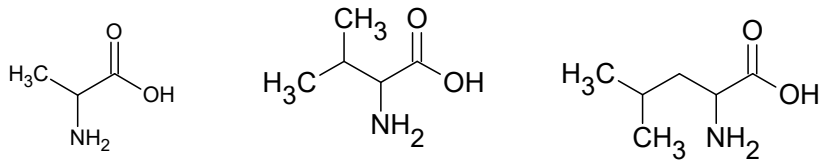
สรุป 01402312 ปฏิบัติการชีวเคมี I ภาคต้น ปีการศึกษา 2561

การทดลองที่ 7 การแยกกรดอะมิโนด้วยโครมาโตกราฟีแบบแบ่งส่วน

1. partition chromatography มี stationary phase เป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บนตัวค้ำจุนที่เป็นของแข็ง ส่วน mobile phase ก็เป็นของเหลวเช่นกัน แต่เป็นตัวทำละลายที่ผสมได้เพียงบางส่วนกับตัวทำละลายใน stationary phase

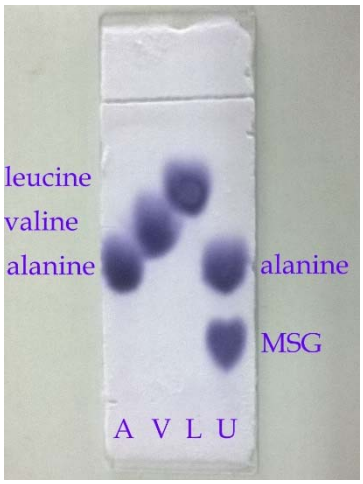
2. การทดลองครั้งนี้มีกรดอะมิโน 3 ชนิดคือ alanine valine และ leucine ใช้ตัวชะที่มี t-butanol เป็น mobile phase และ น้ำเป็น stationary phase



Alanine **(Ala)** Valine **(Val)** Leucine **(Leu)**

3. โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ ใช้กระดาษกรอง ส่วนโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ ใช้กระจกสไลด์กล้องจุลทรรศน์ เคลือบด้วยผงเซลลูโลสผลึกละเอียด (microcrystalline cellulose)

4. ผลการทดลอง



5. ค่า Rf = ระยะทางตั้งแต่จุดเริ่มต้นจนถึงจุดที่สารเคลื่อนที่ถึง หารด้วย ระยะทางตั้งแต่จุดเริ่มต้นจนถึงแนวตัวทำละลาย

6. ค่า Rf มีค่าตั้งแต่ 0-1 ยิ่งค่า Rf มาก แสดงว่า สารนั้นละลายในส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้ดี

7. ค่า Rf ของ Leu > Val > Ala เพราะ Leu มีจำนวนคาร์บอนของ side chain มากกว่า จึงมีความนอนโพลาร์มากกว่า และละลายใน t-butanol ได้ดีกว่ากรดอะมิโนอื่น ๆ

8. นิสิตบางกลุ่มได้รับ unknown ที่มีผงชูรส (MSG) อยู่ด้วย ซึ่งเป็นกรดอะมิโน Glutamic มีความโพลาร์สูง จึงเคลื่อนที่ได้น้อยกว่ากรดอะมิโนอื่น ๆ

9. กรดอะมิโน ทำปฏิกิริยากับน้ำยานินไฮดรินและให้ความร้อนด้วยตู้อบ มองเห็นเป็นจุดสีม่วง

คำถาม

1. เมื่อต้องการให้ผลการแยกสารของโครมาโตกราฟีแบบกระดาษดีขึ้น ต้องแก้ไขอย่างไรบ้าง

ตอบ ต้อง equilibrate ให้นานขึ้น เพื่อให้กระดาษกรองอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย และจุดสารให้มีขนาดเล็ก

2. โครงสร้างของกรดอะมิโนทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อค่า Rf อย่างไร เพราะเหตุใด

ตอบ ค่า Rf ของ Leu > Val > Ala เพราะ Leu มีจำนวนคาร์บอนของ side chain มากกว่า จึงมีความนอนโพลาร์มากกว่า และละลายใน t-butanol ได้ดีกว่ากรดอะมิโนอื่น ๆ

3. ตัวทำละลายสำหรับการ develop 2 ชุด ซึ่งประกอบด้วย t-butanol : น้ำ : ammonium hydroxide ในอัตราส่วน 5:1:1 โดยปริมาตร และในอัตราส่วน 4:1:2 โดยปริมาตร มีผลต่อค่า Rf อย่างไร เหตุใดจึงเป็นเช่นนั้น

ตอบ อัตราส่วน 5:1:1 มีปริมาณ t-butanol มากเมื่อเทียบกับน้ำ ทำให้กรดอะมิโน Leucine เคลื่อนที่ไปได้ไกลมากขึ้น ค่า Rf สูงขึ้น ส่วนปริมาณ ammonium hydroxide ซึ่งทำหน้าที่ปรับประจุของกรดอะมิโนนั้น ไม่ส่งผลต่อค่า Rf มาก เพราะกรดอะมิโนที่นำมาแยกในครั้งนี้ไม่มีประจุที่ side chain

4. สรุปเปรียบเทียบโครมาโตกราฟีแบบกระดาษและแบบแผ่นเคลือบในแง่มุมต่าง ๆ

ตอบ แบบกระดาษ ต้นทุนต่ำ ทำได้ง่าย แต่ใช้เวลานาน และการแยกสู้แบบแผ่นเคลือบไม่ได้

แบบแผ่นเคลือบ ต้นทุนสูงกว่า แต่สะดวก รวดเร็วในการใช้งาน และประสิทธิภาพในการแยกดีกว่าแบบกระดาษ

การทดลองที่ 8 โครมาโทกราฟีหลักการดูดซับ

1. มีประโยชน์มากสำหรับการแยกสารประเภทไม่มีขั้ว มีส่วนสำคัญคือ ตัวดูดซับ (adsorbent) ตัวทำละลาย และสารตัวอย่างที่ต้องการแยก
2. อาศัยหลักการแทนที่ของสารที่จุดดูดซับซึ่งอยู่บนผิวตัวดูดซับโดยตัวทำละลายที่เป็นตัวชะหรือสารตัวอย่างที่ต้องการแยก
3. การทดลองครั้งนี้ใช้ ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับ และสารตัวอย่างเป็นสีอินทรีย์
4. ความมีขั้วของตัวชะ เรียงจากน้อยไปหามาก คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ < เบนซีน < อะซีโทน < เมทานอล
5. ผลการทดลอง ตัวชะที่ประกอบด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์ : เบนซีน 1:4 แยกสีอินทรีย์ 3 ชนิดออกจากกันได้ดีกว่าระบบตัวชะอื่น ๆ

การทดลองที่ 9 เจลฟิลเตรชันและไดอะไลซิส

1. เจลฟิลเตรชันเป็นโครมาโทกราฟีแบบหนึ่ง แยกสารออกจากกันตามขนาดโมเลกุล ในห้องปฏิบัติการได้ทดลองใช้ Sephadex G-25 ซึ่งเป็นชื่อการค้าของ Dextran
2. ปริมาตรของตัวชะที่ใช้จะเป็นปริมาตรเท่าใด หาได้จาก $V_e = V_o + K_dV_i$

สารโมเลกุลใหญ่มาก ๆ จะไม่สามารถเข้าไปในเม็ดเจลได้เลย ค่า K_d จะเท่า 0 ดังนั้นปริมาตรที่ใช้ชะจึงเท่ากับปริมาตรภายนอกเม็ดเจล

3. ในห้องปฏิบัติการ ได้ทดลองแยก Blue dextran (ตัวแทนสารโมเลกุลใหญ่ สีน้ำเงิน) กับ Potassium dichromate (ตัวแทนสารโมเลกุลเล็ก สีเหลือง) และใช้น้ำเป็นตัวชะ
4. สีน้ำเงิน คือ Blue dextran จะออกมาจากคอลัมน์ก่อน เพราะเป็นสารโมเลกุลใหญ่ ไม่เข้าไปในเม็ดเจล
5. วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยวัดที่ 620 นาโนเมตรของ Blue dextran และ 370 นาโนเมตรของ Potassium dichromate
6. Dialysis เป็นการแยกสารโมเลกุลใหญ่กับเล็กออกจากกัน โดยใช้ท่อเซลโลเฟน
7. Potassium dichromate สีเหลืองจากแพร่ออกมาจากถุงได้ ส่วน Blue dextran จะอยู่ภายในถุง
8. สารโมเลกุลเล็กจะออกจากถุง dialysis ทำให้น้ำในบีกเกอร์มีสีเหลืองเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกว่าความเข้มข้นในถุงกับนอกถุงจะเท่ากัน

คำถาม

1. จงเปรียบเทียบวิธีการแยกสารแบบเจลฟิลเตรชันและไดอะไลซิส โดยพิจารณาถึงด้านต่าง ๆ เช่น ความรวดเร็ว การเลือกกับตัวอย่างที่มีปริมาตรมากและน้อย การแยกออกเป็นส่วนย่อย ๆ ฯลฯ

ตอบ เจลฟิลเตรชันมีจุดเด่นด้านความรวดเร็ว และแยกออกเป็นส่วนย่อย ๆ ได้หลายส่วน แต่ใช้ได้กับตัวอย่างปริมาตรน้อย สำหรับไดอะไลซิส ใช้เวลานาน และแยกได้เพียงสารโมเลกุลใหญ่กับเล็กออกจากกัน แต่ใช้กับตัวอย่างปริมาตรมาก ๆ ได้

2. ในการทดลองที่ 9.2 ถ้าโปตัสเซียมไดโครเมตที่มีอยู่ในถุงเซลโลเฟนมีความเข้มข้น 3 โมลาร์ เมื่อถึงภาวะสมดุลโดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำในบีกเกอร์เลย โปตัสเซียมไดโครเมตที่อยู่ในถุงมีความเข้มข้นเป็นเท่าใด

ตอบ ปริมาตรในถุงคือ 3 ml นอกถุงคือ 177 ml รวมเป็น 180 ml

ก่อนเริ่มไดอะไลซิส ในถุงเซลโลเฟนมีเนื้อสารโปตัสเซียมไดโครเมต = 3 mol/L x 3/1000 = 0.009 mol

เมื่อถึงจุดสมดุล เนื้อสารนี้แพร่ออกจากถุงจนความเข้มข้นในถุงกับนอกถุงเท่ากัน

ดังนั้น ความเข้มข้นจะเป็น 0.009 mol x 180/1000 = 1.62×10^{-3} โมลาร์ หรือ 1.62 มิลลิโมลาร์

3. ในการแยกโปรตีนที่ผสมกันอยู่ในสารละลาย ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ก, ข, ค และ ง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 100,000 30,000 35,000 และ 60,000 ตามลำดับ โดยใช้หลักการของเจลฟิลเตรชัน

3.1 ถ้าท่านต้องการแยกโปรตีน ง ออกมาใช้งานแต่เพียงชนิดเดียว ท่านจะเลือกใช้เจลเซฟาเดกซ์ชนิดใด และจงให้เหตุผลต่อการตัดสินใจของท่าน

ตอบ ใช้ Sephadex G-100 เพราะครอบคลุมโปรตีนทั้ง 4 ชนิด (ขนาดโมเลกุลที่แยกได้ 4,000-150,000) ส่วน Sephadex G-250 ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่แยกได้ 5,000-600,000 ก็แยกได้เช่นกัน แต่ช่วงกว้างเกินไป อาจจะทำให้ประสิทธิภาพการแยกสู้ G-100 ไม่ได้

3.2 เจลเซฟาเดกซ์ที่ท่านเลือกใช้ จะทำให้โปรตีนถูกชะออกมาตามลำดับอย่างไร

ตอบ ก ออกมาก่อน เพราะน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด ตามด้วย ง ค และ ข

การทดลองที่ 10 เอนไซม์

1. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ไดแอสเทส ซึ่งเป็น α-amylase ชนิดหนึ่ง

2. ปัจจัยที่ศึกษาคือ ค่า pH อุณหภูมิ และผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

3. ใช้น้ำแป้งเป็น substrate โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน แป้งจะกลายเป็นสีน้ำเงิน เข้มจางตามความเข้มข้น ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้

4. ผลของค่า pH ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นตัวควบคุม โดย pH 4-5 ใช้ acetate buffer ส่วน pH 6-8 ใช้ phosphate buffer

5. ผลการทดลอง พบว่าเอนไซม์ไดแอสเทส ทำงานได้ดีที่ pH ในช่วงที่เป็นกรด คือ 4-5 และอุณหภูมิ 40-60 องศา

6. คำนวณหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาจาก ค่า A ของหลอดที่ไม่มีการย่อยแป้ง ลบด้วย ค่า A ของหลอดที่มีการย่อยแป้งเกิดขึ้น แล้วหารด้วยเวลาที่เกิดปฏิกิริยา คือ 10 นาที

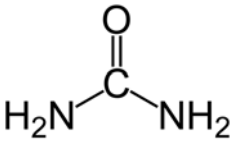
7. ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ เป็นการทดลองเพื่อดูว่าการนำเอนไซม์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนที่จะนำมาทำปฏิกิริยา จะส่งผลต่ออัตราปฏิกิริยาอย่างไร ซึ่งผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ที่นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง 60 องศาเซลเซียสขึ้นไป เอนไซม์จะเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้อัตราปฏิกิริยาต่ำลง

8. การทดลองเรื่อง การยับยั้งเอนไซม์ ใช้เอนไซม์ urease จากถั่วเหลือง ซึ่งจะย่อยยูเรียเป็นแอมโมเนียกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีตัวยับยั้งคือ thiourea ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายยูเรีย จะจับกับเอนไซม์ที่ active site เป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน

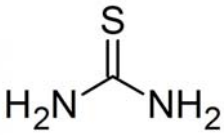
9. ผลการทดลอง หลอดที่เติมยูเรีย จะเกิดสีม่วงแดงเข้มที่สุด เพราะยูเรียถูกย่อยกลายเป็นแอมโมเนียที่ละลายน้ำเป็นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เป็นเบส ทำให้อินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีนเปลี่ยนสี

หลอดที่เติม ไทโอยูเรีย ไม่เกิดปฏิกิริยา จึงไม่มีสีม่วงแดงเกิดขึ้น

หลอดที่เติมสารละลายผสมยูเรียและไทโอยูเรีย เกิดสีม่วงแดงได้ แต่จางกว่าหลอดที่เติมยูเรียเพียงอย่างเดียว



Urea



thiourea

การทดลองที่ 11 ลิพิด 1

1. saponification number (SN) หมายถึง จำนวน mg ของ KOH ซึ่งทำปฏิกิริยาพอดีกับไขมันหรือน้ำมัน 1 g

2. ค่า SN ของไขมันหรือน้ำมันทั่วไป มักจะอยู่ในช่วง 180-260 (ไม่มีหน่วย)

3. ค่า SN ต่ำ แสดงว่า ไขมันมีขนาดโมเลกุลใหญ่ น้ำมันมะพร้าว มีค่า SN อยู่ในช่วง 246-260 ส่วนน้ำมันถั่วเหลือง มีค่า SN 193 แสดงว่า น้ำมันมะพร้าวมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าน้ำมันถั่วเหลือง

4. ค่า SN คำนวณจากสูตร [(a-b) x ความเข้มข้นของกรด x 56]/จำนวนกรัมของไขมัน

โดยที่ a = จำนวน ml ของสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างไขมัน

b = จำนวน ml ของสารละลายกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทขวดที่ใช้น้ำกลั่นแทนไขมัน (ขวด blank)

เช่น a = 4.5 ml, b = 46.0 ml, กรด HCl เข้มข้น 0.5 M, ไขมันหนัก 5.0 กรัม

จะได้ค่า SN = [(46.0-4.5) x 0.5 x 56]/5.0 = 232.4

5. ค่า SN ไม่ได้บอกถึงคุณค่าทางโภชนาการของไขมันนั้น ๆ เพียงแต่สามารถนำไปคำนวณต่อได้ว่า น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดไขมันองค์ประกอบของไขมันนั้น ๆ เป็นเท่าใด

6. การ reflux โดยใช้เครื่องควบแน่น (condenser) ก็เพื่อป้องกันไม่ให้แอลกอฮอล์ระเหยหมดระหว่างต้มไขมันกับ KOH

การทดลองที่ 12 ลิพิด 2

1. สมบัติการละลายของลิพิดชนิดต่าง ๆ ใช้ตัวทำละลาย 6 ชนิด โดยปิโตรเลียมอีเธอร์ จะมีขั้วน้อยที่สุด ส่วน 70% เอทานอล มีขั้วมากที่สุด

2. สังเกตการละลายได้จาก ถ้าละลายได้ดีจะใสเป็นเนื้อเดียวกัน ละลายได้บ้าง จะขุ่นเป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าไม่ละลายจะใสและเป็นเม็ดใหญ่บ้างเล็กบ้าง

3. ไขมันส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย คือ ปิโตรเลียมอีเธอร์

4. การทดสอบความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน หลอดที่มีสีน้ำเงินของไอโอดีน-น้ำแป้งมาก แสดงว่าเป็นกรดไขมันอิ่มตัว ทำให้มีไอโอดีนเหลือ ไม่เข้าไปอยู่ในโมเลกุลของกรดไขมัน

5. การเปลี่ยนรูปเกลือของสบู่ เป็นไปดังสมการ

$$R\text{-}COOK + NaCl \rightarrow R\text{-}COONa + KCl$$

6. สบู่ มีสมบัติเป็น emulsifier ช่วยให้น้ำกับน้ำมันเป็นเนื้อเดียวกันได้

7. Ca Mg และ Pb เกิดสบู่ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไคลสบู่ ที่เกิดในน้ำกระด้าง

8. การคืนรูปกลับเป็นกรดไขมันของสบู่ เป็นไปดังสมการ

$$R\text{-}COONa + HCl \rightarrow RCOOH + NaCl$$

9. การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดไขมันและยูเรีย ขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลของกรดไขมัน และความอิ่มตัวของกรดไขมัน ยิ่งจำนวนคาร์บอนมากและอิ่มตัวมากจะเกิดเร็วกว่าคาร์บอนน้อยและอิ่มตัวน้อย
ดังนั้น กรดสเตียริก (18:0) เกิดเร็วกว่า กรดปาล์มิติก (16:0) ส่วนกรดโอเลอิก (18:1) เกิดช้าที่สุด (ความไม่อิ่มตัวมีอิทธิพลมากกว่าจำนวนคาร์บอน)

10. ปฏิกิริยา Carr-Price ใช้ทดสอบวิตามินเอและแคโรทีน ได้สีน้ำเงิน โดยใช้สารละลายอิ่มตัวของ antimony trichloride ในคลอโรฟอร์มที่แช่เย็นจัด

11. การทดสอบ Modified Further-Meyer ใช้ทดสอบวิตามินอี (tocopherol) ได้สีแดงอมน้ำตาล ใช้กรดไนตริกเข้มข้นและบิวทานอล

การทดลองที่ 13 กรดนิวคลิอิก

1. การแยก DNA จากเม็ดเลือดแดงไก่ เติม SDS เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก

2. 95% เอทานอล ทำให้ DNA ตกตะกอน สามารถใช้แท่งแก้วพันสาย DNA ขึ้นมาได้

3. ปฏิกิริยา Dische ใช้ทดสอบ Deoxyribose ใน DNA โดยใช้สาร diphenylamine ได้สารละลายสีน้ำเงิน

4. ปฏิกิริยา Bial ใช้ทดสอบ ribose ใน RNA โดยใช้สาร orcinol โดยมี Fe^{3+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สีน้ำเงินแกมเขียว

จากซ้ายไปขวา DNA + Dische, RNA+Dische, DNA+Bial และ RNA + Bial

การทดลองที่ 14 แบบจำลองของสารชีวโมเลกุล

จากการทดลองวาดโครงสร้างของสบู่โพแทสเซียมและสบู่โซเดียม ด้วยโปรแกรม ChemSketch แล้วเปิดดูด้วย 3D Viewer โดยใช้แบบจำลองชนิด space filling จะเห็นว่า อะตอมโพแทสเซียมมีขนาดใหญ่กว่าอะตอมของโซเดียม ดังนั้น สบู่โพแทสเซียมจึงเป็นสบู่เหลว ขณะที่สบู่โซเดียมเป็นสบู่แข็ง เพราะสบู่โซเดียม โมเลกุลมีอะตอมที่มีขนาดเล็ก เบียดกันแน่นกว่า

จัดทำเมื่อ 27 พ.ย. 61 โดย อ.พุทธพร ส่องศรี