หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎีบท

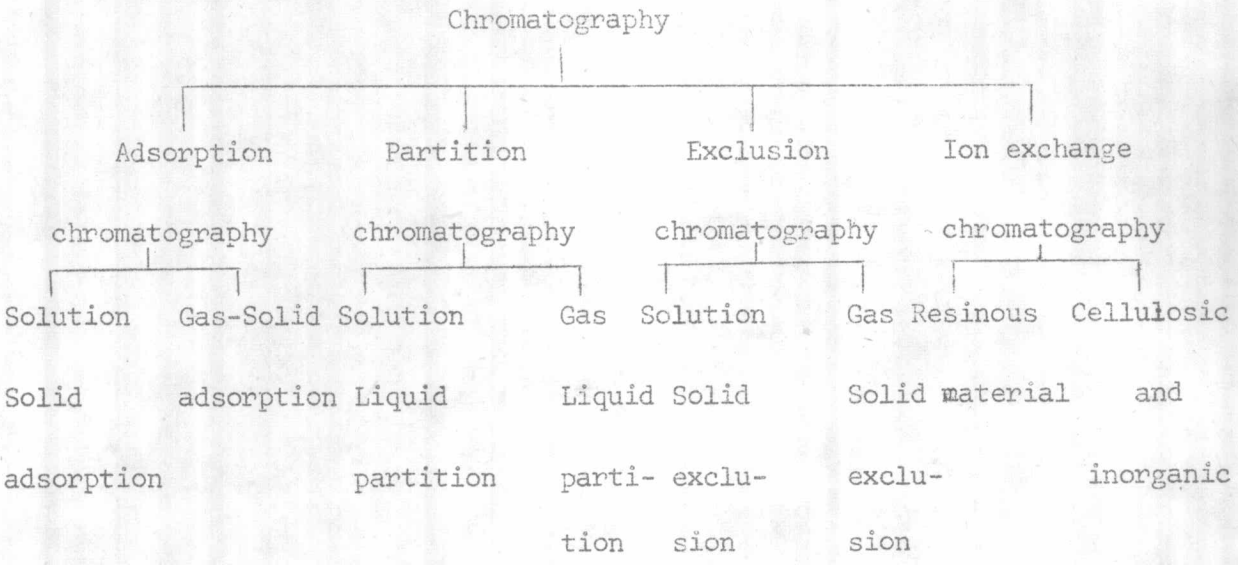
เทคนิคในการตรวจสอบสีนั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคต่าง ๆ กันหลาย ๆ อย่างจึงสามารถจะตรวจสอบได้ดี เช่น ใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี เป็นต้น ซึ่งจะขอกล่าวโดยย่อดังต่อไป

เทคนิคทางโครมาโตกราฟี

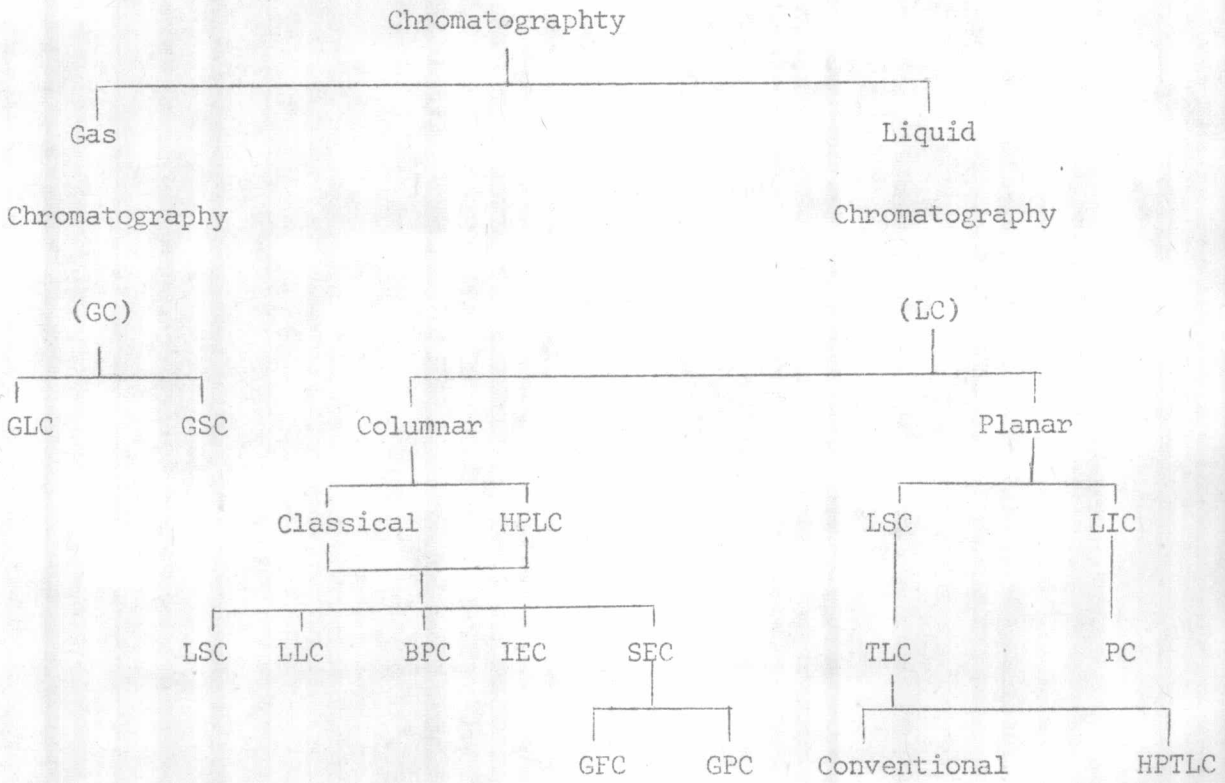
2.1 ความหมายและเทคนิคต่าง ๆ ของโครมาโตกราฟี

โครมาโตกราฟี (Chromatography) เป็นคำที่ใช้กันทั่วไปซึ่งหมายถึง เทคนิคที่ใช้ในการแยกสารออกจากกันโดยอาศัยหลักการที่สารตัวอย่างที่สนใจจะกระจายตัว (partition) อยู่ระหว่างโมไบล์เฟส (mobile phase) กับสเตชันนารีเฟส (stationary phase) โดยที่โมไบล์เฟสเคลื่อนที่ไปทำให้สารที่สนใจเคลื่อนที่ไปด้วยอัตราที่ไม่เท่ากัน[24] โครมาโตกราฟีสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายเทคนิค โดยอาศัยกลไก (mechanism) ของการกระจายตัวและการถูกดูดซับบนสเตชันนารีเฟสเป็นหลักดังแสดงในแผนภูมิที่ 1[25] กับการแยกสารโดยอาศัยสถานะของโมไบล์เฟสเป็นหลักดังแสดงในแผนภูมิที่ 2[25]

สำหรับเปเปอร์โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่เริ่มรู้จักมานานตั้งแต่ปี ค.ศ. 1944[26] ปัจจุบันนี้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีมีการพัฒนาไปอย่างมากมายแต่เปเปอร์โครมาโตกราฟีก็ยังสามารถใช้ได้ดีอยู่เสมอกับงานหลายประเภท หลักการแยกสารโดยใช้เปเปอร์โครมาโตกราฟีนั้นอาศัยกลไกเกี่ยวกับการกระจายตัวของสารที่จะแยก ระหว่างเฟส (phase) 2 เฟสเป็นหลักใหญ่[27] โดยที่ตัวกระดาษจะทำหน้าที่เป็นสเตชันนารีเฟสเนื่องจากในกระดาษประกอบด้วยเซลลูโลส(cellulose) ซึ่งมีโมเลกุลของน้ำแทรกอยู่ดังนั้นจึงถือได้ว่าสเตชันนารีเฟสเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อนระหว่างเซลลูโลสกับน้ำ (cellulose-water complex) แต่ถ้าเรานำกระดาษมาแช่ในสารละลายที่ไม่เป็นโพลาร์ (nonpolar solvent) เช่น น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) กลีเซอรีน (glycerin) สารที่ไม่เป็นโพลาร์นี้จะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของน้ำที่จับอยู่กับเซลลูโลสจึงทำให้เป็นสเตชันนารีเฟสอีกประเภทหนึ่งซึ่งเรียกเปเปอร์โครมาโตกราฟีเช่นนี้ว่า รีเวิร์สเฟสเปเปอร์ โครมาโตกราฟี (reverse phase paper chromatography)



แผนภูมิที่ 1. แสดงเทคนิคต่าง ๆ ของโครมาโตกราฟีโดยอาศัยกลไกของการแยกและการดูดซับบนสเตยันนารีเฟส



แผนภูมิที่ 2. แสดงเทคนิคต่าง ๆ ของโครมาโตกราฟีโดยอาศัยสถานะของโมบิลเฟส

หมายเหตุ

GC	=	Gas Chromatography
GLC	=	Gas Liquid Chromatography
GSC	=	Gas Solid Chromatography
LC	=	Liquid Chromatography
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
LSC	=	Liquid Solid Chromatography
LLC	=	Liquid Liquid Chromatography
BPC	=	Bonded Phase Chromatography
IEC	=	Ion Exchange Chromatography
SEC	=	Size Exclusion Chromatography
GFC	=	Gel Filtration Chromatography
GPC	=	Gel Permeation Chromatography
TLC	=	Thin Layer Chromatography
PC	=	Paper Chromatography
HPTLC	=	High Performance Thin Layer Chromatography

2.2 กลไกของการแยกสารโดยเปเปอร์โครมาโตกราฟี

เมื่อหยดสารที่จะแยกลงบนกระดาษซึ่งมีเซลลูโลสสับกับโมเลกุลของน้ำเป็นสเตชันนารีเฟส ขณะที่ตัวทำละลายที่เป็นโมบัลเฟสเคลื่อนที่ไปบนกระดาษผ่านบริเวณที่มีสารที่จะแยกจะทำให้สารเกิดการกระจายตัวอยู่ในโมบัลเฟสกับสเตชันนารีเฟสซึ่งมีน้ำอยู่และเมื่อโมบัลเฟสเคลื่อนขึ้นไปถึงกระดาษบริเวณที่ไม่มีสารอยู่ก็จะเกิดการกระจายตัวอีกครั้ง โดยสารที่อยู่ในโมบัลเฟสครั้งแรกจะกลับมาอยู่ในส่วนของน้ำที่อยู่ในสเตชันนารีเฟสคืออยู่บนกระดาษอีกครั้งหนึ่งและเมื่อโมบัลเฟสเคลื่อนที่ขึ้นมาติดต่อกันเรื่อย ๆ ก็จะเกิดการกระจายตัวของสารสลับกันไป ซึ่งการกระจายตัวของสารระหว่างเฟสเช่นนี้จะทำให้สารกระจายตัวอยู่ในเฟสใดเฟสหนึ่งได้ดีกว่าก็จะอยู่ในเฟสนั้นเป็นเวลานานจึงทำให้การเคลื่อนที่ได้ไม่เท่ากัน ด้วยเหตุนี้เองเมื่อปล่อยให้โมบัลเฟสเคลื่อนที่ขึ้นไปบนกระดาษในระยะที่พอสมควรและหยุดการ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทดลองก็จะได้โครมาโตแกรมขององค์ประกอบของสารต่าง ๆ ที่จะแยกปรากฏให้เห็นในตำแหน่งต่าง ๆ กัน สำหรับการกระจายตัวของสารที่จะแยกอยู่ในเฟส 2 เฟส อาศัยหลักของ Nernst's distribution law และแสดงด้วยค่าคงที่ของการกระจายตัว (Partition coefficient or Distribution constant) ดังแสดงในสมการที่ 1.

$$D = \frac{Cs}{Cm} \qquad \text{---- (1)}$$

เมื่อ D = ค่าคงที่ของการกระจายตัว

Cs = ความเข้มข้นของสารที่แยกมาอยู่ในสเตชันนารีเฟส

Cm = ความเข้มข้นของสารที่แยกมาอยู่ในโมไบล์เฟส

ในเปเปอร์โครมาโตกราฟีจะแสดงด้วยค่ารีทาร์เดชันแฟคเตอร์ (Retardation factor; R_f) ดังสมการที่ 2.

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่โมไบล์เฟสเคลื่อนที่ได้}} \qquad \text{---- (2)}$$

ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้วัดจากจุดเริ่มต้นที่หยดสารลงบนกระดาษจนถึงจุดกึ่งกลางของโครมาโตแกรมจุดที่มีความเข้มสูงที่สุด ค่า R_f อาจแสดงได้ในเทอมของจำนวนโมเลกุลในแต่ละเฟสซึ่งสัมพันธ์กับค่าคงที่ของการกระจายตัวดังสมการที่ 3. และ 4.

$$R_f = \frac{\text{จำนวนโมลของสารที่สนใจในโมไบล์เฟส}}{\text{จำนวนโมลของสารที่สนใจทั้งหมดในเฟสทั้งสอง}}$$

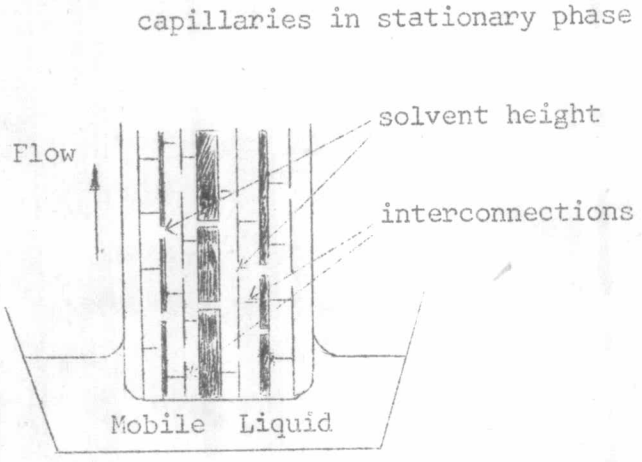
$$= \frac{Cm.Am}{Cm.Am + Cs.As} \qquad \text{---- (3)}$$

เมื่อ Am = พื้นที่หน้าตัดของโมไบล์เฟส (cross-section area of mobile phase)

As = พื้นที่หน้าตัดของสเตชันนารีเฟส (cross-section area of stationary phase)

$$R_f = \frac{Am}{Am + D.As} \qquad (4)^{(28)}$$

ค่า R_f ที่หาได้จากสมการที่ 4 นั้นไม่นิยมใช้เพราะมีข้อยุ่งยากในการหาค่า Am และ As ดังนั้นค่า R_f จึงนิยมคำนวนจากสมการที่ 2. สำหรับระยะทางที่โมบายล์เฟสละเคลื่อนที่ไปได้มากน้อยเพียงใดนั้นโดยปกติแล้วการเคลื่อนที่ของโมบายล์เฟสไม่สามารถควบคุมได้[26] ทั้งนี้เพราะอัตราการเคลื่อนที่ของโมบายล์เฟสขึ้นอยู่กับแรงดึงผิว ความหนืดของตัวทำละลายหรือโมบายล์เฟส และยังขึ้นอยู่กับลักษณะของสเตชันนารีเฟสอีกด้วย ส่วนกลไกของการเคลื่อนที่ของโมบายล์เฟสสามารถอธิบายด้วยรูปที่ 1.[26]



รูปที่ 1. แสดงการเชื่อมโยงของ capillary model ในเปเปอร์โครมาโทกราฟี

จากรูปแสดงให้เห็นว่าสเตชันนารีเฟสมีลักษณะเหมือนหลอดเล็ก ๆ (capillary) ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกันเป็นองค์ประกอบอยู่มากมายวางต่อ ๆ กันและตั้งฉากกับทิศทาง

การเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟส เมื่อเริ่มแรกที่ยังไม่ผ่านโมไบล์เฟสสเตชันนารีเฟสยังแห้งอยู่ต่อเมื่อเริ่มผ่านโมไบล์เฟสที่ปลายข้างหนึ่งเข้ามาในหลอดเล็กแรงตึงผิวของโมไบล์เฟสจะทำให้เกิดแรงดึงดูดกับหลอดเล็ก ๆ อื่น ๆ ทำให้โมไบล์เฟสเคลื่อนที่ขึ้นไปเรื่อย ๆ ด้วยแรง capillary attraction การเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟสผ่านเข้าไปในหลอดเล็ก ๆ นี้ก็มีแรงต้านทานการเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟสด้วยและที่ว่างเป็นช่องติดต่อถึงกันได้หมด ดังนั้นโมไบล์เฟสจึงสามารถจะเคลื่อนที่ผ่านได้ตลอดจากหลอดใหญ่ไปหลอดเล็กได้ ด้วยเหตุนี้เองทำให้แนวของโมไบล์เฟส (solvent front) เคลื่อนที่ได้เร็วในหลอดเล็ก ๆ และเคลื่อนที่ช้าในหลอดใหญ่ ฉะนั้นยิ่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดต่างกันมากก็ยิ่งทำให้การเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟสแตกต่างกัน

ถ้าเราให้ระยะทางที่โมไบล์เฟสเคลื่อนที่ได้เป็น Sf เราสามารถแสดงได้ดังสมการที่ 5

$$Sf = (kt)^{1/2} \qquad \text{-----(5)}$$

เมื่อ t = เวลาที่ให้ตัวทำละลายหรือโมไบล์เฟสผ่านกระดาษ

k = ค่าคงที่ ซึ่งเป็นปฏิภาคโดยตรงกับแรงตึงผิวของสารที่เป็นโมไบล์เฟส (ζ) และแปรผกผันกับความหนืดของโมไบล์เฟส (η)

$$k = \frac{\zeta}{\eta}$$

ดังนั้นความเร็วของโมไบล์เฟส (Uf) คือ

$$Uf = \frac{d\,Sf}{dt} = \frac{k}{2Sf} \qquad \text{----(6)}$$

จากสมการที่ 6. จะเห็นได้ว่า อัตราการเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟสเป็นปฏิภาคโดยตรงกับค่า k ซึ่งขึ้นอยู่กับแรงตึงผิวและความหนืดของโมไบล์เฟส

ดังนั้นค่า R_f จึงขึ้นอยู่กับแฟคเตอร์ต่าง ๆ ซึ่งพอจะสรุปได้ดังนี้ คือ

1. องค์ประกอบของตัวทำละลายที่ใช้เป็นโมไบล์เฟส
2. ชนิดของกระดาษที่ใช้ทำการทดลอง

3. สักษณะของไฟเบอร์ (fiber) ในกระดาษ

4. สักษณะของการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี (development)

5. ความยาวของกระดาษที่ใช้ทดลอง

6. ความเข้มข้นของสารที่ต้องการแยก

7. อุณหภูมิขณะทำการทดลอง

8. สารอื่น ๆ ที่อาจเจือปนอยู่

เนื่องจากค่า R_f ขึ้นกับแฟคเตอร์ต่าง ๆ มากมาย ดังนั้นในการทำวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องเทียบกับสารมาตรฐานไว้ด้วยโดยทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน

2.3 สิ่งที่สำคัญในการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี

สิ่งที่สำคัญที่จะต้องพิจารณาให้ดีในการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีมีดังต่อไปนี้

1. กระดาษที่ใช้ทำการทดลอง

2. ตัวทำละลายที่ใช้ทำหน้าที่เป็นโมไบล์เฟส

3. ภาชนะที่ใช้ในการทดลอง

4. การทดลองเพื่อให้ได้โครมาโตแกรม (Development of Chromatogram)

5. การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

6. การตรวจสอบผลการทดลอง

7. การคำนวณหาค่า R_f

2.3.1 กระดาษที่ใช้ทำการทดลอง

โดยทั่วไปแล้วกระดาษประกอบด้วยเซลลูโลสที่มีความบริสุทธิ์สูงพอสมควร โครงสร้างของโพลีเมอร์ริกเซลลูโลส (polymeric cellulose) จะประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอนไฮโดรกลูโคส (anhydroglucose unit) เป็นจำนวนมาก ตามทฤษฎีแล้วในแต่ละส่วนของกลูโคสจะมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) อยู่ 3 หมู่ แต่ในระหว่างการผลิตกระดาษจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลถูกออกซิไดส์ไปบางส่วนกลายเป็น อัลดีไฮด์ (aldehyde) คีโตน (ketone) หรือ หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) จากการเปลี่ยนแปลงนี้จะทำให้กระดาษสามารถจะมีสิ่งอื่นมาเจือปนได้ง่ายขึ้น

เช่น พวกสารอนินทรีย์ ซึ่งสามารถจะแลกเปลี่ยนไอออนกับหมู่ไฮดรอกซิลได้หรืออาจมีเกลือแร่อย่างอื่นติดมาด้วยในระหว่างการผลิตได้

คุณสมบัติที่สำคัญของกระดาษที่ใช้ในการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี มี 3 ประการ[29] ดังนี้

1. กระดาษควรจะต้องมีคุณภาพดีพอ คือ สามารถแยกสารได้ดีซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอัตราการเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟสบนกระดาษ ถ้าอัตราการเคลื่อนที่ของโมไบล์เฟสเร็วเกินไปจะทำให้การแยกสารอาจไม่ดีเท่าที่ควร

2. ความหนาของไฟเบอร์ในกระดาษมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่จะใช้แยก คือ ถ้าไฟเบอร์สานกันอย่างสม่ำเสมอและมีความหนาพอเหมาะก็จะทำให้กระดาษสามารถจะดูดซับปริมาณของสารตัวอย่างได้มากพอ

3. สิ่งเจือปนอื่น ๆ ในกระดาษ เช่น กรดอะมิโน (amino acid) น้ำตาล ไขมัน หรือสารอนินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งควรจะหาทางกำจัดออกไปก่อนใช้ทำการทดลอง ทั้งนี้เพราะสิ่งเจือปนเหล่านั้นอาจจะมี ผลต่อการทดลอง แต่สามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ให้สูญหายไปได้โดยล้างกระดาษที่จะใช้ทดลองด้วยตัวทำละลายหรือสารเคมีอื่น ๆ ที่เหมาะสม สำหรับกระดาษบางชนิดบริษัทผู้ผลิตอาจจะล้างเอาสิ่งเจือปนออกไปบ้างแล้ว เพื่อใช้ในงานเฉพาะนี้

นอกจากนี้กระดาษที่จะใช้ทำการทดลองจริง ๆ จะต้องนำมาตัดให้ได้ขนาดกว้างยาวพอเหมาะโดยพิจารณาจากจำนวนสารที่ต้องการจะแยกมากน้อยเพียงใดและขนาดของภาชนะที่จะใช้ในการทดลอง (chromatographic chamber)

2.3.2 ตัวทำละลายที่ใช้เป็นโมไบล์เฟส

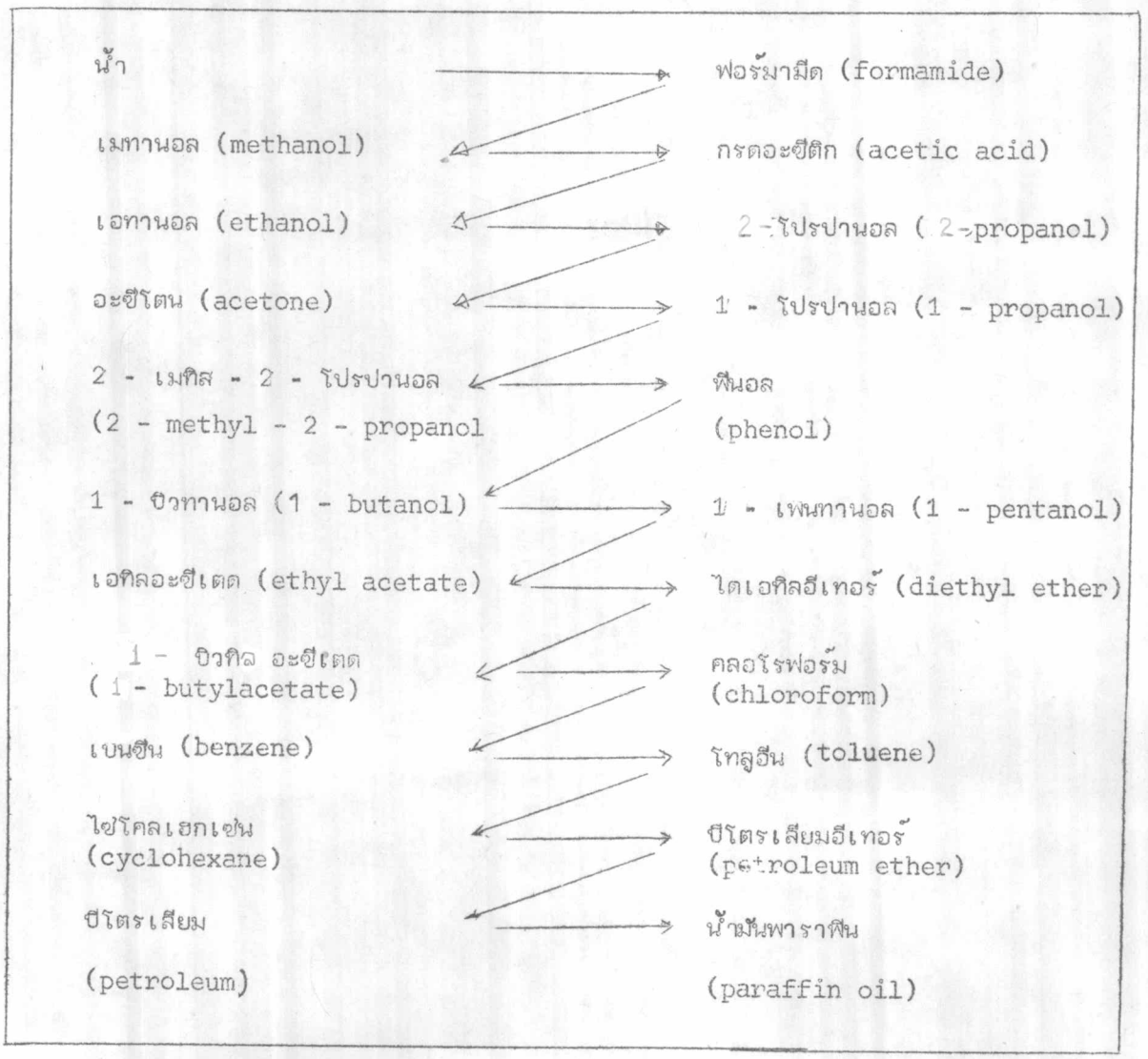
การเลือกตัวทำละลายที่จะนำมาใช้เป็นโมไบล์เฟสเป็นสิ่งสำคัญมากในการทำโครมาโตกราฟี ทั้งนี้เพราะว่าโมไบล์เฟสมี ผลต่อการแยกมาก รูปร่างของโครมาโตแกรม (chromatogram) จะดีหรือไม่นั้นอยู่ที่โมไบล์เฟสที่ใช้

หลักการในการเลือกโมไบล์เฟส สารตัวอย่างที่ต้องการจะแยกควรจะอยู่ในสเตชันนารีเฟสได้ดีกว่าในโมไบล์เฟส แต่สารเคมีทั้งหลายส่วนใหญ่จะละลายได้ในตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติทางเคมี

I16607041

คล้ายกัน เช่น สารที่เป็นโพลาร์ (polar) ก็จะละลายในตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์และสารประเภทที่ไม่เป็นโพลาร์ (nonpolar) ก็จะละลายในตัวทำละลายประเภทที่ไม่เป็นโพลาร์ สารเคมีที่ใช้เป็นตัวทำละลายจะมีค่าโพลาริตี (polarity) แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 5[30] น้ำจะมีโพลาริตีสูงที่สุดแล้วโพลาริตีจะลดลงมาเรื่อย ๆ จนถึงน้ำมันพาราฟิน(paraffin oil) ซึ่งจะเป็นตัวทำละลายที่ไม่เป็นโพลาร์

ตารางที่ 5 แสดงลำดับของโพลาริตี (polarity) ของตัวทำละลายเรียงจากมากไปน้อย



หมายเหตุ ตัวทำละลายจาก ฟอร์มามีด จนถึง 2 - เมทิล - 2 - โปรปานอล จะผสมกับน้ำได้ดีที่สุด ส่วนตัวทำละลายจาก ฟีนอลลงไปจะผสมกับน้ำได้น้อยลงตามลำดับ

โดยทั่วไปโมไบล์เฟสที่จะเลือกใช้อาจเลือกได้ตามลักษณะของสเตชันนารีเฟสซึ่งมี 3 กรณี[29,30] ดังนี้ คือ

1. กรณีที่สเตชันนารีเฟสเป็นน้ำ ถ้าสเตชันนารีเฟสเป็นน้ำที่ดูดอยู่ในเซลลูโลสโมไบล์เฟสที่ใช้ควรจะเป็นสารอินทรีย์ผสมกับน้ำ ซึ่งจะทำให้บรรยากาศในภาชนะที่ทำการทดลองอิ่มตัวได้ด้วยไอน้ำ ตัวทำละลายประเภทนี้เหมาะที่จะใช้ในการแยกสารที่ละลายในน้ำ เช่น พวกน้ำตาล พวกสตรองอิเลคโตรไลท์ (strong electrolyte) ถ้าเพิ่มปริมาณน้ำในโมไบล์เฟสให้มากขึ้น หรือเลือกใช้สารอินทรีย์ที่มีโพลาริตีให้สูงขึ้นก็จะทำให้ค่า R_f เพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามถ้าลดปริมาณน้ำหรือลดโพลาริตีของสารอินทรีย์ที่เลือกใช้ลงจะทำให้ค่า R_f ลดลงด้วย ดังนั้นการจะเปลี่ยนค่า R_f ของสารจึงขึ้นอยู่กับการเพิ่มหรือลดโพลาริตีของสารอินทรีย์กับปริมาณของน้ำที่ใช้เป็นส่วนผสมในโมไบล์เฟส แต่ถ้าสารที่จะแยกเป็นเกลือของพวกกรดอ่อนหรือด่างอ่อนให้เติมกรดหรือด่างซึ่งระเหยได้ดีลงในโมไบล์เฟสด้วย โมไบล์เฟสชนิดนี้จะใช้ได้ดีกับสารตัวอย่างที่ละลายในน้ำ แอมโมเนีย หรือ กรด แต่การแยกจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับฟังชันนัลกรุ๊ปของสารที่จะแยกอีกด้วย เช่น $-SO_3H$, $-COOH$, $-NH_2$ เพราะฟังชันนัลกรุ๊ปเหล่านั้นมีการแตกตัวได้แตกต่างกัน เมื่อทำการทดลองที่มีความเป็นกรดด่างคงที่จะต้องเติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงในโมไบล์เฟสด้วย

2. กรณี ที่สเตชันนารีเฟสเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นโพลาร์ สารอินทรีย์ที่ใช้ในกรณีนี้ได้แก่ ฟอร์มามีดไดเมทิลฟอร์มามีด (dimethylformamide) โปรพีลีนไกลคอล (propyleneglycol) อะเซตามีด (acetamide) เอ็น-เมทิลฟอร์มามีด (N-methylformamide) เป็นต้น ส่วนโมไบล์เฟสที่ใช้ในระบบนี้จะใช้สารอินทรีย์ที่มีโพลาริตีต่ำกว่าและเป็นชนิดที่ไม่ผสมหรือผสมเล็กน้อยกับสเตชันนารีเฟส ถ้าเพิ่มโพลาริตีของโมไบล์เฟสจะทำให้แยกสารที่มีโพลาริตีปานกลางและไม่ละลายในน้ำได้ดีขึ้น

3. กรณีที่สเตชันนารีเฟสเป็นสารอินทรีย์ซึ่งเป็นพวกที่ไม่มีโพลาริตี สารดังกล่าวนี้ได้แก่ น้ำมันพาราฟีน น้ำมันกาด (kerosene) น้ำมันถั่วเหลือง (soya-bean oil) น้ำมันมะกอก (olive oil) ออกตานอล (octanol) เป็นต้น ส่วนโมไบล์เฟสจะต้องเป็นของผสมระหว่างน้ำกับพวกสารอินทรีย์ซึ่งต้องละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซีโตน กรดอะซีติก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อะซีโตไนตริล (acetonitrile) ดีเอ็มเอ็ฟ (DMF) ฟอร์มามีด เป็นต้น

ถ้าใช้น้ำมันพาราฟินเป็นสเตชันนารีเฟส โมไบล์เฟสอาจจะใช้ เมทานอล หรือ เมทานอลผสมกับน้ำ และถ้าเพิ่มปริมาณสารอินทรีย์ลงไปในโมไบล์เฟสจะทำให้ค่า R_f เพิ่มขึ้นได้ซึ่งคล้ายกับการใช้น้ำเป็นสเตชันนารีเฟส

สำหรับในเรื่องของการแยกสีนั้นถ้าเป็นสีที่ละลายน้ำได้ก็มีกฎเกณฑ์ในการเลือกตัวโมไบล์เฟส[31] ดังนี้

1. โมไบล์เฟสชนิดที่ต้องมีน้ำและสารอื่นที่สามารถจะสร้างไฮโดรเจนบอนด์ (hydrogen bond) ได้ เช่น แอลกอฮอล ไกลคอล (glycol) อีเทอร์สารที่แยกหรือสีควรจะละลายได้เพียงเล็กน้อยในโมไบล์เฟส

2. โมไบล์เฟสที่ต้องมีตัวทำละลายอื่น ๆ อยู่ด้วย เช่น พิริดีน ดีเอ็มเอ็ฟ ฟอร์มามีด ไดออกเซน คีโตน และ เอสเตอร์บางชนิดผสมอยู่ด้วยเพื่อลดการดูดซับของสีให้น้อยลง

3. โมไบล์เฟสที่มีสารอินทรีย์ประเภท อลิแฟติก (aliphatic) อโรมาติก(aromatic) ไนเตรด (nitrated) คลอริเนตเตด (chlorinated) หรือ เทอร์ปีนไฮโดรคาร์บอน (terpene hydrocarbon) ผสมอยู่จะไม่เหมาะสมในการทำโครมาโตกราฟีของสี

สำหรับสีที่ละลายในไขมันก็จะใช้หลักการเลือกตัวทำละลายแบบรีเวิร์สเฟสเปเปอร์โครมาโตกราฟี[32,33]

2.3.3 ภาชนะที่ใช้ในการทดลอง (chromatographic tank)

ภาชนะที่ใช้ในการทดลองจะต้องปิดให้มิดชิดได้ เพื่อรักษาให้ไอของโมไบล์เฟสอิ่มตัวอยู่ภายในภาชนะตลอดเวลา โดยทั่วไปลักษณะของภาชนะจะเป็นแบบใดขึ้นอยู่กับเทคนิคของการทำงานเพื่อให้ได้โครมาโตแกรมที่ดีซึ่งดังจะกล่าวต่อไปนี้

2.3.4 การทดลองเพื่อให้ได้โครมาโตแกรม โดยทั่วไปเทคนิคในการดีเวลลอปโครมาโตแกรม (development of chromatogram) นั้นสามารถทำได้ 4 แบบด้วยกันคือ

1. Descending chromatography

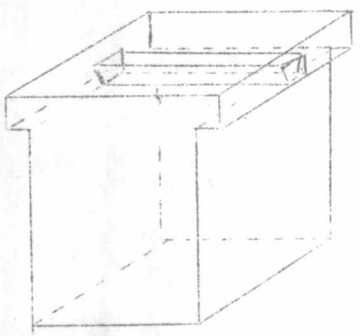
2. Ascending chromatography

3. Horizontal chromatography

4. Circular chromatography

Descending chromatography

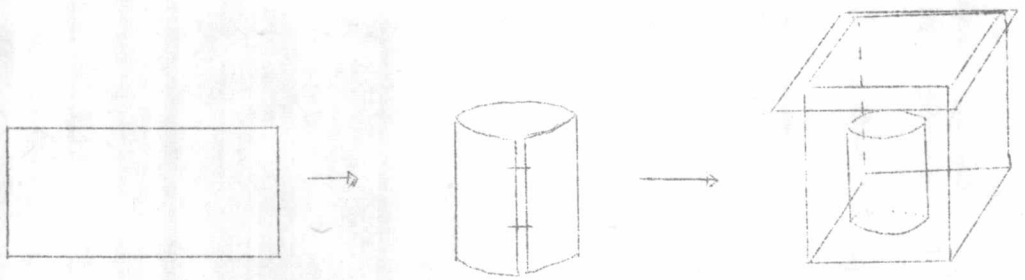
เทคนิคในการดีเวลลอปโครมาโตแกรมโดยวิธีนี้เป็นการให้โมไบล์เฟสเคลื่อนที่จากด้านบนของกระดาษลงมาสู่ด้านล่าง กรณีนี้โครมาโตแทงค์จะต้องมีช่องสำหรับใส่โมไบล์เฟสอยู่ด้านบนของแทงค์เอากระดาษใส่ในช่องด้านบนที่มีตัวทำละลายอยู่โดยจะมีหลอดแก้วอยู่ภายในช่องด้านบนเพื่อใช้คล้องกระดาษ เมื่อใส่โมไบล์เฟสในช่องด้านบนแล้ว จึงปิดฝาแทงค์เพื่อให้ไอของโมไบล์เฟสเกิดการอิ่มตัวภายในแทงค์แล้วจึงจะทำการทดลองได้ ลักษณะของแทงค์ที่จะทำการทดลองมีลักษณะดังรูปที่ 2.[29]



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของแทงค์

Ascending chromatography การดีเวลลอปโครมาโตแกรมโดยวิธีนี้เป็นที่นิยมมาก เพราะใช้อุปกรณ์ง่ายและสะดวกเพียงแต่มีภาชนะที่สามารถปิดมิดชิดได้ เช่น ปีกเกอร์ ขวดโหล หลอดแก้ว ก็สามารถจะทำการทดลองได้โดยใส่โมไบล์เฟสลงในด้านล่างของภาชนะแล้วปิดภาชนะทิ้งไว้จนกว่าภายในภาชนะนั้นจะอิ่มตัวด้วยไอของโมไบล์เฟสจึงจะทำการทดลองได้ โดยนำกระดาษที่มีสารที่จะแยกวางลงในภาชนะได้ทันที

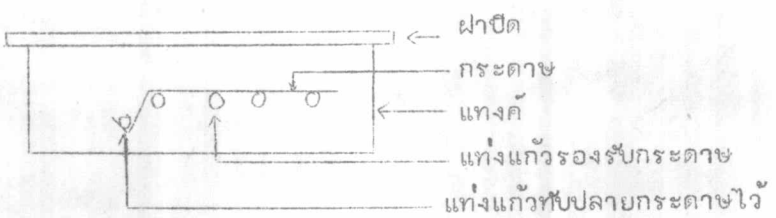
ถ้าในงานวิเคราะห์ที่ทำเป็นงานใหญ่จะทำในโครมาโตแทงค์ที่มีระบบปิดเปิดอย่างดี และมีที่คล้องกระดาษหรือที่คีบกระดาษอยู่ด้านบนของแทงค์เพื่อให้ปลายด้านล่างจุ่มอยู่ในตัวทำละลาย แต่ถ้าทำในภาชนะที่ไม่มีที่คล้องกระดาษเราสามารถที่จะนำกระดาษที่มีสารที่จะแยกอยู่แล้วมามัวนเอาปลายมาชนกันแล้วเย็บจะมีลักษณะคล้ายทรงกระบอก แล้วนำไปวางในตัวทำละลายที่อยู่ด้านล่างของภาชนะได้ทันที ดังรูปที่ 3.[29] วิธีนี้ทำได้ละดวกมากและเหมาะสำหรับการตรวจสอบที่ต้องการความรวดเร็ว



ก. กระดาษที่มีสารที่จะแยก ข. นำปลายกระดาษมาชนกันแล้วเย็บ ค. นำไปใส่ในโครมาโตแทงค์

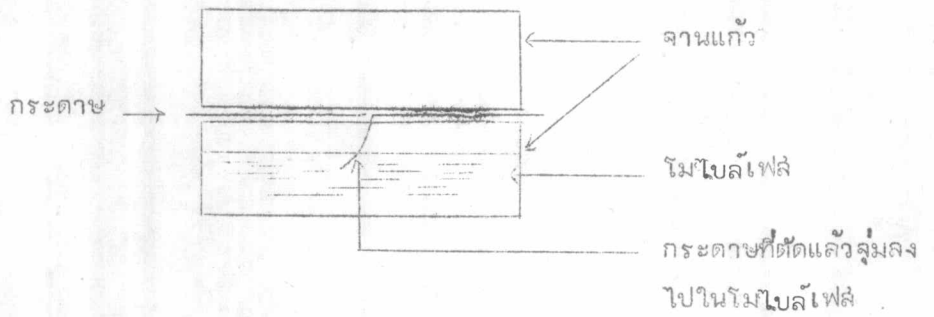
รูปที่ 3 แสดงวิธีการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี

Horizontal chromatography เทคนิคในการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบนี้เพิ่งจะนิยมไม่นานนักทั้งนี้เพราะลักษณะของแทงค์ไม่ใหญ่โตเกินไปนัก ทำให้วางไว้ในตู้อบหรือตู้เย็นได้ละดวก แทงค์ประเภทนี้จะมีแท่งแก้วหรือพวกไฟเบอร์ เช่น ไนลอน (nylon) วางไว้เพื่อให้วางกระดาษข้างบนแท่งแก้วและที่ด้านล่างของแทงค์ใส่โมไบล์เฟสไว้ ลักษณะของแทงค์ดังรูปที่ 4.[29]



รูปที่ 4 แสดง Horizontal chromatography

Circular หรือ Radial chromatography เทคนิคในการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี โดยวิธีนี้จะใช้วิธีหยดสารตัวอย่างลงบนศูนย์กลางของกระดาษที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมและให้โมไบล์เฟส์เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในศูนย์กลางของสารตัวอย่างซึ่งได้ตัดกระดาษเป็นแนวผ่านเข้าไปที่จุดศูนย์กลางของกระดาษและให้กระดาษส่วนนี้จุ่มลงในตัวทำละลาย ๆก็จะเคลื่อนที่ผ่านเข้ามาที่ศูนย์กลางได้ ลักษณะของอุปกรณ์ที่จะใช้ในการทดลองดังรูปที่ 5.[30] ซึ่งประกอบด้วยจานแก้ว (petridishes) 2 อัน อันหนึ่งใช้ทำเป็นฝาปิด อีกอันใช้ใส่โมไบล์เฟส์โดยมีแผ่นกระดาษวางอยู่ตรงกลาง



รูปที่ 5. แสดง Circular chromatography

หลังจากได้พิจารณาเลือกการดีเวลลอปแบบใดแล้วก็ทำการทดลอง และเมื่อดีเวลลอบไปได้ระยะทางที่เห็นว่าเหมาะสมแล้วก็นำเอาไปไว้ในตู้ดูดอากาศ เพื่อทำให้แห้ง หรือ อาจใช้เครื่องเป่าให้แห้งก็ได้ ในการทำการทดลองเพื่อแยกสารในสารตัวอย่างนั้นบางครั้งอาจจะต้องดีเวลลอปหลายแบบซึ่งได้แก่

Multiple development เป็นการนำโครมาโตแกรมที่ได้จากครั้งแรกไปดีเวลลอปในโมไบล์เฟส์เดิมหลาย ๆ ครั้งในทิศทางเหมือนเดิมทุกอย่าง การทำโครมาโตแกรมใหม่แต่ละครั้งต้องทำให้กระดาษแห้งเสียก่อน ๆ ที่จะทำใหม่ทุกครั้ง การทำ multiple development นี้อาจจะช่วยทำให้ผลของการแยกสารหรือการทดลองได้ผลดีขึ้น

Fractional development เป็นการกระทำที่คล้ายกับ multiple delvelopment คือ ทำหลายครั้งและในทิศทางเดิมทุกครั้ง แต่แตกต่างจากวิธีแรกตรงที่ว่าจะต้องมีการเพิ่มโพลาริตีของโมไบล์เฟสขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งการเพิ่มโพลาริตีของโมไบล์เฟสนี้เองจะทำให้ค่า R_f สูงขึ้นกว่าเดิมทำให้ผลการแยกดีขึ้น

Two - Dimensional development ในการที่จะทำการทดลองแบบนี้ได้ส่วนใหญ่กระดาษที่ใช้จะต้องเป็นสี่เหลี่ยมสัตุรัส เพราะเมื่อทำการทดลองครั้งแรกแล้วพบว่าอาจมีบางจุดแยกไม่ดีจึงนำไปดีเวลลอปใหม่ครั้งที่สอง โดยทำในทิศทางใหม่ที่ตั้งฉากกับทิศทางเดิม โมไบล์เฟสที่ใช้แต่ละครั้งก็แตกต่างกันด้วย

Multi - Dimensional development เป็นเทคนิคที่ใช้วิธีการตัดบริเวณจุดแยกของสารที่ได้จากโครมาโตแกรมแรกไปติดลงบนกระดาษแผ่นใหม่แล้วทำการดีเวลลอปใหม่ การทำแบบนี้สามารถทำการทดลองซ้ำได้ตามที่ต้องการโดยใช้โมไบล์เฟสต่าง ๆ กันได้ด้วย

2.3.5 การวิเคราะห์สารตัวอย่าง (sample application)

ขั้นแรกจะต้องทำสารตัวอย่างให้เป็นสารละลายเสียก่อนเพื่อจะนำมาหยดลงบนกระดาษโดยหยดลงบนขีดหรือจุดที่ได้ทำเครื่องหมายไว้ด้วยดินสอดำ การแยกสารตัวอย่างอาจจะทำให้เป็นหยดหรือเป็นแนวแล้วแต่จุดประสงค์ของการแยก การวิเคราะห์สารตัวอย่างอาจจะใช้ไมโครไปเปตหรือหลอดแก้วเล็ก ๆ (capillary) ก็ได้สำหรับงานคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative work) แต่ถ้าเป็นงานด้านปริมาณวิเคราะห์ (quantitative work) จะต้องเข้มงวดในการทดลองเพื่อความถูกต้อง เช่น อาจจะใช้ไมโครไซรินจ์ (microsyringes) ช่วยในการหยดสารแต่ละครั้งที่ตำแหน่งเดิมและจะต้องรอให้แห้งก่อนจึงจะหยดซ้ำลงที่เดิมได้ถ้าใช้เครื่องเป่าให้แห้งจะทำให้ช่วยได้มาก สำหรับปริมาณสารที่หยด ถ้าเป็นการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานควรจะหยดด้วยปริมาณเท่ากันทุกครั้ง เพราะปริมาณสารมีผลต่อรูปร่างของโครมาโตแกรมที่ได้จึงทำให้มีผลต่อเนื่องไปถึงการคำนวณค่า R_f ได้ด้วย

2.3.6 การตรวจสอบผลการทดลอง การวิเคราะห์ผลหลังจากได้โครมาโตแกรมมาแล้วนั้น ก่อนอื่นต้องดูลักษณะของโครมาโตแกรมเสียก่อน เช่น ถ้าสารที่แยกมีสีในตัวเองอยู่แล้วก็จะมองเห็นลักษณะโครมาโตแกรมได้ในทันที แต่ถ้าสารที่แยกไม่มีสีให้เห็นก็จะต้องใช้เทคนิคอื่น ๆ มาช่วยในการวิเคราะห์โครมาโตแกรม โดยทั่วไปเทคนิคในการตรวจสอบสารที่แยกได้ในโครมาโตแกรมมีวิธีการใหญ่ ๆ 3 วิธี[30] ดังนี้

1. ใช้วิธีทางกายภาพ (physical methods) เมื่อได้โครมาโตแกรมแล้วนำไปส่องกับแสงแล้วทำเครื่องหมายรอบสารที่มองเห็น แต่ถ้าส่องแสงแล้วยังมองไม่ได้หมดให้นำไปส่องแสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet) ถ้ามีสารเรืองแสงก็จะปรากฏฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) ออกมาให้เห็นแต่สารบางตัวสามารถจะทำลายฟลูออเรสเซนต์ได้ จึงปรากฏเห็นเป็นจุดมืด ๆ จากพื้นที่เรืองแสงและสามารถจะแก้ปัญหาเกี่ยวกับการทำลายฟลูออเรสเซนต์ได้โดยพ่นละอองของฟลูออเรสซีน (fluorescein) ที่ละลายในสารละลายแอมโมเนียเจือจางลงไปก็จะทำให้มองเห็นได้ชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารบางประเภทที่จะให้ แสงฟลูออเรสเซต์ออกมาได้ เมื่อเอาโครมาโตแกรมไปทำให้เย็นหรือทำให้ร้อน

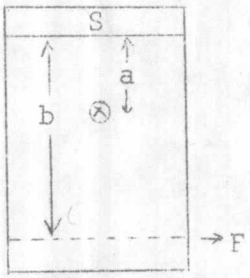
2. ใช้วิธีทางเคมี (chemical methods) โดยใช้สารเคมีเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารที่อยู่บนโครมาโตแกรมเพื่อให้เกิดสีหรือให้ฟลูออเรสเซนต์ สารเคมีที่ใช้อาจจะนำมาพ่นเป็นละอองลงไปบนโครมาโตแกรมหรืออาจนำเอาโครมาโตแกรมจุ่มลงไปในของเหลวเลยก็ได้

3. ใช้วิธีทางชีววิทยา (biological methods) อาศัยผลของการเกิดปฏิกิริยาทางชีววิทยาโดยเอาโครมาโตแกรมที่ได้ใส่ในภาชนะที่ใช้สำหรับเลี้ยงพวกเชื้อจุลินทรีย์ (micro-organism) ถ้าในโครมาโตแกรมมีสารที่เป็นพวกยาปฏิชีวนะก็จะทำให้ต่อต้านการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์นั้นและในทางตรงข้ามถ้ามีสารที่ช่วยกระตุ้นให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตก็จะเห็นพวกจุลินทรีย์เหล่านั้นเติบโตได้ นอกจากนี้ในบางครั้งอาจจะใช้เอ็นไซม์ (enzyme) ช่วยในการตรวจสอบสารบางชนิดได้

2.3.7 การคำนวณหาค่า R_f

เมื่อได้โครมาโตแกรมเป็นที่เรียบร้อยแล้วก็ต้องนำมาคำนวณหาค่า R_f เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป การวัดค่าริทาร์เดชันแฟคเตอร์ (R_f) นี้ใช้อัตราส่วนของระยะทางระหว่างจุด

เริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางของจุดที่ได้ต่อระยะทางที่โมไบล์เฟสเคลื่อนที่ไปได้ดังรูปที่ 6[30]



$R_f = \frac{a}{b}$

S คือจุดเริ่มต้น

F คือแนว solvent front ของโมไบล์เฟส

a = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่มาได้จากจุดเริ่มต้น

b = ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่มาได้

รูปที่ 6. แสดงการหาค่า R_f

ค่า R_f จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 และจะมีค่าใกล้เคียงกันหรือไม่ในการทดลองแต่ละครั้งย่อมขึ้นอยู่กับแฟคเตอร์ต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นการจะวิเคราะห์สารตัวอย่างแต่ละครั้งต้องทำการทดลองกับสารมาตรฐานในกระดาษแผ่นเดียวกันเพื่อให้มีสภาวะเดียวกันทุกอย่างเพื่อลดข้อแตกต่างอันอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดได้

จากหลักการของเปเปอร์โครมาโตกราฟีเราสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบสีได้ทั้งนี้เพราะสีต่าง ๆ สามารถแยกจากกันได้เนื่องจากโครงสร้างของมันต่างกัน สีบางตัวถูกดูดซับ (adsorb) ได้ดีกับสเตชันนารีเฟสก็จะทำให้เคลื่อนที่ไปได้ช้ากว่าสีที่ถูกดูดซับได้น้อยกว่า สีบางตัวที่เคลื่อนที่ช้ามาก ๆ ในโมไบล์เฟสชนิดหนึ่งอาจจะปรากฏเห็นเป็นทางยาว (tail) แต่ถ้าเปลี่ยนโมไบล์เฟสก็อาจจะทำให้การเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นและไม่เป็นทางยาว ค่า R_f ของสีที่ได้จากโครมาโตแกรมมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของสี จึงมีหลักเกณฑ์ในการพิจารณาค่า R_f ของสีอย่างคร่าว ๆ ซึ่งได้จากการทดลอง[31,34] ดังนี้

1. สีที่มีโครงสร้างง่าย ๆ จะมีค่า R_f สูงกว่าสีที่มีโครงสร้างซับซ้อน ทั้งนี้เพราะเมื่อสีมีโครงสร้างซับซ้อน คือ อาจมีฟังชันนัลกรุ๊ป (functional group) มากขึ้นก็ยิ่งสามารถจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างเฟสมากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนกับสีพวกเอโซ (azo dye)

2. ถ้าในโครงสร้างของสีที่มี conjugated double bond มาก ๆ จะทำให้ค่า R_f ต่ำ เพราะโมเลกุลที่มี double bond conjugate กันมาก ๆ จะไปทำให้โมเลกุลเกิดโพลาไรซ์ (polarlized) ซึ่งทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับการเคลื่อนที่จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มี double bond น้อย

3. กรณีสีเอโซ ถ้ามีเอโซกรุ๊ปมากจะทำให้ค่า R_f ต่ำ และถ้ามี amide bridge ก็จะทำให้ค่า R_f ต่ำลงเช่นกัน

4. ถ้าสีมี keto group มากจะทำให้ค่า R_f ลดลง

5. ตัว substituent บางตัวในโมเลกุลของสีทำให้ค่า R_f ต่ำลง เช่น $-SO_3H$, $-OCH_3$, $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$ และ $-NO_2$

6. สีที่มีโครงสร้างสมมาตรกัน (symmetry) จะมีค่า R_f ต่ำกว่าสีที่ไม่สมมาตรกัน (unsymmetric dyes) และสีที่มีไดโพลโมเมนต์ (dipole moment) ต่ำก็จะมีค่า R_f สูง

7. สีที่เป็น stereoisomer กันค่า R_f ของ cis - isomer จะสูงกว่า trans-isomer

8. สีที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะเกิดการดูดซับ ไก้ดีจึงเคลื่อนที่ไก้ไม่ดี ผลคือทำให้ค่า R_f ต่ำ

<u>เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมตรี</u>

เนื่องจากสารเคมีต่าง ๆ สามารถดูดกลืน (absorb) รังสีหรือแสง (radiation of light) ได้แตกต่างกัน ในกรณีของสีก็เช่นเดียวกับสารอินทรียอื่น ๆ ที่สามารถจะดูดกลืนแสงในย่วงความยาวคลื่นต่าง ๆ กันออกไป

จากสเปกตรัม (spectrum) ของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic spectrum) การแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าเป็นพลังงานรูปหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอนุภาคหรือที่เรียกว่า โฟตอน (photon) จากทฤษฎีควันตัม (Quantum)พลังงานของโฟตอนนี้จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความถี่ (frequency) ของมัน ดังสมการที่ 7

$$E = h\nu \qquad \text{.....(70}$$

เมื่อ E = พลังงานของโฟตอนซึ่งอาจมีหน่วยต่าง ๆ กัน

h = Planck's constant มีค่าเท่ากับ 6.63×10^{-34} J·sec

ถ้าคิดว่าการแผ่รังสีมีลักษณะเป็นคลื่น ความเร็วของคลื่นจะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความถี่ และชนิดของตัวกลาง(medium) ซึ่งอาจเขียนเป็นสมการได้ คือ

$$Vi = \lambda i \nu \quad \text{..... (8)}$$

Vi = ความเร็วของคลื่นในตัวกลางชนิดหนึ่ง มีหน่วยเป็น cm/sec

λi = ความยาวคลื่นเป็น cm/cycle

การแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในสูญญากาศมีความเร็วเท่ากับ 2.99792×10^{10} cm/sec ดังนั้น

$$C = \nu\lambda \simeq 3 \times 10^{10} \text{ cm/sec} \quad \text{.....(9)}$$

C = ความเร็วของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในสูญญากาศ

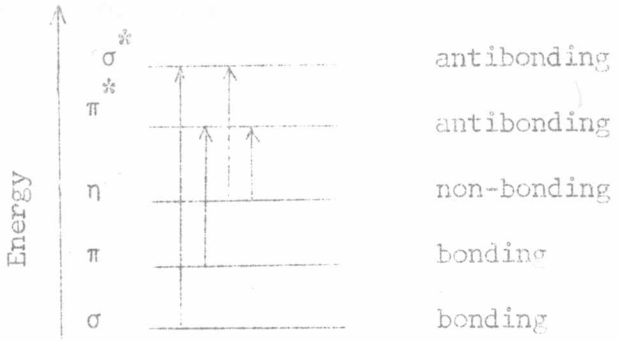
ความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้ากับความยาวคลื่นจะได้ดังสมการที่ 10

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{.....(10)}$$

พลังงานของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้ากว้างมากและแสงอุลตราไวโอเลตจะมีพลังงานสูงกว่าแสงวิสิเบิลและแสงอินฟราเรด

ความยาวคลื่นของแสงอุลตราไวโอเลต อยู่ในช่วงประมาณ 10-400 นาโนเมตร ความยาวคลื่นของแสงวิสิเบิลอยู่ในช่วง 400-800 นาโนเมตร (และช่วงของแสงอินฟราเรดอยู่ในช่วง 1-300 ไมครอน) อะตอมหรือโมเลกุลของสารที่ดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต และวิสิเบิลจะทำให้อิเลคตรอนวงนอกสุดเกิดทรานซิชันชั้น (electronic transition) แต่แสงอินฟราเรดนั้นจะทำให้เกิดการไวเบรชัน (vibration) และโรเทชัน (rotation) ทรานซิชันในโมเลกุลเท่านั้น

สำหรับสารที่มีสีมีความนิยมใช้แสงที่อยู่ในช่วงวิสิเบิลในการวิเคราะห์ ส่วนแสงอินฟราเรดเหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างหาพวกฟังชันนัลกรุ๊ป เนื่องจากสีผสมอาหารเป็นสารอินทรีย์จึงพิจารณาเฉพาะการดูดกลืนแสงของสารอินทรีย์เท่านั้น โดยพลังงานของแสงจะทำให้อิเลคตรอนเคลื่อนที่จาก ground state orbitals ไปยัง excited state หรือ higher energy molecular orbitals ซึ่งเรียกว่า antibonding orbitals ดังแสดงในรูปที่ 7[35]



รูปที่ 7 แสดงระดับของพลังงานของอิเลคตรอนในโมเลกุลของสาร

ถ้าโมเลกุลของสารอินทรีย์ สามารถดูดกลืนแสงในช่วงอุลตราไวโอเลตหรือวิสิเบิลได้ ซึ่งแสดงลักษณะและคุณสมบัติของมัน เรียกว่า โครโมฟอร์ (chromophore) โดยทั่วไปโครโมฟอร์ 3 แบบ คือ

1. โครโมฟอร์ ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุโดยที่ไม่มี lone pair ของอิเลคตรอน เช่น C = C

2. โครโมฟอร์ ที่มี multiple bond ระหว่าง 2 อะตอมของธาตุ โดยที่อะตอมของธาตุหนึ่งมี lone pair ของอิเลคตรอน เช่น C = $\ddot{O}$:

3. โครโมฟอร์ ที่มี benzene ring.

ตัวอย่างกรุปที่เป็นโครโมฟอร์ ได้แก่ -C = C- , -C ≡ C- , -C = O ,

-COOH , $-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH_2$, -N = N- , $-NO_2$, -NO , $-NO_3$

นอกจากในโมเลกุลของสารอินทรีย์จะมีโครโมฟอร์แล้ว ยังอาจมีออกโซโครม (auxochrome) ซึ่งเป็นกรุปที่ไม่ดูดกลืนแสง หรือดูดกลืนแสงได้เพียงเล็กน้อยในช่วงอุลตราไวโอเลต หรือวิสิเบิล แต่กรุปนี้สามารถมีผลต่อแอบซอบชันส์เปกตรัม(absorption spectrum) ของโครโมฟอร์ที่ออกโซโครมนั้นไปเกาะอยู่เปลี่ยนไปในทางที่ความยาวคลื่นที่สั้นลงหรือยาวขึ้น

ถ้ากรณีที่ทำให้ λ max เปลี่ยนไปในทางที่ยาวขึ้น เรียกว่า Bathochromic effect หรือ red shift ถ้าทำให้ λ max เปลี่ยนไปในทางที่สั้นกว่าเดิมเรียกว่า Hypsochromic effect หรือ blue shift

จากที่กล่าวมาเมื่อพิจารณาโมเลกุลของสี ซึ่งประกอบด้วยโครโมฟอร์กับรูปต่าง ๆ กัน จึงทำให้ดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่นไม่เท่ากันเป็นลักษณะเฉพาะของสีแต่ละตัว แม้แต่สีที่มีฟังชันนัลกรุ๊ปเหมือนกันแต่ต่างกันที่ตำแหน่งของการ substituted ก็จะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน ซึ่งสามารถนำมาเป็นหลักในการวิเคราะห์สีได้

สเปกโตรโฟโตเมตรียังนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารได้ด้วย โดยอาศัยกฎของ Beer - Lambert ดังแสดงในสมการที่ 11

$$A = \varepsilon bc = -\log T \qquad \text{.....(11)}$$

เมื่อ A = ค่า absorbance ของสาร

ε = molar absorptivity

T = transmittance

b = ความกว้างของเซลที่ใส่สาร

c = ความเข้มข้นของสาร ในหน่วย $mole/dm^3$ ถ้า c มีหน่วยเป็นอย่างอื่น ค่า ε จะแทนด้วย a (a = absorptivity) ซึ่งเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$A = abc \qquad \text{.....(12)}$$

การจะใช้กฎของ Beer - Lambert นี้ได้มีข้อสมมุติอยู่ 3 ประการ คือ

1. แสงที่ใช้ผ่านสารจะต้องเป็น monochromatic radiation
2. ขบวนการดูดกลืนแสงของแต่ละอนุภาคนั้นไม่ขึ้นแก่กัน
3. ตลอดปริมาตรที่ใช้ถือว่าเป็นเนื้อเดียวกัน

ด้วยเหตุนี้เองกฎของ Beer นี้สามารถนำไปใช้ได้แม้จะมีสารหลายชนิดผสมกันเพราะแต่ละชนิดมีคุณสมบัติไม่ขึ้นแก่กัน ค่า absorbance หรือค่า transmittance ที่ได้ควรอยู่ในช่วง 0.2 - 0.8 หรือ 20 - 80 % T เพราะจะให้ความถูกต้องในการวิเคราะห์ดีที่สุด

สำหรับขั้นตอนในการทำการวิเคราะห์โดยใช้สเปกโตรโฟโตเมตริกเทคนิคนี้ ก่อนทำการวิเคราะห์กับสารตัวอย่าง จะต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ เสียก่อน ที่สำคัญ คือ[36]

1. เรื่องการเตรียมสารละลายตัวอย่างและการทำกราฟมาตรฐาน สารละลายที่เตรียมได้จะต้องมีความเข้มข้นพอเหมาะเพื่อให้มีข้อผิดพลาดน้อยที่สุด และเลือกใช้ตัวทำละลายให้เหมาะสม

2. การเลือกใช้สภาวะของเครื่องมือให้ถูกต้อง คือ light sourceเลือกใช้ lamp ให้ถูกและการเลือก slit ที่จะเปิดตลอดจนการ set up เครื่องให้เรียบร้อยเสียก่อน

3. การเลือกใช้ความยาวคลื่นที่จะวัดค่า absorbance ให้ถูกต้องจริง ๆ ถึงแม้ว่าจะทราบหรือไม่ทราบ ความยาวคลื่นที่จะใช้มาก่อนก็ตามจะต้องตรวจสอบก่อนเสมอ โดยต้องหาแอบซอบชันสเปกตราออกมาดูก่อน โดยวัดค่า absorbance ในช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน แล้วเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ให้ค่า absorbance ที่สูงที่สุด คือ λ max

4. ศึกษาตัวแปรค่าต่าง ๆ ที่จะทำให้ค่า absorbance ที่วัดได้เปลี่ยนไปเป็นต้นว่า

4.1 การเลือกตัวทำละลายจะมีผลมากในช่วงอุลตราไวโอเลต

4.2 pH ของสารละลาย เป็นสิ่งที่สำคัญมากอีกอย่างหนึ่งซึ่งมีผลต่อค่า absorbance หรือ แอบซอบชันสเปกตรา โดยเฉพาะการวิเคราะห์ในช่วงของวิสิเบิลหรือใช้วิธีทำให้สารที่จะวิเคราะห์เกิดสีกับ complexing agents จำเป็นจะต้องควบคุม pH ให้พอเหมาะหรืออาจจะใช้วิธีวัดค่า absorbance ที่ Isobestic point

4.3 ตัวรบกวนอื่น ๆ (interference) มีหรือไม่ เพราะสิ่งนี้มีผลต่อการวิเคราะห์มากที่สุดจึงจำเป็นต้องทราบและหาทางกำจัดเสียก่อน

4.4 อุณหภูมิจำเป็นต้องควบคุม กรณีเครื่องมืออยู่ในห้องปรับอากาศจะไม่มีปัญหา

สำหรับแล่งอินฟราเรดส่วนใหญ่จะใช้ศึกษาโครงสร้างของสาร ดังนั้นการนำอินฟราเรดสเปกโตรโฟโตเมตรีมาใช้กับเรื่องสีนั้นสามารถจะใช้ในการหาโครงสร้าง แต่ก็จะใช้ได้ดีในการ interprete กับโมเลกุลที่มีโครงสร้างไม่ยุ่งยากซับซ้อน ถ้าโมเลกุลของสีที่ใหญ่ซับซ้อนแล้วจะให้สเปกตรัมซับซ้อนและinterprete ได้ยาก[36] แต่เราก็สามารถใช้หลักการของ finger print เทคนิคมาช่วยในการวิเคราะห์ โดยศึกษาอินฟราเรดสเปกตรัมของสีมาตรฐานไว้ แล้วนำอินฟราเรดสเปกตรัมของสีที่จะวิเคราะห์มาเทียบ โดยต้องให้ตรงกันแบบลายมือจึงจะใช้ได้ แต่การวิเคราะห์สีด้วยเทคนิคนี้ไม่ค่อยดวกนัก เพราะสีที่แยกได้จากสารตัวอย่างจะต้องบริสุทธิ์พอเพียงและมีปริมาณมากพอที่จะนำมาศึกษาสเปกตรัมได้