การทำให้เกิดรูปรอยสีโดยใช้กระดาษ
(Paper Chromatography)

โดย

นายแพทย์พูนศักดิ์ สัมภวะผล พ.บ., M.S., Ph. D.

กองวิจัยทางแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

หลักการ ก็คือ การหยดน้ำยาที่ต้องการวิเคราะห์หยดเล็ก ๆ ลงบนกระดาษกรองพิเศษ ซึ่งใช้สำหรับการทำให้เกิดรูปรอยสีโดยเฉพาะโดยวางแนวระดับ (starting line) ที่จะหยดน้ำยาของสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้เว้นระยะห่างจากปลายข้างหนึ่งของกระดาษกรองแต่เพียงเล็กน้อย น้ำยาที่หยดไปแล้วนั้นปล่อยไว้ให้แห้งเอง หรือใช้เครื่องเป่าลมร้อนช่วย ต่อไปเอาปลายกระดาษกรองนี้ใส่ในตัวทำละลายชะล้าง (developing solvent) ซึ่งปกติเป็นตัวทำละลายชนิดอินทรีย์สารซึ่งมีน้ำปนอยู่ด้วย เพื่อให้ตัวทำละลายนั้น (solvent) ซึมผ่านจุดที่หยดน้ำยาไว้แล้วนี้ โดย capillary action ซึ่งจะซึมผ่านไปตามแนวยาวของกระดาษกรอง

วิธีการทำให้เกิดรูปรอยสีโดยใช้กระดาษนี้ สามารถใช้ทำการวิเคราะห์ทางคุณภาพ (Qualitative analysis) และทางปริมาณ (Quantitative analysis) ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้

กฎง่าย ๆ ที่ควรจำไว้ในการทำการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ คือ

1) ควรรักษาอัตราส่วนประกอบของตัวทำละลายที่ใช้ในการทำการวิเคราะห์นี้ไว้ให้คงที่มากที่สุดที่จะมากได้ตลอดการทดลอง เราจะทำรูปรอยสี (chromatogram) ได้ผลดีต่อเมื่อใช้โหลบรรจุ (chamber) ซึ่งปิดสนิท และจะต้องให้ที่ว่างภายในโหลนั้นมีไอระเหยของตัวละลายที่มีอุณหภูมิคงที่อยู่อย่างอิ่มตัว

2) ตัวทำละลายชะล้างควรมีคุณสมบัติซึมเคลื่อบ ค่อนข้างช้า (*ประมาณ 2-3 ซม. ต่อชั่วโมง*) อัตราของการไหลซึมของตัวทำละลายจะเร็วหรือช้ายังเกี่ยวกับ

ก) ชนิดของกระดาษกรองที่ใช้

ข) ความกว้างของกระดาษกรองที่ใช้

ค) ส่วนผสมของตัวทำละลาย

ง) อุณหภูมิของโหลบรรจุ

3) การเลือกตัวทำละลายควรเลือกใช้

ชนิดที่ละลายสารที่เราต้องการวิเคราะห์ได้เพียงเล็กน้อย คือมีการละลายตัวจำกัด ถ้าสารนั้นละลายง่ายเกินไป เราจะพบว่าในขณะที่เราปล่อยให้ตัวทำละลายซึมผ่านไปนั้นมันจะวิ่งเลยเข้ามาอยู่ใกล้แนวหน้าสุดของตัวทำละลาย (solvent front) แต่ถ้าสารนั้นละลายในsolvent ได้น้อยเกินไป มันจะปรากฏอยู่ที่บริเวณใกล้แนวเริ่มต้นเท่านั้น นอกจากนั้นเราจะพบว่า

ก) ตัวทำละลายใช้กับพวกสารที่ละลายในน้ำได้โดยมากมักเป็นอินทรีย์สารที่มีน้ำอยู่ด้วย

ข) ตัวทำละลายใช้กับพวกสารที่ละลายได้เฉพาะในตัวทำละลายชนิดอินทรีย์วัตถุ (*ไม่ละลายในน้ำ*) มักใช้น้ำที่มีอินทรีย์สารอยู่ด้วย

เรื่องทฤษฎีของการทำให้เกิดรูปรอยสีโดยใช้กระดาษนั้น เป็นเรื่องที่ค่อนข้างยาก ถ้าผู้ใดสนใจโปรดอ่านหนังสือ "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis" โดย Richard J. Block, Emmett L.Durrum and Gunter Zweig; Academic Press, 1955 หน้า 7–16

แต่มีอักษรย่อคำหนึ่งที่ใช้เป็นประจำในการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ คือ R_f

$$R_f = \frac{\text{Movement of band}}{\text{Movement of advancing front of fluid}}$$

หรือ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่จุดของสารเคลื่อนไป}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนไป}}$$

ดังนั้นในการหาค่าของ R_f ต้องระวังไม่ให้แนวหน้าสุดของตัวทำละลายเคลื่อนออกไปเลยกระดาษกรอง

วิธีทำโดยทั่วไป

ในการทำการวิเคราะห์โดยวิธีทำให้เกิดรูปรอยสีโดยใช้กระดาษนั้น มีหัวข้อที่ควรทำดังต่อไปนี้

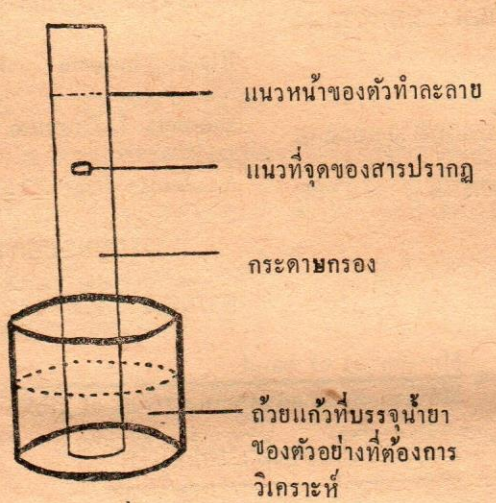
1) การเลือกกระดาษกรอง
2) การเตรียมน้ำยาของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์
2) การหยดน้ำยาของตัวอย่างลงบนกระดาษกรอง
4) การเลือกตัวทำละลาย
5) การทำให้เกิดรูปรอยสี
6) การทำให้รูปรอยสีนั้นแห้งหลังจากทำให้เกิดเป็นรูปรอยขึ้นแล้ว และการหาจุด

7) การหาปริมาณของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์

1. วิธี "Kapillaranalyse"

หลักการที่ใช้ก็คือ ใช้น้ำยาของสารที่ต้องการวิเคราะห์ให้ซึมเข้าโดยตรงต่อกระดาษกรอง แล้ววัดความยาวของการเคลื่อนตัวของแนวหน้าของตัวทำละลาย และของสารที่ต้องการหาเปรียบเทียบกัน

วิธี "Kapillaranalyse" นี้ต่างกับวิธี "paper partition chromatography" ซึ่งเป็นวิธีที่ประดิษฐ์ภายหลัง 80 ปี ข้อดีของวิธี Kapillaranalyse นี้ก็คือไม่ต้องใช้ตัวทำละลายที่จะทำให้เกิดรูปรอยสีอีกอย่างหนึ่ง ดังเช่น partition chromatography เลย

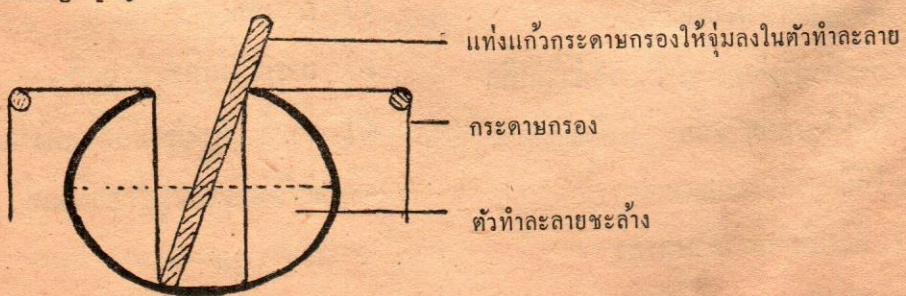


รูปที่ 1

2. วิธี "Descending Chromatography"

Consden, Gordon และ Martin (1944) เป็นผู้ที่แยกส่วนผสมของอะมิโนแอซิดได้สำเร็จเป็นพวกแรกโดยวิธี Descending paper chromatography

ส่วนสำคัญของเครื่องมือก็คือ filter paper strip (*แผ่นกระดาษกรองชนิดแถบม้วน*) ซึ่งใช้ปลายข้างหนึ่งจุ่มลงในอ่างใส่น้ำยาของตัวทำละลาย ดังรูป

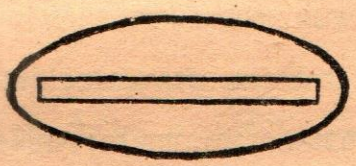


รูปที่ 2

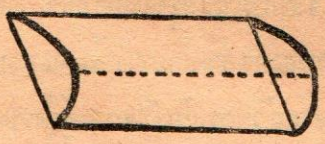
แผ่นกระดาษกรองนี้จะต้องเอามาแขวนในโหลซึ่งลมเข้าไม่ได้ ในโหลบรรจุนี้ต้องให้มีไอของน้ำและตัวทำละลายอบอ่างอิ่มตัว อ่างควรมีแท่งแก้ววางรองรับกระดาษกรองเพื่อกันไม่ให้มี capillary siphoning

เครื่องมืออื่นๆที่ใช้ในการทำ Descending chromatography ควรมี

ก) อ่าง (trough) ใส่น้ำยาสร้างรูปลักษณะของอ่างอาจเป็นรูป



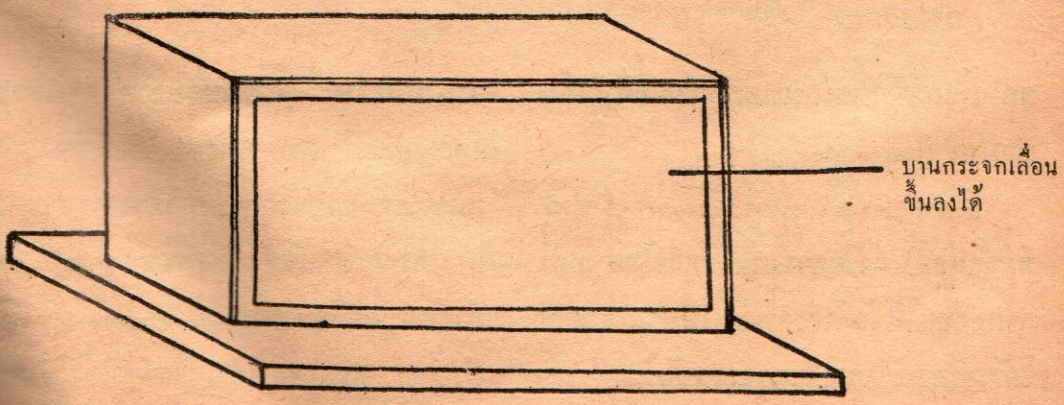
โดยใช้หลอดแก้วพัยเรกซ์ กว้าง 40 มม. เจาะให้มีช่องอากาศออกบนด้านข้างของหลอด ให้ผ้ากาวกว้าง 1 นิ้ว ปิดลงบนหลอดแก้วไปตามทางยาวของหลอดนี้แล้วตัดด้วยกากเพชร หรือแบบที่ขายในท้องตลาดเป็นรูปดังนี้



ข) โหลบรรจุต้องพยายามไม่ให้ตัวทำละลายระเหยออกไปเลย ในระหว่างที่กำลังทำ paper chromatogram เพราะเหตุผลอันนี้ ถ้าเราเลือกโหลบรรจุปิดสนิทที่อากาศเข้าไม่ได้จะให้ผลดีที่สุด เพื่อที่จะให้ภายในโหลบรรจุนั้นได้อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายตลอดเวลา

อาจใช้ Graduated glass cylinders ก็ได้ควรใช้จุกปิดให้สนิทไม่ให้อากาศเข้าออกได้จริงๆ แต่คงใช้ได้สำหรับการใช้ chromatogram ชนิดด้านเดียว (one—dimension work) เท่านั้น

Consden (1944) ใช้ท่อระบายน้ำมาดัดแปลงให้เป็นโหลสำหรับใช้บรรจุได้แต่ทาง

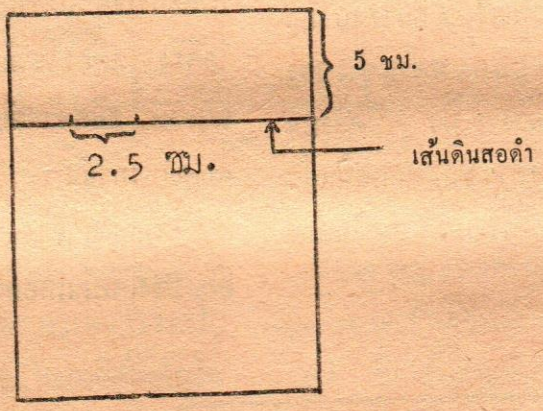


รูปที่ 3

ที่ดีควรใช้แบบสำเร็จรูปเลยดีกว่า

หากต้องทำ two dimensional chromatography แล้วควรใช้เป็นแบบตู้ดีกว่า ซึ่งจะมีตู้ 2 ใบ ใบหนึ่ง ๆ ใส่ตัวทำละลายคนละชนิดจะได้ไม่เสียเวลาเปลี่ยนตัวทำละลายทำการ one-dimensional chromatogram โดย descending method ใช้แถบกระดาษกว้างราว 1.5 ซม. ยาวราว 20–56 ซม. ใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1 กว้าง $\frac{1}{2}$–1" ก็ได้ ขีดเส้นดินสอดำห่างจากปลายข้างหนึ่งประมาณ 5 ซม. ใช้หยดน้ำยาของสารที่จะวิเคราะห์ประมาณ 2–4 ไมโครลิตร (*สำหรับกรดอะมิโนใช้ราว 5–15 ไมโครกรัม*) หยดลงตรงจุดของเส้นดินสอดำนี้โดยใช้ micropipette

แต่ถ้าต้องการหยดจำนวนกรดอะมิโนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันควรใช้กระดาษที่กว้างกว่านี้แล้วหยดให้เป็นจุดห่างกันราว 2.5 ซม. เอาปลายของกระดาษกรองข้างด้านที่ได้หยดน้ำยาของสารไว้แล้วจุ่มลงในอ่างเปล่า กดปลายข้างนี้ไว้ด้วยแผ่นกระจกจุดทัศน์หรือแท่งแก้ว เอาอ่างและกระดาษกรองใส่ลงในโหลซึ่งมีไอของตัวทำละลายชะล้างซึ่งเป็นส่วนผสมของน้ำและตัวทำละลายแต่เป็นส่วนที่มีน้ำเจือปนมาก (water rich part)



เติม water-saturated solvent (*ส่วนที่มีน้ำน้อย*) ลงในอ่างแล้วก็ปิดฝาโหล หลังจากปล่อยให้ตัวทำละลายซึมไปตามกระดาษได้ระยะพอสมควรประมาณ 15 ชั่วโมง (*ระยะที่ซึมเคลื่อนไปจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณภาพกระดาษ, คุณสมบัติของตัวทำละลายและอุณหภูมิ*) เอากระดาษออกและทำเครื่องหมายไว้ที่แนวหน้าสุดของตัวทำละลาย ตากแถบกระดาษให้แห้งแล้วจึงพ่นน้ำยาเพื่อดูตำแหน่งที่เคลื่อนไปโดยใช้ ninhydrin (*ถ้าทำเรื่อง กรดอะมิโน*)

Frierson (1954) ใช้ graduated

cylinder ขนาด 500 มล. ตั้งไว้ใน cylinder แก้ว หรือใน pipette washer (18 x 6") โดยมี bacteria slide staining jar ทำเป็นอ่างใส่ตัวทำละลาย และตั้งบน graduated cylinder

แทนที่จะใช้กระดาษกรองแบบเป็นแถบยาวที่เป็นชนิดม้วน อาจใช้กระดาษกรองกว้างขนาดอื่นก็ได้ ในตัวอย่างแบบนี้จุดน้ำยามาตรฐานและน้ำยาตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ควรเว้นระยะราว 10 ซม. จากปลายสุดข้างหนึ่งของกระดาษกรอง และเว้นระยะระหว่างจุดหนึ่ง ๆ ราว 2-3 ซม. ใช้แท่งแก้วขนาดใหญ่กดกระดาษกรองไว้ในอ่าง แท่งแก้วนี้ควรให้สั้นกว่าอ่างราว 1 นิ้ว และตัดให้เป็นมุมฉากเพื่อสะดวกในการจับ

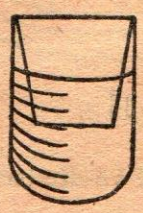
3. วิธี "Ascending chromatography"

การใช้วิธี ascending chromatography ทำโดย Schonbein, Goppelroeder et al. มีประโยชน์หลายอย่างมากกว่า descending technique เป็นต้นว่าได้ผล R_f ตรงกันดี เครื่องมือที่ใช้เป็นเครื่องมือที่ทำง่าย ๆ และเป็นการสะดวกที่จะใช้ ทำวิเคราะห์ของเป็นจำนวนมาก ๆ

เครื่องมือที่ใช้ก็มีโหลบรรจุที่มีอากาศเข้าไม่ได้ขนาดที่เหมาะและมีที่ใส่ตัวทำละลายเก็บไว้ที่ก้นของโหล

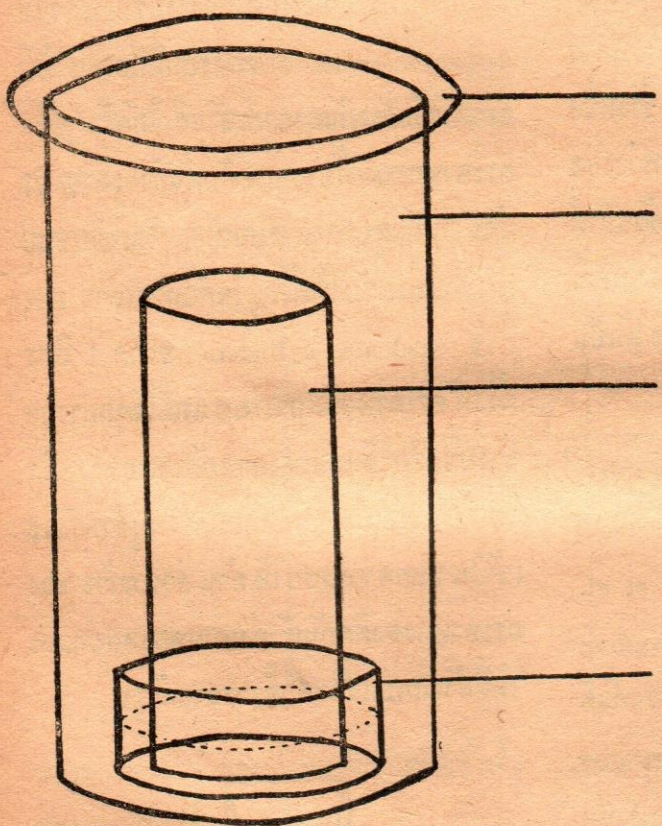
มีข้อเสียอยู่อันหนึ่งที่ว่าในวิธี ascending นี้การซึมไหลของตัวทำละลายช้ากว่าวิธี descending ทำให้มีการซึมของตัวละลายไม่ได้ส่วนกันหลังจากแนวหน้าของตัวทำละลายได้เคลื่อนไปไกลกว่า 25 ซม.

ก) Chromatographic Chamber ใช้ถังดินเคลือบ (earthen-ware jar) ขนาดจุ 6 แกลลอน ที่มีฝาทำด้วยแก้วตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ฝนขอบบนถังให้เรียบแล้วใช้ desiccator grease ทาตรงรอยที่ปิดเพื่อให้มีลักษณะที่ป้องกันอากาศเข้าออกได้จริง ๆ ส่วนกระดาษกรองเมื่อจะจุ่มลงในตัวทำละลายควรม้วนให้เป็นรูปทรงกระบอก โดยเย็บขอบกระดาษสำหรับให้ตั้งอยู่ในตัวทำละลาย บางที่ใช้ graduated cylinders ขนาด 1 ลิตร ตั้งให้กระดาษพันเกาะรอบ และใช้จุกยางอุดข้างบนหรือใช้แผ่นกระดาษตัดปลายข้างหนึ่งให้เรียวแคบเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูสำหรับใส่เข้าในหลอดทดสอบให้ด้านส่วนกว้างของกระดาษกรองติดกันกับด้านบนของหลอดและให้ที่ด้านแคบแช่ในตัวทำละลายดังรูป



ใช้กระดาษกรองขนาด $18 \times 11\frac{1}{4}$" ขีดเส้นดินสอตรงระยะห่างจากปลายด้านของกระดาษกรอง

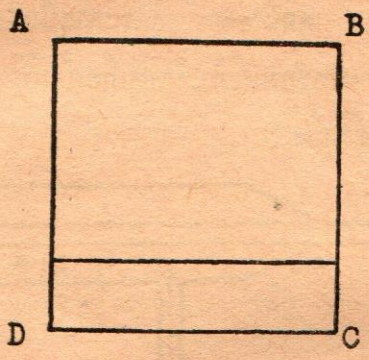
ราว 2.5 ซม. เป็นแนวขวาง บนเส้นนี้แบ่งเป็นช่อง ๆ ช่องหนึ่งห่างกัน 2 ซม. จุดปลายดินสอไว้ เพื่อจะหยดน้ำยาที่ต้องการวิเคราะห์ เมื่อหยดน้ำยาของสารและเห็นว่าแห้งแล้วม้วนกระดาษกรองเข้าให้เป็นรูปทรงกระบอกมีเส้นผ่าศูนย์กลางราว 6 นิ้ว โดยเย็บกระดาษกรองติดเข้าด้วยกัน ตั้งกระดาษรูปทรงกระบอกนี้ให้แนวที่จุดน้ำยาอยู่ตรงกลาง แล้วจุ่มลงในจานขนาดกว้าง 10 นิ้ว ในจานนี้มีตัวทำละลายบรรจุอยู่และตั้งอยู่ในโหล แล้วปิดฝาโหลให้สนิท ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนกระทั่งแนวหน้าของตัวทำละลายซึมขึ้นมาเกือบถึงยอดของกระดาษที่ม้วน มักเป็นเวลาราว 12-18 ชั่วโมง

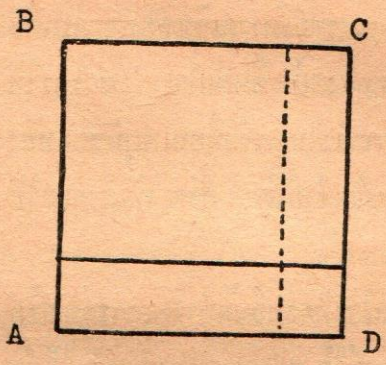


รูปที่ 4

4. วิธี "Two-dimensional chromatography"

ความจริงโดยทั่วไปแล้วการทำ chromatography นิยมใช้ 2 วิธีคือ ascending และ descending chromatography ถ้าแม้นว่าสารนั้นไม่สามารถแยกออกจากกันได้จริง ๆ หรือเป็นที่สงสัยก็ควรทำ two-dimensional chromatography





หลักของวิธีการอันนี้ก็คือการสร้างรูปรอยสีโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดต่างกัน เป็นต้นว่าตัวทำละลายที่เป็นด่างอย่างหนึ่ง และเป็นกรดอีกอย่างหนึ่ง การวางกระดาษครั้งที่ 1 และที่ 2 วางเป็นมุมฉากซึ่งกันและกัน

การทดลองใช้เครื่องมือคล้าย ๆ กับ unidimensional chromatogram เมื่อปล่อยให้แนวหน้าของตัวทำละลายชนิดที่ 1 ซึมมาเกือบสุดปลายข้างหนึ่งของกระดาษกรองแล้ว เอากระดาษกรองออกผึ่งให้แห้ง แล้วเอามาสร้างรูปรอยสีในตัวทำละลายชนิดที่ 2 ต่อไป สำหรับวิธีการใช้ตัวทำละลายชนิดที่ 2 นี้เราจัดแนวกระดาษหรือแนวที่ตัวทำละลายเคลื่อนไปเป็นมุมฉากกับการซึมในแนวเดิม เมื่อจัดทำในตัวทำละลายชนิดที่ 2 นี้เรียบร้อยแล้วก็เตรียมที่จะวิเคราะห์หาสารนั้น ๆ ต่อไป

Two-dimensional chromatography นี้ทำได้ทั้งอย่าง ascending และ descending chromatogram กระดาษกรองที่ใช้มักใช้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสและโหดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า มักทำด้วยกระจกมีกรอบไม้ (รูปที่ 3)

5. วิธี Multiple Development

คือการสร้างรูปรอยสีหลาย ๆ ครั้งมักจะทำ 2-4 ครั้ง เมื่อทำเสร็จไปครั้งหนึ่ง ๆ แล้วก็ทำให้กระดาษกรองแห้งในตู้ควันเสียก่อน เมื่อแห้งแล้วจึงทำซ้ำอีก ทำซ้ำกันอย่างนี้ 2-3 ครั้ง การทำหลาย ๆ ครั้งนี้ทำให้การแยกตัวของสารที่ต้องการแยกดีกว่าที่จะทำการสร้างรูปรอยสีแต่เพียงครั้งคราว เมื่อครั้งสุดท้ายแล้วจึงไปทำให้เกิดสีขึ้น และหาจุดสีโดยมากวิธีนี้ใช้แยกส่วนผสมของน้ำตาลพวก simple sugar

การหาจุดสี

การหาจุดสีนี้เป็นเรื่องสำคัญมาก วิธีที่ง่ายที่สุดควรจะเลือกปฏิกิริยาที่ให้สีเหมาะ ถ้าไม่มีปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดสีก็อาจตรวจได้โดยใช้แสง fluoresence หรือ absorption ใน ultraviolet range เป็นการจำเป็นที่ควรจะทำให้กระดาษที่มีสีนั้นแห้งเสียก่อน เพื่อที่จะ

กำจัดตัวทำละลายที่มากเกินพอออกไปเสียก่อนที่จะทดลองอย่างอื่นต่อไป การทำให้แห้งนี้ควรจะทำในตู้ควันที่อุณหภูมิของห้องหรือใช้ตู้อบไฟฟ้าก็ได้ ถ้าจะให้เร็วควรใช้ forced air oven

การทำให้เกิดจุดสีนั้นทำโดยการจุ่มหรือการพ่นน้ำยาก็ได้ การจุ่มเหมาะสำหรับใช้กับกระดาษกรองแผ่นเล็ก ๆ ควรเลือกตัวทำละลายสำหรับน้ำยาที่จะทำให้เกิดสี ซึ่งสารที่ต้องการตรวจต้องไม่ละลายในนั้น

ประโยชน์ของการทำให้เกิดจุดสีโดยวิธีจุ่มนี้สำหรับในกรณีที่ใช้กับกรดอะมิโน โดยใช้น้ำยาอะซีโตนแทนที่จะใช้วิธีพ่นนั้นมีดังต่อไปนี้

1) กรดอะมิโนต่าง ๆ ไม่ละลายในอะซีโตนและไม่แผ่ออกไป

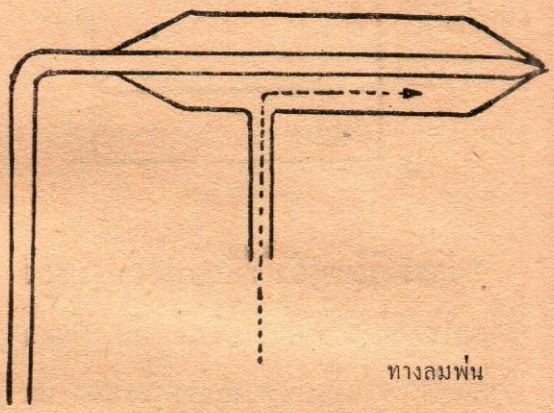
2) ไม่มีกลิ่นเหม็น

3) ราคาถูก

4) ไม่เปลืองที่

การจุ่มหลาย ๆ ครั้งสำหรับกรดอะมิโนใช้น้ำยาสร้างสี 3-4 ชนิด เป็นต้นว่า ninhydrin หรือ isatin, Ehrlich reagent (dimethyaminobenzaldehyde), Sakagerchi หรือ diazo reagents

ในการพ่นทำให้เกิดรูปรอยสีควรใช้เครื่องพ่นที่ทำด้วยแก้ว (glass atomizer) เพื่อพ่นอากาศผ่านรูเล็ก ๆ ใน atomizer จะเกิดศูนย์กาศ ดูดน้ำยาสร้างสีและพ่นเป็นฝอยไปที่กระดาษกรองแล้วไปทำให้เกิดเป็นสีในตู้ร้อนอีกครั้งหนึ่ง



การวัดหาค่า R_f *(ได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว)*

การถ่ายจุดของสารออกจากกระดาษ
Elution of spots

เพื่อประโยชน์ในการทำจุลวิเคราะห์ (micro analysis) หรือการทำให้เกิดรูปรอยสีซ้ำอีก ควรทำการถ่ายจุดสารออกจากกระดาษ

ในการถ่ายใช้สร้างรูปรอยส่วนหนึ่งด้วยน้ำยาสร้างสีแล้ว เอาไปเทียบกับส่วนที่ยังไม่ได้สร้างสีแล้วตัดเอาส่วนที่สงสัยว่าจะมีสารแยกตัวไปทำจุลวิเคราะห์ต่อไป

การเก็บรักษารูปรอยสี
(Preservation of chromatograms)

เนื่องจากรูปรอยสีนั้น ถ้าทิ้งไว้นาน ๆ สีจะซีด *(เป็นต้นว่า สี ninhydrin)* ของ

กรดอะมิโนเป็นต้น ทางที่ดีควรถ่ายรูปเก็บไว้หรืออัดโดยวางแผ่นรูปรอยสี่ บนกระดาษอัดรูปใช้แสงสว่าง 5–15 วินาที แล้วแต่ความเข้มข้นของสีของจุดเหล่านั้น

ข้อพึงระลึกในการทำ

ก. กระดาษกรอง

ก่อนที่จะใช้ควรดูกระดาษกรองที่มีเครื่องหมายบอกไว้ว่า "use in chromatography" จึงจะเป็นอันใช้ได้ เพราะกระดาษกรองธรรมดาอาจมี ionizable substance ปนอยู่ทำให้การอ่านผลผิดไปได้ การใช้กระดาษกรองเกี่ยวกับการแยกกรดอะมิโน โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิด ควรอาศัยหลักดังต่อไปนี้

1. ความสามารถในการแยกสารต่าง ๆ
2. การแผ่ของจุดต่าง ๆ
3. ความสามารถในการทำให้เกิดรูปหรือรอยซึ่งเกิดโดยสิ่งแปลกปลอมในกระดาษกรอง
4. มีหาง "tails" นั่นก็คือมี zones อื่นซึ่งไม่ใช่กรดอะมิโน แต่ว่าให้ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี กับ ninhydrin ได้
5. การเบี่ยงเบนจากแนวดิ่ง
6. อัตราการเคลื่อนของแนวหน้าของตัวทำละลาย

ถ้าผู้ทดลองมีความชำนาญในการทำงานนั้นก็จะเลือกใช้ได้ว่า ควรจะใช้กระดาษกรองชนิดใดสำหรับการทดลองนั้น Rockland เคยทดลองใช้กระดาษกรองถึง 13 ชนิด แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าชนิดไหนเป็นชนิดที่เหมาะที่สุด กระดาษกรองที่ใช้ส่วนมากคือ Whatman, Schleicher and Schüll, Eaton and Dikeman.

ข) การเตรียม และการหยดตัวอย่างที่จะวิเคราะห์

1. *การเตรียม* ในการหาพวกน้ำตาลและกรดอะมิโนต่าง ๆ นั้น สิ่งที่จะรบกวนขัดขวางการกระทำที่สำคัญก็คือ cations ซึ่งควรจะต้องกำจัดโดยวิธี desalt เสียก่อน การ desalt จะทำอย่างไรนั้นเป็นเทคนิคของผู้ทำเอง จะไม่ขอกล่าวในที่นี้

2. *การหยด* ใช้ self filling micro-pipettes มีขนาดแต่ 1–10 ไมโครลิตรน้ำยาที่จะขึ้นไปได้นั้นอาศัย capillary action ปลายของ pipette ควรจะเช็ดให้แห้งเสียก่อนด้วย tissue paper หรือใช้ผ้าสะอาดที่นุ่ม ๆ ให้น้ำยาออกไปโดยเอาไปแตะกับกระดาษกรอง

ใน ascending chromatography โดยใช้ดากเส้นดินสอเป็น land mark มักจะใช้แนวประมาณ 2-3 ซม. ห่างจากขอบด้านของกระดาษกรองแล้ว เว้นระยะ ระหว่างที่จะ

หยดราว 2-2.5 ซม. ระหว่างจุด

ค. อำนาจของอุณหภูมิและการอิ่มตัว ถ้าสามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ก็จะเป็นการดี ถ้าต้องการกระทำให้อุณหภูมิสูง ควรห่อโหลด้วย electric blanket หรือ Thermostatic control

ในการ report R_f values ควรบอกด้วยว่ากระทำที่อุณหภูมิเท่าไร การเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิ อาจ เปลี่ยน แปลง ค่า ของ R_f ได้

ภายในโหล บรรจุ ควร ให้ อิ่มตัว ด้วยไอระเหยของตัว ทำละลาย หรือส่วนผสมของตัวทำละลาย จะเป็นการสะดวกมากถ้าใส่ตัวทำละลายไว้ในภาชนะเล็ก ๆ ที่ก้นโหลราว 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง เทฆนิคอีกอันก็คือบุโหลบรรจุด้วยกระดาษกรองให้สูงเท่าความสูงของโหล และจุ่มกระดาษนี้ลง ในน้ำยาที่เทลงไปเต็มก้นของโหล

ง. ตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ในการ สร้างรูปรอยสีนั้น ส่วนใหญ่ เป็น ชนิด twophase systems หรือส่วนผสมของ miscible "organic solvents" น้ำยาที่เหมาะจะทำให้เกิดจุดที่กลมและขอบไม่แผ่ออกไปมากนัก

อัตราแห่งการเคลื่อนตัวของตัวทำละลายนั้นย่อมแล้วแต่ความเข้มข้น, surface tension และความแน่น

ค่าของ R_f จะสูงขึ้น ถ้ามีจำนวนน้ำใน miscible pair of solvents มากขึ้น

ประโยชน์ของ paper chromatography

ประโยชน์ของ paper chromatography นั้นมีหลายประการคือ

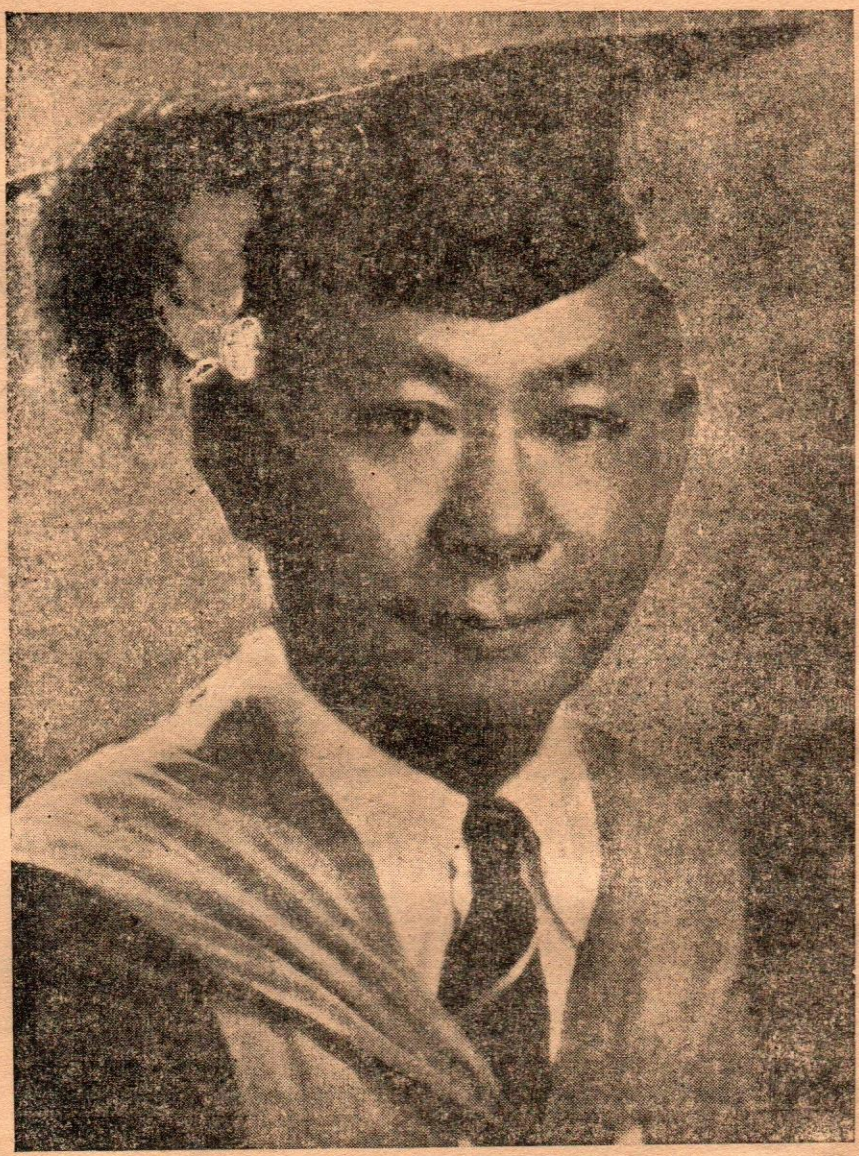
1. เพื่อแยกสาร แต่ละชนิดใน สาร ผสม (mixture) ซึ่งวิธีธรรมดา ไม่สามารถจะทำได้ เพราะอาจแยกออกให้เห็นได้ชัดและบริสุทธิ์ด้วย

2. ช่วยในการทำการวิเคราะห์สารที่เราต้องการหาแต่เพียงเล็กน้อย และ sample ที่ต้องการวิเคราะห์ขนาดเพียง 10 ไมโครกรัม เราก็อาจทำการวิเคราะห์ได้ แม้สารนั้นจะปะปนกันอยู่ในลักษณะ complex form ลักเพียงไร เราก็สามารถที่จะแยกสารนั้นออกจากกันได้ วิธีการทำก็ไม่ยุ่งยากเสียเวลาเหมือนอย่าง chemical analysis ทั่ว ๆ ไป การวิเคราะห์ก็เปลืองchemicals น้อย และก็รวดเร็วทันใจดี ซึ่งระยะการทำโดยมากกินเวลาประมาณ 2 วัน

การวิเคราะห์อาจ ทำได้ ทั้ง คุณภาพและปริมาณเช่นเดียวกับวิธี Chemical หรือ Physical analysis

3. เครื่องมือเครื่องใช้ที่ทำการวิเคราะห์นั้น simple เช่นอาจมีโหลแก้วราคาถูกๆ สัก ใบหนึ่ง กระดาษกรองสำหรับทำการวิเคราะห์ สัก 2-3 แผ่น separatory funnels, สัก 2-3 อัน chemicals 2-3 อย่างก็พอที่จะทำการวิเคราะห์ได้ไม่เป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่นการวิเคราะห์อย่างอื่น

การทำ paper chromatography นั้นอาจ apply ในการวิเคราะห์ amino acids, amines และ proteins, carbohydrates, steroids, bile acids, purines, pyrimidines และวัตถุที่เกี่ยวพันธ์ต่าง ๆ, phenols, aliphatic acids, aromatic acids, พวก porphyrins พวก organic substances บางอย่าง (*เช่น alcohols sulfa drugs เป็นต้น*) พวก antibiotics, vitamins และแร่ธาตุต่าง ๆ



ศาสตราจารย์ พันโท หลวงชัยอัศวรักษ์

M.R.C.V.S. (London) สพ.ด. (กิติมศักดิ์)

อดีตคณบดี คณะสัตวแพทยศาสตร์

ชาตะ ๗ มีนาคม ๒๔๔๕ มรณะ ๒๗ มีนาคม ๒๕๐๓