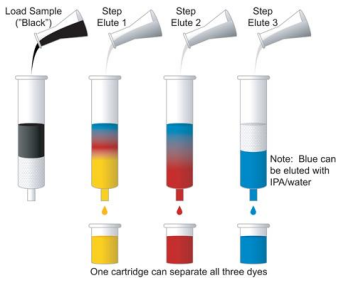
ปฏิบัติการที่ 10
โครมาโทกราฟฟี
(Chromatography)



วัตถุประสงค์ เพื่อแยกสารผสม และคำนวณหาประสิทธิภาพของคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (Column Chromatography)

อุปกรณ์

1. คอลัมน์ (Column)
2. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 cm^3
3. หลอดหยดปลายยาว (Dropper)
4. แท่งแก้ว (Stering rod)
5. ที่จับบิวเรต (Burette clamp)
6. ขาตั้ง (Stand)
7. สำลี (Cotton)
8. ทราย (Sand)
9. นาฬิกาจับเวลา (Stopped watch)

สารเคมี

1. ซิลิกาเจล (SiO_2)
2. 20% *v/v* Ethanol
3. 3:1 กรดอะซิติก
4. สารละลายผสม Methyl Orange และ Methylene blue

โครมาโทกราฟี เป็นเทคนิคการแยกสารละลายให้บริสุทธิ์ หรือแยกสารผสมออกจากกันซึ่งที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน โครมาโทกราฟี แปลว่า การแยกออกเป็นสี ๆ นอกจากจะแยกสารที่มีสีได้แล้ว วิธีโครมาโทกราฟียังสามารถแยกสารที่ไม่มีสีได้อีกด้วย

วิธีทางโครมาโทกราฟีเกี่ยวข้องกับการกระจาย (Distribution) ของสารระหว่างสองเฟส (Phase)โดยเฟสหนึ่งอยู่กับที่เรียกว่า Stationary p hase ส่วนอีกเฟสหนึ่งเคลื่อนที่ เรียกว่า mobile phase เราสามารถแบ่งโครมาโทกราฟีอย่างกว้าง ๆ ได้เป็น 2 พวก ตามลักษณะของเฟสที่เกี่ยวข้องคือ

Adsorption Chromatography ในกรณีนี้ Stationary phase เป็นของแข็ง เช่น อะลูมินา ซิลิกาเจล ส่วน Mobile phase อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ตัวอย่างได้แก่ Column Chromatography , Thin Layer Chromatography , Gas-solid Chromatography

Partition Chromatography ในกรณีนี้ Stationary phase เป็นของเหลวส่วนมากมักจะเป็นน้ำ ซึ่งถูกพยุงอยู่ด้วยของแข็ง (Supporter) ที่พรุน เช่น ดินเบ า (Kieselguhr) หรือ เซลลูโลส (Cellulose) ส่วน Mobile phase อาจเป็นแก๊สหรือของเหลวก็ได้ ตัวอย่างได้แก่ Paper Chromatography, Gas-Liquid Chromatography

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่พอจะทำการทดลองได้ง่าย และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ได้แก่

1. คอลัมน์ โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)
2. ทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)
3. เปเปอร์ โครมาโทกราฟี (Paper Chromatography)

Column Chromatography วิธีนี้เราใช้คอลัมน์แก้วบรรจุตัวดูดซับ (Absorbent) ซึ่งชุ่มอยู่ด้วยตัวทำละลาย (Solvent) ชนิดหนึ่ง เอาสารผสมที่ต้องการแยก (Solute) ซึ่งละลายอยู่ในตัวทำละลายอันเดียวกันข้างต้น มาหยดลงบนตัวดูดซับ แล้วจึงเติมตัวทำละลายตามลงมา ตัวทำละลายจะค่อย ๆ ชะสารที่ต้องการจะแยกให้เคลื่อน ที่ลงไป (elute) ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน จนในที่สุดจะได้แถบสีของแต่ละสารแยกออกจากกัน (ในกรณีที่สารเหล่านั้นมีสีในตัวเอง)

ถ้าสารเหล่านั้นไม่มีสี เราจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นเพื่อหาว่าแต่ละแถบ ของสารอยู่ส่วนไหนของคอลัมน์ เช่นอาจตรวจด้วยแสงอัลตราไวโอเลต หรือสเปรย์ด้วยรีเอเจนต์บางชนิดไปบนตัวดูดซับสำหรับตรวจหาสาร หรือเคลือบตัวดูดซับด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เมื่อสารอยู่ที่ตำแหน่งใดตรงนั้นจะมืด เพราะสารไปบังการเรืองแสง หรืออาจตรวจด้วยเครื่อง Detector ก็ได้

การแยกสารในสารผสมออกจากกันได้ เนื่องจากแต่ละสารถูกดูดซับไว้โดยตัวดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดซับไว้มากกว่า ย่อมเคลื่อนลงมาช้ากว่ าสารที่ถูกดูดซับน้อยกว่า จากหลักกา รนี้เราสามารถแยกสารหลายชนิดออกจากกันได้ หรือ แยกสารมีขั้วต่างกันออกจากกันได้ สารที่มีขั้วมากจะ ถูกดูดไว้แน่นและถูกชะได้ยากกว่าสารที่มีขั้วน้อยกว่า

การแยกสารผสมออกจากกันได้ชัดเจน และห่างกันในเวลาไม่มากนัก แสดงถึงประสิทธิภาพ ของ Column

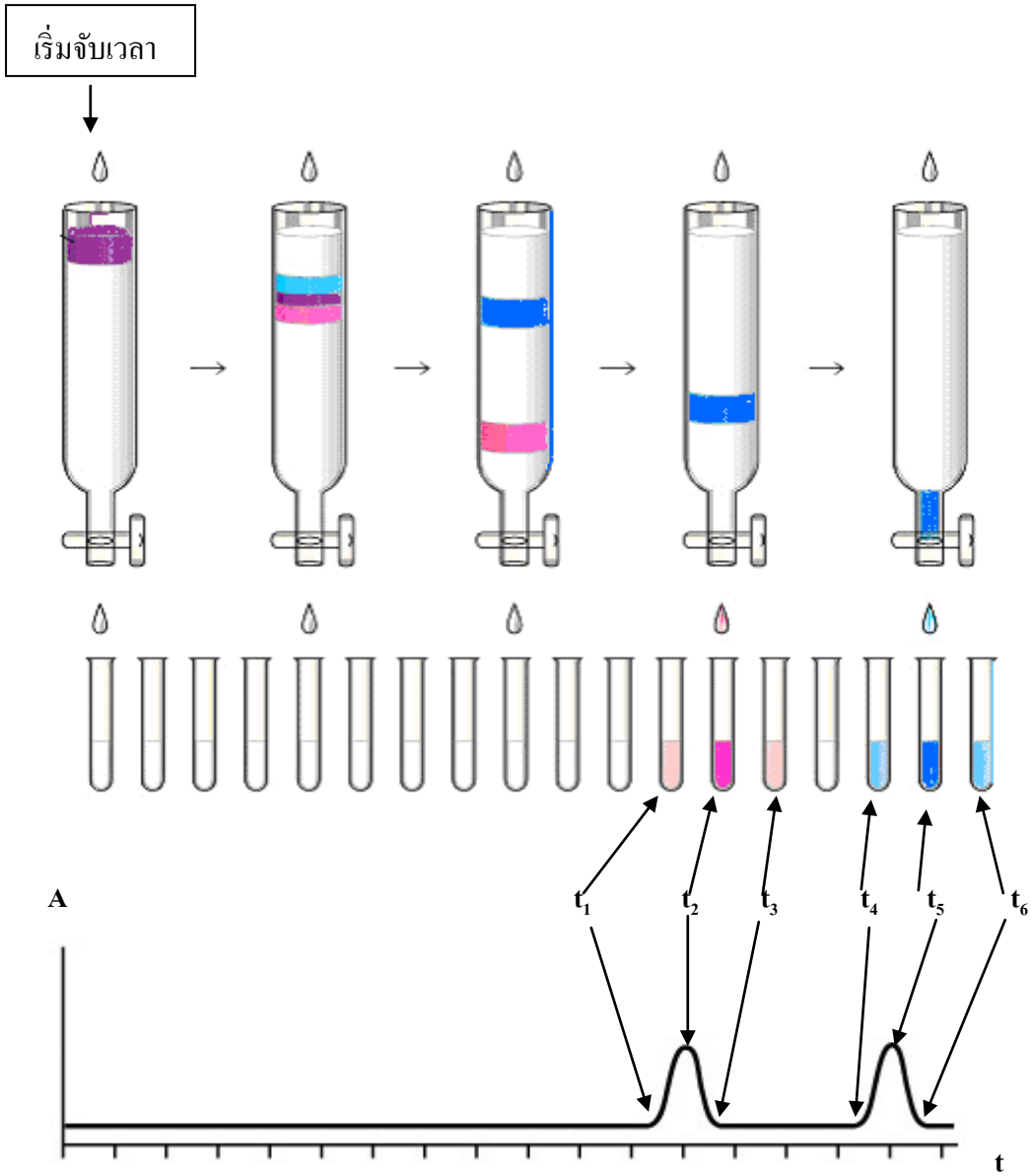
(Resolution) ที่มีความสามารถแยกสาร 2 ชนิดออกจากกัน ประสิทธิภาพของ Column สามารถหาได้โดยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{Resolution } (R_s) = \frac{2\Delta Z}{(W_A + W_B)}$$

เมื่อ ΔZ เป็นระยะห่างระหว่างสองยอด Peak ที่ได้จากการแยก (t_5- t_2)

W_A เป็นความกว้างของฐาน Peak A ($t_3 - t_1$)

W_B เป็นความกว้างของฐาน Peak B (t_6- t_4)



รูปที่ 9.1 Chromatogram ที่แสดงถึง Resolution ที่ดีของ Column

ตัวอย่างสารที่จะแยกออกจากกันได้โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบดูดซับนี้ คือพวกสีย้อม (dye), Chlorophyll, alkaloid ฯลฯ ตัวดูดซับที่ใช้ส่วนมากคือ Alumina (Al_2O_3) หรือ silica gel (SiO_2) , silica gel ใช้ได้ดีกับสารที่เป็นเบส และ

ใช้ได้ดีกับสารเกือบทุกชนิด (โดยเฉพาะสารที่เป็นกรดหรือกลาง หรือเบสที่อ่อนมาก)

วิธีการทดลอง

1. ใช้สำลีอุดปลายคอลัมน์เล็กน้อยและเติมทรายเล็กน้อย เติม 20% ethanol ให้สูงประมาณ 4 ซม.
2. ค่อยๆ บรรจุ Silica gel ลงในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 5 -7 ซม. โดยผ่านกรวยกระดาษที่มีรูเล็กๆ ขนาดปลายปากกา ระวังอย่าให้ติดข้างๆคอลัมน์ ถ้าติดข้างคอลัมน์ให้ฉีดล้างด้วย 20% ethanol เพื่อให้ Silica กระจายตัวสม่ำเสมอตลอดทั้งคอลัมน์
3. เปิดปลายคอลัมน์ปล่อยให้ 20% ethanol ไหลออกจากคอลัมน์ (สังเกตจากจำนวนหยด/นาที ไม่ควรน้อยกว่า 10) จนระดับของ 20% ethanol เสมอกับผิว Silica gel ให้ปิดปลายคอลัมน์ไว้ (ถ้าน้อยกว่า 10 หยดฝนที แสดงว่าคอลัมน์แน่นเกินไป ให้ทำใหม่)
4. หยดสารตัวอย่างผสม ลงบนตัวดูดซับประมาณ 4 – 5 หยด ถ้ามีสารตัวอย่างผสมติดข้างคอลัมน์ ให้ไล่สารที่ติดด้วย 20% ethanol เพียงเล็กน้อยด้วย dropper
5. เปิดปลายคอลัมน์เพื่อให้อย่างสารตัวอย่างผสมค่อย ๆ ซึมลงไปจนหมด
6. ค่อยๆเติม 20% ethanol ลงไปชะสารตัวอย่างผสมโดยให้ 20% ethanol มีระดับสูงกว่าผิว Silica 2 – 3 ซม.
7. เริ่มจับเวลาด้วยนาฬิกาจับเวลา ให้เฝ้าดูคอลัมน์อย่าให้ระดับ 20% ethanol ลดลงต่ำกว่าระดับ Silica ต้องหมั่นเติม 20% ethanol ลงไปในคอลัมน์จนกระทั่งแถบสี เคลื่อนลงมาจนถึงปลายคอลัม น์ (ใช้หลอดแก้วรองรับไว้) เมื่อแถบสีที่ 1 เริ่มหยดออกมาให้นับเวลาเป็น t_1
8. เมื่อส่วนที่เข้มที่สุดของแถบสีที่ 1 เริ่มหยดออกมาให้นับเวลาเป็น t_2 จนกระทั่งแถบสีถูกชะออกมาจนหมดให้นับเวลาเป็น t_3
9. ค่อยๆเติมสารละลาย 3:1 กรดอะซิติก เพื่อชะแถบสีที่ 2 โดยให้มีระดับสูงกว่าผิว Silica 2 – 3 ซม.
10. เมื่อแถบสีที่ 2 เคลื่อนลงมาและเริ่มหยดออกมาจากคอลัมน์ ให้นับเวลาเป็น t_4
11. รอจนส่วนที่เข้มที่สุดเริ่มหยดลงมาให้นับเวลาเป็น t_5 และเมื่อแถบสีน้ำเงินถูกชะออกมาจนหมดให้นับเวลาเป็น t_6

ปฏิบัติการที่ 10
โครมาโตกราฟี
(Chromatography)

รหัสประจำตัว…….……ชื่อ - สกุล……...……
หมายเลขตู้……วันที่ทำการทดลอง…….…….…….เวลา……น.

การทดลอง	เวลา (นาที)
แถบสีที่ 1 เริ่มหยดออกมา (t_1)	
ส่วนที่เข้มที่สุดของแถบสีที่ 1 เริ่มหยดออกมา (t_2)	
แถบสีที่ 1 ถูกชะออกมาจนหมด (t_3)	
แถบสีที่ 2 เริ่มหยดออกมา (t_4)	
ส่วนที่เข้มที่สุดของแถบสีที่ 2 เริ่มหยดลงมา (t_5)	
แถบสีที่ 2 ถูกชะออกมาจนหมด (t_6)	

1. สารผสมของ Methyl Orange และ Methylene blue ใน 50%v/v ethanol มีสี_____
2. สีที่ 1 เป็นสีของ _____ สีที่ 2 เป็นสีของ _____
3. จากการทดลองแสดงว่า Methyl Orange กับ Methylene blue ตัวใดเป็นสาร Polar มากกว่ากันเพราะ

   _____

คำนวณประสิทธิภาพของ Column : Resolution (R_s) $= \dfrac{2\Delta Z}{(W_A + W_B)}$

(ส่งภายในชั่วโมงปฏิบัติการ)