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 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