คม 325 ชีวเคมี 2

เทคโนโลยีของลิปิด

บทที่ 1 ระเบียบวิธีวิทยาของลิปิด

(Methodology of Lipid)

อ.ดร. อนรรฆอร ศรีไสยเพชร

บทนำ

- ลิปิดที่พบในธรรมชาติจะเป็นสารผสมของสารต่างๆ
- การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์นั้นมีเทคนิคและวิธีการที่แตกต่างจากการศึกษาสารชีวโมเลกุลอื่นๆ

- ✓ **สารลิปิดเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ**
- ✓ **ลิปิดที่มีพันธะคู่ ที่ไวต่อออกซิเจนในอากาศ**

การสกัดลิปิดจากเนื้อเยื่อ

- ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) → สกัดได้ค่อนข้างง่าย
- ลิปิดเชิงซ้อน (Complex lipid) ที่อยู่ตามเยื่อเซลล์ (Cell membrane) จะเกาะกับโมเลกุลของโปรตีนและสารอื่นค่อนข้างแน่น

  การสกัดจะทำได้ยากขึ้น

การสกัดลิปิดออกจากเนื้อเยื่อต่างๆจึงต้องคำนึงถึง

- ตัวทำละลายนั้นต้องละลายลิปิดได้
- สามารถทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างลิปิดกับองค์ประกอบอื่นๆของเซลล์ได้

วิธีการของฟอล์ชและคณะ ใช้**คลอโรฟอร์ม** เมทานอล (2 : 1 โดยปริมาตร) และใช้น้ำในเนื้อเยื่อเป็นองค์ประกอบที่ 3

สามารถสกัดลิปิดออกจากเนื้อเยื่อของสัตว์ได้สูงสุด

แต่จะมีสารอื่นที่ไม่ใช่ลิปิดปนมา

อันตราย

เรดิน (Radin) ใช้ไอโซโปรปานอล-เฮกเซน (Iso-propanol-hexane 2 : 3 โดยปริมาตร) ไม่สามารถสกัดสารแกงกลิโอไซด์ออกมาจากเนื้อเยื่อ

- เมล็ดธัญพืชมีแป้งสูง ลิปิดบางตัวสามารถแทรกเข้าไปในร่างแหโมเลกุลของแป้ง บิวทานอล (Butanol) ที่มีน้ำละลายอิ่มตัวจะสกัดลิปิดเหล่านี้ออกได้ดี
- การสกัดลิปิดในเนื้อเยื่อต่างๆของพืชนั้นมักทำการสกัดด้วยไอโซโพรพานอลก่อน เพื่อทำลายแอคติวิตี (Activity) ของเอนไซม์ให้เหลือน้อยที่สุด

การหาปริมาณลิปิดทั้งหมดในเซลล์หรือเนื้อเยื่อยังมีอีกหลายวิธี

1. การใช้ซอกเลต (Soxlet extraction)
2. การใช้เครื่องซอกเทค (Soxtect)

การแยกลิปิดแต่ละชนิดออกตามกลุ่ม

การแยกโดยวิธีการใดวิธีการหนึ่งนั้นไม่สามารถจะแยกลิปิดออกจากกันทั้งหมด

คอลัมน์โครมาโทกราฟี

แยกลิปิดออกเป็นกลุ่มได้ง่าย ด้วยการใช้ตัวชะที่แตกต่างกัน

ลิปิดแบบง่าย (simple lipid)

ฟอสฟอลิปิด (Phospholipid)

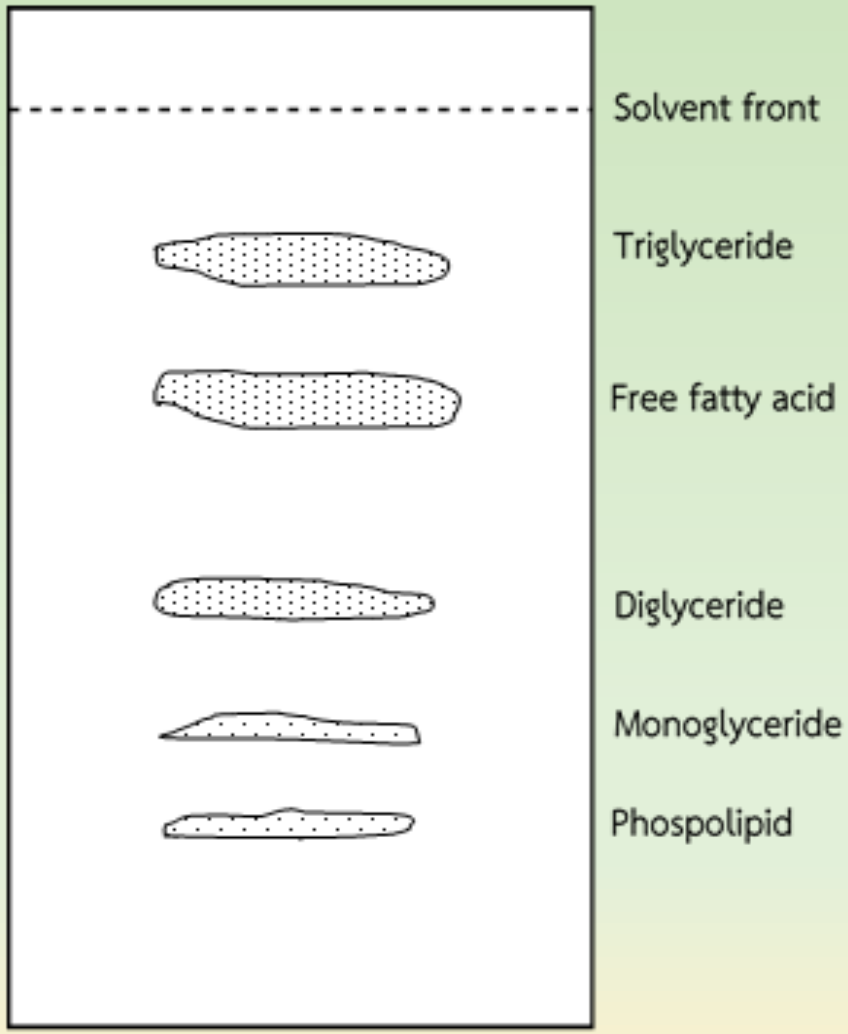
ไกลโคลิปิด (Glycolipid) หรือไกลโคฟิงโกลิปิด (Glycosphingolipid)

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography)

- ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีสามารถจะเคลือบด้วยวัสดุดูดซับหลายชนิด เช่น ซิลิกาเจล (Siliga gel) อะลูมินา (Alumina) เซลลูโลส หรือสารอื่นๆ
- สารที่นิยมใช้ในการแยกลิปิดมากได้แก่ ซิลิกาเจล จี (Siliga gel G) ซึ่งมีแคลเซียมซัลเฟต (Calcium sulfate) ผสมอยู่ประมาณ 13 % เพื่อช่วยให้สารซิลิกาเกาะ ติดกับแผ่นกระจกได้ดีขึ้น
- หากต้องการแยกสารให้ดียิ่งขึ้น ซิลิกาเจล เอช (Siliga gel H) **ซึ่งไม่มีแคลเซียมซัลเฟตผสมอยู่จะแยกสารให้คมชัดกว่า**
- ซิลิกาเจลทั้งสองแบบ ยังมีการเติมสารฟลูออเรสเซนต์ (Fluarescent) ลงไปเพื่อช่วยเพื่อให้การตรวจวัดสารตัวอย่าทำได้ง่ายขึ้นโดยการส่องแบบอุลตร้าไวโอเลต

การแยกสารผสมบนผิวทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล

จะเป็นแบบการเลือกดูดซับระหว่างซิลิกากับสารตัวอย่าง และซิลิกากับตัวชะ



รูปที่ 1.1 แสดงการแยกลิปิดชนิดต่างๆ ด้วย TLC ที่ชะด้วย

Hexane : diethyl ether : formic acid 80 : 20 : 2

แอช พี แอล ซี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

- เครื่องตรวจวัดเอชพีแอลซียังไม่เหมาะกับการวิเคราะห์สารจำพวกลิปิด
- สารลิปิดส่วนใหญ่ไม่ดูดกลืนรังสีอุลตร้าไวโอเลต
- เครื่องมือตรวจวัดดัชนีหักเห (Refractive index detector) มีความว่องไวต่ำ ต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมาก
- อีแวพพอเรทีฟ ไลท์ สแคทเทอริง (Evaporative light scattering) ซึ่งมีความไวสูง เหมาะต่อการวิเคราะห์สารที่ไม่ดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รวมทั้งสารจำพวกลิปิดชนิดต่างๆ เครื่องตรวจวัดนี้อาศัยการกระเจิงแสงของสารตัวอย่างจากการระเหยแห้ง หลังจากถูกชะออกจากคอลัมน์ เครื่องตรวจวัดนี้จึงเหมาะต่อการวิเคราะห์สารลิปิดใน HPLC

แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

- ลิปิดเป็นสารที่มีโพราลิตีต่ำ (ต่ำกว่าสารชีวโมเลกุลอื่นๆ)
- มีขนาดโมเลกุลไม่ใหญ่นัก
- ระเหยเป็นไอได้ง่าย

Gas solid Chromatography (GSC)

คอลัมน์ของ GSC เป็นสารดูดซับ การแยกสารจึงเป็นลักษณะการเลือกดูดซับของสารดูซับในคอลัมน์

Gas liquid Chromatography (GLC)

คอลัมน์ GLC นั้นมีสารรองรับเป็นสารเฉื่อยเคลือบด้วยของเหลว การแยกจะสารเป็นลักษณะการแบ่งการละลายหรือแบ่งการกระจายตัวของสารในของเหลวที่เคลือบสารรองรับแก๊สตัวพา (Carrier Gas)

แคพพิลารีคอลัมน์ (Capillary column)

ไม่มีสารรองรับบรรจุอยู่ ของเหลวที่จะช่วยแยกสารผสมถูกเคลือบไปบนผนังของคอลัมน์ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กมาก (0.1 - 0.75 มม.)

แก๊สโครมาโตกราฟีใช้ด้านการวิเคราะห์เอกลักษณ์ (Identification) ของสารได้หลายวิธีคือ

1. การใช้เวลาชะ (Retention time)
2. การใช้ค่ายึดเหนี่ยวสัมพัทธ์ (Relative retention, α)
3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารในอนุกรมเดียวกัน (Homologous series)
4. ดัชนียึดเหนี่ยว (Retention index, I)
5. การวิเคราะห์โดยอาศัยค่าการตอบสนองสัมพัทธ์ของเครื่องตรวจวัด

1. การใช้เวลาชะ (Retention time)

ภายใต้สภาวะการทำโครมาโตกราฟีคงที่

- อุณหภูมิ
- อัตราการไหลของแก๊สตัวพา
- ความยาวคอลัมน์
- และสารบรรจุในคอลัมน์ เป็นต้น

สารหนึ่งๆ จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยเวลา หรือปริมาตรคงที่

การใช้ประโยชน์จากค่าเวลาชะ (Retention time) หรือปริมาตรชะ (Retention volume)

- นำสารที่ต้องการพิสูจน์มาทำโครมาโตกราฟีในสภาวะเดียวกันกับสารที่รู้สูตรโครงสร้างแน่นอน และเปรียบเทียบเวลาที่สารถูกชะออกมา
- **ถ้าเวลาต่างกันแสดงว่าสารทั้งสองนั้นไม่ใช่สารตัวเดียวกัน**
- **หากเวลาการชะเท่ากัน สารทั้งสองอาจเป็นสารชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้**
- ดังนั้นแก๊สโครมาโตกราฟี จึงเป็น**การพิสูจน์เพื่อหักล้างมากกว่าการพิสูจน์แน่ชัด** (Positive identification)

การใช้ Mass Spectrometer ควบเข้ากับเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Combined GC-MS) เป็นที่นิยมกันมากเพราะสามารถแยกสารผสมและวิเคราะห์คุณลักษณะของสารได้ทันที

<u>การใช้ค่าเวลาชะใช้ได้ 2 ลักษณะ คือ</u>

1. ลักษณะไม่ปรับแก้ค่า
2. ลักษณะปรับแก้ค่ากับค่าของอากาศหรือพีค (Peak) ของตัวทำละลาย

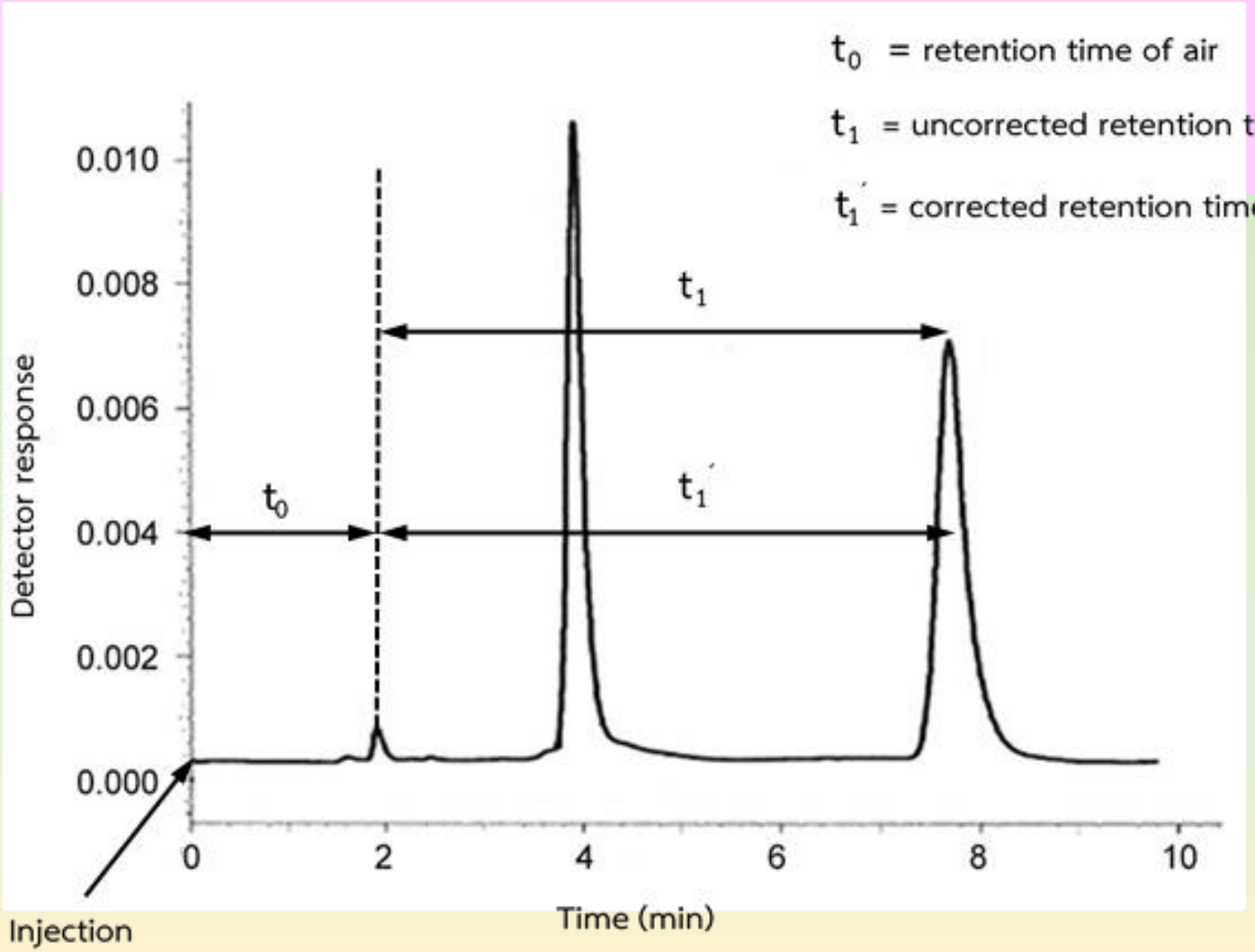
1. ค่าไม่ปรับแก้

ค่าไม่ปรับแก้เป็นเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารเข้าไปจนถึงยอดของพีค (Peak) ที่สารถูกชะออกมา ค่าไม่ปรับแก้ไม่ค่อยใช้กันเพราะข้อมูลไม่อาจนำไปเปรียบเทียบกับเครื่องมือและคอลัมน์ชนิดอื่น

2. ค่าปรับแก้

ค่าปรับแก้เป็นค่าที่วัดจากยอดพีคของอากาศถึงยอดพีคของสาร ค่านี้จะลบเอา Dead volume ของเครื่องมือออกแล้ว

ค่าปรับแก้นี้จะเปลี่ยนตามสภาวะการทำโครมาโตกราฟีอย่างมาก เช่น ขนาดของคอลัมน์ (ความกว้างและความยาว) อัตราการไหลของแก๊สตัวพา อุณหภูมิ ชนิดของสารบรรจุ ชนิดของแก๊สตัวพา เป็นต้น



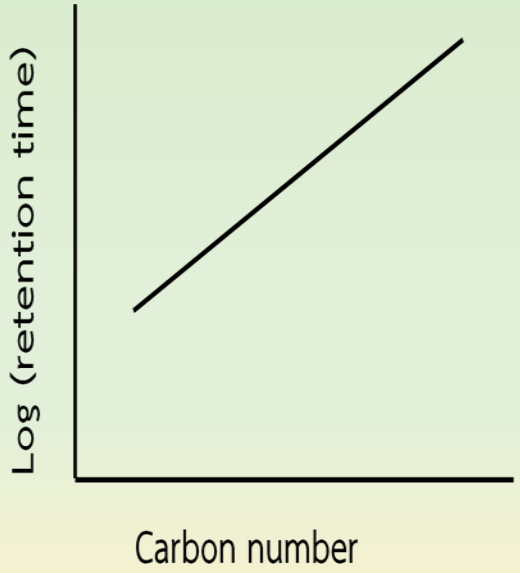
2. การใช้ค่ายึดเหนี่ยวสัมพัทธ์ (Relative retention, **α)**

ได้จากเวลาชะ หรือปริมาตรชะของสารหารด้วย เวลาชะหรือปริมาตรชะของสารอ้างอิงที่ผสมลงไปในตัวอย่าง

$$\alpha = X_2/X_1$$

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารในอนุกรมเดียวกัน (Homologous series)

- สารอนุกรมเดียวกันหมายถึงสารที่มีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) เหมือนกันแต่มีไฮโดรคาร์บอนที่ยาวไม่เท่ากันสารในอนุกรมเดียวกัน
- สารเหล่านี้เมื่อฉีดเข้าไปยังเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี มันจะถูกชะออกมาตามลำดับจำนวนคาร์บอน



เขียนกราฟระหว่างค่า log (เวลาชะ) กับจำนวนคาร์บอนจะได้เส้นตรง

4. ดัชนียึดเหนี่ยว (Retention index, I)

ค่าดัชนียึดเหนี่ยวของ Wehrli และ Kovalts ดังสมการ

$$I = 200\frac{log\alpha(x)}{log\alpha(P_{z+2})} + 100Z$$

- α (x) เป็นค่ายึดเหนี่ยวสัมพัทธ์ (relative retention) ของสาร X โดยอ้างอิงกับสารจำพวกพาราฟิน (paraffin) PZ
- PZ เป็นสารพาราฟินที่มีจำนวนคาร์บอนเป็นเลขคู่
- α (PZ+2) เป็นค่ายึดเหนี่ยวสัมพัทธ์ของสารพาราฟินที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น PZ+2 โดยอ้างอิงกับพาราฟิน PZ

5. การวิเคราะห์โดยอาศัยค่าการตอบสนองสัมพัทธ์ของเครื่องตรวจวัด

เครื่องโครมาโตกราฟีจะต้องมีเครื่องตรวจวัดอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งอาจจะ

1. ต่ออย่างอนุกรม : สารที่ชะออกจากคอลัมน์จะผ่านเข้าไปยังเครื่องตรวจวัดที่ 1 และที่ 2 ตามลำดับ
2. ต่อแบบขนาน : สารที่ชะออกจากคอลัมน์จะถูกแยกออกเป็นสองส่วน เพื่อผ่านเข้าไปยังเครื่องตรวจวัด 2 ชนิด

อัตราส่วนของการตอบสนองของสารจากเครื่องตรวจวัดสองตัว จะบ่งบอกคุณลักษณะของสาร