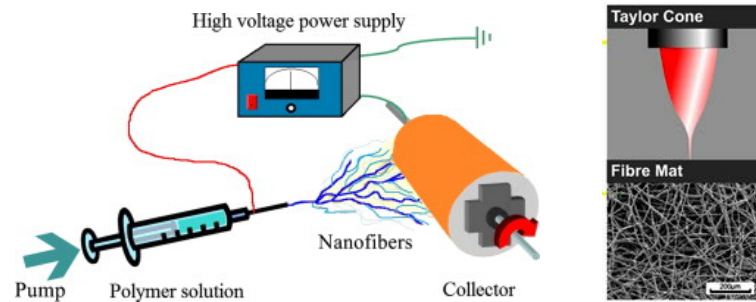


บทนำ

โครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) เป็นเทคนิคการแยกและวิเคราะห์สารในเชิงคุณภาพและปริมาณซึ่งใช้กันแพร่หลาย สำหรับอาหาร ยา ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ฯลฯ เพื่อวัตถุประสงค์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสาร ตรวจสอบความบริสุทธิ์ แยกสารหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ หรือติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารระหว่างขั้นตอนการสังเคราะห์ เหตุผลสำคัญที่ทำให้โครมาโทกราฟีแผ่นบางได้รับความนิยม คือ ความง่ายและสะดวกในการใช้งาน ค่าใช้จ่ายของวิธีโดยรวมค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับวิธีอื่น การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากซับซ้อน และใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็วและถูกต้อง การแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง อาศัยชั้นบางๆ ของ stationary phase ซึ่งเคลือบอยู่บนวัสดุรองรับที่เป็นแผ่นระนาบ ซึ่งอาจเป็นแผ่นแก้ว แผ่นอะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก และ mobile phase ที่เหมาะสมในการพาสารให้เคลื่อนที่ผ่านไปตาม stationary phase และทำให้เกิดการแยกสารออกจากกัน ในทางปฏิบัติผู้วิเคราะห์อาจเตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีขึ้นเองโดยการเคลือบ slurry ของ stationary phase บนแผ่นระนาบให้มีความเรียบและความหนาที่สม่ำเสมอตามที่ต้องการ แล้วระเหยตัวทำละลายออกไป วิธีนี้สามารถใช้ในการเตรียมแผ่นที่เคลือบด้วยวัสดุตามที่ต้องการเพื่อทำหน้าที่เป็น stationary phase แต่อาจจะต้องมีการพัฒนาสูตรในการเตรียม slurry หรือบางครั้งหากวัสดุที่เป็น stationary phase มีคุณสมบัติในการยึดเกาะต่ำ ก็อาจจะต้องผสม binder เช่น calcium sulfate ลงไปใน slurry เพื่อให้ stationary phase สามารถยึดเกาะเป็นชั้นอยู่บนผิวของแผ่นรองรับได้ ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาจากการที่ stationary phase กระเจายตัวไม่สม่ำเสมอ และอาจส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพในการแยกสารได้ นอกจากนี้ผู้เตรียมแผ่นต้องมีทักษะและความชำนาญในการเคลือบ slurry จึงจะได้ชั้นที่เรียบสม่ำเสมออีกด้วย ดังนั้นในปัจจุบันผู้วิเคราะห์ส่วนใหญ่จึงนิยมซื้อหาแผ่นโครมาโทกราฟีสำเร็จรูปจากผู้ผลิตมาใช้งาน ซึ่งสะดวกมากกว่า และได้แผ่นที่มีคุณภาพคงที่ แต่ก็มีข้อจำกัด คือ สำหรับประเทศไทย ยังต้องคงพึ่งพาการนำเข้าแผ่นสำเร็จรูปพร้อมใช้งานเหล่านี้จากต่างประเทศ

อิเล็กโตรสปินนิง (electrospinning) (รูปที่ 1) เป็นเทคนิคหนึ่งในการผลิตเส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในระดับไมโครเมตรถึงนาโนเมตรจากสารละลายพอลิเมอร์หรือพอลิเมอร์หลอมเหลว (melts) โดยอาศัยแรงทางไฟฟ้ากระตุ้นให้หยดของสารละลายพอลิเมอร์ ซึ่งถูกขับออกมาจากปลายเข็มแตกกระจายออกเป็นเส้นใยในลักษณะ Taylor cone พร้อมกับการระเหยไปของตัวทำละลายในสารละลายพอลิเมอร์ เกิดเป็นเส้นใยตกลงบนแผ่นรองรับซ้อนทับเป็นชั้น (mat) เส้นใยนาโนที่ได้มีคุณสมบัติเด่นหลายประการได้แก่ มีความสม่ำเสมอ และพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง มีช่องว่างหรือความพรุนมาก มีความยืดหยุ่นเหมาะสมในการทำเป็นรูปทรงสามมิติ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผู้ศึกษาและเตรียมเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงหลายรูปแบบ เพื่อนำไปใช้งานอย่างหลากหลาย เช่น เตรียมเป็นแผ่นกรอง ใช้เป็นระบบนำส่งยาหรือสารออกฤทธิ์ ตรึงเอนไซม์ สร้าง biosensor หรือเตรียมเป็นเนื้อเยื่อเทียมในงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เป็นต้น [1] อย่างไรก็ตาม จากการทบทวนวรรณกรรมและสารสนเทศที่เกี่ยวข้อง พบว่า ในขณะที่ยางานเกี่ยวกับการผลิตและนำเส้นใยนาโนไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง แต่รายงานเกี่ยวกับการนำเส้นใยนาโนไปประยุกต์ใช้เป็นแผ่น stationary phase สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบางกลับยังมีจำนวนน้อย จนถึงปัจจุบันมีเพียงรายงานการเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงจาก glassy carbon [2] และพอลิเมอร์ ได้แก่ polyacrylonitrile (PAN) [3,4,5] และ polyvinyl alcohol (PVA) [6] เพื่อใช้



รูปที่ 1 เทคนิคอิเล็กโตรสปินนิงสำหรับเตรียมแผ่นเส้นใยนาโน

แยกกรดอะมิโน สี เลเซอร์ (laser dyes) สารสแตยรอยด์ และสารอาหาร ซึ่งพบว่าการเตรียมแผ่นด้วยวิธีดังกล่าวให้แผ่นโครมาโทกราฟีที่บาง แต่มีประสิทธิภาพในการแยกดี และใช้เวลาในการแยกน้อยกว่าแผ่น TLC แบบที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้ มีรายงานหนึ่งฉบับเกี่ยวกับการเตรียมแผ่นเส้นใยชนิดเรียงตัวเป็นระเบียบหรือ aligned nanofibers จาก PAN เพื่อใช้แยกสารในกลุ่ม β -blockers และสแตยรอยด์ ซึ่งพบว่าช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการแยกสารลงไปได้อีก เนื่องจาก mobile phase สามารถเคลื่อนที่ไปบนแผ่น ตามแนวการเรียงตัวที่เป็นระเบียบของเส้นใยได้รวดเร็วขึ้น และยังทำให้ประสิทธิภาพของการแยกสารดีขึ้นด้วย [4] รวมทั้งมีรายงานเกี่ยวกับการปรับปรุงแผ่นเส้นใยเพื่อให้สามารถตรวจวัดสารที่สามารถดูดกลืนแสง UV ได้โดยการผสม photoluminescent dye เข้าไปในเส้นใย [5] ดังนั้นในภาพรวม การวิจัยและพัฒนาแผ่นเส้นใยนาโนจากกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิงเพื่อใช้ในงานโครมาโทกราฟีแผ่นบางจึงมีความน่าสนใจ และถือว่าเป็นเรื่องใหม่ที่ควรทำการศึกษามากขึ้น ทั้งในแง่การนำเอาพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ มาใช้เตรียมแผ่น รวมถึงการปรับปรุงคุณสมบัติของแผ่นให้มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่ดีขึ้น เนื่องจากเส้นใยนาโนมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น stationary phase สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ได้แก่

- 1) การที่มีพื้นฐานทางกายภาพเป็นเส้นใยต่อเนื่องจึงช่วยให้วัสดุหรือพอลิเมอร์ซึ่งทำหน้าที่เป็น stationary phase ยึดต่อกันได้โดยไม่ต้องใช้ binder จึงลดปัญหาที่อาจเกิดจากการที่ stationary phase กระจายตัวไม่สม่ำเสมอเมื่อผสมกับ binder จนอาจลดประสิทธิภาพในการแยกสารได้

- 2) การที่เส้นใยนาโนมีพื้นที่ผิวจำเพาะสูงทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างสารที่ต้องการแยกกับผิว stationary phase ได้ดี ทำให้การแยกมีประสิทธิภาพสูงกว่าการแยกโดยใช้แผ่นโครมาโทกราฟีที่เตรียมจากวัสดุที่มีขนาดอนุภาคใหญ่โดยวิธีการที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน นอกจากนี้ด้วยประสิทธิภาพในการแยกที่เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เส้นใยที่มีพื้นที่ผิวจำเพาะสูง จึงอาจไม่จำเป็นต้องเตรียมชั้น stationary phase ที่หนามาก จึงเป็นการประหยัดวัสดุที่ใช้เคลือบลงบนแผ่นระนาบ และยังทำให้ได้แผ่นโครมาโทกราฟีชนิด ultra-thin ซึ่งทำให้เกิดการแยกของสารได้อย่างรวดเร็ว

- 3) การที่แผ่นเส้นใยมีความพรุนมาก ทำให้ mobile phase เคลื่อนที่พาสารตัวอย่างไปตาม stationary phase ได้อย่างรวดเร็วด้วยแรง capillary จึงลดเวลาที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์ได้

นอกจากนี้อิเล็กโตรสปินนิง ยังเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน ราคาไม่แพง สามารถติดตั้งชุดอุปกรณ์ได้ในห้องปฏิบัติการ และสามารถผลิตเส้นใยจากวัสดุหรือพอลิเมอร์ได้หลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นพอลิเมอร์ชนิดเดียวหรือพอลิเมอร์ผสม โดยการปรับและควบคุมปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการผลิต เช่น ชนิดและความเข้มข้นของพอลิเมอร์ ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลาย อัตราการไหลของสารละลายพอ

ลิเมอร์ออกจากเข็ม ระยะทางระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับ และความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ให้ เพื่อให้ได้ขนาดลักษณะ รูปร่าง และความหนาของชั้นเส้นใยตามที่ต้องการได้

จากเหตุผลที่กล่าวมา คณะผู้วิจัยจึงสนใจและได้ศึกษาพัฒนาเส้นใยนาโนสำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยเลือกใช้ cellulose acetate เนื่องจากเป็นพอลิเมอร์อนุพันธ์ของพอลิเมอร์ cellulose ที่ได้จากธรรมชาติ มีราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และยังไม่เคยมีการนำแผ่น electrospun nanofibers จากพอลิเมอร์ชนิดนี้ไปใช้สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบางมาก่อน โดยคณะผู้วิจัยได้ศึกษาและปรับปรุงปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิง เพื่อให้ได้แผ่นเส้นใยที่มีคุณสมบัติเฉพาะที่เหมาะสมสำหรับเป็น stationary phase แล้วประเมินคุณสมบัติของแผ่นเส้นใยที่ได้ จากลักษณะทางกายภาพ เช่น ขนาด รูปร่าง ความหนา ความเรียบ การยึดเกาะกับแผ่นระนาบ การคงอยู่ของหมู่ฟังก์ชันทางเคมีของพอลิเมอร์ และที่สำคัญคือ ประสิทธิภาพในการแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยอาศัยปัจจัยการวิเคราะห์ ได้แก่ การตรวจหาสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และยาแผนโบราณ และการตรวจหาสารไฮโดรควิโนนและกรดเรตินอิกในเครื่องสำอาง เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสามารถและประสิทธิภาพของแผ่นเส้นใยนาโนในการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง เนื่องจากเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบางมีความเหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารเบื้องต้น ด้วยเหตุผลในด้านราคา วิธีการวิเคราะห์ที่ไม่ยุ่งยากและสามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างไปพร้อมกัน รวมถึงใช้อุปกรณ์ที่ไม่ซับซ้อน สามารถนำไปใช้กับการตรวจวิเคราะห์ในภาคสนามได้ ทั้งนี้ในงานวิจัยได้เตรียมแผ่นซึ่งมีการจัดเรียงตัวของเส้นใยใน 2 ลักษณะ แบบแรก เรียกว่า เส้นใยชนิด non-aligned หมายถึง เส้นใยที่มีการเรียงตัวแบบสุ่ม ไร้ทิศทางที่แน่นอน และอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า เส้นใยชนิด uniaxially aligned หมายถึง เส้นใยที่มีการเรียงตัวเป็นระเบียบเป็นแนวเดียว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนจากพอลิเมอร์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบาง
2. เพื่อศึกษาคูณสมบัติหรือลักษณะเฉพาะของเส้นใยนาโนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็น stationary phase ในโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ซึ่งอาจจะแตกต่างไปจากคุณสมบัติของเส้นใยนาโนที่นำไปใช้กับวัตถุประสงค์อื่นๆ ที่เคยมีรายงานมา
3. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อคุณสมบัติหรือลักษณะของเส้นใยนาโน และปรับ (optimize) ปัจจัยที่มีผลเหล่านั้นเพื่อให้ได้แผ่นเส้นใยนาโนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็น stationary phase ในโครมาโทกราฟีแผ่นบาง
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นเส้นใยนาโนที่เตรียมได้ ในการแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์

Cellulose acetate ($M_v=30$ kDa, degree of acetyl substitution ≈ 2.4) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ตัวทำละลาย ได้แก่ acetone (Carlo, Italy), *N,N*-dimethylacetamide [DMAc, Labscan (Asia), Thailand], methanol (Merck, Germany) and ethanol (Merck) ใช้ชนิด analytical reagent grade

สารมาตรฐาน Dexamethasone (99.7% purity) และ prednisolone (99.8 % purity) ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ hydroquinone และ retinoic acid ได้จากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 F254 และ silica gel 60 RP-18 F254 ซึ่งใช้ในการเปรียบเทียบ ซื้อจากบริษัท Merck ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยาแผนโบราณ และเครื่องสำอางที่ใช้ในการวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างจากพื้นที่จังหวัดนครปฐมและใกล้เคียง ช่วงปี พ.ศ. 2555 – 2556

ใช้ Brookfield DV-III programmable viscometer สำหรับวัดความหนืดของสารละลาย พอลิเมอร์ Kruss DSA10 Mk2 drop shape analyzer ใช้วัด surface tension และ Orion 160 conductivity meter ใช้วัด conductivity ศึกษาลักษณะของแผ่นเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน scanning electron microscope (SEM) รุ่น Camscan Mx2000 (Obducat Camscan Ltd, Cambridge, UK) ร่วมกับ image analysis software JMicroVision V.1.2.7 (University of Geneva, Geneva, Switzerland) และศึกษา chemical functionality ของเส้นใย ด้วย Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy โดยใช้เครื่อง Nicolet Magma-IR system 750

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ แบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนดังนี้

1. การเตรียมแผ่นเส้นใย cellulose acetate ชนิด non-aligned และประยุกต์ใช้สำหรับตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาแผนโบราณ
2. การเตรียมแผ่นเส้นใย cellulose acetate ชนิด aligned และประยุกต์ใช้สำหรับตรวจสอบ hydroquinone และ retinoic acid ในเครื่องสำอาง

การเตรียมแผ่นเส้นใย cellulose acetate ชนิด non-aligned และประยุกต์ใช้สำหรับตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาแผนโบราณ

1. กระบวนการอิเล็กทรอนิกส์

1.1 การเตรียมสารละลายพอลิเมอร์ cellulose acetate

ละลายผง cellulose acetate 1.7 g ในตัวทำละลายผสม 10 mL ซึ่งประกอบด้วย acetone กับ *N,N*-dimethylacetamide (DMAc) ในอัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 2:1, 1:1 และ 1:2 (เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของตัวทำละลาย) เพื่อเตรียมสารละลาย cellulose acetate 17% (w/v) โดยปั่นสารละลายในภาชนะปิด ด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หา surface tension, shear viscosity และค่า conductivity ก่อนนำไปทำอิเล็กทรอนิกส์

1.2 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับอิเล็กโตรสปินนิ่ง

การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งแสดงไว้ดังรูปที่ 2 มีขั้นตอนดังนี้ บรรจุสารละลาย cellulose acetate 5 mL ลงในเข็มฉีดยาชนิดแก้ว ซึ่งต่อปลายด้วยหัวเข็มเบอร์ 20 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.5 mm ใช้ syringe pump ควบคุมอัตราการไหลในการพ่นสารละลายออกจากเข็มให้มีค่า 0.2, 0.6 และ 1.0 mL/h (เพื่อศึกษาผลของอัตราการไหลในการพ่นสารละลาย) ตั้งความต่างศักย์และระยะห่างระหว่างปลายเข็มกับฉากรับหรือ drum collector ที่ 17.5 kV และ 15 cm ตามลำดับ ติดแผ่นอะลูมิเนียมชนิดแข็งขนาดประมาณ 15 x 9 cm² บน drum collector เพื่อทำหน้าที่เป็นแผ่นรองรับเส้นใย โดย drum collector นี้หมุนด้วยความเร็วรอบ 350 rpm อุณหภูมิขณะทำอิเล็กโตรสปินนิ่งคือ 25 °C และ vary ระยะเวลาที่ใช้ในการสปิน 2, 4 และ 6 h เพื่อศึกษาผลของความหนาของชั้นเส้นใย



รูปที่ 2 การติดตั้งอุปกรณ์สำหรับกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งในห้องปฏิบัติการ

2. การประเมินลักษณะของแผ่นเส้นใย

ประเมินลักษณะของแผ่นเส้นใยที่เตรียมได้ ดังนี้ ลักษณะซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ ความเรียบและสม่ำเสมอ การเกาะติดของชั้นเส้นใยกับแผ่นอะลูมิเนียม ลักษณะที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน SEM ได้แก่ รูปร่างของเส้นใย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง และความหนาของชั้นเส้นใย วัดโดยใช้ image analysis software JMicroVision V.1.2.7 โดยการถ่ายภาพ SEM นั้นทำโดยตัดแผ่นเส้นใยให้เป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปเคลือบด้วยทองโดยใช้ sputtering device ให้มีความหนาของชั้นทองประมาณ 150 Å (รูปที่ 3) ศึกษา chemical functionality ของเส้นใย เปรียบเทียบกับ cellulose acetate โดยใช้ Fourier transform infrared spectroscopy โดยบดเส้นใยและตอกรวมกับ potassium bromide ให้เป็นแผ่นบาง แล้วนำไปวัดสเปกตรัมในช่วง 400 – 4,000 cm⁻¹

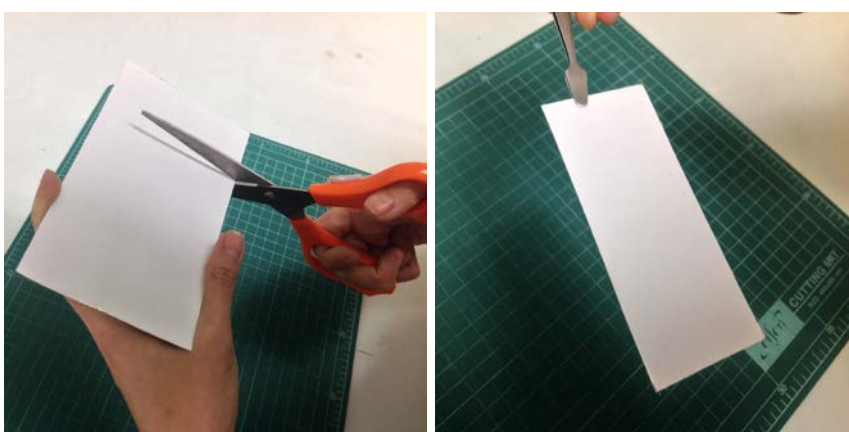


รูปที่ 3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาความทนทานหรือการละลายของแผ่นเส้นใยในตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยลอกแผ่นเส้นใยออกจากแผ่นอะลูมิเนียม แล้วตัดให้มีขนาด $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาปริมาตร 1 mL เขย่านานเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) แล้วสังเกตผลว่า แผ่นเส้นใยมีการละลายหรือไม่ หากละลายหมด หรือละลายได้บ้าง (คงเหลือแผ่นอยู่บ้างบางส่วน) ถือว่า เส้นใยละลายได้ในตัวทำละลายชนิดนั้น

3. การเตรียมแผ่นเส้นใยเพื่อใช้ในงานโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

ทำตัดแผ่นอะลูมิเนียมให้มีขนาด $8.5 \times 4 \text{ cm}^2$ ด้วยกรรไกรอย่างระมัดระวัง (รูปที่ 4) เพื่อป้องกันการหลุดออกของชั้นเส้นใยจาก backing อะลูมิเนียม โดยเลือกบริเวณกลางแผ่น ซึ่งสังเกตเห็นได้ว่ามีเส้นใยสม่ำเสมอ และหลีกเลี่ยงบริเวณขอบซึ่งมักจะมีชั้นเส้นใยบาง

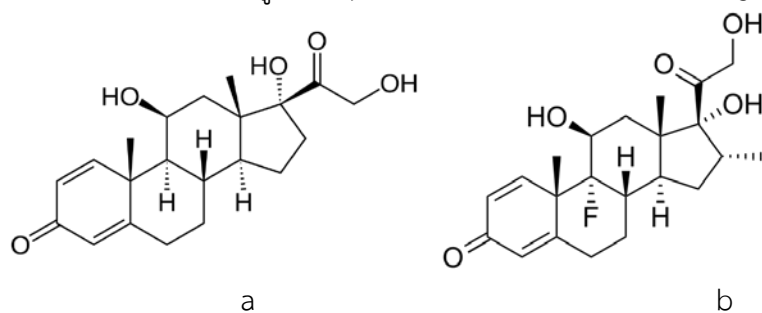


รูปที่ 4 การเตรียมแผ่นเส้นใยชนิด non-aligned สำหรับใช้งานโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

4. การแยกสารสเตียรอยด์ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

ศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นเส้นใย cellulose acetate ในการเป็น stationary phase สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยนำแผ่นไปใช้แยกสารสเตียรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ prednisolone (รูป

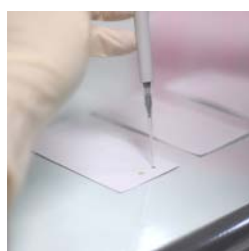
ที่ 5 a) และ dexamethasone (รูปที่ 5 b) ซึ่งมีความแตกต่างกันที่อะตอมของ fluorine และ hydrogen ที่ตำแหน่ง C9 และหมู่ methyl ที่ตำแหน่ง C16 บน steroid ring



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ prednisolone (a) และ dexamethasone (b)

4.1 วิธีการแยกสารบนแผ่นเส้นใยนาโน cellulose acetate

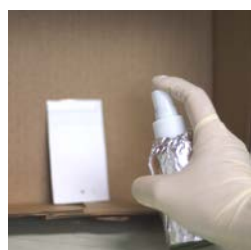
ขั้นตอนการแยกสารบนแผ่นเส้นใย cellulose acetate (รูปที่ 6) ทำโดย spot สารละลาย prednisolone, dexamethasone และสารผสม prednisolone/dexamethasone ซึ่งละลายใน absolute ethanol เข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 1 μ L ด้วยไมโครปิเปตลงบนแผ่นเส้นใยซึ่งตัดเตรียมไว้ ที่ระยะห่างประมาณ 1 cm จากขอบด้านล่าง จากนั้นนำแผ่นวางลงในภาชนะที่ได้ทำให้อิ่มตัวด้วย mobile phase ล่วงหน้าเป็นเวลา 30 นาที mobile phase ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ binary mixture ซึ่งประกอบด้วย methanol กับน้ำ หรือ ethanol กับน้ำ ที่อัตราส่วนต่างๆ ปลอ่ยให้ mobile phase เคลื่อนที่ขึ้นไป จนได้ระยะทาง 7 cm จากจุดเริ่มต้น แล้วนำแผ่นออกจากภาชนะ ผึ่งให้แห้ง ตรวจหาตำแหน่งของจุดบนแผ่นโดยฉีดพ่นด้วยสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.2% w/v tetrazolium blue และ 2% w/v sodium hydroxide ใน methanol จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยเป่าด้วยลมร้อน (อุณหภูมิประมาณ 95 – 100 °C) จากไดร์เป่าผมเป็นเวลา 2 นาที จนปรากฏจุดของสารสเดียรอยด์เป็นจุดสีม่วงน้ำเงิน



Spot ตัวอย่าง



Run TLC



พ่น visualization reagent



ให้ความร้อนเพื่อให้จุดเกิดสี

รูปที่ 6 ขั้นตอนการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการแยกสาร และคำนวณค่า R_f หรือ hR_f ($100 \times R_f$) จากระยะทางที่สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่หารด้วยระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่ และประเมินการแยกระหว่าง prednisolone กับ dexamethasone จากค่า resolution (R_s)

$$R_s = \frac{d}{(W_1 + W_2)/2}$$

และคำนวณค่า number of plate (N) ที่แสดงประสิทธิภาพของการแยกสาร จากสูตร

$$N = 16 (x/W)^2$$

เมื่อ d = ระยะห่างระหว่างจุดของสารทั้งสองชนิด และ W คือความกว้างของจุด และ x คือระยะทางที่จุดเคลื่อนที่ได้จากตำแหน่งเริ่มต้น

4.2 วิธีการแยกสารบนแผ่น cellulose acetate ที่เตรียมโดยวิธีเกลี่ย slurry และบนแผ่น commercial silica

ทดลองแยกสารสเตียรอยด์บนแผ่น cellulose acetate แบบปกติชนิดที่เป็นอนุภาคเปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยนาโน cellulose acetate ที่เตรียมขึ้นจากเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง อย่างไรก็ตามเนื่องจากในปัจจุบันไม่มีแผ่น commercial cellulose acetate จำหน่าย จึงต้องเตรียมแผ่นขึ้นเองในห้องปฏิบัติการโดยเกลี่ย slurry ซึ่งประกอบด้วยผง cellulose acetate ซึ่งบดและผ่านร่ง และ gypsum (ทำหน้าที่เป็น binder) กระจายตัวอยู่ใน methanol และน้ำ บนแผ่นแก้ว ตามวิธีของ 12 จากนั้นจึงนำแผ่นที่ได้ไปใช้แยกสเตียรอยด์โดยใช้ mobile phase ซึ่งประกอบด้วย methanol กับน้ำ หรือ ethanol กับน้ำ เช่นเดียวกับการแยกบนแผ่นเส้นใยนาโน

นอกจากนี้ ยังได้ทดลองแยกสารเพื่อดูการลำดับการเคลื่อนที่ (migration order) ของสารบนแผ่น เปรียบเทียบกับแผ่น commercial silica gel ซึ่งเป็น stationary phase ชนิดที่มีขั้ว โดยใช้ขั้นตอนการแยกเช่นเดียวกัน ตามหัวข้อ 4.1 แต่ใช้ dichloromethane/methanol (90:10, v:v) เป็น mobile phase แทน

4.3 วิธีตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาแผนโบราณ

หลังจากพบว่า แผ่นเส้นใยนาโน cellulose acetate ที่เตรียมขึ้นโดยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิง สามารถแยกสาร prednisolone กับ dexamethasone ออกจากกันได้ จึงได้ทดลองนำแผ่นไปใช้ในการตรวจสอบสารสเตียรอยด์ในตัวอย่างจริง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและยาแผนโบราณ โดยการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ทำโดย นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาแผนโบราณ ในลักษณะผง (ได้แก่ ยาผง ยาเม็ดหรือยาลูกกลอนซึ่งบดแล้ว หรือยาแคปซูลซึ่งแกะเปลือกออก) ประมาณ 50 mg ละลายใน ethanol ปริมาตร 1 mL ในหลอด microcentrifuge tube จากนั้นนำไป sonicate นาน 10 นาที เพื่อช่วยให้ผงยาแตกตัวและละลายได้ดีขึ้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนแยกส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นจึงนำส่วนสารละลายใสส่วนบนไปวิเคราะห์

นอกจากนี้ยังได้หาระดับปริมาณต่ำสุดของ prednisolone และ dexamethasone ที่สามารถแยกและตรวจวัดได้ เพื่อศึกษาความไว (sensitivity) ของวิธี TLC ที่พัฒนาขึ้น โดย spot สารละลาย prednisolone กับ dexamethasone ที่มีความเข้มข้นต่างๆ จากมากไปน้อยลงบนแผ่น แล้วแยกสาร

และตรวจวัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังสามารถเห็นจุดของสารได้ ทั้งนี้ในการประเมินการมองเห็นจุดใช้คนที่มีประสิทธิภาพการมองเห็นปกติจำนวน 5 คน นอกจากนี้ศึกษาความคงสภาพของแผ่นเมื่อเก็บแผ่นไว้เป็นเวลา 6 เดือน

การเตรียมแผ่นเส้นใย cellulose acetate ชนิด aligned และประยุกต์ใช้สำหรับตรวจหา hydroquinone และ retinoic acid ในเครื่องสำอาง

1. กระบวนการอิเล็กทรอนิกส์

ใช้สารละลาย cellulose acetate และการติดตั้งอุปกรณ์ เช่นเดียวกับการเตรียมแผ่นเส้นใยชนิด non-aligned (รูปที่ 7) ยกเว้น ใช้ความเร็วในการหมุนของ drum collector ที่สูงขึ้น (high speed rotating drum) ได้แก่ 4,500, 6,000 และ 7,500 rpm (vary เพื่อศึกษาระดับความเร็วที่ทำให้ได้เส้นใยที่เรียงตัวเป็นระเบียบในแนวเดียว) แทน 350 rpm นอกจากนี้ยังใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอล์ยชนิดอ่อน แทนแผ่นชนิดแข็ง เป็นวัสดุรองรับเส้นใย โดยหุ้มให้แนบรอบ drum เนื่องจากหากใช้แผ่นอะลูมิเนียมแข็งที่ตัดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยม การหมุนของ drum ด้วยความเร็วรอบที่สูง จะทำให้เกิดแรงเหวี่ยงและทำให้แผ่นเกิดหลุดออกจากตัว drum ขณะสปิน



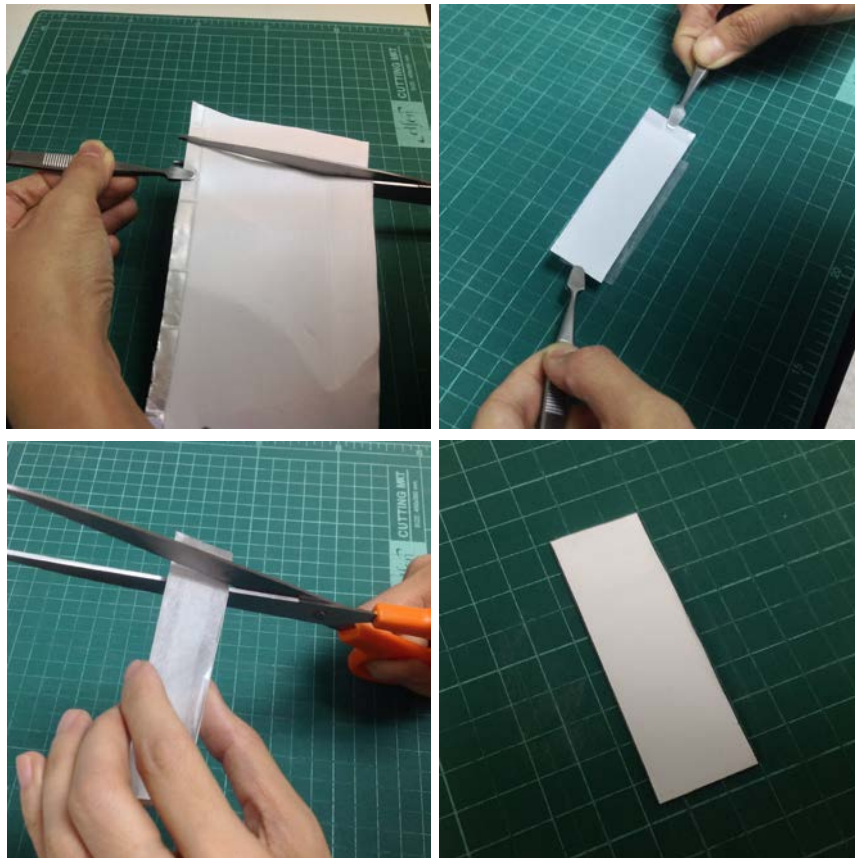
รูปที่ 7 การติดแผ่นอะลูมิเนียมสำหรับการเตรียมแผ่นเส้นใยชนิด aligned

2. การประเมินลักษณะของแผ่นเส้นใย

ประเมินลักษณะของแผ่นเส้นใยด้วยตาเปล่าและด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เช่นเดียวกับการประเมินแผ่นเส้นใยชนิด non-aligned แต่เพิ่มเติมการประเมินการเรียงตัวของเส้นใย (alignment) จากภาพถ่าย SEM โดยนับจำนวนเส้น (จำนวนรวมทั้งสิ้น 50 เส้นต่อภาพ) ที่ทำมุมต่างๆ กับเส้นอ้างอิงซึ่งลากกำหนดไว้ในแนวดิ่ง เช่น ถ้าเส้นใยใดขนานกับเส้นอ้างอิงนี้ หมายถึงทำมุม 0 องศา และถ้าเส้นใยใดตั้งฉากกับเส้นอ้างอิงนี้ หมายถึงทำมุม 90 องศา จากนั้น plot histogram แสดงความถี่หรือจำนวนเส้นใยที่ทำมุมในช่วง 90 ถึง -90 องศา แผ่นเส้นใยที่มีลักษณะ uniaxially aligned ที่ดีหรือเรียงตัวเป็นระเบียบ คือ แผ่นที่มีการกระจายตัวของแท่ง histogram แคบ (narrow distribution)

3. การเตรียมแผ่นเส้นใยชนิด aligned เพื่อใช้ในงานโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

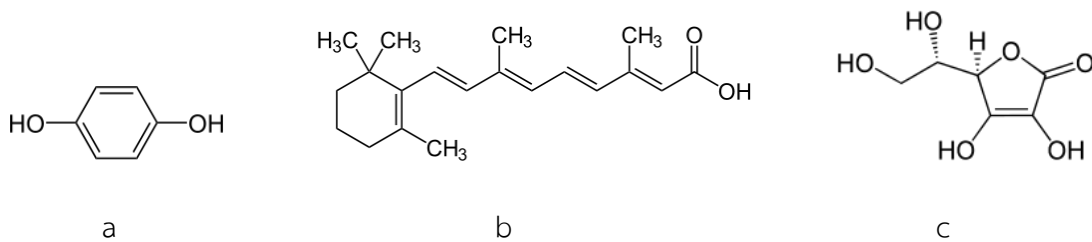
เนื่องจากแผ่นรองรับเส้นใยชนิด aligned เป็นแผ่นอะลูมิเนียมชนิดอ่อนซึ่งมีความแข็งแรงไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้งาน TLC และมีโอกาสโค้งงอได้ง่าย จึงต้องนำแผ่นเส้นใยดังกล่าวติดลงบนแผ่น backing ซึ่งทำด้วยแก้วให้แข็งแรงมากยิ่งขึ้นก่อนนำไปใช้งาน ซึ่งทำโดยใช้กรรไกรตัดแผ่นอะลูมิเนียมให้มีขนาด $7.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ แล้วนำไปติดบนแผ่นแก้วโดยใช้เทปกาวสองหน้า จากนั้นตัดขอบแผ่นอะลูมิเนียมส่วนที่เกินแผ่นแก้วออกให้เรียบร้อยเพื่อพร้อมใช้งาน ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 การเตรียมแผ่นเส้นใยชนิด aligned สำหรับใช้งานโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

4. การแยก hydroquinone และ retinoic acid ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง

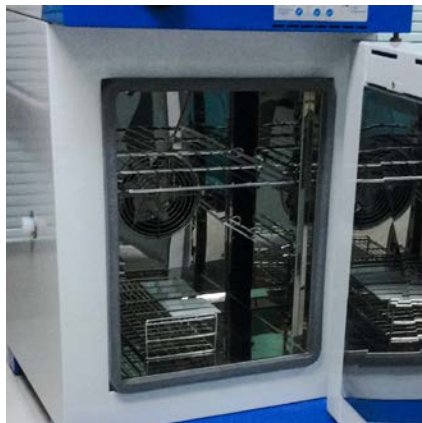
ศึกษาประสิทธิภาพของแผ่นเส้นใย cellulose acetate ชนิด aligned ในการเป็น stationary phase สำหรับโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ความเร็วในการเคลื่อนที่ของ mobile phase บนแผ่น (migration time) และลักษณะของจุดที่ปรากฏบนแผ่นหลังแยก เปรียบเทียบกับชนิด non-aligned โดยนำแผ่นไปใช้แยกสารผสม 3 ชนิด ได้แก่ สารห้ามใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ได้แก่ hydroquinone (รูปที่ 9 a) และ retinoic acid (รูปที่ 9 b) และวิตามินซี (รูปที่ 9 c) ซึ่งเป็นส่วนผสมปกติในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง



รูปที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของ hydroquinone (a) retinoic acid (b) และวิตามินซี (c)

4.1 วิธีการแยกสารบนแผ่นเส้นใยนาโน cellulose acetate

spot สารละลาย hydroquinone, retinoic acid และวิตามินซี ซึ่งละลายใน absolute ethanol เข้มข้น 0.125, 0.67 และ 1 mg/mL ตามลำดับ ปริมาตร 0.5 μ L ด้วยไมโครปิเปตลงบนแผ่นเส้นใยซึ่งตัดเตรียมไว้ ที่ระยะห่างประมาณ 1 cm จากขอบด้านล่าง จากนั้นนำแผ่นวางลงในภาชนะที่ได้ทำให้อิ่มตัวด้วย mobile phase ล้างหน้าเป็นเวลา 30 นาที mobile phase ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย methanol : น้ำ : acetic acid ที่มีอัตราส่วน methanol : น้ำ ต่างๆ และมี acetic acid 2.5% คงที่ ปล่อยให้ mobile phase เคลื่อนที่ขึ้นไป จนได้ระยะทาง 5 cm จากจุดเริ่มต้น แล้วนำแผ่นออกจากภาชนะ ผึ่งให้แห้ง ตรวจหาตำแหน่งของจุดบนแผ่นโดยฉีดยาด้วยสารละลาย 5% (w/v) phosphomolybdic acid ใน ethanol จากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยเป่าด้วยลมร้อน (อุณหภูมิประมาณ 95 – 100 °C) จากใต้เป่าผมเป็นเวลา 2 นาที หรืออาจใช้วิธีนำไปเข้าตู้อบ (hot air oven) อุณหภูมิประมาณ 95 – 100 °C นาน 2 นาที (รูปที่ 10) จนปรากฏจุดสีเทาของสารทั้งสามชนิด



รูปที่ 10 วิธีทำให้จุดของสารปรากฏสีโดยใช้ความร้อนจากตู้อบ

บันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการแยกสาร คำนวณค่า Rf, plate number และหาพื้นที่ของจุดโดยใช้ Photoshop CS6 software (Adobe System, Mountain View, CA, USA) โดยรายงานผลเป็นค่า pixel เปรียบเทียบระหว่างจุดที่ปรากฏบนแผ่นชนิด aligned กับชนิด non-aligned

4.2 การแยกสารบนแผ่น commercial TLC ชนิดอื่นๆ

เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ จึงได้ทดลองแยกสารผสม hydroquinone, retinoic acid และวิตามินซี บนแผ่น commercial TLC ชนิดอื่นซึ่งนิยมใช้กันในปัจจุบัน ได้แก่ แผ่น silica gel 60 F254 และ silica gel 60 RP-18 F254 ซึ่งเป็นชนิด reverse phase โดยใช้ mobile phase ประกอบด้วย methanol : น้ำ : acetic acid ที่มีอัตราส่วน methanol : น้ำ ต่างๆ และ มี acetic acid 5% คงที่ และใช้ขั้นตอนการแยก รวมทั้งวิธีการตรวจหาจุดโดยใช้ 5% (w/v) phosphomolybdic acid ใน ethanol เป็น visualization reagent เช่นเดียวกับการแยกบนแผ่นเส้นใยนาโน cellulose acetate ยกเว้น ใช้ปริมาตรของสารในการ spot ลงบนแผ่นเป็น 2 μL

4.3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจหา hydroquinone และ retinoic acid ในเครื่องสำอาง

หลังจากพบว่า แผ่นเส้นใยนาโน cellulose acetate ชนิด aligned สามารถแยกสาร hydroquinone และ retinoic acid ออกจากกันได้ จึงได้ทดลองนำแผ่นไปใช้ในการตรวจหาสารดังกล่าวในตัวอย่างจริง ได้แก่ ครีมเครื่องสำอาง โดยการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ทำโดย ละลายตัวอย่างครีมประมาณ 0.5 g ด้วย ethanol 1 mL ในหลอด microcentrifuge tube นำไป sonicate นาน 10 นาที แล้วแช่หลอดในน้ำแข็งจนปรากฏชั้น wax แยกออกมาหรือสารละลายมีความข้นเพิ่มขึ้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยก wax ส่วนที่ไม่ละลายออกไป จากนั้นจึงนำส่วนสารละลายใส่ไปวิเคราะห์ ในบางกรณีอาจนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกบางส่วน โดยการพ่นด้วย nitrogen gas เนื้อผิวสารละลาย ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด

นอกจากนี้ยังได้หาระดับปริมาณต่ำสุดของ hydroquinone และ retinoic acid ที่สามารถแยกและตรวจวัดได้ด้วยตา เพื่อประเมินความไว (sensitivity) ของวิธี TLC ที่พัฒนาขึ้น โดย spot สารละลาย retinoic acid กับ hydroquinone ที่มีความเข้มข้นต่างๆ จากมากไปน้อยลงบนแผ่น แล้วแยกสารและตรวจวัดด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังสามารถเห็นจุดของสารได้ ทั้งนี้ในการประเมินการมองเห็นจุดใช้คนที่มีความสามารถในการมองเห็นปกติจำนวน 5 คน และศึกษาความจำเพาะของวิธี โดยทดลองแยกสารอื่นๆ ที่มักพบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์และอาจรบกวนการวิเคราะห์ ได้แก่ arbutin, resorcinol และวิตามินซี ทำการตรวจยืนยันผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานของ ASEAN Guideline ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC [7,8]