

CH 210 Chromatography

ผศ.ดร. สุภาพร แสงศรีจันทร์

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

1

- 1940s Ion exchange partition and column chro. และ เริ่มต้นเทคนิค gas chromatography
- 1950s มีผลงานของ gas adsorption chr. และ gas liquid Chr. (partition)
- partitioning of chromatography โดย Martin and Synge แห่ง the Wool Industries Research Association, Leeds, England ทำให้ได้รับรางวัล Nobel Prize สาขา Chemistry ในปี 1952
- 1960s พัฒนาการใช้งานของเทคนิคโครมาโทกราฟี ในด้าน เคมี ชีวเคมี การแพทย์ เกษษ ฯลฯ
- 1969 มีเครื่อง HPLC ขายเป็นครั้งแรก
- มีการพัฒนามีม ชนิดของอนุภาคบรรจุ และตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ ทำให้ เทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้งานได้กว้างขวางกว่า เทคนิค GC
- Tiselius (Sweden) ได้รับรางวัล Nobel Prize จากงานด้าน Electrophoresis

3

3

ประวัติ

- 1906 Michael Tswett แยกสารที่สีในพืชด้วยผงขอสลด์ และวัตถุอื่นๆ เช่น แป้ง น้ำตาล polysaccharides, sucrose, Indulin



https://en.wikipedia.org/wiki/Mikhail_Tsvet

- 1930s Lederer และกลุ่มวิจัยอื่นๆ ได้ทำการวิเคราะห์ carotenoids, xanthophylls
- 1937 มีหนังสือ Chromatography เล่มแรก เขียนโดย Zech Meister

มีการพัฒนา Paper & column chromatography

2

2

ความหมายของโครมาโทกราฟี

Chromatography = Chroma + Graphein
สี การเขียน

chromatography ตามคำจำกัดความของ IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

A method used primarily for the separation of components of a sample, in which the components are distributed between two phases, one of which is stationary phase, while the other moves in a definite direction

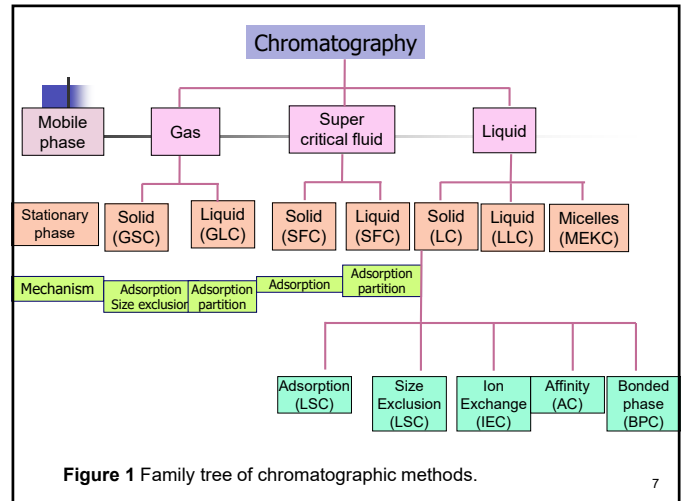
4

4

ความหมายของศัพท์ทางโครมาโทกราฟี

- Stationary phase = เฟสคงที่
- Mobile phase = เฟสเคลื่อนที่
- Elution = ขบวนการชะ พาสารออกจากคอลัมน์
- Eluate = สารที่ถูกชะ พาสารออกจากคอลัมน์
- Eluent = สารที่ชะ พาสารออกจากคอลัมน์
- Solid support = อนุภาคของแข็งที่ช่วยยึดเฟสคงที่ที่เป็นของเหลว
- Packings = อนุภาคของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์
- Retention time = เวลาที่สารใช้ในคอลัมน์

5

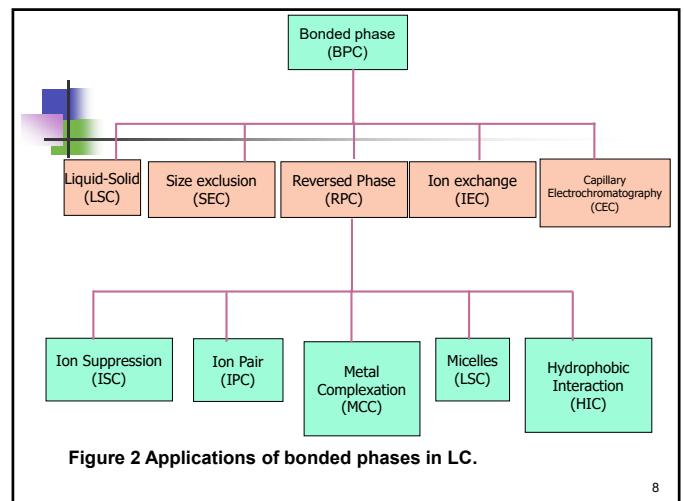


7

การแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี

chromatography

6

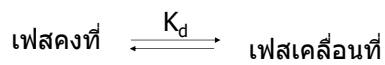


8

ทฤษฎีโครมาโทกราฟี (Chromatographic Theory)

โครมาโทกราฟี เป็นวิธีแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายขององค์ประกอบ ระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

โมเลกุลของสารที่ถูกแยกจะกระจายตัวในระหว่างเฟส 2 เฟส การกระจายตัวนี้ขึ้นกับค่า สัมประสิทธิ์ของการกระจายตัว (K_d)



Distribution Coefficient (K_d),
 K_d = ค่าคงที่ของการกระจายตัว

9

โครมาโทกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์ (liquid column chromatography)

โครมาโทกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์แบ่งตามกลไกในการแยกสารได้ 4 แบบ คือ

1. Liquid liquid chromatography (LLC)(partition chromatography)
2. Liquid solid chromatography (LSC) (adsorption chromatography)
3. Ion-exchange chromatography
4. Exclusion chromatography

11

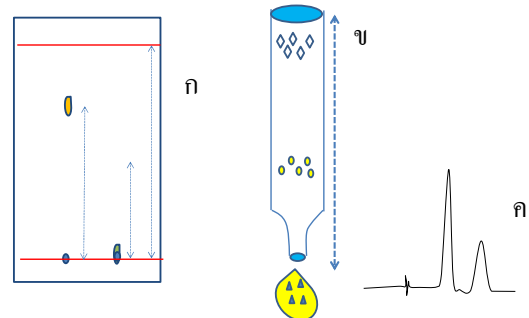
1. Chromatography

Liquid chromatography
Gas Chromatography

Liquid Chromatography

1. Paper chromatography
2. Thin layer chromatography
3. Open column chromatography

0



โครมาโทกราฟีแบบ (ก) กระดาษ (ข) คอลัมน์ (ค) โครมาโทแกรม

12

Paper Chromatography

- แบ่งตามสถานะของเฟสทั้งสองเป็นโครมาโทกราฟีแบบ Liquid-liquid chromatography
- แบ่งตามกลไกการแยกคือ partition chromatography
 - แบ่งได้อีก 2 ชนิด
 - Normal phase chromatography
 - Reversed phase chromatography

13

13

วิธีทำ

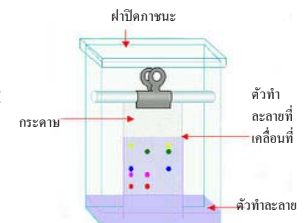
1. การ spot สาร นำกระดาษโครมาโทกราฟีมาวัดระยะห่างจากขอบประมาณ 1.5-2.0 ซม. หยดสารละลายเป็นจุดเล็กๆ และเข้มข้น
2. การ Developing นำกระดาษกรอง หรือ แผ่นTLC ที่มีสารอยู่ นำมาใส่ลงใน Chamber ที่มีตัวอิลูทที่อิมมิดของไอสารอยู่

- Ascending development

- Descending development

• 1-dimension

• 2-dimension



15

Normal phase chromatography

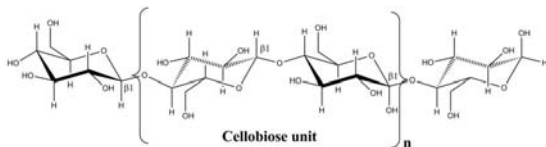
Stationary phase มีความขี้้นมากกว่า mobile phase

- Stationary phase : น้ำ ซึ่ดเกาะบนเยื่อกระดาษ (6-12%)
- Mobile phase: Solvent ที่มี polarity < น้ำ

Reversed phase chromatography

Stationary phase มีความขี้้นน้อยกว่า mobile phase

- Stationary phase : นำกระดาษมาอบไล่ น้ำ แล้วชุบด้วยตัวทำละลายอื่นๆ
- Mobile phase: Solvent ที่มี polarity สูงกว่า st.ph.



14

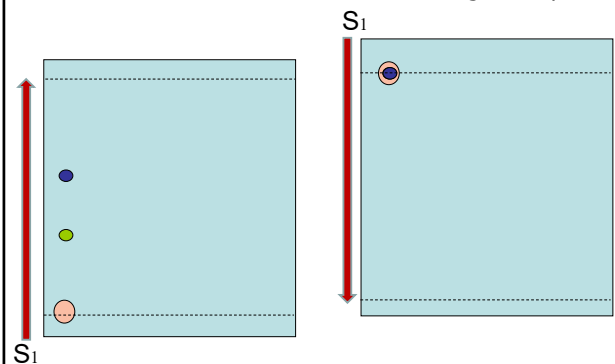
<http://www.intechopen.com/books/liquid-gaseous-and-solid-biofuels-conversion-techniques/hydrotreating-catalytic-processes-for-oxygen-removal-in-the-upgrading-of-bio-oils-and-bio-chemicals>

14

1-dimension PC, TLC

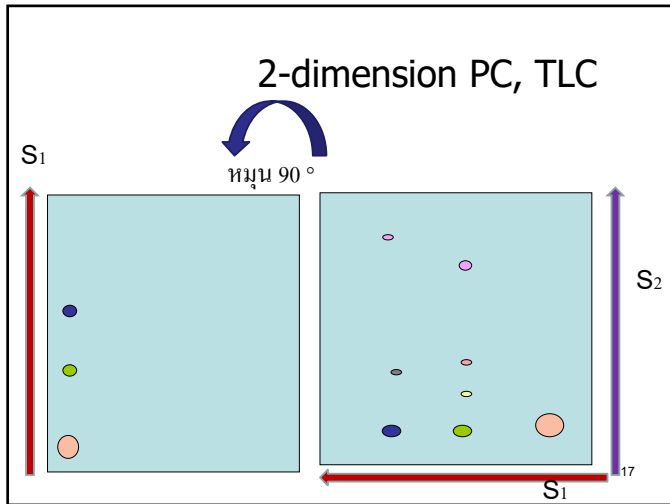
Ascending development

Descending development



16

16



17

การทำคุณภาพวิเคราะห์

โดยการเปรียบเทียบค่า R_f หรือ ค่า $(R_f)_r$ ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

R_f : Retardation factor

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} = \frac{Y}{X}$$

a=สารตัวอย่าง

b=สารมาตรฐาน

X= ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

Y= ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่

Z= ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่

$(R_f)_r$: Relative retardation factor
ค่าการหน่วงสัมพัทธ์

$$R_{fr} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่}} = \frac{Y}{Z}$$

19

19

3 Detection

หลังจากการแยกตัวทำละลายให้แห้งแล้ว สามารถตรวจวัดตำแหน่งของสารที่ถูกแยกโดย

- ด้วยตาเปล่า กรณีที่สารมีสี
- ฉายด้วยรังสี UV
- ฉายด้วยรังสี IR
- ฉายด้วยรังสี Fluorescent เกิดสารเรืองแสงขึ้น
- ตรวจสอบสาร Radio active
- ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่ให้สี
 - อมด้วยไอของไอโอดีน
 - ฟัน ninhydrin เพื่อตรวจหากรด amino
 - สาร AgNO_3 เพื่อตรวจหา sugar

4 นำค่าที่ได้มาหาค่า R_f $K_d = C_s/C_m$

สารที่เกิดการแยกจะมีค่า K_d ที่แตกต่างกันส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ต่างกัน ค่า R_f ต่างกันด้วย

18

18

สารที่มีค่า R_f มาก แสดงว่าสารมีคุณสมบัติ

- สารเคลื่อนที่ได้เร็วหรือมาก
- สารถูกดูดซับได้น้อย
- สารละลายได้ดี

สารมีค่า R_f น้อย แสดงว่าสารมีคุณสมบัติ

- สารเคลื่อนได้ช้าหรือน้อย
- สารถูกดูดซับได้มาก
- สารละลายได้น้อย

สาร 2 ชนิดมีค่า R_f ต่างกัน < 0.05 จะไม่เกิดการแยกขึ้น

สมบัติของค่า R_f

- ไม่มีหน่วย มีค่าไม่เกิน 1
- หาได้จากการทดลองเท่านั้น
- ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและชนิดของตัวทำละลาย
- เป็นค่าเฉพาะค่าคงที่ของแต่ละสาร

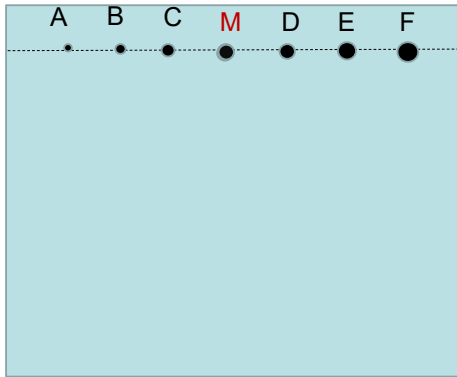
การวิเคราะห์สารเป็นสารชนิดเดียวกัน มีหลักการดังนี้

- มีสีเดียวกัน
- มีค่า R_f เท่ากัน ในระบบการทดลองเดียวกัน

20

20

การทำปริมาณวิเคราะห์



A,B,C,D, E, F = สารมาตรฐานที่มีปริมาณต่างกัน
M= สารผสม

21

21

ประโยชน์ของ PC

- ใช้แยกสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ ซึ่งวิธีอื่นแยกไม่ได้
- ใช้แยกได้ทั้งสารมีสีและไม่มีสี สารไม่มีสีใช้วิเคราะห์ชนิดของสารและหาปริมาณของสารผสม
- ใช้ทดสอบความบริสุทธิ์ของสาร
- ใช้ทดสอบหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมก่อนการทำ HPLC
- ใช้กับตัวอย่างมากๆ ได้ ในขั้นตอน screening

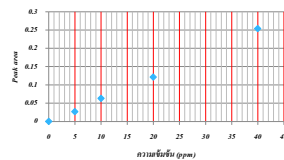
23

23

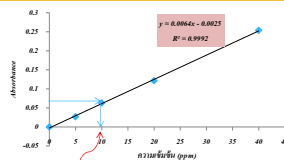
ข้อมูลจากการทดลอง

ความเข้มข้น	พื้นที่
0	0
5	0.027
10	0.063
20	0.121
40	0.254
???	0.096

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นและ พื้นที่



เพิ่มเส้นแนวโน้ม สมการเส้นตรง และค่าความเป็นเส้นตรง



อ่านความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน 10 ppm

คำนวณความเข้มข้นจริง?

22

22

Thin layer chromatography (TLC)

- มีหลักการและเทคนิคคล้าย Paper chromatography ทุกประการ ต่างกันตรง ชนิดของเฟสคงที่
- เป็นรูปแบบหนึ่งของ plane chromatography
- เป็นจุดเริ่มต้นของการทำ column chromatography เนื่องจากการแยกเกิดขึ้นเร็ว ระบบไม่ยุ่งยาก สามารถทำได้บ่อยครั้ง

24

24

เฟสคงที่ Stationary phase

- เฟสคงที่สามารถเลือกได้หลายชนิด เช่น ทำให้เกิดการแยกโดย adsorption, partition (normal phase, reversed phase), ion exchange size exclusion
- Plate มีขนาด 5x10, 10x20, 20x20cm
- ความหนาของสารเคลือบ 200-250 μ m สำหรับอนุภาคขนาด 20 μ m (หรือนานกว่าสำหรับ Conventional plates)
- เกิดการแยก ~200 จุด ในเวลา 25 min ระยะทาง 12 cm
- สารอินทรีย์ เช่น cellulose powders, starch, sephadex, polyamides และ ion exchange resin
- สารอนินทรีย์ เช่น silica gel, alumina, glass powder และ diatomaceous earth

25

25

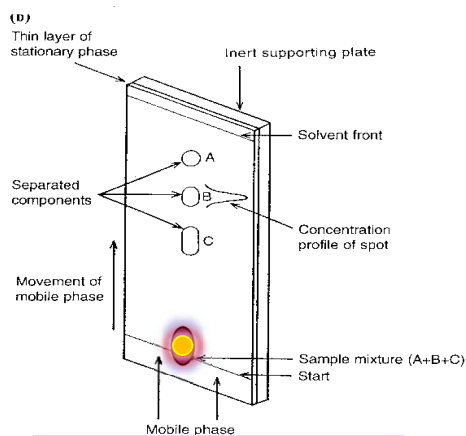
วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC

1. การจุดสาร

1. ใช้ capillary tube จุด (spot) สารเข้มข้น 0.01-0.1%
2. ห่างจากขอบ 1-2cm
3. ขนาดจุดสาร ϕ 5mm ใช้ทำคุณภาพวิเคราะห์
4. ขนาดจุดสาร ϕ <5mm ใช้ทำปริมาณวิเคราะห์
5. ใช้ Pt-iridium capillary tube ในการจุด (spot)
6. ใช้ automatic dispenser system ที่ควบคุมปริมาตรได้แม่นยำ

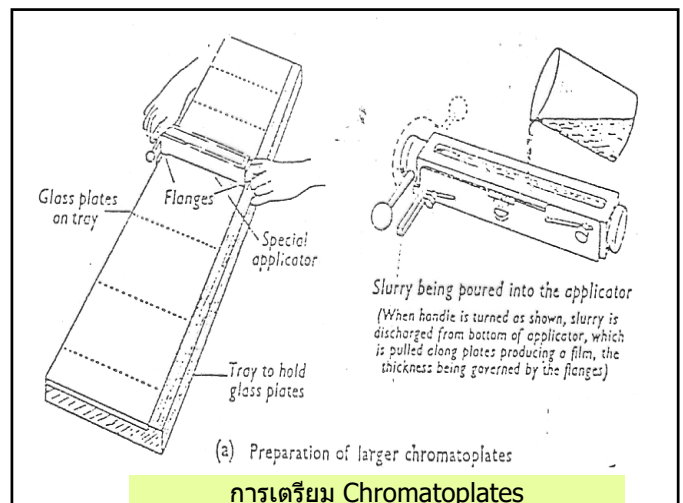
27

27



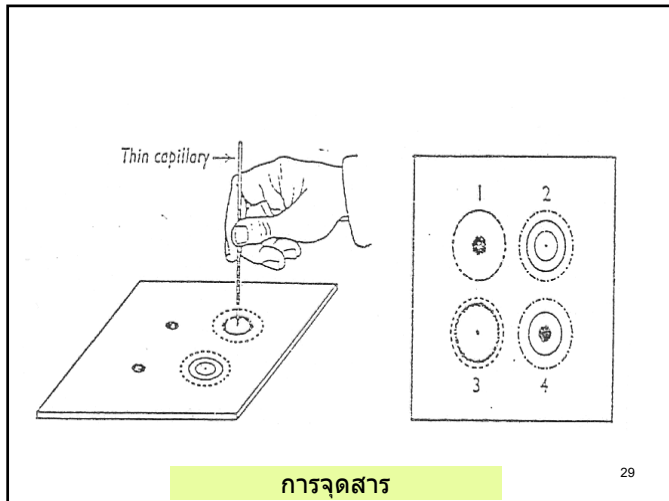
Thin layer chromatography

26



การเตรียม Chromatoplates

28



29



31



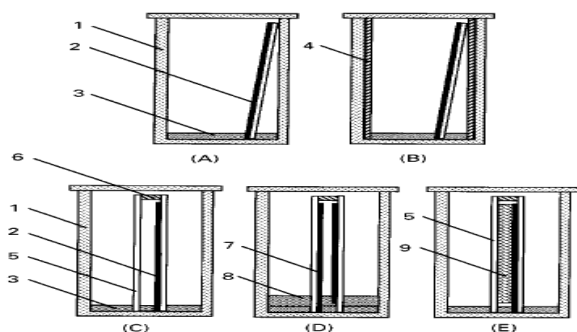
30

2 Plate development

1. ต้องทำการระเหยตัวทำละลายก่อนทำการแยกสาร
2. นำเพลตไปใส่ในภาชนะปิด ภายในบรรจุ mobile phase ที่อิ่มตัวด้วยไอสาร mobile phase (spot สารห้ามจุ่มใน mobile phase)
3. mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่านเพลตด้วยแรง capillary force (ในอัตราไม่คงที่, hyperbolic function) การเคลื่อนที่ลดลงเมื่อระยะทางเพิ่มขึ้น
4. หลังจากตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ประมาณ 2/3 เพลต หยุดการ develop ต้องทำการระเหยตัวทำละลายก่อนทำการตรวจวัดสาร₂

32

Chamber types used for conventional PPC. (A) Unsaturated N-chamber (1, rectangular chamber; 2, chromatographic plate; 3, mobile phase). (B) Saturated N-chamber (4, filter paper soaked with the mobile phase). (C) Unsaturated S-chamber (5, glass cover plate; 6, spacer). (D) Saturated S-chamber (7, facing chromatographic plate, soaked with the mobile phase; 8, second part of the mobile phase). (E) Ultra-micro chamber, a special variety of S-chamber (5, glass cover plate; 9, elastic inert material).



33

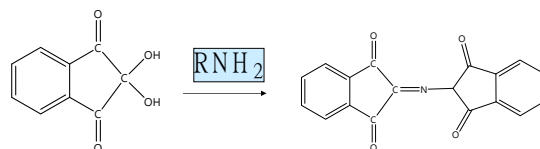
4. พ่นสาร reagent ที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ

สาร เช่น

- NH₂ ทำปฏิกิริยากับ ninhydrin
- Phenol Fe(III)Cl₃
- reducing sugar Aniline phthalate
- metal complex forming reagent



http://www.camag.com/media/M2156CB/lab_orsprueher_small.png



ninhydrin

Blue reaction product

35

35

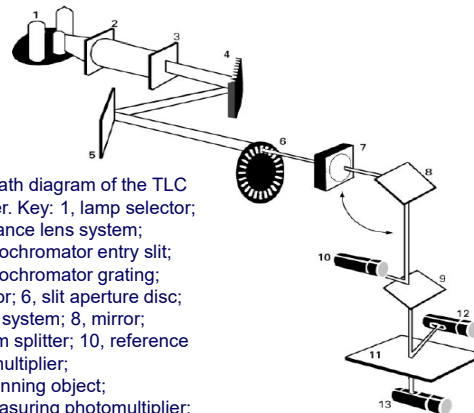
3. Detection การตรวจหาตำแหน่งของสารบนเพลต

- ถ้าสารมีสมบัติ luminescence (สารอินทรีย์ fluorescence, สารอนินทรีย์; phosphorescence phenomena) สามารถตรวจหาการเรืองแสงของสารได้
- ให้เติมสาร fluorescence indicator ลงในสารเคลือบ เมื่อสารที่ถูกตรวจวัดที่เป็น non fluorescence จะเกิดเป็นจุดจางๆ สารที่ใช้เคลือบได้แก่ pyrene derivatives, fulorescein, morin, rhodamine B
- พ่น strong oxidant เช่น HNO₃, KMnO₄, H₂SO₄ จะเกิดเป็นจุดสีดำ สำหรับสารอินทรีย์

34

34

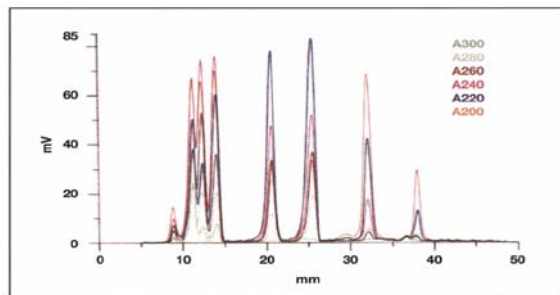
densitometer



Light path diagram of the TLC scanner. Key: 1, lamp selector; 2, entrance lens system; 3, monochromator entry slit; 4, monochromator grating; 5, mirror; 6, slit aperture disc; 7, lens system; 8, mirror; 9, beam splitter; 10, reference photomultiplier; 11, scanning object; 12, measuring photomultiplier; 13, photodiode (transmission).

36

Separation of pesticides in tap water on an HPTLC silica gel 60 plate by AMD. Multi-wavelength (six wavelengths) evaluation permits resolution by optical means of fractions insufficiently separated. (Reprinted from Camag literature, CAMAG, Muttenz, Switzerland.)



37

37



An FDA chemist in the mid-1950s is shown using a column chromatographic apparatus to separate the constituents in a coal tar chemical analysis.

https://en.wikipedia.org/wiki/Column_chromatography#/media/File:FDA_History_-_Column_Chromatography.jpg

39

39

Open column chromatography

38

38

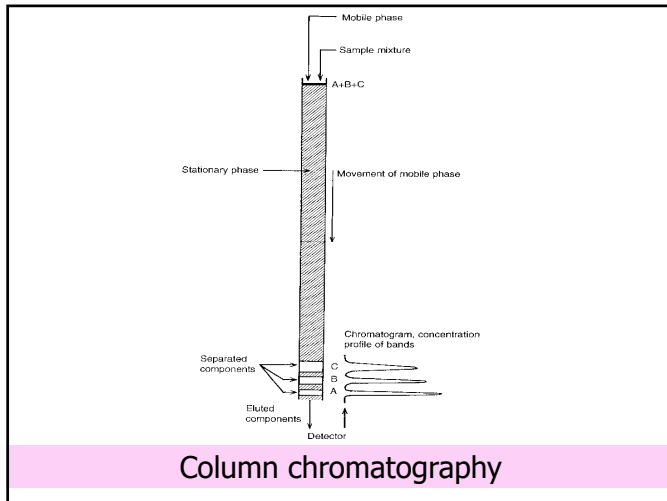
โครมาโทกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์ (liquid column chromatography)

โครมาโทกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์แบ่งตามกลไกในการแยกสารได้ 4 แบบ คือ

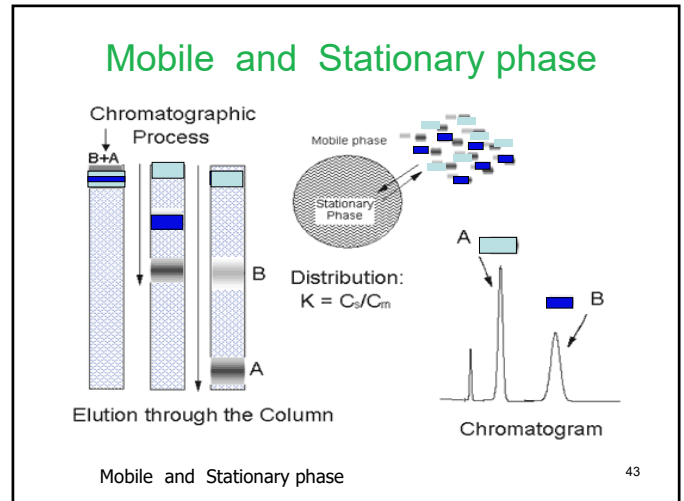
1. Liquid liquid chromatography (LLC) (partition chromatography)
2. Liquid solid chromatography (LSC) (adsorption chromatography)
3. Ion-exchange chromatography
4. Exclusion chromatography

40

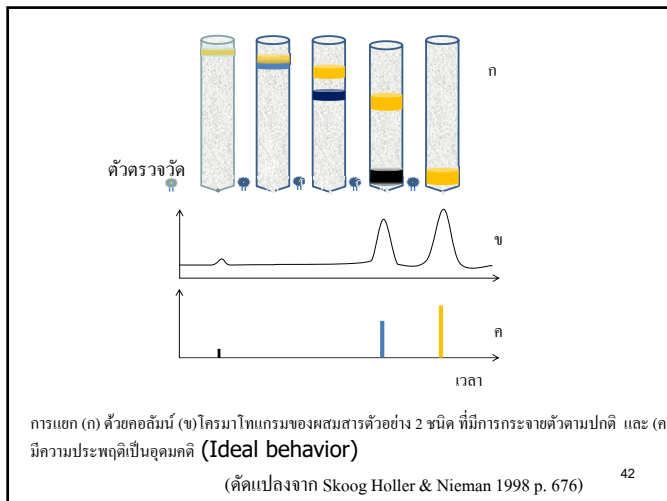
40



41



43



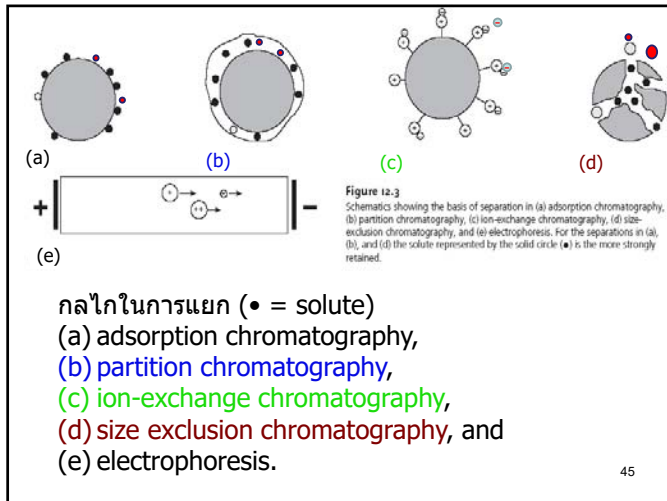
42

อนุภาคบรรจุ

- ค.ศ. 1960
 - ตัวบรรจุเป็นของแข็งที่ไม่มีรูพรุนเป็นแกน เช่น glass bead $\phi \sim 40 \mu\text{m}$ และเคลือบด้วยแผ่นฟิล์มบางๆ (หนา $1-3 \mu\text{m}$)
 - ของแข็งมีลักษณะเป็นรูพรุน silica gel, alumina, resin หรือ polyamide
- ค.ศ. 1980
 - อนุภาคที่ใช้บรรจุอยู่ในคอลัมน์ คือ microparticulate ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน
 - เป็นวัสดุที่บรรจุใน guard column เพื่อให้ทำหน้าที่กรองสิ่งเจือปนออกจากสารละลายตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ที่จะผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ ทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์ยาวนานขึ้น

44

44



45

วิธีการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. การเตรียมคอลัมน์

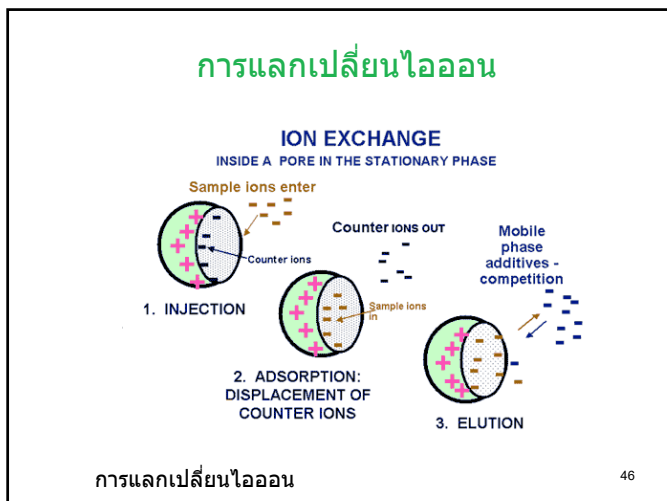
- แพ็คคอลัมน์โดยทำเฟสคงที่ให้เป็นสารแขวนลอย
- เเทลงในคอลัมน์ที่ปิดปลายด้วยสำลี หรือใยแก้ว
- รอให้เฟสคงที่เรียงตัวในคอลัมน์
- ระวัง ต้องให้น้ำบนผิวหน้าเฟสคงที่เล็กน้อยตลอดเวลา

ตัวดูดซับที่เป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีมี 2 แบบ

1. แบบ รีเวอร์สเฟสหรือวัฏภาคกลับ

- เป็นการใช้ของแข็งที่มีโพลาริตีต่ำ เช่น ผงยาง
- ใช้ของแข็งชั้นพอร์ทที่มีของเหลวที่ไม่มีโพลาริตีเคลือบ

47



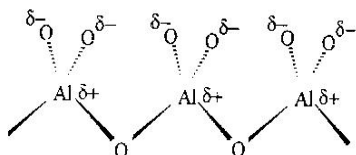
46

2. ตัวดูดซับที่เป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ นอร์มัลเฟสหรือวัฏภาคปกติ

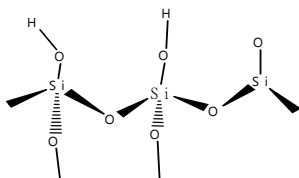
High polarity	Alumina	Greatest adsorption
	Magnesium	
	Charcoal	
	Silica gel	
	Calcium oxide	
	Magnesium carbonate	
	Calcium carbonate	
	Potassium carbonate	
	Sodium carbonate	
	Starch	
Low polarity	Cellulose	Least adsorption

48

Partial structure of alumina



Silica gel matrix structure



49

49

สารที่มีฟังก์ชันนอกกรุ๊ปต่างๆมีโพลาไรตีตามลำดับนี้

High polarity

Longest retention time

Organic acids (RCOOH), base (NH₃, OH⁻)
Alcohols (ROH), Thiol (RSH)
Amines (RNH₂), Nitro groups (RNO₂)
Aldehydes (RCHO), Ketones (RCOR)
Esters (RCOOR')
Halides (RF, RCl, RBr, RI)
Unsaturated hydrocarbons (R-C=C-R')
Saturated hydrocarbons (RCH₂-CH₂-R')
Perfluorocarbons (C_nF_{2n+2})

Low polarity

Shortest retention time

51

2. ใส่สารตัวอย่าง

โดยใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างแล้วปล่อยใกล้
เฟสคงที่มากที่สุดโดยไม่ทำลายผิวหน้าคอลัมน์
และไม่ติดข้างคอลัมน์

สารตัวอย่างที่ใช้มีโพลาไรตีต่างกัน ถ้าเป็น
นอร์มัลเฟสโครมาโทกราฟี สารที่มีโพลาไรตีสูง
จะอยู่ในคอลัมน์ได้นานที่สุด

50

50

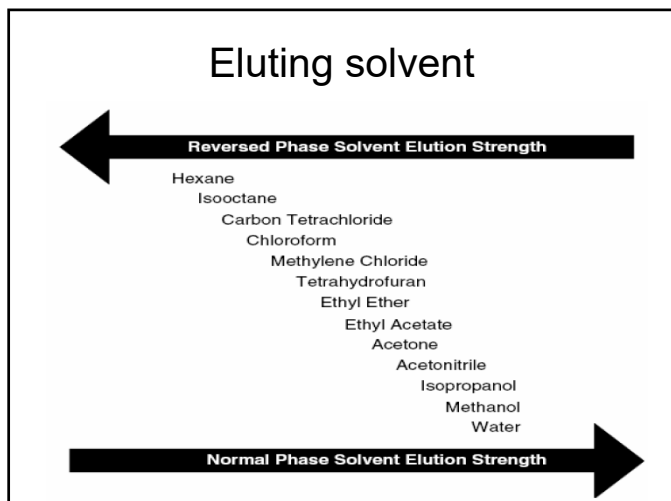
3. ทำการอีลูท

เป็นการเติมสารละลายที่มีโพลาไรตีที่เหมาะสม
ในการชะสารออกจากคอลัมน์
ในการชะสารตัวอย่างที่มีโพลาไรตีสูงต้องใช้ตัว
ทำละลายที่มีโพลาไรตีสูงด้วย

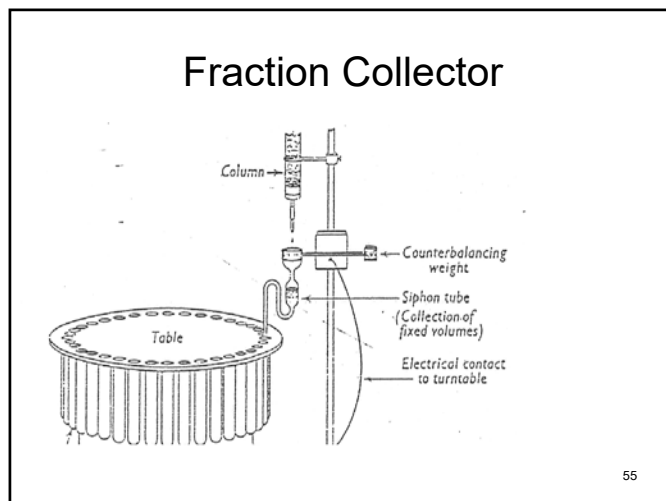
สารผสมที่มีโพลาไรตีแตกต่างกันก็อาจใช้สาร
ชะหลายตัวโดยที่เริ่มจากตัวที่มีโพลาไรตีต่ำ
ก่อน

52

52



53

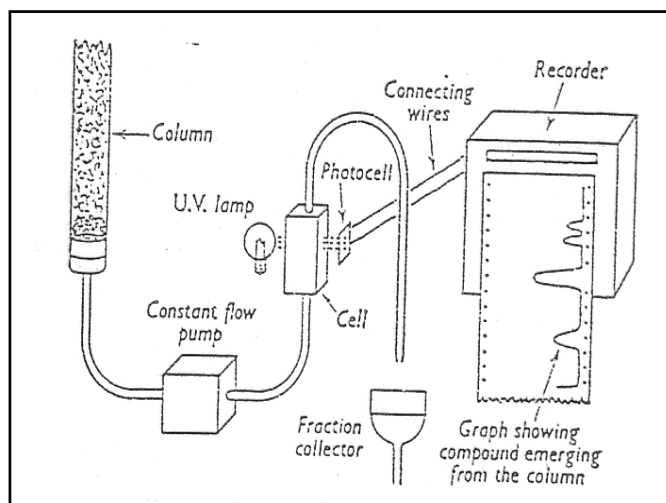


55

- #### 4. เก็บสารตัวอย่าง
- เก็บแบบ manual โดยเก็บทีละ 1-10 mL
 - ใช้เครื่องเก็บ fraction collector สามารถเก็บตัวอย่างแบบอัตโนมัติ โดยไม่ต้องเฝ้า
- #### 5. การวัดปริมาณสารที่ออกจากคอลัมน์
- วัดโดย Optical method; UV, IR, Fluorescence
 - Electrochemical method; Voltametry, conductivity etc.

54

54



56

ข้อเสียของ Open column chromatography

- การบรรจุอนุภาคบรรจุ (packing particle)ทำได้ช้าและเสียเวลา
- ประสิทธิภาพการแยกต่ำ
- ต้องเก็บสารเป็นส่วนๆ ทำให้ใช้เวลานาน

ข้อเสียของ Thin layer chromatography

- ทำเป็นระบบอัตโนมัติไม่ได้
- การทำซ้ำได้ผลไม่คงที่ (low reproducibility)
- ทำปริมาณวิเคราะห์ได้ไม่ดี
- เหมาะกับการวิเคราะห์ เตรียมสารเบื้องต้น

57

57

ข้อดีของ Modern Liquid Chromatography

- คอลัมน์ที่ใช้แยกมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยสามารถเลือกชนิดของเฟสคงที่และระบบของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมได้
- ตัวตรวจวัดเป็นแบบ non-destructive คือไม่ทำลายสาร
- คอลัมน์สามารถใช้ได้ใหม่ได้ re-usable
- การวิเคราะห์เป็นแบบอัตโนมัติได้ โดยเฉพาะขั้นตอนนำสารเข้าเครื่องวิเคราะห์
- มีความถูกต้อง แม่นยำสูง

59

59

Modern Liquid Chromatography

- มีการพัฒนาชนิด วัสดุของอนุภาคบรรจุ
- มีการพัฒนาปั๊มหลายแบบ
- มีการพัฒนาตัวตรวจวัดหลายชนิดขึ้น

ปี คศ 1967 มีการประดิษฐ์ HPLC มาใช้งานด้านการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ โดย Horvath

58

58

แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)



60

60

Gas Chromatography (GC)

เป็นเทคนิคการแยกสารพวกที่มี polarity ต่ำ สารตัวอย่างต้องระเหยเป็นแก๊สหรือไอ ณ จุดฉีดสาร แก๊สเฉื่อยทำหน้าที่พาสารเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งมีเฟสคงที่เป็นของเหลวหรือของแข็งทำหน้าที่แยกสารและถูกตรวจวัดในส่วนของดีเทคเตอร์ต่อไป

1. ถ้า stationary phase เป็น active solid เรียกเทคนิคนี้ว่า Gas Solid Chromatography (GSC) กลไกการแยกแบบดูดซับ (adsorption)
2. ถ้า stationary phase เป็น liquid ที่เคลือบบางๆ บนผิวของ inert granular solid support เทคนิคนี้เรียกว่า Gas Liquid Chromatography (GLC) กลไกการแยกแบบแบ่งแยก (partition)

61

61

ส่วนประกอบสำคัญของ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC)

1. ส่วนฉีดสาร (Injector)
2. เตาอบ (Oven)
3. คอลัมน์ (Column)
4. ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector)
5. ระบบบันทึก และเก็บข้อมูล (Recorder, Integrator) ผลที่ได้จะแสดงในรูปของ โครมาโทแกรม (Chromatogram)

63

63

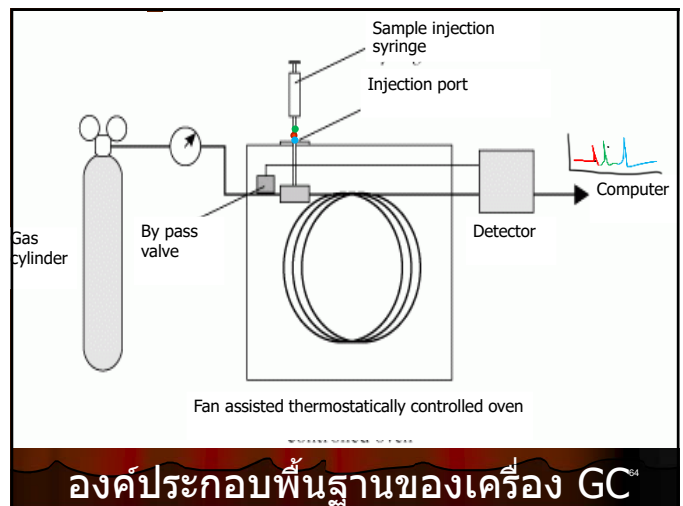
1. Gas Solid Chromatography (GSC)

- ใช้หลักการ adsorption โดย stationary phase เป็นของแข็ง ที่สามารถดูดซับสารที่เป็นแก๊สหรือไอที่ต้องการแยกได้ ใช้แยกสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ ที่สามารถเปลี่ยนเป็นแก๊สหรือไอ โดยมี active solids (adsorptive particles) ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์เป็น molecular sieves หรือ porous polymers, silica gel, alumina และ activated carbon

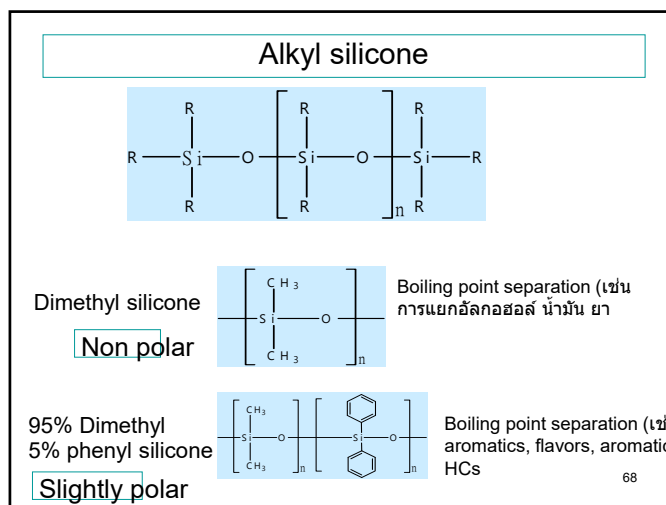
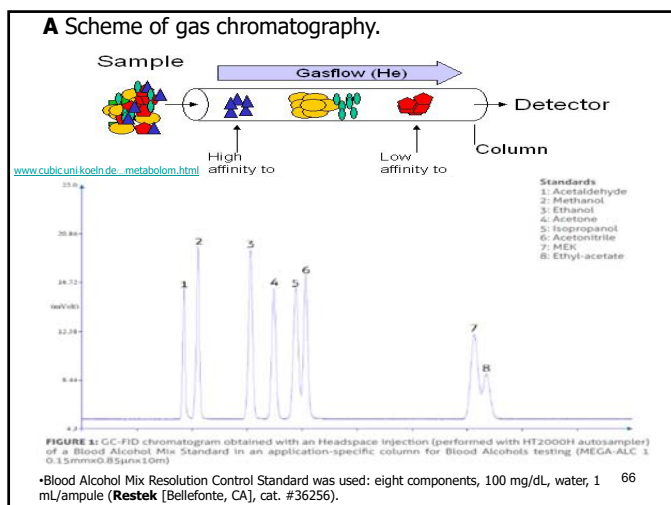
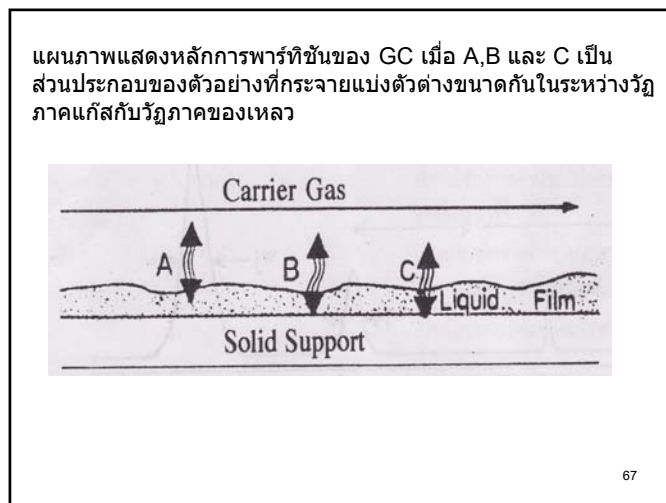
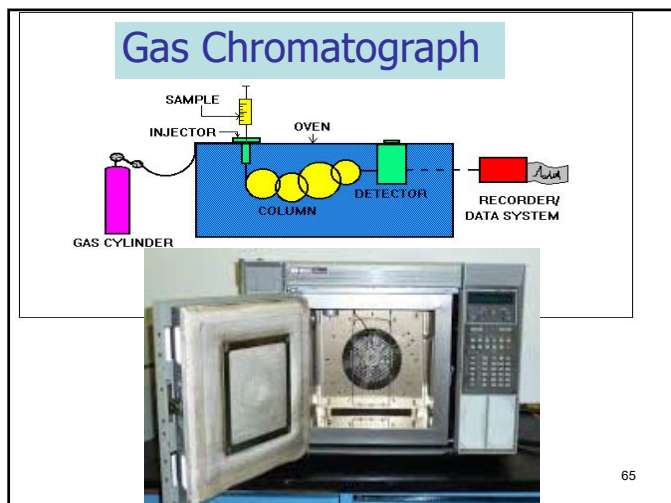
2. Gas Liquid Chromatography (GLC)

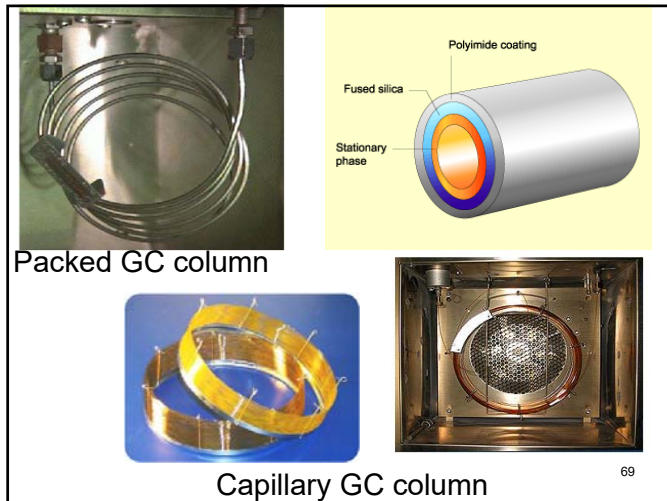
- ใช้หลักการ partition สารผสมที่ต้องการแยกอยู่ในสภาพที่เป็นแก๊ส หรือไอ เมื่อผ่านเข้าสู่คอลัมน์จะแยกออกจากกันโดยความแตกต่างในการกระจายตัวอยู่ใน mobile phase (carrier gas) และ stationary phase ที่เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนผิวของ inert solid support ที่มีพื้นที่ผิวสูง ขนาดสม่ำเสมอ นิยมใช้ celite หรือ glass beads

62



64





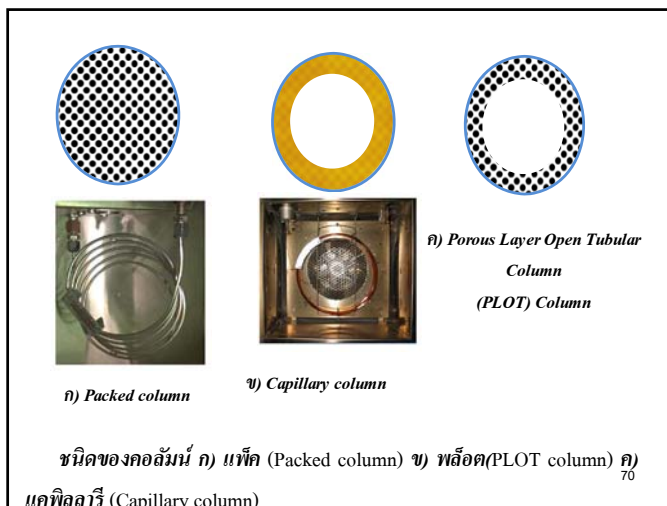
69

Carrier gas

- ทำหน้าที่พา volatile component ในคอลัมน์ มีคุณสมบัติ inert ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง หรือ stationary phase
- ทำหน้าที่พา separated component ไปยัง detector

แก๊สพาที่นิยมโดยทั่วไปได้แก่ ไฮโดรเจน และฮีเลียม

71



70

คุณสมบัติของ Carrier gas

- inert ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกหรือ stationary phase
- มีการแพร่และมีความหนืดต่ำ
- หาง่าย ราคาถูก
- และมีความบริสุทธิ์สูง
- เหมาะกับระบบตรวจวัดที่ใช้

แก๊สพาที่ออกจากท่อแก๊สควรทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านท่อที่บรรจุด้วย molecular sieve เพื่อช่วยขจัดไอน้ำหรือไฮโดรคาร์บอน

72

Sampling Systems

- Gas Samples
 - gas-tight syringes
 - loop valves (0.1 to 10 mL)
- Solid Samples
- Liquid Samples 0-1 μL or diluted
- Vaporizing Injector
 - injector temperature > bp components และ อุณหภูมิ สูงกว่าอุณหภูมิ oven สูงสุด 50°C
 - injector temperature < อุณหภูมิสูงสุด stationary phase ที่ทนได้

73

73

แพ็ค คอลัมน์

- Syringes
 - Plunger-in-barrel (5-1000 μL)
 - plunger-in-needle (0.5 or 1 μL) ดูดสารเท่าไรก็ได้จนถึง 1 μL
 - 5 μL syringe ฉายสารได้ครั้งละ 0.3 μL ได้

Capillary Columns

อัตราเร็วของแก๊ส สำหรับ 0.3 mm i.d. wall coated open-tubular (WCOT) ประมาณ $<2 \text{ mL min}^{-1}$ solvent 1 μL มีปริมาตร 0.5 mL ที่ 250°C จะเกิดปัญหา band broadening ต้องมีวิธีการฉีดที่แตกต่าง

75

75

การฉีด

- sample; liquid, gas, solid (solution, pyrolysis)
- Micro syringe แบบ liquid หรือ gas tight syringe
- Sample valve (reproducibility > 0.5%)
- Head space analysis (solid, liquid sample)
- Auto injector
- Autosampler



74

74

1) Injector

คือ ส่วนที่สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่อง และระเหยเป็น gas พร้อมกับถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนที่จะเข้าสู่ column อุณหภูมิที่เหมาะสมของ injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้สาร ตัวอย่างสามารถระเหยได้แต่ต้องไม่ถูกทำให้สลายตัว (decompose)

- **Solvent** ที่ใช้ละลายสารตัวอย่าง ได้แก่ ether, heptane หรือ methanol
- **อุณหภูมิ** ของ injection port ต้องสูงพอที่จะทำให้สารตัวอย่างเกิดการกลายเป็นไอได้อย่างรวดเร็ว แต่ต้องไม่ทำให้สารตัวอย่างสลายตัวและสูงกว่าอุณหภูมิของคอลัมน์

76

76

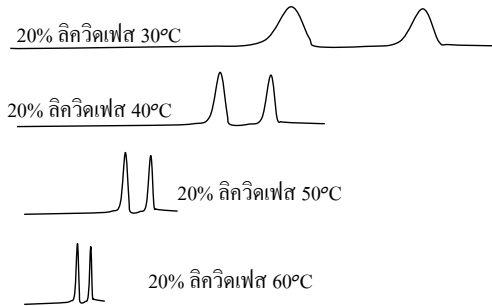
2) Oven

คือ ส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ column เอาไว้ และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของ column ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับสารที่ถูกฉีด ซึ่งอุณหภูมิของ oven นั้นจะสามารถปรับเปลี่ยนได้ 2 แบบคือ

- isocratic temperature (isothermal)
- gradient temperature (program temperature)

ข้อดีของการทำ gradient temperature คือสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีจุดเดือดกว้าง (wide boiling range) และยังช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ (analysis time) ลงได้อีกด้วย

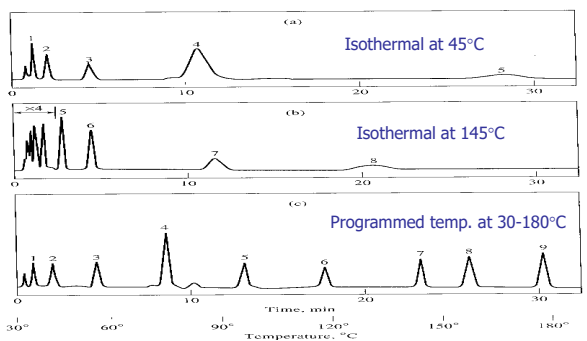
77



ผลของอุณหภูมิที่มีต่อ retention time (แผ่น 2553 หน้า 280)

79

Temperature programming



78

3) Detector

คือ ส่วนที่จะใช้สำหรับตรวจวัด องค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง detector จะทำการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทาง electronic ก่อนส่งไปยังตัวประมวลผลเพื่อทำการเขียนเป็นความสัมพันธ์กับเวลาได้ออกมาเป็น chromatogram

แบ่งได้ 2 ชนิด

- general detector สามารถตรวจวัดสารได้หลายๆ ประเภท
- selective detector ซึ่งจะสามารถเห็นเฉพาะสารที่มีโครงสร้างเฉพาะ, มี functional group หรือ atoms ที่จำเพาะเจาะจง

80

สมบัติของ Detector

- ความไวเพียงพอ
- เสถียรภาพและแม่นยำสูง
- ให้สัญญาณสัมพันธ์กับความเข้มข้นสารที่เป็นเส้นตรงในช่วงกว้าง
- อุณหภูมิช่วง RT - 400°C อย่างน้อย
- เวลาตอบสนองเร็ว
- มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ
- มีความจำเพาะสูง
- ไม่ทำลายสาร

81

81

1. Flame Ionization Detector (FID)

มีคุณลักษณะของ GC ดีเทคเตอร์ในอุดมคติแทบทุกอย่าง
หลักการ

การสันดาปไอของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ในเปลวไฟของไฮโดรเจนในอากาศหรือออกซิเจนและวัดไอออนที่เกิดขึ้นจากองค์ประกอบของพีคที่ออกมาจากคอลัมน์ของ GC ปริมาณที่สามารถตรวจวัดต่ำสุด (minimum detectable quantity; MDQ) เท่ากับ 10^{-11} กรัม และช่วงของกราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงถึง 10^7

สารประกอบหลายอย่างที่ไม่สามารถตรวจวัดโดย FID เช่น ไฮโดรเจน ไนโตรเจน น้ำ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์

สารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่จะตรวจวัดโดย FID ได้จะต้องสามารถผ่านกระบวนการออกซิเดชันได้

83

83

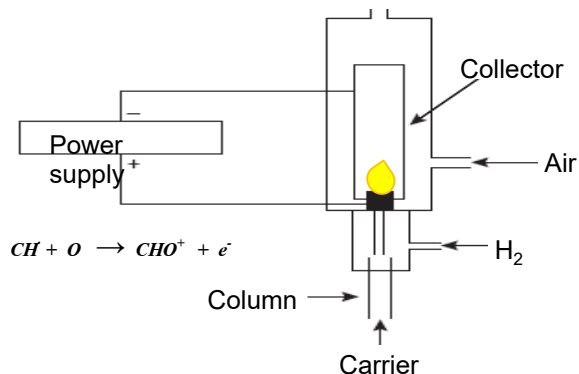
Detector ตรวจวัดสารที่นิยม

- | | |
|---------------------------------------|------|
| 1. Flame Ionization Detector | FID |
| 2. Thermal Conductivity Detector | TCD |
| 3. Flame Thermionic Detector | FTD |
| 4. Flame Photometric Detector | FPD |
| 5. Electron Capture Detector | ECD |
| 6. Photoionization Detector | PID |
| 7. Electrolytic Conductivity Detector | EICD |
| 8. Mass Spectrometer | MS |

82

82

Schematic diagram of a flame ionization detector for gas chromatography (Harvey 2000 p 570)



84

84

2. Electron Capture Detector (ECD)

Detector ชนิดนี้เป็น selective detector เฉพาะที่ใช้วัด Electrophilic compounds อย่างเช่น Halogens, Nitrates และ conjugated carbonyls องค์ประกอบหลักของ detector นี้คือ ^{63}Ni ซึ่งจะให้ electrons เมื่อมีกระแสไฟฟ้าคงที่ เมื่อสารที่เป็น electrophilic compounds เข้าไปจับกับ electrons เป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระแสในการวัดสภาพไวสูง แต่ linearity range แคบ

สมการที่เกิดขึ้นในการวัด Polychlorinated Biphenyls (PCB) โดยใช้ Nitrogen gas เป็น Make-up gas

85

85

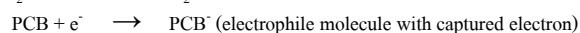
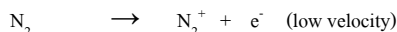
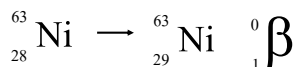
สารประกอบต่อไปนี้ให้ค่า relative ECD response ต่าง ๆ กัน (แม้น 2553 หน้า 296)

สารประกอบไฮโดรคาร์บอน	1
สารประกอบอีเทอร์และเอสเทอร์	10
สารประกอบอะลิฟาติกแอลกอฮอล์ คีโตน เอมีน โมโนคลอไรด์ และฟลูออไรด์	100
สารประกอบพวงโมโนโบรไมด์ ไดคลอไรด์ และไตรฟลูออไรด์	1,000
สารประกอบพวงแอนไฮไดรด์ และไทรคลอไรด์	10,000
สารประกอบพวงโมโนไฮไดรด์ ไดโบรไมด์ พอลิคลอไรด์ และพอลิฟลูออไรด์	100,000
สารประกอบไดไฮไดรด์ ไทโรโบรไมด์ พอลิคลอไรด์ และพอลิฟลูออไรด์	1,000,000

87

87

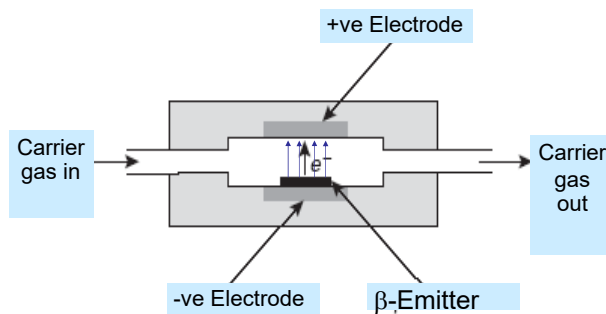
ยกตัวอย่างการตรวจวัดสาร Polychlorinated Biphenyls (PCB) โดยใช้ไนโตรเจน เป็น make-up gas มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังนี้



86

86

Schematic diagram of an electron capture detector for gas chromatography



ลักษณะของอิเล็กทรอนิกส์แบบเจอร์มิเตอร์ (Harvey 2000)

88

3. Mass Spectrometer (MS)

Detector จะทำให้สารแตกตัวเป็น ions ด้วยการให้สารที่ถูก elute ออกมาถูก bombard ด้วย electrons (Electron impact ionization; EI) หรือ gas molecules (Chemical ionization; CI) ซึ่งจะทำให้สารแตกตัวเป็น fragment ที่มีประจุและผ่านไปยัง mass filter ก่อนถูกวัดที่ electron multiplier สามารถวัดสารทุกประเภทที่สามารถแตกตัวใน mass range ที่สามารถวัดได้

89

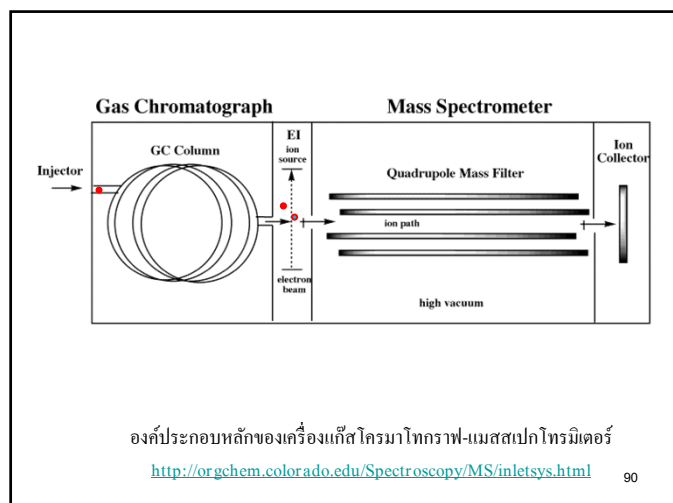
89

ลักษณะเปรียบเทียบของ GC ดีเทคเตอร์ที่สำคัญ

ดีเทคเตอร์	หลักการ	ความจำเพาะ	ความไว	ช่วงเส้นตรง
เฟลมไอออนไนเซชันดีเทคเตอร์ (FID)	เผาสารประกอบในเปลวไฟ H_2 / O_2 ที่ 2000 องศาเซลเซียส	สนองตอบต่อสารอินทรีย์ที่สามารถถูกออกซิไดส์	10^{-12}	10^7
อิเล็กตรอนแคปเจอร์ดีเทคเตอร์ (ECD)	วัดการเปลี่ยนแปลงของกระแสอิเล็กตรอนที่เกิดจากปฏิกิริยาจากสารประกอบอินทรีย์กับอิเล็กตรอน	ตอบสนองต่อสารประกอบทุกอย่างที่ทำปฏิกิริยากับอิเล็กตรอน	10^{-14}	10^3 (10^6 สำหรับ pulsed operation)
Mass spectrometry	สารแตกตัวเป็น ions และแยกตามมวลต่อประจุ m/z	สารเกือบทุกชนิด	10 pg - 10 ng	10^5

91

91



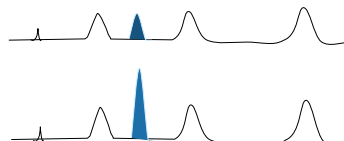
90

90

การทำคุณภาพวิเคราะห์

เพื่อวิเคราะห์สารตัวอย่างว่าเป็นสารอะไร มีกี่ชนิดและเป็นสารใดบ้าง

- ใช้ค่ารีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างกับมาตรฐาน แต่สารต่างชนิดกันอาจให้ค่ารีเทนชันไทม์ตรงกันก็ได้ อาจวิเคราะห์อีกแต่สภาวะการแยกต่างกัน เช่น คอลัมน์ อุณหภูมิ อัตราการไหล เป็นต้น
- เทคนิค spiking บอกว่าพิกไหนเป็นของสารใดในสารผสมนั้น โดยเติมสารสารนั้นลงในสารตัวอย่าง ถ้าโครมาโทแกรมที่ได้มีพิกใดที่มีพื้นที่ได้พิก หรือความสูงเพิ่มขึ้นแสดงว่า พิกนั้นเป็นของสารที่เราเติมลงไป (known compound)



92

92

การทำปริมาณวิเคราะห์

- พื้นที่ใต้พีค หรือความสูงของพีคในการทำคุณภาพวิเคราะห์ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน
 - External standard
 - Standard addition
 - Area normalisation

การประยุกต์ใช้งาน

ใช้ในการวิเคราะห์ทางสิ่งแวดล้อม ทางเภสัชวิทยา ชีวเคมี การพิสูจน์หลักฐาน อาหาร ห้องปฏิบัติการปิโตรเคมี

93

93

การทำงาน

HPLC เป็นเทคนิคแยกสารผสมโดยใช้เครื่องสูบน้ำแรงดันสูง (high pressure pump) สูบของเหลวหรือตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile Phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) เคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column)

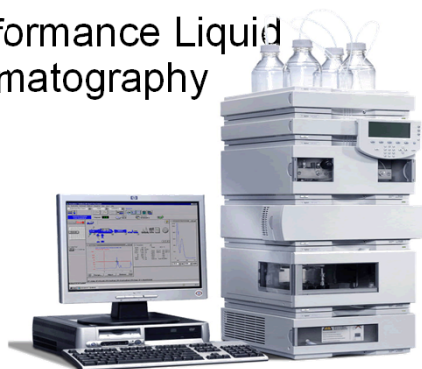
สารผสมเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์แล้วจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) สัญญาณที่ตรวจวัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram) ประกอบด้วยพีค (peaks) ของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารผสม

95

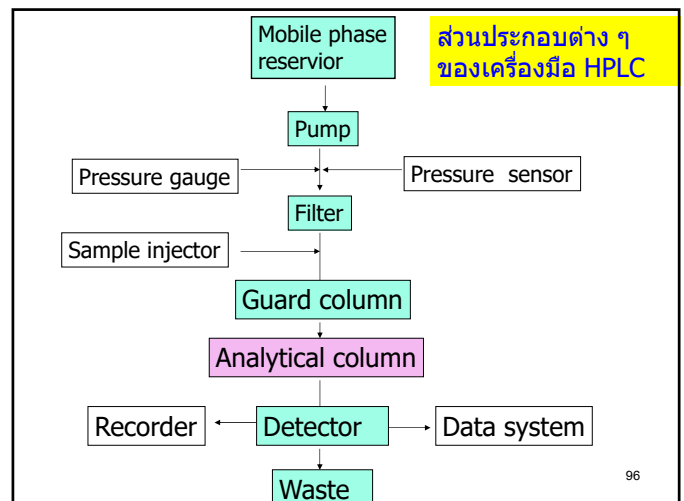
95

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

High Performance Liquid Chromatography

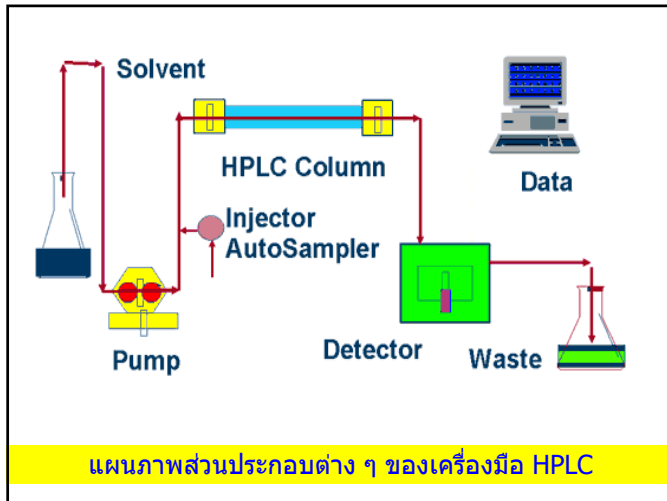


94



96

96



97

การอีลูท

- Isocratic elution เป็นการใช้สารละลายที่เหมาะสมเพียงตัวเดียวตลอดการชะ อาจจะใช้เวลาในการแยก และหรือพีคจะมีหาง
- Gradient elution โดยทำการโปรแกรมตัวทำละลาย คือ การผสมตัวทำละลาย (>) 2 ชนิด

99

99

การเตรียมโมบายเฟส

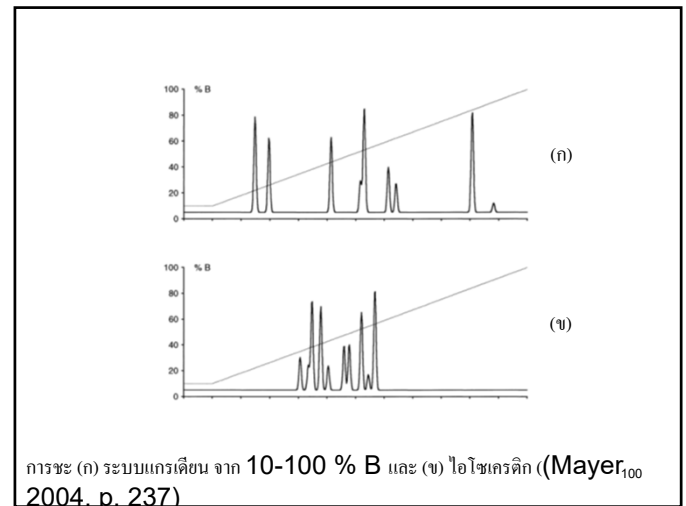
- เลือกใช้ 'HPLC grade' หรือคุณภาพใกล้เคียง
- อาจมีการผสมด้วยอัตราส่วนต่างๆ หรือเติมบัฟเฟอร์ หรือปรับพีเอช
- ต้องมีการกรองก่อนด้วยเมมเบรนขนาด 0.5 or 0.8 μm filter
- โมบายเฟสต้องมีการกำจัดแก๊สก่อน โดยเฉพาะตัวทำละลายที่มีขั้วสูง (น้ำ สารละลายบัฟเฟอร์) เนื่องจากอากาศละลายได้ง่าย,

ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase reservoir)

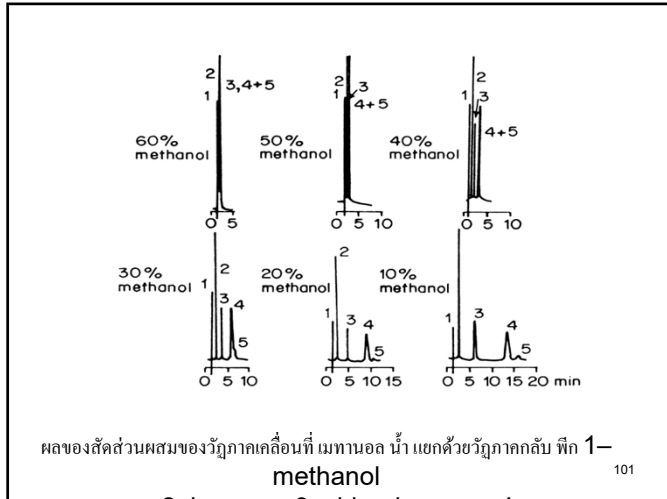
- เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีขนาดประมาณ 1 ลิตร
- อาจมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น ออกซิเจน (degasser)

98

98



100



101

ระบบของปั๊ม (pumping system)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคนาขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ปั๊มความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้สามารถไหลได้

- ปั๊มและส่วนประกอบทำด้วยวัสดุที่ทนทานต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่างๆ ทั้งนี้รวมทั้งท่อ fitting และ flow cell เช่น ทำด้วยเหล็กไร้สนิมคุณภาพสูง inert polymers เช่น polytetrafluoroethylene (PTFE)
- สามารถปั๊มวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีปริมาณมาก ๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการขัดข้อง
- ให้ความดันได้ถึง 4,000 – 6,000 psi
- ควบคุมอัตราการไหลได้ระดับต่ำจนถึง 3 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็นอย่างน้อยและคงที่
- ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลต้องไม่เกิน 1-2 %
- มีปริมาตรภายในต่ำเพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่
- ไม่มีพัลส์ (pulse) หรือมีตัวที่ไขลดพัลส์ (pulse damper)

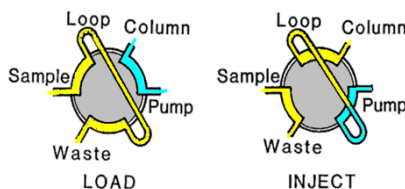
103

อุปกรณ์สำหรับฉีดสารตัวอย่าง

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

วิธีการนิยมใช้

- microsampling valve
- microsyringe ฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum



<http://www.lcresources.com/resources/getstart/2c01.htm>

102

ชนิดของปั๊ม

- mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
- pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

1. Syringe pump และ Constant displacement pump

ปั๊มชนิดนี้มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ (cylinder) ซึ่งบรรจุตัวทำละลายไว้แล้ว มีก้านสูบ (plunger) ซึ่งจะเคลื่อนที่แบบสกรู (screw) ผ่านกล่องเกียร์ (gear box) โดยมี step เป็นตัวควบคุมอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่โดยจะไปทำให้ก้านสูบเคลื่อนที่เร็วหรือช้าลง

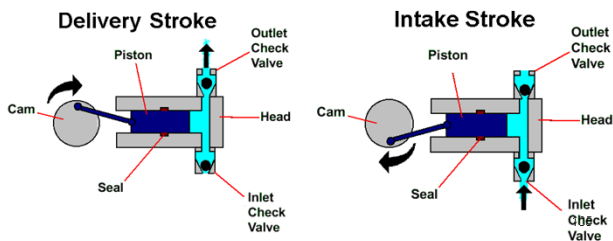
104

102

104

2. ปั๊มแบบชักลูกสูบ (reciprocating pumps)

ปั๊มชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก ก้านสูบปั๊มที่จะเคลื่อนที่เข้าออกตลอดเวลาการทำงาน เมื่อลูกสูบเคลื่อนที่เข้าจะเป็นการดันวฏภาคเคลื่อนที่ให้เข้าสู่คอลัมน์ และเคลื่อนที่ออกนอกจะดึงเอาวฏภาคเคลื่อนที่จาก reservoir เข้าสู่ลูกสูบผ่าน check valve แสดงดังรูปเป็นการควบคุมการเคลื่อนที่กระทำได้โดยการปรับอัตราเร็วของการชักลูกสูบผ่านมอเตอร์ และคอมพิวเตอร์



105

เครื่องตรวจวัด (detector)

107

107

reciprocating pumps

ข้อดี	ข้อเสีย
- มีปริมาตรภายในต่ำ ทำให้การเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายหรือวฏภาคเคลื่อนที่ได้ง่าย - การส่งวฏภาคเคลื่อนที่จะอยู่ในลักษณะต่อเนื่อง - อัตราการไหลของวฏภาคเคลื่อนที่คงที่โดยไม่ต้องคำนึงถึง back pressure ของคอลัมน์	- เกิดพัลส์ขึ้นทำให้ความไวของดีเทคเตอร์บางชนิดมีข้อจำกัด - ต้องมี pulse damper - ปริมาตรของระบบระหว่างปั๊มกับคอลัมน์เพิ่มขึ้น - เกิดความยุ่งยากในการเปลี่ยนตัวทำละลาย - ไม่เหมาะในการทำ gradient elution

106

สมบัติของเครื่องตรวจวัด (detector)

- มีสภาพไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื่อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพ
- เชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง
- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพีคที่ต้องการตรวจสอบ

108

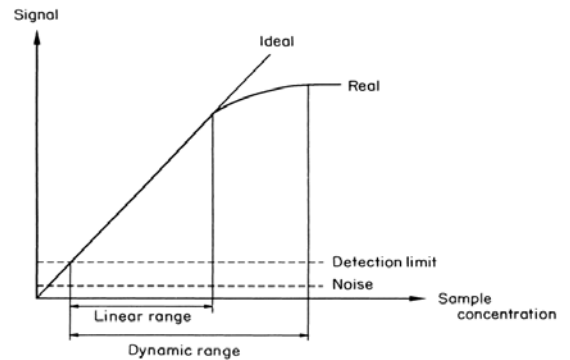
108

ชนิดของเครื่องตรวจวัด ในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

- แบบ bulk property หรือ general detector เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมกับของตัวถูกละลาย เช่น refractive index เป็นต้น
- แบบ solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น เช่น UV-Vis, fluorescence เป็นต้น

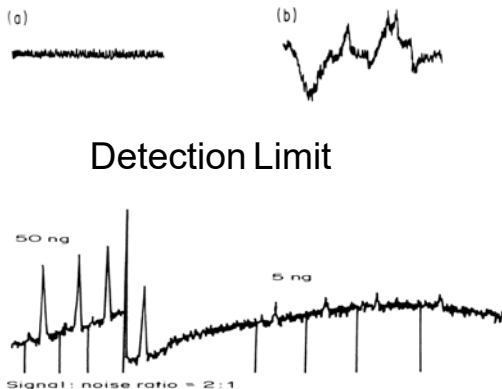
109

Linear detector range



111

Noise



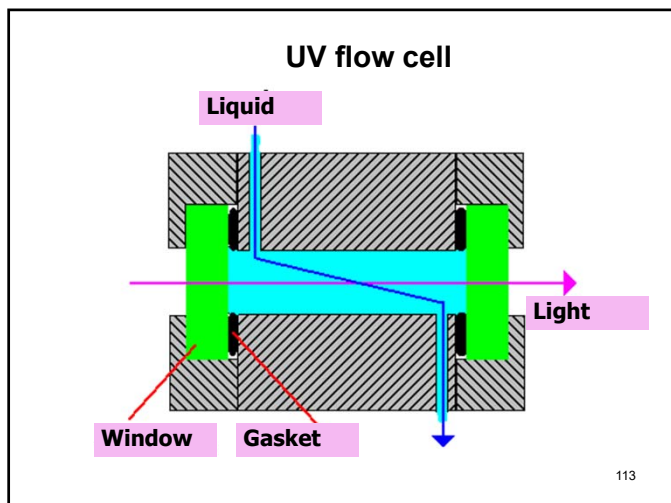
110

Cell Volume

- ปริมาตรของดีเทคเตอร์ต้องมีค่าต่ำ เพื่อป้องกัน peak broadening ต้องมีค่าต่ำกว่า 10% ปริมาตรที่ชะพีคที่แคบที่สุด ปริมาตรมาตรฐาน คือ 8 μ l ถ้าน้อยกว่านี้จะมีผลต่อ detection limit
- ปริมาตร < 8 สำหรับ micro-HPLC

112

112



113

อัลตราไวโอเลต ดีเทคเตอร์ (Ultraviolet detector)

- สามารถวัดแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 190 - 800 nm
- มีโมโนโครเมเตอร์สำหรับเลือกความยาวคลื่น
- สามารถใช้ตรวจหาสารตัวอย่างได้ทั่วไป
- เหมาะสมกับ gradient elution
- ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะไม่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต
- วิเคราะห์หาสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้
- ขนาด 1-10 μL เพื่อลด extra-column band broadening

115

115

Performance of LC detectors					
LC detector	type	LOD (mass)	gradient	Temp. sensitivity	Flow sens.
UV	s	100 pg-1 ng	Yes	Low	No
Fluorescence	s	1-10 pg	Yes	Low	No
Electrochemical	s	10 pg-1 ng	No	1.5%/°C	Yes
RI	Gen.	100 ng-1 ug	No	10-4/°C	No
Conductivity	s	500 pg-1ng	No	2%/°C	Yes
Mass Spect.	s	100 pg-1 ng	Yes	None	No
FT-IR	s	1 ug	Yes	Low	No

114

114

สารที่ดูดกลืนแสงยูวี

- double bond adjacent to an atom with a lone electron pair, $X=Y-Z$ (เช่น vinyl ether);
- bromine, iodine or sulphur;
- a carbonyl group, $C=O$; a nitro group NO_2 ;
- two conjugated double bonds, $X=X-X=X$;
- an aromatic ring;
- inorganic ions: Br^- , I^- , NO_3^- , NO_2^-

116

116

UV detector

- ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ 3 ชนิดที่นิยมใช้ ได้แก่
 - 1. Fixed-wavelength UV detector
 - 2. Variable UV-Vis detector
 - 3. Photodiode-array detector (PDA)

117

117

2. Variable UV-Vis detector

- แหล่งกำเนิดแสงประกอบด้วย D₂ และ W lamps
- Deuterium lamps ให้แสงแบบต่อเนื่อง (-340 nm,
- Tungsten-halogen ให้แสงช่วง near-UV และ visible (340–850 nm) มักใช้ร่วมกับหลอดดิวที่เรียบ
- มีโมโนโครเมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้

119

119

1. Fixed-wavelength UV detector

ประกอบด้วย flow-through cell และแหล่งกำเนิดแสง โดยทำเป็นลำแสงด้วยเลนส์ที่ทำด้วยควอทซ์ให้แสงผ่านเซลล์ของสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง แสงที่ผ่านออกมาจะผ่านการกรองด้วยฟิลเตอร์ จึงผ่านไปยังโฟโตเซลล์ หรือโฟโตไดโอด 2 ตัว

- ดีเทคเตอร์แบบ Fixed-wavelength แทบไม่ใช้กันแล้ว หลอดกำเนิดแสงใช้ mercury (254 nm), cadmium (229 nm), และ zinc lamps (214 nm)

118

118

3. Photodiode-array detector (PDA)

เป็น solid state detector ประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามารถวัดแสงได้หลายๆ ความยาวคลื่นได้ในขณะเดียวกัน

ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง "Reverse Option" คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow-through cell ก่อนที่จะนำไปยังโมโนโครเมเตอร์หรือเกรตติง

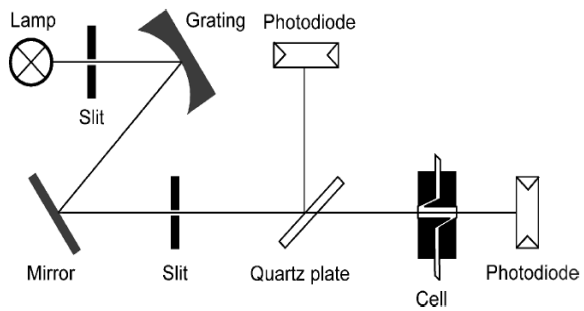
เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ ก่อนตกกระทบบนแผงของโฟโตไดโอด

scan 1msec/spectrum

120

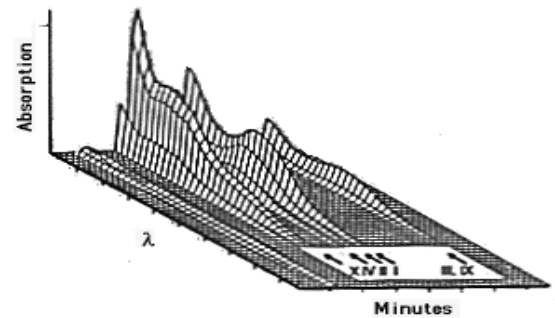
120

HPLC-UV ทั่วไป



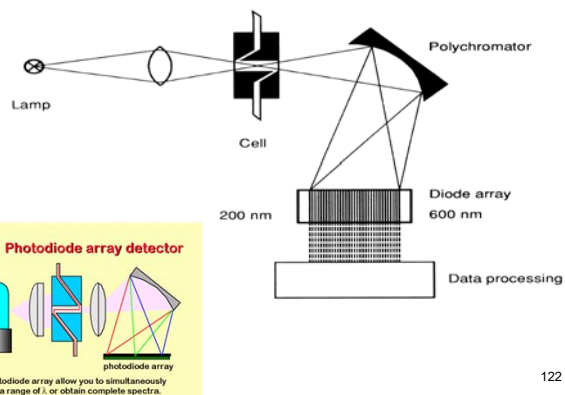
121

ลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากการเขียน 3 มิติ
ระหว่างการดูดกลืน ความยาวคลื่น และเวลา

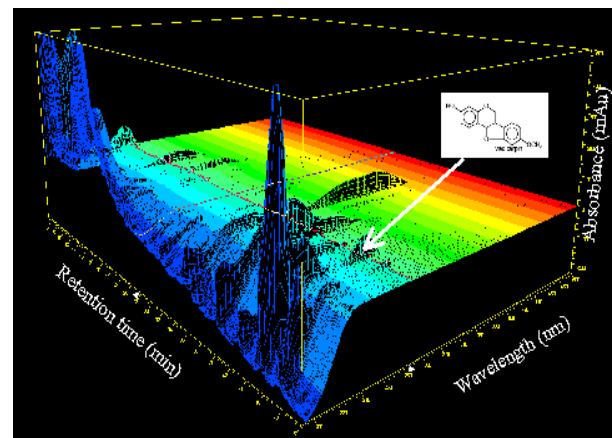


123

Principle of a diode array detector.



122



124

Ion-Exchange Chromatography

By Supaporn Sangsrichan

125

125

Ion-Exchange Chromatography

- Ion-exchange chromatography ถูกใช้ในการแยกกรดอะมิโน ตั้งแต่ปี 1956.
- เทียบได้กับ classical column chromatography ที่ใช้ silica หรือ alumina แต่บรรจุเรซิน หรือ เจลที่ใช้มีขนาดใหญ่ ความดันต่ำ การแยกสารที่ซับซ้อนใช้เวลาหลายวัน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการแยกที่ให้ความรวดเร็ว คือ HPLC และมีการพัฒนาเฟสคงที่มากมาย รวมถึง ion-exchange chromatography

127

127

Ion-Exchange Chromatography

- บทนำ
- หลักการ
- สมบัติของ ion exchangers
- ผลของ mobile phase
- การประยุกต์ใช้งาน

126

126

IEC

- เทคนิคที่ใช้สำหรับแยกสารประกอบที่มีประจุ สารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ เช่น สารอินทรีย์ที่เป็นกรดหรือเบส และสารประกอบที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับ ionic groups

128

128

หลักการ

Ion-Exchange Chromatography เฟสคงที่จะมี side-chain ที่ประกอบด้วยฟังก์ชันนัลกรุปที่มีประจุ เฟสเคลื่อนที่ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย counter ion ซึ่งก็คือ ไอออนที่มีประจุตรงข้ามกับ ionic group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่ใช้เป็น ion-exchanger และ counter ion นี้จะอยู่ในสถานะที่สมดุลกับประจุที่อยู่บน resin ในลักษณะของ ion pair

129

129

เฟสคงที่

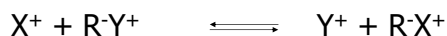
- สารอนินทรีย์ เช่น sodium aluminosilicate, montmorillonite
- สารสังเคราะห์ เช่น Zirconium
- copolymerization
- เรซินที่มีรพูน ควบคุมได้ด้วย %cross linking (1-12%, 8% นิยมใช้)

131

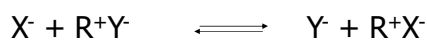
131

สมดุลที่เกิด

Cation exchange:



Anion exchange:



X = ไอออนตัวอย่าง

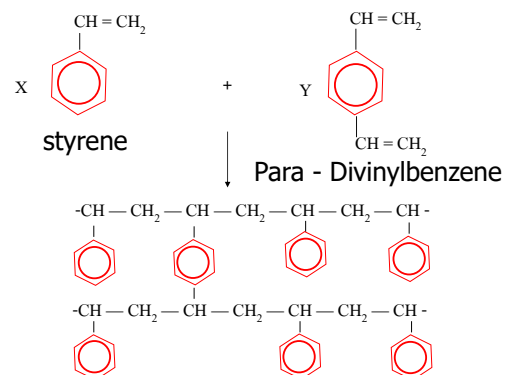
Y = counter ion

R = exchanger

130

130

สารโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากการทำโพลีเมอร์ไรซ์ที่นิยมใช้คือเรซินที่เตรียมจากการโพลีเมอร์สารสไตรีนกับไดไวนิลเบนซีน



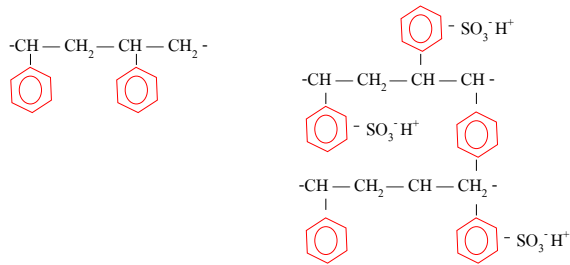
132

132

สามารถแบ่งเรซินตามคุณสมบัติของหมู่ธาตุที่ใส่เข้าไปได้ 2 ชนิด

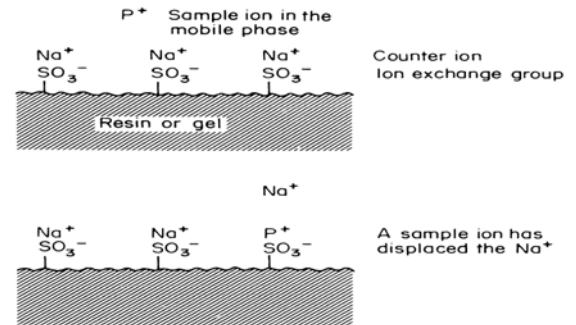
1 ชนิดแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchange)

คือเรซินชนิดที่มีหมู่ธาตุที่เป็นกรดอยู่ในวงอะโรมาติก เตรียมได้โดยนำกรดซัลฟริก + โพลีเมอร์ของ styrene และ divinylbenzen หมู่ SO_3H ดังรูป



133

Cation exchanger

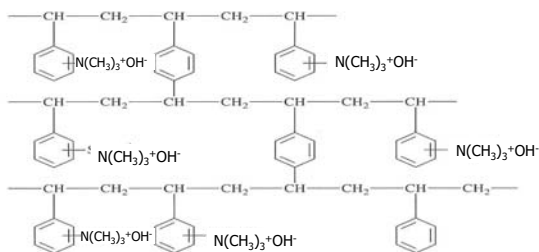


135

135

2 ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบ (Anion Exchange)

คือเรซินชนิดที่มีหมู่ธาตุที่เป็นเบสอยู่ในวงอะโรมาติก เตรียมโดยทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ของเบสกับโพลีเมอร์กับไดไวนิลเบนซีนที่ถูกทำคลอโรเมทิลเลตแล้ว



134

134

การหาสภาวะที่เหมาะสม

- ชนิดของ ion exchanger,
- pH ของ mobile phase,
- ionic strength (ความเข้มข้น) ของ mobile phase
- ชนิดของ counter ions ใน mobile phase

136

136

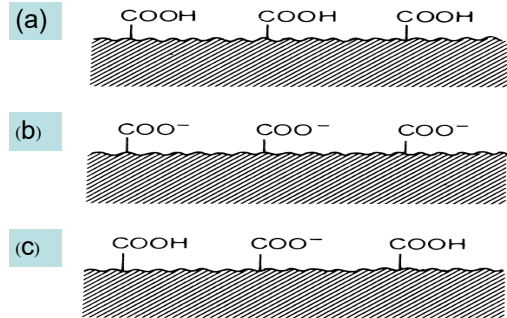
สมบัติของ ION EXCHANGERS

- ion exchangers ที่มีใช้ส่วนใหญ่มีข้อย่ด ตัวแลกเปลี่ยนประจุที่นิยมใช้แสดงดังตาราง
- 4 ชนิดแรกเป็นค่าย่อที่บอกถึงชนิดของการแลกเปลี่ยนประจุ
- ข้อย่ดส่วนที่เหลือสัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันต่างๆ
- หมู่ฟังก์ชันจะเชื่อมต่อกับเรซินที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น styrene-divinylbenzene หรือ ผิวนิลิกา

137

137

- (a) cation exchanger ที่ไม่แตกตัวเป็นไอออน
(b) cation exchanger ที่แตกตัวเป็นไอออนทั้งหมด
(c) cation exchanger ที่แตกตัวเป็นไอออนบางส่วน



139

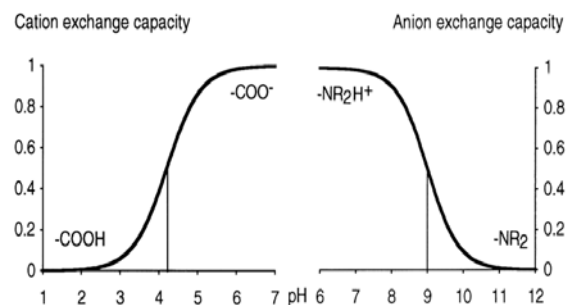
139

คำย่อที่ใช้กับตัวแลกเปลี่ยนไอออน

Abbreviation	Meaning	Type
SAX	Strong anion exchanger	
WAX	Weak anion exchanger	
SCX	Strong cation exchanger	
WCX	Weak cation exchanger	
AE	Aminoethyl	WAX
CM	Carboxymethyl	WCX
DEA	Diethylamine	WAX
DEAE	Diethylaminoethyl	WAX
DMAE	Dimethylaminoethanol	WAX
PEI	Polyethyleneimine	WAX
QA	Quaternary amine	SAX
QAE	Quaternary aminoethyl	SAX
SA	Sulphonic acid	SCX ³⁸

138

Exchange capacity of a weak cation exchanger with pKa 4.2 (left) and of a weak anion exchanger with pKa 9.0 (right).



140

140

สิ่งที่มีผลทำให้เรซินมีความประพฤติต่างกัน

1. ขนาดของเรซิน มีผลต่ออัตราเร็วในการแลกเปลี่ยนไอออนและการซึมผ่านของสารละลายออกจากคอลัมน์
2. Degree of cross – linking จะมีผลทำให้เรซินมีความแข็ง มีการพองตัว และมีขนาดรูต่างๆ กัน
3. Strength of functional group มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายของไอออนระหว่างเรซินกับสารละลาย
4. Number of functional group มีผลทำให้เรซินมีความจุต่างๆ กัน

141

141

ความสามารถดึงดูดระหว่างเรซินกับไอออนสามารถคำนวณได้จากกฎของคูลอมบ์

$$F \propto \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

q(ion) คือ ประจุของไอออน
q(resin) คือ ประจุของไอออน
r คือ ระยะห่างของประจุทั้งสอง

$$\propto \frac{q_{ion} q_{resin}}{r^2}$$

143

143

กฎการเลือก (Selectivity rules)

Ion Exchange Chromatography สามารถแยกไอออนหรือโมเลกุลได้ เนื่องจากประจุไอออนหรือโมเลกุลที่มีประจุต่างกันจึงใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ

1. ชนิดของเรซิน
2. ชนิดของหมู่ฟังก์ชัน
3. เฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูท

142

142

สรุปกฎเกณฑ์สำหรับควบคุมการประพฤติกรรมของไอออนในการแลกเปลี่ยนของเรซินดังนี้

1. ในสารละลายน้ำที่มีความเข้มข้นของไอออนต่ำๆ ไอออนที่มีประจุสูงกว่าจะแลกเปลี่ยนไอออนกับเรซินได้ดีกว่า
2. ไอออนที่มีประจุเท่ากันในสารละลายน้ำที่มีความเข้มข้นต่ำ ไอออนที่ถูกน้ำไฮเดรตได้น้อยกว่าจะแลกเปลี่ยนไอออนกับเรซินได้ดีกว่า
3. เรซินที่มีองค์ประกอบต่างกัน จะทำให้เกิดการเลือกได้
4. ความเข้มข้นสูงๆ ความแตกต่างของการเลือกไอออนที่มีประจุต่างกันจะลดลง

144

144

5. ไอออนของสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ หรือสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะต่างๆ ที่เป็นแอนไอออนสามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ดี
6. ที่อุณหภูมิสูงๆ ในสารละลายที่ไม่ใช่น้ำหรือสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงๆ การแลกเปลี่ยนไอออนที่มีประจุเหมือนกันไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอะตอมมิกนัมเบอร์

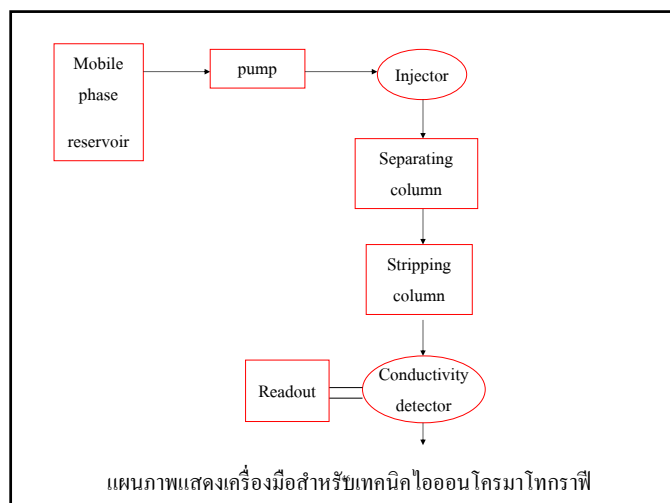
145

การประยุกต์ใช้งาน

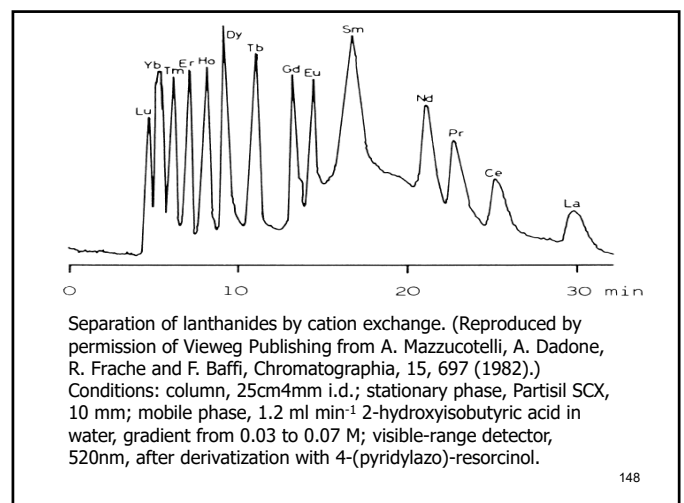
147

145

147

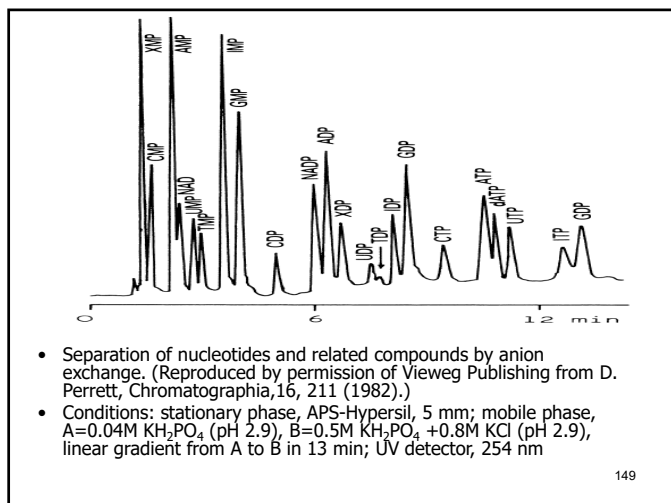


146



148

148



149

งาน วิชา คม 210

ส่งต่อ สุภาพร หน้าห้อง 2310

หัวข้อ

- 1) Gas chromatography
- 2) High performance liquid chromatography (ระบุ Normal phase/Reversed phase)
- 3) Ion exchange chromatography (Cation exchange/Anion exchange)

(รายงานกลุ่มแบ่งหัวข้อหลัก 1-3 นำเสนอหลักการ ทฤษฎี และการประยุกต์ใช้งานตามความสนใจ เช่น พืช สมุนไพร อาหาร น้ำ ดิน สิ่งแวดล้อม ยา เป็นต้น แต่ห้ามซ้ำกัน) เขียนด้วยปากกา มีเอกสารอ้างอิงครบ เช่น หนังสือ และผลงานวิจัยตีพิมพ์อีก 2 เรื่อง

150

150