สรุปวิชา 01402312 ปฏิบัติการชีวเคมี I

บทที่ 1 บัฟเฟอร์

1. บัฟเฟอร์ คือ สารละลายที่สามารถต้านการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างได้ในระดับหนึ่ง

2. ระบบบัฟเฟอร์ในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ ฟอสเฟต ไบคาร์บอเนตและโปรตีน

3. สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยกรดอ่อน (HA) ทำหน้าที่ให้โปรตอน (H^+) = proton donor และคู่เบสของกรดอ่อนนั้น (conjugate base = A^- = proton acceptor)

4. เมื่อเติมกรดลงในสารละลายบัฟเฟอร์

A^- จะทำหน้าที่รวมตัวกับ H^+ เกิดเป็นกรดอ่อน HA ที่แตกตัวได้น้อย ทำให้ pH เปลี่ยนแปลงน้อยมาก

5. เมื่อเติมด่างลงในสารละลายบัฟเฟอร์

HA จะทำหน้าที่ขจัดด่าง โดยรวมตัวกับด่างเกิดเป็นน้ำ pH จึงไม่เปลี่ยน

6. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ ต้องใช้สมการ Henderson-Hasselbalch

$pH = pK_a + \log [A^-]/[HA]$

7. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ จะกำหนดค่าต่าง ๆ ดังนี้

- ชนิดของบัฟเฟอร์ เช่น phosphate acetate citrate
- ค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น 4.0 6.0 6.8 8.0
- ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น 0.1 M 0.5 M (M = โมลาร์)

ค่า pK_a ดูจากตาราง หรือ โจทย์อาจจะกำหนดมาให้เลย เช่น pK_{a2} ของการแตกตัวของ $H_2PO_4^-$ เป็น $H^+ + HPO_4^{2-}$ มีค่า = 6.8

8. ในห้องปฏิบัติการได้ทดลองเตรียม phosphate buffer pH 6.8

9. ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ = ความเข้มข้นขององค์ประกอบทั้งสองรวมกัน ไม่ใช่ค่าเฉลี่ย

10. การเลือกกรดอ่อนมาเตรียมบัฟเฟอร์ ต้องเลือกกรดอ่อนที่มีค่า pKa ใกล้เคียงกับค่า pH ของบัฟเฟอร์ที่ต้องการ หรือห่างกันไม่เกิน 1

11. บัฟเฟอร์ นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ค่า pH ไม่เปลี่ยน

12. ถ้าองค์ประกอบของบัฟเฟอร์ มี A^- เข้มข้นมากกว่า HA ค่า pH ของบัฟเฟอร์จะเป็นเบสมากกว่าค่า pKa

13. ถ้าความเข้มข้นของ A^- เท่ากับ HA ค่า pH จะเท่ากับ pKa

14. การเจือจางสาร ให้หาจำนวนเท่าของการเจือจางก่อน จากนั้นจึงนำตัวเลขจำนวนเท่าไปคำนวณต่อ ตัวอย่างเช่น ต้องการเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 M ให้เป็น 0.1 M ปริมาตร 100 ml

วิธีทำ เอา 0.5 M หารด้วย 0.1 M ได้เท่ากับ 5 แสดงว่าเจือจาง 5 เท่า

จากนั้น เอา 5 ไปหารปริมาตรที่ต้องการ ได้ 100 ml/5 = 20 ml

ดังนั้นต้องเอา 0.5 M มา 20 ml เติมน้ำกลั่น 100-20 = 80 ml ก็จะได้ 0.1 M ตามต้องการ

15. methyl red เปลี่ยนสีช่วง pH 4.2-6.3 จากแดงเป็นเหลือง ดังนั้นที่ pH 6.8 จะมีสีเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อเติมกรด

16. phenol red เปลี่ยนสีช่วง pH 6.8-8.4 จากเหลืองเป็นแดง ดังนั้นที่ pH 6.8 จะมีสีเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อเติมเบส

17. phenolphthalein เปลี่ยนสีช่วง pH 8.3-10.0 จากไม่มีสีเป็นสีชมพู ดังนั้นที่ pH 6.8 จะไม่มีสี และเปลี่ยนเป็นสีชมพูเมื่อเติมเบสมาก ๆ

18. กรณีที่องค์ประกอบของบัฟเฟอร์เป็นเกลือทั้งคู่ เกลือที่มี H มากกว่า ทำหน้าที่เป็น proton donor เช่น NaH_2PO_4 กับ Na_2HPO_4 นั้น ตัวแรกเป็น proton donor

19. บัฟเฟอร์ความเข้มข้นสูง จะมีประสิทธิภาพต้านทานการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดีกว่าบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่ำ นั่นคือ ถ้าทดลองหยดกรดหรือเบสลงไปในบัฟเฟอร์ที่มีอินดิเคเตอร์อยู่ บัฟเฟอร์ความเข้มข้นสูง จะต้องใช้กรดหรือเบสมากกว่าในการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์

บทที่ 2 Spectrophotometry

1. ช่วงคลื่นที่ตามองเห็นอยู่ในช่วง 350 – 780 nanometer (nm)
2. spectrum คือ กราฟเส้นโค้งที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่น
3. ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ไม่มีหน่วย
4. ค่า λmax ของสาร หมายถึง ค่าความยาวคลื่นที่สารนั้นดูดกลืนแสงได้มากที่สุด มีหน่วยเป็น nm
5. A = 2 – log%T เช่น ถ้าค่าเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (%T) = 10 จะได้ค่า A = 1
6. ค่า A มีค่าตั้งแต่ 0 ถึงอนันต์ แต่ค่า %T มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100%
7. ถ้าค่า %T = 100% ค่า A จะเท่ากับ 0
8. สารชนิดเดียวกัน จะมีค่า λmax เท่ากัน
9. ถ้าสาร A และสาร B มีค่า λmax อย่างละ 1 ค่า เมื่อเอาสาร A กับ B ผสมกันมาหา spectrum จะได้ค่า λmax 2 ค่า (มองเห็นเหมือนภูเขา 2 ลูก)
10. เมื่อพล็อตกราฟโดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้น แกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง (A) จะได้กราฟเส้นตรง ผ่านจุดกำเนิด (0,0)
11. สารละลายเปล่า (blank) หมายถึง สารละลายที่มีทุกอย่าง ยกเว้นสารที่ต้องการวิเคราะห์
12. สารละลายสีผสมอาหาร Brilliant blue FCF มีสีน้ำเงิน ค่า λmax = 620 nm
13. สารละลายสีผสมอาหาร Carmoisine (Azorubine) มีสีแดง ค่า λmax = 520 nm
14. สารละลายสีผสมอาหาร Ponceau 4R มีสีแดง ค่า λmax = 500 nm
15. สารละลายสีผสมอาหาร Sunset yellow FCF มีสีส้ม ค่า λmax = 480 nm
16. สารละลายสีผสมอาหาร Tartrazine มีสีเหลือง ค่า λmax = 420 nm

บทที่ 3 คาร์โบไฮเดรต

1. Benedict’s test ใช้ทดสอบน้ำตาล reducing ใช้ $CuSO_4$ โซเดียมซิเตรตและโซเดียมคาร์บอเนต มีสภาวะเป็นด่าง ได้ผลบวกเป็นตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O (คิวปรัสออกไซด์) น้ำตาลซูโครส และโพลีแซคคาไรด์ ให้ผลลบ
2. Barfoed’s test ใช้ทดสอบน้ำตาล monosaccharide ได้ตะกอนสีแดงอิฐ สภาวะเป็นกรด
3. Anthrone test ได้สีน้ำเงินแกมเขียวกับคาร์โบไฮเดรตทุกชนิด
4. Bial’s test ใช้ทดสอบน้ำตาล pentose (เช่น xylose) ได้สีน้ำเงินแกมเขียว
5. Seliwanoff’s test ใช้ทดสอบน้ำตาล ketohexose (เช่น fructose) ได้สีแดง (sucrose กับ inulin ก็ได้ผลบวกด้วย เพราะมี sucrose เป็นองค์ประกอบ)
6. ไอโอดีน ใช้ทดสอบแป้งได้ผลบวกเป็นสีน้ำเงิน

7. การหาปริมาณกลูโคส ใช้วิธี O-toluidine ได้สีน้ำเงินแกมเขียว มีค่า A แปรผันตรงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส นำไปวัดค่า A ที่ 630 นาโนเมตร

8. ความเข้มข้นของกลูโคส หาได้จาก ค่าการดูดแสง (A) หารด้วย ความชันของกราฟมาตรฐาน

9. แนวทางการวิเคราะห์ unknown ที่มีคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิดผสมกัน

- ทดสอบไอโอดีนก่อน ถ้าได้สีน้ำเงิน แสดงว่า มีแป้งอยู่ด้วย
- ทดสอบ Benedict ถ้าได้ผลลบ แสดงว่า ไม่มีน้ำตาล reducing อยู่เลย ซึ่งก็คือ แป้ง + ซูโครส
- ทดสอบ Seliwanoff ถ้าได้ผลบวก แสดงว่า มี fructose หรือ sucrose อยู่ด้วย
- ทดสอบ Bial ถ้าได้ผลลบ แสดงว่า ไม่มี xylose

Unknown	Benedict	Barfoed	Anthrone	Bial	Seliwanoff
แป้ง + sucrose	-	-	+	-	+
แป้ง + fructose	+	+	+	-	+
แป้ง + maltose	+	-	+	-	-
แป้ง + xylose	+	+	+	+	-
Glucose + Xylose	+	+	+	+	-
Maltose + Sucrose	+	-	+	-	+
Sucrose+ Xylose	+	+	+	+	+

บทที่ 4 กรดอะมิโนและโปรตีน I

1. ปฏิกิริยา Ninhydrin เกิดปฏิกิริยากับหมู่ alpha amino ของกรดอะมิโน ได้สีน้ำเงินม่วง ยกเว้นกรดอิมิโน คือ โพรลีน ได้สีเหลือง

2. ปฏิกิริยา Xanthoproteic ใช้ทดสอบกรดอะมิโน aromatic เช่น tyrosine, tryptophan, phenylalanine ได้สีเหลืองใส เมื่อทำให้เป็นด่างโดยการเติม NaOH จะได้เกลือสีส้ม

3. ปฏิกิริยา Sakaguchi ใช้ทดสอบหมู่กัวนิดีนในกรดอะมิโน Arginine ได้สีแดง ใช้แอลฟาแนพธอลและโซเดียมไฮโปโบรไมต์ในการทดสอบ

4. ปฏิกิริยาตะกั่วซัลไฟด์ ใช้ทดสอบกรดอะมิโนซิสเตอีน ได้ตะกอนสีเทาดำ เมื่อเติม lead acetate

5. ปฏิกิริยา Hopkins-Cole's ใช้ทดสอบวงแหวนอินโดลในกรดอะมิโนทริพโตเฟน ใช้กรดไกลออกซิลิก ได้วงแหวนสีม่วงเมื่อเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น

6. การหาปริมาณโปรตีน ใช้วิธี Biuret ได้สีม่วง วัดค่า A ที่ 540 nm และวิธี Bradford วัดค่า A ที่ 595 nm

7. วิธี Biuret ใช้ $CuSO_4$ มีความไวต่ำ เหมาะสำหรับโปรตีนในระดับความเข้มข้น 1-10 mg/ml

8. วิธี Bradford ใช้สี Coomassie Brilliant blue G-250 มีความไวสูง เหมาะสำหรับโปรตีนในระดับความเข้มข้น 10-100 μg/ml (0.01-0.1 mg/ml)

9. ค่า A ที่จะนำมาใช้คำนวณความเข้มข้น ต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 0.1-0.9 เท่านั้น ถ้าน้อยหรือมากกว่านี้ จะเป็นค่าที่ไม่น่าเชื่อถือ

10. น้ำยาแบรดฟอร์ด สีน้ำเงินจะติดหลอดคิวเวตต์ ต้องล้างด้วยกรดหรือแอลกอฮอล์ ในห้องแล็บใช้ ethanol ล้าง

11. การคำนวณหาความเข้มข้นของ unknown ใช้สูตร C unknown = (A unknown/A standard) x C standard

ตัวอย่างเช่น ความเข้มข้นของแอลบูมินไข่ขาว 10 mg/ml วัดค่าการดูดแสงด้วยวิธีไบยูเรทได้ 0.32 และโปรตีน unknown วัดค่าการดูดแสงได้ 0.16 แสดงว่าโปรตีน unknown มีความเข้มข้น
= (0.16/0.32) x 10 mg/ml = 5.0 mg/ml
12. โปรตีน albumin มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบ ทำให้ได้ผลบวกกับปฏิกิริยาที่ทดสอบทุกปฏิกิริยา ส่วนโปรตีนเจลาติน มักจะขาดกรดอะมิโน aromatic ทำให้บางปฏิกิริยาได้ผลลบ
13. ปฏิกิริยา Molisch ใช้ทดสอบคาร์โบไฮเดรต ได้วงแหวนสีม่วงกับน้ำตาลและไกลโคโปรตีน

บทที่ 5 โปรตีน II
1. โปรตีน albumin ละลายน้ำได้และ coagulate ได้เมื่อถูกความร้อน สามารถตกตะกอนด้วย ammonium sulfate อิ่มตัว 100% พบทั้งในน้ำนมและไข่ขาว
2. โปรตีน globulin ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง coagulate ได้เมื่อถูกความร้อน สามารถตกตะกอนได้ด้วย ammonium sulfate 34-50% ของความอิ่มตัว
(วิธีจดจำ glo = กลม = ตกตะกอนง่าย ส่วน อัล = อิ่มตัว อ อ่าง ตกตะกอนยากกว่า)
3. การตกตะกอนที่จุด isoelectric (ค่า pI)
- น้ำนม ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิด เมื่อปรับ pH ให้เป็น 4.8 จะได้โปรตีน เคซีน ตกตะกอนออกมา ส่วนใสจะมีโปรตีน lactoglobulin กับ lactalbumin
- เมื่อนำส่วนใสไปเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ให้มีความเข้มข้น 50% ของความอิ่มตัว จะได้ตะกอนของโปรตีน lactoglobulin แต่ lactalbumin ยังไม่ตกตะกอนออกมา
- หลอดที่เติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตจนอิ่มตัว 100% จะได้โปรตีนทั้งสองชนิดออกมาพร้อมกัน
- การเติมกรดไตรคลอโรแอซีติก (TCA) ลงไปในส่วนใส เพื่อทดสอบว่าในส่วนใสยังมีโปรตีนอยู่หรือไม่ ถ้ามี จะตกตะกอนออกมาเมื่อเติม TCA
- เมื่อนำส่วนใสไปต้ม ก็จะได้โปรตีนทั้งสองออกมา
4. การตกตะกอนด้วย cation ใช้สังกะสีกับปรอท ได้ตะกอนโปรตีน albumin
5. เมื่อเติม EDTA จะเป็น chelating agent จับกับ cation ทำให้โปรตีนละลาย
6. การตกตะกอนด้วย anion ใช้กรดพิคริก กรด TCA และโซเดียมทังสเตท
7. หลอดที่ตกตะกอนได้ไม่ดี จะมีโปรตีนเหลืออยู่ในส่วนใส เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยาไบยูเรท จะได้สีม่วง
8. หลอดที่มีตะกอน เมื่อเติม NaOH ตะกอนจะกลับละลายได้อีก เพราะ Na ไปจับกับแอนไอออน
9. หลอดที่ไม่มีตะกอน เมื่อเติม HCl เพื่อปรับ pH ให้เป็นกรด อาจจะช่วยให้เกิดตะกอนได้ง่ายขึ้น

บทที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธีเคลดาฮ์ล
1. หลักการใช้วิธีการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ทำให้ไนโตรเจนกลายเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นทำปฏิกิริยากับ NaOH ได้แอมโมเนีย ละลายน้ำได้ NH_4OH ซึ่งดักเก็บไว้ได้ด้วยกรดบอริก แล้วไตเตรตหาปริมาณบอเรทไอออนที่เกิดขึ้น
2. เมื่อได้ปริมาณไนโตรเจนเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว นำไปคูณด้วยตัวคูณ จะได้เปอร์เซ็นต์โปรตีน โดยทั่วไปใช้ 6.25 เป็นตัวคูณ

บทที่ 1 บัฟเฟอร์

1. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมขึ้นจากคู่สารต่อไปนี้ จงขีด ✓ ลงในช่อง เพื่อบอกว่าสารใดมีบทบาทเป็น proton donor และสารใดเป็น proton acceptor

	คู่สารคู่ที่ 1		คู่สารคู่ที่ 2		คู่สารคู่ที่ 3	
	H_3PO_4	NaH_2PO_4	Na_2CO_3	$NaHCO_3$	HCOONa	HCOOH
Proton donor	✓			✓		✓
Proton acceptor		✓	✓		✓	

แนวการตอบ สารที่เป็น proton donor จะมี H มากกว่าอีกตัว

2. สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมจาก H_2NCH_2COOH โดยใช้ค่า pK_{a2} = 9.78 จะมี proton donor และ proton acceptor เป็นสารใด

ตอบ ที่ pK_{a2} glycine จะมีสมการการแตกตัวคือ $^+H_3NCH_2COO^- \longrightarrow H^+ + H_2NCH_2COO^-$

ดังนั้น proton donor คือ $^+H_3NCH_2COO^-$ ส่วน proton acceptor คือ $H_2NCH_2COO^-$

3. ในการเตรียมบัฟเฟอร์ 0.25 โมลาร์ พีเอช 7.0 จำนวน 100 มิลลิลิตร จะต้องใช้

ก. 0.25 M NaH_2PO_4 , 0.25 M K_2HPO_4 และน้ำกลั่น อย่างละกี่มิลลิลิตร

จากสมการ Henderson-Hassenbalch pH = pKa + log([A^-]/[HA])

แทนค่าได้ 7.0 = 6.8 + log([A^-]/[HA]) ดังนั้น log([A^-]/[HA]) = 0.2 และ [A^-]/[HA] = 1.58

แต่ [buffer] = [A^-] + [HA] = 0.25 M

ดังนั้น 1.58[HA] + [HA] = 0.25 M และ [HA] = 0.097 M , [A^-] = 0.153 M

พิจารณา 0.25 M NaH_2PO_4 ซึ่งทำหน้าที่เป็น HA จะต้องใช้ปริมาตร = (0.097/0.25) x 100 = 38.8 ml

และต้องใช้ 0.25 M K_2HPO_4 ซึ่งทำหน้าที่เป็น A^- ปริมาตร = (0.153/0.25) x 100 = 61.2 ml

ผสมกันจะได้ 100 ml พอดี ไม่ต้องเติมน้ำกลั่น

ข. 0.5 M NaH_2PO_4 , 0.5 M NaOH และน้ำกลั่นอย่างละกี่มิลลิลิตร

ในกรณีนี้ องค์ประกอบที่ยังขาดอยู่คือ Na_2HPO_4 จะเกิดขึ้นได้ดังสมการ

$NaH_2PO_4 + NaOH \longrightarrow Na_2HPO_4 + H_2O$

จากข้อ ก. ต้องการ Na_2HPO_4 เข้มข้น 0.153 M

ดังนั้นต้องใช้ 0.5 M NaOH ปริมาตร = 0.153/0.5 x 100 = 30.6 ml

และต้องใช้ 0.5 M NaH_2PO_4 ปริมาตร = 0.25/0.5 x 100 = 50 ml ---------- (0.25 M มาจาก 0.097 M + 0.153 M เพราะส่วนหนึ่งทำหน้าที่เป็น HA และอีกส่วนทำหน้าที่เกิดปฏิกิริยากับ NaOH กลายเป็น A^-)

เติมน้ำกลั่นอีก 100-(30.6+50) = 19.4 ml

4. เมื่อนำ 10 มิลลิลิตร 0.5 M CH_3COOH ผสมกับ 10 มิลลิลิตร 0.2 M CH_3COONa สารละลายที่ได้จะมีพีเอชเท่าใด (กำหนด pK_a = 4.76) และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเท่าใด

ปริมาตรรวมหลังผสมรวมกัน เท่ากับ 10+10 = 20 มิลลิลิตร

หลังผสมรวมกันแล้ว ความเข้มข้นของ CH_3COOH จะเป็น 0.25 โมลาร์

หลังผสมรวมกันแล้ว ความเข้มข้นของ CH_3COONa จะเป็น 0.1 โมลาร์

แทนค่าลงในสมการ Henderson-Hasselbalch

$pH = pK_a + \log([A^-]/[HA])$

$pH = 4.76 + \log(0.1/0.25) = 4.36$

และความเข้มข้น = 0.25 + 0.1 = 0.35 โมลาร์

5. การผสมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตทเข้าด้วยกัน จะได้สารละลายบัฟเฟอร์หรือไม่ ถ้าได้จะมีความแตกต่างจากการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตท และการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ อย่างไรบ้าง จงอธิบาย

สมการเคมีของการผสมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตท เป็นดังนี้

$HCl + CH_3COONa \longrightarrow CH_3COOH + NaCl$ องค์ประกอบไม่ครบ ไม่ได้สารละลายบัฟเฟอร์ ขาด A^-

สมการเคมีของการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมแอซีเตท เป็นดังนี้

$CH_3COOH + CH_3COONa \longrightarrow CH_3COONa + CH_3COOH$ ได้องค์ประกอบครบเป็นสารละลายบัฟเฟอร์

สมการเคมีของการผสมสารละลายกรดแอซีติกกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นดังนี้

$CH_3COOH + NaOH \longrightarrow CH_3COONa + H_2O$ องค์ประกอบไม่ครบ ไม่ได้สารละลายบัฟเฟอร์ ขาด HA

เมื่อพิจารณาทั้งสามสมการเคมี ความแตกต่างอยู่ที่องค์ประกอบที่เกิดขึ้นด้านขวามือของสมการ ต้องมีครบทั้งกรดอ่อน (HA) และเกลือของกรดอ่อน (A^-) จึงจะได้สารละลายบัฟเฟอร์

หมายเหตุ กรณีที่ผสม HCl ลงใน CH_3COONa หรือกรณีที่ผสม NaOH ลงใน CH_3COOH โดยจำนวนโมลของ HCl หรือ NaOH น้อยกว่า CH_3COONa หรือ CH_3COOH ตามลำดับ แบบนี้ก็จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ เพราะมีสารเหลือจากปฏิกิริยาอยู่

บทที่ 2 สเปกโตรโฟโตเมตรี

1. นำเนย 10 กรัม มาทำปฏิกิริยาสะพอนิฟิเคชัน แล้วสกัดเอา non-saponification fraction มาละลายในคลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร ค่าการดูดแสงที่วัดได้โดยใช้คิวเวตขนาด 1 เซนติเมตร เป็น 0.55 ที่ 328 นาโนเมตรและ 0.48 ที่ 458 นาโนเมตร **จงคำนวณหาปริมาณแคโรทีนและวิตามินเอที่มีอยู่ในเนย** โดยกำหนดค่า extinction coefficient ของแคโรทีนและวิตามินเอที่ความยาวคลื่นทั้งสองไว้ในตารางข้างล่างนี้

สารประกอบ	$E1\%_{1cm}$ ในคลอโรฟอร์ม	
	328 นาโนเมตร	458 นาโนเมตร
แคโรทีน	340	2200
วิตามินเอ	1550	~0

แนวทางการหาคำตอบ นิสิตต้องตอบให้ได้ก่อนว่าสารทั้งสองต่างรบกวนการวิเคราะห์ซึ่งกันและกันหรือไม่ และถ้ารบกวนการวิเคราะห์ซึ่งกันและกันจริง การรบกวนนั้นจะเกิดขึ้นเมื่อมีการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นใด

ในกรณีที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้น สารทั้งสองต่างรบกวนซึ่งกันและกัน นี่หมายความว่าที่ความยาวคลื่นนี้ สารทั้งคู่ต่างวัดค่าการดูดแสงได้ ดังนั้นค่าการดูดแสงที่วัดได้คือค่าการดูดแสงของสารแต่ละชนิดรวมกัน ซึ่งการหาปริมาณสารชนิดใดจากค่าการดูดแสงด้วยการคำนวณโดยใช้กฎของเบียร์ จึงต้องหักค่าการดูดแสงของสารอีกตัวที่รบกวนการวิเคราะห์ออกก่อน

วิธีทำ ค่า $E1\%_{1cm}$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสงของสารละลายที่มีความเข้มข้นของสารดูดกลืนแสงเป็น 1 กรัมเปอร์เซ็นต์ และความยาวของระยะทางที่แสงส่องผ่านเป็น 1 เซนติเมตร

จากกฎของเบียร์ A = abc เมื่อ a = $E1\%_{1cm}$, b = ระยะทางที่แสงส่องผ่าน = 1 cm และ c = ความเข้มข้นของสาร

จากตาราง จะเห็นว่าที่ความยาวคลื่น 458 นาโนเมตร ไม่มีการดูดกลืนแสงของวิตามินเอรบกวน

ดังนั้น หาปริมาณแคโรทีนได้จาก c = A/(ab) = 0.48/(2200 x 1) = 2.18×10^{-4} กรัม/100 มิลลิลิตร

ส่วนที่ความยาวคลื่น 328 นาโนเมตร แคโรทีนก็สามารถดูดกลืนแสงได้

หาปริมาณวิตามินเอผสมแคโรทีนได้จาก c = A/(ab) = 0.55/(1550 x 1) = 3.55×10^{-4} กรัม/100 มิลลิลิตร

ดังนั้น วิตามินเอมีปริมาณ = 0.55/(1550 x 1) - 0.48/(2200 x 1) = 1.37×10^{-4} กรัม/100 มิลลิลิตร

2. สารละลายสีผสมอาหารตัวอย่าง U.... สี ..... ที่กลุ่มนิสิตได้มา นิสิตคิดว่าจะสามารถหาความเข้มข้นของแต่ละแม่สีที่ผสมอยู่ได้ถูกต้องหรือไม่ แนวการตอบ ให้ดูแนวทางจากคำถามข้อ 1.

วิธีทำ ต้องดูจากการพล็อตกราฟ spectrum ว่ามีการผสมกันของแม่สีแต่ละสีที่ λ_{max} ทั้งสองหรือไม่ ถ้ามีการผสมกันก็จะไม่สามารถหาความเข้มข้นของแต่ละแม่สีได้ถูกต้อง

3. จงให้เหตุผลมา เพราะเหตุใดการหาความเข้มข้นของสารจึงต้องวัดค่าการดูดแสงที่ λ_{max} ของสารนั้น

ตอบ ที่ λ_{max} สารนั้น ๆ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด ทำให้มีความไวในการวัดสูงที่สุด ได้ค่าที่น่าเชื่อถือ ลดการรบกวนจากการดูดกลืนแสงของสารอื่น ๆ ที่อาจปนอยู่

บทที่ 3 คาร์โบไฮเดรต

ตัวอย่างไกลโคเจนที่สกัดได้จาก *E.coli* ปริมาณ 25 มิลลิกรัม ถูกนำมาไฮโดรไลซ์ด้วย 2 มิลลิลิตรของกรดซัลฟิวริก 2 โมลาร์ แล้วทำให้เป็นกลางและเจือจางให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสพบว่ามีความเข้มข้น 2.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไกลโคเจนที่มีอยู่จริงในตัวอย่างที่สกัดได้นี้เป็นเท่าใด

แนวทางการคิดต่อไป ต้องพิจารณาถึงปฏิกิริยาการเชื่อมโยงโมเลกุลของกลูโคสเป็นไกลโคเจน ซึ่งจะมีพันธะไกลโคซิดิกเกิดขึ้น นั้นเป็นอย่างไร ก็จะทราบน้ำหนักไกลโคเจนจริงที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น

วิธีทำ

น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคส = 180 (มี 6.02×10^{23} โมเลกุลต่อ 180 กรัม)

ปริมาณกลูโคสที่มีอยู่ใน 10 มิลลิลิตร คิดได้เป็นโมเลกุลกลูโคสทั้งสิ้น $= 23.5 \times 10^{-3} \times (6.02 \times 10^{23}) / 180 = 7.86 \times 10^{19}$ โมเลกุล

(คำนวณจาก กลูโคส 1 โมลาร์ หมายถึง มีกลูโคส 180 กรัม/ลิตร (180 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ดังนั้น 2.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากผลการวิเคราะห์ แสดงว่าใน 10 มิลลิลิตรมีกลูโคส 10x2.35 = 23.5 มิลลิกรัม)

แต่เนื่องจากในการเกิดไกลโคเจนนั้น เมื่อกลูโคส 2 โมเลกุลมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก จะมีน้ำหลุดออกไป 1 โมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของน้ำ = 18

ดังนั้น น้ำหนักที่แท้จริงของไกลโคเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างคือ ประมาณ (180-18)/180 หรือประมาณ 90% ของน้ำหนักกลูโคสหลังไฮโดรไลส์ หรือประมาณ 23.5x0.9 = 21.15 มิลลิกรัม

บทที่ 4 กรดอะมิโนและโปรตีน 1

1. จากการทดสอบต่าง ๆ เจลาตินมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acids) เป็นอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับแอลบูมินไข่ขาว

ตอบ เจลาตินมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น น้อยกว่าแอลบูมินไข่ขาว สังเกตได้จากการทดสอบ xanthoproteic และ Hopkins-Cole's ให้ผลลบ แสดงว่าขาดกรดอะมิโนชนิด aromatic

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเจลาตินด้วยวิธีวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรกระทำได้หรือไม่ จงให้เหตุผล

ตอบ ไม่ได้ เพราะที่ 280 นาโนเมตรเป็นค่าการดูดกลืนแสงของวงแหวน aromatic แต่เจลาตินขาดกรดอะมิโนชนิด aromatic

3. จงเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนวิธีต่าง ๆ ในหัวข้อต่อไปนี้

ก. ความไวของวิธีวิเคราะห์

วิธีแบรดฟอร์ดไวกว่าวิธีไบยูเร็ต

ข. สภาพธรรมชาติของโปรตีนหลังการวิเคราะห์

วิธี Biuret โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจาก Cu^{2+} เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอะตอมไนโตรเจนที่พันธะ peptide ในสภาวะด่าง

วิธี Bradford โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติเช่นกัน เนื่องจากทำในสภาวะที่เป็นกรด

ค.ข้อจำกัดของการวิเคราะห์

วิธี Biuret อาจมีสารรบกวนปฏิกิริยาได้ เช่น แอมโมเนียมไอออน น้ำตาลรีดิวซิ่ง

วิธี Bradford อาจมีความไม่แน่นอนจากสัดส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น อาร์จินีน ที่มีไม่เท่ากันในโปรตีนแต่ละชนิด

ง. ความสะดวกของการวิเคราะห์

วิธี Biuret มีความไวต่ำ เหมาะสำหรับโปรตีนเข้มข้นสูงเท่านั้น และเสียเวลาตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีก่อนวัดค่าการดูดแสง

วิธี Bradford มีความไวสูง สะดวกกว่า Biuret แต่มีสีติดข้างหลอดคิวเวต ต้องล้างทำความสะอาดทุกครั้ง

บทที่ 5 โปรตีน II

สรุปสาระสำคัญของการทดลอง

1. การตกตะกอนโปรตีน ทำเพื่อ

- นำโปรตีนมาใช้ประโยชน์ต่อ เช่น ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ต้องใช้วิธีที่โปรตีนไม่เสียสภาพธรรมชาติ เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต
- กำจัดโปรตีน เพื่อไม่ให้ปนกับสารอื่นที่ต้องการศึกษา เช่น DNA

2. โปรตีนที่ศึกษาทดลองในครั้งนี้ประกอบด้วยโปรตีนในน้ำนม และโปรตีนในไข่ขาว

3. โปรตีนในน้ำนม ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิดคือ casein, lactalbumin และ lactoglobulin

4. casein มีค่า pI = 4.8 สามารถตกตะกอนออกมาได้โดยปรับ pH น้ำนมด้วยกรดไฮโดรคลอริก และใช้ pH meter วัดค่า pH ตลอดเวลา ส่วนใสจะประกอบด้วยโปรตีนอีก 2 ชนิดที่เหลือ

5. lactalbumin จะตกตะกอนได้ ต้องเติม ammonium sulfate จนอิ่มตัว 100%

6. lactoglobulin จะตกตะกอนได้ ต้องเติม ammonium sulfate จนเข้มข้น 34-50% ของความอิ่มตัวขึ้นไป

7. การต้ม จะทำให้ lactalbumin และ lactoglobulin เกิดการจับตัวเป็นก้อนลิ่ม (coagulate) ได้ แต่ casein ไม่เกิด coagulate

8. ไข่ขาว ประกอบด้วยโปรตีน albumin และ globulin

9. การตกตะกอนด้วย cation ต้องปรับ pH ให้มีประจุสุทธิเป็นลบ (โดยทั่วไปคือเป็นกลางหรือด่างเล็กน้อย) ในห้องปฏิบัติการใช้ cation 2 ชนิดคือ Zn^{2+} ในรูป zinc acetate และ Hg^{2+} ในรูปปรอทคลอไรด์ เมื่อได้ตะกอนโปรตีนแล้ว ถ้าเติม EDTA ลงไป EDTA จะทำหน้าที่เป็น chelating agent ดึง cation กลับออกมาจากโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายได้อีก

10. การตกตะกอนด้วย anion ต้องทำที่ค่า pH เป็นกรดมากกว่าค่า pI ของโปรตีนนั้น ๆ เพื่อให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก ในห้องปฏิบัติการใช้กรด picric, กรด trichloroacetic และ sodium tungstate เมื่อได้ตะกอนโปรตีนแล้ว ถ้าเติม NaOH ลงไป Na^{+} จะไปดึง anion กลับมาจากโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายได้อีก

คำถามท้ายบท

การทดลอง 5.1-5.3

เมื่อนำตะกอนทั้ง 3 หลอด (หลอดที่ 1 และ 2 จากการทดลองที่ 5.2 และหลอดที่ 3 จากการทดลองที่ 5.3) ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ตะกอนจะละลายทุกหลอดหรือไม่ เพราะเหตุใดจงอธิบาย

ตอบ หลอดที่ 1 กับหลอดที่ 2 เป็นโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนยังไม่เสียสภาพธรรมชาติ จึงละลายได้เมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนหลอดที่ 3 เป็นโปรตีนที่เกิด coagulate จากการต้ม ไม่สามารถละลายได้อีก เพราะโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (denatured) ไปแล้ว

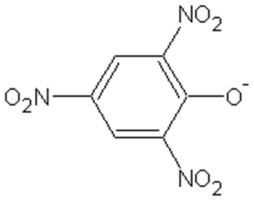
การทดลอง 5.4

EDTA ทำหน้าที่อย่างไร จงอธิบาย

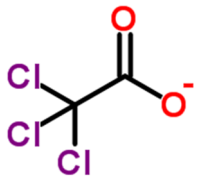
ตอบ ทำหน้าที่เป็น chelating agent จับกับ cation ทำให้โปรตีนสามารถละลายได้อีก

การทดลอง 5.5

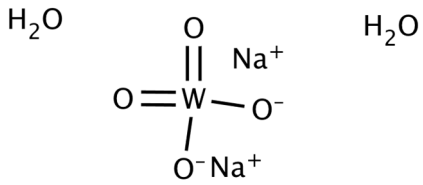
1. แอนไอออนที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนครั้งนี้คืออะไร (เขียนตอบในรูปโครงสร้างเคมีของแอนไอออนนั้น ๆ)



Picrate



Trichloroacetate



Na tungstate

2. แอนไอออนที่ใช้ในครั้งนี้สามารถตกตะกอนได้สำเร็จทุกชนิดหรือไม่ เพราะเหตุใด จงสรุปสภาวะที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตอบ ตกตะกอนสำเร็จเพียงบางชนิด แอนไอออนที่ตกตะกอนได้ดีจะเป็นแอนไอออนที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดพิคริก และโปรตีนที่ตกตะกอนได้ดีต้องมีค่า pI ค่อนข้างสูง เพื่อให้ที่สภาวะของการทดลอง จะมีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก ทำให้รวมตัวกับแอนไอออนได้

3. เพราะเหตุใดการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จึงทำให้โปรตีนกลับมาละลายได้อีก และโปรตีนที่สามารถกลับมาละลายได้อีกนั้น สภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นอย่างไร เหตุใดจึงเป็นเช่นนั้น

ตอบ Na+ ไปแย่งจับกับ anion และ OH- ยังทำให้ค่า pH สูงขึ้น ทำให้โปรตีนไม่มี anion มาจับ และละลายได้อีก โดยโปรตีนยังไม่เสียสภาพธรรมชาติ

การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาฮ์ล

แบบฝึกหัด

ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของเลือดหมูอบแห้ง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอย่างละเอียดแล้วใส่ลงในขวดเคลดาฮ์ล เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร และโปตัสเซียมซัลเฟต 1.5 กรัม ต้มย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 40 ลงไป 15 มิลลิลิตร นำไปกลั่นและรองรับสิ่งที่กลั่นได้ลงในภาชนะที่มีสารละลายบอริกเข้มข้นร้อยละ 0.2 และอินดิเคเตอร์ผสมอยู่ รวมปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายกรดมาตรฐานไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.0196 โมลาร์ การวิเคราะห์นี้ได้มีการทำสารละลายเปล่าควบคู่ไปด้วยโดยไม่มีการใส่ตัวอย่างลงไป บันทึกผลที่ได้ลงไว้ดังนี้

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม) (ต)	100.1	100.2
ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (มิลลิลิตร)		
(ก) ในขวดตัวอย่าง	10.2	10.4
(ข) ในขวดสารละลายเปล่า	0.2	0.2

ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจริง (มิลลิลิตร) (ค = ก-ข)	10.0	10.2
คิดเป็นมิลลิโมลของแอมโมเนียที่เกิด จากการย่อย เท่ากับ (ง = ค x 0.0196)	0.19600	0.19992
คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างได้ เท่ากับ (มิลลิกรัม) (จ = ง x 14)	2.74400	2.79888
คิดเป็นร้อยละไนโตรเจนในตัวอย่าง เท่ากับ (%N) (ฉ = จ /[(ต1 + ต2)]/2 x 100)	2.73989	2.79469
ร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเท่ากับ (%) (ช = ฉ x 6.25)	17.12	17.47

สรุป ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเลือดหมูอบแห้ง เท่ากับ 2.77 มิลลิกรัม

ร้อยละปริมาณโปรตีนในเลือดหมูแห้ง เท่ากับ 17.295

คำถาม จงแสดงวิธีคิดให้เห็นว่าโปรตีนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 16 มีตัวคูณเป็น 6.25 ในการหาร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

วิธีทำ โปรตีน 100 ส่วน มีไนโตรเจนอยู่ 16 ส่วน

ดังนั้นไนโตรเจน 16 ส่วน มีอยู่ในโปรตีน 100 ส่วน

ไนโตรเจน 1 ส่วน จึงมีอยู่ในโปรตีน (100/16) x 1 = 6.25

นั่นคือ ถ้ารู้ปริมาณไนโตรเจน ก็รู้ปริมาณโปรตีนได้ โดยการคูณด้วย 6.25