

บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หลักการวิเคราะห์ปริมาณไอออนโลหะโดยวิธีอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี (Ultraviolet and Visible spectrophotometry) ⁽³⁾

สารเคมีที่มีการดูดกลืนแสงหรือรังสีที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลตและวิสิเบิล ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-800 นาโนเมตร (nm) ส่วนใหญ่ได้แก่สารอินทรีย์ (organic compound) หรือสารประกอบเชิงซ้อน (complex compound) หรือสารอนินทรีย์ (inorganic compound) ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สมบัติของสารดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณอย่างกว้างขวาง เพราะวิธีนี้ให้ความถูกต้องแม่นยำดี และมีสภาพไว (sensitivity) สูง โดยอาจทำการวิเคราะห์อยู่ในรูปของธาตุหรือโมเลกุลก็ได้ แต่ในกรณีที่จะนำไปใช้พิสูจน์ว่าสารดังกล่าวนี้เป็นสารอะไร มีโครงสร้างอย่างไร อาจจะต้องใช้เทคนิคอย่างอื่นเข้าช่วยด้วย เพื่อให้เกิดความแน่ใจ เช่น ใช้เทคนิค IR, NMR spectroscopy เป็นต้น

2.1.1 การดูดกลืนแสงของสารในช่วงวิสิเบิล⁽⁴⁾

เราสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารอินทรีย์และอนินทรีย์จำนวนมากได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิล หลักที่สำคัญในเรื่องนี้คือ สารที่ต้องการหาปริมาณจะต้องมีสีหรือสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นแล้วทำให้เกิดสารที่มีสี ในทางทฤษฎีสารละลายที่มีสีที่ใช้ในการวิเคราะห์ควรมีสมบัติดังนี้

ก. สีของสารควรมีความเข้มมากพอที่จะวัดการดูดกลืนของแสงได้ถึงแม้ว่าสารนั้นจะประกอบด้วยสารที่ต้องการวิเคราะห์เป็นจำนวนเล็กน้อยก็ตาม

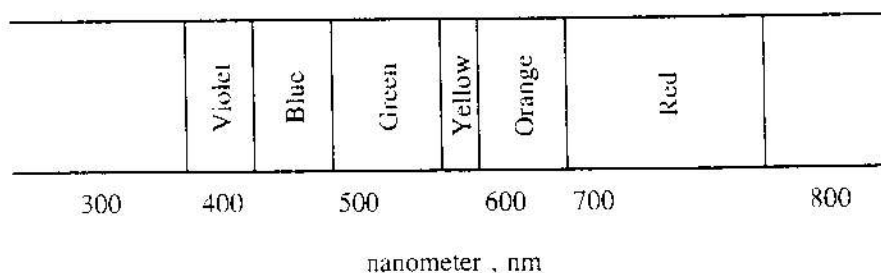
ข. สีของสารที่อยู่ในสารละลายจะต้องอยู่ตัวไม่อาจลงอย่างรวดเร็ว

ค. สีของสารละลายจะต้องไม่เปลี่ยนแปลงหรือหรืออาจลงเมื่อ pH หรืออุณหภูมิของสารละลายเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย

ง. รีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสีกับสารที่เราต้องการวิเคราะห์จะต้องไม่มีสี หรือ ไม่ดูดกลืนแสงที่มีช่วงคลื่นเดียวกับสารที่สีที่เกิดขึ้น

จ. ปฏิกริยาของรีเอเจนต์ที่ทำให้เกิดสารที่มีสีกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ จะต้องให้สารที่มีสีชนิดเดียวกันเท่านั้น

แสงวิสิเบิลประกอบด้วยช่วงคลื่นแคบๆ ของสเปกตรัมช่วงแสงที่มีสมบัติเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งแต่ละช่วงจะมีสีเฉพาะตัวสามารถมองเห็นด้วยตา ช่วงคลื่นของแสงที่กล่าวมานี้จะมีช่วงคลื่นตั้งแต่ 380 nm (แสงสีม่วง) ถึง 780 nm (แสงสีแดง) รูปที่ 2.1 แสดงถึงสเปกตรัมของแสงที่มีสีต่างๆ ที่อยู่ในช่วงของแสงวิสิเบิล



รูปที่ 2.1 แถบสเปกตรัมของแสงที่อยู่ในช่วงของแสงวิสิเบิล⁴¹

แสงที่ประกอบด้วยแสงที่มีสีทุกสีในช่วงคลื่นของแสงที่มีสีทั้งหมด เราจะมองเห็นแสงนั้นเป็นแสงสีขาว (white light) แต่ถ้าแสงสีหนึ่งหรือหลายสีถูกนำออกไปจากแสงสีขาว ตามมนุษย์จะมองเห็นแสงนั้นมีสีอื่นทันที เราแบ่งสมบัติของแสงตามตาของมนุษย์ดังนี้ ชนิดของสี (hue หรือ color) ความเข้มของสี (color intensity) และความสว่าง (brightness) แสงสีต่างๆ แบ่งตามช่วงคลื่นดังรูปที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงและสีที่ตามนุษย์มองเห็น^{1,2)}

ช่วงคลื่นของแสงที่ถูกดูดกลืนโดยสาร (nm)	แสงส่วนที่ถูกดูดกลืนโดยสาร	สีที่มองเห็นด้วยตามนุษย์
400-435	Violet	yellow-green
435-480	blue	yellow
480-490	green-blue	orange
490-500	blue-green	red
500-560	green	purple
560-580	yellow-green	violet
580-595	yellow	blue
595-650	orange	green-blue
650-750	red	blue-green

2.1.2 กฎของเบียร์และแลมเบิร์ต

การวิเคราะห์ปริมาณสารโดยอาศัยการดูดกลืนรังสีของสารนั้น เราอาศัยกฎของเบียร์และแลมเบิร์ตที่ใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนรังสีของสารกับความเข้มข้นของสารนั้น ตามสมการดังต่อไปนี้

$$A = \epsilon bc \quad 2.1$$

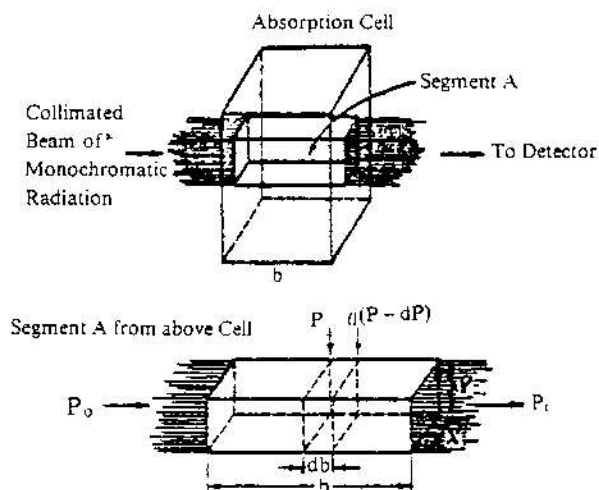
เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง

b = ค่าความยาวของเซลล์บรรจุสารที่ลำแสงผ่าน (cm)

c = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (ppm หรือ Molar)

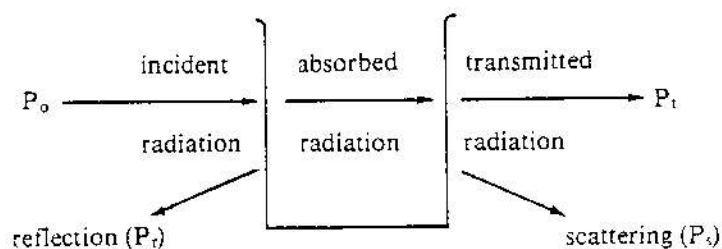
ϵ = molar absorptivity (L mole⁻¹ cm⁻¹)

ในการวัดปริมาณของแสงหรือ radiant ที่ถูกดูดกลืนด้วยสารตัวอย่างนั้น เราสามารถทำได้โดยให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารตัวอย่าง แล้ววัดปริมาณของแสงที่ทะลุผ่านออกมาโดยเปรียบเทียบ กับแสงที่ทะลุออกมาเมื่อไม่มีสารตัวอย่าง ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการวัดการดูดกลืนแสง⁽³⁾

เมื่อผ่านลำแสงเข้าไปในเซลล์ที่บรรจุสารละลายจะเกิดการดูดกลืนขึ้นเป็นบางส่วนและพลังงานของแสงก็จะสูญเสียให้แก่สารละลายไปเป็นบางส่วน ดังรูปที่ 2.2 พลังงานของแสงที่ถูกถ่ายเทให้แก่สารผ่านจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุลของสารนั้น และขึ้นอยู่กับช่วงคลื่นของลำแสงที่ผ่านด้วย



รูปที่ 2.3 การดูดกลืนแสงของสารละลาย⁽³⁾

ถ้ากำหนดให้ P_0 เป็นพลังงานของลำแสงที่ตกกระทบเซลล์ของสารละลาย

P เป็นพลังงานของลำแสงที่ออกจากเซลล์ของสารละลาย

พลังงานของลำแสงเป็นปริมาณที่วัดโดยให้แสงตกกระทบกับโฟโตเซลล์ (photocell) ในหน่วยตรวจวัดอัตราส่วนระหว่างพลังงานของลำแสงที่ตกกระทบและพลังงานของลำแสงหลังจาก

ผ่านเซลล์เรียกว่า ทรานสมิตแตนซ์ (transmittance, T) ซึ่งจะบอกมาในลักษณะของร้อยละ (percent transmittance, %T) ก็ได้

$$T = P/P_0 \quad 2.2$$

ค่าของลอการิทึมฐานสิบของ $1/T$ คือ ค่าแอบซอร์เบ้นซ์ (absorbance) แทนด้วย A

$$A = \log(1/T) = -\log T \quad 2.3$$

$$\text{ดังนั้น } A = \log P/P_0 \quad 2.4$$

ถ้ากำหนดให้ c = ความเข้มข้นของสารที่ดูดกลืนในสารละลาย

b = ความยาวของเซลล์ที่ลำแสงผ่าน (optical path length)

การที่เราได้กฎของเบียร์เป็น $A = \epsilon bc$ นี้เราได้สมมติว่า

1. แสงหรือ radiant power ที่ใช้ผ่านสารละลายหรือวัตถุนั้นต้องเป็น

monochromatic radiation

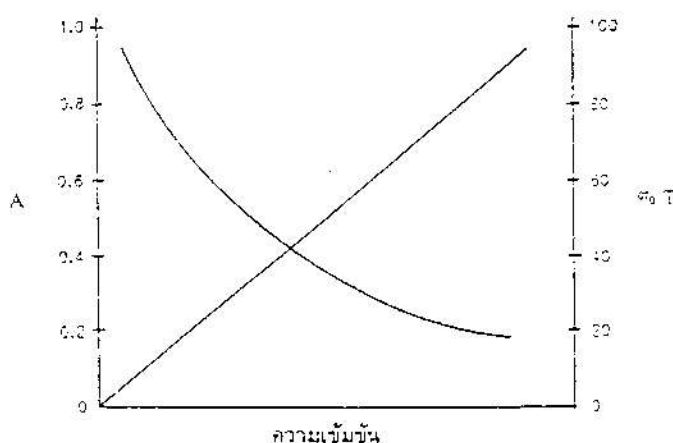
2. กระบวนการดูดกลืนแสงของแต่ละอนุภาคนั้นจะต้องไม่ขึ้นแก่กัน นั่นคือสารละลาย

จะต้องเจือจาง

3. สารละลายที่นำไปวัดจะต้องเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

ถ้าเขียนกราฟระหว่างค่า A กับความเข้มข้น จะได้กราฟเป็นเส้นตรง (ดังรูปที่ 2.4) แต่ถ้าเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ทรานสมิตแตนซ์กับความเข้มข้น จะได้กราฟเป็นเส้นโค้ง ดังรูปที่

2.4



รูปที่ 2.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอบซอร์เบ้นซ์และเปอร์เซ็นต์ทรานสมิตแตนซ์กับความเข้มข้นของสารละลาย^[3]

ในกรณีทำการวิเคราะห์สารอินทรีย์ ซึ่งโดยปกติสารเหล่านั้นมักจะไม่มียีสและไม่ดูดกลืนแสงในช่วงยูวีด้วย ดังนั้นส่วนใหญ่จึงใช้วิธีทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีขึ้น เพื่อให้เกิดการดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิล เช่น ในการหาปริมาณไอออนโลหะนั้นนิยมใช้วิธีทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับสารอินทรีย์บางชนิด อาจเป็น binary complex หรือ ternary complex ก็ได้ยังมีโครโมฟอร์มาก การดูดกลืนแสงก็จะเกิดที่ $\lambda_{\max}$ ขาวขึ้นด้วย การทำให้เกิดปฏิกิริยาอย่างนี้เป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์อย่างยิ่ง คือ ช่วยลดเรื่องของ interferences ทั้งจากตัวสารที่ใช้และตัว binary complex ทำให้การวิเคราะห์ถูกต้องยิ่งขึ้น

สารที่จะใช้ในการทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนและปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนเพื่อให้ได้สารละลายที่มีสี ควรจะต้องมีลักษณะดังนี้

1. ปราศจากสารรบกวนหรือเป็นสารที่บริสุทธิ์
2. ไม่ควรจะมีสี แต่ถ้ามีสี สีที่เกิดขึ้นใหม่ควรจะต้องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นห่างกันพอสมควร
3. ปฏิกิริยาการเกิดสีควรจะต้องเร็วพอสมควร
4. ปฏิกิริยาการเกิดสารเชิงซ้อนจะต้องเป็นปฏิกิริยาที่มีปริมาณสัมพันธ์ที่แน่นอน และเฉพาะเจาะจง
5. สีที่เกิดขึ้นไม่ควรขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่เติมลงไป แต่จะต้องขึ้นอยู่กับสารที่จะวิเคราะห์
6. มีค่า $\lambda_{\max}$ เฉพาะตัว
7. ควรจะต้องทราบถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นอย่างดี

2.2 การแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟี⁽²⁾

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคและวิธีการแยกอีกแบบหนึ่งที่นิยมใช้กันกว้างขวางมากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นเทคนิคในการทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้น สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณและในการแสดงเอกลักษณ์ (identification) หรือวิเคราะห์ทางคุณภาพได้ด้วย กรรมวิธีในการทำโครมาโทกราฟี คือ การทำให้ส่วนผสมของสารตัวอย่างแยกตัวออกจากกันเป็นโซน หรือ แบ่งเป็นตอนๆ ซึ่งเกิดขึ้นได้จากการกระจายของสารระหว่างเฟสสองเฟส ซึ่งเฟสหนึ่งคือเฟสที่เคลื่อนที่ได้ (mobile phase :mp) อีกเฟสหนึ่งคือเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase :sp) การเคลื่อนที่ของเฟสที่เคลื่อนที่ได้จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารผสมแยกออกจากกันเป็นตอนๆ หรือเป็นโซนได้ กระบวนการที่ตัวถูกละลายเคลื่อนที่แยกออกจากกันได้โดยมีตัวทำละลายที่เคลื่อน

ที่ได้เป็นตัวอย่าง เรียกว่า อีลูชัน (elution) หรือการอีลูท ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวพาตัวถูกละลาย นั้นจะเรียกว่า อีลูเอนต์ (eluent) ตัวถูกละลายซึ่งถูกอีลูทจะเรียกว่า อีลูเอต (eluate) เหตุที่เรียก การวิเคราะห์นี้ว่าโครมาโทกราฟี เพราะผู้ค้นพบกรรมวิธีการวิเคราะห์แบบนี้เป็นคนแรกได้พบว่าการแยกที่ทำให้เกิดเป็นโซนหรือเป็นตอนๆ นั้นให้โซนที่มีสี จึงตั้งชื่อวิธีการวิเคราะห์ว่าโครมาโทกราฟี (chromatography) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคและวิธีการของโครมาโทกราฟี เพื่อให้การวิเคราะห์ทำได้ดีขึ้น จนกระทั่งได้เทคนิคและวิธีการวิเคราะห์หลายชนิด ทำให้เกิดการจัดแบ่งชนิด และวิธีการของโครมาโทกราฟีขึ้น ซึ่งในที่นี้จะพูดถึงโครมาโทกราฟีเพียง 2 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ แอดซอร์พชันโครมาโทกราฟี และเอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟีเท่านั้น

2.3 แอดซอร์พชันโครมาโทกราฟี (Adsorption Chromatography)

โครมาโทกราฟีชนิดนี้ เป็นเทคนิคที่ใช้กันมานานกว่าเทคนิคใดทางโครมาโทกราฟี โดยใช้ของแข็งเป็นเฟสอยู่กับที่ (stationary phase:sp) และของเหลวเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase:mp) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า โครมาโทกราฟีแบบของเหลว-ของแข็ง (liquid-solid chromatography: LSC) หลักของการแยกสารนั้นอยู่ที่ว่า สารต่างๆ จะเคลื่อนที่ต่างกันบนเฟสอยู่กับที่หรือตัวดูดซับ (adsorbent) ซึ่งบรรจุอย่างเป็นระเบียบอยู่ในหลอดแก้วในขณะที่มีเฟสที่เคลื่อนที่หรือ ตัวชะ (eluent, solvent) วิ่งผ่านลงมา สารใดมีแรงยึดเหนี่ยวอยู่กับตัวดูดซับมาก และละลายได้น้อยในตัวชะก็จะเคลื่อนที่ช้า สารใดมีแรงยึดเหนี่ยวน้อยกับตัวดูดซับ แต่ละลายได้ในตัวชะก็จะเคลื่อนที่ลงมาเร็วกว่า 3 สิ่งซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการแยกสาร โดย adsorption chromatography คือ เฟสที่อยู่กับที่หรือตัวดูดซับ (adsorbents) , เฟสที่เคลื่อนที่หรือตัวชะ (solvent , eluent) และสารที่ต้องการแยก (substances to be examined)

2.3.1 ตัวดูดซับ (adsorbents)

ต้องมีความสามารถในการดูดซับสารได้ต่างกันไว้ที่พื้นผิว โดยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพื้นผิว ซึ่งจะอุ้มสารไว้ด้วยแรงต่างๆ เช่นพันธะไฮโดรเจน (H-bond) electrostatic force แรงยึดเหนี่ยวเนื่องจาก electronegativity ต่างกันอื่นๆ นอกจาก H-bond และแรงยึดเหนี่ยวระหว่างมวลซึ่งแฟกเตอร์ต่างๆ เหล่านี้ยอมทำให้ตัวดูดซับที่ต่างกันแยกสารได้ต่างกันออกไปตัวดูดซับอาจจะถูกจัดแบ่งออกไปตาม “strength” เช่น silica, alumina และ charcoal จัดว่า “strength” ส่วนน้ำตาลจัดว่าเป็นตัวดูดซับที่ “weak” หรืออาจจัดตาม “polarity” เช่นออกไซด์ต่างๆ เป็นพวก polar ส่วน charcoal

เป็นพวก nonpolar และ silica นับว่าเป็นตัวดูดซับที่นิยมใช้มากที่สุดไม่ใช่แต่เฉพาะคอลัมน์เท่านั้น thin-layer chromatography ก็ใช้มากด้วย

ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าตัวดูดซับมีด้วยกันหลายชนิดเช่น ซิลิกา อะลูมินา และอื่นๆ แต่สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ amberlite XAD-4 resin เป็นตัวดูดซับซึ่งเป็นเรซินโพลีอะโรมาติกที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic polyaromatic resin) จะไม่ดูดซับพวกไอออนและมีขั้ว และมักจะศึกษาภายใต้สภาวะแบบ isocratic ส่วนสมบัติของเรซิน XAD ที่มีใช้กันในปัจจุบันแสดงในตารางที่ 2.2 ในการแยกจะนำสารละลายตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับ ตัวดูดซับจะดูดซับเอาสารที่มีความเป็นกลางไว้ ส่วนสารที่มีประจุจะไม่ถูกดูดซับ จากนั้นจะเอาสารที่ถูกดูดซับบนผิวของตัวดูดซับออกมาด้วยสารละลายผสม เช่น อะซิโตน เมทานอล หรือ เอทานอล เป็นต้น

ตารางที่ 2.2 สมบัติของเรซิน XAD แบบต่างๆ ของบริษัท Sigma Chemical, USA. ⁽¹¹⁾

ชื่อเรซิน	พื้นที่ผิว/m ² g ⁻¹	เส้นผ่าศูนย์กลางรูพรุน เฉลี่ย/Å	ปริมาตร ของรู พรุน/mlg ⁻¹	wet mesh size
XAD-2	330	90	0.65	20-60
XAD-4	725	40	0.98	20-60
XAD-7	450	90	1.14	20-60
XAD-16	800	100	1.82	20-60

2.3.2 เฟสที่เคลื่อนที่หรือตัวชะ

หน้าที่ คือ พาสารที่ต้องการแยกออกจากคอลัมน์ โดยความเร็วต่างกัน ซึ่งในการเลือกใช้ตัวชะนั้นต้องคำนึงถึง polarity เป็นสำคัญโดยให้สัมพันธ์กับสารที่ต้องการแยก และชนิดของตัวดูดซับ ส่วนชนิดของตัวชะโดยมีค่า relative strength (ε) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับแรงยึดกับตัวดูดซับดูในภาคผนวกตารางที่ ก

2.3.3 สารที่ต้องการแยก (substances to be examined)

สารที่แยกไม่ได้โดย adsorption column chromatography ก็เป็นสารซึ่งไม่ละลายในตัวทำละลายใดๆ เลย

2.4 การบรรจุคอลัมน์ (packing the column)

ในการบรรจุตัวดูดซับลงในคอลัมน์ อาจจะใช้วิธีบรรจุแบบแห้ง (dry packing) หรือ บรรจุแบบเปียก (wet packing) ก็ได้ การบรรจุแบบแห้งทำได้โดยค่อยๆ เทตัวดูดซับที่แห้งลงในคอลัมน์ ซึ่งมีตัวทำละลายอยู่เกือบเต็มคอลัมน์ ตัวดูดซับจะค่อยๆ หันถมกันอย่างเป็นระเบียบเกิดเป็นแท่งสูงตามความยาวที่ต้องการซึ่งชุ่มอยู่ในตัวทำละลายที่เลือกแล้วว่าเหมาะสม สำหรับการบรรจุตัวดูดซับลงในคอลัมน์แบบเปียก คือ ตัวดูดซับอยู่ในตัวทำละลายตลอดเวลาก่อนที่จะค่อยๆ เทลงในคอลัมน์ ซึ่งมีตัวทำละลายชนิดเดียวกันอยู่ ในการบรรจุคอลัมน์ชนิดไม่ควรจะให้ความต่างกันมากในประสิทธิภาพของคอลัมน์ แต่คงขึ้นอยู่กับความถนัดของการบรรจุ ชนิดของคอลัมน์นั้นอาจเป็นหลอดแก้วเดี่ยว คอนปลายตีบลง และมีใยแก้ว หรือ filter ปิดกั้นมิให้ตัวดูดซับร่วงหลุดลงมาได้

2.5 เอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟี (exclusion chromatography)

เอกซ์คลูชันหรือเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟีนี้ เป็นเทคนิคทางโครมาโทกราฟีที่แยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดเป็นสำคัญ สารที่จะแยกได้ดีจะต้องมีลักษณะค่อนข้างกลม ซึ่งขนาดจะแปรตามน้ำหนักโมเลกุล สารชีวโมเลกุลที่แยกโดยเทคนิคนี้กันมากปัจจุบันได้แก่ งานวิจัยด้าน เอนไซม์ ฮอร์โมน โปรตีนชนิดต่างๆ และในงานวิจัยนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการแยกไซโตโครฟอร์ด้วย

หลักการแยก คือ การใช้สารประเภท polysaccharides เช่น dextran , agarose หรือ อนุพันธ์ซึ่งอยู่ในลักษณะเป็นเจล ค่อนข้างกลม ขนาดเล็กๆ ซึ่งมีรูพรุนอยู่ทั่วไปหมด เปรียบได้เสมือนตะแกรงร่อน เจลจำนวนมากมาบรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งอิมมัลด้วยบัฟเฟอร์ ความถี่ ความห่างตลอดจนความแข็งแรงของรูพรุนขึ้นอยู่กับชนิดของเจลนั้นๆ

2.5.1 วัสดุสำหรับบรรจุคอลัมน์ (packing material)

วัสดุที่ใช้บรรจุคอลัมน์ในเทคนิคเจลโครมาโทกราฟี สามารถใช้ได้หลายชนิด แต่ละชนิดที่เลือกใช้จะมีผลต่อการแยกที่แตกต่างกันมาก วัสดุสำหรับบรรจุมีทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ในทางอุดมคติวัสดุสำหรับบรรจุคอลัมน์จะต้องมีสมบัติที่สำคัญคือ มีความเฉื่อยทางเคมี กทนต่อความร้อน ด้านทานการไหลได้เพียงเล็กน้อย สามารถให้รีโซลูชันที่สูง ถึงแม้ราคาจะสูงมากก็ตาม การเลือกวัสดุสำหรับบรรจุคอลัมน์จะขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการแยกว่ามีสมบัติอย่างไร เช่น ขนาดโมเลกุล ประจุรวม ความเป็นกรด-เบสและความแรงของไอออนที่ต้องการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 2.3

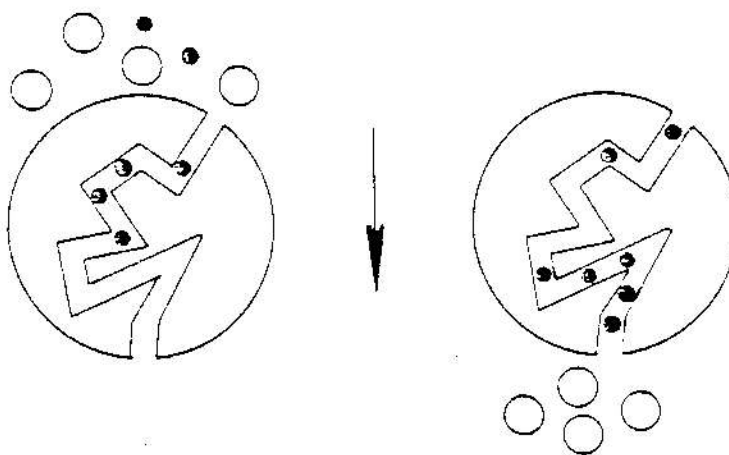
จะแสดงวัสดุที่ใช้บรรจุคอลัมน์ ตัวทำละลาย ช่วงการแยกของขนาดโมเลกุล และชื่อทางการค้าที่ใช้เรียกกันในปัจจุบัน

ตารางที่ 2.3 วัสดุต่างๆ ที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ สำหรับเจลโครมาโทกราฟี⁽²⁾

วัสดุ	ตัวทำละลาย	ช่วงการแยกของ MW	ชื่อการค้า
styrene-divinylbenzene gels	Organic	$5 \times 10^3 - 10^8$	styrene
styrene gels	Organic	$5 \times 10^2 - 1.5 \times 10^3$	Bio-Beads
polyvinylacetate gels	polar organic	$5 \times 10^2 - 1 \times 10^5$	EM-GEL-OR
porous silica beads	Organic-aqueous	$5 \times 10^2 - 2 \times 10^5$	Porasil
porous glass	Organic-aqueous	$5 \times 10^2 - 1.5 \times 10^5$	-
porous glass	Organic-aqueous	$2 \times 10^3 - 9 \times 10^6$	Bio-Gels
Dextran gels	Organic-aqueous	$2 \times 10^2 - 2 \times 10^7$	Sephadex
Acrylamide-methylene bisacrylamide	Aqueous	$2 \times 10^2 - 4 \times 10^4$	Bio-Gel-P
Agarose	Aqueous	$10^4 - 10^6$	Bio-Gel-A

ประโยชน์ของเจลโครมาโทกราฟีที่สำคัญในปัจจุบันคือ ใช้แยกสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ๆ เฟสที่อยู่กับที่เป็นของแข็งที่มีลักษณะโมเลกุลเป็นเจล มีรูพรุน ขนาดของรูแน่นอน สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถเข้าไปในรูของเจลได้ก็จะถูกพาออกจากคอลัมน์ได้ง่ายด้วยเฟสที่เคลื่อนที่ สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กเพียงพอที่จะเข้าไปในรูพรุนของเจลได้ก็จะถูกกักไว้ทำให้ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์นาน ดังแสดงในรูปที่ 2.5 เนื่องจากขนาดของโมเลกุลขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลคือถ้าโมเลกุลมีขนาดใหญ่ ก็จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นรีเทนชันไทม์ของสารตัวอย่างจะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุดจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ก่อน ส่วนสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ทีหลัง ตามลำดับ ขนาดรูพรุนของเจลที่จะยอมให้โมเลกุลของสารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ผ่าน

เข้าไปได้เรียกว่า exclusion limit เช่น เจลที่มี exclusion limit เท่ากับ 50,000 จะยอมให้สารตัวอย่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 50,000 ผ่านเข้าไปได้ ทำให้เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ช้า แต่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 50,000 จะไม่สามารถเข้าไปได้ จึงไม่ถูกกักไว้ ทำให้เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้อย่างง่ายดาย ตามปกติ exclusion limit มีขนาดตั้งแต่ 400 ถึง 50×10^6 การเลือกใช้ชนิดของเจลเพื่อบรรจุในคอลัมน์ ต้องพิจารณาจากสารตัวอย่างที่ต้องการแยก คือต้องเลือกใช้เจลที่มีขนาดของรูพรุนที่ให้สารชนิดหนึ่งผ่านเข้าไปได้ แต่อีกชนิดหนึ่งไม่สามารถเข้าไปได้ จึงจะเกิดการแยกที่ดี



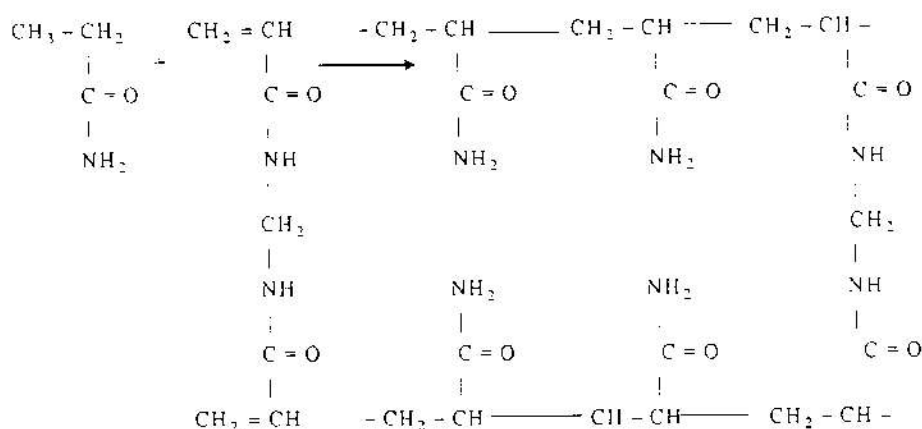
รูปที่ 2.5 รูพรุนของเจลมีผลทำให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเดินทางออกจากคอลัมน์ได้ช้า⁽²⁾

2.5.2 เจลที่ใช้ในการศึกษาทางเอกซ์คูลูชันโครมาโทกราฟี^(2,8)

แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

2.5.2.1 เจลชนิดอ่อน (soft gels) เจลชนิดนี้คือสารโพลิเมอร์ (polymeric material) ที่ได้จากการ cross linked สารพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น dextran ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Sephadex ปกติ Sephadex ที่ใช้ยังแบ่งอีกได้หลายชนิด ตามขนาดรูพรุนที่เกิดจากการ cross linked หรือได้จากการ cross linked สารจำพวก อะครีลาไมด์ (acrylamide) ซึ่งมีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Gel P-2 มีได้หลายขนาดเช่นเดียวกัน การทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้เจลชนิดอ่อนนี้ จะมีชื่อเรียกว่า gel filtration chromatography

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ได้ใช้วัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ คือ เจลที่มีชื่อทางการค้าว่า Bio-Gel P-2 ซึ่งเป็นโพลีอะคริลาไมด์ที่มีรูพรุน เตรียมได้โดยการทำโคโพลิเมอไรเซชัน ของ acrylamide และ N,N'-methylene-bis-acrylamide เป็นตัวพาดเชื่อมในโพลิเมอร์ ดังรูปที่ 2.6 ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ จะต้องมี initiator ซึ่งได้แก่ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene ethylenediamine) และตัวเร่งปฏิกิริยา คือ แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการเกิดอะคริลาไมด์ จากโมโนเมอร์และบิสอะคริลาไมด์⁽⁵⁾

พึงสังเกตว่า ออกซิเจนจะยับยั้งกระบวนการเกิดโพลิเมอร์ ดังนั้นจึงต้องมีการดูดอากาศในสารละลายออกทุกครั้ง ความพรุนของเจล (porosity) ขึ้นอยู่กับสัดส่วนสัมพัทธ์ระหว่างโมโนเมอร์และสารพาดเชื่อม (Cross linking agent) โพลีอะคริลาไมด์เจลนั้น เหมาะสมที่จะใช้ในงานการแยกสารที่มีปริมาณมาก โดยทำการแยกสารบนแผ่นเจล (Slab gel) และในการวิเคราะห์สารโดยใช้เจลแผ่น หรือ เจลในแท่งแก้วกลม⁽⁴⁾ ซึ่ง Bio-Gel P-2 เป็นเจลที่ชอบน้ำและมีประจุอิสระ (hydrophilic and free of charge) และมีข้อดีอีกอย่างคือ ไม่ช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ หรือ leach carbohydrate เหมือน dextran หรือ agarose gel และ Bio-Gel P-2 มีประสิทธิภาพในการแยกที่ดี ในบัฟเฟอร์ที่มี pH 5.5-6.5 อาจใช้ได้ในช่วง pH 2-10 สำหรับการเพิ่มอัตราการไหล และ รีโซลูชันทำได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 4 - 80 °C สมบัติต่างๆ ของ Bio-Gel P-2 แบบต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 สมบัติของ Bio-Gel P-2 gel ขนาดต่างๆ⁽¹¹⁾

Bio-Gel P-2 gel	Mean diameter of Hydrate Beads (μm)	Hydrate Bed Volume(ml/g dry)	Typical Flow rate (cm/hr)	Fractionation Range/Normal Exclusion Limit(dalton)
medium	130 ± 40	3.5	10-15	100-1,800
fine	65 ± 20	3.5	5-10	100-1,800
extrafine	25 ± 5	3.5	5-10	100-1,800

7

จะเห็นได้ว่าการใช้ Bio-Gel P-2 gel ในขั้นตอนการแยกไซเคโรฟอร์นั้น ไซเคโรฟอร์ที่ศึกษาจะมี น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 100- 1,800 คาลตัน

2.5.2.2 เจลชนิดแข็ง (Semirigid Gels)

เจลชนิดนี้ได้จากการ cross linked สารพอลิไสตไทรน (พวกเดียวกับเรซิน) มีชื่อเรียกทางการค้าว่า Bio-Beads S ถ้าใช้เจลชนิดนี้เป็นเฟสที่อยู่กับที่บรรจุในคอลัมน์ จะมีชื่อเรียกว่า Gel permeation

ทั้งเจลชนิดอ่อนและชนิดแข็ง เมื่อต้องการนำมาใช้ต้องนำไปแช่ในในตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ หรือตัวทำละลายไฮโดรฟิลิกก่อน จนกระทั่งพองตัวเต็มที่จึงบรรจุในคอลัมน์

วิธีเอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟีมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีสำหรับสารที่มี น้ำหนักโมเลกุลสูงๆ เช่น เปปไทด์ โปรตีน ฮีโมโกลบิน ฯลฯ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นวิธีการหา น้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้ด้วย ซึ่งทำได้โดยใช้สารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอนหลายๆ ขนาด และมีโครงสร้างเหมือนกับสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ จากนั้นหาค่ารีเทนชัน โวลูมของสารแต่ละตัว นำค่ารีเทนชันโวลูมมาพลอตกราฟเทียบกับค่าล็อกของน้ำหนักโมเลกุล จะได้กราฟเป็นเส้นตรง จากนั้นนำสารตัวอย่างผ่านลงในคอลัมน์ และหาค่ารีเทนชันโวลูมของสารตัวอย่าง จากค่ารีเทนชันโวลูมสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างได้จากกราฟมาตรฐาน นอกจากประโยชน์ทางหาน้ำหนักโมเลกุลแล้ว ยังใช้ประโยชน์ในการเอาไอออนและสารโมเลกุล เล็กออกจากสารตัวอย่างได้ด้วย⁽⁴⁾

สมการที่สามารถใช้อธิบายหลักการของเอกซ์คลูชันโครมาโทกราฟีได้ดีคือ สมการที่ 2.5

$$V_R = V_m + K_d V_p \quad 2.5$$

สำหรับสารตัวอย่างที่มีโมเลกุลใหญ่ๆ หรือน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า exclusion limit ของเจล พบว่าสามารถเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ในเวลาเดียวกับตัวทำละลาย นั่นคือ V_R จะมีค่าเท่ากับ V_m (V_m คือปริมาตรของเฟสที่เคลื่อนที่ ซึ่งเรียกว่า Void Volume) ในกรณีนี้ค่า K_d จะเท่ากับ 0 เพราะไม่เกิดการกระจายของสารตัวอย่างระหว่างเฟสที่อยู่กับที่กับเฟสที่เคลื่อนที่แต่อย่างใด ($K_d = C_s/C_m = 0$ เพราะว่า $C_s = 0$) เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลเล็กเพียงพอที่จะเข้าไปอยู่ในเจลได้หมดจะพิจารณาได้ว่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เข้าไปอยู่ในเจลกับที่อยู่ในตัวทำละลายนอกเจลนั้นไม่แตกต่างกัน ดังนั้น $C_s = C_m$ นั่นคือ $K = C_s/C_m = 1$ สำหรับ V_p คือ ปริมาตรของเฟสที่อยู่กับที่ (pore volume) สามารถหาได้โดยใช้สารตัวอย่างที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเจลได้หมดมาหาค่ารีเทนชันโวลูม (V_R) แล้วแทนค่าลงในสมการ 2.5 โดยใช้ $K_d = 1$ สำหรับค่า V_m หราบได้จากการใช้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูพรุน หาค่ารีเทนชันโวลูม ซึ่งจะได้ $V_R = V_m$ โดยแทนค่าต่างๆ ที่หาก็สามารถคำนวณหาค่า V_p ได้ สำหรับสารตัวอย่างที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่างกลางจะเข้าไปอยู่ในรูพรุนของเจลได้บางส่วนแสดงว่า ค่า K_d จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ซึ่งสามารถคำนวณได้ว่า K_d ของสารตัวอย่างนั้นมีค่าเท่าใดได้ เมื่อทราบค่า V_p , V_m และ V_R ของสารนั้นๆ แล้ว

2.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เมื่อจุลินทรีย์เจริญภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันจะมีการสร้างไซเคโอโรฟอรในปริมาณและโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วใช้กระบวนการทางเคมีเข้ามาช่วยดำเนินการแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

Henry et al. (1990) ศึกษาถึงการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไซเคโอโรฟอรที่มีผลไปยับยั้งการเจริญของ *Ps. tolaasii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคเน่าเสียในเห็ดได้โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่มีเหล็กเป็นส่วนประกอบพบว่าการสร้างไซเคโอโรฟอรที่มีการดูดกลืนคลื่นแสงช่วง 400 nm และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Ps. tolaasii* ได้ซึ่งในทางปฏิบัติต้องมีการเติม EDTA และ bipyridyl เพื่อให้ได้ผลดียิ่งขึ้น

Persmark et al. (1990) พบว่า ภายใต้สภาวะที่มีเหล็กต่ำมีผลต่อแบคทีเรีย ซึ่งไปสนับสนุนการเจริญของพืช โดยจะสร้างไซเคโอโรฟอรส์เชิงวงแหวนที่มีชื่อว่า Pseudactin 589 A ซึ่งจับกับ Fe^{2+} ที่ pH 7 ซึ่งประกอบไปด้วย nonapeptide ที่มีลำดับของกรดอะมิโน ดังนี้ L-Asp-L-Lys-(D)-beta-

OH-Asp-D(L)-Ser-D(L)-Ser-L-Thr-D-Ala-D-Glu-L(D)-Ser-L-Nsuper(epsilon)-amino group โดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ 25 °C ในอาหารกิงส์บีและอาหารเอ็มเอ็ม เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

Kissalita *et al.* (1993) ได้ดัดแปลงอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยง *Pseudomonas fluorescens* 2-79 เพื่อผลิต pyoverdine โดยใช้ casamino acid เลี้ยงจุลินทรีย์ที่ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็ว 200 rpm

Suneja (1992) ได้ศึกษาถึงไฮโดรออกไซด์ของ pyoverdine และ catechol พบว่า เมื่อมีการเติม ammonium acetate ลงในอาหารที่ประกอบไปด้วย manitol 1 % หรือซูโครส 2 % มีการชักนำให้มีการสร้างสารไฮโดรออกไซด์ของ catechol แต่จะไปยับยั้งการสร้างไฮโดรออกไซด์ของ pyoverdine

Cody (1987) ศึกษาพบว่า ไฮโดรออกไซด์ของ pyoverdine ซึ่งสร้างจาก *Ps. syringae* pv. *syringae* B 301D มีลักษณะสีเขียวเหลืองเรืองแสงโดยสร้างขึ้นภายใต้สภาวะที่มีเหล็กจำกัดจึงทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณ Fe^{3+} ต่อการสังเคราะห์ pyoverdine พบว่ามีการสร้าง pyoverdine เพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณ Fe^{3+} แต่ก็จะถูกยับยั้งเมื่อมีปริมาณของ Fe^{3+} มากกว่า หรือเท่ากับ 10 μM ซึ่งในการทดลองนี้การศึกษาเหล็กเข้าสู่ภายในเซลล์ โดยใช้ $^{55}Fe^{3+}$ เป็นตัวตรวจสอบ

Derylo (1994) กล่าวว่า *Rhizobium* ที่แยกได้จากปมรากถั่วชนิดต่างๆ ที่เป็นตัวส่งเสริมการเจริญของพืชพบว่ามีบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างไฮโดรออกไซด์ได้ โดยสังเกตจากการสร้างวงสีส้มบนอาหาร CAS agar ซึ่งพบว่าไฮโดรออกไซด์ที่ *Rhizobium* ผลิตขึ้นเป็นชนิด hydroxamate และ phenolate ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญให้กับพวกแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตไฮโดรออกไซด์ นั่นก็แสดงให้เห็นว่า monohydroxamate เป็นชนิดหนึ่งของไฮโดรออกไซด์

Winkelmann *et al.* (1991) ได้ทำการปรับปรุงวิธีการแยก catechol ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ซึ่งได้ผลดีกว่าการสกัดด้วยสารอินทรีย์ โดยผ่านสารละลายส่วนใส ที่ทำเป็นกรด (pH 2) ด้วยการเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) นำมาผ่านคอลัมน์ XAD-2 เรซิน จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นแล้วจะเอา catechol ออกด้วยเมทานอล ส่วน enterobactin สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ แล้วตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ catechol ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC ที่ใช้ C_{18} reversed phase และ mobile phase เป็นสารผสมระหว่างเมทานอลกับ 0.1 % กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 1:1 สัดส่วนของเฟกแปรเปลี่ยนตามเวลา และสายพันธุ์ที่ใช้ศึกษา

Schwyn และ Neilands (1987) ได้คิดค้นวิธีการตรวจหา และตรวจวัดการเกิดไฮโดรออกไซด์โดยอาศัยหลักการเกิดสี ดังสมการต่อไปนี้



โดยเกิด Nitroxyl radical ($\text{RCONHO}^\cdot$) ขึ้นในระหว่างการออกซิไดซ์ แต่ถ้าเป็น secondary hydroxamic acid จะไม่ถูกออกซิไดซ์ด้วย I_2 โดยตรง ต้อง hydrolysis ก่อนที่จะใช้วิธี Csaky นี้

Berg & Becker test (Indooxine Method) เนื่องจากปฏิกิริยานี้ได้ผลิตภัณฑ์เป็น สารประกอบเชิงซ้อน green indooxine เพราะ hydroxylamine ทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ จะเกิดสาร indooxine และมีค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตีเป็น $0.107 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ โดย 1 mol ของ NH_2OH ให้ indooxine 1 mol ด้วย ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในเวลา 4 ชั่วโมง

Triphenyltetrazolium Chloride test (TTC) อาศัยหลักการ hydrolysis ของ hydroxamic acid ให้สารละลายสีแดงกับ TTC รีเอเจนต์ โดย hydroxylamine จะไม่เกิดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิห้อง (25°C) แต่ถ้าอุณหภูมิเกิน 90°C จะเกิด autoreduction ของ TTC รีเอเจนต์แทน ในที่นี้เขาจึงเลือกอุณหภูมิ 80°C เวลา 5 นาที และ TTC รีเอเจนต์ทำปฏิกิริยาพอดีกับ NH_2OH 1:1 โดย โมล ค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตีเป็น $0.03 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Periodic acid test โดยการออกซิเดชันของ $-\text{CON}(\text{OH})-$ group เกิดเป็น Nitroso dimer ถ้าปฏิกิริยานี้เกิดกับ desferal มีค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตีเป็น $0.03 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ถ้าเกิดกับ ferrichrome มีค่าโมลาร์แอบซอร์ปติวิตีเป็น $0.002 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ แต่ถ้าเป็นไซเคอโรฟอรับริสุทธิให้ โมลาร์แอบซอร์ปติวิตีเท่ากับ $0.033 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ วิธีนี้มีสภาพไวที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ hydroxamic acid ใน unknown siderophores โดยตรง

ในวิธีทั้งหมดที่กล่าวมา Csaky test มีสภาพไวที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ hydroxamic acid และยังมีข้อดีอื่นๆ อีกดังนี้คือ

1. ปลดปล่อย hydroxylamine จาก hydroxamic acid ที่ 120°C เวลา 4 ชั่วโมง
2. การออกซิเดชันของ hydroxamic acid กับ I_2 จะได้ผลดีที่ $\text{pH } 3.1 \pm 0.1$
3. ใช้ N-(1-naphthyl)ethylenediamine เป็นรีเอเจนต์คู่ (coupling reagent) ในการเกิด azo

dye