บทที่ 7

เปเปอร์โครมาโตกราฟี

(Paper Chromatography)

<u>วัตถุประสงค์</u> เพื่อให้นักศึกษามีความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับ

1. เปเปอร์โครมาโตกราฟี
2. เทคนิคการแยกและวิเคราะห์เชิงคุณภาพสารตัวอย่าง โดยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี

สารเคมี

1. สารละลายสีผสมอาหารสีเหลือง
2. สารละลายสีผสมอาหารสีเขียว
3. สารละลายสีผสมอาหารสีน้ำเงิน
4. ไอโซโปรปิลแอลกอฮอล์ (C_3H_7OH)

อุปกรณ์

1. กระดาษกรองวอตแมน (Whatman) เบอร์ 1 ขนาด 14x14 เซนติเมตร
2. หลอดแคปพิลลารี
3. บีกเกอร์
4. ไม้บรรทัด
5. ดินสอ
6. กระจกนาฬิกา
7. กระดาษกาวหรือ staple

ทฤษฎี

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคในการแยกของผสมออกจากกัน และพิสูจน์เอกลักษณ์สาร โดยอาศัยหลักการกระจายของสารแต่ละชนิดในสารผสมที่มีค่าแตกต่างกันระหว่างเฟส 2 เฟส คือเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลว กับเฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งอาจเป็นของเหลวหรือแก๊ส โดยเมื่อผ่านเฟสที่เคลื่อนที่ให้เป็นตัวพาสารผสมซึ่งอยู่ที่เฟสอยู่กับที่ สารใดในของผสมถ้ากระจายได้มากกว่าก็จะถูกแยกออกจากสารผสมได้ดี โครมาโตกราฟีสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดกลไกการกระจายที่เกิดขึ้น คือโครมาโตกราฟีที่ใช้หลักการแบบดูดซับ (adsorption chromatography) และ โครมาโตกราฟีที่ใช้หลักการกระจายตัว (partition chromatography)

โครมาโตกราฟีที่ใช้หลักการแบบดูดซับ

เฟสที่อยู่กับที่จะเป็นของแข็งเช่น อะลูมินา ซิลิกาเจล ส่วนเฟสที่เคลื่อนที่อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ (column chromatography) หลักการแยกสารผสมจะขึ้นอยู่กับสมดุลของสารในเฟสทั้งสอง ซึ่งขึ้นอยู่กับความมีขั้วของสารและของเหลว โดยทั่วไปแล้วสารที่มีหมู่ฟังก์ชันนัลที่มีขั้วจะถูกดูดซับที่ผิวของเฟสที่อยู่กับที่ ทำให้ถูกแยกออกมาได้ยากเมื่อผ่านเฟสที่เคลื่อนที่เข้าไปในเฟสที่อยู่กับที่

โครมาโตกราฟีที่ใช้หลักการกระจายตัว

เฟสที่อยู่กับที่จะเป็นของเหลว ส่วนเฟสที่เคลื่อนที่จะเป็นแก๊สหรือของเหลว ตัวอย่างโครมาโตกราฟีชนิดนี้ได้แก่ gas-liquid chromatography , paper chromatography

โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

เป็นเทคนิคการแยกของผสมออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ ของสารในของผสมบนผิวกระดาษระหว่างตัวทำละลาย ซึ่งเป็นเฟสที่เคลื่อนที่และเฟสที่อยู่กับที่ คือน้ำซึ่งซึมอยู่ระหว่างช่องว่างของโมเลกุลของน้ำในเยื่อกระดาษได้แตกต่างกัน สารใดในสารผสมสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ก็จะถูกจับไว้จึงทำให้เคลื่อนที่บนผิวกระดาษได้ช้าเมื่อจุ่มในตัวทำละลายอินทรีย์ สารใดละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้มากกว่าน้ำก็จะเคลื่อนที่บนผิวกระดาษได้เร็วกว่า จากหลักการนี้ทำให้สามารถแยกสารผสมออกจากกันและพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้โดยเฉพาะสารที่มีปริมาณน้อยและมีสี กรณีเป็นสารละลายไม่มีสี จะต้องใช้สารเคมีที่อยู่ในรูปสารละลายสเปรย์ลงบนกระดาษกรองที่แห้ง บนตำแหน่งที่มีจุดของสารเพื่อให้เกิดสีขึ้น ทำให้ทราบตำแหน่งในการเคลื่อนที่ของสาร

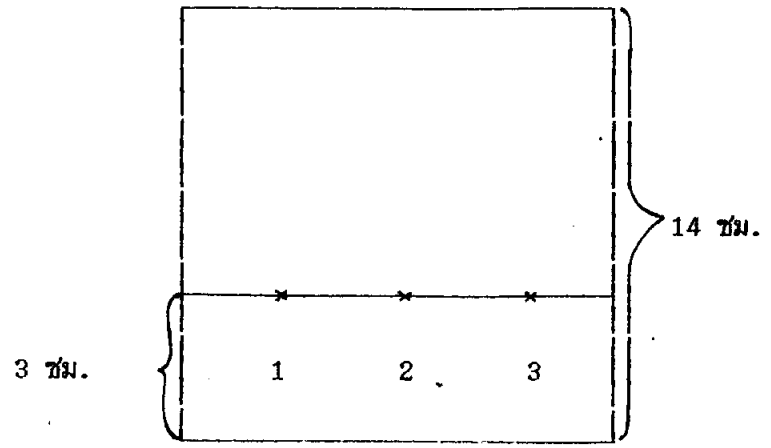
ในการทดลองโครมาโตกราฟีแบบกระดาษจะทำโดย spot. สารลงบนกระดาษกรองให้มีระยะห่างกัน และจุ่มกระดาษกรองในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งนิยมให้เคลื่อนที่จากด้านล่างขึ้นด้านบน เมื่อการทดลองเสร็จแล้วคำนวณหาค่า Rf จากอัตราส่วนของระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร โดยตัวทำละลายผ่านเฟสที่อยู่กับที่ เป็นค่าคงที่เฉพาะตัวสารชนิดหนึ่ง จึงสามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยการเปรียบเทียบค่า Rf ของสารภายใต้เงื่อนไขเดียวกัน

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปได้}}$$

ในการทดลองนี้จะทดลองแยกสารที่ผสมอยู่ด้วยกันในสีผสมอาหาร และคำนวณหาค่า Rf ที่ได้จากการทดลองโดยเปเปอร์โครมาโตกราฟี

วิธีทดลอง

1. ตัดกระดาษกรองวอตแมน (Whatman) เบอร์ 1 ให้ได้ขนาด 14x14 เซนติเมตร ใช้ดินสอดำลากเส้นตรงให้สูงจากขอบกระดาษ 3 เซนติเมตร แบ่งตำแหน่งที่จะ spot สารที่ระยะห่างจากกรอบกระดาษบนเส้นตรงที่ลากไว้แล้ว ในระยะ 3 , 7 และ 11 เซนติเมตร ตามลำดับ และเขียนหมายเลข 1 , 2 , 3 ระบุไว้ในทั้งสามตำแหน่งดังรูป



2. spot สารละลายตัวอย่างโดยใช้หลอดแคปพิลลารี โดยจุดที่ 1 เป็นสารละลายสีผสมอาหารสีเหลือง จุดที่สองสีเขียว และจุดที่สามสีน้ำเงินในตำแหน่งจุดที่ระบุไว้ในข้อ 1

3. ในแต่ละครั้งที่ spot สารต้องรอให้จุดที่ spot แห้งก่อน แล้วจึง spot ซ้ำอีก 2 ครั้ง ซึ่งปกติแล้วจุดที่ spot ไม่ควรจะให้กว้างเกิน 2 มิลลิเมตร

4. เมื่อจุดที่ spot แห้งแล้ว มัวนกระดาษกรองให้โค้งเป็นรูปทรงกระบอกโดยติดด้านข้างเข้าด้วยกันด้วยกระดาษกาว หรือ stapler และให้เว้นช่องว่างไว้เล็กน้อยด้วย

5. จุ่มกระดาษกรองลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. ซึ่งบรรจุ 50 มล. ของไอโซโปรปิลแอลกอฮอล์ผสมกับน้ำ (อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร) ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา

6. ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไป จนเหลือเนื้อที่จากขอบบนของกระดาษกรองประมาณ 3 เซนติเมตร (ใช้เวลาประมาณครึ่งชั่วโมง)

7. ยกกระดาษกรองออกจากบีกเกอร์และใช้ดินสอขีดแนวของตัวทำละลาย (solvent front) ทันที คลี่กระดาษกรองออกและวางทิ้งไว้ให้แห้ง

8. บันทึกสีและระยะทางที่เคลื่อนที่จากแนวเส้นเริ่มต้น โดยวัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกึ่งกลางสารทุกจุด และวัดระยะจากจุดเริ่มต้นถึงตำแหน่งที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปได้

9. คำนวณหาค่า Rf

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการเคมีเรื่อง.....วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อผู้ทำการทดลอง.....รหัส.....เลขที่....

ชื่อผู้ร่วมทำการทดลอง.....รหัส.....เลขที่....

ชื่อผู้ร่วมทำการทดลอง.....รหัส.....เลขที่....

กลุ่มปฏิบัติการ.....section.....ตู้เลขที่.....ห้องที่ทดลอง.....

อาจารย์ผู้ควบคุม 1.....

2.....

3.....

ผลการทดลอง

ผลของโครมาโตแกรมที่ทดลองได้ (ให้นักศึกษาลอกผลที่ได้)

ผลการทดลองของโครมาโตแกรม

ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่.....ซม.

ระยะทางที่สีผสมอาหารสีเหลืองเคลื่อนที่.....ซม.

ค่า Rf ของสีผสมอาหารสีเหลือง.....

ระยะทางที่สีผสมอาหารสีน้ำเงินเคลื่อนที่.....ซม.

ค่า Rf ของสีผสมอาหารสีน้ำเงิน.....

ระยะทางที่สีผสมอาหารสีเขียวเคลื่อนที่.....ซม.

ค่า Rf ของสีผสมอาหารสีเขียว.....

แสดงการคำนวณหาค่า Rf ของสีผสมอาหารแต่ละชนิด

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

คำถาม

1. เหตุใดจึงต้องใช้ดินสอขีดเครื่องหมายบนกระดาษกรองและไม่ใช้ปากกา

.....

.....

.....

.....

.....

2. ในการทดลองเพื่อแยกสารในสีผสมอาหารโดยวิธี เปเปอร์โครมาโตกราฟีนั้น เฟสที่อยู่กับที่และเฟสที่เคลื่อนที่นั้นคืออะไร อธิบาย

.....

.....

.....

.....

.....

3. ประโยชน์ของเปเปอร์โครมาโตกราฟี พร้อมยกตัวอย่าง

.....

.....

.....

.....

.....

4. หลักการเปเปอร์โครมาโตกราฟี ต่างจากคอลัมน์โครมาโตกราฟี หรือไม่

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. สารตัวอย่าง 2 ชนิด ซึ่งมีค่า Rf เท่ากันจะถือเป็นโมเลกุลของสารชนิดเดียวกันได้หรือไม่

.....

.....

.....

.....

.....

6. ในการ spot สารบนกระดาษกรอง เหตุใดจึงต้องเว้นระยะให้ห่างกันพอสมควร (อย่างน้อยประมาณ 1.5 ซม.)

.....

.....

.....

.....

.....