

ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ความหมายของอิเล็กโทรโฟเรซิส (Electrophoresis)

"Electrophoresis" เป็นคำมาจากภาษากรีกว่า "Elektron" ซึ่งเป็นคำศัพท์ของ Electric (ไฟฟ้า) และ "Phore" มาจากภาษาละตินหมายถึง Bearer (ผู้นำไป) ดังนั้น Electrophoresis จึงหมายถึงการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าหรือสนามไฟฟ้าทำให้สารเกิดการเคลื่อนที่ L. Michaelis เป็นคนแรกที่ใช้ศัพท์นี้อธิบายปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ของอนุภาคคอลลอยด์ในสนามไฟฟ้า (Michaelis, 1909 : 81)

Willard ให้ความหมายของอิเล็กโทรโฟเรซิส (Electrophoresis) ว่าหมายถึงการเคลื่อนที่ของอนุภาคขนาดเล็กหรือของโมเลกุลขนาดใหญ่อันเนื่องมาจากผลของสนามไฟฟ้าซึ่งเราให้แก่วัสดุกลางที่อนุภาคเหล่านั้นแขวนลอยอยู่ (Willard, 1965 : 639) ตัวอย่างสารที่เคลื่อนที่ได้เมื่อเราปล่อยกระแสไฟฟ้าลงไป ได้แก่ สารละลายโปรตีน และอนุภาคของคอลลอยด์ ฯลฯ

การเคลื่อนที่ของอนุภาคในสนามไฟฟ้าอาจจะเป็นไปได้สองวิธีคือ เคลื่อนที่โดยไม่มีสเทปีโลยีมีเคียม เช่นกรณีของ Free boundary method หรือการเคลื่อนที่โดยอาศัยสเทปีโลยีมีเคียมก็ได้ เช่นในกรณีของ Zone method (Zweig and Whitaker, 1967 : 1)

Free boundary method หมายถึงการที่เราให้ (Apply) สนามไฟฟ้าแก่อนุภาคที่มีประจุในสารละลาย ทำให้อนุภาคเหล่านั้นเคลื่อนที่ไปหาขั้วไฟฟ้าอย่างเป็นอิสระโดยไม่ต้องมีสเทปีโลยีมีเคียม ส่วน Zone method นั้นหมายถึงการที่เราให้กระแสไฟฟ้าแก่อนุภาคที่มีประจุในสเทปีโลยีมีเคียม ทำให้อนุภาคเหล่านั้นเคลื่อนที่ไปหาขั้วไฟฟ้าโดยผ่านไปในเนื้อสารของสเทปีโลยีมีเคียม แล้วอนุภาคเหล่านี้แยกออกเป็นแถบ (Zone) เนื่องจากอนุภาคต่างชนิดกันมีอัตราการเคลื่อนที่ต่างกัน

ประวัติอิเล็กโตรโฟเรซิส

ใน พ.ศ. 2435 (ค.ศ. 1892) H. Picton และ S.E. Linder (Picton and Linder, 1892 : 148) ได้ศึกษาเรื่องอิเล็กโตรโฟเรซิสโดยวิธี Free boundary method เป็นครั้งแรก แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่พอใจนัก ต่อมา A. Tiselius (Tiselius, 1937 : 524) ได้ศึกษาเรื่องเดียวกันนี้อีกครั้งหนึ่งพบว่าวิธีนี้มีปัญหาหลายประการ อันเป็นสาเหตุให้การทดลองไม่ไฉไลดี เช่น อัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาคมีค่าไม่คงตัวและไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้โดยสมบูรณ์ วิธี Free boundary method จึงไม่เป็นที่นิยม ต่อมานักเคมีหันมาสนใจศึกษาอิเล็กโตรโฟเรซิสบนสเลปโตสโริงมีเดียมแทน (Tiselius and Flodin, 1953 : 461) วิธีใหม่นี้มีชื่อเฉพาะว่า Zone method เขาใช้สเลปโตสโริงมีเดียมเป็นตัวช่วยทำให้สารแยกออกจากกัน วิธีนี้ได้ผลดีกว่าวิธีแรก เพราะแถบสารที่แยกออกจะไม่บิดเบี้ยว (Distort) ทำให้มองเห็นขอบเขตของสารที่แยกออกจากกันได้ชัดเจน สารที่เข้าสเลปโตสโริงมีเดียมมีหลายชนิด เช่น กระจกกรอง แผ่นเซลลูโลส - อะซีเตท แป้ง ผงเซลลูโลส กระจกขายหิน น้ำเยล - อะซีเตท กระจกขายแก้ว ผงซิลิกา กieselguhr ผงแก้วปน และอะกาโรส - เจล (Agarose gel) ที่นิยมใช้กันมากคือกระจกกรอง เพราะเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย เริ่มมีการทดลองง่ายและไฉไลดี

ค่าคงตัวประจำสารและองค์ประกอบของอัตราการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้า

การดูสารที่แยกวิเคราะห์จะเป็นชนิดใด เราอาศัยค่าคงตัวเฉพาะ (Characteristics) ของสารนั้น ๆ สารแต่ละชนิดมีค่าคงตัว ค่านี้ไคแก่ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility) และระยะทางที่สารเคลื่อนที่ในช่วงเวลาที่จำกัดช่วงหนึ่ง

Mikes ได้ศึกษาและจำแนกองค์ประกอบของการเคลื่อนที่ของอนุภาคในสนามไฟฟ้าเป็น 3 ประเภท (Mikes, 1966 : 357) คือ

1. องค์ประกอบที่เกิดจากลักษณะและคุณสมบัติของสารที่จะนำมาแยก ไคแก่ ขนาด จำนวนประจุ รูปร่างและสมบัติทางเคมีของอนุภาคนั้น ๆ
2. องค์ประกอบที่เกิดจากตัวกลาง ไคแก่ ธรรมชาติและคุณสมบัติของตัวกลางคือ

อุณหภูมิ ความหนืด Dielectric constant of solvent, pH, Ionic strength
และ Chemical interactions

3. องค์ประกอบที่เกิดจากสนามไฟฟ้า ได้แก่ ความเข้ม (Intensity) และ Homogeneity of current (หมายถึงกระแสไฟฟ้าที่ควรจะตกเป็นไฟฟ้ากระแสตรงอย่างเดียวนิไม่มีไฟฟ้ากระแสสลับปนอยู่ด้วย เพราะไฟฟ้ากระแสสลับจะทำให้แถบสารบนกระดาษกรองบิดเบี้ยวได้

หลักการและเครื่องมือสำหรับทดลอง Zone electrophoresis

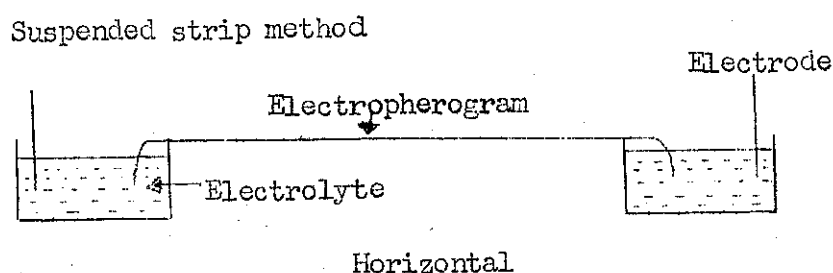
หลักการของการวิเคราะห์สารแบบ Zone electrophoresis คือ นำสารที่เราไม่ทราบ (Unknown sample) และสารที่เราทราบแล้วว่าเป็นอะไร (เรียกว่าสารมาตรฐาน) มาเริ่มต้นเคลื่อนที่พร้อมกันในสนามไฟฟ้า โดยย้ายสารทั้งสองชนิดให้เป็นแถบเล็ก ๆ (Narrow sharp zone) ขวางบนแถบกระดาษกรองที่มีขนาดเท่ากันชนิดละแผ่น แล้วเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ของสารทั้งสองในช่วงเวลาที่เท่ากัน โดยอาศัยทฤษฎีที่ว่าสารชนิดเดียวกันจะมีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากัน และสารต่างชนิดกันจะมีอัตราการเคลื่อนที่ต่างกันจากอัตราการเคลื่อนที่ เราสามารถบอกชนิดของสารที่ต้องการทราบได้

เครื่องมือที่ใช้ทำ Zone electrophoresis ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

1. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) กระแสไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสต้องเป็นกระแสไฟตรงเพื่อให้มีขั้วไฟฟ้าบวกและลบ ปัจจุบันนิยมใช้ไฟฟ้าที่ได้จากการเปลี่ยนไฟ A.C. มาเป็นไฟ D.C. โดยใช้เครื่องแปลงไฟ กระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมในการทดลองมีค่าระหว่าง 50 - 100 mA. และมีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 500 - 1000 V.

2. อิเล็กโตรด (Electrode) ทำจากแท่งถ่านแกรไฟต์หรือสวคิปลาตินัม

3. การจัดวางสเตรปโกลิ้งมีเดีย จัดวางได้ 4 แบบ (Zweig and Whitaker, 1967 : 22 - 28) แต่วิธีที่สะดวกและเหมาะสมที่สุดคือวิธี Suspended strip method เพราะอัตราการเคลื่อนที่ของไอออนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลา



รูปที่ 1 การวางแผนการกระจายของเส้นระหว่างภาชนะที่บรรจุสารอิเล็กโตรไลต์

4. การป้าย (Apply) สารบนอิเล็กโตรเฟอโรแกรม (Electropherogram)

การป้ายสารบนอิเล็กโตรเฟอโรแกรมนั้นจะต้องระวังให้เกิดแถบสารที่แถบที่สุดและไม่ทำให้เกิดรอยบนสเคปี้ไลซึ่งมีเค็มด้วย การป้ายสารมีหลายวิธี โดยทั่วไปป้ายด้วย Micropipet (Contractor, 1965 : 182) หรือป้ายด้วยขอบ Glass microscope slide อีกวิธีหนึ่งใช้คายลีขาวชุบสารละลายที่จะวิเคราะห์ แล้วทาบนเส้นคายบนแผ่นอิเล็กโตรเฟอโรแกรม พยายามทำให้สารที่จะติดบนกระดาษกรองเป็นแถบเล็กที่สุดและอยู่ติดกันไม่ให้ขาดตอน (ให้ได้ Narrow sharp zone)

5. การใช้สารเป็นตัวแทนหรือตัวมาตรฐาน (References or Standards)

เนื่องจากเราใช้ขบวนการอิเล็กโตรเฟอริสในการตรวจพิสูจน์สาร โดยการเปรียบเทียบระยะทางของการเคลื่อนที่ของสารที่เราไม่ทราบกับสารมาตรฐานในช่วงเวลาที่เท่ากัน ดังนั้นจึงต้องให้สารที่จะตรวจพิสูจน์กับสารมาตรฐานเคลื่อนที่บนอิเล็กโตรเฟอโรแกรมแผ่นเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ของสารได้สะดวก การเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่ของสารทำได้สองวิธี คือ วิธีแรกป้ายสารที่จะตรวจและสารมาตรฐานเป็นแถบแคบ ๆ ทั้กัน ถ้าสารทั้งสองเป็นสารชนิดเดียวกันหลังจากปล่อยให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจะพบว่าแถบสารทั้งสองยังคงทั้กันเป็นแถบเดียวไม่ว่าจะเคลื่อนที่ไปอยู่ตำแหน่งใด ๆ ส่วนอีกวิธีหนึ่งให้สารทั้งสองเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าด้วยระยะเวลาเท่ากัน สารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางเท่ากัน

6. การปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าในวงจรเพื่อทำอิเล็กโตรเฟอริส ภายหลังจากการป้ายสารที่จะตรวจพิสูจน์และสารมาตรฐานลงบนจุดตั้งต้นของอิเล็กโตรเฟอโรแกรมแล้ว ทว วาง

ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาทีเพื่อให้สารทั้งหมดเข้าสู่สมดุลไม่มีการแพร่ต่อไปอีก จึงปล่อยกระแสไฟฟ้าเข้าในวงจร เมื่อครบกำหนดเวลาก็กดสวิตช์และนำอิเล็กโตรเฟอโรแกรมออกทันที เพื่อป้องกันไม่ให้อิเล็กโตรไลต์เกิด Siphon ไปตามแผ่นอิเล็กโตรเฟอโรแกรมนั้น นำมาวางตามแนวราบ และทิ้งไว้ให้แห้งหรือใส่ตูบเพื่อจะนำไปตรวจพิสูจน์สารต่อไป

7. การตรวจพิสูจน์สารที่กำลังศึกษา ทำได้หลายวิธีตามแต่จะเหมาะสม วิธีที่นิยมคือการตรวจพิสูจน์โดยสังเกตสีของสารที่มีอยู่แล้วหรือการให้สารนั้นทำปฏิกิริยากับสารเคมีอื่นแล้วเกิดเป็นสีขึ้น

เอกสารเกี่ยวกับการแยกวิเคราะห์ Inorganic cations

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้มีความมุ่งหมายจะนำเทคนิคการทำอิเล็กโตรเฟอริสมาใช้แยกวิเคราะห์สาร Inorganic cations ดังนั้นจึงศึกษาเฉพาะรายงานการแยกวิเคราะห์สาร Inorganic cations พอเป็นแนวความคิดในการทดลองของผู้วิจัยเท่านั้น

ใน พ.ศ. 2471 Kendall (Kendall, 1928 : 163) ได้ทดลองแยกหมู่ของ อีออนออกเป็นสองประเภท คือ ประเภทเคลื่อนที่ไวกว่ากับประเภทเคลื่อนที่ช้า เพื่อให้แถบสารที่เกิดขึ้นแยกจากกันอย่างสมบูรณ์และชัดเจน ต่อมา Strain และ Sullivan (Strain and Sullivan, 1951 : 816) รายงานว่าสามารถแยก Inorganic cations ออกจากกันได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรเฟอริส

Gross พบว่าเทคนิคที่ใช้แยก Inorganic cations ได้ผลดีคือ Zone electrophoresis โดยใช้ความตึงศักย์ 100 V./cm. และใช้เวลา 20 นาที (Gross, 1957 : 1597)

Moghissi ได้ทดลองใช้ Thin - layer เป็นสแตปิลซึ่งมีเค็มนแทนกระดาษกรอง และใช้ความตึงศักย์สูง พบว่า Inorganic cations ส่วนใหญ่แยกออกจากกันได้ในเวลา 2 - 5 นาที (Moghissi, 1964 : 91)

สารอิเล็กโตรไลต์ที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์ Inorganic cations มีหลายชนิด มีผู้ทำการสำรวจไว้ถึง 31 ชนิด (Majumdar and Chabrabortty, 1957 : 228)

แต่ที่นิยมใช้และเหมาะสมในการแยก Inorganic cations มีดังนี้

1. Ammonium carbonate 0.1 M. pH 8.9 (Gross, 1963 : 221)
2. Formic acid 0.75 M. pH 2.0 (Gross, 1963 : 221)
3. Citric acid 1 N. (De Vries, Schutz and Van Dalen, 1964 : 119)
4. Lactic acid 0.05 M. (Moghissi, 1964 : 91)
5. Sodium sulfate 0.5 N. (Chabrabortty, 1961 : 121)

ส่วนกระดาษกรองซึ่งใช้เป็นสเคปโบลิ่งมีคือนั้น ได้มีผู้ศึกษาผลการแยกวิเคราะห์ Inorganic cations โดยใช้กระดาษกรองที่มีความหนาต่างกัน คือ

De Vries และคณะ (De Vries, Schutz and Van Dalen, 1964 : 119) ใช้กระดาษกรอง Whatman No. 1

Gross (Gross, 1963 : 221) กับ Belling และเพื่อน (Belling and Underdown, 1960 : 203) ใช้กระดาษกรอง Whatman No. 3

M. Lederer (Lederer, 1957 : 606) ใช้กระดาษกรอง Arches 302 และ Arches 304

เพื่อตรวจสอบชนิดและตำแหน่งของ Inorganic cations ที่แยกได้ ใช้สารละลายบางชนิดบนแผ่นอิเล็กโตรเฟอโรแกรมเพื่อให้น้ำเข้าทำปฏิกิริยากับ Inorganic cations แล้วเกิดสารที่มีสีขึ้น สารละลายดังกล่าวได้แก่

1. สารละลาย Ammonium sulfide เจือจาง โดยนำอิเล็กโตรเฟอโรแกรมที่ทำให้แห้งแล้วมาพ่นทับด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลไฟด์เจือจาง Inorganic cations ส่วนใหญ่จะทำปฏิกิริยากับสารนี้เกิดสีจำพวกสีเหลือง สีน้ำตาลหรือสีดำ ยกเว้นพวกอัลคาไล หรืออัลคาไลน์ เอิร์ท แคลอไซด์ ซึ่งไม่เกิดสีกับสารนี้

2. 8 - Hydroxyquinoline

ก. ใช้ 8 - Hydroxyquinoline 1% ละลายในสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นบนแผ่นอิเล็กโตรเฟอโรแกรม Inorganic cations ส่วนใหญ่จะทำปฏิกิริยากับสารนี้เกิดสีจำพวกสีเหลือง สีน้ำตาล และบางตัวจะเรืองแสงเมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต

๒. ใช้ 8 - Hydroxyquinoline 1 % ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 80 % พบที่บนอิเล็กโตรเฟอโรแกรมที่แห้ง ต่อจากนั้นนำไปรมด้วยไอแอมโมเนียเข้มข้น เมื่อส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ตจะเรืองแสงเป็นสีเหลืองหรือสีน้ำตาล (De Vries and Others, 1964 : 119)

3. Alizarin

ก. ใช้สารละลาย Alizarin 0.1 % ในน้ำพบที่บนอิเล็กโตรเฟอโรแกรมแล้วรมด้วยไอแอมโมเนีย เป็นการตรวจสอบอัลคาไลไนต์ แคตไอออน โคัลลิสม์หรือสีม่วงแดง (Gross, 1957 : 1597)

ข. ใช้สารละลายอื่นตัวของ Alizarin ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % พบที่บนอิเล็กโตรเฟอโรแกรม ต่อจากนั้นรมด้วยไอแอมโมเนียและพบที่ด้วยสารละลายอื่นตัวของกรดบอริก โคัลลิสม์หรือสีม่วงกับ Inorganic cations บางตัว (De Vries and Others, 1964 : 119)

4. Bromothymol blue

ใช้สารละลายโบรมไทมอลบลู 2 % ในน้ำพบที่บนอิเล็กโตรเฟอโรแกรมที่ทำจคืออิเล็กโตรไลต์ (Background electrolyte) ออกไปหมดแล้ว ใช้สารนี้ตรวจสอบ Mg^{+2} , Na^{+} , K^{+} และนิยมใช้เมื่อมีแอมโมเนีย การบอเหตุเป็นอิเล็กโตรไลต์เพราะสารนี้เมื่ออบที่ร้อนที่ 80° เซ็นติเกรดจะสลายกลายเป็นก๊าซไปหมดทำให้แผ่นอิเล็กโตรเฟอโรแกรมบริสุทธิ์และปราศจากสารอิเล็กโตรไลต์ (Background electrolyte)