บทที่ 4
คอลัมน์โครมาโตกราฟี

4.1 บทนำ

โครมาโตกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารประกอบต่างชนิดกันออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างในการกระจายตัวของสารประกอบในภาคนิ่ง (stationary phase) และภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ถ้าภาคนิ่งถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ เรียกว่า คอลัมน์โครมาโตกราฟี แต่ภาคนิ่งถูกนำไปเคลือบบนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติก เรียกว่า thin-layer chromatography (TLC) ภาคนิ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่เกาะเป็นฟิล์มบางๆ รอบอนุภาคยึด (solid support) ส่วนภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ

พาร์ทิชันโครมาโตกราฟี (Partition Chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบนี้ มีภาคนิ่งเป็นฟิล์มบางๆ ของของเหลว ที่เคลือบผิวหน้าของอนุภาคยึด ถ้าภาคเคลื่อนที่เป็นก๊าซ เรียกว่า gas-liquid chromatography (GLC หรือ GC) แต่ถ้าภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว เรียกว่า liquid-liquid chromatography ตัวอย่างได้แก่ paper chromatography

แอดซอร์ปชันโครมาโตกราฟี (Adsorption chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบนี้ มีภาคนิ่งเป็นของแข็งได้แก่ ตัวดูดซับ (adsorbent) และมีภาคเคลื่อนที่เป็นของเหลว จึงอาจเรียกว่า solid-liquid adsorption chromatography ตัวอย่างได้แก่ คอลัมน์โครมาโตกราฟี และทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

4.2 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)

ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตัวดูดซับ (ภาคนิ่ง) ซึ่งเป็นของแข็งจะถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ส่วนภาคเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายซึ่งจะพาสารเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ ถ้าสารที่เคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับมีหลายชนิดและมีสภาพขั้วแตกต่างกันจะถูกดูดซับในระดับต่างกัน สารใดถูกดูดซับไว้แน่นและละลายในตัวทำละลายได้น้อย จะเคลื่อนที่ช้า ส่วนสารใดที่ถูกดูดซับไม่แน่น จะถูกตัว

4.2.1 ตัวดูดซับ (Adsorbent)

ตัวดูดซับที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ อะลูมินา (alumina) , ซิลิกา เจล (silica gel) , ฟลอริซิล (Florisil) , ถ่าน (charcoal) , แมกนีเซียมออกไซม์ (magnesium oxide) , แป้งและน้ำตาล เป็นต้น แต่ตัวดูดซับที่นักเคมีอินทรีย์นิยมใช้กันมากได้แก่ อะลูมินาและซิลิกาเจล

อะลูมินาดูดซับสารประกอบอินทรีย์ได้แน่นกว่าซิลิกาเจลและแอกติฟ (active) กว่าด้วยโดยทั่วไป อะลูมินาใช้สำหรับแยกสารประกอบอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วต่ำสุดจนถึงสภาพขั้วปานกลาง ส่วนซิลิกาเจลใช้แยกสารประกอบอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูงและเป็นกลาง แอกติวิตีของอะลูมินาและซิลิกาเจลขึ้นกับปริมาณน้ำที่อยู่ในตัวดูดซับนั้น ตัวดูดซับที่ที่มีปริมาณน้ำน้อยที่สุดจะแอกติฟที่สุด

อะลูมินาอาจจำแนกออกได้เป็น 5 เกรด (grade) อะลูมินาแต่ละเกรดมีปริมาณน้ำแตกต่างกันดังนี้

เกรดของอะลูมินา	น้ำในอะลูมินา(%โดยน้ำหนัก)
I	0
II	3
III	6
IV	10
V	15

อะลูมินาเกรด **I** แอกติฟที่สุด (มีน้ำน้อยที่สุด) เตรียมได้โดยการอบขจัดน้ำที่ 380-400°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนอะลูมินาเกรดอื่นๆ เตรียมได้โดยการเติมน้ำในอะลูมินาเกรด **I** วิธีเตรียมคือ เติมน้ำในอะลูมินาเกรด **I** แล้วเขย่าเป็นเวลาหลายชั่วโมง เพื่อให้น้ำกระจายทั่วอนุภาคอะลูมินา

อะลูมินาเกรดสูงๆ ใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วต่ำ ส่วนอะลูมินาเกรดต่ำๆ ใช้แยกสารที่มีสภาพขั้วสูง อะลูมินาเกรด **I** มีแอกติวิตีในการดูดซับสูงมาก จึงอาจเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

อะลูมินาที่ผลิตขายมี 3 แบบ คือ อะลูมินาที่มีสภาพขั้วเป็นด่าง(pH 10) อะลูมินาที่มีสภาพขั้วเป็นกลาง (pH 7.5) และอะลูมินาที่มีสภาพขั้วเป็นกรด (pH 4) สารประกอบที่เป็นกรดจะถูกดูดซับอย่างแน่นหนาโดยตัวดูดซับที่เป็นเบส ส่วนสารประกอบที่เป็นเบสจะถูกดูดซับอย่างแน่นหนาโดยตัวดูดซับที่เป็นกรด กรณีเหล่านี้ทำให้สารถูกดูดซับแน่นเกินไป ไม่สามารถเคลื่อนที่หรือถูกชะออกจากคอลัมน์ ดังนั้น การแยกสารประกอบที่เป็นกรดแก่และเบสแก่ จะต้องใช้ตัวดูดซับที่เป็นกรดและเบสตามลำดับ ตัวอย่างเช่น อะลูมินาสภาพกรดใช้แยกสารประกอบประเภทกรด เช่น กรดคาร์บอกซิลิกและกรดอะมิโน เป็นต้น ส่วนอะลูมินาสภาพเบสใช้แยกสารประกอบที่เป็นเบส เช่น เอมีน เป็นต้น ส่วนอะลูมินาสภาพเป็นกลางก็ใช้แยกสารประกอบที่เป็นกลาง และสารประกอบที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาภายใต้สภาวะกรดและเบส เช่น คีโตน , เอสเทอร์ เป็นต้น ทั้งยังใช้ดูดความชื้นจากตัวทำละลายอินทรีย์ได้ด้วย

ซิลิกาเจลโดยปกติเป็นกรดเล็กน้อย เหมาะสำหรับแยกสารประกอบที่เป็นกลางและเป็นกรด ส่วนสารประกอบที่เป็นเบสจะถูกดูดซับแน่นเกินไปและเคลื่อนที่ช้า แต่อาจแก้ไขโดยการเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หรือไดเอธิลเอมีน (diethylamine) ในภาคเคลื่อนที่

ส่วนตัวดูดซับอื่นๆ มีความสามารถในการดูดซับต่างกัน การเรียงลำดับความสามารถในการดูดซับสารหรือแอกติวิตีของตัวดูดซับเป็นดังนี้

Alumina (Al_2O_3) > Charcoal > Florisil > Silica gel (SiO_2) > Magnesium carbonate หรือ Calcium carbonate > Sucrose , แป้ง

สารประกอบบางชนิดไม่เสถียรต่อกรดและเบส จะสลายตัวเมื่อผ่านตัวดูดซับที่เป็นกรดและเบส ตัวดูดซับที่เป็นกรดและเบสยังอาจเร่งปฏิกิริยาบางปฏิกิริยาได้ เช่น ไฮโดรลิซิสของเอสเทอร์ พอลิเมอไรเซชันของออลิฟีน และปฏิกิริยาคอนเดนเซชันของแอลดิไฮด์และคีโตน เป็นต้น การแยกสารประกอบดังกล่าว จึงควรเลือกใช้ตัวดูดซับที่ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา อัตราส่วนของปริมาณตัวดูดซับต่อปริมาณสารตัวอย่างคือ 20 : 1 แต่ถ้าเป็นสารผสมซับซ้อนต้องใช้ตัวดูดซับมากขึ้น อาจเป็นอัตราส่วน 50 : 1 ถึง 200 : 1

4.2.2 ตัวทำละลายที่พัฒนาแถบ (Developing solvent) หรือ ตัวชะ (Eluent)

ข้อควรคำนึงถึงในการเลือกตัวทำละลายที่ใช้ชะสาร คือ ตัวทำละลายอาจถูกดูดซับบนตัวดูดซับเช่นเดียวกับสาร มันจึงอาจแข่งขันกับสารในการแย่งตำแหน่งดูดซับ ถ้าตัวทำละลายมีสภาพขั้วสูงกว่าสารที่ต้องการแยก ตัวทำละลายนั้นสามารถไล่หรือขยับสารออกจากตำแหน่งที่มันถูกดูดซับอยู่และถูกตัวทำละลายพาเคลื่อนที่ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงจึงไม่เพียงแต่ละลายสาร ยังสามารถไล่ที่และพาสารเคลื่อนที่ไปด้วยกัน ทำให้การแยกสารไม่ได้ผล ส่วนตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำและถ้าสารที่จะแยกทั้งหมดมีสภาพขั้วสูงกว่าตัวทำละลาย สารเหล่านี้จะถูกดูดซับไว้แน่นและเคลื่อนที่ช้าหรือไม่เคลื่อนที่เลย

ความสามารถของตัวทำละลายในการชะสารเรียงลำดับจากต่ำไปสูง

Hexane
Petroleum ether
Cyclohexane
Toluene
Benzene
Dichloromethane
Chloroform
Diethyl ether
Ethyl acetate
Acetone
Propanol
Ethanol
Methanol
น้ำ

↓ **ความสามารถในการชะสารเพิ่มขึ้น**

สภาพขั้วเพิ่มขึ้น

4.2.3 สารประกอบอินทรีย์

สารประกอบอินทรีย์ประเภทต่างๆ มีสภาพขั้วที่แตกต่างกัน จึงถูกดูดซับได้แน่นมากน้อยต่างกันและถูกตัวทำละลายชะออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน สารประกอบที่มีสภาพขั้วสูง เช่น กรดคาร์บอกซิลิกถูกดูดซับไว้แน่นกว่าสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ จึงถูกชะออกจาก

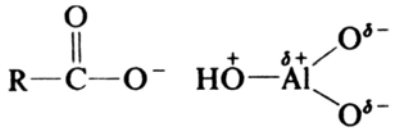
สารประกอบอินทรีย์เรียงลำดับจากสภาพขั้วต่ำสุดจนถึงสูงสุดเป็นดังนี้

Alkanes , alkenes , conjugated dienes และ aromatic hydrocarbons , ethers , alkyl halides , esters , ketones , aldehydes , amines , alcohols , carboxylic acids , amino acids

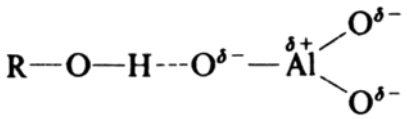
4.2.4 อันตรกิริยาระหว่างตัวดูดซับกับสารประกอบอินทรีย์

อันตรกิริยาหรือแรงกระทำระหว่างตัวดูดซับกับสารประกอบอินทรีย์มีหลายรูปแบบดังนี้

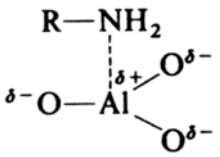
1. **อันตรกิริยา van der waals** เป็นอันตรกิริยาระหว่างตัวดูดซับและสารประกอบอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วต่ำ (non-polar compounds) แรงกระทำเหล่านี้เป็นแรงยึดที่อ่อน สารประกอบที่มีสภาพขั้วต่ำจึงถูกดูดซับไว้ไม่แน่น ยกเว้นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ
2. **อันตรกิริยา ไดโพล์-ไดโพล์ (Dipole-dipole interaction)** เป็นอันตรกิริยาระหว่างตัวดูดซับที่มีขั้วและสารประกอบที่มีสภาพขั้วสูง
3. พันธะไฮโดรเจน เป็นอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) และตัวดูดซับที่ประกอบด้วยอะตอมที่มีสภาพเป็นเบสในโมเลกุล เช่น ออกซิเจนและไนโตรเจน เป็นต้น
4. **อันตรกิริยาโคออดิเนต (Coordination interaction)** เป็นอันตรกิริยาระหว่างตัวดูดซับที่มีขั้วและสารประกอบที่เป็นเบสแก่ เช่น เอมีน ซึ่งจะยึดติดกับอะลูมินาได้แน่นกว่าสารประกอบที่เป็นเบสอ่อน
5. **การเกิดเกลือ** เป็นอันตรกิริยาระหว่างตัวดูดซับที่มีขั้วและสารประกอบที่เป็นกรด



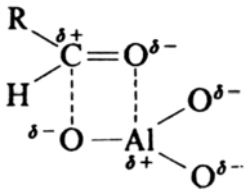
การเกิดเกลือ
(กรดคาร์บอกซิลิก)



พันธะไฮโดรเจน
(แอลกอฮอล)



สารเชิงซ้อนโคออดิเนต
(เอมีน)



อันตรกิริยาไดโพล์-ไดโพล์
(แอลดิไฮด์ คีโตนและสารประกอบคาร์บอนิลประเภทอื่น)

ความแข็งแรงของอันตรกิริยาเหล่านี้เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยเป็นดังนี้
การเกิดเกลือ > อันตรกิริยาโคออดิเนต > พันธะไฮโดรเจน , อันตรกิริยาไดโพล์-ไดโพล์ > อันตรกิริยา van der waals

4.3 เทคนิคการแยกสารผสม โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี

เทคนิคสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแยกสารผสมโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี คือ

4.3.1 การบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์

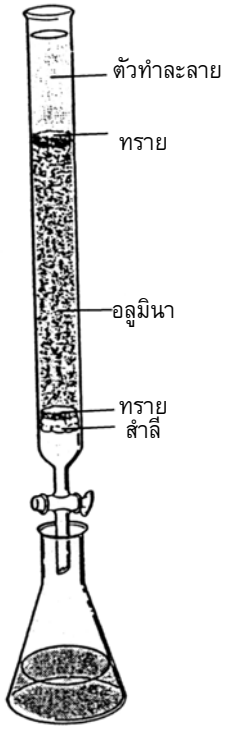
ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ต้องสัมพันธ์กับปริมาณสารที่จะแยก ตัวดูดซับที่ใช้ควรมีปริมาณ 25-30 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง ถ้าเป็นสารผสมที่ซับซ้อนอาจใช้ 50-200 เท่าของปริมาณสารตัวอย่าง อัตราส่วนของความยาวต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ควรเป็น 8 : 1

ก่อนบรรจุสารตัวอย่างในคอลัมน์ อุดปลายล่างของคอลัมน์ด้วยใยไหมหรือสำลี จากนั้นใส่ทรายที่บริสุทธิ์และละเอียดลงบนสำลี เพื่อปรับระดับให้เรียบ ชั้นของทรายใช้เป็นฐานเพื่อรองรับตัวดูดซับ และป้องกันมิให้ตัวดูดซับไหลลงไปอุดปลายของคอลัมน์ ขั้นต่อไปจึงใส่ตัวดูดซับลงในคอลัมน์โดย 2 วิธีต่อไปนี้

1. วิธีบรรจุแบบเปียก หรือ วิธี slurry (Wet pack or **Slurry method)**

บรรจุตัวทำละลายลงในคอลัมน์ประมาณหนึ่งในสามส่วนของคอลัมน์ ใส่ตัวทำละลายในตัวดูดซับแล้วคน (ส่วนผสมนี้เรียกว่า slurry) เท slurryผ่านกรวยลงในคอลัมน์พร้อมๆกับเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกช้าๆ และใช้สายยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์ การไหลของตัวทำละลาย และการเคาะจะช่วยให้ตัวดูดซับอัดแน่น ทั้งยังป้องกันการเกิดฟองอากาศ (**หมายเหตุ 1**) เมื่อบรรจุตัวดูดซับทั้งหมดลงในคอลัมน์แล้ว ใช้แท่งแก้วยาวเกลี่ยผิวของตัวดูดซับให้เรียบ ใส่ทรายทับด้านบนของตัวดูดซับอีกชั้นหนึ่ง คอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับเรียบร้อยแล้ว ควรมีตัวทำละลายเหลืออยู่เหนือ

ชั้นทรายเพื่อป้องกันมิให้ตัวดูดซับแห้ง ถ้าตัวดูดซับแห้ง มันจะหดตัวจากผนังของคอลัมน์ เกิดช่องว่างให้อากาศเข้าไปแทรกได้ และทำให้เกิดรอยแตกแยกในชั้นของตัวดูดซับ จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการแยกต่ำลง



2. วิธีบรรจุแบบแห้ง (Dry pack method)

ใส่ตัวทำละลายในคอลัมน์ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของคอลัมน์ ค่อยๆ เทตัวดูดซับลงไปในคอลัมน์ทีละน้อยอย่างต่อเนื่อง พร้อมกับปล่อยตัวทำละลายให้ไหลออกช้าๆ ใช้สายยางเคาะด้านข้างของคอลัมน์ขณะที่ตัวดูดซับผ่านตัวทำละลายลงไป เพื่อให้ตัวดูดซับอัดแน่นปราศจากฟองอากาศ (ดู**หมายเหตุ 1**) หลังจากใส่ตัวดูดซับลงไปหมดแล้ว เกลี่ยผิวบนของตัวดูดซับให้เรียบ ปิดทับด้วยทรายละเอียดอีกชั้นหนึ่ง ควรมีตัวทำละลายเหลืออยู่ด้านบนของทรายเพื่อป้องกันมิให้คอลัมน์แห้งก่อนใส่สารตัวอย่าง

4.3.2 การใส่สารตัวอย่างในคอลัมน์

สารตัวอย่างที่จะนำเข้าสู่คอลัมน์ควรอยู่ในรูปสารละลายเข้มข้นและมีปริมาตรน้อย ก่อนใส่สารตัวอย่าง ไขตัวทำละลายที่เหลืออยู่บนชั้นทรายออกจนปริ่มชั้นทราย ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างทั้งหมดใส่ที่ด้านบนของคอลัมน์ แล้วปล่อยให้ไหลลงไปจนปริ่มชั้นทรายอีกครั้งหนึ่ง ใช้ปิเปตที่สะอาดและแห้งดูดตัวทำละลายที่ใช้ชะสาร(eluting solvent) ลงไปทีละน้อย เพื่อผลักดันให้สารตัวอย่างผ่านเข้าไปในตัวดูดซับ เมื่อตัวทำละลาย(ตัวชะ) ไหลลงจนปริ่มชั้นทรายแล้ว จึงใส่ตัวชะเพิ่มเติมอีกทีละน้อย สังเกตสีของตัวทำละลายที่อยู่เหนือทรายจะค่อยๆจางลง ทำเช่นนี้จนกระทั่งตัวทำละลายใสไม่มีสี แสดงว่า สารตัวอย่างทั้งหมดได้ถูกนำเข้าสู่ตัวดูดซับแล้ว จากนั้น จึงใส่ตัวทำละลาย(ตัวชะ)ปริมาณมากลงไป

4.3.3 ขบวนการชะสาร (Elution process)

หลักของการเลือกตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะ (Eluent) มีดังนี้

1. ตัวทำละลายที่ใช้ในโครมาโตกราฟีควรเป็นตัวทำละลายบริสุทธิ์ (reagent grade) ถ้าเป็นตัวทำละลายแบบ commercial grade ควรทำการกลั่นใหม่ก่อนนำไปใช้
2. เลือกตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกที่ดีบนแผ่น TLC

3. ตัวชะสารควรเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสม หลีกเลี่ยงการเปลี่ยนตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่างกันอย่างกะทันหัน เช่น การเปลี่ยนจาก hexane เป็น ether ทันทีในระหว่างชะสารเพราะจะเกิดความร้อนขึ้นและความร้อนที่เกิดเพียงพอที่จะทำให้ ether เดือด และเกิดฟองอากาศขึ้นในคอลัมน์ อนึ่ง อัตราการไหลของตัวทำละลายไม่ควรจะเร็วเกินไปจะทำให้สารตัวอย่างไม่มีเวลาเพียงพอที่จะอยู่ในสมดุลกับ (equilibrate with) ตัวดูดซับขณะที่มันผ่านตัวดูดซับ แต่ถ้าอัตราการไหลของตัวทำละลายช้าเกินไปจะเกิดปัญหาการแพร่ (diffusion) ของแถบของสารไปได้ทุกทิศทาง ดังนั้น ไม่ว่าจะเป็นกรณีไหนใน 2 กรณีดังกล่าว จะทำให้การแยกไม่ได้ผลและเพื่อป้องกันการแพร่ของแถบไม่ควรตั้งคอลัมน์ทิ้งไว้ข้ามคืน

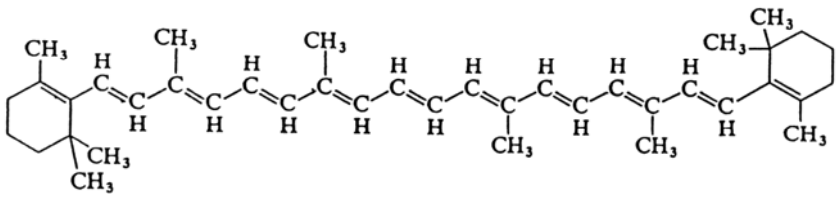
4.3.4 การรองรับสารที่ถูกชะออกและการแยกสาร

การตรวจหาตำแหน่งของแถบสาร (visualization) เพื่อรองรับสารเมื่อออกจากคอลัมน์มีวิธีการดังนี้

1. กรณีที่สารประกอบมีสี สามารถรองรับสารได้เมื่อเห็นแถบสีเคลื่อนลงมา
2. กรณีที่สารไม่มีสี หากสารเหล่านั้นเกิดฟลูออเรสเซนส์กับรังสีอัลตราไวโอเลต เราสามารถมองเห็นแถบได้ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตในที่มืด
3. ในกรณีที่สารประกอบไม่มีสีและไม่เกิดฟลูออเรสเซนส์ การชะสารเหล่านี้ควรใช้กลุ่มตัวทำละลายหรืออนุกรมของตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นทีละน้อย โดยเริ่มต้นจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำสุด (โดยปกติเป็น hexane หรือ petroleum ether) อาจมีแถบหนึ่งเคลื่อนลงมาก่อนและถูกชะออกจากคอลัมน์ จากนั้น ให้เปลี่ยนเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเพิ่มจากเดิมเล็กน้อยและค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สารจะทยอยถูกชะออกทีละตัว วิธีเพิ่มสภาพขั้วของตัวทำละลายที่ได้ผลดีที่สุดคือการใช้ตัวทำละลายผสม เช่น เริ่มต้นจาก hexane แล้วเปลี่ยนเป็น hexane : ether ในอัตราส่วนดังนี้ 9 : 1 , 8 : 2 , 7 : 3 , 6 : 4 , 5 : 5 ,..... เป็นเช่นนี้เรื่อยไปจนในที่สุดเป็น ether บริสุทธิ์ ถ้าการเปลี่ยนสภาพขั้วของตัวทำละลายเป็นแบบก้าวกระโดดจากต่ำไปสูงทันที จะทำให้สารทั้งหมดถูกชะออกพร้อมกัน การรองรับสารละลายที่ออกมาให้รองรับเป็นส่วนๆ แต่ละส่วนมีปริมาตรเท่ากัน นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบด้วย Thin-layer chromatography (TLC) ส่วนใดที่พิสูจน์ด้วย TLC แล้วว่าเป็นสารตัวเดียวกัน ให้เทรวมกันและแยกสารออกโดยระเหยตัวทำละลายออกไป

4.4 การสกัดเบต้า-แคโรทีนจากผัก

แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุสีเหลืองหรือส้มพบในพืช เช่น ผัก ผลไม้และใบไม้ สีเหล่านี้เกิดจากระบบคอนจูเกต (conjugated system) ที่อยู่ในโมเลกุลของสาร แคโรทีนอยด์หลายชนิดในพืชเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น เบต้า-แคโรทีน ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



β -Carotene

ในการทดลองแยกเบต้า-แคโรทีนจากผัก ขั้นแรกคือ การสกัดรงควัตถุจากผักโดยใช้ตัวทำละลายผสม petroleum ether-acetone (อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร) (**หมายเหตุ 2**) นำสารละลายที่ได้มาล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดอะซิโตนและสารอื่นที่ละลายน้ำ แยกชั้นสารละลายอินทรีย์ นำสารละลายดังกล่าวมาทำให้แห้งปราศจากน้ำ และระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกเพื่อทำให้เป็นสารละลายเข้มข้น นำสารละลายที่ได้นี้มาผ่านคอลัมน์ที่มีอะลูมินาเป็นตัวดูดซับ เบต้า-แคโรทีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยใช้ 2% acetone ใน petroleum ether เป็นตัวชะ

หมายเหตุ 1 ในระหว่างการบรรจุตัวดูดซับ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นให้ใช้สำลีหรือทิชชูชุบอะซิโตนหรืออีเทอร์บิดหมาดๆ หุ้มรอบๆ บริเวณที่มีฟองอากาศ แล้วทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง การระเหยของตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำจะทำให้ตัวดูดซับเย็นลง เกิดการหดตัวและไล่ฟองอากาศออกไป แต่ถ้าฟองอากาศอยู่ไม่ลึกจากด้านบน อาจใช้แท่งแก้วยาวคนตัวดูดซับแรงๆ พร้อมกับเคาะด้านข้างของคอลัมน์ให้ตัวดูดซับลงมาอัดแน่นอีกครั้งหนึ่ง

หมายเหตุ 2 ความจริงอะซิโตนเป็นสารละลายที่ดีที่สุดในการสกัดรงควัตถุจากผัก แต่สารละลายที่ได้จากการสกัดมักมีสารแขวนลอยอยู่ ต้องกรองสารแขวนลอยออกเพื่อให้สารละลายใส จึงใช้ตัวทำละลายผสม acetone-petroleum ether ที่มีอัตราส่วนเหมาะสม ถ้าตัวทำละลายผสมมี acetone มากเกินไป จะมีสารแขวนลอย แต่ถ้ามี petroleum ether มากเกินไป จะทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพต่ำ ดังนั้น อัตราส่วนของตัวทำละลายผสมที่ดีที่สุดคือ 1 : 1 โดยปริมาตร

การทดลองที่ 4
คอลัมน์โครมาโตกราฟี : การแยกเบต้า-แคโรทีนจากผัก

วิธีทดลอง

การสกัดรงควัตถุในผัก

ชั่งผักประมาณ 15 กรัม หั่นผักเป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดโดยใช้ครก หรือเครื่องบด (ถ้าบดในครก ให้ใส่ทรายเล็กน้อยเพื่อช่วยให้เนื้อเยื่อผักเปื่อย) ใส่ตัวทำละลายผสม acetone-petroleum ether (1 : 1) ประมาณ 30 มิลลิลิตรเพื่อละลายรงควัตถุในผัก ใช้ครกหรือช้อนบดขยี้ผักให้เปื่อยเพื่อให้รงควัตถุออกจากผักและละลายในตัวทำละลาย สารละลายของรงควัตถุควรมีสีเขียวคล้ำ ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายผสมอีก 2 ครั้งๆ ละ 30 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาเทรวมกัน ใส่สารละลายทั้งหมดในกรวยแยก (พยายามกันมิให้เศษผักหล่นเข้าไปในกรวยแยก เพราะเศษผักจะไปอุดรูด้านล่างของกรวยแยก) ใส่น้ำลงไปเขย่ากับสารละลายนี้ 3 ครั้งๆ ละ 20 มิลลิลิตร แล้วไขชั้นน้ำทิ้งไป (การล้างสารละลาย 3 ครั้งจะช่วยกำจัด acetone) นำสารละลายที่ได้มาใส่ anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำที่หลงเหลืออยู่ ใช้แท่งแก้วคนสารละลายสังเกตดูว่า สารละลายใสไม่มีคราบน้ำแล้วจึงกรองเอา anhydrous Na_2SO_4 ออก นำสารละลายที่ได้มาต้มไล่ตัวทำละลายในตู้ควันจนเหลือปริมาตรประมาณ 2–3 มิลลิลิตร เทสารละลายในหลอดแก้ว สารละลายเข้มข้นนี้ประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด นำสารละลายนี้ไปแยกเบต้า-แคโรทีนออกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี

การบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์

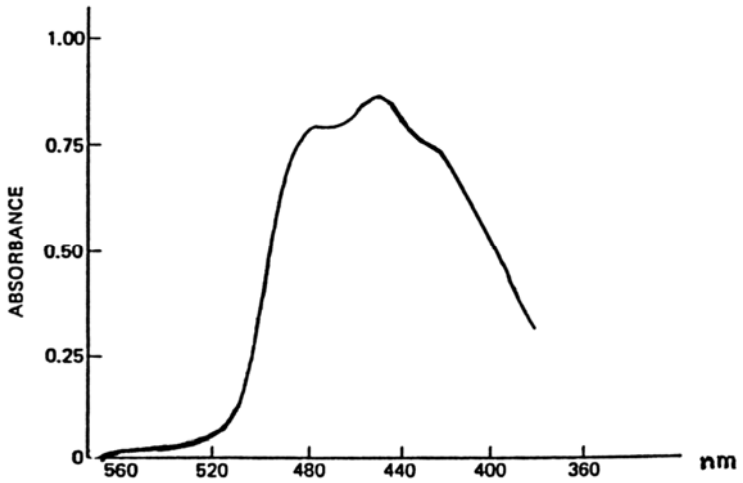
ใช้คอลัมน์ที่**แห้ง**และ**สะอาด** ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาวประมาณ 25 -30 ซม. ชั่งอะลูมินาประมาณ 13 กรัม ใส่ petroleum ether ในอะลูมินา กวนให้เป็น slurry แล้วจึงเทลงในคอลัมน์ (ดูรายละเอียดในหัวข้อ 4.3.1) เมื่อบรรจุอะลูมินาทั้งหมดในคอลัมน์แล้ว เกลี่ยผิวบนให้เรียบ ใส่ anhydrous Na_2SO_4 ที่ด้านบนของอะลูมินาสูงประมาณ 1 ซม. และตามด้วยทรายอีกชั้นหนึ่ง ปล่อยให้สารละลายไหลออกจนเหลือความสูงประมาณ 1 ซม.แล้วปิด คอลัมน์ดังกล่าวเป็นคอลัมน์ที่พร้อมสำหรับแยกสาร

การใส่สารตัวอย่างและการชะสาร

ก่อนใส่สารตัวอย่างในคอลัมน์ ให้เตรียม 50 มิลลิลิตรของตัวทำละลาย 2% acetone ใน petroleum ether และเตรียมปิเปตที่แห้งและสะอาด 2 อัน ปล่อยตัวทำละลาย petroleum ether ให้ไหลออกจนปริ่มชั้นทราย ใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ทั้งหมดลงไปในคอลัมน์ รอให้สารตัวอย่างไหลลงไปจนปริ่มชั้นทราย ใช้ปิเปตอีกอันหนึ่ง ดูดตัวทำละลาย 2% acetone ใน petroleum ether (ตัวชะ) ประมาณ 1 มิลลิลิตรหรือน้อยกว่าใส่ลงไปทันที (อย่าปล่อยให้ของเหลวเหนือทรายแห้งเด็ดขาด !) ตัวชะจะพาสารตัวอย่างที่เหลือเล็กน้อยให้เข้าไปในตัวดูดซับ เมื่อตัวทำละลายไหลลงจนปริ่มชั้นทรายอีกครั้งหนึ่ง ให้ดูดตัวชะอีกประมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ลงไป ทำเช่นนี้หลายครั้ง จะเห็นตัวทำละลายซึ่งมีสีเขียวเข้มในตอนแรกค่อยๆจางลงเรื่อยๆ จนในที่สุดจะไม่มีสี เมื่อถึงจุดนี้ จึงดูดตัวชะปริมาณมากลงไปในคอลัมน์ เมื่อสารตัวอย่างเข้าสู่ตัวดูดซับ จะเห็นแถบสีเหลืองปรากฏ และค่อยๆ เคลื่อนที่ลงมา ส่วนรงควัตถุอื่นซึ่งมองเห็นเป็นสีเขียวจะติดอยู่ด้านบนของตัวดูดซับ ไม่เคลื่อนที่ลงมา เมื่อแถบสีเหลืองเคลื่อนลงมาถึงด้านล่างของคอลัมน์ ให้รองรับด้วย flask ขนาด 250 มิลลิลิตรจนแถบสีเหลืองถูกชะออกหมด

นำสารละลายเบต้า-แคโรทีนที่ได้ไปวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ช่วงความยาวคลื่น 370–530 นาโนเมตร ใส่สารละลายเบต้า-แคโรทีนในหลอดบรรจุสารและใช้ petroleum ether เป็น blank ถ้า absorbance ไม่อยู่ในช่วง 0.8–1.0 ต้องทำสารละลายให้เจือจางลง (ไม่จำเป็นต้องทราบความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลาย

Electronic absorption spectrum ของเบต้า-แคโรทีนใน petroleum ether แสดงอยู่ในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 Electronic absorption spectrum ของเบต้า-แคโรทีนใน petroleum ether

คำถามท้ายบท

1. จงแนะตัวดูดซับและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารผสมต่อไปนี้โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

   CH_3CH_2COOH , $CH_3CH_2CH_2OH$, $CH_3(CH_2)_5CH_3$
2. จงบอกชนิดของตัวดูดซับที่ท่านเลือกเพื่อแยกเบต้า-แคโรทีนจากผัก
3. จงบอกเหตุผลที่ไม่ควรใช้ตัวทำละลายต่อไปนี้ในการแยกสารผสม

   ก. ใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงกว่าสารทุกตัวที่อยู่ในสารผสม

   ข. ใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำกว่าสารทุกตัวที่อยู่ในสารผสม
4. จงยกตัวอย่างผักและผลไม้ที่เป็นแหล่งของเบต้า-แคโรทีนมาสัก 6 อย่าง
5. เบต้า-แคโรทีนมีประโยชน์อย่างไรในเชิงโภชนาการ
6. ท่านคิดว่าจะเกิดอะไรขึ้น ถ้าสารตัวอย่างที่นำเข้าสู่คอลัมน์ไม่แห้ง (ยังคงมีน้ำหลงเหลืออยู่) จงอธิบายและให้เหตุผล
7. จงบอกระบบตัวทำละลายที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนของการทดลองนี้

   ก. ใช้สกัดรงควัตถุออกจากผักใบเขียว

   ข. ใช้บรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์

   ค. ใช้ชะเบต้า-แคโรทีนออกจากคอลัมน์
8. ในการบรรจุตัวดูดซับในคอลัมน์ หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นในชั้นของตัวดูดซับ ควรแก้ไขอย่างไร