บทที่ 2
ลิปิด

ลิปิด เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำแต่จะละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น อีเธอร์ ปิโตรเลียมอีเธอร์ คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตทตระคลอไรด์ เบนซีน อะซีโตน และอัลกอฮอลล์ หน้าที่ที่สำคัญของชีวโมเลกุลประเภทลิปิดคือ เป็นแหล่งสะสมพลังงาน เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และคอยเป็นเกราะป้องกันมิให้โมเลกุลประเภทโพลาร์ผ่านเข้าออกเซลล์ได้โดยง่าย ลิปิดแบ่งได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ลิปิดเชิงเดียว (simple lipid) ลิปิดเชิงประกอบ (compound lipid) และลิปิดอนุพันธ์ (derived lipid)

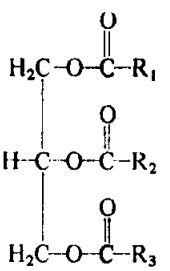
ลิปิดเชิงเดียว ได้แก่

1. **แอซิลกลีเซอรอลหรือกลีเซอไรด์** (acylglycerol, glyceride) เป็นเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอล (glycerol) กับกรดไขมัน (fatty acid) กลีเซอรอลมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ ดังนั้นอาจจะรวมตัวกับกรดไขมันโดยขบวนการ esterification เป็นโมโน-, ได- หรือไตรแอซิลกลีเซอรอลก็ได้

1 หรือ α .....

2 หรือ β .....

3 หรือ α'.....



ตำแหน่งคาร์บอน โครงสร้างไตรแอซิลกลีเซอรอล

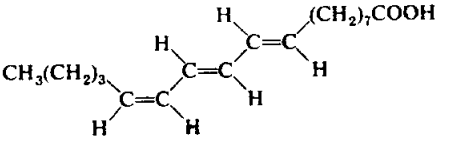
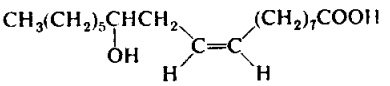
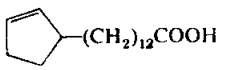
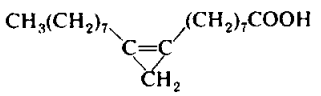
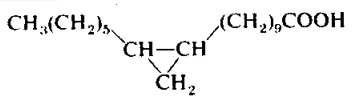
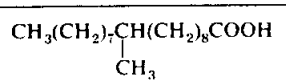
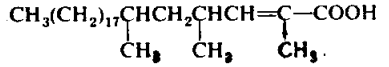
ในธรรมชาติพบไตรแอซิลกลีเซอรอลมากกว่าโมโน- หรือไดแอซิลกลีเซอรอล กรดไขมัน R_1 R_2 และ R_3 อาจเหมือนกันหรือต่างกันและจะเป็นกรดไขมันที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัวก็ได้ ถ้านำไตรแอซิลกลีเซอรอลไปทำปฏิกริยา saponification ซึ่งเป็นการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยด่างจะให้ผลิตผลเป็นกลีเซอรอลและเกลือของกรดไขมัน ที่อุณหภูมิห้องไตรแอซิลกลีเซอรอลจะมีสถานะเป็นของแข็งหรือของเหลวก็แล้วแต่ชนิดและธรรมชาติของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบ

2. **กรดไขมัน** (fatty acid)

ตารางที่ 2.1 กรดไขมันที่พบมากในธรรมชาติ

I. Even-numbered—straight-chain—fully saturated		
Lauric acid (C_{12})	0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
Myristic acid (C_{14})	0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
Palmitic acid (C_{16})	0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
Stearic acid (C_{18})	0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
Arachidic acid (C_{20})	0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
II. Even-numbered—straight-chain—unsaturated (all *cis*)		
Palmitoleic acid (C_{16}) Δ^{9}	1	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
Oleic acid (C_{18}) Δ^{9}	1	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
Linoleic acid (C_{18}) $\Delta^{9,12}$	2	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
Linolenic acid (C_{18}) $\Delta^{9,12,15}$	3	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$
Arachidonic acid (C_{20}) $\Delta^{5,8,11,14}$	4	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$
III. Miscellaneous acids (very limited occurrence)		
Ricinoleic acid (C_{18}) Δ^{9} (hydroxy-containing)	1	$CH_3(CH_2)_5CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$ | OH
Tuberculostearic acid (C_{19}) (branched, odd)	0	$CH_3(CH_2)_7CH(CH_2)_8COOH$ | CH_3
Lactobacillic acid (C_{19}) (cyclic branch, odd)	0	$CH_3(CH_2)_5CH$ — $CH(CH_2)_9COOH$ \ / CH_2

ตารางที่ 2.2 กรดไขมันที่พบในปริมาณเล็กน้อย

จำนวนคาร์บอน	ชื่อ	โครงสร้าง	แหล่งที่มา
18	Eleostearic acid		The main (80%) fatty acid obtained by hydrolysis of tung oil
18	Ricinoleic acid		The main (80%) fatty acid obtained by hydrolysis of castor oil
18	Chaulmoogric acid		From oil of *Hydnocarpus kurzii* (used in the treatment of leprosy)
19	Sterculic acid		From kernel oil of *Sterculia foetida*
19	Lactobacillic acid		From phospholipids of bacteria
19	Tuberculostearic acid		From tubercule bacilli
20	Arachidonic acid	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	From human fat (0.3-1.0%) liver, lecithins
22	Cetoleic acid	$CH_3(CH_2)_9CH{=}CH(CH_2)_9COOH$	From fish oils
22	Erucic acid	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_{11}COOH$ (*cis*)	From seed oils of rape, wallflower nasturtium, and mustard
24	Nervonic acid	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_{13}COOH$ (*cis*)	From fish oils and brain tissues
27	Mycolipenic acid		From tubercule bacilli

กรดไขมันส่วนใหญ่จะเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่มีหมู่คาร์บอกซิลิคอยู่ตรงปลาย จำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ตั้งแต่ 4-30 อาจมีความอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว ถ้าไม่อิ่มตัวจะมีพันธะคู่ (double bond) ได้ประมาณ 1-6 พันธะซึ่งมักจะมีรูปลักษณ์ (configuration) แบบ cis- ไตรแอซิล-กลีเซอรอลใดที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นจำนวนมาก ไตรแอซิลกลีเซอรอลนั้นจะมี

ตารางที่ 2.3 กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขมันและน้ำมันบางชนิด

	AVERAGE COMPOSITION OF FATTY ACIDS (mole %)											
	SATURATED								UNSATURATED			
FAT OR OIL	C_4 BUTYRIC ACID	C_6 CAPROIC ACID	C_8 CAPRYLIC ACID	C_{10} CAPRIC ACID	C_{12} LAURIC ACID	C_{14} MYRISTIC ACID	C_{16} PALMITIC ACID	C_{18} STEARIC ACID	C_{16} PALMIT-OLEIC ACID	C_{18} OLEIC ACID	C_{18} LINOLEIC ACID	C_{18} LINOLENIC ACID
Animal Fats												
Butter	3-4	1-2	0-1	2-3	2-5	8-15	25-29	9-12	4-6	18-33	2-4	
Lard						1-2	25-30	12-18	4-6	48-60	6-12	0-1
Beef tallow						2-5	24-34	15-30		35-45	1-3	0-1
Vegetable Oils												
Olive						0-1	5-15	1-4		67-84	8-12	
Peanut							7-12	2-6		30-60	20-38	
Corn						1-2	7-11	3-4	1-2	25-35	50-60	
Cottonseed						1-2	18-25	1-2	1-3	17-38	45-55	
Soybean						1-2	6-10	2-4		20-30	50-58	5-10
Linseed							4-7	2-4		14-30	14-25	45-60
Coconut		0-1	5-7	7-9	40-50	15-20	9-12	2-4	0-1	6-9	0-1	
Marine Oils												
Cod liver						5-7	8-10	0-1	18-22	27-33	27-32	

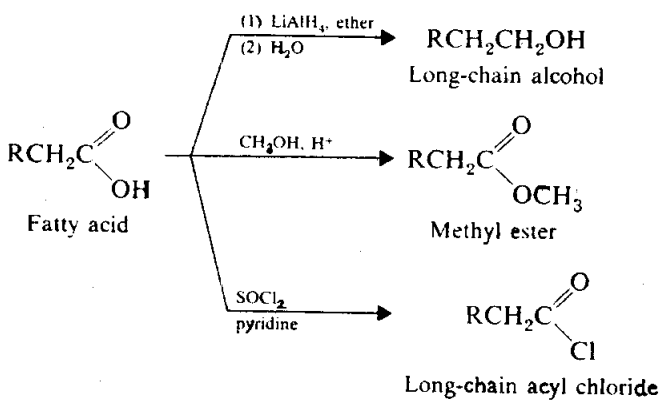
จุดหลอมเหลวต่ำ มีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องเรียกว่า น้ำมัน (oil) โดยมากเป็นน้ำมันจากพืช และสัตว์เลือดเย็นเช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันตับปลา ถ้าไตรแอซิลกลีเซอรอลใด ที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวเป็นจำนวนมาก ก็จะมีจุดหลอมเหลวสูง มีสถานะเป็นของแข็ง ที่อุณหภูมิห้องเรียกว่า ไขมัน (fat) โดยมากได้จากสัตว์เลือดอุ่นเช่น น้ำมันหมู เนย ไขสัตว์ เป็นต้น แต่ไม่ว่าจะเป็นน้ำมันหรือไขมันก็ตามต่างก็เป็นของผสมระหว่างลิปิดโมเลกุลประเภทต่าง ๆ มิใช่มีแต่แอซิลกลีเซอรอลเพียงอย่างเดียว

สัญญลักษณ์ที่ใช้ในตารางที่ 2.1 เช่นว่า linolenic acid (C_{18}) $\triangle^{9,\ 12,\ 15}$ หมายความว่า กรดไขมันนี้มีคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ 3 แห่งที่ตำแหน่ง 9-10, 12-13 และ 15-16 อาจเขียนได้อีกแบบเป็น $C_{18:3}{}^{\triangle 9,\ 12,\ 15}$ ตัวเลขที่อยู่หลังเครื่องหมายโคลัน (:, colon) บอกถึงจำนวนพันธะคู่

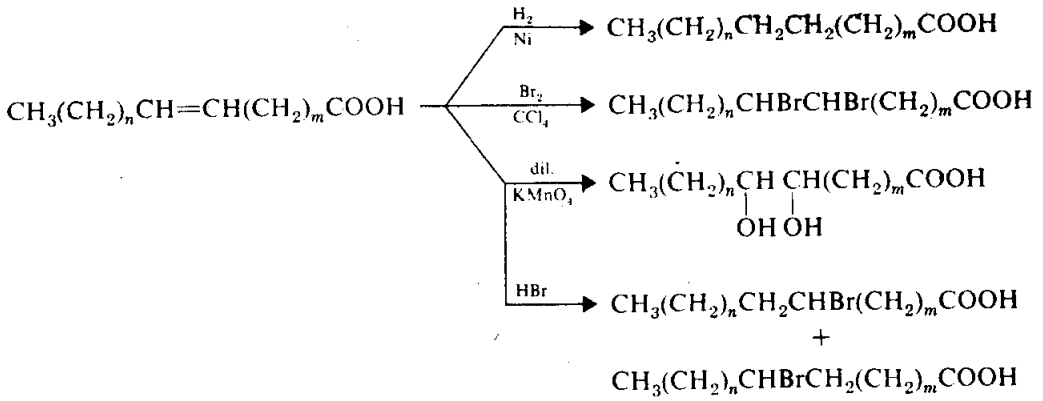
เนื่องจากคนเราไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่าหนึ่งพันธะได้ จึงจำเป็นที่จะต้องได้รับกรดไขมันประเภทนี้ (polyunsaturated fatty acid) จากอาหารที่รับประทานเข้าไป กรดไขมันประเภทนี้จึงจัดเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) ได้แก่ กรดไขมัน linoleic กรดไขมัน linolenic และกรดไขมัน arachidonic

ปฏิกริยาของกรดไขมัน

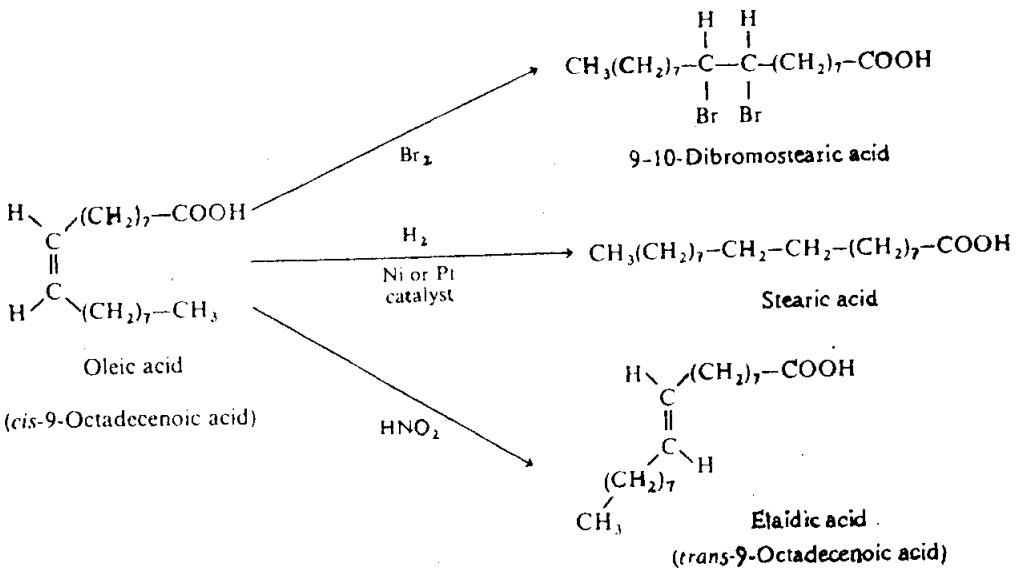
โมเลกุลของกรดไขมันมีหมู่คาร์บอกซิลิค ดังนั้นจึงเกิดปฏิกริยาได้เหมือนกรดคาร์บอกซิลิคทั่ว ๆ ไปเช่น เกิดปฏิกริยา esterification หรือรีดัคชั่น เป็นต้น ส่วนที่เป็นสายยาวของไฮโดรคาร์บอนนั้นปฏิกริยาสำคัญต่าง ๆ มักจะเกิดที่บริเวณพันธะคู่ โครงสร้างที่เหลือส่วนใหญ่จะเฉื่อย (inert) ต่อสารเคมี



ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นที่หมู่คาร์บอกซิลิคของกรดไขมัน



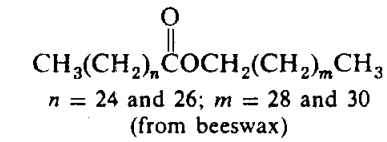
ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นที่พันธะคู่ของกรดไขมัน



ปฏิกริยาที่เกิดกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเลอิค

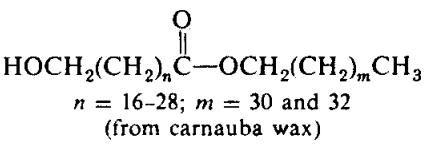
นอกจากนั้นอาจจะเกิด autooxidation ที่พันธะคู่ได้ถ้ามีแสงหรือรังสีหรือโลหะบางชนิดปะปนอยู่ในลิปิดนั้น ซึ่งจะเป็นต้นเหตุให้เกิด free radicals และการออกซิเดชั่นตามมามีผลทำให้ลิปิดนั้นมีกลิ่นเหม็นหืน (rancid) การเปลี่ยนแปลงอย่างนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารเรียกว่า oxidative rancidity ป้องกันได้โดยการเติม antioxidants ลงในผลิตภัณฑ์อาหารพวกลิปิด เพื่อเป็นตัวหยุดยั้งการทำงานของ free radicals การเหม็นหืนอาจมีสาเหตุจาก hydrolytic rancidity ก็ได้ ถ้าหากว่าไตรแอซิลกลีเซอรอลถูกไฮโดรไลซ์ได้กรดไขมันสายสั้น ๆ ที่ระเหยและส่งกลิ่นออกมา

3. **ขี้ผึ้ง** (waxes) เป็นเอสเทอร์ระหว่าง aliphatic alcohol หรือ sterol กับกรดไขมันสายยาว ที่อิ่มตัว ไม่ละลายน้ำ ไม่มีพันธะคู่ ทำให้ลิปิดประเภทนี้มีความเฉื่อย เป็นเอสเทอร์ที่ต่างไปจากพวกแอซิลกลีเซอรอล เพราะมีพันธะเอสเทอร์เพียงหนึ่งพันธะเท่านั้น เมื่อขี้ผึ้งได้รับความเย็นจะแข็งแต่เปราะ ถ้าได้รับความร้อนพออุ่น ๆ จะนุ่ม ปั้นหรือโค้งให้บิดงอได้



$CH_3(CH_2)_nCOCH_2(CH_2)_mCH_3$

n = 24 and 26; m = 28 and 30
(from beeswax)



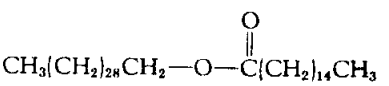
$HOCH_2(CH_2)_nC{-}OCH_2(CH_2)_mCH_3$

n = 16–28; m = 30 and 32
(from carnauba wax)

โครงสร้างทั่วไปของขี้ผึ้งบางชนิด

$CH_3(CH_2)_{14}COCH_2(CH_2)_{14}CH_3$

Cetyl palmitate
(from spermaceti)



$CH_3(CH_2)_{28}CH_2{-}O{-}C(CH_2)_{14}CH_3$

myricyl palmitate
(primary component of beeswax)

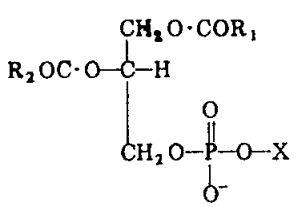
โครงสร้างขี้ผึ้งซึ่งเป็นไขปลาวาฬชนิดหนึ่ง โครงสร้างขี้ผึ้งจากตัวผึ้ง

นอกจากนั้นก็ยังมีขี้ผึ้ง lanolin, turtle wax ขี้ผึ้งนี้จะเป็นตัวกันน้ำ (waterproof coating) ให้กับผิวหนัง ขนสัตว์ ขนนก โครงร่างภายนอกของพวกแมลง ใบไม้หรือผลไม้ ถ้าเราสังเกตเปลือกนอกของผลแอปเปิล จะรู้สึกเป็นมันเงาซึ่งเป็นตัวอย่างของขี้ผึ้งที่พบในพวกผลไม้

ลิปิดเชิงประกอบ

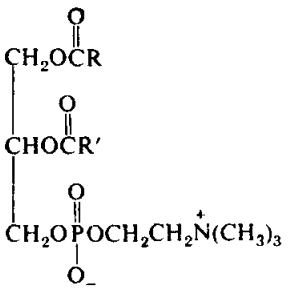
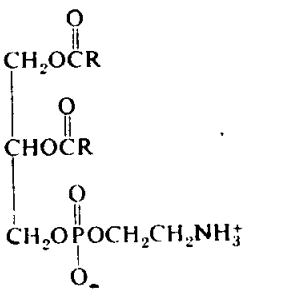
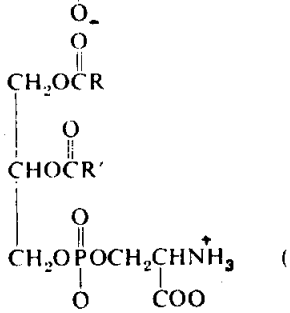
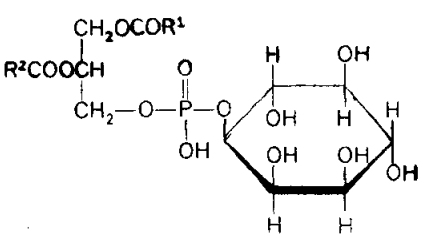
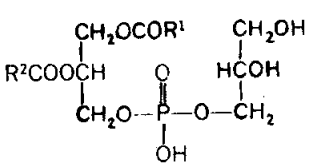
ลิปิดนี้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ถ้านำมาย่อยสลายมักจะได้สารอื่นนอกเหนือไปจากอัลกอฮอลล์และกรดไขมัน

1. **ฟอสโฟลิปิด** (phospholipids) เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลกับกรดไขมันและมีกรดฟอสโฟริคซึ่งเชื่อมอยู่กับอัลกอฮอลล์ (X) ด้วยพันธะเอสเทอร์เช่นกันอีกด้วย มีสูตรโครงสร้างดังนี้

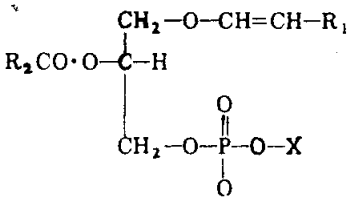


L-Phospholipid

ตารางที่ 2.4 ฟอสโฟลิปิดที่พบในธรรมชาติ

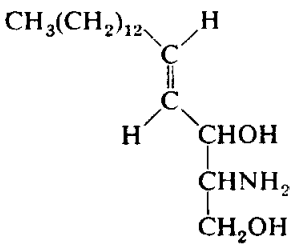
ชื่อแบบ Recommended	ชื่อแบบ Trivial	โครงสร้าง
Phosphatidyl choline	Lecithin	 (from choline) R is saturated and R is unsaturated
Phosphatidyl ethanolamine	cephalin	 (from ethanolamine)
Phosphatidyl serine	—	 (from L-serine) R and R′ are like those of lecithins
Phosphatidyl inositol	—	
Phosphatidyl glycerol	—	

2. **พลาสมาโลเจน (plasmalogens)** สูตรโครงสร้างคล้ายฟอสโฟลิปิดมาก ยกเว้นกรดไขมันตรงตำแหน่งที่ 1 เชื่อมต่อกับกลีเซอรอลด้วยพันธะไวนิลอีเธอร์ (vinyl ether bond) ไม่ใช่พันธะเอสเทอร์



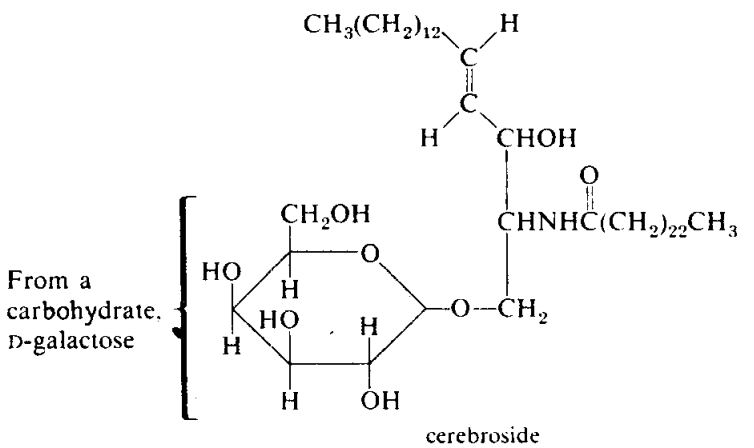
plasmalogens

3. **สฟิงโกลิปิด (sphingolipids)** ประกอบด้วย amino alcohol sphingosine (sphingenine) แทนที่จะเป็นกลีเซอรอล



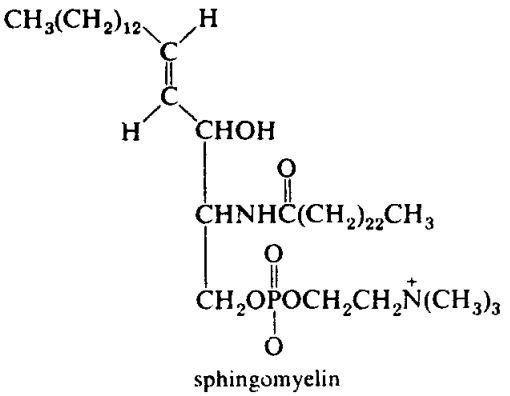
sphingosine

สฟิงโกลิปิดเป็นโครงสร้างที่ถาวรมั่นคงและถูกเผาผลาญได้ช้ากว่าพวกฟอสโฟลิปิด ตัวอย่างของลิปิดประเภทนี้ได้แก่ cerebrosides, sphingomyelins และ psychosine เป็นต้น



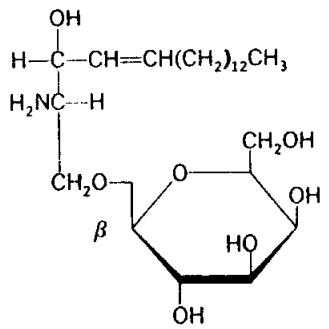
cerebroside

cerebrosides = ceramide + น้ำตาลกาแลคโตสหรือกลูโคส



sphingomyelin

sphingomyelins = ceramide + phosphorylcholine
หรือ phosphoryl-ethanolamine



Psychosine

Psychosine คือ
cerebroside ที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยด่างเอากรดไขมันออกไป

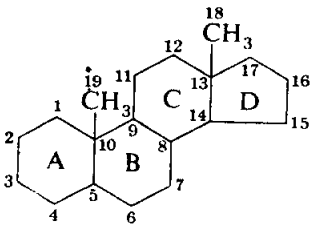
สำหรับ cerebrosides และ psychosine นั้นบางครั้งเรียกว่า ไกลโคสฟิงโกลิปิด (glycosphingolipid) เนื่องจากประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรทกับสฟิงโกลิปิด ไกลโคสฟิงโกลิปิดที่ยุ่งยากและซับซ้อนขึ้นไปอีกคือ gangliosides โครงสร้างประกอบด้วย sphingosine และสายของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี N-acetylneuraminic acid (NANA) อยู่ด้วย

สฟิงโกลิปิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งของ myelin นอกเหนือไปจากโปรตีนและคาร์โบไฮเดรท myelin นี้ทำหน้าที่เป็นฉนวนหุ้มกันแส้นใยประสาท axon ของเซลล์ประสาท ซึ่งมี electrical nerve impulses อยู่เรื่อย ๆ myelin จึงทำหน้าที่เสมือนฉนวนหุ้มสายไฟนั่นเอง

ลิปิดอนุพันธ์

ลิปิดประเภทนี้เป็นอัลกอฮอลล์ไม่ใช่เอสเทอร์ดังนั้นไม่สามารถจะเกิดปฏิกริยา saponification ได้ ได้แก่พวก สเตียรอยด์ (steroids) วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน (fat soluble vitamins) ถูกจัดไว้ในสารประเภทลิปิดเพราะว่าคุณสมบัติในการละลายคล้ายคลึงกับพวกลิปิดมาก

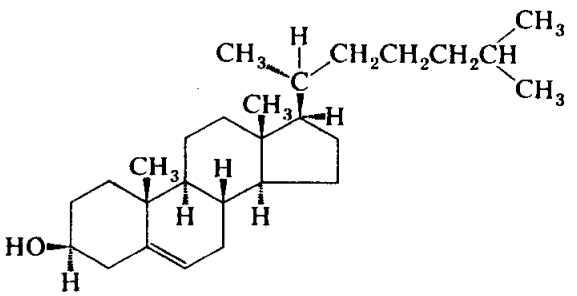
สเตียรอยด์ทุกตัวจะมี perhydrocyclopentanophenanthrene (C_{17}) **เป็นโครงสร้างพื้นฐาน**



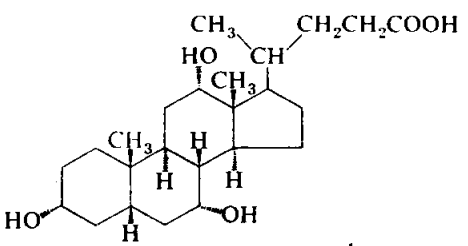
Perhydrocyclopentanophenanthrene ring

หมู่ที่มาแทนที่ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ถ้าอยู่บนระนาบของวงให้ใช้สัญญลักษณ์ β **และแทนด้วยเส้นทึบ ถ้าอยู่ล่างระนาบของวงให้ใช้สัญญลักษณ์** α **และแทนด้วยเส้นประ**

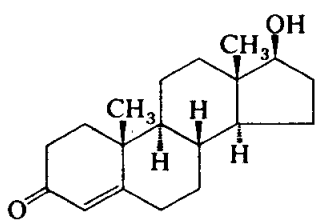
Cholesterol **เป็นสเตียรอยด์ที่พบมากที่สุดและเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สเตียรอยด์อื่น ๆ อีกมากมายเช่น น้ำดี** (bile acids) **ฮอร์โมน** aldosterone, **ฮอร์โมนเพศชาย** testosterone **และฮอร์โมนเพศหญิง** progesterone **เป็นต้น**



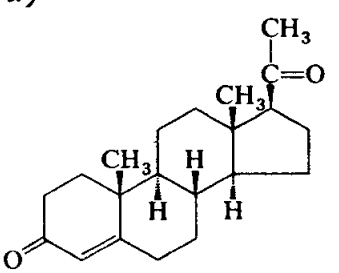
Absolute configuration of cholesterol
(5-cholesten-3β-ol)



Cholic acid (bile acid)

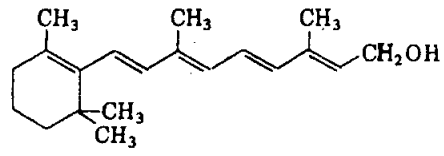
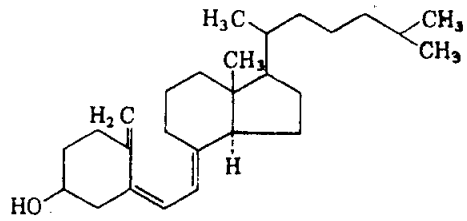
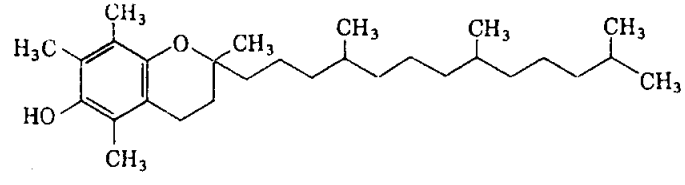
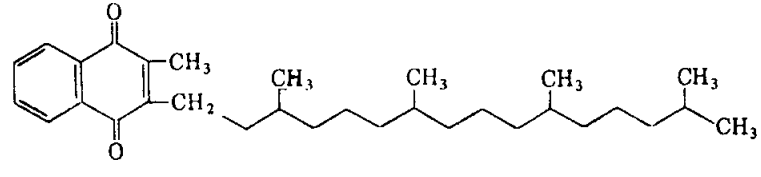


Testosterone
(17β-hydroxy-4-androsten-3-one)



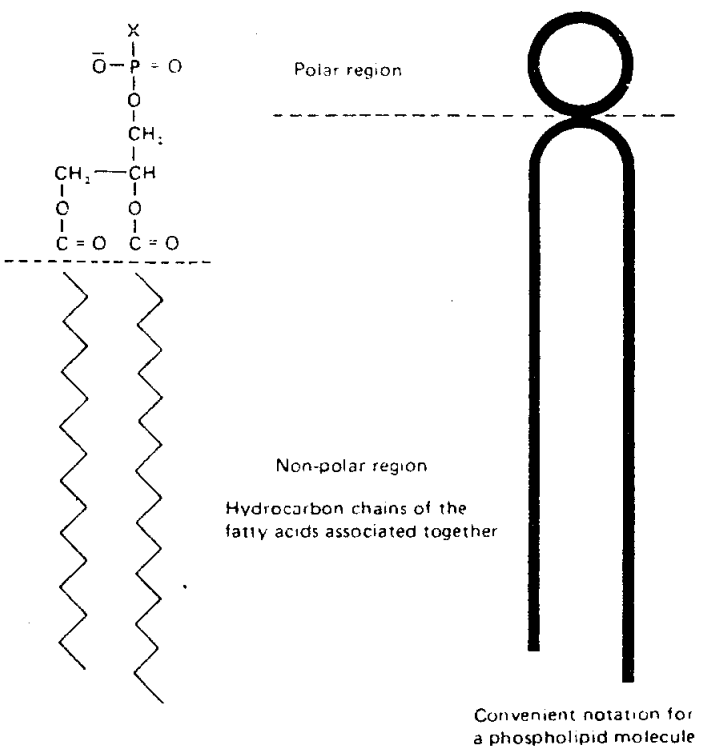
Progesterone
(4-pregnene-3.20-dione)

ตารางที่ 2.5 วิตามินที่ละลายได้ในไขมัน

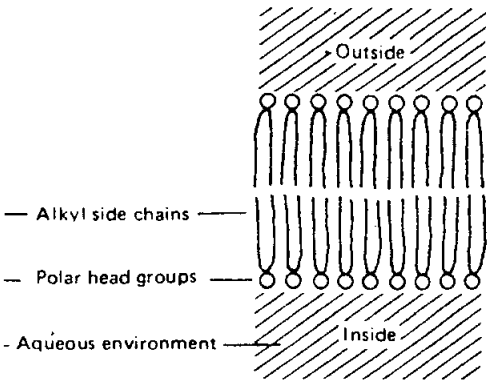
วิตามิน	แหล่งที่มา	หน้าที่
วิตามิน A (retinol) 	ผัก, ตับปลา ผลิตภัณฑ์นมเนย	ถ้าขาดวิตามิน A จะทำให้มองไม่เห็นในที่มืด ไม่สามารถปรับสายตาให้ชินต่อความมืด (night blindness) นอกจากนั้นวิตามิน A ยังจำเป็นต่อการสร้างกระดูกและฟัน
วิตามิน D_3 (cholecalciferol) 	ตับปลา ผลิตภัณฑ์นมเนย	จำเป็นต่อการดูดธาตุ Ca^{+2} ในทางเดินอาหาร และสำคัญต่อการสร้างกระดูก ถ้าขาดวิตามินนี้จะทำให้เด็กเป็นโรคกระดูกอ่อน (ricketts)
วิตามิน E (α-Tocopherol) 	ธัญพืชและพวกพืชสีเขียว	สัตว์ต้องการวิตามินนี้มากกว่าคน ทำหน้าที่เป็น antioxidant เพื่อป้องกันมิให้ส่วนสำคัญต่าง ๆ ของเซลล์ถูกออกซิไดซ์
วิตามิน K_1 (phylloquinone) 	ผักสีเขียว	จำเป็นต่อการแข็งตัวของเลือด ถ้าขาดวิตามินนี้จะทำให้เลือดแข็งตัวช้า

เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane)

เราสามารถศึกษาโครงสร้างและส่วนละเอียดต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วย ลิปิด 40% โปรตีน 60% คาร์โบไฮเดรทและไอออนต่าง ๆ อีกบ้างเล็กน้อย ลิปิดส่วนใหญ่เป็นพวกฟอสโฟลิปิดซึ่งมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จัดเป็นโมเลกุล amphipathic คือมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำภายในโมเลกุลเดียวกัน ส่วนที่ชอบน้ำก็จะอยู่ใกล้น้ำ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะพยายามหนีน้ำโดยการเข้าไปใกล้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของฟอสโฟลิปิดอีกโมเลกุลหนึ่ง ทำให้เกิดเป็นลิปิดสองชั้น (lipid bilayer) ขึ้นมา โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดยังเป็น zwitterion อีกด้วย กล่าวคือ มีทั้งประจุบวกและประจุลบภายในโมเลกุลนั้น ๆ ประจุบวกเนื่องมาจากหมู่เบส เช่น โคลีน (choline) เป็นต้น ส่วนประจุลบเนื่องมาจากหมู่ฟอสเฟต

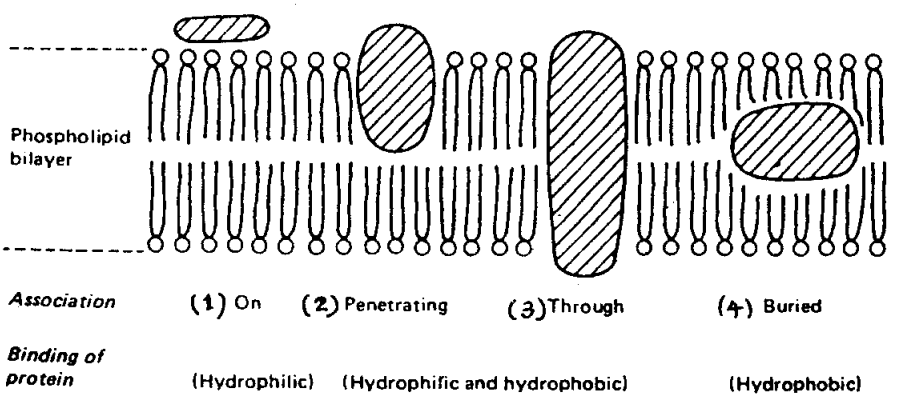


รูปที่ 2.1 โมเลกุล amphipathic ของฟอสโฟลิปิด



รูปที่ 2.2 ลักษณะการเกิดลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์

สมมุติฐานล่าสุดเกี่ยวกับเยื่อหุ้มเซลล์คือ สมมุติฐาน fluid mosaic ของ Singer และ Nicolson (1972) ได้อธิบายเกี่ยวกับคุณสมบัติกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ว่าจะต้องประกอบด้วยลิปิดสองชั้น มีโมเลกุลโปรตีนเกาะยึดในแบบต่าง ๆ ได้ทั้งหมด 4 แบบด้วยกัน



รูปที่ 2.3 การเกาะยึดแบบต่าง ๆ ของโปรตีนกับฟอสโฟลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์

โปรตีนน้อยชนิดที่มีการรวมตัวกับฟอสโฟลิปิดตามแบบที่ 1 ซึ่งการรวมแบบนี้อาศัยแรงไฟฟ้าสถิตย์ สามารถแยกโปรตีนออกโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง ๆ โปรตีนที่เหลือส่วนใหญ่จะรวมตัวตามแบบที่ 2, 3 และแบบที่ 4 ซึ่งเป็นการรวมตัวที่แข็งแรง จะแยกโปรตีนเหล่านี้ออกได้ก็ต่อเมื่อใช้ดีเทอร์เจนต์ (detergents) หรือตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) ทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ให้เสียไป

การทดลอง

การทดลองที่ 2.1 การตรวจสอบคุณสมบัติในการละลายของลิปิดบางชนิด

หลักการ ลิปิดละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์

สารเคมี คลอโรฟอร์ม เอธานอล เบนซีน คาร์บอนเตทตระคลอไรด์
น้ำมันมะกอก น้ำมันหมู เลซิธิน (lecithin)
0.05 M NaOH
0.05 M HCl

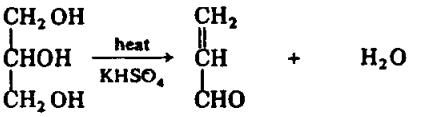
ชนิดของลิปิด / ชนิดตัวทำละลาย	น้ำมันมะกอก	น้ำมันหมู	เลซิธิน
1. น้ำ			
2. คลอโรฟอร์ม			
3. เอธานอล			
4. เบนซีน			
5. คาร์บอนเตทตระคลอไรด์			
6. 0.05 M NaOH			
7. 0.05 M HCl			

วิธีการ น้ำมันมะกอกและน้ำมันหมูให้ใช้อย่างละ 2 หยด ส่วนเลซิธินซึ่งเป็นของเหลวข้นหนืดและเหนียวมากให้แตะปลายแท่งแก้วมาทดสอบเพียงเล็กน้อย หยดตัวทำละลายแต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอดของลิปิด หลอดละ 2 มล. การรายงานผลการละลายในตารางให้ใช้เครื่องหมายดังต่อไปนี้

+3	ละลายได้ดีมาก
+2	ละลายได้ปานกลาง
+1	ละลายได้บ้าง
0	ไม่ละลายเลย

การทดลองที่ 2.2 การตรวจสอบกลีเซอรอล (Acrolein Test)

หลักการ กลีเซอรอลหรือเอสเทอร์ของกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นกับกรดไขมัน ถ้านำไปทำปฏิกริยากับ anhydrous potassium bisulfate ($KHSO_4$) จะถูกดึงน้ำออกจากโมเลกุลได้ก๊าซ acrolein เป็นอัลดีไฮด์ที่ไม่อิ่มตัวและมีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว



Glycerol Acrolein

สารเคมี กลีเซอรอล

$KHSO_4$

ตะเกียงบุนเส็น

วิธีการ ใส่สาร $KHSO_4$ ประมาณ 1.5 กรัมลงในหลอดทดลองชนิดทนไฟ เติมกลีเซอรอลลงไป 1-2 หยดนำไปเผาไฟโดยใช้ตะเกียงบุนเส็นธนที่ก้นหลอดทดลอง ตอนแรกให้ใช้ไฟอ่อนก่อนเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ตอนหลังค่อย ๆ เพิ่มไฟให้รุนแรงขึ้น ดอยดมกลิ่นก๊าซ acrolein ที่เกิดขึ้นอย่างระมัดระวังด้วย ใช้มือโบกพัดให้ก๊าซเข้าจมูกเพียงเล็กน้อย อย่านำหลอดทดลองไปจ่อที่จมูกเด็ดขาด

การทดลองที่ 2.3 การตรวจสอบความไม่อิ่มตัว (Test for degree of unsaturation)

หลักการ การทดสอบนี้อาศัยปฏิกริยา halogenation ระหว่างฮาโลเจนกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยที่โบรมีนหรือไอโอดีนจะเข้าไปทำปฏิกริยาที่พันธะคู่ของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวนั้น ปฏิกริยานี้อาจเรียกว่าเป็นการฟอกสีโบรมีนหรือไอโอดีน เพราะตราบใดที่ยังมีความไม่อิ่มตัวเหลืออยู่ สีโบรมีนหรือไอโอดีนที่ใส่ลงไปจะหายไปทันที เมื่อทำปฏิกริยากับพันธะคู่จนหมดแล้วจึงจะปรากฏสีของโบรมีนหรือไอโอดีนที่มากเกินพอให้เห็น เปรียบเทียบปริมาณฮาโลเจนที่ใช้สำหรับลิปิดแต่ละชนิด ลิปิดใดที่ต้องใช้ปริมาณฮาโลเจนมากแสดงว่ามีความไม่อิ่มตัวมาก ลิปิดใดที่ใช้ปริมาณฮาโลเจนน้อยก็แสดงว่ามีความไม่อิ่มตัวน้อย

สารเคมี น้ำมันมะกอก น้ำมันหมู เลซิธิน

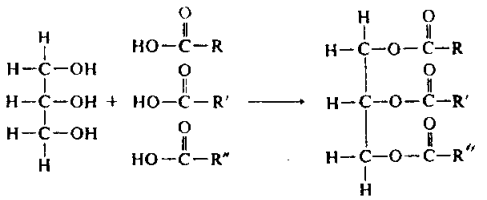
คลอโรฟอร์ม

โบรมีนในคลอโรฟอร์ม

วิธีการ ละลายลิปิดแต่ละชนิด (น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก อย่างละ 2 หยด เลซิธินปริมาณเล็กน้อย) ด้วย 1 มล. คลอโรฟอร์มในหลอดทดลอง 3 หลอด ส่วนหลอดที่ 4 ไม่ต้องใส่ลิปิดมีแต่ 1 มล. คลอโรฟอร์มเพียงอย่างเดียว หยดสารละลายโบรมีนในคลอโรฟอร์มลงในหลอดที่ 4 หนึ่งหรือสองหยดเพื่อเป็นหลอดเปรียบเทียบ เนื่องจากหลอดที่ 4 ไม่มีลิปิดสีโบรมีนที่ใส่ลงไปจะไม่หายไป หยดสารละลายโบรมีนในคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองที่มีลิปิดอีก 3 หลอดจนกระทั่งสีเหมือนหลอดที่ 4 นับจำนวนหยดของสารละลายโบรมีนที่ใช้สำหรับแต่ละหลอด พิจารณาจากผลที่ได้ว่าลิปิด 3 ชนิด น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก เลซิธิน ชนิดใดมีความไม่อิ่มตัวมากกว่ากัน

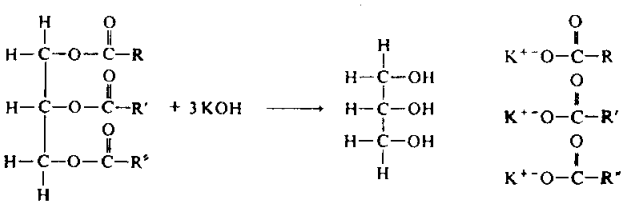
การทดลองที่ 2.4 การหาค่า saponification number

หลักการ ไตรแอซิลกลีเซอรอลถูกไฮโดรไลซ์ได้ทั้งในสภาวะเป็นกรดหรือเป็นด่างหรือโดยเอ็นไซม์ไลเปส (Lipases) การไฮโดรไลซ์ในด่างเรียกว่า saponification เพราะได้สบู่ (soap) ออกมาด้วย สบู่นี้ก็คือเกลือโซเดียมหรือเกลือโปแตสเซียมของกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนมาก ๆ นั่นเอง จากปฏิกริยาไฮโดรไลซีสในด่างสามารถหาค่า saponification number ได้ ค่า saponification number เป็นค่าเฉพาะตัวของไขมันหรือน้ำมันแต่ละชนิด เป็นตัวเลขที่บอกถึงจำนวนมิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เข้าทำปฏิกริยา saponification กับไขมันหรือน้ำมันหนัก 1 กรัม ไขมันหรือน้ำมันชนิดใดประกอบด้วยเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนมาก ๆ น้ำหนักโมเลกุลย่อมจะสูง จำนวนโมลของสารประกอบเอสเทอร์ในลิปิดนั้นต่อหน่วยน้ำหนักของลิปิดที่เท่ากันย่อมจะน้อย ดังนั้นมิลลิกรัมของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องการไปทำปฏิกริยากับเอสเทอร์ของกรดไขมันก็จะน้อยด้วย ทำให้ค่า saponification number ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับไขมันหรือน้ำมันที่มีโครงสร้างของกรดไขมันเป็นไฮโดรคาร์บอนสายสั้น ๆ จึงกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่า ไขมันหรือน้ำมันที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีค่า saponification number ต่ำ ไขมันหรือน้ำมันใดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำก็จะมีค่า saponification number สูง



กลีเซอรอล กรดไขมัน 3 ชนิด ไตรแอซิลกลีเซอรอล

ปฏิกริยา esterification ของกรดไขมัน



ไตรแอซิลกลีเซอรอล โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ กลีเซอรอล สบู่ (เกลือของกรดไขมัน)

ปฏิกริยา saponification ของไตรแอซิลกลีเซอรอล

ตารางที่ 2.6 ค่า saponification number และ iodine number ของไขมันและน้ำมันบางชนิด

	Saponification Number	*Iodine Number*
Fats		
Butter	210-230	26-28
Lard	195-203	46-70
Tallow	190-200	30-48
Edible Oils		
Olive oil	187-196	79-90
Corn oil	187-196	109-133
Soybean oil	189-195	127-138
Cottonseed oil	190-198	105-114
Peanut oil	188-195	84-102
Safflower oil	188-194	140-156
Nonedible Oils		
Linseed oil	187-195	170-185
Tung oil	190-197	163-171

สารเคมี สารละลายไขมัน 40% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในเบนซีน
เศษกระเบื้อง
*Ethanolic-KOH (ความเข้มข้นโดยประมาณ 0.5 M)
บิวเรตต์
สารละลายมาตรฐาน HCl ความเข้มข้น 0.5 M
สารละลายฟีนอลฟธาลีน
เครื่องมือที่จะทำการ reflux พร้อมทั้งกรีส (grease) สำหรับทา

วิธีการ ปิเปตต์สารละลายไขมัน 40% ในเบนซีนมา 5 มล. ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมขนาด 50 มล. ปิเปตต์สารละลาย ethanolic-KOH ความเข้มข้นโดยประมาณ 0.5 M เติมลงไป 25 มล. ใส่เศษกระเบื้อง 5-6 ชิ้นเพื่อกันการเดือดอย่างรุนแรง นำไป reflux ประมาณ 45 นาที ทำการทดลองเปรียบเทียบด้วยโดยใช้เบนซีน 5 มล. แทนสารละลายไขมัน 40% ในเบนซีน ใส่ลงในขวดแก้วก้นกลมขนาด 50 มล. ตามด้วยสารละลาย ethanolic-KOH 25 มล., เศษกระเบื้องและนำไป reflux 45 นาทีเช่นกัน เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นหรือแช่ในอ่างน้ำเย็น เทสารละลายที่ reflux เรียบร้อยแล้วนี้ลงในขวดแก้วทรงกรวย (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มล. ชะล้างขวดแก้วก้นกลมด้วยน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยเพื่อมิให้สารหลงเหลือติดค้างอยู่ในขวดแก้วก้นกลม น้ำชะล้างนี้นำไปเทรวมกันลงในขวดแก้วทรงกรวย หยดสารละลายฟีนอลฟธาลีนลงไป 1-2 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) แล้วไตเตรทแบบที่เรียกว่า back-titration กับสารละลายมาตรฐาน HCl เพื่อหาปริมาณ KOH

ที่ยังคงเหลืออยู่ ดูการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีชมพูเป็นไม่มีสี จดบันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน HCl ที่ใช้ในการไตเตรททั้งของขวดตัวอย่างและขวดเปรียบเทียบเพื่อคำนวณหาค่า saponification number ต่อไป

การคำนวณ : กำหนดให้

สารละลายมาตรฐาน HCl มีความเข้มข้น = C **Molar**

ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน HCl ที่ใช้ในการไตเตรทขวดตัวอย่าง = A มล.

ปริมาตรสารละลายมาตรฐานHCl ที่ใช้ในการไตเตรทขวดเปรียบเทียบ = B มล.

น้ำหนักโมเลกุล KOH = 56

∴ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน HCl **ที่พอดีกับ** สารละลาย KOH ที่ไปทำปฏิกริยากับลิปิด = B − A มล.

จำนวนมิลลิโมลของ KOH ที่ทำปฏิกริยากับลิปิด = C(B − A) มิลลิโมล

จำนวนมิลลิกรัมของ KOH ที่ทำปฏิกริยากับลิปิด = 56C(B − A) มิลลิกรัม

5 มล. ของสารละลายลิปิด 40% ที่ใช้ในการทดลอง = $\frac{40}{100} \times 5$ กรัม

∴ลิปิดที่ใช้ในการทดลอง = 2 กรัม

ดังนั้นค่า saponification number = $\frac{56C(B-A)}{2}$

นอกจากนี้แล้วยังสามารถคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของกรดไขมันได้อีกด้วย จากปฏิกริยา saponification จะพบว่าหนึ่งโมลของ KOH ทำปฏิกริยากับหนึ่งส่วนสามโมลของไตรแอซิลกลีเซอรอลของลิปิดนั้น ๆ

1 โมล KOH $\equiv \frac{1}{3}$ โมลลิปิด

$\frac{1}{3}$ โมลลิปิด = 1 โมลกรดไขมัน + $\frac{1}{3}$ โมลกลีเซอรอล* − 1 โมลน้ำ

= 1 โมลกรดไขมัน + $\frac{1}{3}$ (92)* − 18

= 1 โมลกรดไขมัน + 30.67 − 18

= 1 โมลกรดไขมัน + 12.7

∴ 1 โมล KOH = 1 โมลกรดไขมัน + 12.7

1 โมลกรดไขมัน = 1 โมล KOH − 12.7

*(น้ำหนักโมเลกุลกลีเซอรอล 92, น้ำหนักโมเลกุลน้ำ 18)

จากข้างบนที่ว่า KOH จำนวน $C(B-A)$ มิลลิโมล $\equiv$ 2 กรัมของลิปิด

ถ้า KOH จำนวน 1 โมล $\equiv \frac{2}{C(B-A)} \times 10^3$ กรัมของลิปิด

นำไปแทนค่า

$\therefore$ 1 โมลกรดไขมันมีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ย $= \left[\frac{2}{C(B-A)} \times 10^3 \right] - 12.7$

การทดลองที่ 2.5 การหา iodine number ของลิปิด

หลักการ อาศัยปฏิกริยา halogenation เช่นเดียวกับการทดสอบความไม่อิ่มตัวของลิปิด การทดลองนี้ละเอียดและถูกต้องยิ่งกว่า เพราะสามารถหาค่า iodine number ได้ ค่านี้เป็นค่าคงที่และเฉพาะตัวสำหรับลิปิดแต่ละชนิดเช่นเดียวกันกับค่า saponification number ค่า **iodine number** บอกถึงจำนวนกรัมของไอโอดีนที่ถูกดูดไว้ด้วยลิปิด 100 กรัม ซึ่งค่านี้ขึ้นอยู่กับอีกหลายแฟคเตอร์เช่น ขึ้นอยู่กับว่าโมเลกุลไตรแอซิลกลีเซอรอลของลิปิดนั้น ๆ มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่ร้อยละเท่าใด ขึ้นอยู่กับความไม่อิ่มตัวของโมเลกุลกรดไขมันและน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของลิปิด iodine number ของกรดไขมันอิ่มตัวมีค่าเท่ากับศูนย์ กรดไขมันใดมีความไม่อิ่มตัวสูงก็จะมีค่า iodine number สูงด้วยเช่น ตัวอย่างเช่น

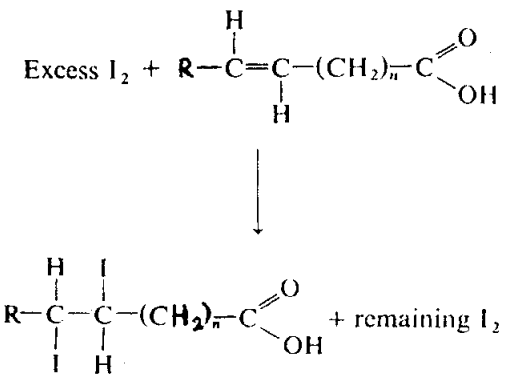
กรด Oleic มีค่า iodine number 90

กรด Linoleic มีค่า iodine number 181

กรด Linolenic มีค่า iodine number 274

ปฏิกริยาที่เกิดขึ้น

Halogenation:



แล้วทำการไตเตรท I_2 ที่เหลือกับสารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์

สารเคมี ขวดที่มีจุกปิดแน่น

*สารละลาย Hanus iodine

*สารละลาย KI 15%

*สารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ ความเข้มข้น 0.1 M

น้ำแป้ง 1%

วิธีการ ใช้วิธีของ Hanus ขวดแก้วทรงกรวยที่ใช้ในการทดลองนี้ควรจะชะล้างเสียก่อนด้วยเอธานอลหรือคลอโรฟอร์มเพื่อให้แน่ใจว่าปราศจากน้ำและความชื้น

ปิเปตต์ลิปิดใส่ลงในขวดแก้วทรงกรวยที่มีฝาครอบหรือมีจุกปิด ประมาณให้น้ำหนักของลิปิดอยู่ในช่วง 0.1-0.3 กรัม เติมคลอโรฟอร์มที่ปราศจากน้ำลงไป 10 มล. จากนั้นปิเปตต์สารละลาย Hanus ใส่ลงไปอีก 30 มล. ปิดจุก เขย่าให้เข้ากัน วางตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 45 นาที ขวดทรงกรวยที่เป็นขวดเปรียบเทียบให้ทำเช่นเดียวกันนี้แต่ไม่ต้องใส่ลิปิด

เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว เติมสารละลาย 15% KI ลงในขวดทั้งสอง ขวดละ 10 มล. เขย่าเพื่อให้ไอโอดีนที่มากเกินพอและยังเหลืออยู่ในชั้นคลอโรฟอร์มนั้นออกมาอยู่ในชั้นของสารละลาย KI เติมน้ำกลั่น 75 มล. ลงในขวดเหล่านั้น พยายามชะล้างไอโอดีนที่อาจติดอยู่ตามข้างขวดหรือที่ฝาครอบออกให้หมด นำไปไตเตรทกับ 0.1 M $Na_2S_2O_3$ จนกระทั่งได้สีเหลืองจางซึ่งแสดงว่าไอโอดีนส่วนใหญ่เข้าทำปฏิกริยากับ $Na_2S_2O_3$ แล้ว เหลือไอโอดีนอีกเป็นส่วนน้อยและใกล้จะถึง end point ให้เติมน้ำแป้งลงไป 1 มล. สารละลายในขวดจะเป็นสีน้ำเงิน ทำการไตเตรทต่อไปจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป จดบันทึกปริมาตรของสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้สำหรับขวดตัวอย่างและขวดเปรียบเทียบ เพื่อนำไปคำนวณหาค่า iodine number ต่อไป

การคำนวณหาค่า iodine number

กำหนดให้ : สารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ มีความเข้มข้น = 0.1 M

ปริมาตรของ 0.1 M $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไตเตรทขวดตัวอย่าง = A มล.

ปริมาตรของ 0.1 M $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ในการไตเตรทขวดเปรียบเทียบ = B มล.

$\therefore$ ปริมาตรของ 0.1 M $Na_2S_2O_3$ที่พอดีกับไอโอดีนที่เข้าทำปฏิกริยา = B – A มล.

จากสมการ, 2 โมล $Na_2S_2O_3$ ทำปฏิกริยาพอดีกับ 1 โมล I_2

1 โมล $Na_2S_2O_3$ ทำปฏิกริยาพอดีกับ $\frac{1}{2}$ โมล I_2

$\frac{(B-A)\,0.1}{10^3}$ โมล $Na_2S_2O_3$ ทำปฏิกริยาพอดีกับ $\frac{1}{2} \times \frac{(B-A)\,0.1}{10^3}$ โมล I_2

น้ำหนักโมเลกุลของ I_2 = 254

∴ จำนวนกรัมของ I_2 ที่เข้าทำปฏิกริยากับลิปิด = $\frac{1}{2} \times \frac{(B-A)\,0.1}{10^3} \times 254$

ดังนั้นค่า iodine number = $\frac{1}{2} \times \frac{(B-A)\,0.1}{10^3} \times 254 \times \frac{100}{y}$

= $\frac{1.27\,(B-A)}{y}$

เมื่อ y คือน้ำหนักเป็นกรัมของลิปิด

การทดลองที่ 2.6 การหาค่าความเป็นกรด (acid value) ในไขมัน

หลักการ ไขมันที่เก็บไว้นาน ๆ อาจเหม็นหืนได้ เนื่องจากออกซิเจนในอากาศทำให้เกิดสารพวกเปอร์ออกไซด์ขึ้นตรงบริเวณพันธะคู่และเมื่อถูกย่อยสลายโดยเชื้อจุลินทรีย์จะให้ผลิตผลเป็นกรดไขมันอิสระ ปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นมีมากน้อยเพียงใดจะเป็นเครื่องชี้บ่งถึงคุณภาพและอายุของพวกไขมันได้

ค่าความเป็นกรด เป็นตัวเลขที่บอกถึงมิลลิกรัมของ KOH ที่จะทำให้กรดไขมันอิสระในไขมัน 1 กรัมเป็นกลาง (neutral)

สารเคมี น้ำมันมะกอก เนย มาการีน (ทั้งที่เป็นของใหม่และที่ปล่อยตั้งทิ้งไว้ในอากาศหลาย ๆ วัน)

ตัวทำละลายไขมัน 95% อัลกอฮอลล์ผสมกับอีเธอร์ที่เป็นกลางต่อฟีนอลฟธาลีนด้วยอัตราส่วน 1 : 1

ฟีนอลฟธาลีน 1% ในอัลกอฮอลล์

KOH 0.1 M เป็นสารละลายต่างมาตรฐาน

บิวเรตต์

วิธีการ ชั่งไขมันที่ต้องการตรวจสอบมา 10 กรัม ละลายในตัวทำละลายไขมัน 50 มล. เติมฟีนอลฟธาลีน 1 มล. เขย่าให้เข้ากันดี นำไปไตเตรทกับ 0.1 M KOH จนกระทั่งได้สีชมพูเรื่อ ๆ ที่ถาวรเกิดขึ้น จดบันทึกปริมาตรต่างที่ใช้ นำไปคำนวณหาค่าความเป็นกรดในไขมันแต่ละชนิด

การทดลองที่ 2.7 การหาปริมาณ cholesterol ในเลือด

หลักการ acetic anhydride จะทำปฏิกริยากับ cholesterol ใน $CHCl_3$ ได้สารสีแดงหรือม่วง แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและเขียวในที่สุด ปฏิกริยาการเกิดสีนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเกี่ยวข้องกับปฏิกริยา esterification ตรงหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 3 และยังมีการเปลี่ยนแปลงอย่างอื่นเกิดขึ้นในโมเลกุลอีกด้วย

ทำการสกัด cholesterol และลิปิดอื่นออกจากเลือดหรือซีรัมโดยใช้อัลกอฮอลล์ผสมกับอะซีโตนเป็นตัวสกัด ในขณะเดียวกันตัวสกัดนี้สามารถตกตะกอนโปรตีนลงมาด้วย ทำการระเหยตัวสกัดในอ่างน้ำเดือด residue ที่ได้ละลายใน $CHCl_3$ แล้วจึงไปตรวจสอบโดย Liebermann Burchard Test เครื่องแก้วที่ใช้ทุกชนิดต้องแห้งสะอาดและปราศจากน้ำ

สารเคมี เลือดหรือซีรัม

สารผสมอัลกอฮอลล์กับอะซีโตน อัตราส่วน 1 : 1

$CHCl_3$

สารผสม acetic anhydride – H_2SO_4 อัตราส่วน 30 : 1 เตรียมแล้วใช้ทันที เวลาเตรียมต้องระมัดระวังเป็นพิเศษด้วย

cholesterol ใน $CHCl_3$ (2 มก./มล.) เวลาจะใช้ให้เจือจางลงไป 5 เท่า ด้วย $CHCl_3$ ให้เป็น 0.4 มก./มล.

เครื่องหมุนเหวี่ยง

วิธีการ เตรียมสารผสมอัลกอฮอลล์-อะซีโตนไว้ในหลอดหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) 10 มล. ปิเปตต์เลือดหรือซีรัมลงไป 0.2 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือด เมื่อสารละลายในหลอดหมุนเหวี่ยงเดือด เขย่าต่ออีก 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเอาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้ในหลอดทดลอง นำไประเหยให้แห้ง ทำให้เย็น ละลาย residue ที่ได้ในหลอดทดลองนี้ด้วย $CHCl_3$ 2 มล. ส่วนหลอดเปรียบเทียบมีแต่ $CHCl_3$ อย่างเดียว 2 มล. เติมสารผสม acetic anhydride – H_2SO_4 ไปในหลอดทั้งสองหลอดละ 2 มล. เขย่าให้ผสมกันดี ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดการดูดแสงที่ 680 นาโนเมตร

ระดับปรกติของ cholesterol ในซีรัมอยู่ระหว่าง 100-250 มก./100 มล. ค่าเฉลี่ยของ cholesterol ในซีรัมสำหรับผู้ชายอายุ 25 ปี ประมาณ 200 มก./100 มล. และจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น ถึงจุดสูงสุดตอนอายุราว 40-50 ปี จากนั้นจึงค่อยลดลง โดยปรกติปริมาณ cholesterol ในผู้หญิงจะต่ำกว่าผู้ชายจนกระทั่งถึงระยะหมดประจำเดือน (menopause) ระดับ cholesterol จึงเพิ่มสูงขึ้นและอาจสูงกว่าระดับ cholesterol ของผู้ชายในวัยเดียวกัน

ถ้าปริมาณ cholesterol สูงถึง 300 มก./100 มล. หรือมากกว่าแสดงว่าเป็นโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (coronary disease) ถ้าสูงกว่าระดับปรกติถึง 25% มักจะเป็นโรคเกี่ยวกับไตอักเสบ (nephritis) ผิวหนังบวมน้ำและนิ่ม (myxoedema) และการสะสมลิปิดมากเกินไป (xanthomatosis)

การทดลองที่ 2.8 ผลขององค์ประกอบลิปิดต่อการซึมซาบของ lipid monolayer

หลักการ การทดลองที่จะทำต่อไปนี้เป็นการทดลองง่าย ๆ เพื่อดูว่าการส่งผ่านโมเลกุลแบบ simple diffusion ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ ในที่นี้ใช้ lipid monolayer แทน lipid bilayer โดยที่เราเท butanol ลงไปในปิดเกอร์ที่ใส่น้ำจะเห็นว่าแยกเป็นสองชั้น น้ำอยู่ล่าง butanol อยู่บน ถ้ามีลิปิดซึ่งเป็นโมเลกุลประเภท amphipathic อยู่ด้วยก็จะมีการเคลื่อนตัวของโมเลกุลมาที่บริเวณรอยต่อระหว่างสารสองชั้นนี้ ส่วนโพลาร์ของโมเลกุลก็จะอยู่ในชั้นน้ำข้างล่าง

ส่วน hydrophobic ของโมเลกุลก็จะอยู่ในชั้น butanol ข้างบน ในชั้นของ butanol นั้นมี methylene blue อยู่ด้วยทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงิน สะดวกในการติดตามผล

สารเคมี กรดไขมัน (stearic, oleic)

แอซิลกลีเซอรอล (triolein, tripalmitin)

ฟอสโฟลิปิด (lecithin)

สเตียรอล (cholesterol)

butanol

methylene blue ใน butanol (0.25 กรัม/ลิตร)

วิธีการ เตรียมหลอดทดลอง 7 หลอด แต่ละหลอดมีน้ำ 5 มล. ค่อย ๆ ปิเปตต์ 5 มล. ของ butanol ซึ่งมี methylene blue และลิปิด 200 มิลลิกรัม ลงไปข้าง ๆ หลอดแก้วเพื่อให้แยกกันเป็นสองชั้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลกับหลอดที่ไม่มีลิปิดใน butanol

การทดลองที่ 2.9 ผลของดีเทอร์เจนต์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง

หลักการ ดีเทอร์เจนต์เป็นสารที่สามารถ emulsify พวกลิปิด ดังนั้นจึงทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ในกรณีของเม็ดเลือดแดง ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายให้แตกออก ฮีโมโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนก็จะออกมาอยู่นอกเซลล์ เราสามารถติดตามผลของดีเทอร์เจนต์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ โดยการวัดการดูดแสงของฮีโมโกลบินที่อยู่นอกเซลล์เนื่องจากการทำลายนั้น

สารเคมี เลือดหนู

น้ำเกลือไอโซโทนิค (8.9 กรัม/ลิตร)

ดีเทอร์เจนต์ (10 กรัม/ลิตร)

ประเภทเป็นกลาง Triton X-100

ประเภทแคทไอออน Cetyltrimethylammonium bromide

ประเภทแอนไอออน Sodium dodecyl sulphate

หลอดหมุนเหวี่ยง

อ่านน้ำอุณหภูมิ 37°ซ

สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หรือ คัลเลอริมิเตอร์

วิธีการ นำเลือดจากหนูที่เพิ่งฆ่าใหม่ ๆ มา 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงซึ่งมีสารกันการแข็งตัวของเลือด trisodium citrate (ความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร) นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตกลงมา ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือไอโซโทนิค 2 ครั้ง แล้วละลายด้วยน้ำเกลือนี้ให้ปริมาตรเป็น 0.5 มล. เท่าเดิม ทำการเจือจางสารละลายเม็ดเลือดแดงจนกระทั่งได้ว่า ถ้านำสาร

ละลายเม็ดเลือดแดงมา 0.5 มล. เติม Triton X-100 ปริมาตร 4.5 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเอาส่วนใสออกมาวัดการดูดแสงที่ 540 นาโนเมตร จะได้ค่าประมาณ 0.8-0.9 นั่นหมายถึงการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงเป็น 100% การดูดแสงที่วัดได้ในแต่ละครั้งให้แปรค่าไปเป็นเปอร์เซ็นต์การแตกสลายของเม็ดเลือดแดง

ปิเปตต์สารละลายเม็ดเลือดแดงมาอีก 0.5 มล. ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มล. ซึ่งมีน้ำเกลืออยู่ 4.5 มล. เขย่าให้เข้ากันดี เติมสารที่จะตรวจสอบลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ 37°ซ 20 นาที นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแล้วแยกส่วนใสไปวัดการดูดแสงที่ 540 นาโนเมตร ในตอนแรกหาความเข้มข้นของดีเทอร์เจนต์แต่ละชนิดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสลายเสียก่อน จากนั้นจึงขยายช่วงของความเข้มข้นของดีเทอร์เจนต์แต่ละชนิดให้กว้างออกไป เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การแตกสลายของเม็ดเลือดแดงกับความเข้มข้นของดีเทอร์เจนต์

การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย ethanolic-KOH ความเข้มข้นโดยประมาณ 0.5 M :
   ชั่ง KOH มา 28.0 กรัม ละลายด้วย 90% EtOH ให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร (เวลาใช้สารนี้ ควรทากรีสตามคอขวดแก้วหรือจุกแก้วสำหรับปิดด้วยเพื่อกันการติดแน่นของเนื้อแก้วเนื่องจากสารละลายเป็นด่าง)
2. สารละลาย Hanus iodine :
   ละลายไอโอดีน 13.2 กรัม ในกรดอะเซติคเข้มข้น 1000 มล. นำไปอุ่นให้ร้อนเพื่อให้ไอโอดีนละลาย ทำให้เย็น แล้วเติมโบรมีนเหลวลงไป 3 มล. เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชาที่มีฝาปิดแน่น การเตรียมสารละลายนี้ต้องทำในตู้ดูดควันและควรระวังเกี่ยวกับไอระเหยของไอโอดีนให้มากเป็นพิเศษ
3. สารละลาย potassium iodide 15% :
   ละลาย KI 15 กรัมในน้ำ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชา
4. สารละลายมาตรฐาน $Na_2S_2O_3$ ความเข้มข้น 0.1 M :
   ชั่ง $Na_2S_2O_3\,5H_2O$ 24.8 กรัม นำไปละลายในน้ำต้มเดือดที่เย็นแล้วให้ปริมาตรเป็น 1000 มล. ในขวดปริมาตร ถ่ายสารละลายใส่ขวดสีชาไว้แล้วเก็บไว้ในที่มืด

คำถามท้ายบท

1. ให้บอกชื่อตัวทำละลายลิปิดที่ดีมาสัก 3 ชนิด

2. ถ้านำกรด Oleic ไปทำปฏิกริยากับ $KHSO_4$ จะได้ก๊าซ acrolein หรือไม่?

3. ค่า iodine number ของลิปิดมีความสัมพันธ์กับจุดหลอมเหลวหรือไม่? อย่างไร?

4. น้ำมันมะกอกหรือน้ำมันหมูมีความไม่อิ่มตัวมากกว่ากัน?

5. ให้คำจำกัดความของคำว่า saponification number, iodine number และค่าความเป็นกรด (acid value)

6. ถ้าลิปิดมีค่า iodine number เท่ากับศูนย์ หมายความว่าอย่างไร?

7. สารละลาย potassium iodide ที่ใส่ลงไปตอนทำการทดลองหาค่า iodine number นั้น เพื่อวัตถุประสงค์อะไร?

8. การเกิดกลิ่นเหม็นหืน (rancidity) ของลิปิดมีสาเหตุจากอะไรบ้าง?

9. ให้บอกชื่อกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acid) ต่อร่างกาย

10. น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันลินซีด ชนิดใดสามารถฟอกสีไอโอดีนได้ดีกว่ากัน?

11. อธิบายเหตุผลว่าทำไมค่า saponification number จึงแปรผกผันกับค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยของกรดไขมัน

12. ไขมันที่มีค่า saponification number สูงจำเป็นต้องมีค่า iodine number สูงด้วยหรือไม่?

13. จากตารางที่ 2.6 น้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันดอกคำฝอยจะฟอกสีไอโอดีนได้ดีกว่ากัน?

14. Liebermann-Burchard Test มีประโยชน์ทางการแพทย์อย่างไร?

15. ดีเทอร์เจนต์ประเภทใดที่สามารถแตกสลายเม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด?