บทที่ 6
โครมาโตกราฟี

โครมาโตกราฟี เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลาย ขนาดและประจุของโมเลกุลสารในองค์ประกอบสองส่วน ส่วนคงที่ (stationary phase) ซึ่งอาจเป็นของแข็ง หรือของเหลวที่ฉาบอยู่บนตัวค้ำจุน (supporting medium) ส่วนนี้อยู่กับที่ โมเลกุลสารที่จะแยกจะต้องผ่านส่วนนี้ไป อีกส่วนหนึ่งเป็นส่วนเคลื่อนที่ (moving phase) อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซที่จะพาโมเลกุลสารที่จะแยกออกไปจากส่วนคงที่

ชนิดของโครมาโตกราฟี

1. โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (adsorption chromatography)
2. โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)
3. เจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี (gel-filtration chromatography)
4. โครมาโตกราฟีแบบแยกส่วน (partition chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

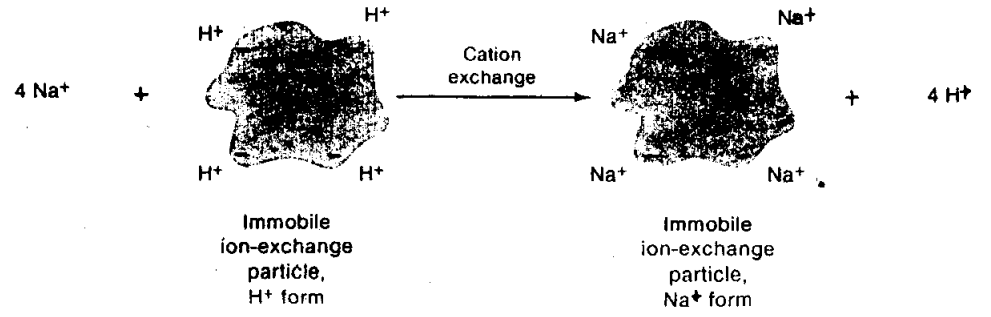
วิธีการนี้แยกสารโดยผ่านสารที่ต้องการจะแยกลงไปในคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับ (ad sorbent) สารเหล่านั้นจะถูกดูดไว้ที่ผิวหน้าของคอลัมน์ และค่อย ๆ เคลื่อนตัวเองไปตามคอลัมน์เมื่อผ่านตัวทำละลายหรือสารผสมตัวทำละลายตามลงไป สารใดที่มีสัมพรรคภาพ (affinity) กับสารตัวทำละลายสูงจะถูกดูดซับไว้น้อย จะเคลื่อนตัวออกจากคอลัมน์ได้ไว

สัมพรรคภาพระหว่างสารและตัวดูดซับขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของสารนั้น ธรรมชาติตัวทำละลาย และธรรมชาติของตัวดูดซับ ตัวดูดซับของแข็งที่ใช้มากคืออะลูมินา แมกนีเซียมซิลิเกท แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ฟลอไรซิล (florisil) ถ่าน ซูโครส เซลลูโลส และแป้ง ตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซน เบนซีน อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม อัลกอฮอลล์ คีโตน และสารผสมตัวทำละลายระหว่างน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ โครมาโตกราฟีชนิดนี้ใช้แยกสารที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ละลายได้บ้างนิดหน่อยในน้ำ เช่น สารประกอบเชิงซ้อนลิปิด สเตียรอยด์ คาโรตินอยด์ คลอโรฟิลล์ต่าง ๆ เป็นต้น

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

เป็นวิธีการแยกโดยอาศัยแรงดึงดูดของประจุตรงข้าม ระหว่างประจุบนโมเลกุลของสารที่จะแยกกับประจุบนอนุภาคของเรซิน (resin) ซึ่งเป็นส่วนคงที่ โมเลกุลของสารใดที่ไม่มีประจุหรือประจุชนิดเดียวกันกับอนุภาคเรซิน ก็จะผ่านไปและถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนด้วยบัฟเฟอร์

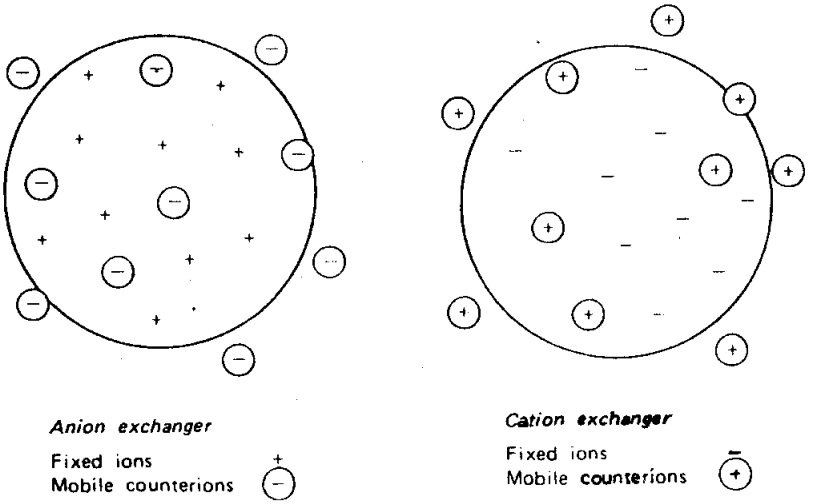
และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นหรือเปลี่ยน pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ก็จะสามารถชะสารที่เกาะอยู่กับเรซินออกได้



รูปที่ 6.1 วิธีการแลกเปลี่ยนประจุบวก

อนุภาคเรซินแบ่งออก 2 ประเภท คือ

1. อนุภาคเรซินที่มีประจุลบ ใช้สำหรับแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger)
2. อนุภาคเรซินที่มีประจุบวก ใช้สำหรับแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger)

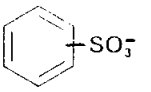
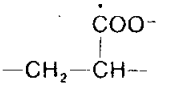
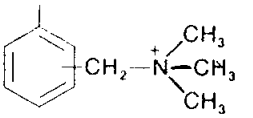
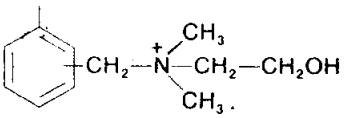
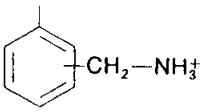
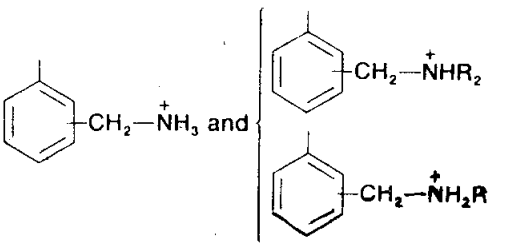


รูปที่ 6.2 เรซินทั้งสองประเภท

ธรรมชาติของสารที่ใช้เป็นเรซิน :

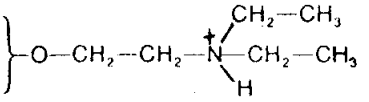
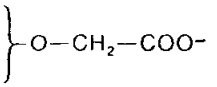
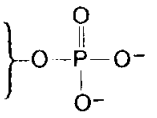
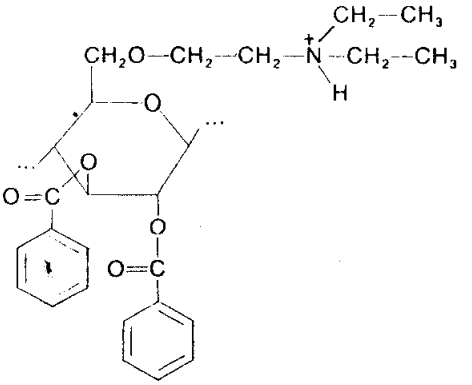
1. เป็นสารพวกโพลีสไตรีน (polystyrene) ที่เติมหมู่แอซิดิคเช่น $-SO_3H$, $-COOH$ หรือหมู่เบซิคเช่น $-NR_3$, $-NH_3^+$ ดังในตารางที่ 6.1 ตัวเลขตามหลังชื่อเรซินจะบอก degree of cross-linkage เช่น Dowex 50 – X 8 หมายถึงมีการใส่สาร divinylbenzene ลงไป 8% ในขณะที่ทำการสังเคราะห์โพลีเมอร์นี้ หรือ Dowex 50 – X 2, Dowex 50 – X 12 เป็นต้น โพลีเมอร์ใดที่ปริมาณร่างแหสูงจะทำให้โมเลกุลสารผ่านไปได้ช้า Dowex – X 2 แค่นั้นก็มีปริมาณร่างแหสูง ดังนั้นเรซินพวกนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ ๆ ส่วนมากจะใช้ในการแยกสารโมเลกุลเล็กที่มีประจุเช่นเปปไทด์ หรือน้ำตาลที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นต้น

ตารางที่ 6.1 เรซินที่เป็นสารโพลีสไตรีน

Name	Class	Functional group
Dowex 50	Cation exchanger (strong)	
IRC-150	Cation exchanger (weak)	
Dowex 1	Anion exchanger (strong	
Dowex 2	Anion exchanger (strong)	
IR-45	Anion exchanger (weak)	
Dowex 3	Anion exchanger (weak)	

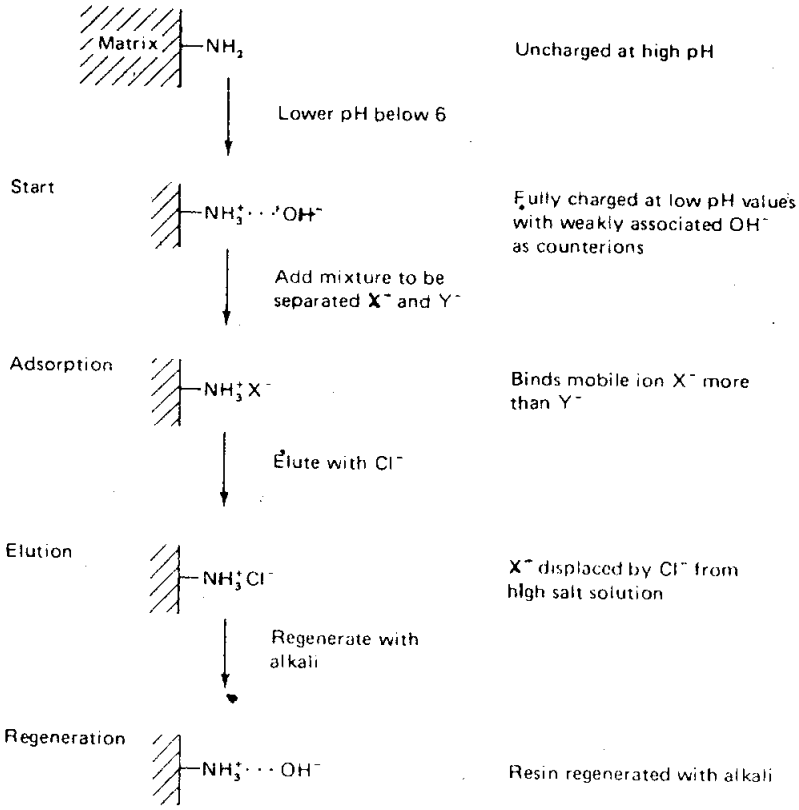
2. เป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ ที่ใช้มากคือเซลลูโลสและ sephadex (dextran) ที่เติมหมู่ diethylaminoethyl (DEAE) หมู่ carboxymethyl (CM) หมู่ฟอสเฟต หรือเติมหมู่ benzoylated-DEAE (B-DEAE) หมู่เหล่านี้จะเพิ่มความสามารถในการดูดซับโดยเฉพาะ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6.2 เหมาะสำหรับใช้แยกสารโมเลกุลใหญ่ที่มีประจุเช่นโปรตีน กรดนิวคลีอิค (ดูรูปที่ 6.3)

ตารางที่ 6.2 เรซินเป็นโพลีแซคคาไรด์

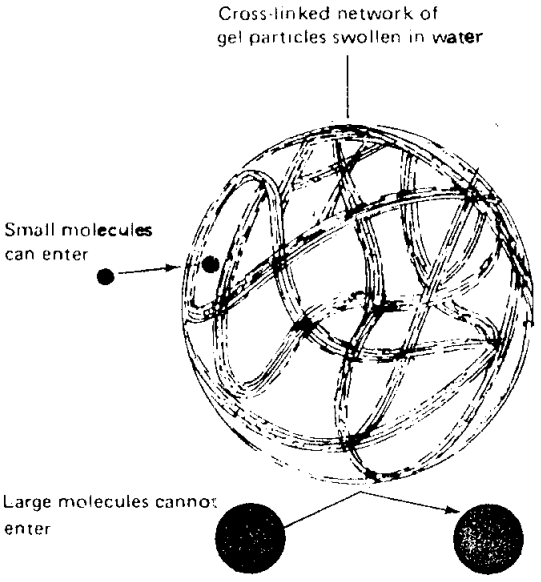
Name	Class	Functional group
DEAE-cellulose and DEAE-Sephadex	Anion exchanger (weak)	Cellulose or Sephadex 
Carboxymethyl (CM) = cellulose and Carboxymethyl (CM) = Sephadex	Cation exchanger (weak)	Cellulose or Sephadex 
Phospho-cellulose and Phospho-Sephadex	Cation exchanger (strong)	Cellulose or Sephadex 
Benzoylated DEAE (B-DEAE) – cellulose and benzoylated DEAE (B-DEAE) – Sephadex	Anion exchanger (weak)	

เจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี

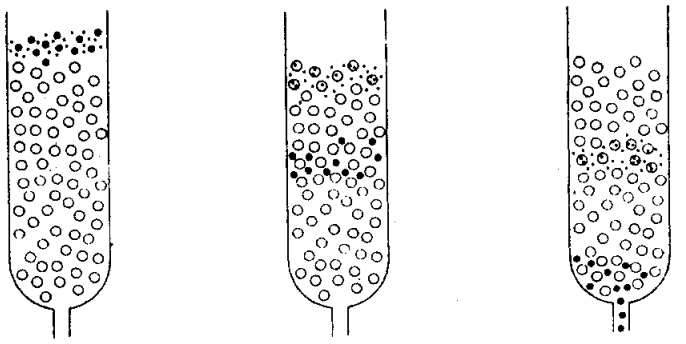
การแยกสารวิธีนี้อาศัยขนาดของโมเลกุลเป็นสำคัญ ส่วนคงที่ประกอบด้วยอนุภาคเจลที่มีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ ยอมให้น้ำหรือสารโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารูพรุนผ่านเข้าออกเนื้อเจลได้ สารโมเลกุลใหญ่กว่ารูพรุนจะเข้าเจลไม่ได้ จึงถูกชะออกมาตามช่องว่างระหว่างอนุภาคเจล โดยส่วนเคลื่อนที่ สารโมเลกุลใหญ่จะออกจากคอลัมน์ได้ก่อนสารโมเลกุลเล็กซึ่งต้องเสียเวลาผ่านเข้าไปในอนุภาคเจล เจลมีขนาดรูพรุนต่าง ๆ กันไป เราสามารถเลือกใช้เจลที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสมในการแยกสารขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กันได้ (ดูรูปที่ 6.4 และ 6.5)



รูปที่ 6.3 ขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุลบ



รูปที่ 6.4 อนุภาคเจล



รูปที่ 6.5 หลักการของเจลฟิลเตรชั่น

สารที่ใช้เป็นอนุภาคเจลหรือเนื้อเจล เป็นพวก sephadex, agarose (sepharose),cross-linked agarose (sepharose CL) sephacryl,bio-gel P, agarose (bio-gel A), bio-glas,bio-beads (**โพลีสไตรีน**) เวลาจะใช้จะต้องเลือกโพลีเมอร์ที่มีร่างแหพอเหมาะกับขนาดโมเลกุลของสารที่จะแยก ดังจะเห็นจากตัวอย่างในตาราง 6.3

ตารางที่ 6.3 คุณสมบัติของ sephadex

Type	Molecular weight fractionation range: Polysaccharides	Molecular weight fractionation range: Peptides and proteins	Water regain (g/g dry gel)	Bed volume (ml/g dry gel)
G10	up to 700	up to 700	1.0	2
G15	up to 1500	up to 1500	1.5	3
G25*	100– 5000	1000– 5000	2.5	5
G50	500– 10 000	1500– 30 000	5.0	10
G75	1000– 50 000	3000– 80 000	7.5	12–15
G100	1000–100 000	4000–150 000	10.0	15–20
G150	1000–150 000	5000–400 000	15.0	20–30
G200	1000–200 000	5000–800 000	20.0	30–40

*G25→200 are available as superfine grade also. By permission of Pharmacia.

ขนาดของอนุภาคใน sepadex แต่ละประเภทยังแบ่งย่อยออกไปเป็นอย่างหยาบ (coarse) ปานกลาง (medium) ละเอียด (fine) ละเอียดมาก (superfine) อย่างละเอียดเหมาะสำหรับการแยกที่ต้องการผลถูกต้องที่สุด (high resolution) อย่างหยาบเหมาะสำหรับการเตรียมงาน (preparative work) เพราะอัตราการไหลค่อนข้างเร็ว sephadex เป็นสารที่อยู่ตัว ไม่ทำปฏิกริยากับด่างและ

กรดอ่อน แต่พันธะไกลโคซิดิคจะถูกไฮโดรไลซ์ในสารละลายเข้มข้นของกรดแก่ sephadex ใน 0.02 M HCl จะเสถียรอยู่ได้นาน 6 เดือน แต่ถ้าใช้ 0.1 M HCl เสถียรอยู่ได้แค่ 1-2 ชั่วโมง ควรหลีกเลี่ยงการใช้สารออกซิไดซิ่งกับ sephadex ในการเก็บรักษาถ้าเป็น sephadex เปียก ควรใส่โทลูอีนหรือฟีนอล หรือคลอโรฟอร์มลงไปนิดหน่อย เพื่อกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย sephadex ที่ใช้แล้วนำกลับมาใช้ได้อีก แต่ต้องล้างน้ำให้สะอาดเก็บไว้ในห้องเย็นสักพักหนึ่งก่อนนำมาใช้ sephadex อยู่ตัวในช่วงpH 4-10 อุณหภูมิ 0-30°ซ ถ้าเป็น sepharose CL ยิ่งจะมีเสถียรภาพดี อยู่ตัวในช่วง pH 3-14 เพิ่มอุณหภูมิได้ถึง 70°ซ

ตารางที่ 6.4 ธรรมชาติของสารที่เป็นเนื้อเจล

Name	Type of backbone	Supplier	Approximate average molecular sieve size
Sephadex, G-10	Dextran (polyglucose)	Pharmacia Inc.	350
Bio-Gel, P-2	Polyacrylamide	Bio-Rad Labs	700
Sephadex, G-25	Dextran (polyglucose)	Pharmacia Inc.	2,500
Sephadex, G-50	Dextran (polyglucose)	Pharmacia Inc.	15,000
Bio-Gel, P-60	Polyacrylamide	Bio Rad Labs	30,000
Bio-Gel, P-100	Polyacrylamide	Bio Rad Labs	55,000
Sephadex, G-100	Dextran (polyglucose)	Pharmacia Inc.	65,000
Bio-Gel, P-150	Polyacrylamide	Bio-Rad Labs	80,000
Sephadex, G-150	Dextran (polyglucose)	Pharmacia Inc.	150,000
Bio-Gel, P-300	Polyacrylamide	Bio-Rad Labs	200,000
Bio-Gel, A-1.5m	Agarose (polygalactose)	Bio-Rad Labs	500,000
Sepharose, 6B	Polysaccharide	Pharmacia Inc.	2,000,000
Bio-Gel, A-50m	Agarose (polygalactose)	Bio-Rad Labs	10,000,000

สารที่จะแยกโดยผ่านคอลัมน์ของเจลนี้จะต้องปริมาตรไม่สูงนัก โดยมากให้ปริมาตรน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความแตกต่างระหว่างปริมาตรของเหลวทั้งหมดกับ void volume

โครมาโตกราฟีแบบแยกส่วน

การแยกวิธีนี้เป็นอินเตอร์มิเดียทระหว่างโครมาโตกราฟีแบบดูดซับและโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ใช้สำหรับแยกสารที่ละลายได้ทั้งในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์

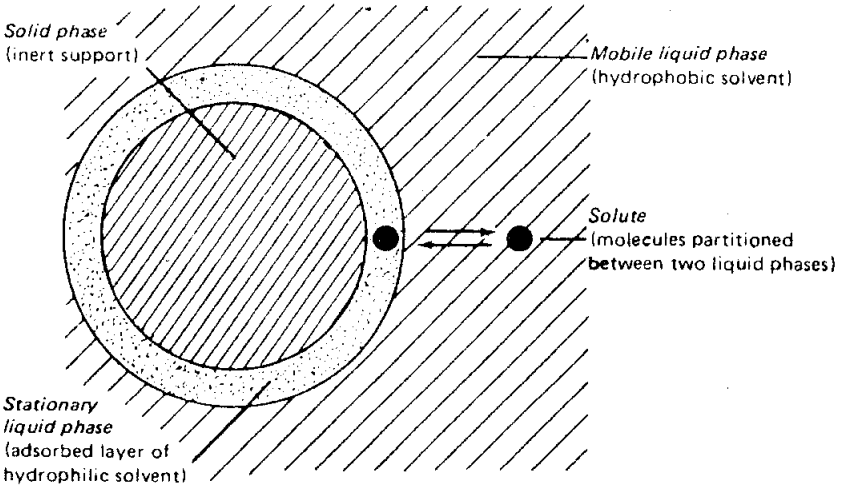
ถ้าเรานำสารชนิดหนึ่งไปเขย่ากับตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันในกรวยแยก สารนั้นจะแพร่กระจายเข้าไปอยู่ในชั้นทั้งสองของตัวทำละลายอย่างไม่สม่ำเสมอ ที่ภาวะสมดุลย์ อัตราส่วนความเข้มข้นของสารนั้นในชั้นทั้งสองจะมีค่าคงที่ เรียกว่า สัมประสิทธิ์การแยกส่วน (partition coefficient, α)

$$\alpha = \frac{\text{ความเข้มข้นสารในตัวทำละลาย 1}}{\text{ความเข้มข้นสารในตัวทำละลาย 2}}$$

เมื่อปริมาตรของตัวทำละลายทั้งสองเท่ากัน จะได้ว่า

$$\alpha = \frac{\text{ปริมาณสารในตัวทำละลาย 1}}{\text{ปริมาณสารในตัวทำละลาย 2}}$$

ตัวทำละลาย 1 มักจะเป็นน้ำ เป็นส่วนคงที่ที่ติดอยู่กับตัวค้ำจุน ตัวค้ำจุนเป็นสารเฉื่อย (inert material) อาจจะบรรจุอยู่ในคอลัมน์หรือฉาบเป็นแผ่นบาง ๆ บนกระจก ส่วนเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ จะไหลผ่านส่วนคงที่ไป ถ้าหากค่าสัมประสิทธิ์การแยกส่วนของสารที่จะแยกมีค่าแตกต่างกันมากพอ สารเหล่านั้นก็จะถูกแยกออกจากกัน



รูปที่ 6.6 หลักการการแยกส่วนระหว่างของเหลว-ของเหลว

เปเปอร์โครมาโตกราฟี ธินแลย์โครมาโตกราฟี (thin-layer chromatography หรือ TLC) คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography) และ countercurrent distribution chromatography ก็อาศัยหลักการแยกส่วนแบบนี้เช่นกัน จะใช้สารละลายอิ่มตัวของตัวทำละลายอินทรีย์ในตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์มากกว่าเช่นน้ำ เมื่อระบบตัวทำละลายหรือสารผสมตัวทำละลายนี้เคลื่อนไปบนกระดาษ (ในกรณีของเปเปอร์โครมาโตกราฟี) น้ำซึ่งมีความเป็นโพลาร์มากกว่าจะถูกดูดซับติดกับโมเลกุลเซลลูโลส เป็นส่วนคงที่ที่เป็นโพลาร์ ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารนอนโพลาร์จะเคลื่อนที่ผ่านไป เกิดการแยกของสารโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การแยกส่วนที่แตกต่างกันของสารเหล่านั้น

เทคนิคของเปเปอร์โครมาโตกราฟีและธินแลย์โครมาโตกราฟีนั้น เราจะหยดสารปริมาณเล็กน้อยลงบนแผ่นกระดาษหรือแผ่นธินแลย์ (thin-layer plate) ทำให้แห้งแล้วนำไปจุ่มในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของระบบตัวทำละลาย การเคลื่อนที่ของระบบตัวทำละลายไปบนแผ่นกระดาษหรือแผ่นธินแลย์มี 2 วิธี วิธี ascending เป็นการเคลื่อนที่ขึ้นโดยอาศัย capillary action และวิธี

descending เป็นการเคลื่อนที่ลงโดยอาศัยแรงดึงดูดโลก (gravity) และ (capillary action) (ดูรูปที่ 6.7)

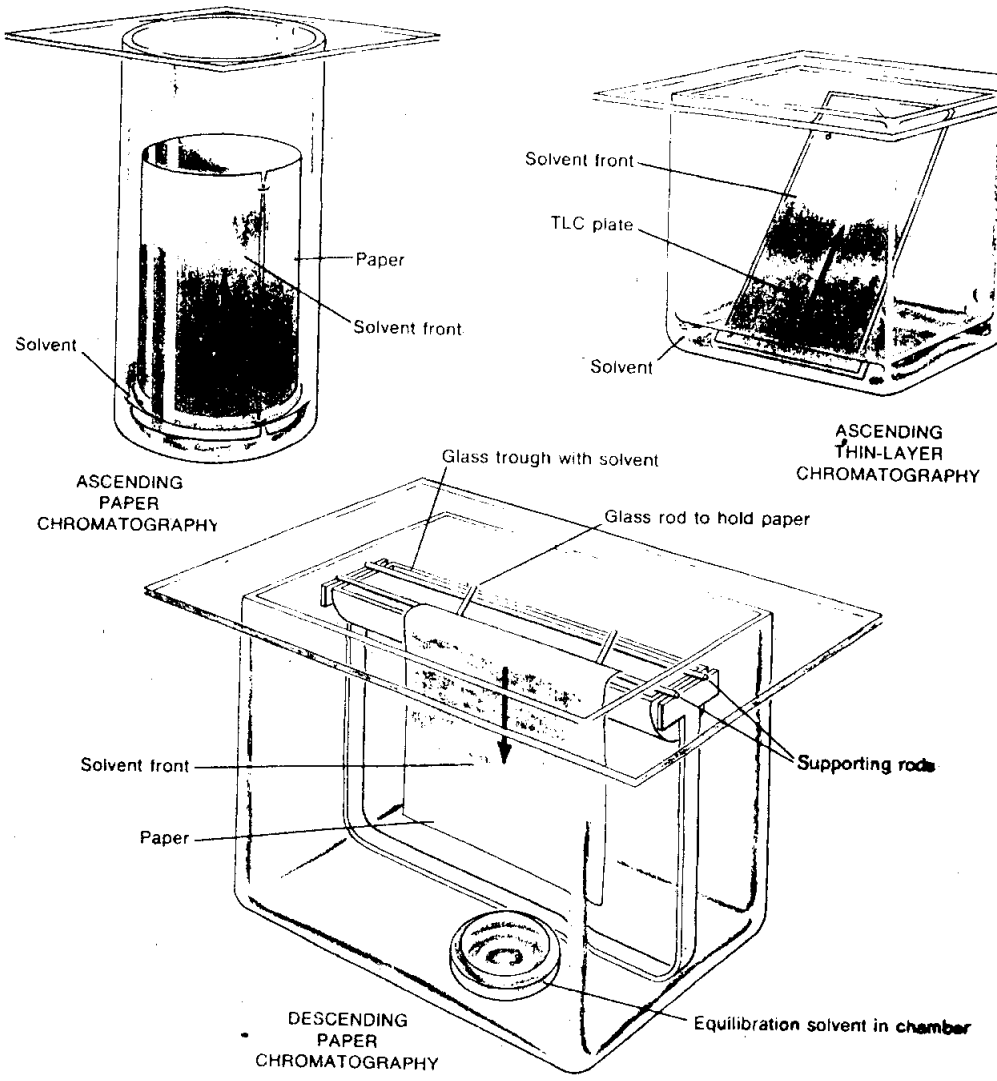
เมื่อระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนเกือบจะสุดขอบบนของแผ่นกระดาษหรือแผ่นธินแลย์ ซึ่งก็ใช้เวลาต่างกันขึ้นอยู่กับความหนาแผ่นกระดาษหรือแผ่นธินแลย์ ระบบตัวทำละลายที่ใช้และอุณหภูมิ ธินแลย์โครมาโตกราฟีใช้เวลาน้อยกว่าเปเปอร์โครมาโตกราฟี นำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ไปทำให้แห้ง พ่นด้วยรีเอเจนต์จำเพาะต่อสารนั้น ๆ เพื่อให้เกิดสี หรือถ้าสารนั้นมีคุณสมบัติในการดูดแสงช่วง UV ก็นำโครมาโตแกรมนั้นไปผ่านแสง UV ในที่มืด วงตำแหน่งของจุดต่าง ๆ ไว้หาค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย}}$$

ก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) บางครั้งอาจเรียกว่า gas liquid partition chromatography (GLPC) หรือ vapor-phase chromatography (VPC) เป็นวิธีการสำหรับใช้แยกสารที่กลายเป็นไอได้โดยไม่สลายตัว (decompose) อาศัยความสามารถในการที่จะกลายเป็นไอของสารซึ่งขึ้นอยู่กับจุดเดือดและหลักการร่วมของโครมาโตกราฟีแบบแยกส่วนและโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ ไม่ขอกล่าวรายละเอียดไว้ในที่นี้

คอลัมน์โครมาโตกราฟี

เป็นโครมาโตกราฟีแบบแยกส่วนระหว่างของแข็ง-ของเหลว อาศัยคุณสมบัติในการดูดซับและการละลาย ตัวดูดซับของแข็งที่ใช้กันมากคือ ซิลิกาเจล ($SiO_2 . x H_2O$) อาจเรียกกรด silicic และอะลูมินา ($Al_2O_3 . x H_2O$) อะลูมินาเตรียมมาจากแร่บอกไซท์ที่ไม่บริสุทธิ์ ($Al_2O_3 . x H_2O + Fe_2O_3$) วิธีการเตรียมนั้นต้องใช้ NaOH อะลูมินาที่เตรียมได้โดยวิธีนี้เรียกเบสิคอะลูมินา (basic alumina) เนื่องจากยังคงมี NaOH หลงเหลืออยู่ ดังนั้นจึงทำให้เป็นกลางโดยการล้างด้วยกรดเรียกแอซิด-วอชด์อะลูมินา (acid-washed alumina) หรือแอซิดิคอะลูมินา (acidic alumina) อาจมีกรดปนอยู่ จึงต้องใช้น้ำชะล้างกรดออกไปให้หมดได้อะลูมินาที่เป็นกลาง (neutral alumina) เวลาจะใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ ควรจะเลือกชนิดที่เหมาะกับสารที่จะแยก เช่นถ้าสารที่จะแยกทำปฏิกริยากับกรดได้ก็ควรเลือกใช้เบสิคอะลูมินาหรืออะลูมินาเป็นกลาง



รูปที่ 6.7 เปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบ ascending และ descending ธินแลย์โครมาโตกราฟีแบบ ascending

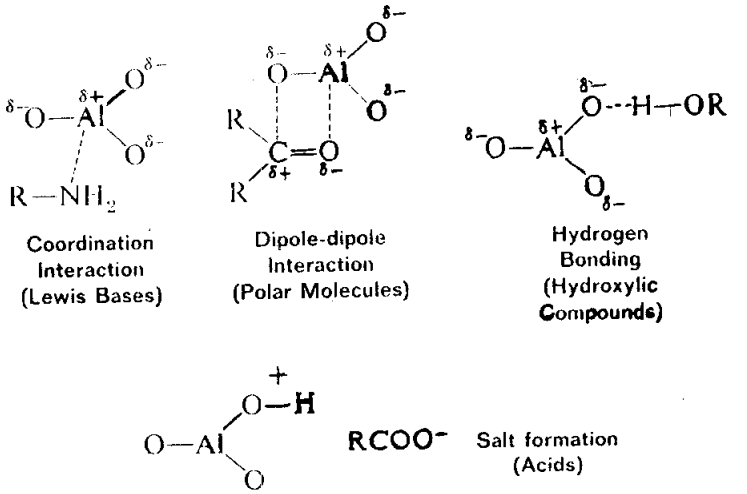
ตารางที่ 6.5 ตัวดูดซับของแข็งสำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี

Cellulose Starch Sugars Magnesium Silicate Calcium Sulfate Silicic Acid Silica Gel Florisil Magnesium Oxide Aluminum Oxide (Alumina)* Activated Charcoal (Norit)	INCREASING STRENGTH OF BINDING INTERACTIONS TOWARD POLAR COMPOUNDS ↓

เซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลเหมาะสำหรับการแยกผลิตผลธรรมชาติ (natural products) แมกนีเซียมซิลิเกทใช้สำหรับการแยกสเตียรอยด์ น้ำตาลที่มีหมู่อะเซทิล และน้ำมันหอม (essential oil) ซิลิกาเจลและฟลอไรซิล ใช้ในการแยกพวกไฮโดรคาร์บอน อัลกอฮอลล์ คีโตน เอสเทอร์ กรด สารประกอบเอโซ (azo compound) อะลูมินาเบสิคอะลูมินาเหมาะสำหรับแยกพวกแอมีน แอซิดิคอะลูมินาเหมาะสำหรับแยกพวกกรดคาร์บอกซิลิคและกรดอะมิโนอะลูมินาเป็นกลางใช้แยกสารที่ไม่เป็นกรดและไม่เป็นด่าง

ปฏิกริยาระหว่างตัวดูดซับอะลูมินาหรือซิลิกาเจลกับสารอินทรีย์ :

เมื่อผ่านสารละลายที่ประกอบด้วยโมเลกุลสารอินทรีย์ลงไปในคอลัมน์ของอะลูมินา (หรือซิลิกาเจล) สารอินทรีย์จะถูกดูดซับติดกับอนุภาคอะลูมินาไว้ด้วยแรงต่าง ๆ ซึ่งขนาดของแรงไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับชนิดของแรงนั้น ๆ



รูปที่ 6.8 ปฏิกริยาระหว่างสารประกอบอินทรีย์กับอะลูมินา

ถ้าเป็นสารนอน-โพลาร์จะจับกับอะลูมินาด้วยแรงแวนเดอวาลส์ซึ่งเป็นแรงอย่างอ่อน ยกเว้นสารนอน โพลาร์ที่น้ำหนักโมเลกุลสูงจึงจะจับกับอะลูมินาด้วยแรงที่มั่นคง สารโพลาร์จะยึดกับอะลูมินาด้วยปฏิกริยาโคออร์ดิเนชั่น ปฏิกริยาไดโพล-ไดโพล หรืออาศัยพันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิค ปฏิกริยาของสารที่มีต่อซิลิกาเจลก็เป็นเช่นเดียวกันนี้

กฎที่ใช้ได้ทั่วไปก็คือ สารที่จะแยกมีความเป็นโพลาร์มากเท่าใดก็จะยิ่งจับกับอะลูมินาหรือซิลิกาเจลได้ดีและแข็งแรงมากเท่านั้น

ตัวทำละลาย :

ในการชะสารที่เกาะติดอยู่กับคอลัมน์ บางครั้งก็ใช้ตัวทำละลายเดี่ยว บางครั้งก็ใช้ตัวทำละลายผสมเพื่อให้ผลการแยกดีขึ้น อย่างไรก็ตามขั้นตอนแรกเริ่มของการชะ (elution) จะต้องใช้ตัวทำละลายนอน-โพลาร์ชะเอาสารนอน-โพลาร์ออกมาก่อน แล้วค่อย ๆ เพิ่มความเป็นโพลาร์เพื่อบังคับให้สารโพลาร์ออกจากคอลัมน์ทีหลัง

ตารางที่ 6.6 ตัวทำละลายที่ใช้ในการทำโครมาโตกราฟี เรียงลำดับตามความเป็นโพลาร์

Petroleum ether	
Cyclohexane	
Carbon tetrachloride	
Benzene	
Methylene chloride	INCREASING POLARITY
Chloroform	AND "SOLVENT POWER"
Diethyl ether	TOWARD POLAR FUNCTIONAL
Ethyl acetate	GROUPS
Pyridine	
Acetone	
Ethanol	
Methanol	
Water	
Acetic acid	

ตารางที่ 6.7 การเรียงลำดับของสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์

Hydrocarbons	Fastest (will elute with non-polar solvent)
Olefins	
Ethers	
Halocarbons	
Aromatics	
Ketones	ORDER OF ELUTION
Aldehydes	
Esters	
Alcohols	
Amines	
Acids, Strong bases	Slowest (need a polar solvent)

ดังนั้นสารนอน-โพลาร์จะเคลื่อนตัวออกจากคอลัมน์ก่อนสารโพลาร์ ถ้าสารนอน-โพลาร์เหมือนกันแต่น้ำหนักโมเลกุลต่างกัน สารนอน-โพลาร์ที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงออกจากคอลัมน์ก่อน

ข้อระวังเกี่ยวกับการใช้ตัวทำละลายก็คือ อย่าเพิ่มความเป็นโพลาร์ของตัวทำละลายเร็วเกินไป ! โดยเฉพาะเวลาที่ใช้คอลัมน์ของอะลูมินาหรือซิลิกาเจล เพราะจะทำให้แท่งของตัวดูดซับในคอลัมน์แตก (crack) การแยกสารก็จะไม่ได้ผลดีเพราะเกิดความไม่ต่อเนื่องของแท่งตัวดูดซับในคอลัมน์

เนื่องจากเมื่อตัวทำละลายไปล้อมรอบ (solvate) อะลูมินาหรือซิลิกาเจล จะมีการสร้างพันธะอย่างอ่อน (weak bond) และคายความร้อนออกมา ความร้อนทำให้ตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอและเกิดเป็นฟองอากาศในที่สุด เป็นสาเหตุให้แท่งตัวดูดซับในคอลัมน์แตกออก

ตัวทำละลาย+อะลูมินา ——→ (อะลูมินา-ตัวทำละลาย)+ความร้อน

เวลาใช้ตัวดูดซับอะลูมินาหรือซิลิกาเจล ให้หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรดเป็นด่าง หรือตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์มากเกินไป

ขนาดของคอลัมน์ :

ขนาดคอลัมน์และปริมาณตัวดูดซับที่ถูกต้องจะให้ผลการแยกสารที่ดี โดยทั่วไปจะใช้ปริมาณตัวดูดซับหนักเป็น 25-30 เท่าของน้ำหนักสารที่จะแยก อัตราส่วนความสูง : เส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์โดยประมาณ 8 : 1

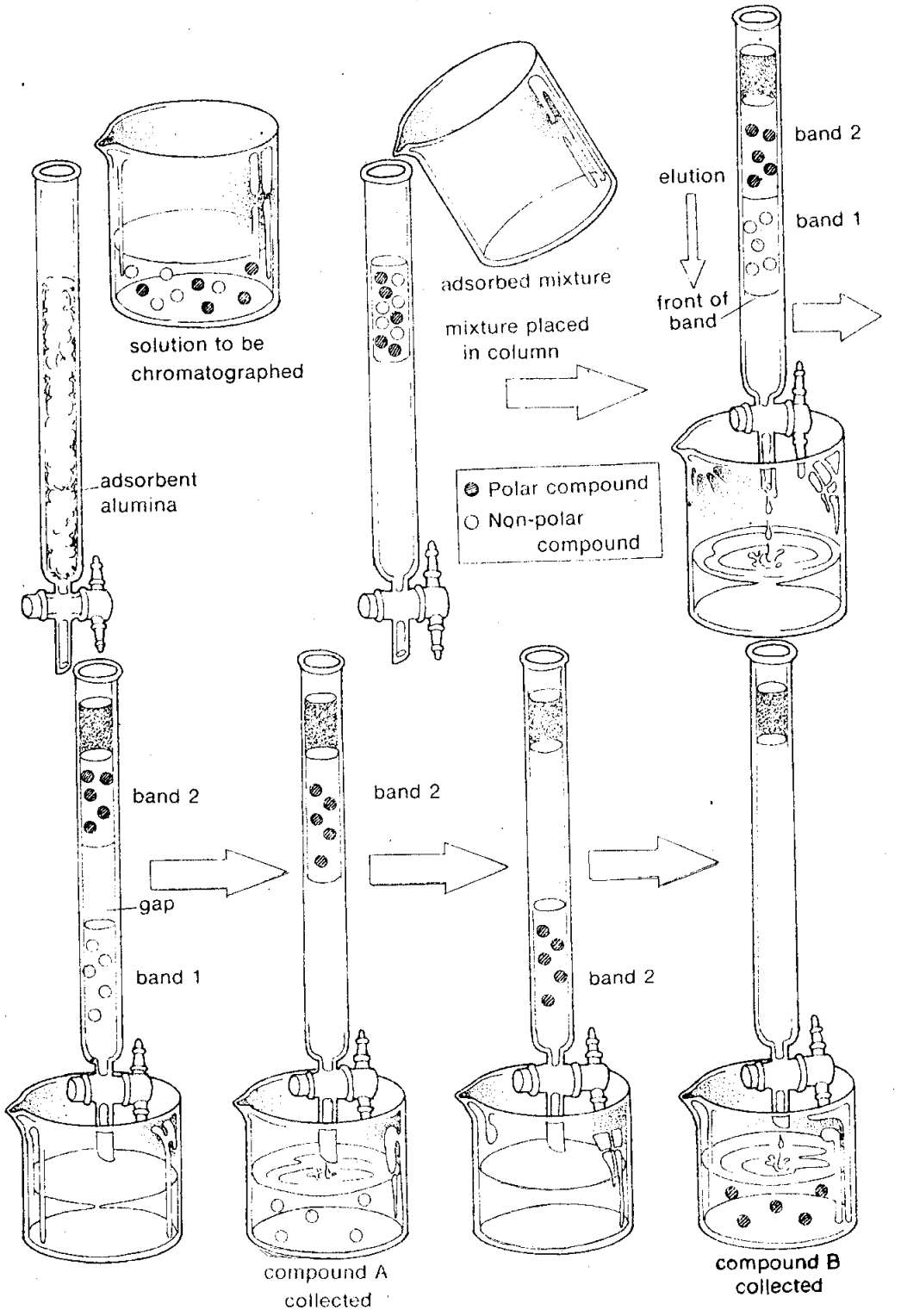
ตารางที่ 6.8 ปริมาณตัวดูดซับและขนาดคอลัมน์ที่พอเหมาะกับน้ำหนักสารที่จะแยก

AMOUNT OF SAMPLE	AMOUNT OF ADSORBENT	COLUMN DIAMETER	COLUMN HEIGHT
0.01 g	0.3 g	3.5 mm	30 mm
0.10	3.0	7.5	60
1.00	30.0	16.0	130
10.00	300.0	35.0	280

ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความยากง่ายในการแยกสารนั้น ๆ ด้วย ถ้าเป็นสารที่แยกง่ายอาจลดขนาดคอลัมน์และปริมาณตัวดูดซับลง ถ้าเป็นสารที่แยกยากจะต้องเพิ่มขนาดคอลัมน์และปริมาณตัวดูดซับ

อัตราการไหลของตัวทำละลาย :

ผลการแยกที่ดีจะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของตัวทำละลายด้วย ถ้าตัวทำละลายผ่านคอลัมน์ช้าเกินไป สารที่ต้องการแยกก็จะแพร่กระจาย (diffuse) ซึ่งอัตราการแพร่กระจายอาจจะสูงกว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสารออกจากคอลัมน์ เป็นผลให้แถบ (band) กว้างออกไป การแยกก็จะไม่ได้ผลดี



รูปที่ 6.9 ขั้นตอนการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ผลของการแยกสารจะดีหรือไม่ ขึ้นอยู่กับสิ่งต่อไปนี้ คือ

1. ชนิดของตัวดูดซับและปริมาณที่ใช้
2. ความเป็นโพลาร์ของตัวทำละลาย
3. ขนาดคอลัมน์ (ความยาวxเส้นผ่าศูนย์กลาง)
4. อัตราการชะหรืออัตราการไหลของตัวทำละลาย)

(ดังได้กล่าวไว้โดยละเอียดแล้ว)

การบรรจุตัวดูดซับลงในคอลัมน์ :

แบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ การบรรจุแบบเปียก (slurry method) และการบรรจุแบบแห้ง (dry pack method)

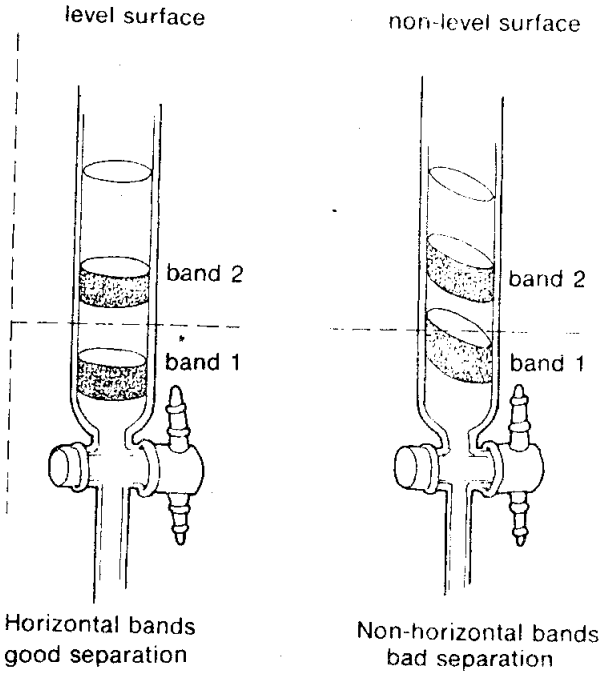
การบรรจุแบบเปียก : ค่อย ๆ เติมตัวดูดซับทีละน้อย ๆ ลงไปในตัวทำละลายซึ่งอยู่ในบีคเกอร์ อย่าเติมตัวทำละลายทั้งหมดลงไปในตัวดูดซับเป็นอันขาด เนื่องจากตัวดูดซับจะถูกล้อมรอบด้วยตัวทำละลายพร้อม ๆ กันโดยกระทันหัน คายความร้อนออกมาจนกระทั่งอาจทำให้ตัวทำละลายเดือดได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้อีเธอร์หรือตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำเป็นผลให้ของผสมที่ได้เป็นก้อน (lumpy) ในระหว่างที่เติมตัวดูดซับลงไปให้คนไปด้วยเพื่อเป็นการไล่ฟองอากาศ

เตรียมคอลัมน์โดยการเติมตัวทำละลายลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายนั้นไหลช้า ๆ ลงสู่บีคเกอร์รองรับ ขณะเดียวกันก็คนของผสมตัวทำละลาย-ตัวดูดซับให้ทั่ว เทผ่านกรวยกรองลงสู่ปากคอลัมน์ เคาะข้างคอลัมน์เบา ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ เมื่อเทของผสมใส่ลงในคอลัมน์หมดแล้วรอให้คอลัมน์อัดตัวแน่น ระวังอย่าให้ผิวหน้าของแท่งตัวดูดซับแห้งเป็นอันขาด ตัวทำละลายในบีคเกอร์รองรับนำไปใช้ได้อีก

การบรรจุแบบแห้ง : เติมตัวทำละลายลงไปในคอลัมน์แล้วปล่อยให้ไหลช้า ๆ ลงสู่บีคเกอร์รองรับ ค่อย ๆ เติมตัวดูดซับลงไปทีละน้อยเคาะด้านข้างคอลัมน์เบา ๆ เมื่อแท่งตัวดูดซับในคอลัมน์สูงเท่าที่ต้องการแล้วให้หยุดเติมตัวดูดซับ ระวังอย่าให้ผิวหน้าของแท่งตัวดูดซับแห้งเป็นอันขาด ตัวทำละลายในบีคเกอร์รองรับนำไปใช้ได้อีกเช่นกัน

ในขั้นตอนการบรรจุตัวดูดซับลงในคอลัมน์มักจะประสบปัญหา 2 ประการ คือ

1. ผิวหน้าคอลัมน์เอียง ปกติผิวหน้าควรจะเป็นเส้นตรงในแนวนอน ตั้งฉากกับแกนของคอลัมน์ แต่ถ้าผิวหน้าเอียงจะทำให้แถบของสารที่จะแยกเอียงตามไปด้วย



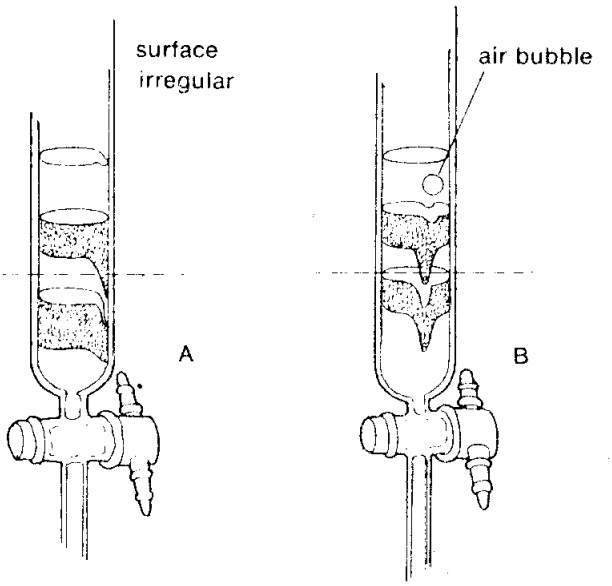
รูปที่ 6.10 ผิวหน้าของคอลัมน์เอียง

เมื่อเป็นเช่นนี้จะทำให้การแยกไม่ได้ผลดี โดยเฉพาะเมื่อแถบที่ 1 และแถบที่ 2 อยู่ใกล้กัน เนื่องจากกว่าแถบที่ 1 ยังถูกชะออกจากคอลัมน์ไม่หมดดีก็มีแถบที่ 2 ปนมา

2. ผิวหน้าคอลัมน์ไม่เรียบ หรือภายในคอลัมน์มีฟองอากาศ ทำให้บางส่วนของแถบสารนั้น ๆ ถูกชะลงมาก่อนเป็นทาง (channeling) ถ้าสารสองแถบอยู่ใกล้กัน ส่วนของแถบบนซึ่งล่วงหน้าออกมาก่อนอาจจะมาปะปนกับส่วนของแถบล่างซึ่งยังถูกชะออกจากคอลัมน์ไม่หมด (ดูรูปที่ 6.11)

การใส่สารละลายที่ต้องการแยกลงในคอลัมน์ (applying the sample to the column) :

ปล่อยตัวทำละลายให้ไหลออกจากคอลัมน์เพื่อเป็นการลดปริมาตรตัวทำละลายลงมาให้มากที่สุดจนเกือบจะถึงผิวหน้าคอลัมน์ แต่อย่าให้ผิวหน้าคอลัมน์แห้ง ปิเปตต์สารละลายที่จะแยกใส่ลงในคอลัมน์ โดยให้ปลายปิเปตต์แตะด้านในของคอลัมน์หรือระดับตัวทำละลายเล็กน้อยค่อย ๆ ปล่อยให้สารละลายไหลลงไปตามคอลัมน์ด้านใน จนกระทั่งได้เป็นแถบบาง ๆ ของสารละลายบนผิวหน้าคอลัมน์ รอให้สารละลายนั้นค่อย ๆ ซึมผ่านลงไปในคอลัมน์จนเกือบหมด จึงปิเปตต์ตัวทำละลายเติมลงไปด้วยวิธีการเดียวกัน ระวังอย่าให้กระเทือนผิวหน้าของคอลัมน์ ในตอนแรกให้ใช้ตัวทำละลายปริมาตรน้อยก่อน เพื่อให้แน่ใจว่าสารละลายที่ต้องการแยกนั้นซึมผ่านคอลัมน์ลงไปหมด ถ้าใส่ตัวทำละลายลงไปมากตั้งแต่ตอนแรก จะทำให้สารที่ต้องการแยกแพร่



รูปที่ 6.11 channeling ที่เกิดขึ้นเนื่องจากผิวหน้าคอลัมน์ไม่เรียบ หรือมีฟองอากาศภายในคอลัมน์

กระจายขึ้นมาอยู่ในตัวทำละลาย ไม่ถูกดูดซับเข้าไปในคอลัมน์

คอลัมน์ที่ตั้งทิ้งไว้นานเกินไป จะทำให้ตัวดูดซับเกิดการบวมน้ำ มีผลกระทบกระเทือนทำให้อัตราการไหลของตัวทำละลายเป็นไปได้ช้า สารที่ต้องการแยกจึงกระจายตัวในทุกทิศทางเป็นแถบสารที่กว้างกว่าปกติ

การชะสารออกจากคอลัมน์ (Elution) :

เริ่มต้นการชะ (elute) ด้วยตัวทำละลายนอน-โพลาร์ เช่น เฮกเซน ปิโตรเลียม อีเธอร์ก่อน แล้วค่อย ๆ เพิ่มความเป็นโพลาร์โดยเติมตัวทำละลายที่โพลาริตี (polarity) สูงกว่าเฮกเซนเช่น เบนซีน อีเธอร์ (ตัวอย่างเช่นค่อย ๆ เพิ่ม 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50% และ 100% ของอีเธอร์หรือเบนซีน) ขั้นตอนการเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายต้องค่อยเป็นค่อยไป อย่าให้โพลาริตีเพิ่มเร็วนักเพราะจะเกิด heat of solvation ดังได้กล่าวไว้แล้ว (หน้า 211) ทำให้แท่งตัวดูดซับในคอลัมน์แตกและแยกเป็นทาง โดยเฉพาะอีเธอร์ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่จุดเดือดต่ำและมีค่า heat of solvation สูง ส่วนใหญ่แล้วการชะสารอินทรีย์ออกจากคอลัมน์อะลูมินาหรือซิลิกาเจลจะใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน-อีเธอร์ หรือเฮกเซน-เบนซีนแล้วตามด้วยคลอโรฟอร์ม หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายที่โพลาริตีสูงเพราะอาจทำให้ตัวดูดซับละลายและถูกชะออกมา โดยเฉพาะตัวดูดซับอะลูมินาหรือซิลิกาเจล

อัตราการไหลของตัวทำละลายไม่ควรจะเร็วเกินไป เพราะจะทำให้ได้ผลการแยกไม่ดี สารอาจปะปนกันออกมา ถ้าอัตราการไหลค่อนข้างช้าหรือตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้นานเกินไปจะเกิดการแพร่กระจายของสารทุกทิศทางทำให้แถบสารกว้าง เป็นผลเสียต่อการแยกอีกเช่นกัน อัตราการไหลตัวทำละลายโดยประมาณควรจะอยู่ระหว่าง 5-50 หยด/นาที ไม่ควรเตรียมคอลัมน์หรือตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้ค้างคืนเพราะจะเกิดการบวมน้ำของตัวดูดซับ

ธินแลย์โครมาโตกราฟี

เป็นวิธีการแยกสารที่นิยมกันมาก ใช้สารปริมาณเพียงเล็กน้อยให้ผลการแยกภายในเวลาอันรวดเร็ว หลักการเหมือนคอลัมน์โครมาโตกราฟีคือ เป็นโครมาโตกราฟีแบบแยกส่วนระหว่างของแข็ง-ของเหลวเช่นกัน ต่างกันตรงที่ว่าคอลัมน์โครมาโตกราฟีนั้นปล่อยให้ตัวทำละลายไหลลงซึ่งเป็นแบบ descending แต่ธินแลย์โครมาโตกราฟีจะให้ตัวทำละลายไหลขึ้นเป็นแบบ ascending

ตัวดูดซับถูกฉาบไว้บาง ๆ บนแผ่นกระจกหรือแผ่นสไลด์เล็ก ๆ เรียกแผ่นธินแลย์ (thin-layer plate) หรือสไลด์ธินแลย์ (thin-layer slide) หยดสารที่ต้องการแยกลงบนปลายด้านหนึ่ง (ปลายล่าง) ของแผ่นธินแลย์ด้วยหลอด capillary ทำให้แห้ง นำไปวางในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย โดยปลายล่างแผ่นธินแลย์จุ่มอยู่ในตัวทำละลาย ระดับตัวทำละลายต้องอยู่ใต้ระดับสาร ตัวทำละลายจะซึมจากปลายล่างขึ้นไปปลายบนแผ่นธินแลย์โดยอาศัย capillary action (หน้า 208)

แผ่นธินแลย์เป็นส่วนคงที่และมีโพลาริตีสูงกว่าตัวทำละลายซึ่งเป็นส่วนเคลื่อนที่ ดังนั้นเมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่นธินแลย์จะเกิดการแยกสารตามคุณสมบัติในการละลายและการดูดซับ สารที่เป็นโพลาร์จะถูกยึดเกาะอยู่กับตัวดูดซับบนแผ่นธินแลย์ เคลื่อนที่ขึ้นช้าหรือไม่สามารถเคลื่อนที่ สารนอน-โพลาร์จะถูกพาขึ้นไปตอนบนโดยตัวทำละลาย การเคลื่อนที่ของสารนอน-โพลาร์จึงเป็นไปได้ไวกว่าสารที่เป็นโพลาร์ ทำให้แยกสารออกจากกันได้ บนแผ่นโครมาโตแกรมสารนอน-โพลาร์จะอยู่สูงกว่าหรือให้ค่า R_f มากกว่าสารที่เป็นโพลาร์

นำแผ่นโครมาโตแกรมไปทำให้แห้ง ถ้าสารที่แยกมีสีก็จะเห็นจุดของสีต่าง ๆ ทำการวัดระยะทางเพื่อหาค่า R_f แต่ถ้าเป็นสารไม่มีสีมีวิธีทำให้มองเห็นจุดเหล่านั้นโดยการนำไปผ่านแสง UV หรือนำไปใส่ภาชนะที่มีเกล็ดไอโอดีน (iodine chamber) ก็แล้วแต่ธรรมชาติของสารที่แยกเหล่านั้น

การเตรียมสไลด์ธินแลย์และแผ่นธินแลย์ :

ตัวดูดซับ ที่ใช้กันมากคือ อะลูมินา-G และซิลิกาเจล-G ตัวG หมายถึงยิปซั่ม (gypsum คือ แคลเซียมซัลเฟต) ยิปซั่มเมื่อถูกน้ำจะแข็งตัวขึ้น เป็นตัวช่วยยึด (binder) ตัวดูดซับเข้าด้วยกัน

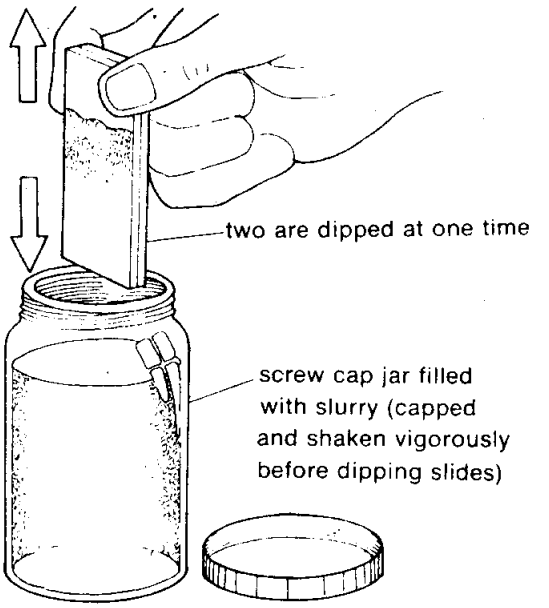
และยึดติดกับแผ่นกระจกด้วย ตัวดูดซับสำหรับธินแลย์โครมาโตกราฟีจะมีขนาดของอนุภาคเล็กและละเอียดกว่าตัวดูดซับที่ใช้กับคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยเฉพาะอะลูมินา G หรือซิลิกาเจล G ซึ่งมียิปซั่ม ถ้านำไปใช้ทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีจะทำให้ตัวดูดซับแข็งตัวและตัวทำละลายไหลผ่านไปไม่ได้

ตัวทำละลาย มักจะใช้คลอโรฟอร์ม เนื่องจากมีจุดเดือดต่ำ (61°ซ) ระเหยไปได้ไว ไม่จำเป็นต้องนำแผ่นธินแลย์ที่ฉาบแล้วไปเข้าตู้อบ และคลอโรฟอร์มไม่ทำให้ตัวดูดซับเป็นก้อน เก็บไว้ใช้ได้นานวัน แต่มีข้อเสียเมื่อใช้คลอโรฟอร์มก็คือ แผ่นธินแลย์ที่ฉาบจะมีความเปราะต้องถือด้วยความระมัดระวัง บางคนอาจจะเติมเมธานอลลงไปในคลอโรฟอร์มนิดหน่อยเพื่อให้ยิปซั่มแข็งตัว ถ้าใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจะต้องรีบฉาบตัวดูดซับลงบนกระจกทันทีก่อนที่จะเกิดการแข็งตัวขึ้น

การเตรียมของผสมตัวดูดซับ ให้ทำในขวดมีฝาปิด ใช้คลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตรต่อตัวดูดซับ 1 กรัม ค่อย ๆ เติมซิลิกาเจล-G ลงในคลอโรฟอร์มทีละน้อยพร้อมกับคนไปด้วย ทำวิธีนี้ของผสมจะไม่เป็นก้อน เมื่อเติมเสร็จแล้วปิดฝาให้แน่นเขย่าแรง ๆ ให้เข้ากันดี เก็บไว้ใช้ได้หลายวัน ไม่จำเป็นต้องใช้ทันทีเหมือนของผสมที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

การเตรียมสไลด์ ล้างสไลด์ให้สะอาดด้วยสบู่แล้วจุ่มสไลด์นั้นใน 50% เมธานอล ทำให้แห้ง เวลาจับสไลด์ต้องจับตรงขอบห้ามจับบนแผ่นสไลด์ เพราะรอยนิ้วมือบนแผ่นสไลด์จะทำให้ฉาบของผสมตัวดูดซับไม่ติดกระจก

การฉาบสไลด์ นำสไลด์ไปจุ่มในขวดของผสมตัวดูดซับพร้อม ๆ กันทีเดียวสองแผ่น (เขย่าขวดก่อนที่จะจุ่ม)



รูปที่ 6.12 การฉาบสไลด์โดยวิธีจุ่ม

ใช้เวลาในการจุ่มประมาณ 2 นาที ยกสไลด์ทั้งสองออกจากกันแล้วทำให้แห้ง สไลด์ธินแลย์ที่ได้ต้องเรียบ สม่ำเสมอ ไม่เป็นรอย ไม่เป็นก้อน

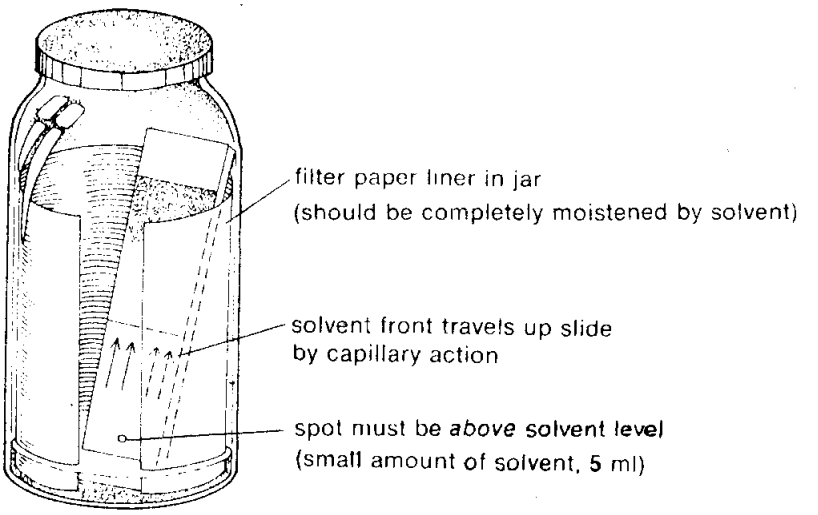
การเตรียมแผ่นธินแลย์ ใช้แผ่นกระจกขนาด 20x25 ซม. ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ถ้าเป็นซิลิกาเจล-G ใช้สาร 1 กรัมในน้ำ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี นำไปฉาบแผ่นกระจกทันทีโดยใช้เครื่องลากแผ่นธินแลย์แล้วนำไปอบ 110° ประมาณ 1 ชั่วโมง (วิธีการนอกเหนือจากนี้เหมือนขั้นตอนการเตรียมสไลด์ธินแลย์)

การหยดสารลงบนแผ่นธินแลย์ (spotting the plate) :

สารที่เป็นของแข็งให้ละลายในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม อะซีโตน หรือเมธิลีนคลอไรด์ ถ้าเป็นของเหลวก็พร้อมที่จะหยดได้เลยโดยใช้หลอด capillary ที่ดึงปลายให้แหลม แตะหลอด capillary เบาๆที่ปลายข้างหนึ่งของแผ่นธินแลย์แล้วยกขึ้น สารละลายในหลอดcapillaryไหลลงสู่แผ่นธินแลย์โดย capillary action พยายามให้สารละลายที่หยดลงไปมีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กที่สุด ถ้าต้องการหยดซ้ำเพื่อให้สารเข้มข้นต้องรอให้สารที่หยดไปครั้งแรกแห้งก่อน จึงจะหยดซ้ำตามไปทีหลัง เพื่อไม่ให้เส้นผ่าศูนย์กลางกว้างเกินไป เมื่อนำแผ่นธินแลย์ไปดิวิลอป (develop) ในตัวทำละลายเส้นผ่าศูนย์กลางนี้ก็จะยิ่งกว้างออกไปอีก

การดิวิลอปสไลด์ธินแลย์ :

ทำในขวดที่มีฝาปิดโดยใส่ตัวทำละลายลงไปในขวด ข้าง ๆ ขวดมีกระดาษกรองที่ชุ่มไปด้วยตัวทำละลายเพื่อให้เกิดความอิ่มตัวของไอตัวทำละลายขึ้นภายในขวด การดิวิลอปจะได้เร็วขึ้น จุ่มสไลด์ธินแลย์ลงในขวด ระดับของสารที่หยดจะต้องอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย ถ้าระดับตัวทำละลายสูงกว่าสารก็จะชะสารออกมาอยู่ในตัวทำละลายหมดไม่ขึ้นไปบนแผ่นธินแลย์



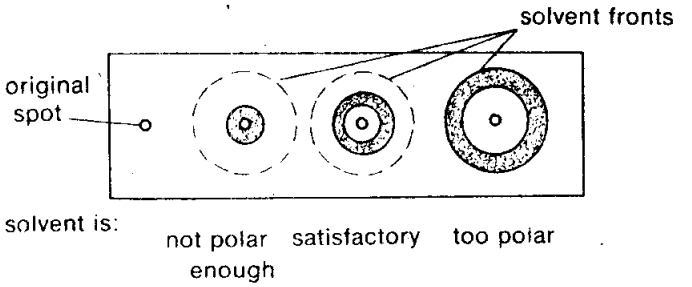
รูปที่ 6.13 การดิวิลอปสไลด์ธินแลย์

สารจะเคลื่อนที่ขึ้นไปบนแผ่นธินแลย์ค่อนข้างเร็วโดนอาศัย capillary action ระวังอย่าให้ตัวทำละลายเคลื่อนไปจนสุดขอบ ให้ห่างจากขอบบ้างเล็กน้อยมิฉะนั้นแล้วจะเกิดการแพร่กระจายของสารขณะที่ตัวทำละลายไม่สามารถเคลื่อนที่ต่อไปได้อีก หยิบแผ่นธินแลย์ออกจากขวด ใช้ดินสอขีดระดับการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายไว้ ทำให้แห้ง หาวิธีที่เหมาะในการทำให้มองเห็นสารนั้นต่อไป

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสำหรับการดิวิลอป :

การเลือกตัวทำละลายขึ้นอยู่กับสารที่จะแยก ควรจะทดสอบตัวทำละลายหลาย ๆ ชนิด แล้วเลือกชนิดที่ให้ผลการแยกดีที่สุด ตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์เกินไปจะทำให้สารทุกตัวขึ้นไปพร้อมกับตัวทำละลาย ตรงกันข้ามตัวทำละลายที่มีความเป็นโพลาร์ไม่พอเพียงจะทำให้สารเคลื่อนที่ได้น้อย

วิธีการตรวจสอบความเหมาะสมของตัวทำละลายที่สะดวกและรวดเร็วก็โดยการหยดสารที่จะแยกลงไปบนแผ่นธินแลย์หลาย ๆ หยด แต่ละหยดห่างกันอย่างน้อย 1 ซม. ดังรูป



รูปที่ 6.14 การตรวจสอบความเหมาะสมของตัวทำละลายโดยดูจากวงแหวนที่เกิดขึ้น

ใช้หลอด capillary ที่มีตัวทำละลายแตะเบา ๆ ตรงจุดที่หยดสารจุดหนึ่ง ตัวทำละลายจะแผ่ออกไปเป็นวงกลม ใช้ดินสอวงกลม วงการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายไว้เปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายแต่ละชนิดบนจุดของสารแต่ละจุด เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปสารจะเคลื่อนตามไปเป็นวงแหวน เลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยการพิจารณาวงแหวนที่เกิดขึ้น (ดูรูปที่ 6.14)

คลอโรฟอร์มและเบนซีนเป็นสารที่มีโพลาริตีปานกลางเหมาะสำหรับใช้เป็นตัวทำละลาย

เฮกเซน ปิโตรเลียมอีเธอร์ เบนซีนเหมาะสำหรับการแยกสารไฮโดรคาร์บอน เฮกเซนหรือปิโตรเลียมอีเธอร์เป็นสัดส่วนกับเบนซีนหรืออีเธอร์จะเป็นตัวทำละลายที่มีโพลาริตีปานกลางเหมาะสำหรับการแยกสารทั่ว ๆ ไป เอธิลอะซีเตท อะซีโตน เมธานอล ใช้ในการแยกสารที่เป็นโพลาร์

วิธีการทำให้มองเห็นสาร (visualization method) :

ถ้าสารที่แยกออกมาแล้วไม่มีสี จะต้องนำไปทำปฏิกริยากับรีเอเจนต์จำเพาะต่อสารนั้น ๆ เพื่อให้เกิดสีขึ้นมาและสามารถมองเห็นได้ เช่นการทำปฏิกริยากับไอโอดีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเหลืองหรือน้ำตาล สีนี้ไม่ถาวร เมื่อไอโอดีนระเหิด (sublime) ออกไปจากแผ่นธินแลย์สีก็จะจางลง ดังนั้นเมื่อเกิดสีแล้วให้รีบวงตำแหน่งของสารด้วยดินสอไว้ทันที สารประกอบอินทรีย์ส่วนใหญ่จะเกิดปฏิกริยากับไอโอดีนยกเว้นไฮโดรคาร์บอนที่อิ่มตัวและอัลคิลฮาไลด์ (alkyl halide)

อีกวิธีหนึ่งก็โดยการส่องดูด้วยหลอดแสง UV ในที่มืด สารที่แยกถ้ามีคุณสมบัติในการดูดแสงช่วง UV ก็จะเรืองแสงวาวจนเห็นได้ชัด

วิธีที่สามเป็นการใส่อินดิเคเตอร์เรืองแสงได้ลงไปในตัวดูดซับที่ฉาบบนแผ่นธินแลย์ โดยมากใช้สารผสมระหว่างซิงค์ และแคดเมี่ยมซัลไฟด์ ซึ่งเมื่อนำไปส่องดูภายใต้แสง UV แผ่นธินแลย์ทั้งแผ่นจะเรืองแสง ส่วนสารที่แยกออกมาจะเห็นเป็นจุดสีดำ

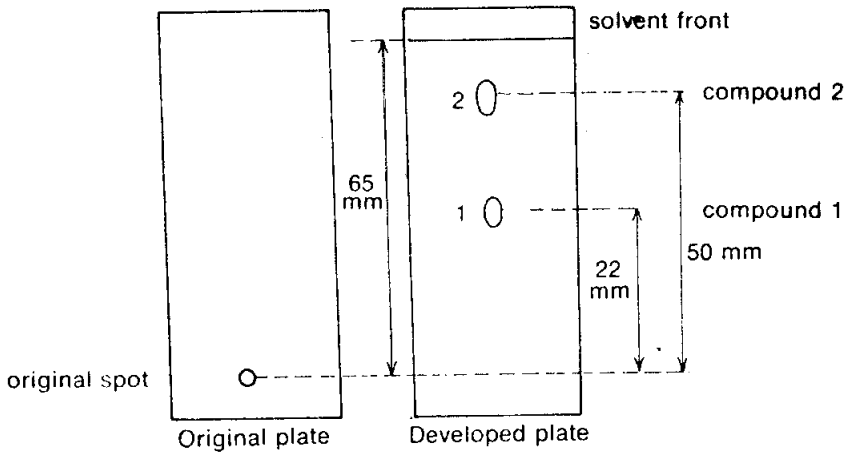
นอกจากนี้ก็ยังมีวิธีการที่จำเพาะสำหรับหมู่ฟังก์ชั่นนัลแต่ละหมู่ เช่น การฉีดพ่นสารอัลคิลฮาไลด์บนแผ่นธินแลย์ด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเจือจางได้เป็นซิลเวอร์ฮาไลด์ เมื่อถูกแสงสารนี้จะสลายตัวกลายเป็นซิลเวอร์เห็นเป็นจุดสีดำ หรือการฉีดพ่นสารอินทรีย์ด้วยกรดซัลฟิวริคเข้มข้น แล้วอบที่อุณหภูมิ 110°ซ เพื่อให้ถูกเผาไหม้โดยสมบูรณ์เห็นเป็นจุดสีดำ หรือการฉีดพ่นสารพวกกรดอะมิโนต่าง ๆ ด้วยนินไฮดรินรีเอเจนต์ ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงที่มองเห็นชัด ฯลฯ เป็นต้น (ดูรูปที่ 6.15)

ค่า R_f :

คำว่า R_f ย่อมาจาก ratio of front คิดได้โดย

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย}}$$

ค่า R_f ของสารหนึ่งภายใต้สภาวะเดียวกันจะมีค่าคงที่ ซึ่งค่าขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของสารนั้น ๆ สภาวะเดียวกันในที่นี้รวมถึงระบบตัวทำละลาย ตัวดูดซับที่ใช้ ความหนาของแผ่นธินแลย์ และปริมาณสารที่หยดลงบนแผ่นธินแลย์ ฯลฯ เมื่อหาค่า R_f ออกมาแล้ว ถ้าต้องการบ่งให้ชัดลงไปว่าเป็นสารชนิดนั้น ๆ ควรจะทำการวิเคราะห์แบบอื่น เพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมและสนับสนุนว่าเป็นสารนั้นจริง เพราะสารสองชนิดอาจให้ค่า R_f ออกมาเท่ากันได้ เหมือนกับที่สารสองชนิดอาจมีจุดหลอมเหลวเท่ากันได้



R_f (compound 1) = $\frac{22}{65}$ = 0.34 R_f (compound 2) = $\frac{50}{65}$ = 0.77

รูปที่ 6.15 การคำนวณหาค่า R_f

ประโยชน์ของธินแลย์โครมาโตกราฟีในทางเคมีอินทรีย์ :

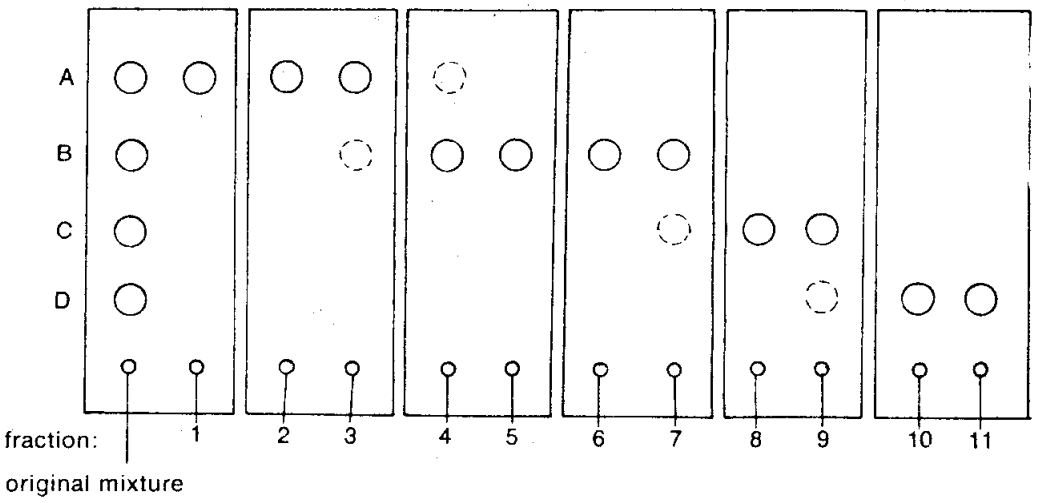
1. วิธีการนี้บอกได้ว่าสารประกอบสองชนิดเหมือนกันทุกอย่าง (identical) หรือไม่ โดยพิจารณาจากค่า R_f บนแผ่นธินแลย์เดียวกัน ค่า R_f ที่เท่ากันแสดงว่าสารสองชนิดนั้นเหมือนกันทุกอย่าง

2. ใช้ตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบในสารผสม โดยดูว่าได้จุดของสารออกมากี่จุด ได้หนึ่งจุดแสดงว่าสารตัวอย่างนั้นประกอบด้วยสารเพียงชนิดเดียว ถ้าได้หลายจุดแสดงว่าสารตัวอย่างเป็นของผสม

3. ใช้ตรวจหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี อาศัยหลักการดังได้กล่าวไว้แล้ว (หน้า 219) โดยให้ตัวดูดซับที่ฉาบบนแผ่นธินแลย์เป็นชนิดเดียวกันกับตัวดูดซับที่จะใช้ในคอลัมน์ วิธีนี้สะดวกรวดเร็ว ใช้สารปริมาณน้อย และประหยัดเวลา

4. ใช้ติดตามผลการแยกของคอลัมน์โครมาโตกราฟี (ดูรูปที่ 6.16)

ตัวทำละลายชนิดหนึ่งสามารถแยกของผสมออกมาได้เป็น 4 ชนิด คือ สาร A, สาร B, สาร C และสาร D เมื่อนำตัวทำละลายนี้ไปชะสารออกจากคอลัมน์ เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด 11 แฟรคชั่น ๆ ละ 15 มิลลิลิตร นำแต่ละแฟรคชั่นไปทำธินแลย์โครมาโตกราฟี ผลปรากฏมาดังรูป 6.16 แฟรคชั่น 1-3 มีสาร A,แฟรคชั่น 4-7 มีสาร B,แฟรคชั่น 8 และ 9 มีสาร C,แฟรคชั่น 10 และ 11 มีสาร D.แฟรคชั่น 3, 4, 7 และ 9 มีการปลอมปน (contamination) ออกมาบ้าง



รูปที่ 6.16 การใช้ธินแลย์โครมาโตกราฟีติดตามผลการแยกของคอลัมน์โครมาโตกราฟี

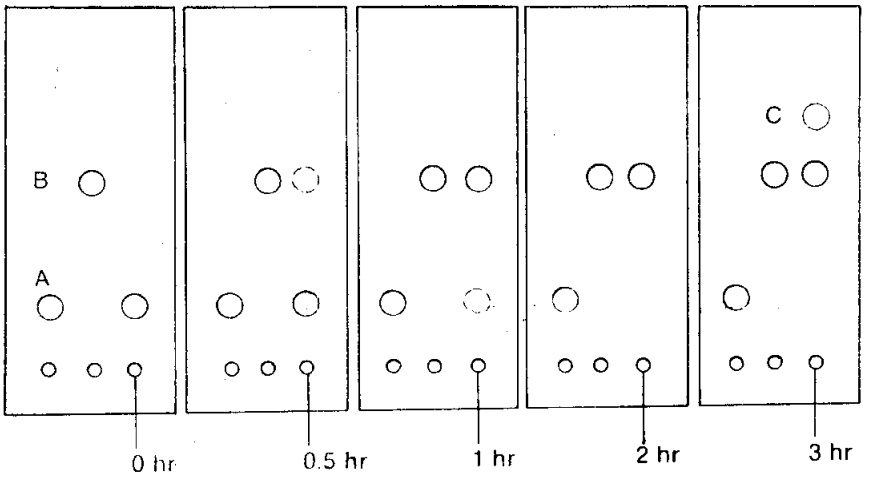
5. ตรวจสอบประสิทธิภาพการแยก การสกัด การตกผลึก โดยดูผลบนแผ่นธินแลย์ ถ้าได้จุดเดียวก็แสดงว่าสารนั้นบริสุทธิ์

6. ใช้ติดตามความก้าวหน้าของปฏิกริยา โดยนำตัวอย่างสารจากหลอดทดลองที่เวลาต่าง ๆ กันของการเกิดปฏิกริยาไปทำธินแลย์โครมาโตกราฟี ผลเป็นดังรูป 6.17

ปฏิกริยาที่กำลังติดตามเป็นการเปลี่ยนสาร A ไปเป็นสาร B จากผลของธินแลย์โครมาโตกราฟีที่ได้ทำให้ทราบว่า ที่เวลาเริ่มต้นมีแต่สาร A เกิดปฏิกริยาเปลี่ยนไปเป็นสาร B ได้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นไปจะเริ่มมีสาร C เกิดขึ้น ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกริยานี้คือ 2 ชั่วโมง

เปเปอร์โครมาโตกราฟี (paper chromatography)

หลักการส่วนใหญ่สัมพันธ์กันกับธินแลย์โครมาโตกราฟี เป็นโครมาโตกราฟีแบบแยกส่วนระหว่างของเหลว-ของเหลว ถึงแม้เปเปอร์โครมาโตกราฟีจะใช้กระดาษซึ่งก็คือเซลลูโลสเป็นตัวค้ำจุน แต่เซลลูโลสมิได้ทำหน้าที่เป็นส่วนคงที่ เซลลูโลสจะดูดน้ำจากบรรยากาศ (atmosphere) โดยเฉพาะบรรยากาศที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำสามารถดูดน้ำได้ถึง 22% น้ำที่เกาะอยู่กับเซลลูโลสนี้เองจะทำหน้าที่เป็นส่วนคงที่ เมื่อพิจารณาระบบตัวทำละลายที่ใช้สำหรับเปเปอร์โครมาโตกราฟีจะเห็นว่าส่วนใหญ่มีน้ำเป็นองค์ประกอบเสมอ ทั้งนี้ เพื่อให้เซลลูโลสอิ่มตัวด้วยน้ำตลอดเวลา ดังนั้นการแยกโดยเปเปอร์โครมาโตกราฟีนี้ สารที่ละลายได้ดีในน้ำหรือสารที่มีโอกาสสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำจะมีการเคลื่อนที่ช้า วิธีนี้เหมาะในการแยกสารที่มีความเป็นโพลาร์ เช่น น้ำตาล



รูปที่ 6.17 การติดตามปฏิกริยาโดยใช้ธินแลย์โครมาโตกราฟี

กรดอะมิโน รงควัตถุธรรมชาติ (natural pigments) ค่า R_f ที่ได้บนแผ่นกระดาษนั้นเชื่อถือได้เป็นอย่างดี เพราะกระดาษมีโครงสร้างที่เป็นระเบียบดี การวัดระยะทางที่เคลื่อนที่วัดจากขอบบนหรือต้าแหน่งสูงสุดของจุดสารมากกว่าที่จะวัดจากจุดกึ่งกลางเหมือนในธินแลย์โครมาโตกราฟี

การทดลองที่ 6.1 การแยกฮีโมโกลบินและ 2, 4-dinitrophenylaspartic acid โดยใช้ sephadex G-25

หลักการ (หน้า 202)

สารเคมี sephadex G-25

คอลัมน์ขนาด 20 ซม.x1 ซม.

*ฮีโมโกลบิน (น้ำหนักโมเลกุล 66,000)

2, 4-dinitrophenylaspartic acid (น้ำหนักโมเลกุล 299)

NaCl 10 กรัม/ลิตร

วิธีการ แช่ sephadex G-25 4 กรัมในสารละลาย NaCl ตั้งทิ้งไว้พร้อมกับคนไปด้วยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคเจลเกิดการบวมน้ำ เมื่อครบกำหนดเวลาให้เทสารแขวนลอยเจลลงในคอลัมน์จนได้ขนาดแท่งเจล 18 ซม.x1 ซม. ตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้เพื่อให้อนุภาคเจลตกลงมาและมีการจัดตัวที่ดี

ปิเปตต์ 0.5 มิลลิลิตรของ สารผสมระหว่างฮีโมโกลบินและ 2, 4-dinitrophenylaspartic acid ที่ pH เป็นกลาง ใส่ลงในคอลัมน์แล้วชะด้วยสารละลาย NaCl เก็บแฟรคชั่นละ 3 มิลลิลิตร จนกระทั่ง 2, 4-dinitrophenylaspartic acid ถูกชะออกมาหมด วัดการดูดแสงที่ 400 นาโนเมตร (2, 4-dinitrophenylaspartic acid) และการดูดแสงที่ 555 นาโนเมตร (ฮีโมโกลบิน) ของแต่ละแฟรคชั่น นำผลที่ได้ไป ขียนกราฟพร้อมทั้งบอกด้วยว่าสารทั้งสองออกมาที่แฟรคชั่นใด void volume ของคอลัมน์นี้เป็นเท่าใด

การทดลองที่ 6.2 การแยกเกลือออกจากสารละลายโปรตีนโดยใช้ sephadex G-25

หลักการ โปรตีนเป็นสารโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนตัวออกจากคอลัมน์ sephadex G-25 หรือ sephadex G-50 ได้ก่อน ส่วนเกลือเป็นสารโมเลกุลเล็กจะเสียเวลาในการผ่านเข้าไปในอนุภาคเจล จึงออกมาจากคอลัมน์ได้ช้า วิธีการนี้ใช้แทนวิธีการไดอะไลซีส (dialysis) ได้

สารเคมี sephadex G-25

คอลัมน์ขนาด 20 ซม.x1 ซม.

ฮีโมโกลบิน (เหมือนการทดลอง 6.1)

NaCl 10 กรัม/ลิตร

วิธีการ เตรียมคอลัมน์ sephadex G-25 เหมือนการทดลอง 6.1 ปิเปตต์ 4 มิลลิลิตรของสารผสมระหว่างฮีโมโกลบินและน้ำเกลือใส่ลงในคอลัมน์ ปล่อยให้สารผสมไหลลงสู่คอลัมน์จนเกือบหมด ทำการชะด้วยน้ำกลั่น เก็บแฟรคชั่นละ 3 มิลลิลิตรจนกระทั่ง NaCl ถูกชะออกมาหมด วัดการ

ดูดแสงของธีโมโกลบินที่ 555 นาโนเมตร และหาปริมาณ Na^+ หรือ Cl^- ในแต่ละแฟรคชั่น โดยวิธีทางเคมี ให้บอกว่าสารทั้งสองนี้ถูกชะออกมาในแฟรคชั่นที่เท่าใด

การทดลองที่ 6.3 การแยกรงควัตถุในใบหญ้าโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต

หลักการ ทำการสกัดใบหญ้าด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วนำแท่งซอล์คที่ใช้เขียนกระดานจุ่มลงไปในสารละลายเข้มข้นของรงควัตถุที่สกัดได้ ของเหลวจะซึมขึ้นไปตามแท่งซอล์คโดย capillary action เมื่อเกิดการแยกชั้นจะเห็นเป็นแถบสีต่าง ๆ บนแท่งซอล์ค คลอโรฟิลล์สีเขียว แซนโตฟิลล์สีเหลือง และคาโรตีนสีส้ม

สารเคมี ใบหญ้า
ที่บดยา
แท่งซอล์ค
อะซีโตนหรือเอธานอล

วิธีการ ใช้กรรไกรตัดหญ้าให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปบดกับอะซีโตนหรือเอธานอลในที่บดยา เพื่อสกัดสารออกมาพยายามให้ได้สารละลายที่เข้มข้นของรงควัตถุ กรองหรือหมุนเวี่ยงเอากากทิ้งไป ใช้ของเหลวสีเขียวเข้มที่ได้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีคเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้ววางตั้งแท่งซอล์คในแนวดิ่งลงตรงกลางบีคเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้สารแยกตัวออกจากกันเมื่อเสร็จสิ้นการแยกให้บอกชนิดของรงควัตถุในใบหญ้า

การทดลองที่ 6.4 การแยกรงควัตถุในใบไม้โดยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ

หลักการ (หน้า 199)

สารเคมี คอลัมน์ขนาด 20 ซม.x1 ซม.
ใบผักโขมสด ๆ (fresh spinach leaves)
อะลูมินา
แคลเซียมคาร์บอเนต
ซูโครส หรือ icing sugar
Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ (anhydrous)
ปิโตรเลียมอีเธอร์ (จุดเดือด 60°-80°ซ)
เมธานอล
เบนซีน
เครื่องปั่น

วิธีการ **การสกัด** : ปั่นใบผักโขมในเครื่องปั่น แล้วสกัดโดยการเขย่ากับตัวทำละลายผสม ปิโตรเลียมอีเธอร์ : เมธานอล : เบนซีน (45 : 15 : 5) กรองเอาส่วนที่เป็นกากทิ้งไปเก็บฟิลเตรทไว้ ล้างฟิลเตรทด้วยน้ำ 4 ครั้ง เพื่อขจัดเมธานอล ห้ามเขย่าแรง ๆ เพราะจะเกิดเป็นอิมัลชั่น เติม Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำลงไปเพื่อดูดน้ำแล้วกรองออก นำไประเหยในตู้ควันเพื่อลดปริมาตร

การเตรียมคอลัมน์ : บรรจุตัวดูดซับสามชนิดต่อไปนี้ลงในคอลัมน์เดียวกันโดยใช้ปิโตร-เลียมอีเธอร์เป็นตัวทำละลาย ก) อะลูมินาสูง 5 ซม. ข) แคลเซียมคาร์บอเนตสูง 7 ซม. ค) ซูโครสสูง 7 ซม. ตัดกระดาษกรองให้เส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าปากคอลัมน์เล็กน้อย นำไปสอดคั่นระหว่างตัวดูดซับแต่ละชนิด อาจต้องทำการซัคชั่น (suction) เบา ๆ เพื่อให้ตัวดูดซับในคอลัมน์จัดตัวได้ดีขึ้น ล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสมเบนซีน : ปิโตรเลียมอีเธอร์ (1 : 4) หลาย ๆ ครั้ง

การแยกและการชะ : ใส่ของเหลวที่สกัดได้ลงไปบนผิวหน้าคอลัมน์ ของเหลวนั้นจะค่อย ๆ ซึมลงสู่แท่งตัวดูดซับในคอลัมน์จนเกือบจะหมด เติมตัวทำละลายผสมเบนซีน : ปิโตรเลียมอีเธอร์ (1 : 4) ถ้าอัตราการไหลช้าเกินไปให้อัดแรงดันเบา ๆ (apply gentle pressure) ที่ปากคอลัมน์ เก็บแฟรคชั่นแล้วนำไปวัดการดูดแสง

การทดลองที่ 6.5 การแลกเปลี่ยนประจุบวกระหว่างเรซินกับ NaCl

หลักการ (หน้า 200)

สารเคมี เรซินที่เป็นกรดแก่

เรซินที่เป็นกรดอ่อน

NaCl 10 กรัม/ลิตร

NaOH 0.1 M

คอลัมน์ขนาด 20 ซม.x1 ซม.

วิธีการ บรรจุเรซินที่เป็นกรดแก่ 5 กรัมลงในคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่ง pH ของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เท่ากับ pH ของน้ำกลั่น ปิเปตต์ 10 มิลลิลิตรของ NaCl ใส่ลงไปบนผิวหน้าคอลัมน์ เมื่อ NaCl ซึมลงสู่คอลัมน์จวนจะหมด ทำการชะสารโดยใช้น้ำจนกระทั่งสารละลายที่ออกจากคอลัมน์มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับ 0.1 M NaOH คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ Na^+ ที่ถูกแลกเปลี่ยน

ทำการทดลองซ้ำกับเรซินที่เป็นกรดอ่อน เปรียบเทียบผลระหว่างเรซินสองชนิดนี้

การทดลองที่ 6.6 การแยกกรดอะมิโนโดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

หลักการ (หน้า 200)

สารเคมี คอลัมน์ขนาด 20 ซม.x1.5 ซม.

เรซินที่เป็นกรดแก่

HCl 4 M

HCl 0.1 M

ใยแก้ว

*สารผสมกรดอะมิโน

Tris-HCl buffer 0.2 M pH 8.5

NaOH 0.1 M

กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร

Acetate buffer 4 M pH 5.5

*นินไฮดรินรีเอเจนต์ในบัฟเฟอร์

Methyl cellosolve (ethylene glycol monomethyl ether)

50% เอธานอล

นินไฮดริน 0.2% ในอะซีโตน

ตู้อบอุณหภูมิ 105°ซ

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ **การเตรียมเรซิน** : แช่เรซินใน 4 M HCl (15-30 มิลลิลิตรต่อเรซินแห้ง 1 กรัม) คนบา ๆ จนกระทั่งเรซินบวมน้ำ รอให้เรซินตกลงมาแล้วเทกรดทิ้งไป ล้างด้วย 0.1 M HCl อีกครั้งหนึ่ง แล้วทำเป็นสารแขวนลอยใน 0.1 M HCl เช่นกัน นำไปบรรจุลงในคอลัมน์

การชะกรดอะมิโนออกจากคอลัมน์ : ปิเปตต์สารผสมกรดอะมิโน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ เมื่อสารละลายซึมเข้าสู่คอลัมน์เกือบหมดให้เติม 0.2 มิลลิลิตรของ 0.1 M HCl ทำเช่นนี้อีกสองครั้ง แล้วเติม 2 มิลลิลิตรของ 0.1 M HCl จากนั้นให้ต่อคอลัมน์เข้ากับภาชนะที่บรรจุ 0.1 M HCl ได้ 500 มิลลิลิตร (อาจใช้กรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตรเป็น reservoir) ปรับระดับกรวยแยกให้ได้อัตราการไหลประมาณ 1 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาทั้งหมด 40 แฟรคชั่น ๆ ละ 2 มิลลิลิตร ทำการตรวจสอบกรดอะมิโนทุก ๆ ห้าแฟรคชั่น โดยการหยดสารตัวอย่างของแต่ละแฟรคชั่นลงบนกระดาษกรอง นำกระดาษกรองไปจุ่มนินไฮดรินรีเอเจนต์ในอะซีโตนแล้วอบที่ 105°ซ ถ้าได้จุดสีม่วงบนกระดาษกรองหมายความว่า มีกรดอะมิโนในสารตัวอย่างจากแฟรคชั่นนั้น ๆ เมื่อกรดอะมิโนตัวแรกถูกชะออกมาหมดแล้วให้เอากรวยแยกที่บรรจุ 0.1 M HCl ออกจากปากคอลัมน์ รอให้ปริมาตร 0.1 M HCl เหนือคอลัมน์ลดลงมาจนเกือบจะถึงผิวหน้า

คอลัมน์ เติม 2 มิลลิลิตรของ 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.5 ลงในคอลัมน์ ต่อกรวยแยกที่บรรจุบัฟเฟอร์เข้ากับปากคอลัมน์ทำการชะไปเรื่อยจนกระทั่งกรดอะมิโนตัวที่สามออกมาจากคอลัมน์

การตรวจหากรดอะมิโนในแต่ละแฟรคชั่น : ปรับ pH ของแต่ละแฟรคชั่นให้เป็น 5.0 โดยการเติมกรดหรือด่าง 2-3 หยด เติมนินไฮดรินรีเอเจนต์ในบัฟเฟอร์ 0.2 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็น เติม 3 มิลลิลิตรของ 50% เอธานอล ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปอ่านค่าการดูดแสงที่ 570 นาโนเมตร จัดทำหลอดเปรียบเทียบและหลอดมาตรฐานที่เหมาะสมด้วย เขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดอะมิโนในแต่ละแฟรคชั่นกับปริมาตรที่ถูกชะออกมา

อยากทราบว่ากรดอะมิโนถูกชะออกจากคอลัมน์เรียงตามลำดับอย่างไร? ทำไมจึงเป็นเช่นนั้น?

ตารางที่ 6.9 ค่า pK_a และ pI ของกรดอะมิโนทั้ง 3 ตัว

กรดอะมิโน	pK_{a_1}	pK_{a_2}	pK_{a_3}	pI
aspartic acid	2.0	3.9	10.0	2.9
histidine	1.8	6.0	9.2	7.6
lysine	2.2	9.2	10.8	10.0

การทดลองที่ 6.7 การวิเคราะห์น้ำตาลในนมโดยเปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบ descending

หลักการ ตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมด้วยกรด trichloroacetic แล้วหมุนเหวี่ยงเอาตะกอนทิ้งไป นำส่วนใสมาทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี ใช้ aniline-diphenylamine reagent ในการทำให้มองเห็นจุดของกรดอะมิโน

สารเคมี อุปกรณ์การทำโครมาโตกราฟีแบบ descending

กระดาษโครมาโตกราฟีวัตต์แมนเบอร์ 1

ตัวทำละลาย ไอโซโปรปานอล : น้ำ (4 : 1)

*aniline-diphenylamine reagent

*สารละลายมาตรฐานของน้ำตาล

น้ำนม

กรด trichloroacetic 100 กรัม/ลิตร

เครื่องเป่าผม

เครื่องฉีดพ่นรีเอเจนต์

ตู้อบอุณหภูมิ 100°ซ

วิธีการ **การตกตะกอนโปรตีน** : ปิเปตต์น้ำนม 2 มิลลิลิตรใส่ลงในน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เติมกรด trichloroacetic 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีน นำส่วนใสไปทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี

การทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี : หยดสารต่อไปนี้ลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี

1. สารละลายมาตรฐานแลคโตส
2. ส่วนใสของน้ำนมที่แยกโปรตีนออกแล้ว
3. สารละลายมาตรฐานแลคโตส+ส่วนใสของน้ำนมที่แยกโปรตีนออกแล้ว
4. สารละลายมาตรฐานกลูโคส
5. สารละลายมาตรฐานกาแลคโตส
6. สารละลายมาตรฐานไรโบส์
7. สารละลายมาตรฐานไซโลส
8. สารละลายมาตรฐานฟรุคโตส
9. สารละลายมาตรฐานแรมโนส (rhamnose)
10. สารละลายมาตรฐานกรดกลูคิวโรนิค (glucuronic acid)
11. สารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน (glucosamine)

เมื่อสารแห้งดีแล้วนำไปดิวิลอปแบบ descending ปล่อยให้ตัวทำละลายไหลจากบนลงล่าง ตั้งทิ้งไว้ค้างคืน วันรุ่งขึ้นนำกระดาษออกมาทำให้แห้งในตู้ควัน แล้วฉีดพ่นกระดาษโครมาโตกราฟีด้วย aniline-diphenylamine reagent ในตู้ควัน นำไปอบ 100°ซ วัดระยะทางเพื่อหาค่า R_f

การทดลองที่ 6.8 การวิเคราะห์น้ำตาลในน้ำผลไม้โดยธินแลย์โครมาโตกราฟี

หลักการ (หน้า 216)

สารเคมี *แผ่นธินแลย์ที่ฉาบด้วยซิลิกาเจล G

ภาชนะที่จะใช้ในการดิวิลอปแผ่นธินแลย์

ตัวทำละลายผสม เอธิลอะซีเตท : ไอโซโปรปานอล : น้ำ : พิริดีน (26 : 14 : 7 : 2)

น้ำผลไม้คั้นสด ๆ น้ำมะนาว น้ำส้ม น้ำองุ่น น้ำสับปะรด

เอธานอล (absolute ethanol)

aniline-diphenylamine reagent เหมือนการทดลองที่ 6.7

สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลต่าง ๆ เหมือนการทดลองที่ 6.7

เครื่องเป่าผม

เครื่องฉีดพ่นรีเอเจนต์

ตู้อบอุณหภูมิ 105°ซ

วิธีการ ปิเปตต์น้ำผลไม้มา 1 มิลลิลิตร เติมเอธานอล 3 มิลลิลิตร เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีน นำส่วนใสไปหยดลงบนแผ่นธินแลย์ หยดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลต่าง ๆ ด้วย แล้วดิวิลอปในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอตัวทำละลาย ต้องคอยเฝ้าดูระวังอย่าให้ตัวละลายขึ้นไปจนถึงขอบบน เทคนิคของธินแลย์โครมาโตกราฟีนี้ใช้เวลาในการดิวิลอปไม่นานเหมือนกับเปเปอร์โครมาโตกราฟี หยิบแผ่นธินแลย์ออกมาทำให้แห้ง ฉีดพ่นด้วย aniline-diphenylamine reagent สังเกตสีของน้ำตาลแต่ละตัวที่ปรากฏออกมาด้วย วัดค่า R_f รายงานเกี่ยวกับน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำผลไม้แต่ละชนิด

การทดลองที่ 6.9 การแยกลิปิดโดยธินแลย์โครมาโตกราฟี

หลักการ ลิปิดเป็นชีวโมเลกุลที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อทำการแยกลิปิดออกเป็นหมวดหมู่โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายได้แล้ว นำไปวิเคราะห์โดยธินแลย์โครมาโตกราฟี ตัวทำละลายนอน-โพลาร์จะแยกลิปิดที่เป็นกลาง ส่วนตัวทำละลายโพลาร์จะแยกลิปิดที่มีประจุ ต้องเลือกตัวดูดซับและตัวทำละลายให้เหมาะสมสำหรับลิปิดแต่ละประเภท

สารเคมี แผ่นธินแลย์ซิลิกาเจล G

ภาชนะที่จะใช้ในการดิวิลอปแผ่นธินแลย์

ตัวทำละลายผสม ปิโตรเลียมอีเธอร์: ไดเอธิลอีเธอร์ : กรด glacial acetic 80 : 20 : 1

n-hexadecane และ n-ocfadecane

โคเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol acetate, cholesterol oleate และ cholesterol stearate)

เอสเทอร์ของไวตามิน A (vitamin A palmitate)

ไตรแอซิลกลีเซอรอล (glycerol trioleate, glycerol tristearate และ glycerol tripalmitate)

กรดไขมันอิสระ (oleic acid, palmitic acid, stearic acid)

สเตียรอล (โคเลสเตอรอล)

น้ำมันที่พบตามธรรมชาติ (น้ำมันมะกอก น้ำมันตับปลา)

2', 7'-dichlorofluorescein 2 กรัม/ลิตรของ 95% EtOH

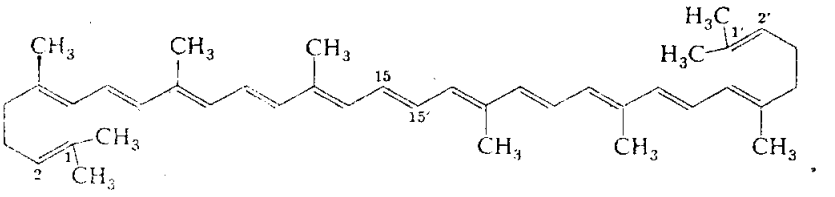
50% H_2SO_4

ตู้อบ 110°ซ

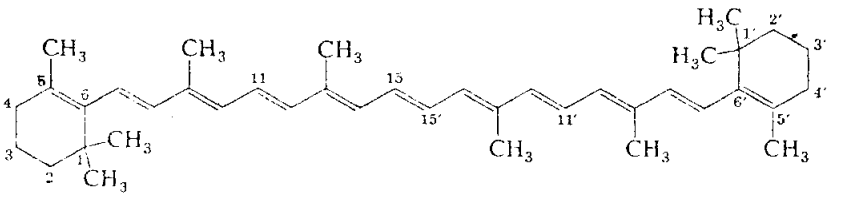
หลอดแสง UV

วิธีการ การเตรียมแผ่นธินแลย์ : ทำความสะอาดแผ่นกระจกด้วยเอธานอล แล้วนำไปฉาบด้วยซิลิกาเจล G ให้หนาประมาณ 0.25 มิลลิเมตร อบที่ 110°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็น แล้วหยดสารละลายลิปิด 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในตัวทำละลายลงไป นำไปดิวิลอปในภาชนะที่มีตัวทำละลายผสมปิโตรเลียมอีเธอร์ : ไดเอธิลอีเธอร์ : กรด glacial acetic 80 : 20 : 1 เสร็จแล้วฉีดพ่นด้วยสารละลาย dichlorofluorescine เมื่อแห้งดีแล้วให้นำไปส่องดูจุดต่าง ๆ ด้วยหลอดแสง UV ในที่มืด จะเห็นจุดเรืองแสงสีเขียวบนพื้นดำ ฮ้าจจะใช้ 50% H_2SO_4 ฉีดพ่นแผ่นธินแลย์ก็ได้ แล้วนำไปอบ 110°ซ 10 นาที แต่วิธีนี้ต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ

การทดลองที่ 6.10 การแยกบีต้าคาโรตีนและไลโคปีน (lycopene) โดยธินแลย์โครมาโตกราฟี



Lycopene



β-Carotene

หลักการ คาโรตินอยด์เป็นรงควัตถุธรรมชาติที่พบได้มากทั้งในพืชและสัตว์ ตัวอย่างของคาโรตินอยด์ที่เป็นไฮโดรคาร์บอนคือ บีต้าคาโรตีนและไลโคปีน คาโรตีนเป็นรงควัตถุสีเหลืองพบได้ในแครอต (carrot) ส่วนไลโคปีนเป็นรงควัตถุสีแดงพบได้ในมะเขือเทศ

ใช้เอธานอลดูดน้ำออกจากมะเขือเทศเข้มข้นหรือแครอตเข้มข้น (tomato หรือ carrot paste) ก่อน เพื่อที่จะสกัดต่อไปโดยเมธิลีนคลอไรด์ (อาจใช้เอธิลีนคลอไรด์หรือคลอโรฟอร์มแทน) จะได้ให้ผลดี เมธิลีนคลอไรด์ไม่ปนเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ ดังนั้นการแยกสารโดยตัวทำละลายนี้จึงไม่ค่อยมีประสิทธิภาพถ้าไม่ขจัดน้ำออกก่อนที่จะสกัด

สารเคมี มะเขือเทศหรือแครอตเข้มข้น

95% เอธานอล

เมธิลีนคลอไรด์ (จุดเดือด 41°ซ) หรือเอธิลีนคลอไรด์ (จุดเดือด 82-84°ซ) หรือคลอโรฟอร์ม

เครื่องมือในการ reflux

สารละลาย NaCl ที่อิ่มตัว
Na_2SO_4 ที่ปราศจากน้ำ
สไลด์ธินแลย์ที่ฉาบด้วยซิลิกาเจล-G
สารละลายมาตรฐานบีต้าคาโรตีนและไลโคปีน
เบนซีน
ไซโคลเฮกเซน
ภาชนะบรรจุเกล็ดไอโอดีนพร้อมฝาปิด

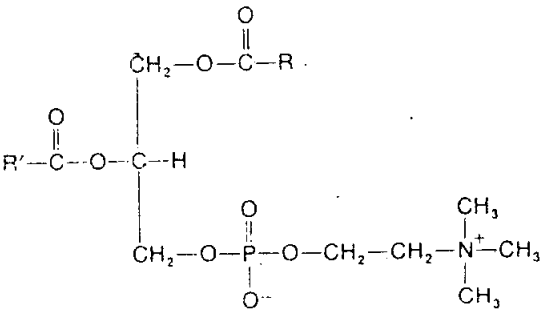
วิธีการ นำมะเขือเทศเข้มข้นหรือแครอตเข้มข้น 5 กรัม เติม 95% เอธานอล 10 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดอ่อน ๆ เป็นเวลา 5 นาทีในตู้ดูดควัน กรองผ่านกรวยกรอง ใช้แท่งแก้วกดส่วนที่เป็นกากกับด้านข้างกรวยกรอง เพื่อให้เอธานอลออกมามากที่สุดเท่าที่จะทำได้ นำส่วนกากไปสกัดด้วยเมธิลีนคลอไรด์ 10 มิลลิลิตร ในเครื่องมือ reflux 3-4 นาที ตัวทำละลายนี้เป็นอันตรายต้องระวังเป็นพิเศษ อย่าให้ไอของสารนี้ฟุ้งกระจายอยู่ในห้องปฏิบัติการ กรองเพื่อเก็บฟิลเตรทสีเหลืองไว้ นำกากไปสกัดด้วยวิธีเดิมอีก 3 ครั้ง รวบรวมฟิลเตรทสีเหลืองที่ได้จากการสกัดด้วยเมธีลีนคลอไรด์ทุกครั้งไว้ด้วยกัน

นำฟิลเตรทที่ได้ทั้งหมด (4 ครั้ง) ไปใส่ในกรวยแยก เติมสารละลาย NaCl ที่อิ่มตัวลงไป 3-4 มิลลิลิตร เพื่อให้เห็นการแยกชั้นชัดเจนยิ่งขึ้น เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ชั้นของเมธิลีนคลอไรด์ซึ่งความหนาแน่นมากกว่าน้ำและมีคาโรตินอยด์ปนอยู่จะอยู่ข้างล่าง ส่วนชั้นน้ำจะอยู่ข้างบน กรองชั้นของเมธิลีนคลอไรด์ (ชั้นล่าง) ผ่านกรวยกรองที่มี Na_2SO_4 อยู่บนสำลีเพื่อขจัดน้ำ นำฟิลเตรทครั้งสุดท้ายนี้ไประเหยในตู้ดูดควันเพื่อลดปริมาตรลง แล้วหยดลงบนแผ่นธินแลย์ควบคู่ไปกับบีต้าคาโรตีนและไลโคปีนมาตรฐาน นำไปดิวิลอปในภาชนะที่มีตัวทำละลายผสมเบนซีน-ไซโคลเฮกเซน (1 : 9) วัดระยะทาง หาค่า R_f จากผลที่ได้บนแผ่นธินแลย์ ถ้าสีของคาโรตินอยด์บนแผ่นธินแลย์จางไปก็ให้นำไปทำปฏิกริยากับไอของเกล็ดไอโอดีนในภาชนะที่เตรียมไว้

บอกชื่อสารคาโรตินอยด์ที่พบในมะเขือเทศเข้มข้น ถ้ามีสารคาโรตินอยด์สองชนิดให้เปรียบเทียบค่า R_f ด้วย

การทดลองที่ 6.11 การสกัด การแยกและการวิเคราะห์สารฟอสฟาติดีลโคลีน (phosphatidyl choline) จากไข่แดง

หลักการ ฟอสฟาติดีลโคลีน มีอีกชื่อหนึ่งว่า เลซิธิน (lecithin) เป็นฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์และพืชชั้นสูง โครงสร้างประกอบด้วยกลีเซอรอล ฟอสเฟต กรดไขมัน และโคลีน



โครงสร้างเลซิธิน

ปกติแล้วกรดไขมันที่ตำแหน่งที่ 1 หรือตำแหน่ง α มักจะเป็นกรดไขมันที่อิ่มตัว กรดไขมันที่ตำแหน่งที่ 2 หรือตำแหน่ง β มักจะเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว

ก่อนเริ่มต้นการสกัดให้ใช้อะซิโตนแยกลิปิดที่มีความเป็นโพลาร์น้อย เช่นไตรแอซิลกลีเซอรอล ไขมัน สเตียรอยด์ ตลอดจนรงควัตถุธรรมชาติออกก่อนแล้วจึงทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายผสมเมธานอล : คลอโรฟอร์ม จากนั้นทำโครมาโตกราฟีแบบดูดซับโดยใช้คอลัมน์ของอะลูมินา เพื่อแยกโมโนแอซิลฟอสฟาติดีลโคลีน (monoacyl phosphatidyl choline หรืออีกชื่อหนึ่งว่า lysolecithin) และฟอสโฟแอซิลกลีเซอรอลอื่น ๆ ออกไป เก็บแฟรคชั่นต่าง ๆ แล้วนำไปวิเคราะห์โดยธินแลย์โครมาโตกราฟี

ฟอสโฟแอซิลกลีเซอรอลเป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ตัวนัก เนื่องจากเป็นสารที่มีพันธะคู่ภายในสายไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นขั้นตอนการสกัดและการแยกควรจะทำที่อุณหภูมิต่ำและไม่ให้ถูกกับอากาศ

สารเคมี ไข่ไก่
อะซีโตน
เมธานอล
คลอโรฟอร์ม
สารเลซิธินมาตรฐาน 0.1 กรัม/มล. ของเฮกเซน
แอซิดิคอะลูมินา
ใยแก้ว
กระดาษกรอง
แผ่นธินแลย์ที่ฉาบด้วยซิลิกาเจล-G
คอลัมน์ขนาด 40 ซม.x2 ซม.
หลอด capillary

เครื่องปั่น
กรวยกรอง buchner
อ่างน้ำแข็ง
โรตาเวเปอร์ (rotatory evaporator หรือ rotavapor)
ภาชนะที่ใส่เกล็ดไอโอดีนพร้อมฝาปิด
ภาชนะที่จะใช้ในการดิวิลอปแผ่นธินแลย์
vacuum pump

วิธีการ การสกัดลิปิดที่มีความเป็นโพลาร์จากไข่แดง : ต่อยไข่ 2 ฟองแยกเอาเฉพาะไข่แดงไปใส่ไว้ในเครื่องปั่น เติมอะซีโตนแช่เย็นลงไป 100 มิลลิลิตร ปิดฝาเครื่องปั่นให้ดี ปั่นเป็นเวลา 1 นาที กรองผ่านกรวยกรอง buchner ทิ้งส่วนที่เป็นฟิลเตรทเก็บส่วนที่เป็นกากไปปั่นกับอะซีโตนเย็นในเครื่องปั่นอีกครั้งหนึ่ง กรองแล้วเก็บส่วนกากไว้เช่นเดิม ในส่วนฟิลเตรทที่ทิ้งไปประกอบด้วยลิปิดที่มีความเป็นโพลาร์น้อย เช่น ไตรแอซิลกลีเซอรอล สเตียรอยด์ รงควัตถุ ฯลฯ เป็นต้น

นำส่วนกากไปสกัดด้วยตัวทำละลายผสม MeOH : $CHCl_3$ (1 : 1) ที่แช่เย็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยแช่ภาชนะที่ทำการสกัดไว้ในอ่างน้ำแข็ง คนไปด้วยเป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านกรวยกรอง buchner เช่นเดิม เก็บฟิลเตรทไว้พยายามอย่าให้มีน้ำปน นำส่วนกากไปสกัดแบบเดิมอีกครั้งหนึ่งเก็บฟิลเตรททั้งสองครั้งรวมกันไว้แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้การลดความดันโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า "โรตาเวเปอร์" ลดปริมาตรให้เหลือประมาณ 5-10 มิลลิลิตร เก็บส่วนนี้ไว้ทำคอลัมน์และธินแลย์โครมาโตกราฟีต่อไป

การแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี : ค่อย ๆ เติมตัวดูดซับอะลูมินาที่ชั่งไว้ 30 กรัม ลงใน $CHCl_3$ 100 มิลลิลิตร ทีละน้อย ๆ จนหมด เตรียมคอลัมน์ไว้ให้สะอาดและปราศจากน้ำ รองพื้นส่วนปลายคอลัมน์ด้วยใยแก้วหรือสำลี เติม $CHCl_3$ ลงในคอลัมน์ไว้ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทอะลูมินาใน $CHCl_3$ ลงในคอลัมน์เปิดปลายคอลัมน์ให้มีการไหลของ $CHCl_3$ ตลอดเวลา ชะด้านข้างคอลัมน์ด้วย $CHCl_3$ เมื่ออะลูมินาจัดตัวดีแล้วตัดกระดาษกรองเป็นวงกลมให้เส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าปากคอลัมน์เล็กน้อย วางลงบนผิวหน้าคอลัมน์กันการกระทบกระเทือนบริเวณนี้ ลดปริมาตร $CHCl_3$ ในคอลัมน์ให้อยู่เหนือผิวหน้าคอลัมน์เล็กน้อย ระวังอย่าให้ผิวหน้าคอลัมน์แห้ง ปิเปตต์ฟอสฟาติดีลโคลีนที่สกัดได้ใส่ลงในคอลัมน์ (อย่าลืมแบ่งส่วนหนึ่งไปทำธินแลย์โครมาโตกราฟีด้วย) ปล่อยให้สารนี้ค่อย ๆ ซึมลงสู่แท่งตัวดูดซับ เนื่องจากสารที่สกัดได้มีความหนืดสูงอาจทำให้ตัวทำละลายไหลช้า ถ้าหนืดมากจนกระทั่งตัวทำละลายไม่ไหลเลยให้เติม 0.2 มิลลิลิตรของ $CHCl_3$

อัตราการไหลของ $CHCl_3$ ควรจะประมาณ 10 มิลลิลิตร/นาที เมื่อ $CHCl_3$ ที่เติมไหลลงสู่คอลัมน์เกือบจะหมด เริ่มต้นการชะสารด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้

แฟรคชั่น 1 $CHCl_3$ 40 มิลลิลิตร

แฟรคชั่น 2 $CHCl_3$ 20 มิลลิลิตร (อาจจะใช้ปริมาตรเพียงแค่ชะสารสีเหลืองออกไปจากคอลัมน์จนหมด)

แฟรคชั่น 3 75 มิลลิลิตร $CHCl_3$: MeOH (9 : 1)

แฟรคชั่น 4 50 มิลลิลิตร $CHCl_3$: MeOH (9 : 1)

ทำการระเหยแต่ละแฟรคชั่นในตู้ควันเพื่อให้ปริมาตรลดลง

การวิเคราะห์โดยธินแลย์โครมาโตกราฟี : หยดสารของแต่ละแฟรคชั่นพร้อมทั้งฟอสฟาติดีลโคลีนมาตรฐานและฟอสฟาติดีลโคลีนที่ไม่ผ่านการแยกโดยคอลัมน์ลงไปบนแผ่นธินแลย์มีทั้งหมด 6 จุด แต่ละจุดควรมีเส้นผ่าศูนย์กลาง $\leq$ 3 มิลลิเมตรนำไปจุ่มในภาชนะที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย $CHCl_3$: MeOH : H_2O 65 : 25 : 4 ระดับตัวทำละลายต้องต่ำกว่าระดับของสารที่หยดลงไป วิธีการดิวิลอปนี้เป็นแบบ ascending เมื่อการแยกสิ้นสุดลง ยกแผ่นธินแลย์ออกมาใช้ดินสอขีดบอกระดับการเคลื่อนที่ตัวทำละลายไว้ ทำให้แห้งแล้วนำไปวางในภาชนะที่มีเกล็ดไอโอดีนเพื่อให้มองเห็นตำแหน่งที่สารเคลื่อนที่ขึ้นมา ใช้ดินสอวงตำแหน่งของจุดต่าง ๆ ไว้ อยากทราบว่าฟอสฟาติดีลโคลีนที่บริสุทธิ์ที่สุดอยู่ในแฟรคชั่นที่เท่าใด

การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายฮีโมโกลบิน :
   เตรียมได้โดยการหมุนเหวี่ยงพลาสมา (plasma) ให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน เติมน้ำลงไปในเม็ดเลือดแดงด้วยปริมาตรที่เท่ากัน เม็ดเลือดแดงจะแตกออก นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อตกตะกอน ghost แล้วเก็บส่วนของเหลวมาใช้
2. สารละลายผสมของกรดอะมิโน :
   ละลายกรดแอสปาติค ฮิสติดีนและไลซีนใน 0.1 M HCl ให้ความเข้มข้นเป็น 2 มิลลิกรัม/มล.
3. นินไฮดรินรีเอเจนต์ในบัฟเฟอร์ :
   ละลายนินไฮดริน 20 กรัม และไฮดรินแดนติน (hydrindantin) 3 กรัม ใน methyl cellosolve 750 มิลลิลิตร เติม 250 มิลลิลิตร ของ acetate buffer 4 M pH 5.5 เตรียมใช้ใหม่ ๆ และเก็บในขวดสีชา
4. aniline-diphenylamine reagent :
   ผสม aniline (10 กรัม/ลิตรอะซีโตน) กับ diphenylamine (10 กรัม/ลิตรอะซีโตน) กับ 85% กรดฟอสฟอริคด้วยอัตราส่วน 5 : 5 : 1 เตรียมใช้ใหม่ ๆ สารนี้เป็นอันตรายต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ !
5. สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลต่าง ๆ :
   ละลายน้ำตาลต่อไปนี้ใน 10% ไอโซโปรปานอล ให้มีความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร น้ำตาลแรมโนส แลคโตส ไรโบส ไซโลส กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส กรดกลูคิวโรนิคและกลูโคซามีน
6. แผ่นธินแลย์ที่ฉาบด้วยซิลิกาเจล-G (เฉพาะการทดลองที่ 6.8)
   เตรียมซิลิกาเจล-G ใน 0.02 M sodium acetate นำไปฉาบบนแผ่นกระจกให้มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร อบที่ 105°ซ 30 นาที

คำถามท้ายบท

1. ในการแยก $(NH_4)_2SO_4$ ออกจากสารละลายโปรตีน ท่านคิดว่าควรจะใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบใด?

2. อธิบายความหมายคำว่า void volume ของเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี

3. กำหนดให้ โปรตีน A มีน้ำหนักโมเลกุล 100,000 โปรตีน B มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 โปรตีน C มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 ถ้านำโปรตีน 3 ชนิดนี้ไปแยกโดยใช้หลักการของเจลฟิลเตรชั่น ให้บอกว่าโปรตีนใดถูกชะออกมาก่อนหลังตามลำดับอย่างไร?

4. ถ้าผลธินแลย์โครมาโตกราฟีปรากฏออกมาว่า สารทุกตัวเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทางเท่ากันกับการเคลื่อนที่ของตัวละลาย ท่านจะแก้ปัญหานี้อย่างไร? จงอธิบาย

5. ทำไมไลโคปีนจึงมีค่า R_f ต่ำกว่าบีต้าคาโรตีน?

6. ในตัวทำละลายไซโคลเฮกเซน สารคาโรตินอยด์ให้ค่า R_f ค่าหนึ่ง ถ้าเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเบนซีน : ไซโคลเฮกเซน ให้ทำนายค่า R_f ที่จะเปลี่ยนแปลงไป

7. ทำไมจึงต้องค่อย ๆ ใส่ตัวดูดซับลงในตัวทำละลาย ไม่ควรใส่ตัวทำละลายลงไปในตัวดูดซับ?

8. เปเปอร์โครมาโตกราฟีเป็นโครมาโตกราฟีแบบแยกส่วนระหว่างของแข็ง-ของเหลวใช่หรือไม่? จงอธิบาย

9. การดิวิลอปโครมาโตกราฟีแบบ ascending และ descending ต่างกันอย่างไร?

10. สารชนิดหนึ่งเคลื่อนที่ได้ 6 ซม. ในขณะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 12 ซม. ให้หาค่า R_f

11. ผลจากโครมาโตแกรมปรากฏว่าแยกสารออกมาได้ 2 ชนิด สารหนึ่งเคลื่อนที่ไปได้ 5 ซม. ในขณะที่อีกสารหนึ่งเคลื่อนที่ไปได้ 10 ซม. ระดับตัวทำละลายเป็น 11 ซม. ให้หาค่า R_f ของสารทั้งสอง

12. ซิลิกาเจลและซิลิกาเจล-G ต่างกันอย่างไร?

13. บอกวิธีที่จะทำให้มองเห็นสารลิปิดบนแผ่นธินแลย์มา 2-3 วิธี

14. ขั้นตอนการเตรียมตัวดูดซับในตัวทำละลายเพื่อไปฉาบบนแผ่นธินแลย์ การใช้น้ำและการใช้ $CHCl_3$ เป็นตัวทำละลายนั้นมีวัตถุประสงค์ต่างกันอย่างไร?

15. เพราะเหตุใดจึงไม่ควรเพิ่มโพลาริตีของตัวทำละลายเร็วเกินไปในขั้นตอนการชะสารออกจากคอลัมน์?

16. การที่ผิวหน้าคอลัมน์เอียง มีผลต่อการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีอย่างไรบ้าง?

17. ให้บอกแฟคเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อวิธีการแยกโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

18. ท่านนำอะลูมินาสำหรับฉาบบนแผ่นธินแลย์มาบรรจุลงในคอลัมน์เพื่อทำการแยกสารได้หรือไม่? เพราะเหตุใด?

19. Dowex 50- x2 เหมาะสำหรับการแยกสารชนิดใด? ใช้หลักการของโครมาโตกราฟีแบบไหนในการแยกสารนั้น ๆ

20. ถ้าต้องการเห็นสารน้ำตาลที่เคลื่อนที่ขึ้นมาบนแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟี ท่านจะใช้รีเอเจนต์ชนิดใดในการฉีดพ่นแผ่นกระดาษนั้น