ตอนที่ 1

โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper Chromatography)

1

จุดประสงค์

1. เพื่อศึกษาโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ
2. สามารถใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบกระดาษแยกสารผสม

ทฤษฎี

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการแยกสารประกอบ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาโดยชาวรัสเซียชื่อ Mikhail Tsvet ในปี ค.ศ.1906 โดยเรียกเทคนิคนี้ว่า *โครมาโทกราฟี (chromatography = writing with color)* มาจากภาษากรีก (khroma = สี, graphein = วาดกราฟ, เขียน) เนื่องจากใช้ครั้งแรกในการแยกสารสีของพืช (pigments)

การแยกสารผสมโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีนั้นจะอาศัยการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสสองเฟส คือ *เฟสอยู่กับที่ (stationary phase)* และ *เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)* เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน และมีกลไก (mechanism) ที่เกิดขึ้นในโครมาโทกราฟี 2 กระบวนการ คือ

1. **กระบวนการดูดซับ (adsorption)** กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งที่เรียกว่า *LSC (liquid-solid chromatography)* เช่น อลูมินา ซิลิกาเจล การดูดซับที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับพื้นที่ผิวของของแข็ง

2. **กระบวนการแบ่งส่วน (partition)** กระบวนการนี้เกิดขึ้นเมื่อเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวเรียกว่า *LLC (liquid-liquid chromatography)* การแยกส่วนของสารขึ้นอยู่กับสภาพละลายได้สัมพัทธ์ (relative solubility) ของโมเลกุลต่างๆในของเหลวที่เป็นเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่

เทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งจะทำให้ส่วนผสมของสารตัวอย่างแยกตัวออกจากกันเป็นโซนๆ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการขึ้นมาวิเคราะห์หลายวิธีการด้วยกัน ถ้าจัดแบ่งตามลักษณะของวิธีการทำโครมาโทกราฟี จะแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

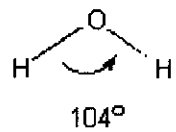
1. **โครมาโทกราฟีแบบแผ่น (plane chromatography)** โครมาโทกราฟีประเภทนี้มีทั้ง*เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว*เรียกว่า LLC, liquid-liquid chromatography เช่น การทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ และ*เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง*เรียกว่า LSC, liquid-solid chromatograpy เช่น การทำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin layer chromatograpy, TLC)

2. **โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography)** การเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ของโครมาโทกราฟีประเภทนี้จะอาศัยแรงโน้วถ่วงของโลก ซึ่งปัจจุบันพัฒนาขึ้นโดยใช้ความดันช่วย สามารถใช้ได้ทั้ง*เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลว (LLC)* และ*เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็ง (LSC)*

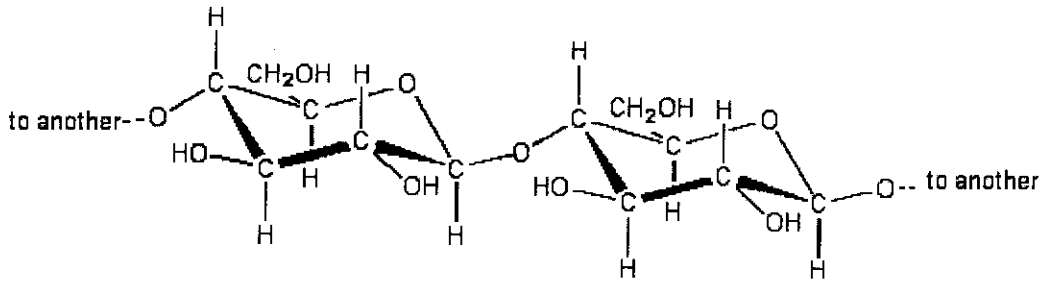
โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper Chromatography)

จัดเป็นโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน ที่ใช้เทคนิคของโครมาโทกราฟีที่เกิดบนแผ่นที่ใช้*ความชื้น (H_2O)* ในกระดาษเป็น*เฟสอยู่กับที่* โครมาโทกราฟีแบบกระดาษมักนิยมใช้กันงานทางด้านชีวเคมี ใช้วิเคราะห์ได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีสีและไม่มีสี ที่นิยมใช้วิเคราะห์ได้แก่ กรดอะมิโน (amino acid) สารสีธรรมชาติ (natural pigment) และน้ำตาล เป็นต้น โดยหยดสารตัวอย่างลงบนแผ่นกระดาษ ซึ่งปกติแผ่นกระดาษที่ใช้จะมีส่วนประกอบของน้ำ (ประมาณ 6-12%) และเซลลูโลส (cellulose) ภายใน

เซลลูโลสจะมีโครงสร้างที่มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลด้วยกันเอง น้ำจะช่วยให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสน้อยลง



โครงสร้างโมเลกุลของน้ำ

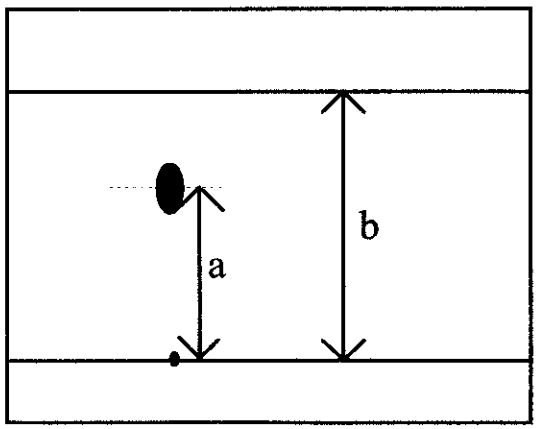


โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลส

เนื่องจากโครงสร้างที่สามารถเกิดพันธะได้ระหว่างน้ำและเซลลูโลส ที่บริเวณที่มีขั้วของโมเลกุล (–OH) สำหรับ*เฟสเคลื่อนที่*จะทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายสารตัวอย่างและเป็นตัวพาให้หยดของสารตัวอย่างเคลื่อนที่ไปตามแผ่นกระดาษ แต่ละองค์ประกอบในสารตัวอย่างจะถูกพาจากเฟสเคลื่อนที่และถูกดูดซับจากเฟสอยู่กับที่แตกต่างกัน ทำให้ระยะทางที่ตัวถูกละลาย (องค์ประกอบในสารตัวอย่าง) แต่ละชนิดเคลื่อนที่ต่างกันและแยกออกจากกันได้ในที่สุด สำหรับระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่หรือตัวถูกละลายเคลื่อนที่ (วัดจากจุดกึ่งกลางของหยดสารถึงจุดเริ่มต้น) ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (วัดจากจุดที่ตัวทำละลายเริ่มพาตัวถูกละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงจุดที่ตัวทำละลายหยุดเคลื่อนที่ เรียกว่า *solvent front*) ซึ่งเป็นค่าคงที่สำหรับสารแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิและตัวทำละลายหนึ่งๆเท่านั้น

ค่าคงที่ดังกล่าวจะเขียนอยู่ในเทอมของ R_f (Retention factor)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$



$$R_f = \frac{a}{b}$$

ค่า R_f สามารถที่จะบ่งชี้ได้ว่าตัวถูกละลายชนิดนั้นเป็นสารใด แต่เนื่องจากตัวทำละลาย (เฟสเคลื่อนที่) ที่ใช้ในโครมาโทกราฟีแบบกระดาษมีหลายชนิด ดังนั้นค่า R_f ของสารแต่ละชนิดในตัวทำละลายต่าง ๆอาจเท่ากันได้ จึงต้องมีสารมาตรฐานมาเทียบโดยการใช้สภาวะเดียวกันกับสารตัวอย่างและพิจารณาว่าค่า R_f เท่ากันหรือไม่ ถ้าได้ค่าเดียวกันก็ยืนยันได้ว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐาน

สำหรับเฟสเคลื่อนที่ (ตัวทำละลาย) ปกติจะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar) น้อยกว่าน้ำ เพื่อน้ำจะได้ช่วยยึดเหนี่ยวกับกระดาษได้ดี เมื่อหย่อนกระดาษลงในตัวทำละลายผสม ทั้งนี้เพราะกระบวนการ ที่เฟสเคลื่อนที่พาตัวถูกละลายเคลื่อนที่ เรียกว่า *การทำให้เกิดภาพ (developing)* ซึ่งทำในภาชนะปิดที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันคือ สารละลายผสมของอัลกอฮอล์กับน้ำ โมเลกุลของน้ำในตัวทำละลายจะเคลื่อนที่ไปยึดติดกับโมเลกุลของเซลลูโลสในกระดาษ ถ้าสารตัวอย่างใดมีโมเลกุลที่สามารถละลายน้ำได้ โมเลกุลของสารนั้นจะเคลื่อนที่ตามไปด้วย เราจึงใช้เทคนิคของโครมาโทกราฟีแบบกระดาษมาวิเคราะห์แยกสีของสีย้อมได้

เทคนิคการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ

1. **การจุดสารละลาย (spot)** จุดสารตัวอย่างให้มีขนาดเล็กที่สุด จากนั้นทำให้แห้งก่อน เพื่อให้ตัวทำละลายที่มีอยู่ในสารตัวอย่างระเหย
2. **การทำให้เกิดภาพ (developing)** ให้ใส่กระดาษลงในภาชนะปิด (chamber) ที่อิ่มตัวไปด้วยไอของตัวทำละลายและมีตัวทำละลายบรรจุอยู่ ตัวทำละลายจะพาตัวถูกละลายเคลื่อนที่จากด้านล่างขึ้นไปด้านบน
3. **การตรวจหา (detection)** การทำเครื่องหมายการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย (solvent front) และตัวถูกละลาย ให้ทำเครื่องหมายไว้ก่อนที่ตัวทำละลายจะระเหยไปหมด จะใช้ดินสอในการทำเครื่องหมาย ไม่ใช้ปากกา เนื่องจากในปากกาจะมีสีที่สามารถละลายในตัวทำละลายได้
4. **การวิเคราะห์ข้อมูล (analysis)** การหาค่า R_f เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ทำให้สามารถวิเคราะห์ทางคุณภาพได้

คำถามก่อนการทดลอง

1. เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบกระดาษอาศัยหลักการใดในการแยกสาร
2. ก) "เฟสอยู่กับที่" ในการทดลองโครมาโทรกราฟีแบบกระดาษคืออะไร
   ข) "เฟสเคลื่อนที่" ในการทดลองโครมาโทรกราฟีแบบกระดาษคืออะไร
3. ค่า R_f คือค่าอะไร
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการจุดสารคืออะไร

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สีผสมอาหาร สีเขียว สีเหลือง สีน้ำเงิน ปากกาหมึกซึมสีดำ
2. ตัวทำละลายไอโซโพรพานอล : น้ำกลั่น (2:1)
3. หลอดคะปิลลารี
4. บีกเกอร์
5. กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 4x10

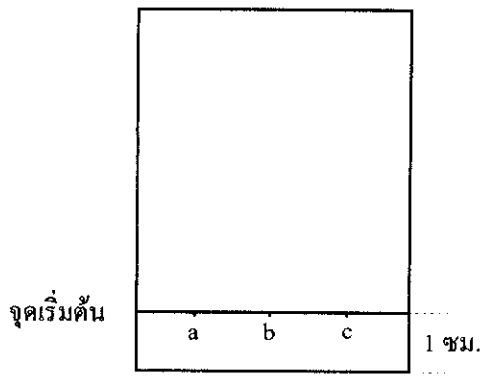
ข้อควรระวังและปฏิบัติ

1. ห้ามวางกระดาษกรองบนโต๊ะโดยตรงขณะที่จุดสารตัวอย่าง ให้วางกระดาษกรองบนกระดาษที่สะอาดก่อน
2. ระวังไม่ให้จุดสารตัวอย่างใหญ่เกิน 2 มิลลิเมตร
3. ก่อนจุดสารตัวอย่างซ้ำ ต้องให้จุดสารตัวอย่างเดิมแห้งก่อน
4. ห้ามใช้หลอดคะปิลลารีของแต่ละสารตัวอย่างปนกัน

วิธีทำการทดลอง

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์สีผสมอาหาร

1. นำกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 4x10 ซม. ขีดเส้นเริ่มต้นของสารตัวอย่างให้สูงจากขอบล่าง 1 ซม. แบ่งจุดที่หยดสารเป็น 3 ส่วน ให้ห่างกันประมาณ 1 ซม. ดังรูปที่ 1.1 *ด้วยดินสอ* ห้ามใช้ปากกาโดยเด็ดขาด เนื่องจากสีของน้ำหมึก สามารถถูกละลายได้ด้วยตัวทำละลาย



รูปที่ 1.1 กระดาษกรองที่เตรียมไว้สำหรับหยดสาร

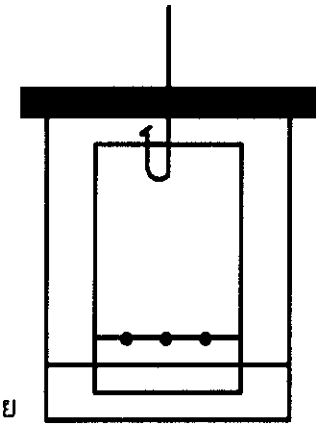
2. วางกระดาษกรองที่เตรียมไว้บนกระดาษที่สะอาด ใช้หลอดคะปิลลารี spot สารตัวอย่างลงบนกระดาษกรองที่ตำแหน่งต่าง ๆอย่างระมัดระวัง ดังนี้

a - สีเหลือง b - สีเขียว c - สีน้ำเงิน

โดยแยกใช้คะปิลลารีแต่ละสี ทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการ spot ซ้ำอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง

3. เทตัวทำละลาย (ไอโซโพรพานอล:น้ำ 2:1) 30 มล. ลงในภาชนะที่เตรียมให้ (champer) ปิดฝาภาชนะ

4. จุ่มกระดาษกรองในภาชนะที่เตรียมไว้ในข้อ 3 โดยให้ส่วนปลายของกระดาษกรองอยู่ต่ำกว่าตัวทำละลายในภาชนะประมาณ 0.5 ซม. **ระวังอย่าให้จุดที่หยดสารตัวอย่าง สัมผัสกับตัวทำละลายและอย่าให้กระดาษเอียง** ปิดฝาภาชนะ ดังรูปที่ 1.2



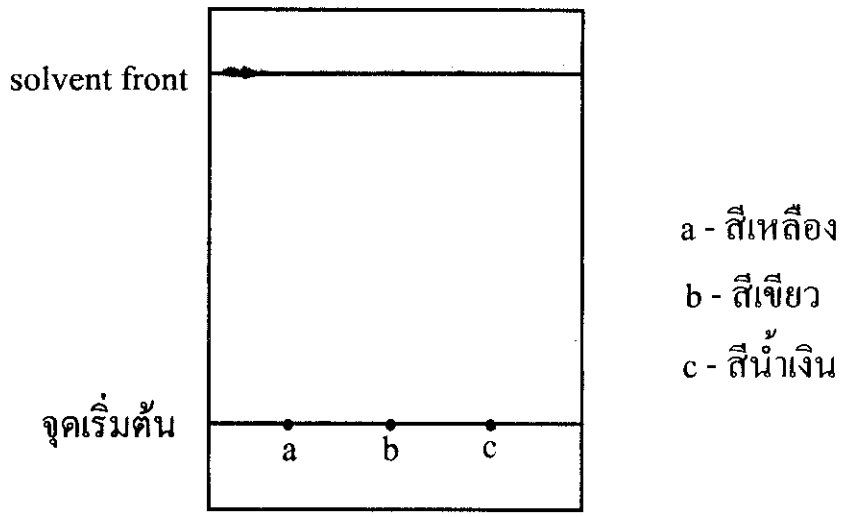
รูปที่ 1.2 ภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายและกระดาษกรอง

5. ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนกระทั่งสังเกตเห็นการแยกของแต่ละองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างชัดเจน **ระวังไม่ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เลยส่วนบนของกระดาษกรอง** นำกระดาษขึ้นจากภาชนะที่ใส่ ทำเครื่องหมาย solvent front ด้วยดินสอและวงตำแหน่งของสีที่ปรากฏอยู่บนกระดาษกรอง แล้วทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน

6. วัดระยะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นของจุดสารตัวอย่างถึงจุดกึ่งกลางของจุดที่ปรากฏ และวัดระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นของสารตัวอย่างถึง solvent front

7. หาค่า R_f ของแต่ละจุด (สารตัวอย่างที่เป็นของผสมจะมีหลายจุด ค่า R_f ของสารตัวอย่างนั้นจะมีหลายค่าด้วย)

ผลการทดลอง



ตารางสรุปผลการทดลอง

สารตัวอย่าง	สีที่ปรากฏ	ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.) (x)	ระยะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ (ซม.) (y)	R_f (y/x)
สีเหลือง	.....	.....	.....	.....
สีเขียว				
จุดที่ 1	.....	.....	.....	.....
จุดที่ 2	.....	.....	.....	.....
สีน้ำเงิน	.....	.....	.....	.....

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของหมึกสีดำ

1. นำกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาด 4x10 ซม. ขีดเส้นเริ่มต้นของสารตัวอย่างให้สูงจากขอบล่าง 1 ซม. *ด้วยดินสอ* แล้วจุดปากกาสีดำลงบนกระดาษ ทิ้งไว้ให้แห้ง

2. เทตัวทำละลาย (ไอโซโพรพานอล:น้ำ 2:1) 30 มล. ลงในภาชนะที่เตรียมให้ (champer) ปิดฝาภาชนะ

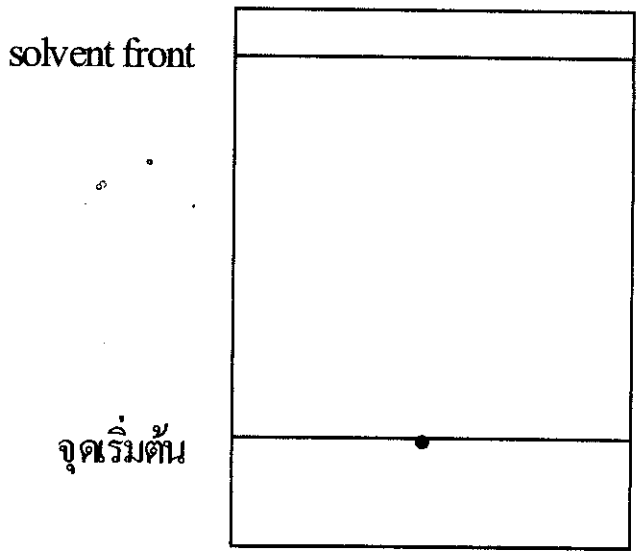
4. จุ่มกระดาษกรองในภาชนะที่เตรียมไว้ในข้อ 2 โดยให้ส่วนปลายของกระดาษกรองอยู่ต่ำกว่าตัวทำละลายในภาชนะประมาณ 0.5 ซม. **ระวังอย่าให้จุดที่หยดสารตัวอย่างสัมผัสกับตัวทำละลายและอย่าให้กระดาษเอียง** ปิดฝาภาชนะ ดังรูปที่ 1.2

5. ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปจนกระทั่งสังเกตเห็นการแยกของแต่ละองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างชัดเจน **ระวังไม่ให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เลยส่วนบนของกระดาษกรอง** นำกระดาษขึ้นจากภาชนะที่ใส่ ทำเครื่องหมาย solvent front ด้วยดินสอและวงตำแหน่งของสีที่ปรากฏอยู่บนกระดาษกรอง ทิ้งไว้ให้แห้งในตู้ดูดควัน

6. วัดระยะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นของจุดสารตัวอย่างถึงจุดกึ่งกลางของจุดที่ปรากฏ และวัดระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นของสารตัวอย่างถึง solvent front

7. หาค่า R_f ของแต่ละจุด (สารตัวอย่างที่เป็นของผสมจะมีหลายจุด ค่า R_f ของสารตัวอย่างนั้นจะมีหลายค่าด้วย)

ผลการทดลอง



ตารางสรุปผลการทดลอง

สีที่ปรากฏ	ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.) **(x)**	ระยะที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่ (ซม.) **(y)**	R_f (y/x)
.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....

ตอบคำถาม

1. นักศึกษาคิดว่าสีเขียวมีส่วนผสมของสีเหลืองหรือไม่ เพราะเหตุใด
2. ถ้าสารผสมที่แยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบกระดาษเป็นสารผสมไม่มีสี เราสามารถหาตำแหน่งของจุดต่างๆบนกระดาษได้หรือไม่ โดยวิธีใด
3. เปรียบเทียบสารตัวอย่าง สีเหลืองและสีน้ำเงิน ว่าสารใดที่สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเพราะเหตุใด
4. สารตัวอย่างหมึกสีดำมีส่วนผสมของสีใดบ้าง