บทที่ 2

เทคนิคทางโครมาโตกราฟีและสเปกโตรโฟโตเมตรี

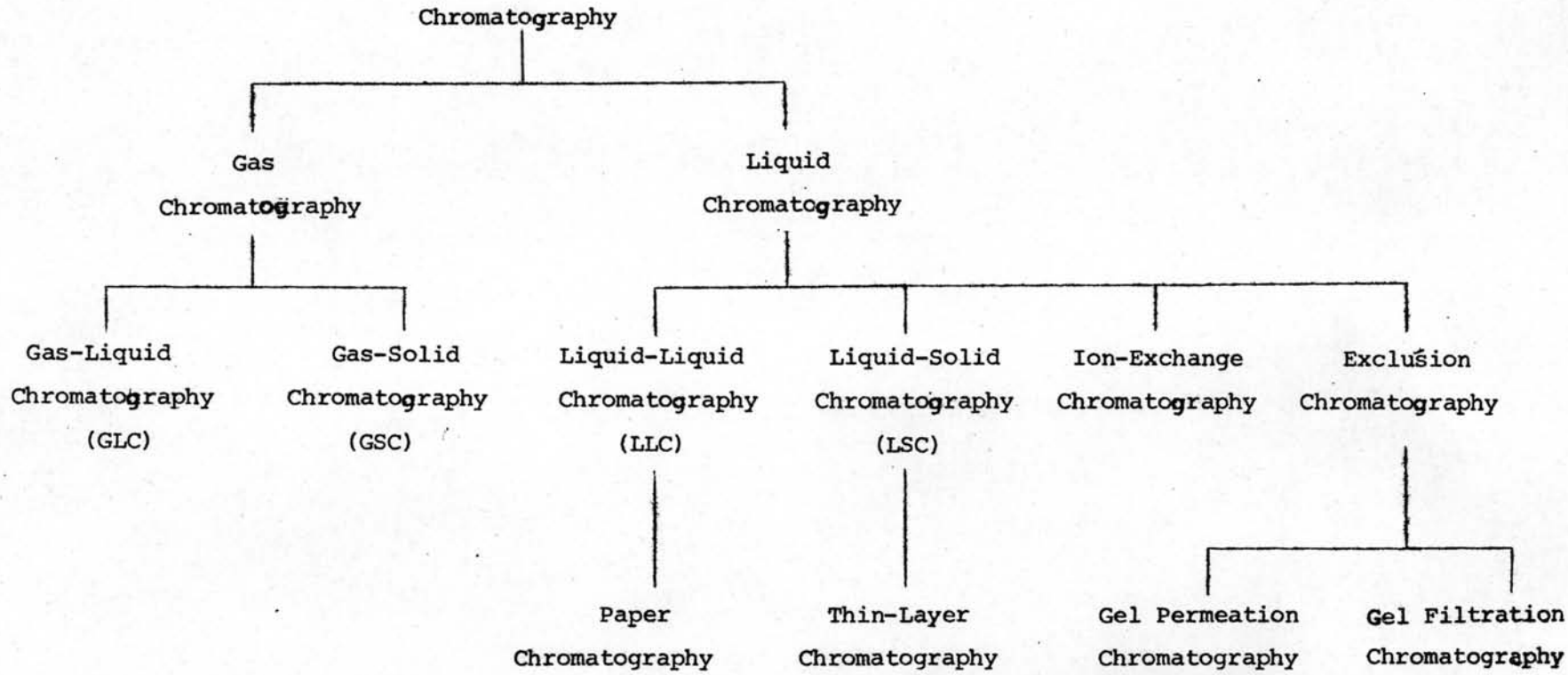
2.1 เทคนิคทางโครมาโตกราฟี (Chromatographic technique)

โครมาโตกราฟี (Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ของของผสมออกจากกันโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของสารในระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ (stationary phase) และวัฏภาคที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase) ต่างกัน[56] ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ขึ้นกับความแตกต่างของการเกิด adsorption , partition, ion-exchange และ molecular sieving effect ขององค์ประกอบของสารที่ต้องการแยก

วัฏภาคซึ่งอยู่กับที่โดยทั่วไปเป็นของแข็ง (เป็นผงหรือเป็นเม็ดที่มีรูพรุน) หรือของเหลวที่อยู่บน solid support ส่วนวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้อาจเป็นของเหลวหรือกาซ ดังนั้น จึงสามารถแบ่งเทคนิคทางโครมาโตกราฟีออกเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ ตามวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้[57,58] คือ กาซโครมาโตกราฟี และลิควิดโครมาโตกราฟี เทคนิคทั้งสองนี้สามารถแบ่งย่อยออกได้อีกตามชนิดของวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ ดังแสดงในรูปที่ 1

เปเปอร์โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคหนึ่งของลิควิด-ลิควิดโครมาโตกราฟี โดยทั่วไปวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้จะเป็นตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ (organic solvent) และวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่คือน้ำหรือของเหลวที่เป็นโพลาร์อื่น ๆ ในเซลลูโลสของกระดาษ[59]

วิธีการของเปเปอร์โครมาโตกราฟีนั้นทำได้ด้วยการหยดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการจะแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ลงบนกระดาษกรองที่ใช้แยกใกล้กับด้านหนึ่งของกระดาษแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง จุ่มกระดาษด้านที่ใกล้กับจุดของสารตัวอย่างลงในตัวทำละลายซึ่งเป็นวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ในภาชนะปิดโดยให้จุดของสารตัวอย่างอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมผ่านกระดาษกรองและทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ด้วยอัตราต่าง ๆ กัน จึงสามารถแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกันได้ เมื่อแนวของตัวทำละลาย (solvent front)



รูปที่ 1 แสดงชนิดต่าง ๆ ของโครมาโตกราฟี[57]

ใกล้กับอีกด้านหนึ่งของกระดาษให้เอากระดาษออกมายืดแนวของตัวทำละลาย นำไปทำให้แห้ง และวงแต่ละจุดของสารที่แยกออกจากกันไว้

2.1.1 ทฤษฎีและกลไก (Theory and Mechanism)

โดยทั่วไปกระดาษที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟีควรเป็นกระดาษกรองซึ่งเส้นใยมีคุณสมบัติเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน มีวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่และมีช่องสำหรับให้วัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ช่องเหล่านี้เล็กมากจึงทำให้เกิด capillary driving force สำหรับตัวทำละลาย ดังนั้น เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จะดึงให้คอสัมพันธ์ของของเหลวเคลื่อนที่ตามขึ้นไปบนแผ่นกระดาษ ถึงแม้ว่าช่องเหล่านี้จะมีขนาดไม่เท่ากันและทิศทางไม่แน่นอนแต่ส่วนใหญ่จะเป็นช่องที่ต่อกันตลอด ทำให้การเคลื่อนที่ของวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เป็นไปแบบต่อเนื่องกัน สำหรับช่องที่ไม่ต่อกันซึ่งมีเพียงเล็กน้อยจะหยุดการเคลื่อนที่ของวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ทำให้สารเป็นทางยาว (tailing) (58)

เส้นใยของกระดาษประกอบด้วยเซลลูโลสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตโพลีเมอร์ที่สามารถเกิด hydrogen-bonded cross-linked network ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) แต่ละเส้นใยของเซลลูโลสประกอบด้วยหน่วยเล็ก ๆ ที่เรียกว่าไฟบริลล์ (fibrils) จัดเรียงตัวกัน ไฟบริลล์ประกอบด้วยบริเวณที่มีการจัดตัวของโมเลกุลอย่างเป็นระเบียบซึ่งเรียกว่าคริสตัลไลต์ (crystallites) และบริเวณที่มีการจัดตัวอย่างไม่เป็นระเบียบซึ่งเรียกว่าบริเวณอมอร์ฟัส (amorphous regions) (58) วัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ส่วนใหญ่จะอยู่ในบริเวณอมอร์ฟัสและเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเซลลูโลส (59) สารตัวอย่างจะเกิด partition ในวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่นี้ สำหรับคริสตัลไลต์จะว่างเปล่าและเกิด adsorption กับสารตัวอย่างได้ ดังนั้น เซลลูโลสจึงเป็นตัวกลางที่ทำให้เกิดทั้ง partition และ adsorption นอกจากนี้เซลลูโลสจะแสดงคุณสมบัติในการแลกเปลี่ยนไอออนโดยมีความจุของการแลกเปลี่ยนไอออน 5-50 ไมโครอิควิวาเลนท์ต่อกรัม ดังนั้น ในเปเปอร์โครมาโตกราฟีจะมีกลไก (mechanism) หลายชนิดเกิดขึ้นแต่ที่สำคัญที่สุดคือ liquid partition

2.1.1.1 <u>การเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก</u> (solute migration)[59,60]

สำหรับการเกิด partition ในโครมาโตกราฟีนั้นมีคำที่ควรทราบคือ

$$\text{Retardation factor} \quad : \quad R_f = \frac{A_m}{A_m + K_d A_s}$$

$$\text{Partition coefficient:} \quad K_d = \frac{A_m}{A_s}\left(\frac{1}{R_f} - 1\right)$$

เมื่อ A_m และ A_s คือพื้นที่หน้าตัดของวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้และวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่แต่การวัด A_m และ A_s เป็นไปได้ยาก โดยทั่วไป A_m/A_s จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของกระดาษและตัวทำละลายที่ใช้ ดังนั้น จึงหาค่า R_f โดยตรงจากโครมาโตแกรม

2.1.1.2 <u>การแผ่ขยายของโซน</u> (Zone Spreading)

ในการทำโครมาโตกราฟีจะพบเสมอว่าบริเวณของสารที่แยกออกมาหรือบริเวณของจุดแยกมักจะเกิดการแผ่ขยายและจะเพิ่มขึ้นในทุกทิศทาง และการแผ่ขยายนี้จะมากที่สุดในทิศทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่เพราะแฟกเตอร์ทั้งหมดที่ทำให้เกิดการแผ่ขยาย (eddy diffusion , ordinary diffusion และ non-equilibrium ที่เกิดจาก partition kinetics) มีผลในทิศทางนี้ ส่วนการแผ่ขยายทางด้านข้างเกิดจากแฟกเตอร์ 2 ชนิดแรกเท่านั้น จากสาเหตุนี้จึงทำให้จุดแยก (spots) ของสารบนเปเปอร์โครมาโตแกรมมีรูปรีโดยที่แกนที่ยาวกว่าอยู่ในทิศทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

เมื่อเริ่มต้นทำการทดลองความเร็วของตัวทำละลายจะสูง แต่เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ห่างไปจากเดิมมากขึ้นความเร็วจะลดลง จาก Van Deemter equation

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

เมื่อ H = Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)

A,B,C = ค่าคงที่สำหรับระบบใดระบบหนึ่งโดย A เกี่ยวข้องกับ eddy diffusion , B เกี่ยวข้องกับ molecular diffusion และ C เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อ mass transfer

v = อัตราการเคลื่อนที่ของวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้

เมื่ออัตราการเคลื่อนที่ของวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้สูง non-equilibrium factor (เทอม Cv) สำคัญที่สุด และเมื่ออัตราการเคลื่อนที่ต่ำ molecular diffusion (เทอม $\frac{B}{v}$) จะเป็นแฟกเตอร์ที่สำคัญ ดังนั้น เมื่อเริ่มทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี non-equilibrium effect เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เกิดการแผ่ขยาย ทำให้จุดแยกยาว แต่เมื่อเวลาผ่านไป molecular diffusion จะสำคัญกว่าทำให้จุดแยกแผ่ขยายออกไปทางด้านข้าง ความสามารถในการแยกจะมากในตอนแรก และลดลงในตอนหลัง

2.1.2 <u>เทคนิคต่าง ๆ ที่จะต้องคำนึงถึงในการทำการทดลอง</u>

2.1.2.1 <u>กระดาษที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี</u>

โดยทั่วไปจะใช้กระดาษกรองซึ่งมีน้ำเป็นวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ สามารถใช้แยกสารที่เป็นไฮโดรฟิลลิก นอกจากนี้ยังมีกระดาษอีกหลายชนิดซึ่งใช้แยกสารที่เป็นไฮโดรโฟบิก เช่น กระดาษอะเซทิเลทเตด (acetylated papers) กระดาษที่ชุบด้วยซิลิโคน (silicone-treated papers) กระดาษเหล่านี้บางอาจใช้เป็นตัวซัพพอต (support) สำหรับรีเวิสเฟสโครมาโตกราฟี (reversed phase chromatography) อีกด้วย

ในการทำโครมาโตกราฟีกระดาษที่ใช้มีผลต่อการแยกและรูปร่างของจุดแยก ถ้ากระดาษที่ใช้ทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ช้ารูปร่างของจุดแยก และการแยกจะดีขึ้น

ความยาวของกระดาษที่ใช้ขึ้นกับขนาดของภาชนะที่ใช้และประสิทธิภาพในการแยก (separation efficiency) ส่วนความกว้างขึ้นกับจำนวนสาร

ตัวอย่าง โดยทั่วไประยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่อย่างน้อยที่สุดควรเป็น 10 เซนติเมตร

2.1.2.2 ระบบตัวทำละลาย (Solvent System)

ถ้าการเลือกระบบตัวทำละลายเหมาะสมจะทำให้ประสิทธิภาพของการแยกและรูปร่างของจุดแยกดี สารที่จะทำโครมาโตกราฟีจะต้องละลายในวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ได้ดีกว่าในวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ ในการเลือกระบบตัวทำละลายนั้นต้องพิจารณาถึงโพลาริตี (polarity) ความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจน หรือ reactivity ของตัวทำละลาย ระบบตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมากแบ่งเป็น 3 พวกตามวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ดังต่อไปนี้

(1) ระบบที่มีน้ำเป็นวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่

วัฏภาคซึ่งอยู่กับที่คือน้ำที่เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเซลลูโลส (water-cellulose complex) วัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้คือตัวทำละลายอินทรีย์ในของผสมซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ระบบนี้เหมาะสำหรับใช้กับสารที่เป็นกลางซึ่งละลายน้ำได้ดี สารที่มีขั้วและสารอิออนิก

(2) ระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นโพลาร์เป็นวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่

วัฏภาคซึ่งอยู่กับที่คือตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นโพลาร์ซึ่งจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเซลลูโลส โดยมากใช้ฟอร์มาไมด์ (formamide) ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide) โพรพิลีน ไกลคอล (propylene glycol) เป็นต้น ส่วนวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นโพลาร์เล็กน้อยจึงไม่ละลายในวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่หรือละลายได้เพียงเล็กน้อย

(3) ระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่เป็นโพลาร์เป็นวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่

วัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ได้แก่น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil)

น้ำมันก๊าด (kerosene) น้ำมันมะกอก (olive oil) ลอริลแอลกอฮอล์ (lauryl alcohol) 1-โบรโมแนพทาลีน (1-Bromonaphthalene) เป็นต้น

วัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เป็นของผสมระหว่างน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ เช่น เมทานอล เอทานอล อะซีโตน กรดอะซีติก อะซีโตไนตริล พิริดีน ฟอร์มาไมด์ และไดเมทิลฟอร์มาไมด์ ในระบบนี้โพลาริตีของวัฏภาคทั้งสองตรงข้ามกับโครมาโตกราฟีที่ใช้โดยทั่ว ๆ ไป จึงเรียกว่ารีเวิร์สเฟสโครมาโตกราฟี

การเตรียมกระดาษที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัฏภาคที่อยู่กับที่นั้น สำหรับตัวทำละลายที่ระเหยง่ายให้นำกระดาษวางในภาชนะปิดที่มีไอของตัวทำละลายนั้นอยู่จนกระทั่งถึงสภาวะสมดุล ส่วนตัวทำละลายที่ระเหยยากให้นำกระดาษจุ่มลงในสารละลายของวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยง่ายแล้วทิ้งไว้จนตัวทำละลายระเหยไปหมด

2.1.2.3 การแยกสารตัวอย่าง[60,61]

สารตัวอย่างที่ใช้ในเทคนิคนี้ต้องทำให้เป็นสารละลายโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมและในปริมาณที่พอเหมาะ ตัวทำละลายที่ใช้ควรระเหยได้ง่ายและไม่ละลายเอาวัฏภาคซึ่งอยู่กับที่ออกไป ปริมาณของสารที่ใช้ขึ้นกับ detection sensitivity และการละลายของสารนั้นในวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ ถ้าใช้สารตัวอย่างปริมาณมากเกินไปแนวของตัวทำละลายจะอิ่มตัวระหว่างที่ผ่านจุดแยกของสารทำให้โครมาโตแกรมที่ได้เป็นแถบยาว การหยดสารละลายของสารตัวอย่างลงบนกระดาษทำได้โดยใช้ไมโครปิเปต หรือหลอดคาปิลารีโดยให้จุดของสารมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-15 มิลลิเมตร ถ้าต้องการใช้สารละลายปริมาตรมาก ๆ เช่น ในกรณีที่สารตัวอย่างละลายได้น้อยหรือต้องการแยกสารปริมาณมากต้องใช้วิธีหยดหลาย ๆ ครั้ง และก่อนที่จะหยดต่อไปจะต้องรอให้แห้งเสียก่อน

2.1.2.4 ภาชนะที่ใช้ (Development tank)[58]

เป็นภาชนะแก้วที่มีฝาปิดเพื่อให้บรรยากาศในภาชนะนั้นอิ่มตัว

i 17938089

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้วยตัวทำละลายอยู่ตลอดเวลา ปกติจะใส่รัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ลงในภาชนะนี้แล้วปิดฝาทิ้งไว้ เพื่อให้แน่ใจว่าไอของตัวทำละลายอิ่มตัวก่อนที่จะทำการทดลอง การที่ต้องให้ไอของตัวทำละลายอิ่มตัวก่อนเพื่อป้องกันการระเหยของตัวทำละลายจากโครมาโตแกรม และเพื่อทำให้บรรยากาศในภาชนะอยู่ในสภาวะสมดุล (equilibrium) ซึ่งจะมีผลทำให้การทดลองมีความแม่นยำดี

2.1.2.5 <u>วิธีทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี</u> (Development Methods)

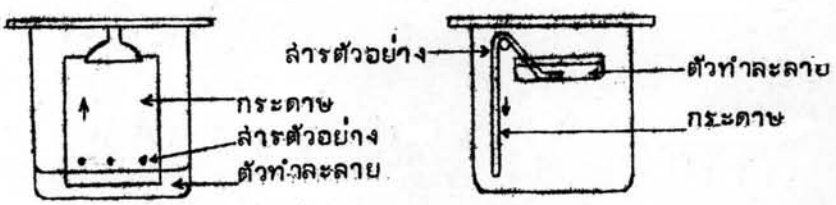
การทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีอาจแบ่งออกได้ดังนี้

(1) <u>Descending Chromatography</u>

วิธีนี้รัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่จากด้านบนลงมาด้านล่างของกระดาษโดยอาศัย capillary action และ gravity การเคลื่อนที่จะเกิดขึ้นค่อนข้างเร็ว ซึ่งมีผลทำให้การแยกไม่ดีนัก

(2) <u>Ascending Chromatography</u>

วิธีนี้รัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่จากด้านล่างขึ้นไปด้านบนของกระดาษโดยอาศัย capillary action เท่านั้น gravity จะเป็นแรงต้านทานทำให้รัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ได้ช้า



(ก) (ข)

รูปที่ 2 แสดงการทำโครมาโตกราฟี (ก) ascending (ข) descending chromatography

(3) Horizontal Chromatography

วิธีนี้วางกระดาษในแนวราบ การเคลื่อนที่ของวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้จะขึ้นกับ capillary action เท่านั้น ส่วน gravity ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้นัก

(4) Radial Chromatography

วิธีนี้เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ กระดาษที่ใช้เป็นวงกลม นำสารละลายของสารตัวอย่างไปหยดเป็นช่วง ๆ ห่างจากจุดศูนย์กลางของกระดาษเล็กน้อย ให้วัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ผ่านเข้าไปยังจุดศูนย์กลางของกระดาษแล้วเคลื่อนที่ตามแนวรัศมีของวงกลม สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ในทิศทางเดียวกับวัฏภาคซึ่งเคลื่อนที่ได้ทำให้ได้แถบแคบ ๆ ของสารแต่ละชนิด

(5) Two-dimension Chromatography

วิธีนี้ทำโดยหยดสารตัวอย่างที่จุด ๆ หนึ่งใกล้มุมหนึ่งของกระดาษแล้วทำโครมาโตกราฟีในตัวทำละลายชนิดแรก เมื่อนำโครมาโตแกรมที่ได้ออกมาทำให้แห้งแล้วหมุนกระดาษไป 90° นำไปทำโครมาโตกราฟีใหม่ในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง องค์ประกอบของสารตัวอย่างจะแยกออกจากกันโดยกระจายไปทั่วทั้งแผ่นโครมาโตแกรม ข้อเสียของวิธีนี้คือสารตัวอย่างที่ใช้มีปริมาณน้อย และไม่สามารถเปรียบเทียบสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานบนกระดาษแผ่นเดียวกันได้

(6) Multiple Development[56,59]

วิธีการนี้ทำเพื่อให้ระยะทางในการเคลื่อนที่ของวัฏภาคที่เคลื่อนที่ได้เพิ่มขึ้นโดยความยาวของกระดาษเท่าเดิม คือหลังจากทำโครมาโตกราฟีครั้งหนึ่งแล้วเอาโครมาโตแกรมที่ได้มาทำให้แห้งแล้วนำไปทำโครมาโตกราฟีอีกครั้งหนึ่งด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันหรือต่างกันในทิศทางเดียวกัน การทำเช่นนี้ 2-4 ครั้งจะทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ แยกจากกันได้ดี

(7) Continuous Development (Overrun Development)

วิธีนี้ใช้เมื่อสารที่ต้องการแยกมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมากในตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ทดลอง ในกรณีนี้ให้เลือกตัวทำละลายที่ให้ค่า R_f ต่ำ และให้เคลื่อนที่ผ่านกระดาษอย่างต่อเนื่องจนหยดออกจากปลายด้านหนึ่งของกระดาษที่ตัดเป็นรูปพัดเสียก่อน เพื่อให้ตัวทำละลายหยดออกจากกระดาษอย่างสม่ำเสมอ วิธีการนี้จะทำให้สาร 2 ชนิดที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันแยกออกจากกันได้

นอกจากนี้การทำโครมาโตกราฟีอาจทำได้ด้วยวิธีอื่น ๆ อีกเช่น wedge-strip chromatography ซึ่งใช้หลักการเดียวกับ radial chromatography แต่ไม่มีข้อจำกัด ในเรื่องระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย และ centrifugal chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคซึ่งเร่งการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายโดยแรงเหวี่ยง

2.1.2.6 วิธีตรวจสอบสารที่แยกได้บนโครมาโตแกรม (Detection Methods)

สำหรับสารที่มีสีจะสามารถมองเห็นได้โดยตรง แต่ถ้าสารไม่มีสีจะต้องใช้วิธีต่าง ๆ ดังนี้

(1) วิธีทางกายภาพ (Physical Methods)

ทำโดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตส่องโครมาโตแกรม สารบางชนิดจะให้ฟลูออเรสเซนต์เกิดขึ้น แต่สารบางชนิดจะทำลายฟลูออเรสเซนต์และเกิดเป็นจุดดำบนพื้นของโครมาโตแกรมการทำลายฟลูออเรสเซนต์นี้จะเห็นได้ชัดขึ้นเมื่อใช้สารละลายเจือจางของสารที่ให้ฟลูออเรสเซนต์ฉีดลงไปบนโครมาโตแกรม

(2) <u>วิธีทางเคมี</u> (Chemical Methods)

วิธีนี้เป็นการทำให้เกิดสารที่มีสีหรือสารที่ให้ฟลูออเรสเซนต์โดยทำให้สารบนโครมาโตแกรมเกิดปฏิกิริยากับสารที่เหมาะสม ในทางปฏิบัติจะฉีดสารลงบนโครมาโตแกรม หรือจุ่มโครมาโตแกรมลงในภาชนะที่บรรจุสารนั้นอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างของสารที่ใช้ได้แก่นินไฮดริน (ninhydrin) ซึ่งใช้ตรวจสอบกรดอะมิโน (amino acids)

(3) <u>วิธีทางชีววิทยา</u> (Biological Methods)

วิธีนี้ใช้เมื่อสารตัวอย่างมี biological activity ทำโดยนำสารที่แยกได้บนโครมาโตแกรมใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีสารแอนตี้ไบโอติกบนโครมาโตแกรมจะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในทำนองเดียวกันสารที่มีคุณสมบัติในการเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก็สามารถใช้วิธีนี้ได้โดยจะทำให้เกิดผลในทางตรงกันข้าม

(4) <u>วิธีอื่น ๆ</u>

สารบางชนิดจะมีวิธีทดสอบโดยเฉพาะเช่นสารป้องกันสนิม แอนตี้ออกซิแดนท์ สารกันบูดสังเคราะห์ การทดสอบสารเหล่านี้จะใช้วิธีแตกต่างกันออกไป

2.1.2.8 <u>การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี</u>

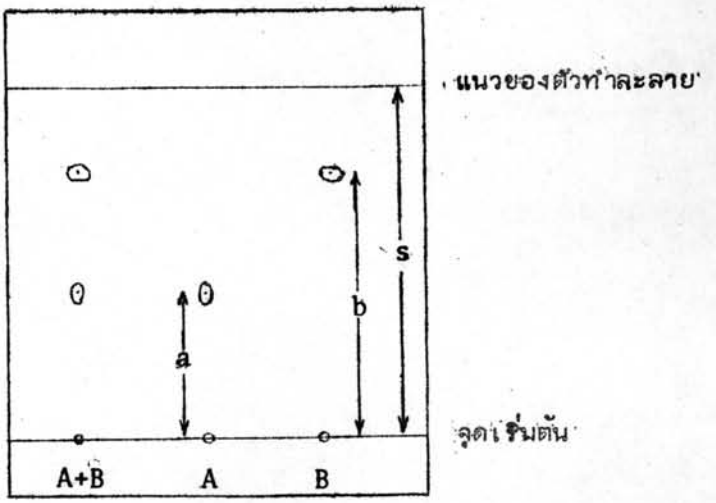
เทคนิคทางเปเปอร์โครมาโตกราฟีนอกจากจะใช้ในการแยกสารแล้วยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ (qualitative analysis) ของสารได้ เพราะตำแหน่งของสารบนโครมาโตแกรมเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิดในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง และแสดงในรูปของค่า R_f (Retardation factor) โดยที่

$$\text{ค่า } R_f \text{ ของสาร} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่วัฏภาคยิ่งเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ไป}}$$

ค่า R_f หาได้ง่ายโดยการวัดระยะทางในโครมาโตแกรม ดังรูปที่ 3 การวัดระยะทางที่สาร

เคลื่อนที่โดยมากวัดถึงจุดกึ่งกลางของจุดแยก แต่ในบางครั้งรูปร่างของจุดแยกทำให้ไม่สามารถหาจุดกึ่งกลางที่ถูกต้องได้อาจต้องหาค่า R_f จากขอบบนและล่างของจุดแยกซึ่งในกรณีนี้ต้องระบุวิธีหาค่า R_f ไว้ด้วย

สารชนิดเดียวกันเมื่อทำโครมาโตกราฟีในสภาวะเดียวกันจะมีค่า R_f เท่ากัน ถ้าเปรียบเทียบสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานจะสามารถพิสูจน์ได้ว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นสารอะไร การพิสูจน์สารด้วยเปเปอร์โครมาโตกราฟีจะได้ผลดียิ่งเมื่อ



รูปที่ 3 แสดงเปเปอร์โครมาโตแกรมของของผสมที่มีองค์ประกอบ 2 ชนิด.
(A และ B) R_f ของ A=a/s R_f ของ B=b/s

เลือกสภาวะของการทำโครมาโตกราฟีให้สารที่ต้องการพิสูจน์มีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0.30 ถึง 0.70 เนื่องจากในช่วงนี้การแยกจะเกิดขึ้นได้ดี

นอกจากนี้อาจใช้เทคนิคทางเปเปอร์โครมาโตกราฟีในการทำปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) และใช้ในการเตรียมสาร (preparative paper chromatography) ได้อีกด้วย

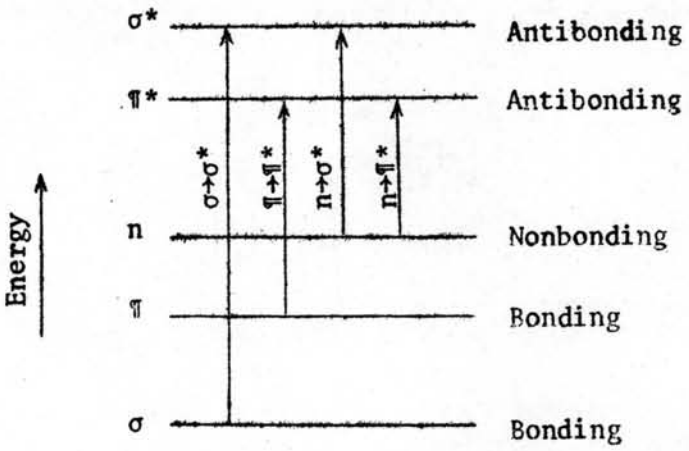
2.2 เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี (Spectrophotometric technique)[61]

เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรีเป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการเกิด interaction ระหว่างรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) กับสารต่าง ๆ ซึ่งจะทำให้เกิดขบวนการดูดกลืน (absorption) รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าที่ความยาวคลื่นซึ่งพอดีกับพลังงานที่ต้องใช้ในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานที่แน่นอนของสารจากระดับพลังงานต่ำไปสู่ระดับพลังงานที่สูงกว่า

2.2.1 เทคนิคทางอุลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรี (UV-Visible Spectrophotometric technique)

เมื่อให้แสงอุลตราไวโอเลต (200-400 นาโนเมตร) หรือวิสิเบิล (400-800 นาโนเมตร) ผ่านเข้าไปยังสารเคมี ถ้าสารนั้นมีการดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลตหรือวิสิเบิลซึ่งมีพลังงานมากพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอิเลกตรอน (electronic transition) โดยเฉพาะอิเลกตรอนที่อยู่วงนอกสุด (outer , valence electrons) จะได้รับพลังงานเพิ่มขึ้นไปสู่ระดับพลังงานที่สูงกว่า

สารอินทรีย์เมื่อดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลต หรือวิสิเบิลจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอิเลกตรอนจาก π bonding molecular orbital เป็น π^* antibonding molecular orbital , n (non-bonding) molecular orbital เป็น σ^* antibonding molecular orbital และ n(non-bonding) molecular orbital เป็น π^*antibonding molecular orbital ดังแสดงในรูปที่ 4 การดูดกลืนแสงในช่วงนี้จะเกิดกับหมู่ฟังก์ชันแนล (functional group) บางชนิดซึ่งเรียกว่าโครโมฟอร์ เช่น หมู่คาร์บอนิล หมู่เอโซ เป็นต้น มีหมู่ฟังก์ชันแนลบางชนิดไม่ดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลตและวิสิเบิลแต่มีผลทำให้โครโมฟอร์ที่หมู่ฟังก์ชันแนลนั้นไปเกาะอยู่ดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด (maximum absorption) ที่ความยาวคลื่นยาวกว่าเดิม หมู่ฟังก์ชันแนลเหล่านี้เรียกว่าออกโซโครม เช่น -OH , $-NH_2$, -Cl



รูปที่ 4 แสดงระดับพลังงานของอิเลกตรอนในโมเลกุล (electronic molecular energy levels)[61]

สำหรับสารอนินทรีย์มีการดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลต และวิสิเบิลได้เช่นเดียวกัน การดูดกลืนแสงของสารอนินทรีย์ที่สำคัญที่สุดได้แก่ charge-transfer absorption เนื่องจากเป็นการดูดกลืนแสงที่ให้ค่า molar absorptivity (ε_{max}) สูง ทำให้การวิเคราะห์มี sensitivity สูงโดยทั่วไปจะเกิดกับสารประกอบเชิงซ้อน

แสงในช่วงวิสิเบิลเป็นช่วงซึ่งสามารถมองเห็นได้เป็นสีต่าง ๆ และการที่สารดูดกลืนแสงในช่วงนี้จะมีผลทำให้มองเห็นสารเป็นสีต่าง ๆ กัน เมื่อแสงในช่วงนี้ตกกระทบสาร ถ้าแสงสะท้อน (reflect) หมดจะเห็นสารเป็นสีขาว ถ้าแสงถูกดูดกลืน (absorb) หมดจะเห็นสารเป็นสีดำ แต่ถ้าแสงบางส่วนถูกดูดกลืนและบางส่วนสะท้อนจะมองเห็นสารนั้นเป็นสีในช่วงของแสงที่ไม่ถูกดูดกลืน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของสีที่ถูกดูดกลืนและสีของสารที่มองเห็น

ช่วงความยาวคลื่นของแสงที่ถูกดูดกลืน (นาโนเมตร)	สีที่ถูกดูดกลืน	สีที่ตามองเห็น
400-465	ม่วง	เหลือง-เขียว
465-482	น้ำเงิน	เหลือง
482-487	น้ำเงินเขียว	ส้ม
487-493	น้ำเงิน-เขียว	แดง-ส้ม
493-498	เขียวน้ำเงิน	แดง
498-530	เขียว	แดง-ม่วง
530-559	เขียวเหลือง	ม่วงแดง
559-571	เหลือง-เขียว	ม่วง
571-576	เหลืองเขียว	ม่วง
576-580	เหลือง	น้ำเงิน
580-587	เหลืองส้ม	น้ำเงิน
587-597	ส้ม	น้ำเงินเขียว
597-617	ส้มแดง	น้ำเงิน-เขียว
617-780	แดง	น้ำเงิน-เขียว

เทคนิคทางอุลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีสามารถใช้ได้ทั้งการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณวิเคราะห์

<u>การวิเคราะห์คุณภาพ</u> (Qualitative Analysis)

การพิสูจน์สารบริสุทธิ์ทำได้โดยการเปรียบเทียบรายละเอียดต่าง ๆ ของสเปกตรัมของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานซึ่งถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันจะต้องให้สเปกตรัมเหมือนกัน นอกจากนี้อุลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกตรัมจะทำให้ทราบว่ามีหรือไม่มีโครโมฟอร์บางชนิดในสารอินทรีย์นั้นด้วย

<u>การทำปริมาณวิเคราะห์</u> (Quantitative Analysis)

อุลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีเป็นเทคนิคที่ดีในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารซึ่งสามารถใช้กับสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์จำนวนมาก ให้ผลถูกต้องดี (good accuracy) แม้จะมีสารเพียงเล็กน้อย (trace amount) ก็ตาม และยังเป็นเทคนิคที่ทำได้สะดวกและรวดเร็ว

การหาปริมาณของสารใช้กฎของเบียร์ (Beer's Law)

$$A = \varepsilon bc$$

A = Absorbance

ε = molar absorptivity

b = path length (เซนติเมตร)

c = ความเข้มข้น (โมล/ลูกบาศก์เดซิเมตร)

จากสมการนี้แสดงให้เห็นว่า absorbance ของสารละลายจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารเมื่อ path length คงที่ ข้อจำกัดของกฎนี้คือ

1. แสงที่ใช้ต้องมีความยาวคลื่นเท่ากัน (monochromatic radiation)
2. ขบวนการดูดกลืนแสงของแต่ละอนุภาคไม่ขึ้นแก่กัน

3. ตลอดปริมาตรที่ใช้ถือว่าเป็นเนื้อเดียวกัน

4. ต้องไม่มี interaction ระหว่างอนุภาค

2.2.2 <u>เทคนิคทางอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตเมตรี</u> (Infrared Spectrophotometry)[61]

การดูดกลืนแสงในย่านอินฟราเรดของสารทำให้เกิด vibrational และ rotational transition ได้ถ้าโมเลกุลของสารนั้นมีการเปลี่ยนแปลง dipole moment ขึ้น

ย่านของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดแบ่งเป็น 3 ย่านใหญ่ ๆ คือ

1. Overtone region (16668-4000 cm^{-1} หรือ 0.6-2.5 μ) ซึ่งเรียกว่า Near Infrared สเปกตราที่ได้ในย่านนี้มักเป็นพีก (peak) กว้าง สามารถใช้ทำปริมาณวิเคราะห์ได้

2. Fundamental region (4000-666 cm^{-1} หรือ 2.5-15 μ) เป็นย่านที่ใช้มากที่สุดซึ่งจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ของหมู่ฟังก์ชันแนล และให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างของโมเลกุลได้ ย่านนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

ก. Group-frequency region (4000-1300 cm^{-1} หรือ 2.5-7.7μ) การดูดกลืนแสงของสารในย่านนี้ขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันแนล

ข. Fingerprint region (1300-666 cm^{-1} หรือ 7.7-15 μ) การดูดกลืนแสงของสารในย่านนี้ขึ้นกับโครงสร้างของโมเลกุลที่สมบูรณ์ สเปกตราในย่านนี้ค่อนข้างซับซ้อน

3. Far Infrared (666-200 cm^{-1} หรือ 15-50 μ) สเปกตราในย่านนี้จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับ rotational transition เป็นส่วนใหญ่ซึ่งไม่ค่อยใช้ในการตรวจ

พิสูจน์สารมากนัก

อินฟราเรดสเปกโตรโฟโตเมตรีใช้กันมากที่สุดในการพิสูจน์สารอินทรีย์ เพราะอินฟราเรดสเปกตราของสารอินทรีย์ค่อนข้างซับซ้อน มี absorption peak เป็นจำนวนมากซึ่งสามารถใช้ในการเปรียบเทียบได้ อินฟราเรดสเปกตรัมของสารอินทรีย์จึงเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวชนิดหนึ่งของสาร[27] โดยเฉพาะในย่าง fingerprint

สำหรับการพิสูจน์สีย้อมโดยใช้อินฟราเรดสเปกตรัมทำได้โดยใช้ fingerprint technique[27] โดยเปรียบเทียบสเปกตรัมของสีตัวอย่างกับสีมาตรฐานว่าแตกต่างหรือเหมือนกันอย่างไร