บทที่ 4
ลิควิดโครมาโตกราฟี
(Liquid Chromatography)

ลิควิดโครมาโตกราฟี คือ เทคนิคการทำโครมาโตกราฟีที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ส่วนเฟสอยู่กับที่จะเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ถ้าเป็นของแข็งจะเรียกว่า Liquid-Solid Chromatography (LSC) ถ้าเป็นของเหลวจะเรียกว่า Liquid-Liquid Chromatography (LLC) ลิควิดโครมาโตกราฟีสามารถแบ่งตามเทคนิคของการวิเคราะห์ได้อีกหลายวิธี ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1.2 ดังนั้นในบทนี้จะขอกล่าวถึง เทคนิค และวิธีการวิเคราะห์ของแต่ละวิธีไว้เพื่อความเข้าใจ ยกเว้นวิธี ion exchange chromatography จะขอกล่าวรายละเอียดไว้ในบทที่ 5

เพลนโครมาโตกราฟี (Plane chromatography)

ในสมัยโบราณชาวโรมันรู้จักวิธีการทดสอบของเหลวว่ามีสารมีสี (dyes and pigments) ผสมอยู่หรือไม่ โดยการหยดของเหลวนั้นลงบนแผ่นกระดาษหรือผ้า ถ้าของเหลวนั้นมีสารที่มีสีผสมอยู่ จะเกิดการแพร่กระจายเป็นวงกลมของแถบสีที่สังเกตเห็นได้ ต่อมาประมาณ 120 ปีล่วงมาแล้ว นักเคมีชาวเยอรมันได้ปรับปรุงเทคนิคนี้ให้มี reproducibility ดีขึ้น เพื่อใช้ในงานวิเคราะห์ทางปริมาณ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ก็ยังไม่เป็นที่ยอมรับกัน จนกระทั่งในช่วง 50 ปีที่ผ่านมา P. Martin และผู้ร่วมงานได้ค้นพบกรรมวิธีของโครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน (Partition chromatography) ทำให้สามารถจัดวิธีการวิเคราะห์นี้ เป็นชนิดหนึ่งของโครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน ซึ่งเรียกว่า เปเปอร์โครมาโตกราฟี (PC) โดยมีความชื้นในกระดาษทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ จึงทำให้ในระยะหลังเทคนิคของการวิเคราะห์แบบเปเปอร์โครมาโตกราฟีได้รับความนิยม และนำมาใช้งานมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานทางด้านชีวเคมี

หลังจากที่รู้จักเทคนิคของเปเปอร์โครมาโตกราฟี และคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้ว นักวิทยาศาสตร์ได้พบปัญหาในการแยกสารโดยใช้คอลัมน์ คือ เมื่อแยกสารออกจากกันได้แล้ว โดยเห็นเป็นแบนด์ในคอลัมน์ จะไม่สามารถตัดเอาส่วนที่แยกได้นั้นออกจากคอลัมน์ได้ ถ้าต้องการได้ส่วนที่แยกนั้น ต้องหาตัวทำลายที่เหมาะสม อีลูทมันออกจากคอลัมน์ ซึ่งทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองตัวทำละลาย เมื่อพิจารณาเทคนิคของการทำคอลัมน์ พบว่าสารตัวอย่างที่

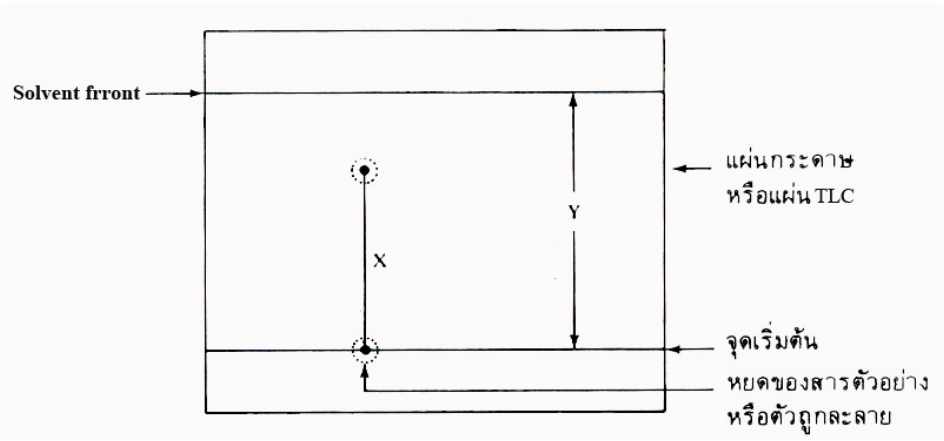
ทฤษฎีและหลักการทั่วๆ ไปของโครมาโตกราฟี ที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 สามารถนำมาอธิบายในเพลนโครมาโตกราฟีได้เช่นกัน กล่าวคือ สารตัวอย่างหรือตัวถูกละลายสามารถเกิดสมดุลระหว่างเฟสทั้งสองได้ตามกฎของการกระจาย คือ

$$K_d = \frac{C_s}{C_m} \qquad \text{.....(4.1)}$$

เมื่อหยดสารตัวอย่างลงบนแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC ถ้าสารตัวอย่างนั้นประกอบด้วยสารหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีค่า K_d ต่างกัน หลังจากที่ทำให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไปตามเพลนพบว่า หยดของสารตัวอย่างนั้นสามารถเคลื่อนที่ไปตามเพลนได้ด้วยแรงขับของตัวพาหรือเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเรียกว่า driving force เนื่องจากเกิด capillary action ในขณะเดียวกัน เฟสอยู่กับที่อาจจะทำหน้าที่หน่วง (retarding action) สารตัวอย่างแต่ละชนิดจะถูกขับและถูกหน่วงได้ไม่เท่ากัน ทำให้ถูกแยกออกจากกันเป็นโซนได้ ซึ่งเป็นหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี ระยะทางที่สารตัวอย่างหรือตัวถูกละลายเคลื่อนที่ได้ เรียกว่า ค่ารีเทนชัน องศาของรีเทนชัน (degree of retention) ในการทำเพลนโครมาโตกราฟีสามารถแสดงได้ในเทอมของ retardation factor (R_f)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad .....(4.2)$$

การวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายให้วัดที่จุดกึ่งกลางของหยดสารตัวอย่างจากจุดเริ่มต้นถึงจุดที่เคลื่อนที่มาถึง สำหรับระยะทางของตัวทำละลายจะเริ่มวัดจากจุดเริ่มต้นเมื่อตัวทำละลายเริ่มพาตัวถูกละลายให้เคลื่อนที่จนถึงจุดที่ตัวทำละลายหยุดเคลื่อนที่ ซึ่งเรียกว่า Solvent front ดังแสดงในรูปที่ 4.1

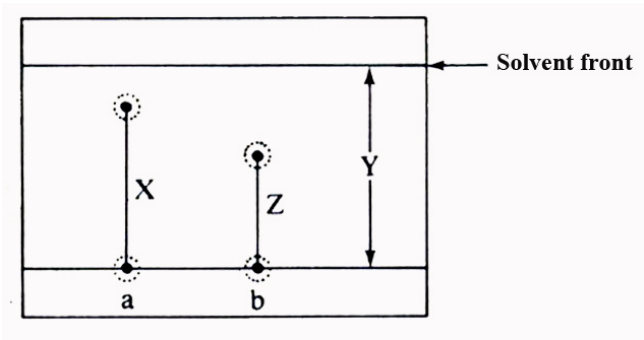


รูปที่ 4.1 แสดงระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย

จากรูปแสดงว่า $R_f = \frac{X}{Y}$

R_f เป็นค่าคงที่สำหรับสารชนิดหนึ่ง ๆ ที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ และตัวทำละลายชนิดหนึ่งๆ ดังนั้น การคำนวณหาค่า R_f จะทำให้สามารถชี้บอกได้ว่าสารตัวนั้นคืออะไร ทำให้สามารถทำการวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ (Qualitative) แต่เนื่องจากตัวถูกละลายมีมากมาย หลายชนิด และบางชนิดอาจมีค่า R_f ใกล้ๆ กันหรือเท่ากัน จึงไม่สามารถใช้ค่า R_f ที่ได้จากการทดลองเพียงครั้งเดียว บอกได้ว่าสารตัวอย่างนั้นคืออะไร การทดลองควรทำหลายครั้งโดยเปลี่ยนตัวทำละลายและทำเทียบกับสารมาตรฐาน ถ้าได้ค่า R_f ของสารตัวอย่าง และสารมาตรฐานเท่ากันทุกครั้ง ก็ยืนยันได้ว่าสารตัวอย่างคือสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน หรืออาจใช้วิธีผสมสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานเข้าด้วยกัน แล้วทำการทดลองโดยเปลี่ยนตัวทำละลาย 2-3 ชนิด ถ้าได้โซนเพียงโซนเดียวทุกครั้ง จะยืนยันได้ว่าสารตัวอย่างคือสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานเช่นกัน จะเห็นได้

การใช้ค่า R_f ของตัวถูกละลายสำหรับการวิเคราะห์ทางคุณภาพตามวิธีที่กล่าวมา พบว่ามีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้บ้าง เนื่องจากการวัดระยะทางของตัวทำละลายเพราะบางที Solvent front ที่ได้มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง การใช้ค่า R_f จึงได้ผลไม่ดีนัก วิธีที่ดีคือใช้ค่า R_f สัมพัทธ์ ซึ่งหาได้จากระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่ (สารมาตรฐานคนละชนิดกับสารตัวอย่าง) ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงการทำโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างคู่กับสารมาตรฐาน

a คือสารตัวอย่าง X คือระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่

b คือสารมาตรฐาน Z คือระยะที่สารมาตรฐานเคลื่อนที่

ค่า R_f สัมพัทธ์ $(R_f)_r$ มีค่าดังนี้

$$(R_f)_r = \frac{X}{Z} \qquad \text{.....(4.3)}$$

$\frac{X}{Z}$ เป็นค่าที่ใช้เปรียบเทียบในการวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ดีกว่า ค่า R_f เพราะมี reproducibility ดีกว่า

สำหรับประสิทธิภาพในการแยกและทฤษฎีของเพลตสามารถอธิบายได้แบบเดียวกับโครมาโตกราฟีแบบทั่วๆ ไป ในกรณีที่สาร 2 ชนิด มีค่า R_f ต่างกันน้อยกว่า 0.05 พบว่าการแยกสารสองชนิดออกจากกันนั้นเป็นไปไม่ได้

สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f และค่า K_d ได้โดยมีหลักการพิจารณาดังนี้ คือ ระยะทางเฉลี่ยที่โมเลกุลของตัวถูกละลายเคลื่อนที่ได้จะแปรผันโดยตรงกับความเร็ว ซึ่งความเร็วของการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายต่อความเร็วของการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ได้นั้นสัมพันธ์โดยตรงกับเศษส่วนของเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ เศษส่วนเวลาที่ตัวถูกละลายที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่สามารถแสดงได้ในเทอมของจำนวนโมเลกุลของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ต่อจำนวนโมเลกุลของตัวถูกละลายที่มีอยู่ทั้งหมดนั่นคือ

$$R_f = \frac{\text{จำนวนโมเลกุลของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่}}{\text{จำนวนโมเลกุลทั้งหมด}}$$

$$= \frac{C_m A_m}{C_m A_m + C_s A_s} \qquad \text{.....(4.4)}$$

เมื่อ A_m และ A_s คือพื้นที่หน้าตัดของเฟสทั้งสองที่วัดได้บนแผ่นกระดาษหรือแผ่น TLC

นำค่า C_m หารทั้งเศษและส่วนในสมการที่ 4.4

$$\therefore \quad R_f = \frac{A_m}{A_m + A_s \frac{C_s}{C_m}} \qquad \text{.....(4.5)}$$

จากสมการที่ 4.1 แทนค่าลงใน 4.5 จะได้

$$R_f = \frac{A_m}{A_m + K_d A_s} \qquad \text{.....(4.6)}$$

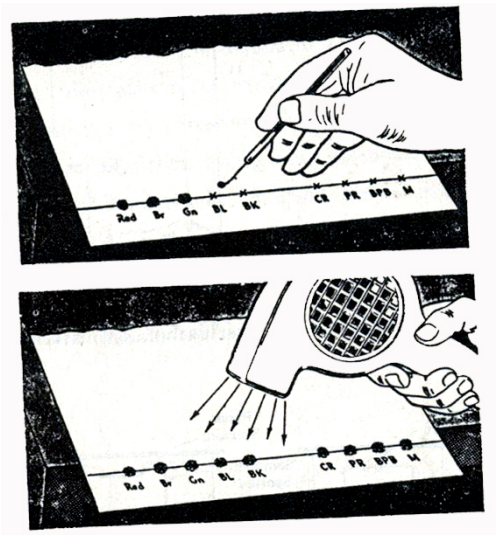
เนื่องจากพื้นที่หน้าตัดของ A_m และ A_s ในทางปฏิบัติวัดได้ยาก ดังนั้น สมการที่ 4.6 จึงไม่นิยมใช้ ใช้เพียงแสดงให้เห็นว่าค่า R_f จะมีค่าขึ้นอยู่กับค่า K_d

เปเปอร์โครมาโตกราฟี (Paper Chromatography, PC) วิธีการนี้จัดเป็นเทคนิคของ liquid-liquid chromatography หรือ partition chromatography มีเฟสอยู่กับที่คือน้ำ ซึ่งเกาะอยู่ในแผ่นกระดาษ ทำหน้าที่เป็นตัวช่วย ตามปกติในแผ่นกระดาษจะมีน้ำอยู่ประมาณ 6-12% และ

นอกจากใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาร์มาก เช่น น้ำ เป็นเฟสอยู่กับที่ตามที่กล่าวมาแล้ว สามารถกลับเฟสได้ (reversed-phase chromatography) โดยใช้สารที่มีโพลาร์น้อยคือสารจำพวก ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) เช่น ยางลาเทกซ์ น้ำมัน และซิลิโคนออยส์ เป็นต้น ฉาบลงบนแผ่นกระดาษแล้ว ใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาร์มากเป็นเฟสเคลื่อนที่แทน วิธีการโครมาโตกราฟีแบบนี้มีประโยชน์มากในการแยกกรดไขมัน (fatty acids) และสารประกอบที่ไม่มีโพลาร์ (non polar compounds)

วิธีการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี ขั้นตอนในการวิเคราะห์สามารถทำได้ดังนี้ คือ

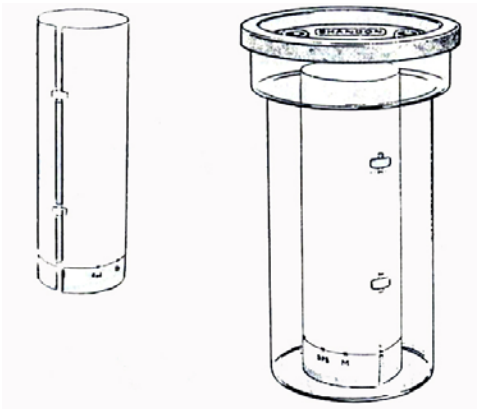
1. *การจุดสารตัวอย่าง* (Spot) จุดสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวลงบนแผ่นกระดาษที่มีขนาดพอเหมาะตามปกติใช้กระดาษกรอง เช่น กระดาษกรอง whatman No.1 ถ้า ต้องการจุดสารตัวอย่างลงไปหลายจุดให้ใช้กระดาษแผ่นใหญ่ เมื่อต้องการดีเวลลอปให้ใช้วิธีม้วนกระดาษให้เป็นทรงกระบอก แต่ถ้าต้องการจุดสาร 2-3 จุด หรือเพียงจุดเดียว ให้ใช้แผ่นกระดาษที่มีความกว้างน้อยขนาด 1.5-3 ซม. และยาว 25-30 ซม. เมื่อเริ่มต้นจุดสารตัวอย่างต้องให้ทุกจุดอยู่บนเส้นตรงเดียวกัน โดยอยู่เหนือปลายขอบล่างประมาณ 1-1.5 ซม. และต้องทำให้เป็นวงกลมที่มีขนาดเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ จากนั้นทำให้จุดของสารตัวอย่างแห้ง คือ ทำให้ตัวทำละลายระเหยไปให้หมด ดังแสดงในรูปที่ 4.3



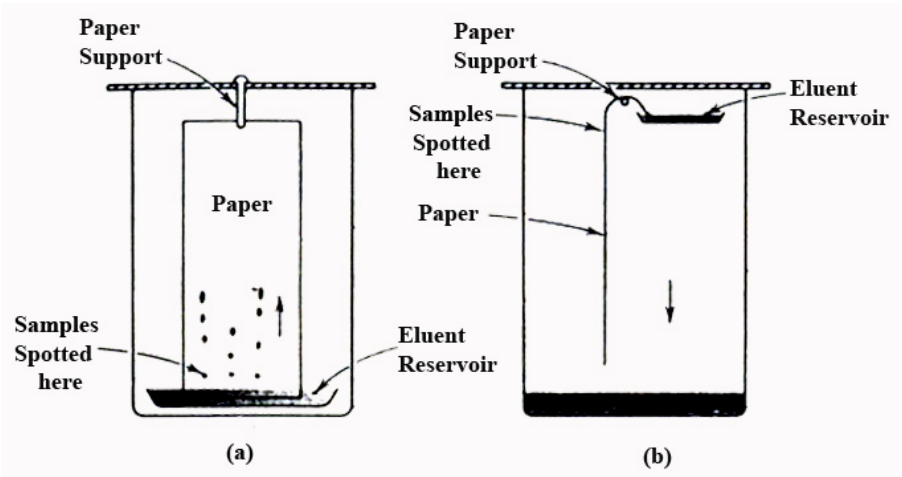
รูปที่ 4.3 แสดงวิธีการจุดสารตัวอย่างลงบนกระดาษกรองและทำให้แห้ง

2. *การดีเวลลอป* (Developing) กระดาษกรองที่จุดสารตัวอย่างเรียบร้อยแล้วสามารถนำมาทำการดีเวลลอปได้ โดยใส่ในถัง (Chamber) ที่มีตัวทำละลาย หรือ ตัวอีลูท สำหรับดีเวลลอปบรรจุอยู่ และอิ่มด้วยไอของมัน ลักษณะการใส่อาจจะม้วนกระดาษกรองเป็นทรงกระบอก ซึ่งทำให้ตั้งบนตัวทำละลายได้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.4 หรืออาจใช้เป็นแผ่นโดยมีคลิปจับให้ห้อยอยู่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.5 (a) ลักษณะของการดีเวลลอปแบบนี้เรียกว่า การดีเวลลอปแบบขึ้น (ascending development) คือ ตัวทำละลายจะเคลื่อนที่จากล่างขึ้นข้างบน

นอกจากนี้สามารถใช้วิธีการดีเวลลอปโดยให้ตัวทำละลายหรือตัวอีลูทเคลื่อนที่จากข้างบนลงข้างล่าง ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4.5 (b) เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอีลูทไหลลงข้างล่างเร็วเกินไปเนื่องจากเกิดกาลักน้ำ ที่แผ่นกระดาษตรงที่ออกจากตัวอีลูทต้องทำให้โค้งเป็นรูปตัว U



รูปที่ 4.4 การม้วนกระดาษกรองและใส่ลงในถังเพื่อทำการดีเวลลอป

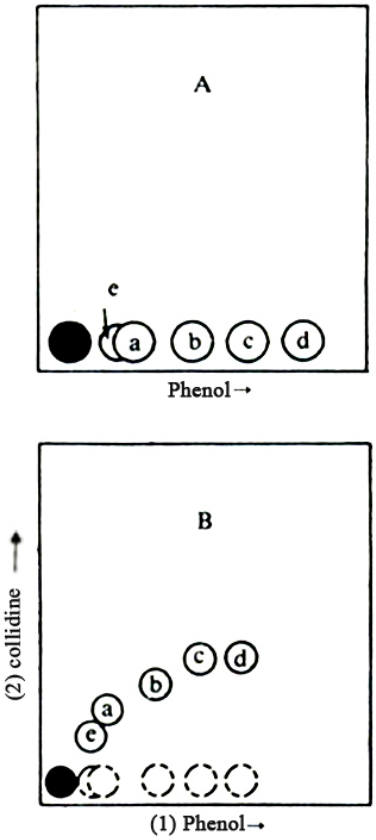


รูปที่ 4.5 a) แสดงวิธีการดีเวลลอปแบบขึ้น (ascending development)

b) แสดงวิธีการดีเวลลอปแบบลง (descending development)

การดีเวลลอปด้วยวิธีการทั้งสองแบบที่กล่าวมาเป็นการดีเวลลอปแบบมิติเดียว (one dimension) ซึ่งไม่เหมาะสำหรับการดีเวลลอปสารตัวอย่างที่มีค่า R_f ใกล้ ๆ กัน ซึ่งทำให้พิสูจน์ได้ยากว่าสารนั้นคืออะไร วิธีที่สามารถทำให้การแยกและการพิสูจน์ทำได้ดีขึ้นมีความถูกต้องแน่นอนขึ้น คือ การทำดีเวลลอปแบบ 2 มิติ (two dimension) สามารถทำได้โดยใช้ตัวอีลูท 2 ชนิด หลังจากที่จุดสารตัวอย่างลงบนแผ่นกระดาษ แล้วให้ทำการดีเวลลอปแบบเดียวกับทำ 1 มิติ เมื่อเสร็จการดีเวลลอปครั้งแรกแล้ว ต้องทำให้ตัวอีลูทตัวที่ 1 ระเหยไปจนกระดาษแห้งก่อน

90°



รูปที่ 4.6 การทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีโดยการดีเวลลอป 2 มิติ

A) เมื่อดีเวลลอปด้วยฟีนอลเพียงอย่างเดียว

B) เมื่อหมุน 90° แล้ว ดีเวลลอปต่อด้วยโคลลิดีน (collidine)

ตัวถูกละลาย a = glutamic acid

b = serine

c = threonine

d = alanine

e = aspartic acid

ตัวทำละลายหรือตัวอีลูทที่เหมาะสมในการทำ PC สำหรับสารแต่ละชนิดได้ถูกทดลองไว้แล้ว และได้ตีพิมพ์ไว้ในวารสารต่าง ๆ ตลอดจนการใช้ตัวทำละลายผสม ซึ่งไม่มีข้อจำกัดสำหรับขนาดและชนิดของสารผสม ก็ได้มีการศึกษาค้นคว้าและตีพิมพ์ไว้มากมาย ดังนั้นในการทำ PC ไม่จำเป็นต้องเสียเวลาในการทดลองหาตัวอีลูทที่เหมาะสม สามารถนำผลงานที่เคยตีพิมพ์แล้วมาใช้ได้เลย สำหรับตัวอีลูทที่ใช้มากที่สุด คือ สารละลายผสมของ แอลกอฮอล์ (เช่น เมทานอล, เอทานอล บิวทานอล ฯลฯ) กับน้ำ ถ้าใช้ตัวทำละลายที่เป็นกลางต้องมีการเติมกรดอะซิติก, กรดเกลือ หรือแอมโมเนีย ด้วย เพื่อป้องกันการเกิดหาง (tailing) ของจุดตัวอย่าง

3. *ดีเทคชัน* (Detection) เมื่อให้เวลาในการเคลื่อนที่ของตัวอีลูทและสารตัวอย่างเพียงพอแล้ว ให้ทำเครื่องหมายที่ตัวอีลูท หรือตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึง เรียกว่า Solvent front ต่อจากนั้น ทำให้ตัวทำละลายระเหยไปให้หมด ตัวถูกละลายหรือสารตัวอย่างจะเหลือติดอยู่ที่กระดาษกรอง ถ้าตัวถูกละลายเป็นสารที่มีสี ก็สามารถใช้ตาเปล่าดีเทคจุดต่าง ๆ ได้ แต่ถ้าตัวถูกละลายที่ติดอยู่ที่กระดาษกรองไม่มีสีสามารถดีเทคตำแหน่งของตัวถูกละลายที่มองไม่เห็นนี้ได้หลายวิธี ดังนี้ คือ

ก) ใช้สารที่สามารถทำปฏิกิริยากับตัวถูกละลายแล้วให้สารมีสีได้ เช่น ฉีดพ่นสารนินไฮดริน (ninhydrin) สำหรับดีเทคกรดอะมิโน ฉีดพ่นสารละลายเงินไนเตรตสำหรับดีเทคน้ำตาล เป็นต้น

ข) ใช้วิธีดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet absorbance) ผ่านแสง UV ลงไปบนแผ่นกระดาษ สารตัวอย่างจะดูดกลืนแสง UV ทำให้มองเห็นตำแหน่งของสารตัวอย่างได้ และสามารถใช้เครื่องวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนได้ ซึ่งจะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของสารตัวอย่าง

ค) ใช้วิธีดูดกลืนแสงอินฟราเรด (infrared absorbance)

ง) ทำให้สารตัวอย่างเกิดการเรืองแสง (fluorescent) หรือฉีดสารบางชนิด ให้ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างแล้วเกิดสารเรืองแสง

จ) วัดกัมมันตภาพรังสี อาจใช้สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive reagents) ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่าง แล้วนำผลที่ได้ไปวัดปริมาณรังสีกับเครื่องวัดรังสี ปริมาณรังสีจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของสารตัวอย่าง

เมื่อสามารถดีเทคตำแหน่งของสารตัวอย่างได้ก็สามารถหาค่า R_f ได้ ซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสามารถทำได้โดยวัดปริมาณความเข้มของจุดสารตัวอย่างหรือการดูดกลืนแสงเทียบกับแคลิเบร-

วิธีการเปเปอร์โครมาโตกราฟี เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อยกว่าการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี แต่มีข้อเสีย คือ เทคนิคในการปฏิบัติเพื่อให้ได้ผลดีนั้นยุ่งยากมาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นานพอสมควร วิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ทางชีวเคมีได้ดีพอๆ กับการวิเคราะห์ทางเคมีอนินทรีย์ และเคมีอินทรีย์ นอกจากนี้ ยังใช้เป็นวิธีการสำหรับควบคุมความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ทางอาหารและยาได้ด้วย

ทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-Layer Chromatography ; TLC)

หลักการและเทคนิคของการวิเคราะห์วิธีนี้เหมือนกับวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟีทุกประการ แตกต่างกันที่ตัวเพลตแทนที่จะเป็นแผ่นกระดาษ จะใช้ของแข็งดูดซับ (Sorbent) ฉาบเป็นแผ่นบาง ๆ บนแผ่นแก้วหรือพลาสติก หรือแผ่นอะลูมิเนียม ตามปกติแผ่นบาง ๆ ของของแข็งที่ฉาบบนแผ่นแก้วจะมีความหนาระหว่าง 0.10 ถึง 10 มิลลิเมตร วิธี TLC สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ได้กว้างขวางกว่าวิธี PC เพราะสามารถเลือกใช้เฟสอยู่กับที่ได้หลายชนิด สำหรับตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวอีลูทหรือสารดีเวลลอปทุกตัวที่สามารถใช้ในวิธี PC จะสามารถนำมาใช้ในวิธี TLC ได้ทั้งหมด โดยการเลือกของแข็งที่เป็นตัวดูดซับ และตัวอีลูทที่เข้าคู่กันได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม จะทำให้สามารถแยกสารได้เป็นอย่างดี ตัวอย่างของการเลือกใช้คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.1 สำหรับตัวดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่จะเป็นของแข็งที่ทำหน้าที่ดูดซับเองโดยตรง ซึ่งเป็นลักษณะของโครมาโตกราฟี แบบ LSC หรือจะเป็นของแข็งที่ฉาบด้วยตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ ซึ่งเป็นลักษณะของโครมาโตกราฟีแบบ LLC ก็ได้ ดังนั้นของแข็งที่นำมาฉาบบนแผ่นแก้วสำหรับทำ TLC จะไม่ถูกเรียกว่า Adsorbent แต่จะใช้คำว่า Sorbent ซึ่งแทนได้ทั้งสองความหมาย

ตารางที่ 4.1 คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารต่าง ๆ ด้วยวิธี TLC

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
1. Chloroplast Pigment	a. Isooctane-acetone-ether (3:1:1)-silica gel and polyamide b. Petroleum ether-benzene-$CHCl_3$-acetone-isopropanol (50:35:20:5:0.17)-cellulose c. Petroleum ether-n-propanol (99.2:0.8) followed by 20% $CHCl_3$ in petroleum ether (2 dimensional)-sucrose d. Petroleum ether-acetone (4:5)-alumina e. Petroleum ether-n-propanol (199:1)-starch f. Petroleum ether-acetone (7:3)-magnesia-celite (1:1 w/w) and hydroxyapatite g. Petroleum ether-acetone (8:2)-calcium carbonate h. Methanol Satd. with paraffin-silica gel G-$Ca(OH)_2$ (1:4) impreg with paraffin
2. 2, 4-Dinitrophenyl-hydrazone of Aldehydes and ketones	a. Hexane-ethyl acetate (4:1 or 83:2)-silica gel b. Benzene or $CHCl_3$ or ether or benzene-hexane (1:1)-alumina c. Petroleum ether-benzene mixtures containing small amounts of pyridine-$ZnCO_3$
3. Alkaroids	a. Benzene-ethanol (9:1) or $CHCl_3$-acetone-diethylamine (5:4:1)-Silica gel b. $CHCl_3$ or ethanol or cyclohexane-$CHCl_3$ (3:7) plus 0.05% diethylamine-alumina c. Benzene-heptane-$CHCl_3$-diethylamine (6:5:1:0.02) cellulose impreg with formamide

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
4. Amines	a. Ethanol (95%)-NH_3 (25%) (4:1)-silica gel. b. Acetone-heptane (1:1)-alumina c. Acetone-H_2O (99:1)-kieselguhr G
5. Sugars	a. Benzene-acetic acid-methanol (1:1:3)-silica gel buffer with boric acid b. n-propanol-conc. NH_3-H_2O (6:2:1)-silica gel G c. Butanol-pyridine-H_2O (6:4:3) or ethyl acetate pyridine-H_2O (2:1:2)-cellulose d. Ehtyl acetate-isopropanol-H_2O (65:24:12 or 5:2:05)-kieselguhr G buffered with 0.02 N Sodium acetate e. Ethyl acetate-benzene (3:7) (for sugar acetates) starch-bound silicic acid
6. Carboxylic Acids	a. Benzene-methanol-acetic acid (4:8:8)-silica gel. b. Methanol or ethanol or ether-polyamide c. Isopropyl ether-formic acid-H_2O (90:7:3)-kieselguhr G-polyethylene glucol (M-1000) (2:1)
7. Sulfonamide	a. $CHCl_3$-ethanol-heptane (1:1:1)-silica gel G.
8. Food Dyes.	a. Methyl ethy1 ketone-acetic acid-methanol (40:5:5)-silica gel G b. Butanol-ethanol-H_2O (9:1:1, 8:2:1, 7:3:3, 6:4:4 or 5:5:5)-alumina c. Aq sodium citrate (2.5%)-NH_3 (25%) (4:1)-cellulose
9. Essential oils	a. Hexane-starch-bound silicic acid b. Benzene-$CHCl_3$ (1:1)-silica gel G

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
10. Flavonoids and Coumarins	a. Ethyl acetate-Skellysolve B-starch-bound silicic acid b. Methanol-H_2O (8:2 or 6:4)-polyamide c. Toluene-ethyl formate-formic acid (5:4:1)-silica gel G + Sodium acetate d. Petroleum ether-ethyl acetate (2:1)-silica gel G
11. Metal Ions	a. Dilute HCl-Starch-bound alumina-Celite b. Acetone-conc. HCl-2, 5-hexanedione (100:1:0.5)-silica gel G c. 1M aq. $NaNO_3$-Dowex 1 + cellulose d. Methanol-alumina
12. Insecticides	a. Cyclohexane-hexane (1:1) or CCl_4-ethyl acetate (8:2)-silica gel G b. Hexane-alumina c. Heptane saturated with acetic acid-starch-bound silicic acid d. Chloroform-silica gel G + oxalic acid
13. Lipids	a. Petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (90:10:1 or 70:20:4)-silica gel G b. Petroleum ether-diethyl ether (95:5)-alumina c. $CHCl_3$-methanol-H_2O (80:25:3)-silicic acid
14. Fatty acids	a. Petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (70:30:1082)-silica gel G b. Acetic acid-CH_3CN (1:1)-kieselguhr impreg. with undecane

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
	c. Benzene-diethyl ether (75:25 or 1:1)-starch-bound silicic acid d. CH_3CN-acetic acid-H_2O (70:10:25)-silica gel G impreg. with silicone oil.
15. Glycerides	a. $CHCl_3$-acetic acid (99.5:0.5)-silica gel G impreg. with $AgNO_3$ b. $CHCl_3$-benzene (7:3)-silica gel G c. $CHCl_3$-methanol-H_2O (5:15:1)-silica gel G impreg. with undecane d. Petroleum ether-diethyl ether (9:1 to 4:6)-plaster-bound silicic acid e. Methyl isobutyl ketone-hydroxyapatite f. Acetone-CH_3CN (8:2 or 7:4)-kieselguhr G impreg. with petroleum
16. Glycolipids	a. Propanol-12% NH_3 (4:1)-silica gel G
17. Phospholipids	a. $CHCl_3$-methanol-H_2O (60:35:8 or 65:25:4)-silica gel G
18. Nucleotides	a. 0.15 M NaCl or 0.01-0.06 N HCl-Ecteola cellulose b. Sat aq. $(NH_4)_2SO_4$-1 M Sodium acetate-2-propanol (80:18:2)-cellulose c. 0.02-0.04 N aq. HCl-DEAE cellulose d. Gradient elution : start with 1 N formic acid and add 10 N formic acid which is 2 M in ammonium formate-DEAE Sephadex A-25 e. 1.0-1.6 M LiCl-cellulose PEI

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
19. Phenols	a. Xylene, $CHCl_3$ or xylene-$CHCl_3$ (1:1, 3:1, 1:3)-Starch-bound silicic acid or silicic acid-kieselguhr (1:1) b. Benzene-alumina plus acetic acid c. Benzene-1, 4-dioxane-acetic acid (90:25:4)-Silica gel G d. Diethyl ether-alumina e. Hexane-ethyl acetate (4:1 or 3:2)-silica gel plus oxalic acid f. Hexane or cyclohexane or benzene-polycaprolactam g. Ethanol-H_2O (8:3) containing 4% boric acid and 2% sodium acetate-silica gel G plus boric acid h. CCl_4-acetic acid (9:1) or cyclohexane-acetic acid (93:7)-polyamide 6
20. Amino acids	a. Butanol-acetic acid-H_2O (3 or 4:1:1) or phenol-H_2O (75:25) or propanol-34% NH_3 (67:33)-silica gel G b. Butanol-acetic acid-H_2O (4:1:1)-cellulose c. Butanol-acetic acid-H_2O (3:1:1)-or pyridine- H_2O (1:1 or 80:54)-alumina d. Ethanol-NH_3 (conc.)-H_2O (7:1:2)-silica gel G buffered with equal portions of 0.2 M KH_2PO_4 and 0.2 M Na_2HPO_4 e. n-Butanol-acetone- NH_3-H_2O (10:10:5:2) followed by isopropanol-formic acid-H_2O (20:1:5) (2 dimensional)-cellulose
21. Polypeptides and Proteins	a. $CHCl_3$-methanol or acetone (9:1)-silica gel G b. Potassium phosphate buffers, pH 6.5-polyamides-bound hydroxyapatite c. H_2O or 0.05 M NH_3-Sephadex G-25

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
	d. Phosphate buffers-DEAE Sephadex A-25
22. Steriods and Sterols	a. Benzene or benzene-ethyl acetate (9:1 or 2:1) -Silica gel G b. $CHCl_3$-ethanol (96:4)-alumina c. Ethyl acetate-cyclohexane mixtures-starch-bound silicic acid d. Benzene-isopropanol-silica gel plus NaOH e. Methanol-H_2O (95:5)-Celite impreg with paraffin oil f. Cyclohexane-heptane (1:1)-silica gel G-kieselguhr G (1:1) g. Cyclohexane-ethyl acetate (99.5:0.5)-kieselguhr G h. Acetic acid-H_2O (95:8 or 90:10)-kieselguhr G imprge. with undecane
23. Terpenoid	a. Hexane or hexane-ethyl acetate (85:15)-starch-bound silicic acid b. Benzene or benzene-petroleum ether or-ethanol mixtures-alumina c. Isopropyl ether or isopropyl ether-acetone (5:2 or 19:1)-silica gel G
24. Vitamins	a. Methanol, CCl_4, Xylene, $CHCl_3$ or Petroleum ether-alumina b. Methanol, propanol, or $CHCl_3$-silica gel G c. Acetone-paraffin (H_2O sat) (9:1)-silica gel G impreg. with paraffin

ชนิดของสารที่ต้องการแยก	คู่ของตัวดูดซับและตัวอีลูทที่เหมาะสม
25. Barbiturates	a. $CHCl_3$-n-butanol-25% NH_3 (70:40:5)-silica gel
26. Digitalis compounds	a. $CHCl_3$-pyridine (6:1)-silica gel
27. Polycyclic Hydrocarbons	a. CCl_4-alumina
28. Purines	a. Acetone-$CHCl_3$-n-butanol-25% NH_3 (3:3:4:1)-silica gel

วิธี TLC ใช้ประโยชน์ได้ดีกว่าวิธี PC สามารถวิเคราะห์สิ่งที่ PC ทำไม่ได้ และมีข้อดีกว่าวิธี PC หลายประการ สรุปได้ดังนี้ คือ

ก. เวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยกว่า

ข. เลือกใช้เฟสอยู่กับที่ได้มากมายหลายชนิด

ค. ใช้ในการวิเคราะห์สารพวกลิปิด (lipids) ได้ดีกว่า

ง. มีการแยกที่ดีกว่า (better resolution)

จ. สามารถใช้ได้กับตัวทำละลายที่มีการกัดกร่อนอย่างแรง เช่น กรดซัลฟูริกเข้มข้น

ฉ. เมื่อทำการอีลูท แยกสารตัวอย่างได้แล้ว สามารถขูดเอาจุดหรือแบนด์ที่แยกได้ ออกไปทำการวิเคราะห์ต่อไปอีกได้

วิธีการของ TLC ได้ถูกพัฒนามาเรื่อย ๆ เพื่อทำให้สามารถใช้ได้กับสารที่มีปริมาณน้อยลง แยกได้ดีขึ้น และใช้เวลาน้อยลง ซึ่งทำให้เกิดเทคนิคใหม่ของการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงเรียกว่า High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า HPTLC มีขั้นตอนในการวิเคราะห์แบบเดียวกับ TLC ทุกประการ แตกต่างกันที่เทคนิคของ HPTLC นั้น ต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วยทำการวิเคราะห์เพราะต้องมีความแม่นยำในการทำมาก HPTLC แตกต่างจาก TLC ที่ขนาดของตัวดูดซับที่ฉาบบนเพลตคือมีขนาดเล็กกว่า ตามปกติ TLC มีขนาดประมาณ 12 μM ขนาดของ HPTLC ประมาณ 7 μM เท่านั้น การฉาบต้องทำให้บางกว่า เรียบสม่ำเสมอ และแน่นกว่า HPTLC มีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า TLC มาก สามารถแยกสารผสมหลายชนิดออกจากกันได้โดยใช้ระยะทางเพียง 5 ซม. เท่านั้น ในขณะที่ TLC ใช้ประมาณ 15-20 ซม. นั่นคือ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะ

วิธีการทำทินแลเยอร์โครมาโตกราฟี ขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำ TLC จะคล้ายคลึงกับการทำ PC โดยมีขั้นตอนในการเตรียมเพลตเพิ่มขึ้นอีกขั้นตอนหนึ่ง

1. *การเตรียมเพลตสำหรับแยก* (Preparation of Separating Layers) แผ่นแก้วที่นำมาใช้สำหรับให้ของแข็งดูดซับยึดเป็นแผ่นบาง ๆ (thin layer) ได้นั้นตามปกติมีขนาด 20x20 ซม. หรือ 10x20 ซม. ส่วน HPTLC ใช้ขนาด 5x5 ซม. สำหรับของแข็งตัวดูดซับมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์

สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวดูดซับ ได้แก่ ผงเซลลูโลส (cellulose powders) แป้ง (starch) เซฟาเดกซ์ (sephadex or superfine) โพลีอะไมด์ (polyamides) และไอออนเอกซ์เชนจ์เรซิน (ion exchange resin)

สารอนินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวดูดซับ ได้แก่ ซิลิกาเจล (silica gel) อะลูมินา (alumina) ผงแก้ว (glass powder) และ diatomaceous earth เป็นต้น สารพวกนี้อาจทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับโดยตรง หรืออาจใช้สารตัวอื่นฉาบลงบนสารเหล่านี้อีกทีหนึ่งก่อนแล้วค่อยนำไปใช้

เมื่อเลือกใช้ของแข็งดูดซับได้แล้ว ให้เตรียมเป็นสารละลายหนืด (slurry) คล้ายโคลนโดยค่อย ๆ เทของแข็งที่มีตัวยึดเหนี่ยวผสมอยู่ เช่น ซิลิกาเจล-จี หรือ อะลูมีนา-จี (จี หมายถึงตัวยึดเหนี่ยวยิปซัม [$(CaSO_4)_2 \cdot H_2O$] ซึ่งเป็นตัวที่นิยมใช้กันมาก) ลงในตัวทำละลายพร้อมคนไปด้วย ถ้าใช้วิธีเทตัวทำละลายลงในของแข็งแล้วคน จะทำให้สารละลายหนืดที่ได้เป็นเม็ด ตัวทำละลายที่ใช้อาจเป็นน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ก็ได้ตามความเหมาะสม สำหรับตัวยึดเหนี่ยว (binder) นอกจากยิปซัมแล้วอาจเป็นสารชนิดอื่นได้อีก สำหรับตัวยึดเหนี่ยวที่นิยมใช้อีกตัวหนึ่งคือแป้ง (starch) เมื่อเตรียมสารสำหรับฉาบได้แล้ว สามารถทำการฉาบลงบนแผ่นแก้วได้ 3 วิธีคือ

ก. ใช้แผ่นแก้วจุ่มลงในสารละลายหนืดแล้วนำมาทำให้แห้ง แผ่นแก้วที่ฉาบได้แล้วต้องมีลักษณะเรียบและสม่ำเสมอ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฝีมือของผู้ทดลอง

ข. ใช้เครื่องลาก นำสารละลายหนืดที่เตรียมได้ใส่ลงในรางแล้วลากไปตามแผ่นแก้วโดยใช้มือลาก ความหนาของสารที่ฉาบสามารถปรับได้ที่เครื่องลาก ความเรียบและสม่ำเสมอขึ้นอยู่กับฝีมือของผู้ทดลองเช่นกัน แต่วิธีนี้จะได้ผลดีกว่าวิธีแรก

ค. ใช้เครื่องลากอัตโนมัติ การทำเพลตโดยใช้เครื่องลากอัตโนมัติจะได้เพลตที่มีความหนาสม่ำเสมอ ใช้ในงานวิเคราะห์ได้ดีกว่าการเตรียมด้วยมือ

ในทางการค้าได้มีบริษัทผู้ผลิต ผลิตเพลตสำเร็จรูปขาย ซึ่งทำให้ผู้วิเคราะห์สะดวกขึ้น สามารถซื้อมาใช้ได้เลยไม่ต้องเสียเวลาในการเตรียม และเพลตสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นมาขายนั้นมีคุณภาพดีกว่าที่เตรียมเอง ส่วนใหญ่ใช้กับงานวิเคราะห์ที่เรียกว่า HPTLC เพลตที่เตรียมขึ้นเองไม่สามารถนำมาใช้กับ HPTLC ได้

ก่อนนำเพลตที่เตรียมได้ไปใช้งาน ต้องตรวจสอบดูก่อนว่าในเพลตไม่มีมลทินปนอยู่ โดยนำไปส่องกับแสงอุลตราไวโอเลต ถ้าปรากฏว่ามีจุดของสารปรากฏขึ้น แสดงว่ามีมลทินปนอยู่ ต้องใช้วิธีล้างเพลตก่อน เรียกว่า Prewashing โดยการนำเพลต ไปจุ่มในตัวทำละลายที่ใช้ดีเวลลอป เพื่อให้สารมลทินถูกอีลูทออกไปให้หมด จากนั้นนำเพลตมาทำให้แห้ง แล้วจึงค่อยนำไปใช้งาน

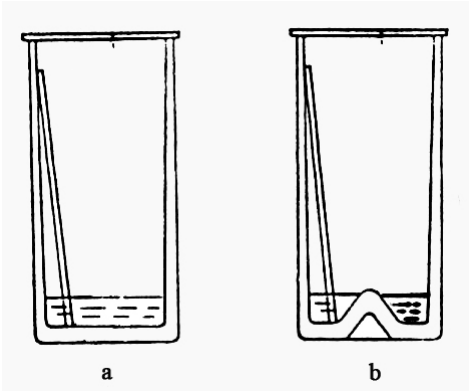
2. *การใส่สารตัวอย่างลงในเพลต* (Sample application) การใส่สารตัวอย่างลงในเพลตสามารถทำได้ 2 ลักษณะ คือ

ก. ทำเป็นจุด (spotwise) โดยการใช้คาปิลลารีหยดสารตัวอย่างลงไป ต้องพยายามทำให้เป็นจุดเล็กที่สุดเท่าที่จะทำได้ สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือ หรือใช้เครื่องอัตโนมัติ ถ้าใช้เครื่องอัตโนมัติสามารถกำหนดปริมาตรของสารตัวอย่างที่หยดลงไปได้แน่นอนกว่าการใช้มือ และลักษณะของจุดที่ได้มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอกว่า

ข. ทำเป็นแบนด์ (Bandwise) เนื่องจากมือคนไม่สามารถลากขนาดของสารตัวอย่างที่ใส่ลงในเพลตให้เป็นแบนด์ได้สม่ำเสมอ วิธีการนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วย ซึ่งจะทำให้แบนด์ที่ได้สม่ำเสมอและมีขนาดที่แน่นอน

เนื่องจากการวิเคราะห์วิธี TLC เหมือนกับวิธี PC คือไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ทางคุณภาพหรือทางปริมาณ ต้องทำควบคู่กับสารมาตรฐาน ดังนั้น การใส่สารตัวอย่างลงในเพลตต้องทำสลับกันกับสารมาตรฐาน ให้จุดทุกจุดอยู่บนเพลตเดียวกัน เพื่อจะได้มีสภาวะของการทดลองแบบเดียวกันทุกประการ จึงจะเปรียบเทียบกันได้

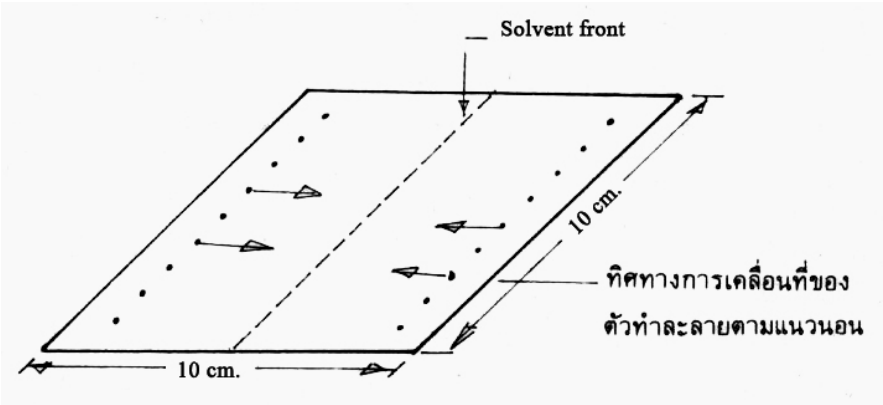
3. *ทำการดีเวลลอป* สามารถทำได้แบบเดียวกับวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี คือ ดีเวล-ลอปจากล่างขึ้นบน หรือจากบนลงล่าง หรือทำโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด แบบ 2 มิติ ตัวถังหรือแชมเบอร์ (Chamber) ที่ใช้สำหรับทำการดีเวลลอป มีลักษณะเป็นถังแก้ว ที่มีฝาปิด เพื่อให้มองเห็นการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างได้ ก้นถังมีได้ 2 แบบ คือ แบบเรียบ และแบบแบ่งเป็น 2 หลุม ดังแสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ถังสำหรับทำการดีเวลลอป
a. ใช้กับตัวทำละลายชนิดเดียว
b. ใช้กับตัวทำละลายชนิดหนึ่ง และต้องการให้บรรยากาศอิ่มด้วยไอของตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง

ถังแก้วแบบก้นเรียบ (แบบ a) ใช้สำหรับทำการดีเวลลอปสารที่ใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว ลักษณะถังแบบนี้จะแคบ ส่วนถังแบบมีก้น 2 หลุม (แบบ b) ใช้สำหรับใส่ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือตัวทำละลายชนิดหนึ่ง ใช้สำหรับทำการดีเวลลอป ส่วนอีกชนิดหนึ่งใส่ไว้เพื่อทำให้บรรยากาศภายในอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายชนิดที่ 2 ซึ่งจะทำให้การดีเวลลอปได้ผลดีขึ้น หรืออาจใช้ในการดีเวลลอปเพลต 2 อันไปพร้อม ๆ กันก็ได้เมื่อใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกัน

การดีเวลลอปแบบที่กล่าวมาใช้สำหรับการทำ TLC ทั่ว ๆ ไป ถ้าเป็นการวิเคราะห์แบบ HPTLC สามารถทำการดีเวลลอปได้อีกแบบหนึ่ง เรียกว่าการดีเวลลอปแบบแซนด์วิช (Sandwich) เราทราบแล้วว่าการทำ HPTLC สามารถแยกสารได้ในระยะ 5 ซม. ดังนั้น ถ้าเราใช้แผ่นแก้วที่มีขนาด 10x10 ซม. แล้วจุดสารลงบนแผ่นแก้วที่ฉาบแล้ว ดังแสดงในรูป 4.8 จากนั้นทำการดีเวลลอปตามแนวนอนให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากสารตัวอย่าง 2 ข้าง เมื่อตัวทำละลาย 2 ข้างเคลื่อนมาชนกัน การเคลื่อนที่ของตัวทำละลายและสารตัวอย่างก็จะหยุด แสดงว่า Solvent front ก็คือจุดกึ่งกลางของเพลตหรือจุดที่ตัวทำละลายชนกันพอดี วิธีการนี้ สะดวกที่ไม่ต้องเสียเวลานั่งเฝ้า และในการทำครั้งหนึ่ง ๆ สามารถทำได้หลายตัวอย่าง เพราะทำทั้ง 2 ข้างของเพลต ถ้าแต่ละจุดของตัวอย่างห่างกัน 1 ซม. แสดงว่า ข้างหนึ่งของเพลตจะได้ 9 ตัวอย่าง รวม 2 ข้าง เท่ากับ 18 ตัวอย่าง



รูปที่ 4.8 การดีเวลลอปแบบแซนด์วิช

การเลือกใช้ตัวทำละลายสำหรับการดีเวลลอป ในกรณีที่สารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เป็นสารที่ไม่ทราบว่า คืออะไร หรือไม่มีการรายงานมาก่อนว่า ควรใช้ตัวทำละลายชนิดใด จะต้องมีการทดสอบ เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม การทดลองเลือกใช้ตัวทำละลายมีกฎเกณฑ์ว่า ควรเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำสุดก่อน แล้วค่อยเพิ่มไปเรื่อยๆ จนกว่าจะได้ตัวทำละลายที่สามารถแยกตัวถูกละลายออกได้อย่างเหมาะสม ตารางที่ 4.2 เป็นตารางแสดงโพลาริตีของตัวทำละลายชนิดต่างๆ เรียงจากน้อยไปหามาก ตามค่าคงที่ไดอิเล็กตริก สำหรับตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการดีเวลลอปได้นั้น ต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมดังนี้คือ

ก. ต้องมีความหนืดต่ำ (low viscosity) เพื่อทำให้เคลื่อนที่ได้เร็ว

ข. ถ้าจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม ควรทำเป็นตัวทำละลายผสมที่น้อยชนิดเพราะถ้าผสมหลายชนิดจะมีโอกาสผิดพลาดได้ง่ายในการเตรียมส่วนผสม

ค. ถ้าเป็นสารผสมต้องสามารถผสมได้เป็นเนื้อเดียวกันจึงจะนำมาใช้ได้ (homogeneous)

ง. ต้องมีความบริสุทธิ์สูง ความบริสุทธิ์ในที่นี้ไม่ได้หมายถึงว่า ต้องปราศจากแร่ธาตุหรือสิ่งเจือปนทั้งหมด 100% หรือต้องใช้เกรดสเปคโตร แต่ความบริสุทธิ์ในที่นี้หมายถึงว่า ไม่มีตัวทำละลายตัวอื่นที่มีโพลาริตี ตรงข้ามกับตัวทำละลายที่ใช้ปนอยู่ด้วย

จ. ควรเป็นตัวทำละลายที่เตรียมได้ใหม่ๆ

ตารางที่ 4.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการดีเวลลอป เรียงตามโพลาริตีจากน้อยไปมาก

ตัวทำละลาย	ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก
n-Hexane	1.9
Isooctane	1.9
Cyclohexane	2.0
Carbontetrachloride	2.2
Dioxane	2.2
Benzene	2.3
Xylene	2.3
Toluene	2.4
Carbondisulfide	2.6
di-iso-propylether	3.9
Diethylether	4.3
Chloroform	4.8
n-Butylacetate	5.0
phenyl chloride	5.7
Ethyl acetate	6.0
Acetic acid	6.3
Tetrahydrofuran	7.6
Dichloro methane	9.1
Pyridine	13.2
iso-propane	13.8
n-Butanol	17.9
Acetone	21.5
n-propanol	22.5
Ethanol	25.0
Methanol	33.6
Acetonitrile	38.8
Water	81

4. *ดีเทคชัน* (Detection) วิธีดีเทคชันเพื่อหาจุดของสารตัวอย่างบนเพลตของ TLC ทำได้แบบเดียวกับเปเปอร์โครมาโตกราฟี แต่ถ้าเป็นการทำ HPTLC ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะสำหรับวัดปริมาณและตำแหน่งของสารตัวอย่าง เรียกว่า Densitometer หรือ Scanner โครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่องจะมีลักษณะเป็นพีก เช่นเดียวกับการทำก๊าซโครมาโตกราฟีหรือโครมาโต-กราฟีชนิดอื่นๆ สามารถวัดรีเทนชันและพื้นที่พีกหรือความสูงได้ ถ้าต่อเครื่องมือเข้ากับอินทิเกรเตอร์ก็จะให้ตัวเลขที่นับได้สัมผัสกับพื้นที่พีก ซึ่งมีหลักการในการวิเคราะห์เช่นเดียวกับก๊าซโครมาโตกราฟีที่กล่าวไว้ในบทที่ 6 สามารถใช้ได้ทั้งงานวิเคราะห์ทางคุณภาพและทางปริมาณ

คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography)

กลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้นในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี สามารถใช้เป็นหลักในการอธิบายทฤษฎีและหลักการของโครมาโตกราฟีทั่วๆ ไปทุกชนิด ดังที่กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 การทำลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์สามารถแบ่งได้อีกหลายชนิดขึ้นอยู่กับสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่

ถ้าสารที่บรรจุคือของแข็งที่ทำหน้าที่ดูดซับจะเรียกวิธีการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบนี้ว่า adsorption chromatography หรือ Liquid Solid Chromatography (LSC) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในคอลัมน์ขึ้นอยู่กับเวลาที่ตัวถูกละลายนั้นถูกดูดซับที่ผิวของของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ ถ้าการดูดซับมีค่ามาก เวลาที่ใช้อยู่ในคอลัมน์จะนานทำให้ค่ารีเทนชันไทม์มีค่ามาก

ถ้าสารที่บรรจุในคอลัมน์คือของแข็งที่ฉาบด้วยของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่หรือของเหลวฉาบที่ผิวของคอลัมน์เมื่อใช้คอลัมน์เล็กมาก ๆ จะเรียกว่า partition chromatography หรือ Liquid-Liquid Chromatography (LLC) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายในคอลัมน์ขึ้นอยู่กับการละลายของตัวถูกละลายในเฟสทั้งสองที่เป็นของเหลว ถ้าการละลายของตัวถูกละลายในเฟสของเหลวที่อยู่กับที่มีค่ามาก ค่ารีเทนชันไทม์จะมีค่ามาก

ถ้าสารที่บรรจุในคอลัมน์ คือ เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ จะเรียกวิธีการนี้ว่าไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion-exchange chromatography) ค่ารีเทนชันไทม์ของตัวถูกละลายขึ้นอยู่กับความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างไอออนของตัวถูกละลายกับไอออนในเรซิน ไอออนเอกซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี ต่างจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบอื่น คือตัวถูกละลายที่ถูกแยกคือไอออน ในขณะที่วิธีอื่นคือโมเลกุลที่เป็นกลาง

สามารถพิจารณาการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลายภายในคอลัมน์ด้วยเทอมของ retardation factor (R_f) ได้เช่นเดียวกับเพลนโครมาโตกราฟี ซึ่งมีค่าสัมพันธ์กับค่า K_d ตามสมการที่ 4.6 คือ

$$R_f = \frac{A_m}{A_m + K_d A_s}$$

เมื่อชนิดของโครมาโตกราฟีที่ทำคือคอลัมน์ ดังนั้น ในการทดลองสามารถหาค่าของ A_m, A_s, และ K_d ได้ จึงทำให้สามารถคำนวณหาค่า R_f ได้จากสมการที่ 4.6 ถ้าสารตัวอย่างประกอบด้วยตัวถูกละลาย 2 ชนิด M และ N สามารถหาอัตราส่วนของค่า R_f ของสารทั้งสองได้ดังนี้

$$\frac{(R_f)_M}{(R_f)_N} = \frac{A_m + K_{dN} A_s}{A_m + K_{dM} A_s} \qquad \text{.....(4.7)}$$

สมการนี้ใช้สำหรับการเปรียบเทียบอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของตัวถูกละลาย 2 ชนิดในคอลัมน์

เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ พบว่าตำแหน่งที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงสุดจะเคลื่อนที่ต่ำลงๆ เมื่อตัวทำละลายมีปริมาตรมากขึ้น ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ทำให้ตัวถูกละลายส่วนที่มีความเข้มข้นมากที่สุดออกจากคอลัมน์ คือ V V จะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นกับความสูงของคอลัมน์ ถ้าคอลัมน์สั้นจะใช้ V น้อย ถ้าคอลัมน์ยาวจะใช้ V มาก โดยมีความสัมพันธ์ดังนี้ คือ

$$L = NH = \frac{V}{A_m + K_d A_s} \qquad \text{.....(4.8)}^{(1)}$$

L คือความยาวของคอลัมน์ ซึ่งหาได้จากค่าจำนวนเพลต (plate number, N) คูณกับความสูงของเพลต (plate height, H)

---

(1) ดูที่มาของสูตรนี้ได้จากหนังสือ Skoog, D.A. and D.M. West, *Principles of Instrumental Analysis Analysis*; Holt, Rinehart and Winston Inc: New York 1971 page 619.

ปริมาตรรวมทั้งหมดที่บรรจุในคอลัมน์สามารถหาได้จากรัศมีของหลอดแก้วกับความยาวคือ $V_c = \pi r^2 L$ ซึ่งปริมาตรรวมทั้งหมดมีค่าเท่ากับปริมาตรของเฟสอยู่กับที่ (V_s) บวกกับปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ (V_m) ถ้าในคอลัมน์มีเฟสเฉื่อยหรือของแข็งซัพพอทอยู่ด้วย ต้องรวมปริมาตรของเฟสเฉื่อยด้วย (V_i) นั่นคือ

$$V_c = V_m + V_s + V_i$$

เนื่องจากพื้นที่หน้าตัดของเฟสแต่ละเฟสหาได้จากปริมาตรหารด้วยความยาวของคอลัมน์ ดังนั้นจะได้พื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์ทั้งหมดมีค่า คือ

$$A = A_m + A_s + A_i$$

ตัวอย่างที่ 4.1 คอลัมน์กลาส (glass column) มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 14 มิลลิเมตร บรรจุของแข็งที่มีความหนาแน่น 2.00 กรัม / ลบ.ซม. จำนวน 30.0 กรัม ความสูงของสารที่บรรจุเท่ากับ 18.0 ซม. สารตัวอย่างผสมของสาร 2 ชนิด ถูกนำมาผ่านในคอลัมน์แล้วอีลูทด้วยตัวทำละลายที่ทำให้มีค่า K_d = 1 สำหรับสาร A และ 1.8 สำหรับสาร B จงคำนวณหาค่า retardation factors ของสาร A และสาร B และปริมาตรของตัวทำละลายที่ต้องใช้ในการอีลูทสารตัวอย่างแต่ละตัวให้ส่วนที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายมากที่สุดออกจากคอลัมน์

วิธีทำ ขั้นแรกให้หาค่า A_m และ A_s ของคอลัมน์ก่อน

ปริมาตรของของแข็งที่บรรจุ (V_s) $= \dfrac{30.0\ g}{2.00\ g/cm^3} = 15\ cm^3$

ปริมาตรที่บรรจุในคอลัมน์ (V_c) $= \pi r^2 L$

$= \dfrac{22}{7} \times (0.70)^2 \times 18 = 28\ cm^3$

$\therefore$ ปริมาตรของตัวทำละลายที่อยู่ในคอลัมน์ (V_m) $= 28-15$

$= 13\ cm^3$

นั่นคือ

$$A_m = \frac{V_m}{L} = 13/18.0 = 0.72\ cm^2$$

$$A_s = \frac{V_s}{L} = 15/18.0 = 0.83\ cm^2$$

จากสมการที่ 4.6

$$R_{f_A} = \frac{A_m}{A_m + K_{d_A} A_s}$$

$$= \frac{0.72}{0.72 + 1.0 \times 0.83} = 0.46$$

$$R_{f_B} = \frac{0.72}{0.72 + 1.8 \times 0.83} = 0.32$$

จากสมการที่ 4.8 สามารถหาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการอีลูทให้ส่วนที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายมากที่สุดออกจากคอลัมน์ได้ คือ

$$L = \frac{V_A}{A_m + K_{d_A} A_s}$$

$$V_A = 18\ (0.72 + 1.0 \times 0.83)$$

$$= 28\ cm^3$$

$$V_B = 18\ (0.72 + 1.8 \times 0.83)$$

$$= 40\ cm^3$$

ตัวอย่างที่ 4.2 จงคำนวณหาค่า R_f ของสารประกอบ A และ B ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายเท่ากับ 0.200 และ 2.50 ตามลำดับ คอลัมน์ที่ใช้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.00 ซม. สูง 30.0 ซม. บรรจุด้วยอะลูมินา 80.0 กรัม (ความหนาแน่น 3.60 g/cm^3) น้ำ 10 ลบ.ซม. และตัวอีลูท 62.0 ลบ.ซม.

วิธีทำ

$$A_s = \frac{V_s}{L} = \frac{80.0}{3.6} \times \frac{1}{30} = 0.74 \text{ ตร.ซม.}$$

$$A_m = \frac{V_m}{L} = \frac{62.0}{30} = 2.07 \text{ ตร.ซม.}$$

$$A_i = \frac{V_i}{L} = \frac{10.0}{30.0} = 0.333 \text{ ตร.ซม.}$$

สามารถตรวจสอบผลได้ดังนี้ คือ ผลรวมของ $A_s + A_m + A_i$ ต้องมีค่าเท่ากับพื้นที่หน้าตัดของคอลัมน์ ซึ่งหาได้จาก πr^2

$$A = \pi r^2 = \frac{22}{7} \times 1^2 = 3.14 = 0.74+2.07+0.333$$

แทนค่า A_m และ A_s ลงในสมการที่ 4.6

$$R_{f_A} = \frac{2.07}{2.07 + 0.200 \times 0.74} = \frac{2.07}{2.22}$$

$$= 0.932$$

$$R_{f_B} = \frac{2.07}{2.07 + 2.50 \times 0.74} = \frac{2.07}{3.92}$$

$$= 0.528$$

ตัวอย่างที่ 4.3 2, 4-lutidine มีค่า R_f = 0.75 โดยใช้สารผสมของ butanol-formic acid-น้ำ (75:15:10) เป็นตัวอีลูท เมื่อใช้เงื่อนไขเดียวกันพบว่า 2, 6 lutidine จะมีค่า R_f = 0.79 ต้องใช้คอลัมน์ยาวเท่าใดจึงจะทำให้ค่าต้องการแยก (R) ของสารทั้งสองมีค่าเท่ากับ 1.25 เมื่อ H = 0.0028, A_m = 0.53, A_s = 0.173

วิธีทำ จากสมการที่ 4.6

$$R_{f_{2,4}} = \frac{A_m}{A_m + K_{d_{2,4}} \times A_s}$$

$$0.75 = \frac{0.53}{0.53 + K_{d_{2,4}} \times 0.173}$$

$$K_{d_{2,4}} = 1.02$$

$$0.79 = \frac{0.53}{0.53 + K_{d_{2,6}} \times 0.173}$$

$$K_{d_{2,6}} = 0.814$$

เมื่อ $k' = K_d \frac{V_s}{V_m} = K_d \frac{A_s \cdot L}{A_m \cdot L} = K_d \frac{A_s}{A_m}$

$\therefore \quad k'_{2,4} = 1.02 \times \frac{0.173}{0.53} = 0.333$

$k'_{2,6} = \frac{0.814 \times 0.173}{0.53} = 0.266$

จากสมการที่ 3.17 $\quad \alpha = \frac{K_{d_2}}{K_{d_1}}$

Kd_2 หมายถึง สารที่ถูกอีลูทออกมาทีหลังหรือที่มีค่า K_d มาก

Kd_1 หมายถึง สารที่ถูกอีลูทออกมาก่อน หรือที่มีค่า K_d น้อย

$\therefore \quad \alpha = \frac{K_{d_{2,4}}}{K_{d_{2,6}}}$

$= \frac{1.02}{0.814} = 1.25$

จากสมการที่ 3.42

$N = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \left(\frac{1 + k'_{2,4}}{k'_{2,4}}\right)^2$

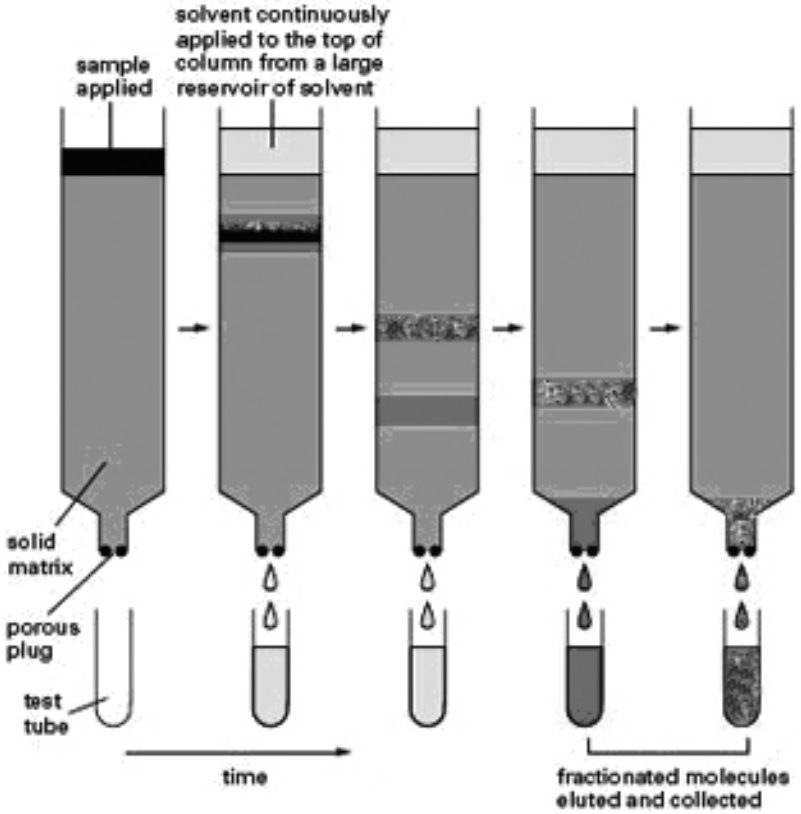
$= 16 \times (1.25)^2 \left(\frac{1.25}{1.25 - 1}\right)^2 \left(\frac{1 + 0.333}{0.333}\right)^2$

$\simeq 10{,}000$

$L = NH = 10{,}000 \times 0.0028$

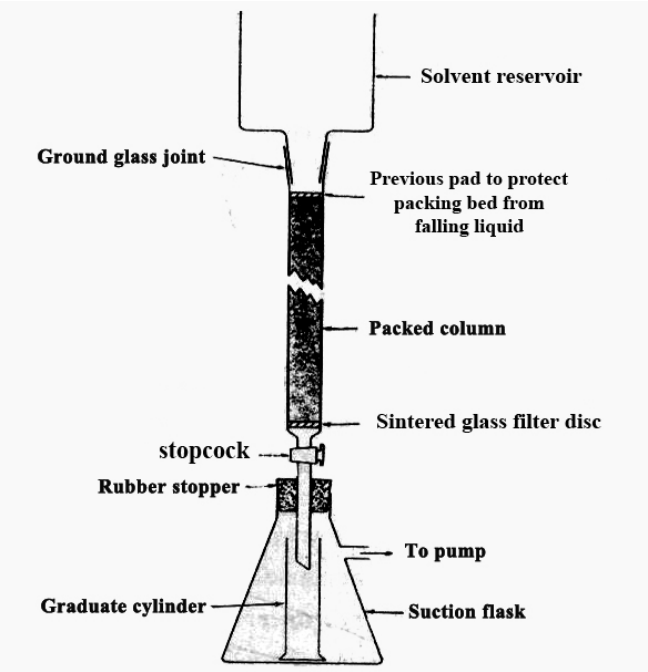
$\therefore$ คอลัมน์ที่ใช้ต้องยาว = 28 ซม.

เทคนิคในการทำคอลัมน์โครมาโตรกราฟี คอลัมน์ที่ใช้ในโครมาโตกราฟี มีลักษณะเป็นหลอดแก้วกลวง ปลายข้างหนึ่งทำให้เล็กลง เพื่อต่อเข้ากับตัวควบคุม การไหลของตัวทำละลาย ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ขนาดของคอลัมน์มีได้หลายขนาด ตั้งแต่เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ถึง 5 เซนติเมตร และยาว 10 ถึง 50 เซนติเมตร ความสูงและขนาดของเฟสอยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์จะมีผลต่ออัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ถ้าเฟสอยู่กับที่มีขนาดเล็กและบรรจุในคอลัมน์สูงมากๆ จะทำให้การไหลของเฟสเคลื่อนที่ช้ามาก ทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน



รูปที่ 4.9 คอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี

วิธีทำให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นสามารถทำได้โดยใช้ความดันช่วย ลักษณะการต่อเครื่องมือเพื่อทำให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เร็วขึ้น แสดงไว้ในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 การต่อเครื่องมือสำหรับทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เร็วขึ้น

สิ่งที่สำคัญในการทำโครมาโตกราฟีทุกชนิด คือ ต้องการให้ประสิทธิภาพดีที่สุด คอลัมน์จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อมีค่า HETP (height equivalent of a theoretical plate, H) ต่ำสุด ค่า HETP เป็นค่าที่ขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ตามสมการของ Van Deemter (ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในบทที่ 6) คือ

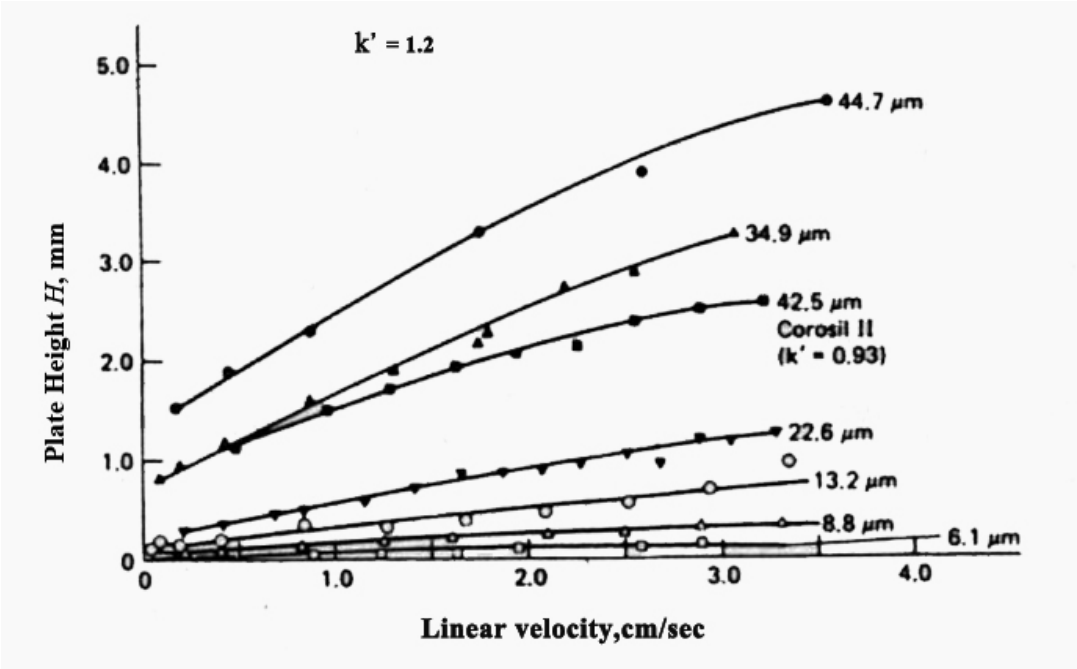
$$H = A + B/u + Cu \qquad \text{.....(4.9)}$$

เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว ทำให้ค่าการกระจายของสารตัวอย่างในเฟสของเหลว หรือเทอม B มีค่าน้อยมาก ดังนั้น สมการของ Van Deemter ในลิควิดโครมาโตกราฟีสามารถเขียนได้เป็น

$$H \simeq A + Cu \qquad \text{.....(4.10)}$$

สมการนี้จะไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นจริงถ้าอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าน้อยมากๆ การเพิ่มอัตราการไหลจะมีผลทำให้ค่า HETP เพิ่มขึ้นหรือประสิทธิภาพลดลงนั่นเอง ดังแสดงใน

$$\frac{2}{10} - \frac{3}{10}$$



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่กับค่า HETP ของของแข็งที่มีขนาดต่างๆ กัน ที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ คอลัมน์ที่ใช้มีขนาด 30 ซม. X 2.4 ซม. ของแข็งที่บรรจุ คือ ซิลิกาเจล ที่มีขนาดต่างๆ กัน

จากรูปที่ 4.11 จะเห็นได้ว่า เมื่อของแข็งมีขนาดเล็กๆ การเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่จะมีผลต่อค่า HETP น้อยมาก ดังนั้น ในการทำลิควิดโครมาโตกราฟีถ้าใช้ของแข็งขนาดเล็กๆ บรรจุในคอลัมน์ สามารถทำให้การวิเคราะห์เร็วขึ้นได้ โดยเพิ่มความดันให้เฟสเคลื่อนที่ไหลได้เร็วขึ้น โดยไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง

การวิเคราะห์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีสามารถทำได้ตามขั้นตอน ดังนี้

1. เตรียมคอลัมน์ ที่ปลายล่างของคอลัมน์ต้องถูกปิดไว้ด้วยใยแก้วหรือสำลี เพื่อป้องกันไม่ให้ของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์ไหลออกจากคอลัมน์ได้ จากนั้นนำเฟสอยู่กับที่ซึ่งเป็นของแข็งมากวนกับตัวทำลาย ซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นสารละลายแขวนลอย (Suspension) แล้วเทสารละลายแขวนลอยลงในคอลัมน์ รอให้ของแข็งนอนก้น แล้วไขตัวทำละลายทิ้งไปส่วนหนึ่ง อย่าให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นเทสารละลายแขวนลอยลงในคอลัมน์อีก แล้วทำเช่นเดิม จนได้ความสูงของคอลัมน์ตามต้องการ และตัวทำลายเกือบแห้ง คืออยู่เหนือของแข็งเพียงเล็กน้อย

สำหรับของแข็งที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ต้องมีคุณสมบัติที่มีโพลาริตีมากกว่าเฟสเคลื่อนที่ การเลือกใช้ของแข็งต้องให้เหมาะสมกับชนิดของสารตัวอย่าง ของแข็งที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ มี 2 ชนิด คือ

ก. ของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ ของแข็งที่นำมาบรรจุในคอลัมน์ ต้องมีขนาดสม่ำเสมอ ขนาดของแข็งจะมีผลต่อเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และประสิทธิภาพของคอลัมน์ ดังนั้นขนาดที่เลือกใช้ควรเหมาะสม ของแข็งที่นำมาใช้ต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากการดูดซับของสารตัวอย่างขึ้นอยู่กับโพลาริตีของตัวดูดซับหรือเฟสอยู่กับที่ นั่นคือ การเพิ่มโพลาริตีของตัวดูดซับจะทำให้การดูดซับเพิ่มขึ้น ดังนั้น ผู้วิเคราะห์สามารถควบคุมการแยกได้โดยเลือกเฟสอยู่กับที่ให้เหมาะสม การเพิ่มโพลาริตีของเฟสอยู่กับที่จะทำให้สารตัวอย่างที่มีโพลาริตีสูงอยู่ในคอลัมน์ได้นาน หรือมีรีเทนชันไทม์มากนั่นเอง ของแข็งที่นิยมใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้แสดงในตารางที่ 4.3 โดยเรียงตามโพลาริตีของแข็ง อะลูมินา และซิลิกาเจล จะเป็นตัวที่นิยมใช้มากที่สุด สำหรับอะลูมินา ยังแบ่งได้อีกหลายเกรดตามปริมาณของน้ำที่อยู่ในผลึก อะลูมินาที่มีน้ำอยู่มากจะมีความสามารถในการดูดซับน้อยลง เพราะน้ำที่ถูกดูดซับไว้จะทำให้ปริมาณเนื้อที่ของการดูดซับลดลง สำหรับซิลิกาเจลคือของแข็งโพลีเมอร์ของกรดซิลิซิก (H_2SiO_3) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ Si-OH ทำหน้าที่ดูดซับ

ตารางที่ 4.3 ตัวดูดซับที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี เรียงตามโพลาริตี

High polarity	Alumina	Greatest adsorption
↓	Magnesium	↓
	Charcoal	
	Silica gel	
	Calcium oxide	
	Magnesium Carbonate	
	Calcium Carbonate	
	Potassium Carbonate	
	Sodium Carbonate	
	Starch	
Low polarity	Cellulose	Least adsorption

ข. ของเหลวที่ฉาบบนของแข็งช่วย ของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นของแข็งช่วย (Solid Support) ควรเป็นของแข็งที่มีโพลาริตีสูง เพื่อทำให้ดึงดูดเฟสอยู่กับที่ ซึ่งเป็นของเหลวที่มีโพลาริตีสูงไว้ได้ดี ซึ่งเป็นการทำโครมาโตกราฟีแบบธรรมดาทั่วๆ ไป คือ ให้เฟสอยู่กับที่มีโพลาริตีสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ ของแข็งซัพพอทที่ใช้สามารถเลือกใช้ตามตารางที่ 4.3 เช่นกัน ในการวิเคราะห์หลายแบบสามารถใช้เฟสอยู่กับที่เป็นน้ำ ซึ่งฉาบบนของแข็ง ซัพพอท ซิลิกาเจล หรือของแข็งอื่นๆ ตามตารางที่ 4.2 น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงที่สุด ดังนั้น เฟสเคลื่อนที่จะใช้ตัวทำละลายใดๆ ก็ได้ที่แสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งมีโพลาริตีต่ำกว่าน้ำ ตามปกติเหตุผลที่สำคัญในการเลือกเฟสเคลื่อนที่คือต้องไม่สามารถละลายเฟสอยู่กับที่ได้ ในกรณีที่ต้องการกลับเฟสของเฟสอยู่กับที่ให้มีโพลาริตีน้อยกว่าเฟสเคลื่อนที่สามารถทำได้ ซึ่งเป็นเทคนิคตรงข้ามกับการทำโครมาโตกราฟีแบบธรรมดาทั่วๆ ไป เรียกว่า reverse phase chromatography วิธีการทำคือ ใช้ของแข็ง ซัพพอทที่ไม่มีโพลาริตี เช่น ผงยาง และใช้เฟสอยู่กับที่ของเหลวที่ไม่มีโพลาริตีด้วยเป็นตัวฉาบ เช่น เบนซิน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ กรณีนี้เฟสเคลื่อนที่คือน้ำหรือตัวทำละลายอื่นที่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับของเหลวที่ใช้เป็นเฟสอยู่กับที่ และมีโพลาริตีสูง

2. ใส่สารตัวอย่าง วิธีใส่สารตัวอย่างให้ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างให้ได้ปริมาตรตามต้องการแล้วใส่ลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวัง พยายามปล่อยสารละลายตัวอย่างออกจากปิเปต

สารตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์มีได้หลายชนิด แต่ละชนิดมีโพลาริตีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับฟังก์ชันนอลกรุ๊ฟ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 สารตัวอย่างที่มีโพลาริตีสูงจะอยู่ในคอลัมน์ได้นาน คือ มีค่ารีเทนชันไทม์มากในการทำโครมาโตกราฟีแบบธรรมดา

ตารางที่ 4.4 สารต่าง ๆ จัดตามฟังก์ชันนอลกรุ๊ฟที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีโดยเรียงตามลำดับโพลาริตี

High Polarity	Organic acids (RCOOH), base (NH_3, OH^-)	Long retention time
↑	Alcohols (ROH), thiol (RSH)	↑
	Amines (RNH_2), nitro groups (RNO_2)	
	Aldehydes (RCHO), Ketones ($R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-R'$)	
	Esters ($RCOOR'$)	
	Halides (RF, RCl, RBr, RI)	
	Unsaturated hydrocarbons ($R-C=C-R'$)	
	Saturated hydrocarbons ($R-CH_2-CH_2-R'$)	
Low polarity	Perfluorocarbons (C_nF_{2n+2})	Short retention time

สารตัวอย่างที่จัดเรียงในตารางที่ 4.4 จะช่วยให้สามารถทำนายได้ว่าสารตัวใดควรถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ก่อนหรือหลัง

ตัวอย่างที่ 4.4 จงเรียงลำดับการอีลูทสารต่อไปนี้ จากรีเทนชันไทม์ต่ำสุดไปหามากที่สุด ในการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบธรรมดา

$CH_3CH_2CH_3$, CH_3COOCH_3, $CH_3CH(NH_2)CH_3$,

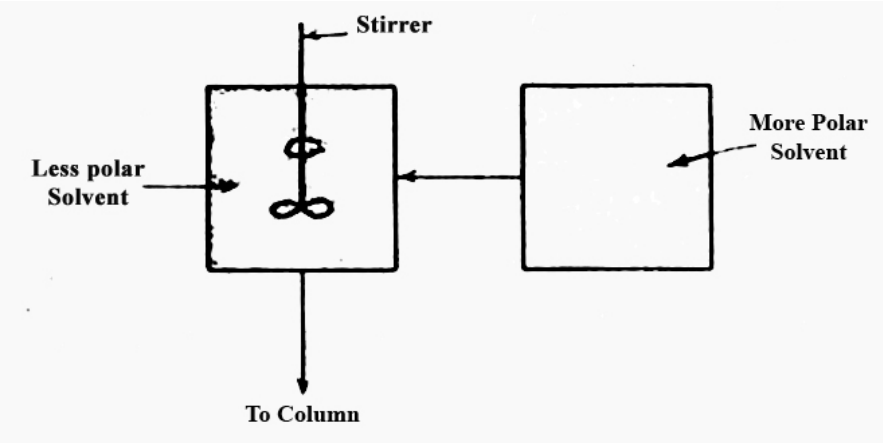
CH_3CH_2COOCH, $CH_3CH_2CH_2OH$, $CH_3CH=CH_2$, $CH_3CH_2CH_2CL$

ตอบ $CH_3CH_2CH_3 < CH_3CH=CH_2 < CH_3CH_2CH_2CL < CH_3COOCH_3$

$< CH_3CH(NH_2)CH_3 < CH_3CH_2CH_2OH < CH_3CH_2COOH$

3. ทำการอีลูท เมื่อใส่สารตัวอย่างลงในคอลัมน์เรียบร้อยแล้วให้เติมตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่หรือตัวอีลูท ตัวอีลูทจะไหลลงสู่คอลัมน์ตามแรงดึงดูดของโลก สามารถปรับขนาดของอัตราการไหลได้ถ้าไหลเร็วเกินไปโดยใช้จุกปิดเปิด ที่ต่อเข้ากับปลายข้างล่างของคอลัมน์ แต่ถ้าตัวอีลูทไหลช้าเกินไปสามารถช่วยทำให้ไหลเร็วขึ้นได้โดยใช้เครื่องดูดช่วย (suction-pump) ดังแสดงในรูปที่ 4.10 เมื่อให้เวลาในการอีลูทเพียงพอและเหมาะสม สารตัวอย่างที่เป็นสารผสมจะสามารถแยกออกจากกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 (2, 3)

การเลือกใช้ตัวอีลูทขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ถ้าต้องการอีลูทสารตัวอย่างที่เป็นโพลาร์ต้องใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูง ชนิดของตัวทำละลายที่เรียงตามโพลาริตีได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 ในบางครั้งพบว่าการใช้ตัวอีลูทเพียงตัวเดียวไม่สามารถอีลูทสารผสมทุกตัวในสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ได้ จึงต้องมีการเปลี่ยนตัวอีลูทให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น สารตัวอย่างเป็นสารผสมของสารหลายชนิดที่มีโพลาริตีต่างกัน การเลือกใช้ตัวอีลูทควรเลือกตัวที่ไม่มีโพลาร์ (non-polar) ก่อน ตัวอีลูทจะสามารถอีลูทสารตัวอย่างที่ไม่มีโพลาร์หรือมีโพลาร์น้อยที่สุดออกมาก่อน จากนั้นเปลี่ยนตัวอีลูทให้มีโพลาริตีสูงขึ้น จะทำให้สารที่มีโพลาร์ถูกอีลูทออกมาได้ตามลำดับ วิธีที่ดีในการเปลี่ยนตัวอีลูทจากไม่มีโพลาร์เป็นมีโพลาร์คือต้องค่อยๆ เปลี่ยนอย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งทำได้โดยใช้ตัวอีลูทที่มีโพลาร์สูงกว่าไหลเข้าไปผสมในถังของตัวอีลูทที่มีโพลาร์ต่ำกว่า แล้วคนตัวทำละลายทั้งสองให้เข้ากัน จากนั้นค่อยปล่อยเข้าไปในคอลัมน์ ดังแสดงในรูป 4.12 การทำเช่นนี้จะทำให้สารตัวอย่างเคลื่อนที่ลงตามคอลัมน์ได้เร็วขึ้นตามกำลังของตัวอีลูทที่ถูกผสมด้วยตัวทำละลายที่มีโพลาร์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ วิธีการนี้จะทำให้แบนด์ที่ได้ไม่มีหาง (no-tailing) การเพิ่มกำลังหรือความเป็นโพลาร์ของตัวอีลูทอย่างต่อเนื่องตามที่กล่าวมาคล้ายกับการโปรแกรมอุณหภูมิในการทำก๊าซโครมาโตกราฟี



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนโพลาริตีของตัวอีลูทอย่างต่อเนื่อง

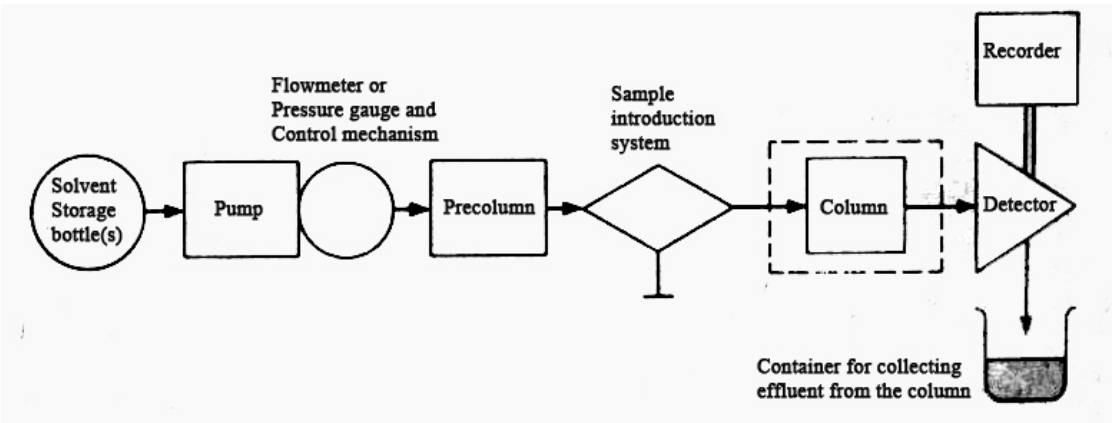
4. เก็บสารตัวอย่างที่ออกจากคอลัมน์ สารละลายที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์สามารถเก็บได้เป็นส่วนๆ (fraction) เช่น ส่วนละ 1 ถึง 10 ลบ.ซม. แล้วนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป เมื่อสามารถหาปริมาณของสารตัวอย่างในแต่ละส่วนได้จะทำให้สามารถสร้างเคอร์ฟของการอีลูทได้ (elution curve) และศึกษาได้ว่าส่วนใดของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์จะมีสารตัวอย่างมากที่สุด และถ้าต้องการเก็บสารตัวอย่างให้ได้สมบูรณ์ จะต้องเก็บตั้งแต่ส่วนใดถึงส่วนใด ถ้าการไหลของตัวอีลูทช้ามาก การเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ จะเสียเวลามากในการเฝ้าดู สามารถใช้เครื่องมือช่วย ซึ่งเรียกว่า fraction collector

5. การวัดปริมาณสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ (Detection) สารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี คือ ใช้การวิเคราะห์ทางแสง (optical method) เช่น UV, IR และ fluorescence เป็นต้น หรือใช้การวิเคราะห์ทางเคมีวิเคราะห์เชิงไฟฟ้า (Electroanalytical method) เช่น การทำโวลแทมเมตรีการวัดค่าการนำไฟฟ้า และวัดค่าศักย์ไฟฟ้า เป็นต้น

เทคนิคการวิเคราะห์วิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน และยังคงใช้ได้ดีจนถึงปัจจุบันโดยที่สารตัวอย่างต้องมีปริมาณมากพอสมควร จึงจัดประเภทของการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้เป็น Classical Liquid Chromatography หรือ Conventional Liquid Chromatography ในปัจจุบันเทคนิคของการทำลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ได้ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยลง และสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยลง โดยใช้เครื่องมือช่วย ทำให้เกิดเทคนิคของการวิเคราะห์

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC คือ เทคนิคหนึ่งของลิควิดโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่สามารถแยกได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ เพราะใช้ความดันช่วย และของแข็งที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดเล็ก จากรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นแล้วว่า เมื่อใช้ของแข็งบรรจุในคอลัมน์ขนาดเล็กๆ จะทำให้มีค่า HETP ต่ำ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ไม่มีผลต่อค่า HETP ดังนั้น การใช้ความดันช่วยทำให้เฟสเคลื่อนที่ไหลได้เร็วขึ้น จะไม่ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ลดลง เนื่องจากการทำ HPLC ต้องใช้ความดันช่วยจึงต้องมีเครื่องมือสำหรับปั๊มตัวอีลูท และเนื่องจากปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้มีจำนวนน้อย ดังนั้น หลังจากที่สารตัวอย่างถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ต้องมีเครื่องมือที่เรียกว่า ดีเทคเตอร์ (detector) วัดสารปริมาณน้อยๆ ที่ถูกอีลูทออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนประกอบของเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยในการวิเคราะห์จะรวมกันเข้าเป็นเครื่องมือ 1 ชุดของ HPLC ซึ่งสรุปเป็นแผนภาพได้ดังแสดงในรูปที่ 4.13

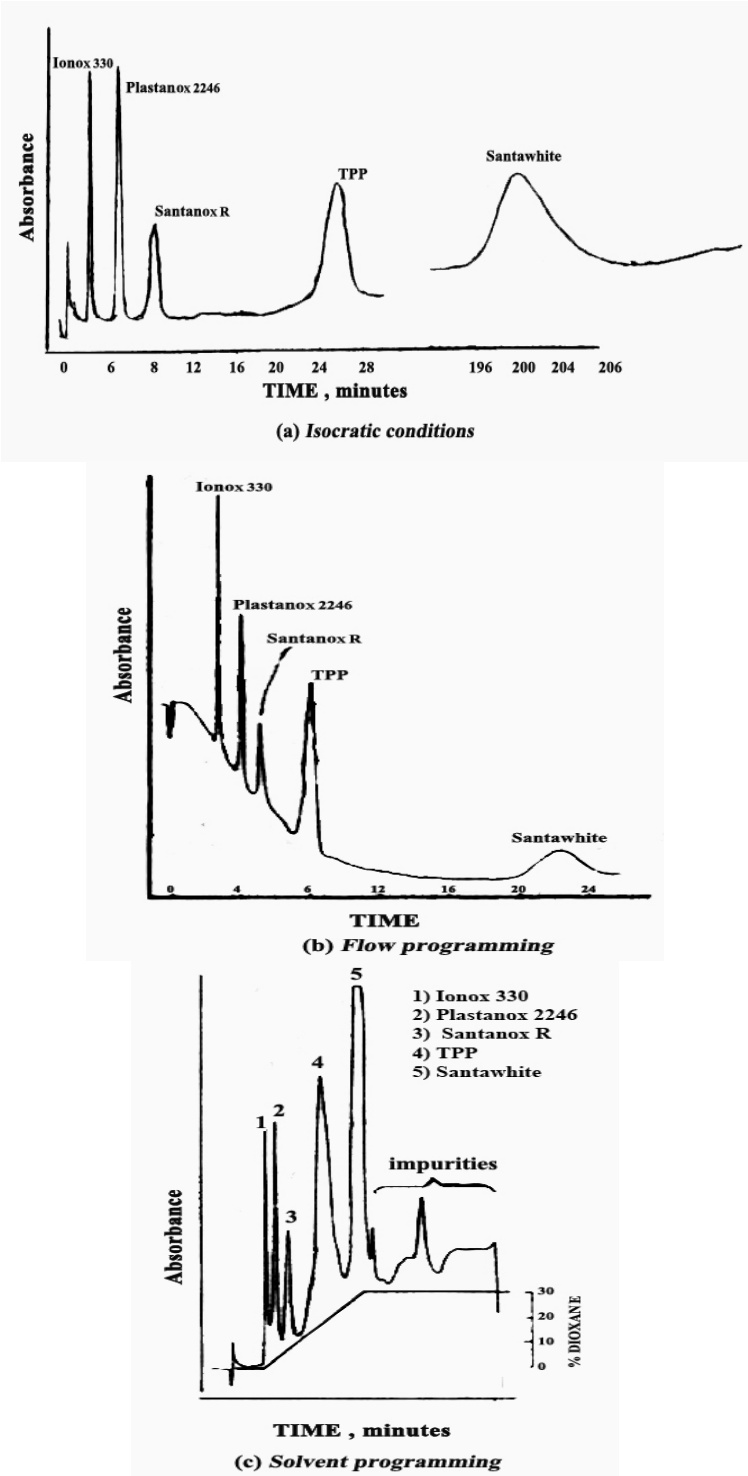


รูปที่ 4.13 แผนภาพของเครื่องมือ HPLC ส่วนของเส้นประหมายถึง เตาที่สามารถควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ได้

ส่วนประกอบแต่ละส่วนทำหน้าที่ดังต่อไปนี้

1. ถังใส่ตัวทำละลายที่เคลื่อนที่ (Solvent reservoir) ถังใส่ตัวทำละลายจะทำด้วยแก้วหรือสเตนเลสก็ได้ มีขนาดบรรจุ 1-2 ลิตร ตามปกติควรต่อกับตัวทำลายก๊าซ (degassing system) เพื่อดูดก๊าซออกซิเจนหรือไนโตรเจน ที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายออก ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟองก๊าซในคอลัมน์ หรืออาจรบกวนเครื่องวัดดีเทคเตอร์ ตัวทำลายก๊าซประกอบด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ ส่วนให้ความร้อน ตัวคนสารละลาย (stirrer) และส่วนทำการกลั่น (distillation system) ถ้าการวิเคราะห์ใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียว เครื่องมือจะมีถังใส่ตัวทำละลาย และตัวทำลายก๊าซเพียงชุดเดียว แต่ถ้าต้องใช้ตัวทำละลายผสมในการอีลูทต้องมีเครื่องมือ 2 ชุด ต่อเชื่อมกันเพื่อทำให้ตัวทำละลายสามารถผสมกันและเปลี่ยนโพลาริตีได้อย่างต่อเนื่อง (gradient elution) ซึ่งเรียกว่า การโปรแกรมตัวทำละลาย (solvent programming)

การอีลูทโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเพียงตัวเดียว (isocratic condition) จะทำให้ใช้เวลาในการแยกนาน และสารตัวอย่างที่ถูกอีลูทออกมาทีหลังมักจะมีหาง (tailing) ดังแสดงในรูปที่ 4.14 (a) แต่ถ้าเปลี่ยนตัวอีลูทโดยทำการโปรแกรมตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีกที่ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.14 (c) การโปรแกรมตัวทำละลายสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง โดยการเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ หรือทำเป็นขั้น (Stepwise) คือเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงเวลาหนึ่ง ต่อจากนั้นก็ควบคุมให้คงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง แล้วก็เพิ่มขึ้นอีก จากนั้นก็ควบคุมให้คงที่อีกเป็นเช่นนี้ตลอดการทดลอง

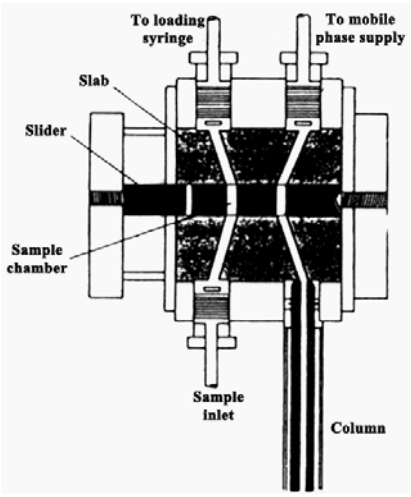


รูปที่ 4.14 โครมาโตแกรมที่ได้จากการแยกโดยใช้เครื่องมือ HPLC

2. เครื่องปั๊ม (pump) ทำหน้าที่ปั๊มตัวทำละลายเข้าคอลัมน์ด้วยความดันอย่างน้อย 1000 psi (lbs/in^2) ความดันที่เหมาะสมและใช้ได้ดีคือ 4000 ถึง 6000 psi ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลของตัวทำละลายมีค่าเท่ากับ 3 ลบ.ซม./นาที อัตราการไหลควรควบคุมให้คงที่ เบี่ยงเบนได้ไม่เกิน ±2% เนื่องจากการไหลมีผลโดยตรงต่อเวลาที่ใช้ในการแยก ถ้าเพิ่มความเร็วของการไหลของตัวทำละลายจะทำให้สารตัวอย่างถูกอีลูทได้เร็วขึ้น ดังนั้นในการแยก ถ้าทำการโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลาย พบว่า การแยกจะใช้เวลาน้อยลง ลักษณะพีกที่ได้ดีขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.14 (b) การโปรแกรมอัตราการไหลของตัวทำละลายสามารถทำได้ทั้งแบบต่อเนื่องและแบบเป็นขั้น เช่นเดียวกับการโปรแกรมตัวทำละลาย

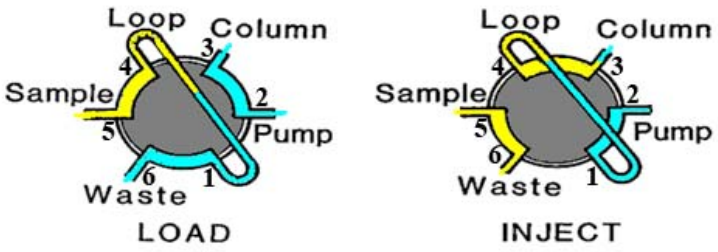
3. Precolumn เครื่องมือ HPLC บางเครื่องต้องมีคอลัมน์เพิ่มขึ้นอีก 1 อัน เรียกว่า precolumn มีสารบรรจุอยู่เหมือนกับคอลัมน์ที่ใช้งาน แต่ขนาดของสารที่บรรจุอยู่ใหญ่กว่าเพื่อไม่ให้ความดันของตัวทำละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์นี้ลดลง คอลัมน์นี้มีหน้าที่แยกเอามลทินที่ติดอยู่ในตัวทำละลายออกไป หรือทำให้ตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวอีลูทบริสุทธิ์ขึ้น

4. ส่วนฉีดสารตัวอย่าง (Sample injection system) ส่วนฉีดสารตัวอย่างที่ใช้ใน HPLC มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.15 วาล์วที่ใช้คือ สไลเดอร์วาล์ว (Slider valve) ที่ผลิตขึ้นจากบริษัท Kel-F สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าทางวาล์วโดยเข็มฉีดยา จากนั้นตัวสไลเดอร์จะเคลื่อนจากซ้ายมือไปขวามือ จนกระทั่งสารตัวอย่างอยู่ในทิศทางการไหลของตัวอีลูท สำหรับขนาดของวาล์วที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปจะมีหลายขนาด ตั้งแต่ 2μl ถึง 100 μl



รูปที่ 4.15 ส่วนฉีดสารตัวอย่าง

ระบบฉีดสารตัวอย่างได้ถูกพัฒนาขึ้นอีกเป็นแบบ sampling valve ที่ทนต่อแรงดันสูงของเฟสเคลื่อนที่ วาล์วเป็นระบบ six-port โดยตำแหน่งพอร์ตที่ 1 และ 4 จะต่อกับ loop ที่ใช้บรรจุสารตัวอย่าง ตำแหน่งพอร์ตที่ 2 และ 3 จะต่อกับปั๊มและคอลัมน์ ตำแหน่งพอร์ตที่ 5 และ 6 เป็นตำแหน่งที่ไหลออกของตัวอย่างและเฟสเคลื่อนที่ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 การทำงานมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนที่เรียกว่า load ตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปใน loop จนเต็ม ส่วนเกินจะไหลออกที่ตำแหน่งพอร์ตที่ 6 ตามรูปที่ 4.16 (a) ขั้นตอนที่ 2 เป็นการสั่งฉีดมีการปรับทิศทางการไหลของเฟสเคลื่อนที่ตามรูปที่ 4.16 (b) เฟสเคลื่อนที่จะพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ระบบฉีดสารตัวอย่างชนิดนี้เป็นที่นิยมกันในปัจจุบัน ที่รู้จักกันกว้างขวางคือของบริษัท Valco และ Rheodyne



รูปที่ 4.16 ระบบฉีดสารตัวอย่างแบบ Six-port valve

5. คอลัมน์ (Column) คอลัมน์สำหรับใช้ในงานวิเคราะห์ HPLC ทำด้วยหลอดแก้วอย่างหนาหรือสเตนเลส มีขนาดความยาว 15 ถึง 150 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2-3 มิลลิเมตร คอลัมน์ขนาดที่ยาวเป็นเมตรก็สามารถใช้ได้เช่นกันโดยขดเป็นวงกลม

สารที่บรรจุในคอลัมน์มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นของแข็งดูดซับ ซึ่งต้องมีขนาดเล็กมากและมีได้หลายขนาด มีชื่อเรียกทางการค้าต่างๆ กัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.5 อีกชนิดหนึ่งเป็นของเหลวฉาบบนของแข็งซัพพอท (solid support) ซึ่งมีทั้งแบบธรรมดาและกลับเฟส (reverse phase) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.6

ของแข็งตัวดูดซับที่นิยมใช้ใน HPLC คือ ซิลิกา และอะลูมินา การเลือกใช้สามารถจัดแบ่งตามประเภทของสารที่นำมาวิเคราะห์ได้ดังนี้

ก. ถ้าเป็นสารประเภทกรด (acidic compound) ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

ข. ถ้าเป็นสารที่เป็นเบสเล็กน้อย pK_b น้อยกว่า 5 ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ

ค. โมเลกุลที่ไม่อิ่มตัว เช่น Olefinic และ aromatic ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

ง. สารที่มีกลุ่มฮาโลเจนควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

จ. สารที่ไวต่อกรด ควรใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

ฉ. สารที่ไวต่อเบส ควรใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ

สำหรับการเลือกเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นของเหลวที่ฉาบบนของแข็งซัพพอท ให้พิจารณาเลือกตามโพลาริตีของสารตัวอย่าง และตัวอีลูทที่ใช้เช่นเดียวกับการทำ Conventional liquid Chromatography

นอกจากนี้เฟสอยู่กับที่ยังสามารถใช้เรซินที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้ (ion-exchange resin) เรซินที่นำมาใช้ใน HPLC ต้องเป็นชนิด strong cation หรือ strong anion exchanger ซึ่งมีหลายชนิด และมีชื่อเรียกทางการค้าต่างๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 4.7 สำหรับทฤษฎีและหลักการของการแลกเปลี่ยนไอออนและรายละเอียดต่างๆ ของ ion-exchange chromatography จะกล่าวไว้ในบทที่ 5

ตารางที่ 4.5 ของแข็งดูดซับที่บรรจุในคอลัมน์สำหรับ HPLC

Adsorbent	Form[a]	Particle diameter, μm[b]	Trade name
Silica gel	M	4	MicroSil Silica Gel[c]
	M	5	Partisil 5[d]
	M	10	Partisil 10[d]
	M	20	Partisil 20[d]
	P	40	HS Partisil[d]
	P	40	HC Partisil[d]
	M	5, 10, 30	LiChrosorb SI-60[e]
	M	5, 10, 30	LiChrosorb SI-100[e]
	M	5, 10, 15, 20	Polygosil-60[f]
	M	40	Chromasorb LC-I[g]
	M	5, 10, 20	LiChrosphere SI-100[e]

Adsorbent	Form[a]	Particle diameter, μm[b]	Trade name
	M	10	Vydac 101IR[h]
	M	10	Vydac 101TP[h]
	M	5, 10	Spherisorb S-W[i]
	M	10	μPorasil[i]
Alumina	M	5, 10, 30	LiChrosorb Alox-T[e]
	M	5, 10, 20	LiChrosorb Alox 60-D[e]
	M	40	Chromosorb LC-3[g]
	M	5, 10, 20	Spherisorb AY[i]
	P	40	HS Pellumina[d]
	P	40	HC Pellumina[d]
Polyamide	P	40	Pellamidon[d]

[a]M = porous microparticulate; P = pellicular.

[b]The diameters are average particle diameters.

[c]Manufactured by Micromeritics Instrument Corp.

[d]Manufactured by Whatman. Inc.

[e]Manufactured by E. Merck.

[f]Manufactured by Macherey-Nagel.

[g]Manufactured by Johns-Manville.

[h]Manufactured by the Separations Group.

[i]Manufactured by Phase Separations Limited.

[j]Manufactured by Waters Associates.

ตารางที่ 4.6 ของเหลวที่ฉาบบนของแข็งซัพพอท ใช้บรรจุในคอลัมน์สำหรับ HPLC

Liquid group	Type	Particle diameter, μm	Trade name
Amine	Normal	10	MicroSil NH_2[a]
		10	LiChrosorb NH_2[b]
		5, 10	Polygosil 60-D-NH2[c]
		5, 10	Nucleosil NH2[a]
		10	μ Bondapak NH2[d]
		10	Spherisorb S5NH[e]
Nitrile	Normal	10	MicroSil CN[a]
		5, 10	Polygosil 60-D-CN[c]
		10	Vydac 501TP[f]
		5	Spherisorb S5CN[e]
		5, 10	Nucleosil CN[c]
		10	Chromosorb LC-8[a]
		10	μ Bondapak CN[d]
Amine and nitrile	Normal	10	Partisil-10 PAC[h]
		40	Co:Pell PAC[b]
Octyl (C_8H_{17})	Reverse phase	4	MicroSil C_8[a]
		5, 10	LiChrosorb RP-8[b]
		5, 10	Polygosil-60-D-C_8[c]
		5, 10	Nucleosil C_8[c]
		10	

Liquid group	Type	Particle diameter, μm	Trade name
			Vydac 2081 R[f]
Octadecyl ($C_{18}H_{37}$)	Reverse phase	4	
		5, 10	MicroSil C_{18}[a]
		5, 10	Polygosil-60-D-C18[c]
		5, 10	LiChrosorb RP-18[b]
		10	Nucleosil C 18[c]
		10	μ Bondapak C18[d]
		5	Vydac 201 IR[f]
		10	Partisil-5 ODS[h]
		40	Partisil-10 ODS-2[h]
			Co: Pell ODS[h,i]

[a]Manufactured by Micromeritics Instrument Corp.

[b]Manufactured by E. Merck.

[c]Manufactured by Macherey-Negel.

[d]Manufactured by Waters Associates.

[e]Manufactured by Phase Separations Ltd.

[f]Manufactured by the Separations Group.

[g]Manufactured by Johns-Manville.

[h]Manufactured by Whatman. Inc.

[i]A pellicular on glass beads.

ตารางที่ 4.7 เรซินที่ใช้บรรจุในคอลัมน์สำหรับ HPLC

Type	Particle diameter, μm	Trade name
Anion exchanger	10	Partisil-10 SAX[a]
	10	LiChrosorb AN[b]
	10	Ionex-SB10[c]
	10	Vydac 301TP[d]
	5, 10	Nucleosil SB[c]
	40	As Pellionex SAX[a, e]
		Partisil-10 SCX[a]
Cation exchange.	10	LiChrosorb KAT[b]
	10	Ionex-SA10[c]
	10	Vydac 401TP[d]
	10	Nucleosil SA[c]
	5, 10	HC Pellionex SCX[a, e]
	40	

[a]Manufactured by Whatman, Inc.

[b]Manufactured by E. Merck.

[c]Manufactured by Macherey-Negel.

[d]Manufactured by the Separations Group.

[e]A pellicular on glass bead.

6. ส่วนควบคุมอุณหภูมิ (Temperature Control) ตามปกติการทำลิควิดโครมาโตกราฟีทั่วๆ ไป นิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น ส่วนควบคุมอุณหภูมิอาจใช้เป็นถังน้ำหุ้มคอลัมน์ไว้ (water jacketed) เพื่อทำให้อุณหภูมิคงที่ แต่ถ้าต้องการให้รีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างสั้นขึ้น อาจเพิ่มอุณหภูมิให้แก่คอลัมน์ก็ได้เช่นเดียวกับก๊าซโครมาโตกราฟี โดยใช้เตา (oven) ที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้

7. ดีเทคเตอร์ (Detector) ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC ไม่มีชนิดที่มีความไวสูงแบบก๊าซโครมาโตกราฟี ดีเทคเตอร์จะเป็นชนิดใดขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่าง ซึ่งสามารถวัดปริมาณของสารได้ตามคุณสมบัติของสารนั้นๆ ตารางที่ 4.8 ได้แสดงชนิดต่างๆ ของดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC สำหรับดีเทคเตอร์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตหรือแสงวิสิเบิล (UV-Vis Spectophotometer) มีลักษณะการทำงานดังแสดงในรูปที่ 4.16

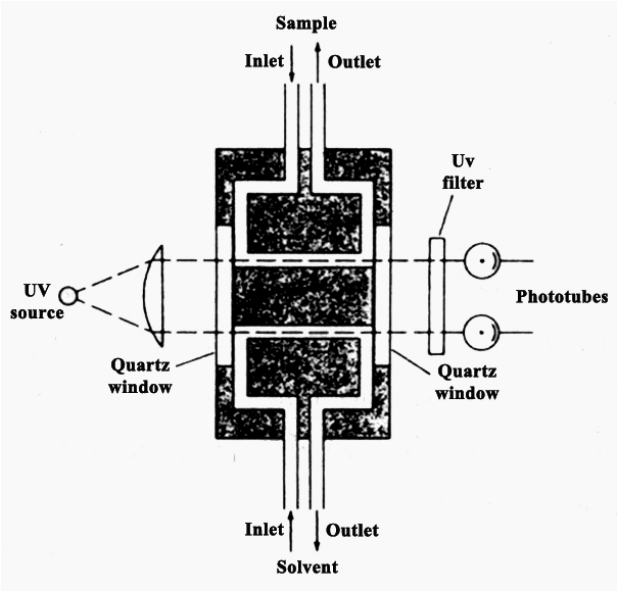
ตารางที่ 4.8 ดีเทคเตอร์ที่ใช้ใน HPLC

Detector Basis	Type[b]	Maximum Sensitivity[c]	Flow Rate Sensitive	Temperature Sensitivity	Useful with Gradient ?	Available Commercially ?
UV absorption	S	$5x10^{-10}$	No	Low	Yes	Yes
IR absorption	S	10^{-6}	No	Low	Yes	Yes
Fluorometry	S	10^{-10}	No	Low	Yes	Yes
Refractive index	G	$5x10^{-7}$	No	$\pm 10^{-4}$ °C	No	Yes
Conductometric	S	10^{-8}	Yes	± 1°C	No	Yes
Moving wire	G	10^{-8}	Yes	None	Yes	Yes
Mass spectrometry	S	10^{-10}	No	None	—	Yes
Polarography	S	10^{-10}	Yes	± 1°C	—	No
Radioactivity	S	—	No	None	Yes	No

[a]Most of these data were taken from: L., R. Snyder and J.J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromotography.* New York: Wiley-Interscience, 1964, p. 162.

[b]G = general; S = selective

[c]Sensitivity for a favorable sample in grams per milliter.



รูปที่ 4.17 อุลตราไวโอเลต ดีเทคเตอร์สำหรับ HPLC

เปรียบเทียบการวิเคราะห์ระหว่างวิธี GC กับ HPLC

ทั้ง GC และ HPLC เป็นเทคนิคของการวิเคราะห์วิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่ใช้เครื่องมือช่วย ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการแยกและประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางคุณภาพและทางปริมาณได้ดีทั้งสองชนิด เมื่อเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของทั้งสองวิธีพบว่า วิธี HPLC มีข้อดีอยู่หลายประการ คือ

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ วิธี HPLC ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียมที่ยุ่งยากก่อน (pre-treatment) ขอเพียงแต่ให้สารตัวอย่างอยู่ในสภาพที่เป็นของเหลวก็สามารถนำมาฉีดเข้าเครื่อง แล้วทำโครมาโตแกรมได้เลยโดยตรง

2. วิธี HPLC สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารได้มากชนิดกว่าวิธี GC เพราะ HPLC ไม่มีข้อจำกัดว่าต้องเป็นสารที่ระเหยได้ ทำให้สามารถใช้ HPLC วิเคราะห์สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ ได้

3. วิธี HPLC มีคอลัมน์ให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมของสารตัวอย่างได้มากชนิดกว่า GC ทำให้ใช้ในการวิเคราะห์สารได้มากชนิดกว่า

4. สามารถทำให้การแยกดีขึ้นได้ (high resolution) โดยเปลี่ยนความเข้มข้นหรือชนิดของเฟสเคลื่อนที่ได้ตามความเหมาะสมได้มากมาย

5. การเกิดปฏิกิริยาการแบ่งส่วนหรือดูดซับ ระหว่างสารตัวอย่างกับเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ สามารถเกิดที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้น การแยกสารโดยวิธี HPLC จึงใช้งานที่อุณหภูมิปกติของห้องปฏิบัติการได้ ในขณะที่วิธี GC ต้องทำที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิห้อง จึงจำเป็นต้องให้พลังงานความร้อนแก่คอลัมน์ ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธี HPLC

6. ในกรณีที่ต้องการเก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หรือทดสอบด้วยวิธีอื่นให้แน่ใจอีกครั้งหนึ่ง พบว่า วิธี HPLC สามารถทำได้ง่ายกว่าวิธี GC

7. สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ไอออนของสารอนินทรีย์ได้

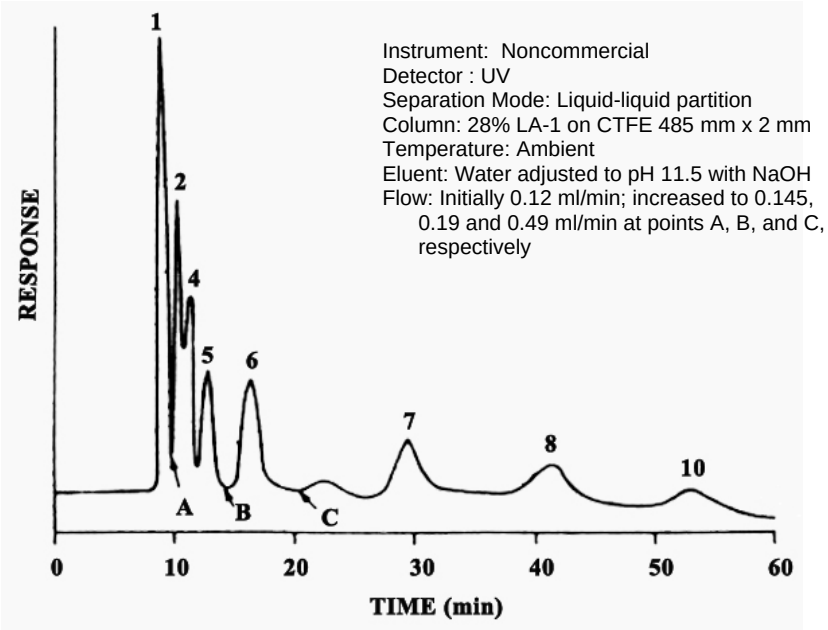
สำหรับข้อดีของวิธี GC คือ มีความสามารถในการแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้ดี ให้ผลที่เที่ยงตรงและรวดเร็วกว่าวิธี HPLC เครื่องมือมีส่วนประกอบที่ไม่ซับซ้อนและราคาถูกกว่า

การประยุกต์วิธี HPLC ทางการวิเคราะห์

เนื่องจากโครมาโตแกรมที่ได้ของ HPLC และ GC มีลักษณะเหมือนกัน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ทางคุณภาพและการวิเคราะห์ทางปริมาณจึงทำได้แบบเดียวกันทุกประการ กล่าวคือ การวิเคราะห์ทางคุณภาพสามารถทำได้โดยเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ หรือรีเทนชันโวลูมของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน หรือโดยต่อเครื่อง HPLC เข้ากับเครื่องมือที่สามารถช่วยในการพิสูจน์ได้ เช่น เครื่อง IR NMR, และ mass spectrophotometer

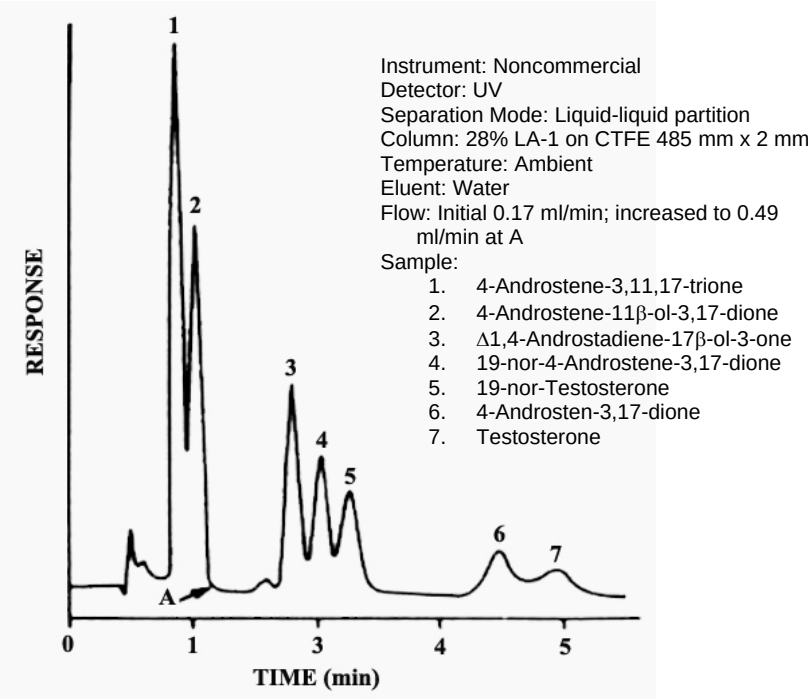
สำหรับการวิเคราะห์ทางปริมาณสามารถทำได้โดยวัดขนาดของพีกด้วยวิธีการวัดความสูง วัดพื้นที่พีก ใช้เพลนิมิเตอร์ (Planimeter) หรือใช้อินทิเกรเตอร์ (Integrator) เมื่อทราบขนาดของพีกแล้วสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยเทียบขนาดของพีกสารตัวอย่างกับพีกสารมาตรฐานซึ่งสามารถทำได้ 3 แบบ คือ วิธีเทียบกับสารมาตรฐานเพียงตัวเดียว (Absolute Method) วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) และวิธีเติมสารมาตรฐาน (Standard addition) หรือใช้วิธี Internal normalization หรือใช้วิธี Correction factor (ให้ดูรายละเอียดในบทที่ 6)

วิธี HPLC สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารได้มากมายหลายชนิด ทั้งทางชีวเคมี ทางอาหาร ทางเภสัช และทางเทคนิคการแพทย์ ซึ่งจะขอยกตัวอย่างโครมาโตกราฟีที่ได้จากการทำ HPLC สารบางชนิดมาแสดงไว้ในรูปข้างล่างนี้

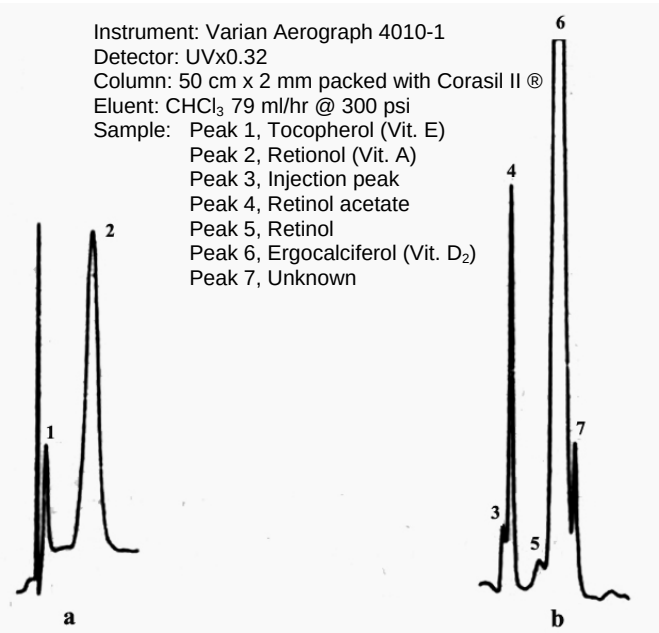


No.
1 1,3,5 (10)-estratrien-3,17β-diol-17α-glucosiduronic acid (estradiol-17α-glucosiduronic acid)
2 1,3,5(10)-estratrien-3,16α,17β-triol (estriol)
3 1,3,5(10)-estratrien-3,16α,17α-triol (17-epiestriol)
4 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-16,17-dione (16-ketoestrone)
5 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol-16-one (16-ketoestradiol)
6 1,3,5(10)-estratrien-3,16β,17β-triol (16-epiestriol)
7 1,3,5(10)-6,8-estrapentaen-3-ol-17-one (equilinen)
8 1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol (estradiol)
9 1,3,5(10)-estratrien-2-methoxy-3-ol-17-one (2-methoxyestrone)
10 1,3,5(10),7-estratetraen-3-ol-17-one (equilin)
11 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one (estrone)

รูปที่ 4.18 การแยกฮอร์โมนอีสโตรเจน



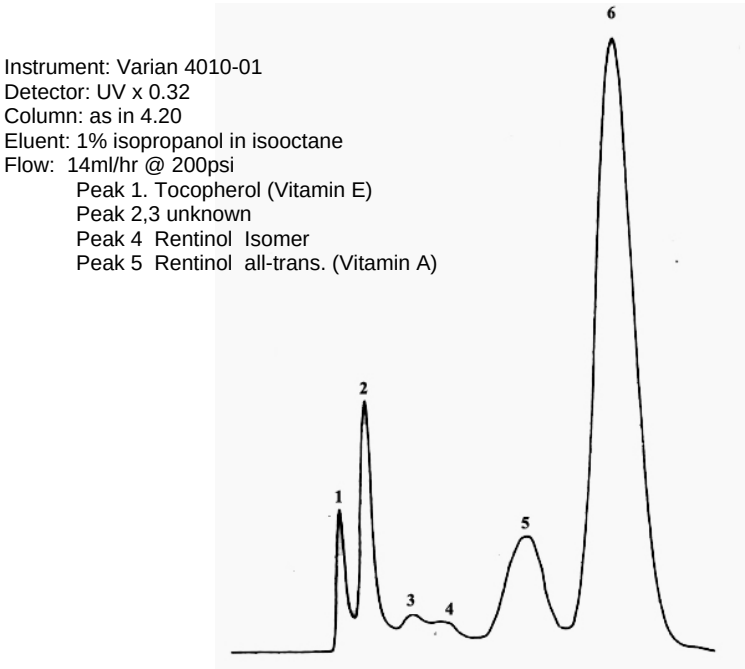
รูปที่ 4.19 การแยกฮอร์โมนแอนโดรเจน



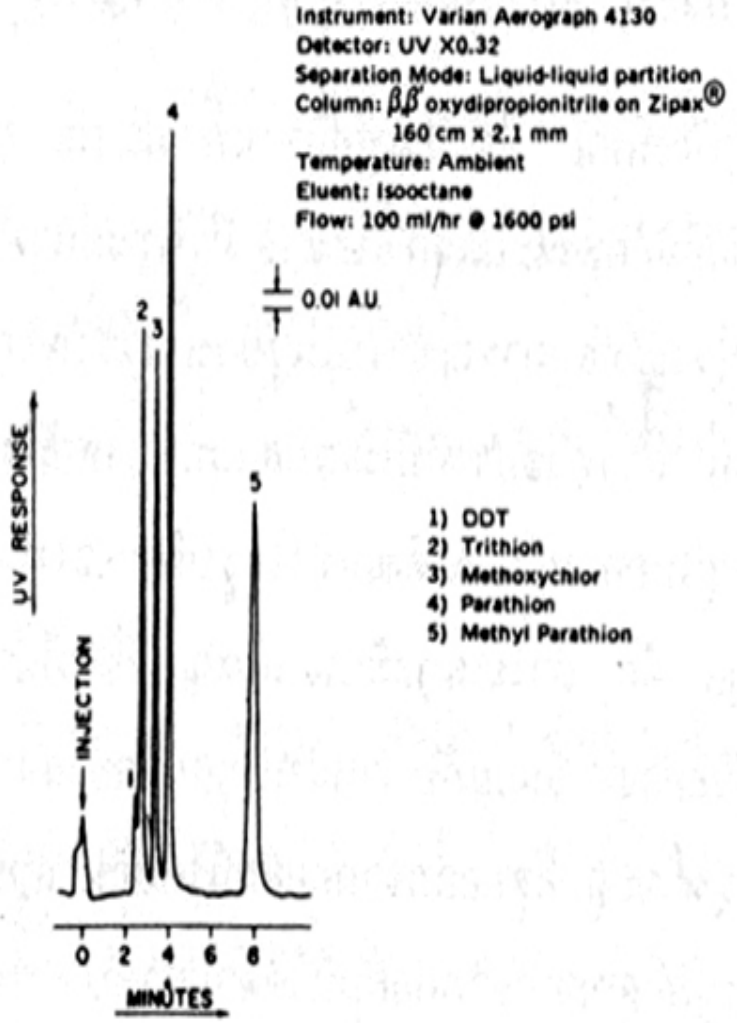
รูปที่ 4.20 a) การแยกวิตามิน A และ E

b) การแยกวิตามิน A และ D_2

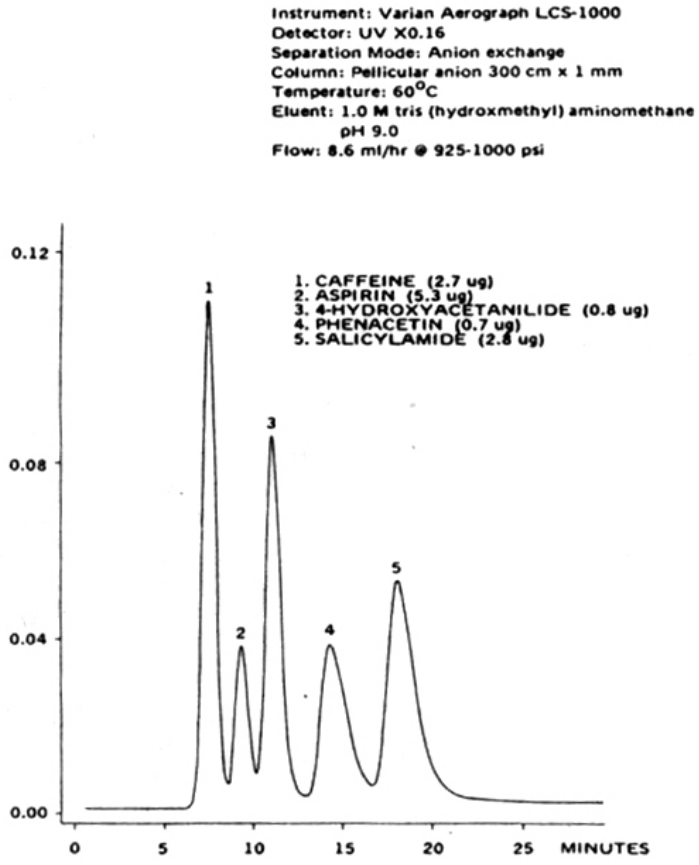
เมื่อทำการเปลี่ยนตัวทำละลายในการแยกวิตามิน A และ E จากรูปที่ 4.20 (a) มาเป็นตัวทำละลายผสมของ 1% isopropyl alcohol ใน iso octane และเปลี่ยนเงื่อนไขของการทดลองบางอย่างเป็นเงื่อนไข ดังแสดงในรูปที่ 4.21 เมื่อเปรียบเทียบการแยกระหว่างรูปที่ 4.20 (a) กับรูปที่ 4.21 ซึ่งเป็นสารตัวอย่างอย่างเดียวกัน พบว่า การใช้เงื่อนไขตามรูปที่ 4.21 สามารถแยกได้ดีกว่าเงื่อนไขตามรูปที่ 4.20 (a)



รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมของการแยกวิตามิน A และ E



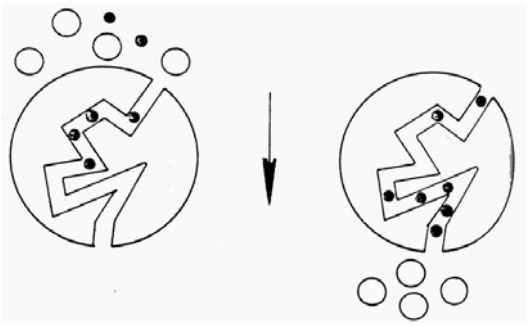
รูปที่ 4.22 โครมาโตแกรมของยาฆ่าแมลง (insecticide)



รูปที่ 4.23 การแยกสารที่ใช้เป็นยาระงับปวด

เอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี (exclusion chromatography)

โครมาโตกราฟีชนิดนี้ ใช้เป็นเทคนิคในการแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ๆ เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งที่มีลักษณะโมเลกุลเป็นเจล มีรูพรุนขนาดใหญ่ ขนาดของรูแน่นอน สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถเข้าไปในรูของเจลได้จะถูกพาออกมาจากคอลัมน์ได้ง่ายด้วยเฟสเคลื่อนที่ สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กเพียงพอที่จะเข้าไปในรูของเจลจะถูกกักไว้ ทำให้ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นาน ดังแสดงในรูปที่ 4.24 เนื่องจากขนาดของโมเลกุลขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล คือ ถ้าโมเลกุลมีขนาดใหญ่ จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุด ถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า จะถูกอีลูทออกจากคอลัมน์ได้ตามลำดับ



รูปที่ 4.24 รูของเจลจะมีผลทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเดินทางออกจากคอลัมน์ได้ช้า

เจลที่ใช้ในการทำเอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟีแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. **เจลชนิดอ่อน** (Soft Gels) เจลชนิดนี้ คือ สารโพลีเมอร์ (Polymeric material) ที่ได้จากการ cross linked สารพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น dextran ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Sephadex ปกติ Sephadex ที่ใช้ยังแบ่งได้อีกหลายชนิดตามขนาดรูที่เกิดจากการ cross linked ดังแสดงในตารางที่ 4.9 หรือได้จากการ cross-linked สารจำพวก อะไครลาไมด์ (acrylamide) ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Gel P มีได้หลายขนาดเช่นเดียวกัน การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้เจลชนิดอ่อนนี้จะมีชื่อเรียกว่า gel filtration chromatography

ตารางที่ 4.9 ชนิดของ Sephadex Gels.

Sephadex Type	Water Regain gH_2O/g Dry Sephadex	Bed Volume cm^3/g Dry Sephadex	Fractionation Range for Peptides and Globular Proteins, M.W.
G-10	1.0±0.1	2-3	Up to 700
G-15	1.5±0.2	2.5-3.5	Up to 1500
G-25	2.5±0.2	4-6	1,000 to 5,000
G-50	5.0±0.3	9-11	1,500 to 30,000
G-75	7.5±0.5	12-15	3,000 to 70,000
G-100	10.0±1.0	15-20	4,000 to 150,000
G-150	15.0±1.5	20-30	5,000 to 400,000
G-200	20.0±2.0	30-40	5,000 to 800,000

2. **เจลชนิดแข็ง** (Semirigid gels) เจลชนิดนี้ได้จากการ cross-linked สารพวกโพลีสไตรรีน (พวกเดียวกับเรซิน) มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Beads S ถ้าใช้เจลชนิดนี้เป็นเฟสอยู่กับที่ที่บรรจุในคอลัมน์ จะมีชื่อเรียกว่า Gel permeation chromatography

ทั้งเจลชนิดอ่อนและชนิดแข็ง เมื่อต้องการนำมาใช้ต้องนำไปแช่ในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ หรือตัวทำละลายไฮโดรฟิลลิก (hydrophilic) ก่อน จนกระทั่งพองตัวเต็มที่แล้วจึงบรรจุในคอลัมน์ วิธีเอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟี มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีสำหรับสารที่มีน้ำหนัก โมเลกุลสูงๆ เช่น เปปไตด์ โปรตีน ฮีโมโกลบิน ฯลฯ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นวิธีการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้ด้วย ซึ่งทำได้โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอนหลายๆ ขนาด และมีโครงสร้างเหมือนกับสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ จากนั้นหาค่ารีเทนชันโวลูมของสารมาตรฐานแต่ละตัวนำค่ารีเทนชันโวลูมมาพลอตกราฟเทียบกับค่าล็อกของน้ำหนักโมเลกุลจะได้กราฟที่เป็นเส้นตรง จากนั้นนำสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ และหาค่ารีเทนชันโวลูมของสารตัวอย่าง จากค่ารีเทนชันโวลูม จะสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้จากกราฟมาตรฐาน

สมการที่สามารถใช้อธิบายหลักการของเอกซ์คลูชันโครมาโตกราฟีได้ดี คือ สมการที่ 3.14 คือ

$$V_R = V_m + K_d V_s \qquad \text{.....(4.10)}$$

สำหรับสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่ ๆ หรือน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า exclusion limit ของเจล พบว่าสามารถเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาเดียวกับตัวทำละลาย นั่นคือ V_R จะมีค่าเท่ากับ V_m (V_m คือ ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเรียกว่า Void Volume) ในกรณีนี้ค่า K_d จะมีค่าเท่ากับ 0 เพราะไม่เกิดการกระจายของสารตัวอย่างระหว่างเฟสอยู่กับที่กับเฟสเคลื่อนที่แต่อย่างใด ($K_d = C_s/C_m = 0$ เพราะว่า $C_s = 0$) เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กลงเพียงพอที่จะเข้าไปอยู่ในเจลได้หมด จะพิจารณาได้ว่า ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เข้าไปอยู่ในเจลกับที่อยู่ในตัวทำละลายนอกเจลนั้น ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น $C_s = C_m$ นั่นคือ $K_d = C_s/C_m = 1$ สำหรับ V_s ซึ่งคือปริมาตรของเฟสอยู่กับที่ (pore volume) สามารถหาได้โดยใช้สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้หมด มาหาค่ารีเทนชันโวลูม (V_R) แล้วแทนค่าลงในสมการที่ 4.10 โดยใช้ $K_d = 1$ สำหรับค่า V_m ทราบได้จากการใช้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของเจล หาค่ารีเทนชันโวลูม ซึ่งจะได้ $V_R = V_m$ (เพราะ $K_d = 0$) โดยการแทนค่าต่าง ๆ ที่ทราบจะสามารถคำนวณหาค่า V_s ได้ สำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่างกลางจะเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้บางส่วน แสดงว่า ค่า K_d จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่า K_d ของสารตัวอย่างนั้น มีค่าเท่ากับเท่าใดได้เมื่อทราบค่า V_s, V_m และ V_R ของสารนั้น ๆ แล้ว

ตัวอย่างที่ 4.5 สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80,000 ถูกนำมาผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุเจลซึ่งมี exclusion limit เท่ากับ 40,000 ปรากฏว่าวัดค่ารีเทนชันโวลูมได้เท่ากับ 25 ลบ.ซม. เมื่อเปลี่ยนเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงเป็นขนาดที่สามารถเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้หมด พบว่ามีรีเทนชันโวลูมเท่ากับ 152 ลบ.ซม. จากนั้นนำสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ พบว่ามีรีเทนชันโวลูมเท่ากับ 102 ลบ.ซม. จงคำนวณหาค่า Void Volume (V_m) และ Pore Volume (V_s) ของคอลัมน์และหาค่า K_d ของสารตัวอย่าง

วิธีทำ เมื่อใช้สารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 80,000 ซึ่งสูงกว่า exclusion limit แสดงว่า $K_d = 0$ และ $V_R = V_m = 25$ ลบ.ซม. เมื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กจะได้ $V_R = 152$ ลบ.ซม. และ $K_d = 1$ นั่นคือ สามารถหา V_s ได้จากสมการที่ 4.10

$$V_R = V_m + K_d V_s$$

$$152 = 25 + (1)\, V_s$$

$$\therefore\ V_s = 127 \text{ ลบ.ซม.}$$

เมื่อเปลี่ยนเป็นสารตัวอย่างที่ให้ค่ารีเทนชันโวลูมเท่ากับ 102 ลบ.ซม. แสดงว่าสารตัวอย่างนี้มีค่า K_d ที่สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4.10 เช่นกัน คือ

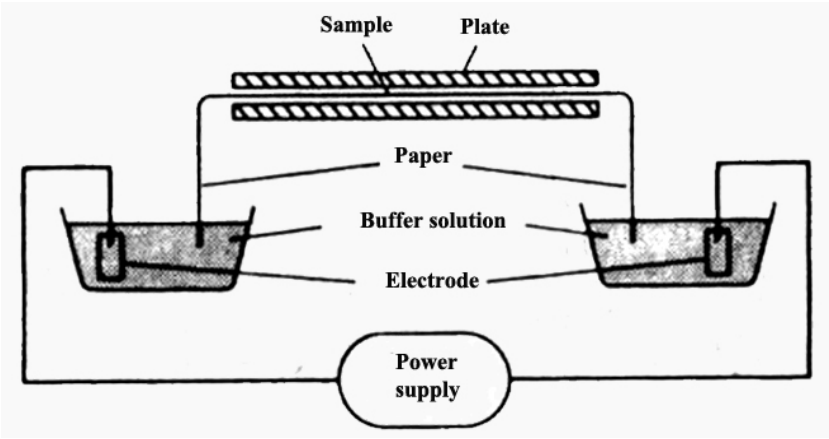
$$102 = 25 + K_d\,(127)$$

$$\therefore\ K_d = 0.61$$

อิเล็กโตรฟอเรซีส (Electrophorésis)

อิเล็กโตรฟอเรซีส หมายถึง การเคลื่อนที่ของอนุภาคคอลลอยด์ที่มีประจุภายในสารละลาย ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า อนุภาคที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่เข้าหาสนามไฟฟ้าลบ อนุภาคคอลลอยด์ที่มีประจุต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่สวนทางกัน อนุภาคที่มีประจุเหมือนกันจะเคลื่อนที่ได้เร็วหรือช้าต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนประจุ ขนาด และน้ำหนักของอนุภาคนั้น (ขึ้นอยู่กับ charge to mass ratio) อนุภาคที่มีประจุสูงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอนุภาคที่มีประจุต่ำ และอนุภาคที่มีขนาดใหญ่และน้ำหนักมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็กและน้ำหนักน้อย จะเห็นได้ว่า การแยกโดยวิธีนี้ไม่ต้องมีเฟสเคลื่อนที่ ไอออนของสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ได้ด้วยแรงดึงดูดของประจุ แสดงว่า ไม่มีกระบวนการแบ่งส่วนของสารตัวอย่างระหว่างเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่เกิดขึ้น จึงไม่จัดวิธีวิเคราะห์นี้ไว้เป็นเทคนิคหนึ่งของโครมาโตกราฟี แต่จะขอนำมากล่าวไว้ในบทนี้ เพราะว่าเป็นเทคนิคของการแยกมีส่วนคล้ายโครมาโตกราฟีมาก

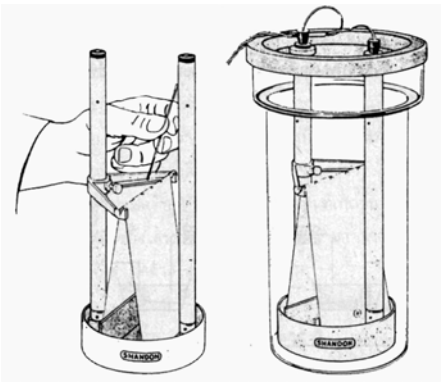
วิธีอิเล็กโตรฟอเรซีสสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี ขึ้นอยู่กับเทคนิคของการแยกว่าเกิดขึ้นโดยมีตัวกลางช่วยค้ำจุนหรือไม่ ถ้าการแยกนั้นเกิดขึ้นภายในสารละลายโดยตรงจากการผ่านสนามไฟฟ้าลงในสารละลาย แล้วทำให้เกิดการแยกขึ้นจะเรียกว่า free-solution method วิธีนี้ใช้ได้ดีมากในการแยกโปรตีน สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีได้เป็นอย่างดี แต่มีปัญหาคือแต่ละส่วนที่แยกออกจากกันได้ในสารละลายมีโอกาสผสมกันได้ง่าย ถ้าเกิดการคนขึ้นและเทคนิคของการนำเอาส่วนที่แยกได้ออกจากสารละลายทำได้ยาก อีกวิธีหนึ่งคือใช้ตัวกลางช่วยค้ำจุน ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ กระดาษ (ใช้กระดาษชนิดเดียวกับการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี) เมมเบรนของเซลลูโลสอะซิเตต ผงเซลลูโลส starch gel agar gel เรซิน ผงแก้ว และซิลิกาเจล เป็นต้น สำหรับตัวกลางเหล่านี้ยกเว้น กระดาษ และเมมเบรนของเซลลูโลสอะซิเตตต้องถูกเตรียมให้เป็นแผ่นบางๆ (thin layer) โดยใช้แผ่นแก้วหรือพลาสติกยึดเหมือนกับการทำ TLC เมื่อเตรียมแผ่นกระดาษหรือแผ่น thin layer ได้แล้ว ให้นำมาทำให้ชุ่มด้วยสารละลายอิเล็กโตรไลต์ จากนั้นจุด (spot) สารตัวอย่างลงบนกึ่งกลางของแผ่นกระดาษหรือแผ่น thin layer แล้ว



รูปที่ 4.25 แสดงแผนภาพอย่างง่ายในการทำอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี

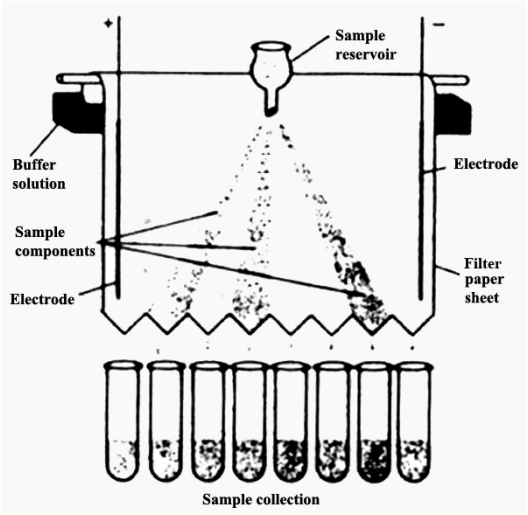
จะเห็นได้ว่าวิธีการทำอิเล็กโตรฟอเรซีสแบบที่ 2 นี้ คล้ายคลึงกับการทำโครมาโต-กราฟีมาก จึงมีชื่อเรียกเทคนิคและวิธีการนี้ว่า อิเล็กโตรโครมาโตกราฟี (Electrochromathography) ถ้าใช้กระดาษในการทำอิเล็กโตรฟอเรซีสจะเรียกเป็นชื่อเฉพาะว่า เปเปอร์อิเล็กโตรฟอเรซีส (paper electrophoresis) ถ้าใช้เจลที่ยึดอยู่บนแผ่นแก้ว จะเรียกว่า เจลอิเล็กโตรฟอเรซีส (gel electrophoresis)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ ได้พัฒนาและปรับปรุงแก้ไขให้ดีขึ้นเรื่อยๆ จนได้เครื่องมือที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ เครื่องมือที่เป็นรูปทรงสามเหลี่ยมทำด้วยภาชนะที่ไม่เป็นสนิม มีราวแท่งแก้วอยู่ข้างบนสำหรับพาดกระดาษ แล้วปล่อยชายลงมาสองข้างตรึงอยู่กับราวข้างล่าง



รูปที่ 4.26 เครื่องมือการทำอิเล็กโตรโครมาโตกราฟีแบบทรงสามเหลี่ยม

ถ้าต้องการเก็บสารตัวอย่างที่แยกได้ ต้องใช้วิธีทำอิเล็กโตรฟอเรซีสอย่างต่อเนื่อง โดยให้แผ่นกระดาษอยู่ในแนวยืน สารตัวอย่างจะถูกใส่ลงในกระดาษตรงส่วนบนสุด สารตัวอย่างจะแยกออกจากกันด้วยแรงดึงดูดของประจุในสนามไฟฟ้า แต่มันจะเคลื่อนต่ำลงมาได้ด้วยการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายตัวอย่างที่ไหลออกจากกระดาษสามารถเก็บได้เป็นส่วนๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.27

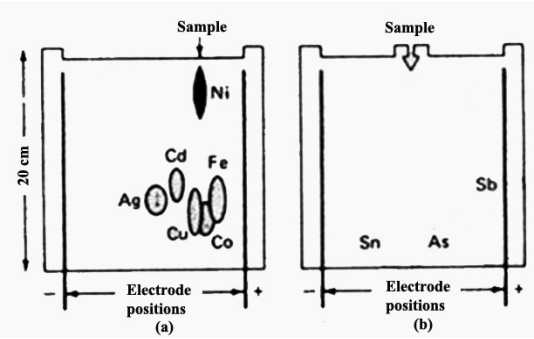


รูปที่ 4.27 การทำเปเปอร์อิเล็กโตรฟอเรซีสที่สามารถเก็บส่วนที่แยกได้

การประยุกต์วิธีอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี

วิธีอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ทางเทคนิคการแพทย์ และชีวเคมีได้เป็นอย่างดี การประยุกต์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางทางเทคนิคการแพทย์ คือ การแยกโปรตีน หรือสารที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ ออกจากเซรุ่ม ปัสสาวะ ของเหลวในไขสันหลัง น้ำในกระเพาะอาหาร หรือของเหลวอื่นๆ ในร่างกาย การประยุกต์ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในทางชีวเคมี คือแยกโมเลกุลของสารต่างๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกัน เช่น สารจำพวกอัลคาลอยด์ สารปฏิชีวนะ กรดนิวคลีอิก วิตามิน สารมีสีตามธรรมชาติ สเตอรอยด์ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต และกรดอินทรีย์ เป็นต้น

นอกจากนี้ วิธีอิเล็กโตรโครมาโตกราฟี ยังสามารถประยุกต์ใช้ในการแยกไอออนของสารอนินทรีย์ได้ด้วย ตามรูปที่ 4.28 (a) แสดงการแยกไอออนของโลหะ 6 ตัว ซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับไดเมทิลไกลออกซีม (dimethyl glyoxime) การเคลื่อนที่ของไอออนสามารถเคลื่อนไปทางขั้วแคโทด หรือแอโนดก็ได้ขึ้นอยู่กับประจุของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะนั้นๆ จะเห็นได้ว่านิกเกิลไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เพราะนิกเกิลเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เป็นตะกอนกับไดเมทิลไกลออกซีมซึ่งไม่มีประจุ ตามรูปที่ 4.28 (b) แสดงการเคลื่อนที่ของไอออน Sn^{2+}, As^{3+} และ Sb^{3+} โดยการทำอิเล็กโตรฟอเรซีส อย่างต่อเนื่อง แล้วเก็บสารที่แยกได้ทางปลายข้างหนึ่งของกระดาษ



รูปที่ 4.28 อิเล็กโตรโคมาโตแกรมของสารอนินทรีย์

a) แคทไอออนแต่ละตัวเข้มข้น 0.0005M ในสารละลาย 0.1 M tartaric acid สารละลายที่ใช้ชะล้างหรือบัฟเฟอร์ คือสารผสมของ 0.01 M ammonium tartrate 0.005 M dimethyl glyoxime และ 4M ammonia สังเกตจุดของโลหะได้โดยใช้ H_2S สภาวะของการทดลอง 160 V, 100 mA. ในเวลา 20 นาที

b) การทำอิเล็กโตรฟอเรซีสอย่างต่อเนื่อง เพื่อแยกสารละลายผสมของ 0.005 M As(III) 0.005 M Sb(III) และ 0.005M Sn(II) ใน 0.02 M tartaric acid, 0.04 M lactic acid และ 0.04 M dl alanine สังเกตจุดของโลหะได้โดยใช้ H_2S สภาวะการทดลอง 300 V 95 mA.

แบบฝึกหัดบทที่ 4

1. จงอธิบายความหมายของคำต่อไปนี้
   a) Retardation factor (R_f)
   b) Reverse phase chromatography
   c) Isocratic elution
   d) Gradient elution
   e) Pre-column

2. สารตัวอย่างประกอบด้วยสาร 2 ชนิด ถูกแยกออกจากกันด้วยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี หลังจากทำการดีเวลลอป 1 ชั่วโมง ได้ solvent front เท่ากับ 10.3 ซม. สารตัวอย่าง A เคลื่อนที่ได้ 7.5 ซม. สารตัวอย่าง B เคลื่อนที่ได้ 2.3 ซม. จากจุดเริ่มต้น จงคำนวณหาค่า R_f

   ตอบ 0.73, 0.22

3. หลังจากทำการดีเวลลอป TLC ปรากฏว่าได้ solvent front เท่ากับ 15.0 ซม. และสารประกอบชนิดที่ 1 เคลื่อนที่ได้ 11.6 ซม. ชนิดที่ 2 เคลื่อนที่ได้ 5.6 ซม. และชนิดที่ 3 เคลื่อนที่ได้ 1.5 ซม. จากจุดเริ่มต้น จงคำนวณหาค่า R_f ของสารประกอบแต่ละชนิด

   ตอบ 0.773, 0.37, 0.10

4. สารตัวอย่างที่ไวต่อซิลิกาชนิด A มีค่า R_f = 0.50 เมื่อใช้ 1 : 3 เบนซีนต่อเมทานอลเป็นตัวทำละลาย เมื่อใช้สารตัวอย่างเดิม แต่เปลี่ยนเป็นซิลิกาชนิด B ปรากฏว่ามีค่า R_f = 0.40 จงแสดงว่า ซิลิกาชนิดใดมีความไวต่อสารตัวอย่างมากกว่ากัน

5. คอลัมน์กลาสมีพื้นที่หน้าตัด 1.00 ตร.ซม. ถูกนำมาบรรจุของแข็งสูง 10.0 ซม. ความหนาแน่นของของแข็ง คือ 2.5 กรัม/ลบ.ซม. ใช้ของแข็งเท่ากับ 15.0 กรัม
   a) จงคำนวณหาค่า R_f ของตัวถูกละลายที่มีค่า K_d เท่ากับ 1.0, 2.0, และ 4.0 ตามลำดับ
   b) จงหาปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการอีลูทตัวถูกละลายส่วนที่เข้มข้นที่สุดออกจากคอลัมน์

6. คอลัมน์ที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน ถูกเตรียมโดยใช้หลอดแก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 10 มิลลิเมตร บรรจุด้วยซิลิกาเจลที่แห้ง 30 กรัม (ความหนาแน่น = 2.3 กรัม/ลบ.ซม.) ก่อนที่ใส่ซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ได้นำไปแช่น้ำ ปรากฏว่าซิลิกาเจลจะดูด

7. จงหาค่า R_f ของฟีนอล และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้คอลัมน์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2 ซม. ยาว 30 ซม. บรรจุอะลูมินา 83 กรัม (ความหนาแน่น = 3.6 กรัม/ลบ.ซม.) น้ำ 96 ลบ.ซม. และสารผสมของบิวทานอลกับไพริดีน 61 ลบ.ซม. เมื่อมีค่า K_d เท่ากับ 0.194 และ 3.42 ตามลำดับ

8. โดยใช้คอลัมน์เดียวกันกับโจทย์ข้อ 7 จงหาค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายของ gallic acid และ protocatechnic acid เมื่อมีค่า R_f เท่ากับ 0.43 และ 0.74 ตามลำดับ

9. Prolinol มีค่า R_f = 0.26 เมื่อใช้สารบิวทานอลอิ่มตัวใน 1% NH_3 เป็นตัวอีลูท โดยการใช้เงื่อนไขเดิม พบว่า Aspartidiol มีค่า R_f = 0.23 จะต้องใช้คอลัมน์ยาวเท่าใดจึงจะทำให้การแยก (Resolution, R) มีค่าเท่ากับ 1.00 เมื่อ H = 0.0032, A = 0.27, A_m = 0.64

10. ถ้าคอลัมน์ในโจทย์ข้อ 9 ยาว 80 ซม. ค่า HETP มีค่าเท่ากับเท่าใด

11. จะต้องใช้ตัวอีลูทจำนวนเท่าใดในโจทย์ข้อ 9 เพื่อทำให้ส่วนที่มี Prolinol มากที่สุดถูกอีลูทออกจากคอลัมน์

12. คอลัมน์อะลูมินามีค่า A_s = 0.16 และ A_m = 0.57 มีจำนวนเพลต (N) = 6200 เพลต ในช่วงความยาว 18 ซม. ถ้า sulfanilic acid มีค่า R_f = 0.51 และ sulfamethazine มีค่า R_f = 0.55 ในคอลัมน์นี้ จงคำนวณหาค่าการแยก (R)

13. t-amylalchol-glacial acetic acid-water ผสมกันในอัตราส่วน 4:1:1 แล้วนำมาใช้เป็นตัวอีลูทสำหรับการแยกสารผสมของสีย้อมต้องใช้คอลัมน์ยาวเท่าใดเพื่อทำการแยก bromothymol blue (R_f = 0.88) ออกจาก metacresol purple (R_f = 0.66) ให้ได้สมบูรณ์ เมื่อ H = 0.0023, A_s = 0.13, A_m = 0.38

14. สารตัวอย่างชนิดหนึ่งถูกอีลูทได้อย่างรวดเร็ว เมื่อใช้คอลัมน์อะลูมินาและอะซิโตนเป็นตัวอีลูท ถ้าเปลี่ยนตัวอีลูทเป็นคลอโรฟอร์ม ท่านคิดว่าสารตัวอย่างจะถูกอีลูทได้เร็วขึ้นหรือช้าลง

15. จงเรียงลำดับการอีลูทที่ท่านคิดว่าเป็นไปได้ของสารต่อไปนี้เมื่อใช้อะลูมินาบรรจุในคอลัมน์

butanol, butyl chloride, hexanoic acid, hexane และ 2-hexene

16. จงทำนายลำดับการอีลูทของสารต่อไปนี้ เมื่อใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วยแคลเซียมออกไซด์

butanol, methanol, hexanol และ ethanol

17. จงเรียงลำดับการอีลูทของสารต่อไปนี้ เมื่อใช้การวิเคราะห์แบบ Liquid-Solid Chromatography (LSC)

C_6H_5COOH, C_6H_6, C_6H_5Cl, C_6H_5OH

18. สารประกอบ A, B และ C มีค่ารีเทนชันไทม์ (t_R) 1.25, 15.0 และ 22.5 ซม. ถ้าสารประกอบ A ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ จงคำนวณหาค่ารีเลทีฟรีเทนชันของ C เทียบกับ B

ตอบ 1.55

19. จงคำนวณหาค่าคาพาซิตีแฟคเตอร์ (K') ของสาร B และ C ในโจทย์ข้อ 18

ตอบ 11.0, 17.0

20. ข้อมูลต่อไปนี้ได้จากการทำ reverse phase ของ HPLC ค่ารีเทนชันไทม์ทั้งหมดวัดจากพีกของสารที่ไม่ถูกหน่วงในคอลัมน์ จงคำนวณหาค่ารีเลทีฟรีเทนชันของสารแต่ละตัวเทียบกับ 3-methoxy tyramine

สารประกอบ	รีเทนชันไทม์, นาที
Vanilline mandelic acid	3.23
Normetanephrine	3.87
Metanephrine	5.81
3-Methoxy tyramine	7.31
Homovanillic acid	11.70

21. จงคำนวณหาค่าคาพาซิตีแฟคเตอร์ (K') ของสาร Normetanephrine ในโจทย์ข้อ 20 ถ้า t_m มีค่าเท่ากับ 0.15 นาที

ตอบ 25.8

22. ค่ารีเทนชันไทม์ของยาปราบศัตรูพืชต่อไปนี้ ถูกแยกโดยวิธี reverse phase HPLC สมมติว่าใช้อัตราการไหล 1.15 ลบ.ซม./นาที จงคำนวณหาค่ารีเทนชันโวลูมของยาปราบศัตรูพืชแต่ละตัว

Pesticide	Retention time, minute
Baygon	5.25
Carbamate	6.03
Barban	12.41

23. โดยใช้คอลัมน์ยาว 25.0 ซม. พบว่า เบนซินมีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 33.0 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 15.1 นาที จงคำนวณหาจำนวนเพลตตามทฤษฎีและ HETP

ตอบ 0.327 cm/plate

24. ค่ารีเทนชันไทม์ของสารประกอบอินทรีย์ในการทำลิควิดโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ยาว 100 ซม. มีค่าเท่ากับ 10.0 นาที ความกว้างของพีกมีค่าเท่ากับ 24 วินาที จงคำนวณหา HETP ของคอลัมน์

ตอบ 0.10 mm/plate

25. จงคำนวณหาการแยกระหว่างพีก 2 พีก ซึ่งมีค่ารีเทนชันไทม์เท่ากับ 18.5 และ 20.9 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 130 และ 182 วินาที

ตอบ 0.92

26. จงคำนวณหาการแยกของโครมาโตกราฟีพีก 2 พีก ค่ารีเทนชันไทม์ของพีกที่ 1 มีค่าเท่ากับ 10.52 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 0.38 นาที ค่ารีเทนชันไทม์ของพีกที่ 2 มีค่าเท่ากับ 11.36 นาที ความกว้างของพีกเท่ากับ 0.48 นาที การแยกที่ได้เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หรือไม่

ตอบ 2.0, เพียงพอ

27. ค่ารีเทนชันไทม์ของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000 ผ่านลงในคอลัมน์ของเจลที่มี exclusion limit 80,000 มีค่าเท่ากับ 15 ลบ.ซม. ค่ารีเทนชันโวลูมของสารแนพทาลีน (น้ำหนักโมเลกุล 128) ผ่านลงในคอลัมน์ชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากับ 124 ลบ.ซม. เมื่อนำสารตัวอย่างมาผ่านในคอลัมน์ของเจลนี้บ้าง ปรากฏว่าได้ค่ารีเทนชันโวลูมเท่ากับ 87 ลบ.ซม.

ตอบ 109 ลบ.ซม., 0.66

28. โดยวิธี gel filtration chromatography น้ำตาลซูโครสมีโมเลกุลขนาดเล็กพอที่จะเข้าไปอยู่ในรูของเจลได้หมด มีค่ารีเทนชันโวลูม = 195 ลบ.ซม. เมื่อใช้ Blue dextran ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีขนาดใหญ่มาก ซึ่งไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูของเจลได้ จะมีค่ารีเทนชันโวลูม = 39 ลบ.ซม. จงคำนวณหาค่ารีเทนชันโวลูมของ Cytochrom C เมื่อ Cytochrom C มีค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจายในคอลัมน์ชนิดนี้เท่ากับ 0.81

ตอบ 1.7×10^2 ลบ.ซม.

29. จงหาน้ำหนักโมเลกุลของ Chymotrypsinogen จากข้อมูลที่ได้จากการทำเอกซ์คลูชันโคร-มาโตกราฟี ดังนี้

สารประกอบ	M.W.	V_R, cm^3
Cytochrome C	13,000	140
Myoglobin	16,900	133
Ovalbumin	46,000	107
Urease	483,000	45
Chymotrypsinogen	?	125

ตอบ 23,000

30. จากข้อมูลข้างล่างนี้ จงคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง (Unknown)

Protein	M.W.	Relative mobility
Lysozyme	14,400	0.90
Trysin	23,300	0.73
Lactate dehydrogenase	36,000	0.57
Ovalbabin	43,000	0.54
Catalase	62,000	0.38
Brovine Serum albumin	68,000	0.48
Unknown	?	0.68