ตอนที่ 3

4 โครมาโทกราฟี

- ❑บทนำ
- ❑หลักการของโครมาโทกราฟี
- ❑ประเภทของโครมาโทกราฟี
  - โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ
  - โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง
  - โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

บทนำ

ในปี ค.ศ. 1903 นักพฤกษศาสตร์ชาวรัสเซียชื่อ Mikhail Tswett ทำการทดลองแยกสารที่มีสีจากพืช (plant pigments) โดยตัวดูดซับที่เป็นของแข็งซึ่งบรรจุในคอลัมน์ ผลปรากฏว่ามีแถบสีเกิดขึ้นในคอลัมน์ คือแถบสีเหลืองและแถบสีเขียว และให้ผลการทดลองเช่นเดิมเมื่อทำการทดลองซ้ำ ทำให้ทราบว่าสารที่มีสีจากพืช มีสารประกอบรวมอยู่มากกว่าหนึ่งชนิด Tswett เรียกกระบวนการแยกนี้ว่า โครมาโทกราฟี (chromatography) ซึ่งมาจากภาษากรีก (chroma แปลว่า สี, graphein แปลว่า วาดภาพ) โครมาโทกราฟีจึงมีความหมายว่า "แผนภาพที่เกิดจากการแยกสี" การทดลองของ Tswett เป็นการเริ่มต้นของโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ตัวดูดซับ (adsorption column chromatography) ซึ่งเป็นเทคนิคพื้นฐานในการทำโครมาโทกราฟีแบบอื่นๆ ที่ได้พัฒนาขึ้นในเวลาต่อมา

หลักการของโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟี เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของโมเลกุลของสาร เช่น สมบัติในการละลาย น้ำหนักโมเลกุล ประจุบนโมเลกุล หมู่สำคัญทางเคมี หรือความจำเพาะทางชีวภาพ โมเลกุลของสารละลาย (solute molecules) ที่ผสมกันอยู่จะผ่านเข้าสู่ระบบของโครมาโทกราฟีซึ่งประกอบด้วยส่วนคงที่ (stationary phase) และส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) สารซึ่งมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันจะแบ่งตัวอยู่ในส่วนทั้งสองได้ต่างกัน โดยสารที่ยึดกับส่วนคงที่ได้ดีจะเคลื่อนที่ได้ช้า ในขณะที่สารซึ่งถูกพาไปพร้อมกับส่วนเคลื่อนที่ได้ดีจะเคลื่อนที่ได้เร็ว ระยะทางการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดจึงแตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้

การศึกษาทางชีวเคมีนั้นมีความจำเป็นที่ต้องแยกสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิดที่ผสมกันอยู่ออกจากกัน เทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นวิธีหนึ่งซึ่งนิยมใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล ทั้งนี้โครมาโทกราฟีมีอยู่หลายประเภท ซึ่งสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารชีวโมเลกุลแต่ละชนิด

ประเภทของโครมาโทกราฟี

1. โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography)
2. โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (thin layer chromatography; TLC)
3. โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography)

1. โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ

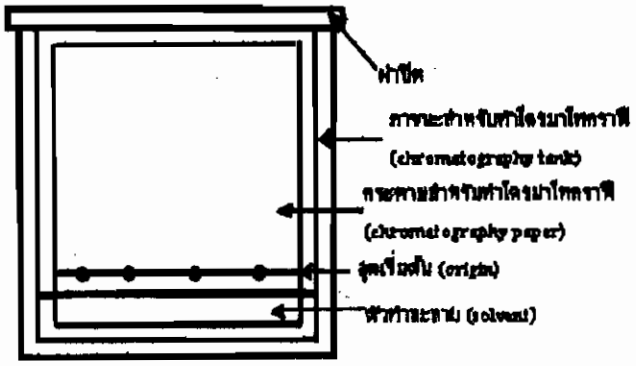
ระบบการแยกสารโดยโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ เป็นวิธีแยกสารออกจากกันโดยอาศัยหลักการแบ่งละลาย (partition) ส่วนคงที่คือน้ำที่ยึดกับตัวค้ำจุน (supporting medium) ซึ่งเป็นกระดาษ ส่วนเคลื่อนที่คือของเหลวซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่อิ่มตัวด้วยน้ำเรียกว่าตัวชะ (eluent) ส่วนเคลื่อนที่ทำหน้าที่แยกสารออกจากจุดเริ่มต้นไปตามทิศทางการเคลื่อนที่

ของระบบ สารที่นำมาแยกเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก (น้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 3,000) และสามารถให้ผลการแยกที่ดีกับสารที่มีปริมาณน้อย

ในการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ สารต่างๆ ซึ่งผสมกันอยู่จะกระจายตัวอยู่ในส่วนคงที่และส่วนเคลื่อนที่ตามค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (partition coefficient; α) เมื่ออยู่ในสภาวะสมดุลค่า α คือ

$$\alpha = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายที่อยู่กับที่}}{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายที่เคลื่อนที่}}$$

ในการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ ดังรูปที่ 4.1 เมื่อให้ตัวทำละลายชะสารในระยะเวลาหนึ่งสารที่มีค่า α ต่างกันจะแยกออกจากกันได้ ดังนั้นในระบบตัวทำละลายผสมหนึ่ง ๆ สารที่มีค่า α ต่างกันมาก สามารถแยกออกจากกันได้เร็ว ส่วนสารที่มีค่า α เท่ากันจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้



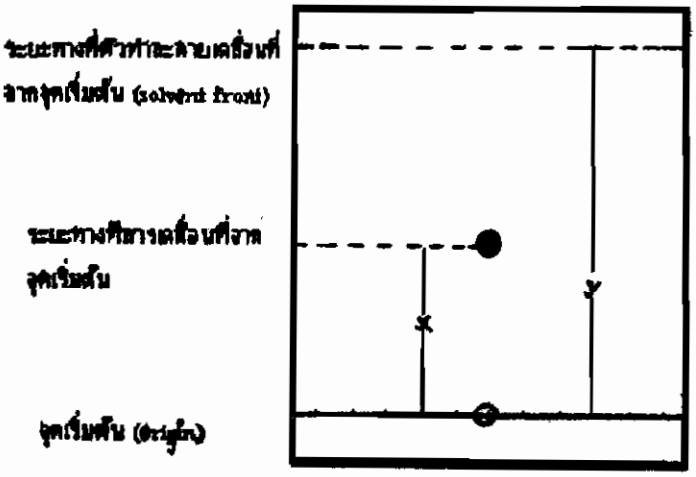
รูปที่ 4.1 แสดงการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ เมื่อหยดสารที่จุดเริ่มต้น (origin) จึงใส่ลงในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายอินทรีย์ ปิดภาชนะเพื่อให้สารแต่ละชนิดเคลื่อนที่ออกจากกัน

ส่วนคงที่คือน้ำที่ยึดกับกระดาษซึ่งเป็นเซลลูโลส โดยทั่วไปใช้กระดาษกรอง (filter paper) น้ำในเนื้อกระดาษเรียกว่า water of hydration น้ำสามารถละลายสารที่โพลาร์ได้ดี ส่วนเคลื่อนที่เป็นสารอินทรีย์ที่โพลาร์น้อยกว่าน้ำ หรือมีสภาพขั้วต่ำกว่าน้ำ สารที่โพลาร์

น้อยจะเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้นห่างออกไปพร้อมกับส่วนเคลื่อนที่ ดังนั้นสารที่โพลาร์น้อยสามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางมากกว่าสารที่โพลาร์มาก ความสัมพันธ์ของระยะทางการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิดจากจุดเริ่มต้น (origin) กับระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายจากจุดเริ่มต้น กำหนดเป็นค่า Retention factor (R_f)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น}}$$

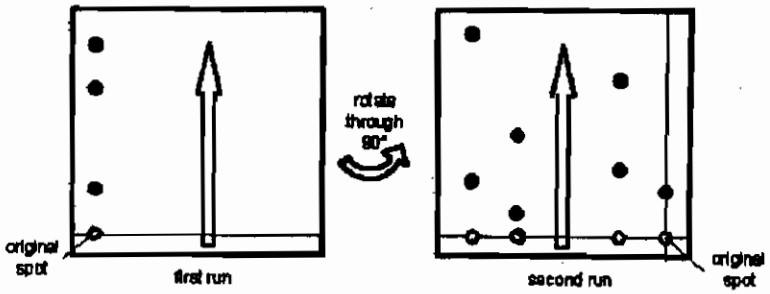
ค่า R_f ของสารแต่ละชนิดจะคงที่ภายใต้สภาวะหนึ่งๆ สามารถวิเคราะห์ได้ว่าสารตัวอย่างนั้นเป็นสารใดได้ เมื่อทำการทดลองหาค่า R_f ของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในการทดลองชุดเดียวกัน ดังรูปที่ 4.2 แสดงวิธีการหาค่า R_f ของสาร



รูปที่ 4.2 แสดงการหาค่า R_f ในการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ $R_f = \frac{x}{y}$

เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบกระดาษชนิด 2 มิติ (two dimensional paper chromatography) ดังรูปที่ 4.3 เป็นเทคนิคในการแยกสารที่ทำให้ผลการแยกดีขึ้น การหยดสารตัวอย่างจะทำที่มุมของกระดาษ แล้วใช้ระบบตัวทำละลายผสมหนึ่ง เพื่อให้สารเคลื่อนที่

แยกออกจากกัน จากนั้นหมุนกระดาษทำมุม 90 องศา แล้วใช้ระบบตัวทำละลายผสมอีกระบบหนึ่ง สารจะแยกออกจากกันได้มากขึ้น



รูปที่ 4.3 แสดงการทำโครมาโทกราฟีแบบกระดาษชนิด 2 มิติ

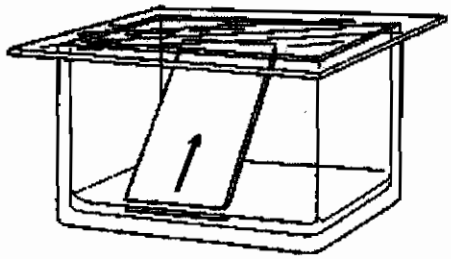
2. โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

การแยกสารโดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง มีหลักการเช่นเดียวกับโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ คือสารแต่ละชนิดซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันนั้น มีค่าสัมประสิทธิ์ของการแบ่งละลายที่แตกต่างกัน ระบบการแยกประกอบด้วยส่วนคงที่ซึ่งเป็นของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) และส่วนเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายที่ทำหน้าที่เป็นตัวชะ (eluent) ตัวดูดซับเป็นของแข็งที่ถูกนำมาเคลือบติดอยู่กับแผ่นกระจกหรือพลาสติก ตัวดูดซับที่นิยมใช้กันมากได้แก่ ซิลิกาเจลจี (silica gel G) และอะลูมินา (alumina) นอกจากนี้ยังมีตัวดูดซับชนิดอื่นๆ ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสามารถนำมาใช้แยกสารได้หลายประเภท ส่วนเคลื่อนที่ของระบบอาจใช้ตัวทำละลายเดี่ยวหรือตัวทำละลายผสมซึ่งมีสภาพขั้วต่ำกว่าตัวดูดซับ

เมื่อนำสารมาแยกโดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง ดังรูปที่ 4.4 สารบางชนิดจะถูกยึดไว้กับตัวดูดซับซึ่งเป็นส่วนคงที่ได้ดี แต่สารบางชนิดถูกพาเคลื่อนที่ไปพร้อมกับส่วนเคลื่อนที่ได้ดี สารแต่ละชนิดจึงมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่เท่ากัน ทั้งนี้การแยกเกี่ยวข้องกับแรงที่สารกระทำกับตัวดูดซับ ได้แก่ แรงแวนเดอร์วาลล์ พันธะไฮโดรเจน และการแลกเปลี่ยนประจุ เป็นต้น รวมทั้งการแบ่งละลายของสารในตัวทำละลายเคลื่อนที่

ตารางที่ 4.1 แสดงชนิดของตัวดูดซับที่ใช้แยกสารโดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

ตัวดูดซับ	ชนิดของสารที่นำมาแยก
ซิลิกาเจล	กรดอะมิโน, น้ำตาล, กรดไขมัน, ลิปิด, อัลคาลอยด์
อะลูมินา	กรดอะมิโน, สารประกอบฟีนอล, คาโรทีน, วิตามิน, สเตียรอยด์, อัลคาลอยด์
เซลลูโลส	กรดอะมิโน, นิวคลีโอไทด์, อัลคาลอยด์
แป้ง	กรดอะมิโน
เซฟาเดกซ์	กรดอะมิโน, โปรตีน



รูปที่ 4.4 การทำโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) เมื่อหยดสารลงบนแผ่น TLC ให้อยู่เหนือระดับของตัวทำละลาย จากนั้นนำแผ่น TLC ใส่ลงในภาชนะที่บรรจุตัวทำละลาย ปิดฝาภาชนะ สารจะเริ่มเคลื่อนที่ในทิศทางจากด้านล่างสู่ด้านบน

3. โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์เป็นการแยกสารโดยที่ส่วนคงที่คือตัวกลางหรือตัวดูดซับซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ในขณะที่ส่วนเคลื่อนที่คือตัวทำละลายหรือตัวชะที่ไหลผ่านคอลัมน์ ดังรูปที่ 4.5 สารต่างๆ จะแยกออกจากกันตามความสามารถในการยึดกับตัวกลางและการละลายในตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ แบ่งชนิดของโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ตามประเภทของตัวกลางที่บรรจุในคอลัมน์ ดังนี้

3.1 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (gel filtration chromatography)

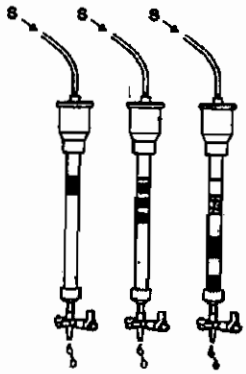
3.2 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion–exchange chromatography)

3.3 โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี (affinity chromatography)

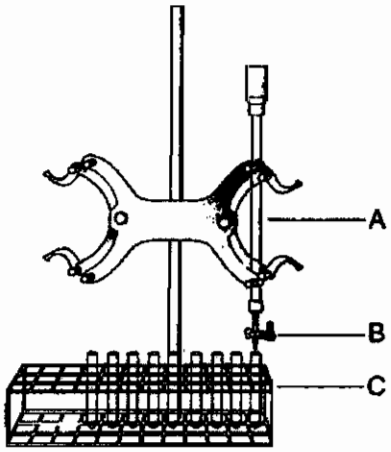
3.4 โครมาโทกราฟีแบบก๊าซ–ของเหลว (gas–liquid chromatography; GLC)

3.5 โครมาโทกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง (high performance liquid chromatography; HPLC)

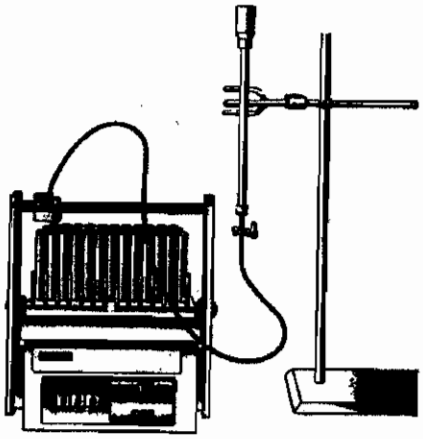
การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ที่ประกอบขึ้นเอง โดยทั่วไปอุปกรณ์ประกอบด้วยคอลัมน์ ฐานยึดคอลัมน์ และหลอดทดลองสำหรับเก็บสารละลายที่ได้จากคอลัมน์ ดังรูปที่ 4.6 ในกรณีที่ต้องเก็บสารละลายจากคอลัมน์จำนวนมากอาจใช้เครื่องมือเก็บสารละลาย (fraction collector) ดังรูปที่ 4.7 เครื่องมือนี้สามารถตั้งโปรแกรมเพื่อเก็บสารละลายแต่ละหลอดตามปริมาตรที่ต้องการ การทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์บางกรณีมีการปรับระบบตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ให้เป็นระบบเกรเดียนท์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสาร ดังรูปที่ 4.8 และมีอุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูลประกอบรวมอยู่ในระบบทำให้ได้ข้อมูลออกมาในขณะที่ได้ละลายจากคอลัมน์



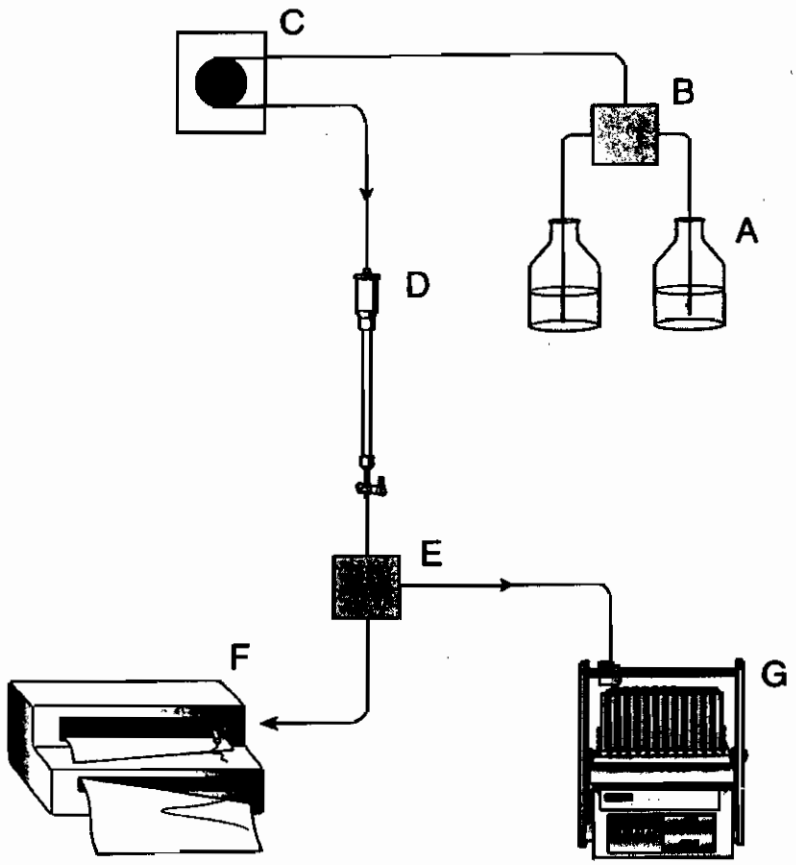
รูปที่ 4.5 หลักการทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ รูปด้านซ้ายแสดงการใส่สารผสมลงสู่คอลัมน์ จากนั้นชะด้วยตัวทำละลาย รูปกลางสารเริ่มแยกออกจากกันเมื่อทำการชะด้วยตัวทำละลายไประยะหนึ่ง รูปขวาสารชนิดแรกเริ่มไหลออกจากคอลัมน์



รูปที่ 4.6 เครื่องมือที่ใช้ทั่วไปในการทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดย A คือ คอลัมน์ B คือก๊อกปิด-เปิด และ C คือหลอดทดลองที่ใช้เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์



รูปที่ 4.7 แสดงเครื่องมือที่ใช้เก็บสารละลาย (fraction collector) ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์



รูปที่ 4.8 แสดงการทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ด้วยระบบเกรเดียนท์ A คือภาชนะที่บรรจุตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน B คือเครื่องมือในการเตรียมตัวทำละลายที่ผสมกันระหว่างภาชนะ A ทั้งสอง C คืออุปกรณ์ที่ทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่สู่คอลัมน์ D ส่วน E คือตัวตรวจจับสัญญาณแล้วส่งไปยังตัวบันทึกข้อมูล F G คือเครื่องมือในการเก็บสารละลายจากคอลัมน์

โครมาโทกราฟีแบบก๊าซ-ของเหลว

โครมาโทกราฟีแบบก๊าซ–ของเหลวมีหลักในการแยกสารโดยอาศัยการแบ่งละลาย โดยใช้คอลัมน์ที่ยาวและเล็ก ซึ่งทำด้วยแก้วหรือโลหะ ภายในบรรจุด้วยของแข็งที่เฉื่อย มีการเคลือบด้วยของเหลวที่ไม่ระเหยหรือมีจุดเดือดสูง เช่น ซิลิโคน (silicone) หรืออนุพันธ์ของพอลิออกซีเอธิลีน (polyoxyethylene)

ในการทำโครมาโทกราฟีแบบก๊าซ–ของเหลว จะทำการฉีดสารละลายที่มีสารต่างๆ ผสมกันอยู่เข้าที่ปลายด้านหนึ่งของคอลัมน์ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 170 – 225 °C อุณหภูมินี้จะทำให้สารกลายเป็นไอ และส่งผ่านไปยังคอลัมน์โดยก๊าซที่เฉื่อย เช่น ไนโตรเจน (N_2) สารจะแยกออกจากกันตามคุณสมบัติการแบ่งละลาย ระหว่างส่วนคงที่คือของเหลวที่เคลือบอยู่ในคอลัมน์กับส่วนเคลื่อนที่คือก๊าซ

โครมาโทกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง

โครมาโทกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง หรือเรียกโครมาโทกราฟีแบบของเหลวความดันสูง (high pressure liquid chromatography) เรียกชื่อย่อว่า HPLC มีหลักในการแยกโดยใช้การดูดซับ การแลกเปลี่ยนไอออน ขนาด หรือโครมาโทกราฟีแบบ reverse phase โดยมีตัวกลางถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ที่มีขนาดเล็กและยาว คอลัมน์อาจทำด้วยแก้วหรือพลาสติก สารละลายที่ทำการแยกและวิเคราะห์จะส่งผ่านคอลัมน์ด้วยแรงดันสูง (ประมาณ 10,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)

การแยกสารโดยวิธี HPLC มีข้อดีคือ สามารถตรวจสอบผลการแยกได้สะดวก โดยอาศัยการวัดการดูดกลืนแสง วัดดรรชนีหักเห (refractive index) หรือวัดฟลูออเรสเซนซ์ และวิเคราะห์ผลจากการประมวลผ่านคอมพิวเตอร์ ใช้เวลาในการแยกน้อย สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยกว่าพิโคโมล (picomole) ได้

หมายเหตุ เทคนิคการทำโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และโครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี รายละเอียดอยู่ในบทที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

การทดลองที่ 4.1

การแยกกรดอะมิโนโดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

การทดลองนี้เป็นการแยกกรดอะมิโนที่ผสมกัน โดยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC) และทำการหาค่า R_f บนแผ่น TLC สามารถเปรียบเทียบหาชนิดของกรดอะมิโนโดยใช้กรดอะมิโนมาตรฐาน

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

แผ่น TLC ขนาด 7 × 7 เซนติเมตร

หลอดคาปิลลารี

กระบอกสำหรับสเปรย์สาร

สารเคมี

1% สารละลายกรดอะมิโนผสมใน citrate buffer pH 3

2 % (w/v) กรดอะมิโนมาตรฐาน

ฟีนอล : กรดอะซิติก : น้ำ (4 : 1 : 1)

สารละลายนินไฮดริน

วิธีการทดลอง

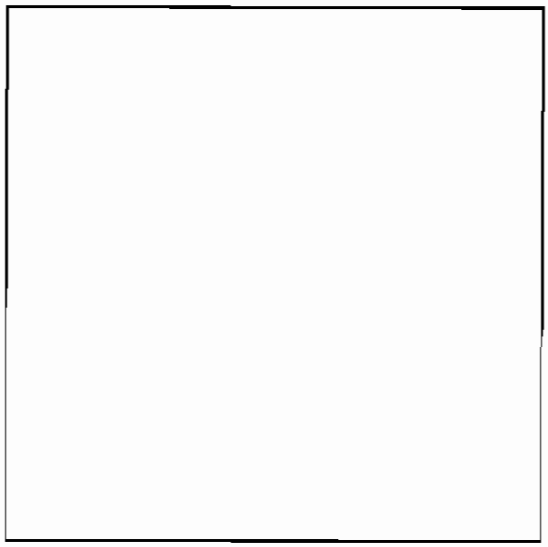
1. เตรียมแผ่น TLC ขนาด 7 × 7 เซนติเมตร (ห้ามจับบริเวณที่มีสารเคลือบอยู่)

2. spot กรดอะมิโนผสมลงบนแผ่น TLC ให้สูงจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร โดยพยายาม spot จุดให้เล็กที่สุด และ spot กรดอะมิโนมาตรฐานบนแผ่น TLC แผ่นเดียวกัน

3. นำแผ่น TLC ไปวางในภาชนะที่มีสารผสมของฟีนอล : กรดอะซิติก : น้ำ ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 ปิดฝาภาชนะ ตั้งไว้จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่มาเกือบถึงด้านบน

4. นำแผ่น TLC ออกจากภาชนะ ขีดเส้นระยะที่สารละลายเคลื่อนที่ ผึ่งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปสเปรย์ด้วยนินไฮดริน จะปรากฏสีม่วงตรงบริเวณที่มีกรดอะมิโน ให้หาค่า R_f ของกรดอะมิโนที่แยกได้

ผลการทำ TLC



คำถาม

1. กรดอะมิโนตัวอย่างที่แยกได้มีชื่อว่าอะไรบ้าง

   .....

   .....

2. ในกรณีที่ค่า R_f ของกรดอะมิโนใกล้เคียงกันมาก หรือเกือบเท่ากัน จะทำการทดลองวิธีใด เพื่อแยกกรดอะมิโนนั้นๆ ออกจากกัน

   .....

   .....