การประยุกต์ใช้เครื่องมือในทางเภสัชวิเคราะห์ 1

โครงการหนังสือวิชาการที่น่าพิมพ์ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ให้จัดพิมพ์และจำหน่ายในราคาย่อมเยา

□□□□□□□□□□□□ (F)(1-10).indd 1 1/1/44 BE 9:40 AM

การประยุกต์ใช้เครื่องมือในทางเภสัชวิเคราะห์ 1

คณะผู้เขียน
กรกช กังวาลทัศน์
นันทนา นุชถาวร
ปองทิพย์ สิทธิสาร
ศรีวรรณ ธีระมั่นคง
อรภา สกุลพาณิชย์

บรรณาธิการ
ศรีวรรณ ธีระมั่นคง

สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
2562

□□□□□□□□□□□□ (F)(1-10).indd 3 1/1/44 BE 9:40 AM

หนังสือที่ได้รับทุนสนับสนุนการเขียนตำราจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ พ.ศ. 2559

การประยุกต์ใช้เครื่องมือในทางเภสัชวิเคราะห์ 1 / กรกช กังวาลทัศน์ ...
[และคนอื่นๆ] ; บรรณาธิการ ศรีวรรณ ธีระมั่นคง.
1. ยา – การวิเคราะห์. 2. เภสัชเคมี – วิธีการ.

QV 25
ISBN 978-616-314-521-5

ลิขสิทธิ์ของ **ดร. ภญ. กรกช กังวาลทัศน์,**
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภญ. นันทนา นุชถาวร,
รองศาสตราจารย์ ดร. ภญ. ปองทิพย์ สิทธิสาร,
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภญ. ศรีวรรณ ธีระมั่นคง,
ดร. ภญ. อรภา สกุลพาณิชย์
สงวนลิขสิทธิ์

ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 1 เดือนตุลาคม 2562
จำนวน 100 เล่ม

จัดพิมพ์และจำหน่ายโดย**สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์**
ท่าพระจันทร์: อาคารธรรมศาสตร์ 60 ปี ชั้น U1 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ถนนพระจันทร์ กรุงเทพฯ 10200 โทร. 0-2223-9232
ศูนย์รังสิต: อาคารโดมบริหารชั้น 3 ห้อง 317 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12121
โทร. 0-2564-2859-60 โทรสาร 0-2564-2860
http://www.thammasatpress.tu.ac.th, email: unipress@tu.ac.th

พิมพ์ที่**ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ็มแอนด์เอ็ม เลเซอร์พรินต์**
นายสมชาย ดำขำ ผู้พิมพ์ผู้โฆษณา

แบบปกโดย ชนิสรา นาถนอม

ภาพปก Designed by Freepik
(http://www.freepik.com)

ราคาเล่มละ 220.- บาท

สารบัญ

		หน้า
คำนำ		**(9)**
บทที่ 1	**อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี**	**1**
	1.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสเปกโทรสโกปี	2
	1.2 รังสีอัลตราไวโอเลตและแสงที่มองเห็น	3
	1.3 หลักการและทฤษฎีของเทคนิคอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโทรสโกปี	4
	1.4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการวัดการดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล	14
	1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์	17
	1.6 วิธีวิเคราะห์และเทคนิคการวิเคราะห์	22
	บทสรุป	29
	เอกสารอ้างอิง	31
บทที่ 2	**ฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี**	**33**
	2.1 ลูมิเนสเซนซ์	33
	2.2 ประวัติศาสตร์การพบฟลูออเรสเซนซ์	34
	2.3 หลักการของฟลูออเรสเซนซ์	34
	2.4 จลนศาสตร์ของโฟโตลูมิเนสเซนซ์	38
	2.5 ผลได้ควอนตัม	39
	2.6 ความสัมพันธ์ระหว่างฟลูออเรสเซนซ์กับความเข้มข้นของสาร	40
	2.7 สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์	42
	2.8 โครงสร้างโมเลกุลที่เกิดฟลูออเรสเซนซ์	43
	2.9 ชนิดของฟลูออโรฟอร์	46
	2.10 ปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์	47
	2.11 ปรากฏการณ์การลดความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์	48
	2.12 เครื่องสเปกโทรฟลูออโรโฟโตมิเตอร์	50
	2.13 การประยุกต์เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ในงานเภสัชวิเคราะห์	53
	2.14 ตัวอย่างการวิเคราะห์ตัวอย่างยาโดยใช้เทคนิคฟลูออเรสเซนซ์	54
	บทสรุป	56
	เอกสารอ้างอิง	57

□□□□□□□□□□□□ (F)(1-10).indd 5 1/1/44 BE 9:40 AM

		หน้า
บทที่ 3	**อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี**	**59**
	3.1 หลักการและทฤษฎี	60
	3.2 ลักษณะอินฟราเรดสเปกตรัม	67
	3.3 เครื่องอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์	72
	3.4 เทคนิคการเตรียมสารตัวอย่าง	76
	3.5 ชนิดของตัวทำละลาย	81
	3.6 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ	82
	3.7 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ทางเภสัชวิเคราะห์	95
	บทสรุป	97
	เอกสารอ้างอิง	98
บทที่ 4	**โปรตอน-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี**	**101**
	4.1 หลักการและทฤษฎี	102
	4.2 สเปกตรัมโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์	108
	4.3 เครื่องเอ็นเอ็มอาร์	123
	4.4 การเตรียมสารตัวอย่างวิเคราะห์	124
	4.5 วิธีทดสอบหมู่ที่มีโปรตอนแลกเปลี่ยน	126
	4.6 การประยุกต์เทคนิคเอ็นเอ็มอาร์ในทางเภสัชกรรม	126
	4.7 ตัวอย่างการวิเคราะห์ตัวยาสำคัญในผลิตภัณฑ์ยา	128
	บทสรุป	131
	เอกสารอ้างอิง	132
บทที่ 5	**ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับโครมาโทกราฟี**	**135**
	5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟี	135
	5.2 ประเภทของโครมาโทกราฟี	137
	5.3 พันธะที่เกี่ยวข้องกับอันตรกิริยาระหว่างวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่	139
	5.4 สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย	140
	5.5 ความคงอยู่ของสารในโครมาโทกราฟี	141
	5.6 กลไกการดูดซับ	142
	5.7 การตรวจวัดติดตาม	145
	5.8 วิธีทางโครมาโทกราฟี	146
	5.9 ค่าต่างๆ ทางโครมาโทรกราฟี	155

		หน้า
	บทสรุป	161
	เอกสารอ้างอิง	162
บทที่ 6	**เครื่องโครมาโทกราฟีทีแอลซีสมรรถนะสูง และเครื่องเดนสิโทมิเตอร์**	**163**
	6.1 หลักการและทฤษฎี	164
	6.2 เครื่องมือที่ใช้	166
	6.3 เทคนิคและวิธีการวิเคราะห์	171
	6.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างบนแผ่นทีแอลซี	175
	6.5 ตัวอย่างการหาปริมาณสารสำคัญในพืชสมุนไพร	179
	บทสรุป	183
	เอกสารอ้างอิง	184
บทที่ 7	**เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง**	**185**
	7.1 หลักการ	186
	7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อเวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์	189
	7.3 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	191
	7.4 วัฏภาคเคลื่อนที่	197
	7.5 คอลัมน์	198
	7.6 ระบบการชะสาร	212
	7.7 ขั้นตอนการแยกสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	213
	7.8 เทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบคู่ไอออน	213
	7.9 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ	214
	บทสรุป	217
	เอกสารอ้างอิง	218
บทที่ 8	**เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส**	**225**
	8.1 บทนำ	225
	8.2 หลักการ	226
	8.3 การจำแนกประเภทของเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส	227
	8.4 เครื่องมือและอุปกรณ์	232
	8.5 วิธีวิเคราะห์โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส	235

		หน้า
	8.6 เทคนิคการตรวจหาตัวอย่าง	246
	บทสรุป	251
	เอกสารอ้างอิง	252
บทที่ 9	**แคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส**	**255**
	9.1 บทนำ	255
	9.2 หลักการ	257
	9.3 การจำแนกวิธีการแยกสารโดยแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส	261
	9.4 เครื่องมือแคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีส	269
	9.5 การประยุกต์ใช้แคพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซีสในทางเภสัชศาสตร์	277
	เอกสารอ้างอิง	279
ดัชนี		**283**

คำนำ

ยาหรือผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมถือเป็นสิ่งที่สำคัญต่อสิ่งมีชีวิต การวิเคราะห์คุณภาพยาให้ถูกต้องจึงเป็นสิ่งที่สำคัญเช่นกัน การเข้าใจเทคนิคเครื่องมือต่างๆ ที่เกี่ยวกับการประยุกต์ในงานเภสัชวิเคราะห์จึงเป็นสิ่งที่ต้องตระหนักและควรศึกษาให้เข้าใจ ตำรา*การประยุกต์ใช้เครื่องมือในทางเภสัชวิเคราะห์ 1* เล่มนี้ นำเสนอหลักการเครื่องมือชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางเภสัชกรรมทั้งทางด้านสเปกโทรสโกปี และด้านโครมาโทกราฟี ซึ่งเนื้อหาในตำรามีการกล่าวถึงหลักการ เทคนิค และการประยุกต์งานทางด้านเภสัชกรรม ทั้งนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ บางชนิดที่ยังไม่ได้กล่าวถึงในตำรา ซึ่งเป็นเทคนิคที่สำคัญเช่นกัน แต่ด้วยเทคนิคอื่นๆ นั้นมีรายละเอียดมากประกอบกับมีข้อจำกัดด้านเวลาด้วย ทำให้คณะผู้เขียนต้องกำหนดขอบเขตของตำราไว้เพียงเท่านี้ก่อน หากมีโอกาสคณะผู้เขียนจะรวบรวมเป็นตำราหรือหนังสือเพื่อให้ผู้อ่านได้มีโอกาสอ่านต่อไป

ตำราเล่มนี้ได้รับแรงบันดาลใจจากการเรียนการสอนในวิชา “ภศ. 330 – การควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ 2” คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ต้องการให้นักศึกษาได้เข้าใจถึงเทคนิคเครื่องมือต่างๆ ซึ่งได้พยายามรวบรวมความรู้จากคณาจารย์ผู้มีประสบการณ์ด้านต่างๆ โดยตั้งใจให้เนื้อหาทางด้านวิชาการอ่านง่าย และสามารถเข้าถึงองค์ความรู้ได้ง่ายไม่ยากจนเกินไป อีกทั้งได้พยายามเพิ่มเติมตัวอย่างการนำเทคนิคไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมต่างๆ คณะผู้เขียนหวังใจว่าตำราเล่มนี้จะช่วยให้นักศึกษาและผู้ที่สนใจได้เข้าใจถึงความรู้เกี่ยวกับเครื่องมือต่างๆ และสามารถนำไปประยุกต์กับงานวิจัย หรืองานประจำต่างๆ ได้ไม่มากก็น้อย

คณะผู้เขียนขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาเขียนตำราเพื่อถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ที่ดียิ่งมาสู่ตำราเล่มนี้ และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อรลักษณา แพรัตกุล ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าช่วยตรวจสอบภาษาในบางบทของตำราเล่มนี้ พร้อมชี้แนะและให้ความรู้แก่บรรณาธิการ และขอขอบคุณกองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการเขียนตำราเล่มนี้

สุดท้ายนี้หากตำราเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้เขียนต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ และขอน้อมรับความผิดพลาดทุกประการไว้ พร้อมน้อมรับฟังข้อคิดเห็นหรือข้อเสนอแนะจากผู้อ่านทุกท่านไว้เพื่อแก้ไขปรับปรุงตำราให้ดีมีประโยชน์และถูกต้องยิ่งๆ ขึ้นไป

ศรีวรรณ ธีระมั่นคง
บรรณาธิการ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ตุลาคม 2562

□□□□□□□□□□□□ (F)(1-10).indd 9 1/1/44 BE 9:40 AM

5

ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับโครมาโทกราฟี

Basic Principle of Chromatography

*ศรีวรรณ ธีระมั่นคง**

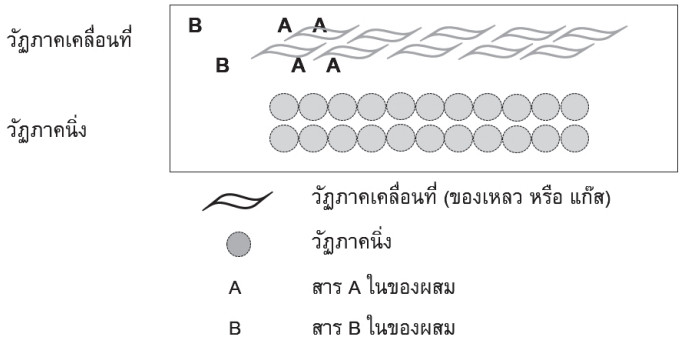
เทคนิคการแยกสารผสมให้ได้สารบริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกผลึก การสกัดแยก การกลั่น (กลั่นแบบธรรมดา, กลั่นลำดับส่วน) วิธีโครมาโทกราฟี และวิธีอื่นๆ แต่วิธีโครมาโทกราฟีจัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง จึงได้รับความนิยมอย่างมากในการแยกสารเดี่ยวออกจากสารผสม สำหรับบทนี้จะกล่าวถึงหลักการพื้นฐานของเทคนิคโครมาโทกราฟีเพื่อให้ผู้อ่านได้ศึกษาทำความเข้าใจ ก่อนไปสู่เทคนิคอื่นๆ ต่อไป

5.1 เทคนิคโครมาโทกราฟี (1-3)

ในช่วงประมาณปี ค.ศ. 1906 นักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซียชื่อ Mikhail Tswett เป็นคนแรกที่คิดค้นเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยทำการแยกสีที่มีในต้นไม้ คำว่า “chromatography” เป็นคำภาษากรีกที่มาจากคำว่า “chroma” (แปลว่า สี) และ “graphy” (แปลว่า การศึกษา การเขียน)

* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร., เภสัชกรหญิงประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

□□□□□□□□□□□□ 5 135-162.indd 135 1/1/44 BE 9:47 AM



รูปที่ 5-1 ส่วนประกอบต่างๆ ในเทคนิคโครมาโทกราฟี

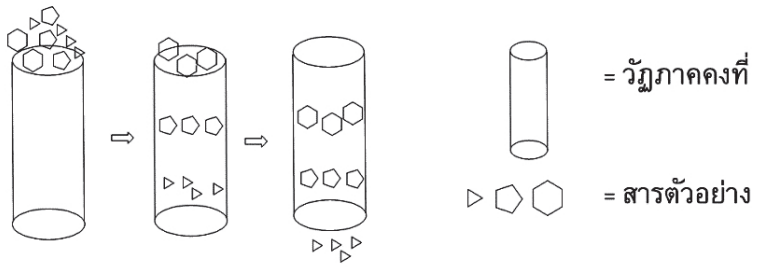
โครมาโทกราฟีเป็นวิธีทางกายภาพที่แยกสารผสม 2 ชนิดหรือมากกว่าออกจากกัน โดยสารผสมจะกระจายตัวอยู่ระหว่างสองวัฏภาค (phase) ซึ่งการแยกสารผสมอาศัยหลักการที่สารต่างๆ ในของผสมมีการกระจายตัวแตกต่างกันในสองวัฏภาค (รูปที่ 5-1) ดังนั้นเทคนิคโครมาโทกราฟีมีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนหลัก คือ (1,3)

- *วัฏภาคนิ่ง (stationary phase)* อาจเป็นของแข็งถูกอัดแน่นในคอลัมน์หรือแผ่นอะลูมิเนียม หรือของเหลวกระจายตัวเคลือบเป็นชั้นๆ หรือเป็นชั้นฟิล์มบางๆ อยู่บนตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็ง วัฏภาคนิ่งจะเป็นชั้นที่มีสมบัติเฉพาะ มีหลากหลายชนิดแตกต่างกันไป วัฏภาคนิ่งทำหน้าที่ช่วยแยกสารออกจากกัน

- *วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)* อาจเป็นของเหลวหรือแก๊สก็ได้ เป็นตัวช่วยพาสารตัวอย่างเข้าสู่วัฏภาคนิ่งและทำการแยกสารผสมออกจากกัน เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวบางครั้งเรียก “ตัวชะ (eluent)”

- *สารตัวอย่าง* อาจเป็นสารผสมที่ต้องการแยกออกจากกัน เช่น A B แทนตัวอย่างสารผสมที่ต้องการแยกออกจากกัน

กระบวนการในการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีคือ สารที่จับหรือติดอยู่กับวัฏภาคนิ่งได้นานและดีกว่าที่อยู่หรือละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ สารชนิดนั้นจะเคลื่อนตัวหรือออกมาช้ากว่าสารที่ไม่ชอบอยู่กับวัฏภาคนิ่ง จากนั้นสารตัวอื่นๆ ก็จะค่อยๆ แยกออกจากกัน (รูปที่ 5-2) การตรวจสอบหรือเก็บตัวอย่างจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ตรวจวัดที่เหมาะสมเพื่อติดตามสารที่ต้องการในช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งกลไกหรือเทคนิคในการแยกจะกล่าวถึงในหัวข้อถัดไป (3,4)



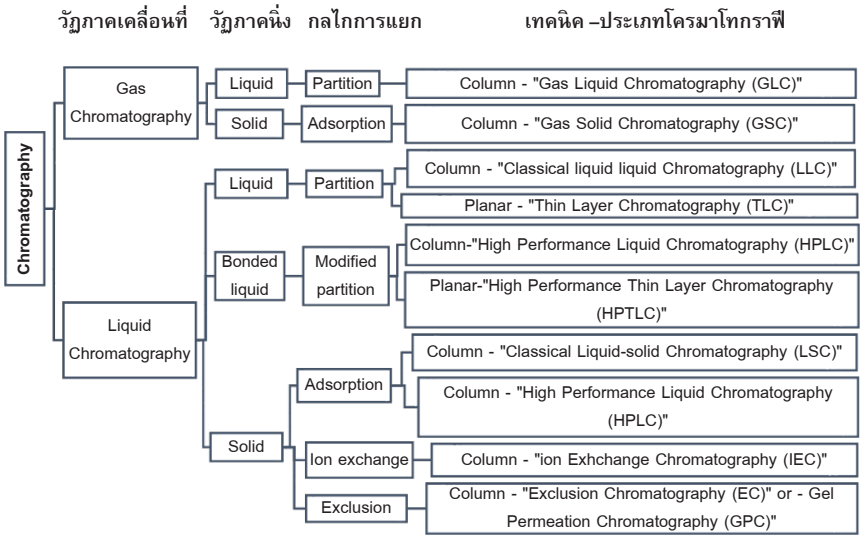
รูปที่ 5-2 กระบวนการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

5.2 ประเภทของโครมาโทกราฟี (2-5)

ประเภทของโครมาโทกราฟีสามารถแบ่งตามวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เป็น 2 ระบบใหญ่ๆ คือ โครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) และ โครมาโทกราฟีแก๊ส (gas chromatography) ซึ่งแต่ละชนิดยังสามารถแบ่งย่อยได้ตามวัฏภาคนิ่ง กลไกการแยกที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 5-3

5.2.1 โครมาโทกราฟีแก๊ส (gas chromatography, GC)

เป็นการแยกสารผสมโดยอาศัยแก๊สเฉื่อยเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่หรือแก๊สพา (carrier gas) เช่น ไนโตรเจน ฮีเลียม หลักการคือสารตัวอย่างถูกระเหยเป็นไอและถูกวัฏภาคเคลื่อนที่พาเข้าสู่คอลัมน์ ซึ่งคอลัมน์จะอยู่ในระบบปิดที่ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้สารอยู่ในรูปไอระเหยตลอดในคอลัมน์ หลักในการแยกเกิดจากความแตกต่างในความชอบของสารที่มีต่อวัฏภาคนิ่ง และการควบคุมอุณหภูมิในคอลัมน์ทำให้สามารถแยกสารต่างๆ ในตัวอย่างออกจากกันได้ในคอลัมน์ จากนั้นจึงเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจวัดต่อไป



รูปที่ 5-3 แผนภาพแสดงประเภทโครมาโทกราฟี (3)

เทคนิคโครมาโทกราฟีแก๊สแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามชนิดของวัฏภาคนิ่ง คือ โครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส-ของเหลว (gas-liquid chromatography, GLC) และ โครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส-ของแข็ง (gas-solid chromatography, GSC) มีรายละเอียดในหัวข้อต่อไป

5.2.2 โครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography, LC)

มีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวซึ่งของเหลวอาจเป็นสารที่มีขั้วสูงหรือต่ำขึ้นกับความมีขั้วของวัฏภาคนิ่ง โดยเทคนิคนี้มีหลักในการแยกสารผสมคือ สารตัวอย่างถูกละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วถูกวัฏภาคเคลื่อนที่พาเข้าสู่วัฏภาคนิ่งในคอลัมน์ หลักในการแยกก็เช่นเดียวกับโครมาโทกราฟีแก๊ส คือ อาศัยความแตกต่างในความชอบของสารที่มีต่อวัฏภาคนิ่งเมื่อสารถูกแยกในคอลัมน์ จะผ่านเข้าสู่อุปกรณ์ตรวจวัดต่อไป ปัจจุบันยาส่วนใหญ่วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวมากกว่าวิธีโครมาโทกราฟีแก๊ส เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบ่งออกได้ตามชนิดของวัฏภาคนิ่ง หลักในการแยกและลักษณะอุปกรณ์ที่ใช้แยก ได้ดังนี้

(1) โครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของแข็ง (liquid-solid chromatography; LSC)

(2) โครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid chromatography; LLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวนิยมใช้กันมาก เทคนิคนี้มีทั้งรูปแบบคอลัมน์และแบบแผ่น อุปกรณ์ที่ใช้ผลิตเป็นแผ่น เช่น กระดาษ แก้ว อะลูมิเนียม หรืออื่นๆ ส่วนอุปกรณ์ที่ใช้ผลิตเป็นคอลัมน์อาจทำจากแก้วหรือโลหะ ซึ่งมีหลายแบบและหลายขนาด ดังแสดงในรูปที่ 5-4

รูปที่ 5-4 ตัวอย่างคอลัมน์แก้ว (ซ้าย) และ คอลัมน์โลหะ (ขวา)

5.2.2.1 โครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของแข็ง (LSC)

มีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวและวัฏภาคนิ่งเป็นของแข็ง ประเภทของโครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของแข็ง แบ่งเป็นประเภทต่างๆ ตามหลักการแยกสาร ดังนี้

- *โครมาโทกราฟีชนิดดูดซับ (adsorption chromatography) (3,5)*

ใช้หลักการแยกสารโดยสารมีสมบัติจับกับตัวดูดซับ (adsorbent) ที่เป็นวัสดุในวัฏภาคนิ่ง และใช้สารละลายชะเอาสารออกจากตัวดูดซับ โดยการเปลี่ยนสภาพความมีขั้วของสารละลายก็จะชะสารออกมาจากวัฏภาคนิ่งได้ ตัวอย่างเช่น โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography) หรือเรียกย่อๆ ว่า “ทีแอลซี (TLC)” โครมาโทกราฟีชนิดกระดาษ (paper chromatography) และ

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) (4, 5)

- *โครมาโทกราฟีชนิดแยกขนาด (size exclusion chromatography; SEC) (3)*

วัสดุที่ใช้เป็นวัฏภาคนิ่งบรรจุในคอลัมน์มักเป็นเม็ดเจลซึ่งมีรูพรุน (pore size) และขนาดช่องรูพรุนนี้มีความจำเพาะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลซึ่งเป็นวัฏภาคนิ่งได้ ดังนั้นเทคนิคนี้สามารถใช้แยกสารผสมที่มีขนาดต่างกันออกจากกันได้ ตัวอย่างเทคนิคนี้ เช่น โครมาโทกราฟีชนิดกรองด้วยเจล (gel filtration chromatography; GFC) และ โครมาโทกราฟีชนิดซึมผ่านเจล (gel permeation chromatography, GPC)

- *โครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography, IEX) (3)*

เทคนิคนี้อาศัยหลักการที่สารมีประจุไฟฟ้าที่แตกต่างกัน คือ สารที่ต้องการวิเคราะห์มีประจุตรงข้ามกันกับประจุบนวัสดุของคอลัมน์ (เช่น เรซิน) ทำให้สารถูกจับไว้ เทคนิคโครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนไอออน แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation-exchange chromatography) โครมาโทกราฟีแลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion-exchange chromatography)

- *โครมาโทกราฟีชนิดแยกตามความชอบจำเพาะ (affinity chromatography, AFC) (6)*

ใช้หลักการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของความจำเพาะทางชีวภาพของสาร เช่น คอลัมน์ที่มีลิแกนด์ (ligand) ติดอยู่บนวัฏภาคนิ่งบนคอลัมน์และมีความจำเพาะกับสารที่ต้องการแยก เช่น เอนไซม์-ซับสเตรท แอนติเจน-แอนติบอดี

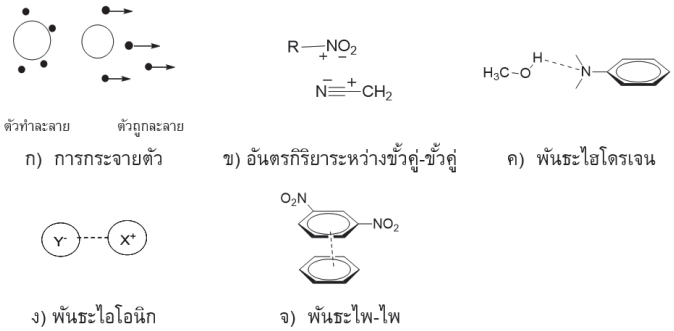
5.2.2.2 โครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของเหลว (LLC)

โครมาโทกราฟีชนิดนี้มีวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคนิ่งเป็นของเหลวซึ่งของเหลวที่เคลือบอยู่บนวัสดุของวัฏภาคนิ่ง อาจเป็นของเหลวที่ถูกเปลี่ยนแปลงพันธะ (bonded liquid) ทำให้สมบัติของวัฏภาคนิ่งเดิมเปลี่ยนไปช่วยแยกสารได้เหมาะสมกับสารตัวอย่างมากขึ้น จึงทำให้ใช้งานในประเภทต่างๆ ได้หลากหลายเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างที่ใช้เทคนิคนี้ เช่น ทีแอลซี, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และโครมาโทกราฟีทีแอลซีสมรรถนะสูง (HPTLC)

5.3 พันธะที่เกี่ยวข้องกับอันตรกิริยาระหว่างวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ (3)

การเกิดพันธะต่างๆ ส่งผลต่อระยะเวลาที่สารตัวอย่างจับกับวัฏภาคนิ่งได้นานหรือไม่ ชนิดของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลที่สำคัญ ได้แก่ (รูปที่ 5-5)

5.3.1 การกระจาย (dispersion) บางครั้งเรียก “แรงลอนดอน (London force)” เกิดจากอิเล็กตรอนของอะตอมข้างเคียง ทำให้เกิดการดึงดูดทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) การเกิดอันตรกิริยาชนิดนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเกิดอันตรกิริยาแบบไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction)



ก) การกระจายตัว ข) อันตรกิริยาระหว่างขั้วคู่-ขั้วคู่ ค) พันธะไฮโดรเจน

ง) พันธะไอโอนิก จ) พันธะไพ-ไพ

รูปที่ 5-5 รูปแบบการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของสารกับวัฏภาคนิ่ง แบบกระจายตัว (ก); แบบขั้วคู่-ขั้วคู่ (ข); แบบพันธะไฮโดรเจน (ค); แบบพันธะไอโอนิก (ง); แบบพันธะไพ-ไพ (จ) (3)

5.3.2 อันตรกิริยาระหว่างขั้วคู่-ขั้วคู่ (dipole-dipole interaction) ของสารตัวอย่างกับตัวทำละลาย เช่น สารกลุ่มไนโตรกับตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile)

5.3.3 พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ระหว่างสารที่ให้ไฮโดรเจนกับสารที่รับไฮโดรเจน

5.3.4 พันธะไอโอนิก (ionic bonding) ระหว่างสารตัวอย่างที่มีประจุกับตัวทำละลายที่มีประจุ

5.3.5 พันธะไพ-ไพ (π-π bonding) หรือการถ่ายโอนประจุ (charge transfer) ระหว่างสารตัวอย่างที่มีอิเล็กตรอนน้อย (electron-poor solute) กับตัวทำละลายที่มีอิเล็กตรอนมาก (electron-rich solvent) เช่น เบนซีน ทำให้เกิดพันธะไพระหว่างกัน

5.4 สัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (K_D) (2)

โดยทั่วไปการสกัดสารโดยใช้ของเหลวสกัดในห้องปฏิบัติการนิยมใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยมีข้อกำหนดว่าตัวทำละลายทั้งสองนี้ต้องไม่ละลายเข้ากันและไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างกัน นอกจากนี้สารต้องไม่เกิดปฏิกิริยาต่อตัวทำละลายทั้งสอง ไม่เกิดการจับรวมตัวกันหรือแตกตัวในตัวทำละลายทั้งสอง เช่น ตัวทำละลายประเภทอินทรีย์ (ออกทานอล, คาร์บอนเททระคลอไรด์) และตัวทำละลายประเภทน้ำ

สารที่สกัดจะกระจายอยู่ในชั้นของเหลวชนิดใดมากกว่ากันขึ้นกับลักษณะและสมบัติของสารต่อการละลายในแต่ละชั้นของตัวทำละลาย โดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์การแพร่กระจาย (distribution coefficient; partition coefficient, K_D)

$$K_D = [A]_o / [A]_{aq} \qquad \text{สมการที่ 5-1}$$

$[A]_o$ คือ ความเข้มข้นของสารที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ออกทานอล (octanol)

$[A]_{aq}$ คือ ความเข้มข้นของสารที่ละลายในตัวทำละลายประเภทน้ำ

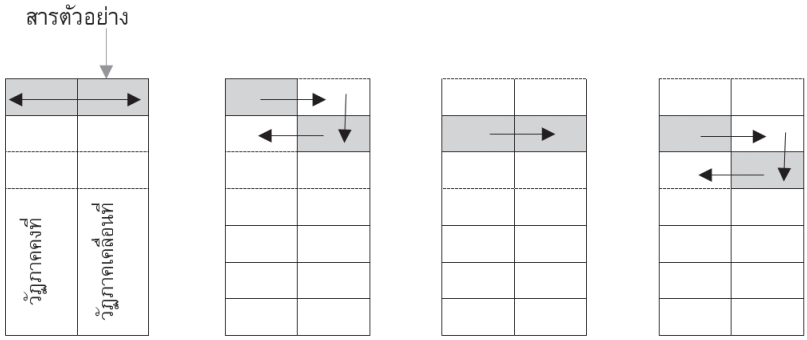
ค่าสัมประสิทธิ์นี้แสดงสัดส่วนของความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์และความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ ค่าสัมประสิทธิ์เป็นค่าคงที่ ณ อุณหภูมิและความดันที่คงที่หนึ่งๆ ค่า K_D สูง หมายถึงสารหรือตัวยาชอบละลายในตัวทำละลายอินทรีย์มากกว่าในน้ำ ซึ่งจากหลักการนี้ หากนำมาใช้เทียบกับโครมาโทกราฟี ค่า K_D ก็จะหมายถึงการกระจายของสารที่ต้องการแยกระหว่างวัฏภาคนิ่งและวัฏภาคเคลื่อนที่ ความแตกต่างนี้ส่งผลให้สามารถแยกสารผสมออกจากกัน สารจะกระจายไปอยู่ที่วัฏภาคใดโดยดูจากการกระจายของสารเข้าไปอยู่ในวัฏภาคนิ่งและในวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังสมการ

$$K = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในวัฏภาคนิ่ง}}{\text{ความเข้มข้นของสารในวัฏภาคเคลื่อนที่}} \qquad \text{สมการที่ 5-2}$$

ดังนั้นถ้าค่า K สูง หมายถึง สารชอบกระจายตัวในวัฏภาคนิ่งมากกว่าในวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งทำให้สารที่จะแยกใช้เวลานานในการแยกออกมาจากวัฏภาคนิ่งในคอลัมน์นั่นเอง

5.5 ความคงอยู่ของสารในโครมาโทกราฟี (Retention) (3)

การที่สารอยู่ในวัฏภาคนิ่งโดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ไปในคอลัมน์นั้น เมื่อสารสัมผัสกับผิวของวัฏภาคนิ่งจะเกิดการกระจายตัวของสารบนผิวขึ้นกับค่าการกระจายตัวของสารต่อผิววัฏภาคนิ่งว่าชอบกระจายตัวมากน้อยเพียงใด ซึ่งคล้ายกับการจำลองการกระจายตัวของสารในกรวยแยก (separation funnel) กรวยที่หนึ่ง แต่มีความแตกต่างกับหลักการในกรวยแยก คือ การแยกในคอลัมน์ไม่ได้เกิดภาวะสมดุลจนนิ่งก่อนค่อยแยก แต่จะกระจายไปวัฏภาคนิ่งถัดๆ ไปเพื่อแยกแบบต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ตามทิศทางการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ ดังรูปที่ 5-6



รูปที่ 5-6 การกระจายตัวของสารในวัฏภาคนิ่งและถูกพาไปด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่

สารตัวอย่างถูกพาไปด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ และกระจายตัวเข้าไปในวัฏภาคนิ่งเรียกว่าเกิด “กระบวนการดูดซับ (sorption)” และเมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่าน ความเข้มข้นของสารในวัฏภาคเคลื่อนที่ลดลงสารตัวอย่างในวัฏภาคนิ่งจะเคลื่อนออกมาจากวัฏภาคนิ่งไปสู่วัฏภาคเคลื่อนที่อีกครั้งเพื่อรักษาค่าคงที่ของการกระจายตัว (K_D) กระบวนการที่สารกลับคืนออกมาอีกครั้งเรียกว่า “กระบวนการคาย (desorption)” สารที่ซับไว้จะปล่อยออกมา ดังนั้นจากหลักการนี้สารแต่ละตัวในของผสมมีสมบัติในการกระจายเข้าวัฏภาคนิ่งต่างกัน ทำให้แยกสารแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์ได้ กล่าวสรุปคือ กลไกการแยกสารในวัฏภาคนิ่งนี้ใช้หลักกลไกการซับ และระยะเวลาที่สารตัวหนึ่งอยู่ในคอลัมน์ตั้งแต่เวลาที่สารเข้าไปในคอลัมน์จนถูกชะออกจากคอลัมน์ เรียกว่า “retention time (t)”

ปัจจัยที่มีผลต่อการคงอยู่ของสารในวัฏภาคนิ่ง ได้แก่

1. พันธะการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลกับวัฏภาคนิ่ง ขึ้นกับลักษณะของวัฏภาคนิ่งกับสารโมเลกุลที่แยก หากมีโอกาสเกิดพันธะมากสารจะคงอยู่ในวัฏภาคนิ่งนานมากขึ้น

2. ชนิดของวัฏภาคนิ่ง ความมีขั้ว หรือขนาดอนุภาคภายใน เช่น สารมีลักษณะมีขั้ว เช่นเดียวกับวัฏภาคนิ่งจะจับกันแน่นในวัฏภาคนิ่งนาน

3. อุณหภูมิ เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อเอนทัลปี (enthalpy) ของสารละลายซึ่งมีผลที่สำคัญเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงระหว่างของเหลวกับแก๊ส โดยทั่วๆ ไปการเพิ่มความร้อนมีผลทำให้สารอยู่ในคอลัมน์ไม่นาน สารจะออกมาจากวัฏภาคนิ่งหรือคอลัมน์ได้เร็วขึ้น

4. อัตราเร็วของวัฏภาคเคลื่อนที่ ส่งผลให้สารเคลื่อนตัวออกมาจากวัฏภาคได้เร็วขึ้น แต่ต้องคำนึงถึงอัตราเร็วที่มากเกินไปอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการแยกสารผสมลดลงเพราะสารยังแยกกันไม่สมบูรณ์บนวัฏภาคนิ่ง แต่เพิ่มความเร็วจึงทำให้สารออกมาเร็วขึ้น เป็นต้น

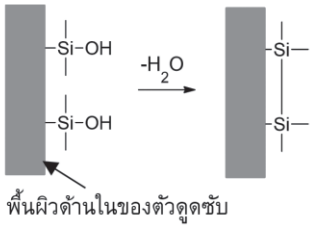
5.6 กลไกการดูดซับ (3-7)

กลไกการดูดซับ (sorption mechanism) ที่เกี่ยวกับการแยกสารต่างๆ เช่น แยกสารไม่มีขั้ว สารมีขั้ว สารที่แตกตัวเป็นไอออน สารพอลิเมอร์ หรืออื่นๆ อาจจำแนกชนิดกลไกได้ดังนี้

5.6.1 กลไกชนิดดูดซับ (adsorption)

หลักการของกลไกการดูดซับคือ สารและตัวทำละลายแข่งกันจับตัวดูดซับของแข็งที่เป็นวัสดุของวัฏภาคนิ่ง โดยตัวดูดซับที่นิยมใช้ คือ ซิลิกา และ อะลูมินา (alumina) กรณีตัวดูดซับเป็นซิลิกา พื้นผิวของซิลิกาเป็นหมู่ไฮดรอกซิลมีความเป็นขั้วสูง หากสารที่ต้องการแยกในคอลัมน์ซิลิกาเป็นสารไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยจะไม่ชอบจับกับผิวของวัฏภาคนิ่งและอยู่ที่ผิวของตัวดูดซับได้ไม่นาน (unretain) ส่วนโมเลกุลที่มีขั้วเกิดพันธะไฮโดรเจนได้จะยึดจับกับตัวดูดซับได้ดีและอยู่ติดนาน ความแรงของการชะ (elution strength, eluting power) เป็นค่าที่ใช้วัดความสามารถของตัวทำละลายที่ดึงสารวิเคราะห์ออกจากตัวดูดซับ ถ้าค่าสูงหมายถึงสามารถดึงออกมาได้ดี ซึ่งลำดับของค่านี้จะขึ้นกับชนิดของตัวดูดซับและสารที่แยก

โดยทั่วไปลำดับการชะสารออกจากตัวดูดซับที่มีขั้วจะขึ้นกับความมีขั้วของสารที่แยก หากสารมีขั้วน้อยจะออกมาก่อน ลำดับสารที่มีขั้วน้อยเรียงไปหาขั้วมาก เช่น $-CH=CH- < -OCH_3 < -CO_2R < -C=O < -CHO < -SH < -NH_2 < -OH < -CO_2H$ โดยพันธะหลักที่เกี่ยวข้องในการจับกันระหว่างโมเลกุล คือ แรงลอนดอน (London force) กลไกการแยกนี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อแยกสารที่เป็นไอโซเมอร์เรขาคณิต (geometric isomer) ได้ เช่น 1,2-, 1,3- และ 1,4 -dibromobenzene อย่างไรก็ตามเนื่องจากพื้นผิวของอนุภาคซิลิกาประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของหมู่ไซลานอล (silanol, -Si-OH) เมื่อปล่อยให้ซิลิกาแห้ง หมู่ไซลานอล 2 หมู่ มีโอกาสเกิดการรวมกันและเกิดเป็นพันธะดังรูปที่ 5-7 ซึ่งทำให้ความสามารถของตัวดูดซับเปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อประสิทธิภาพการแยก



รูปที่ 5-7 การรวมของหมู่ไซลานอลหลังจากสูญเสียน้ำ

กลไกนี้ที่พบมากในโครมาโทกราฟีชนิดของเหลว-ของแข็ง (LSC) ซึ่งเป็นวิธีที่เก่าแก่ที่สุด ตัวอย่างวิธีที่ใช้กลไกการแยกนี้ เช่น ทีแอลซี ใช้แยกสีในพืช วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง HPLC ที่ใช้คอลัมน์แบบดั้งเดิมนั้นใช้หลักการดูดซับ แต่ปัจจุบันคอลัมน์แบบดัดแปลงวัฏภาคนิ่งเป็นที่นิยมซึ่งใช้หลักการพาร์ทิชันแทนซึ่งจะกล่าวถึงรายละเอียดในตอนถัดไป

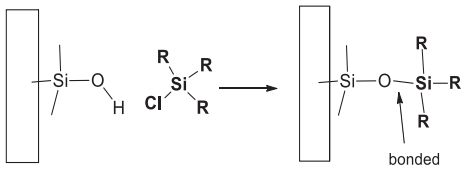
5.6.2 กลไกชนิดแบ่งส่วน (partition)

ตัวค้ำจุนบนวัฏภาคนิ่งที่เป็นของแข็งถูกเคลือบด้วยของเหลว เช่น เทคนิคโครมาโทกราฟีแก๊ส ชนิดแก๊ส-ของเหลว (GLC) ทีแอลซี หลักการแยกอาศัยความสามารถในการกระจายตัวของสาร (แก๊ส หรือของเหลว) ในของเหลว คือ สารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านของเหลวที่เคลือบอยู่บนตัวค้ำจุนซึ่งตัวค้ำจุนเป็นวัสดุที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นมักเป็นวัสดุที่ประกอบด้วยซิลิกา (silica, SiO_2) หากสารที่ต้องการแยกมีสมบัติชอบของเหลวบนวัสดุก็จะติดอยู่บนตัวค้ำจุนนาน แต่สารที่ไม่ชอบก็จะถูกชะออกไปจากตัวค้ำจุนเร็ว ในสมัยก่อนการใช้หลักการนี้กับเทคนิค HPLC ค่อนข้างทำได้ยากเนื่องจากมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลวซึ่งสามารถชะหรือละลายของเหลวที่อยู่บนตัวค้ำจุนทำให้เสียสภาพของวัฏภาคนิ่งได้ แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาสมบัติของวัฏภาคภายในให้เป็นของเหลวที่ไม่ละลายไปกับตัวทำละลายได้ง่ายทำให้ HPLC ใช้หลักกลไกนี้เพิ่มมากขึ้น พันธะที่เกี่ยวข้องกับกลไกนี้เป็นตัวกำหนดการละลายของสาร เช่น การกระจายตัว แรงขั้วคู่-ขั้วคู่ แรงขั้วคู่-ขั้วคู่เหนี่ยวนำ (dipole / induced dipole) และพันธะไฮโดรเจน

สารที่เป็นของเหลวเคลือบบนตัวค้ำจุนของวัฏภาคนิ่งสามารถเป็นของเหลวชนิดต่าง ๆ มากมาย แต่ต้องเป็นสารที่ไม่ระเหยในคอลัมน์ ณ อุณหภูมิที่ทำการทดลอง โดยทั่วไปจะแสดงการกระจายตัวของสารในวัฏภาคใดได้มากน้อยจะแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์แบ่งส่วน (partition coefficient, K_D) ดังสมการที่ 5-2

5.6.3 กลไกชนิดวัฏภาคเกิดพันธะ (bonded phase)

เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงวัฏภาคนิ่งให้เป็นวัฏภาคที่เกิดพันธะ เรียกว่า "bonded phase" วิธีนี้เกิดจากการพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาข้อจำกัดของการใช้ของเหลวเป็นวัฏภาคนิ่ง ซึ่งการดัดแปลงพันธะนี้ช่วยถนอมวัฏภาคนิ่งให้มีอายุการใช้งานยาวนานขึ้น ลดการละลายและหลุดลอกออกของวัฏภาคนิ่ง และยังช่วยเพิ่มความคงทนต่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นอีกด้วย การเตรียมวัฏภาคพันธะเตรียมโดยนำผิวซิลิกาที่มีหมู่ไซลานอล (silanol) มาทำปฏิกิริยากับคลอโรไซเลน (chlorosilane) เกิดพันธะที่เปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลไป (รูปที่ 5-8) การดัดแปลงหมู่ R ที่แตกต่างกันส่งผลให้ลักษณะของวัฏภาคเปลี่ยนแปลงย่อมส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขั้วของวัฏภาค โดยมาก R มักเป็น หมู่เมทิล หรือสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon chain) เป็นสาย C6, C8, C18 เป็นต้น



รูปที่ 5-8 การเตรียมดัดแปลงผิวซิลิกาของวัฏภาคนิ่งเพื่อทำเป็นวัฏภาคเกิดพันธะ

5.6.4 กลไกชนิดการแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange)

เทคนิคนี้อาศัยหลักการที่สารมีประจุที่แตกต่างกัน คือ สารที่ต้องการวิเคราะห์มีประจุตรงข้ามกันกับประจุบนวัสดุของคอลัมน์ ทำให้สารถูกจับไว้ เช่น สารวิเคราะห์มีประจุบวกจะจับกับวัฏภาคนิ่งที่มีประจุลบโดยการจับและปล่อยเป็นแบบผันกลับได้ จากนั้นสารที่ติดกับวัฏภาคนิ่งนี้จะถูกชะออกมาเมื่อมีการปรับพีเอชของวัฏภาคเคลื่อนที่หรือถูกแทนที่ด้วยตัวทำละลายที่มีความแรงไอออนมากกว่า (ionic strength)

5.6.5 กลไกชนิดคู่ไอออน (ion-pairing)

กลไกนี้ใช้หลักการแยกสารที่เป็นไอออนหรือสารที่แตกตัวเป็นไอออน มีข้อดีกว่าเทคนิคที่ใช้กลไกการแยกแบบแลกเปลี่ยนไอออนตรงที่สามารถใช้วัฏภาคนิ่งหรือคอลัมน์ที่มีใช้กันทั่วไป วิธีนี้ใช้กับสารตัวอย่างที่มีลักษณะชอบไขมันน้อยหรือมีประจุนั่นเอง ซึ่งเมื่อผ่านวัฏภาคนิ่งที่มีขั้วน้อยจำพวกไฮโดรคาร์บอน สารตัวอย่างไม่ชอบอยู่ในคอลัมน์จึงถูกชะออกอย่างรวดเร็ว เทคนิค

นี้เติมสารที่เป็นไอออนคู่ของสารตัวอย่างเพื่อไปลดความเป็นขั้วของสาร ทำให้สารไม่ถูกชะเร็วเกินไปจึงถูกแยกได้ดีขึ้นดังสมการที่ 5-3

$$A^+ + B^- \longrightarrow AB \qquad \text{สมการที่ 5-3}$$

(A^+ คือ ตัวอย่างสารที่มีประจุบวก B^- คือ สารคู่ไอออน AB สารที่เมื่อจับกันมีค่าความเป็นกลาง)

5.6.6 กลไกชนิดแยกตามความชอบจำเพาะ (affinity)

อาศัยความสัมพันธ์ของความดึงดูดในการจับกันมักพบในสารจำพวกชีวโมเลกุล เช่น การเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับลิแกนด์ (ligand) ที่เหมาะสมที่อยู่บนวัฏภาคนิ่ง ลิแกนด์นี้จะมีความจำเพาะกับโปรตีนและจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ วัฏภาคนิ่งมักเป็นสารจำพวกเจล

5.6.7 กลไกชนิดแยกตามขนาด (size exclusion)

เป็นกลไกที่แตกต่างจากกลไกอื่นๆ คือ แยกตามขนาดของโมเลกุลที่จะแยกในวัฏภาคนิ่งเป็นหลัก โดยโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดของตัวเจลในวัฏภาคนิ่ง สารจะหลุดรอดไม่ผ่านเจลจึงถูกชะออกมาก่อน

5.7 การตรวจวัดติดตาม (monitoring detection)

วิธีการตรวจวัดสารที่แยกออกจากกันด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถใช้วิธีต่างๆ ดังนี้

- *วิธีทางกายภาพ* โดยอาศัยดูด้วยตาเปล่า มักใช้ในกรณีที่สารมีสีและผ่านโครมาโทกราฟีเกิดการแยกสีผสมออกจากกันและมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

- *วิธีทางเคมี* โดยใช้สารเคมีสเปรย์ หรือใช้ไอของสารระเหิดเพื่อดูสีที่เกิดจากปฏิกิริยากับสารที่แยกบนแผ่นทีแอลซีหรือกระดาษ

- *วิธีทางสเปกโทรสโกปี* เป็นวิธีที่ใช้อุปกรณ์ตรวจวัด เช่น อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปี สำหรับการตรวจติดตามดูทีแอลซีนิยมใช้แหล่งกำเนิดแสงที่ความยาวคลื่นสั้น (254 นาโนเมตร) และที่ความยาวคลื่นยาว (365 นาโนเมตร) นอกจากนี้กรณีโครมาโทกราฟีที่ใช้แรงดันต่างๆ นิยมนำมาเชื่อมต่อกับอุปกรณ์ตรวจวัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารได้โดยตรง อุปกรณ์ตรวจวัดเหล่านั้น เช่น อัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล ฟลูออเรสเซนซ์ และอื่นๆ ซึ่งใช้เพื่อช่วยดูหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างสารได้ เป็นต้น

- *วิธีตรวจวัดอื่นๆ* ได้แก่ การตรวจค่าดัชนีการหักเหแสง (refractive index) การตรวจวัดการนำไฟฟ้า (conductivity) การกระเจิงของแสง (light scatter) เป็นต้น