บทที่ 5

Preparative Thin-layer Chromatography (PLC)

5.1 บทนำ

Thin-layer chromatography (TLC) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการกระจายของสารระหว่างภาคนิ่งซึ่งเป็นตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็งและตัวทำละลายซึ่งเป็นภาคเคลื่อนที่ที่เคลื่อนผ่านตัวดูดซับ TLC จึงจัดเป็น solid-liquid adsorption chromatography เช่นเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี แต่เดิม TLC ใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยเพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์สารโดยเปรียบเทียบ R_f ของสารกับสารแท้(authentic sample) TLC ยังใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการแยกสารผสมที่มีปริมาณมากโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

5.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-layer chromatography หรือ TLC)

TLC เป็นแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกแข็ง (ขนาด 5 x 10 ซม^2 หรือ 5 x 20 ซม^2) เคลือบด้วยตัวดูดซับเป็นชั้นบางๆ (หนาขนาด 0.25-0.3 มม.) ตัวดูดซับที่ใช้กับ TLC มีขนาดอนุภาคเล็กกว่าที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี ชนิดของตัวดูดซับที่ใช้ก็เช่นเดียวกับที่ใช้กับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา คิเซลกัวร์ (kieselguhr) และผงเซลลูโลส เป็นต้น ตัวดูดซับเหล่านี้มักมีสารเรืองแสงผสมอยู่ เพื่อใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยมองภายใต้แสง UV

วิธีการของ TLC แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมแผ่น TLC
2. การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC
3. การพัฒนาให้เกิดการแยกสารบนแผ่น TLC (Developement of TLC plate)
4. การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)
5. การคำนวณหาค่า R_f

5.2.1 การเตรียมแผ่นTLC

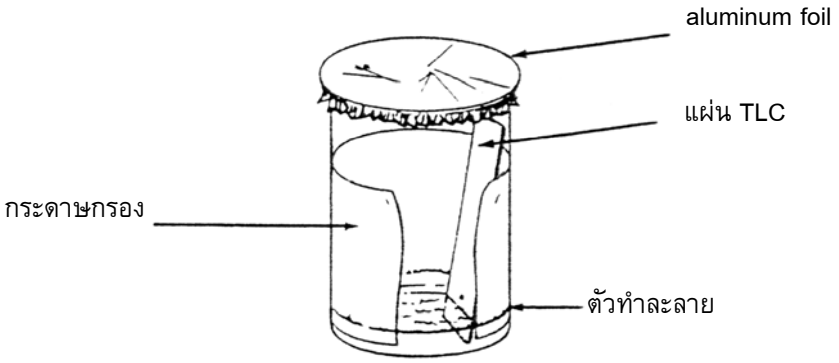
นำตัวดูดซับมาผสมกับน้ำทำเป็นสเลอร์รี่ (slurry) สัดส่วนของตัวดูดซับกับตัวทำละลายทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำสเลอร์รี่ที่ผสมกันดีแล้วมาเคลือบเป็นชั้นบางๆ บนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติกที่สะอาดและแห้ง ตัวดูดซับมักมีตัวยึด (binder) เช่น calcium sulfate (Plaster of Paris) หรือแป้งผสมอยู่เล็กน้อยเพื่อให้ตัวดูดซับยึดกับแผ่นแก้วหรือพลาสติก แผ่น TLC อาจเตรียมในห้องปฏิบัติการก่อนใช้หรือซื้อแผ่น TLC ที่ผลิตสำเร็จรูปมาใช้

5.2.2 การจุดสารตัวอย่างบนแผ่น TLC

ใช้หลอดแคปิลลารี(capillary)ขนาดเล็กมาดูดสารละลายของสารตัวอย่าง แล้วจุดบนแผ่น TLC ควรจุดให้ห่างจากขอบล่างประมาณ 1.5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางของจุดไม่ควรเกินกว่า 2 มม. รอให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้งก่อนทำขั้นตอนต่อไป

5.2.3 Development ของ แผ่น TLC (Development of TLC plate)

นำแผ่น TLCที่จุดสารตัวอย่างแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยให้ตำแหน่งจุดอยู่เหนือตัวทำละลาย ภายในภาชนะแก้วควรใส่กระดาษกรอง (รูปที่ 5.1) และปิดฝาภาชนะให้สนิทเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นด้านบนได้เร็วขึ้น เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบน ให้นำแผ่น TLC ออกพร้อมกับขีดแนวของตัวทำละลาย (solvent front) ก่อนที่ตัวทำละลายจะแห้ง ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่มีส่วนสำคัญต่อการคำนวณค่า R_f



รูปที่ 5.1 Development ของแผ่น TLC

5.2.4 การตรวจหาจุดบนแผ่น TLC (Visualization)

การตรวจหาตำแหน่งของจุดบนแผ่น TLC จะง่ายมากถ้าเป็นสารประกอบที่มีสี แต่ถ้าเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี มีวิธีการตรวจหาได้หลายวิธีดังนี้

1. มองแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ในที่มืด สารประกอบที่เกิดฟลูออเรสเซนส์ จะเกิดความสว่างมากภายใต้แสง UV เครื่องที่ให้กำเนิดแสง UV เรียกว่า Ultraviolet lamp ตัวดูดซับมักมีสารเรืองแสงซึ่งเป็นสารผสมของ cadmium sulfide และ zinc sulfide ปนอยู่ ดังนั้นเราจะสังเกตเห็นแสงสีเขียวสว่างทั่วแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ในที่มืด ถ้าสารตัวอย่างดูดกลืนแสง UV แสง UV ตรงตำแหน่งที่สารอยู่จะถูกดูดกลืน ทำให้ตำแหน่งดังกล่าวมืดลงและเห็นเป็นจุดมืด ถ้าสารตัวอย่างเป็นสารเรืองแสงและเรืองแสงเป็นสีอื่นที่ไม่ใช่สีเขียว ก็ช่วยให้สังเกตง่ายขึ้น

2. นำแผ่น TLC มาใส่ในภาชนะที่มีผลึกของไอโอดินอยู่ ถ้าทิ้งแผ่น TLC ไว้ จะเห็นจุดสีน้ำตาลเกิดบนแผ่นTLC จุดสีน้ำตาลเกิดจากสารประกอบอินทรีย์(ยกเว้น alkanes และ alkyl halides) เกิดโมเลกุลเชิงซ้อนกับไอโอดิน

3. ฉีดพ่นแผ่น TLC ด้วยสารเคมี เช่น กรดซัลฟุริกเข้มข้น , กรด H_2SO_4 + HNO_2 , H_2SO_4 + $Na_2Cr_2O_7$ หรือ H_2SO_4 + $K_2Cr_2O_7$ เมื่อฉีดแล้วให้ความร้อนกับแผ่น TLC ที่ 100 ^{O}ซ เป็นเวลา 2-3 นาที จะเห็นจุดดำบริเวณที่มีสารตัวอย่างอยู่

4. การตรวจสอบกรดอะมิโน ให้ฉีดพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน(ninhydrine) จะเห็นเป็นจุดสีม่วงปรากฏตรงบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่

5. การตรวจสอบ alkyl halides ให้ฉีดพ่นสารละลายเจือจางของ silver nitrate บนแผ่น TLC จะเกิด silver halides Silver halides จะสลายตัวเมื่อถูกแสง ทำให้เกิดจุดดำ (เป็น Ag อิสระ) บนแผ่น TLC

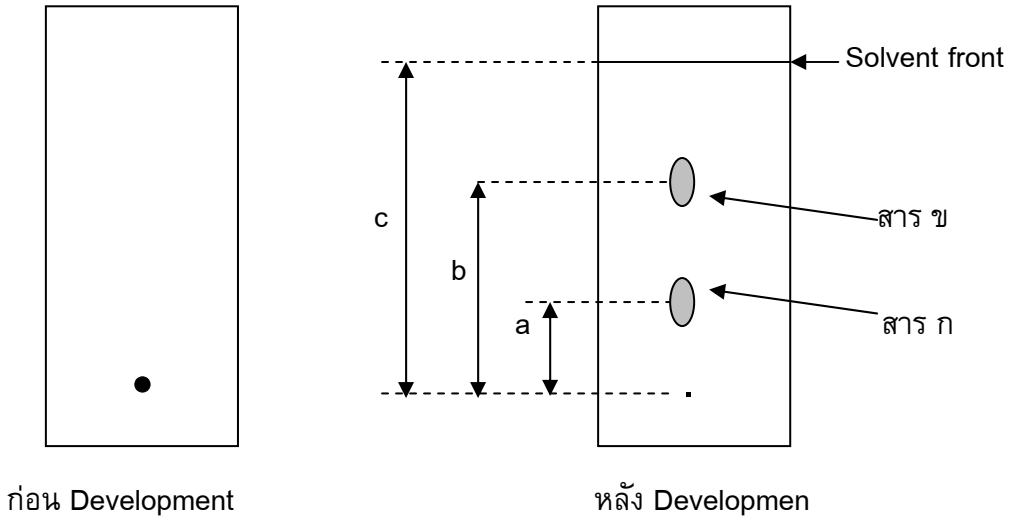
5.2.5 การคำนวณหาค่า R_f

ค่า R_f เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่างๆ (ตัวดูดซับ , ตัวทำละลาย และความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด ค่านี้แปรเปลี่ยนได้ถ้าสภาวะในการทดลองเปลี่ยน

ค่า R_f ถูกนิยามไว้ดังนี้ :

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

การพิสูจน์ว่าสารเป็นตัวเดียวกันหรือไม่โดยการเปรียบเทียบค่า R_f ระหว่างสาร ควรใช้ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบโดยใช้ตัวทำละลายหลายๆ ระบบ สารประกอบต่างชนิดกันอาจมีค่า R_f เหมือนกันในตัวทำละลายหนึ่ง แต่จะมี R_f ที่แตกต่างกันในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งแน่นอน (รูปที่ 5.2)



$$R_f \text{ (สาร ก)} = \frac{a}{c}$$

$$R_f \text{ (สาร ข)} = \frac{b}{c}$$

รูปที่ 5.2 การคำนวณค่า R_f

5.3 การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยใช้แผ่น TLC

ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นภาคเคลื่อนที่ อาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือเป็นตัวทำละลายผสม การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมควรทำอย่างมีระบบดังนี้ จุดสารตัวอย่างที่เป็นสารผสมลงบนแผ่น TLC หลายๆ แผ่น เลือกตัวทำละลายหลายๆ ระบบ เช่น ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน อีเทอร์ และเมทานอล ตามลำดับ (ตัวทำละลายเรียงลำดับจากสภาพขั้วต่ำไปยังสภาพขั้วสูง) แล้ววางแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างแล้วลงในตัวทำละลายแต่ละชนิดๆ ละ 1 แผ่น หาค่า R_f ของแต่ละแผ่นในตัวทำละลายที่ต่างกัน เลือกตัวทำละลายที่สามารถให้ผลการแยกที่ชัดเจน

5.4 ประโยชน์ของ TLC

1. ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยการเปรียบเทียบค่า R_f ของสารตัวอย่างกับสารแท้ (authentic sample) เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารตัวเดียวกัน ในงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์สาร ถ้าต้องการพิสูจน์ว่า ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเป็นสารที่ต้องการหรือไม่ ให้หาสารตัวเดียวกันนี้ที่ได้จากปฏิกิริยาอื่นมาจุดบนแผ่น TLC เทียบกับสารที่เกิดจากปฏิกิริยา ก็จะทราบว่าปฏิกิริยาที่วางแผนไว้ได้ผลตามที่ต้องการหรือไม่ เป็นวิธีตรวจสอบผลขั้นต้นที่รวดเร็วกว่าวิธีอื่น

2. ใช้ตรวจสอบความก้าวหน้าของปฏิกิริยาโดยหาค่า R_f ของสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ เมื่อเวลาผ่านไปสารตั้งต้นย่อมมีปริมาณน้อยลง ส่วนผลิตภัณฑ์ย่อมมีมากขึ้น เราสามารถใช้ TLC ตรวจสอบระยะเวลาที่ปฏิกิริยาเกิดจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

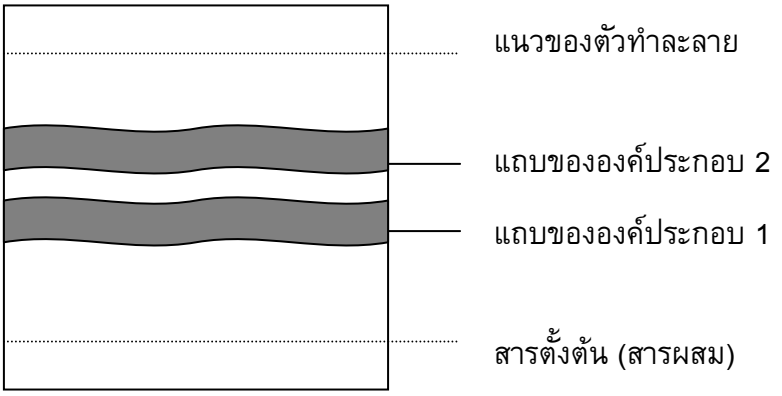
3. ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่บริสุทธิ์ย่อมให้จุดเพียงจุดเดียวบนแผ่น TLC ในทุกระบบตัวทำละลาย

4. ใช้หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

5.5 Preparative thin-layer chromatography (PLC)

PLC เป็นแผ่น TLC ขนาดใหญ่และหนาขึ้น มีขนาด 20 x 20 ซม^2 ถึง 20 x 40 ซม^2 ความหนาของตัวดูดซับอาจเคลือบหนาถึง 1.5 มม. PLC สามารถใช้แยกสารได้ถึง 2 กรัม โดยทั่วไป แผ่น PLC ขนาด 20 x 20 ซม^2 1 แผ่นอาจแยกสารได้ถึง 50-100 มิลลิกรัมทั้งนี้ขึ้นกับความซับซ้อนของสารผสม ถ้ามีสารหลายตัวและมี R_f ใกล้กัน สารที่จะแยกควรใช้ให้น้อยลงสำหรับการแยกในแต่ละแผ่น

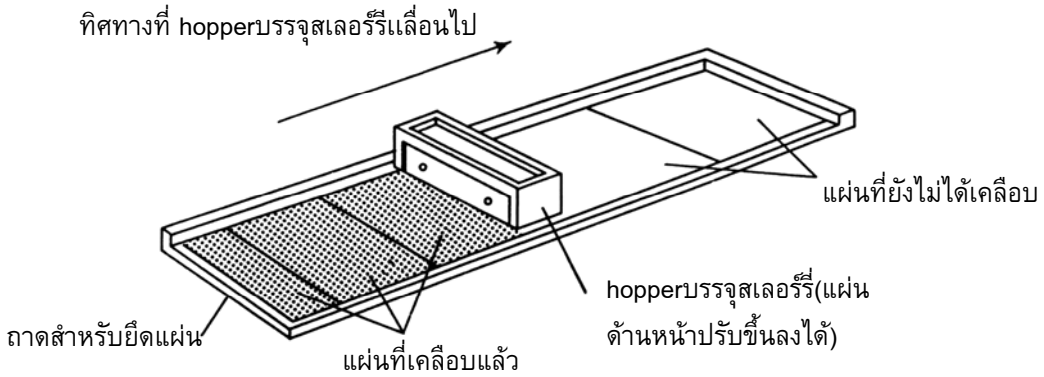
ในแผ่น PLC สารจะถูกแยกเป็นแถบ(รูปที่ 5.3) ถ้าเป็นสารประกอบไม่มีสีให้ตรวจสอบภายใต้แสง UV ทำเครื่องหมายบริเวณแถบเหล่านี้ และขูดตัวดูดซับของแต่ละแถบออกนำไปละลายในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง



รูปที่ 5.3 แผ่น PLC แสดงแถบของสารหลังจากแยกแล้ว

5.5.1 การเตรียมแผ่น PLC

เครื่องมือที่ใช้เคลือบตัวดูดซับเรียกว่า plate spreader (รูปที่ 5.4) การเตรียมแผ่น PLC ทำได้โดยนำแผ่นกระจกที่แห้งและสะอาดมาวางเรียงบนถาดซึ่งมีกรอบยึดแผ่นกระจกไว้ ผสมตัวดูดซับกับน้ำทำเป็นสเลอร์รี (slurry) สัดส่วนของตัวดูดซับกับน้ำให้เป็นไปตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต นำตัวดูดซับที่เตรียมเป็นสเลอร์รีมาใส่ใน hopper ซึ่งมีลักษณะเป็นกล่องสี่เหลี่ยมที่มีด้านบนและด้านล่างเปิด (ดูรูปที่ 5.4) แผ่นกั้นด้านหน้าของกล่องนี้สามารถขยับขึ้นลงได้เพื่อปรับความหนาของตัวดูดซับที่จะเคลือบบนแผ่นกระจก เมื่อลาก hopper ที่บรรจุสเลอร์รีไปบนแผ่นกระจก ตัวดูดซับจะปกคลุมและเคลือบบนแผ่นกระจก นำแผ่นกระจกที่เคลือบตัวดูดซับแล้วไปเข้าตู้อบ อบที่ 110 ^{O}ซ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ควรเก็บแผ่น PLC ไว้ในตู้ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันฝุ่น และก่อนใช้ควรนำแผ่น PLC ไปอบก่อน



รูปที่ 5.4 Plate spreader ที่ใช้เตรียมแผ่น PLC

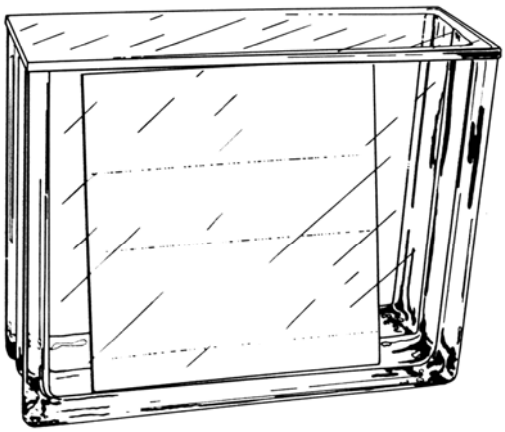
5.5.2 การ “ขีด” สารตัวอย่างบนแผ่นPLC

การ “ขีด” สารตัวอย่างลงบนแผ่น PLC ต้องเตรียมอุปกรณ์ลักษณะคล้ายพู่กันโดยพันสำลีที่ปลายลวด แล้วแยงลงไปที่ปลายล่างของปิเปตหรือหลอดหยดให้สำลีโผล่พ้นปลายล่างเล็กน้อย แล้วดึงลวดออก ใช้อุปกรณ์นี้ดูดสารตัวอย่างและขีดลงบนแผ่น PLC พยายามขีดให้เป็นเส้นบางที่สุด (5-8 มม.) โดยไม่ขูดเอาตัวดูดซับออก ขีดซ้ำจนสารตัวอย่างหมด เส้นที่ขีดควรห่างจากขอบล่างของแผ่นไม่ต่ำกว่า 2 ซม. แผ่น PLC 1 แผ่น ขนาด 20 x 20 ซม^2 ในกระบวนการ แอดซอปชันสามารถแยกสารผสมประมาณ 50 มิลลิกรัม

5.5.3 Development ของแผ่น PLC (Development of PLC)

ใส่แผ่น PLC ที่ “ขีด” สารไว้แล้วลงไปในภาชนะแก้วหรือแทงค์ที่มีฝาปิดสนิท (รูปที่ 5.5) ภายในแทงค์ใส่แผ่นกระดาษกรองชิดผนังของแทงค์ ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาเพื่อให้ภายในแทงค์อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ทดลองหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมจากแผ่นTLC ตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกสารผสมได้ดีกับแผ่นTLC ก็จะให้ผลการแยกที่คล้ายคลึงกันกับแผ่นPLC ด้วย ควรเลือกระบบตัวทำละลายที่ทำให้สารตัวที่เคลื่อนที่เร็วที่สุด มีค่า R_f ต่ำกว่า 0.5 ในการพัฒนาแถบเพียงครั้งเดียว ถ้าการพัฒนาแถบครั้งแรกไม่สามารถแยกสารออกจากกัน ให้ทำการพัฒนาซ้ำ การพัฒนาแถบหลายครั้งเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถแยกสารผสมที่มี R_f ใกล้เคียงกันออกจากกัน



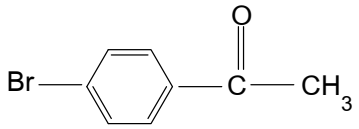
รูปที่ 5.5 ภาชนะแก้วหรือแทงค์สำหรับพัฒนาแถบบนแผ่น PLC

การทดลองที่ 5

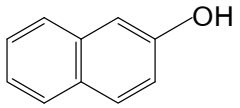
การแยกสารผสมของพารา-โบรโมอะซิโตฟีโนน(p-bromoaceto-phenone) และเบต้า-แนฟทอล(β-naphthol) โดย Preparative Thin-layer Chromatography

วิธีทดลอง

ก. การทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับแยกสารผสมของพารา-โบรโมอะซิโต ฟีโนน (p-bromoacetophenone) และเบต้า-แนฟทอล (β-naphthol) โดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี



p - bromoacetophenone



β - Naphthol

ใช้ปิเปตดูดสารละลายของสารตัวอย่าง (ซึ่งประกอบด้วยพารา-โบรโมอะซิโตฟีโนน 2 กรัม และเบต้า-แนฟทอล 2 กรัมในคลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตร) 2.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดแก้ว ใช้หลอดแคพิลลารี (capillary) จุ่มสารตัวอย่าง แล้วจุดบนแผ่น TLC ขนาด 5 x 10 ซม^2 หลังจุดสาร ให้ส่องดูภายใต้แสง UV ถ้าจุดไม่ชัดเจน ให้จุดซ้ำอีก ขนาดของจุดไม่ควรเกิน 2 มิลลิเมตร

ตัวทำละลายที่ใช้พัฒนาแถบมีหลายชนิด ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ , ไดคลอโรมีเทน , คลอฟอร์ม , เอธีลอะซิเตต เป็นต้น นักศึกษาจะต้องทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกพารา-โบรโมอะซิโตฟีโนนและเบต้า-แนฟทอล โดยแต่ละกลุ่มจะทดลองแยกสารด้วยตัวทำละลายเพียง 1 ชนิดบนแผ่น TLC นักศึกษาแต่ละกลุ่มจะนำตัวทำละลายที่กำหนดให้ไปใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร แล้วใส่แผ่นกระดาษกรองโดยรอบ (ดูรูปที่ 5.1) ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ รอให้ตัวทำละลายค่อยๆ ซึมขึ้นมาบนกระดาษกรองสัก 2-3 นาที จนภายในบีกเกอร์อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย จากนั้นใส่แผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างและแห้งแล้วลงไป

ในบีกเกอร์ (ระวังอย่าให้ตัวทำละลายท่วมจุดของสาร) ปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ให้มิดชิด และมิให้มีการรบกวนขณะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นมา ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นมาจนประมาณ 3/4 ความสูงของแผ่น TLC นำแผ่น TLC ออกแล้วทำเครื่องหมายแนวของตัวทำละลาย(solvent front) นำแผ่นTLCที่แห้งแล้วไปส่องภายใต้แสงUV ทำเครื่องหมายตำแหน่งของจุดต่างๆ บนแผ่น TLC วัดระยะที่สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่เพื่อใช้คำนวณค่า R_f (รูปที่ 5.2) นำค่า R_f ที่คำนวณได้ (ของแต่ละกลุ่ม) ไปกรอกบนกระดาน นำผลการทดลองของทุกกลุ่มมาพิจารณาเพื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายที่เหมาะสมคือตัวทำละลายที่สามารถแยกสาร 2 ตัวออกจากกันได้ดีโดยที่จุด 2 จุดมีระยะห่างกันพอ สมควร ตัวทำละลายที่สามารถแยกสารผสมได้ดีใน TLC จะมีความสามารถในการแยกคล้าย คลึงกันใน PLC เมื่อเลือกระบบตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกดีที่สุดได้แล้วให้ใช้ระบบตัวทำละลายดังกล่าวสำหรับแยกสารผสมในแผ่น PLC ต่อไป

ข. การแยกสารผสมของพารา-โบรโมอะซิโตฟีโนนและเบต้า-แนฟทอลโดยใช้ PLC (Preparative thin-layer Chromatography)

ก่อนอื่นให้นักศึกษาเตรียมอุปกรณ์ลักษณะคล้ายพู่กัน (หัวข้อ 5.5.2) นำอุปกรณ์ดังกล่าวมาดูดสารตัวอย่าง แล้ว “ขีดเส้น” ลงบนแผ่น PLC ที่มีซิลิกาเจลเคลือบอยู่อย่างแผ่วเบา (ห้ามใช้ดินสอขีดเส้นบนแผ่น PLC เพราะปลายแหลมของดินสออาจขูดเอาตัวดูดซับบางส่วนออกมา) และควร ” ขีด“ ให้เป็นเส้นบางที่สุดเท่าที่ทำได้ (ความหนาของเส้นไม่ควรเกิน 8 มม.) เส้นที่ขีดควรห่างจากขอบล่างของแผ่น PLC ไม่น้อยกว่า 2 ซม. แต่ละครั้งที่ขีดสารตัวอย่างลงบนแผ่น PLC ควรรอให้ตัวทำละลายที่ขีดก่อนหน้านี้แห้งเสียก่อนและเนื่องจากสารตัวอย่างที่ใช้แยกมีปริมาณน้อย จึงควรพยายามขีดสารลงบนแผ่น PLC ให้หมดโดยกลั้วหลอดบรรจุสารตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม 2-3 ครั้งๆละ 0.1-0.2 มล. เพื่อไปละลายสารตัวอย่างที่แห้งติดอยู่ในหลอดแล้วขีดต่อจนสารหมด เมื่อ “ขีด” สารทั้งหมดลงบนแผ่น PLC แล้วนำไปเป่าให้แห้งในตู้ควัน ใส่ตัวทำละลายที่เลือกลงไปในแทงค์ แล้วใส่กระดาษกรองขนาด 20 x 20 ซม.^{2}สองแผ่นวางแนบผนังด้านในแทงค์สองด้าน ให้ตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษกรองให้ชุ่มก่อน นำแผ่น PLC ที่ขีดสารตัวอย่างและแห้งแล้วลงในแทงค์ แทงค์ 1 อันใส่แผ่น PLC ได้ 2 แผ่น โดยวางหงายให้ตัวดูดซับอยู่ด้านบนแล้วพิงไปด้านข้าง 2 ด้านๆ ละแผ่น ปิดฝาให้มิดชิด รอให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นมาจนเกือบถึงขอบบน นำแผ่น PLC ออกจากแทงค์แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้งในตู้ควัน

นำแผ่น PLC ที่แห้งแล้วไปส่องภายใต้แสง UV ขีดเส้นกั้นบริเวณที่มีแถบของสารทั้งสองตัวอยู่ ขูดตัวดูดซับบริเวณที่มีสารอยู่ออกโดยใช้มีดโกนหรือ spatula ลงไปในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 อัน เพื่อมิให้สับสนนักศึกษาควรเขียนระบุแถบที่ถูกต้องไว้ข้างบีกเกอร์ ใส่เมทานอลลงไปละลายสารทั้งสองตัวออกจากตัวดูดซับที่ขูดออก แล้วกรองใส่บีกเกอร์อีก 2 อัน**ที่ชั่งไว้แล้ว** นำบีกเกอร์ที่มีสารละลายของสารไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง ชั่งน้ำหนักของแต่ละบีกเกอร์ที่มีสารอยู่ เอาน้ำหนักที่ได้ไปลบน้ำหนักของบีกเกอร์ออก จะได้น้ำหนักของสารแต่ละตัว นำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้ และหาจุดหลอมเหลวของสารทั้งสองตัว

จากจุดหลอมเหลวของสารทั้ง 2 ตัว นักศึกษาสามารถสรุปได้ว่า แถบบนและแถบล่างของแผ่น PLC เป็นของสารใด สารตัวไหนที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า เพราะเหตุใด

คำถามท้ายบท

1. Adsorption และ Partition chromatography ต่างกันอย่างไร
2. ในกระบวนการ adsorption สารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วสูงจะเคลื่อนที่ไปกับตัวทำละลายเร็วหรือช้ากว่าสารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วต่ำ
3. TLC มีประโยชน์อย่างไร
4. ในการแยกด้วย TLC เหตุใดจึงไม่ให้ระดับของตัวทำละลายอยู่เหนือจุดของสาร
5. เหตุใดจึงต้องรีบขีดแนวของตัวทำละลายหลังจากเอาแผ่น TLC ออก
6. ในขบวนการ adsorption chromatography สารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วสูงจะเคลื่อนที่ไปกับภาคเคลื่อนที่ (ตัวทำละลาย) เร็วหรือช้ากว่าสารตัวอย่างที่มีสภาพขั้วต่ำกว่า
7. จงเขียนสูตรโครงสร้างของพารา-โบรโมอะซิโตฟีโนนและเบต้า-แนฟทอล ในการทดลองเรื่อง “PLC” นี้ สารสองตัวนี้ตัวไหนเคลื่อนที่เร็วกว่า(แถบบน)
8. ในการแยกสารผสมพารา-โบรโมอะซิโตฟีโนนและเบต้า-แนฟทอลด้วย PLC ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกคืออะไร