บทที่ 2

ทฤษฎี

(Theory)

2.1 <u>เทคนิคธินแลร์โครมาโทกราฟี</u> (Thin Layer Chromatography, TLC) (26)

<u>ประวัติของ TLC</u> เทคนิคนี้เริ่มเป็นที่รู้จักครั้งแรกในปี คศ.1938(พศ.2481) โดย N.A.Ismailov และ Sharaiber นักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซียได้นำตัวดูดซับ(adsorbent) คืออลูมินา(alumina)ผสมกับน้ำนำมาฉาบบนแผ่นกระจกเมื่อแห้งดีแล้วจึงทำการหยดสารละลายที่สกัดได้จากพืช ด้วยแอลกอฮอล์ลงบนตัวดูดซับและได้สังเกตุเห็นวงแหวนซ้อนกันหลายชั้น ซึ่งเทียบลักษณะวงแหวนนั้นได้เช่นเดียวกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี(column chromatography)

หลายปีต่อมา Martin และ Synge ได้พัฒนาวิธีการที่เขาเรียกว่าพาติชันโครมาโทกราฟี(Partition Chromatography) โดยเคลือบสเตชันนารีเฟส(stationary phase) บนโซลิตซัพพอร์ท (solid support) ที่มีลักษณะคล้ายซิลิกาเจล(silica gel) แล้วจึงนำไปใส่ลงในคอลัมน์และให้ตัวชะล้าง(eluent) เช่น พวกคลอโรฟอร์ม(chloroform) เป็นโมบายเฟสเพื่อแยกกรดอะมิโนและอนุพันธ์ และ เพื่อที่จะทำการแยกกรดอะมิโนและอนุพันธ์ในระดับปริมาณสารเป็นไมโครกรัมจึงได้นำกระดาษกรองมาใช้และถือว่าเป็น "open" column ดังนั้นหลังจากปี คศ.1944 เป็นต้นมายุคนั้นจึงได้มีการพัฒนาเปเปอร์โครมาโทกราฟี(Paper Chromatography) กันอย่างมากมาย จนถึงปี คศ.1956 ได้มีการพิมพ์เกี่ยวกับเรื่องนี้ถึงกว่าหนึ่งหมื่นฉบับ การพัฒนาเทคนิคต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่การเปลี่ยนองค์ประกอบของตัวทำละลายใหม่ๆ การเปลี่ยนแปลงแก้ไขเส้นใยเซลลูโลส(cellulose fibers) โดยเฉพาะได้พยายามทำการลด adsorption effects โดยการผลิตกระดาษใยแก้ว(glass fiber paper) ขึ้นมาใช้แทน

ในปี คศ.1950 Kirchner และ Miller ได้พยายามที่จะนำกระดาษใยแก้วที่นำไปชุบ(impregnated)ด้วยซิลิกาเจลมาใช้แต่ไม่ประสพผลสำเร็จ พวกเขาจึงได้กลับมาสนใจงานของ Meinhard และ Hall (คศ.1948) ผู้ซึ่งได้นำเทคนิคที่ถูกเรียกว่า "Surface

Chromatography" ของ Ismailov-Shraiber มาใช้ Kirchner และ Miller จึงประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรกในการแยกอนุพันธ์ของ terpene โดยเทคนิคทาง Thin Layer Chromatography

ในปี คศ.1954 Reisema ได้ใช้แผ่นกระจกที่ยาวและใหญ่ขึ้น (12.5x17.8 cm ซึ่งเดิมใช้แผ่นที่มีขนาดเดียวกันกับแผ่น slide ที่ใช้ในกล้องจุลทรรศน์) เพื่อให้สามารถทำการแยกได้มากขึ้น ถึงแม้ว่าในเวลาต่อมาได้มีการพยายามนำวิธีการ TLC นี้มาใช้ในทางปฏิบัติก็ตามแต่ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากค่า R_f ไม่แน่นอน นักวิทยาศาสตร์ในสมัยนั้นจึงเพ่งเล็งไปที่โครงสร้างของตัวดูดซับ โดยได้ทำให้ชั้นที่ฉาบบางลง และให้เม็ดซิลิกาเจลเล็กลงเรื่อยๆ จนในที่สุด ปี 1956 ก็ประสบผลสำเร็จ พิมพ์ผลงานออกมาในชื่อเรื่อง Thin Layer Chromatography แต่ไม่ได้รับความสนใจ ภายหลังจึงได้ปรับปรุงบางอย่างให้ดีขึ้น เช่น วิธีการทำชั้นที่ฉาบให้มีความสม่ำเสมอ การเลือกชนิดตัวดูดซับที่สามารถใช้ได้อย่างกว้างขวาง สำหรับวิเคราะห์สารเกือบทุกชนิดและอื่นๆ ในปี คศ.1954 ในงานนิทรรศการ Alcheme ห้องปฏิบัติการของบริษัทอุตสาหกรรมใหญ่แห่งหนึ่ง ทางภาคใต้ของเยอรมันและสวิสได้นำวิธีการใหม่นี้ออกแสดง สามารถแสดงให้เห็นถึงวิธีการทางโครมาโทกราฟีที่ประหยัดเวลาได้ ตั้งแต่นั้นมาการพัฒนาเทคนิคต่างๆ ของ TLC และการนำเทคนิคชนิดนี้ไปใช้จึงเริ่มมีขึ้นทั้งทางยุโรปตะวันตก และ ยุโรปตะวันออก

2.1.1 <u>ตัวดูดซับของ TLC</u>

สารที่ใช้เป็นตัวดูดซับของ TLC สามารถหาได้ง่ายกว่าสารที่ใช้เป็นตัวดูดซับของคอลัมน์โครมาโทกราฟี อีกทั้งยังมีความแตกต่างกันในลักษณะโครงสร้างเม็ดละเอียด (fine-grained structure) อีกด้วย

ในการเลือกใช้เม็ดละเอียดนั้น ต้องพิจารณาเทคนิคการเตรียม และ migration time โดยปกติขนาดเม็ด(grain size)ของตัวดูดซับอยู่ในระหว่าง 5-50 um เพื่อให้ได้การแยกที่เหมือนเดิมทุกครั้งจึงต้องรักษามาตรฐานของตัวดูดซับให้เหมือนกันทุกครั้งในการผลิต ในการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมนั้นต้องค่อยๆ เพิ่ม องค์ประกอบของส่วนผสมลงไปถึงจุดที่เรียกว่า"critical pairs" ตัวดูดซับที่มีรูพรุนนั้นสามารถวัดความแตกต่างได้จาก เส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุน(°A) ปริมาตรของรูพรุน(cm^3/g) พื้นที่ผิว(m^2/g) และ ความถ่วงจำเพาะ(g/cm^3) ค่าอื่นๆ ที่ต้องมีคือ ค่า pH เมื่อตัวดูดซับผสมกับน้ำ (10% adsorbent) ค่าความบริสุทธิ์ของตัวดูดซับ ปริมาณของสิ่งเจือปนทั้งชนิดสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่ปนลงไป

ในระหว่างการผลิตและไม่สามารถแยกออกได้

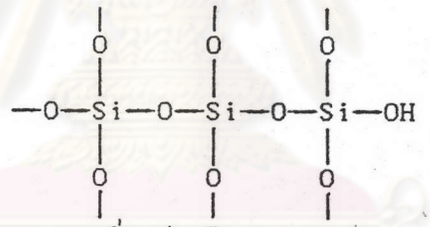
ชนิดของตัวดูดซับ

ตัวดูดซับของ TLC สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1.1.1 ตัวดูดซับชนิดสารอนินทรีย์ ได้แก่

ก. ซิลิกาเจล (Silica Gel)

ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับที่ใช้มากที่สุดใน TLC ซิลิกาเจลเป็นสารที่มีรูพรุนและเป็นอสัณฐาน(amorphous) ซิลิกาเจลเตรียมจากการไฮโดรลิสิส(hydrolysis) ของโซเดียมซิลิเกต(sodium silicate) ไปเป็น polysilicic acid ผ่านกระบวนการควบแน่น(condenzation) และพอลิเมอไรเซชัน(polymerization) โดยแรกเริ่มเกิดเป็นไมเซล(micelle)ก่อนแล้ว จึงก่อรูปเป็นเจล(gel) ลักษณะพื้นฐานของ polysilicic gel จะเป็นรูปทรงเตตระฮีดรอน(tetrahedral) โดยอะตอมของออกซิเจนจะอยู่รอบๆ อะตอมของซิลิกอนแต่ละอะตอม โดยเป็นหมู่ siloxane หรือ Si-O-Si bridges โดยที่มีกลุ่ม Si-OH อยู่ที่ตรงปลาย ดังรูป(27)



กลุ่ม Si-OH ซึ่งอยู่บนผิวของ framework สามารถทำปฏิกิริยาได้หลายอย่าง เช่น

$$SiOH + ClSi(CH_3)_3 \longrightarrow SiOSi(CH_3)_3 + HCl$$

ปฏิกิริยาที่ปลายซึ่งเดิมเป็น hydrophillic จะกลายเป็น hydrophobic ทำให้เปลี่ยนคุณสมบัติของประจุที่ผิวของซิลิกาเจลไป

$$SiOH + CH_2N_2 \longrightarrow SiOCH_3 + N_2$$

และปฏิกิริยาของ Si-OH เมื่ออยู่ในน้ำจะเกิดการแตกตัว(dissociate) ดังสมการ

$$SiOH \rightleftharpoons SiO^- + H^+$$

ซึ่งมีค่าคงที่ของการแตกตัวในระดับ $10^{-6} - 10^{-8}$

และน้ำซึ่งจะระเหยออกไปเมื่อซิลิกาเจลถูกความร้อน ก็สามารถกลับมาเป็นสภาพเดิมได้ เมื่อซิลิกาเจลนั้นถูกน้ำ

$$Si\text{-}O\text{-}Si + H_2O \rightleftharpoons 2\ SiOH$$

หรืออาจเกิดการรวมตัว(associate) ที่ผิวของหมู่ SiOH

$$SiOH\cdots\cdots OH_2$$

ตัวดูดซับซิลิกาเจลที่ใช้สำหรับ TLC นั้นมีทั้งชนิดที่ผสมและไม่ผสมตัวยึดเกาะ(binder)ลงไป และตัวยึดเกาะที่ผสมลงไปในซิลิกาเจลอาจเป็น ยิปซั่ม (gypsum, plaster of Paris) ซึ่งมีชื่อเรียกทางเคมีว่า แคลเซียมซัลเฟต เฮมิไฮเดรต ($CaSO_4 \cdot {}^1/_2H_2O$) หรือ แป้ง(starch) อย่างใดอย่างหนึ่ง

ยูวี อินดิเคเตอร์ ที่เติมลงไปผสมซิลิกาเจลด้วยนั้นใช้ Sodium Fluorescein เมื่อใช้กับแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือเกลือโซเดียมของกรด hydroxy-purene-sulfonic เมื่อใช้กับแสงยูวี ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ข. <u>อลูมินา</u> (Alumina)

อลูมินา หรือ Aluminium(Oxide) Hydroxide นั้นมีทั้งชนิดเป็นกรด เบส หรือกลาง พบว่าลักษณะโครงสร้างที่ผิวของอลูมินานั้นทุกๆ อะตอมของอลูมิเนียมจะล้อมรอบด้วยอะตอมของออกซิเจนอยู่ 6อะตอม โดยมีโมเลกุลของน้ำเกิดพันธะไฮโดรเจนกับอะตอมของออกซิเจน

อลูมินาที่เหมาะสมสำหรับใช้ใน TLC เป็น Aluminium oxide ซึ่งเตรียมจากแร่ bohmite ที่มีในธรรมชาติ มีพื้นที่ผิวระหว่าง 100-250 m^2/g และมี ขนาดเม็ดเล็กกว่า 60 μm ตัวยึดเกาะที่ใช้ผสมกับอลูมินานั้นใช้ยิปซั่มเช่นเดียวกับซิลิกาเจล ส่วนยูวีอินดิเคเตอร์ที่ผสมในอลูมินาก็เช่นเดียวกันกับของซิลิกาเจล

ค่า pH ของอลูมินาที่เป็นเบส มีค่าประมาณ 9 pH ของอลูมินาที่เป็นกรดมีค่าประมาณ 4

อลูมินาที่ไม่มีตัวยึดเกาะผสม จะมีการละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วได้น้อย

ค. <u>Keiselguhr</u>

Keiselguhr เป็นที่รู้จักกันดีในชื่อของ diatomaceous earth ประกอบไปด้วย ซากที่เป็นโครงสร้างซิลิกาที่แข็งของสัตว์น้ำเล็กๆ ในทะเลที่เรียกว่า ไดอะตอม (diatom) diatomite นั้นมีอยู่ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของโลกมีลักษณะโครงสร้างที่เป็นรูพรุนแข็งและมีพื้นที่ผิวมาก สามารถนำมาใช้ได้โดยไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพมักใช้เป็นตัวช่วยกรอง(filter aid) ในห้องปฏิบัติการทดลอง ในโรงงานอุตสาหกรรม และใช้

017589

ในการกรองน้ำ เมื่อนำมาใช้ใน TLC ต้องทำการปรับปรุงคุณภาพก่อน ในโครมาโทกราฟีทั่วไป นิยมนำมาใช้เป็นโซลิตซัพพอร์ท สำหรับการแยกสารโดยเทคนิคพาติชันโครมาโทกราฟี

. องค์ประกอบหลักใน Keiselguhr คือ SiO_2 ซึ่งมีอยู่ประมาณ 90% นอกนั้นมีอยู่ในปริมาณน้อยได้แก่ Al_2O_3, Fe_2O_3, TiO_2, CaO, MgO และ alkali oxides (เช่น Na_2O)

Keiselguhr ที่ใช้ใน TLC มีขนาดเม็ดเล็กกว่า 60 um และผสมยิปซั่มเป็นตัวยึดเกาะ

ง. <u>ตัวดูดซับอนินทรีย์ชนิดอื่นๆ</u> ได้แก่

พวกซิลิเกต (silicates) เช่น แมกนีเซียมซิลิเกต(magnesium silicate) เป็นที่รู้จักได้แก่ Florisil และ Talc และแคลเซียมซิลิเกต(calcium silicate) ซิลิเกตทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นเบส

พวกฟอสเฟตได้แก่ไตรแคลเซียมฟอสเฟต(tricalcium phosphate)

แคลเซียมซัลเฟต หรือยิปซั่ม ใช้ในการแยกสารอาหารบางอย่างทางชีว-วิทยา เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดไขมัน และ กลีเซอไรด์(glyceride)

Glass powder ใช้ในการแยกพวก wax

2.1.1.2 <u>ตัวดูดซับชนิดสารอินทรีย์</u> ได้แก่

ก. <u>เซลลูโลสและอนุพันธ์</u>(Cellulose and its derivatives)

เซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างของกระดาษนั้นมีลักษณะเป็นเส้นใย(fibrous) ที่เชื่อมกันเป็น network มีช่องว่างขนาดใหญ่ เมื่อนำไปใช้ในโครมาโทกราฟีทำให้เกิดการแพร่กระจายของสารมาก ดังนั้นจึงมีการนำผงเซลลูโลส(Cellulose Powder) ซึ่งมีช่องว่างเล็กกว่าเมื่อเกาะรวมกันมาใช้ ผงเซลลูโลสมีหลายชนิด ได้แก่

1. <u>ผงเซลลูโลสชนิดธรรมดา(Normal Cellulose Powder)</u>

เซลลูโลสประกอบด้วย หน่วยของเซลโลไบโอส (cellobiose) หลายหน่วย ต่อกันโดยพันธะ β-1,4-glycosidic bond เซลลูโลสเหมาะสำหรับใช้ในการแยกสารประกอบพวกชอบน้ำ (hydrophilic) เซลลูโลสสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน กับแอลกอฮอล์และน้ำได้ เซลลูโลสที่ใช้ใน TLC แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

- เส้นใยเซลลูโลส (fibrous cellulose) ที่มีในธรรมชาติ เตรียมได้โดยวิธีการตามปกติในโรงงานผลิตฝ้าย มีค่า degree of polymerization

ของผงเซลลูโลสตามธรรมชาติ (MN300) อยู่ในช่วง 400-500 ความยาวของเส้นใยของ MN300 อยู่ในช่วงระหว่าง 2-20 μm และมีพื้นที่ผิว 15000 cm^2/g และเมื่อผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพแล้วจะทำให้มีความบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ มีชื่อเรียกใหม่ว่า Cellulose powder MN300 HR การเกาะยึด (adhesion) ของเซลลูโลสนั้นมีมากยิ่งกว่าตัวดูดซับอนินทรีย์ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติม additive เช่น ยิปซั่มลงไป แต่ถ้ามีการเติมยิปซั่มลงไปจะทำให้มีผลต่อการแยกอีกด้วย

- "microcrystalline" Cellulose เตรียมได้จากการไฮโดรลิสิสของเซลลูโลสบริสุทธิ์ มีค่า degree of polymerization 40-200 ขนาดเม็ด 19-38 μm มีชื่อทางการค้าว่า"Avicel" เซลลูโลสประเภทนี้มีความบริสุทธิ์สูงกว่าเส้นใยเซลลูโลสที่มีในธรรมชาติ แต่มีสิ่งเจือปนประเภท ninhydrin-positive มากกว่า

2. Acetylated Cellulose Powder

ใช้เป็น reversed-phase chromatography โดยการทำ acetylation ให้มีหมู่ acetyl แทนที่หมู่ hydroxy ของหน่วย เซลลูโลส ปริมาณของการ acetylation มีค่าตั้งแต่ 2-3% ถึง 44.8% การเพิ่มหมู่ acetyl ให้มากขึ้นจะเป็นการเพิ่มการไม่ชอบน้ำ(hydrophobic) ให้แก่ผงเซลลูโลส ดังนั้น ตัวดูดซับประเภทนี้ จึงเหมาะสำหรับใช้ในการแยกสารประเภทชอบไขมัน(lipophillic)

3. Cellulose Ion-Exchange Powder หรือ Cellulose Exchanger

มีโครงสร้างที่เป็นเส้นใยมีพื้นที่ผิว และมีความจุมากจนโมเลกุลของ สารประกอบประเภทชอบไขมัน(lipophillic) ขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน สามารถแพร่ผ่านเข้าไปใน matrix นี้ได้ ด้วยคุณสมบัติชอบน้ำ(hydrophilic) ของเซลลูโลส ซึ่งแตกต่างจาก resin exchanger สังเคราะห์ ทำให้ cellulose ion-exchanger มีความสำคัญที่ใช้ในการแยก และทำสารทางชีวเคมีให้บริสุทธิ์ Cellulose ion-exchanger powder เหล่านี้ ได้แก่ Diethylaminoethyl-cellulose(DEAE), Aminoethyl-cellulose (AE), Polyethyleneimine-impregnated cellulose (PEI), Polyphosphate-impregnated cellulose(Poly-P) เป็นต้น

ข. แป้ง (Starch)

เป็นอีกรูปหนึ่งของโพลีแซคคาไรด์(polysaccharide) ซึ่งเป็นผลรวม

ของหน่วยมอลโทส (maltose) หลายๆ หน่วยมารวมกัน ใช้ในการแยกสารประเภทชอบน้ำ(hydrophilic)เหมือนเซลลูโลส สามารถทำเป็น reverse-phase chromatography ได้โดยการทำ impregnate ด้วยน้ำมันพาราฟิน น้ำมันจากพืช และ dimethylformamide

ค. ตัวดูดซับอินทรีย์ชนิดอื่นๆ

เช่น ซูโครส(sucrose) และแมนิทอล(manitol) ใช้ในการแยกเม็ดสีพวกคลอโรพลาสท์(chloroplast) Dextran gels (Sephadex Superfine) ในการแยกโมเลกุลใหญ่ (macromoleculles) เช่น เพพไทด์ เอนไซม์ ฮอร์โมน และอื่นๆ

2.1.1.3 ตัวดูดซับโพลีเอไมด์(Polyamide)

สารพวกโพลีเอไมด์บางประเภท เช่น polycaprolactam . และ Nylon 6,6 (polyhexamethylenediaminoadipate) สามารถนำมาทำเป็นตัวดูดซับสำหรับ TLC เพื่อใช้ในการแยกสารพวกฟีนอล(phenols) เนื่องจากสารพวกนี้สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซี(hydroxy group)ของฟีนอล พันธะเหล่านี้ไม่แข็งแรงและสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้(reversible) โมเลกุลของตัวถูกละลายสามารถถูกแทนที่โดยการชะตัวทำละลายที่มีพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงกว่าออกไปได้ ตัวทำละลายเหล่านี้เรียงตามลำดับ ความสามารถการคาย(desorption)ได้แก่ dimethylformamide > formamide > acetone > methanol > น้ำ

2.1.1.4 การ modify ตัวดูดซับ โดยวิธีการ Impregnetion

วิธีการนี้เป็นการเปลี่ยนคุณสมบัติที่ผิวของตัวดูดซับ ทำให้ความมีขั้วที่ผิวของตัวดูดซับเปลี่ยนไปสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. การ Impregnation ก่อนการฉาบตัวดูดซับ แทนที่ตัวดูดซับจะถูกนำไปผสมกับน้ำ จะใช้สารละลายของ กรด เบส หรือ เกลือของสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำแทนแล้วจึงนำไปฉาบบนแผ่น

2. การ Impregnation ของตัวดูดซับ TLC ที่ถูกฉาบบนแผ่นแก้ว ทำโดยการจุ่ม หรือพ่นแผ่น TLC ที่เคลือบแล้วนั้นด้วย 5-10% ของสารที่เคลือบซึ่งไม่ละลายในตัวทำละลายที่ใช้ หรือ ทำ ascending development ในสารละลายของสารเคลือบ แล้วทำให้แห้ง

ชนิดของสารที่ทำ Impregnation

- สารอนินทรีย์ ได้แก่ สารละลายของกรดออกซาลิก โพแทสเซียม-

ไฮดรอกไซด์ เงินไนเตรต สารละลายบัฟเฟอร์(buffer) ของตัวทำละลายชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ เป็นต้น

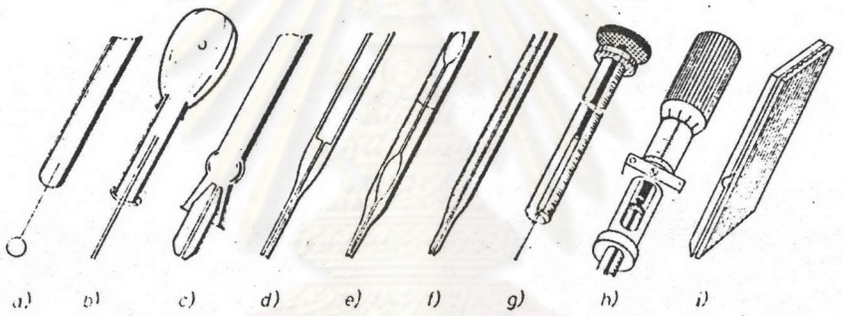
- สารอินทรีย์ ได้แก่ Undecane, Squalane, Polyethylene glycol, DMSO และอื่นๆ เป็นต้น

2.1.2 <u>การใส่สารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC</u> (Sample Application) (28)

สารละลายส่วนใหญ่ที่ใส่ลงบนแผ่น TLC มีความเข้มข้น 0.1-1% ใช้ปริมาตร 1-20 µL และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของจุดเริ่มต้น 2-5 mm สามารถทำได้ใน 2 ลักษณะ คือ

2.2.2.1 <u>การใส่สารตัวอย่างลงไปเป็นจุด</u> (Spot Application)

สามารถทำโดยใช้ loops, pipette หรือ syringe สัมผัสที่ผิวของแผ่น ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการใส่สารตัวอย่างที่เป็นสารละลาย

a) platinum loops

b)-e) Micro bulb pipette

f) Graduated micropipettes

g)-h) Microsyringes

2.1.2.2 <u>การใส่สารตัวอย่างเป็นแถบ</u> (Band Application)

การใส่สารลงบนแผ่น TLC ให้เป็นแถบนั้นจะดีหรือไม่ ขึ้นอยู่กับความสม่ำเสมอของการใส่สารอย่างมาก ตัวอย่างของเครื่องมือที่ใช้สำหรับใส่สารให้เป็นแถบแสดงดังรูป i) glass capillaries หลายๆ อันจัดเรียงเป็นแถบขนานกันโดยแต่ละอันจะติดกับสารละลายที่จะใส่ลงบนแผ่น การทำ TLC เป็นแถบมักใช้ใน preparative TLC และยังสามารถใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้อย่างดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 การเลือกโมบายเฟสใน TLC

ตัวทำละลายที่ใช้เป็นโมบายเฟสใน adsorption chromatography ของ TLC นั้น ตัวทำละลายที่มีขั้วมากจะเกิดการเกาะติด(adsorb)ตัวดูดซับที่มีขั้วมาก ได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย และ ในทางตรงกันข้าม ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยจะเกิดการเกาะติดตัวดูดซับที่มีขั้วน้อย(reverse-phase)ได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วมาก กรณีเช่นนี้ จึงเกิดการแข่งขันการเกาะติดที่ผิวตัวดูดซับระหว่าง สารที่ต้องการแยกและตัวทำละลาย ดังนั้นยิ่งสารที่ต้องการแยกมีขั้วมากกว่าตัวทำละลายเท่าใด ก็จะเกิดการเกาะติดที่ผิวของตัวดูดซับที่มีขั้วได้ดีกว่าตัวทำละลายมากขึ้นเท่านั้น ดังนั้นการเลือกใช้โมบายเฟสจึงมีความสำคัญต่อการชะล้างมาก

หมู่ฟังชันนัลของสารที่สามารถเกาะติดที่ผิวของตัวดูดซับที่มีขั้ว เรียงตามลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ $R-SO_3H$, $R-COOH$, $R-CONH_2$, $R-OH$, $R-NH_2$, $R-COOCH_3$, R_1-NH-R_2, $R-NO_2$, $R-OCH_3$, $R-Cl$ และ $R-H$

การเลือกโมบายเฟสสำหรับ adsorption TLC จึงมีข้อควรปฏิบัติดังนี้

1. สารทุกชนิดที่ต้องการแยกควรละลายในโมบายเฟสได้ปานกลาง ถ้าละลายได้ดีเกินไปอาจไม่เกิดการเกาะติดตัวดูดซับ

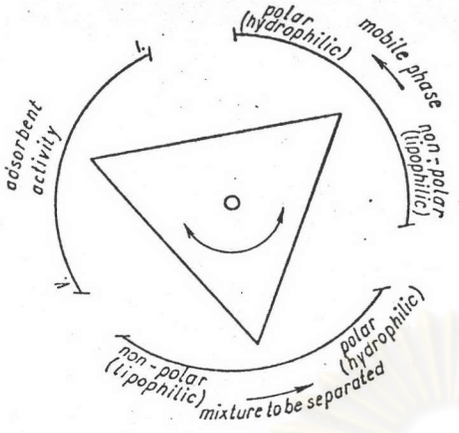
2. ความสามารถในการเกาะติดตัวดูดซับควรปานกลาง

3. สารที่ต้องการแยกต้องไม่ทำปฏิกิริยากับโมบายเฟส และ ไม่ควรเลือกโมบายเฟสที่ทำปฏิกิริยากับตัวดูดซับ เช่น ไม่ควรใช้กรดอินทรีย์กับตัวดูดซับพวกคาร์บอเนต (carbonate)

4. ในการใช้ตัวทำละลายผสมเป็นโมบายเฟส การเติมตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อย ลงในตัวทำละลายที่มีขั้วมากในปริมาณมาก มีผลกระทบน้อยกว่าการเติมตัวทำละลายที่มีขั้วมากลงในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยในปริมาณน้อย

ในการเลือกตัวดูดซับและโมบายเฟส เพื่อใช้ในการแยกสาร สารมารถสรุปวิธีได้โดยใช้ไดอะแกรม ดังรูปที่ 2.2 (27)

สามเหลี่ยมนั้นสามารถหมุนได้รอบทิศ ซึ่งตรงปลายแต่ละด้านแสดงถึงสารที่ต้องการแยก ความมีขั้วของตัวทำละลาย(โมบายเฟส) และ activity ของตัวดูดซับ



รูปที่ 2.2
แสดงการเลือกใช้ตัวดูดซับ และโมบายเฟสสำหรับการแยกของผสม และ activity ของตัวดูดซับ

2.1.4 ค่า R_f

ในการศึกษาทาง TLC และ paper chromatography ใช้ค่า R_f ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ distribution coefficient เป็นตัวเปรียบเทียบคุณสมบัติการแยกของสารแต่ละชนิด

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ไปได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปได้}}$$

สิ่งที่มีอิทธิพลต่อค่า R_f คือองค์ประกอบที่ต่างกันของตัวทำละลาย(โมบายเฟส) อุณหภูมิ ขนาดของภาชนะบรรจุโมบายเฟส ความหนาของการฉาบตัวดูดซับ และ ธรรมชาติของของผสมนั้น อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการลดอิทธิพลต่างๆ เหล่านี้ จึงได้กำหนดค่า R_f สัมพัทธ์ขึ้นมา โดยเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าค่า R_x หรือ ค่า R_{st} เมื่อให้สารที่เป็นมาตรฐานอยู่บนแผ่นเดียวกันกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ค่า R_x (R_{st}) นี้มีค่าคงที่ไม่ว่ากรณีใดๆ

$$R_{st} = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลาง spot ของสารวิเคราะห์}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลาง spot ของสารมาตรฐาน}}$$

2.1.5 การ development

ก่อนที่จะทำการ development แผ่น TLC ที่ใส่สารตัวอย่างแล้วนั้น ควรมีการ equilibrate ภาชนะที่บรรจุโมบายเฟสก่อน ให้เกิดความสม่ำเสมอของ gas phase ในภาชนะนั้น เพื่อให้ค่า R_f ของสารเหมือน ๆ กันทุกครั้ง การ equilibrate ทำโดยการให้กระดาษกรองติดอยู่ที่ผนังภาชนะชุ่มไปด้วยโมบายเฟส ขนาดของภาชนะที่บรรจุโมบายเฟสนั้นควรมีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ เพื่อให้ช่องว่างที่เหลืออยู่ในภาชนะน้อยที่สุด ทำให้ลดอัตราการระเหยของโมบายเฟสออกจากแผ่นระหว่างการ development

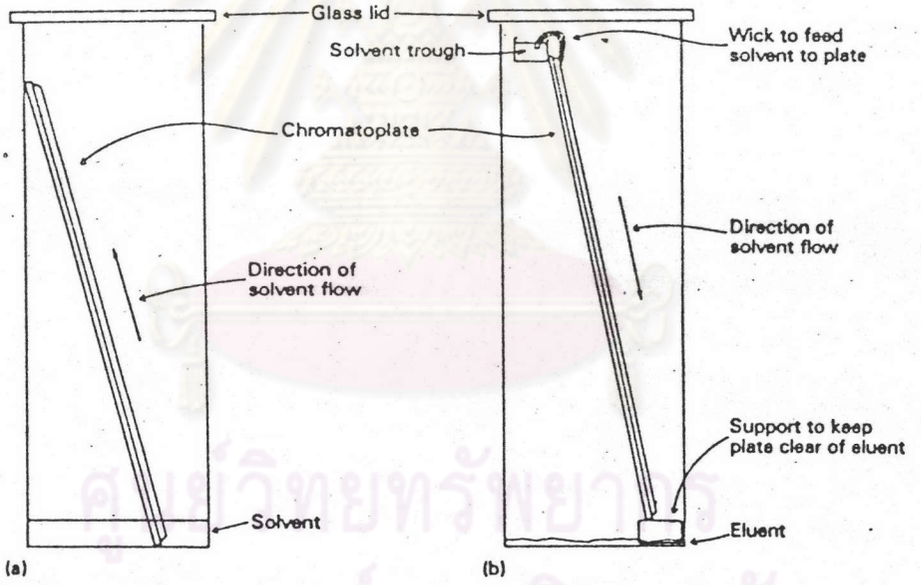
ปัจจัยอื่นๆ ที่ต้องควบคุมให้ได้มาตรฐานทุกครั้งคือ ความสูงของโมบายเฟส ระยะจากผิวของโมบายเฟสถึงจุดของ spot เริ่มต้น และ ตำแหน่งของ spot เริ่มต้น

เทคนิคการ development แบ่งออกตามลักษณะการเคลื่อนที่ของโมบายเฟส ได้เป็น 3 แบบ คือ

2.1.5.1 Ascending Development

เป็นเทคนิคการ development ที่นิยมใช้มานาน ตำแหน่งจุดเริ่มต้นของสารตัวอย่างนั้น อยู่สูงกว่าผิวหน้าตัวทำละลายที่อยู่ในภาชนะประมาณ 0.5-1.0 cm ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ขึ้นสู่ขอบแผ่นด้านบนสวนทิศกับแรงโน้มถ่วงของโลกโดยอาศัย capillary action สารองค์ประกอบจะแยกออกจากกันโดยอาศัย distribution coefficient

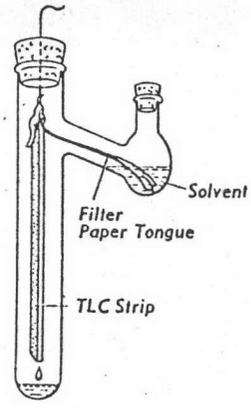
ภาชนะ(chamber)ที่ใช้ในการ development แบบนี้ได้แก่ Normal chamber, Rectangular chamber, S-chamber และ moisture chamber



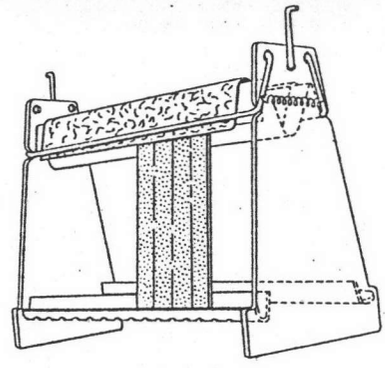
รูปที่ 2.3 การ development แผ่น TLC : (a) Ascending; (b) Descending

2.1.5.2 Descending Development

เป็นเทคนิคการ development ที่ทิศทางการเคลื่อนที่ของโมบายเฟสมีทิศทางเดียวกันกับแรงโน้มถ่วงของโลก เครื่องมือที่ใช้ในเทคนิคชนิดนี้ มีกระดาษกรองสัมผัสที่ปลายขอบแผ่นด้านบน ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เข้าสู่แผ่นโดยผ่านกระดาษกรอง ดังแสดงในรูปที่ 2.3 (b)



รูปที่ 2.4 การทำ descending development ของแผ่น TLC แคบ ๆ โดยใช้หลอดแก้วขนาดใหญ่ซึ่งมีส่วนต่อออกไปด้านข้างเพื่อบรรจุโมบายเฟส



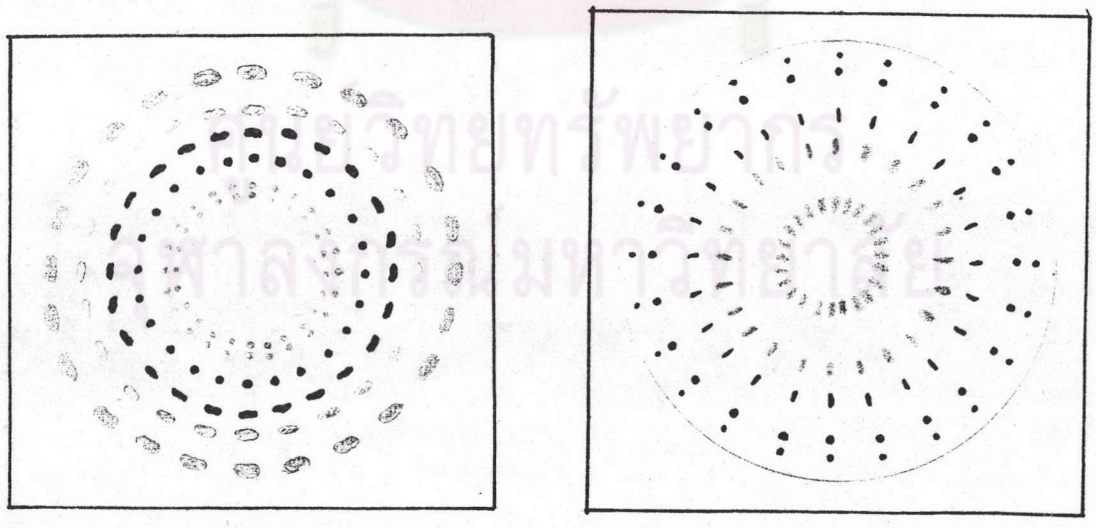
รูปที่ 2.5 การทำ descending development ของแผ่น TLC ขนาดใหญ่ โมบายเฟสซึ่งอยู่ด้านบนสามารถเข้าสู่แผ่น TLC โดยอาศัยกระดาษกรองมีห่วงโลหะกดทับกระดาษกรองให้อยู่ติดกับแผ่น

2.1.5.3 Horizontal Development

เทคนิคชนิดนี้แสดง ทิศทางการเคลื่อนที่ของโมบายเฟสตั้งฉากกับแรงโน้มถ่วงของโลก สามารถทำได้ 3 ลักษณะ คือ

- เชิงวงกลม (Circular)

การ development แบบนี้จะทำใช้วิธีใส่สารตัวอย่างในตำแหน่งใกล้จุดศูนย์กลางเป็นวงกลม ดังรูป โมบายเฟสจะถูกนำเข้าสู่แผ่นตรงจุดศูนย์กลางโดยอาศัยใยผ้าซึ่งมีปลายด้านหนึ่งจุ่มอยู่ในภาชนะใส่โมบายเฟส ทิศทางการเคลื่อนที่ของโมบายเฟสจะมีทิศทางออกจากจุดศูนย์กลางของแผ่น



a b

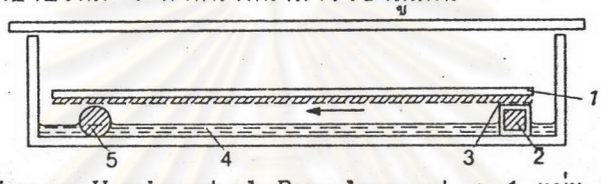
รูปที่ 2.6 การทำ horizontal development : (a) เชิงวงกลม(circular) ; (b)เชิงรัศมี(anticircular)

- เชิงรัศมี (Anticircular)

สารตัวอย่างถูกใส่ในตำแหน่งเส้นรอบวงของวงกลม ดังรูปที่ 2.6 b โมบายเฟสจะถูกนำเข้าสู่แผ่นโดยอาศัยเครื่องมือซึ่งมีแท่นวางแผ่นหมุนได้รอบ ดังนั้นทิศทางการเคลื่อนที่ของ โมบายเฟสจะมีทิศจากเส้นรอบวงเข้าหาจุดศูนย์กลางของแผ่น

- เชิงเส้น (Linear)

การ development แบบนี้ ค่า R_f ที่หาได้จะเนื่องมาจาก capillary action อย่างเดียวเท่านั้น ไม่มีผลกระทบเนื่องจากแรงโน้มถ่วงของโลกเลย ภายหลังจากการ ใส่สารตัวอย่างในแนวขนานขอบแผ่นด้านหนึ่งแล้ว วางแผ่นคว่ำลงดังรูป กระดาษกรองซึ่งจุ่มอยู่ในโมบายเฟส จะทำหน้าที่นำสารเข้าสู่แผ่น

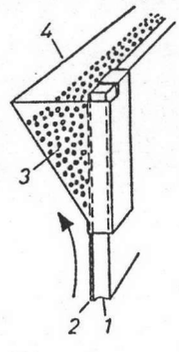


รูปที่ 2.7 การทำ Linear Horizontal Development : 1 แผ่น TLC ถูกคว่ำด้านหน้าลง; 2 แท่งเหล็กซึ่งหุ้มด้วยกระดาษกรอง(3); 4 โมบายเฟส; 5 แท่งแก้ว

2.1.6 การ development เทคนิคพิเศษ

2.1.6.1 Continuous Development

ภายหลังจากการ development ครั้งแรกแล้ว ถ้าสารตัวอย่างเกิดการแยกในช่วงไม่เกิน 1 ใน 3 ของความยาวของการแยก เราสามารถใช้วิธีการ Continuous Development หรือ Multiple Development ได้เพื่อให้สารเกิดการแยกที่ดีขึ้น Continuous Development นั้นเราให้โมบายเฟสเข้าสู่แผ่นอย่างต่อเนื่อง ตรงปลายแผ่นนั้น อาจต่อกับตัวดูดซับที่ซับเอาโมบายเฟสส่วนเกินออก หรือต่อกับเครื่องมือให้ความร้อนทำให้โมบายเฟสระเหยออกไป ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 เครื่องมือที่ใช้สำหรับ Continuous Development มีแผ่นมุมเอียง บรรจุตัวดูดซับ : 1 แผ่น ; 2 ชั้นตัวดูดซับ ; 3 ตัวดูดซับสำหรับดูดโมบายเฟสขึ้น ; 4 แผ่นมุมเอียง

2.1.6.2 Multiple Development

เป็นการ development ซ้ำหลายครั้งในโมบายเฟสชนิดเดียวกัน ถ้าจำนวนครั้งในการ development ซ้ำ คือ n ค่า R_f ที่เปลี่ยนไปในการ develop แต่ละครั้งคำนวณได้จาก

$$^{n}R_f = 1 - (1- R_f)^n$$

เทคนิคการทำซ้ำหลายครั้งนี้ อาจทำให้ค่า R_f เปลี่ยนไปจากเดิมได้บ้าง ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสาร และ การเปลี่ยนแปลงของ spot ภายหลังการ development แต่ละครั้ง (เช่น spot อาจไม่เป็นทรงกลม หรือ ไม่อยู่ตรงกลาง)

2.1.6.3 Stepwise Development

ใช้สำหรับแยกสารผสมซึ่งจะทำให้เกิดการแยกได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ซึ่งมีขั้วมากน้อยต่างกัน ใช้ตัวทำละลายแรกที่มีขั้วมากกว่าทำการแยกไปได้ช่วงหนึ่งให้เกิดการแยกของสารที่มีขั้วมากกว่า แล้วจึงทำการ development ครั้งต่อมาด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าเดิม เพื่อทำให้เกิดการแยกของสารที่มีขั้วน้อยกว่าบ้าง โดยปกติมักจะให้การ development ครั้งหลังมีระยะทางยาวกว่าครั้งแรกเสมอ ดังแสดงในรูปที่ 2.9

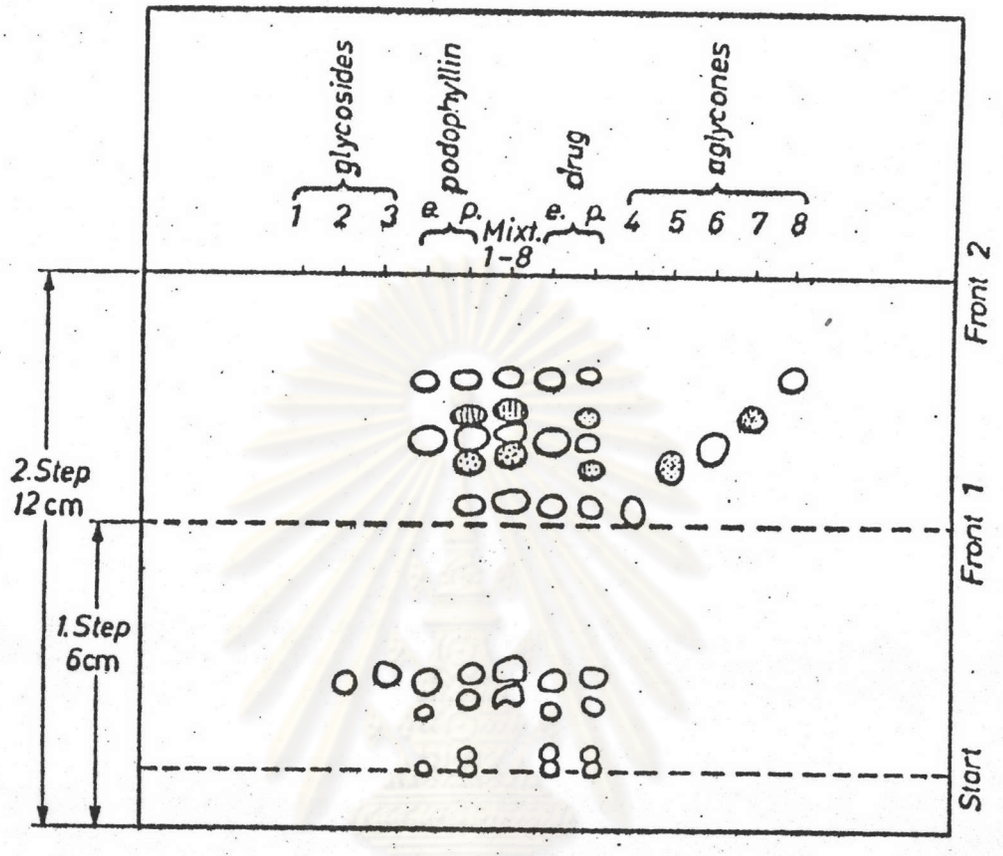
2.1.6.4 การแยกใน 2 ทิศทาง และ เทคนิค SRS (Seperation, Reaction, Seperation)

การแยกใน 2 ทิศทาง (2-Dimension) ทำได้โดยการ spot สารตัวอย่างที่มุมหนึ่ง แล้วทำการ development ตามปกติ จากนั้นหมุนแผ่นเป็นมุม 90° ตั้งฉากกับขอบแผ่นเดิม ทำการ development ซ้ำอีกครั้งโดยอาศัย ตัวทำละลายชนิดที่ 2 วิธีนี้ใช้ในการแยกสารผสมที่มีองค์ประกอบมากๆ

เทคนิค SRS เป็นการแยกใน 2 ทิศทางแต่ภายหลังการ develop ครั้งแรกนั้น ต้องนำสารไปทำปฏิกิริยาให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่น นำไปผ่านแสงยูวี, รังสีเอ็กซ์, รังสีแกมมา, ความร้อน หรือแก๊ส เป็นต้น แล้วจึงทำการ development ซ้ำด้วยโมบายเฟสชนิดเดิม

2.1.6.5 การแยกหลายทิศทาง (Multidimension)

เป็นวิธีการเช่นเดียวกันกับการแยกใน 2 ทิศทางโดยทำการ spot สารตัวอย่างที่มุมหนึ่ง จำนวนหลายแผ่น การ develop ในครั้งแรกใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน หมุนแผ่นเป็นมุม 90° แล้วทำการ develop ครั้งที่ 2 โดยแต่ละแผ่น ใช้ตัวทำละลายต่างชนิด



รูปที่ 2.9 Stepwise Development ในการแยกองค์ประกอบของ podophyllum บนแผ่นซิลิกาเจล : ตัวทำละลาย, ขั้นที่ 1 คลอโรฟอร์ม-เมธานอล(90+10), ขั้นที่ 2 คลอโรฟอร์ม-อะซีโตน(65+35) :

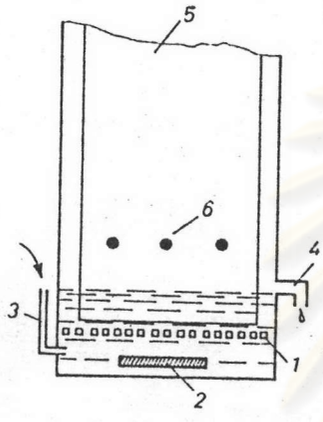
1 α-peltatin-β-glucoside; 2 podophyllotoxin glucoside; 3 β-peltatin-β-D-glucoside; 4 4'-demethylpodophyllotoxin; 5 α-peltatin; 6 podophylotoxin; 7 β-peltatin; 8 dehydroxy podophyllotoxin ปริมาณสารองค์ประกอบบริสุทธิ์แต่ละชนิดที่ใส่ลงบนแผ่น 1.0 μg ส่วนสารที่สกัดได้จาก podophyllins และยาใส่ลงบนแผ่น 5 μL สารที่พ่นลงบนแผ่นเพื่อให้เกิดสีคือ กรดซัลฟุริก-อะซีติกแอนไฮไดรด์(1+3) และอบที่ 100°C เป็นเวลา 15 นาที

(e=emodi, p=peltatum -drug)

กันทำให้เกิดการแยกแตกต่างลักษณะกันออกไป สารที่พ่นลงบนแผ่น(spraying agent)เพื่อทำปฏิกิริยาภายหลังการ development ก็ต่างกันออกไป

2.1.6.6 Gradient Elution

เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจาก column chromatography โดยการค่อยๆ เปลี่ยนโมบายเฟสให้มี elution power สูงขึ้นเรื่อยๆ เครื่องมือที่ใช้สำหรับเทคนิคชนิดนี้แสดงให้เห็น ดังรูปที่ 2.10

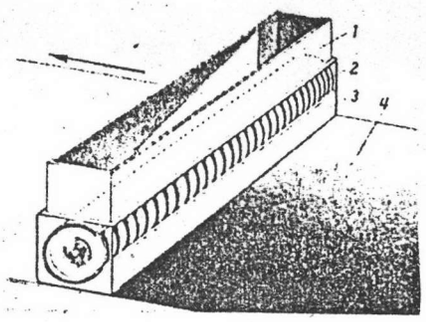


การทำ gradient elution ทำได้โดยการนำโมบายเฟส เข้าทาง capillary ใน chamber รูปทรงกระบอกซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. มีแท่งคนแม่เหล็ก(2) ในการผสมโมบายเฟส ให้เข้ากัน ปริมาตรใน chamber ถูกควบคุมให้คงที่โดยมีทางออก(4)

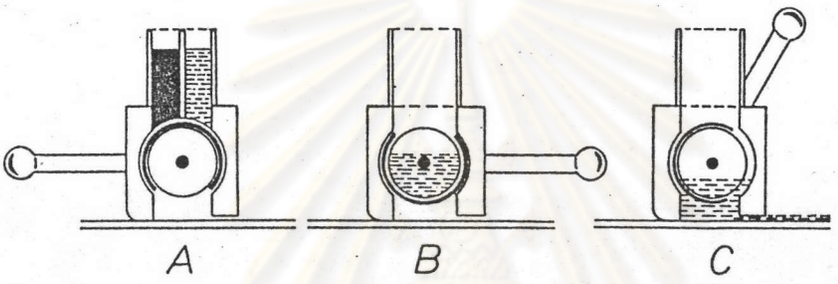
รูปที่ 2.10 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการทำ gradient elution: 1 แผ่นเจาะเป็นร่องเพื่อวางแผ่น TLC ; 2 แท่งคนแม่เหล็ก ; 3 ทางเข้าสำหรับโมบายเฟสชนิดที่สอง ; 4 ทางออกของโมบายเฟส; 5 แผ่น TLC แคบๆ ; 6 จุดเริ่มต้น

2.1.6.7 Gradient Layer ของ TLC

เพื่อให้เกิดการแยกที่ดีขึ้น จึงได้มีผู้คิดค้นการผสมตัวดูดซับที่อยู่บน TLC ให้อยู่ในลักษณะ gradient การเลือกตัวดูดซับทั้งสอง หรือหลายชนิดที่เหมาะสมนั้น เพื่อเป็นการดูว่าชนิดใดที่ผสมกันแล้วทำให้เกิดการแยกได้ดีที่สุด ตัวอย่างของเครื่องมือชนิดนี้มีชื่อว่า GM-spreader แสดงดังรูปที่ 2.11-2.13



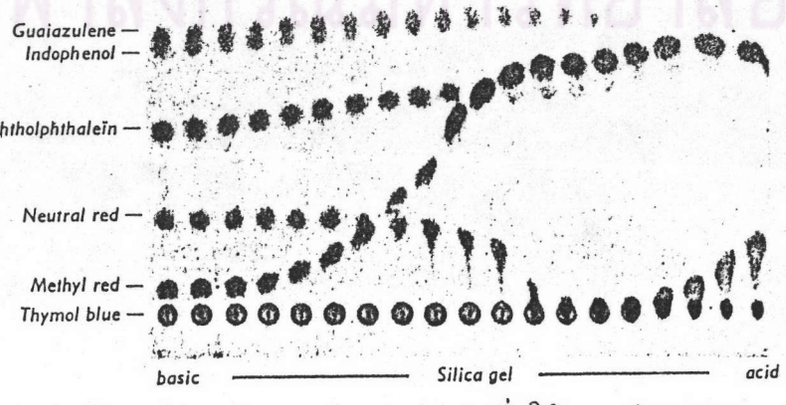
รูปที่ 2.11 แผนผังแสดงภาคตัดขวางของ GM-Spreader ในระหว่างการเคลือบชั้นตัวดูดซับลงบนแผ่น : 1 ภาชนะเปิดด้านบนและด้านล่างมีแผ่นวางแนวทแยงแบ่งตัวดูดซับต่างกันสองชนิด ; 2 ลูกกลิ้งทำหน้าที่ผสม ; 3 ฐานโลหะ ; 4 ชั้นตัวดูดซับเป็น gradient



รูปที่ 2.12 ภาคตัดขวางของ GM-Spreader (A)หลังจากบรรจุตัวดูดซับทั้งสองชนิดลงไปในช่อง; (B)ระหว่างการผสม และ (C)ในขณะทำการเคลือบ

ตัวดูดซับต่างชนิดกัน จะนำใส่ไว้ในช่องใส่ตัวดูดซับ(1) ผสมกัน(2)และถูกฉาบลงบนแผ่น ถ้าตัวดูดซับชนิดหนึ่งมี fluorescence indicator และอีกชนิดหนึ่งไม่มี fluorescence indicator จะสังเกตุได้ว่าความเข้มของแสงที่ fluorescence ออกมาจะลดลงจากด้านหนึ่งไปสู่อีกด้านหนึ่ง (4)

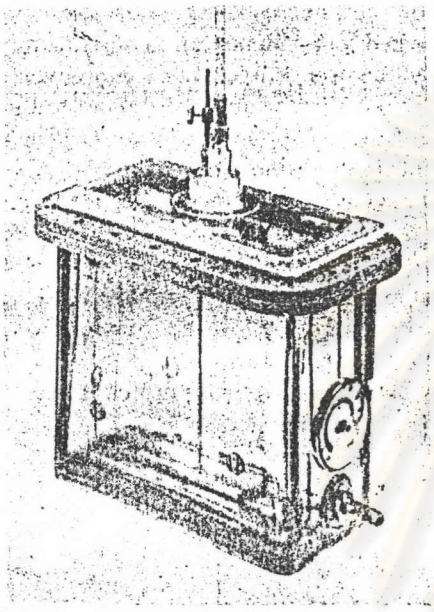
รูปแสดงตัวอย่างของการใช้ gradient layer แสดงดังรูป 2.13



รูปที่ 2.13 แสดงลักษณะ spot ของสารบน TLC เมื่อใช้ gradidnt layer

2.1.6.8 การใช้อุณหภูมิใน TLC (Temperature TLC)

ได้มีการศึกษาแล้วว่าใน adsorption TLC นั้น อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง (20°- 4°C) มีผลต่อเวลาการแยกของสารและค่า R_f น้อย แต่สำหรับใน Partition TLC นั้น การแยกสารพวกกรดไขมันจะเกิดได้ดีเมื่อใช้อุณหภูมิ 4°- 6°C ซึ่งดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง เครื่องมือที่ใช้สำหรับควบคุมอุณหภูมิใน TLC แสดง ดังรูปที่ 2.14



รูปที่ 2.14 ภาชนะที่ใช้ในการทำ development สำหรับ temperature TLC สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

เครื่องมือชนิดนี้เรียกว่า "Cryobox" ควบคุมอุณหภูมิได้ระหว่าง +50°C ถึง -50°C โดยมีเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบหน้าปัทม์ติดอยู่ด้านข้าง และมีเทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิภายใน ในการ development ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง จะต้องทำการอุ่นเครื่องเสียก่อน

พบว่าในสารประกอบบางชนิด ค่า R_f ลดลง เมื่อลดอุณหภูมิลงและ การเกิดการแยกน้อยลง แต่สามารถใช้ได้ดีกับการแยกสารที่ระเหยได้บ้าง เช่น พวก terpene

2.1.7 การหาตำแหน่งของสารและการตรวจวัด (Location and Detection)

สำหรับสารที่มีสีนั้น เราสามารถมองเห็นได้ และทราบตำแหน่งของสาร แต่สำหรับสารบางชนิดซึ่งไม่มีสี จำเป็นต้องมีวิธีการในการตรวจวัดสารเหล่านั้นซึ่งสามารถจำแนกได้ 2 วิธี คือ

2.1.7.1 วิธีการทางเคมีและชีวเคมี(Chemical and Biochemical Method)

การตรวจวัดวิธีนี้สามารถทำได้โดย การพ่นสารเคมีหรือสารทางชีวเคมีที่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ spot แล้วทำให้เกิดสี หรือเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ที่มีสี สารเคมีที่พ่นนั้นแบ่งออกเป็น สารที่ทำปฏิกิริยาไม่จำเพาะเจาะจงได้แก่ สารที่ทำปฏิกิริยากับสารทั่วไปได้เป็นส่วนมาก และสารที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจงกับสารตัวอย่าง คือสามารถนั้นทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่มีหมู่ฟังชันนัลจำเพาะ

การให้ความร้อนกับแผ่นภายหลังจากการพ่นสารแล้ว มีความจำเป็นมาก เพราะเป็นการเร่งปฏิกิริยา บางครั้งใช้วิธีการจุ่มแผ่น TLC ลงในสารละลายของสารเคมีนั้นแทน แม้ว่าวิธีการนี้จะทำให้เกิดความสม่ำเสมอมากกว่าการพ่น แต่สารตัวอย่างอาจเกิดการสูญเสียไปได้ และอาจเกิดการกระจาย(spread) ของ spot ทำให้สูญเสีย Resolution และ Sensitivity

สารทางชีวเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยานั้น มักเป็นสารที่ทำปฏิกิริยาจำเพาะเจาะจง เช่น พวกเอนไซม์ โคเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งใช้ในการตรวจสอบสารทางชีววิทยา และชีวเคมี เช่น เอนไซม์จากหัวผึ้ง หรือจากตับลูกวัว เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 สารเคมีบางชนิดที่ช่วยบอกตำแหน่งของสารบน TLC

สารเคมี	สีของ spot ที่เกิดขึ้น	ชนิดของสารที่ต้องการตรวจวัด
ไอ I_2	น้ำตาล	สารอินทรีย์ทั่วไปประเภทไม่อิ่มตัว
2,7-Fluorescein	เหลือง-เขียว	สารอินทรีย์ส่วนใหญ่
Ninhydrin	ชมพู-ม่วง	กรดอะมิโน และ เอมีน
2,4-DNP	ส้ม-แดง	คีโตน และ อัลดีไฮด์
Antimony chloride	มีหลายลักษณะ	สเตอรอยด์ วิตามินแบบวงแหวน และ carotenoids
Bromophenol blue หรือ bromocresol green	เหลือง	กรดอินทรีย์
Diphenylcarbazide	มีหลายลักษณะ	อิออนของโลหะ

2.1.7.2 วิธีการทางกายภาพ (Physical Methods)

ก. การตรวจสอบด้วยแสงยูวี

แผ่น TLC ส่วนใหญ่มี fluorescence indicator ซึ่งดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 254 nm และปล่อยแสงกลับออกมามีสีเขียว ดังนั้นแผ่นที่มี fluorescence เมื่อผ่านแสงยูวีจึงมีสีเขียว ถ้าสารประกอบที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm และเกิดการ quench แสง fluorescence ดังนั้น spot นั้นจึงมีสีมืดบนพื้นแผ่นสีเขียว indicator นี้ไม่ละลายในตัวทำละลายปกติ วิธีนี้จึงเป็นการตรวจสอบที่ไม่จำเพาะเจาะจงและไม่เป็นการทำลายสาร ดังนั้นจึงสามารถชูดเอาตัวดูดซับในตำแหน่งที่มีสารตัวอย่างอยู่ออกมาแล้วสกัดเอาสารนั้น ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมได้

ข. การใช้มาตรวัดความทึบแสง

เครื่องวัดความทึบแสง(Spectrodensitometer)หรือ TLC scanner นั้นสามารถใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์สำหรับ TLC โดยอาจทำการวัด การดูดกลืนแสง (Absorbance) ฟลูออเรสเซนต์(Fluorescence) หรือ การสะท้อนกลับของแสง (Reflectance) รายละเอียดดูได้ในหัวข้อ 2.2.4

นอกจากนี้ ยังอาจทำการตรวจวัดโดยอาศัยสารกัมมันตรังสี ทำ radio-tracer แล้วทำการตรวจวัดโดยอาศัยวิธีการทาง Autoradiography หรือ Liquid scintillation counting หรือ ทำการ scan chromatogram ด้วยเครื่อง Geiger-Muller counter เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เทคนิคการวิเคราะห์ทางไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ธินแลร์โครมาโทกราฟี(High Performance Thin Layer Chromatographic Techniques) (HPTLC) (29-34)

ในศตวรรษนี้วิธีการวิเคราะห์ทาง Thin Layer Chromatography หรือ TLC ได้เป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางและนำมาใช้ประโยชน์ได้ จึงได้มีผู้คิดค้นพยายามนำ TLC มาใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ในระดับต่ำๆ แต่ไม่สามารถทำได้เพราะต้องใช้เทคนิคพิเศษควบคู่ไปด้วย เช่น การพ่นสารเคมีเพื่อทำปฏิกิริยากับสารให้เกิดเป็นอนุพันธ์ที่มีสีขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาระบบ TLC ในทุกๆ ด้าน เช่น การควบคุมขนาดเม็ดซิลิกาเจลให้เล็กลงและมีการกระจายสม่ำเสมอมากขึ้น เทคนิคการใส่สารตัวอย่างลงบนแผ่นให้มีความสม่ำเสมอและมี ความเที่ยง(reproducibility) มากขึ้น ตลอดจนเทคนิคการวัดความเข้มข้นของสาร เป็นต้น เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการทำทั้งคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ จึงเรียกเทคนิคชนิดนี้ว่าไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ธินแลร์โครมาโทกราฟี หรือ HPTLC

ดังนั้น HPTLC จึงมีหลักการเช่นเดียวกันกับ TLC แต่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ทั้งแบบคุณภาพ(Qualitative Analysis) และการวิเคราะห์แบบปริมาณ(Qauntitative Analysis)

ส่วนประกอบต่างๆ ของ HPTLC ที่สำคัญมีดังนี้

2.2.1 แผ่น HPTLC (HPTLC Plates)

แผ่น HPTLC นี้นับได้ว่าเป็นหัวใจสำคัญของ HPTLC Halpaap และ Ripphahn จากบริษัท E.Merck ได้ทำการพัฒนาขึ้นมา Activity ของซิลิกาเจล ดูได้จากลักษณะรูพรุนของมัน(ซึ่งบอกถึงลักษณะและการกระจายขนาดของเม็ด) และระดับของปริมาณน้ำที่ติดอยู่กับหมู่ silanol อีกตัวแปรหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของแผ่น HPTLC คือ การควบคุมขนาดของเม็ดและการกระจายขนาดของเม็ดซิลิกาเจล เพื่อที่จะทำให้เกิดการแยกที่เหมาะสมที่สุด ส่วน migration time ของ HPTLC นั้นเช่นเดียวกับ TLC ที่ขึ้นกับ capillary force ซึ่งต่างจาก HPLC ที่ขึ้นกับแรงกดดันจากภายนอก(external pressure)

ได้มีการกล่าวว่า ความแตกต่างทางโครมาโทกราฟีระหว่างแผ่น HPTLC และแผ่น TLC นั้นอาจไม่มากเท่าที่คาดไว้ Brinkmann(31)ได้ทำการเปรียบเทียบค่า minimum plate height ระหว่าง แผ่น HPTLC และแผ่น TLC พบว่ามีค่าแตกต่างกันค่อนข้างน้อย ซึ่งเขาได้ตั้งข้อสังเกตุว่าแท้จริงแล้วขนาดเม็ดซิลิกาเจลของ HPTLC และ TLCไม่ได้แตกต่างกัน

มากนัก และชี้ให้เห็นว่าเนื่องจาก Merck Technical Bulletin เพียงแต่กำหนดไว้ว่าช่วงขนาดเม็ดซิลิกาเจลของแผ่น HPTLC จะต้องน้อยกว่าแผ่น precoated TLC เท่านั้น

ในขณะที่ได้มีการพัฒนาแผ่นซิลิกาเจลโดยทำเป็น reversed-phase HPTLC Bringmann และ De Varies ได้ทำการเปรียบเทียบแผ่น HPTLC ต่างๆ หลายชนิด โดยใช้สารหลายประเภทพบว่า ชั้น precoated RP-8 มีความแข็งน้อยกว่าแผ่น HPTLC และแผ่น TLC ธรรมดา เวลาที่ใช้ในการแยก(run time) ของ precoated LiCrosorb RP-2, RP-8, และ RP-18 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเพิ่มสัดส่วนของน้ำในโมบายเฟส ส่วนแผ่น KC_{18} นั้นใช้เวลาในการแยกน้อยกว่า precoated plate เหล่านั้น 3-4 เท่าเมื่อใช้โมบายเฟสชนิดเดียวกัน precoated cellulose HPTLC มีค่า plate height น้อยกว่าแผ่น cellulose TLC และเวลาที่ใช้ในการ develop ก็น้อยกว่าด้วย

โดยปกติแล้วแผ่น HPTLC จะมีขนาด 10x10, 10x20 และ 20x20 cm ซึ่งแต่ละแผ่นมีขนาดเท่าๆ กันทุกแผ่น มีความหนาของผิวเคลือบ 200 ไมโครเมตร สม่ำเสมอเท่ากันตลอดทั้งแผ่น

2.2.2 Sample Application (32)

ข้อควรกระทำเพื่อให้การใส่สารดีที่สุด

Kaiser ได้อธิบายปัจจัยที่ทำให้การใส่สารเกิดได้ดีที่สุด โดยอาศัยการคำนวณทางคณิตศาสตร์ และเรียกปัจจัยนั้นว่า Dosage Quality, Q_D เมื่อ

$$Q_D = (b_1 - b_o) / (b_1 + b_o)$$

ค่า Q_D เป็นค่าที่บอกถึงระดับของการแผ่ขยายของ spot ระหว่างลำดับขั้นของการทำ chromatography โดยที่

b_o คือ รัศมีของ spot เริ่มต้น

b_1 คือ รัศมีของ spot หลังการ development

เมื่อค่า b_o มีค่าน้อยๆ ค่า Q_D จะมีค่าเข้าใกล้ 1 ซึ่งทำให้ความสามารถในการแยกเพิ่มขึ้น ดังนั้นเทคนิคของการใส่สารที่ดีควรจะทำดังนี้

1. ใช้ปริมาตรสารน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้

2. ความเข้มข้นของสารละลายที่ spot สูงมากๆ

วิธีการใส่สารตัวอย่างลงบนแผ่นให้มีประสิทธิภาพสูงสามารถทำได้หลายวิธีคือ

self-loading capillaries, contact spotting, spot predevelopment และการใช้แผ่น precoated ซึ่งมี concentration zone

2.2.2.1 Self-loading Capillaries

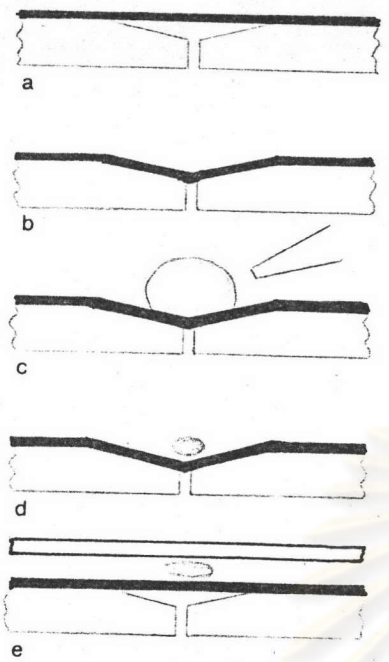
เราสามารถใส่สารที่มีปริมาตรน้อยๆ ลงบนแผ่น HPTLC ได้ โดยใช้ platinum-irridium capillary ซึ่งมีทั้งขนาด 100 และ 200 nL capillary ชนิดนี้มีปฏิกิริยาต่อสารส่วนใหญ่น้อยมาก และที่ส่วนปลายนั้นถ้าจำเป็นสามารถนำไปเผาได้ สารจะลงสู่แผ่นโดยการแตะปลาย capillary บนแผ่นเพียงเบาๆ ซึ่งคล้ายกับวิธีการของ TLC ธรรมดา

การใช้วิธีการนี้มีข้อดี คือ มี reproducibility ที่ดีมากสำหรับการใช้สารในปริมาณน้อยๆ แต่มีข้อเสียเปรียบคือ มีราคาแพงเมื่อเทียบกับ capillary แบบแก้ว

ถ้าปริมาตรของสารน้อยๆ มีวิธีการใส่สารลงบนแผ่นอีกวิธีหนึ่ง คือใช้ microsyringe ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารที่ใช้ได้ เนื่องจากการทำงานของ syringe ใช้วิธีการ displacement ไม่ใช่หลักการของ capillary ดังนั้น สารสามารถปล่อยลงสู่แผ่นได้โดยไม่สัมผัสแผ่น microcapillary pipette นั้นเป็นแบบ non-disposible fixed volume ดังนั้นจึงต้องพิจารณาถึง ปัญหาการ cleaning และปัญหา sample carryover ด้วย

2.2.2.2 Contact Spotting

สารตัวอย่างทางชีววิทยาที่มีความเข้มข้นมากใช้วิธี capillary pipette และ microsyringe ได้ยาก เทคนิคที่เหมาะสมที่ใช้คือ contact spotting ทำโดยการหยดสารปริมาตร 100 μL ลงบนแผ่นพอลิเมอร์บางๆ ทำให้หยดสารมีความเข้มข้นสูงขึ้นโดยการระเหยปริมาตรจะลดลง แล้วนำแผ่นพอลิเมอร์นั้นไป contact กับชั้นตัวดูดซับของแผ่น HPTLC โดยการใช้เครื่องมือ contact spotting อัตโนมัติ (29)



รูปที่ 2.15 การใส่สารตัวอย่างโดยวิธี contact spoting เมื่อสูบอากาศออกความดันอากาศใต้แผ่นฟิลม์ลดลง แผ่นฟิลม์ฟลูออโรพอลิเมอร์จะยุบตัวลงแนบกับแผ่นโลหะ(a และ b) ปิเปตสารตัวอย่างใส่ลงบนแผ่น(c) และทำระเหยจนแห้ง(d) ทำการถ่ายเทใส่แผ่น HPTLC โดยค่อยๆ ปล่อยอากาศเข้า(e)

2.2.2.3 Concentration Zone

เทคนิคของการใช้ narrow Keiselguhr concentration layer นั้น Abbott และ Thomson ได้อธิบายว่า อาศัยหลักการของความแตกต่างระหว่าง absorbing power ของตัวดูดซับ 2 ชนิด Halpaap และ Krebs เป็นคนแรกที่ศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างแผ่นที่มี concentration zone และแผ่นที่ไม่มี concentration zone ทั้งของ HPTLC และ TLC ย่านความเข้มข้น(concentration zone) นั้นมีความกว้าง 25 mm มีความยาวตลอดในทิศทางที่ตั้งฉากกับทิศทางการ development และมีความหนาประมาณ 150 ไมโครเมตร สารที่ใช้ทำ concentration zone ประกอบด้วย ซิลิกาสังเคราะห์ที่มีรูพรุน(synthetic porous silica) และมีปริมาตรรูพรุนขนาดกลาง มีเส้นผ่าศูนย์กลางของรูพรุนใหญ่มาก(ประมาณ 5000 nm) แต่มีพื้นที่ผิวน้อยมาก(1 m^2/g) สามารถใส่สารใส่ใน concentration zone โดยวิธีธรรมดา เช่น ปริมาตร 2 ถึง 20 µL โดยใช้ glass capillary ขณะทำการ develop ตัวทำละลายจะทำการพาเอาสารผ่าน concentration zone ไปสะสมรวมกันที่บริเวณรอยต่อระหว่างตัวดูดซับ 2 ชนิด เป็นแถบเล็กๆ มีความยาวเท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของ spot เริ่มต้น

Halpaap และ Krebs ได้ใช้จำนวนสารที่สามารถแยกได้ (separation number) ของ Kaiser มาทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ แผ่น TLC ชนิดซิลิกาเจล-60 ที่มีและไม่มี concentration zone และแผ่น HPTLC ที่มีและไม่มี

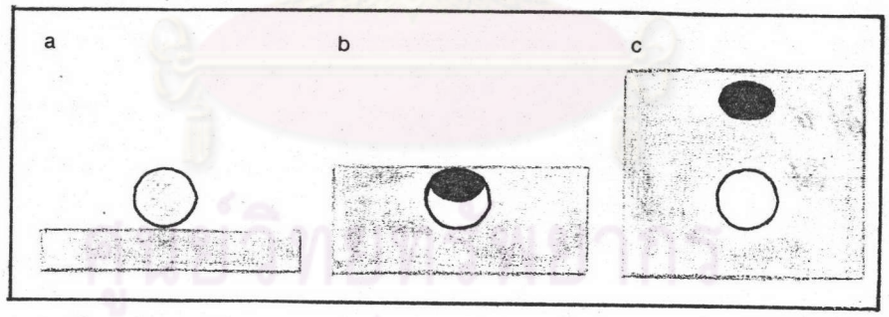
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17821690

concentration zone พบว่ามีความสามารถในการแยกได้อย่างสมบูรณ์โดยที่มีจำนวนสารที่สามารถแยกได้(separation number)สูงสุด ได้ตั้งแต่ช่วง $R_f = 0$ ถึง $R_f = 1$ และการแยกนั้นจะพิจารณาว่าสมบูรณ์ต่อเมื่อ ช่วงการแยกที่ความเข้มข้นสูงสุด มีค่าเท่ากับ หรือมากกว่า ผลบวกของความกว้างของพีก (peak) ที่ครึ่งหนึ่งของความสูง 2 พีก รวมกัน และพบว่าสำหรับแผ่น HPTLC ที่มี concentration zone ให้ค่าความสามารถในการแยกสารได้มากกว่าถึง 6 เท่า ของแผ่นที่ไม่มี concentration zone

2.2.2.4 Spot Predevelopment

Blome เป็นผู้พบวิธีนี้ ซึ่งทำโดยการใส่สารด้วยวิธีใช้ glass capillary ปริมาตร 1-10 μL หรือเครื่องมือที่ใช้ในการ spot อื่นๆ หลังจากนั้นใช้ตัวทำละลายที่ strong ชะพาเอาสารในระยะทางการ develop สั้นๆ เพื่อทำให้เข้มข้นขึ้นเป็นแถบ(band)แคบๆ ดังรูป ถ้าองค์ประกอบบางอย่างของสารผสมไม่เคลื่อนที่เมื่อใช้ตัวทำละลายนั้นให้เปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ โดยการทำซ้ำอีกครั้ง แล้วจึงนำแผ่นไปทำให้แห้ง ทำการ develop ในโมบายเฟสที่เหมาะสมต่อไป Concentration Effect ของวิธีนี้ก็คล้ายกับการทำ Programmed Multiple Development ซึ่งการใส่สารลงบนแผ่น TLC โดยวิธีการปกติ และทำให้เป็นแถบที่เข้มข้นขึ้นโดยมีตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นลงตามแผ่น TLC นั้น



รูปที่ 2.16 กลไกของการทำ Spot Reconcentration(Predevelopment) : เมื่อเริ่มต้น (a) ใช้ตัวทำละลายใหม่เคลื่อนที่ไปบนตัวดูดซับผ่าน spot เริ่มต้นทำให้องค์ประกอบเดิมบน spot ถูกทำให้เข้มข้นขึ้น (b) และเมื่อตัวทำละลายผ่านไป spot ใหม่ที่เกิดขึ้นจะเคลื่อนที่จากเดิมเล็กน้อย (c)

2.2.3 Plate Development

เราอาจ develop แผ่น HPTLC ได้ในลักษณะเช่นเดียวกันกับ TLC คือ ในรูปแบบเชิงเส้น วงกลม และเชิงรัศมี โดยอาจใช้เทคนิคพิเศษควบคู่ไปด้วย เช่น แบบ continuous , แบบทำการ develop ซ้ำๆ หลายครั้ง , และแบบ overpressure

2.2.3.1 Ascending and Descending Development

เป็นวิธีการเก่าแก่ที่ใช้ในการ develop แผ่น คือนำแผ่นไปใส่ในภาชนะขนาดใหญ่กว่าแผ่น จึงทำให้มีปริมาตรของไอของโมบายเฟสมาก โมบายเฟสที่จะ develop นั้นสูงขึ้นมาจากขอบแผ่นประมาณ 1 เซนติเมตร สิ่งที่ควรระวังเกี่ยวกับ chamber ประเภทนี้คือปริมาตรของ vapor phase ที่สัมผัสกับแผ่นนั้นมีมาก ไอของโมบายเฟสที่มีความเป็นขั้วสูงอาจเกิดการเกาะติดได้ดีกว่า ทำให้รบกวนต่อคุณภาพระบบ chromatography ให้เสียได้

ผลกระทบของไอของโมบายเฟสที่มีต่อแผ่นอาจทำให้ลดลงได้โดยใช้ "sandwich" chamber โดยนำแผ่นกระจกอีกแผ่นมาปิดแผ่น HPTLC หรือ TLC ที่ต้องการ develop นั้น วิธีนี้จะช่วยลดการสัมผัสระหว่างไอของตัวทำละลายและสารที่เคลือบ บนแผ่นอีกทั้งยังทำให้ reproducibility ของระบบดีขึ้นอีกด้วย

2.2.3.2 Circular and Anticircular Development (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.1.5.3)

โดยปกติแล้วการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายในเชิงเส้น ซ้ำลงเป็น กำลังสองของระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนไปได้ แต่ในการ develop แบบวงกลมนั้นตัวทำละลายจะถูกดึงไปเพื่อเพิ่มพื้นที่ ในการ develop ของแผ่น ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายจึงยังคงที่ สารประกอบที่มีค่า R_f ต่ำๆ จึงสามารถทำการแยกได้โดย develop แบบนี้

Camag ได้ออกแบบ chamber สำหรับการ develop เชิงรัศมี เรียกว่า U-chamber การเคลื่อนที่ของโมบายเฟส ใช้การควบคุมทางไฟฟ้า โดยมีมอเตอร์หมุนเพื่อควบคุมการปล่อยตัวทำละลายให้คงที่ เมื่อใช้ U-chamber ค่า R_f มี ความแม่นยำและมี reproducibility ของตำแหน่งการปล่อยตัวทำละลายดีประกอบกับการมิให้โมบายเฟสถูกอากาศ และมีการควบคุม gas phase ที่สัมผัสกับผิวของแผ่นที่ดีกว่า

การ develop เชิงรัศมี ทิศทางของตัวทำละลายจะเคลื่อนที่เข้าสู่ใจกลาง พื้นที่ในการ develop จะลดลงไปเรื่อยๆ เมื่อเทียบกับการ develop แบบเชิงเส้นแล้ว อัตราการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายจึงเร็วกว่า ประโยชน์อีกข้อของแบบรัศมีคือสามารถตรวจสอบสารที่มีค่า R_f สูงได้

2.2.3.3 Multiple and Stepwise Development

เทคนิคการ develop ซ้ำ (multiple development) แม้ว่าไม่ใช่เทคนิคใหม่ แต่ยังคงใช้ได้ดีกับแผ่น HPTLC ภายหลังจากการ develop ครั้งแรกแล้วทำให้

แห้งจากนั้นทำการ develop ซ้ำอีก โดยอาจทำการเปลี่ยนระบบตัวทำละลายได้ เทคนิคนี้ใช้ได้ดีโดยเฉพาะเมื่อหลังจากการ develop ครั้งแรกแล้วเกิดปรากฏการณ์ tailing ตัวทำละลายชนิดต่อมาจะช่วยทำการผลักดันให้ tailing ของ spot นั้นให้แคบเข้าเป็นแถบแคบๆ จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบ โดยเฉพาะใช้ในงานการแยกสารผสมที่ซับซ้อน (complex mixture)

multiple development อาจทำอย่างอัตโนมัติ โดยเทคนิค Programmed Multiple Development (PMD) ในทางปฏิบัติเทคนิค PMD สามารถทำโดยการ develop ระยะสั้นหลายครั้ง โดยที่ให้ครั้งหลังมีระยะทางในการแยกยาวกว่าครั้งแรก ซึ่งเหมือนกันกับ stepwise development (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ 2.1.6.3)

2.2.3.4 Continuous Development

Continuous Development เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของการ develop TLC และ HPTLC โดยเน้นความสำคัญของ resolving power มากกว่าความรวดเร็วในการวิเคราะห์ วิธีการคือ ในระหว่างการ develop นั้น เมื่อโมบายเฟสเคลื่อนที่จนถึงขอบแผ่นแล้ว ทำการระเหยโมบายเฟสที่อยู่ที่ขอบแผ่น ซึ่งจะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโมบายเฟสอย่างต่อเนื่อง Solvent Strength ของการ develop แบบนี้น้อยกว่าวิธีการ develop ปกติ และมีข้อดีสำหรับการ develop ที่ต้องการให้ อัตราการเคลื่อนที่ของโมบายเฟสเร็วมากในช่วงต้น แผ่น HPTLC ก็สามารถใช้วิธีการนี้ได้เช่นเดียวกัน

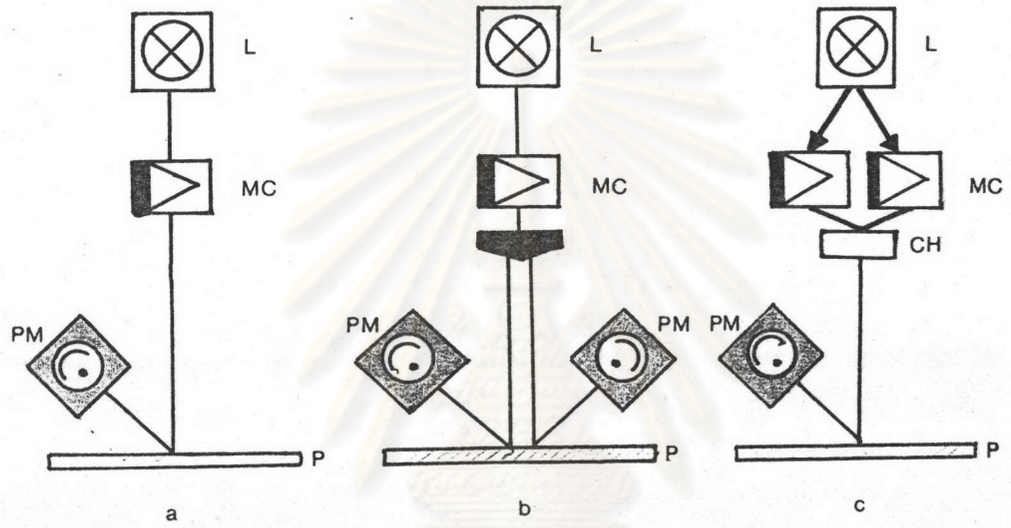
2.2.3.5 Overpressured TLC/HPTLC

Overpressured TLC เป็นเทคนิคผสมระหว่าง TLC และ HPLC โดยใช้แผ่นที่หุ้มด้วยเมมเบรนพลาสติก ทำการ develop โดยวางแผ่นชนิดนี้ลงใน Pressurized Ultramicro Chamber (PUM Chamber) โมบายเฟสผ่านเข้าสู่แผ่นโดยอาศัยแรงดัน เป็นที่สังเกตุว่าวิธีการนี้ อัตราการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเร็วกว่าแบบปกติ เวลาที่ใช้ในการ develop และ การกระจายของ spot น้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีค่า R_f สูง เวลาที่ใช้ในการ develop เร็วขึ้น 5-10 เท่า และเมื่อใช้แผ่น HPTLC วิธีก็จะให้ resolution สูงอีกด้วย

2.2.4 Scanning Densitometer

การหาปริมาณขององค์ประกอบที่สามารถแยกได้โดยใช้ HPTLC ทำได้โดยการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance[1]) หรือวัดอิมิชัน(emission)ที่ให้ออกมา

เป็น fluorescence ความทึบแสงของ spot ที่อยู่บนแผ่น HPTLC นั้นสามารถทำการวัดโดยให้แสงจากแหล่งกำเนิดแสงผ่าน slit ซึ่งการเลือกความกว้างของ slit ขึ้นอยู่กับ เส้นผ่าศูนย์กลางของ spot ที่ใหญ่ที่สุด เมื่อแสงจากเหล่งกำเนิดกระทบสารที่อยู่ บนแผ่น จึงทำการวัดแสงที่สะท้อน และ/หรือ กระเจิงออกมาโดยใช้ photomultiplier บริเวณใดของแผ่นที่ไม่มีสารดูดกลืนแสงก็จะให้สัญญาณออกมาสูงสุด ตำแหน่งใดที่แสงตกกระทบสารที่ดูดกลืนแสงจะให้สัญญาณลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น^2 ของสารบริเวณนั้น



รูปที่ 2.17 รูปแสดง Scanning Densitometer ชนิดต่างๆ กัน : L = แหล่งกำเนิดแสง ; MC = โมโนโครเมเตอร์ ; PM = photomultiplier ; P = แผ่น TLC หรือ HPTLC ; CH = chopper

---

1. การวัดการดูดกลืนแสงของสารหรือค่า absorbance ในความหมายของ HPTLC นั้น มิได้หมายความเช่นเดียวกับการวัด absorbance ในเครื่องมือ spectrophotometer อื่น แต่สามารถเทียบได้กับคำจำกัดความทางคณิตศาสตร์ คือ Optical Density ของสาร เมื่อให้ลำแสงตกกระทบสู่แผ่นบริเวณที่มีสารที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นนั้นได้ ค่าของ Optical Density ขึ้นอยู่กับ solid angle ที่สามารถตรวจวัดได้โดย phototube หรือ photomultiplier

2. ความเข้มข้นของสาร ในทาง HPTLC และ TLC หมายถึง ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร) คูณกับปริมาตรของสารที่ spot ลงบนแผ่น จึงมีหน่วยเป็นกรัม

ระบบในทาง scanning densitometry มีด้วยกัน 3 ระบบ คือ รูป(a) ลำแสงเดี่ยวผ่านโมโนโครเมเตอร์(monocromator) ซึ่งตั้งฉากกับแผ่น HPTLC และมี photomultiplier เป็นตัวตรวจวัดแสงกระเจิงออกมา แผ่นจะถูกตรึงอยู่บนแท่นที่เคลื่อนที่ได้ด้วยมอเตอร์ มีทิศทางการเคลื่อนที่ตั้งฉากกับความยาวของ slit การจัดแบบนี้ ผลที่ได้นั้นสามารถวิเคราะห์ได้ดีเยี่ยม แต่บางครั้งเกิด baseline drift อันเนื่องมาจากความสามารถในการดูดซับสูงเกินไปของตัวดูดซับ

ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยใช้ double-beam scanner รูป(b) ความแตกต่างของสัญญาณทั้งสองจะช่วยลด background ของแผ่นลง แต่ยังคงมีความผิดปกติเล็กน้อยเกี่ยวกับความไม่สม่ำเสมอของแผ่นทำให้เกิดปัญหา ดังนั้นจึงแก้ไขโดยการใช้ลำแสงคู่(dual-wavelength)มีโมโนโครเมเตอร์ 2 อัน แสงที่ออกจากโมโนโครเมเตอร์ จะสลับกันส่องผ่านไปยังแนวแยกของสาร

densitometer เหล่านี้ สามารถวัดแสงที่ความยาวคลื่นได้ในช่วงยูวี จนถึงช่วงแสงที่ตามองเห็นได้ (visible spectrum)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การเปรียบเทียบเทคนิคธินแลร์โครมาโทกราฟี และ เทคนิคไฮเพอฟอร์แมนซ์ธินแลร์โครมาโทกราฟี

Fennimore และ Davis (37) ได้ทำการเปรียบเทียบเทคนิค TLC และ HPTLC ไว้ดังนี้

พารามิเตอร์ (Parameter)	TLC	HPTLC
ปริมาตรสารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)	1-5	0.1-0.2
เส้นผ่าศูนย์กลางของจุดสารเริ่มต้น (มิลลิเมตร)	3-6	1-1.5
เส้นผ่าศูนย์กลางของจุดสารที่แยกตัว (มิลลิเมตร)	6-15	2-5
ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย (เซนติเมตร)	10-15	3-6
เวลาที่ใช้ในการแยก (นาที)	30-200	3-20
Plate Height (um)	30	12
Effective Theoretical Plates	<600	<5000
Separation Number	10	10-20
ค่าเฉลี่ยของขนาดเม็ดตัวดูดซับ (ไมโครเมตร)	20	5
ค่าการกระจายเม็ดตัวดูดซับ (ไมโครเมตร)	10-60	หนาแน่นเท่ากันตลอด
ความหนาของชั้นตัวดูดซับ (Absorbent Layer)	100-250	200
ขีดจำกัดการวิเคราะห์, การดูดกลืนแสง (นาโนกรัม)	1-5	0.1-0.5
ขีดจำกัดการวิเคราะห์, ฟลูออเรสเซนต์ของสาร (นาโนกรัม)	50-100	5-10
จำนวนจุดสารในหนึ่งแผ่น	10	36