บทที่ 6
การหาปริมาณ alcohol ในผลิตภัณฑ์สารให้กลิ่นรส โดยเทคนิค Gas Chromatography

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเรียนรู้การใช้งานเครื่อง Gas Chromatograph
2. เพื่อเรียนรู้วิธีการหาปริมาณ alcohol ในผลิตภัณฑ์สารให้กลิ่นรสโดยใช้เทคนิค Gas Chromatograph

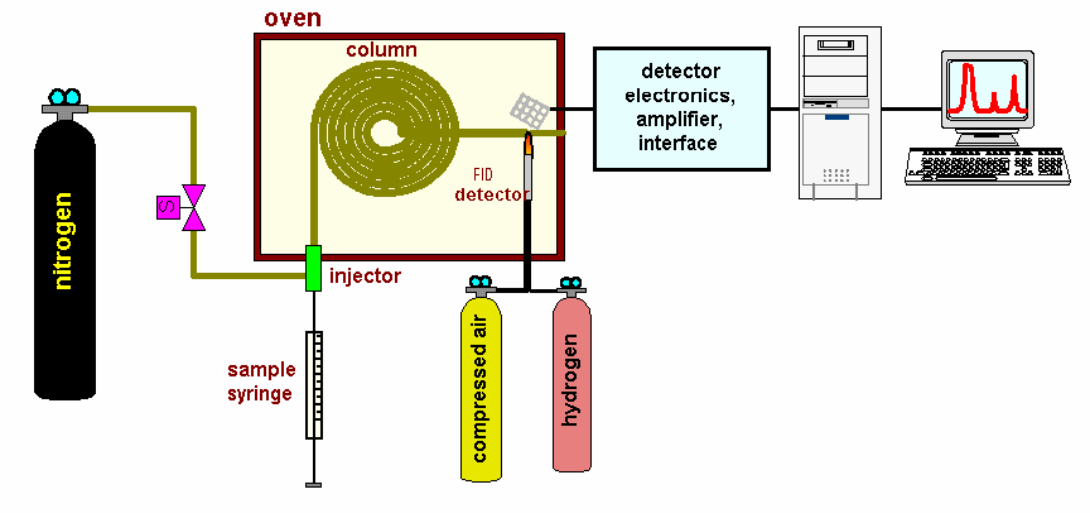
---

แก๊สโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์องค์ประกอบของสารในของผสมที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ที่อุณหภูมิพอเหมาะ

เทคนิคโครมาโตกราฟีทุกประเภทจะมีหลักการทำงานที่คล้ายคลึงกัน คือ ทำการแยกองค์ประกอบของสารที่กระจายอยู่ระหว่างเฟสที่ไม่ผสมกันสองเฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) องค์ประกอบของสารตัวอย่างซึ่งมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างจากเฟสทั้งสองจะเคลื่อนที่ผ่านด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน เมื่อองค์ประกอบของสารเคลื่อนที่ผ่านออกมาจากระบบจะถูกชะแล้วผ่านไปยังเครื่องตรวจวัดซึ่งจะทำการรายงานผลออกมาในรูปแบบของโครมาโตแกรมเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป สิ่งที่ทำให้เทคนิคโครมาโตกราฟีแต่ละเทคนิคมีความแตกต่างกันคือเฟสเคลื่อนที่สำหรับแก๊สโครมาโตกราฟีจะมีเฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส

นอกจากการจำแนกประเภทของเทคนิคโครมาโตกราฟีด้วยเฟสเคลื่อนที่แล้ว ยังสามารถใช้เฟสอยู่กับที่ในการแยกย่อยประเภทของแก๊สโครมาโตกราฟีได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. แก๊สโครมาโตกราฟีแบบของแข็ง (Gas-solid chromatography, GSC) โครมาโตกราฟีประเภทนี้จะใช้ของแข็ง เช่น ซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ กลไกการแยกสารที่เกิดขึ้นเป็นแบบการดูดซับ ดังนั้นการแยกสารจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการดูดซับของสารที่บรรจุในคอลัมน์

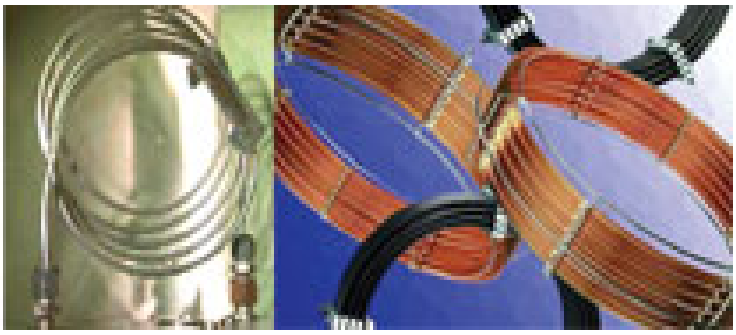


ภาพที่ 6.1 องค์ประกอบของเครื่อง Gas Chromatograph

ที่มา : http://www.LAB_TODAY.GC.htm

ลักษณะของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีโดยทั่วๆ ไป จะประกอบด้วยส่วนต่างๆ 4 ส่วนดังนี้

1. Gas supply unit แก๊สที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่จะต้องเป็นแก๊สเฉื่อย โดยปกติแล้วจะใช้ไนโตรเจน ฮีเลียม อาร์กอน หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการเลือกชนิดของแก๊สจะขึ้นกับชนิดของเครื่องตรวจวัด เฟสเคลื่อนที่นี้จะถูกนำเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีผ่านทางตัวควบคุมอัตราการไหลเพื่อรักษาให้มีอัตราการไหลคงที่ถ้าอัตราการไหลมีการเปลี่ยนแปลงไปเพียง 1 เปอร์เซ็นต์จะทำให้เวลาในการหน่วงเหนี่ยวเปลี่ยนไป 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจะให้ความแม่นยำมีค่าไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์จะต้องทำการควบคุมอัตราการไหลให้มีการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเรื่องยากในการควบคุมเพราะเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการทำโปรแกรมอุณหภูมิก็จะส่งผลต่อการ

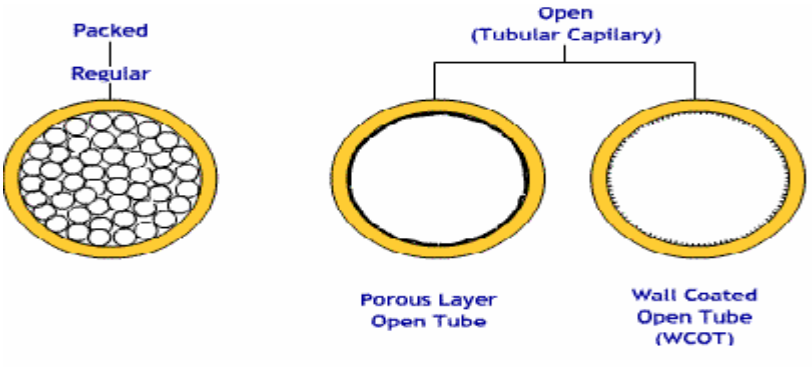


ภาพที่ 6.2 ชนิดของคอลัมน์

ซ้าย : แพ็คคอลัมน์ (pack column)

ขวา : แคปิลารีคอลัมน์ (capillary column)

ที่มา : http://www.chromatography-online.org.

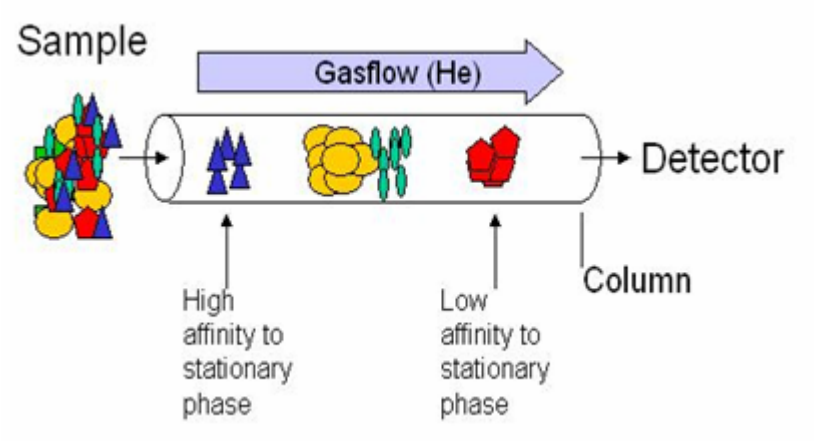


ภาพที่ 6.3 ภาพตัดขวางของโครงสร้างภายในของคอลัมน์ที่ใช้ในเครื่อง GC

ซ้าย : packed column

ขวา : capillary column

ที่มา : http://www.chromatography-online.org.



ภาพที่ 6.4 การแยกองค์ประกอบของสารภายในคอลัมน์ของเครื่อง GC

ที่มา : http://www.chromatography-online.org.

3. **Detector unit** เครื่องตรวจวัดเป็นอุปกรณ์ชิ้นสุดท้ายของแก๊สโครมาโตรกราฟี ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสารที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์แล้วส่งสัญญาณไฟฟ้าไปยังระบบประมวลผลซึ่งในปัจจุบันจะใช้ระบบการควบคุมผ่านทางคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะให้รายละเอียดของโครมาโตแกรม ข้อมูลของพีค (พื้นที่ ความสูง ความกว้าง เป็นต้น) การสอบเทียบ การคำนวณ การรายงานผล และสถิติเครื่องตรวจวัดมีหลายประเภท แต่ละประเภทมีลักษณะเฉพาะตัวแปรในการทำงาน และประสิทธิภาพที่แตกต่างกันออกไป ในตารางที่ 6.1 แสดงเครื่องตรวจวัดทั่วๆ ไปที่ใช้ในเครื่องมือแก๊สโครมาโตกราฟีเครื่องตรวจวัดและท่อที่เชื่อมระหว่างคอลัมน์กับเครื่องตรวจวัดจะต้องรักษาอุณหภูมิให้สูงกว่าอุณหภูมิของตู้อบไม่เกิน 15 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเกิดการควบแน่นตรงบริเวณท่อหรือเครื่องตรวจวัดซึ่งจะส่งผลให้เกิดสัญญาณรบกวนและลดประสิทธิภาพในการตอบสนองของเครื่องตรวจวัดได้

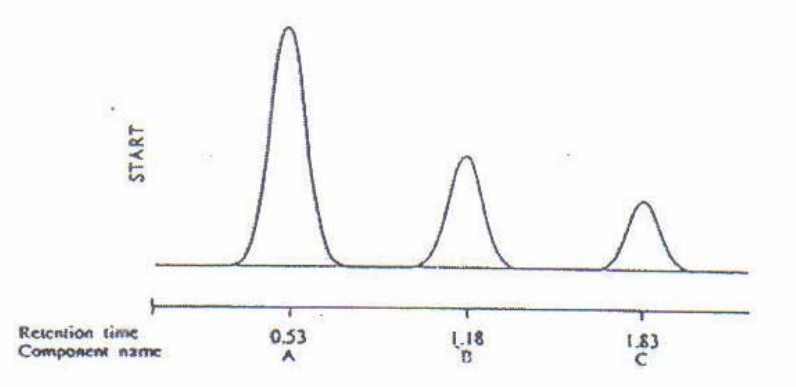
ตารางที่ 6.1 เครื่องตรวจวัดทั่วๆ ไปที่ใช้ในเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

เครื่องตรวจวัด	ประเภท	Support gases	การเลือกจำเพาะ	ความสามารถในการตรวจวัด	Dynamic range
Flam Ionization (FID)	Mass flow	ไฮโดรเจนและอากาศ	สารประกอบอินทรีย์โดยส่วนใหญ่	100 pg	107
Thermal Conductivity (TCD)	ความเข้มข้น	สารมาตรฐาน	ใช้งานได้ทั่วๆ ไป	1 ng	107
Electron Capture (ECD)	ความเข้มข้น	Make-up	แฮไลด์ ไนเตรต ไนไตร เปอร์ออกไซด์ แอนไฮไดรด์ โลหะอินทรีย์	50 fg	105
Nitrogen-Phosphorus	Mass flow	ไฮโดรเจนและอากาศ	ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส	10 pg	106
Flame Photometric (FPD)	Mass flow	ไฮโดรเจน อากาศ ออกซิเจน	กำมะถัน ฟอสฟอรัส ดีบุก โบรอน อาร์เซนิก เจอร์มาเนียม เซเลเนียม โครเมี่ยม	100 pg	103
Photo Ionization (PID)	ความเข้มข้น	Make-up	อะลิฟาติกส์ อะโรมาติกส์ คีโตน เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ เอมีน เฮเทอโรไซคลิก organosulphurs และโลหะอินทรีย์ บางประเภท	2 pg	107

แก๊สโครมาโตกราฟีให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูงความหลากหลายในการเลือกใช้เฟสอยู่กับที่ทำให้มีคุณสมบัติการหน่วงเหนี่ยวสารที่แตกต่างกันส่งผลให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้เป็นจำนวนมาก เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในแก๊สโครมาโตกราฟีมีความไวสูง สามารถตรวจวัดสารประกอบได้อย่างถูกต้อง แม่นยำเนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส จึงสามารถต่อ เข้ากับ mass spectrometer ทำให้แก๊สโครมาโตกราฟีกลายเป็นเครื่องมือในการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มสูงมากขึ้น

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

Retention time (RT) คือ เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์นับจากเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์ถึงตำแหน่งเวลาที่ detector อ่านสัญญาณสูงสุด (peak) จากการตรวจวัดสารนั้นๆ ดังแสดงในภาพที่ 6.5



ภาพที่ 6.5 Chromatogram ที่แสดง retention time ขององค์ประกอบ A,B และ C

โดย retention time เป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิดในสภาวะการวิเคราะห์เดียวกันทั้งชนิดของคอลัมน์ และอุณหภูมิที่ใช้ ค่า retention time ของสารชนิดเดียวกันที่วิเคราะห์ได้ควรจะต้องคงที่หรือมีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังนั้นการตรวจพิสูจน์ชนิดของสารองค์ประกอบใด ๆในของผสมตัวอย่างสามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารองค์ประกอบในของผสมตัวอย่าง (unknown) กับสารองค์ประกอบมาตรฐานดังแสดงในภาพที่ 6.6

ปริมาณของสารตัวอย่าง

ปริมาณของสารตัวอย่างมีความสำคัญอย่างมากในการวิเคราะห์ซึ่งถ้าฉีดสารตัวอย่างเข้าไปมากเกินไปจะทำให้เกิด column overloaded ซึ่ง พีกที่ตรวจวัดได้จะเปลี่ยนไป ทำให้ค่า retention time เปลี่ยนไป ดังแสดงในภาพที่ 6.7 ซึ่งต้องลดขนาดของสารตัวอย่างลงให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์เพื่อแก้ไขปัญหานี้

ภาพที่ 6.6 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยการเปรียบเทียบ ค่า retention time ของสารตัวอย่างกับสารองค์ประกอบมาตรฐาน

ภาพที่ 6.7 ผลกระทบของการฉีดปริมาณสารตัวอย่างที่มีต่อ retention time

A. เมื่อคอลัมน์ไม่ overloaded

B. เมื่อคอลัมน์มี overloaded เล็กน้อย

C. เมื่อคอลัมน์มี overloaded มาก

อุณหภูมิของคอลัมน์

อุณหภูมิของคอลัมน์มีส่วนสำคัญต่อการแยกสารตัวอย่างดังแสดงในภาพที่ 6.8

ภาพที่ 6.8 ผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อ retention time

เมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์เพิ่มขึ้นจะทำให้องค์ประกอบของสารมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้น ช่วยให้การวิเคราะห์เร็วขึ้น ในขณะที่เมื่ออุณหภูมิของคอลัมน์ลดลงจะช่วยให้เกิดการแยกองค์ประกอบต่าง ๆดีขึ้น ดังนั้นเพื่อให้เกิดการแยกที่ดี และมี retention time ไม่นานเกินไปควรเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเลือกใช้อุณหภูมิเฉลี่ยของจุดเดือดของสารตัวอย่างนั้น ๆแต่ควรระวังไม่ให้สูงเกินกว่าอุณหภูมิของ packing ที่จะทนได้

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย GC ได้รับความนิยมสูงมากโดยเทคนิคต่าง ๆที่ใช้ในการหาปริมาณของสารมี 3 เทคนิคคือ

1. วิธี normalization
2. วิธี external standardization

3. วิธี internal standardization

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย Internal standardization method

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย Internal standardization method เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณสารได้ถูกต้องที่สุด แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ internal standard โดยสารที่จะใช้เป็น internal standard นั้นต้องมีคุณสมบัติดังนี้

1. สารนั้นต้องมีคุณสมบัติคล้ายกับสารที่จะวิเคราะห์
2. สารนั้นต้องถูกชะออกจากคอลัมน์หมด
3. สารนั้นต้องให้ peak ที่แยกอยู่ต่างหากโดย peak จะไม่ซ้ำหรือเหลื่อมทับ peak อื่นๆและอยู่ใกล้ peak ที่ต้องการหา
4. สารนั้นต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่เกี่ยวข้อง

ภาพที่ 6.9 ให้ methanol เป็นตัวทำละลาย (peak 1)

ให้ iso-propanol เป็น internal standard (peak 2)

ให้ t-butyl alcohol เป็นสารมาตรฐานซึ่งต้องมีหลายความเข้มข้น (peak3) และ peak ที่ 4 เป็น t-butyl alcohol ที่ไม่ทราบความเข้มข้น

ภาพที่ 6.9 Chromatogram ของสารมาตรฐาน a, b, c และสารตัวอย่าง x

จาก chromatogram สามารถหาอัตราส่วนของพื้นที่ peak (ratio peak area)ได้คือ

อัตราส่วนพื้นที่ peak = พื้นที่ peak ของสารมาตรฐาน / พื้นที่ peak ของ internal standard

หรือ

อัตราส่วนพื้นที่ peak = พื้นที่ peak ของ t-butyl alcohol / พื้นที่ peak ของ iso-propanol

เมื่อเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ peak กับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐาน t-butyl alcohol จะได้ calibration curve ดังภาพที่ 6.10

ภาพที่ 6.10 Calibration curve ของสารมาตรฐาน

การตรวจหาปริมาณแอลกอฮอล์ในสารให้กลิ่นรส โดย

Gas Chromatographic methods

วิธีนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณแอลกอฮอล์ใน almond , lemon, orange และ lime extract

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- **เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี**

detector : Flame Ionization Detector (FID)

column : Chromosorb 102 ซึ่งมีขนาดของอนุภาค 100-120 เมส

อุณหภูมิของคอลัมน์ : 160^0ซ (isothermal)

อุณหภูมิของ detector และ injector : 200^0ซ

อัตราการไหลของ He: 50 มิลลิลิตร/นาที

retention time ของ EtOH , n – PrOH และ tetrahydrofuran มีค่าเท่ากับ 1.00 , 2.06 และ 3.04

- **การเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐาน**

ปิเปต absolute alcohol ปริมาณ 5 , 10 , 15 และ 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย แอลกอฮอล์มาตรฐานความเข้มข้น 5, 10 , 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์

- ปิเปตสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน volumetric flask ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- เติม n - PrOH เพื่อใช้เป็น internal standard ปิดฝาทันที และ เขย่าเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- ฉีดสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐานในปริมาณ 0.1 μl โดยใช้ microsyringe ขนาด 1 ไมโครลิตร

- หาพื้นที่ใต้กราฟ จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่ (R) ของ EtOH และ n-PrOH แล้ว plot graph ความสัมพันธ์ระหว่างค่า R และค่า % EtOH
- หาปริมาณ แอลกอฮอล์ในตัวอย่างเหมือนกับวิธีการที่ใช้กับ standard แต่ก่อนที่จะฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง GC ให้เขย่าเป็นเวลา 10 นาที
- ถ้าตัวอย่างมีปริมาณ EtOH มากกว่า 20% ให้ปิเปตตัวอย่างปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask เติม tetrahydrofuran ในปริมาณ 20 มิลลิลิตรจากนั้นเติม n – PrOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

คำนวณหา % EtOH ได้จากความสัมพันธ์

% EtOH = (EtOH peak area / n – PrOH peak area) x (1.00 / slope) x F

F = 1 (undilute sample)

= 5 (dilute sample)