บทความวิชาการ

การใช้ Thin Layer Chromatography ในการวิเคราะห์ทางด้านอาหารและการเกษตร
(Thin Layer Chromatography in Food and Agricultural Analysis)

โดย ณัฏฐิกา ศิลาลาย[1] และ ชัชวาล โชติมากร[2]

Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพของอาหารอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการทั่วไป และยังถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบของอาหาร วัตถุเจือปนในอาหาร สารปนเปื้อนต่างๆ และตรวจสอบสารประกอบต่างๆ ของอาหาร เช่นประเภทกลุ่มของ ไขมัน (lipid) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) เป็นต้น

High Performance TLC (HPTLC) จัดเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งอาศัยการเคลื่อนที่บนชั้นของตัวดูดซับที่ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กกว่าซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมโครเมตร ขณะที่ TLC ธรรมดาทั่วไปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12-20 ไมโครเมตร แนวในการเคลื่อนที่ของอนุภาคใน HPTLC จะมีลักษณะที่แคบกว่านอกจากนั้นชั้นของตัวดูดซับก็บางกว่า และระยะทางในการเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่ถูกวิเคราะห์ก็สั้นกว่าด้วย จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแยกเพิ่มขึ้น และเร็วมากขึ้น

การเตรียมและการใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์

ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จะคล้ายคลึงกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับ GC และ HPLC แต่ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้กับ TLC นั้นจะง่ายกว่าและไม่ยุ่งยากเพราะว่าชั้นของตัวดูดซับที่ใช้วิเคราะห์ของ TLC จะถูกใช้เพียงครั้งเดียว โดยตัวอย่างจะถูกนำมาจุดหรือหยดลงบนชั้นของตัวดูดซับได้โดยตรง หรือบางครั้งอาจจะต้องเจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วย TLC โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (Solvent Extraction) น้ำกลั่น (Steam distillation) และบางครั้งอาจผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของแข็ง (Liquid-solid column chromatography) ก่อนวิเคราะห์

Layer and mobile phase

ชนิดของตัวดูดซับ (Adsorbent) และตัวแลกเปลี่ยนอิออน (Ion-exchange layer) ต่างๆ ถูกเลือกเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ทางด้านอาหาร โดยแผ่น (Plate) ที่นำมาใช้ในการแยกนั้นโดยทั่วไปมักจะเป็นแบบ Pre-adsorbent เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการในการแยก ในส่วนของ Normal phase layer นั้นถูกนำมาใช้สำหรับวิเคราะห์อาหารบางชนิด ซึ่งรวมไปถึงอะลูมินา (Alumina) และเซลลูโลส (Cellulose) ในขณะที่ Reverse phase TLC นั้นจะแสดงถึงรูปแบบของพันธะทางเคมีของ C-18, C-2, C-8 และ Diphenyl layers เพื่อผลการวิเคราะห์ที่ดีสุด Plates จะถูกล้างด้วยสารละลายเพียงชนิดเดียว หรือตัวทำละลายผสมก่อนจะนำมาใช้ และโดยทั่วไปมักใช้ dichloromethane-methanol ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อวัตถุประสงค์นี้

การพัฒนาชั้น Layer

TLC จะแสดงออกมาในรูป 1 มิติ โดยอาศัยการไหลตามแนวแรงโน้มถ่วงของโลก ด้วยการใช้เฟสเคลื่อนที่เพียงอย่างเดียว (Single mobile phase) ในลักษณะของสารละลาย

nsilalai@hotmail.com

[1] Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University

[2] Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan

บริเวณการตรวจสอบ (Detective zone)

สารที่สามารถเปลี่ยนสี หรือสารที่เรืองแสงหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบบนตัวดูดซับของการวิเคราะห์ โดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 254 นาโนเมตร หรือ 366 นาโนเมตร ของรังสีอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet) แต่การตรวจสอบด้วยสารเรืองแสงจะเป็นที่นิยมมากกว่าเนื่องจากความจำเพาะเจาะจงและความไวในการตรวจสอบ วิธีใหม่ๆที่ใช้ในการตรวจสอบจะมีรายงานอยู่มากมายใน TLC Literatures ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบไขมันในธรรมชาติของสัตว์ เพื่อบ่งบอกถึงปริมาณที่มีโดยใช้ Densitometry ที่ความยาวคลื่น (λ) = 430 นาโนเมตร ซึ่งสามารถฉีดด้วยสารด้วย Reagents ที่ต่างกันถึง 3 ชนิด ได้แก่

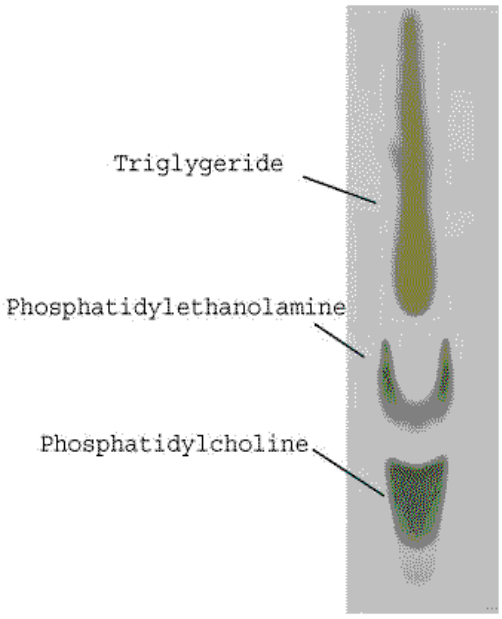
(1) คิวปริกอะซิเตต(cupric acetate) เข้มข้น 3% ในสารละลายกรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid solution) เข้มข้น 6% แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(2) กรดซัลฟูริค (Sulfuric acid) เข้มข้น 35% แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) จากขั้นตอนที่ (1) แล้วตามด้วยขั้นตอนที่ (2)

การใช้รูปภาพของสารสี หรือรงควัตถุจาก TLC (Documentation of Chromatograms)

ภาพถ่ายของสารสี หรือรงควัตถุ (Chromatograms) เป็นวิธีการที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้บันทึกและเก็บรักษาผลที่ได้จากการทดลอง การวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC โดยการเก็บเอกสารต่างๆ เพื่อนำมาประกอบการศึกษาทดลองกลายเป็นสิ่งสำคัญเพิ่มมากขึ้น และจำเป็นอย่างมากในการทำ Good Laboratory Practice (GLP) และ Good Manufacturing Practice (GMP) การวิเคราะห์ด้านปริมาณโดยการวัดปริมาณของตัวอย่างและตำแหน่งบนตัวดูดซับ ด้วยการใช้ Silt-scanning densitometer วิดีโอ หรืออาจใช้กล้อง ที่เรียกว่า CCD camera (Image processing) ซึ่งเครื่องมือที่กล่าวมาข้างต้นนั้นมีความจำเป็นอย่างมากในการวิเคราะห์เพื่อให้ผลที่ได้ถูกต้องแม่นยำและเที่ยงตรงยิ่งขึ้นดังตัวอย่างรูปที่ 1



รูปที่ 1: TLC of Lipid of rainbow trouth (*Oncorhynchus mykiss*)

Developing solvent: Petroleum ether: Diethylether (80:20). The bands were visualized by spraying with 50% sulfuric acid in ethanol followed by heating for 1 hr at 180 °C.

บทสรุปของการเลือกใช้ TLC และ HPTLC ในการวิเคราะห์ด้านอาหารและเกษตรกรรม (Summaries of selected TLC and HPTLC methods for food and agricultural analyses)

จากที่กล่าวมาข้างต้น พอจะสรุปได้โดยสังเขปถึงการเลือกใช้ TLC เพื่อนำมาตรวจสอบองค์ประกอบที่สำคัญๆ ในตัวอย่างอาหารและทางการเกษตร การพัฒนารูปแบบของตัวดูดซับและเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ของตัวอย่างบางกลุ่มถูกแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Summaries of selected TLC and HPTLC method for food and agricultural analysis

Sample preparation	Stationary phase	Mobile phase	Detection
1. Lipid (neutral lipid) in eggs (extraction from egg yolk with chloroform-methanol (2:1))(1)	Channeled pre-adsorbent high performance silica gel	1. Petroleum : diethyl ether : acetic acid (80:20:2) for determination of cholesterol, triacylglycerols and free fatty acid 2. n-hexane: petroleum: diethyl ether: acetic acid (50:20:5:1) for cholesterol esters	PMA (5% in ethanol) and heating at 110-120 ^{o}C for 5-10 min
2. Pigment (bixin, lycopene, canthaxanthin and β-apo-8'-carotenal) (Acetone extraction, ether partitioning and saponification)(2)	Silica gel	Hexane: acetone (9:1), dichloro-methane: diethyl ether (9:1), petroleum: benzene (1:1) and petroleum ether	Natural color
3. Sugars in beverages (Sodas and iced teas were diluted with ethanol-water 7:3 and spotted directly)(3)	Silica gel 60 impregnated by spraying with 0.1 M of sodium hydrogen sulfate and pH 4.8 of citrated buffer solution	Acetonitrite-water (85:15)	Purple zones by spraying with 1- naphthol (5g)-ethanol (160 ml)-sulfuric acid (20 ml)-water (13 ml) solution and heating at 110 ^{o}C for 5-10 min
4. Polyphosphate in seafood (Fish were homogenized mixed with water (1:2) for 1 min and the filtrate collected over No 4 filter paper) (4)	Cellulose	2-propanol: 1-propanol: trichloacetic acid: ammonium hydroxide: water (200 ml : 175 ml : 25 g :1 ml : 125 ml)	Molybdenum blue spray reagent followed by sodium pyrosulfate-sodium sulfitemethyl-aminophenol reagent

Table 1 (cont.) Summaries of selected TLC and HPTLC method for food and agricultural analysis

Sample preparation	Stationary phase	Mobile phase	Detection
5. Quinine in tonic water (Degassed tonic waters were spotted directly)(3)	Channeled preadsorbent high performance silica gel	Toluene: acetone: diethyl ether: ammonium hydroxide: methanol (12 : 18 : 6 : 1.5 : 1)	Natural fluorescent
6. Heterocyclic oxygen compounds in citrus fruit essential oil (Commercial oils were analyzed without dilution with hexane)(5)	Silica gel 60 F HPTLC	n-butyl acetate: hexane (8:2) and chloroform: n-butyl acetate: hexane (9 : 1 : 15) Overpressure development	254 and 366 nm UV light
7. Phenylurea herbicides in plants (Carrots, apples, asparagus and wheat were extracted with acetone and extracts purified by silica SPE)(6)	Silica gel 60 F HPTLC	AMD with a 25 cycle gradient Composed of acetonitrite, dichloromethane, acetic acid, toluene and hexane in varying proportions	254 nm UV light

เอกสารอ้างอิง

1. Smith M.C., Webster C.L., Shema J. and Freid B. 1995. J. Liq Chromatogr. 18:527.
2. Minguez-Mosquera M.J., Hornero-Mendez D. and Garrido Fernandez J.1995. J. AOAC Int. 78:491.
3. Shema J. and Zulick D.L. 1996. Acta Chromatogr. 6:7.
4. Kerzynowek J. and Panunzio L.J. 1995. J. AOAC Int. 78:1328.
5. Dugo P., Mondello L., Lamonica G. and Dugo G. 1996. J. Planer Chromatogr-Mod. TLC. 9:120.
6. Lautie J.P. and Stankovic C.1996. J. Planer Chromatogr-Mod. TLC. 9:113.