Chromatography for Biodiesel Analysis

- “โครมาโทกราฟี **(chromatography)**” มาจากภาษากรีก “chromatos” แปลว่า สี
- ความหมายเดิมของ chromatography หมายถึงการแยกของผสมที่มีสี
- ในปัจจุบันหมายถึงเทคนิคที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)
- **เฟสคงที่**อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว
  - ของแข็งการแยกจะเป็นแบบดูดซับ (adsorption)
  - ของเหลวการแยกสารจะเป็นแบบแบ่งละลาย (partition)
- **เฟสเคลื่อนที่**อาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊สทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดในสารผสมให้เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้

Chromatography แบบต่าง ๆ

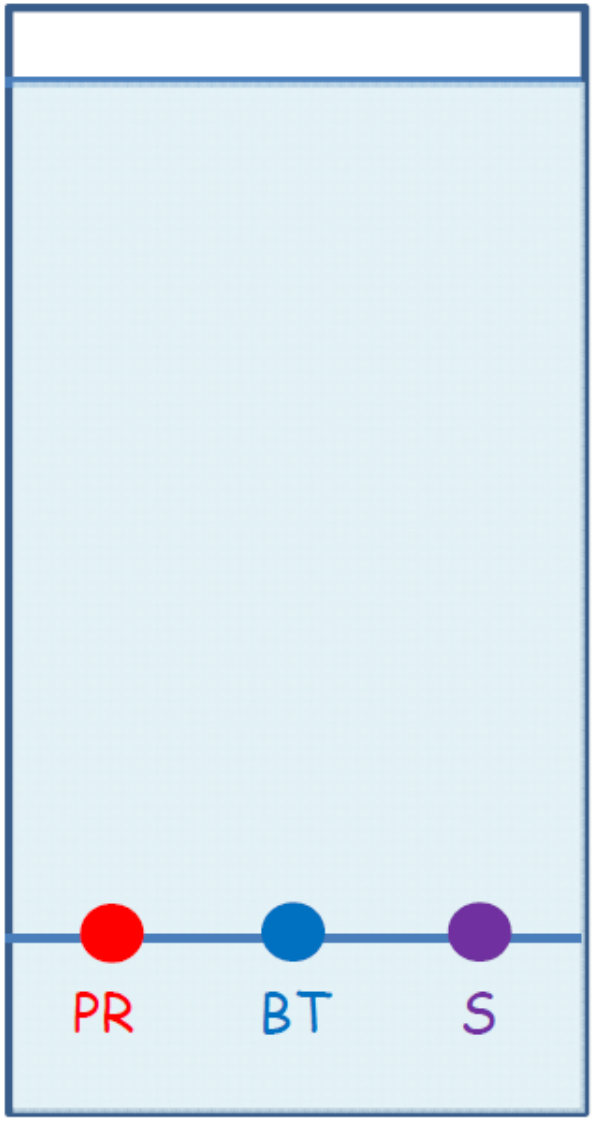
โครมาโทกราฟี	เฟสคงที่	เฟสเคลื่อนที่	หลักการทำงาน
Column Chromatography (CC)	ของแข็ง	ของเหลว	Adsorption
Thin-Layer Chromatography (TLC)	ของแข็ง	ของเหลว	Adsorption
Gas-Solid Chromatography (GC)	ของแข็ง	แก๊ส	Adsorption
Paper Chromatography	ของเหลว	ของเหลว	Partition
Gas-Liquid Chromatography	ของเหลว	แก๊ส	Partition

Process on chromatography

กระบวนการโครมาโทกราฟีเกิดขึ้นเนื่องจากสารที่ต้องการแยกมีการเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ซึ่งเนื่องมาจากแรง 2 แรง คือ

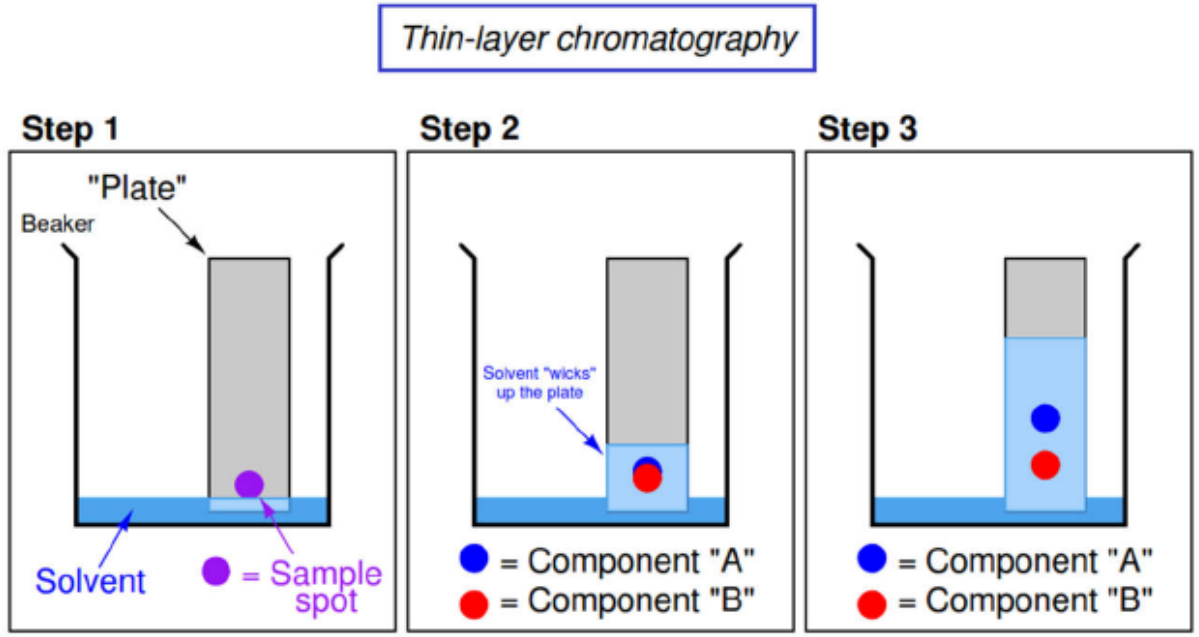
1. แรงผลักดัน (Propelling forces) เกิดเนื่องจากการไหลของตัวเฟสเคลื่อนที่หรือความสามารถในการละลายของสารในตัวเฟสเคลื่อนที่

2. แรงดึง (Retarding forces) หมายถึงแรงที่เฟสคงที่ดึงดูดสารไว้ เช่น แรงวานเดอวาลส์ แรงพันธะไฮโดรเจน เป็นต้น



Thin layer chromatography (TLC)

- เป็นโครมาโทกราฟีแบบดูดซับ Solid-liquid chromatography
- ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยเฟสคงที่ที่เป็นของแข็ง เฟสคงที่ที่นิยมใช้คือ silica gel ($SiO_2.XH_2O$) และ alumina (Al_2O_3)
- เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว



ที่มา: https://instrumentationtools.com/wp-content/uploads/2018/02/thin-layer-chromatography.png

การเลือก mobile phase

การเลือกตัวทำละลายนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการแยก เช่น

- กรณีที่สารมี polarity น้อย จะต้องใช้ developing solvent ที่ค่อนข้าง non-polar แล้วจึงเพิ่ม polarity ของตัวทำละลาย ตามความมีขั้วของสารที่ต้องการแยก

ตัวทำละลายที่ใช้กันมาก ได้แก่ (เรียงตาม polarity จากน้อยไปมาก)

ปิโตรเลียมอีเทอร์ < เฮกเซน < คาร์บอนเตตราคลอไรด์ < เบนซีน < คลอโรฟอร์ม < ไดเอทิลอีเทอร์ < เอทิลอะซิเตต < อะซีโตน < เอทานอล < เมทานอล < น้ำ

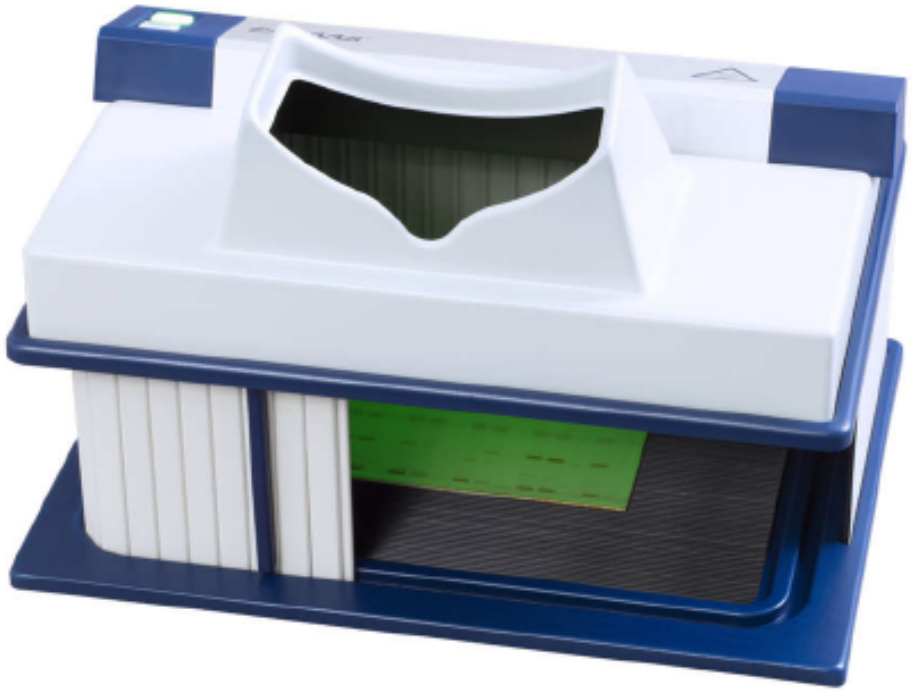
โดยปกตินิยมใช้ตัวทำละลายผสม เพื่อให้มีความสามารถในการละลายและพาสารเคลื่อนที่ได้อย่างพอเหมาะ ตัวทำละลายผสมที่นิยมใช้ เช่น Hexane/Diethyl ether, Chloroform/Methanol, Hexane/ethylacetate, Petroleum ether/Ethyl acetate/Methanol

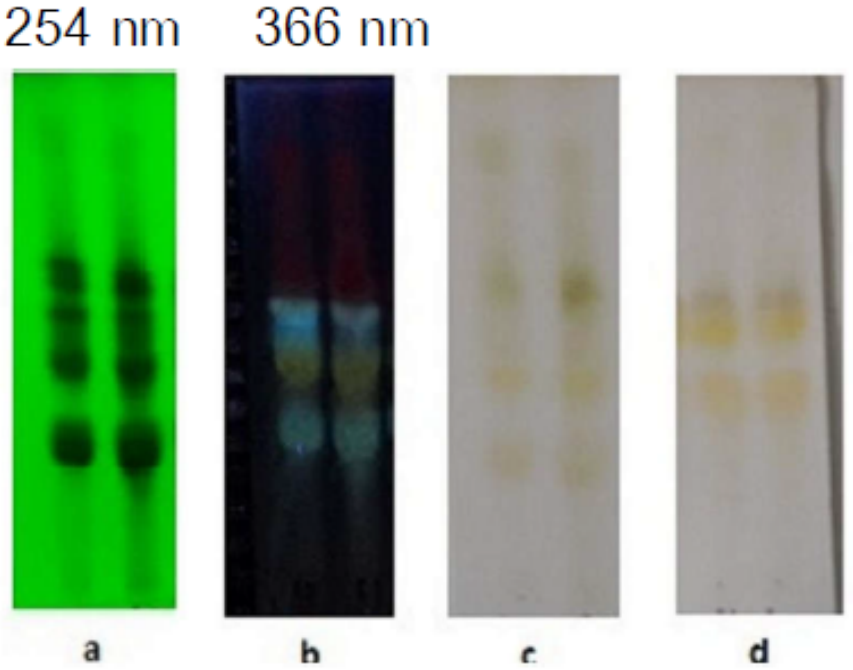
การหาตำแหน่งสารบน microplate

1. ดูจากสีของสารนั้น ๆ ที่ปรากฏให้เห็นด้วยตา

2. ในกรณีที่สารไม่มีสี การเลือกใช้เทคนิคใดนั้น ขึ้นกับสมบัติของสารที่ศึกษา เช่น

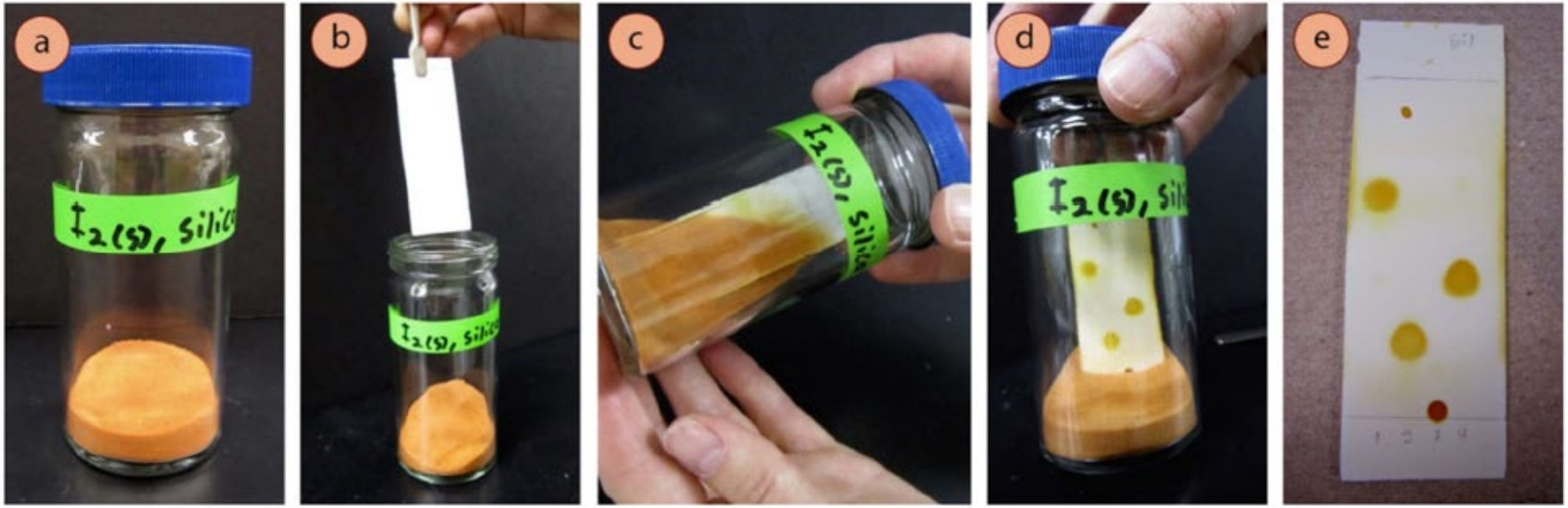
2.1 การฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ในกรณีที่สารนั้นสามารถดูดกลืนรังสี UV ได้ จะปรากฏสีภายใต้รังสี UV





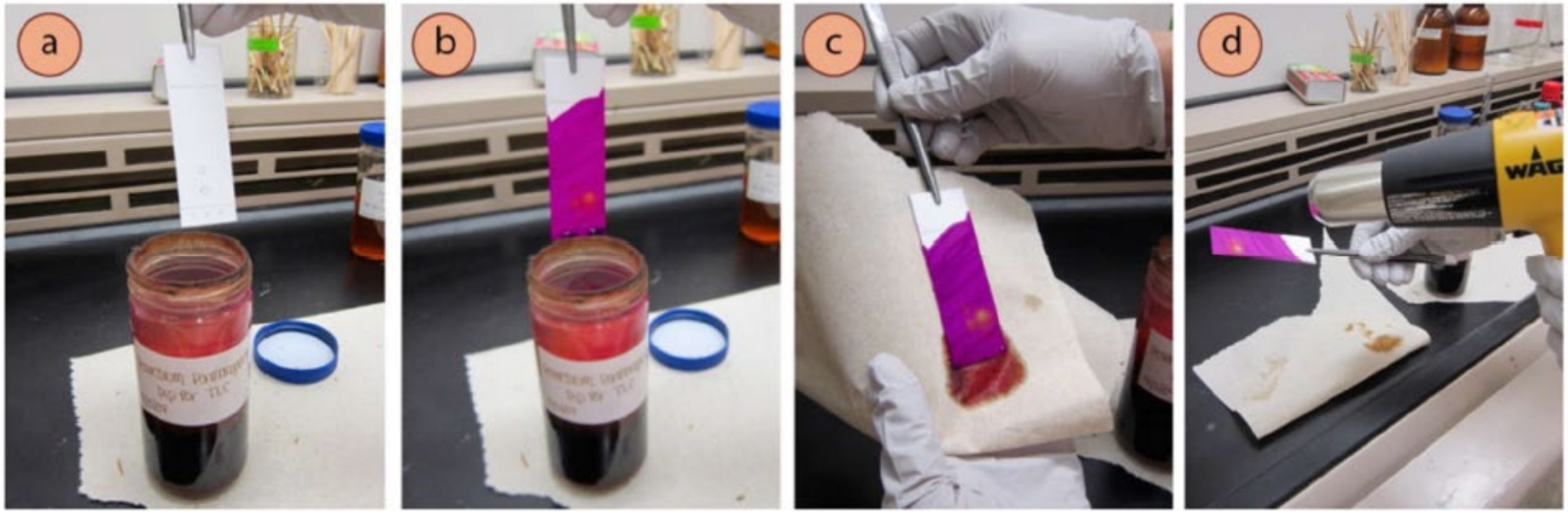
การหาตำแหน่งสารบน microplate

2.2 การนำ Chromatoplate ไปวางในภาชนะที่มีผลึก Iodine (ใช้ผลึก I_2 0.5 กรัม ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิดมิดชิด) สารอินทรีย์เกือบทุกชนิด (ยกเว้น saturated hydrocarbons และ halides) จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ Iodine เป็นสีน้ำตาลหรือสีม่วงปรากฏบน plate ชั่วคราว



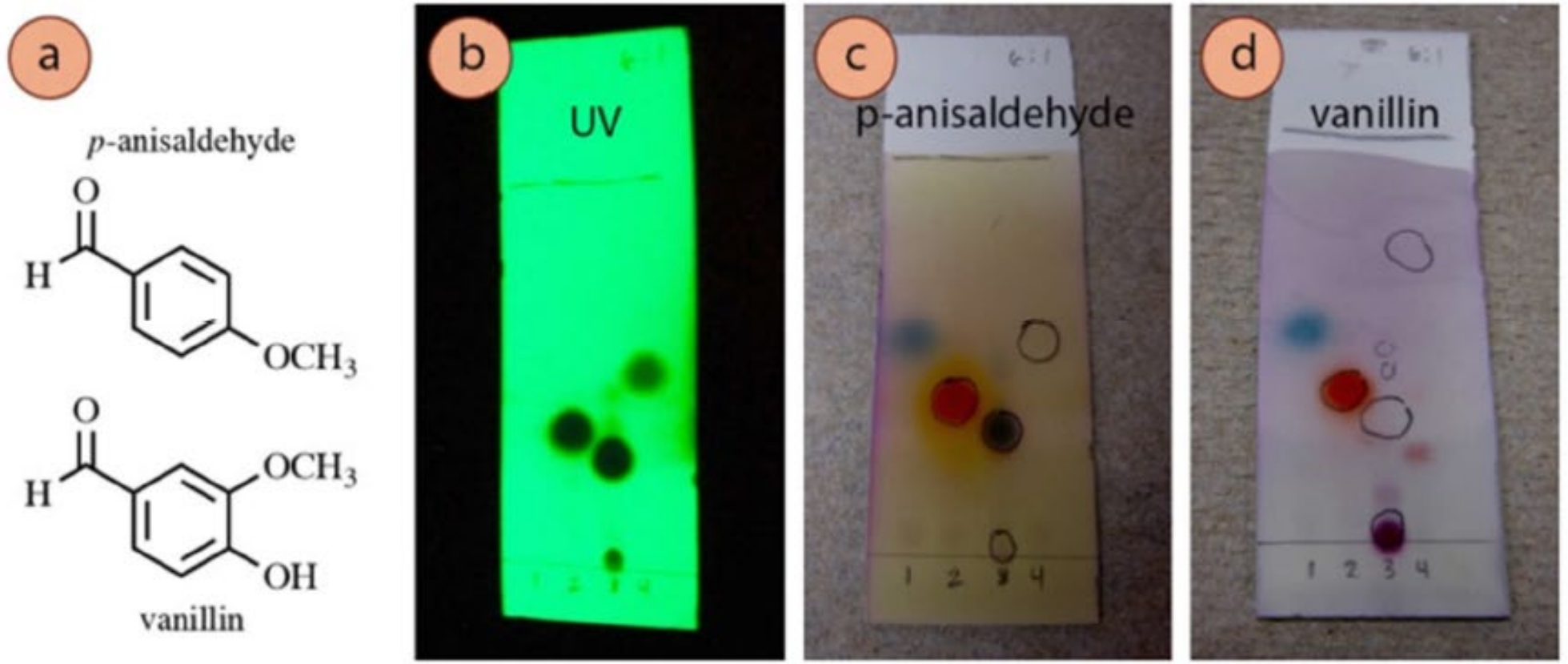
การหาตำแหน่งสารบน microplate

2.3 การพ่นด้วย developing agents อื่นๆ ที่เกิดปฏิกิริยากับสารที่จะแยกแล้วให้สีปรากฏให้เห็นโดยสามารถเลือกใช้รีเอเจนต์ได้ตามความเหมาะสม



การหาตำแหน่งสารบน microplate

2.3 การพ่นด้วย developing agents อื่นๆ ที่เกิดปฏิกิริยากับสารที่จะแยกแล้วให้สีปรากฏให้เห็นโดยสามารถเลือกใช้รีเอเจนต์ได้ตามความเหมาะสม



Determination R_f

ค่า R_f หรือค่า “rate of flow” คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

ในกรณีที่ใช้ตัวดูดซับเดียวกัน ใช้ระบบตัวทำละลายเดียวกัน
และระบบที่ศึกษาอยู่ในสภาวะ
(อุณหภูมิ, ความดัน, ความหนาของตัวดูดซับ ฯลฯ) เดียวกัน
สารหนึ่ง ๆ จะมีค่า คงที่เสมอ
การวัดเปรียบเทียบค่า จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสาร

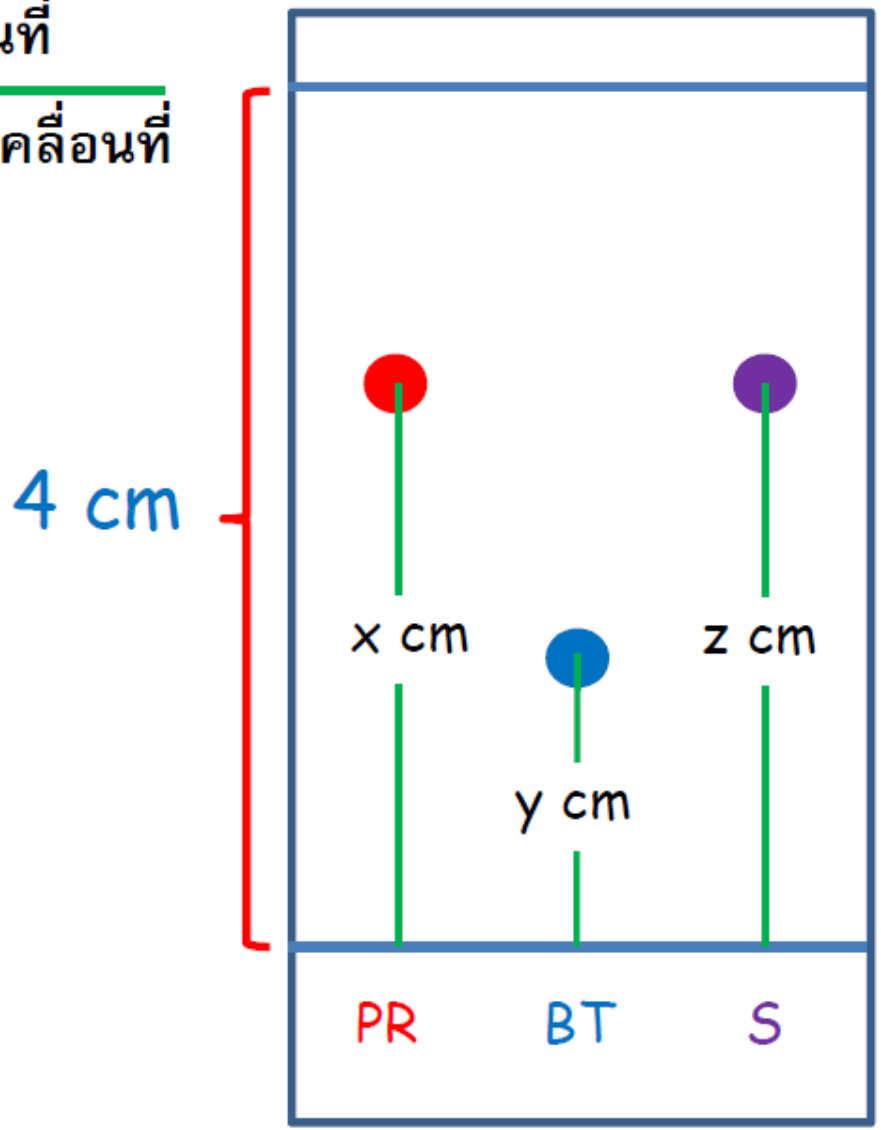
Determination R_f

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

R_f ของ PR = $\frac{x}{4}$

R_f ของ BT = $\frac{y}{4}$

R_f ของ S = $\frac{z}{4}$



Applications in organic chemistry

1) สารที่มีค่า ภายใต้สภาวะเดียวกัน ย่อมเป็นสารเดียวกัน จึงใช้พิจารณาสารที่สงสัยเทียบกับสารมาตรฐานได้

2) ตรวจสอบจำนวนสารในสารผสม โดยดูจำนวนจุดของสารบนโครมาโทแกรม

3) หาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับโครมาโทกราฟีคอลัมน์

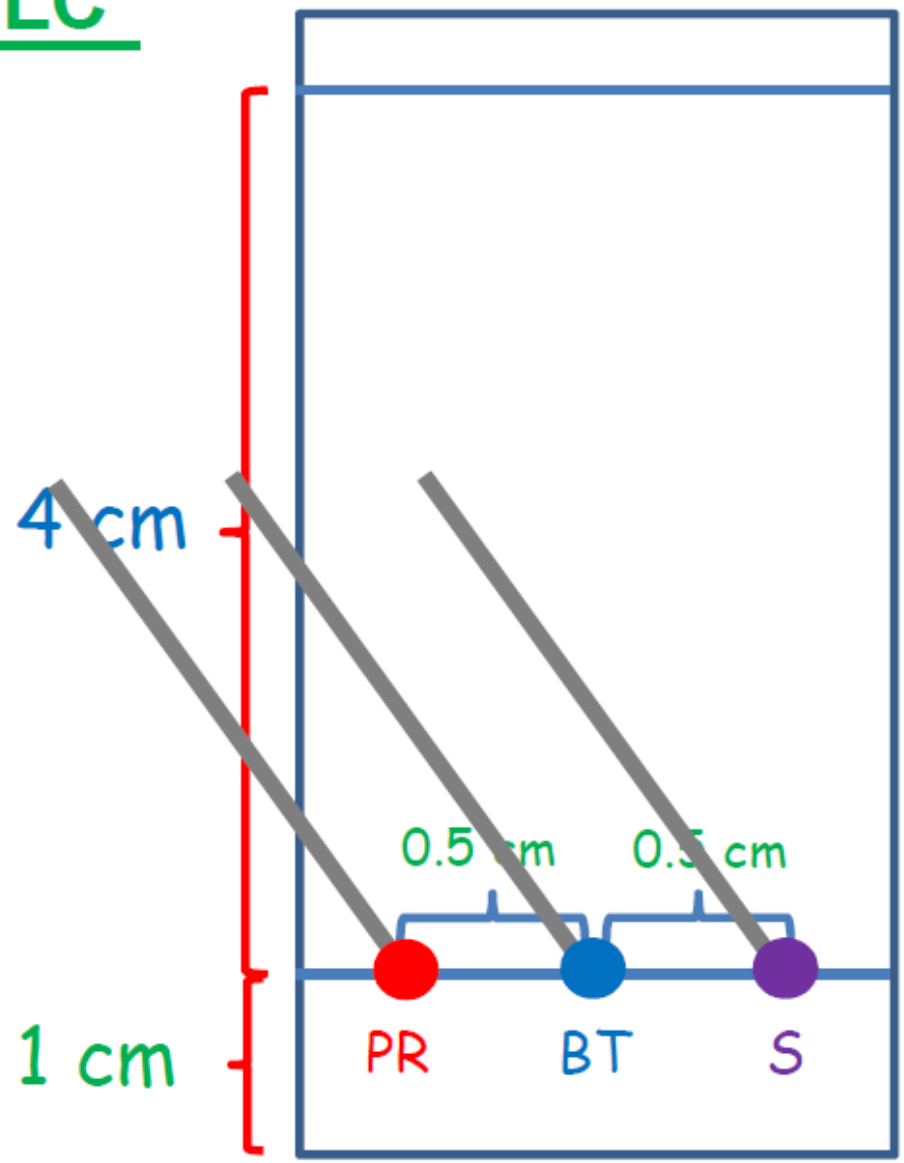
4) ติดตามสารที่แยกจากคอลัมน์ โดยเทคนิค TLC โดยเทียบค่า ของแต่ละแฟคชั่น

5) ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารซึ่งสารบริสุทธิ์ ควรจะมีจุดเดียว

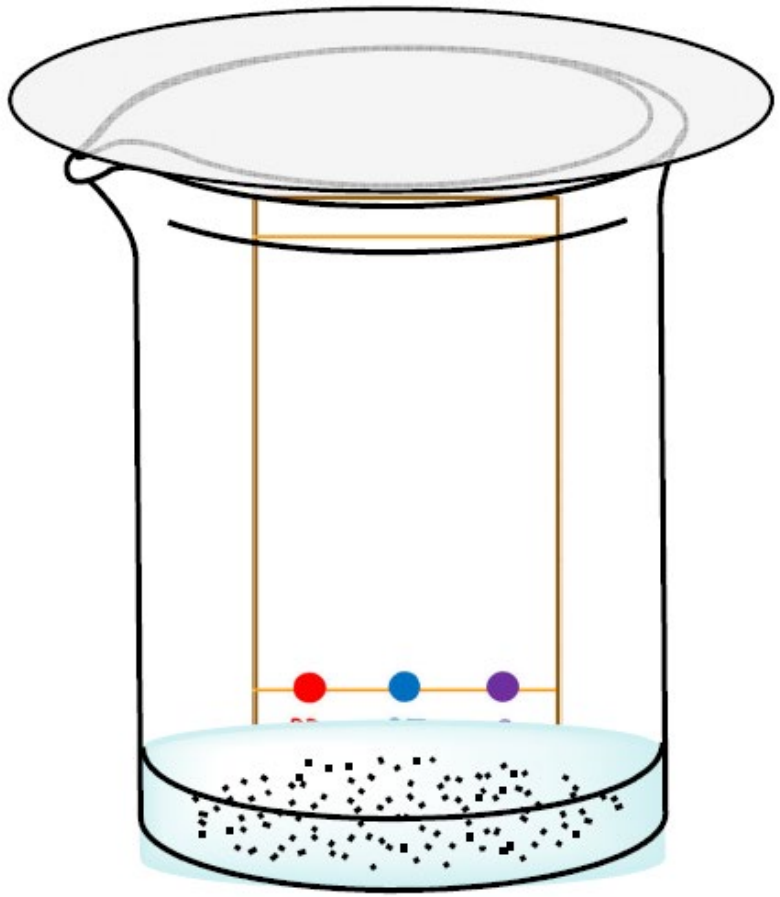
6) ใช้ติดตามการดำเนินไปของปฏิกิริยาว่าปฏิกิริยานั้นเกิดขึ้นหรือไม่ สิ้นสุดแล้วหรือยังมีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นกี่ชนิด เป็นต้น

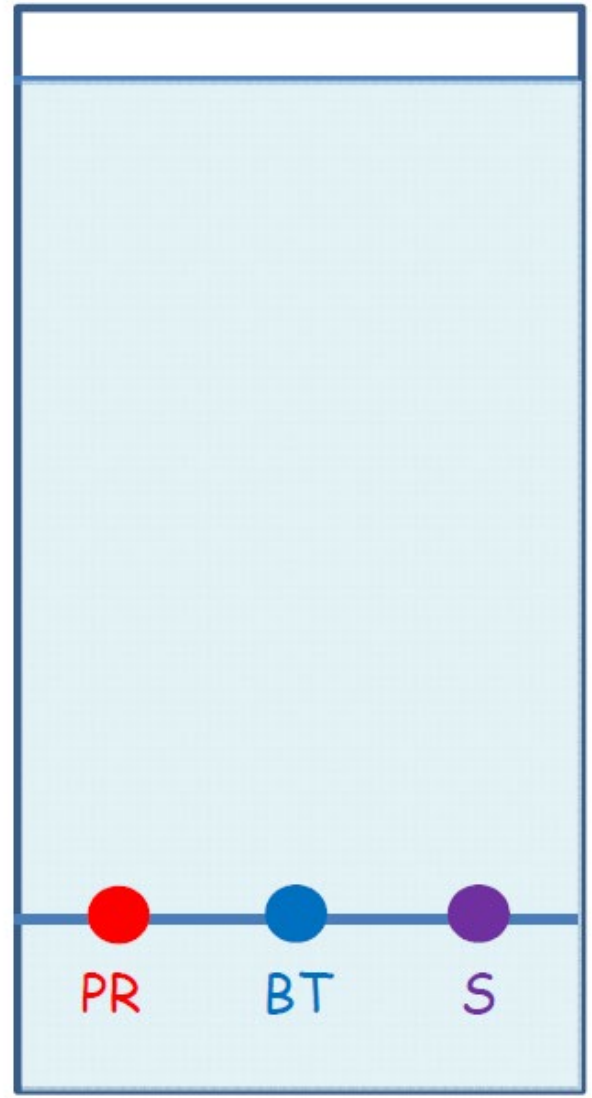
Preparation of mobile phase

การเตรียมแผ่น TLC



การแยกสาร





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

R_f ของ PR = $\frac{x}{4}$

R_f ของ BT = $\frac{y}{4}$

R_f ของ S = $\frac{z}{4}$