

รูปที่ 9.21 แสดงวิธีวัดความสูงของพีค

การหาพื้นที่ของพีค การหาพื้นที่ของพีคสามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. ตัดพีคที่ได้ออกมาซึ่งน้ำหนัก จะได้พื้นที่พีคในหน่วยของน้ำหนักที่ซึ่งได้วิธีนี้ทำได้เมื่อกระดาษที่ใช้ทำโครมาโตแกรมเป็นเนื้อเดียวกันตลอด คือมีน้ำหนักต่อหน่วยพื้นที่คงที่ วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้กับพีคที่ซ้อนกัน ถึงแม้ว่าจะซ้อนกันเพียงเล็กน้อยก็ตาม

2. วิธีการคำนวณพื้นที่สามเหลี่ยม เนื่องจากพีคที่ได้จากการทดลองสามารถเกิดได้หลายลักษณะ ดังนั้นจึงมีวิธีการคำนวณพื้นที่ของพีคสามเหลี่ยมอยู่หลายวิธี คือ

ก. ถ้าพีคที่ได้จากการทดลองมีลักษณะที่สมมาตร ดังแสดงในรูปที่ 9.22 วิธีการคำนวณสามารถทำได้ 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 หาความกว้างของฐานพีค และความสูงของพีค จากนั้นหาพื้นที่ของพีคได้จากสูตร

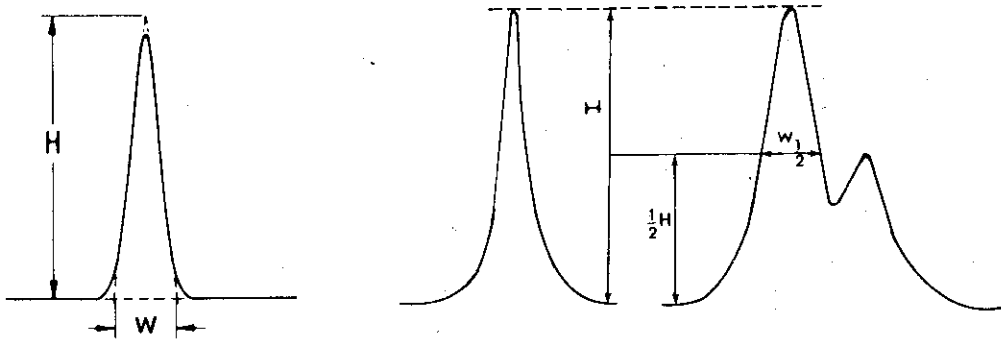
$$\text{Peak area} = \frac{1}{2} WH$$

แบบที่ 2 บางครั้งความกว้างของพีคหาได้ยาก เนื่องจากพีคที่ได้มีลักษณะ

ข้อนี้ ให้ใช้วิธีหาความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูงแล้วคำนวณพื้นที่ที่พีคได้จากสูตร

$$\text{Peak area} = \frac{W_1 H}{2}$$

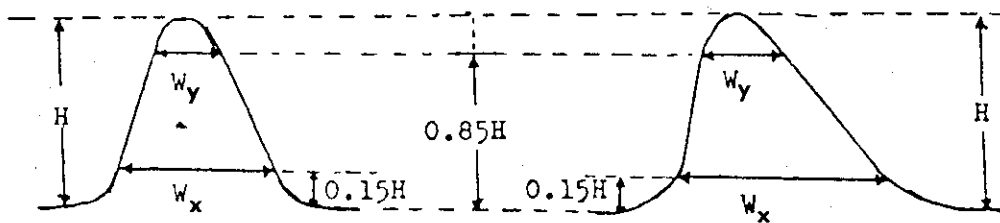
$W_1$  คือความกว้างของ Peak ที่ครึ่งหนึ่งของความสูงของพีค (H)



รูปที่ 9.22 แสดงวิธีการวัดความกว้างของพีค (Bandwidth) สำหรับพีคที่สมมาตร

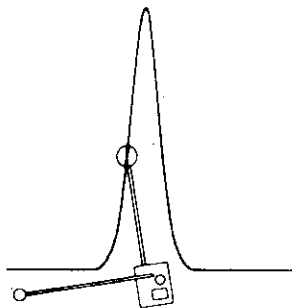
ข. ถ้าพีคที่ได้มีลักษณะกว้างมาก (broad) และมีหาง (tailing) ดังแสดงในรูปที่ 9.23 พื้นที่พีคสามารถคำนวณได้โดยการใช้ความกว้างของพีคที่ความสูงเท่ากับ  $0.15 H$  และ  $0.85 H$  ซึ่งให้ค่าเป็น  $W_x$  และ  $W_y$  ตามลำดับ ความกว้างของพีคทั้งสองจุดนี้บวกกัน จะมีค่าเท่ากับความกว้างของฐานพีค นั่นคือ สามารถคำนวณหาพื้นที่ที่พีคได้จากสูตร

$$\text{Peak area} = \left[ \frac{W_x + W_y}{2} \right] H$$



รูปที่ 9.23 แสดงวิธีการหาความกว้างของพีคสำหรับพีคที่กว้างมากและมีหาง

3. ใช้วิธีแพลนนิมิเตอร์ (Planimeter method) แพลนนิมิเตอร์เป็นเครื่องมือสำหรับหาพื้นที่ของรูปต่าง ๆ ที่อยู่บนแผ่นเรียบหรือแผ่นกระดาษเท่านั้น โดยใช้เครื่องมือนี้ลากไปตามเส้นของรูปที่ต้องการวัดขนาดดังแสดงในรูปที่ 9.24 ขณะที่ทำการลากจะมีตัวเลขปรากฏขึ้นที่เครื่องมือ โดยหมุนไปเรื่อย ๆ ตามระยะทางที่ลาก ซึ่งเป็นค่าที่สัมพันธ์โดยตรงกับพื้นที่ที่สามารถเคลือบให้เป็นค่าของพื้นที่ได้ ความแน่นอนและถูกต้องในการวัดพื้นที่วิธีนี้ขึ้นอยู่กับเครื่องมือและความชำนาญของผู้วัด ความแน่นอนของเทคนิคนี้มีน้อยกว่าวิธีวัดพื้นที่สามเหลี่ยม ความแน่นอนสามารถทำให้ดีขึ้นได้โดยทำการวัดด้วยเครื่องแพลนนิมิเตอร์หลาย ๆ ครั้งแล้วใช้ค่าเฉลี่ยที่วัดได้



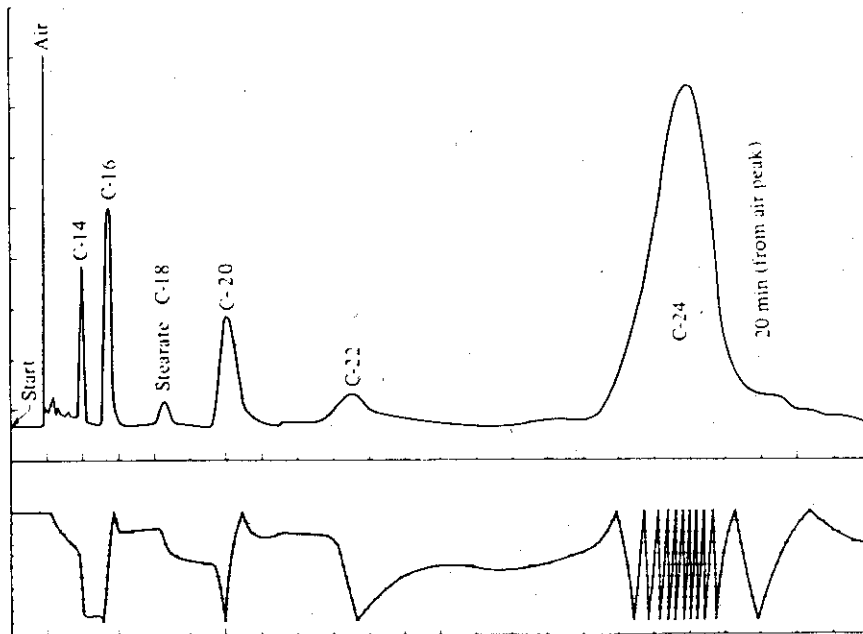
รูปที่ 9.24 การวัดพื้นที่ที่พิกด้วยเครื่องแพลนนิมิเตอร์

4. วิธีการใช้อินทิเกรเตอร์ (Integrator method) อินทิเกรเตอร์เป็นส่วนหนึ่งของเครื่องมืออีกส่วนหนึ่งที่ใช้ต่อเข้ากับเครื่องบันทึกสำหรับหาพื้นที่ของพิก โดยวิธีการนับเลข แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

ก. อินทิเกรเตอร์ที่ทำด้วยระบบอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งเรียกว่า digital integrator อินทิเกรเตอร์แบบนี้สามารถบอกขนาดของพื้นที่เป็นตัวเลขที่นับได้ ตัวเลขที่นับได้ไม่ใช่พื้นที่ของพิกแต่จะสัมพันธ์โดยตรงกับพื้นที่พิก เครื่องก๊าดโครมาโตกราฟีที่มีส่วนของอินทิเกรเตอร์แบบนี้ต่อกับเครื่องบันทึก จะทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของสารได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นไม่ต้องเสียเวลาหาพื้นที่พิก

ข. อินทิเกรเตอร์ที่ทำด้วยระบบเมคานิกส์ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า disc integrator

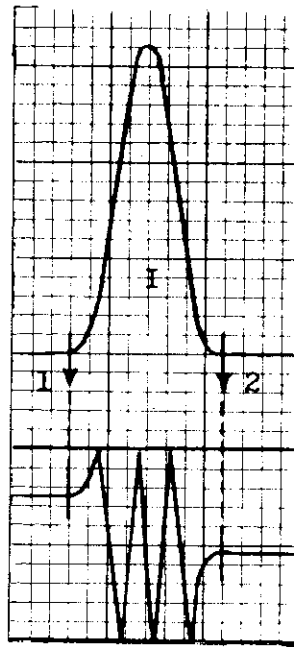
อินทิเกรเตอร์แบบนี้จะบันทึกการนับออกมาเป็นเส้นกราฟแบบพื้นเลื่อยควบคู่ไปกับการบันทึกพีคของโครมาโตแกรม ถ้าพีคมีพื้นที่มากอินทิเกรเตอร์ก็จะลากเส้นกลับไปกลับมาได้หลายเส้น ถ้ามีพื้นที่น้อยก็จะมีเส้นกราฟพื้นเลื่อยน้อยเส้น โครมาโตแกรมที่ทำควบคู่กับอินทิเกรเตอร์มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 9.25



รูปที่ 9.25 โครมาโตแกรมและเส้นกราฟที่ได้จาก disc integrator

การอ่านกราฟที่ได้จากอินทิเกรเตอร์ออกมาเป็นตัวเลขที่นับได้สามารถทำได้ โดยมีหลักการดังนี้ คือ ในส่วนของกราฟอินทิเกรเตอร์แผ่นกระดาษจะแบ่งช่องไว้ทั้งหมด 10 ช่อง ตามรูปที่ 9.25 ให้ 1 ช่องมีค่าเท่ากับ การนับเลขได้เท่ากับ 10 แสดงว่าถ้าปากกาของอินทิเกรเตอร์สามารถลากเส้นได้ 10 ช่อง ก็แสดงว่าเกิดการนับเท่ากับ 100 ดังนั้นวิธีการนับออกมาเป็นตัวเลขก็คือนับให้ได้ว่าอินทิเกรเตอร์ลากเส้นทั้งหมดกี่ช่องในช่วงเวลาของ 1 พีก ตัวเลขที่นับได้ทั้งหมดจะสัมพันธ์กับพื้นที่ที่พีกนั่นเอง วิธีการนับตัวเลขจากอินทิเกรเตอร์สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. ถ้าพีกที่ได้มีเส้นฐาน (base line) ขนานกับเส้นแบ่งช่องของกระดาษ ดังแสดงในรูปที่ 9.26 จะมีวิธีการนับตัวเลขดังนี้คือ

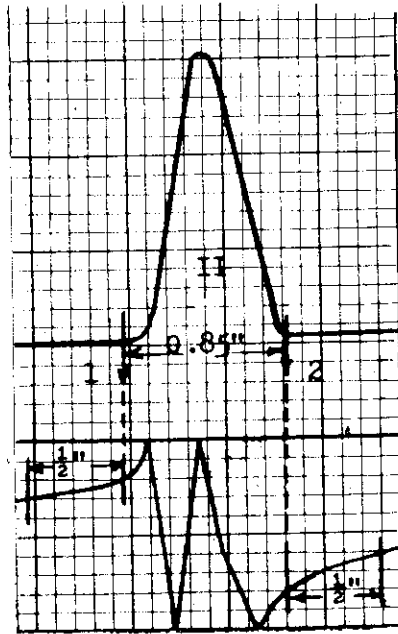


รูปที่ 9.26 แสดงวิธีการนับตัวเลขสำหรับพีกที่มีเส้นฐานขนานกับเส้นแบ่งช่องของกระดาษ

ให้ลากเส้นตรงตามแนวตั้ง 2 เส้น โดยให้พีกอยู่ระหว่างเส้นตรงทั้งสอง ตามรูปที่ 9.26 คือเส้นตรง 1 และ 2 การนับของอินทิเกรเตอร์ที่อยู่ระหว่างเส้นตรง 1 และ 2 จะได้ตัวเลขที่สัมพันธ์กับพื้นที่พีก ตัวอย่างวิธีการนับตามรูปที่ 9.26 คือจากจุดที่เส้นตรงเส้นที่ 1 ตัดกราฟของอินทิเกรเตอร์ ลากไปจนถึงจุดยอดของกราฟอินทิเกรเตอร์ อ่านค่าการนับได้เท่ากับ 24 ครั้ง จากนั้นนับเส้นกราฟที่เหลือที่กลับไปกลับมาจะมีทั้งหมด 5 เส้น แสดงว่านับได้อีก 500 ครั้ง และจากส่วนต่ำสุดของกราฟที่เหลืออันสุดท้ายลากไปถึงจุดที่เส้นตรงเส้นที่ 2 ตัดกราฟ จะอ่านค่าการนับได้เท่ากับ 46 ครั้ง

นั่นคือ ตัวเลขที่ได้จากการนับทั้งหมดของพีก I คือ  $24 + 500 + 46 = 570$  ครั้ง

2. ถ้าเส้นฐานของพีกไม่ขนานกับเส้นแบ่งช่องของกระดาษดังแสดงในรูปที่ 9.27 ต้องมีการแก้ไขค่าที่ได้จากการนับด้วย ดังนั้น วิธีการนับพีกชนิดนี้ต้องทำสองขั้นตอน คือ ทำการนับแบบเดียวกับข้อ 1. และทำการแก้ไขตามรูปที่ 9.27 สามารถทำการนับได้ดังนี้ คือ



รูปที่ 9.27 แสดงวิธีการนับตัวเลขสำหรับพีกที่มีเส้นฐานไม่ขนานกับเส้นแบ่งช่องกระดาษ

ขั้นที่ 1 ทำการนับแบบเดียวกับข้อ 1. (ให้ดูรูปที่ 9.27 ประกอบด้วย)

- จากจุดตัดของเส้นที่ -1 กับกราฟ ถึงส่วนยอดของอินทิเกรตอร์นับได้เท่ากับ 20 ครั้ง (ได้ระยะ 2 ช่องพอดี)

- เส้นกราฟพื้นเลื่อยมี 3 เส้น แสดงว่านับได้เท่ากับ 300 ครั้ง

- จากจุดต่ำสุดของพื้นเลื่อยอันสุดท้ายถึงจุดตัดของเส้นตรงที่ 2 นับได้ 20 ครั้ง

นั่นคือ พื้นที่พีกที่ยังไม่แก้ไขนับได้เท่ากับ  $20 + 300 + 20 = 340$  ครั้ง

ขั้นที่ 2 ทำการแก้ไขเส้นฐาน

พิจารณาทางด้านซ้ายมือของพีก จากจุดตัดของเส้นตรงที่ 1 วัดระยะทางออกไปครึ่งนิ้ว (เรียกว่า left slant) พบว่าความลาดชันของเส้นกราฟอ่านได้ 10 ครั้ง คือ เท่ากับ 1 ช่องพอดี

$$\begin{aligned} \therefore \text{ความลาดทางซ้าย} &= 10 \text{ ครั้ง/ครึ่งนิ้ว} \\ &= 10 \times 2 = 20 \text{ ครั้ง/นิ้ว} \end{aligned}$$

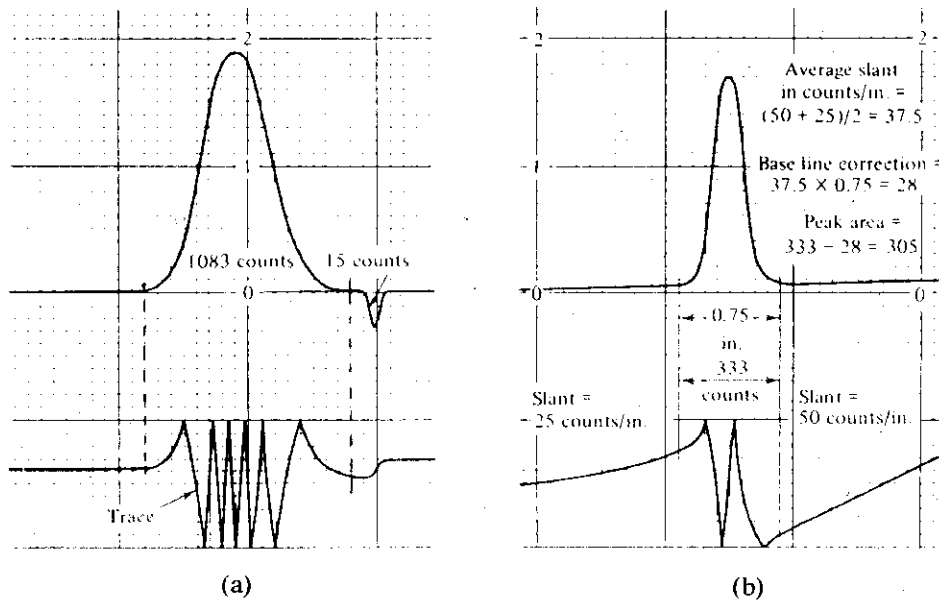
พิจารณาทางด้านขวามือของพีค จากจุดตัดของเส้นตรงที่ 2 วัดระยะทางออกไป  
ครึ่งนิ้ว (เรียกว่า right slant) พบว่าความลาดของเส้นกราฟอ่านได้ 19 ครั้ง

$$\begin{aligned} \therefore \text{ความลาดทางขวา} &= 19 \text{ ครั้ง/ครึ่งนิ้ว} \\ &= 19 \times 2 = 38 \text{ ครั้ง/นิ้ว} \\ \text{ค่าเฉลี่ยของความลาด} &= \frac{20 + 38}{2} \\ &= 29 \text{ ครั้ง/นิ้ว} \end{aligned}$$

เพราะว่าความกว้างของพีค (จากเส้นตรงที่ 1 ถึงเส้นตรงที่ 2) มีค่าเท่ากับ  
0.85 นิ้ว

$$\begin{aligned} \therefore \text{ค่าสำหรับแก้ไข} &= 29 \times 0.85 = 25 \\ \therefore \text{พื้นที่พีคที่แก้ไขแล้วนับได้} &= 340 - 25 = 315 \text{ ครั้ง} \end{aligned}$$

ตัวอย่างที่ 9.16 จากรูป a และ b ข้างล่างนี้ จงหาจำนวนครั้งที่นับได้ของอินทิเกรเตอร์



วิธีทำ a) - ส่วนตัดของเส้นตรงที่ 1 กับกราฟนับได้ = 38  
- เส้นกราฟพื้นเลี่ยนับได้ 10 เส้น แสดงว่านับได้ = 1000

- ส่วนตัดของเส้นตรงที่ 2 กับกราฟนับได้ = 45

∴ พื้นที่ฟีกที่นับได้ =  $33 + 1000 + 45 = 1083$  ครั้ง

b) ได้แสดงวิธีการไว้ในรูปแล้ว

จะเห็นได้ว่าวิธีการหาขนาดของฟีกแบบต่าง ๆ ที่กล่าวมาจะทำให้ได้ค่าที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารในหน่วยต่าง ๆ เช่น หน่วยความสูงเป็นเซนติเมตร หน่วยของพื้นที่เป็นตารางเซนติเมตร หน่วยน้ำหนักเป็นมิลลิกรัม และหน่วยการนับเลขเป็นจำนวนครั้ง เป็นต้น หลังจากที่ได้ขนาดของฟีกซึ่งจะอยู่ในหน่วยใดก็ตาม สามารถนำมาคำนวณหาเป็นปริมาณของสารแต่ละชนิดในสารตัวอย่างได้ โดยมีวิธีการดังนี้ คือ

1. **วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน** โดยใช้สารมาตรฐานเพียงชุดเดียวทำโครมาโตแกรม แล้ววัดขนาดของพื้นที่ จากนั้นนำสารตัวอย่างมาทำโครมาโตแกรมแล้ววัดขนาดของพื้นที่บ้าง โดยวิธีการคำนวณแบบเทียบบัญญัติไตรยางค์ก็สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้ วิธีการนี้ต้องแน่ใจว่าได้ทำโครมาโตแกรมในสภาวะการทดลองเดียวกันทุกประการ และต้องไม่มีสิ่งรบกวนขนาดของฟีกในสารตัวอย่าง

2. **วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน** (Calibration curve) โดยการนำสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน หลาย ๆ ขนาดความเข้มข้นมาทำโครมาโตแกรม จากนั้นวัดขนาดของฟีกแต่ละอัน แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยการพลอตระหว่างขนาดของฟีกเทียบกับปริมาณความเข้มข้น เมื่อทำโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างและวัดขนาดของฟีกได้แล้ว ก็สามารถนำมาอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานได้

3. **วิธีเติมสารมาตรฐาน** (Standard addition method) โดยใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างกันหลาย ๆ ขนาดเติมลงในสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นคงที่ นำมาทำโครมาโตแกรมแล้ววัดขนาดของฟีกต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น จากนั้นพลอตกราฟระหว่างขนาดของฟีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน จากกราฟสามารถหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างได้

วิธีทำกราฟมาตรฐานและวิธีเติมสารมาตรฐานของการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ก็เหมือนกับวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของเทคนิคการวิเคราะห์วิธีอื่น ๆ นั่นเอง ดังนั้นจึงไม่ขอกล่าวรายละเอียดซ้ำอีกในที่นี้

4. **Internal normalization** ทำได้โดยรวมพื้นที่ฟีกหรือขนาดของฟีกทั้งหมด



ทุกพีคที่ปรากฏในโครมาโตแกรมเข้าด้วยกัน แล้วกำหนดให้เป็น 100% เมื่อต้องการหาเปอร์เซ็นต์ของพีคของสารที่สนใจสามารถคำนวณได้จาก

$$\% \text{ Peak A} = \frac{\text{Area of Peak A}}{\text{Total area}} \times 100$$

ตัวอย่างที่ 9.17 สารตัวอย่างผสม 4 ชนิด เมื่อนำเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แล้วทำโครมาโตแกรมได้พีค 4 พีค จากการคำนวณหาพื้นที่ของแต่ละพีคปรากฏว่าได้ผลดังนี้

พีคของสาร A = 10.0 ตารางเซนติเมตร

พีคของสาร B = 18.0 ตารางเซนติเมตร

พีคของสาร C = 8.0 ตารางเซนติเมตร

พีคของสาร D = 14.0 ตารางเซนติเมตร

รวมพื้นที่พีคทั้งหมด = 50 ตารางเซนติเมตร

$$\therefore \%A = \frac{10.0}{50.0} \times 100 = 20.0\%$$

$$\%B = \frac{18.0}{50.0} \times 100 = 36.0\%$$

$$\%C = \frac{8.0}{50.0} \times 100 = 16.0\%$$

$$\%D = \frac{14.0}{50.0} \times 100 = 28.0\%$$

$$\text{รวม} = 100\%$$

วิธีการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารแบบนี้จัดว่าง่าย สะดวกและรวดเร็ว แต่มีข้อแม้ว่าสารที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ต้องออกจากคอลัมน์ทั้งหมด และสารแต่ละชนิดต้องมีความไวต่อดีเทคเตอร์เหมือนกัน

5. Compensated normalization ตามความเป็นจริงแล้วดีเทคเตอร์ไม่สามารถมีความไวต่อสารทุกตัวได้เหมือนกัน หรือบางทีสารที่วิเคราะห์ออกจากคอลัมน์ได้ไม่หมด การคำนวณแบบวิธีที่ 4 จึงไม่ได้ผลที่ถูกต้อง วิธีการที่จะทำให้ถูกต้องสามารถทำได้โดยปรับค่าพื้นที่พีคหรือค่าที่นับได้เสียใหม่ด้วย การหา Response factor ของสารนั้น ๆ ค่า Response factor สามารถหาได้จากการฉีดสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนและเท่ากันของสาร

ที่ต้องการหาปริมาณทุกตัวในสารผสมแล้วนำมาหาอัตราส่วนของค่าที่นับได้ เทียบกับสารตัวใดตัวหนึ่งในสารมาตรฐานผสมนั้น ซึ่งเรียกว่าค่า response factor เช่น มีสารผสมของ ethanol benzene hexane และ methylbenzene ต้องการนำมาหาเปอร์เซ็นต์ของสารแต่ละตัวโดยใช้คอลัมน์ squalane ดีเทคเตอร์ TCD ทำที่อุณหภูมิ 60°C ทำได้โดย นำสารมาตรฐานของสารทั้ง 4 ที่มีปริมาณน้ำหนักเท่ากันมาผสมกันแล้วฉีดเข้าไปในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี หลังจากนั้นให้ฉีดสารตัวอย่างผสมบ้าง ปรากฏได้ข้อมูลดังนี้

พีค	สาร	$t_R$ (นาที)	Integrator counts สารมาตรฐานผสม	Integrator counts สารตัวอย่างผสม
1	ethanol	0.8	15600	24470
2	benzene	3.3	12674	11171
3	hexane	4.1	14230	4160
4	methylbenzene	6.0	12410	10816

จากนั้นให้หา Response factor จากสารมาตรฐาน โดยใช้เบนซีนเป็นตัวเทียบ (หรือสารตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ตัวนี้)

พีค	Integrator counts สารมาตรฐานผสม	Response factor
1	15600	$15600/12674 = 1.23$
2	12674	$12674/12674 = 1.00$
3	14230	$14230/12674 = 1.12$
4	12410	$12410/12674 = 0.98$

ขั้นตอนมาให้หาค่า Response factor นี้หาค่า compensated counts ของสารตัวอย่างผสม เมื่อได้ค่าที่นับได้ที่แก้ไขแล้วก็สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารแต่ละตัวในสารผสมได้อย่างถูกต้อง

พีค	Integrator counts สารตัวอย่างผสม	compensated count	% ที่ถูกต้อง
1	24470	$24470/1.23 = 19894$	$\frac{19894}{45816} \times 100 = 43.4\%$
2	11171	$11171/1.00 = 11171$	$\frac{11171}{45816} \times 100 = 24.4\%$
3	4160	$4160/1.12 = 3714$	$\frac{3714}{45816} \times 100 = 8.1\%$
4	10816	$10816/0.98 = 11037$	$\frac{11037}{45816} \times 100 = 24.1\%$
		รวม = 45816	= 100%

6. **Internal standard** วิธีการนี้ได้ผลน่าพอใจมากกว่าวิธี normalization วิธี normalization นั้นสารตัวอย่างต้องมีส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ทราบว่าเป็นอะไรทั้งหมด และส่วนประกอบต่าง ๆ ต้องไม่สูญเสียไปไหนเลยขณะกำลังอยู่ในการทำ จึงพบว่าวิธีการทำ Internal standard จะให้ผลทางการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวที่สนใจได้ดีกว่า เพราะเป็นการหาเฉพาะตัวที่สนใจ ส่วนตัวประกอบอื่น ๆ ไม่ต้องมาเกี่ยวข้อง ซึ่งทำได้โดยเตรียมสารมาตรฐานของสารตัวที่สนใจให้มีปริมาณต่าง ๆ กัน แล้วเติมสารมาตรฐานอีกชนิดหนึ่ง (ซึ่งเรียกว่า internal standard) ที่มีปริมาณคงที่ลงในสารมาตรฐานตัวที่สนใจที่มีปริมาณต่าง ๆ กันนั้น แล้วนำมาทำโครมาโตแกรม หาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่พีคหรือค่าที่นับได้ของสารมาตรฐานทั้งสอง จากนั้นนำค่าอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารมาตรฐานทั้งสองมาพลอตกราฟเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานตัวที่สนใจ เมื่อนำอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (internal standard) มาเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถทราบปริมาณสารตัวอย่างได้

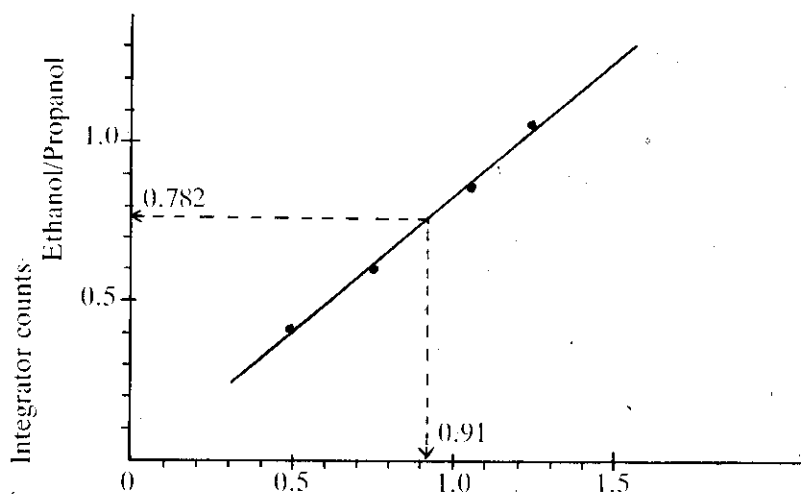
ตัวอย่างที่ 9.18 ในการวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในเลือด โดยวิธี internal standard ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 และ 1.5 mg/cm<sup>3</sup> นำสารละลายมาตรฐานเหล่านี้ และตัวอย่างเลือดมา 1 cm<sup>3</sup> เจือจางด้วย 0.1 mg/cm<sup>3</sup> ของ propan-2-ol เป็น 10 cm<sup>3</sup> จากนั้นทำโครมาโตแกรมโดยฉีดสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างครั้งละ 1 µl ลงในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีที่ใช้คอลัมน์ PEG-400 อุณหภูมิ 80°C ดีเทคเตอร์ FID ข้อมูลที่ได้มีดังนี้

	Integrator counts	
	Ethanol peak	Propanol Peak
ethanol standards:		
0.5 mg/cm <sup>3</sup>	5518	12754
0.75 mg/cm <sup>3</sup>	7563	11893
1.0 mg/cm <sup>3</sup>	10350	12084
1.25 mg/cm <sup>3</sup>	13935	12870
1.5 mg/cm <sup>3</sup>	15628	12314
blood sample	9862	12604

#### วิธีทำ

จากข้อมูลที่ได้ให้หาอัตราส่วนของค่าที่นับได้ระหว่าง Ethanol peak/propanol peak แล้วนำไปพลอตกราฟเทียบความเข้มข้นของเอทานอล

	Integrator counts		
	Ethanol peak	Propanol peak	Ethanol/Propanol
<b>Ethanol standards:</b>			
0.5 mg/cm <sup>3</sup>	5518	12754	5518/12754 = 0.433
0.75 mg/cm <sup>3</sup>	7563	11893	7563/11893 = 0.634
1.0 mg/cm <sup>3</sup>	10350	12084	10350/12084 = 0.857
1.25 mg/cm <sup>3</sup>	13935	12870	13935/12870 = 1.08
1.5 mg/cm <sup>3</sup>	15628	12314	15628/12314 = 1.27
blood sample:	9862	12604	9862/12604 = 0.782



จากกราฟอ่านความเข้มข้นของเอทานอลในสารตัวอย่างเลือดได้ = 0.91 mg/cm<sup>3</sup>

เครื่องมือก๊าซโครมาโตกราฟีได้ถูกพัฒนา และปรับปรุงอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้ได้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การแยกดีขึ้น ใช้ได้กับขนาดของสารตัวอย่างที่น้อยลง และมีขนาดไม่ใหญ่โตจนเกินไป ซึ่งเป็นการแข่งขันกันทางการค้าของบริษัทผู้ผลิต บางบริษัทใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ควบคุมการทำงานของเครื่องด้วย ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องสูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันราคาก็สูงขึ้นด้วย ปัจจุบันเครื่องมือโครมาโตกราฟีได้ถูกพัฒนามาจนทำให้ลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้ใกล้เคียงกับโครมาโตแกรมในอุดมคติมาก ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์โดยวัดพื้นที่ของพีคตามแบบต่าง ๆ ที่กล่าวมาจึงเป็นวิธีที่ล้ำสมัยไม่สามารถนำมาใช้ได้กับโครมาโตแกรมที่ได้นี้ ส่วนใหญ่แล้วเครื่องมือจะมีส่วนของอิเล็กทรอนิกส์อินทิเกรเตอร์แบบนับตัวเลข (digital) ต่อเข้าไปด้วย ซึ่งตัวเลขที่นับได้จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสาร ทำให้การวิเคราะห์สะดวกและรวดเร็วขึ้นมาก ก๊าซโครมาโตกราฟีสามารถประยุกต์ใช้กับงานวิเคราะห์สารประเภทต่าง ๆ ได้มากมาย ตัวอย่างของงานที่ประยุกต์ใช้สำหรับการวิเคราะห์สารจำพวกยาปราบศัตรูพืชชนิด organochloro pesticide ซึ่งมีสภาวะของการทดลองดังนี้ (Experimental condition)

<b>เครื่องมือ</b>	Packard 433 series Gas chromatography
<b>ดีเทคเตอร์</b>	Packard Model 902 Electron Capture Detector
<b>ก๊าซตัวพา</b>	Nitrogen P = 100 kPa
<b>อัตราการไหล</b>	bypass (N <sub>2</sub> ) 40 cm <sup>3</sup> /min air-cooling (OCI) 500 cm <sup>3</sup> /min
<b>คอลัมน์</b>	material fused silica length 25 m. i.d. 0.23 mm. Stationary phase CP.-sil 5 CB film thickness 0.14 μm
<b>อุณหภูมิ</b>	Detector 300° C Oven 90° C (1.5 min) $\xrightarrow{30^\circ \text{ C/min}}$ 180° C $\downarrow 3.5^\circ \text{ C/min}$ 225° C (1 min)

**เข็มฉีดยาสารตัวอย่าง SGE 5  $\mu$ l 5A-SOC-100**

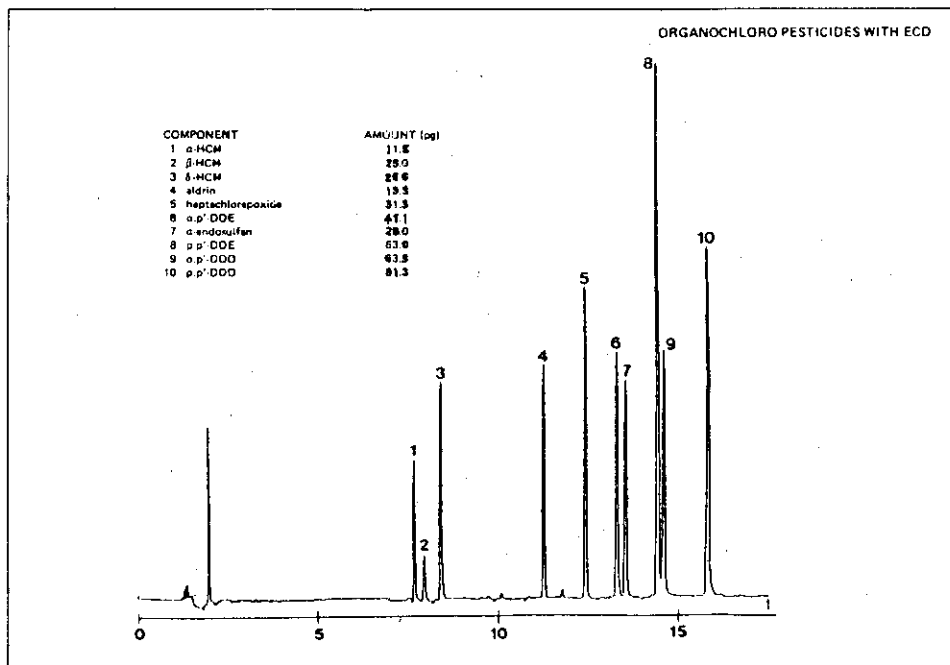
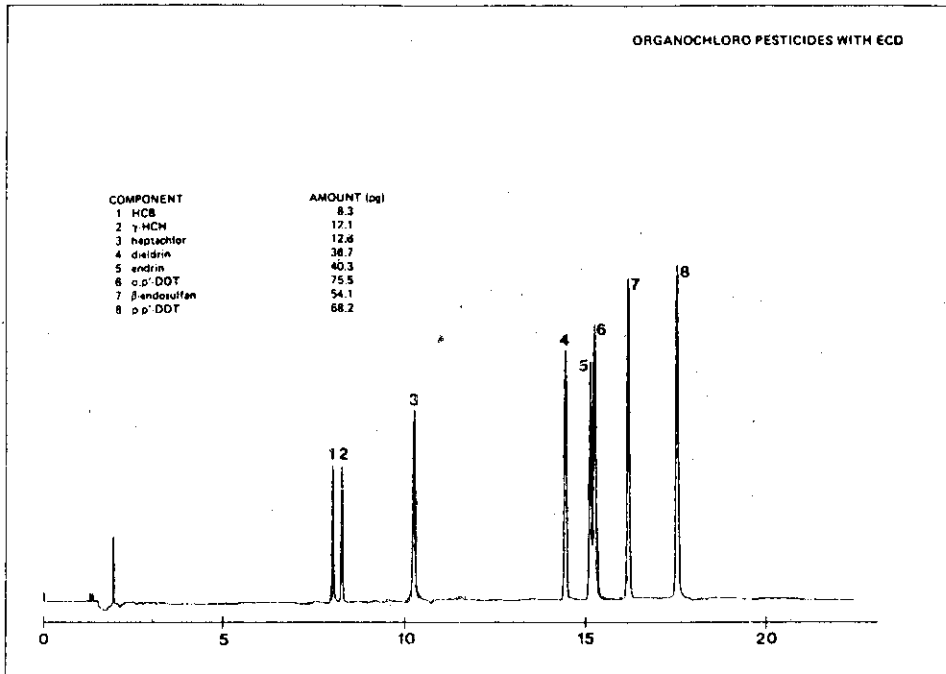
fused silica needle ; effective length 100 mm.

o.d. 0.17 mm.

**ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไป 0.5  $\mu$ l และ 0.45  $\mu$ l**

**อัตราเร็วของกระดาษบันทึก (Chart speed) 1 cm/min**

**ผลที่ได้จากการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 9.28**



รูปที่ 9.28 ผลที่ได้จากการทดลองยาปราบศัตรูพืช



## แบบฝึกหัดบทที่ 9

- จงนิยามความหมายของคำต่อไปนี้
  - Resolution
  - Retention Volume
  - Specific retention Volume
  - Retention Index
  - Van Deemter plot
  - Optimum flow rate.
- จงอธิบายความหมายของ theoretical plate และ Height equivalent of a theoretical plate
- ข้อมูลต่อไปนี้ ได้จากการทำก๊าซโครมาโตกราฟี
$$t_R = 5.0 \text{ นาที}, \quad t_{air} = 1.0 \text{ นาที}$$
$$V_s = \text{ปริมาตรของเฟสที่อยู่กับที่} = 20 \text{ cm}^3$$
$$F = 50 \text{ cm}^3/\text{min.}$$
จงคำนวณหา
  - $k'$
  - $V_m$
  - $K_d$
  - $V_R$
- จงคำนวณหาค่า  $H$  และ  $N$  ของคอลัมน์ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ didodecylphthalate ซึ่งได้คาร์เท็นชันใหม่ เท่ากับ 9.59 นาที และพีกมีความกว้าง 1.20 นาที
- จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎีของคอลัมน์ ซึ่งให้รีเทนชันใหม่สารตัวอย่าง 7.66 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 47 วินาที
- จงหาค่า  $H$  ของคอลัมน์ที่ยาว 2.00 เมตร เพื่อให้พีกที่มีรีเทนชันใหม่ 10.0 นาที มีความกว้างของพีก 30 วินาที
- สารประกอบจำพวก chlorinated hydrocarbon คือ 1, 1, 1-trichloroethane ถูกนำมาทำก๊าซโครมาโตกราฟี ปรากฏว่าวัดคาร์เท็นชันใหม่ได้เท่ากับ 137 วินาที ความกว้างของ

พีทเท่ากับ 10 วินาที จงคำนวณหาค่า HETP ของ คอลัมน์ในหน่วยเซนติเมตร เมื่อคอลัมน์มีความยาว 5 ฟุต

ตอบ 0.0507 cm.

8. ข้อมูลต่อไปนี้สำหรับทำก๊าซโครมาโตกราฟี คือ

length of column 22.6 cm.

flow rate 0.287 cm<sup>3</sup>/min

V<sub>m</sub> 1.26 cm<sup>3</sup>

V<sub>s</sub> 0.148 cm<sup>3</sup>

โครมาโตแกรมของสารผสม A, B และ C มีข้อมูลดังนี้

	T <sub>R</sub> (min)	ความกว้างของพีท (min)
พีทอากาศ	4.2	—
A	6.4	0.45
B	14.4	1.07
C	15.4	1.16
D	20.7	1.45

จงคำนวณ

a) จำนวนเพลตที่ใช้สำหรับแต่ละพีท

b) HETP ของคอลัมน์

9. จากโจทย์ข้อ 8 จงคำนวณเกี่ยวกับสาร B และ C

a) การแยก (resolution)

b) รีเลทีฟรีเทนชัน หรือ selectivity factor ( $\alpha$ )

c) ความยาวของคอลัมน์ที่ต้องการให้การแยก มีค่าเท่ากับ 1.5

d) เวลาที่ต้องใช้ในการแยก B ออกจาก C เมื่อมีการแยก 1.5

10. จากโจทย์ข้อ 8 จงคำนวณเกี่ยวกับ C และ D ในคำถามแบบเดียวกับข้อ 9

11. ข้อมูลต่อไปนี้ได้จากการทำก๊าซโครมาโตกราฟีของคอลัมน์ที่ยาว 40 ซม.

สารประกอบ	$t_R$ (min)	W (min)
Air	2.5	—
Methylcyclohexane	10.7	1.3
Methylcyclohexene	11.6	1.4
toluene	14.0	1.8

จงคำนวณ

- ค่าเฉลี่ยของจำนวนเพลตตามทฤษฎีจากข้อมูล
  - ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ในข้อ a
  - ค่าเฉลี่ย HETP ของคอลัมน์
    - methylcyclohexene กับ methylcyclohexane
    - methylcyclohexene กับ toluene
    - methylcyclohexane กับ toluene
- จงคำนวณหา asymmetry factor ของโครมาโตกราฟี พีคที่มีความกว้างของพีคที่ 15% ของความสูงเท่ากับ 0.41 นาที ทางข้างซ้ายของรีเทนชันไทม์ และ 0.83 นาที ทางข้างขวาของรีเทนชันไทม์
  - จงคำนวณหา asymmetry factor ของโครมาโตกราฟีพีคที่มี  $W_{0.15L} = 28$  วินาที และ  $W_{0.15R} = 43$  นาที
  - สารผสมของ 1, 1, 1-trichloroethane และ Carbontetrachloride ถูกจำแนกออกจากกัน โดยใช้วิธีก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ยาว 10 ฟุต ได้ข้อมูลดังนี้
 

$t_{air} = 10$  วินาที

$t_{R_1}$  (1, 1, 1-trichloroethane) = 250 วินาที

$t_{R_2}$  (Carbontetrachloride) = 300 วินาที

ความกว้างของพีคที่ 1 ( $W_1$ ) = 8 วินาที

ถ้าต้องการให้การแยก (resolution) มีค่าเท่ากับ 1.5 ต้องใช้จำนวนเพลตตามทฤษฎีอย่างน้อยเท่าไร และคอลัมน์ควรยาวอย่างน้อยเท่าไร

15. ในการทดลองก๊าซโครมาโตกราฟี ความดันของก๊าซก่อนเข้าคอลัมน์มีค่าเท่ากับ 5 atm และหลังจากออกคอลัมน์ เท่ากับ 1 atm จงหาความดันเฉลี่ยในคอลัมน์
16. ค่าคงที่ในสมการ Van Deemter ของคอลัมน์ 2 ชนิด มีค่าดังนี้

	A (cm)	B (cm <sup>2</sup> /sec)	C (sec.)
Column 1	0.18	0.40	0.24
Column 2	0.05	0.50	0.10

- a) จงหาว่าคอลัมน์ชนิดใด มีค่าเฟลตตามทฤษฎีมากกว่า ถ้าใช้ก๊าซตัวพาที่มีความเร็ว 0.50 cm./sec.
- b) อัตราการไหลของก๊าซตัวพา ที่เหมาะสมที่สุด ( $U_{opt.}$ ) ควรมีค่าเท่าไร
17. โดยการใช้  $N_2$  เป็นก๊าซตัวพา พบว่า ค่าคงที่ในสมการของ Van Deemter มีค่าดังนี้

$$A = 0.10 \text{ cm}$$

$$B = 0.080 \text{ cm}^2/\text{sec}$$

$$C = 0.01 \text{ sec}$$

จงสร้างกราฟที่พลอตระหว่าง ค่า HETP กับค่า U จากค่า U = 1.0 cm/sec. จนถึง 10.0 cm./sec. โดยมีช่วงเท่ากับ 1.0 cm/sec. และหาค่า  $U_{opt.}$  จากกราฟเทียบกับค่า U ที่ได้ จากสมการ

$$U = \sqrt{B/C}$$

18. คอลัมน์ที่ใช้ในการแยกไฮโดรคาร์บอนโดยใช้ก๊าซไฮโดรเจนเป็นตัวพา มีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของก๊าซตัวพากับค่า HETP ดังนี้

U cm/sec.	HETP (cm)
1.0	0.625
5.0	0.525
8.0	0.7125

จงคำนวณหาค่า A, B, C ของคอลัมน์นี้ และสร้างกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า HETP กับค่า u

- ตอบ A = 0.05 cm.  
 B = 0.500 cm<sup>2</sup>/sec.  
 C = 0.075 sec.

19. จงคำนวณหาการแยกของพีค 2 พีค ซึ่งค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 18.5 และ 20.9 นาที ความกว้างของพีคเท่ากับ 130 และ 182 วินาที
20. จากข้อมูลของก๊าซโครมาโตกราฟีข้างล่างนี้ จงคำนวณหาค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสาร B เทียบกับสาร A

สาร	รีเทนชันไทม์
Air	24 วินาที
A	5.63 นาที
B	7.53 นาที

21. รีเทนชันไทม์ที่แก้ไขโดยหักเวลาของพีคอากาศออกแล้ว มีหน่วยเป็นนาทีของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดเซนตรง โดยใช้อัตราการไหลของก๊าซอัตรา 85 cm<sup>3</sup>/min อุณหภูมิของคอลัมน์ 90°C ชนิดของคอลัมน์ คือ silicone oil column มีค่าดังนี้

C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>
0.00	0.12	0.60	1.44	2.80	5.90	11.6	22.8

- a) จงคำนวณหาค่ารีเทนชันไวลุ่มของสารแต่ละชนิด
- b) คำนวณรีเลทีฟรีเทนชันของสารแต่ละชนิด
- c) พล็อตกราฟระหว่าง ค่า log retention time เทียบกับ จำนวนคาร์บอน
22. สารอินทรีย์อัลเคนชนิดเซนตรง ถูกนำมาทำก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้ Squalene เป็นเฟสของเหลวในคอลัมน์ ปรากฏว่าได้ข้อมูลของรีเทนชันไทม์ ดังนี้

สารประกอบ	t <sub>R</sub> (sec)
n-Hexane (C <sub>6</sub> )	50
n-Octane (C <sub>8</sub> )	62
n-Decane (C <sub>10</sub> )	118
n-Dodecane (C <sub>12</sub> )	241

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ทราบว่าเป็นอัลเคนชนิดตรงเช่นกันมาทำก๊าซโครมาโตกราฟี แบบเดียวกัน ปรากฏว่าได้รีเทนชันไทม์เท่ากับ 85 วินาที จงหาว่าสารตัวอย่างควรเป็นสารอะไร

ตอบ n-nonane.

23. ค่ารีเทนชันไทม์ที่แก้ไขโดยหักเอาเวลาของพีกอากาศแล้วของสารมีค่าต่อไปนี้ จงหาค่ารีเทนชันอินเด็กซ์ของสารแต่ละชนิด

Ethane	0.25 min	2-Methyl butane	1.2 min
propane	0.45	Butene-1	0.80
n-Butane	0.95	Hexene-1	2.95
n-Pentane	1.80	Ethylene	0.15
n-Hexane	3.50	Benzene	3.75
n-Heptane	6.95	n-Butanol	8.40
n-Octane	13.7	Water	3.50

24. ข้อมูลต่อไปนี้ได้จากกรทำก๊าซโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิคงที่ซึ่งคำนวณหาค่ารีเทนชันอินเด็กซ์จากสมการของ Kavats สำหรับสารประกอบ A, B, และ C

สารประกอบ	รีเทนชันไทม์ (นาที)
Air	0.32
n-pentane (C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> )	4.49
A	6.23
n-Hexane (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	7.08
B	7.78
n-Heptane (C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> )	11.52
C	16.24
n-Octane (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> )	18.11

โดยการพลอตกราฟระหว่าง ค่า I กับ  $\log (t_R - t_m)$  ของข้อมูลข้างบนนี้ จงหาค่ารีเทนชันไทม์ของ n-butane

25. เบนซินที่บริสุทธิ์  $2 \mu\text{g}$  ถูกนำมาฉีดลงในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ให้พีคที่มีพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร เมื่อนำสารตัวอย่างผสม  $1 \mu\text{g}$  ฉีดลงในเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี ในสภาวะเดิม ได้พื้นที่พีคของเบนซินมีค่าเท่ากับ 5 ตารางเซนติเมตร จงคำนวณหาว่ามีเบนซินอยู่ที่ไมโครกรัมในสารตัวอย่าง และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

ตอบ  $0.4 \mu\text{g}$ , 40%

27. สารมาตรฐานถูกเตรียมขึ้นโดยใช้สารต่อไปนี้ มีน้ำหนักเท่า ๆ กัน คือ n-hexane, n-heptane, n-undecane และ n-tetradecane สารมาตรฐานหนักที่มีน้ำหนักของสารอย่างละ  $0.20 \mu\text{g}$  ถูกฉีดลงในคอลัมน์ ได้พื้นที่พีคดังแสดงในตารางข้างล่าง

ปริมาณ $\mu\text{g}$	สารประกอบ	พื้นที่พีค
0.20	n-hexane	106.9
0.20	n-heptane	102.6
0.20	n-Undecane	80.0
0.20	n-Tetradecane	50.0

เมื่อนำสารตัวอย่างที่ประกอบด้วยสารเหล่านี้เช่นกันมาทำโครมาโตแกรม ปรากฏว่าได้พื้นที่พีค ดังนี้

ปริมาณ $\mu\text{g}$	สารประกอบ	พื้นที่พีค
?	n-hexane	32.6
?	n-heptane	46.8
?	n-Undecane	73.8
?	n-tetradecane	84.9

จงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสารต่าง ๆ นี้

27. ข้อมูลในการทำก๊าซโครมาโตกราฟีของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

ความเข้มข้น	พื้นที่พีค
0.200	1.43
0.400	2.86
0.600	4.29
0.800	5.73
1.000	7.16
Sample	4.10

จงคำนวณความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

28. โดยการใช้เทคนิคของวิธีการเติมสารมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณของสาร โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี จากข้อมูลข้างล่างนี้ จงหาความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม $\text{mg}/\text{cm}^3$	พื้นที่พีค
0 (pure sample)	3.72
1.23	7.00
3.47	12.70
4.89	16.30
6.24	20.01
7.15	22.75

29. สารตัวอย่างผสมของ Chlorinated hydrocarbon ถูกนำมาทำก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้ดีเทคเตอร์ชนิด TCD สารมาตรฐานที่ทราบส่วนประกอบถูกนำมาทำข้อมูลทั้งหมด ดังนี้



สารมาตรฐาน	wt ( $\mu\text{g}$ )	พื้นที่พีค สารมาตรฐาน	พีคสารตัวอย่าง
Chlorethane	0.40	110.0	82.3
1-Chloropropane	0.40	112.2	ไม่มีพีค
1-Chloropentane	0.40	87.3	125.2
1-Chloroheptane	0.40	78.4	180.0

จงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของสารตัวอย่างโดยวิธีเทียบกับสารมาตรฐาน และโดยวิธี Internal normalization.

- ตอบ** วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน 17, 32, 51 วิธี Internal normalization 21, 32, 47  
30. จากรูปที่ 9.25 จงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารแต่ละตัวในโครมาโตแกรม