# บทที่ 2
# การใช้เครื่องมือ

เครื่องมือจัดเป็นอุปกรณ์ที่จำเป็น และมีการใช้มากในห้องปฏิบัติการทั่วไป และในกระบวนวิชาปฏิบัติการชีวเคมีและเทคโนโลยี (TN 312) นี้ นักศึกษาจะได้เรียนรู้วิธีการใช้เครื่องมือเหล่านั้นอย่างถูกวิธี ได้แก่ เครื่องแก้วต่างๆ เครื่องชั่ง (balance) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer) ซึ่งได้จัดไว้เป็นเครื่องมือส่วนกลางใช้ร่วมกัน ผู้เข้าปฏิบัติการควรศึกษารายละเอียดหลักการและวิธีการใช้ ข้อควรระวัง ให้เข้าใจก่อนการปฏิบัติการทดลอง ปฏิบัติตามขั้นตอนที่กำหนด ช่วยกันรักษาความสะอาดของเครื่องมือและบริเวณโดยรอบ หากเครื่องมือขัดข้องอย่าแก้ไขเอง ให้แจ้งอาจารย์ผู้ควบคุมทันที รายละเอียดของเครื่องมือที่นักศึกษาควรทราบมีดังต่อไปนี้

**1. เครื่องแก้ว (glass ware)**

เครื่องแก้วเป็นอุปกรณ์หลัก หรืออุปกรณ์พื้นฐานที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปความสะอาดของเครื่องแก้วจัดเป็นปัจจัยพื้นฐาน ซึ่งมีความสำคัญที่จะทำให้การทดลองประสบผล สำเร็จหรือไม่ การใช้ปริมาตรที่ถูกต้องเป็นอีกปัจจัยที่จะทำให้การทดลองประสบผลสำเร็จ

เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับวัสดุที่นำมาผลิตเครื่องแก้วนั้นๆ ได้แก่

-**Borosilicate** เครื่องแก้วชนิดนี้จะทนความร้อนได้ดี และทนต่อการกัดกร่อนของสารเคมี กรดและด่าง ได้แก่ เครื่องแก้วของ Kimax และ Pyrex

-**Alumina-silicate** เครื่องแก้วชนิดนี้จะมีความทนทาน และทนความร้อนสูงได้ดีกว่าเครื่องแก้วที่ทำจาก borosilicate เช่น เครื่องแก้วของ Corex

-**Soda - lime** เครื่องแก้วชนิดนี้ไม่ทนต่อความร้อน นิยมใช้ทำเครื่องแก้วที่ใช้แล้วทิ้ง มีข้อควรระวังสำหรับการใช้เครื่องแก้วชนิดนี้คือ เป็นเครื่องแก้วชนิดที่มีความเป็นด่างอยู่ในตัว จึงควรล้างด้วยน้ำขจัดไอออน ก่อนนำไปใช้งาน

เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการทั่วไป สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะของการใช้งานได้ดังนี้

**1.1 เครื่องแก้วที่ใช้เป็นภาชนะบรรจุ**

เครื่องแก้วประเภทนี้จะมีขีดบอกปริมาตรคร่าวๆ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้วัดปริมาตร ใช้เป็นภาชนะบรรจุในการเตรียมสารละลาย หรือผสมสารละลาย ได้แก่ บีกเกอร์ (beakers) ขวดรูป (erlenmeyer flasks) และหลอดทดลอง (test tubes)

**1.2 เครื่องแก้วที่ใช้วัดปริมาตร**

เครื่องแก้วประเภทนี้มีขีดบอกปริมาตร ซึ่งได้ทำการวัดเทียบกับปริมาตรมาตราฐานแล้ว ได้แก่ กระบอกตวง (cylinder) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) บิวเรตต์ (burette) และปิเปตต์ (pipette) ซึ่งแต่ละชนิดจะมีความถูกต้องแม่นยำแตกต่างกัน การเลือกใช้งานขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดลอง ในกระบวนวิชาปฏิบัติการชีวเคมีและเทคโนโลยีนี้จะเกี่ยวข้องกับการวัดปริมาตรหลายปฏิบัติการ ทั้งในปริมาตรระดับ

**<u>กระบอกตวง (measuring cylinders หรือ graduated cylinders)</u>**

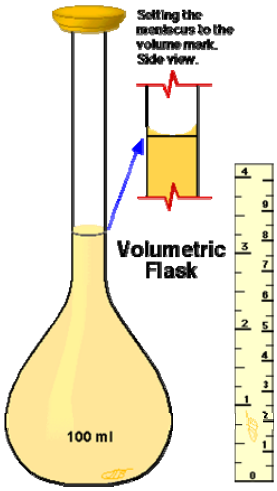
เป็นเครื่องแก้วที่มีลักษณะเป็นกระบอก มีขีดบอกปริมาตรที่แบ่งย่อยหลายขีดที่ปริมาตรต่างๆ และมีขนาดต่างๆ กัน ใช้สำหรับวัดปริมาตรของสารละลายในระดับปริมาตรเป็นมิลลิลิตร เพื่อความถูกต้องในการวัด **ควรเลือกขนาดของกระบอกตวงให้พอเหมาะกับปริมาตรที่ต้องการตวง** เช่น ใช้ขนาด 25 มิลลิลิตร ในการตวงปริมาตรของสารละลาย 15- 25 มิลลิลิตร และใช้ขนาด 250 มิลลิลิตร ในการตวงปริมาตรของสารละลาย 150 - 250 มิลลิลิตร เป็นต้น ซึ่งความแม่นยำจะอยู่ในระดับ ±1% ไม่เหมาะที่จะใช้ในการวิเคราะห์แบบปริมาณ (quantitative analysis) ดังวิธีการอ่านปริมาตร รูปที่ 2.1

**<u>ขวดวัดปริมาตร (volumetric flasks)</u>**

เป็นขวดวัดปริมาตรลักษณะกลมก้นแบน (flatter bottom) ก้านขวดยาว ดังรูปที่ 2.2 มีขีดบอกปริมาตรจำเพาะค่าหนึ่งเพียงขีดเดียวที่ก้านขวด ใช้สำหรับวัดปริมาตรของสารละลายในระดับปริมาตรเป็นมิลลิลิตรจำเพาะขนาดเดียว มีขนาดต่างๆ กัน ให้เลือกใช้ ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร มีความแม่นยำสูงกว่ากระบอกตวง เช่น ขนาด 500 มิลลิลิตร ± 0.2 มิลลิลิตร มีวิธีการอ่านปริมาตรเช่นเดียวกับกระบอกตวง

(ก) (ข)

**<u>รูปที่ 2.1</u>** แสดงกระบอกตวงขนาดต่างๆ (ก) และวิธีการอ่านปริมาตรสารละลายในกระบอกตวง (ข)



**<u>รูปที่ 2.2</u>** แสดงขวดวัดปริมาตร (volumetric flasks) และวิธีการอ่านปริมาตรสารละลายในขวดวัดปริมาตร

**ที่มา**: http://inst.sfcc.edu/chemscape/catofp/mixpour/volflask/volflask.htm

**<u>ปิเปตต์ (Pipette)</u>**

เป็นเครื่องแก้วที่มีลักษณะหลอดแก้วขนาดเล็กมีขีดบอกปริมาตร มีขนาดต่างๆ กันในระดับมิลลิลิตร ใช้ตวงหรือดูดสารละลายเมื่อต้องการปริมาตรน้อยๆ และต้องการความถูกต้อง มักใช้คู่กับลูกยาง (pipette rubber bulb) ที่ใช้ใน TN 312 มีขนาด 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 และ 10 มิลลิลิตร โดยปิเปตต์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการแบ่งเป็น 2 แบบ คือแบบที่ใช้ในการถ่ายเทสารละลายจากภาชนะหนึ่งไปยังอีกภาชนะหนึ่งในปริมาตรที่ต้องการ เรียกปิเปตต์แบบนี้ว่า “to deliver” หรือ “T.D.” และแบบที่ใช้ในการวัดปริมาตรสารละลาย เรียกปิเปตต์แบบนี้ว่า “to contain” หรือ “T.C.” ทั้งสองชนิดนี้มีหลายชนิดขึ้นกับการออกแบบ เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน มีชื่อเรียกและวิธีการใช้แตกต่างกันดังนี้คือ

<u>ปิเปตต์แบบกระเปาะ</u> (volumetric หรือ transfer pipette)

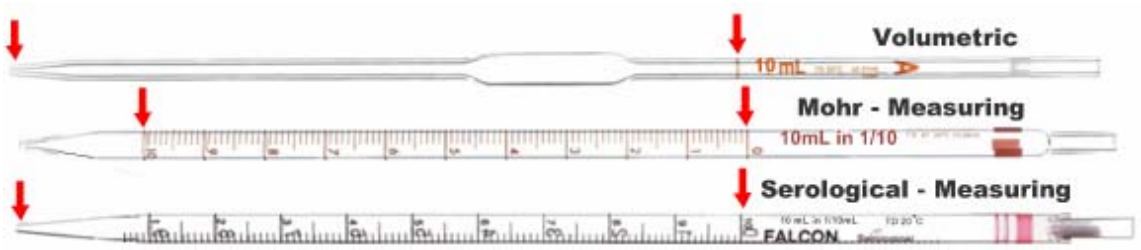
เป็นปิเปตต์แบบ T.D. มีกระเปาะตรงกลาง และมีขีดบอกปริมาตรเพียงขีดเดียวตามที่กำหนด โดยไม่มีการแบ่งขีดย่อย ใช้ในการถ่ายเทสารละลาย โดยการปล่อยสารละลายให้ออกจนหมดแล้วแตะปลายของปิเปตต์กับผิวด้านในของภาชนะรองรับ ไม่ต้องเป่าสารละลายหยดสุดท้ายที่เหลือค้างออก จึงจะได้ปริมาตรที่ถูกต้อง

<u>ปิเปตต์แบบมอห์ร</u> (Mohr pipette)

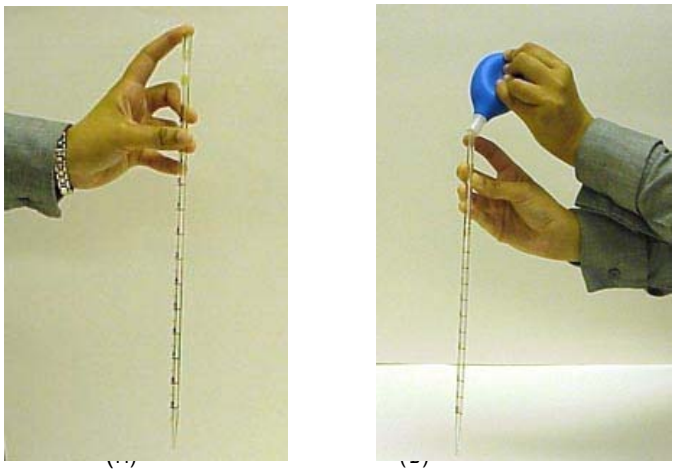
เป็นปิเปตต์แบบ T.D. มีหลายขนาด มีขีดแบ่งปริมาตรเป็นส่วนย่อยตั้งแต่ 0.1 มิลลิลิตร จนถึง 0.01 มิลลิลิตร มีขีดปริมาตรตั้งแต่ขีดศูนย์ลงไป แต่ไม่มีการแบ่งขีดไปจนถึงปลายล่างสุด ดังนั้นวิธีใช้จึงไม่ควรปล่อยสารละลายให้ไหลออกจนถึงปลายล่างสุดที่ไม่มีขีดปริมาตร และไม่ต้องเป่าสารละลายออก เพราะจะทำให้ได้ปริมาตรเกินความเป็นจริง

<u>ปิเปตต์แบบเซโรโลจิคัล</u> (serological pipette)

เป็นปิเปตต์แบบ T.D. มีลักษณะคล้ายปิเปตต์แบบมอห์ร แต่มีขีดแบ่งปริมาตรเป็นส่วนย่อยจนถึงปลายล่างสุด ดังนั้นหลังจากการถ่ายเทสารละลายจนหมดแล้วต้องเป่าให้สารละลายที่ค้างอยู่ที่ปลายออกให้หมด จึงจะได้ปริมาตรที่ถูกต้อง จะสังเกตได้โดยมีแถบฝ้าทึบหรือวงสองวงเป็นเครื่องบ่งชี้อยู่ด้านบนของปิเปตต์แต่ถ้าไม่มีเครื่องบ่งชี้ดังกล่าว ให้แตะปลายปิเปตต์กับผิวด้านในของภาชนะรองรับจนสารละลายออกหมดโดยไม่ต้องเป่าปิเปตต์



**<u>รูปที่ 2.3</u>** แสดงลักษณะปิเปตต์แบบต่างๆ



**<u>รูปที่ 2.4</u>** แสดงวิธีการจับปิเปตต์ที่ถูกต้อง (ก) และวิธีการใช้ลูกยาง (pipette rubber bulb) กับปิเปตต์ (ข)

เครื่องมือสำหรับใช้วัดปริมาตรนอกจากเครื่องแก้วดังกล่าวแล้ว ยังมีอุปกรณ์ที่ใช้วัดและดูดสารละลายในลักษณะเดียวกันคล้ายปิเปตต์ แต่อาศัยแรงดูดแบบระบบปั๊มพ์จากมือ มีหลายขนาดให้เลือกใช้ระดับไมโครลิตรและมิลลิลิตร แต่นิยมใช้กับปริมาตรน้อยๆ ในระดับไมโครลิตรมากกว่า อุปกรณ์ดังกล่าวได้แก่

**<u>ออโตปิเปตต์</u> (auto-pipette)**

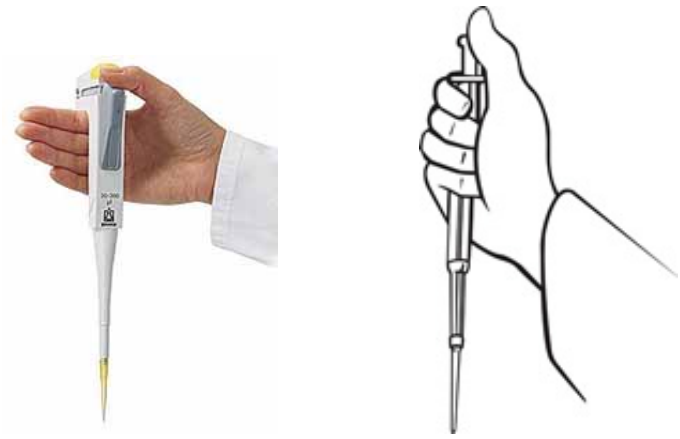
เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการดูดสารละลาย ที่ได้รับการพัฒนาเพื่อให้สะดวกต่อการใช้งานมากยิ่งขึ้น (ดังรูปที่ 2.5) ใช้สำหรับดูดของเหลวที่มีปริมาตรน้อยในระดับไมโครลิตร และมิลลิลิตร มีทั้งที่มีปริมาตรจำเพาะค่าหนึ่ง เช่น 1, 10, 20, 50, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร และสามารถปรับปริมาตรได้ เช่น 0.1 ถึง 2 ไมโครลิตร 1 ถึง 10 ไมโครลิตร 10 ถึง 200 ไมโครลิตร 100 ถึง 1,000 ไมโครลิตร 500 ถึง 5,000 ไมโครลิตร และ 1 ถึง 10 มิลลิลิตร เป็นต้น มีความแม่นยำสูง ลักษณะเป็นด้ามดูดใช้คู่กับส่วนที่ดูด ซึ่งนำมาต่อเรียกว่า “pipette tip” มีขนาดใช้คู่กับขนาดของออโตปิเปตต์ ใช้แล้วทิ้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารละลาย

(ก) (ข)

**<u>รูปที่ 2.5</u>** แสดงออโตปิเปตต์ ขนาดต่างๆ (ก) และ ปิเปตต์ทิป (ข)

**ที่มา**: www.i2sinc.com

หลักการที่สำคัญในการใช้ออโตปิเปตต์ คือต้องสังเกตดูว่าเป็นออโตปิเปตต์ชนิดใด และเลือกใช้ขนาดของออโตปิเปตต์ให้ใกล้เคียงกับปริมาตรของละลายที่ต้องการดูด เช่น ถ้าต้องการปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร จะต้องใช้ออโตปิเปตต์ขนาด 0.10 มิลลิลิตร หรือ 0.20 มิลลิลิตรไม่ควรใช้ ออโตปิเปตต์ขนาด 1.0 มิลลิลิตร หรือมากกว่านี้ดูด เพราะจะทำให้การอ่านปริมาตรมีโอกาสผิดพลาดได้ แม้ว่าออโตปิเปตต์จะมีขนาดเป็นมิลลิลิตร แต่การใช้ส่วนใหญ่ควรจะใช้ในปริมาตรน้อยๆ ในหน่วยของไมโครลิตรจะดีกว่า



**<u>รูปที่ 2.6</u>** แสดงวิธีการที่ถูกต้องในการจับออโตปิเปตต์

**ที่มา**: www.rapidcalservices.com

**<u>รีปิเปตต์ (repipette)</u>**

ปัจจุบันได้มีการนำเอาระบบของปั้มพ์มาผลิตอุปกรณ์ที่ใช้ในการดูดจ่ายสารละลาย ที่ เรียกว่า รีปิเปตต์ เป็นออโตปิเปตต์ชนิดที่ใช้จ่ายสารละลายในปริมาตรที่ต้องการได้หลายๆ ครั้ง ในการดูดเพียงครั้งเดียว เช่น ในกรณีมีจำนวนหลอดทดลองที่ต้องการปริมาตรเท่ากัน จำนวนมากๆ โดยรีปิเปตต์นี้ลักษณะเป็นกระบอกสูบ มีสเกลบอกปริมาตร และชุดตั้งปริมาตรตามต้องการให้ปริมาตรคงที่ (ดังรูป 2.7 ก) เมื่อทำการดูดสารละลายโดยใช้แรงมือ (ระบบปั้มพ์มือ) ให้ดึงปลายกระบอกสูบให้สุดจะได้สารละลายเต็มกระบอก ตั้งระดับปริมาตรที่ต้องการ ทำการจ่ายสารใส่หลอด เช่นเดียวกับการใช้ออโตปิเปตต์ มีหลายขนาดให้เลือกใช้ คือ 0.025 – 0.25 มิลลิลิตร 0.10 – 0.5 มิลลิลิตร (กระบอกสูบมีลักษณะคล้ายกับกระบอกเข็มฉีดยา ดังรูป 2.7 ข) 1.0 – 50 มิลลิลิตร เป็นต้น เหมาะกับงานที่ทำเป็นประจำ และตัวอย่างครั้งละมากๆ เช่น งานในโรงพยาบาล มีความแม่นยำน้อยกว่าออโตปิเปตต์

(ก) (ข)

**<u>รูปที่ 2.7</u>** แสดงชุดรีปิเปตต์ (repipette) แบบต่างๆ

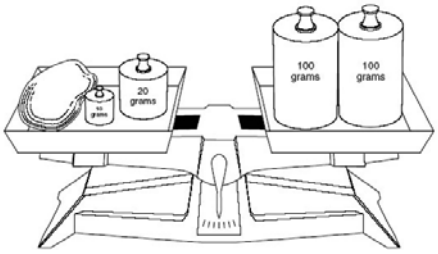
**2. เครื่องชั่ง (balance)**

เครื่องชั่งในห้องปฏิบัติการทั่วไปมีอยู่หลายแบบ แต่ละแบบจะมีความละเอียดแตกต่างกัน ดังนั้น การเลือกใช้เครื่องชั่งให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของความถูกต้องแม่นยำเหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการจึงมีความสำคัญ โดยถ้าต้องการชั่งสารปริมาณครั้งละมากๆ ไม่ต้องการความละเอียดควรใช้เครื่องชั่งหยาบ ถ้าชั่งสารครั้งละน้อยๆ แต่ต้องการความละเอียดและแม่นยำสูงควรเลือกใช้เครื่องชั่งแบบละเอียดหรือวิเคราะห์ อย่าชั่งสารปริมาณน้อยโดยใช้ภาชนะรองชั่งที่มีขนาดใหญ่ เช่น อย่าชั่งสาร 0.1 กรัม โดยขวดชั่งหรือบีกเกอร์ที่มีน้ำหนัก 100 กรัม จะทำให้ความแม่นยำลดลง เพราะการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเพียงเล็กน้อยจากน้ำหนักรวมที่มากกว่ามาก ก็ทำให้ความถูกต้องลดลงไปได้มาก และความแม่นยำของการชั่งน้ำหนักยังขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ต้องการใช้ เช่น ต้องการใช้สารปริมาณ 0.1 - 0.5 กรัม (100 – 500 มิลลิกรัม) ควรใช้เครื่องชั่งที่ให้ความแม่นยำในระดับ ± 1 มิลลิกรัม

***การจัดวางเครื่องชั่งมีความสำคัญมาก โดยต้องวางอยู่บนพื้นระนาบตรงไม่เอียง*** สำหรับเครื่องชั่งไฟฟ้าจะมีเครื่องบ่งชี้ระดับที่เรียกว่า “ลูกน้ำ” เป็นองค์ประกอบติดอยู่กับเครื่องชั่ง

**<u>เครื่องชั่งแบบหยาบ</u>**

เครื่องชั่งแบบหยาบจะมีอยู่ 2 ลักษณะ คือ เครื่องชั่งแบบสองจานซึ่งต้องใช้ตุ้มน้ำหนักวางบนจานข้างหนึ่ง และสารที่ต้องการชั่งวางบนจานอีกข้างหนึ่ง (ดังรูปที่ 2.8 ก) โดยมีตัวเลื่อนบนรางสำหรับปรับน้ำหนักที่ละเอียดมากขึ้น ความแม่นยำน้อย อยู่ในระดับทศนิยม 1 ตำแหน่ง และเครื่องชั่งแบบจานเดี่ยว (ดังรูปที่ 2.8 ข) มีหน้าปัดเป็นสเกลบอกน้ำหนัก มักจะมีตัวเลขบอกขีดจำกัดของน้ำหนักที่ชั่งได้ไว้หน้าเครื่อง จะให้ความแม่นยำที่น้อยกว่าคือในระดับทศนิยม 1 หรือ 2 ตำแหน่ง โดยสามารถชั่งน้ำหนักได้ในช่วง 0.01 กรัม ถึง 250-300 กรัม




(ก)

**<u>รูปที่ 2.8</u>** แสดงเครื่องชั่งหยาบชนิดสองจาน (ก) และเครื่องชั่งแบบจานเดี่ยว (ข)

**<u>เครื่องชั่งแบบละเอียด หรือแบบวิเคราะห์</u> (analytical balance)**

เป็นเครื่องชั่งที่สามารถอ่านค่าน้ำหนักได้ละเอียดในหน่วยมิลลิกรัม มีความแม่นยำสูง มีความไว (sensitivity) ต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก จะให้ความแม่นยำระดับทศนิยม 4 ตำแหน่ง โดยสามารถชั่งน้ำหนักได้ในช่วง 0.1 มิลลิกรัม ถึง 100 - 150 กรัม โดยทั่วไปจะเป็นเครื่องชั่งไฟฟ้า มีจานเดี่ยวสำหรับวางสารที่ต้องการชั่งอยู่ในตู้กระจก ซึ่งมีบานกระจกด้านข้างเลื่อนปิด - เปิดได้ (ดังรูปที่ 2.9) เพื่อป้องกันการสั่นสะเทือนเนื่องจากแรงลมภายนอก ที่อาจรบกวนในการชั่งสารปริมาณน้อย และแสดงผลน้ำหนักบนหน้าปัดเป็นตัวเลขไฟฟ้า

**<u>รูปที่ 2.9</u>** แสดงเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียดชนิดจานเดี่ยว

**<u>ข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องชั่งแบบวิเคราะห์</u>**

เครื่องชั่งแบบละเอียดมักมีกลไกพิเศษ ซึ่งถ้าใช้ไม่ถูกวิธีจะทำให้ชำรุดเสียหายได้ จึงมีข้อควรปฏิบัติในการใช้เครื่องชั่งแบบวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

1. เครื่องชั่งต้องตั้งอยู่ในแนวระนาบที่มีระดับเท่ากัน และมีฐานที่มั่นคง ปราศจากการสั่นสะเทือน โดยสังเกตเครื่องบ่งชี้ระดับที่เรียกว่า “ลูกน้ำ” ซึ่งมีลักษณะเป็นฟองอากาศที่บรรจุในตลับพลาสติกติดอยู่กับเครื่อง จะต้องอยู่ตรงกลางตลับ
2. ก่อนใช้เครื่องชั่ง ตรวจดูว่าบนจานสำหรับวางสารที่จะชั่งสะอาดหรือไม่ ถ้ามีสารอื่นหกอยู่ให้ปัดด้วยแปรงขนอ่อน ถ้าสเกลไม่ชี้ตำแหน่งศูนย์ ให้ปรับตามที่คู่มือระบุไว้ ในปัจจุบันเครื่องชั่งแบบวิเคราะห์ส่วนใหญ่ สามารถปรับน้ำหนักภาชนะชั่งให้เป็นศูนย์ได้ก่อนชั่งสาร (tarring)
3. ห้ามชั่งสารที่มีฤทธิ์กัดกร่อน เช่น กรดต่างๆ ถ้าจำเป็นให้ใส่สารดังกล่าวในขวดที่ปิดสนิท เพื่อป้องกันไอระเหยของสารดังกล่าวในการชั่งสาร ห้ามวางสารลงบนจานของเครื่องชั่งโดยตรง เพราะอาจเกิดปฏิกิริยาการกัดกร่อนจากสารได้ ต้องใส่สารที่ต้องการชั่งในภาชนะรองรับ เช่น กระดาษสำหรับชั่งสาร (weighing paper) ซึ่งมีผิวเคลือบมัน หรือกระดาษกรอง แผ่นอลูมินัม(aluminum foil) หรือกระจกนาฬิกา เมื่อมีการหกของสารให้ปัดสารออกด้วยแปรงขนอ่อนทันที เพราะถ้าทิ้งไว้สารอาจถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนในอากาศ ทำให้มีฤทธิ์การกัดกร่อนได้ **ควรจำไว้ว่า สารที่หกเป็นสารชนิดใดผู้ที่ทำหกจะเป็นผู้ที่รู้เท่านั้น ผู้อื่นไม่สามารถรู้ได้**
4. สารที่ต้องการชั่งควรมีอุณหภูมิใกล้เคียงหรือเท่ากับอุณหภูมิห้อง การชั่งสารที่มีอุณหภูมิแตกต่างจากอุณหภูมิห้องมากจะทำให้การชั่งน้ำหนักคลาดเคลื่อน
5. ควรตรวจสอบน้ำหนักสูงสุดที่ชั่งได้ จะระบุไว้ที่บริเวณหน้าปัดของเครื่อง(โดยทั่วไปจะเขียนว่า Max. หรือ Maximum) ห้ามชั่งของที่มีน้ำหนักเกินค่า Max. เด็ดขาด และควรชั่งของ

ที่มีน้ำหนักไม่เกิน 90 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักสูงสุด (ค่า Max.) เพื่อช่วยลดความเสื่อมจากการใช้งานของตัวเครื่องชั่ง

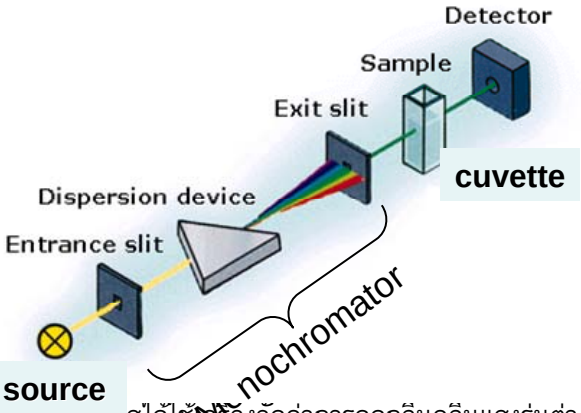
6. เมื่อใช้เครื่องชั่งเสร็จแล้ว ทำความสะอาดจานชั่งด้วยแปรงขนอ่อน แล้วเลื่อนบานกระจกด้านข้างปิดให้เรียบร้อย และรักษาความสะอาดบริเวณรอบๆ เครื่องชั่งด้วย

***หมายเหตุ** *การ tarring* ไม่ควรใช้ภาชนะที่มีน้ำหนักมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสารที่จะชั่ง เช่น หากต้องการชั่งสารเคมีน้ำหนัก 10 กรัม ไม่ควรใช้ภาชนะที่มีน้ำหนักมากกว่า 1 กรัมในการชั่งสารเคมีดังกล่าว

**3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)**

เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงคลื่นต่างๆ ของสารละลายที่บรรจุในหลอดพิเศษเรียกว่า คิวเวตต์ (cuvette) หรือเซลล์ (รูป 2.10) มีลักษณะคล้ายหลอดทดลอง หรือเป็นหลอดสี่เหลี่ยมทำมาจากวัสดุใสที่มีขนาดแน่นอน ได้แก่ ควอร์ทซ (quartz) ใช้วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ 200 - 400 นาโนเมตร และพลาสติกหรือแก้วใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เห็นด้วยตาเปล่า (visible light) ที่ 400 – 700 นาโนเมตร สำหรับคิวเวตต์ที่เป็นหลอดสี่เหลี่ยมมักจะทำให้มีด้านที่เป็นฝ้าไว้สองด้าน เพื่อกำหนดเป็นด้านที่มือจับป้องกันการเกิดรอยนิ้วมือรบกวนการวัดแก่ด้านใสที่ให้แสงผ่าน

เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงนี้มีหลายแบบขึ้นอยู่กับความละเอียด และช่วงคลื่นของแสงที่ใช้ องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่องได้แก่ แหล่งกำเนิดแสง (light source) ตัวเลือกช่วงคลื่นแสง (monochromator) ที่บรรจุสารละลายตัวอย่าง (cuvettes) ตัววัดความเข้มของแสง (detector) อาจจะเป็นหน้าปัดสเกล หรือจอ LCD บอกค่าการดูดแสงหรือ % แสงส่องผ่าน (absorbance หรือ % transmittance) และอาจมีเครื่องบันทึกประกอบด้วย (ดังรูปที่ 2.11)




**รูปที่ 2.11**

ในการทดลองนี้ท่านจะมีโอกาสได้ใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลืนแสงรุ่นต่างๆ ดังนี้

**Spectronic 20, Genesys**

ซึ่งมีองค์ประกอบและวิธีการใช้งานง่าย โดยสามารถวัดแสงได้ในช่วงคลื่นของแสงที่เห็นด้วยตาเปล่าเท่านั้น (visible light) คือตั้งแต่ประมาณ 350 ถึง 700 นาโนเมตร

( ก ) (ข)

**<u>รูปที่ 2.12</u>** แสดงเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง รุ่น Spectronic 20 Genesys (ก) และ จอ LCD บอกค่าในช่วงคลื่นของแสง (nm) และค่าการดูดแสง (A) (ข)

**<u>วิธีการใช้เครื่อง Spectronic 20 Genesys</u>**

**กรณีที่ใช้วัดค่า Absorbance และ Transmittance มีดังนี้**

1. กดปุ่ม △ ▽ nm (325 ถึง 1100 nm) เลือกค่าความยาวคลื่นที่ต้องการ
2. กดปุ่ม A/T/C (A=Absorbance, T=Transmittance, C=Concentration) เลือก Mode ที่ต้องการ
3. ใส่ blank แล้วกดปุ่ม 0 ABS/100%T เพื่อทำการ setting blank
4. ใส่ตัวอย่างแล้วอ่านค่าที่วัดได้
5. เมื่อทำการวัดตัวอย่างทั้งหมดแล้ว นำคิวเวตต์ที่บรรจุสารตัวอย่างออกจากเครื่อง ล้างคิวเวตต์ด้วยน้ำสะอาดหรือน้ำกลั่น คว่ำให้แห้ง ห้ามเช็ดด้วยกระดาษทิชชู่ ผ้า หรือนำไปอบแห้ง ปิดเครื่องให้เรียบร้อยก่อนออกจากห้องปฏิบัติการ

## กรณีการใช้วัดค่าความเข้มข้น

1. เลือก mode การวัดค่าความเข้มข้น จากปุ่ม A/T/C เลือก C
2. ใส่สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ในช่องใส่สาร
3. กดปุ่มเข้าไปที่ standard จากหน้าจอเครื่อง แล้วป้อนค่าความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน
4. นำสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ออกจากช่องใส่สาร
5. ใส่สารตัวอย่างที่ต้องการวัดลงในช่องใส่สาร
6. อ่านค่าที่วัดได้

**<u>วิธีการใช้เครื่อง Spectronic Genesys 5</u>**

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงรุ่นนี้ สามารถวัดการดูดกลืนคลื่นแสงได้ในช่วงคลื่นของแสงที่เห็นด้วยตาเปล่า (visible light) และช่วงอัลตราไวโอเลตได้ (UV light) ได้ คือตั้งแต่ 200 - 1100 นาโนเมตร สามารถใส่คิวเวตต์ได้ 8 อันพร้อมๆ กัน และเลือกคิวเวตต์ที่ต้องการอ่านค่าได้ (รูปที่ 2.13) โดยมีวิธีการใช้งาน ดังนี้

**<u>รูปที่ 2.13</u>** แสดงเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงรุ่น Spectronic Genesys 5

**กรณีที่ใช้วัดค่า Absorbance และ Transmittance มีดังนี้**

1. กดปุ่ม △ ▽ nm (200 -1100 นาโนเมตร) เลือกค่าความยาวคลื่นที่ต้องการ
2. กดปุ่ม A/T/C (A=Absorbance, T=Transmittance, C=Concentration) เลือก mode ที่ต้องการ
3. ใส่ blank แล้วกดปุ่ม 0 ABS/100%T เพื่อทำการ setting blank
4. ใส่ตัวอย่างแล้วอ่านค่าที่วัดได้

## กรณีการใช้วัดค่าความเข้มข้น

1. เลือก mode การวัดค่าความเข้มข้น จากปุ่ม A/T/C เลือก C
2. ใส่สารละลายมาตรฐาน (standard solution) ในช่องใส่สาร
3. กดปุ่มเข้าไปที่ standard จากหน้าจอเครื่อง แล้วป้อนค่าความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน
4. นำสารละลายมาตรฐาน (standard solution) ออกจากช่องใส่สาร
5. ใส่สารตัวอย่างที่ต้องการวัดลงในช่องใส่สาร
6. อ่านค่าที่วัดได้

**<u>วิธีการใช้เครื่อง BECKMAN DU® 650 Spectrophotometer</u>**

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงรุ่นนี้ จัดเป็น scanning spectrometer คือเครื่องที่สามารถวัดเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นแสง (wavelength) ที่เปลี่ยนแปลงไปแบบอัตโนมัติของสารละลายตัวอย่าง หรือที่เรียกว่า สเปกตรัม สามารถวัดการดูดกลืนคลื่นแสงได้ทั้งช่วงคลื่นของ visible light และช่วง UV light คือตั้งแต่ 200 - 1100 นาโนเมตร มีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีโปรแกรมสำเร็จสำหรับคำนวณหาค่าทางสถิติของปริมาณ หรือความเข้มข้น มีหน่วยความจำสำหรับเก็บข้อมูลสามารถประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย เช่น สามารถใช้วัดการดูดกลืนคลื่นแสงได้ครั้งละหลายคลื่นแสง (multiple wavelength) พร้อมๆ กัน สามารถต่อกับเครื่องควบคุมอุณหภูมิได้ วิธีการใช้งานเช่นเดียวกับเครื่อง **Spectronic Genesys 5**

**<u>รูปที่ 2.14</u>** แสดงเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงรุ่น BECKMAN DU 650

## <u>ข้อควรปฏิบัติในการใช้งานเครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง</u>

1. ควรอุ่นเครื่อง (warm) โดยการเปิดเครื่องทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อเตรียมหลอดกำเนิดแสงให้ปล่อยช่วงแสงที่คงที่ก่อนการใช้งาน ปัจจุบันเครื่องบ้างยี่ห้อไม่จำเป็นต้องอุ่นเครื่องก่อนก็ได้
2. ก่อนปิดเครื่องควรตรวจดูว่ามีอะไรตกค้างอยู่หรือไม่ ถ้ามีควรนำออกก่อนปิดเครื่อง
3. ขณะที่เครื่องกำลังทำการตรวจสอบระบบตัวเอง (primary check) หรือขณะที่เครื่องอยู่ในสถานะ setting blank และขณะที่อ่านค่าการดูดกลืนแสง ห้ามเปิดฝาเด็ดขาด
4. อ่านคู่มือการใช้งาน กรณีที่จะทำการเปลี่ยนแปลงในปุ่ม utility
5. ควรใช้เพียงปลายนิ้วสัมผัสที่ปุ่มต่างๆ อย่าใช้ปลายเล็บกด
6. การวางเครื่องไม่ควรวางใกล้เครื่อง NMR, centrifuge และในที่ชื้น หรือ มีฝุ่น

**4. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (centrifuge)**

สารที่ไม่ละลายหรือแขวนลอยในสารละลายในหลอด เมื่อตั้งทิ้งไว้สามารถแยกออกจากสารละลายได้ โดยเป็นตะกอนสู่ก้นหลอดได้ตามแรงโน้มถ่วงของโลก (gravitational force; g) ทั้งนี้จะขึ้นกับขนาดของสาร ถ้ามีขนาดใหญ่จะใช้เวลาน้อย และสารที่มีขนาดเล็กจะใช้เวลามากขึ้น แต่ถ้าสารมีขนาดเล็กมากไม่สามารถตะกอนได้จะต้องเพิ่มแรงโน้มถ่วงของโลกให้มากขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยการนำสารละลายนั้นไปทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วคงที่ จะเกิดมีแรงหนีศูนย์กลางเกิดขึ้นกระทำต่อสาร เรียกว่า “centrifugal force” ซึ่งจะสัมพันธ์กับแรงโน้มถ่วงโลก เรียกว่า relative centrifugation force (RCF) เช่น ถ้าค่า RCF เป็น 500 x g แสดงว่า centrifugal force มีค่ามากกว่าแรงโน้มถ่วง 500 เท่า

เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการเพิ่มแรงโน้มถ่วงให้กับสารที่แขวนลอยในสารละลาย หรือใช้ในการแยกสารตัวอย่างที่ไม่ละลาย หรือแยกตะกอนออกจากสารละลาย โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างรอบแกน หรือภายใต้สนามการหมุนเหวี่ยง (centrifugal field) นั่นเอง สำหรับในปฏิบัติการ TN312 สารตัวอย่างหรือตะกอนจะได้แก่ เซลล์ ออร์แกเนลล์ และสาร ชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน ดีเอ็นเอ เป็นต้น โดยในการเลือกความเร็วรอบที่ใช้นั้น ขึ้นกับขนาด รูปร่าง ความหนาแน่น ของสารที่ต้องการแยก และความหนืดของสารละลาย

**หลักการ**ปั่นเหวี่ยงสาร พบว่าเมื่อวัตถุหมุนเหวี่ยงอยู่รอบแกนใดๆ ด้วยความเร็วคงที่รอบแกน ซึ่งเรียกว่า **“ความเร็วเชิงมุม (ω)”** จะทำให้มีแรงหนีศูนย์กลางเกิดขึ้น เรียกว่า **“F”**

ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงจะขึ้นกับขนาดอนุภาค หรือมวลของสารที่ต้องการปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน ถ้ามีระยะทางจากแกน = r และ ถ้า m = มวลสาร จะได้สมการ

$$F = m\omega^2 r$$

โดยที่ r = ระยะทางจากแกน (รัศมี) มีหน่วยเป็นเซ็นติเมตร

ω = ความเร็วเชิงมุม (angular velocity) หน่วยเป็น radius/sec

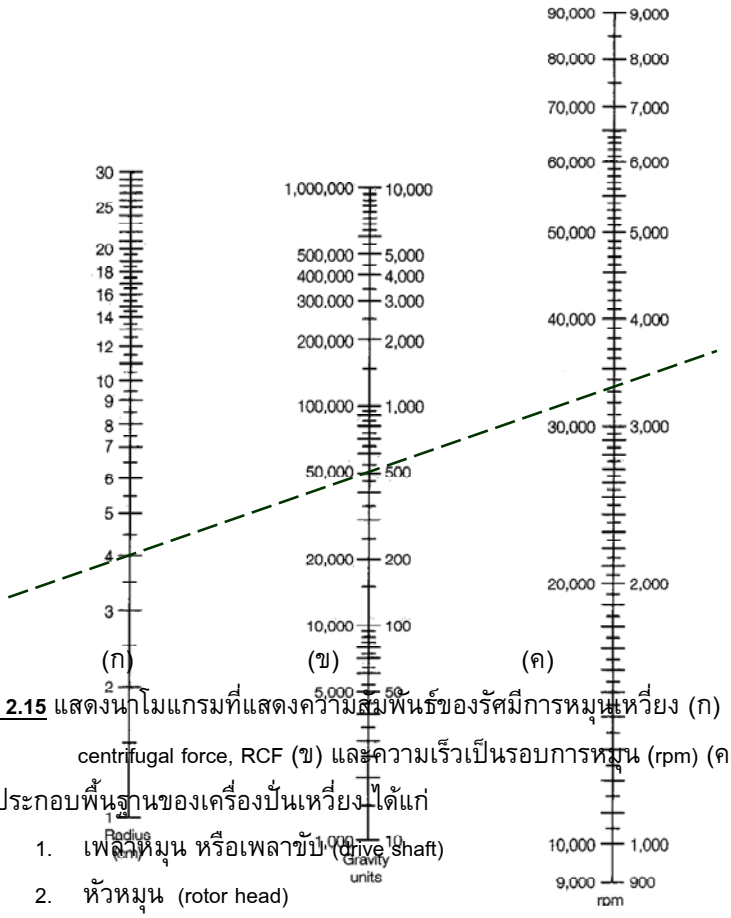
ตามหลักสากล F จะแสดงในหน่วยสัมพันธ์กับค่า g (แรงโน้มถ่วง) ซึ่งคือแรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ (relative centrifugal force) “RCF” คูณด้วยแรงโน้มถ่วงของโลก

$$RCF \times g = m\omega^2 r$$

เมื่อความเร็ววัดเป็นจำนวนรอบต่อนาที (revolutions per minute, RPM) จะได้ความ สัมพันธ์ดังนี้

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} \times (rpm)^2 \times r$$

ความสัมพันธ์นี้ ถ้าต้องการปั่นเหวี่ยงสารด้วยแรง centrifugal force ขนาดหนึ่ง และมีรัศมีการหมุนเหวี่ยงที่ต่างกัน สามารถคำนวณหาความเร็วเป็นรอบการหมุนได้ ซึ่งได้มีการสร้างเป็นสเกลความสัมพันธ์สำเร็จรูปขนานกัน ที่เรียกว่า **"นาโมแกรม"** (namogram) เพื่อความสะดวกในการใช้งาน ดังรูปที่ 2.15 โดยการใช้ไม้บรรทัดทาบบนสเกลให้อยู่บนเส้นตรงเดียวกันทั้งสามสเกลดังเส้นประ แสดง centrifugal force สัมพันธ์กับแรงโน้มถ่วงโลก 50,000 g (ข) เมื่อใช้รัศมีการหมุนเหวี่ยง 4 เซ็นติเมตร (ก) จะเท่ากับการหมุนเป็นรอบ 32,200 รอบต่อนาที (rpm) (ค)

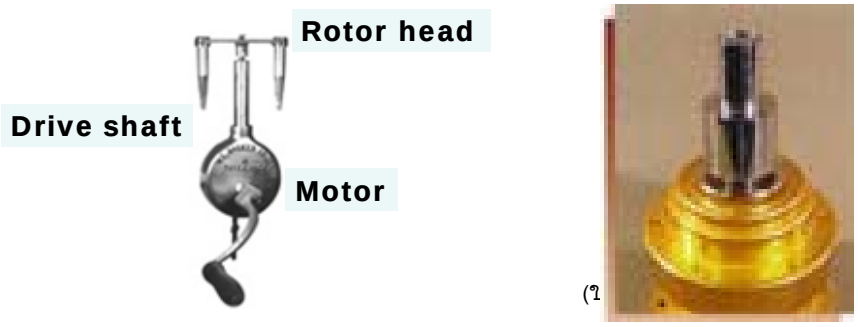



(ก) (ข) (ค)

**รูปที่ 2.15** แสดงนาโมแกรมที่แสดงความสัมพันธ์ของรัศมีการหมุนเหวี่ยง (ก) แรง centrifugal force, RCF (ข) และความเร็วเป็นรอบการหมุน (rpm) (ค)

องค์ประกอบพื้นฐานของเครื่องปั่นเหวี่ยง ได้แก่

1. เพลาหมุน หรือเพลาขับ (drive shaft)
2. หัวหมุน (rotor head)
3. มอเตอร์ (moter)



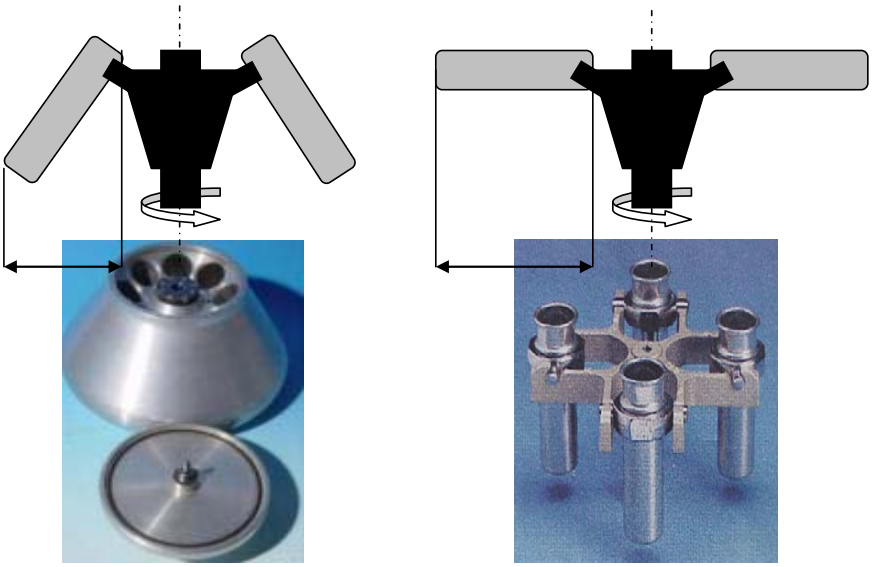

(ข

**รูปที่ 2.16** แสดงส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดมือหมุน (ก) และ drive shaft ของเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดไฟฟ้า (ข)

**เพลาหมุน หรือเพลาขับ (drive shaft)** มีลักษณะเป็นแกนเหล็กกล้าที่ต่อเชื่อมจากส่วน ของมอเตอร์ (moter) ดังรูป 2.16 (ข) สำหรับรองรับภาชนะที่ใส่สารที่ต้องการปั่น ที่เรียกว่า หัวหมุน (rotor head)

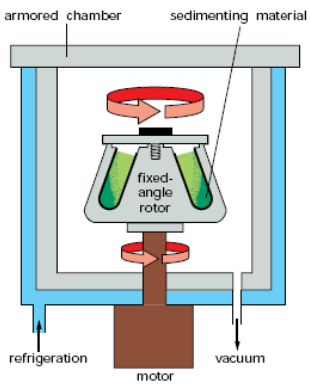
**หัวหมุน (rotor)** ทำหน้าที่รองรับภาชนะที่ใส่สารที่ต้องการปั่น ทำจากวัสดุโลหะ เช่น อลูมิเนียม เหล็กกล้า หรือแทนทาเนียม ซึ่งจะมีน้ำหนักและความทนทานแตกต่างกัน โดยวัสดุที่ทนต่อการกัดกร่อนน้อยที่สุด ได้แก่ อลูมิเนียม วัสดุที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ดีที่สุด ได้แก่ แทนทาเนียม ซึ่งสามารถจำแนกหัวหมุนออกได้เป็น 2 ชนิด

1. ชนิดที่การหมุนทำมุมกับแกนหมุนคงที่ขณะหมุน (angle head or fixed angle rotors) ไม่ว่าจะมีการเพิ่มแรงหมุนมากขึ้น ลักษณะคล้ายอ่างหรือโถข้าว ดังรูปที่ 2.17 (ก)
2. ชนิดที่การหมุนทำมุมกับแกนหมุนเปลี่ยนแปลงขึ้นกับการเพิ่มแรงหมุน จนขนานกับแกนหมุน (horizontal or swinging out rotors) ดังรูปที่ 2.17 (ข)



**รูปที่ 2.17** แสดง rotors ชนิด fixed angle rotors (ก) และชนิด swinging out rotors (ข)

**มอเตอร์** ในปัจจุบันเครื่องปั่นเหวี่ยงทั่วไปที่ใช้ในห้องทดลองมอเตอร์จะเป็นมอร์เตอร์ไฟฟ้า (electric motor) และเป็นชนิดที่หัวหมุนจะอยู่ภายในตัวเครื่อง ที่เรียกว่า ห้องเครื่อง (chamber) ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อความปลอดภัย และมีระบบทำความเย็น หรือระบบสูญญากาศ (vacuum) เป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้นในเครื่องที่มีความเร็วรอบสูงๆ เพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิหรือลดความร้อนที่เกิดขึ้นจากแรงเสียดสีของหัวหมุนกับอากาศ



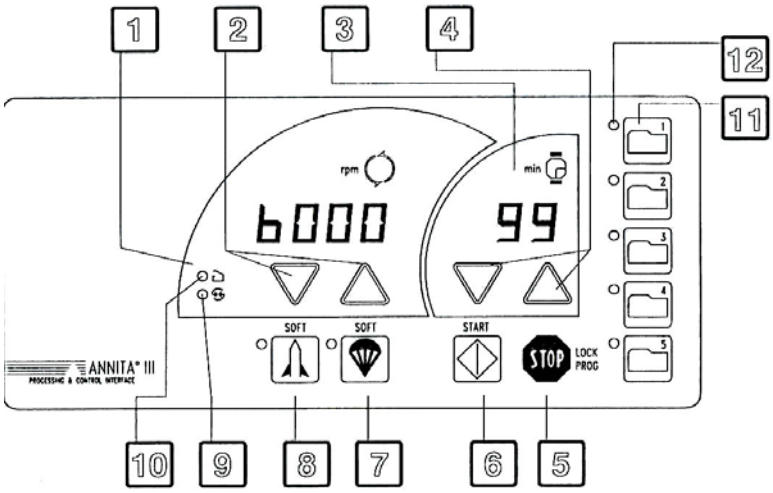

**รูปที่ 2.18** แสดงลักษณะมอเตอร์ ที่มี drive shaft (ก) แ

สำหรับในปฏิบัติการ TN 312 นี้นักศึกษาจะมีโอกาสใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสารหลายแบบ แล้วแต่ความเหมาะสมในแต่ละบทปฏิบัติการ เครื่องปั่นเหวี่ยงที่นักศึกษามีโอกาสได้ใช้มาก คือ เครื่องปั่นเหวี่ยง ALC รุ่น PK 120 และ BECKMAN GS-15 (ดังรูปที่ 2.19) ด้วยเหตุนี้จะอธิบายรายละเอียดการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่นนี้โดยสังเขป

(ก) (ข)

**<u>รูปที่ 2.19</u>** แสดงเครื่องปั่นเหวี่ยง ALC รุ่น PK 120 (ก) และ BECKMAN GS-15 (ข)

**<u>วิธีการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง ALC รุ่น PK-120</u>**



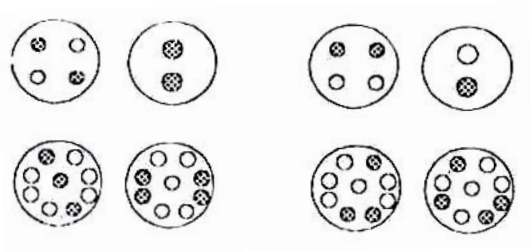

**<u>รูปที่ 2.20</u>** แสดงแผงหน้าปัดควบคุมการใช้งาน ALC รุ่น PK-120

1. ความเร็วรอบ (rpm.) :- ตัวเลขแสดงค่าความเร็วรอบ
2. ปุ่มตั้งค่าความเร็วรอบ SET rpm. KEY (+,-) :- กดปุ่ม $\Delta$ หรือ $\nabla$ สำหรับตั้งค่าความเร็วรอบ
3. เวลา (นาที) :- ตัวเลขแสดงเวลา (ตั้งแต่ 1-99 นาที, 0 = hold)
4. ปุ่มกำหนดเวลาปั่น SET min. Key (+,-) :- กดปุ่ม $\Delta$ หรือ $\nabla$ เพื่อกำหนดเวลาที่ใช้ในการปั่น
5. ปุ่ม Stop :- ใช้หยุดการทำงานของเครื่อง
6. ปุ่ม Start :- สำหรับการเริ่มการทำงานของเครื่อง
7. ปุ่มกำหนดค่าอัตราเบรค :- กำหนดได้ 0-4 ระดับ
8. ปุ่มกำหนดค่าอัตราเร่ง :- กำหนดได้ 1-5 ระดับ
9. สัญญาณไฟสีเขียว (Green LED) :- สัญญาณแสดงการทำงานของเครื่อง
10. สัญญาณไฟสีเหลือง (Yellow LED) :- สัญญาณแสดงว่าเปิดฝาเครื่องได้
11. ปุ่มโปรแกรม 5 ปุ่ม :- สำหรับการเรียกใช้งานที่ป้อนโปรแกรมไว้

12. สัญญาณไฟของปุ่มโปรแกรม

**<u>ขั้นตอนวิธีการใช้</u>**

1. กดปุ่ม ON/OFF ด้านซ้ายของเครื่องเพื่อเปิดเครื่อง
2. เปิดฝาครอบโดยกดปุ่มด้านขวา
3. บรรจุอุปกรณ์ที่ใช้ในการปั่นให้อยู่ในตำแหน่งที่สมดุลกัน
    3.1 กรณี swingout rotor :- ให้ดูหมายเลขที่ bucket (กระเช้า) แล้ววางแขวนบนแกนที่มีหมายเลขตรงกัน
    3.2 บรรจุตัวอย่าง (specimen) ลงใน bucket ให้อยู่ในตำแหน่งที่สมดุลกัน



4. ปิดฝาครอบให้สนิท
5. เลือกการใช้งาน

เครื่องปั่น ALC รุ่น PK-120 เลือกการใช้งานได้ 2 แบบ คือ

1. การทำงานแบบ manual (manual operative mode)
2. การทำงานแบบใช้ program (program operative mode)

**การทำงานแบบ manual**

manual mode (สัญญาณไฟของปุ่มโปรแกรมทุกปุ่มดับ) กำหนดค่าความเร็วรอบ (rpm) เวลา อัตราเร่ง อัตราหยุด ที่ต้องการแล้วกดปุ่ม start เพื่อเริ่มการทำงาน

**การทำงานแบบใช้โปรแกรม**

เลือกโปรแกรมใดโปรแกรมหนึ่งที่กำหนดไว้ล่วงหน้ามาใช้งาน โดยกดปุ่มโปรแกรมนั้น (โปรแกรม 1-5) เมื่อเลือกใช้โปรแกรมแล้วจะมีสัญญาณไฟปรากฏด้านหน้าโปรแกรมที่เลือก จากนั้นกดปุ่ม start เพื่อเริ่มการทำงาน เมื่อต้องการยกเลิกการใช้โปรแกรมนั้นกดปุ่มเดิมซ้ำอีกครั้งสัญญาณไฟก็จะดับ

**5. เครื่องวัดพีเอช (pH Meter)**

ความเป็นกรดหรือด่างของสารละลายมีความสำคัญในงานทางชีวเคมี เพราะมีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของสารชีวโมเลกุล (biomolecule) ขนาดใหญ่ เช่น โครงสร้างของโปรตีน หรือการทำงานของเอนไซม์ (enzyme) นอกจากนี้การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ยังเป็นงานพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ในแทบทุกอุตสาหกรรม รวมถึงงานวิเคราะห์วิจัยระดับสูง ซึ่งสิ่งที่ชี้บอกถึงความเป็นกรด คือ ค่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน [$H^+$] และสิ่งที่ชี้บอกความเป็นด่าง คือ ค่าความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์ไอออน [$OH^-$]

เครื่องวัดพีเอช คือ เครื่องมือทางไฟฟ้าที่ใช้วัดสภาพความเป็นกรด หรือเป็นด่างของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย (aqueous solution) ซึ่งนิยมบอกด้วยหน่วย pH โดยวัดเป็นค่าความต่างศักย์ของเคมีไฟฟ้าของไฮโดรเจนไอออน (the *potential of hydrogen*) จัดเป็น potentiometer ชนิดหนึ่ง

สัญญาณจากหลอดอิเลกโทรดแก้ว (glass electrode) ซึ่งไวต่อการเปลี่ยนแปลง [$H^+$] แต่ไม่ไวต่อไอออนบวกชนิดอื่น เช่น $Na^+$ และ $K^+$ จะถูกเปรียบเทียบกับสัญญาณที่เกิดขึ้นจากสารละลายที่ทราบค่าพีเอช สัญญานจะถูกขยายปรากฏเป็นค่าพีเอชของสารละลายที่ต้องการ บนหน้าปัทม์ของเครื่อง

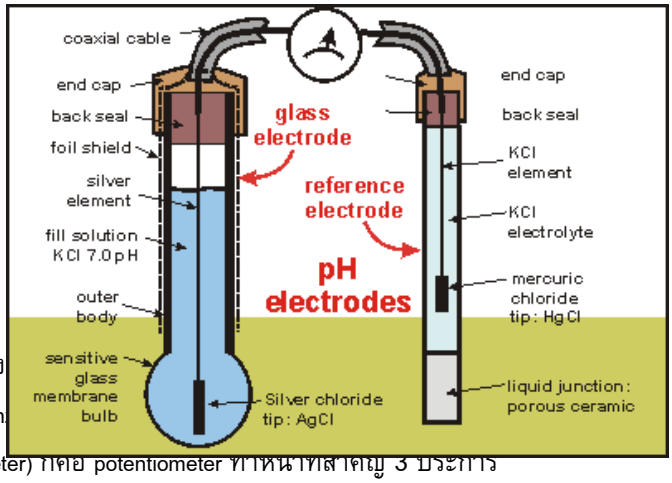
**หลักการ** เมื่อโลหะสัมผัสกับสารละลายกรดหรือเกลือ จะทำให้มีความต่างศักย์เคมี ไฟฟ้าของไฮโดรเจนไอออน ($H^+$) ที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายที่รู้ค่าในอิเลกโทรดตรวจวัด (sensing electrode) มักเรียกว่า glass electrode (membrane) กับสารละลายภายนอก โดยจะเชื่อมต่อกับ อิเลกโทรดอ้างอิง (reference electrode) เพื่อให้เกิดกระแสไฟฟ้าครบวงจร แล้วขยายให้มีความต่างศักย์สูงขึ้นด้วย potentiometer

เครื่องวัดพีเอช ประกอบด้วยส่วนสำคัญสองส่วนที่สามารถทำให้เครื่องทำงานได้ครบวงจร ส่วนประกอบทั้ง 2 คือ อิเลกโทรด และตัวเครื่อง

1. อิเลกโทรด ทำหน้าที่ตรวจวัดความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายที่ พีเอช 7.0 (standard pH buffer) ซึ่งความต่างศักย์ระหว่างอิเลกโทรดทั้ง 2 คือ อิเลกโทรดอ้างอิงกับอิเลกโทรดชี้บอก จะมีค่าความต่างศักย์เท่ากับศูนย์มิลลิโวลต์ ถ้าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเพิ่มขึ้นหรือลดลง ความต่างศักย์ก็จะเพิ่มขึ้น หรือลดลงตามความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายนั้น โดยมีอิเลกโทรดเป็นตัวทำหน้าที่รับสัญญาณนั้นๆ

**รูปที่ 2.21** แสดงเครื่องวัดพีเอช

**ที่มา**: http://www.brinkmann.com/products/metrohm_744_Bencht




**รูปที่ 2.22** แสดง

**ที่มา**: www.seafriends.org.n

2. ตัวเครื่อง (meter) ก็คือ potentiometer ทำหน้าที่สำคัญ 3 ประการ
   - ปรับความต่างศักย์ให้กับอิเลกโทรดอ้างอิงให้มีค่าความต่างศักย์เป็นศูนย์ และคงที่
   - แปลงสัญญาณความต่างศักย์ไอออนของอิเลกโทรดให้เป็นความต่างศักย์ไฟฟ้า
   - ขยายสัญญาณความต่างศักย์ทางไฟฟ้าให้เพิ่มมากขึ้นเพียงพอทำให้เข็ม หรือตัวเลขแสดงออกที่มิเตอร์

ในส่วนของอิเลกโทรดที่นำมาใช้ส่วนใหญ่ในปัจจุบันเป็น combination pH electrode คือการรวม reference electrode และ sensing electrode มาอยู่ด้วยกัน ซึ่งออกแบบไว้ให้สะดวกในการใช้งาน

- sensing electrode หรืออิเลกโทรดตรวจวัดทำด้วยแก้วพิเศษ ที่ปลายออกแบบเป็นรูปกระเปาะ ซึ่งเป็นบริเวณที่บางมาก (glass membrane) โดยยอมให้ $H^+$ ผ่าน ภายในบรรจุบัฟเฟอร์เอาไว้ แต่มีบางประเภทเป็นรูปอื่น เช่น รูปเข็ม แต่ทุกชนิดจะเหมือนกันตรงบริเวณที่ $H^+$ ผ่านผิวแก้วจะบางมาก
- reference electrode หรืออิเลกโทรดอ้างอิงทำหน้าที่ให้ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่ขั้วตรวจวัดเดินครบวงจร โดย KCl ชนิดอิ่มตัวที่อยู่ในอิเลกโทรดอ้างอิงซึมผ่านออกมาเป็น salt bridge เชื่อมกับ sensing electrode

**<u>วิธีการใช้เครื่องวัดพีเอช</u>**

ก่อนการใช้งานจำเป็นต้องปรับตั้งเครื่อง ที่เรียกว่า calibrate หรือ standardize ตัวเครื่องก่อนเพื่อให้พร้อมอ่านค่าสารตัวอย่างได้ถูกต้อง วิธี standardize โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ

1. single point standardization คือ การใช้ standard buffer ตัวเดียว วิธีทำให้จุ่มอิเลก-โทรดลงใน standard แล้วใช้ปุ่ม calibration ปรับค่าพีเอช ให้ได้เท่ากับ standard buffer ตัวนั้น จากนั้นเครื่องก็พร้อมวัดสารละลายตัวอย่างต่อไป

**<u>*หมายเหตุ</u>** วิธีนี้มีข้อเสีย คือ ถ้าสารละลายตัวอย่างมีค่าไม่ใกล้เคียงกับ standard จะมีโอกาสผิดพลาดเบี่ยงเบนไปได้มาก โดยปกติไม่ควรห่างเกิน ±1.5 พีเอช วิธีนี้ใช้กับเครื่องรุ่น model เล็กๆ ที่ไม่มี slope control

2. two point standardization ใช้ standard buffer 2 ตัว วิธีทำให้จุ่มอิเลกโทรดลงใน บัฟเฟอร์ตัวแรกที่มีค่าเท่ากับ isopotential point (เครื่องส่วนใหญ่ตั้งไว้ที่ 7) ใช้ปุ่ม calibrate ปรับค่าให้ได้เท่ากับค่าบัฟเฟอร์ ฉีดล้าง (rinse) อิเลกโทรดด้วยน้ำกลั่น ซับเบาๆ แล้วจุ่มลงในตัวที่ 2 เช่น บัฟเฟอร์พีเอช 4 หรือ 10 (ไม่ควรห่างเกิน 3 พีเอช) ถ้าอ่านได้ไม่ตรง ให้ใช้ slope control ปรับให้ตรง (% slope ควรอยู่ในช่วง 90 -105)

**<u>*หมายเหตุ</u>** วิธีนี้ค่าพีเอชของสารละลายตัวอย่าง ที่อยู่ระหว่าง 2 จุดที่ standardize ไว้ จะไม่มีผิดพลาด และหลังจากปรับเครื่องไว้แล้วในการวัดสารละลายตัวอย่างครั้งต่อไปก็ไม่จำเป็นต้อง standardize ใหม่ ยกเว้นผ่านไปนานมาก เช่น 3 เดือน หรือ 6 เดือน ก็ควรจะทำการ standardize ใหม่

สำหรับเครื่องที่ควบคุมด้วย microprocessor ก็มีความคล้ายคลึงกันในวิธีการใช้งานแต่มีข้อดีกว่าตรงที่ขั้นตอนน้อยลง เนื่องจากเครื่องมีหน่วยความจำ แต่ก็มีข้อเสียตรงที่ถอดปลั๊กไฟไม่ได้ เพราะหน่วยความจำจะถูกลบ จะต้องทำการ calibration ใหม่ทุกครั้งถ้าถอดปลั๊กทำให้สิ้นเปลือง standard buffer

**ปัญหาของการวัดพีเอช**

โดยปกติการวัดค่าพีเอชมักมีปัญหาในเรื่อง “ค่าหรือตัวเลขไม่นิ่ง” ซึ่งทำให้บางแห่งไม่ต้องการใช้แบบตัวเลข และทำให้ผู้ผลิตบางยี่ห้อออกแบบเครื่องวัดพีเอชมาคล้ายเป็นการแก้ปัญหาคือ ล็อกค่าไว้เสมือนค่านิ่งโดยใช้ microprocessor กำหนดเวลา ซึ่งค่าที่ให้จะ “ไม่ตรงความจริง” เพราะปกติการที่ค่าไม่นิ่งนั้นมีสาเหตุหลายประการซึ่งแบ่งออกได้ดังนี้

1. จากตัวเครื่อง (meter) มีสาเหตุดังนี้
   - มีคลื่นไฟฟ้ามารบกวนที่ตัวเครื่อง และตัวเครื่องไม่ได้ต่อสายดิน
   - ใช้งานเครื่องทันทีหลังเปิดเครื่อง ซึ่งระบบยังอุ่นเครื่องไม่พอ
2. จากอิเลกโทรด (electrode) มักมีสาเหตุมาจาก

- อิเลกโทรดที่ได้รับมาใหม่ๆ ไม่ได้ทำการแช่ไว้ในบัฟเฟอร์ก่อนการใช้งาน ปลาย อิเลกโทรดแห้งเกินไป ทำให้ไม่มีการตอบสนองของ sensing area ต่ออิออน ดังนั้นอิเลกโทรดถ้าได้รับมาใหม่ๆ ก่อนการใช้ควรแช่ไว้ใน บัฟเฟอร์ พีเอช 4 อย่างน้อย 1 ชั่วโมง
- อิเลกโทรดที่ใช้งานมานานจะมีคราบ หรือฟิล์มมาเกาะที่ส่วน sensing area หรือเกิดผลึก KCl มาอุดที่ junction ของส่วน reference electrode
- อิเลกโทรดขณะที่ใช้งานไม่ได้เปิดช่องอากาศ (breathing hole) ทำให้ KCl ไม่สามารถซึมผ่านออกมาทำให้ความไวหรือการตอบสนองของ sensing area ต่อ อิออนช้าลง

3. จากตัวอย่างที่วัด ซึ่งมีสาเหตุมาจาก
   - อุณหภูมิของสารละลายตัวอย่างเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา เช่น กรณีออกมาจากตู้เย็นอุณหภูมิจะค่อยๆ สูงขึ้น ซึ่งค่าพีเอชจะเปลี่ยนไปตามอุณหภูมิ
   - สารละลายตัวอย่างที่นำมาวัดไม่มีสภาพของบัฟเฟอร์ โดยเฉพาะที่มีอิออนอยู่น้อยเช่น น้ำกลั่น กรณีนี้สารจะเปลี่ยนแปลงพีเอชได้ง่าย เช่น มี $CO_2$ ในอากาศละลายลงในสารละลาย เกิดเป็นกรดคาร์บอนิก ($H_2CO_3$) ก็จะทำให้แสดงสภาพเป็นกรดทันที
   - สารละลายตัวอย่างที่วัดในแต่ละครั้งมีพีเอชหรืออุณหภูมิต่างกันมาก ยกตัวอย่างเช่น สารละลายแรกมีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารต่อไปมีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้อิเลกโทรดต้องใช้เวลาปรับเข้าสู่สมดุล
4. เทคนิคการวัดที่ไม่ถูกต้อง
   - ปัญหาเกิดขึ้นเพราะไม่ได้ใช้ magnetic stirrer (เป็นเครื่องกวนสารแบบต่อเนื่อง) ทำให้สารละลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้สารเชื่อมวงจร (salt bridge) คือ KCl ที่เชื่อมระหว่าง sensing และ reference electrode ไม่เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน (homogeneous) คือมีความเข้มข้นตรงจุด reference electrode มากกว่า sensing electrode ทำให้ตัวเลขเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา แต่จะไปในทางเดียวกัน เช่น 7.31, 7.32, 7.33 ซึ่งต้องใช้เวลานานกว่าจะคงที่เพราะต้องรอให้ KCl เกิดการกระจายตัวในภาชนะเท่ากันหมดซึ่งเวลาจะขึ้นกับขนาดของภาชนะ เช่น บีกเกอร์ที่ใช้วัด

จากปัญหาของตัวเลขหรือค่าที่ไม่นิ่ง จะส่งผลให้การวัดค่าสารตัวอย่างผิดพลาดเนื่องจาก standardize ผิด ยกตัวอย่าง เช่น กรณีเราไม่ได้ใช้ magnetic stirrer ร่วมด้วย และทำการ calibrate เร็วเกินไปโดยไม่ได้รอให้เกิดสมดุลย์ของปฏิกิริยาก่อน ค่าที่เครื่องอ่านเมื่อ standardize เครื่องด้วย พีเอช 7 หลังเวลาผ่านไป 1 นาทีอาจเป็น 6.98 ซึ่งถ้าในเวลานานออกไปจะได้ 7 เป็นผลให้การวัดสารตัวอย่าง หรือบัฟเฟอร์ตัวที่ 2 มีค่าเบี่ยงเบนจากความเป็นจริง โดยเฉพาะค่าที่ไกลจากจุดที่ standardize ไว้

**การบำรุงรักษาเครื่องวัดพีเอช**

1. ตัวเครื่องควรติดตั้งไว้ในที่ที่เหมาะสม เช่น ในที่ที่อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงมาก (โดยเฉพาะเครื่องที่ควบคุมด้วย microprocessor) ควรหาผ้าหรือพลาสติกคลุมป้องกันฝุ่นหลังการใช้งาน เพราะฝุ่นจะทำหน้าที่เป็นแกนดูดความชื้น ไม่ควรติดตั้งใกล้เครื่องมือใหญ่ๆ เช่น atomic absorption ถ้าสงสัยว่าเครื่องเสียก่อนส่งเครื่องซ่อมควรตรวจเช็คเครื่องตามวิธี check out ที่แต่ละเครื่องบอกไว้ การส่งซ่อมควรส่งบริษัทฯ ที่เป็นตัวแทนโดยตรง เพราะจะมีวงจรของเครื่องความชำนาญสูงและสามารถสั่งอะไหล่ได้
2. อิเลกโทรด ระหว่างการใช้งานควรใช้ด้วยความระมัดระวัง โดยเฉพาะที่บริเวณปลาย อิเลกโทรด ที่เรียกว่า sensing area ระวังอย่าให้กระทบกับของแข็ง เวลา rinse ด้วยน้ำกลั่นระหว่างสารตัวอย่าง ให้ใช้กระดาษทิชชูซับเบาๆ หลังการใช้งานควรเก็บแช่ไว้ในสารละลายที่เหมาะสม คือ ที่มีอิออนมากพอควรและมีฤทธิ์เป็นกรด เช่น บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 กรณีใช้งานไปนานๆ จะ

ทำไค่าเบี่ยงเบนหรือ slope ลดต่ำลง อาจ**ทำความสะอาดด้วย 0.1 M ammonium bi-fluoride** ประมาณ 1 นาที แล้วแช่ลงในบัฟเฟอร์ หรือ KCl อิ่มตัวตามเดิม ซึ่งวิธีนี้เป็นการแก้ไขหรือทำให้ sensing electrode ดีขึ้น สำหรับส่วน reference electrode ถ้ามีปัญหา**ให้แช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที**

## 6. เครื่องแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

อิเลกโทรโฟรีซีส เป็นการศึกษาการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า สามารถแยกสารชนิดต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะโปรตีนและกรดนิวคลิอิก โดยใช้บ่งชี้ความบริสุทธิ์ของสาร ปริมาณของสารตัวอย่าง น้ำหนักโมเลกุล (หน่วยย่อย) ของโปรตีน หรือขนาดของสายดีเอ็นเอ ใช้ในการศึกษาลายแบบของโปรตีน (proteomic) ของเอนไซม์ (zymogram) หรือลายแบบของดีเอ็นเอ (DNA-fingerprint) เพื่อเทียบสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต การศึกษาปฏิกิริยาเอนไซม์ ตลอดจนการศึกษาพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งเทคนิคทางอิเลกโทรโฟรีซีสมีมากมายหลายชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของสารชีวโมเลกุลที่ต้องการศึกษา

โดยการทำปฏิบัติการในวิชา TN 312 นักศึกษาจะได้มีโอกาสใช้เทคนิคอิเลกโทรโฟรีซีสในการศึกษาสารชีวโมเลกุล คือ โปรตีนและกรดนิวคลิอิก ดังนั้นจะขอกล่าวเฉพาะหลักการทั่วไปชนิดที่ใช้ในปฏิบัติการ

**หลักการ**

เมื่อโมเลกุลที่มีประจุเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ที่ความเร็วคงที่ จะได้ดังสมการที่ 1

$$Ze \cdot E = fV \quad \ldots\ldots\ldots\ldots 1$$

$$V = Ze \cdot E / f \quad \ldots\ldots\ldots\ldots 2$$

เมื่อ Ze = ประจุสุทธิบนโมเลกุล

E = สนามไฟฟ้าในหน่วย โวล์ต / เซ็นติเมตร

V = ความเร็วของโมเลกุล

f = frictional coefficient ซึ่งขึ้นกับมวลและรูปร่างของโมเลกุล

จากสมการ สรุปได้ว่า

$$V \propto Ze$$

$$\propto 1/f$$

$$\propto E$$

ในการทำอิเลกโทรโฟรีซีสทั่วไปมักจะให้ E ให้มีค่าคงที่ตลอดการทดลอง จากสมการที่ 2 จะได้ว่า

$$V / E = Ze / f$$

**นั้นคือ** 1. การเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุนี้ จะขึ้นกับอัตราส่วนของ Ze / f

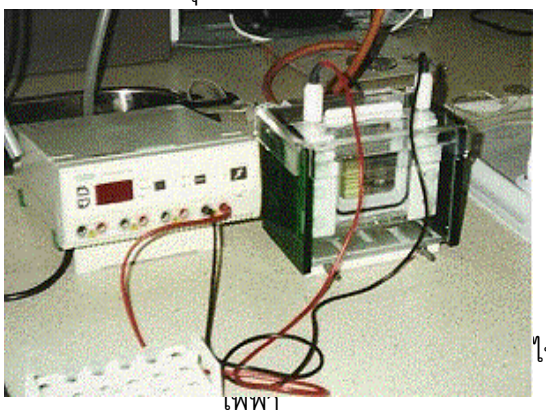
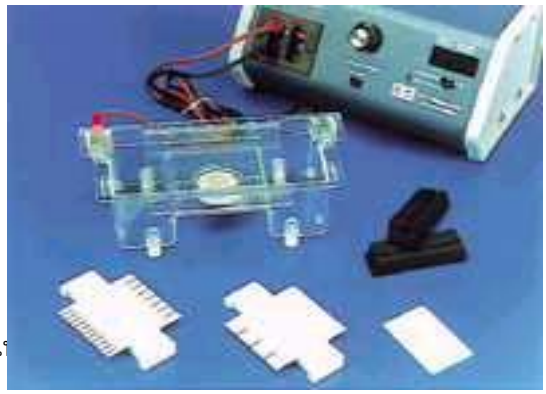
2. ถ้าโมเลกุลมีรูปร่าง (conformation) เหมือนกัน ค่า f จะขึ้นกับขนาดไม่ขึ้นกับรูปร่าง การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะขึ้นกับประจุ ต่อ มวลของโมเลกุลเท่านั้น (charge-to-mass)

ในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่ต่อสนามไฟฟ้า (v / E) เรียกว่า electrophoretic mobility หรือ "$\mu$" นั่นคือ โมเลกุลที่ต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราการเคลื่อนที่ต่างกัน ทำให้สารแยกออกจากกันได้

**องค์ประกอบของชุดอิเลกโทรโฟรีซีส**

1. แหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า (power pack) มักเป็นไฟฟ้ากระแสตรง (direct current) ถ้าใช้ความต่างศักย์ระหว่าง 100 – 500 โวลต์ จะเรียกว่า low voltage แต่ถ้าใช้มากกว่า 500 โวลต์ จะเรียกว่า high voltage (รูปที่ 2.23)
2. ภาชนะสำหรับใส่สารละลายนำไฟฟ้า (electrophoresis unit) มักเรียกว่า chamber สำหรับสารละลายนำไฟฟ้า มักเป็นบัฟเฟอร์ เพื่อเชื่อมให้วงจรไฟฟ้าครบวงจร เกิดกระแสไฟฟ้าไหลผ่านต่อเนื่อง ลักษณะเป็นอ่าง หรือกล่องที่มีขั้วไฟฟ้าอยู่ด้วย ซึ่งลักษณะจะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของอิเลกโทรโฟรีซีส (รูปที่ 2.23)

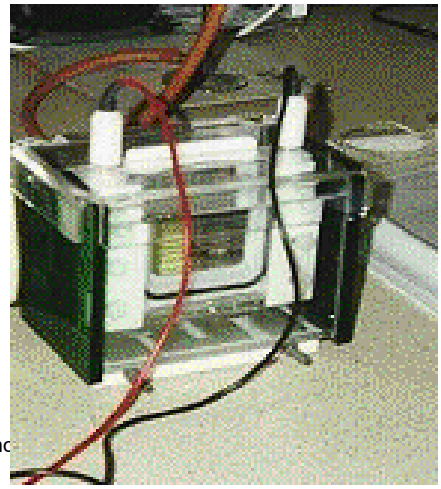
สำหรับงานทางด้านชีวโมเลกุลที่เป็นโปรตีนจะมีแผ่นรองรับ และงานที่กี่ยวกับกรดนิวคลิอิกมักจะมีฐานรองรับตัวกลางค้ำจุน (solid supporting medium) ที่สารดังกล่าวเคลื่อนที่ผ่าน

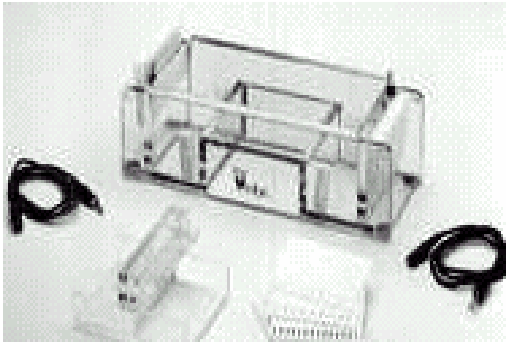



ไฟฟ้า

ในการจำแนกชนิดของอิเลกโทรโฟรีซีสตามลักษณะของเครื่องมือ สามารถจำแนกได้ดังนี้

2. **vertical gel electrophoresis** มีทั้งแบบแท่ง (column gel) และแบบแผ่น (slab gel) นิยมใช้แยกโปรตีน และดีเอ็นเอขนาดเล็ก (โอลิโกนิวคลีโอไทด์)
3. **horizontal gel electrophoresis** เป็นการทำอิเลกโทรโฟรีซีสในแนวนอน โดยภาชนะสำหรับใส่สารละลายนำไฟฟ้าจะมีแท่นรองตัวกลางค้ำจุน นิยมใช้ในแยกดีเอ็นเอและ อาร์เอ็นเอ





**<u>รูปที่ 2.25</u>** แสดงลักษณะของ horizontal gel electrophoresis

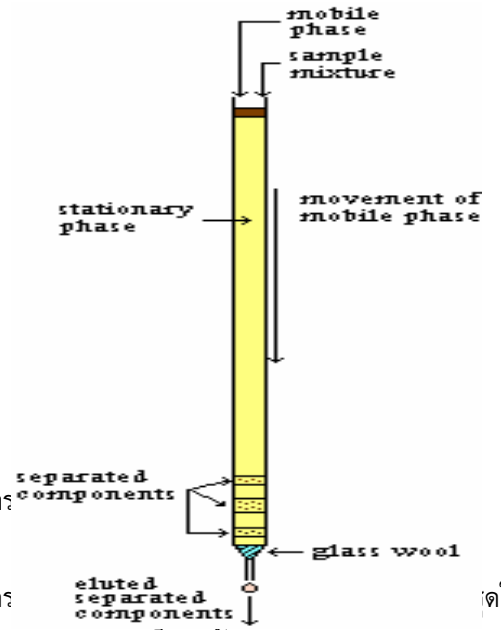
**7. โครมาโทกราฟี (chromatography)**

โครมาโทกราฟีเป็นวิธีการทางกายภาพ (physical method) ที่มีความสำคัญ และนิยมใช้มากในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารชีวโมเลกุลต่างๆ ซึ่งในรายวิชา TN 312 นักศึกษาจะได้ทำปฏิบัติการโดยใช้หลักโครมาโทกราฟีในบทปฏิบัติการโปรตีน ซึ่งอาศัยคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีน ได้แก่ ขนาดและรูปร่าง (size & shape) คุณสมบัติของการมีประจุ (ionisation) และความจำเพาะทางชีวเคมี ซึ่งวิธีการโครมาโทกราฟีสำหรับโปรตีนที่นิยมใช้ คือ ชนิดคอลัมน์ (column chromatography method) ซึ่งมีหลักการดังนี้

**หลักการของโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์**

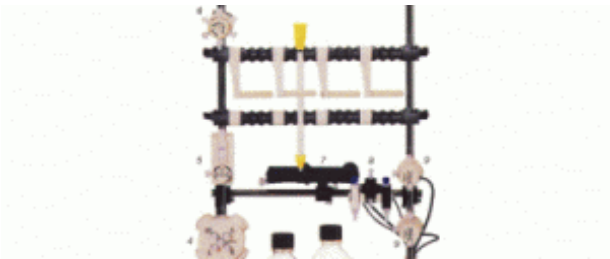
จัดเป็น liquid-liquid chromatograph ที่มีส่วนคงที่ (stationary phase) เป็น porous granule หรือเป็น liquid ที่ฉาบหรือเคลือบบนตัวกลางค้ำจุนที่เฉื่อย (inert solid support) ที่ถูกบรรจุอยู่ในหลอดแก้ว พลาสติก หรือท่อโลหะ และส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) จะเคลื่อนผ่านทำหน้าที่พา หรือชะสารตัวอย่างผ่านออกจากส่วนคงที่อย่างต่อเนื่อง (continuos flow) (ดังรูป 2.26)

โดยในขั้นตอนการแยกนั้น ให้นำสารตัวอย่างที่ต้องการแยกนำมาหยดบนผิวหน้าของส่วนคงที่ให้เป็นชั้นบางๆ เมื่อถูกชะผ่านด้วยส่วนเคลื่อนที่ สารที่ผสมในตัวอย่างจะกระจายตัวอยู่ระหว่าง 2 ส่วน (phases) ได้ไม่เท่ากัน ก็จะถูกชะออกมา (elution) ด้วยปริมาณส่วนเคลื่อนที่ที่ไม่เท่ากัน จะสามารถแยกเก็บเป็นแต่ละส่วน (fraction) ได้




**<u>รูปที่ 2.26</u>** แสดงหลักการ

ในงานด้านชีวเคมีที่ใช้โคร ดใช้งานที่มีระบบควบคุมอัตราการไหลของส่วนเคลื่อนที่ (pump) ระบบการเก็บลำดับส่วน (fraction collector) ระบบติดตามผล (detector) ระบบประมวลผล (recorder or integrator) แม้แต่คอลัมน์ก็เป็นแบบสำเร็จ ซึ่งสะดวกกับการใช้งานเป็นอย่างมาก



**<u>รูปที่ 2.27</u>** แสดงระบบของโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

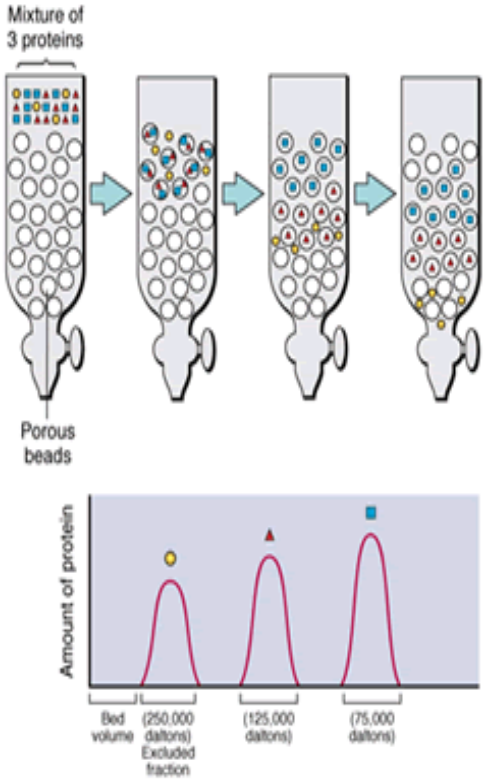
**ที่มา:** คู่มือแนะนำสินค้าของบริษัท Bio-Rad

**การจำแนกชนิดของโครมาโทกราฟีแบบคอลมัน์**

โครมาโทกราฟีแบบคอลมัน์สามารถจำแนกได้ตามสมบัติของสารได้ ดังนี้

**1. โครมาโทรกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชัน (gel filtration chromatography)**

เป็นการแยกที่อาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ (physical property) ของสาร คือ ขนาดและรูปร่าง (molecular size and shap) โดยมีส่วนเคลื่อนที่พาเคลื่อนที่ผ่านส่วนคงที่ ซึ่งเป็นสารที่มี รูพรุน (porous granual) โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถผ่านเข้าไปในรูพรุนได้ (ขนาดที่เลือกใช้) จะถูกชะออกมาก่อน และสารที่มีขนาดเล็กจะสามารถแพร่ผ่าน เข้าสู่รูพรุนได้ (diffuse) ทำให้ต้องใช้เวลามากกว่าสารขนาดใหญ่ในการที่จะผ่านออกจากคอลัมน์ ทำให้สารตัวอย่างแยกจากกันได้ (ดังรูป 2.28)



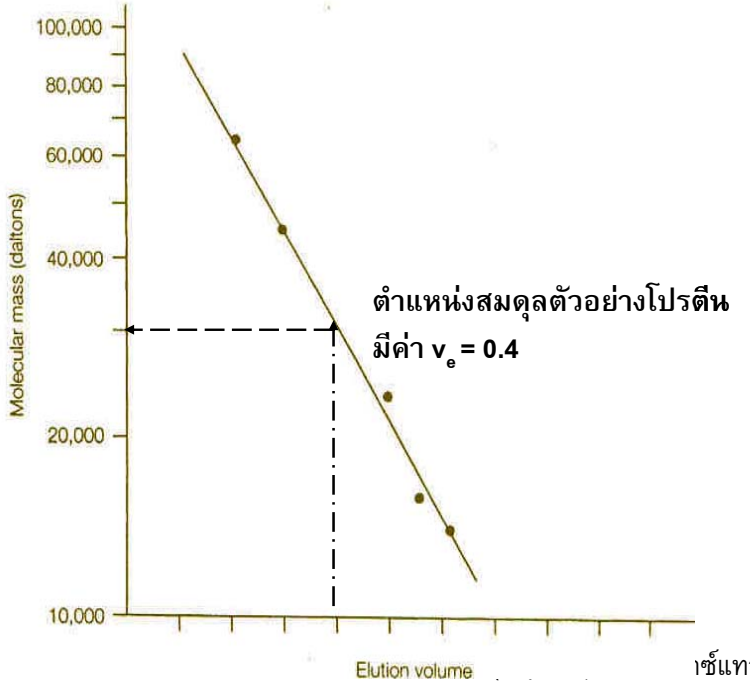

**<u>รูปที่ 2.28</u>** แสดงลักษณะการแยกสารของเทคนิคโครมาโทรกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชัน

**ที่มา:** http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/gifs/gel_filtration2.gif

ในการแยกสารแต่ละชนิดที่มีขนาดโมเลกุลที่ต่างกันออกจากกัน ด้วยเทคนิคเจลฟิลเทรชันนั้น สามารถสร้างความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรส่วนเคลื่อนที่ทั้งหมด (total volume ($V_t$)), ปริมาตรส่วนเคลื่อนที่ที่

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

โดยที่ $K_{av}$ = ค่าคงที่ของสารต่าง ๆ ที่ผ่านคอลัมน์ที่กำหนด ในภาวะที่กำหนด ดังนั้น เมื่อนำสารมาตราฐานที่รู้ขนาดโมเลกุลมาผ่านคอลัมน์ จะได้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $K_{av}$ และค่า log ของขนาดโมเลกุลเป็นเส้นตรง (ในบางตำราจะใช้ elution volume แทนค่า $K_{av}$ ดังรูปที่ 2.29)




**รูปที่**

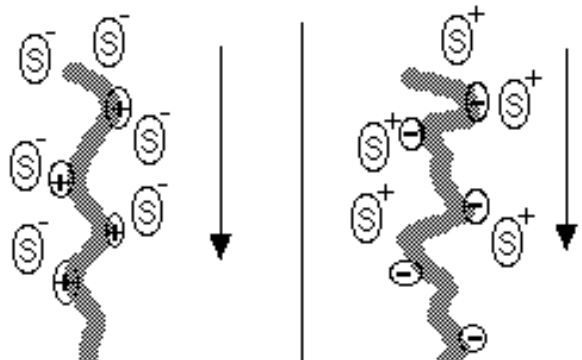
ในเทค เซ์แทรน(sephadex) พอลิอะคริลาไมด์ (bio-gels) เดร็กซ์แทรน-พอลิอะคริลาไมด์ (sephacryl) และอะกาโรส ที่มีขนาดรูพรุนที่ผู้ผลิตสามารถควบคุมได้ ใช้สำหรับขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กัน เช่น Sephadex G-50 และ Sephadex G-100 เหมาะสำหรับแยกสารขนาดโมเลกุล 1,500-30,000 ดาลตัน และ 4,000-150,000 ดาลตัน ตามลำดับ (ข้อจำกัดการเลือก gel)

ส่วนเคลื่อนที่ในระบบนี้ มักเป็นบัฟเฟอร์ โดยอาศัยการชะแบบ isocratic elution คือสารตัวอย่างอยู่ในภาวะเดียวกันตลอดการทดลอง

**2. โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)**

เทคนิคนี้อาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของประจุ (ionization) ของหมู่ฟังก์ชัน (functional group) บนโมเลกุลของโปรตีนที่สามารถแตกประจุ (ionized) ให้ประจุรวมเป็นบวก หรือลบได้ และสามารถจับกับส่วนคงที่ซึ่งมีประจุตรงข้ามกัน ซึ่งอาศัยแรงกระทำระหว่างประจุที่สามารถย้อนกลับได้ (reversible electrostatic interaction) โดยมีส่วนเคลื่อนที่เป็นบัฟเฟอร์ เพื่อควบคุมพีเอชให้สารตัวอย่างแสดงความเป็นประจุตลอดการทดลอง ซึ่งสามารถจำแนกโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุได้เป็น 2 ชนิด คือ

- แบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) คือชนิดที่ส่วนคงที่มีประจุเป็นบวก และจะจับประจุลบบนผิวโปรตีน
- แบบแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) คือชนิดที่ส่วนคงที่มีประจุเป็นลบ และจับประจุเป็นบวกบนผิวโปรตีน



**รูปที่ 2.30** แสดง fibrous form ของ anion exchanger และ cation exchanger

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุทั้ง 2 ชนิดนี้ มีทั้ง strong ion และ weak ion exchanger ซึ่งขึ้นอยู่กับประจุบนหมู่ฟังก์ชันบนส่วนคงที่ (ตารางที่ 2.1 และ 2.2) โดยส่วนคงที่มักเป็นเรซินทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ ซึ่งประจุบนหมู่ฟังก์ชันจะยึดจับบนผิวด้วยพันธะ โควาเลนท์

**ตารางที่ 2.1** แสดงหมู่ฟังก์ชันของ anion-exchanger

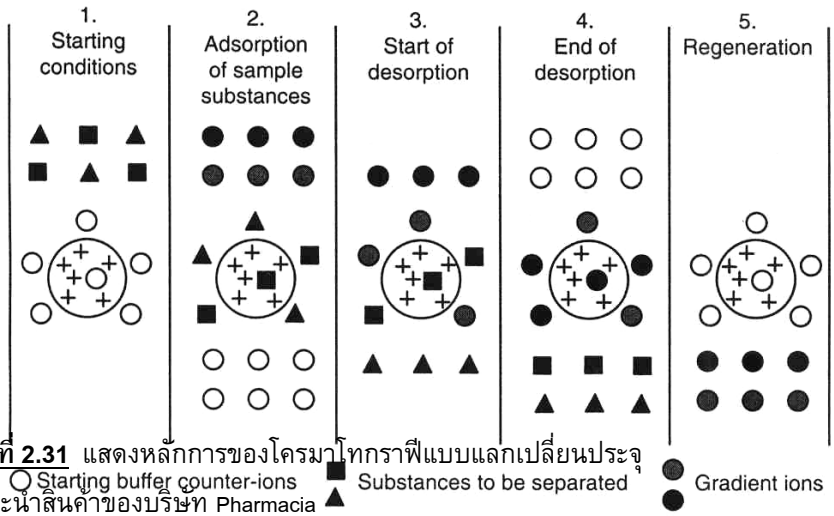
| Anion exchangers | Functional group |
|---|---|
| Amino ethyl ($AE^-$) | $-OCH_2CH_2NH_3^+$ (weak) |
| Diethylaminoethy ($DEAE^-$) | $-OCH_2CH_2NH_2^+(CH_2CH_3)_2$ (weak) |
| Quaternary aminoethyl ($QAE^-$) | $-OCH_2CH_2N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$ (strong) |

**ตารางที่ 2.2** แสดงหมู่ฟังก์ชันของ cation-exchanger

| Cation-exchanger | Functional group |
|---|---|
| Carboxymethyl ($CM^-$) | $-OCH_2COO^-$ (weak) |
| Phospho | $-PO_4H_2^-$ (intermediate) |
| Sulfopropyl ($SP^-$) | $-CH_2CH_2CHSO_3^-$ (strong) |

โดยในเทคนิคนี้อาศัยหลักการในการแยก (จากรูปที่ 2.31) ดังนี้

1. Starting conditions จะต้องทำให้หมู่ฟังก์ชันของส่วนคงที่อยู่ในภาวะสมดุลด้วยส่วนเคลื่อนที่ (equilibrate) เพื่อให้ประจุเป็นไปตามชนิดของ ion-exchanger ที่ใช้ในที่นี้จะเป็น anion exchanger คือ จะมีประจุเป็นบวก
2. Adsorption of sample substances โปรตีนที่มีประจุสุทธิ (net charge) เป็นลบ จะเข้าจับกับหมู่ฟังก์ชันที่เป็นบวกของส่วนคงที่ โปรตีนที่มีประจะสุทธิมากก็จะจับได้แน่น กว่าโปรตีนที่มีประจุสุทธิน้อยกว่า
3. Start of desorption และ End of desorption โปรตีนจะถูกปล่อยหลุดออกจากส่วนคงที่ โดยการชะออกด้วยการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช หรือเพิ่มค่า ionic strength ของส่วนเคลื่อนที่ จนโปรตีนถูกชะออกหมด
4. Regeneration เมื่อโปรตีนถูกชะออกหมด จะนำส่วนเคลื่อนที่เริ่มต้น (เดิม) มาผ่านลงในคอลมัน์ เพื่อให้ส่วนคงที่กลับสู่ภาวะเริ่มต้น



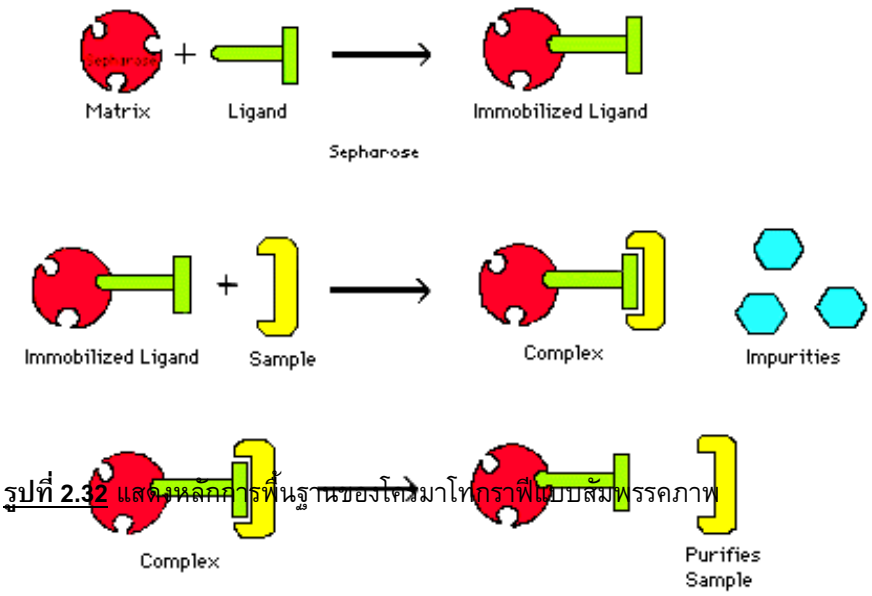

**รูปที่ 2.31** แสดงหลักการของโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ
**ที่มา:** คู่มือแนะนำสินค้าของบริษัท Pharmacia

**3. โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography)**

โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพนี้อาศัยความจำเพาะทางชีวเคมี ซึ่งอาศัยคุณสมบัติความจำเพาะของสารที่เคลือบหรือฉาบอยู่บนส่วนคงที่ ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยก เช่น เอ็นไซม์กับซับสเตรท แอนติเจนกับแอนติบอดี เป็นต้น โดยสารจำเพาะที่เคลือบบนส่วนคงที่จะจับแบบแน่นด้วยพันธะโควาเลนต์ เรียกว่า immobilized และเรียกสารจำเพาะนี้ว่าลิแกนด์

**องค์ประกอบในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ**

1. Inert solid support เป็นสารที่จะนำมา immobolized กับลิแกนด์ หรือ spacer arm ทำหน้าที่เป็นส่วนคงที่ เรียกว่า bead matrix มีคุณสมบัติ คือ มีความคงตัว (rigid & stable) มีพื้นที่ผิวมาก (high surface area) ที่นิยมใช้ ได้แก่ เซลลูโลส เดร็กซ์แทรน พอลิอะคริลาไมด์ และเซฟาโรส
2. Ligand เป็นสารที่นำมา immobilized กับ inert solid support ทำหน้าที่เป็นส่วนคงที่ หรือส่วนสัมพรรคภาพ อาศัยแรงยึดเหนี่ยวแบบโควาเลนต์ แต่ในบางกรณีจะมีการใช้สารช่วยที่เรียกว่า spacer arms เพื่อใช้แยกโปรตีนที่สนใจ เช่น เอนไซม์จะใช้ substrate-analogue, inhibitor หรือ cofactor ของเอนไซม์นั้นเป็นลิแกนด์ แอนติเจนจะใช้แอนติบอดีนั้นเป็นลิแกนด์ receptor จะใช้ฮอร์โมนของ receptor นั้นเป็นลิแกนด์ ไกลโคโปรตีนจะใช้เลกตินนั้นเป็นลิแกนด์
3. Target protein




**รูปที่ 2.32** แสดงหลักการพื้นฐานของโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ

**สมบัติของสารที่จะนำมาใช้แยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ**

1. มีคุณสมบัติการจับกันอย่างจำเพาะทางชีวภาพ (specific binding of biological activity) เช่น enzyme active sites, receptor binding sites, antibody binding sites ซึ่งลิแกนด์จะเป็นได้ทั้ง natural ligand หรือสารที่เป็น analogue ของ natural ligand จะเป็นการแยกแบบ specific separation
2. มี naturally occurring prosthetic groups เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งคุณสมบัตินี้ จะทำให้การแยกเป็นแบบ group separation และลิแกนด์จะเป็นเลกตินหรือน้ำตาล เช่น Con A และ *N*-acetyl glucosamine เป็นต้น
3. โมเลกุลที่มีการติดหมู่จำเพาะ (affinity tag) เช่น โอลิโกฮีสทีดีน (His-tag), glutathione-S-transferase (GST) ซึ่งคุณสมบัตินี้ จะเป็นการแยกแบบจำเพาะสำหรับ recombinant fusion proteins