography

1. ที่ความเข้มข้นต่ำและอุณหภูมิปกติ การแลกประจุจะเพิ่มขึ้นเมื่อวาเลนซีเพิ่มขึ้น $Na^+ < Ca^{2+} < Al^{3+} < Th^{4+}$

2. ที่ความเข้มข้นต่ำและอุณหภูมิปกติ การแลกเปลี่ยนประจุจะเพิ่มขึ้นเมื่อ atomic number เพิ่มขึ้น $Li^+ < Na^+ < K^+$, $Zn^{2+} < Ba^{2+}$

3. ที่ความเข้มข้นสูง การแลกเปลี่ยนประจุจะลดลงถ้าค่า activity coefficient สูงขึ้น การแลกเปลี่ยนจะมากขึ้น และในบางกรณีไอออนที่มีประจุต่ำจะมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนได้สูงขึ้น เช่น $Na^+ < Ca^+$

4. การแลกเปลี่ยน potential ของ H^+ และ OH^- ions ขึ้นกับ functional group และ hydrogenหรือ hydroxyl ion ถ้าความแรงของกรดและด่างเพิ่มขึ้นการแลกเปลี่ยนประจุจะลดลง

5. ไอออนของสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ หรือสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะด่างๆ ที่

เป็นแอนไอออนสามารถแลกเปลี่ยนไอออนกับเรซินได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากเกิดแรงทาง ไฟฟ้าสถิตย์และแรงแวนเดอวอลล์

6. ที่อุณหภูมิสูงๆ ในสารละลายที่ไม่ใช่น้ำหรือสารละลายที่รับความเข้มข้นสูงๆ การแลกเปลี่ยนของไอออนที่มีประจุเหมือนกันไม่เพิ่มขึ้นตามน้ำหนักอะตอมหรือน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้น

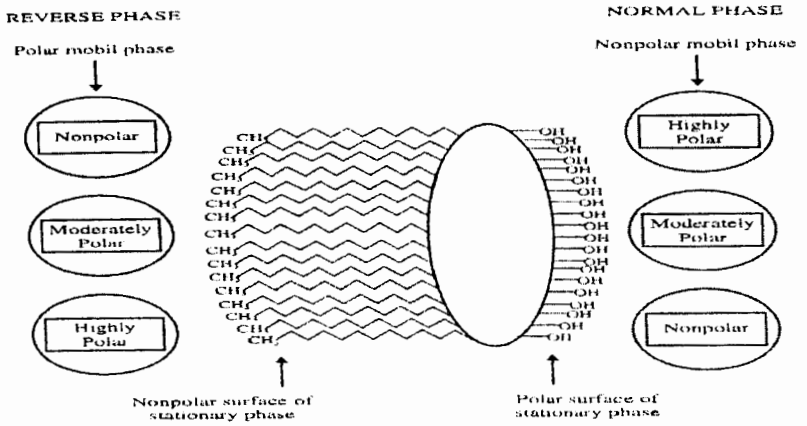
การประยุกต์ใช้ Ion exchange chromatography ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหาร

1. แยกโลหะต่างๆ โดยทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนชนิดแอนไอออนกับคลอไรด์ไอออน หลังจากนั้นใช้สารละลายไล่โลหะต่างๆ ออกจากคอลัมน์โดยควบคุมความเข้มข้นของคลอไรด์ไอออน เช่นสารหนู โครเมียม ตะกั่ว สังกะสี ต้องใช้เรซินที่สังเคราะห์พิเศษสำหรับไล่โลหะพิษ

2. การแยกกรดอะมิโน โดยควบคุม pH ของสารละลายที่จะไล่ที่กรดอะมิโนจากคอลัมน์ใช้กับสารประกอบที่มีประจุหรือสารที่แตกตัวให้ประจุ

3. การทำน้ำบริสุทธิ์ น้ำประปามีแร่ธาตุหลายชนิดปนอยู่ เช่น เหล็ก ตะกั่ว แมงกานีส แมกนีเซียม โซเดียม โปแตสเซียม และแคลเซียม คือ มีทั้งแคทไอออน และแอนไอออน วิธีแยกโดยผ่านน้ำลงบนคอลัมน์ที่มีแคทไอออน และแอนไอออนเรซินที่เป็นชนิดกรดแก่ และเบสแก่ในรูป H^+ และ OH^- เช่น ถ้าน้ำมีแมกนีเซียมคลอไรด์ปนอยู่ Mg^{+2} จะแลกเปลี่ยน H^+ จากแคทไอออนได้ H^+ 2 ตัว และ Cl^- 2 ตัวจาก $MgCl_2$ จะแลกเปลี่ยนไอออน OH^- จากแอนไอออนเรซินได้ OH^- 2 ตัวเช่นกัน ดังนั้น แมกนีเซียมไอออนและคลอไรด์ไอออนจะเกาะอยู่กับเรซินในคอลัมน์ น้ำที่ออกจากคอลัมน์จะเป็นน้ำบริสุทธิ์ไม่มีโลหะออกมา

4. การแยกเกลือ



ภาพที่ 9.1 แสดงสภาวะของเฟสเคลื่อนที่

ที่มา ; Dennis D. Miller, 1998

ทฤษฎีที่ใช้อธิบายเกี่ยวกับการแยกสาร โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี

ทฤษฎีนี้ได้สมมติว่าคอลัมน์แบ่งออกเป็นโซนๆ (Zone) เรียกว่า theoretical plates ความสูงแต่ละโซน หรือ height equivalent to theoretical plate (HETP)
มี 2 ทฤษฎี คือ

1. Height equivalent to a theoretical plates (HETP) ผู้ที่นำเอาทฤษฎีนี้มาใช้เกี่ยวกับ partition chromatography คือ Martin และ Synge ทฤษฎีนี้สมมุติว่า column แบ่งออกเป็น 2 zone **เรียกว่า theoretical plate (HETP)** และหาได้โดยสมมุติว่าในแต่ละชั้นจะเกิดสมดุลที่สมบูรณ์ ระหว่าง Gas phase และ liquid phase ซึ่งประสิทธิภาพของ column สามารถหาได้จากจำนวน plate (N) หรือความสูงของ zone

$$H = L/N$$

L = length of column

ใน GC ค่า H จะต่ำกว่า 1-3 มม.

ใน HPLC ค่า Hจะต่ำกว่าค่า H ใน GC ประมาณ 1-2 เท่า

สรุป column ที่มี efficiency สูงต้องมี N สูง

สรุป column ที่มี efficiency สูงต้องมี H ต่ำ

สำหรับ plate theory จะบอกให้รู้ว่า ถ้าอัตราไหลของแก๊สตัวพา (flow rate) เพิ่มขึ้น HETP จะมีค่าน้อยลง

2. Rate Theory เนื่องจาก plate theory ไม่สามารถอธิบายกลไกในการหาแฟคเตอร์ต่างๆ และกระบวนการเกิดแถบที่กว้าง (band broadening process) ของ chromatogram

จึงต้องใช้ทฤษฎีเกี่ยวกับอัตราความเร็ว (Rate theory) อธิบายลักษณะของ chromatogram ทฤษฎีนี้ขึ้นกับตัวแปรต่างๆ เช่น อัตราการถ่ายเทมวลระหว่าง stationary phase และ mobile phase อัตราการแพร่กระจายของตัวถูกละลายใน column อัตราการไหลของแก๊สและhydrodynamic ของ mobile phase

การที่แต่ละ zone จะแยกออกจากกันได้มากน้อยเพียงใดย่อมขึ้นอยู่กับตัวแปร 3 ชนิด คือ

1. **การแพร่กระจายแบบธรรมดา (ordinary diffusion)** เกิดจากความแตกต่างระหว่างบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงกับความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น จึงเกิดการเคลื่อนที่ของสารจากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำไปในทิศทางตามคอลัมน์ การ

แพร่กระจายแบบนี้เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลหลังจากที่โมเลกุลได้มีการชนกันแล้ว

2.การแพร่กระจายแบบ Eddy (Eddy diffusion) เกิดจากความแตกต่างของการไหลของ mobile phase ไปในทิศทางต่างๆ สารตัวอย่างที่ถูกแยกจะเลือกเคลื่อนที่ไปในทิศทางต่างๆด้วย mobile phase ซึ่งจะพาสารไปได้เร็วในทางที่กว้าง เคลื่อนที่ช้าในทางไหลที่แคบ เมื่อสารเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์จะทำให้บางโมเลกุลของสารเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าและได้ระยะทางมากกว่า บางโมเลกุลอาจเคลื่อนที่ไปได้ช้าและได้ระยะทางสั้นกว่า กระบวนการแพร่กระจายแบบ Eddy diffusion จึงเป็นผลจากการไหลของสารตัวอย่างไหลในคอลัมน์ที่มีช่องว่างที่ไม่สม่ำเสมอและอนุภาคที่จะวิเคราะห์มีขนาดต่างๆกัน

3. ความไม่สมดุลเฉพาะแห่ง (Local Equilibrium) เนื่องจากอัตราการเกิดสมดุลย์ดลอดคอลัมน์แตกต่างกัน เป็นผลให้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เคลื่อนที่มาก่อนส่วนกลางและส่วนท้ายแตกต่างกัน ฉะนั้นในส่วนของคอลัมน์แต่ละส่วนจะพยายามทำให้เกิดสมดุลย์ด้วยการเปลี่ยนความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เช่นบางครั้งความเข้มข้นเพิ่มขึ้น บางครั้งความเข้มข้นลดลง ในกระบวนการนี้จะเกิดความไม่สมดุลขึ้นในแต่ละ theoretical plate ถ้าให้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นจะเป็นการเพิ่มความไม่สมดุลให้เกิดมากขึ้น

Column efficiency

การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี แถบที่แยกได้บางครั้งแคบ (sharp) บางครั้งกว้าง (broad) ทั้งนี้เนื่องจากการกระจายของโมเลกุลของสารที่ทำการแยกเกิดการเบี่ยงเบนเกิดจากความไม่สมดุลระหว่าง stationary phase กับ mobile phase เรียกว่า การด้านทานการไหลของสาร (resiatance to mass transfer)

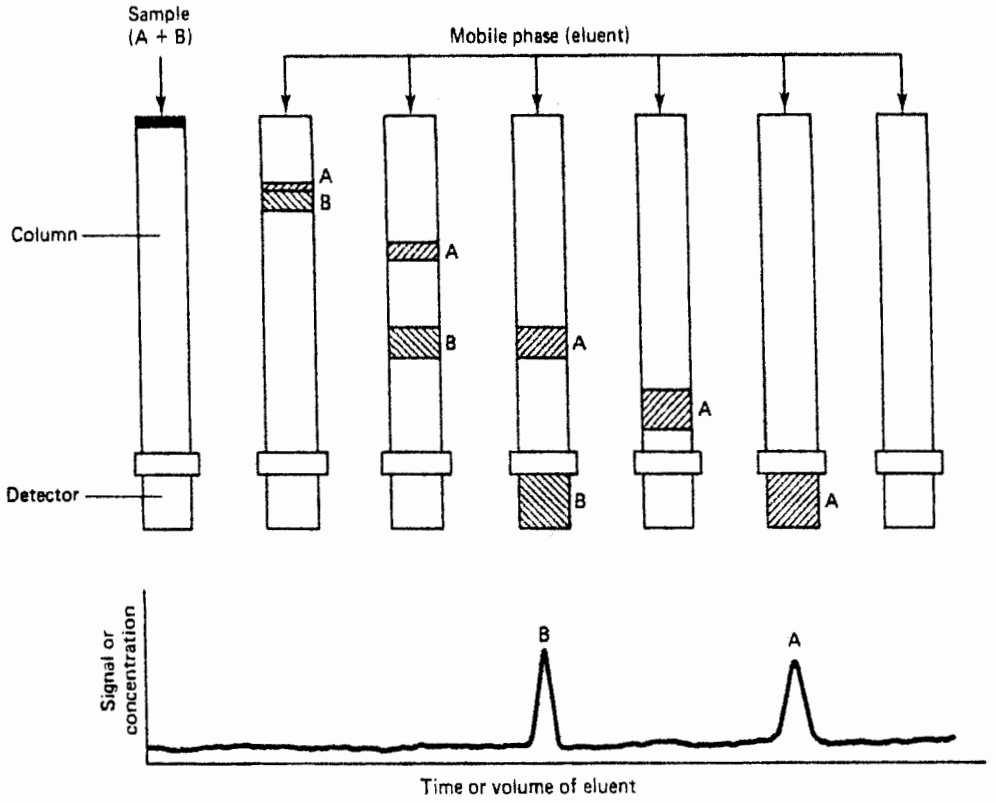
การไหลของโมเลกุลในระยะทางที่แตกต่างกันจะมีสาเหตุมาจากลักษณะของอนุภาคของสารที่บรรจุใน column และอีกสาเหตุหนึ่งคือการแพร่ในแนวการไหลของ mobile phase การวัด column efficiency โดยดูจากค่า theoretical plates (N)

$N = (t_r / w)^2$

t_r = retention time

w = ความกว้างของฐาน peak

สมมุติ column เกิดจาก plates หลาย plates มารวมกันแต่ละ plate จะเกิดสมดุลของการกระจายของตัวถูกละลายระหว่าง stationary phase และ mobile phase ถ้า N มีค่ามาก column efficiency จะดีขึ้น



ภาพที่ 9.2 แสดงการเจือจางสารละลายใน mobile phase

ที่มา : Larry G. Hargis, (1988)