

## บทที่ 2

### เทคนิคพื้นฐานของการทำปฏิบัติการทางชีวเคมี

ชีวเคมีเป็นการศึกษาทางด้านเคมีของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะองค์ประกอบที่เรียกว่าชีวโมเลกุล (biomolecule) หรือสารเคมีที่พบในสิ่งมีชีวิต เช่น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขมัน (lipid) โปรตีน (protein) และ กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) เป็นต้น เพื่อให้ทราบและเข้าใจถึงโครงสร้าง, คุณสมบัติ, การทำงานและการเปลี่ยนแปลงของชีวโมเลกุลดังกล่าว จึงควรที่จะต้องเข้าใจหลักการ วิธีการหรือเทคนิคต่างๆ รวมทั้งอุปกรณ์และหน่วยต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาชีวโมเลกุล ดังต่อไปนี้

#### ก. หน่วยทางชีวเคมี

นิยมใช้หน่วยตามระบบเมตริก (metric system) เช่น มิลลิกรัม, กรัม และ ลิควิวาเลนต์ หรือสมมูล (equivalent) โดยจะใช้ในสัดส่วนที่แตกต่างกันด้วยเลขยกกำลัง 3 เท่า ซึ่งได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงหน่วยพื้นฐานที่ใช้ทางชีวเคมี โดยมีสัดส่วนแตกต่างกัน ด้วยเลขยกกำลัง 3

หน่วยโมล	หน่วยลิตร
1 โมล (mole)	1 ลิตร (l.)
1 มิลลิโมล (m mole) = $10^{-3}$ โมล	1 มิลลิลิตร (ml.) = $10^{-3}$ ลิตร
1 ไมโครโมล (u mole) = $10^{-6}$ โมล	1 ไมโครลิตร (ul.) = $10^{-6}$ ลิตร
1 นาโนโมล (n mole) = $10^{-9}$ โมล	1 นาโนลิตร (nl.) = $10^{-9}$ ลิตร
1 พิโคโมล (p mole) = $10^{-12}$ โมล	
หน่วยกรัม	หน่วยอควิวาเลนต์หรือสมมูล
1 กรัม (g.)	1 ลิควิวาเลนต์หรือสมมูล (E)
1 มิลลิกรัม (mg.) = $10^{-3}$ กรัม	1 มิลลิอควิวาเลนต์ (mE) = $10^{-3}$ ลิควิวาเลนต์
1 ไมโครกรัม (ug.) = $10^{-6}$ กรัม	1 ไมโครอควิวาเลนต์ (uE) = $10^{-6}$ ลิควิวาเลนต์

คะแนนการสอบย่อยรวม	10 %
คะแนนความตั้งใจในการทำปฏิบัติการ	10 %
คะแนนรายงานรวม	40 %
คะแนนสอบปลายภาค	<u>40 %</u>
รวมทั้งหมด	<u>100 %</u>

นักศึกษาที่ได้คะแนนน้อยกว่า 55% จะพิจารณาว่าไม่ผ่านปฏิบัติการวิชา TN 312 (ปฏิบัติการ  
ชีวเคมีและ เทคโนโลยี)

หน่วยพื้นฐานแต่ละค่านี้ สามารถเขียนความสัมพันธ์ในเทอมของความเข้มข้น ได้ดังนี้

ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ (molar, M) = จำนวนโมล (mole) / ปริมาตรของสารละลาย (L.)

จำนวนโมล = มวลของสาร (g.) / มวลโมเลกุล

ความเข้มข้นในหน่วยนอร์แมล (normal, N) = จำนวนกรัมสมมูล (gE) / ปริมาตรของสารละลาย (L.)

จำนวนกรัมสมมูล (gE) = มวลของสาร (g.) / สมมูล (E)

สมมูลกรด = มวลโมเลกุลของกรด / สภาพเบส

สมมูลเบส = มวลโมเลกุลของเบส / สภาพกรด

สมมูลของเกลือ = มวลโมเลกุลของเกลือ / จำนวนประจุ + หรือ -

### ข. เทคนิคการผสมสาร

กรณีที่ต้องการผสมสารละลาย 2 ชนิดให้เข้ากัน สามารถทำได้ดังนี้

1. เทสารละลายกลับไป-มา ในหลอดทดลองหรือภาชนะทั้งสอง
2. เทสารละลายที่มีปริมาณมากลงในสารละลายที่มีปริมาณน้อย
3. สารละลายที่มีปริมาณน้อยให้ผสมกันแล้วใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน

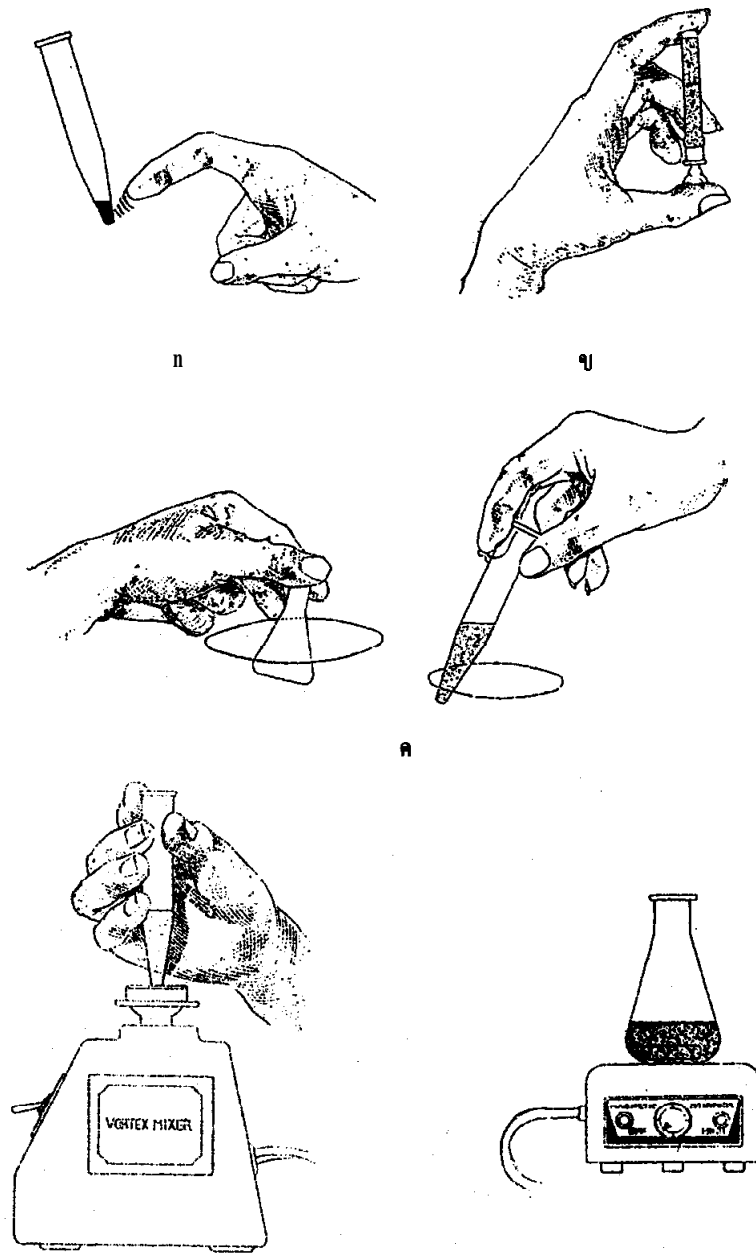
กรณีที่ต้องการละลายสารที่เป็นของแข็งในตัวทำละลายหรือสารละลาย สามารถกระทำ  
ได้ดังนี้

1. สารที่มีปริมาณน้อยมักบรรจุในหลอดทดลอง จากนั้นจึงใช้นิ้วคีบที่ปลายหลอดทดลองเบาๆ เรียกว่า "tapping" หรือใช้ pasteur pipette คูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง
2. สารที่บรรจุใน Erlenmeyer flask หรือ beaker มักใช้วิธีหมุนให้เป็นวง เรียกว่า "rotation"
3. การผสมโดยคว่ำและหงายหลอดทดลองหรือภาชนะอื่นกลับไปกลับมา โดยใช้จุก หรือแผ่น parafilm ปิดปากหลอดทดลองหรือภาชนะดังกล่าว เรียกว่า "inversion"
4. ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันในหลอดทดลองหรือภาชนะที่บรรจุ
5. ใช้เครื่องไฟฟ้าในการผสม ที่นิยมใช้มี 2 แบบ คือ

5.1 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) เป็นเครื่องที่ใช้ผสมสารละลายในหลอดทดลอง โดยวางหลอดทดลองที่มีสารละลายบนส่วนเครื่อง เมื่อเปิดสวิตช์ ส่วนหัวของเครื่องจะเขย่าเป็นวง ทำให้สารละลายในหลอดหมุนเป็นวงและผสมกันมากที่สุด

5.2 เครื่องกวนสารแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer) เป็นเครื่องที่ใช้ผสมสารละลาย โดยใช้แท่งแม่เหล็กขนาดเล็กใส่ลงในภาชนะที่บรรจุสาร จากนั้นนำไปวางบนเครื่องกวน เมื่อเปิดสวิตช์เครื่องจะเกิดการหมุนของมอเตอร์ที่อยู่ภายใน ผลก็คือ จะไปเหนี่ยวนำให้แท่งแม่เหล็กขนาดเล็กหมุนตาม ทำให้สารภายในภาชนะ เกิดการผสมกันตามการหมุนของแท่ง

## แม่เหล็กขนาดเล็ก



รูปที่ 2.1 แสดงการผสมสารแบบ tapping(ก) แบบ inversion(ข) แบบ rotation(ค) เครื่องผสมสาร vorter mixer(ง)และเครื่องกวนสารแบบแม่เหล็กไฟฟ้า magnetic stirrer(จ)

ค. การใช้เครื่องแก้ว

เครื่องแก้วที่ใช้สำหรับวัดปริมาตรของสารละลายในห้องปฏิบัติการชีวเคมีโดยทั่วไป เช่น

กระบอกตวง (measuring cylinder) pipette และ burette ฯลฯ แต่ละชนิดมีลักษณะการใช้งานที่แตกต่างกัน จึงควรรู้วิธีใช้ของแต่ละชนิด เพื่อจะได้สารละลายที่มีปริมาตรตามที่ต้องการ

1. กระบอกตวง (Measuring cylinder) มีขีดบอกปริมาตรอยู่ตรงด้านข้างใช้ในการตวงสารละลายที่ต้องการทราบปริมาตรโดยประมาณ กระบอกตวงมีขนาดต่างๆ กัน ในการใช้งานจึงควรเลือกขนาดของกระบอกตวงให้เหมาะกับปริมาตรของของเหลวที่จะตวง

2. Burette เป็นท่อแก้วตรงที่มีขนาดสม่ำเสมอ ด้านบนมีขีดแบ่งปริมาตรตั้งแต่ขีด 0 จนถึงขีดบอกปริมาตรสุดท้ายที่ปลายล่าง สามารถอ่านปริมาตรได้ละเอียดถึง 0.1 ml. ปลายล่างสุดจะมีก๊อกเปิด-ปิด สำหรับควบคุมการปล่อยสารละลายจาก burette บริเวณก๊อกมักจะเคลือบด้วย greese บางๆ หลังจากทำความสะอาดแล้ว เพื่อช่วยในการหล่อลื่นระหว่างที่มีการหมุนเปิด-ปิดก๊อก การใช้ burette ในการวัดปริมาตรสารละลายมีข้อปฏิบัติดังนี้

2.1 ให้ตรวจดูว่ามีฟองอากาศบริเวณปลาย burette หรือไม่ ถ้ามีให้เปิดก๊อกเพื่อปล่อยให้สารละลายไหลออกไปพร้อมกับฟองอากาศนั้น

2.2 อ่านขีดปริมาตรเริ่มแรกทางด้านบนก่อนที่จะปล่อยสารละลายออกจาก burette และควรระวังไม่ให้สารละลายไหลออกจนเกินขีดสุดท้ายทางด้านล่างของ burette เนื่องจากไม่มีขีดบอกปริมาตรเมื่ออยู่ระดับต่ำกว่าขีดดังกล่าว จะทำให้ไม่ทราบปริมาตรที่แน่นอนได้

2.3 การปล่อยสารละลายออกจาก burette ควรกระทำอย่างช้าๆ เพื่อให้สารละลายทั้งหมดที่ติดและไม่ได้ติดข้างๆ ท่อแก้วไหลลงมาพร้อมๆ กัน

2.4 การอ่านปริมาตรของสารละลายใน burette ระดับของสายตาจะต้องอยู่บนแนวเส้นตรงเดียวกับระดับของสารละลาย

3. Pipette เป็นเครื่องแก้วที่ใช้ดูดสารละลายออกมา เพื่อจุดประสงค์ 2 ประการ คือ

3.1 ใช้ในการถ่ายเทสารละลายจากภาชนะหนึ่งไปยังภาชนะหนึ่ง ตามปริมาตรที่ต้องการ เรียก pipette แบบนี้เรียกว่า "to deliver" หรือ "T.D" Pipette แบบนี้มีด้วยกันหลายชนิด คือ

3.1.1 Volumetric หรือ Transfer pipette เป็น pipette ชนิดที่มีกระเปาะอยู่ตรงกลาง ที่ปลายบนมีขีดบอกปริมาตรเพียงขีดเดียว ใช้ในการถ่ายเทสารละลาย โดยจะได้ปริมาตรที่ถูกต้อง เมื่อปล่อยให้สารละลายไหลออกจาก pipette จนหมด จากนั้นจึงตะปปลาย pipette กับข้างภาชนะที่รองรับ

3.1.2 Ostwald-Folin pipette เป็น pipette ที่มีกระเปาะแก้วก่อนมาทางปลายล่าง ที่ปลายบนมีขีดบอกปริมาตรเพียงขีดเดียว เพื่อให้ได้ปริมาตรในการถ่ายเทได้ถูกต้อง เมื่อปล่อยให้ของเหลวไหลออกจาก pipette จนหมดแล้วจะต้องเป่าให้ของเหลวออกจนหมด

pipette ชนิดนี้มักใช้วัดปริมาตรของเหลวที่มีความหนืดสูง เช่น เลือด น้ำเชื่อม เป็นต้น

3.1.3 Serological pipette เป็น pipette ที่มีขีดบอกปริมาตรย่อยจากทุกขีด 0 ทางด้านบนไปจนถึงปลายล่างสุด อาจมีตัวเลขหรือเครื่องหมายปรากฏทางปลายบน เช่น

1 in 1/100 ml. หมายความว่า ปริมาตรที่วัดได้ทั้งหมด 1 ml. โดยยาน 1 ขีดย่อยมี

ค่าเท่ากับ 1/100 ml.

A หรือ B หมายถึง ระดับเกรดของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานของสถาบันอังกฤษ

$\pm 0.01$  หมายความว่า ความผิดพลาดในการวัด เดจิ่ง มีค่าเท่ากับ  $\pm 0.01$  ml.

วงแหวน 2 วงซ้อนกันที่ปลายบน แถบแก้วขึ้นเป็นวงแหวนที่ปลายบน, ลูกศรปลายซึ่งอยู่เหนือขีดย่อยบนสุด และคำว่า "blow out" ที่ปลายบน หมายถึง การเป่าสารละลายที่เหลืออยู่ในภาชนะที่รองรับหลังจากที่ปล่อยสารละลายออกจาก pipette ชนิดนี้จนหมด ถ้าไม่มีเครื่องหมายเหล่านี้ปรากฏให้ใช้กับและปลาย pipette ข้างๆ ภาชนะที่รองรับก็จะ ให้ปริมาตรตามที่วงแหวน

3.1.4 Mour pipette เป็น pipette ที่มีขีดบอกปริมาตรย่อยๆ จากขีด 0 ทางด้านบน ขีดสุดท้ายจะอยู่บนเนื้อปลายล่างสุด ดังนั้นจึงไม่ควรถ่ายสารละลายโดยลอกมาต่ำกว่าขีดสุดท้าย pipette ชนิดนี้มีขีดแบ่งย่อยละเอียดถึง 0.1-0.01 ml. คล้ายกับแบบ serological pipette

3.2 ใช้ในการวัดปริมาตรของสารละลาย เป็น pipette แบบที่เรียกว่า "to contain" หรือ "T.C." มีกรวยปากที่ถึงการปริมาตรน้อยๆ เช่น Sahli pipette เป็น pipette ที่มีขีดบอกปริมาตรจากปากค้ำหนึ่ง เวลาใช้ต้องต้อสาขาง แล้วดูของเหลวโดยผ่านทางสายยาง หลังจากปล่อยของเหลวลงในภาชนะแล้ว จะต้องดูระดับและสายหรือตัวท้าวละลาย เพื่อจะทราบของเหลวที่ติดค้างอยู่ภายในออกทั้งหมด จึงจะได้ปริมาตรที่ถูกต้อง

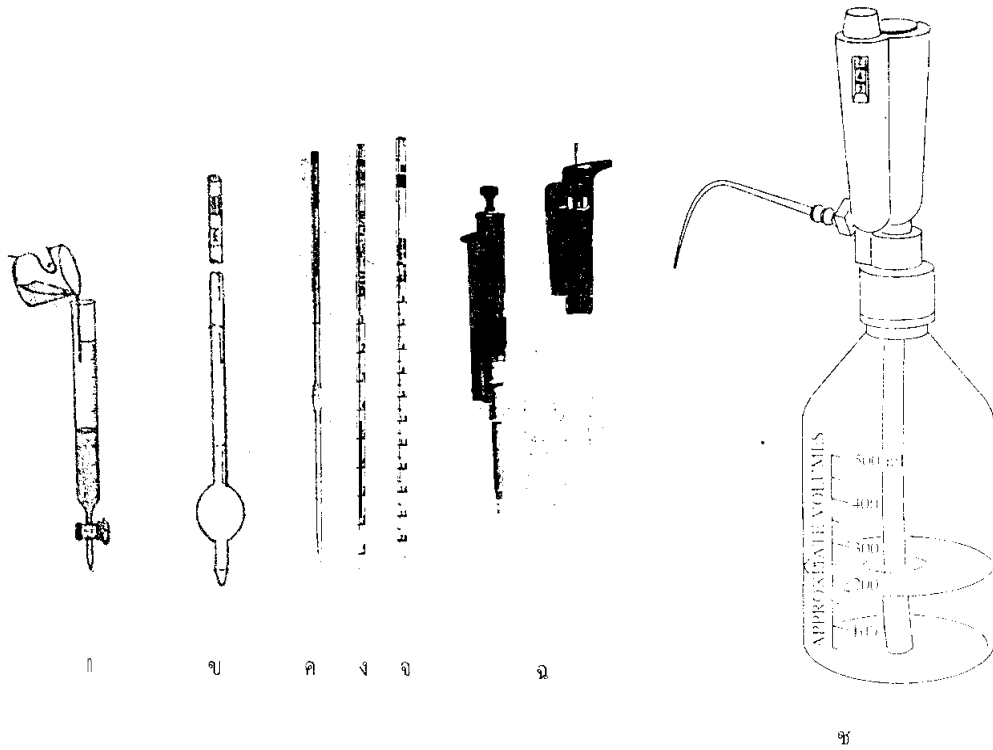
### 2.3 Pipette ชนิดอื่น ๆ

3.3.1 Automatic pipette หรือ Autopipette เป็น pipette ที่ทำงานอัตโนมัติสำหรับดูดเพื่อจุดหรือปล่อยสารละลาย ส่วนล่างจะคล้ายกับ tip ที่ทำด้วยพลาสติก เพื่อบรรจุเป็นสารละลายตามปริมาตรที่ต้องการ ส่วน tip นี้สามารถถอดเข้าออกได้ เพื่อนำออกมาล้างหรือเปลี่ยนเป็นอันใหม่ Pipette ชนิดนี้มักใช้วัดปริมาตรน้อยๆ ระดับไมโครลิตร ( $\mu$ l) และสูงสุดไม่เกิน 5 มิลลิเมตร (ml.) การทำงานง่ายและสะดวก มีความถูกต้องและแม่นยำสูง แต่ราคาค่อนข้างแพง Pipette ชนิดนี้ด้วยกัน 2 แบบ คือ แบบปริมาตรคงที่ (fixed volume type) และแบบปรับปริมาตรได้ (adjustable volume type)

3.3.2 Dispenser (Dilutor หรือ Pipettor) เป็นอุปกรณ์ที่ประกอบด้วยภาชนะบรรจุสารละลาย กับส่วน pipette ซึ่งปรับปริมาตรได้ตามที่ต้องการ การดูดและปล่อยสาร

ละลายอาศัยแรงดันอากาศทำให้สามารถถ่ายเทสารละลายได้รวดเร็ว และสะดวก

4. Pasteur pipette เป็นหลอดแก้วขนาดเล็ก ปลายแหลม ส่วนบนต่อกับบลูบยางที่ใช้  
บังคับเวลาการดูดและปล่อยสารละลาย มักใช้ในการถ่ายเทสารละลายจากภาชนะหนึ่ง ไปยังภาชนะ  
อื่นโดยไม่มีค่านิ่งถึงปริมาตร



รูปที่ 2.2 แสดงเครื่องแก้วชนิดต่างๆ Burette(ก) Oswald-Folin pipette(ข)  
Volumetric pipette(ค) Serological pipette (ง) Mohr pipette(จ)  
Automatic Pipette(ฉ) และ PipettorหรือDilutor(ช)

ง.การใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)

ทฤษฎีการหมุนเหวี่ยง

การที่วัตถุหมุนรอบแกนใดๆ จะทำให้เกิดแรงชนิดหนึ่งทีเรียกว่า "แรงหนีศูนย์กลาง (centrifugal force, G)" ภายใต้แรง G นี้ ถ้ามีมวลเลกุลบรรจุอยู่ในวัตถุดังกล่าว จะทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของมวลเลกุลออกจากจุดศูนย์กลางของการเหวี่ยง ไปรวมตัวกันเป็นตะกอนที่ปลายสุดของแรง G จึงใช้เป็นการหนึ่งในการแยกมวลเลกุลใหญ่ๆ ออกจากกัน ค่า G นี้มีความสัมพันธ์ค่าต่าง ๆ ดังนี้

$$G = \omega^2 \times r$$

โดยที่  $r$  เป็นค่าของรัศมีในการหมุน มักใช้หน่วยเป็น cm.

$\omega$  เป็นค่าความเร็วเชิงมุม (angular velocity) มีหน่วยเป็น

radian/sec ปกติแล้ว 1 รอบ ของการหมุนจะมีค่าระยะ เชิงมุม

$2\pi$  radians ดังนั้นค่า  $\omega$  สามารถเขียนได้ในเทอมของจำนวนรอบ

ต่อนาที (revolution per minute , rpm)

$$\omega = 2\pi \text{ rpm} / 60$$

$$\therefore G = 4\pi^2 (\text{rpm})^2 \times r / 3600$$

โดยทั่วไปแล้ว ค่า  $G$  มักจะแสดงออกมาเป็นค่าแรงหนีศูนย์กลางสัมพัทธ์

(relative centrifugal force, RCF) หรือจำนวนเท่าของความโน้มถ่วง (number time

of gravity , xg) มากกว่า ค่า  $G$  โดยตรง ดังนั้นความสัมพันธ์ใหม่สามารถเขียนได้เป็น

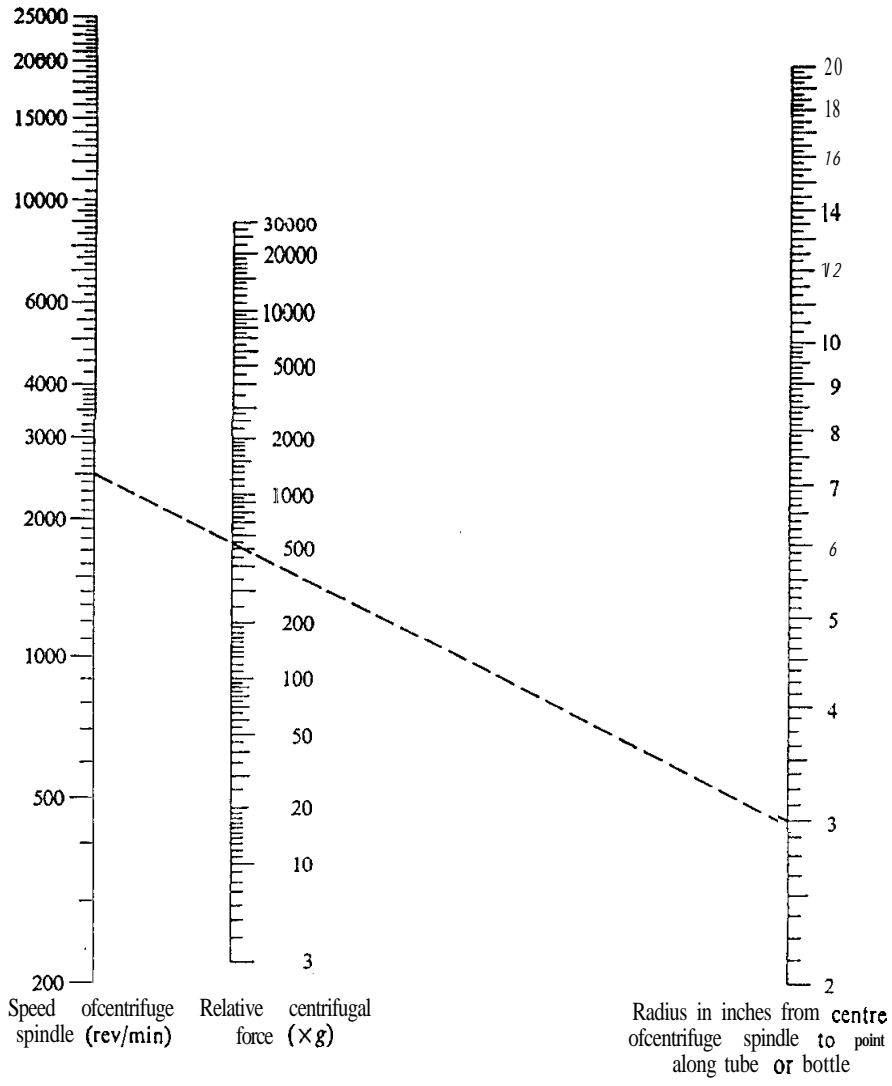
$$\text{RCF} \times 980 = 4\pi^2 (\text{rpm})^2 \times r / 3600$$

$$\therefore \text{RCF} = 4\pi^2 (\text{rpm})^2 \times r / 3600 \times 980$$

$$\approx 1.11 \times 10^{-5} (\text{rpm})^2 r$$

ดังนั้นถ้าทราบรัศมีของการหมุนและค่าของ RCF หรือ xg ก็จะคำนวณหาค่า rpm ได้ หรืออาจใช้การเทียบค่าจากความสัมพันธ์ในรูปที่ 2.3 ซึ่งประกอบด้วยสเกล 3 เส้น ดังนี้คือ เมื่อทราบค่า RCF หรือ xg และรัศมีการหมุน (radius) แล้ว ให้ลากเส้นตรงผ่านค่าทั้งสองต่อเลยไปตัดสเกลของ rev/min อ่านค่าที่ได้ จะทำให้ทราบค่า rpm ที่ต้องการ ค่า rpm หรือจำนวนรอบต่อวินาทีนี้เป็นค่าที่ใช้บอกความเร็วในการหมุนเหวี่ยงของ เครื่องหมุนเหวี่ยงและหรือหัวเหวี่ยง (rotor) แต่ละแบบ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมี 2 ชนิด คือ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ และ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

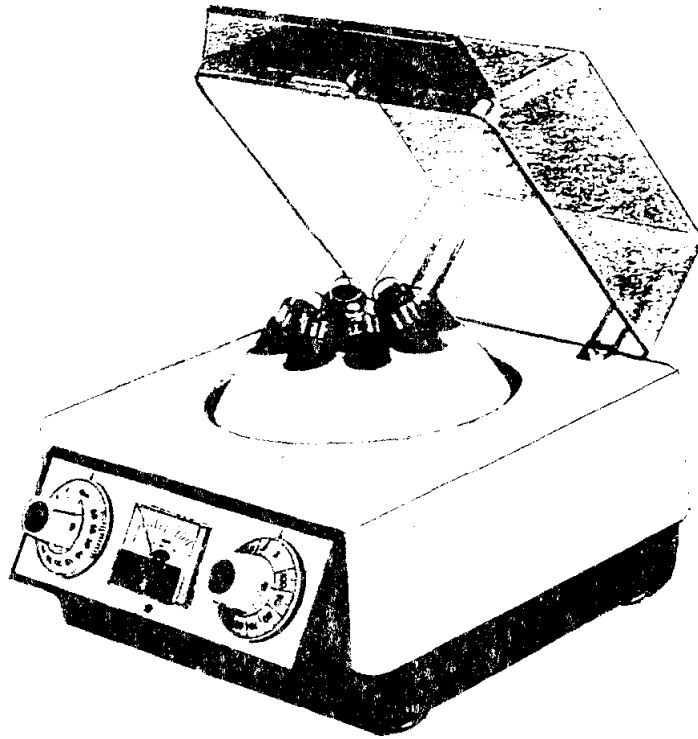




**รูปที่ 2.3** เป็น nomogram แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า rpm หรือ rev/min, RCF หรือ xg และรัศมีของการหมุน (radius)

การใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (Low speed centrifuge)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบมีหัวเหวี่ยงเป็นแบบ fixed angle สามารถเหวี่ยงหรือปั่นได้ ความเร็วสูงสุด 5,500 rpm และยังสามารถปรับระดับความเร็วและตั้งเวลาในการปั่นได้ วิธี การใช้ให้ดูรูปที่ 2.4 ประกอบดังนี้

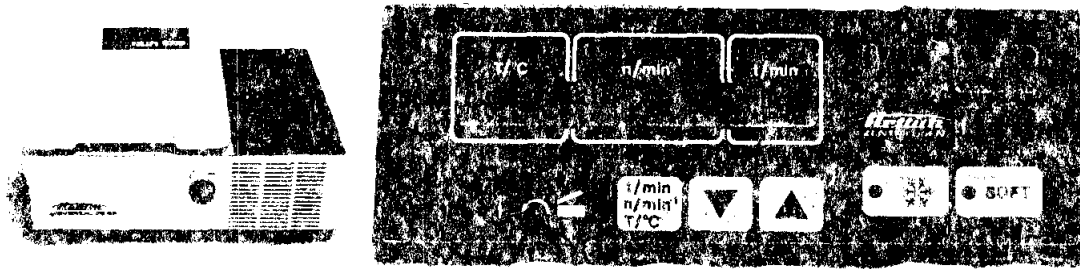


**รูปที่ 2.4** แสดง เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดความเร็วต่ำ

1. ตรวจสอบว่าปุ่มหมุนด้านหน้าอยู่ในตำแหน่ง 0 นาทีและ 0 % จากนั้นเสียบปลั๊ก เปิดฝาครอบเครื่อง โดยดึงปุ่มล็อกขึ้น
2. ใส่หลอดเหวี่ยงที่บรรจุสารต่างๆ ลงในช่องใส่หลอดเหวี่ยงที่อยู่ตรงกันข้าม โดยหลอดทั้งสองจะต้องมีน้ำหนักเท่ากัน แล้วจึงปิดฝาครอบเครื่องและกดล็อก
3. ตั้งเวลาในการหมุนเหวี่ยง เป็นนาที โดยหมุนปุ่มทางด้านซ้าย ซึ่งสามารถตั้งเวลาได้ตั้งแต่ 0-60 นาที
4. ค่อยๆ หมุนปุ่มเพิ่มความเร็วซึ่งเป็นค่า % จาก 0-100 โดยให้สังเกตที่เครื่องหมุนเหวี่ยง เริ่มหมุนเหวี่ยง ความเร็วของเครื่องหมุนเหวี่ยงสามารถตรวจสอบได้จากเข็มสเกลด้านหน้าเครื่อง ซึ่งแต่ละหน่วยบนสเกลจะมีค่าแสดงเป็น RPM x 1000 จนกระทั่งได้ความเร็วตามที่ต้องการ จึงหยุดหมุนปุ่มเพิ่มความเร็ว
5. เมื่อครบเวลาที่ตั้งไว้ เครื่องหมุนเหวี่ยงจะหยุดทำงานเอง จากนั้นจึงเปิดฝาครอบเครื่องแล้วจึงนำหลอดเหวี่ยงออกมาได้
6. กรณีที่เลิกใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแล้ว ให้ปิดฝาครอบเครื่องและกดล็อก จากนั้นหมุนปุ่มเพิ่มความเร็วกลับไป 0% และดึงปลั๊กออก

การใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (High speed centrifuge)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบนี้มีหัวเหวี่ยงเป็นแบบ fixed angle และ swinging สามารถเหวี่ยงหรือปั่นด้วยความเร็วสูงสุด 15,000 และ 5000 rpm ตามลำดับ เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบนี้ นอกจากจะปรับระดับความเร็วและตั้ง เวลาในการ เครื่องหมุนเหวี่ยงได้แล้ว ยังสามารถปรับระดับ อุณหภูมิภายในช่องหรือบริเวณ (chamber) ที่มีการหมุนเหวี่ยงได้ตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส ถึง 10 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีระบบทำความเย็นภายในเครื่อง วิธีการใช้ที่ดูรูปที่ 2.5 ประกอบ






รูปที่ 2.5 แสดง เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดความเร็วสูง

1. เปิดสวิทช์เครื่อง
2. เปิดฝาครอบเครื่อง โดยหมุนปุ่มดำที่อยู่ด้านหน้าเครื่องไปทางซ้าย จากนั้นขยับหัวเหวี่ยงตามแบบที่ตั้งการ (fixed angle) หรือ swinging) วางไว้ให้เข้าล็อกกับแกน ภายใน chamber แล้วจึงปลดฝาด้านหน้าเครื่อง หมุนปุ่มดำไปทางขวา
3. ตั้งอุณหภูมิ (T/°C) rpm (n/min<sup>-1</sup>) และ เวลาที่ใช้ในการหมุนเหวี่ยง (t/min) โดยกดที่ตัวเลขบนแผงหน้า ปัดไปบนแผงหน้า  $\frac{t/min}{n/min T/°C}$  จะเห็นตัวเลขที่ปรากฏบนจอกระดาน ขยับสองทีที่เลือก จากนั้นกดปุ่มที่ต้องการค่าตัวเลขที่ ตัวเลขที่ปรากฏ ให้กดที่ตำแหน่ง ▼ กรณีที่ต้องการค่ามากกว่าตัวเลขที่ปรากฏให้กดที่ตำแหน่ง ▲
4. ปิดเครื่องไว้ประมาณ 15 นาที
5. หมุนปุ่มดำไปทางซ้าย เปิดฝาด้านหน้าเครื่อง ใส่หลอดเหวี่ยงที่บรรจุสารต่างๆ ลงในช่องใส่หลอดเหวี่ยงที่อยู่ตรงกันข้าม โดยหลอดทั้งสองจะต้องมีน้ำหนักเท่ากัน แล้วจึงปลดฝาด้านหน้าเครื่อง หมุนปุ่มดำไปทางขวา
6. ทำการหมุนเครื่องเหวี่ยง โดยกดปุ่ม START ตัวเลขที่ปรากฏบนจอ จะแสดงค่า rpm หรือ n/min<sup>-1</sup> เพิ่มขึ้น จนถึงค่าที่ตั้งไว้ ส่วนเวลาหรือ t/min จะมีตัวเลขลดลงจากที่ตั้งไว้จนถึง 0 เครื่องจะหยุดทำการหมุนได้เอง
7. จากนั้นจึง เปิดฝาด้านหน้าเครื่อง โดยหมุนปุ่มดำไปทางซ้าย นำหลอดเหวี่ยงออกจากเครื่องได้

8. กรณีที่เลิกใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงแล้ว ให้นำหัวเหวี่ยงออกจาก chamber วางเก็บในที่เรียบร้อย เช็ดภายใน chamber ให้แห้งแล้วจึงปิดฝาครอบและสวิตซ์เครื่อง

#### หมายเหตุ

- กรณีที่มีไฟสว่างขึ้นในตาแหน่ง  แสดงถึงความไม่สมดุลของหลอดเหวี่ยงที่กำลังทำการหมุนเหวี่ยงอยู่ ให้กดปุ่ม STOP ทันที สักครู่เครื่องจะหยุด จากนั้นเปิดฝาครอบเครื่อง นำหลอดเหวี่ยงที่อยู่ตรงกันข้ามทุกคู่มาปรับให้มีน้ำหนักเท่ากัน แล้วจึงวางลงในช่องใส่หลอดเหวี่ยงที่อยู่ตรงกันข้าม ทำการหมุนเหวี่ยงใหม่
- ขณะที่เครื่องกำลังหมุนเหวี่ยง สามารถตรวจดูได้จากไฟที่สว่างขึ้นในตาแหน่ง 
- ไฟในตาแหน่ง  สว่างขึ้น แสดงว่า ขณะนี้สามารถเปิดฝาครอบเครื่อง โดยหมุนปุ่มตาแหน่งด้านหน้าของเครื่องไปทางซ้าย

#### จ. การใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

##### ทฤษฎีการดูดกลืนแสง

แสง เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเมื่อผ่านไปยังโมเลกุลของสาร และเกิดการดูดกลืนพลังงานแสงเข้าไป จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพลังงานภายในโมเลกุลของสารนั้น โดยที่ปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนเข้าป็นี่เราสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการหาปริมาณของสารได้ โดยอาศัยกฎของ Lambert - Beer ดังนี้

เมื่อแสงซึ่งเป็น monochromatic light ผ่านสารละลายที่ประกอบด้วยสารซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ละลายอยู่ จะทำให้แสงที่ผ่านออกมามีปริมาณหรือความเข้มลดลง และปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนไว้ (absorbance เขียนย่อว่า A หรือ optical density เขียนย่อว่า O.D) จะขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของสารที่สามารถดูดกลืนนั้น ดังสมการ

$$A = \log I_0/I = E \cdot c \cdot d$$

โดยที่  $I_0$  คือ ความเข้มของแสงก่อนผ่านสารละลาย

$I$  คือ ความเข้มของแสงหลังจากผ่านสารละลาย

$E$  คือ ค่าคงที่ของการดูดกลืนแสง (extinction coefficient) ซึ่งมีค่าเฉพาะขึ้นอยู่กับความยาวของคลื่นแสงและธรรมชาติของสารนั้นๆ ค่านี้อาจหาได้จากหนังสือคู่มือทางชีวเคมี

$c$  คือ ความเข้มข้นของสารละลาย

$d$  คือ ระยะทางที่แสงวิ่งผ่านสารละลายที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงปกติมีค่าเท่ากับ 1 cm.

ค่า E อาจกำหนดเป็น  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารดูดกลืนแสงเข้มข้น 1% w/v โดยระยะทางที่แสงวิ่งผ่านสารละลายมีค่าเท่ากับ 1 cm.

ค่า E อาจกำหนดเป็น  $E_{1\text{cm}}^{1\text{M}}$  หรือ molar extinction coefficient หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารดูดกลืนแสงเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร โดยระยะทางที่แสงวิ่งผ่านสารละลายมีค่าเท่ากับ 1 cm.

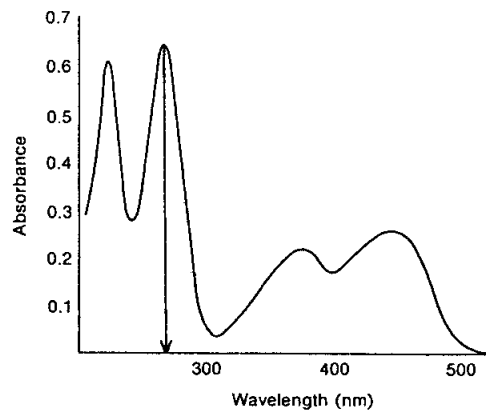
การดูดกลืนแสงอาจวัดออกมาเป็น % transmittance ซึ่งเขียนย่อว่า %T โดยมีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มของแสงดังนี้

$$\%T = I/I_0 \times 100$$

ค่า A และ %T ของสารละลายจะสามารถวัดได้โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ซึ่งจะบอกค่า A เป็นสเกลเชิง log ระหว่าง 0-∞ และบอกค่า %T เป็นสเกลเชิงเส้นจาก 0-100% โดยทั่วไปนิยมอ่านค่า A แทนค่า %T เนื่องจากเป็นค่าที่แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร และสามารถประยุกต์ของ Lambert-Beer คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายได้

การหาปริมาณสารจากการวัดค่า A หรือ O.D สามารถกระทำได้หลายวิธี คือ

1. โดยอาศัยการหาความยาวคลื่นของแสงที่สารนั้นมีการดูดกลืนมากที่สุด (maximum absorption,  $\lambda_{\text{max}}$ ) แสงแต่ละชนิดมักจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ได้ไม่เท่ากัน ถ้านำค่าที่ได้จากการดูดกลืนแสงของสารนั้น (absorbance) กับความยาวคลื่นต่างๆ (wavelength) มาเขียนเป็นกราฟจะเรียกว่า "absorption spectrum" ดังแสดงในรูปที่ 2.6



**รูปที่ 2.6** แสดง absorption spectrum ของ riboflavin (22  $\mu\text{M}$  ในสารละลาย 0.1 M sodium phosphate, pH 7.06)

ถ้าลากเส้นตั้งจากจุดที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดไปตัดบนแกนของความยาวคลื่นจะได้ค่า  $\lambda_{\max}$  ซึ่งค่า  $\lambda_{\max}$  นี้จะใช้ประโยชน์ในการหาค่า  $E$  ของสารนั้นได้ และถ้าเราทราบค่า absorbance ของสารนั้นในสารละลายที่วัด  $d$  ความยาวคลื่นเดียวกัน จากกฎของ Lambert- Beer เราจะสามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารดูดแสงในสารละลายได้ดังนี้

$$\text{จากกฎของ Lambert - Beer, } A = E \cdot c \cdot d$$

$$\therefore c = A / E \cdot d$$

2. โดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง แล้วคำนวณหาปริมาณของสารในสารละลายตัวอย่าง โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้

$$C_u = A_u \cdot C_s / A_s$$

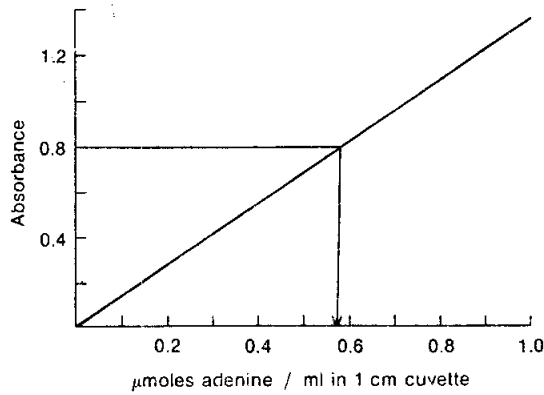
โดยที่  $C_s$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

$A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

$C_u$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

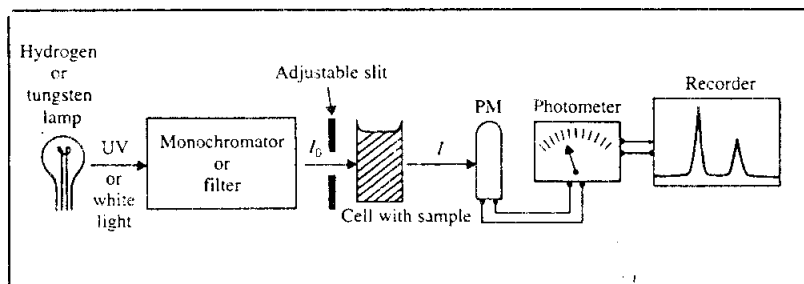
$A_u$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

3. โดยอาศัยการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการนำสารละลายที่ทราบความเข้มข้นต่างๆ กันมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (ในทางปฏิบัติมักจะใช้ความยาวคลื่นที่  $\lambda_{\max}$ ) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟดังแสดงในรูปที่ 2.7 จะได้กราฟเส้นเรียกว่า "เส้นมาตรฐาน" (standard curve or calibration curve) บางกรณีถ้าสารละลายมีความเข้มข้นสูงมากๆ จะได้กราฟเส้นมาตรฐานไม่เป็นเส้นตรง ดังนั้นจึงควรเตรียมสารละลายที่มีค่า absorbance ไม่เกิน 0.6-0.8 และในการสร้างเส้นมาตรฐานทุกครั้งควรจะปรับค่า absorbance ของสารอื่น ๆ ที่อยู่ในสารละลายให้มีค่า absorbance = 0 เพื่อให้ค่า absorbance ที่วัดได้เป็นค่าที่มาจาก การดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการวัดเท่านั้น ซึ่งกระทำได้โดยจะต้องเพิ่มหลอดทดลองอีก 1 หลอดที่ใส่สารทุกชนิดเหมือนกับหลอดที่จะทำการวัดค่า absorbance ยกเว้นสารที่ต้องการวัดเพียง อย่างเดียวเราเรียกสารละลายนี้ว่า "blank" เมื่อทำการวัด absorbance ของสารละลาย ตัวอย่างแล้วจึงนำมาอ่านเป็นค่าความเข้มข้นได้โดยตรงจากเส้นมาตรฐานที่สร้างขึ้น



**รูปที่ 2.7** แสดงกราฟเส้นมาตรฐานและการหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

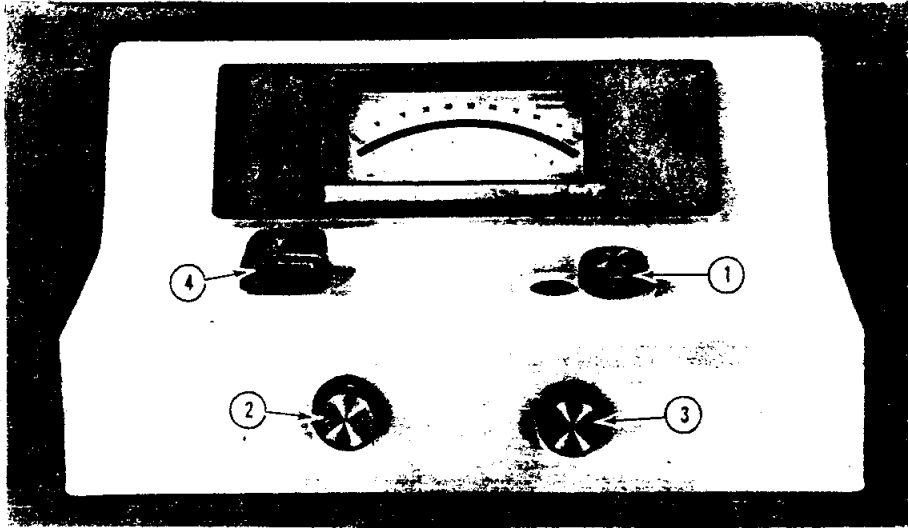
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นต่างๆ กันของสารละลาย เครื่องมือชนิดนี้มีด้วยกันหลายแบบขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นที่วัดและความละเอียดที่ต้องการ องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องได้แก่ แหล่งกำเนิดแสง (light source), ตัวเลือกความยาวคลื่น (monochromator), ช่องใส่ cuvette ที่บรรจุสารละลายซึ่งต้องการวัดค่า absorbance (sample holder), ตัววัดความเข้มของแสง (light detector) และสเกลบอกค่า absorbance ซึ่งอาจมีเครื่องบันทึกต่ออยู่ (photometer และ recorder) ดังในรูปที่ 2.8 (หลอดวัดการดูดกลืนแสง หรือ cuvette เป็นหลอดที่ทำด้วยวัสดุใสและมีขนาดคงที่แน่นอน อาจทำด้วยแก้วหรือพลาสติก หรือ quartz ขึ้นอยู่กับช่วงคลื่นที่จะวัด เช่น ช่วงแสง visible, VIS (400 - 700 nm.) จะใช้หลอดแก้วหรือพลาสติก และช่วงแสง ultraviolet, UV (200 - 400 nm.) จะใช้หลอด quartz)



**รูปที่ 2.8** แสดงแผนภาพส่วนประกอบของเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

### การาช้เครื่อง Spectronic 20

เครื่อง Spectronic 20 เป็นเครื่อง VIS-spectrophotometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอด tungsten สามารถวัดแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 350-700 nm. มีวิธีช้ดังนี้ (ดูรูปที่ 2.9 ประกอบ)



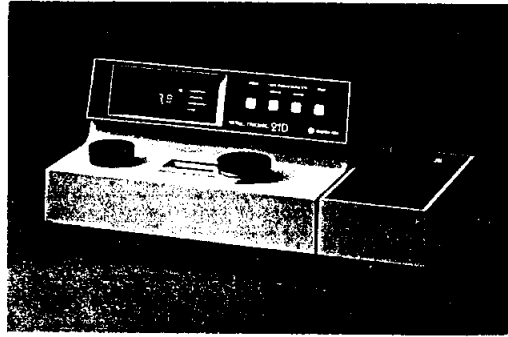
รูปที่ 2.9 แสดงเครื่อง Spectronic 20(1=wavelength scale control, 2=zero adjuster, 3=light control และ 4=sample holder)

1. เปิดสวิตช์เครื่องโดยหมุนปุ่มปรับศูนย์ (zero adjuster) ไปทางขวา อุ่นเครื่องไว้อย่างน้อย 15 นาที
2. ตั้งความยาวคลื่นตามที่ต้องการโดยหมุนปุ่มปรับช่วงคลื่น (wavelength scale control)
3. ตั้งเครื่องให้อ่านได้ % transmittance = 0 หรือ absorbance =  $\infty$  โดยการหมุนที่ปุ่มปรับศูนย์ (zero adjuster)
4. เปิดฝาช่อง sample holder บรรจุหลอด cuvette ที่มีสารละลาย blank แล้วจึงปิดฝา
5. หมุนปุ่มปรับปริมาณแสง (light control) เพื่อให้เครื่องอ่านได้ % transmittance = 100 หรือ absorbance = 0
6. ใส่หลอด cuvette ที่มีสารละลายที่ต้องการวัด ลงไปในช่องใส่ sample-holder แทนหลอด blank ปิดฝาแล้วจึงอ่านค่า % transmittance หรือ absorbance จากสเกล
7. เมื่อเลิกใช้เครื่องให้ปิดสวิตช์เครื่องโดยหมุนปุ่มปรับศูนย์ไปทางซ้ายสุด



### การใช้เครื่อง Spectronic 21

เครื่อง Spectronic 21 เป็นเครื่อง VIS-spectrophotometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอด tungsten เช่นเดียวกัน แต่สามารถวัดแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นกว้างกว่าเครื่อง Spectronic 20 คือ 320-1000 nm. มีวิธีใช้ดังนี้ (ดูรูปที่ 2.10 ประกอบ)

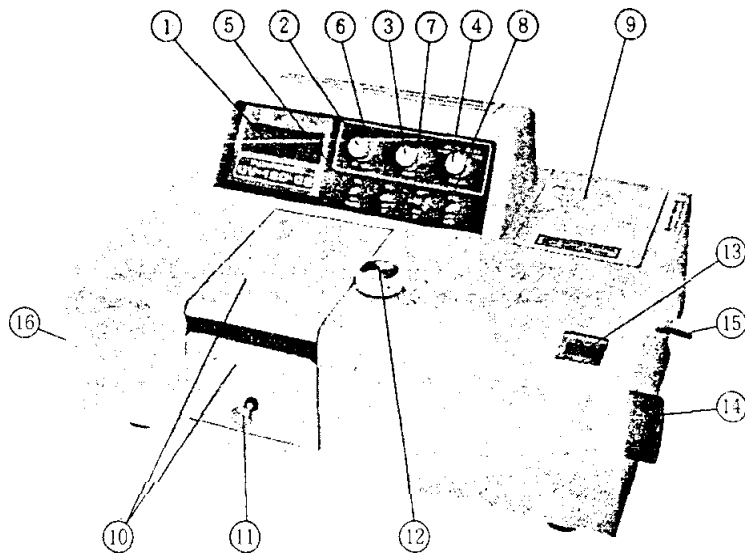


รูปที่ 2.10 แสดงเครื่อง Spectronic 21

1. เปิดสวิตช์เครื่องโดยหมุนปุ่มสวิตช์กำลัง (power switch) ที่อยู่ทางซ้ายมือ อุณหภูมิเครื่องไว้อย่างน้อย 15 นาที
2. ตั้งความยาวคลื่นตามที่ต้องการ โดยหมุนปุ่มปรับช่วงคลื่น (wavelength selector) ที่อยู่ทางขวามือ
3. เปิดฝาช่อง sample holder บรรจุหลอด cuvette ที่มีสารละลาย blank แล้วจึงปิดฝา
4. หมุนปุ่มปรับ 100 %T หรือ 0 A (100% T/zero A control) จนกระทั่งอ่านค่าสเกลได้ %T = 100 หรือ A = 0
5. ใส่หลอด cuvette ที่มีสารละลายที่ต้องการวัด ลงไปในช่อง sample holder แทนหลอด blank ปิดฝาจากรุ่นนั้นจึงอ่านค่า %T หรือ A เป็นตัวเลขบนจอ
6. เมื่อเลิกใช้เครื่องแล้วให้ปิดสวิตช์เครื่องโดยหมุนปุ่มสวิตช์กำลัง

### การใช้เครื่อง Shimadzu Spectrophotometer UV 120-02

เครื่อง Shimadzu Spectrophotometer UV 120-02 เป็นเครื่อง UV/VIS - spectrophotometer ที่มีแหล่งกำเนิดแสง 2 ชนิด คือ หลอด tungsten ให้แสงที่มีความยาวคลื่น 340-1000 nm. และหลอด deuterium หรือ hydrogen ให้แสงที่มีความยาวคลื่น 200-340 nm. โดยแสดงค่า A และ %T เป็นตัวเลขไฟฟ้า มีวิธีใช้ดังนี้ (ดูรูปที่ 2.11 ประกอบ)



**รูปที่ 2.11** แสดงเครื่อง Shimadzu Spectrophotometer UV 120-02(1=จอแสดงตัวเลข, 2=0%T control,3=CONC range control,4=Range selection switch,5=Power switch,6=W,tungsten lamp lighting switch,7=D<sub>2</sub>,deuterium lamp lighting switch,8=SENS switch, 9=Lamp housing cover,10=ช่องใส่ sample, 11=ปุ่มตั้งเบี่ยง sample,12=100%T/Zero A,13=ช่องแสดงค่า wavelength, 14=Wavelength control และ 15=คานสำหรับเลือกlamp)

1. เปิดสวิตช์เครื่องโดยหมุนปุ่มสวิตช์กำลัง (power switch) ในตำแหน่ง ON
2. ปรับความยาวคลื่น โดยหมุนปุ่มปรับช่วงคลื่น (wavelength control) จะเห็นตัวเลขหน่วย nm. ตรงช่องแสดงค่า wavelength
3. ปรับ filter
  - 3.1 กรณีที่ใช้ความยาวคลื่นมากกว่า 340 nm. จะต้องดันคานที่อยู่ทางขวา ด้านข้างของเครื่องมาข้างหน้า ซึ่งเป็นตำแหน่งของ VIS
  - 3.2 กรณีที่ใช้ความยาวคลื่นน้อยกว่า 340 nm. จะต้องดันคานที่อยู่ทางขวา ด้านข้างของเครื่องไปข้างหลัง ซึ่งเป็นตำแหน่งของ UV
4. เปิดหลอดกำเนิดแสง (lamp)
  - 4.1 กรณีที่ใช้ความยาวคลื่นในช่วง VIS ให้เปิดสวิตช์ W ตรงแผงหน้าปัดในตำแหน่ง ON
  - 4.2 กรณีที่ใช้ความยาวคลื่นในช่วง UV ให้เปิดสวิตช์ D<sub>2</sub> ตรงแผงหน้าปัด ซึ่งมีด้วยกัน 3 จังหวะ โดยจะต้องกดสวิตช์ลงสุดในตำแหน่ง HEAT ค้างไว้ 10 วินาที แล้วจึงดัน

สวิตช์ขึ้นสุดในตำแหน่ง ON

5. ปรับความไว (sensitivity)

5.1 กรณีที่ใช้ความยาวคลื่นในช่วง 325-390 nm. ต้องกดสวิตช์ SENS ตรงแผงหน้าปัดไปที่ตำแหน่ง HIGH

5.2 กรณีที่ใช้ความยาวคลื่นนอกเหนือจากที่กล่าวต้องกดสวิตช์SENSไปที่ตำแหน่ง LOW

6. เปิดเครื่องทิ้งไว้ 10 นาที

7. ปรับเครื่องให้อยู่ในสภาพพร้อม โดยหมุนปุ่ม RANGE ตรงแผงหน้าปัดไปที่ตำแหน่ง 0-100 % จากนั้นจึงเปิดฝาของช่องใส่ sample ขึ้น แล้วหมุนปุ่ม 0 % T control ตรงแผงหน้าปัดจนกระทั่งอ่านค่าตัวเลขตรงหน้าปัดมีได้ 0.00 จึงปิดฝา

8. เลือกค่าการตรวจวัด

8.1 กรณีที่ต้องการอ่านค่า %T ให้ใส่ cuvette ที่มีสารละลาย blank ลงในช่องใส่ sample holder แล้วจึงปิดฝา

8.2 กรณีที่ต้องการอ่านค่า A ให้หมุนปุ่ม RANGE ตรงแผงหน้าปัดไปที่ตำแหน่ง ABS 0-2 จากนั้นใส่ cuvette ที่มีสารละลาย blank ลงในช่องใส่ sample แล้วจึงปิดฝา

9. หมุนปุ่ม 100% T/Zero A ให้อ่านค่าตัวเลขที่ปรากฏบนหน้าปัดมีได้ 100 % T หรือ 0

10. หากการตรวจวัดโดยใส่หลอด cuvette ซึ่งบรรจุสารละลายที่ต้องการวัด ลงในช่องใส่ sample แทนหลอด blank อ่านค่าตัวเลขที่ปรากฏบนหน้าปัดมี

11. เมื่อเลิกใช้แล้ว ให้ปิดสวิตช์ P และ D<sub>2</sub> ตรงแผงหน้าปัดในตำแหน่ง OFF แล้วจึงปิดสวิตช์กำลัง ในตำแหน่ง OFF

**ฉ. โครมาโตกราฟี (Chromatography)**

**หลักการของโครมาโตกราฟี**

โครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร โดยอาศัยคุณสมบัติของความแตกต่างทางสัมพรรคภาพ (affinity) ระหว่างองค์ประกอบ 2 ส่วน คือ

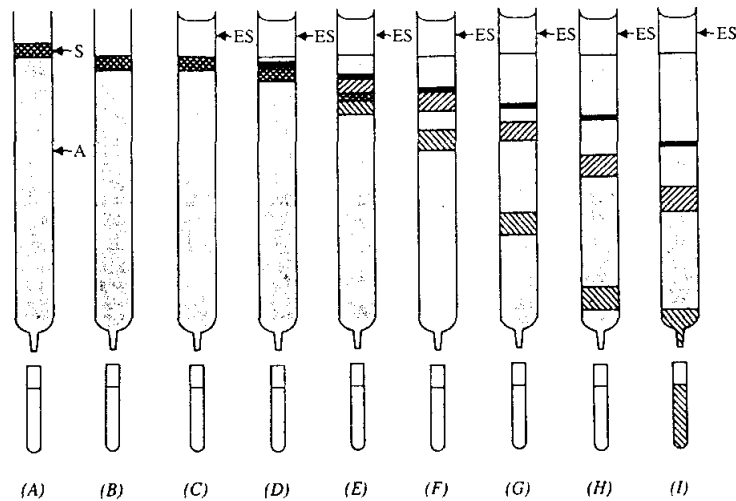
1. ส่วนที่คงที่ (Stationary phase) ซึ่งอาจมีสถานะ เป็นของแข็งหรือของเหลว

2. ส่วนที่เคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งอาจมีสถานะ เป็นแก๊สหรือของเหลว

สัมพรรคภาพที่เกิดขึ้นบนส่วนที่คงที่ มักจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติทางการดูดซับ (adsorption), การแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange) และการละลายในตัวทำละลาย หรือ matrix (เรซินที่มีช่องว่างภายใน เนื่องจากโครงสร้างที่สานกันเป็นตาข่าย) จึงทำให้สามารถแยก

แบ่งโครมาโตกราฟีออกเป็นชนิดต่างๆ โดยเลือกใช้อุปกรณ์ในการแยกสารเป็นท่อแก้วยาว หรือ column เพื่อให้ได้สารปริมาณมาก หรือเพื่อเป็นการเตรียมสารดังต่อไปนี้

1. โครมาโตกราฟีชนิดดูดซับ (Adsorption chromatography) เป็นการแยกสารผ่านไบบน column ที่บรรจุตัวดูดซับ (adsorbent) อยู่ภายใน หลังจากที่มีการเติมสารที่ต้องการแยกลงไปแล้ว จะมีการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมเติมลงไปในขณะที่สารเคลื่อนที่ใน column (ดูรูปที่ 2.12 ประกอบ) หลักการของการแยกชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของสารที่ต้องการแยกกับตัวดูดซับซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนที่คงที่ และกับตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนของเคลื่อนที่ ถ้าสารที่ต้องการแยกถูกดูดซับได้น้อยและละลายได้ดีในตัวทำละลายที่เติมลงไป จะทำให้การเคลื่อนที่ของสารดังกล่าวออกมาจาก column ได้เร็ว ผลก็คือสามารถแยกสารนั้นๆ ออกมาได้ก่อนและในทางกลับกัน ถ้าสารนั้นๆ ถูกดูดซับได้มากและละลายได้น้อย จะทำให้แยกสารดังกล่าวออกมาได้ช้า

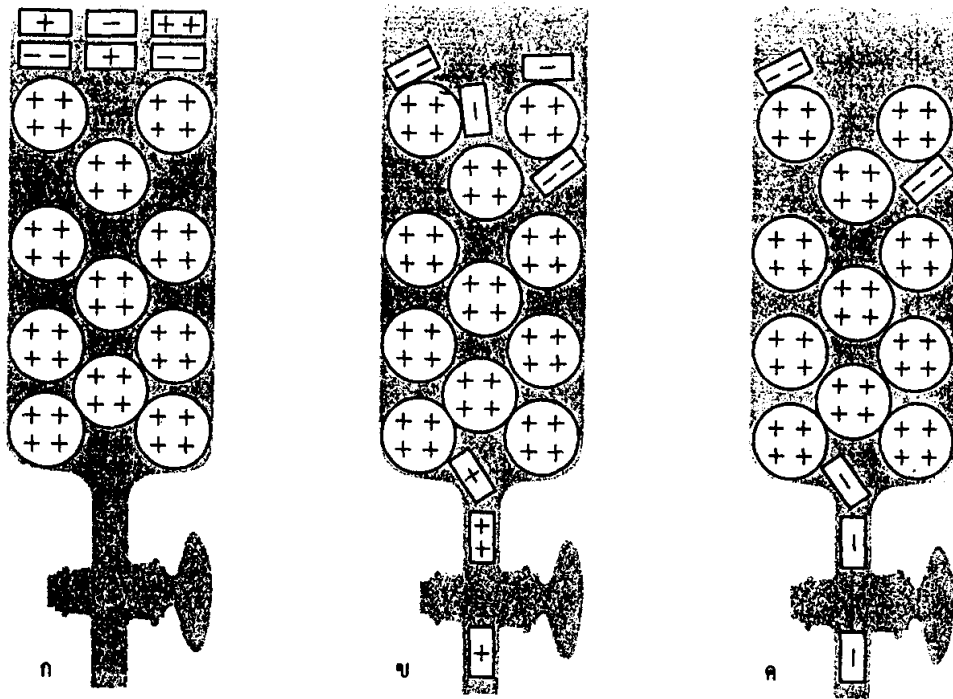


**รูปที่ 2.12** แสดงขั้นตอนการแยกสารโดยใช้ adsorption chromatography

[A=adsorbent, S=สารที่ต้องการแยก, ES=ตัวทำละลายที่เติมลงไป, (A) เป็นขั้นตอนในการเติมสารที่ต้องการแยกไปบน column, (B) เป็นขั้นตอนการดูดซับของสารบน adsorbent, (C) เป็นขั้นตอนในการเติมตัวทำละลาย, (D) (E) (F) เป็นขั้นตอนที่เกิดจากการแยกสารออกเป็น 2 และ 3 ชนิด, (G) (H) เป็นขั้นตอนที่เกิดการแยกสารออกเป็น 3 ชนิดอย่างเห็นได้ชัด และ (I) เป็นขั้นตอนการไหลของสารตัวแรกออกจาก column บางทีเรียกขั้นนี้ว่า "elution step"]

ตัวดูดซับที่นิยมมาใช้นี้มักจะเป็นของแข็งจำพวก aluminium oxide , magnesium silicate, calcium hydroxide, ถ่าน (charcoal), น้ำตาลทราย (sucrose) เป็นต้น ส่วนตัวที่ละลายที่นิยมมาใช้นี้จะเป็นพวกตัวที่ละลายอินทรีย์ เช่น hexane, benzene, ether, chloroform, alcohol, ketone และสารละลายระหว่างน้ำกับตัวที่ละลายอินทรีย์ในอัตราส่วนต่างๆ กัน แล้วแต่ความเหมาะสมในการแยกสารที่ต้องการ โครมาโตกราฟชนิดดูดซับมักใช้ในการแยกสารจำพวก lipids, steroids , carotenoids และ chlorophylls

2. โครมาโตกราฟชนิดแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography) เป็นการแยกสารที่ขึ้นอยู่กับ สัมพรรคภาพระหว่างประจุบนสารที่ต้องการแยกและประจุบน resin ซึ่งบรรจุอยู่ใน column โดยทำหน้าที่เป็น stationary phase ส่วน mobile phase จะเป็น buffer ซึ่งสามารถปรับเปลี่ยนค่า pH หรือความเข้มข้น ให้เหมาะสมกับการชะของสารที่ต้องการและไม่ต้องการให้ออกจาก column (ดูรูปที่ 2.13 ประกอบ)



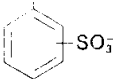




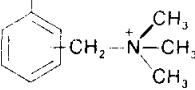
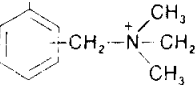
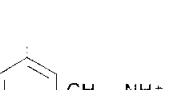

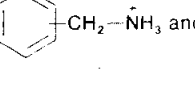
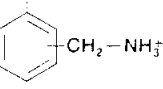
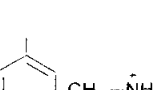


รูปที่ 2.13 แสดงขั้นตอนในการแยกสารโดยวิธี ion-exchange chromatography ชนิด anion exchanger ก. เป็นขั้นตอนในการเติมสารที่ต้องการแยกบน column ข. เป็นขั้นตอนที่เกิดการเกาะติดของประจุชนิดตรงข้ามบน resin และการไหลออกของประจุชนิดเดียวกับ resin และ ค. เป็นขั้นตอนที่มีการชะสารที่เกาะติดบน resin ด้วย buffer ที่มีความเข้มข้นมากขึ้นเพื่อ แลกเปลี่ยนการเกาะติดบน resin

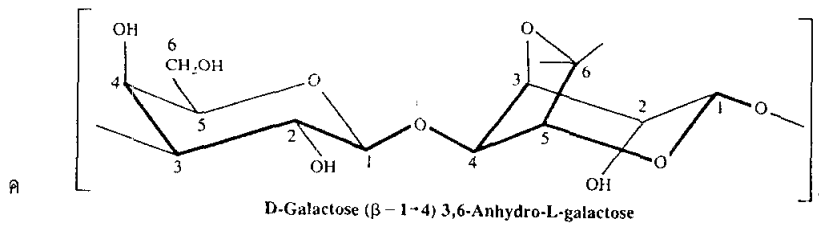
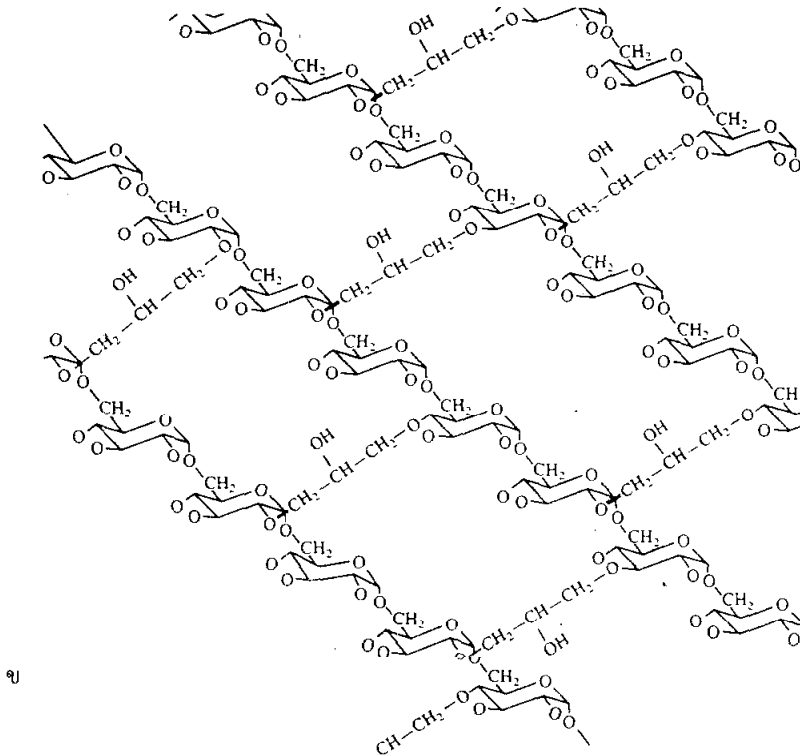
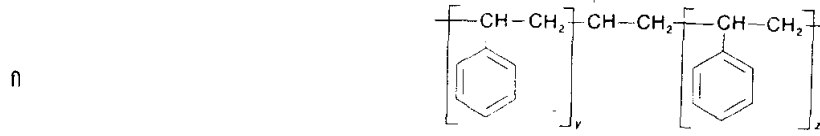
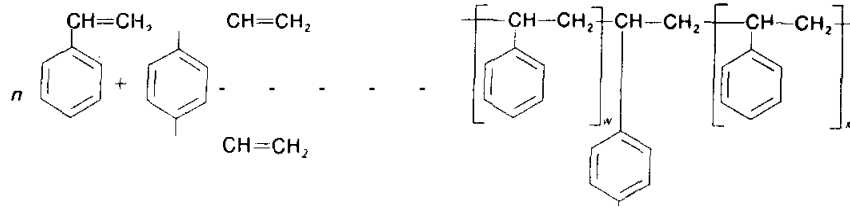
ปกติเรซินที่นำมาใช้ในโครมาโตกราฟแบบนี้ (แสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.3) มักมีคุณสมบัติที่เฉื่อยต่อปฏิกิริยา (inert) และไม่ละลายในตัวทำละลายใดๆ (immobile) เช่น พวกร copolymer ของ styrene และ divinylbenzene ซึ่งใช้ในการแยกสารหรือไอออนที่มีขนาดเล็ก และพวกร polysaccharide เช่น cellulose, dextran หรือ sephadex และ agarose สูตรโครงสร้างของ polymer เหล่านี้แสดงในรูปที่ 2.14 และ 2.15 บน resin จะมีหมู่ฟังก์ชันมาเกาะทำให้มีประจุเกิดขึ้น ถ้าเป็นประจุลบจะเรียก resin นี้ว่า "anion exchanger" ถ้าเป็นประจุบวกจะเรียก resin นี้ว่า "cation exchanger" เหล่านี้ยังสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ตามความแรงของประจุบน resin

1. Strong ion exchanger เช่น

- Cation exchanger ที่มีหมู่ quaternary aminoethyl (QAE)
- Anion exchanger ที่มีหมู่ sulphonate

ตารางที่ 2.2 แสดง resin ชนิดต่างๆ ที่เป็น copolymer ของ styrene และ divinylbenzene

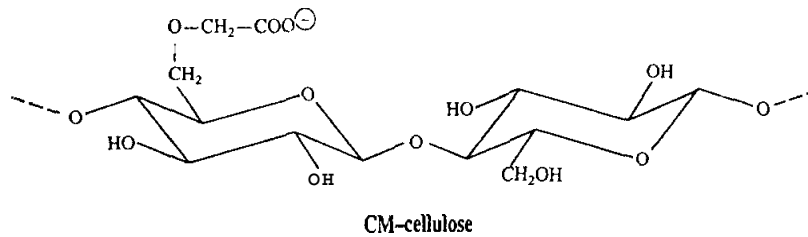
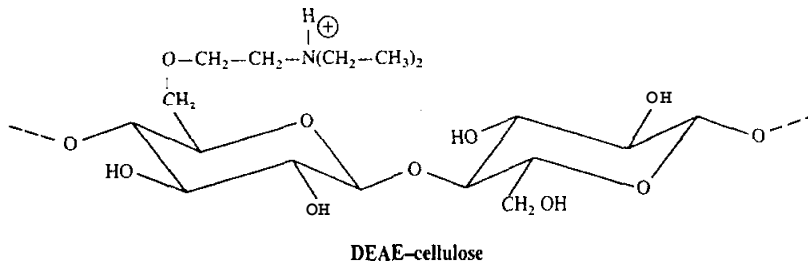
ชนิดของ ion exchanger	ชื่อทางการค้า	หมู่ฟังก์ชันที่แสดงประจุบน resin
Strong cation exchanger	Amberlite IR 120	
	Bio-Rad AG 50	
	Dowex 50	
	Zeocarb 225	
Weak cation exchanger	Amberlite IRC-150	
	Bio-Rad AG 1	
Strong anion exchanger	Dowex 1	
	Amberlite IRA-410	
	Bio-Rad AG 2	
	Dowex 2	
Weak anion exchanger	Amberlite IR-45	
	Bio-Rad AG 3	
	Dowex WGR	
	Dowex 3	



**รูปที่ 2.14** แสดงสูตรโครงสร้างของ polymer บางตัวที่นำมาใช้เป็นเรซิน ก.การเกิด copolymer ของ styrene และ divinylbenzene ข.เป็น polymer ของ dextran และ ค.เป็น polymer ของ agarose

ตารางที่ 2.3 แสดง resin ชนิดต่างๆ ที่เป็น polysaccharide

ชนิดของ ion exchanger	ชื่อทางการค้า	หมู่ฟังก์ชันที่แสดงประจบน resin
Strong cation exchanger	Phospho-cellulose	Cellulose } $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\   \\ \text{O}^- \end{matrix}$
	Phospho-sephadex	Sephadex } $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}-\text{P}-\text{O}^- \\   \\ \text{O}^- \end{matrix}$
Weak cation exchanger	CM-cellulose หรือ Cellex-CM	Cellulose } $\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
	CM-sephadex	Sephadex } $\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
	CM-sepharose	Agarose
	Strong anion exchanger	QAE-sephadex
Weak anion exchanger	Cellex T	Cellulose
	Cellex D	Cellulose } $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
	DEAE-sephadex	Sephadex } $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
	DEAE-sepharose	Agarose } $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$



รูปที่ 2.15 แสดง โครงสร้างของ เรซินชนิด anion exchanger เช่น DEAE-cellulose

และ ชนิด cation exchanger เช่น CM-cellulose

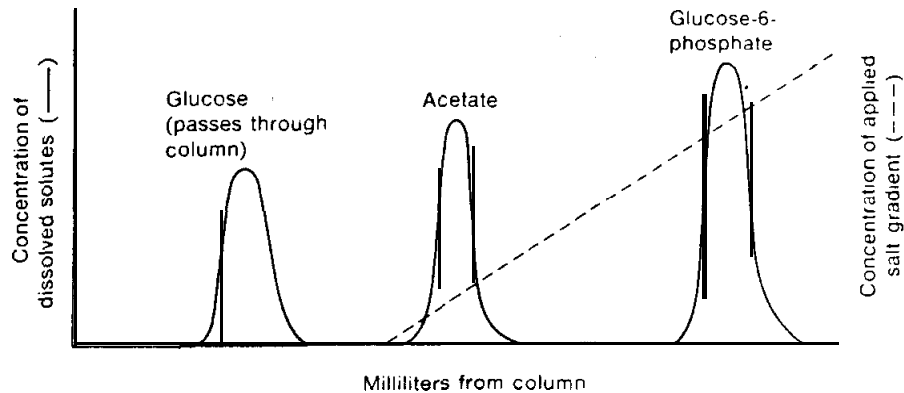
2. Weak ion exchanger เช่น

- Cation exchanger ที่มีหมู่ carboxymethyl (CM)

- Anion exchanger ที่มีหมู่ diethylaminoethyl (DEAE)

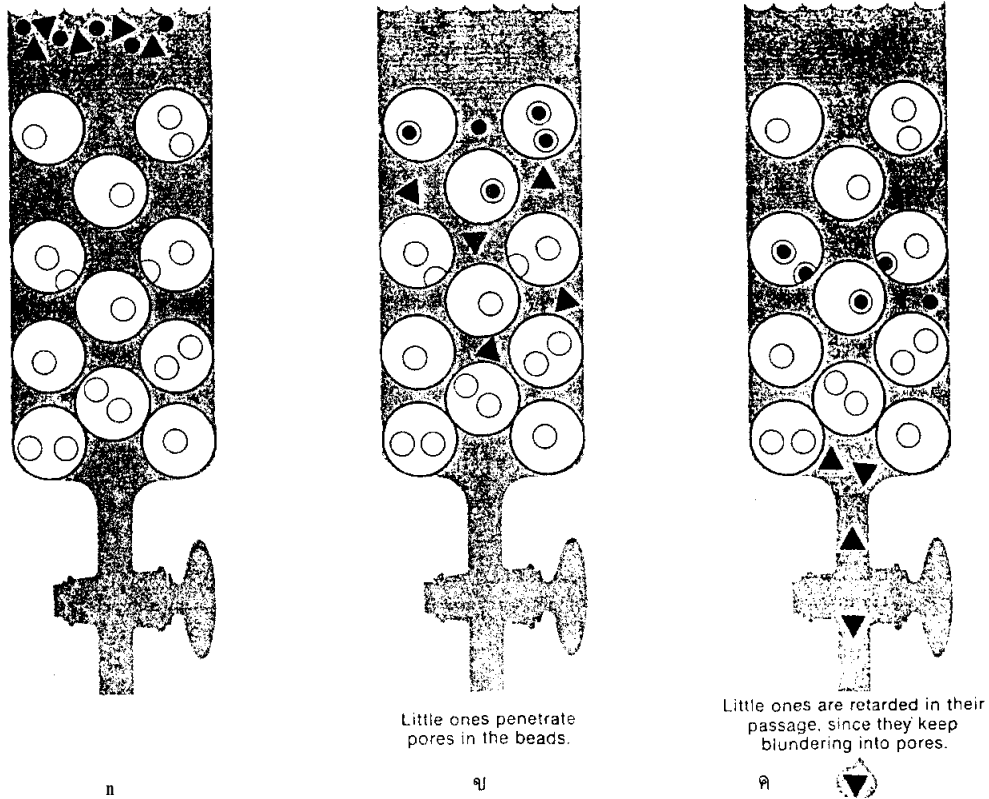


หลังจากทำการแยกสารต่างๆ ผ่าน column แบบนี้แล้ว ส่วนต่างๆ(fraction)ที่ออกมาจาก column สามารถนำไปวัดปริมาณ หรือความเข้มข้นของสารที่อยู่ใน fraction และสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าต่างๆ ได้ดังในรูปที่ 2.16 คือ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการแยกกับปริมาตรของสาร(ml.) ที่ออกมาจาก column และความเข้มข้นของเกลือใน buffer ที่ใช้ชะสารต่างๆ ให้ออกมาจาก column



รูปที่ 2.16 แสดง chromatogram ที่ได้จากการแยกสารต่างๆ เช่น glucose, acetate และ glucose-6-phosphate ผ่าน column ที่บรรจุด้วย resin ชนิด Dowex 1 โดย (—) เป็นเครื่องหมายแทนการชะของสารที่ต้องการแยก และ (---) เป็นเครื่องหมายแทนการใช้เกลือในการชะของสารที่ต้องการออกจาก column ณ ความเข้มข้นต่างๆ กัน

3. โครมาโตกราฟีชนิดเจลพิวเตชัน หรือ เอกซคลูชัน (Gel filtration or Exclusion chromatography) เป็นการแยกสารที่ขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพของสารที่ต้องการแยกในการละลาย หรือแทรกผ่านเข้าไปใน matrix ที่มีลักษณะเป็นรูพรุนบรรจุอยู่ใน column โดยสารที่มีขนาดและรูปร่างเล็กจะมีสัมพรรคภาพสูงต่อการผ่านรูพรุนใน matrix ซึ่งช่องว่างในรูพรุนนี้จะทำหน้าที่เป็นส่วนที่คงที่ ดังนั้นสารดังกล่าวจะถูกชะออกมาจาก column ได้ช้ากว่าสารที่มีขนาดและรูปร่างใหญ่ เนื่องจากต้องใช้เวลาในการเคลื่อนที่ผ่านภายในรูพรุน ขณะที่สารขนาดและรูปร่างใหญ่เคลื่อนที่ผ่านเฉพาะช่องว่างภายนอก matrix (ทำหน้าที่เป็นส่วนที่เคลื่อนที่) จึงทำให้ถูกชะออกมาจาก column ได้ก่อน (ดูรูปที่ 2.17 ประกอบ)



**รูปที่ 2.17** แสดงขั้นตอนในการแยกสารโดยวิธี gel filtration หรือ exclusion chromatography ก. เป็นขั้นตอนในการเติมสารที่ต้องการแยกไปบน column ข. เป็นขั้นตอนการเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของสารที่มีขนาดเล็ก และ ค. เป็นขั้นตอนที่สารขนาดใหญ่ถูกชะออกมาจาก column ได้ก่อนสารที่มีขนาดเล็ก

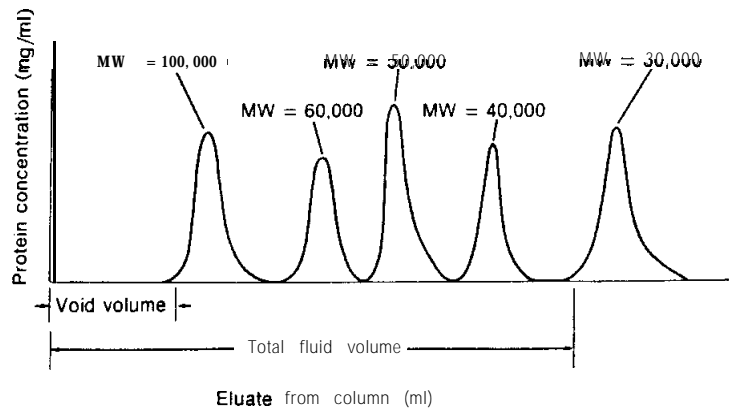
ส่วนที่เรียกว่า matrix จะมีลักษณะเป็น gel ซึ่งเป็น polymer ของพวก dextran (sephadex), agarose (sepharose, Bio-gel A, Sagavac) , polyacrylamide (Bio-Gel P) polyacryloylmorphine (Enzocryl Gel) หรือ polystyrene (Bio-Beads S) ซึ่ง gel แต่ละชนิดจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับขนาดและรูปร่างของสารที่ต้องการแยก ซึ่งได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.4

รูปที่ 2.18 เป็นตัวอย่างในการแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ ตั้งแต่ 30,000 - 100,000 ที่ถูกชะออกมาจาก column ชนิด gel filtration หรือ exclusion เรียงตามลำดับก่อน-หลัง ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลใหญ่-เล็ก โดยที่ Void volume เป็นปริมาตรเริ่มต้นก่อนที่จะมีการชะสารโมเลกุลใหญ่ออกมา ซึ่งก็คือปริมาตรของช่องว่างภายนอก matrix หรือ gel ที่บรรจุใน column

**ตารางที่ 2.4** แสดงคุณสมบัติของ gel ชนิดต่างๆ ที่ใช้ใน gel filtration หรือ  
exclusion chromatography

ชนิดของ polymer	ชื่อทางการค้า	ช่วงขนาดของโมเลกุลที่เข้าแยก	Bed Volume
Dextran	-Sephadex G 10	< 700	2-3
	G 25	1000 - 5000	2-3
	G 50	1500 - 30,000	4-6
	G 100	4000 - $1.5 \times 10^5$	15-20
	G 200	5000 - $6.0 \times 10^5$	30-40
	-Sephadex S 200	5000 - $2.5 \times 10^5$	ttt
	s 300	10,000 - $1.5 \times 10^6$	+++
	S 300	20,000 - $8.0 \times 10^6$	ttt
	Agarose	-Sepharose 2B	10,000 - $4.0 \times 10^6$
4B		60,000 - $2.0 \times 10^7$	ttt
6B		70,000 - $4.0 \times 10^7$	ttt
+Bio-Gel A 5m		10,000 - $5.0 \times 10^6$	ttt
A15m		40,000 - $1.5 \times 10^7$	+++
A50m		$10 \times 10^5$ - $5.0 \times 10^7$	ttt
A150m		$10 \times 10^6$ - $1.5 \times 10^8$	ttt
polyacrylamide		+Bio - Gel P2	100 - 1,800
	P6	1,000 - 6,000	7
	P30	2,500 - 40,000	11
	P100	5,000 - $1.0 \times 10^5$	15
	P300	60,000 - $4.0 \times 10^5$	30

t ผลิตโดยบริษัท Pharmacia Biotechnology , uppsala , Sweden ; tt ผลิตโดย  
บริษัท Bio-Rad, Richmond, California, USA, Bed Volume ( เป็นปริมาณในหน่วย ml. ของ  
gel แห่ง 1 g. เมื่ออุ้มน้ำเต็มที่แล้ว ; +++ ได้ถูกผลิตออกมาในรูปของ เจลที่อุ้มน้ำเต็มที่แล้ว



**รูปที่ 2.18** แสดง chromatogram ในการแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ กัน ผ่าน gel filtration หรือ exclusion chromatography

### ข. อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

#### หลักการของอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ขึ้นอยู่กับเคลื่อนที่ของที่มีประจุ (charged molecules) ในสนามไฟฟ้า โดยจะเคลื่อนที่ผ่านสารละลาย หรือ supporting medium ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม

ถ้ากำหนดให้  $q$  เป็นค่าประจุของโมเลกุลที่ต้องการแยก

$x$  เป็นค่าความเข้มของสนามไฟฟ้า (intensity of electric field)

$f$  เป็นค่าแรงเสียดทานของโมเลกุล

$v$  เป็นค่าอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลใดๆ

จะพบว่า แรงที่กระทำต่อโมเลกุลมีค่า  $= qx$

และแรงต้านทานการเคลื่อนที่มีค่า  $= fv$

ณ ภาวะสมดุลจะได้ว่า  $qx = fv$

กรณีที่โมเลกุลของสารที่ต้องการแยกมีลักษณะเป็นทรงกลม (spherical molecule) ซึ่งมีรัศมีเป็น  $r$  เคลื่อนที่ผ่านสารละลายหรือตัวกลางที่มีความหนืดเป็น  $n$  จากกฎของStoke จะได้ว่า

$$f = 6 \pi nr$$

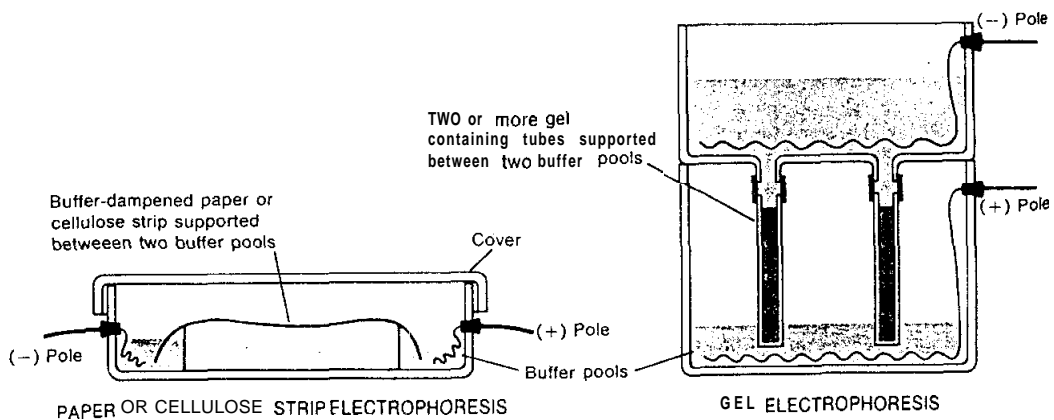
$$\text{ดังนั้น} \quad qx = 6 \pi nr v$$

$$\dots \quad v/x = q/6 \pi nr$$

ค่า  $v/x$  หรือ อัตราความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลใดๆ ต่อความเข้มของสนามไฟฟ้า 1 หน่วย ได้ถูกนิยามว่าเป็นค่า electrophoretic mobility ดังนั้นค่า electrophoretic mobility นี้จึงขึ้นอยู่กับความหนืดของตัวกลาง, ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลที่ต้องการแยก และประจุของโมเลกุลที่ต้องการแยกด้วย

ประจุของโมเลกุล ( $q$ ) สามารถเปลี่ยนแปลงค่าได้โดยการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของตัวกลาง ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็น buffer ของพวก formate, acetate, citrate, barbitone, phosphate, Tris, EDTA หรือ pyridine ในอัตราส่วนของความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยมักใช้ในช่วงที่มี ionic strength 0.05-0.10 M (ionic strength =  $1/2 \sum cz^2$ ,  $c$  เป็นความเข้มข้นของไอออนหนึ่งๆ ในหน่วย mole/l และ  $z$  เป็นค่าประจุของไอออนนั้นๆ) โดยจะมีผลต่อค่า pH ของตัวกลางตามความสัมพันธ์อันสมการของ Henderson-Hasselbalch  $pH = pKa + \log [Salt]/[Acid]$  หรือ  $pH = pKa + \log [unionized form]/[ionized form]$  นั่นคือ การเปลี่ยนค่า pH จะทำให้ค่า electrophoretic mobility เปลี่ยนไปด้วย

การแยกสารโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสผ่านสารละลาย buffer โดยตรงมักจะเกิดการแพร่ (diffuse) ของสารที่ต้องการแยกได้ง่าย จึงมีการใช้ supporting medium ที่มีลักษณะเป็นของแข็ง หรือกึ่งแข็ง เช่น กระดาษกรอง cellulose acetate, agar-gel, starch-gel และ polyacrylamide gel เป็นต้น โดยจะวาง supporting medium ระหว่างตัวกลาง 2 ส่วนที่แยกจากกัน และมีขั้วไฟฟ้าต่ออยู่ตัวกลางละขั้ว เมื่อจะทำการแยกสาร จะต้องใส่หรือหยอด (apply) สารที่ต้องการแยกบน supporting medium และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) ซึ่งสามารถควบคุมกำลังไฟฟ้า (power), กระแสไฟฟ้า (current) หรือความต่างศักย์ (voltage) ที่ส่งให้กับระบบของการแยกได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.19

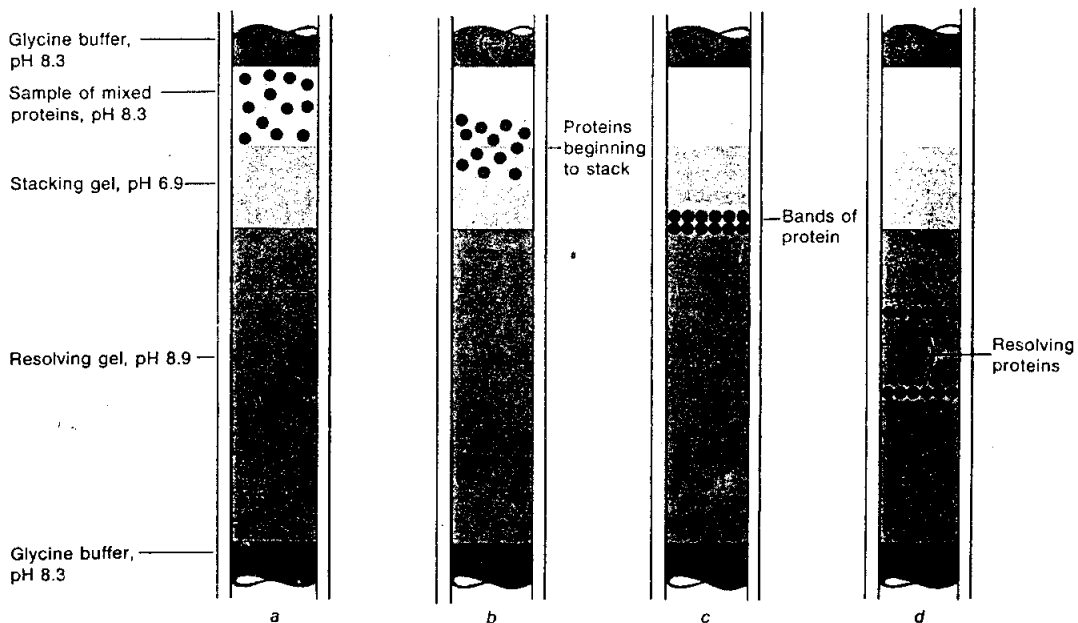


รูปที่ 2.19 แสดง เครื่องสำร็จของอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis apparatus)

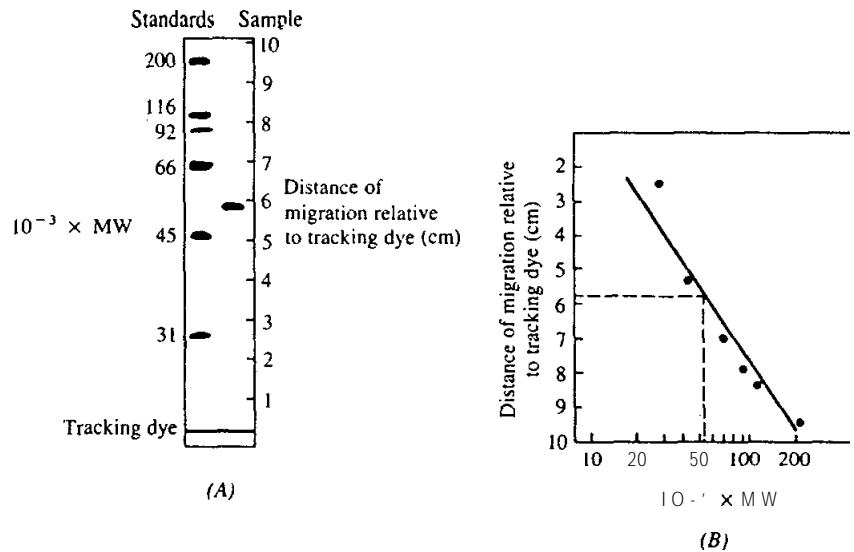
แบบใช้กระดาษกรองและ gel

นอกจากนี้ในการแยกสารโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ใช้ gel เป็น supporting medium ยังมีการประยุกต์ เพื่อทำการแยกสารดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะพวกโปรตีน มีดังนี้คือ

1. เติมสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ลงไปจับกับโปรตีนในลักษณะ non-covalent ด้วยอัตราส่วน 1 โมเลกุลของ SDS ต่อกรดอะมิโน 2-3 ตัวในโปรตีนนั้นๆ ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ โดยจำนวนประจุลบจะเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนในโปรตีน และโปรตีนดังกล่าวจะสูญเสียสภาพธรรมชาติเปลี่ยนรูปร่างเป็น rod shape ที่มีความยาวเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโน มีผลทำให้ค่า electrophoretic mobility ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนเพียงอย่างเดียว ขั้นตอนการแยกแสดงในรูปที่ 2.20 โปรตีนที่แยกได้สามารถนำเข้าสู่ขั้นตอนการคำนวณหา molecular weight (MW) ของโปรตีนต่างๆได้ โดยอาศัยการเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนที่ต้องการ กับโปรตีนมาตรฐานตามรูปที่ 2.21 (อัตราการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ = อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนตัวหนึ่ง / อัตราการเคลื่อนที่ของรงควัตถุขนาดเล็กที่มีประจุลบ เช่น bromophenol blue) ระบบอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนี้ เรียกว่า "SDS-polyacrylamide gel electrophoresis , SDS-PAGE"

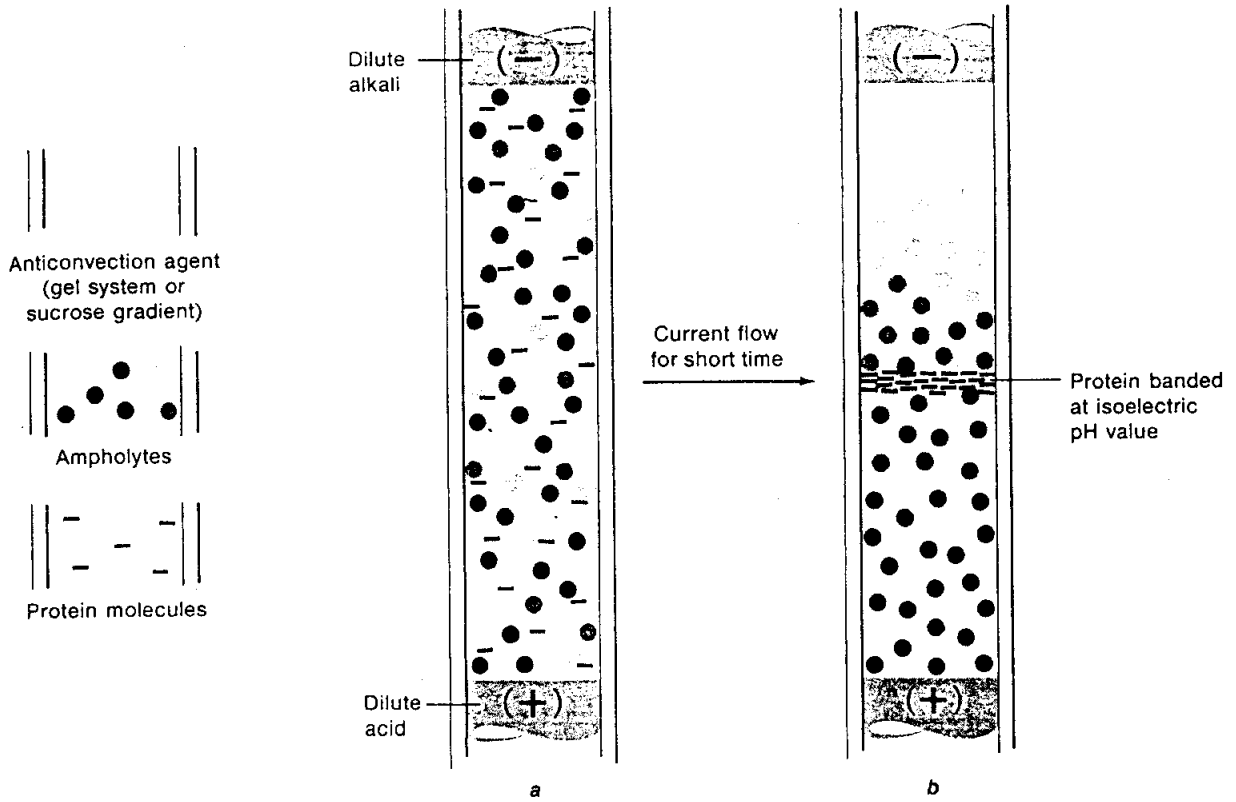


**รูปที่ 2.20** แสดงขั้นตอนการแยกสารโดยวิธี SDS-PAGE a. เป็นขั้นตอนการเติม protein sample บน polyacrylamide gel b. เป็นขั้นตอนที่เริ่มมีการเคลื่อนที่ของ protein เนื่องจากกระแสไฟฟ้าที่จ่ายเข้าในระบบ c. เป็นขั้นตอนที่เริ่มมีการแยกของ protein และ d. เป็นขั้นตอนที่ protein แยกออกจากกันอย่างชัดเจน



**รูปที่ 2.21** แสดง electrophoresis pattern ของโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) ที่ทราบ MW และ โปรตีนตัวอย่าง (sample protein), A และกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $\log MW$  กับ ค่าอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัว, B ซึ่งทำให้ทราบว่าโปรตีนตัวอย่างมี MW ประมาณ 54,000

2. เติมสาร ampholyte ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของพวกกรดอ่อนและเบสอ่อน (เช่น carboxyls, imidazoles และ amines เป็นต้น) ลงไป เพื่อทำให้เกิด pH gradient ภายใน gel ขณะที่มีการผ่านสนามไฟฟ้าเข้าไป เมื่อมีการเติมโปรตีนที่ต้องการแยกลงไปใน gel โปรตีนจะเคลื่อนที่ผ่านอนุภาคของ gel ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้าม จนกระทั่งถึงบริเวณที่ gel มี pH เท่ากับ pI ของโปรตีน โปรตีนจะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากมีประจุสุทธิเป็น 0 เราจึงสามารถแยกโปรตีนนั้นออกมาได้ตามค่า pI (ดูรูปที่ 2.22 ประกอบ) ระบบอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบนี้ เรียกว่า "Isoelectric focusing gel electrophoresis , IEF gel"



รูปที่ 2.22 แสดงขั้นตอนของการเกิด Isoelectric focusing a.เป็นขั้นตอนานการเตรียมโปรตีนที่ต้องการแยก, ampholyte และ gel เข้าด้วยกัน และ b.เป็นขั้นตอนที่เกิดการแยกของโปรตีน ณ จุด pI เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในระยะเวลาหนึ่ง