บทที่ 10
โครมาโทกราฟี

10.1 ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

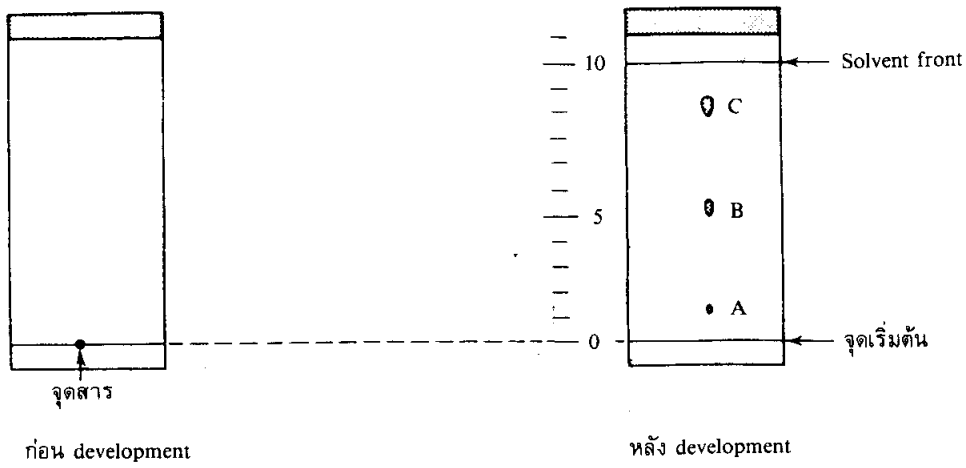
10.1.1 บทนำ

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการแยกสาร อาจเป็นแบบ Preparative Thin Layer Chromatography ซึ่งหมายถึงการแยกสารผสมที่มีปริมาณน้อย ๆ หรือแบบ Analytical Thin Layer Chromatography หมายถึงการตรวจสอบจำนวนสารประกอบที่มีอยู่ในสารผสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร ตรวจสอบปฏิกิริยาที่กำลังดำเนินอยู่ว่าสมบูรณ์หรือไม่ และใช้หาตัวดูดซับและตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารนั้นโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี เพราะ TLC เป็นวิธีที่ง่าย และใช้เวลาไม่มากนัก

วิธีการทำงานของ TLC สารที่ต้องการแยกจะถูกจุดลงบนแผ่น TLC ที่ปลายด้านหนึ่งเป็นจุดเล็ก ๆ นำแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นนี้ไปจุ่มในภาชนะที่มีตัวทำละลายบรรจุอยู่ โดยเอาปลายด้านที่มีสารจุดอยู่จุ่มลงไป ตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่จะเคลื่อนพาสารบนตัวดูดซับขึ้นไปตามแผ่น TLC โดยการซึมตามรูเล็ก (capillary action) ในขณะเดียวกันตัวดูดซับจะพยายามดึงหรือยึดเอาสารนั้นไว้ จึงทำให้สารเคลื่อนที่ไปได้ช้ากว่าตัวทำละลาย อัตราส่วนของระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่สารนั้นเคลื่อนที่ต่อระยะทางสูงสุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ (solvent front) จะมีค่าคงที่ เรียกว่าค่า R_f ซึ่งย่อมาจาก Retention Factor ค่า R_f เป็นค่าเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ดังนั้นสารต่างชนิดกันจะมีค่า R_f ต่างกัน อย่างไรก็ตามสารที่มีค่า R_f เท่ากันไม่จำเป็นต้องเป็นสารชนิดเดียวกัน โดยปกติค่า R_f จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของตัวดูดซับ ชนิดของตัวทำละลาย และความหนาของตัวดูดซับที่เคลือบบนแผ่นกระจก

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$

ตัวอย่างการคำนวณค่า R_f ดังแสดงในรูปที่ 10.1



$$R_f\,(\text{สาร A}) = \frac{1.4}{10.0} = 0.14$$

$$R_f\,(\text{สาร B}) = \frac{5.5}{10.0} = 0.55$$

$$R_f\,(\text{สาร C}) = \frac{8.6}{10.0} = 0.86$$

รูปที่ 10.1 การคำนวณค่า R_f ในทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ขั้นตอนการทำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีมีดังนี้

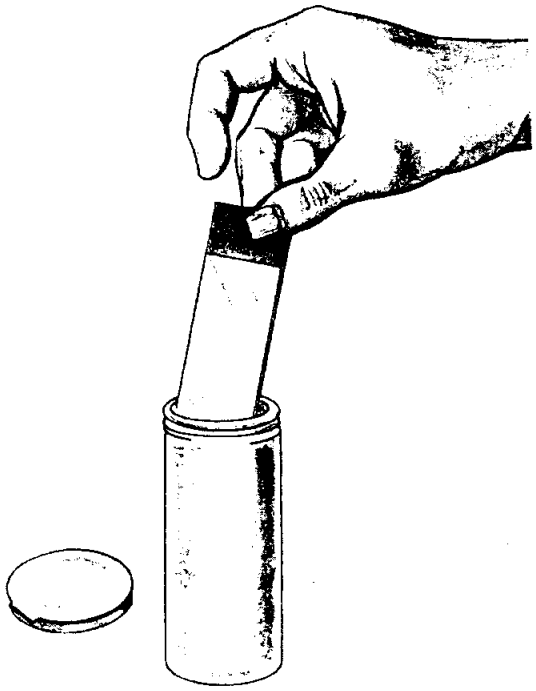
1. การเตรียมแผ่น TLC
2. การจุดสารที่ต้องการแยกลงบนแผ่น TLC
3. development ของแผ่น TLC ในตัวทำละลาย
4. visualization
5. การคำนวณค่า R_f

ขั้นที่ 1 การเตรียมแผ่น TLC

ตัวดูดซับที่นิยมใช้กันมากใน TLC คือ ซิลิกาเจลและอะลูมินาที่มีขนาดของอนุภาคเล็กกว่าที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี และมักจะผสมอยู่กับตัวยึดเช่น แคลเซียมซัลเฟตที่มีน้ำผลึก ($CaSO_4 \cdot 0.5H_2O$ ที่เรียกกันว่า Plaster of Paris) หรือ แป้ง

วิธีเตรียมแผ่น TLC ในห้องปฏิบัติการมี 2 วิธี

ก. วิธีจุ่ม (dipping procedure) ทำโดยการจุ่มแผ่นกระจกหรือแผ่นสไลด์เล็ก ๆ ลงใน slurry ของตัวดูดซับ (ดูรูปที่ 10.2) วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถเตรียมได้เร็ว slurry ที่ใช้สามารถเตรียมโดยใช้อัตราส่วนซิลิกาเจล 1 กรัมต่อคลอโรฟอร์ม 3 มล. แล้วบรรจุในภาชนะซึ่งเป็นขวดปากกว้างที่มีฝาปิดเป็นเกลียว โดยระดับของ slurry ในภาชนะควรสูงประมาณ 3 นิ้ว

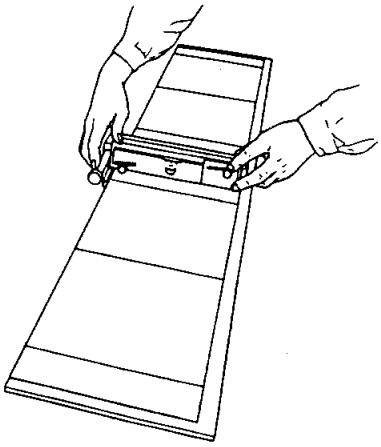


รูปที่ 10.2 การจุ่มแผ่นสไลด์ลงใน slurry

ก่อนจุ่มแผ่นสไลด์ ต้องเขย่าหรือกวนให้ slurry เข้ากันดีเสียก่อน ประกบแผ่นสไลด์ที่แห้งและปราศจากฝุ่นละอองเข้าด้วยกัน แล้วจุ่มลงไปใน slurry ในลักษณะตั้งฉาก โดยให้เหลือที่ว่างบริเวณที่นิ้วมือจับประมาณ $\frac{1}{4}$ นิ้ว ดึงแผ่นสไลด์ขึ้นอย่างช้า ๆ จากนั้นขูดแผ่นสไลด์ด้านล่างกับปากภาชนะเพื่อกำจัด slurry ส่วนเกินให้หมดไปพร้อมปิดภาชนะใส่ slurry ให้แน่นเพื่อกันการระเหยของตัวทำละลาย ปล่อยให้ slurry ที่เคลือบอยู่บนแผ่นสไลด์แห้งเล็กน้อย แล้วจึงแยกแผ่นสไลด์ออกจากกัน ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งสนิทก่อนที่จะนำไปใช้งาน ถ้าตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นสไลด์

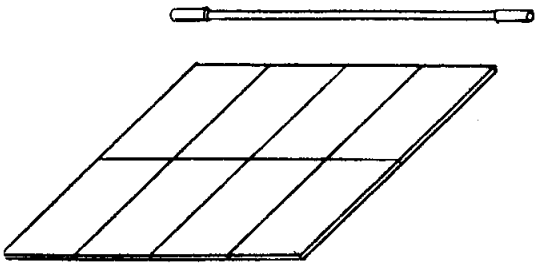
บางเกินไป หรือมีผิวไม่เรียบเป็นเม็ด ๆ แสดงว่า slurry ที่เตรียมขึ้นมานั้นเจือจางเกินไป หรือ slurry ยังผสมไม่เข้ากันดี

ข. วิธีเคลือบ (spreading procedure) ทำโดยเคลือบตัวดูดซับลงบนแผ่นกระจกโดยใช้ spreader วิธีนี้นิยมใช้ในการเตรียมแผ่น TLC ที่มีขนาดใหญ่ เช่น ขนาด 5 x 20, 10 x 20 และ 20 x 20 ซม. เป็นต้น ลักษณะของเครื่องมือที่ใช้เคลือบแผ่น TLC จะแตกต่างกันไปตามบริษัทผู้ผลิต แต่องค์ประกอบสำคัญของเครื่องมือ คือ มีแผ่นที่วางกระจก และที่ใส่ slurry (spreader) ซึ่ง spreader บางชนิดสามารถปรับเพื่อให้ได้ความหนาของตัวดูดซับที่เคลือบลงบนกระจกได้ตามต้องการ เช่น หนา 0.3, 0.5 หรือ 1 มม. วิธีเคลือบให้ลาก spreader เลื่อนไปบนแผ่นกระจก (ดูรูปที่ 10.3)



รูปที่ 10.3 เครื่องมือเตรียมแผ่น TLC *โดยใช้* spreader

ในกรณีที่ไม่มีเครื่องมือดังกล่าวข้างต้น การเคลือบตัวดูดซับบนแผ่นกระจกสามารถทำโดยการเรียงแผ่นกระจก 8 แผ่นบนโต๊ะปฏิบัติการดังในรูปที่ 10.4



รูปที่ 10.4 การเตรียมแผ่น TLC *โดยวิธีเคลือบ*

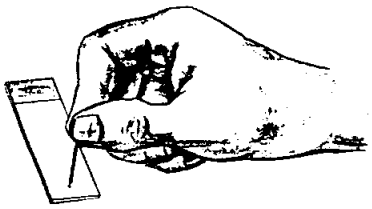
สำหรับแท่งแก้วที่ใช้ลาก slurry ไปบนแผ่นกระจกเป็นแท่งแก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มม. ซึ่งมีท่อยางสั้น ๆ สวมอยู่ที่ปลายทั้งสองด้าน (ดูรูปที่ 10.4) slurry ที่ใช้ในวิธีเคลือบมักจะเตรียมโดยใช้อัตราส่วนซิกาเจล 4 กรัมต่อน้ำ 8 มล. ในขวดที่ปิดได้ เขย่าขวดอย่างแรงประมาณ 30 วินาทีเพื่อให้ซิลิกาเจลและน้ำผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เท slurry ที่เตรียมขึ้นอย่างสม่ำเสมอจากขอบด้านหนึ่งไปหาขอบอีกด้านหนึ่งของแผ่นกระจกที่วางเรียงกัน ลากแท่งแก้วในแนวตั้งฉากกับแนวที่เท slurry โดยลากแท่งแก้วจากขอบด้านหนึ่งไปหาขอบอีกด้านหนึ่งและลากกลับทางเดิมอย่างช้า ๆ จากนั้นปล่อยให้ตัวดูดซับที่เคลือบอยู่บนแผ่นกระจกแห้งเล็กน้อย แล้วใช้ปลายช้อนตักสารแยกแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นออกจากกัน ทิ้งไว้ให้แห้งเองในอากาศเป็นเวลา 10-15 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-100°ซ ประมาณ 30 นาทีก่อนที่จะนำไปใช้

การเตรียมแผ่น TLC โดยวิธีเคลือบเป็นที่นิยมใช้กันมาก เพราะตัวดูดซับที่เคลือบบนแผ่นกระจกจะมีความหนาอย่างสม่ำเสมอ ข้อเสียคือแผ่น TLC ที่เตรียมขึ้นจะแห้งสนิทได้ยากกว่าวิธีแรก เพราะ slurry ที่ใช้จะใช้น้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ระเหยยากผสมกับซิลิกาเจล

ขั้นที่ 2 การจุดสารที่ต้องการแยกลงบนแผ่น TLC

หลอดคะปิลลารีที่ใช้ในการจุดสารลงบนแผ่น TLC ควรมีขนาดเล็กมาก ๆ ซึ่งอาจเตรียมได้โดยการเผาหลอดคะปิลลารีที่ใช้หาจุดหลอมเหลวตรงกลางหลอดด้วยตะเกียงบุนเสน พอแก้วเริ่มอ่อนตัว ให้ดึงปลายทั้งสองออกจากกันตรง ๆ โดยเร็วในแนวราบยาวประมาณ 4-5 ซม. จากนั้นหักตรงส่วนที่เล็กที่สุดออกจากกัน จะได้หลอดสำหรับหยดสาร 2 หลอด

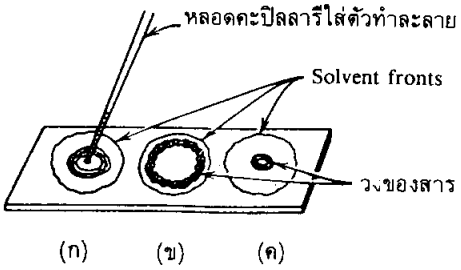
การเตรียมสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบให้ละลายสารนั้นในตัวทำละลายที่ละลายสารได้ดี จากนั้นจุ่มหลอดคะปิลลารีที่เตรียมขึ้นลงในสารละลาย แล้วนำไปจุดลงบนแผ่น TLC เพียง 1 หยด ควรจุดให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC 1 ซม. (ดูรูปที่ 10.5) ขนาดจุดของสารบนแผ่น TLC ควรมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มม. ถ้าสารละลายที่เตรียมเจือจางมาก จำเป็นต้องใช้สารละลายปริมาณมากขึ้น ก่อนที่จะจุดสารละลายนี้ซ้ำลงไปบนจุดเดิมควรรอให้สารที่จุดลงไปครั้งแรกแห้งเสียแล้ว เพื่อป้องกันไม่ให้จุดของสารใหญ่เกินไป ถ้าต้องการจุดสารบนแผ่น TLC มากกว่า 1 จุด ควรจุดให้ห่างกันพอสมควร นอกจากนี้ควรรอให้จุดของสารแห้งก่อนที่จะนำไป develop



รูปที่ 10.5 การจุดสารลงบนแผ่น TLC

สิ่งที่ควรระวังเมื่อทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC คือ ไม่ควรให้มีผลึกของสารเกิดขึ้น หรือมีผลึกของสารที่ติดมากับหลอดคะปิลลารีอยู่บนจุดสาร เพราะจะทำให้สารเคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC มีลักษณะเป็นเส้น นอกจากนี้ไม่ควรให้จุดของสารบนแผ่น TLC ใหญ่เกินไปหรือมีปริมาณสารมากเกินไป เพราะจะทำให้การแยกสารเกิดได้ไม่ดีเท่าที่ควร และไม่ควรจุดสารชิดขอบใดขอบหนึ่งของแผ่น TLC มากเกินไป

ในกรณีที่ใช้ TLC สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารอย่างคร่าว ๆ สามารถทำได้โดยใช้หลอดคะปิลลารีจุดสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1 ซม. ตามความยาวของแผ่น ใช้หลอดคะปิลลารีอีกจำนวนหนึ่งจุ่มลงไปในตัวทำละลายต่าง ๆ ที่จะใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่หลอดละ 1 ชนิด แล้วนำมาหยดลงบนแผ่น TLC ให้ทับลงบนจุดของสารที่จะทดสอบ กำหนดแนวเคลื่อนที่สูงสุดของเฟสเคลื่อนที่ พิจารณาลักษณะของตัวทำละลายที่เหมาะสมได้ดังแสดงในรูปที่ 10.6 คือตัวทำละลายที่ดีควรพาสารเคลื่อนออกจากจุดตั้งต้นไปประมาณ 0.3-0.5 เท่าของรัศมีของวงตัวทำละลาย

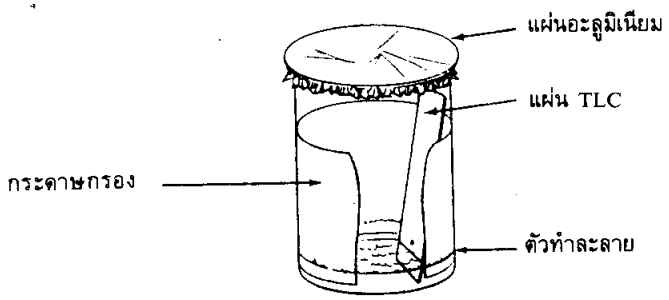


รูปที่ 10.6 การเลือกตัวทำละลายโดยใช้ TLC *ก) ลักษณะตัวทำละลายที่เหมาะสม ข) ลักษณะตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสม (ตัวทำละลายมีโพลาริตีมากเกินไป) ค) ลักษณะตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสม (ตัวทำละลายมีโพลาริตีน้อยเกินไป)*

ถ้าไม่สามารถหาตัวทำละลายชนิดเดียวที่เหมาะสมได้ ควรใช้ตัวทำละลายผสมเป็นเฟสเคลื่อนที่

ขั้นที่ 3 development ของแผ่น TLC ในตัวทำละลาย

ภาชนะที่ใช้ develop แผ่น TLC ควรเป็นขวดปากกว้างที่มีฝาปิดสนิท หรือบีคเกอร์ที่มีแผ่นอะลูมิเนียมบาง ๆ ปิดที่ปากบีคเกอร์ หรือแก้วน้ำที่ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ภาชนะนี้จะใช้ใส่ตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยปริมาณของตัวทำละลายควรสูงประมาณ 0.5 ซม. จากก้นภาชนะ ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงเท่ากับภาชนะลงไปด้วย เพื่อให้ไอของตัวทำละลายอิ่มตัวและกระจายทั่วภาชนะ จากนั้นให้หย่อนแผ่น TLC ลงไปอย่างช้า ๆ โดยเอาด้านที่มีหยดสารอยู่ข้างล่าง (ดูรูปที่ 10.7) สิ่งสำคัญคือระดับของตัวทำละลายจะต้องต่ำกว่าจุดที่หยดสารบนแผ่น TLC ปิดภาชนะทันที ระหว่าง develop แผ่น TLC ไม่ควรเคลื่อนย้ายภาชนะหรือทำให้ภาชนะกระเทือน เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ซึมขึ้นมาจนถึงระดับที่ต้องการแล้ว (ประมาณ 1 ซม. จากขอบบน) เอาแผ่น TLC ออกพร้อมทำเครื่องหมายแสดงตำแหน่งสูงสุดที่ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปทันที แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง



รูปที่ 10.7 development *ของแผ่น* TLC

ขั้นที่ 4 visualization

การตรวจสอบจุดของสารประกอบที่ไม่มีสีบนแผ่น TLC ภายหลัง develop สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดของสาร วิธีที่นิยมใช้กันเสมอมีดังนี้

ก. นำแผ่น TLC ไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เฉพาะสารเรืองแสงเท่านั้นที่จะทำให้มองเห็นจุดของสารบนแผ่น TLC สำหรับสารที่ไม่เรืองแสงการตรวจสอบจุดของสารประเภทนี้บนแผ่น TLC สามารถทำได้เมื่อใช้ตัวดูดซับที่ผสมสารเรืองแสง เช่น ซิลิกาเจล GF (F แสดงว่ามี

สารเรืองแสงผสมอยู่) มาเตรียมแผ่น TLC เพราะสารเรืองแสงที่ผสมอยู่กับตัวดูดซับจะทำให้แผ่น TLC ปรากฏเป็นสีเขียวตลอดแผ่นเมื่อนำไปส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลต ส่วนจุดของสารที่แยกบนแผ่น TLC จะปรากฏเป็นจุดสีม่วงเข้มถ้าสารนั้นสามารถดูดแสงอัลตราไวโอเลต ให้วงจุดของสารเอาไว้

ข. นำแผ่น TLC ใส่ลงในภาชนะที่มีเกล็ดไอโอดีน 2-3 เกล็ดแล้วปิดฝาภาชนะเสีย สารประกอบอินทรีย์ส่วนใหญ่ ยกเว้นสารประกอบพวกอัลเคนและอัลคิลเฮไลด์ จะสามารถรวมตัวกับไอโอดีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น ทำให้เห็นเป็นสีน้ำตาล เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้เป็นปฏิกิริยาผันกลับ ดังนั้นเมื่อเอาแผ่น TLC มาวางทิ้งไว้ภายนอกสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะจางหายไป จึงควรทำเครื่องหมายทันทีที่เอาแผ่น TLC ออกจากภาชนะที่บรรจุไอโอดีน

ค. นำแผ่น TLC ไปพ่นด้วยกรดซัลฟุริกเจือจางในแอลกอฮอล์ เมื่อแผ่น TLC แห้ง จึงนำไปทำให้ร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 100°ซ โดยอาจวางไว้บน hot plate หรือในตู้อบ สารประกอบอินทรีย์เกือบทุกตัวเมื่อถูกกรดซัลฟุริกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อน ทำให้เห็นเป็นจุดสีดำบนแผ่น TLC

ขั้นที่ 5 การคำนวณค่า R_f

คำนวณค่า R_f ของสารบนแผ่น TLC ตามวิธีที่กล่าวในตอนต้นของบทนี้ ถ้าใช้ TLC สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารควรเปรียบเทียบค่า R_f ของสาร unknown กับสาร known ในตัวทำละลายหลาย ๆ ชนิด เพราะสารประกอบต่างชนิดกันอาจมีค่า R_f เท่ากันในตัวทำละลายชนิดหนึ่ง แต่ค่า R_f จะต่างกันเมื่อเปลี่ยนตัวทำละลาย นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบสารต่าง ๆ ควรจุดสารที่ต้องการเปรียบเทียบบนแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน เพื่อให้ภาวะต่าง ๆ ในการทำ TLC เหมือนกัน

10.1.2 วิธีทดลอง

1. เตรียมแผ่น TLC จำนวน 5 แผ่นตามวิธีในขั้นที่ 1 (ก)

2. เตรียมภาชนะสำหรับ develop แผ่น TLC โดยใส่กระดาษกรองที่มีความสูงเท่ากับภาชนะลงไป ใส่เมทิลีนคลอไรด์ (CH_2Cl_2) ลงไปเพื่อเป็นเฟสเคลื่อนที่ ระดับของเมทิลีนคลอไรด์ในภาชนะควรสูงประมาณ 0.5 ซม. ปิดฝาภาชนะ แล้วตั้งทิ้งไว้จนภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของเมทิลีนคลอไรด์

3. นำสารละลายในอะซีโตนของ o-nitroaniline (สาร ก) p-nitroaniline (สาร ข) และ

2,4-dinitroaniline (สาร ค) มาอย่างละ 3-4 หยด ใช้หลอดคะปิลลารีจุดสารที่ต้องการทดสอบบนแผ่น TLC โดยให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC 1 ซม.

TLC แผ่นที่ 1 ใช้จุดสาร ก, ข, ค รวม 3 จุด ๆ ละ 2 หยด ให้ห่างกันพอประมาณ ใส่แผ่น TLC นี้ลงในภาชนะสำหรับ develop ที่เตรียมเอาไว้ ปิดฝาภาชนะเมื่อตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับที่ต้องการ (ประมาณ 0.5 ซม.จากขอบบน) เอาแผ่น TLC ออกให้ทำเครื่องหมายของ solvent front ไว้ทันที ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง สังเกตผลที่เกิดขึ้น แล้วนำแผ่น TLC ไปใส่ในภาชนะที่มีไอโอดีน จะเกิดเป็นจุดสีน้ำตาลขึ้น ดึงแผ่น TLC ออกจากขวดไอโอดีน แล้วรีบทำเครื่องหมายทันที บันทึกระยะทางที่สารทั้ง 3 เคลื่อนที่ และคำนวณหาค่า R_f

TLC แผ่นที่ 2 ให้จุดสาร ก + ข, ข และ ข + ค ให้ห่างกันพอประมาณ ทำเช่นเดียวกับ TLC แผ่นที่ 1 แล้วคำนวณหาค่า R_f

TLC แผ่นที่ 3 ให้จุดสาร ก, ก + ค และ ค ทำเช่นเดียวกับ TLC แผ่นที่ 1 แล้วคำนวณหาค่า R_f

สำหรับแผ่น TLC ที่เหลือ ให้หาว่า unknown เป็นสารประกอบตัวใด

หมายเหตุ

ในการจุดสารบนแผ่น TLC ถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันให้จุด ๆ ละ 2 หยด ส่วนสารผสมให้จุดสารละหยดเสมอ ภายหลัง develop แผ่น TLC ถ้าสารแยกจากกันไม่ดีควรทำซ้ำใหม่ นอกจากนี้ควรวาดภาพผลที่เกิดขึ้นลงในสมุดบันทึกทุกครั้ง

10.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

10.2.1 บทนำ

คอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่ใช้แยกสารในปริมาณมาก ๆ ซึ่งไม่สามารถแยกโดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี คอลัมน์โครมาโทกราฟีเป็นกระบวนการซึ่งสารที่ต้องการแยก (ในรูปที่เป็นของเหลวหรือสารละลาย) ถูกเติมลงบนตัวดูดซับที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ในขั้นแรกสารที่จะแยกจะถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ ดังนั้นเมื่อเติมตัวทำละลายซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ลงไปให้ไหลผ่านคอลัมน์จะเกิด adsorb และ desorb ของสารนั้นกับตัวดูดซับที่เป็นเฟสนิ่ง ผลที่ได้คือ สารแต่ละชนิดใน

สารผสมจะถูกแยกออกมาเป็นแถบ ๆ ซึ่งแถบเหล่านี้จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ตามลำดับ การชะ (elution) คือ การไหลของสารออกมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ ในการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแยกสาร ถ้าหากใช้เฟสนิ่งและเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม จะสามารถแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากสารผสมได้ดีมาก อย่างไรก็ตามก่อนที่จะทำการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จำเป็นต้องตรวจสารที่ต้องการแยกก่อนด้วย TLC เพื่อให้ทราบว่ามีสารปนอยู่มากน้อยเพียงไร นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าใช้อะไรเป็นเฟสนิ่งและใช้อะไรเป็นเฟสเคลื่อนที่

ขั้นตอนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีมีดังนี้

1. การเตรียมคอลัมน์
2. การใส่สารที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์
3. development ของคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย
4. การแยกสารออกจากตัวทำละลาย

ขั้นที่ 1 การเตรียมคอลัมน์

คอลัมน์ที่นิยมใช้เป็นคอลัมน์แก้วที่มีรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กัน ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้สำหรับงานส่วนมากจะมีอัตราส่วนของความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ประมาณ 10 : 1 คอลัมน์ที่มีอัตราส่วนดังกล่าวนี้มาก ได้แก่คอลัมน์ที่ยาวมาก ๆ จะเหมาะสำหรับสารที่แยกออกจากกันได้ยาก ข้อเสียคือการแยกสารในคอลัมน์ยาวจะใช้เวลามากกว่าการแยกจะสมบูรณ์ นอกจากนี้การแยกสารจะเกิดได้ดีเมื่ออัตราส่วนของปริมาณตัวดูดซับต่อปริมาณสารที่จะแยกเท่ากับ 30 : 1 โดยประมาณ

สำหรับการแยกสาร 1 กรัมหรือน้อยกว่าอาจใช้บิวเรตต์ขนาด 50 มล.เป็นคอลัมน์ ถ้าคอลัมน์ที่ใช้ไม่มีก๊อกปิดเปิด อาจใช้ท่อยางสั้น ๆ สวมที่ปลายล่างของคอลัมน์ แล้วใช้ตัวหนีบ ๆ ที่ท่อยางเพื่อทำหน้าที่ควบคุมอัตราการไหลของตัวทำละลายแทนก๊อกปิดเปิด

ในการเตรียมคอลัมน์ ให้ตั้งคอลัมน์ในแนวตั้งฉากกับพื้นระนาบ ใส่สำลีลงไปเล็กน้อย เติมตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ตัวแรกลงไป ใช้แท่งแก้วยาวกดบนสำลีเบา ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ เมื่อแน่ใจว่าไม่มีฟองอากาศแล้วจึงเติมทรายละเอียดลงไป โดยให้ชั้นทรายสูงประมาณ 1 ซม. ปรับผิวหน้าของทรายให้เรียบ โดยใช้ท่อยางเคาะด้านนอกของคอลัมน์เบา ๆ ชั้นทราย

จะป้องกันตัวดูดซับไม่ให้ไหลออกจากคอลัมน์ และทำให้ฐานของตัวดูดซับเรียบ หลังจากนั้นให้เติมตัวดูดซับ เช่น อะลูมินา หรือซิลิกาเจล วิธีการเติมตัวดูดซับที่นิยมใช้กันมี 2 วิธีคือ

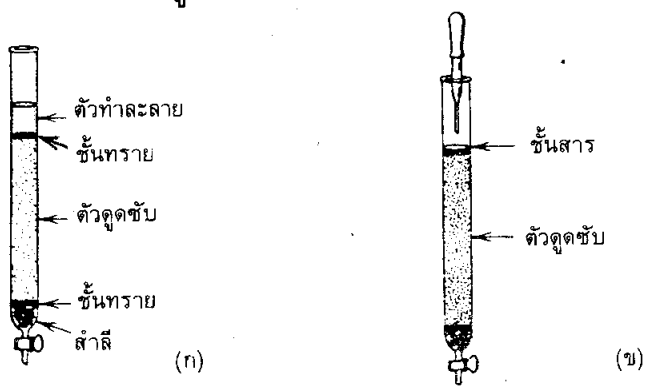
วิธีที่ 1 ใส่ตัวดูดซับลงในตัวทำละลายจำนวนหนึ่งในบีคเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนกระทั่งไม่มีฟองอากาศเหลืออยู่ สารผสมที่ได้เรียกว่า slurry ค่อย ๆ เท slurry ลงในคอลัมน์ และในขณะเดียวกันก็เปิดก๊อกปิดเปิดเพื่อให้ตัวทำละลายไหลออกไป พยายามรักษาระดับความเร็วของการเท slurry และการไหลออกของตัวทำละลายให้สม่ำเสมอ เมื่อเท slurry ลงไปในคอลัมน์หมดแล้วให้ใช้ท่อยางเคาะรอบ ๆ ด้านนอกของคอลัมน์อย่างเบา ๆ เพื่อให้ตัวดูดซับอัดกันแน่นยิ่งขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันมาก

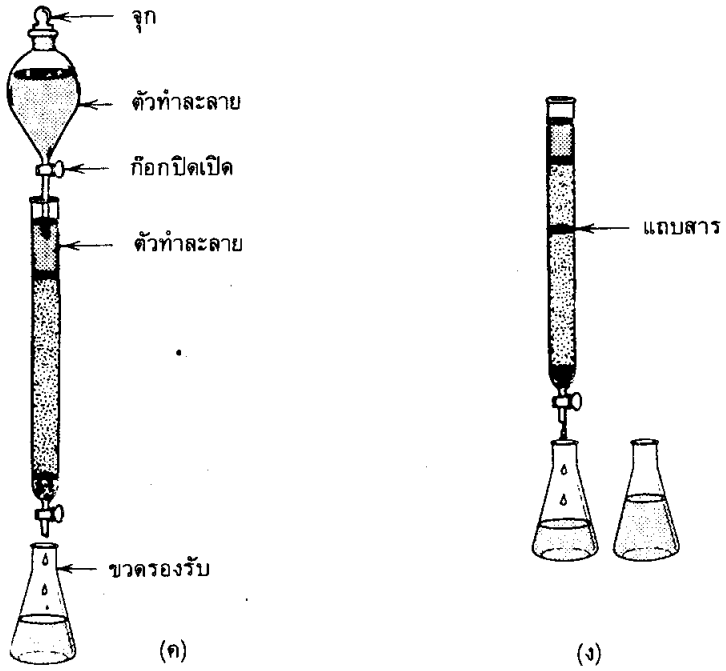
วิธีที่ 2 เติมตัวดูดซับที่แห้งลงไปในคอลัมน์ที่มีตัวทำละลายบรรจุอยู่อย่างช้า ๆ ในขณะเดียวกันให้เปิดก๊อกปิดเปิดให้ตัวทำละลายไหลออก พร้อมกับใช้ท่อยางเคาะด้านนอกของคอลัมน์

ข้อควรระวัง อย่าให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าระดับของตัวดูดซับในระหว่างการเตรียมคอลัมน์

ในการเตรียมคอลัมน์ทั้งวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 เมื่อแน่ใจว่าตัวดูดซับอัดกันแน่นดีแล้ว จึงเติมทรายลงไป โดยให้ชั้นทรายสูงประมาณ 1 ซม. เคาะด้านนอกของคอลัมน์อย่างเบา ๆ ด้วยท่อยาง ชั้นทรายจะป้องกันและรักษาผิวหน้าของตัวดูดซับให้เรียบ ถ้าไม่ใช้ทราย จะใช้กระดาษกรองตัดเป็นแผ่นกลมขนาดคอลัมน์ก็ได้ จะต้องรักษาระดับของตัวทำละลายให้ท่วมทรายตลอดการทดลอง เพราะเมื่อตัวดูดซับแห้งจะเกิดฟองอากาศขึ้นในคอลัมน์ ทำให้เกิดรอยแยกที่ตัวดูดซับ เรียกว่าเกิด column cracking

การเตรียมคอลัมน์ที่ดี ตัวดูดซับจะต้องอัดกันแน่น สม่ำเสมอ และมีผิวหน้าเรียบ





รูปที่ 10.8 ขั้นตอนการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ขั้นที่ 2 การใส่สารที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์

ก่อนที่จะใส่สารที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ จะต้องเปิดก๊อกปิดเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกไป เพื่อให้ตัวทำละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับทราย ถ้าไม่ใช้ทราย ก็ให้ตัวทำละลายลดลงมาอยู่ระดับเดียวกับตัวดูดซับ

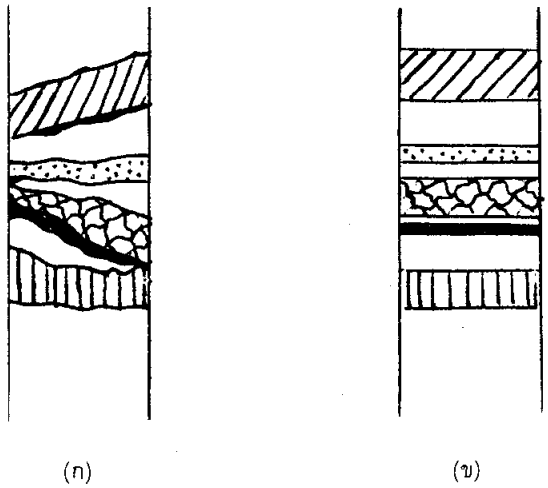
ถ้าสารที่ต้องการแยกเป็นของแข็ง หรือเป็นของเหลวเหนียว ๆ จะต้องนำมาละลายในตัวทำละลายในปริมาณน้อยที่สุดก่อน แต่ถ้าสารนั้นเป็นของเหลวข้นสามารถนำไปใช้ได้เลย ทั้งนี้เพื่อที่จะให้สารถูกดูดซึมเป็นแถบแคบ ๆ ตัวทำละลายที่ใช้โดยมากมักเป็นชนิดเดียวกับตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ตัวแรก ในกรณีที่สารที่ต้องการแยกไม่ละลาย หรือละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ตัวแรก ให้ละลายสารในตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงขึ้น ทำให้สารละลายเข้มข้นก่อนนำไปใช้ในคอลัมน์ ใช้ disposable pipette ช่วยในการใส่สารละลายลงในคอลัมน์ (ดูรูปที่ 10.8 ข) เมื่อใส่สารเรียบร้อยแล้ว ให้เปิดก๊อกปิดเปิดเพื่อให้ตัวทำละลายไหลออกจากคอลัมน์อย่างช้า ๆ ในขณะเดียวกันสารที่จะแยกจะเริ่มถูกดูดซับโดยตัวดูดซับอย่างช้า ๆ เมื่อ

ตัวทำละลายลดลงมาอยู่ในระดับเดียวกับตัวดูดซับให้ปิดก๊อกปิดเปิดทันที จะเห็นได้ว่าตอนนี้ระดับของตัวทำละลายจะต่ำกว่าทราย

ขั้นที่ 3 development ของคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย

เติมตัวทำละลายลงในคอลัมน์อย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันไม่ให้ผิวหน้าของตัวดูดซับได้รับความกระทบกระเทือน ในขั้นแรกควรใช้ disposable pipette เติมตัวทำละลายลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นสามารถเติมตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องผ่านทางกรวยแยกซึ่งวางอยู่เหนือคอลัมน์ (ดูรูปที่ 10.8 ค.) โดยใส่ตัวทำละลายลงในกรวยแยกแล้วปิดจุก นำกรวยแยกนี้ไปวางเหนือคอลัมน์ในลักษณะที่ปลายของกรวยแยกจุ่มอยู่ในตัวทำละลายในคอลัมน์ เปิดก๊อกปิดเปิดของกรวยแยก เมื่อตัวทำละลายในคอลัมน์ลดต่ำกว่าปลายของกรวยแยกตัวทำละลายในกรวยแยกจะไหลออกมาชดเชยส่วนที่ลด การเติมตัวทำละลายจะเกิดต่อเนื่องกันโดยอัตโนมัติจนกระทั่งตัวทำละลายในกรวยแยกหมด ส่วนก๊อกปิดเปิดที่ส่วนล่างของคอลัมน์ควรปรับให้มีอัตราการไหลออกของตัวทำละลายให้พอเหมาะ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของคอลัมน์และสารที่ต้องการแยก เริ่มทำการเก็บตัวทำละลายที่ออกมาจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ในตอนนี้จะมีโครมาโทแกรมเกิดขึ้น ถ้าสารที่แยกมีสี จะสามารถติดตามการชะของสารแต่ละตัวออกจากคอลัมน์ได้ง่าย แต่ถ้าสารที่แยกไม่มีสี โดยทั่ว ๆ ไปจะเก็บตัวทำละลายและสารที่ออกจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ละเท่า ๆ กัน แล้วตรวจสอบสารในแต่ละส่วนด้วย TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน

ถ้าโครมาโทแกรมไม่ยอมแยกตัวออกจากกันหรือการเคลื่อนของสารลงสู่คอลัมน์เกิดขึ้นช้ามาก ควรเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายที่ใช้ทีละน้อย โดยการผสมตัวทำละลายเดิมกับตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงกว่า โดยให้องค์ประกอบของตัวทำละลายผสมมีเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงเพิ่มจาก 5%, 10%, 20%, 40% และ 80% แล้วตามด้วยตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงเพียงอย่างเดียว เรียกวิธีการชะสารที่มีการเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายว่า การชะแบบลำดับส่วน (fractional หรือ stepwise elution) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด เพราะทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารเพิ่มขึ้น ข้อควรระวังในการชะสารแบบลำดับส่วน คือ ต้องไม่เปลี่ยนโพลาริตีของตัวทำละลายเร็วเกินไป เพราะจะทำให้เกิด column cracking ส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว หรือใช้ตัวทำละลายผสมที่มีอัตราส่วนคงที่ตั้งแต่แรกจนกระทั่งการแยกสมบูรณ์เรียกว่า การชะแบบธรรมดา (simple elution)



รูปที่ 10.9 (ก) ลักษณะโครมาโทแกรมที่ไม่ดี
(ข) ลักษณะโครมาโทแกรมที่ดี

สำหรับสาเหตุที่ทำให้ได้โครมาโทแกรมที่ไม่ดี มีดังนี้

1. ตัวดูดซับและตัวทำละลายที่ใช้ไม่บริสุทธิ์
2. การบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์ไม่ดีพอ
3. การเปลี่ยนโพลาริตีของตัวทำละลายเร็วเกินไป
4. สารเกิดการสลายตัวในคอลัมน์

ขั้นที่ 4 การแยกสารออกจากตัวทำละลาย

นำส่วนที่เก็บจากคอลัมน์ซึ่งมีตัวทำละลายปนอยู่กับสารไประเหยโดยใช้ vacuum rotary evaporator เพื่อไล่ตัวทำละลายให้หมดไป

10.2.2 วิธีทดลอง การแยก methyl orange ออกจาก methylene blue

เตรียมคอลัมน์โดยใช้อะลูมินาที่เป็นกลางเป็นเฟสนิ่ง และ 95% เอทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ นำสารผสมใน 95% เอทานอลของ methyl orange และ methylene blue (ในอัตราส่วน 1 : 5) มาใส่ลงในคอลัมน์ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น ในขั้นแรกใช้ 95% เอทานอลเพื่อ develop โครมาโทแกรม methylene blue จะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อน หลังจาก methylene blue ผ่านออกจากคอลัมน์หมดแล้ว ให้เปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำกลั่น เก็บส่วนของ methyl orange ที่ถูกชะออกมา

หมายเหตุ อาจารย์ผู้ควบคุมจะสาธิตการเตรียมคอลัมน์ และการแยกสารให้ดู

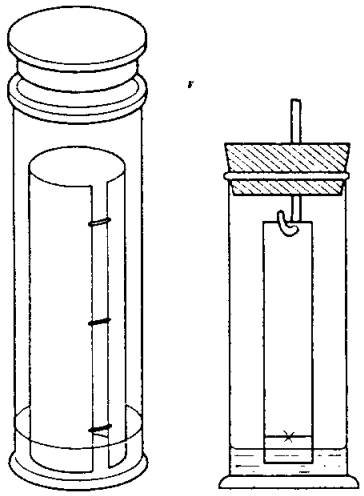
10.3 เปเปอร์โครมาโทกราฟี

10.3.1 บทนำ

เปเปอร์โครมาโทกราฟีเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับใช้แยกสารประกอบอินทรีย์ที่มีโพลาริตีสูง ๆ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น หลักการและการปฏิบัติจะเหมือนกับ TLC ที่กล่าวในหัวข้อที่ 10.1 คือ สารที่ต้องการแยกจะถูกจุดลงบนปลายด้านหนึ่งของกระดาษกรอง ใส่กระดาษกรองในภาชนะสำหรับ develop โดยให้ปลายด้านที่มีจุดสารจุ่มอยู่ในตัวทำละลาย (ระวังอย่าให้ระดับของตัวทำละลายสูงกว่าจุดสารบนกระดาษกรอง) เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนไปตามกระดาษกรองจะพาเอาสารติดไปด้วย การคำนวณค่า R_f ในเปเปอร์โครมาโทกราฟีจะเหมือนกับใน TLC

ในเปเปอร์โครมาโทกราฟี development ของโครมาโทแกรมสามารถทำได้หลายวิธี สำหรับวิธีที่นิยมใช้กันมากมีดังนี้

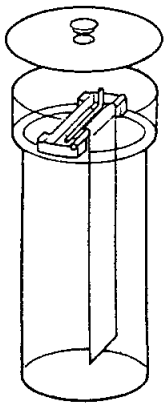
ก. ascending technique เป็นวิธีที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปตามแผ่นกระดาษกรอง (ดูรูปที่ 10.10)



(ก) (ข)

รูปที่ 10.10 development *ของโครมาโทแกรมโดย* ascending technique

ข. descending technique เป็นวิธีที่ตัวทำละลายซึ่งบรรจุอยู่ที่ส่วนบนของภาชนะเคลื่อนที่ลงมาตามแผ่นกระดาษกรอง (ดูรูปที่ 10.11)



รูปที่ 10.11 development *ของโครมาโทแกรมโดย* descending technique

จากรูปที่ 10.11 จะเห็นได้ว่าแผ่นกระดาษกรองจะถูกแขวนในแนวดิ่ง โดยมีปลายบนจุ่มอยู่ในตัวทำละลาย

10.3.2 วิธีทดลอง กรดอะมิโนที่ใช้ : glycine, phenylalanine, alanine, leucine, tyrosine, argenine, glutamic acid, mixture, unknown ก และ ข

ใช้หลอดคะปิลลารีจุดสารละลายของกรดอะมิโนลงบนกระดาษกรองชนิด Whatman No. 1 ที่จัดไว้ให้ โดยจุดสารให้ห่างจากขอบด้านล่างและด้านข้างด้านละ 1.5 ซม. ในกรณีที่มีสารที่ต้องการแยกหลายตัว จะต้องจุดสารให้ห่างกันพอประมาณ นอกจากนี้ควรให้จุดสารมีขนาดเล็กที่สุด และควรจุดสารซ้ำที่จุดเดิม 2-3 ครั้ง สิ่งสำคัญคือจะต้องปล่อยให้สารแห้งก่อนที่จะจุดซ้ำลงไป เมื่อจุดสารบนแผ่นกระดาษกรองเรียบร้อยแล้ว ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจึงม้วนแผ่นกระดาษกรองเป็นรูปทรงกระบอกและเย็บปลายทั้งสองเข้าด้วยกัน (ดูรูปที่ 10.10 ก.) ระวังอย่าให้ปลายทั้งสองนี้ติดกัน จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะสำหรับ develop ซึ่งมีตัวทำละลายผสมของบิวทานอล เอทานอล และน้ำในอัตราส่วน 2 : 2 : 1 บรรจุอยู่ ปิดฝาภาชนะ ให้สังเกตดูว่าระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดสารบนกระดาษกรองหรือไม่ เมื่อตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับที่ต้องการ (ประมาณ 0.5 ซม. จากขอบบน) เอาแผ่นกระดาษกรองออก ทำเครื่องหมายแสดงระดับสูงสุดที่ตัวทำละลาย

เคลื่อนไปบนกระดาษกรองทันที ทิ้งแผ่นกระดาษกรองให้แห้ง เนื่องจากกรดอะมิโนที่ใช้เป็นสารประกอบที่ไม่มีสี จึงต้องใช้สารละลาย 0.2% ninhydrin ในเอทานอลฉีดพ่นลงไปบนแผ่นกระดาษกรองให้ทั่ว (ควรทำในตู้ควัน) แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 5-10 นาที จะมีสีน้ำเงินม่วงปรากฏให้เห็น ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับ ninhydrin ใช้ดินสอวงรอบจุดเหล่านั้น บันทึกระยะทางที่กรดอะมิโนทั้งหมดเคลื่อนที่ และคำนวณค่า R_f นอกจากนี้ควรลอกผลที่เกิดขึ้นบนแผ่นกระดาษกรองลงในสมุดบันทึกด้วย

10.4 คำถามท้ายบท

1. จงบอกผลที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในการทำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี และเปเปอร์โครมาโทกราฟี เมื่อ

ก. จุดสารที่ต้องการแยกมากเกินไป

ข. ใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงในการ develop

ค. ระดับของตัวทำละลายในภาชนะสำหรับ develop สูงกว่าจุดของสารบนแผ่น TLC หรือกระดาษกรอง

ง. ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปเลยขอบบนสุดของแผ่น TLC หรือแผ่นกระดาษกรอง

จ. จุดสารที่ต้องการแยกชิดขอบด้านข้างมากเกินไป

ฉ. ลืมปิดฝาภาชนะขณะ develop แผ่น TLCหรือแผ่นกระดาษกรองที่จุดสารไว้แล้ว

ช. ลืมทำเครื่องหมายแสดง solvent front บนแผ่น TLC หรือแผ่นกระดาษกรองภายหลัง development

2. จงจัดลำดับโพลาริตีจากน้อยไปหามากของสารประกอบไนโตรอะนิลีน และกรดอะมิโนตามผลที่ปรากฏบนแผ่น TLC และแผ่นกระดาษกรองตามลำดับ

3. ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร ก, ข และ ค โดยใช้ TLC พบว่าสาร ก และ ข มีค่า R_f เท่ากันในเบนซีน และคลอโรฟอร์ม ส่วนสาร ค มีค่า R_f เท่ากับสาร ก ในเบนซีน และมีค่า R_f เท่ากับสาร ข ในคลอโรฟอร์ม จงสรุปผลการทดลองนี้

4. จงบอกผลที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี เมื่อ

ก. ละลายสารที่ต้องการแยกในตัวทำละลายปริมาณมาก แล้วนำสารละลายที่ได้

ใส่ลงในคอลัมน์โดยไม่ได้ทำให้สารละลายเข้มข้นเสียก่อน

ข. ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าตัวดูดซับขณะทำการทดลอง

ค. ใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงกว่าสารที่ต้องการแยกเป็นเฟสเคลื่อนที่

ง. ใช้ตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำกว่าสารที่ต้องการแยกเป็นเฟสเคลื่อนที่

จ. อัตราการไหลของตัวทำละลายและสารออกจากคอลัมน์เร็วเกินไป

5. ในการแยกสารผสมของสารประกอบอินทรีย์ โดยทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีบนซิลิกาเจล และใช้อะซีโตนเป็นเฟสเคลื่อนที่ ผลปรากฏว่าไม่สามารถแยกสารในสารผสมออกจากกันเลย อยากทราบว่าควรเปลี่ยนตัวดูดซับที่ใช้หรือตัวทำละลายที่ใช้จึงจะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารเพิ่มขึ้น

6. ควรเลือกใช้โครมาโทกราฟีแบบใด เพื่อพิสูจน์ว่าสาร unknown คือ กลูโคส

7. จงบอกวิธีตรวจสอบสารที่ไม่มีสีที่แยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีมา 2 วิธี

8. ถ้าต้องการแยก o-nitrophenol ออกจาก p-nitrophenol โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ควรเลือกใช้อะลูมินาหรือซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับจึงจะเหมาะสม และไอโซเมอร์ใดคาดว่าจะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อน ให้เหตุผลสั้น ๆ ประกอบคำตอบ

ผลการทดลองบทที่ 10
ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

วันที่ทำการทดลอง.....

สารประกอบ	ระยะทางที่เคลื่อนที่ขึ้นไป (ซม.)	ค่า R_f
ตัวทำละลาย		
o-nitroaniline		
p-nitroaniline		
2,4-dinitroaniline		
unknown		

∴ สาร unknown คือ .....

ผลการทดลองบทที่ 10
คอลัมน์โครมาโทกราฟี

วันที่ทำการทดลอง.....

ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่คือ.....

ลักษณะผงอะลูมินา.....

สารผสมของ methyl orange และ methylene blue ใน 95% เอทานอลมีสี.....

methylene blue ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์มีสี.....

methyl orange ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์มีสี.....

เปรียบเทียบอัตราการถูกดูดด้วยอะลูมินาระหว่าง methylene blue และ methyl orange.....

.....

.....

ผลการทดลองบทที่ 10
เปเปอร์โครมาโทกราฟี

วันที่ทำการทดลอง.....

กรดอะมิโน	ระยะทางที่เคลื่อนที่ขึ้นไป (ซม.)	ค่า R_f
glycine		
phenylalanine		
alanine		
leucine		
tyrosine		
argenine		
glutamic acid		
mixture		
unknown ก		
unknown ข		

mixture ประกอบด้วย.....

สาร unknown ก คือ.....

สาร unknown ข คือ.....