

การแยกรงควัตถุต่าง ๆ จากใบพืช

เมื่อแสงส่องกระทบวัตถุใด ๆ ก็ตาม แสงจะถูกสะท้อนกลับ แสงจะส่องผ่านทะลุวัตถุหรือแสงจะถูกดูดกลืนโดยวัตถุนั้น สารที่ดูดกลืนแสงที่ตามองเห็นได้ (visible light) สารนี้เรียกว่า สารสี (pigments) สารสีต่างชนิดกันจะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างกัน และความยาวคลื่นที่ถูกดูดกลืนจะหายไป ถ้าสารสีดูดกลืนความยาวคลื่นทั้งหมด สารสีจะปรากฏเป็นสีดำ ถ้าใช้แสงสีขาวส่องไปที่สารสี สีที่เห็นคือสีที่ถูกสะท้อนหรือส่องผ่านทะลุสารสีนั้น การที่เรามองเห็นใบไม้เป็นสีเขียวเพราะคลอโรฟิลล์ดูดกลืนแสงสีแดงและน้ำเงิน ขณะเดียวกันปล่อยให้แสงสีเขียวผ่านทะลุผ่านหรือสะท้อนกลับมา ความสามารถของสารสีในการดูดกลืนความยาวคลื่นสามารถวัดได้ในเชิงปริมาณ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ใบไม้ของพืชส่วนใหญ่มีสีเขียว บางชนิดมีสีแตกต่างกันไป การที่มีใบไม้มีสีต่าง ๆ แสดงว่าใบไม้ประกอบด้วยสารสีชนิดเดียวหรือไม่ และแม้แต่ใบไม้ที่มีสีเขียวล้วน ๆ นักศึกษาจะพิสูจน์ได้อย่างไรว่าใบไม้นั้นประกอบด้วยสารสีชนิดเดียวหรือประกอบด้วยสารสีหลายชนิด

วัตถุประสงค์ เพื่อให้ผู้ศึกษา

1. สกัดและแยกสารสีจากใบไม้ได้
2. จัดชุดเครื่องมือเทคนิคเปเปอร์โครมาโทกราฟีได้

เนื้อหา

รงควัตถุที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ด้วยแสง เป็นสารประกอบประเภทไขมัน ซึ่งอยู่ภายใน คลอโรพลาสต์ อาจสกัดรงควัตถุออกมาได้ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น ethyl alcohol รงควัตถุที่สกัดได้นี้ อาจนำมาแยกได้เป็นชนิดต่าง ๆ ได้หลายวิธี เช่น วิธีที่เรียกว่า เปเปอร์โครมาโทกราฟี (paper chromatography) วิธีนี้มักจะใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดผสมกันและมีกระดาษ-กรองทำหน้าที่เป็นตัวกลางให้ตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปตามความยาวของกระดาษ รงควัตถุต่างชนิดกันจะถูกแยกออกจากกัน โดยอาศัยหลักการ 2 ข้อ คือ ข้อหนึ่ง เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนผ่าน รงควัตถุที่อยู่บนกระดาษ รงควัตถุต่างชนิดกันจะละลายปนไปกับตัวทำละลายนั้นเป็นส่วนใหญ่ และข้อสอง ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ไปบนกระดาษ กรองด้วยความเร็วไม่เท่ากัน เนื่องจากถูกดูดซับบนกระดาษกรองไม่เท่ากัน รงควัตถุที่ละลายปนอยู่กับตัวทำละลายก็จะเคลื่อนที่ไปตามกระดาษกรองด้วยความเร็วที่ไม่เท่ากันด้วย

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. ใบพืชสดที่มีสีเขียว 1 – 2 กรัม
2. โกร่งพร้อมที่บิด
3. อะซิโตน 10 มล.
4. โครมาโตกราฟีโซลเวนท์ 10 มล. (ใช้ petroleum ether ผสมกับ acetone ในอัตราส่วน 9:1)
5. กระดาษกรอง เช่น whatman # 1
6. หลอดทดลองพร้อมจุกคอร์ก ϕ 150 มม.
7. เข็มหมุด 1 เล่ม
8. ก้านไม้ขนาดเล็กปลายแหลม 1 ก้าน
9. test tube rack 1 อัน
10. กรรไกร

วิธีการทดลอง

1. วิธีแยกรงควัตุออกจากใบพืช

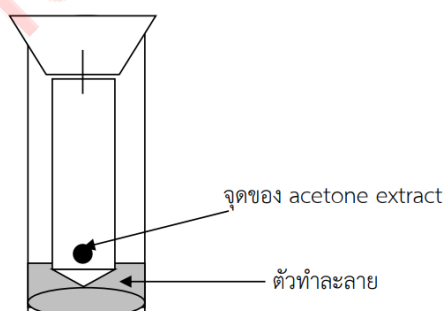
นำใบพืชประมาณ 1 – 2 กรัม มาฉีกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในโถรงเติม acetone ลงไปในโถรงประมาณ 5 – 6 มล. ตำใบพืชให้ละเอียด รงควัตุในใบพืชจะละลายอยู่ใน acetone สารละลายนี้เรียกว่า acetone extract

2. เตรียมอุปกรณ์ paper chromatography

ตัดกระดาษกรองขนาดยาวประมาณ 10 ซม. กว้างประมาณ 1 ซม. จำนวน 1 แผ่น ตัดปลายกระดาษกรองข้างหนึ่งให้แหลม ใช้เข็มหมุดเจาะปลายกระดาษอีกด้านหนึ่งแล้วปักลงที่จุกคอรัค (กระดาษกรองจะแขวนอยู่กับเข็มหมุด) แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลอง โดยให้ปลายกระดาษกรองอยู่เหนือก้นหลอดทดลองขึ้นมาเล็กน้อย ทำเครื่องหมายไว้ที่ข้างหลอดทดลองให้ตรงกับปลายกระดาษกรองแล้วนำกระดาษกรองและจุกคอรัคออกจากหลอดทดลอง นำตัวทำละลาย (chromatographic solvent) ใส่ลงในหลอดทดลอง โดยให้ระดับผิวของตัวทำละลายสูงกว่าขีดที่ทำเป็นเครื่องหมายไว้ประมาณ 0.5 ซม. (ดังภาพที่ 1)

3. วิธีแยกรงควัตุชนิดต่าง ๆ

นำก้านไม้จุ่มลงใน acetone extract แล้วนำไปหยดบนกระดาษกรอง ให้ห่างจากปลายกระดาษกรองด้านแหลมประมาณ 1 – 1.5 ซม. แล้วปล่อยให้แห้ง ทำเช่นนี้อีก 2 – 3 ครั้ง จนกระทั่งขนาดของจุดของ acetone extract มีขนาดกว้างประมาณ 0.3 – 0.5 ซม. เมื่อ acetone extract บนกระดาษกรองแห้งดีแล้ว นำกระดาษกรองใส่ลงในหลอดทดลอง ให้ปลายกระดาษกรองจุ่มอยู่ใน chromatographic solvent และให้จุด acetone extract อยู่เหนือระดับ chromatographic solvent พอประมาณ (ดังภาพที่ 7.3) นำหลอดทดลองไปตั้งไว้ใน test tube rack โดยให้หลอดทดลองตั้งอยู่ในแนวตั้งและอย่าให้กระดาษกรองสัมผัสกับข้างหลอดทดลองปล่อยให้ chromatographic solvent ขึ้นมาตามกระดาษกรอง นักศึกษาจะสังเกตเห็นโครมาโทแกรม (chromatogram) เกิดขึ้น เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จนเกือบจะถึงขอบบน ให้ดึงแผ่นกระดาษกรองออก ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง



ภาพที่ 1 การเตรียมอุปกรณ์ paper chromatography

รายงานปฏิบัติการ

วันที่ทำการทดลอง.....

กลุ่มที่.....หมู่เรียนที่.....

ชื่อ-สกุล รหัส.....

บันทึกการทดลอง และตอบคำถามต่อไปนี้

1. รงควัตถุเหล่านี้อยู่ในตำแหน่งใดในเซลล์ และมีหน้าที่อย่างไรในการสังเคราะห์แสง

.....
.....
.....

2. รงควัตถุที่แยกได้จากวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี มีสีใดบ้าง.....

.....และรงควัตถุที่เคลื่อนที่ตามกระดาษกรองได้เร็วที่สุดคือ.....

.....ช้าที่สุดคือ.....ซึ่งแสดงว่า.....

.....
.....

3. เหตุใดตัวทำละลายจึงละลายรงควัตถุได้มากน้อยต่างกัน

.....
.....
.....

บันทึกผลการทดลอง

จงแสดงลักษณะของโครมาโทแกรมที่เกิดขึ้น (วาดรูปพร้อมอธิบาย)

สรุปผลการทดลอง

.....
.....
.....