สนุกกับ Lab by ครูชมบี

ep.13 Laboratory Thin-layer chromatography การวางแผนงาน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชมภูนุช เผื่อนพิภพ

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

ทำความรู้จักกับ Chromatography

Chromatography
(โครมาโทกราฟี)

มาจากภาษากรีก “chromatos” แปลว่า สี

ความหมายเดิมของ คือ การแยกสารผสมที่มีสี ซึ่งมาจากพืชชนิดต่างๆ

ความหมายปัจจุบัน คือ การแยกสารผสมทุกชนิด ทั้งที่มีสีและไม่มีสี

นิยมใช้ในการแยกสารผสม

ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ หรือความแท้

วิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis)

วิธี Chromatography คือ การแยกสาร หรือแยกองค์ประกอบในสารผสม (mixture)

ในการแยกจะแยกส่วนผสม 2 ส่วน/เฟส

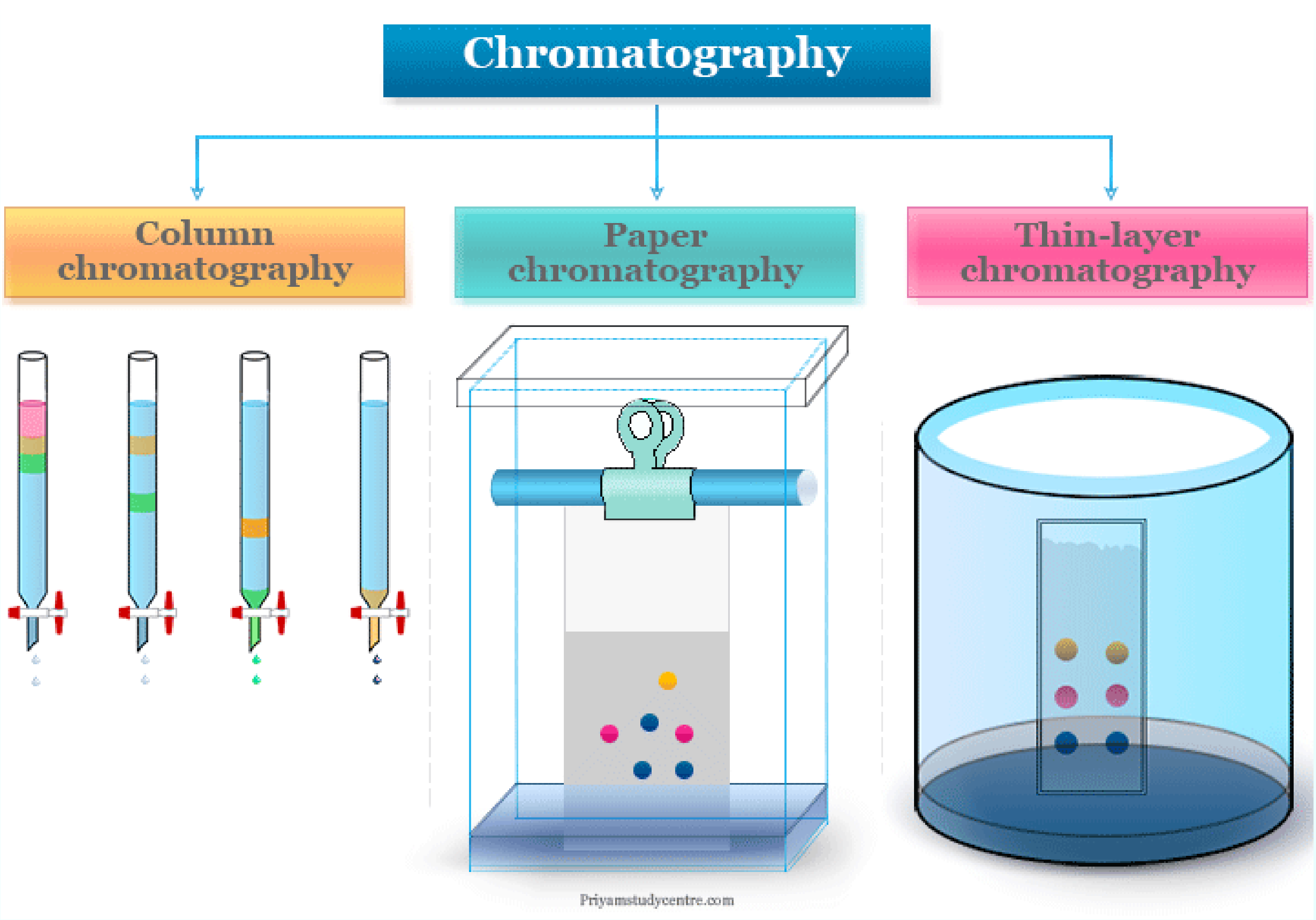
- วัฏภาคคงที่ (stationary phase)

  คือ column, plate, paper เป็นเฟสของแข็ง หรือเฟสของเหลวที่เคลือบบนพื้นผิวของเฟสของแข็ง

- วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

  คือ ของเหลว หรือแก๊สในโครมาโทกราฟี

หลักการ สารที่มีการดูดซับหรือการกระจายตัว coefficient ต่างกันจะเคลื่อนที่ได้ต่างกัน



https://www.priyamstudycentre.com/2021/11/chromatography-techniques.html

วัตถุประสงค์ในการทำ chromatography

- เพื่อแยกสารสำคัญออกจากสารผสม
- เพื่อตรวจวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารผสม

ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

- เพื่อพิสูจน์อัตลักษณ์ของสาร
- เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์/ ความแท้
- เพื่อตรวจหาสารปนเปื้อน

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

- เพื่อตรวจหาปริมาณสารสำคัญในสารผสม

กระบวนการของ Chromatography

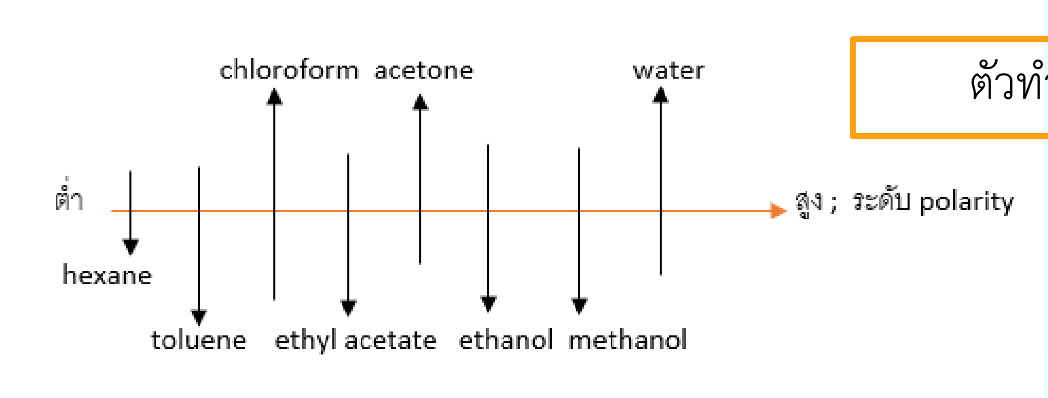
นิยมมากที่สุด

- วัฏภาคคงที่ (stationary phase)

โดยทั่วไปอยู่ในสถานะเป็นสารดูดซับ (absorbent) เช่น silica gel, aluminum, cellulose, polyamide

- วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

จะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดผสมกัน เรียกว่า ระบบตัวทำละลาย (solvent system) คือ การผสมตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดในอัตราส่วนต่างๆ



ตัวทำละลายที่ใช้จะมีความเป็นขั้วแตกต่าง

กระบวนการของโครมาโทกราฟี เกิดขึ้นได้จากสารที่ต้องการแยกมีการเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน เนื่องจาก แรง 2 ประเภท คือ

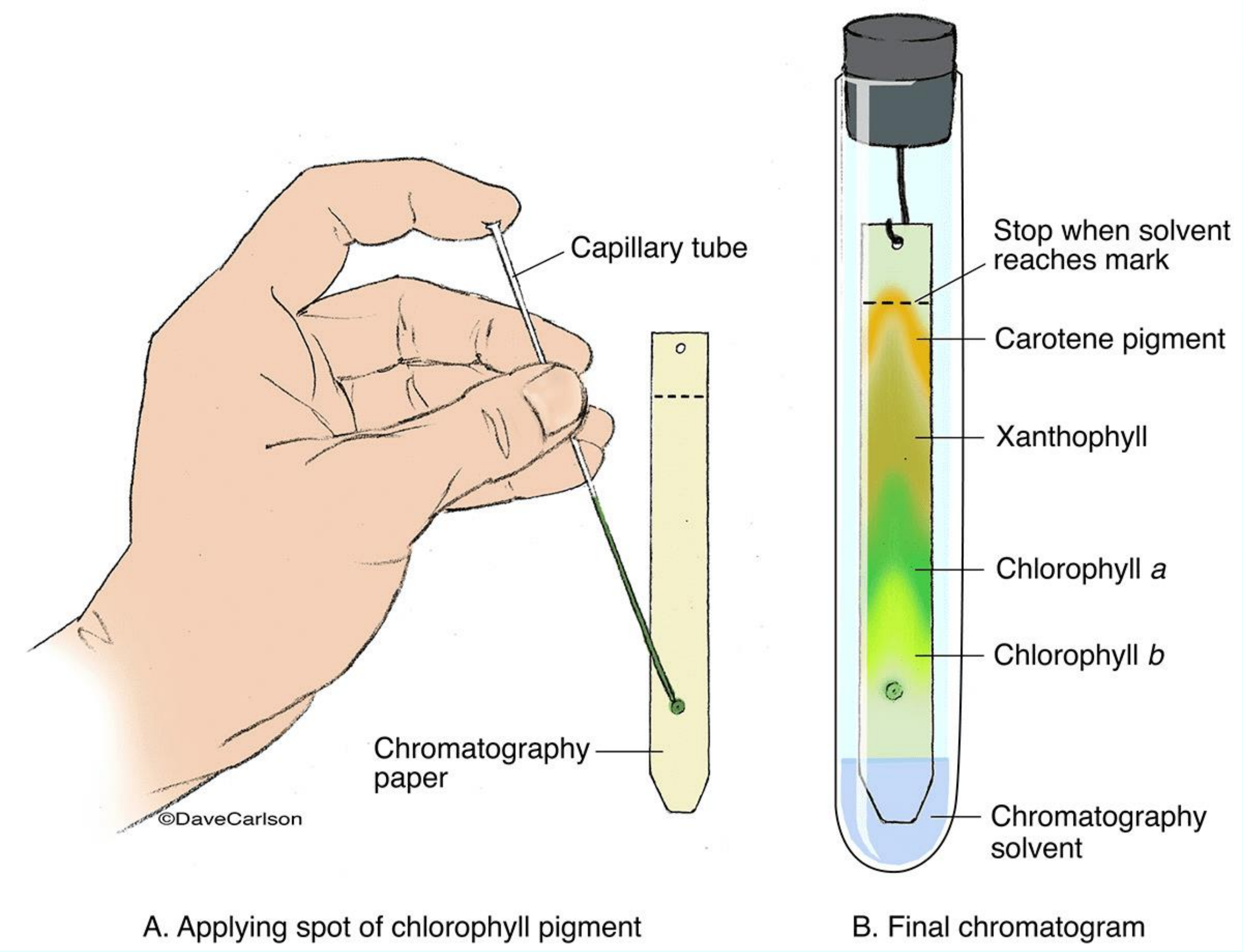
1. **แรงผลักดัน (propelling forces)** เกิดจากการไหลของ mobile phase หรือเกิดจากความสามารถในการละลายของสารใน mobile phase

2. **แรงดึง (retarding forces)** เกิดจากการดูดซับของสารบน stationary phase ด้วยแรงต่างๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน, แรงแวนเดอร์วาล เป็นต้น

ตัวดูดซับ (absorbent) ทำหน้าที่เป็น stationary phase

- TLC ตัวดูดซับจะถูกเคลือบเป็นฟิล์มบางๆ บน plate แก้ว หรือพลาสติก โดยมีแคลเซียมซัลเฟต หรือ organic polymer เป็นตัวยึดตัวดูดซับให้ติดแน่นบน plate
- Column ตัวดูดซับจะถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์
- Paper ตัวดูดซับ คือ cellulose ในกระดาษ

Paper Chromatography



https://onlineorganicchemistrytutor.com/paper-chromatography/

Adsorption (การดูดซับ)

- การดูดซับ หรือการดูดติดผิว (adsorption) เป็นกระบวนการกักสารละลาย หรือสารแขวนลอยขนาดเล็กซึ่งละลายอยู่ในน้ำ ให้อยู่บนผิวของสารอีกชนิดหนึ่ง
- adsorbent คือ สารดูดซับ หรือตัวดูดซับ
- adsorbate คือ สารที่ถูกดูดซับ หรือตัวที่ถูกดูดซับ

Absorption (การดูดซึม)

- การดูดซึม (absorption) ในทางเคมี คือ ปรากฏการณ์ หรือกระบวนการทางเคมีหรือฟิสิกส์ที่อะตอม, โมเลกุล หรือไอออนเข้าไปในส่วนที่เป็นเนื้อในของวัสดุที่เป็นแก๊ส, ของเหลว หรือของแข็ง
- absorbent คือ สารดูดซึม หรือตัวดูดซึม
- absorbate คือ สารที่ถูกดูดซึม หรือตัวที่ถูกดูดซึม

การดูดซึม (absorption) นั้นเป็นกระบวนการที่แตกต่างจากการดูดซับ (adsorption) เพราะในการดูดซึม โมเลกุลที่ถูกดูดซึมจะไปอยู่ในปริมาตรของวัสดุ ส่วนการดูดซับโมเลกุลที่ถูกดูดซับจะไปอยู่ที่ผิวของวัสดุ

อะไรคือ TLC

Thin Layer Chromatography (TLC)

โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง หรือแบบชั้นบาง

- เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ที่การแยกเกิดขึ้นบนของแข็งที่เป็นผงละเอียดแผ่กระจายเป็นชั้นบาง ของแข็งนี้คือตัวดูดซับ (adsorbent) ที่ทำหน้าที่เป็น stationary phase เคลือบอยู่บนแผ่นวัสดุ อาจเป็นแก้ว, aluminum, plastic เรียกแผ่นวัสดุเหล่านี้ว่า "TLC plate"

- เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร, ตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารประกอบ, ติดตามความคืบหน้าของปฏิกิริยา, กำหนดองค์ประกอบของตัวทำละลายสำหรับการเตรียมการแยกสาร, เป็นหลักฐานยืนยันชนิดของสาร, ตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในสารผสมได้

https://www.makingmolecules.com/blog/thin-layer-chromatography-tlc

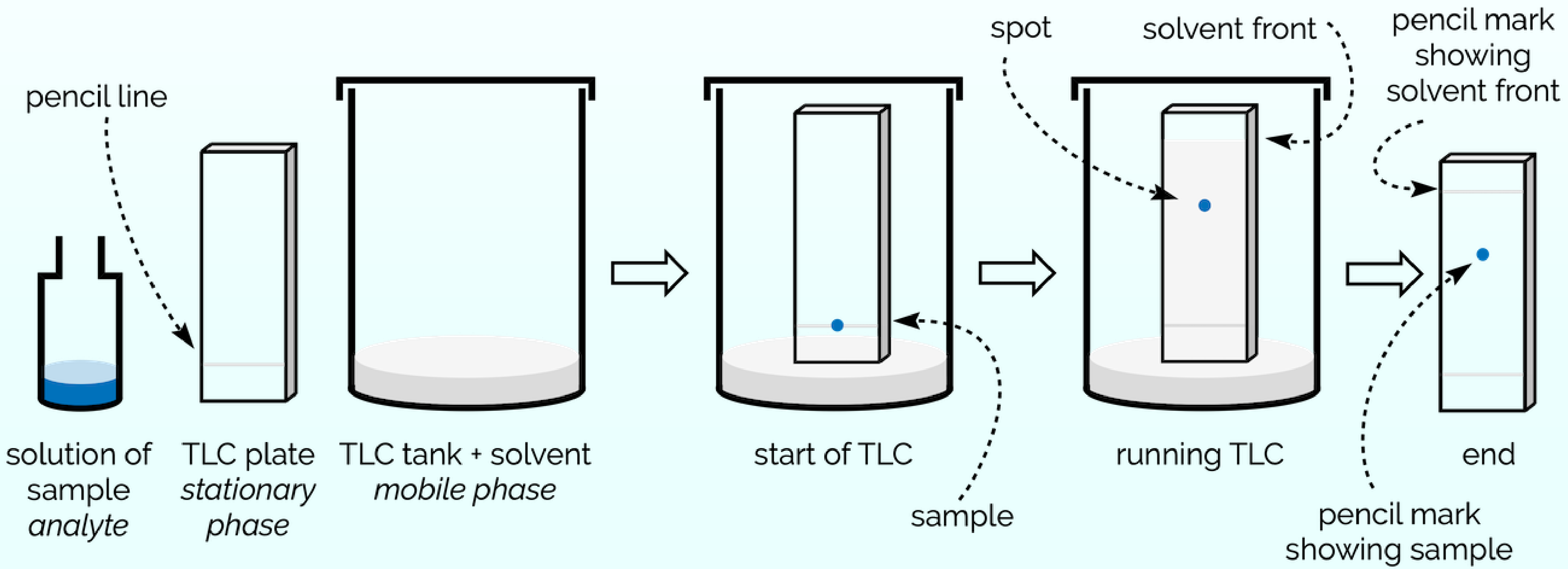
ข้อดีของเทคนิค TLC

1. ง่าย สะดวก และรวดเร็ว
2. ราคาไม่แพง ประหยัด
3. Load ได้หลายตัวอย่างต่อแผ่น (plate) จึงตรวจหาสารหลายชนิดได้ในเวลาเดียวกัน

ข้อเสีย

1. ความละเอียดไม่สูงมาก
2. ความแม่นยำ และประสิทธิภาพต่ำ
3. ไม่สามารถบอกปริมาณที่แน่นอนของสารที่แยกออกมาได้

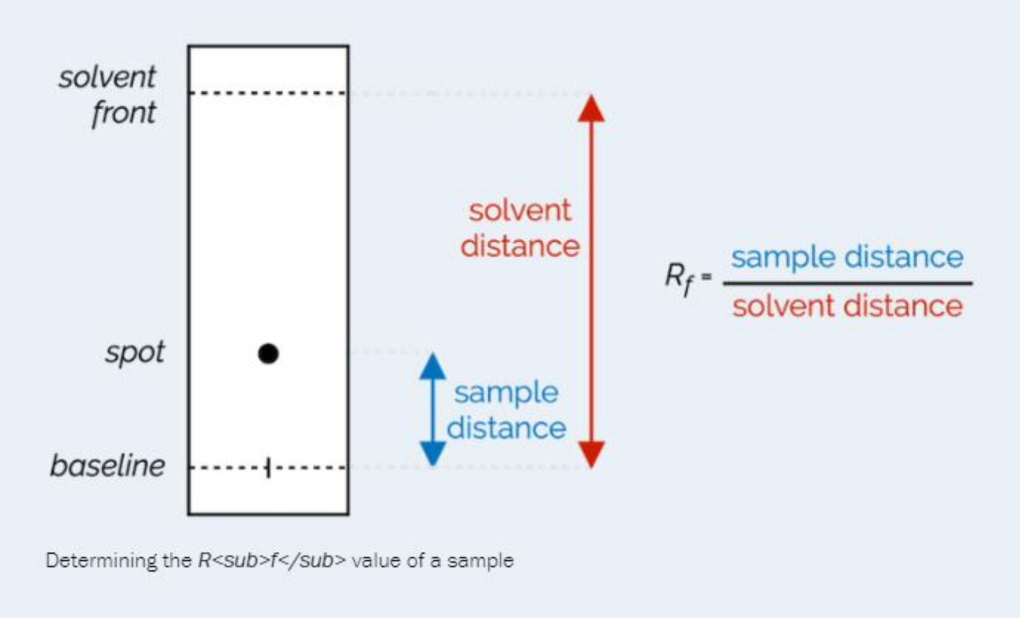
Thin Layer Chromatography (TLC)



- สารผสมที่ต้องการแยกจะถูก load บน TLC plate และให้ mobile phase เคลื่อนผ่าน โดยใน 1 TLC plate สามารถ load ได้หลายตัวอย่าง จึงหาชนิดสารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกันบน plate นี้

https://www.makingmolecules.com/blog/thin-layer-chromatography-tlc

Thin Layer Chromatography (TLC)

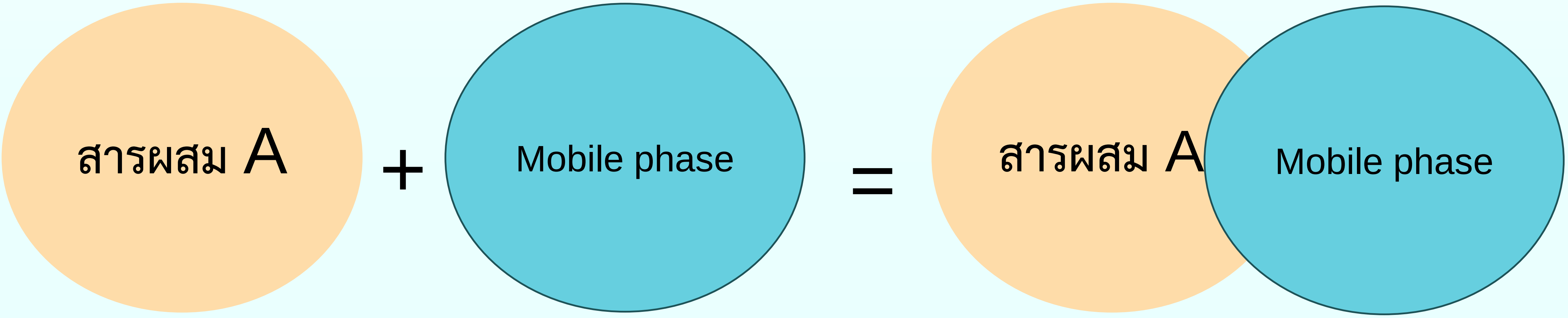


https://www.makingmolecules.com/blog/thin-layer-chromatography-tlc

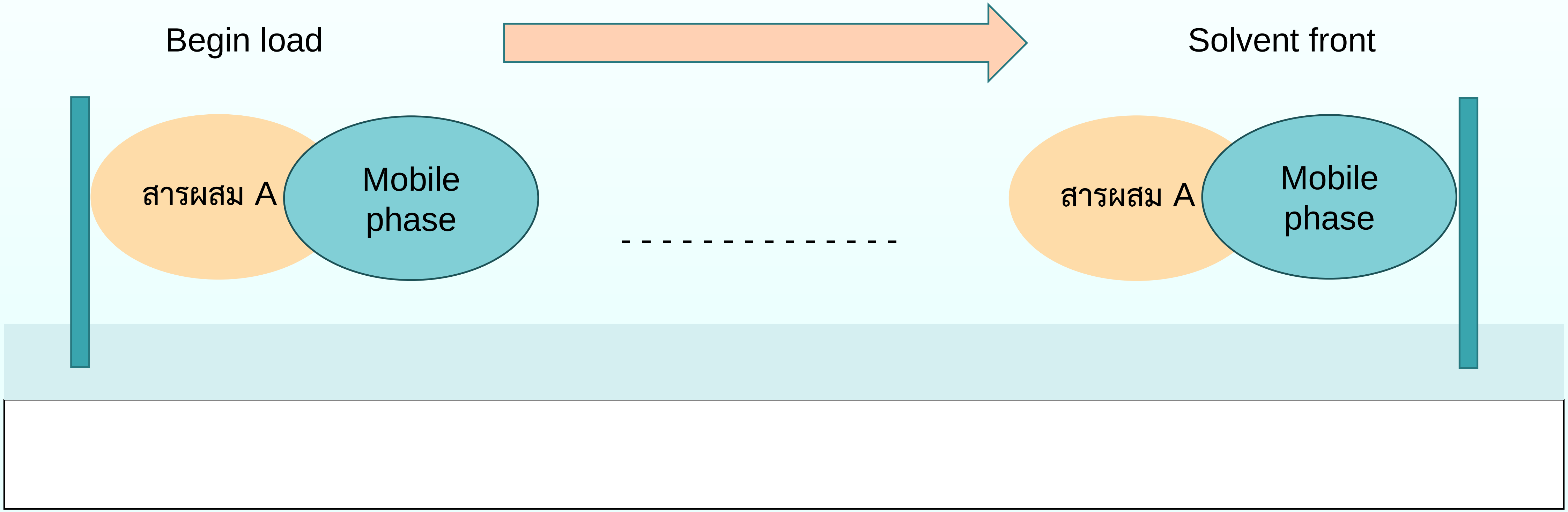
ค่า R_f เป็น อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการ spot ไปถึงตำแหน่งสุดท้ายในการเคลื่อนที่ เทียบกับระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก spotting ถึง solvent front) เนื่องจากสารต่างชนิดกันจะถูกดูดซับด้วย stationary phase ได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทำละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากัน การแยกจึงเกิดขึ้น ค่า R_f ของสารแต่ละชนิดใน stationary phase และ mobile phase หนึ่งๆ จะเป็นค่าคงที่และใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

หลักการของ TLC

mobile phase จะพาสารผสมให้เคลื่อนที่ไปตามระนาบบน stationary phase โดยการเคลื่อนที่ดังกล่าว เรียกว่า “development”



การเคลื่อนที่แบบ development

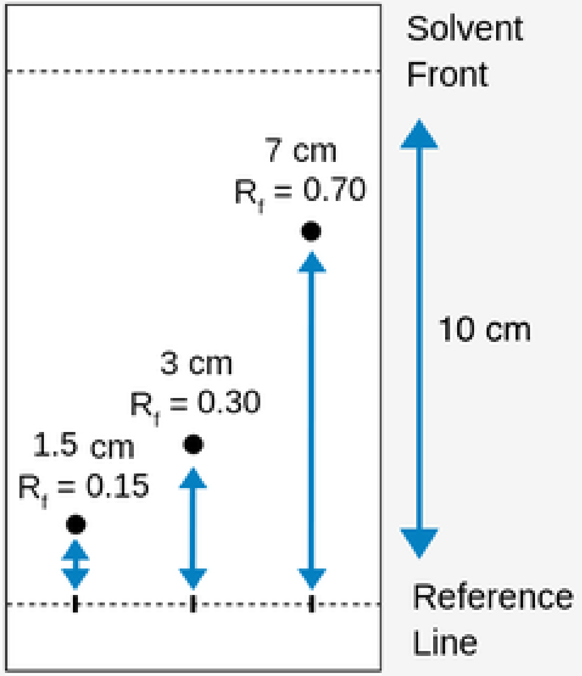


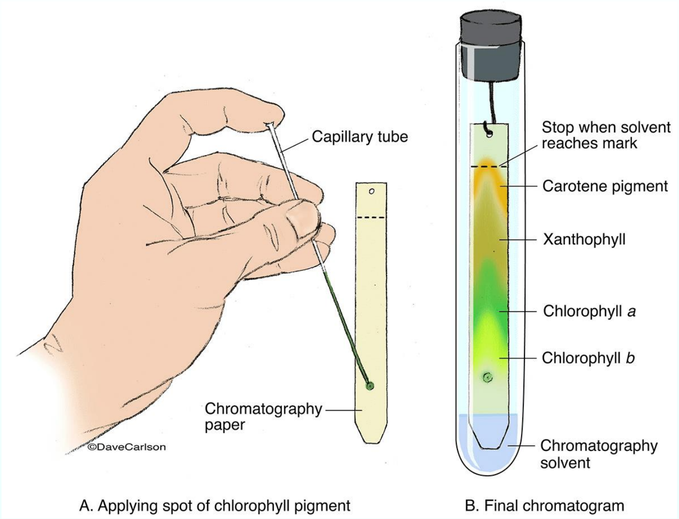
- โดยอัตราการเคลื่อนที่ไม่เท่ากันของสารชนิดต่างๆ สารจึงแยกออกจากกันเป็นจุด (●) หรือ band (▬) เรียกลักษณะนี้ว่า “chromatogram”

การคำนวณตำแหน่งของสารบน chromatogram

- R_f

$$R_f = \frac{\text{Distance travelled by the substance}}{\text{Distance travelled by the solvent front}}$$





Pigments	Theoretical Rf
Chlorophyll a	0.68
Chlorophyll b	0.54
Chlorophyll b	0.03
β-carotene	0.94
Fucoxanthine	0.51
Lutein	0.43
Neoxanthine	0.22
Violaxanthine	0.08

NA – Not appeared

https://onlineorganicchemistrytutor.com/paper-chromatography/

https://www.researchgate.net/figure/Rf-values-of-different-pigments_tbl6_275257570

ขอบคุณค่ะ