# CH 210
# Chromatography

By Supaporn Sangsrichan

## ประวัติ

- 1906 Michael Tswett แยกสารที่สีในพืชด้วยผงชอล์ค และวัตถุอื่นๆ เช่น แป้ง น้ำตาล polysacharides, sucrose, Indulin
- 1930s Lederer และกลุ่มวิจัยอื่นๆ ได้ทำการวิเคราะห์ carotenoids, xanthophylls
- 1937 มีหนังสือ Chromatography เล่มแรก เขียนโดย Zech Meister

  ↓ มีการพัฒนา Paper & column chromatography
- 1940s Ion exchange partition and column chro. และเริ่มต้นเทคนิค 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 พัฒนาการใช้งานของเทคนิคโครมาโท-กราฟี ในด้าน เคมี ชีวเคมี การแพทย์ เภสัช ฯลฯ
- 1969 มีเครื่อง HPLC ขายเป็นครั้งแรก
- มีการพัฒนาปั๊ม ชนิดของอนุภาคบรรจุ และตัวตรวจวัดชนิดต่างๆ ทำให้ เทคนิคนี้เป็นที่นิยมใช้งานได้กว้างขวางกว่าเทคนิค GC
- Tiselius (Sweden) ได้รับรางวัล Nobel Prize จากงานด้าน Electrophoresis



## 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



## ความหมายของศัพท์ทางโครมาโทกราฟี

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



## การแบ่งชนิดของโครมาโทกราฟี

**chromatography**

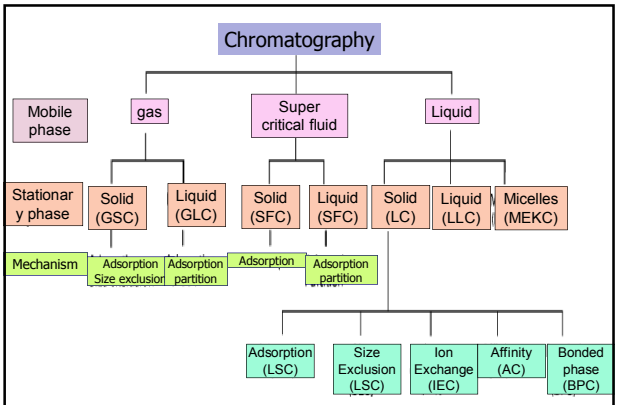



**Figure 1** Family tree of chromatographic methods.

7

# 1. Chromatography

Liquid chromatography

Gas Chromatography

## Liquid Chromatography

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

10

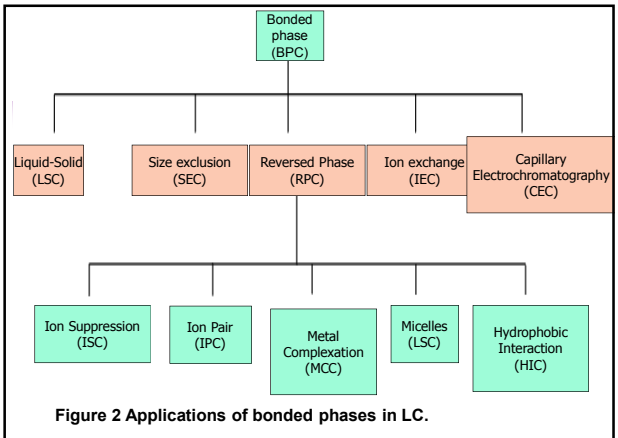



**Figure 2 Applications of bonded phases in LC.**

8

## 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

## ทฤษฎีโครมาโทกราฟี (Chromatographic Theory)

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

โมเลกุลของสารที่ถูกแยกจะกระจายตัวในระหว่างเฟส 2 เฟส การกระจายตัวนี้ขึ้นกับค่า สัมประสิทธิ์ของการกระจายตัว (Kd)

เฟสคงที่ $\underset{\rightleftharpoons}{\overset{Kd}{}}$ เฟสเคลื่อนที่

Distribution Coefficient (Kd),
Kd = ค่าคงที่ของการกระจายตัว

9

## Paper Chromatograpgy

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

12

| Normal phase chromatography | Reversed phase chromatography |
|---|---|
| Stationary phase มีความมีขั้วมากกว่า mobile phase<br>□ Stationary phase : น้ำ ยึดเกาะบนเยื่อกระดาษ (6-12%)<br>□ Mobile phase: Solvent ที่มี polarity < น้ำ | Stationary phase มีความมีขั้วน้อยกว่า mobile phase<br>□ Stationary phase :นำกระดาษมาอบไล่น้ำแล้วชุบด้วยตัวทำละลายอื่นๆ<br>□ Mobile phase: Solvent ที่มี polarity สูงกว่า st.ph. |

13

3 Detection

หลังจากการระเหยตัวทำละลายให้แห้งแล้ว สามารถตรวจวัดตำแหน่งของสารที่ถูกแยกโดย

- ด้วยตาเปล่า กรณีที่สารมีสี
- ฉายด้วยรังสี UV
- ฉายด้วยรังสี IR
- ฉายด้วยรังสี Fluorescent เกิดสารเรืองแสงขึ้น
- ตรวจหาสาร Radio active
- ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่ให้สี
  - อบด้วยไอของไอโอดีน
  - พ่น ninhydrin เพื่อตรวจหากรด amino
  - สาร $AgNO_3$ เพื่อตรวจหา sugar

16

## วิธีทำ

1. การ spot สาร ทำให้มีขนาดเล็กและเข้มข้น
2. การ Developing นำกระดาษกรอง หรือ แผ่น TLC ที่มีสารอยู่ นำมาใส่ลงในโถ Chamberที่มีตัวอีลูทที่อิ่มตัวของไอสารอยู่
   - Ascending development
   - Descending development
     - 1-dimension
     - 2-dimension

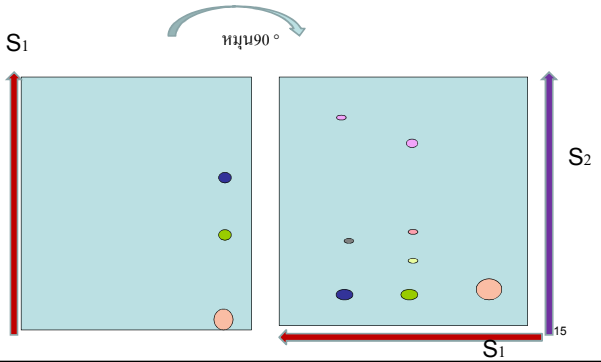
## วิธีทำ

นำกระดาษโครมาโทกราฟีมาวัดระยะห่างจากขอบประมาณ 1.5-2.0 ซม.

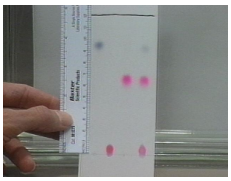
หยดสารละลายเป็นจุดเล็กๆ

นำกระดาษไปจุ่มลงในตัวทำละลาย (ระวังอย่าให้ตัวทำละลายถูกจุดของสารตัวอย่าง ) ปิดฝาภาชนะ ทิ้งไว้เป็นเวลา ประมาณ 15-20นาที

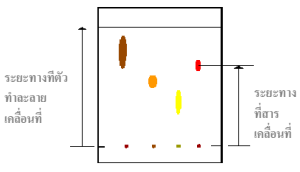
## 2-dimension PC, TLC




นำกระดาษออกมาแล้วทำให้แห้งวัดระยะของตัวทำละลายและสารตัวอย่างทีเคลื่อนที่



นำค่าที่ได้มาหาค่า $R_f$



Kd= Cs/Cm

สารที่เกิดการแยกจะมีค่า Kd ที่แตกต่างกันส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ต่างกัน

การทำคุณภาพวิเคราะห์
โดยการเปรียบเทียบค่า Rf หรือ ค่า (Rf)r ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน

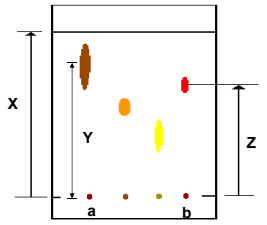
$R_f$ : Retardation factor

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

$(R_f)r$ : Relative retardation factor ค่าการหน่วงสัมพัทธ์

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่}}$$

19




**Rf ของสารตัวอย่าง** $R_f = \frac{Y}{X}$

**Rf ของสารมาตรฐาน** $R_f = \frac{Z}{X}$

**Rf สัมพัทธ์** $(R_f)_r = \frac{Y/X}{Z/X} = \frac{Y}{X} \cdot \frac{X}{Z} = \frac{Y}{Z}$

**a=สารตัวอย่าง**

**b=สารมาตรฐาน**

**X= ระยะทางทีตัวทำละลายเคลื่อนที่**

**Y= ระยะทางทีสารตัวอย่างเคลื่อนที่**

**Z= ระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่**

20

**<u>สมบัติของค่า Rf</u>**

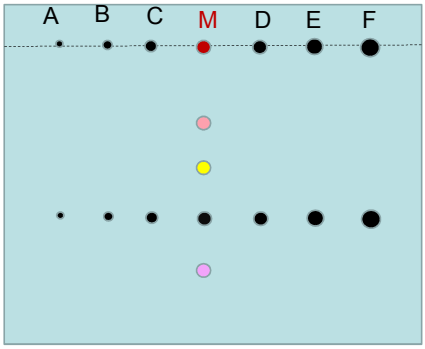
- 1. ไม่มีหน่วย
- 2. หาได้จากการทดลองเท่านั้น
- 3. มีค่าไม่เกิน 1
- 4. ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและชนิดของตัวทำละลาย
- 5. เป็นค่าเฉพาะค่าคงที่ของแต่ละสาร

**<u>การวิเคราะห์สารเป็นสารชนิดเดียวกัน มีหลักการดังนี้</u>**

- 1. มีสีเดียวกัน
- 2. มีค่า Rf เท่ากัน
- 3. มีระบบการทดลองเดียวกัน

22

การทำปริมาณวิเคราะห์




A,B,C,D, E, F = standard of known amount of compound
M= mixture of unknown

23

**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**

21

<u>ประโยชน์</u>

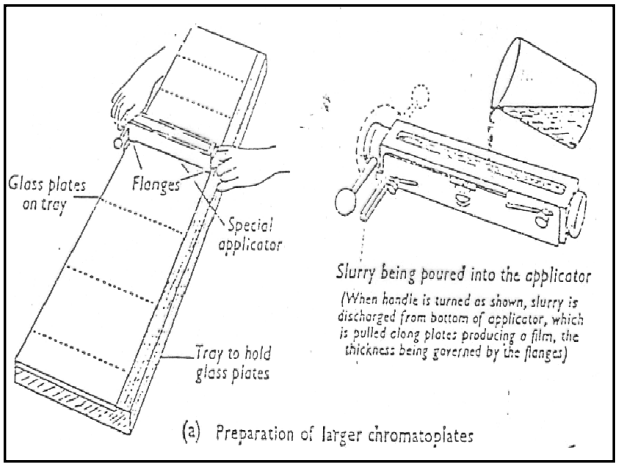
- ใช้แยกสารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ ซึ่งวิธีอื่นแยกไม่ได้
- ใช้แยกได้ทั้งสารมีสีและไม่มีสี สารไม่มีสีใช้วิเคราะห์ชนิดของสารและหาปริมาณของสารผสม
- ใช้ทดลองความบริสุทธิ์ของสาร
- ใช้ทดลองหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมก่อนการทำ HPLC
- ใช้กับตัวอย่างมากๆได้ ในขั้นตอน screening

24

## Thin layer chromatography

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

25




## เฟสคงที่ Stationary phase

➢เฟสคงที่สามารถเลือกได้หลายชนิด เช่น ทำให้เกิดการแยกโดย adsorption, partition (normal phase, reversed phase), ion exchange size exclusion

➢Plate มีขนาด 5x10, 10x20, 20x20cm

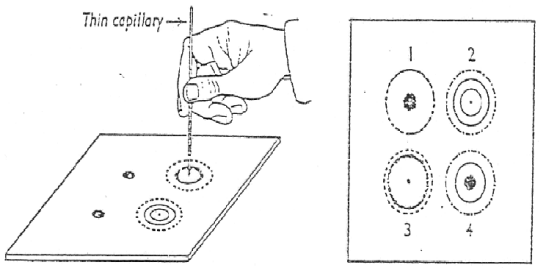
➢ความหนาของสารเคลือบ 200-250μm สำหรับอนุภาคขนาด 20μm (หรือหนากว่าสำหรับ Conventional plates)

➢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

26




29

## วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC

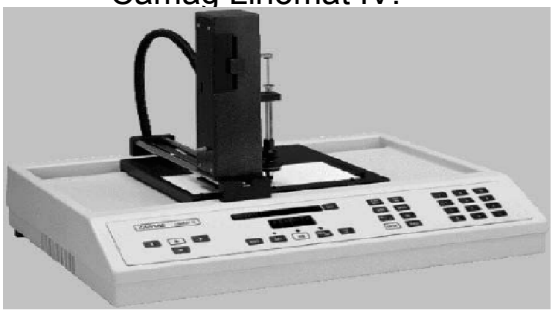
### 1. การจุดสาร

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

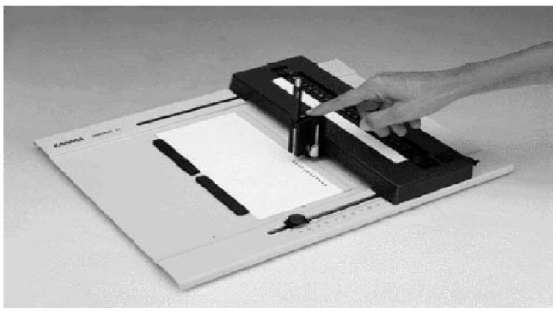
**Sample Application as Spots**

Camag Linomat IV.



30

## Sample Application as Bands
Camag Nanomat.



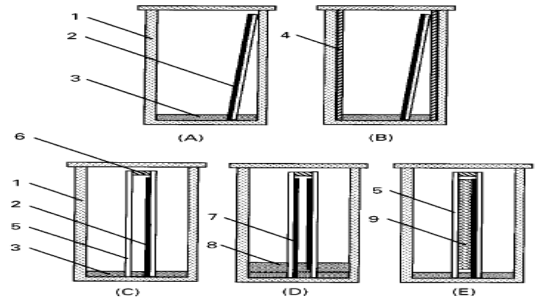
31

## 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 ต้องทำการระเหยตัวทำละลายก่อนทำการตรวจวัดสาร

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).**



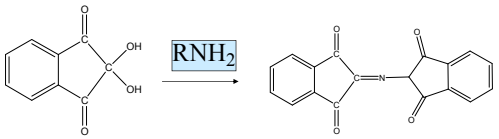

## 3. Detection การตรวจหาตำแหน่งของสารบนเพลต

1. ถ้าสารมีสมบัติ luminescence (สารอินทรีย์ fluorescence, สารอนินทรีย์;phosphorescence phenomena) สามารถตรวจหาการเรืองแสงของสารได้
2. ให้เติมสาร fluorescence indicator ลงในสารเคลือบ เมื่อสารที่ถูกตรวจวัดที่เป็น non fluorescence จะเกิดเป็นจุดจางๆ สารที่ใช้เคลือบได้แก่ pyrene derivatives, fulorescein, morin, rhodamine B
3. พ่น strong oxidant เช่น $HNO_3$, $KMnO_4$, $H2SO_4$ จะเกิดเป็นจุดสีดำ สำหรับสารอินทรีย์

34

4. พ่นสาร reagent ที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อสาร เช่น

| | |
|---|---|
| -$NH_2$ ทำปฏิกิริยากับ ninhydrin | |
| -Phenol | $Fe(III)Cl_3$ |
| -reducing sugar | Aniline phthalate |
| -metal | complex forming reagent |

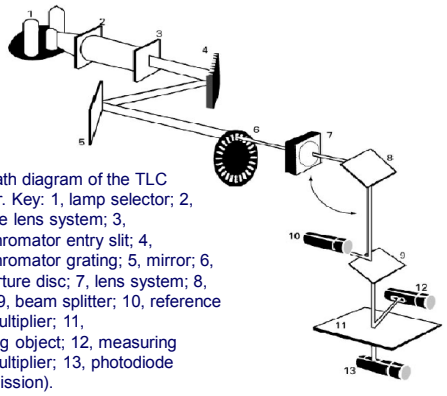



ninhydrin

Blue reaction product

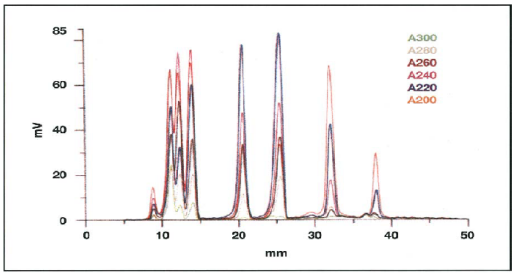
35

## 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).

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

## โครมาโทกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์ (liquid column chromatography )

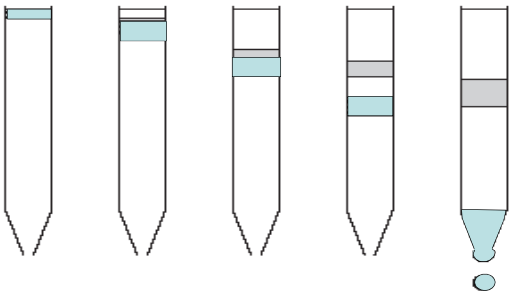
โครมาโทกราฟีของเหลวแบบคอลัมน์แบ่งตามกลไกในการแยกสารได้ 4 แบบ คือ

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

40

## Open column chromatography

38

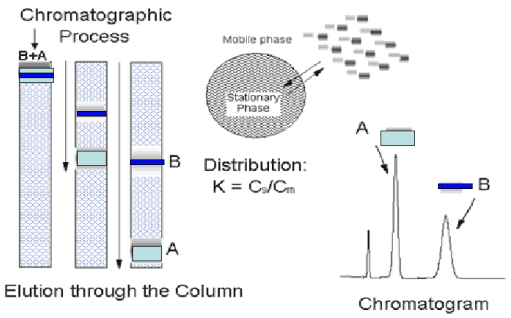


การแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แสดงการแยกของสารสองชนิด

41

39

## Mobile and Stationary phase




Mobile and Stationary phase

42

## อนุภาคบรรจุ

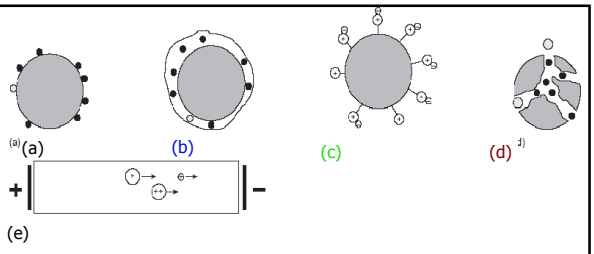
- ค.ศ. 1960
  - ตัวบรรจุเป็นของแข็งที่ไม่มีรูพรุนเป็นแกน เช่น glass bead $\phi \sim 40$ μm และเคลือบด้วยแผ่นฟิล์มบางๆ (หนา 1-3 μm)
  - ของแข็งมีลักษณะเป็นรูพรุน silica gel, alumina, resin หรือ polyamide
- ค.ศ.1980
  - อนุภาคที่ใช้บรรจุอยู่ในคอลัมน์ คือ microparticulate ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน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

43

## วิธีการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. การเตรียมคอลัมน์
   - แพ็คคอลัมน์โดยทำเฟสคงที่ให้เป็นสารแขวนลอย
   - เทลงในคอลัมน์ที่ปิดปลายด้วยสำลี หรือใยแก้ว
   - รอให้เฟสคงที่เรียงตัวในคอลัมน์ ให้มีความสูงตามต้องการ
   - ระวัง ต้องให้มีน้ำบนผิวหน้าเฟสคงที่เล็กน้อยตลอดเวลา

46




กลไกในการแยก (• = solute)
(a) adsorption chromatography,
(b) partition chromatography,
(c) ion-exchange chromatography,
(d) size exclusion chromatography, and
(e) electrophoresis.

44

## ตัวดูดซับที่เป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ นอร์มัลเฟส

High polarity

Low polarity

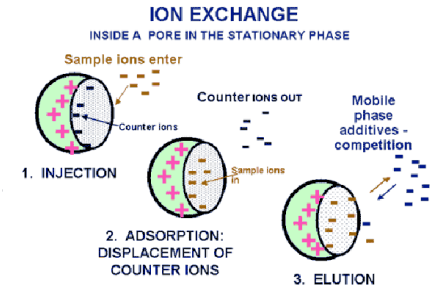
Alumina
Magnesium
Charcoal
Silica gel
Calcium oxide
Magnesium carbonate
Calcium carbonate
Potassium carbonate
Sodium carbonate
Starch
Cellulose

Greatest adsorption

Least adsorption

47

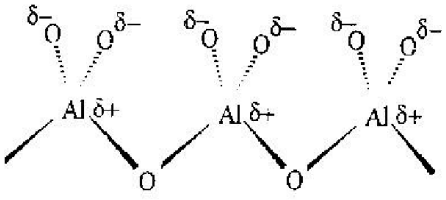
## การแลกเปลี่ยนไอออน




การแลกเปลี่ยนไอออน

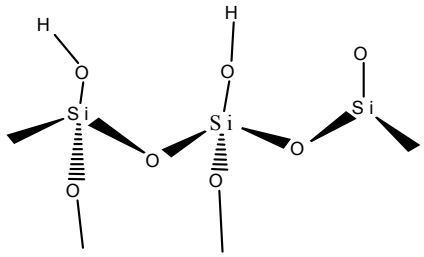
45

## Partial structure of alumina




48

## Silica gel matrix structure



49

สารที่มีฟังก์ชันนอลกรุ๊พต่างๆมีโพลาริตีตามลำดับนี้

High polarity

Organic acids (RCOOH), base ($NH_3$, $OH^-$)
Alcohols (ROH), Thiol (RSH)
Amines ($RNH_2$) Nitro groups ($RNO_2$)
Aldehydes (RCHO), Ketones (RCOR)
Esters (RCOOR')
Halides (RF, RCl, RBr, RI)
Unsaturated hydrocarbons (R-C=C-R')
Saturated hydrocarbons ($RCH_2$-$CH_2$-R')
Perfluorocarbons ($C_nF_{2n+2}$)

Low polarity

Longest retention time

Shortest retention time

ตัวดูดซับที่เป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ รีเวอร์สเฟส

- เป็นการใช้ของแข็งที่มีโพลาริตีต่ำ เช่น ผงยาง
- ใช้ของแข็งซับพอร์ทที่มีของเหลวที่ไม่มีโพลาริตีเคลือบ

* ระวัง ต้องให้มีน้ำบนผิวหน้าเฟสคงที่เล็กน้อยตลอดเวลา*

50

3. ทำการอีลูท

เป็นการเติมสารละลายที่มีโพลาริตีที่เหมาะสมในการชะสารออกจากคอลัมน์
ในการชะสารตัวอย่างที่มีโพลาริตีสูงต้องใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงด้วย

สารผสมที่มีโพลาริตีแตกต่างกันก็อาจใช้สารชะหลายตัวโดยที่เริ่มจากตัวที่มีโพลาริตีต่าก่อน

53

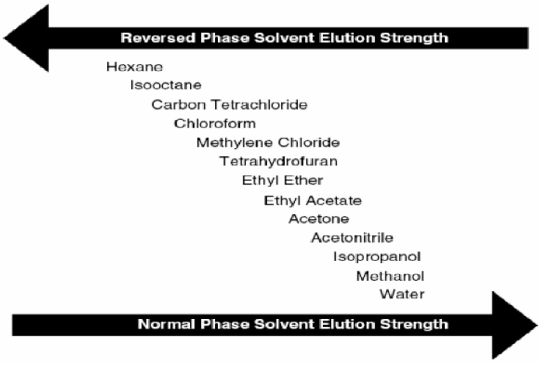
2. ใส่สารตัวอย่าง

โดยใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างแล้วปล่อยใกล้เฟสคงที่มากที่สุดโดยไม่ทำลายผิวหน้าคอลัมน์และไม่ติดข้างคอลัมน์

สารตัวอย่างที่ใช้มีโพลาริตีต่างกัน ถ้าเป็นนอร์มัลเฟสโครมาโทกราฟี สารที่มีโพลาริตีสูงจะอยู่ในคอลัมน์ได้นานที่สุด

51

## Eluting solvent



## 4. เก็บสารตัวอย่าง

- เก็บแบบ manual โดยเก็บทีละ 1-10 mL
- ใช้เครื่องเก็บ fraction collector
  สามารถเก็บตัวอย่างแบบถี่ได้ โดยไม่ต้องเฝ้า

## 5. การวัดปริมาณสารที่ออกจากคอลัมน์

- วัดโดย Optical method; UV, IR, Fluorescence
- Electrochemical method; Voltametry, conductivity etc.

55

## ข้อเสียของ Open column chromatography

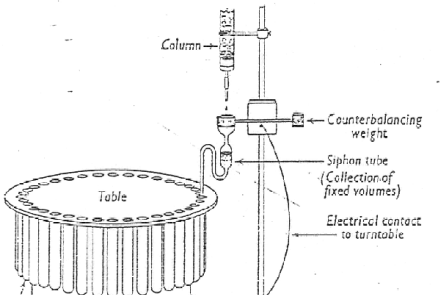
- การบรรจุอนุภาคบรรจุ (packing particle)ทำได้ช้าและเสียเวลา
- ประสิทธิภาพการแยกต่ำ
- ต้องเก็บสารเป็นส่วนๆ ทำให้ใช้เวลานาน

## ข้อเสียของ Thin layer chromatography

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

58

## Fraction Collector



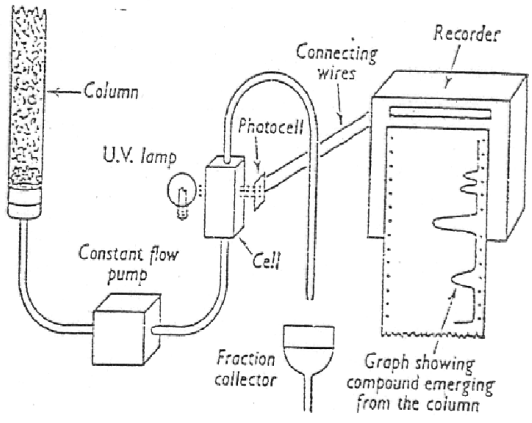

56

## Modern Liquid Chromatography

- มีการพัฒนาชนิด วัสดุของอนุภาคบรรจุ
- มีการพัฒนาปั๊มหลายแบบ
- มีการพัฒนาตัวตรวจวัดหลายชนิดขึ้น

ปี คศ 1967 มีการประดิษฐ์ HPLC มาใช้งานด้านการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ โดย Horvath

59




## ข้อดีของ Modern Liquid Chromatography

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

60

# แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

61

Gas Chromatography (GC) เป็นเทคนิคการแยกสารพวกที่มี polarity ต่ำ สารตัวอย่างต้องระเหยเป็นแก๊สหรือไอ ณ จุดฉีดสาร carrier gas เป็น mobile phase พาสารเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งมี stationary phase ที่เป็น liquid หรือ solid ทำหน้าที่แยกสารและถูกตรวจวัดในส่วนของดีเทคเตอร์ต่อไป

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)

62

## 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

63

## 2. Gas Liquid Chromatography (GLC)

- ใช้หลักการ partition สารผสมที่ต้องการแยกอยู่ในสภาพที่เป็น แก๊ส หรือไอ เมื่อผ่านเข้าสู่คอลัมน์จะแยกออกจากกันโดยความแตกต่างในการกระจายตัวอยู่ใน mobile phase (carrier gas) และ stationary phase ที่เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนผิวของ inert solid support

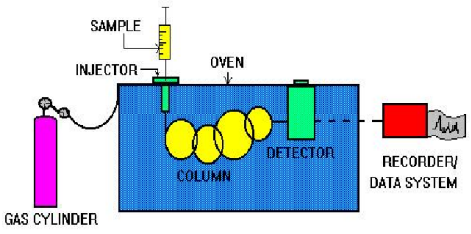
64

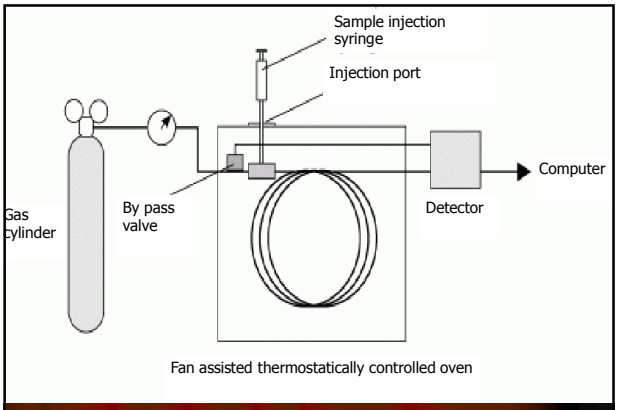
## ส่วนประกอบสำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC)

- ส่วนฉีดสาร (Injector)
- เตาอบ (Oven)
- คอลัมน์ (Column)
- ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector)
- ระบบบันทึก และเก็บข้อมูล (Recorder, Integrator)
- ผลที่ได้จะแสดงในรูปของ โครมาโทแกรม (Chromatogram)

65

## Gas Chromatograph






## องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่อง GC



## แพ็ค คอลัมน์

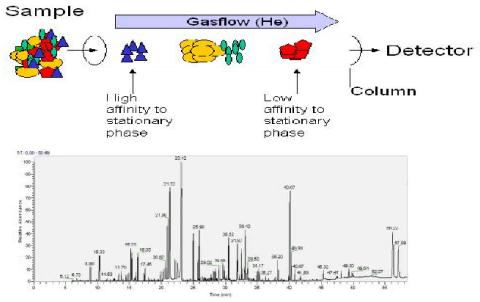
- Syringes
  - Plunger-in-barrel (5-1000 μL)
  - plunger-in-needle (0.5 or 1 μL) ดูดสารเท่าไรก็ได้จนถึง 1 μL
  - 5 μL syringe จ่ายสารได้ครั้งละ 0.3 μL ได้

**Capillary Columns**

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



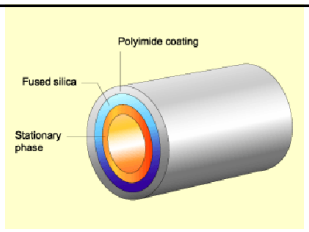
**A** Scheme of gas chromatography.

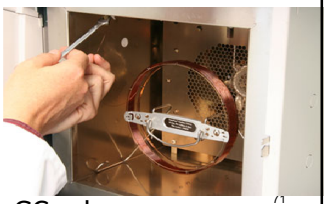



**B** Typical chromatogram of a cell extract of *C. glutamicum*.

www.cubic.uni-koeln.de/.../metabolom.html

Packed GC column





Capillary GC column

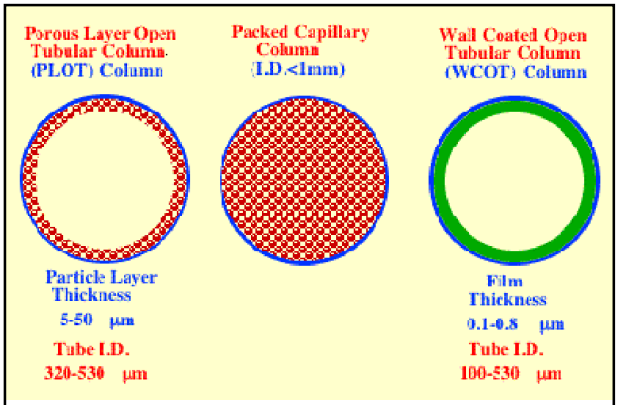


## คุณสมบัติของ Solid support

- inert
- มี large surface area
- regular shape หรือ uniform size

Solid support ที่นิยมใช้คือ celite หรืออาจใช้ glass beads






Different Types of Small Bore Columns

## Carrier gas

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

แก๊สพาที่นิยมโดยทั่วไปได้แก่ ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และฮีเลียม

## 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

76

## คุณสมบัติของ Carrier gas

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

แก๊สพาที่ออกจากท่อแก๊สควรทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านท่อที่บรรจุด้วย molecular sieve เพื่อช่วยขจัดไอน้ำหรือไอน้ำมัน

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

77

## Sampling Systems

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

75

## 2) Oven

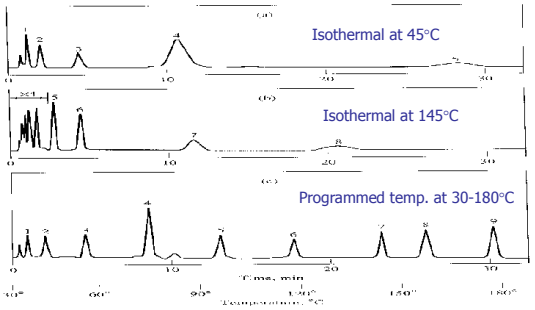
คือ ส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ column เอาไว้ และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของ column ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับสารที่ถูกฉีด ซึ่งอุณหภูมิของ oven นั้นจะสามารถปรับเปลี่ยนได้ 2 แบบคือ

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

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

78

## Temperature programming




79

## 3) Detector

คือ ส่วนที่จะใช้สำหรับตรวจวัด องค์ประกอบที่มีอยู่ในสาร ตัวอย่าง ดูว่าสารที่เราสนใจนั้นมีปริมาณอยู่เท่าไร ซึ่งความสามารถของการตรวจวัดนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของ detector ที่เลือกใช้

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ คือ detector

detector จะทำการเปลี่ยนเป็นสัญญาณทาง electronic ก่อนส่งไปยังตัวประมวลผลเพื่อทำการเขียนเป็นความสัมพันธ์กับเวลาได้ออกมาเป็น chromatogram ดังนั้นการเลือก detector จึงต้องทำให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์

80

## สมบัติของ Detector

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

81

## Detector

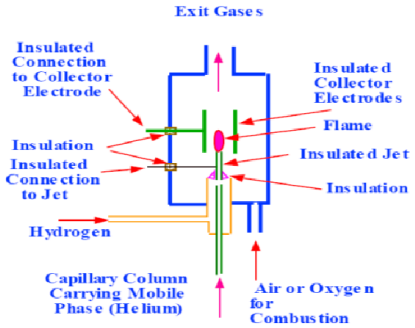
- general detector สามารถตรวจวัดสารได้หลายๆ ประเภท
- selective detector ซึ่งจะสามารถเห็นเฉพาะสารที่มีโครงสร้างเฉพาะ, มี functional group หรือ atoms ที่จำเพาะเจาะจง

82

## 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 ElCD
8. Mass Spectrometer MS
9. Pulsed Flame Photometric Detector PFPD

83




Schematic diagram of a flame ionization detector for gas chromatography

84

## 1. Flame Ionization Detector (FID)

มีคุณลักษณะของ GC ดีเทคเตอร์ในอุดมคติแทบทุกอย่าง

หลักการ

การสันดาปไอของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ในเปลวไฟของไฮโดรเจนในอากาศหรือออกซิเจนและวัดไอออนที่เกิดขึ้นจากองค์ประกอบของพีคที่ออกจากคอลัมน์ของ 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

85

## ลักษณะเปรียบเทียบของ GC ดีเทคเตอร์ที่สำคัญ

| ดีเทคเตอร์ | หลักการ | ความจำเพาะ | ความว่องไว | ช่วงเส้นตรง |
|---|---|---|---|---|
| เทอร์มัลคอนดักทิวิตีดีเทคเตอร์ (TCD) | วัดความแตกต่างของค่าการนำความร้อนของแก๊ส | สนองตอบต่อสารประกอบทุกอย่าง | $10^{-10}$ | $10^{4}$ |
| เฟลมไอออนไนเซชันดีเทคเตอร์ (FID) | เผาสารประกอบในเปลวไฟ $H_2$ / $O_2$ ที่ 2000 องศาเซลเซียส | สนองตอบต่อสารอินทรีย์ที่สามารถถูกออกซิไดส์ | $10^{-12}$ | $10^{7}$ |
| อิเล็กตรอนแคพเจอร์ดีเทคเตอร์ (ECD) | วัดการเปลี่ยนแปลงของกระแสอิเล็กตรอนที่เกิดจากปฏิกิริยาจากสารประกอบอินทรีย์กับอิเล็กตรอน | ตอบสนองต่อสารประกอบทุกอย่างที่ทำปฏิกิริยากับอิเล็กตรอน | $10^{-14}$ | $10^{3}$ ($10^{6}$ สำหรับ pulsed operation) |

88

## 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

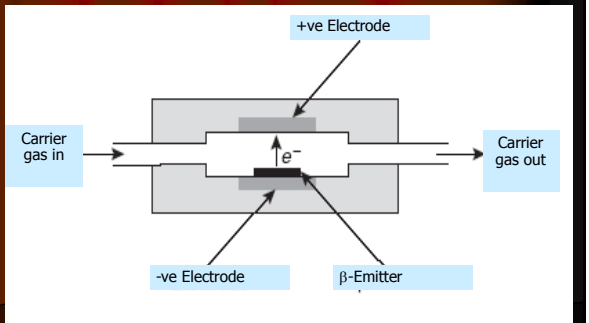
$$N_2 \longrightarrow N_2^+ + e^-$$
$$PCB + e^- \longrightarrow PCB^-$$
$$PCB^- + N_2^+ \longrightarrow \text{neutral compound}$$

## Properties of Some Gas Chromatography Selective Detectors

| Detector | Selectivity mode | Approximation sensitivity (g) |
|---|---|---|
| ECD | Affinity to low-energy electrons | $10^{-13}$ – $10^{-14}$ |
| Thermionic | Nitrogen,<br>Phosphorous | $10^{-12}$<br>$10^{-13}$ |
| Flame-photometric | Sulpher | $10^{-9}$ |
| Electrolytic conductivity | Halogen compounds | $10^{-11}$ |
| Ultraviolet | Aromatics | $10^{-9}$ |
| Photoionisation | Partially enhanced response to certain organic molecules as compared with FID (not truly selective) | $10^{-11}$ – $10^{-12}$ |

89

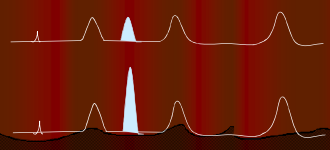
## Schematic diagram of an electron capture detector for gas chromatography




## การทำคุณภาพวิเคราะห์

เพื่อวิเคราะห์สารตัวอย่างว่าเป็นสารอะไร มีกี่ชนิดและเป็นสารใดบ้าง

1. ใช้ค่ารีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน แต่สารต่างชนิดกันอาจให้ค่ารีเทนชันไทม์ตรงกันก็ได้ อาจวิเคราะห์อีกแต่สภาวะการแยกต่างกัน เช่น คอลัมน์ อุณหภูมิ อัตราการไหล เป็นต้น
2. เทคนิค spiking บอกว่าพีกไหนเป็นของสารใดในสารผสมนั้น โดยเติมสารสารนั้นลงในสารตัวอย่าง ถ้าโครมาโทแกรมที่ได้มีพีกใดที่มีพื้นที่ได้พีก หรือความสูงเพิ่มขึ้นแสดงว่า พีกนั้นเป็นของสารที่เราเติมลงไป (known compound)

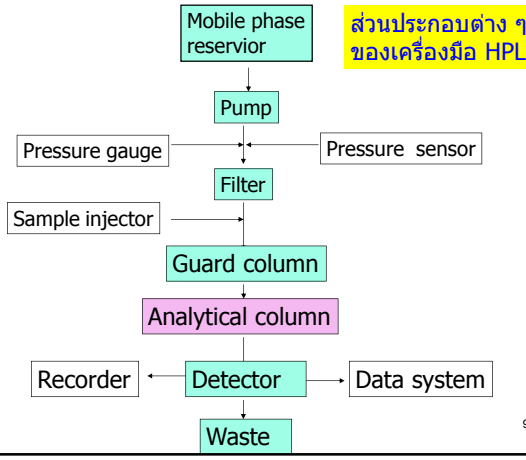


## Quantitative Applications

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

ใช้ในการวิเคราะห์ทางสิ่งแวดล้อม ทางการแพทย์ ชีวเคมี การ พิสูจณ์หลักฐาน อาหาร ห้องปฏิบัติการปิโตรเคมี



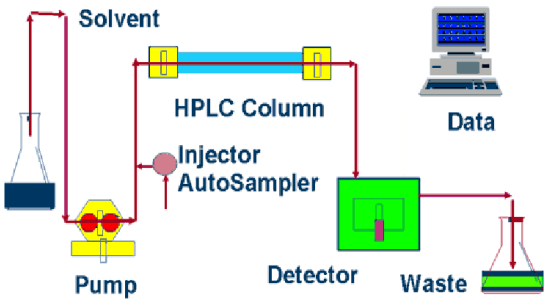



ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องมือ HPLC



## เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

# High Performance Liquid Chromatography




แผนภาพส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องมือ HPLC

## การทำงาน

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

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



## 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)

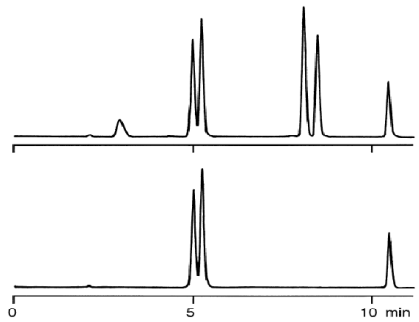
97

## การอีลูท

- Isocratic elution เป็นการใช้สารละลายที่เหมาะสมเพียงตัวเดียวตลอดการชะ อาจจะใช้เวลานานในการแยก และหรือพีกจะมีหาง
- Gradient elution โดยทำการโปรแกรมตัวทำละลาย คือ การผสมตัวทำละลาย (>) 2 ชนิด

98

## Isocratic vs Gradient




99

## อุปกรณ์สำหรับฉีดสารตัวอย่าง (sample introduction devices)

การผ่านสารตัวอย่างเข้าไปยังคอลัมน์ควรจะอยู่ในลักษณะที่เป็นแถบที่แคบมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

วิธีการนิยมใช้

- microsampling valve
- microsyringe ฉีดสารตัวอย่างผ่าน septum

100

## CAPILLARY TUBING

- Capillaries (o.d. outer diameter) ขนาด 1/16 นิ้ว (1.6 mm) เป็นที่นิยมใช้กับคอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน ขนาด 0.17, 0.25, 0.50 และ 1.0mm

101

## ระบบของปั๊ม (pumping system)

ใน HPLC มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็กบรรจุอยู่ ความต้านทานจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆ และคอลัมน์มีขนาดเล็กด้วย จึงจำเป็นที่จะต้องใช้ปั๊มความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้สามารถไหลได้

102

## หลักการเลือก pumping system

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

## ปั๊มแบบชักลูกสูบ (reciprocating pumps)

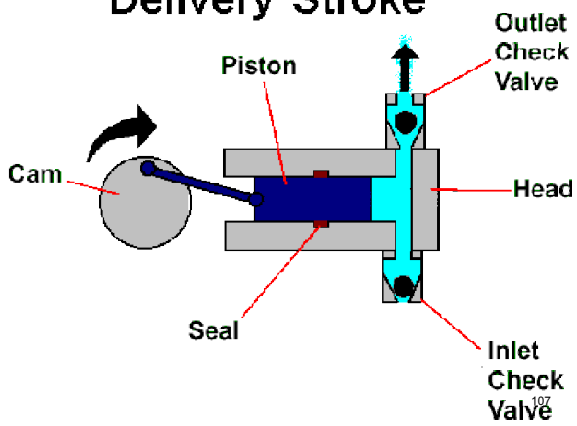
ปั๊มชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก ก้านสูบปั๊มที่จะเคลื่อนที่เข้าออกตลอดเวลาการทำงาน เมื่อลูกสูบเคลื่อนที่เข้าจะเป็นการดันวัฏภาคเคลื่อนที่ให้เข้าสู่คอลัมน์ และเคลื่อนที่ออกนอกจะดึงเอาวัฏภาคเคลื่อนที่จาก reservoir เข้าสู่ลูกสูบผ่าน check valve แสดงดังรูปเป็นการควบคุมการเคลื่อนที่กระทำได้โดยการปรับอัตราเร็วของการชักลูกสูบผ่านมอเตอร์ และคอมพิวเตอร์

106

## ชนิดของปั๊ม

- mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่
- pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่

104

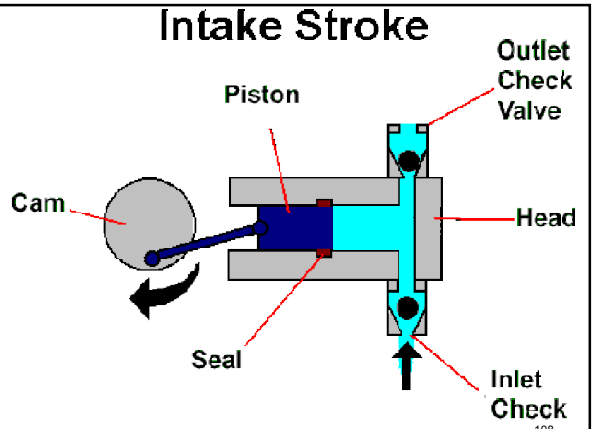



107

## Syringe pump และ Constant displacement pump

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

105




108

## reciprocating pumps

| ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|---|
| • มีปริมาตรภายในต่ำ ทำให้การเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ง่าย<br>• การส่งวัฏภาคเคลื่อนที่จะอยู่ในลักษณะต่อเนื่อง<br>• อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่คงที่ดี โดยไม่ต้องคำนึงถึง back pressure ของคอลัมน์ | • เกิดพัลส์ขึ้นทำให้ความไวของดีเทคเตอร์บางชนิดมีข้อจำกัด<br>• ต้องมี pulse damper<br>• ปริมาตรของระบบระหว่างปั๊มกับคอลัมน์เพิ่มขึ้น<br>• เกิดความยุ่งยากในการเปลี่ยนตัวทำละลาย<br>• ไม่เหมาะในการทำ gradient elution |

## เครื่องตรวจวัด (detector)



## ชนิดของเครื่องตรวจวัดในเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

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



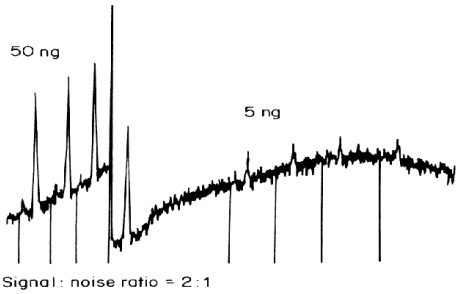
## สมบัติของเครื่องตรวจวัด (detector)

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

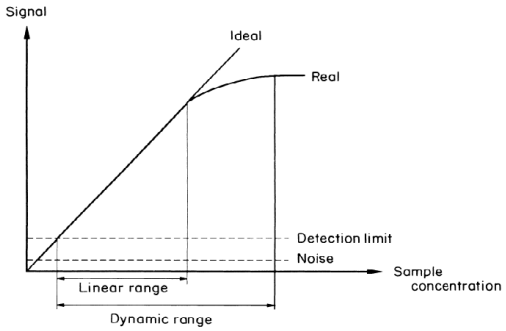


## Noise

## Detection Limit



## Linear detector range




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 |

## Cell Volume

- ปริมาตรของดีเทคเตอร์ต้องมีค่าต่ำ เพื่อป้องกัน peak broadening ต้องมีค่าต่ำกว่า 10% ปริมาตรที่ชะพีคทีแคบที่สุด ปริมาตรมาตรฐาน คือ 8 μl ถ้าน้อยกว่านี้จะมีผลต่อ detection limit
- ปริมาตร < 8 สำหรับ micro-HPLC

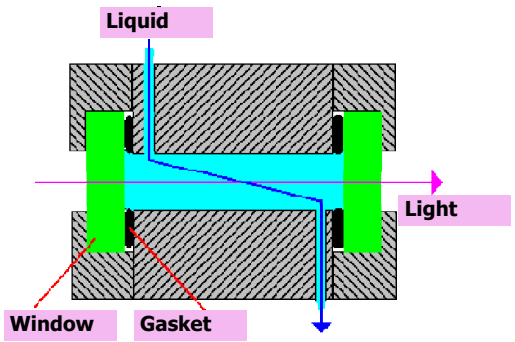
116

## อัลตราไวโอเลต ดีเทคเตอร์ (Ultraviolet detector)

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

119

## UV flow cell




117

## 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: $Br^-$, $I^-$, $NO_3^-$, $NO_2^-$

120

## UV detector

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

121

## 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)

122

## 2. Variable UV-Vis detector

- แหล่งกำเนิดแสงประกอบด้วย $D_2$ และ W lamps
- Deuterium lamps ให้แสงแบบต่อเนื่อง (- 340 nm,
- Tungsten–halogen ให้แสงช่วง near-UV และ visible (340–850 nm) มักใช้ร่วมกับหลอดดิวที่เรียม
- มีโมโนโครเมเตอร์ เพื่อใช้สำหรับเลือกความยาวคลื่นตามที่ต้องการได้

123

## 3. Photodiode-array detector (PDA)

เป็น solid state detector ประกอบด้วยโฟโตไดโอดจำนวนมาก สามาถวัดแสงได้หลายๆ ความยาวคลื่นได้ในขณะเดียวกัน

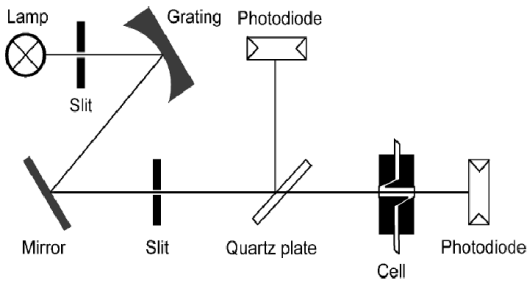
ระบบทางเดินของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง " Reverse Option" คือแสงจากแหล่งกำเนิดหรือจากหลอดยูวีจะผ่านไปยัง flow-through cell ก่อนที่จะนำไปยังโมโนโครเตอร์หรือเกรตติง

เมื่อแสงที่ตกกระทบบนเกรตติงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆก่อนตกกระทบบนแผงของโฟโตไดโอด

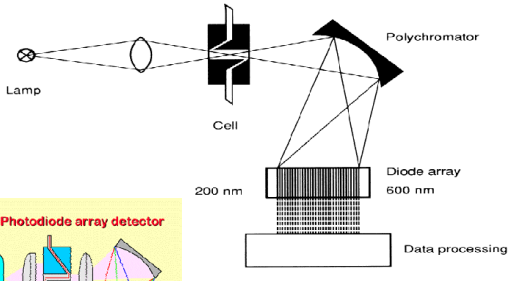
scan 1msec/spectrum

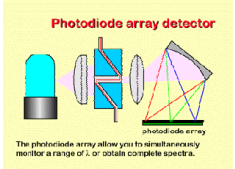
124

## HPLC-UV ทั่วไป



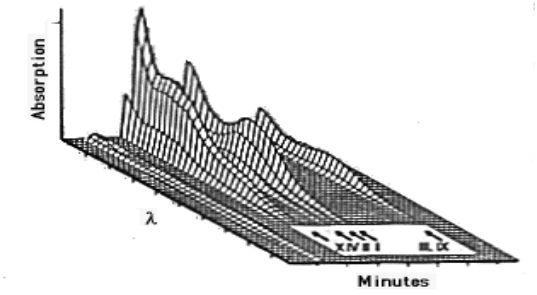

## Principle of a diode array detector.



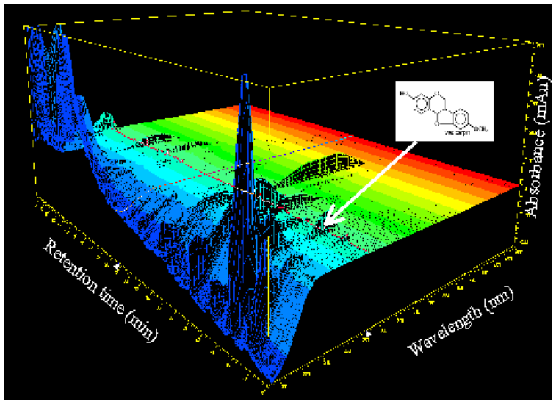




126

ลักษณะของสเปกตรัมที่ได้จากการเขียน 3 มิติ ระหว่างการดูดกลืน ความยาวคลื่น และเวลา








## Ion-Exchange Chromatography

By Supaporn Sangsrichan



## Ion-Exchange Chromatography

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



## Ion-Exchange Chromatography

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



## IEC

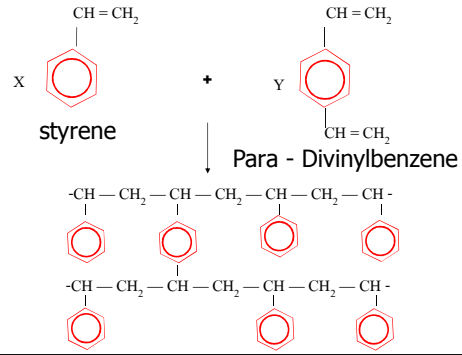
- เทคนิคที่ใช้สำหรับแยกสารประกอบที่มีประจุ สารประกอบที่แตกตัวเป็นไอออนได้ เช่น สารอินทรีย์ที่เป็นกรดหรือเบส และสารประกอบที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับ ionic groups

## หลักการ

Ion-Exchange Chromatography เฟสคงที่จะมี side-chain ที่ประกอบด้วยฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่มีประจุ เฟสเคลื่อนที่ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย counter ion ซึ่งก็คือ ไอออนที่มีประจุตรงข้ามกันกับ ionic group ที่อยู่บนผิวของอนุภาคที่ใช้เป็น ion-exchanger และ counter ion นี้จะอยู่ในสภาวะที่สมดุลกับประจุที่อยู่บน resin ในลักษณะของ ion pair

133

สารโพลีเมอร์ที่สังเคราะห์ได้จากการทำโพลีเมอร์ไรซ์ที่นิยมใช้คือเรซินที่เตรียมจากการโพลีเมอร์สารสไตรีนกับไดไวนิลเบนซิน




136

## สมดุลที่เกิด

Cation exchange:

$X^+ + R^-Y^+ \rightleftharpoons Y^+ + R^-X^+$

Anion exchange:

$X^- + R^+Y^- \rightleftharpoons Y^- + R^+X^-$

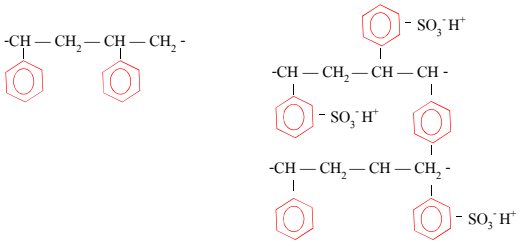
X = ไอออนตัวอย่าง
Y = counter ion
R = exchanger

134

สามารถแบ่งเรซินตามคุณสมบัติของหมู่ธาตุที่ใส่เข้าไปได้ 2 ชนิด

1 ชนิดแลกเปลี่ยนแคทไอออน (cation exchange)

คือเรซินชนิดที่มีหมู่ธาตุที่เป็นกรดอยู่ในวงอะโรมาติก เตรียมได้โดยนำกรดซัลฟุริก + โพลีเมอร์ของ styrene และ divinylbenzen หมู่ $SO_3H$ ดังรูป



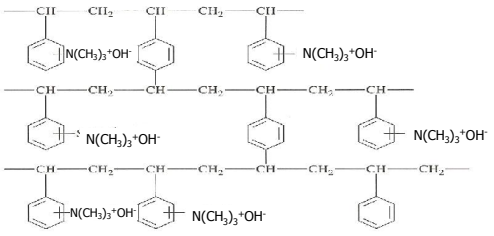

## เฟสคงที่

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

135

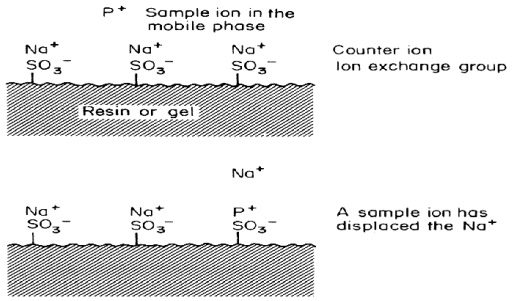
2 ชนิดแลกเปลี่ยนไอออนลบ (Anion Exchange)

คือเรซินชนิดที่มีหมู่ธาตุที่เป็นเบสอยู่ในวงอะโรมาติก เตรียมโดยทำปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ของเบสกับโพลีเมอร์กับไดไวนิลเบนซินที่ถูกทำคลอโรเมทิลเลตแล้ว




138

## Cation exchanger




139

## คำย่อที่ใช้กับตัวแลกเปลี่ยนไอออน

| Abbreviation | Meaning | | Type |
|---|---|---|---|
| SAX | Strong anion exchanger | | |
| WAX | Weak anion exchanger | | |
| SCX | Strong cation exchanger | | |
| WCX | Weak cation exchanger | | |
| AE | Aminoethyl | $-CH_2-CH_2-NH_3^+$ | WAX |
| CM | Carboxymethyl | $-CH_2-COO^-$ | WCX |
| DEA | Diethylamine | $-NH(CH_2-CH_3)_2^+$ | WAX |
| DEAE | Diethylaminoethyl | $-CH_2-CH_2-NH(CH_2-CH_3)_2^+$ | WAX |
| DMAE | Dimethylaminoethanol | $-O-CH_2-CH_2-NH(CH_3)_2^+$ | WAX |
| PEI | Polyethyleneimine | $-(NH-CH_2-CH_2-)_n-NH_3^+$ | WAX |
| QA | Quaternary amine | $-NR_3^+$ (R :$CH_3$) | SAX |
| QAE | Quaternary aminoethyl | $-CH_2-CH_2-N(CH_2-CH_3)_3^+$ | SAX |
| SA | Sulphonic acid | $-SO_3^-$ | SCX |

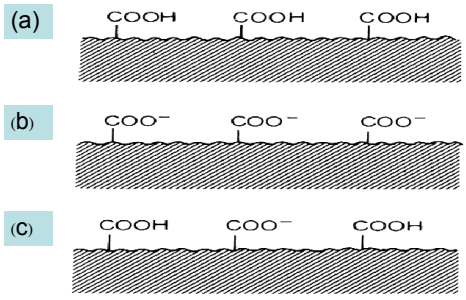
142

## การหาสภาวะที่เหมาะสม

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

140

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



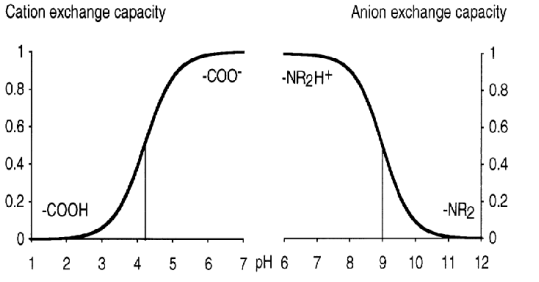

143

## สมบัติของ ION EXCHANGERS

- ion exchangers ที่มีใช้ส่วนใหญ่มีชื่อย่อ ตัวแลกเปลี่ยนประจุที่นิยมใช้แสดงดังตาราง
- 4 ชนิดแรกเป็นคำย่อที่บอกถึงชนิดของการแลกเปลี่ยนประจุ
- ชื่อย่อส่วนที่เหลือสัมพันธ์กับหมู่ฟังก์ชันต่างๆ
- หมู่ฟังก์ชันจะเชื่อมต่อกับเรซินที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น styrene–divinylbenzene หรือ ผิวซิลิกา

141

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




144

สิ่งที่มีผลทำให้เรซินมีความประพฤติต่างกัน

1. ขนาดของเรซิน
2. Degree of cross – linking
3. Strength of functional group
4. Number of functional group

145

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

146

กฎการเลือก (Selectivity rules)

Ion Exchange Chromatography สามารถแยกไอออนหรือโมเลกุลได้ เนื่องจากประจุไอออนหรือโมเลกุลที่มีประจุต่างกันจึงใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ

1. ชนิดของเรซิน
2. ชนิดของหมู่ฟังก์ชัน
3. เฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูท

147

ความสามารถดึงดูดระหว่างเรซินกับไอออน สามารถคำนวณได้จากกฎของคูลอมบ์

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

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

q(ion) คือ ประจุของไอออน

q(resin) คือ ประจุของไอออน

r คือ ระยะห่างของประจุทั้งสอง

148

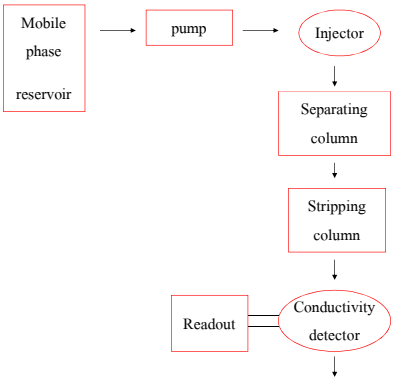
สรุปกฎเกณฑ์สำหรับควบคุมการประพฤติของไอออนในการแลกเปลี่ยนของเรซินดังนี้

1. ในสารละลายน้ำที่มีความเข้มข้นของไอออนต่ำๆ ไอออนที่มีประจุสูงกว่าจะแลกเปลี่ยนไอออนกับเรซินได้ดีกว่า
2. ไอออนที่มีประจุเท่ากันในสารละลายน้ำที่มีความเข้มข้นต่ำ ไอออนที่ถูกน้ำไฮเดรทได้น้อยกว่าจะแลกเปลี่ยนไอออนกับเรซินได้ดีกว่า
3. เรซินที่มีองศาเชื่อมโยงต่างกัน จะทำให้เกิดการเลือกได้
4. ความเข้มข้นสูงๆ ความแตกต่างของการเลือกไอออนที่มีประจุต่างกันจะลดลง

149

5. ไอออนของสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ หรือสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะต่างๆ ที่เป็นแอนไอออนสามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ดี
6. ที่อุณหภูมิสูงๆ ในสารละลายที่ไม่ใช่น้ำหรือสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงๆ การแลกเปลี่ยนไอออนที่มีประจุเหมือนกันไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอะตอมมิกนัมเบอร์

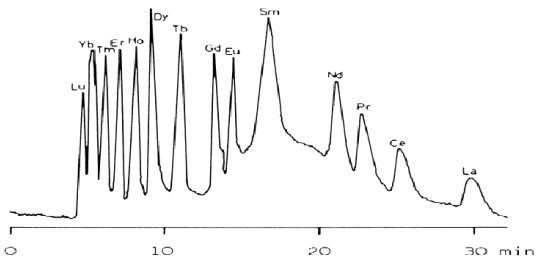
150




แผนภาพแสดงเครื่องมือสำหรับเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี

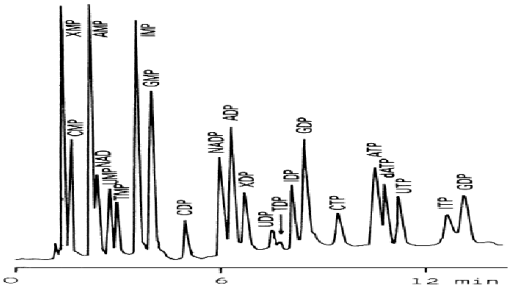
# การประยุกต์ใช้งาน

152




Separation of lanthanides by cation exchange. (Reproduced by permission of Vieweg Publishing from A. Mazzucotelli, A. Dadone, R. Frache and F. Baffi, Chromatographia, 15, 697 (1982).) Conditions: column, 25cm4mm i.d.; stationary phase, Partisil SCX, 10 mm; mobile phase, 1.2 ml $min^{-1}$ 2-hydroxyisobutyric acid in water, gradient from 0.03 to 0.07 M; visible-range detector, 520nm, after derivatization with 4-(pyridylazo)-resorcinol.

153




- Separation of nucleotides and related compounds by anion exchange. (Reproduced by permission of Vieweg Publishing from D. Perrett, Chromatographia,16, 211 (1982).)
- Conditions: stationary phase, APS-Hypersil, 5 mm; mobile phase, A=0.04M $KH_2PO_4$ (pH 2.9), B=0.5M $KH_2PO_4$ +0.8M KCl (pH 2.9), linear gradient from A to B in 13 min; UV detector, 254 nm

154