การทดลองที่ 7 การแยกกรดอะมิโนด้วยโครมาโตกราฟีหลักการการแบ่งส่วน

อ.ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อให้มีความเข้าใจในโครมาโตกราฟีหลักการแบ่งส่วน

2. เพื่อให้รู้จักเทคนิควิธีการของโครมาโตกราฟีแบบกระดาษและแบบแผ่นเคลือบ ตลอดจนการแปลผล

โครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน (partition chromatography) เป็นระบบการแยกสารที่มีวัฏภาคคงที่เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็ง วัฏภาคเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวเช่นกันแต่เป็นตัวทำละลายที่ผสมได้เพียงบางส่วนกับตัวทำละลายในวัฏภาคคงที่ ซิลิกาเจล คีเซลกัวร์ (kieselguhr) หรือผงเซลลูโลสมักใช้เป็นตัวค้ำจุนวัฏภาคคงที่ ตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่มักมีสภาพมีขั้วสูงกว่าตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เทคนิคนี้เรียกว่า **โครมาโตกราฟีแบบเฟสปกติ (normal phase chromatography)** ถ้ากรณีที่วัฏภาคคงที่เป็นตัวทำละลายที่มีสภาพมีขั้วต่ำกว่าในวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อใช้ในการแยกสารประเภทไม่มีขั้ว เทคนิคนี้เรียกว่า **โครมาโตกราฟีแบบกลับเฟส (reverse phase chromatography)** ซึ่งต้องเคลือบผิวตัวค้ำจุนด้วยสารพวกไม่ชอบน้ำเสียก่อนหรือใช้ตัวค้ำจุนที่มีสายโซ่ไฮโดรคาร์บอนเชื่อมติดอยู่ เช่น ซิลิกาเจลที่มี C_8 และ C_{18} เชื่อมติดอยู่

การเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับความเข้มข้นสัมพันธ์ในวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ ตัวถูกละลายจะเคลื่อนที่กลับไปกลับมาระหว่างวัฏภาคทั้งสอง อัตราการเคลื่อนที่ของสารขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารในทั้งสองวัฏภาคนั้น ซึ่งสามารถแสดงเป็น**ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งส่วน (partition coefficent (k))**ได้ว่า คือ **ความเข้มข้นของสารในวัฏภาคเคลื่อนที่หารด้วยความเข้มข้นของสารในวัฏภาคคงที่** เมื่อถึงสมดุลแล้ว ค่า k นี้มีค่าคงที่ตามอุณหภูมิที่กำหนด ดังนั้นสารที่มีความสามารถละลายในวัฏภาคคงที่ได้ดีกว่าจะเคลื่อนตัวไปได้ช้ากว่าสารที่มีความสามารถละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่ดีกว่า

การเปลี่ยนส่วนผสมของชนิดตัวทำละลายมีผลเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของตัวถูกละลายในวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ สารบางชนิดสามารถอยู่ในรูปของไอออนได้หลายรูป เช่น กรดอะมิโนสามารถอยู่ในรูปแคตไอออน แอนไอออน ไอออนขั้วคู่ (zwitterion) หรือไอออนขั้วคู่รวมกับไอออนชนิดใดชนิดหนึ่งอีกชนิด การแยกให้ได้ผลดีควรมีการควบคุมรูปไอออนให้อยู่ในรูปใดรูปหนึ่ง ซึ่งทำได้หลายทาง เช่น เติมกรดหรือด่างลงในสารตัวอย่าง หรือลงในวัฏภาคคงที่ เติมบัฟเฟอร์ลงในวัฏภาคคงที่

ในการทดลองครั้งนี้เป็นการแยกกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ อะลานีน วาลีน และลิวซีน โดยใช้ตัวชะที่มีเทอเชียรีบิวทานอล (t-butanol) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และน้ำเป็นวัฏภาคคงที่ แต่ตัวทำละลายทั้งสองสามารถผสมรวมกันได้ทุกอัตราส่วน ในระบบโครมาโทกราฟีจะแยกเป็นวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ต้องอาศัยตัวค้ำจุน เซลลูโลสที่ใช้หรือที่เป็นองค์ประกอบในในกระดาษมีสมบัติที่ชอบน้ำ จึงทำให้น้ำมาเกาะและแยกตัวออกมาทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ได้

การทดลองที่ 7.1 การแยกกรดอะมิโนโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้

1. กระดาษกรอง Whatman No.1
2. สารละลายกรดอะมิโนอาลานีน วาลีน ลิวซีน และสารละลายผสมของกรดอะมิโน
3. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์
4. เทอเชียรีบิวทานอล (t-butanol)
5. น้ำยานินไฮดริน (สารละลาย 0.2% นินไฮดรินในอาซีโตน)
6. ขวดแก้วที่มีจุกและก้านลวดที่จุกไว้สำหรับแขวนกระดาษ

วิธีทดลอง

1. ตัดกระดาษกรองให้มีขนาด 2.5 × 9 เซนติเมตร 2 แผ่น เจาะรูไว้ฟากหนึ่งของกระดาษ อีกฟากหนึ่งวัดจากขอบกระดาษขึ้นมา 1 เซนติเมตร ใช้ดินสอดำลากเส้นและทำเครื่องหมายเป็นจุดแยกจากกันไว้ 4 จุดบนแนวเส้นนี้ไว้เป็นตำแหน่งสำหรับหยดสารละลายกรดอะมิโน จากนั้นวัดขึ้นไป 5 เซนติเมตรจากแนวเส้นที่ลาก กำหนดเป็นแนวตัวทำละลาย (solvent front) ด้วยการลากเส้นด้วยดินสอ ทำเช่นนี้ไว้แผ่นหนึ่งและอีกแผ่นหนึ่ง กำหนดแนวตัวทำละลายไว้ 3 เซนติเมตร
2. ใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายกรดอะมิโนแต่ละชนิด และหยดลงตามตำแหน่งกรดอะมิโนที่กำหนดไว้ 2 ไมโครลิตร โดยพยายามให้หยดสารบนกระดาษมีขนาดเล็กที่สุด
3. เตรียมตัวทำละลายสำหรับใช้ในการ develope ซึ่งประกอบด้วยเทอเชียรีบิวทานอล : น้ำ : แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 5:1:1 โดยปริมาตร แล้วเติมลงในขวด แล้วปิดจุกขวดไว้
4. เมื่อจุดหยดสารบนกระดาษแห้งแล้ว นำแผ่นกระดาษไปแขวนในขวดที่มีตัวทำละลายสำหรับใช้ในการ develope โดยไม่ต้องจุ่มกระดาษลงในน้ำยา เพื่อทำการ equilibrate เป็นเวลา 30 นาที
5. กดลวดที่แขวนกระดาษให้ปลายกระดาษจุ่มลงตัวทำละลายในเพื่อทำการ develope แบบซึมขึ้น
6. เมื่อตัวทำละลายซึมขึ้นถึงแนวตัวทำละลาย 3 หรือ 5 เซนติเมตรแล้ว เปิดขวดนำแผ่นกระดาษกรองออกมาผึ่งให้ตัวทำละลายระเหย แล้วนำไปอบที่ 100 °ซ ให้ตัวทำละลายทุกชนิดระเหยออกหมด
7. วางแผ่นกระดาษกรองที่แห้งแล้วลงบนกระจกนาฬิกา ใช้หลอดหยดดูดน้ำยานินไฮดรินหยดรดลงบนแผ่นกระดาษกรองให้ชุ่มทั่วแผ่น นำไปอบที่ 100 °ซ ทิ้งไว้ชั่วครู่หนึ่ง
8. นำแผ่นกระดาษออกจากตู้อบ วงรอบจุดตามรอยสี หาจุดกึ่งกลางของจุดสี แล้วหาค่า R_f ของแต่ละจุดและวิเคราะห์ผลการแยกของสารละลายผสมว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดใดบ้าง โดยที่ค่า

$$\mathbf{R_f\ (retardation\ factor)} = \frac{\textbf{ระยะทางตั้งแต่จุดเริ่มต้นจนถึงจุดที่สารเคลื่อนที่ถึง}}{\textbf{ระยะทางตั้งแต่จุดเริ่มต้นจนถึงแนวตัวทำละลาย}}$$

9. เปรียบเทียบลักษณะผลการแยกของกรดอะมิโนและประสิทธิภาพการแยกระหว่างการ develope 3 และ 5 เซนติเมตร

ผลการทดลองที่ 7.1

ตัวทำละลายที่ใช้		……..	……
ระยะทางที่ develope		…….	…….
ระยะทางที่สาร	จุดที่ 1	…….	…….
เคลื่อนที่ได้ และ	2	…….	…….
ค่า R_f ของ	3	…….	…….
แต่ละจุด	4	…….	……...

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 7.1

การทดลองที่ 7.2 การแยกกรดอะมิโนโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ

สารเคมีและอุปกรณ์ 1. แผ่นเคลือบที่เคลือบด้วยผงเซลลูโลสผลึกละเอียด (Microcrystalline cellulose)

2. ขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิด

3. สารเคมีที่ระบุไว้ในการทดลองที่ 7.1 ข้อ 2-5

วิธีทดลอง

1. นำแผ่นเคลือบมา 2 แผ่น กำหนดแนวจุดหยดสารและแนวตัวทำละลาย (solvent front) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 7.1 ต่างกันตรงที่**ห้ามใช้ดินสอลากทำแนวหยดจุดสาร** ให้ทำโดยวัดจากขอบล่างของแผ่นขึ้นมา 1 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายเล็ก ๆ ไว้ที่บริเวณขอบทั้งสองด้านของแผ่น **โดยห้ามให้ผงเคลือบบริเวณนั้นหลุดร่อนออกเป็นบริเวณกว้างโดยเด็ดขาด** จากนั้นวัดขึ้นไป 5 เซนติเมตรจากแนวเครื่องหมายเล็ก ๆ ที่ทำไว้ กำหนดเป็นแนวตัวทำละลาย (solvent front) ด้วยการขีดลากเป็นรอยแนวร่องด้วยดินสอ และทำเช่นเดียวกันนี้กับแผ่นเคลือบอีกแผ่นหนึ่ง แต่กำหนดแนวตัวทำละลายไว้ที่ 3 เซนติเมตร

2. หยดสารโดยใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายกรดอะมิโนแต่ละชนิด แล้วหยดลงตามตำแหน่งกรดอะมิโนที่กะระยะด้วยสายตาให้ได้พอดี 4 จุดที่อยู่ห่างกันในแนวระนาบเดียวกันกับเครื่องหมายเล็ก ๆ ที่อยู่บริเวณขอบทั้งสองด้านของแผ่น **การหยดจุดสารนั้นต้องไม่ไปทำให้ผิวของแผ่นเคลือบกระทบกระเทือน**หรือ**เกิดหลุมบริเวณที่หยดจุดสารโดยเด็ดขาด**

3. เตรียมชุดตัวทำละลายที่ใช้ในการ develope เช่นเดียวกับการทดลองที่ 7.1 แล้วเติมลงในขวดแก้วปากกว้าง ปิดฝาไว้

4. เมื่อจุดหยดสารบนแผ่นเคลือบแห้งแล้ว (อาจใช้เครื่องเป่าผมเป่าจุดหยดสารให้น้ำในสารตัวอย่างระเหยไป) นำแผ่นเคลือบใส่ลงในขวดแก้วให้ develope แบบซึมขึ้น ปิดฝาไว้ให้สนิท

5. เมื่อตัวทำละลายซึมถึงแนวตัวทำละลาย 3 หรือ 5 เซนติเมตร ให้นำแผ่นเคลือบออกจากขวดมาผึ่งให้แห้ง หรือเป่าด้วยลมร้อนจากเครื่องเป่าผม เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด

6. ทดลองต่อตามข้อ 7 และ 8 ของการทดลองที่ 7.1

7. เปรียบเทียบประสิทธิภาพและผลการแยกสารของการ develope 3 และ 5 เซนติเมตร

8. เปรียบเทียบประสิทธิภาพและผลการแยกสารของโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบนี้กับโครมาโตกราฟีแบบกระดาษในการทดลองที่ 7.1

ผลการทดลองที่ 7.2

ตัวทำละลายที่ใช้	……..	……
ระยะทางที่ develope	…….	…….
ระยะทางที่สาร จุดที่ 1	…….	…….
เคลื่อนที่ได้ และ 2	…….	…….
ค่า R_f ของ 3	…….	…….
แต่ละจุด 4	…….	……...

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลองที่ 7.2

คำถาม

1. เมื่อต้องการให้ผลการแยกสารของโครมาโทกราฟีแบบกระดาษดีขึ้น ต้องแก้ไขอย่างไรบ้าง

2. โครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อค่า R_f อย่างไร เพราะเหตุใด

3. สรุปเปรียบเทียบโครมาโทกราฟีแบบกระดาษและแบบแผ่นเคลือบในแง่มุมต่าง ๆ

สอบปฏิบัติการประจำบท

ให้เลือกหลอดตัวอย่างสารละลายกรดอะมิโนผสมมาหลอดหนึ่งมาวิเคราะห์ว่ามีกรดอะมิโนชนิดใดผสมอยู่ในหลอดดังกล่าว (มีอยู่ 2 ชนิดต่อหลอด) โดยการใช้โครมาโทกราฟีแบบกระดาษและแบบแผ่นเคลือบ หยดสารละลายจากหลอดที่เลือกไว้ลงบนแผ่นกระดาษหรือแผ่นเคลือบลงในตำแหน่งจุดที่ 4 ทั้งนี้ให้ทำสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน 3 ชนิด คือ กรดอะมิโนอะลานีน วาลีน ลิวซีน ควบคู่ไปด้วยในแผ่นกระดาษและแผ่นเคลือบ โดยหยดลงในตำแหน่งจุดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เขียนผลและสรุปผลการทดลอง ระบุชนิดของกรดอะมิโนลงในรายงาน ส่งในชั่วโมงการเรียนครั้งต่อไป