

สนุกกับ Lab by ครูชมบี

ep.14 Laboratory Thin-layer chromatography การปฏิบัติ 1

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชมภูษ เฝื่อนพิภพ

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร

เทคนิค TLC



Thin Layer Chromatography (TLC)

โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง หรือแบบชั้นบาง

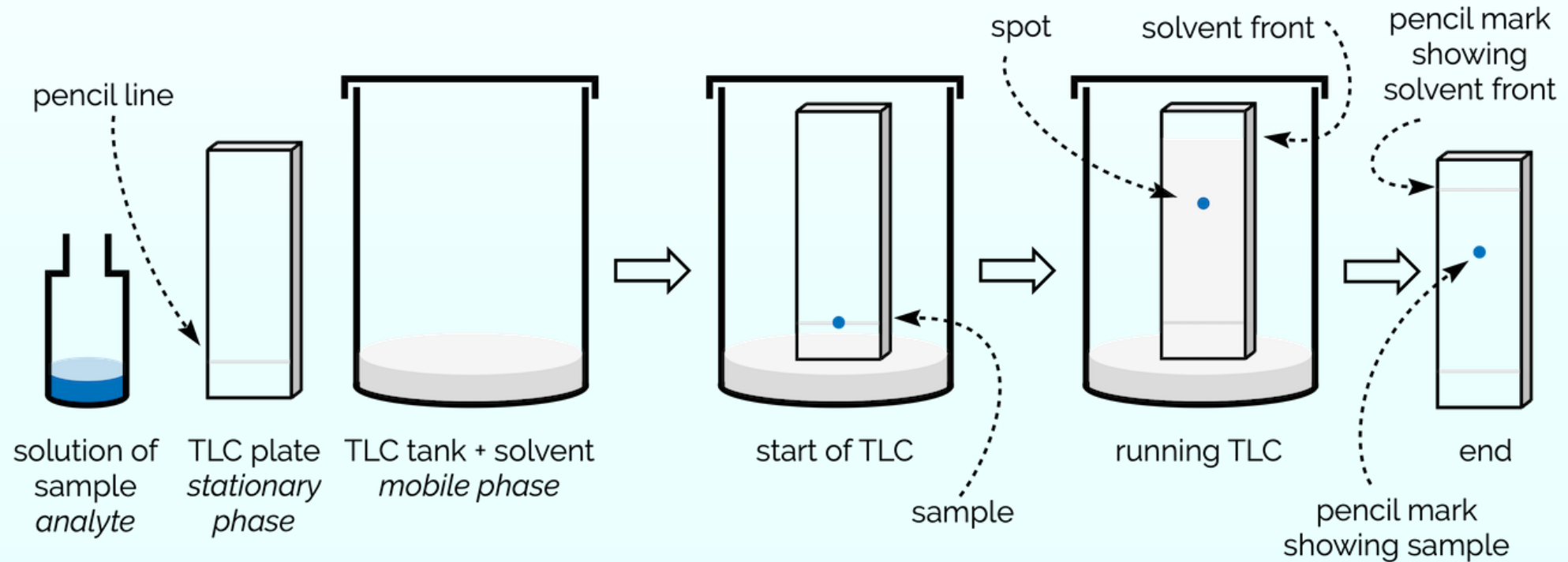
- เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ที่การแยกเกิดขึ้นบนของแข็งที่เป็นผงละเอียดแผ่กระจายเป็นชั้นบาง ของแข็งนี้คือตัวดูดซับ (adsorbent) ที่ทำหน้าที่เป็น stationary phase เคลือบอยู่บนแผ่นวัสดุ อาจเป็นแก้ว, aluminum, plastic เรียกแผ่นวัสดุเหล่านี้ว่า “TLC plate”

Thin Layer Chromatography (TLC)

โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง หรือแบบชั้นบาง

- เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร, ตรวจสอบเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารประกอบ, ติดตามความคืบหน้าของปฏิกิริยา, กำหนดองค์ประกอบของตัวทำละลายสำหรับการเตรียมการแยกสาร, เป็นหลักฐานยืนยันชนิดของสาร, ตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบในสารผสมได้

Thin Layer Chromatography (TLC)



ขั้นตอนในการทำ TLC

Application

- การหยดตัวอย่าง
 - ระยะเวลาเหมาะสม

Development

- การชะแผ่นด้วยตัวทำละลาย
 - เพื่อให้สารที่หยดลงไปเกิดการแยกเป็นจุดหรือแถบ

Documentation

- การถ่ายภาพหลังจากการแยก

Derivatization

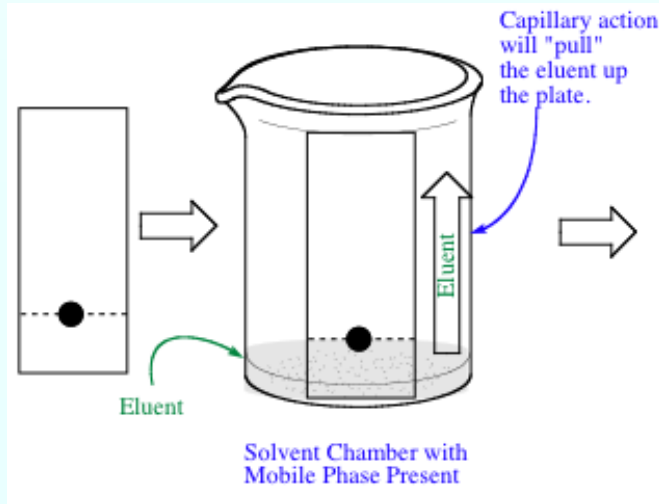
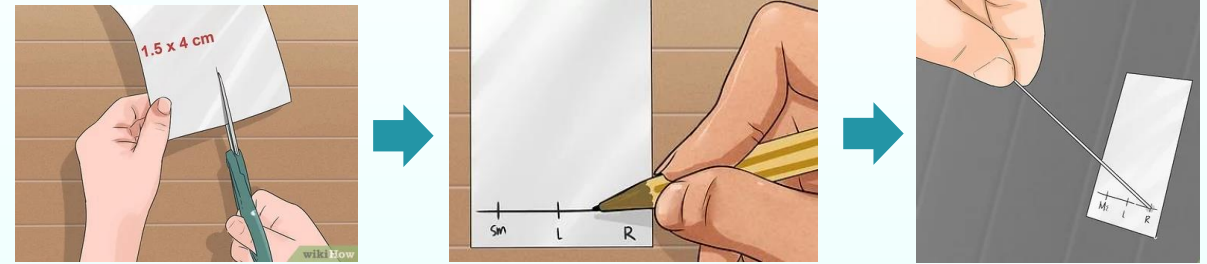
- การพ่นสารละลายที่เหมาะสม
 - กรณีที่สารเป้าหมายมองไม่เห็น

Detection

- การตรวจวัด

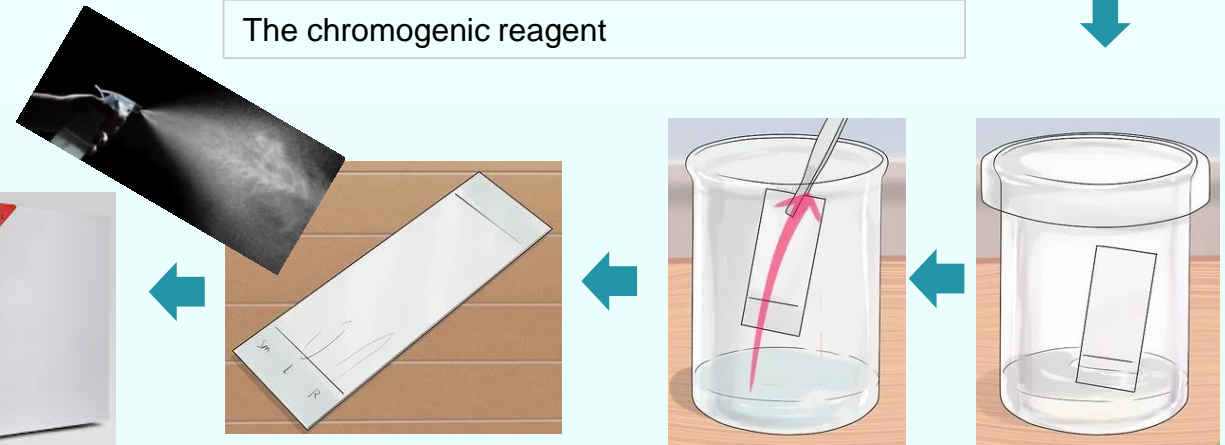
Thin layer chromatography (TLC)

- The solvent system consisted of n-butanol:acetic acid:water (2:1:1) for chromatogram.
- The sugar were located using vanillin-ethanol-sulphuric acid as the chromogenic reagent.



105 °C for 20 min.

The chromogenic reagent



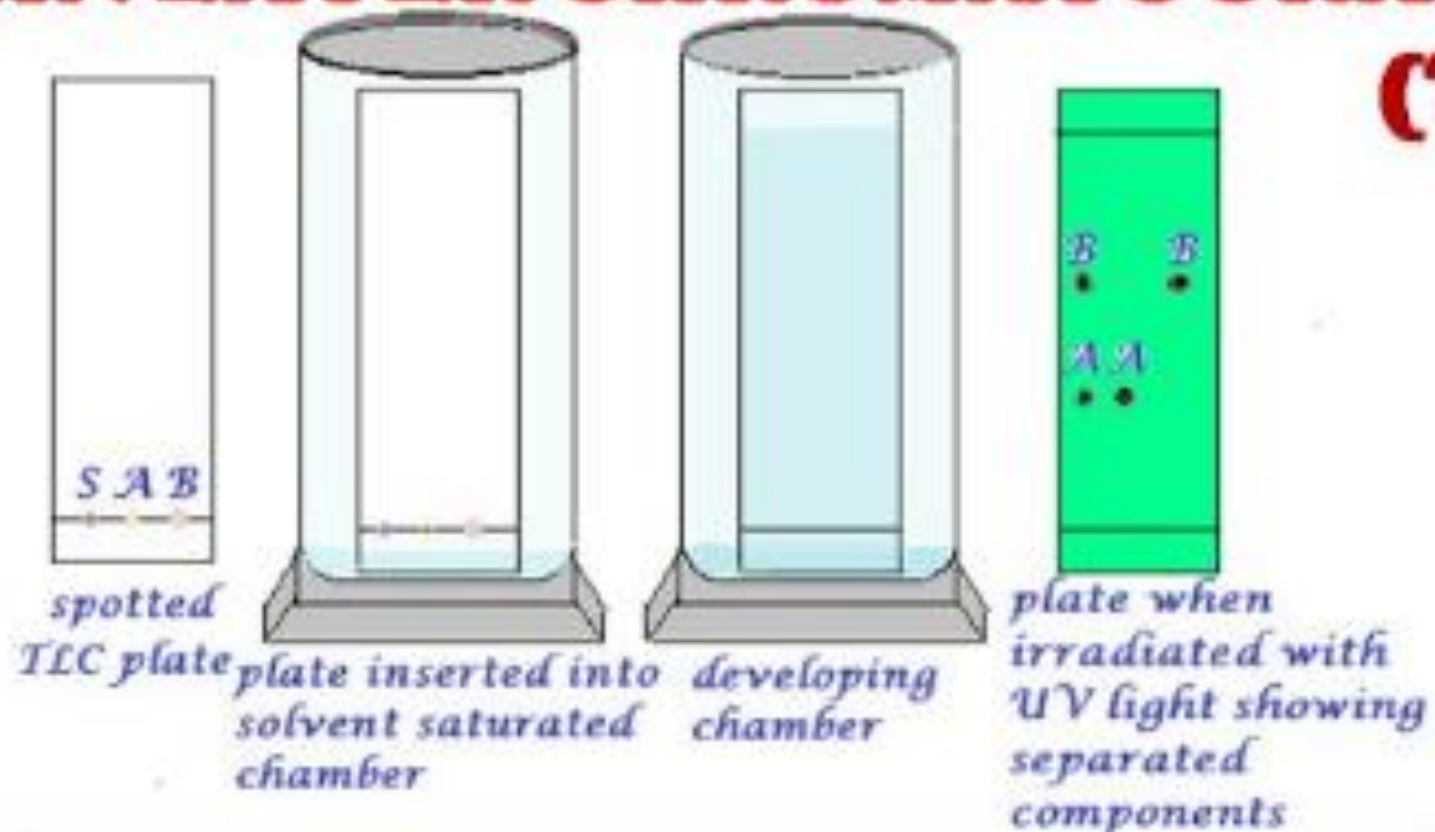
n-butanol:acetic acid:water (2:1:1) 30 mL

6 - Methodology

เครื่องมือและอุปกรณ์หลักเทคนิค TLC



THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)



อุปกรณ์การแยกสาร



TLC tank



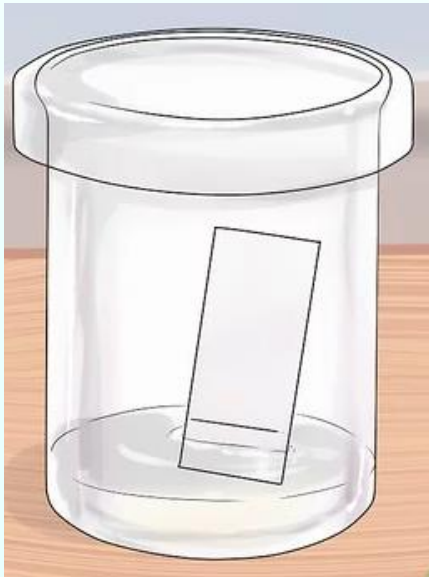
TLC plate



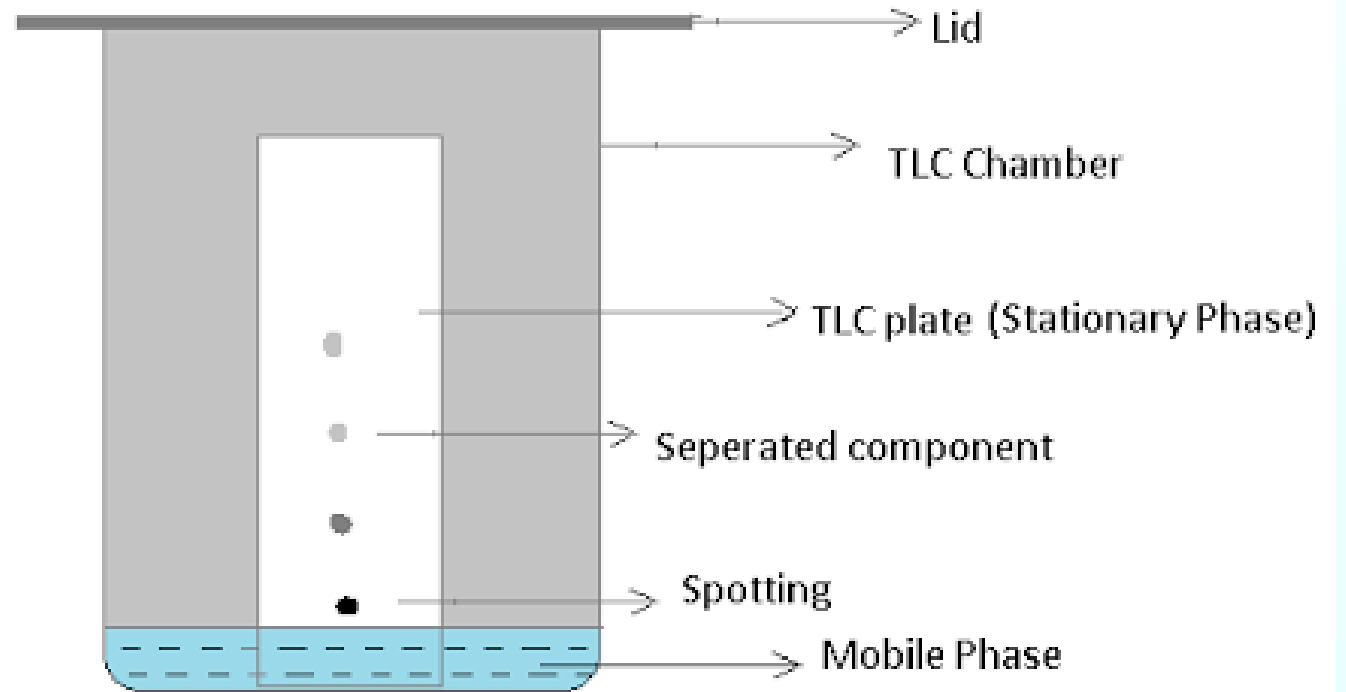
<https://labasiabd.com/product/tlc-equipment-thin-layer-chromatography-set/>

<https://www.sentezlab.com/en/product/merck-105554-aluminum-tlc-plate-silica-gel-coated-with-flourescent-indicator-f254-the-silica-gel-tlc-plates-come-in-a-quantity-of-25-size-20x20-cm-for-thin-layer-chromatography-applications>

https://www.monotaro.co.th/p/68397762.html?utm_id=google_pla_th&gclid=Cj0KCQiA_P6dBhD1ARIsAAGI7HA6e8KwGMQ8YD0Xs8QqbfIjdbP_lwoFOTx_YgH2o2vxCQHct0BhDklaAIX0EALw_wcB



Thin Layer Chromatography



อุปกรณ์การแยกสาร (ต่อ)

- TLC chamber หรือ TLC developing tank (ควรใช้แบบ 2 รางคู่)
- Desiccator (ใช้ทำให้แผ่นมีความชื้นตามกำหนด)
- Dryer (ไดร์เป่าผมก็ได้) เป่า TLC ให้แห้งตามกำหนด
- ปากคีบ หยิบ TLC



ขั้นตอนหลักของเทคนิค TLC



ขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 -- การเตรียมตัวอย่าง และ **mobile phase**

ขั้นตอนที่ 2 -- การ **load** สารตัวอย่าง บน **TLC plate**

ขั้นตอนที่ 3 -- การทำ **development**

ขั้นตอนที่ 4 -- การตรวจสอบผล

ขั้นตอนที่ 1 -- การเตรียมตัวอย่าง และ **mobile phase**

- สารตัวอย่าง

- ต้องเป็น **liquid** หรือสารละลายที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

- ตัวทำละลายที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูงและระเหยง่าย เพื่อไม่ทำให้

spot สารใหญ่เกินไป

ขั้นตอนที่ 1 -- การเตรียมตัวอย่าง และ mobile phase

- mobile phase

- ใช้เป็นระบบตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดในอัตราส่วนต่างๆ กัน
- ตัวทำละลายควรมีความบริสุทธิ์สูงและไม่ระเหยง่ายเกินไป
- ไม่ทำปฏิกิริยากับ **stationary phase** หรือสารตัวอย่าง
- ระบบตัวทำละลาย ไม่ควรเกิน 4 ชนิด เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อน

spot สารตัวอย่างลงบนแผ่น TLC ด้วยมือ และเครื่อง

- ดูเชิงคุณภาพ จะใช้ได้ทั้งมือและเครื่อง
- แต่ถ้าวิเคราะห์เชิงปริมาณ จะตรวจเฉพาะแบบ band เท่านั้น
- การหยดสารด้วยมือ
 - ใช้ capillary tube ขนาดรูเล็กที่สุด
 - หยดสารไม่ควรมากเกินไป เพราะอาจเกิดการซ้อนทับของการเคลื่อนที่ของสารได้

ขั้นตอนการหยดสารด้วยมือ

1. นำ TLC ออกจากกล่อง และเขียนมุมขวาว่าทำอะไร
2. วัดระยะ solvent front จากขอบ plate ด้านล่าง-บน
 - TLC = 130 mm
 - HPTLC = 70 mm
3. ถ่ายภาพแผ่นภายใต้แสงขาว (หากมีรอยปนเปื้อนให้เปลี่ยนแผ่น)
 - ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254/366 nm
4. กำหนดบริเวณหยดสารตัวอย่างบนแผ่น ก่อนหยดสารวัดระยะแถบที่จะหยดสาร
5. หยดสารตามจุด (ควรหยดให้คุ่มค่า เพราะแถบหยดได้ถึง 15 จุด/ แถบ)

ขั้นตอนที่ 2 -- การ load สารตัวอย่าง บน TLC plate

- ใช้อุปกรณ์ capillary tube หรือ micropipette
- นำสารมา spot เป็นจุด หรือแถบสั้นๆ
- ตำแหน่ง spot สารต้องไม่สัมผัสกับระดับ mobile phase ใน TLC tank

ขั้นตอนที่ 3 -- การทำ development

- นำ mobile phase บรรจุใน TLC tank
- ปิดฝาทิ้งไว้ ประมาณ 15 นาที
- เพื่อให้ภายใน tank เกิดการอิ่มตัว (saturation)
 - (ใส่กระดาษกรองใน tank ทำให้ชุ่มด้วย mobile phase เพื่อช่วยเร่งการเกิดการอิ่มตัว)
- นำ TLC tank มาใส่ใน tank ให้เกิด development เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่จนถึงระดับ solvent front ให้เอา TLC plate ออกจาก tank และทิ้งให้แห้ง เพื่อนำไปตรวจสอบผล

ขั้นตอนที่ 4 -- การตรวจสอบผล

- ตรวจสอบโดยตรงจากสายตา (กรณีมีสีปรากฏ) หรือนำไปฉีดพ่นด้วย **reagent** (กรณีไม่มีสี)
- นำ **plate** ไปให้ความร้อน เพื่อให้สีปรากฏ
- นำ **plate** ไปตรวจสอบภายใต้แสง UV
 - ความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร (**long wavelength**) ใช้ตรวจสอบสารที่เรืองแสง
 - ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (**short wavelength**) ใช้ตรวจสอบการดูดกลืนแสง

สรุป เทคนิค TLC ในการแยกสารผสม

1. **Mobile phase** พาสารผสมเคลื่อนที่ไปในแนวระนาบบน **stationary phase**
2. สังเกตการแยกได้จาก **spot** หรือ **band** บน **TLC plate**
3. ตำแหน่งของสารที่เป็น **spot** หรือ **band** ระบุได้ด้วยค่า R_f
4. ค่า R_f คือ อัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ **mobile phase** เคลื่อนที่

ข้อเสนอแนะ

- บ่มแผ่น TLC ให้ครบ 30 นาที
- ตรวจสอบว่าเตรียม developing solvent ถูกต้อง
- เติมปริมาณ developing solvent ใน chamber ให้ถูกต้อง
- ตรวจสอบว่าถัง developing solvent ไว้ใน tank อย่างน้อย 20 นาที (chamber saturate)

ข้อเสนอแนะ (ต่อ)

- ใส่แผ่น TLC ให้ตรงที่สุด
- ทิ้ง **solvent** และแผ่น TLC ให้ถูกต้องตามข้อบังคับการจัดการของเสียสารเคมี
- ไม่ล้าง **tank** ด้วยน้ำยาซักล้าง หลังใช้ให้ตากแห้งใน **hood**
- ควรใส่แว่น ถุงมือ หน้ากาก เปิดระบบไหลเวียนอากาศให้ดี

ขอบคุณค่ะ