บทนำ
ข้อควรปฏิบัติในการใช้ห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์ส่วนกลาง

นอกจากนักศึกษาจะได้รับอุปกรณ์ประจำกลุ่มตามรายการที่ปรากฏในแบบฟอร์มแล้ว นักศึกษาจะมีโอกาสใช้อุปกรณ์และเครื่องมือส่วนกลางร่วมกับผู้อื่นอีกด้วย การใช้อุปกรณ์ส่วนกลางจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือในการระมัดระวังและรักษาจากผู้ใช้ทุกคน เพื่อให้อุปกรณ์เหล่านั้นอยู่ในสภาพที่ใช้ได้ดีอยู่เสมอ ข้อควรปฏิบัติในการใช้อุปกรณ์ส่วนกลางคือ

อ่างน้ำ ใช้เทเฉพาะของเหลวเท่านั้น อย่าทิ้งของแข็ง เช่น กระดาษกรอง ก้านไม้ขีด ฯลฯ ลงไป เพราะทำให้เกิดการอุดตันขึ้น กรด ด่าง และสารตัวทำละลายต่าง ๆ ปริมาณน้อยอาจเททิ้งลงในอ่างและเปิดน้ำให้ไหลตามลงไปมากเพียงพอ แต่ถ้าปริมาณมากควรใช้อ่างเคลือบมีซักโครก

สารตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น แอลกอฮอล์ อีเทอร์ อะซีโตน ถ้ามีปริมาณมาก อย่าทิ้งเพราะมีราคาแพง ควรนำไปใส่ขวด ที่เตรียมไว้ให้เพื่อนำไปกลั่นมาใช้ได้ใหม่

เครื่องมือ ในการเข้าปฏิบัติการแต่ละครั้งจะมีเครื่องมือส่วนกลาง เช่น พีเอชมิเตอร์ สเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ เซนตริฟิวจ์ เครื่องชั่ง ฯลฯ นักศึกษาต้องศึกษาวิธีการใช้ให้เข้าใจก่อนใช้ นักศึกษาต้องปฏิบัติตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ หากเครื่องมือขัดข้องอย่าแก้ไขเอง **รักษาความสะอาดของเครื่องมือ และบริเวณรอบที่ตั้งด้วยตลอดเวลา**

น้ำกลั่นและน้ำยาเคมี

น้ำกลั่น หรืออาจเป็น Deionized water (ซึ่งเป็นน้ำที่กำจัดสารที่มีประจุออกจากน้ำฝนด้วย ion-exchange resin) เป็นน้ำที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการเตรียม จึงควรใช้อย่างประหยัด และดูแลอย่าให้ไหลทิ้งโดยไม่จำเป็น

น้ำยาเคมี ในการทดลองแต่ละการทดลองจะมีสารหรือน้ำยาเคมีส่วนกลางพร้อมกับปิเปตต์ หรือเครื่องวัดปริมาตรอื่น ๆ วางไว้ที่โต๊ะกลาง สำหรับใช้ร่วมกัน ให้ระมัดระวังในการหยิบใช้ดังต่อไปนี้

- อย่าเคลื่อนย้ายสาร หรือน้ำยาส่วนกลางไปจากที่ตั้งไว้ให้
- ใช้น้ำยาสารเคมีต่าง ๆ เท่าที่จำเป็น ใช้มากเกินไปนอกจากจะสิ้นเปลืองโดยไม่จำเป็นแล้วยังอาจทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้
- สารและน้ำยาเคมีในแต่ละขวด ต้องไม่มีสารอื่นเจือปนอยู่ ห้ามใช้ ปิเปตต์ หรือกระบอกตวงน้ำยาของสารหนึ่งไปใช้กับอีกสารหนึ่งอย่างเด็ดขาด หากไม่แน่ใจให้ใช้ปิเปตต์ หรือกระบอกตวงอันใหม่ที่สะอาด อย่าเสี่ยงใช้เครื่องวัดปริมาตรที่ไม่สะอาดจะทำให้น้ำยาทั้งขวดเสียได้
- ระวัง อย่าทำน้ำยาหรือสารเคมีหกในบริเวณโต๊ะกลาง หากบังเอิญทำหกให้รีบทำความสะอาดทันที

การล้างและการทำความสะอาดเครื่องแก้ว

1. ล้างเครื่องแก้วทุกชนิดทันทีที่ทำการทดลองเสร็จ หากทิ้งไว้จนแห้ง จะทำให้ล้างยากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเครื่องแก้วเปื้อนไขมัน หรือเนื้อเยื่อต่าง ๆ

2. ล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำยาล้างหรือผงซักฟอก และน้ำพร้อมใช้แปรงขัดระวังไม่ให้โลหะด้วยแปรงขูดเครื่องแก้วจนเป็นรอย หรือแตกร้าว แล้วกรอกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

3. เครื่องแก้วที่ล้างไม่สะอาดหลังจากล้างครั้งแรก อาจจำเป็นต้องได้รับการแช่ในน้ำผงซักฟอกสักระยะหนึ่ง แล้วล้างอีกครั้ง ในบางกรณีอาจต้องตามด้วยการแช่ค้างคืนในกรดเข้มข้นแล้ว จึงล้าง

- การล้างปิเปตต์ ต้องระวังอย่าให้ปลายบิ่น หากใช้ดูดเลือกหรือของเหลวอื่น ๆ ที่ข้นหนืดให้ล้างด้วยน้ำก่อนแล้วด้วยน้ำยาล้างหรือผงซักฟอก หรือแช่ทิ้งไว้ระยะหนึ่ง อาจช่วยให้การทำความสะอาดดีขึ้น แต่เวลาแช่ให้แช่โดยตั้งปลายแหลมขึ้น และแช่ให้ท่วมถึงปลายปิเปตต์

อุบัติเหตุ และการป้องกัน

การแต่งกาย ไม่แต่งกายด้วยชุดที่รุ่มราย ควรสวมเสื้อคลุมทับ ผมยาวต้องรวบผมให้เรียบร้อยควรสวมรองเท้าไม่สูงกินไป และควรสวมแว่นนิรภัยเพื่อกันสารเคมีระเหย หรือกระเด็นเข้าตา

การปิเปตต์น้ำยาเคมี ต้องใช้ลูกยางสำหรับดูด ไม่ใช้ปากดูด เพราะน้ำยาเคมีหลายอย่าง เช่น กรดเข้มข้น สารพวกไซยาไนด์ หรือกัมมันตรังสี เป็นอันตรายถึงชีวิตได้ทั้งทันที และระยะยาว

การผสมสารเคมีและการใช้ตู้ควัน สำหรับสาร หรือปฏิกิริยาที่เกิดแก๊สพิษ กลิ่นเหม็น มีควันเกิดขึ้น ให้ทำในตู้ควันทุกครั้ง กรณีที่ปฏิกิริยาบังเอิญเกิดแก๊สพิษหรือควันเกิดขึ้น ให้รีบนำภาชนะไปไว้ในตู้ควันและปิดตู้ทันที

สารเคมีถูกผิวหนังหรือเข้าตา ให้ใช้น้ำจำนวนมากล้างให้สะอาดแล้วนำส่งแพทย์หรือโรงพยาบาลทันทีถ้าจำเป็นโลหะบางตัวเช่น Na K ต้องคีบออกก่อนแล้วล้างด้วยน้ำมาก ๆ

การระวังเกี่ยวกับไฟ ในห้องปฏิบัติการ มีสารตัวทำละลายที่ไวไฟอยู่หลายชนิด เช่น อีเทอร์ อะซีโตน ฯลฯ เวลาจุดตะเกียงบุนเซ็น จึงควรระวังไม่ให้อยู่ใกล้สารไวไฟเหล่านี้ (การจุดตะเกียงนั้นให้จุดไม้ขีดก่อนแล้วจึงเปิดแก๊ส) ถ้าโดนไฟไหม้ หรือน้ำร้อนลวกบริเวณไม่มากนัก ให้ทายาสำหรับไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก แต่ถ้าเสื้อผ้าติดไฟ ต้องดับไฟ โดยนอนราบกลิ้งลงกับพื้น และรีบหาผ้าห่มหนา ๆ คลุมเปลวไฟให้ดับก่อนลามถึงผม

อันตรายจากสารเคมี

สารเคมีในห้องปฏิบัติการทางเคมีมีหลายตัวที่เป็นอันตรายและควรใช้ความระมัดระวัง ในที่นี้กล่าวถึงสารเคมีบางตัวที่เป็นพิษ ที่นำมาใช้ในการทดลอง หรือที่เกิดจากปฏิกิริยาขณะทำการทดลอง

กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

ระเหยง่ายให้ไอของแก๊สไฮโดรเจนคลอไรด์ เมื่อหายใจเข้าไปทำให้ระคายเคืองเยื่อจมูก และหลอดลม ถ้าได้รับมากถึงระดับ 10 ppm (part per million) ทำให้เกิดโรคน้ำคาเนื้อในปอด (lung edema)

กรดไนตริก (HNO_3)

ระเหยง่าย เมื่อได้รับเข้าไปจะมีอาการปวดลำคอ ทางเดินอาหาร และกระเพาะอาหาร ท้องร่วง อาจช็อคและเสียชีวิตได้ เพราะไม่มีอากาศบริสุทธิ์หายใจ เนื่องจากเป็นโรคน้ำคาเนื้อในคอหอย

แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟต์ (H_2S)

หายใจเข้าไประยะแรก ๆ ประสาทชาไม่ได้กลิ่นอีกต่อไป ถ้ามีปริมาณน้อยจะแสบตา น้ำตาไหลแสบจมูก ร้อนคอ ไอ ปวดศีรษะ ชีพจรเต้นเร็ว หายใจตื้น แล้วหมดสติ สูดเข้าไปมากทันทีจะเสียชีวิตได้ภายใน 2-3 นาที เนื่องจากหยุดหายใจ

แอมโมเนียเข้มข้น (NH_3)

ไอระเหยจากสารทำให้แสบตา แสบจมูก ตาแดง

เบนซิน (C_6H_6)

ได้รับพิษโดยหายใจเข้าไป และดูดซึมทางผิวหนัง พิษมากน้อยขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ ถ้ามากอาการรุนแรงถึงเสียชีวิต อาการก่อนเสียชีวิตคือ ชักกระตุก อ่อนเพลีย และหมดสติ ได้รับปริมาณน้อย วิงเวียนศีรษะ การทรงตัวไม่ดี อาเจียน อาการอื่น ๆ เช่น คลุ้มคลั่ง เบนซินที่เข้าไปในร่างกายมีผลให้เส้นโลหิตฝอยในสมอง เส้นโลหิตฝอยตามเนื้อเยื่อหุ้มปอด เนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร ลำไส้ ไตและอวัยวะอื่น ๆ แตก

คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (CCl_4)

มีอาการมึนงง ระคายเคืองตา ตาแดง ไอ เม็ดโลหิตแดงและขาวลดลง อาจมีโลหิตไหลออกทางจมูก คลื่นเหียน อาเจียน ท้องร่วง ปวดท้องอย่างรุนแรง ปัสสาวะมีเม็ดโลหิตแดงเจือปน หัวใจหย่อนสมรรถภาพ มีโลหิตคั่งในหัวใจ ความดันสูง ตับถูกทำลาย ตับโต หรือตับแข็ง เกิดอาการปัสสาวะขัด หรือเป็นพิษ

เมทานอล (CH_3OH)

กินเข้าไป เกิดอาการอ่อนเพลีย ปวดศีรษะ มึนงง อาเจียน ปวดหน้าอก กระเพาะ และหลังตัวเย็น ตาพร่า หรือตาบอด เสียชีวิตได้ ได้รับไอ จะทำให้ตาอักเสบ มองไม่ค่อยเห็น มีเม็ดบวมที่นัยน์ตา เนื่องจากเมทานอลไปทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อประสาทและจอรับภาพ อาเจียน เบื่ออาหาร

เอทานอล (C_2H_5OH)

กินเข้าไปบ่อย ๆ เกิดอันตรายต่อตับ และทำให้ตามัว ยับยั้งการทำงานของสมองบางส่วน

อะซีโตน (C_3H_6O)

มีอาการเฉียบพลัน อาเจียน หมดสติ ปัสสาวะมีโลหิตปน ตับและไตผิดปกติ อาการที่เรื้อรัง คือมีผลต่อระบบประสาททำให้มึนงง ได้รับน้อยแต่ติดเป็นเวลานาน ทำให้ปวดศีรษะ ระคายเคืองจมูก คอน้ำตาไหล หายใจเข้าไปมาก ๆ เป็นเวลานานอาจอาเจียนเป็นโลหิต ในปัสสาวะมีเม็ดโลหิตแดงและเม็ดโลหิตขาวปนออกมา

ฟอร์มาลดีไฮด์ (CH_2O)

ถ้าได้รับเข้าไปมาก อาจทำให้เสียชีวิตได้ กินเข้าไปทำให้อักเสบภายในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ปวดท้องอย่างรุนแรง ได้รับน้อยจะเร่งการทำงานของตับและหัวใจ ได้รับมากทำให้ความดันโลหิตต่ำ เมื่อสัมผัสทำให้เป็นผื่นตามผิวหนัง เป็นลมพิษ เปลือกตาบวม ฝ่ามือมีรอยแตก เนื้อกระจกตาอักเสบ น้ำตาไหล ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ชีพจรเต้นเร็ว แรง เหงื่อยออกผิดปกติ ประสาทรับความรู้รสผิดปกติ หายใจเข้าไปให้ใช้แอมโมเนียดมโดนผิวหนังล้างด้วยน้ำสบู่โดยเร็ว

อีเทอร์ ($C_2H_5OC_2H_5$)

หายใจเข้าไปมาก ๆ อย่างรวดเร็วจะทำให้หยุดหายใจ รายที่เกิดอาการรุนแรง จะคลุ้มคลั่ง คลื่นเหียน ชัก หมดสติ ได้รับบ่อย ๆ เป็นเวลานาน ทำให้น้ำย่อยลด น้ำหนักลด ท้องผูก ไม่สามารถรับรู้รสอาหาร ในผู้หญิง พบว่าเม็ดเลือดมากเกินไป ในผู้ชายมีอาการโลหิตจาง ถ้าถูกไอของอีเทอร์ทำให้เป็นโรคผิวหนัง คือผิวแห้งและแตก คันตามใบหน้า

เอทิลอะซิเตต ($CH_3COOC_2H_5$)

หายใจเข้าไปเกิดอาการระคายเคืองจมูก คอ สัมผัส ทำให้เกิดโรคผิวหนัง กระจกตาขุ่นมัว มึนงง ถึงแก่ความตายได้ เนื่องจากสารนี้อยู่ตามอวัยวะและเนื้อเยื่อมาก ยังทำให้เกิดการอักเสบที่ม้าม ไต และเส้นโลหิตในปอดแตก หายใจเข้าไปนาน ๆ ทำให้ประสาทรับกลิ่นผิดปกติและเกิดเหงือกอักเสบ

ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN)

เป็นของเหลวใส หรือแก๊ส หายใจเข้าไปทำให้ช่วงหายใจสั้นลง ขยับตัวไม่ได้ หมดสติ ชัก และถึงแก่ชีวิต เนื่องจากหายใจไม่ออก รับเข้าไปมากจะถึงแก่ชีวิตโดยเร็ว ได้รับน้อยจะปวดศีรษะ คลื่นเหียน อาเจียนได้รับน้อย ๆ เป็นเวลานานทำให้กล้ามเนื้ออ่อนกำลังลง อ่อนเพลีย ปริมาณที่ทำให้ถึง แก่เสียชีวิต ได้รับเพียง 55 mg เท่านั้น แม้ไม่ได้กิน สัมผัส ก็ได้รับอันตรายถึงแก่ชีวิตได้

ปรอท (Hg) และสารประกอบปรอท

มีอาการคลื่นเหียน อาเจียน ท้องร่วง อาจมีโลหิตปนออกมา ทำให้คอหอย และหลอดอาหารหดตัว อ่อนเพลีย เกิดอาการช็อค โลหิตเป็นพิษ และปัสสาวะขัด

นอกจากนี้ยังสารประกอบที่เป็นอันตรายโดยตรงต่ออวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย

ตา (Eye)

เครซอล ไฮโดรควิโนน อะซิติคแอนไฮไดร์ด อะโครลีน เบนซิลคลอไรด์ บิวทิลแอลกฮอล์

เยื่อระบบหายใจส่วนบน

โอโซน ไดเมทิลซัลเฟต โครเมียม อะซิติกแอนไฮไดรด์ อะโครลีน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ บิวทิล แอลกฮอล์ อะเซทาลดีไฮด์

ตับ (Liver)

เครซอล ไดเมทิลซัลเฟต คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไตรคลอโรเอทิลีน เปอร์คลอโรเอทิลีน โทลูอีน

หัวใจ (Heart)

อะนิลีน

ปอด (Lung)

นิกเกิล ซิลิกา แอสเบสทอส เบริเลียม โครเมียม ไมคา ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอลลิลคลอไรด์ ไนโตรเจนไอออกไซด์ ไดคลอโรเอทิลอีเทอร์

ผิวหนัง

บิวทิลแอลกอฮอล์ นิกเกิล ฟีนอล ไตรคลอโรเอทิลีน

สมอง (Brain)

เบนซีน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ คาร์บอนไดซัลไฟด์ บิวทิลามีน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เตตระ เอทิล เลด แมงกานีส ปรอท ตะกั่ว ไดเมทิลานิลีน อะเซทาลดีไฮด์ ไนโตรเบนซีน ทอลเลียม

ไต (Kidney)

คลอโรฟอร์ม ปรอท ไดเมทิลซัลเฟต

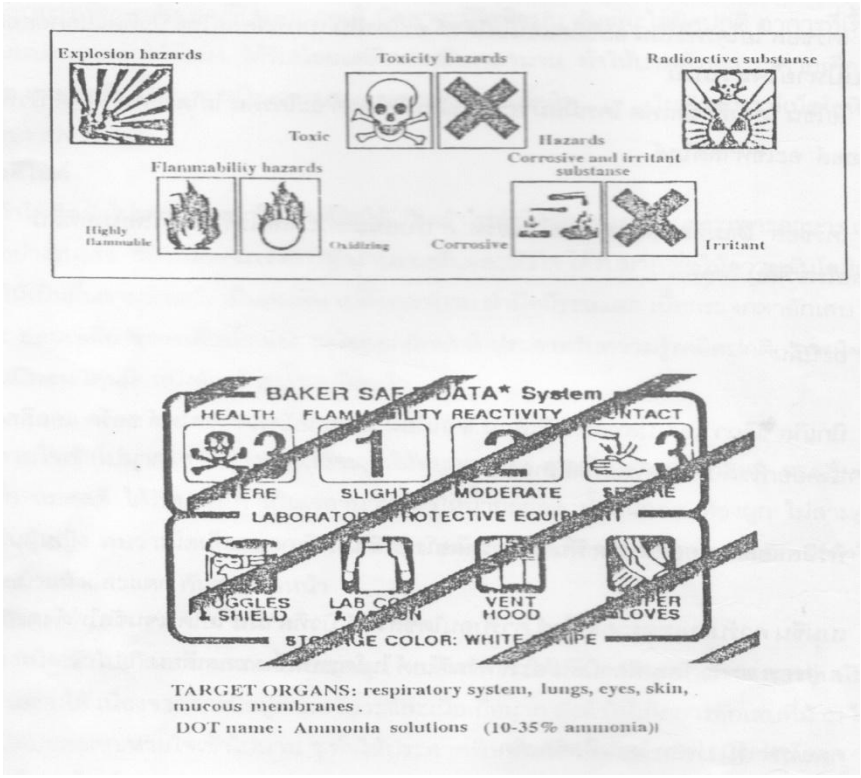
เลือด (Blood)

ไนโตรเบนซีน อะนีลีน อาร์เซนิก เบนซีน คาร์บอนมอนอกไซด์ โทลูอีน

ขณะเรียนปฏิบัติการเคมี นักศึกษาต้องมีความระมัดระวังและสังเกตสิ่งต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น สังเกตขวด ภาชนะที่บรรจุสารเคมี จะพบว่าที่ฉลากมีข้อมูลต่าง ๆ เช่น สูตรมวลโมเลกุล การบ่งบอกถึงอันตราย ความเป็นพิษ และไวไฟ โดยสังเกตจากฉลากข้างขวด ได้แก่

สีแดง	หมายถึง	ความไวไฟ
สีเหลือง	หมายถึง	ความไวในปฏิกิริยา
สีน้ำเงิน	หมายถึง	สุขภาพ ช่องที่ไม่มีสีไว้ใส่ข้อมูลพิเศษ เช่น สารกัมมันตรังสี

ตัวอย่างฉลากปิดข้างขวด

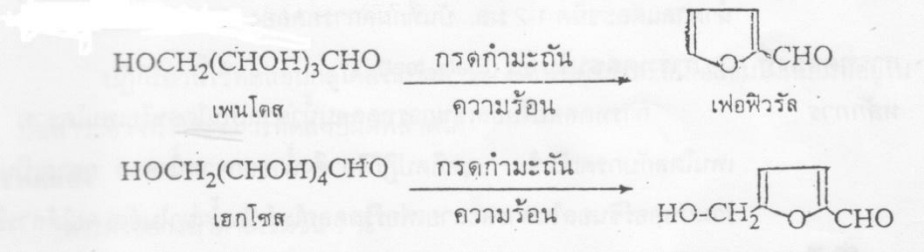


บทปฏิบัติการที่ 1

การทดสอบคาร์โบไฮเดรต

การทดลองที่ 1.1 การทดสอบโมลิสช์ (Molisch's test)

หลักการ การทดสอบโมลิสช์ เป็นวิธีการทดสอบน้ำตาลทั่ว ๆ ไป โดยใช้กรดเข้มข้นดึงน้ำออกจากน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซล กลายเป็นเฟอฟิวรัลและไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัล ตามลำดับ ดังสมการ



ในกรณีของเฮกโซล ถ้าเป็นอัลโดเฮกโซสจะได้อนุพันธ์เฟอฟิวรัลประมาณ 1% ของที่ควรจะได้ตามทฤษฎีและถ้าเป็นคีโตนเฮกโซสจะได้อนุพันธ์เฟอฟิวรัล 20-25% ของที่ควรได้ตามทฤษฎี เมื่อให้เฟอฟิวรัลหรืออนุพันธ์ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัลรวมกับแอลฟาแนพทอล (α-napthol) (ในน้ำยาโมลิสช์) จะให้สารสีชมพูจนถึงม่วง

สารที่ใช้ในการทดลอง

-สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้น 1%

-น้ำยาโมลิสช์

-กรดกำมะถันเข้มข้น

วิธีการทดลอง ใส่น้ำตาลแต่ละชนิดแยกกันในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 1 มล. เติมน้ำยาโมลิสช์ลงไปหยอดละ 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน ค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกลงข้าง ๆ หลอดทดลอง หลอดละประมาณ 0.5 มล. (ทำด้วยความระมัดระวัง) สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.2 การทดสอบเซลิวานอฟฟ์ (Seliwanoff's test)

หลักการ การทดสอบเซลิวานอฟฟ์เป็นการทดสอบน้ำตาลคีโตสแบบฟูราโนสเมื่อต้มน้ำตาลในกรดเกลือเข้มข้น 10-20% น้ำตาลคีโตสแบบฟูราโนสจะเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เฟอฟิวรัลได้เร็วกว่าน้ำตาลอัลโดสแบบไพราโนส ซึ่งจะรวมกับรีซอร์ซีนอล (Resocinol) (ในน้ำยาเซลิวานอฟฟ์) ได้สารสีส้มแดง กลูโคสหรือน้ำตาลอื่น ๆ ปริมาณมากอาจเกิดสารสีคล้ายกันนี้

สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้น : เตรียมน้ำตาลตามตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1.1-1.6

**น้ำยาโมลิสช์ : สารละลายแอลฟาแนพทอล 5% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% (เตรียมใหม่ ๆ ในวันทดลอง)

สารที่ใช้ในการทดลอง

-สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้ม 1%

-น้ำยาเซลิวานอฟฟ์

วิธีการทดลอง ใส่น้ำยาเซลิวานอฟฟ์ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 2 มล. เติมสาระละลายตัวอย่างชนิดละ 5 หยด ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด อุ่นในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 15 นาที สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด 1-2 มล. บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบไบอัล (Bial's test)

หลักการ การทดสอบไบอัลเป็นการทดสอบน้ำตาลเพนโตสหรือเพนโตซาน เมื่อต้มน้ำตาลเพนโตสกับกรดเข้มข้น จะเกิดปฏิกิริยาดึงน้ำออกจากน้ำตาล กลายเป็นเฟอริวรัลซึ่งเมื่อรวมกับออร์ซินอลในสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ในน้ำยาไบอัล) จะได้สารสีเขียวอมน้ำเงิน

สารที่ใช้ในการทดลอง

-สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้น 1%

-น้ำยาไบอัล**

วิธีการทดลอง

ใส่น้ำยาไบอัลลงในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 3 มล. เติมสารละลายน้ำตาลตัวอย่างชนิดละ 0.5 มล. ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด อุ่นในอ่างน้ำร้อน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.4 การทดสอบอะนิลีนอะซีเตต (Aniline acetate test)

หลักการ การทดสอบอะนีลีนอะซีเตต เป็นการทดสอบน้ำตาลเพนโตสหรือเพนโตซานอีกวิธีหนึ่ง โดยอาศัยหลักที่ว่า เมื่อต้มน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซสกับกรด จะเกิดปฏิกิริยาดึงน้ำออกจากน้ำตาลกลายเป็นเฟอฟิวรัลตามลำดับ และเนื่องจากไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัลละลายในกรดได้มากกว่าเฟอฟิวรัลและไม่ระเหยด้วยไอน้ำเฟอฟิวรัลจะรวมกับอะนีลีน (ในน้ำยาอะนิลีนอะซีเตต) กลายเป็นสารสีแดงเชอรี่

---

*น้ำยาเซลิวานอฟฟ์: สารละลายรีซอร์ซินอล 0.15% ในกรดเกลือเจือจาง (1: 2)

**น้ำยาไบอัล: ออร์ซินอล 0.3% ในกรดเกลือเข้มข้นและมีสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1% ผสมอยู่ 0.3%

สารที่ใช้ในการทดลอง

-สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้ม 1%

-น้ำยาอะนิลีนอะซีเตต***

วิธีการทดลอง ใส่น้ำตาลแต่ละชนิดแยกกันในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มล. เติมกรดกำมะถันเข้มข้นลงไปหลอดละ 2 มล. ตัดกระดาษกรองเป็นแผ่นเล็ก ๆ ชุบน้ำยาอะนีลีอะซีเตต อังที่ปากหลอดทดลองขณะอุ่นสารละลายให้เดือดสังเกตการเปลี่ยนแปลงบันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.5 การทดสอบเฟห์ลิง (Fehling's test)

หลักการ การทดสอบเฟห์ลิงเป็นการทดสอบโมโนแซ็กคาไรด์ และรีดิวซิงไดแซ็กคาไรด์ โดยอาศัยสมบัติที่ว่าหมู่แอลฟาไฮดรอกซีคีโตนในน้ำตาล สามารถรีดิวส์น้ำยาเฟห์ลิงให้กลายเป็นคิวปรัสออกไซด์ ซึ่งเป็นตะกอนสีแดงอิฐ ดังสมการ

$$RCHO + 2Cu^{2+} + 4OH^{-} \longrightarrow RCOOH + Cu_2O + 2H_2O$$

ปฏิกิริยานี้ใช้ทดสอบกลูโคสในปัสสาวะ แต่กรดยูริกและเกลือแอมโมเนียมที่อยู่ในปัสสาวะอาจทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้ม 1%
- สารละลายเฟห์ลิง เอ.
- สารละลายเฟห์ลิง บี.

วิธีการทดลอง ผสมสารละลายเฟห์ลิง เอ. กับสารละลายเฟห์ลิง บี. เข้าด้วยกันอย่างละ 5 มล. เขย่า แล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละประมาณ 2 มล. เติมน้ำตาลแต่ละชนิด ชนิดละ 0.5 มล. ลงในแต่ละหลอด เขย่า อุ่นในอ่างน้ำร้อนประมาณ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงบันทึกผลการทดลอง

สำหรับซูโครส ให้ทดลองซ้ำโดยการเติมกรดเกลือเข้มข้น 2-3 หยด อุ่นให้เดือดทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปทดลอง เปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งแรก

---

*สารละลายเฟห์ลิงเอ: คอปเปอร์ซัลเฟต 34.64 กรัมในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 500 มล.

**สารละลายเฟห์ลิงบี : โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 173 กรัม + NaOH 65 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 500 มล.

***น้ำยาอะนิลีนอะซิเตต: อะนิลีน 2% ในกรดอะซิติกเข้มข้น (เตรียมในวันทดลอง)

การทดลองที่ 1.6 การทดลองเบเนติกต์ (Benedict's test)

หลักการ การทดสอบเบเนดิกต์เป็นการทดสอบโมโนแซ็กคาไรด์ และรีดิวซิงไดแซ็กคาไรด์โดยอาศัยสมบัติที่ว่าหมู่อัลดีไฮด์หรือหมู่แอลฟาไฮดรอกซีคีโตนในน้ำตาล สามารถรีดิวส์น้ำยาเบเนดิกต์ให้กลายเป็นคิวปรัสออกไซด์ เช่นเดียวกับการทดสอบเฟห์ลิง

วิธีนี้ดัดแปลงมาจากการทดสอบเฟห์ลิง และเป็นวิธีที่สะดวกกว่าการทดสอบเฟห์ลิงเพราะใช้น้ำยาเพียงชนิดเดียวและให้ผลแน่นอนกว่า

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารตัวอย่างน้ำตาลเข้มข้น 1%
- สารละลายน้ำแป้ง 1%
- น้ำยาเบเนดิกต์***

วิธีการทดลอง ใส่น้ำยาเบเนดิกต์ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 2 มล. เติมน้ำตาล แต่ละชนิดชนิดละ 0.5 มล. ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่า อุ่นในอ่างน้ำร้อนประมาณ 10 นาที สังเกตการทดลอง บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1.7 การทดสอบน้ำตาลรีดิวส์จากการสลายโพลีแซ็กคาไรด์

หลักการ โซ่โพลีแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยหมู่รีดิวส์หนึ่งหมู่จากหน่วยย่อย 100 หน่วย หรือมากกว่านั้น จึงไม่แสดงสมบัติรีดิวส์ แต่ถ้านำโพลีแซ็กคาไรด์ไปสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้โมโนแซ็กคาไรด์ ซึ่งแสดงสมบัติรีดิวส์

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลายน้ำแป้ง 1%
- กรดเกลือเข้มข้น
- สารละลายไอโอดีน
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์
- น้ำยาเบเนดิกต์***
- สำลี

**สารละลายไอโอดีน : โพแทสเซียมไอโอดีน 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. เขย่าให้เข้ากันละลายไอโอดีน 0.15 กรัม ลงไป

วิธีการทดลอง ใส่สารละลายน้ำแป้งลงในหลอดทดลอง 3 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้น 5 หยด เขย่า อุ่นในอ่างน้ำร้อน ใช้หลอดหยดดูดสารละลายทุก ๆ นาที แล้วหยดลงบนแผ่น กระจกหรือแผ่นเคลือบขาว 1 หยด ผสมกับสารละลายไอโอดีน 1 หยด ทำเช่นนี้จนกระทั่งสารละลายไม่เกิดสีม่วงแดงกับไอโอดีน ทำสารละลายที่เหลือให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำมาทดสอบกับน้ำยาเบเนดิกต์อุ่นในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงบันทึกผลการทดลอง

ทดลองซ้ำโดยใช้สำลี 0.5 กรัม ละลายในกรดเกลือเข้มข้ม 2 มล. แทนสารละลายน้ำแป้ง

การทดลองที่ 1.8 การทดสอบไอโอดีน

หลักการ การทดสอบไอโอดีนเป็นการทดสอบแป้งและไกลโคเจน เมื่อให้แป้งทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน จะได้สารสีม่วง น้ำเงิน ส่วนไกลโคเจนและแป้งที่สลายโมเลกุลเล็กลง เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน จะได้สารสีน้ำตาลแดง และสีม่วงแดงตามลำดับ

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลายน้ำแป้ง 1%
- สารละลายกลูโคส 1%
- กรดเกลือเข้มข้น 1%
- สารละลายไอโอดีน**

วิธีทดลอง ใส่สารละลายน้ำแป้ง และกลูโคส แยกกันในหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดละ 2 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้นหลอดละ 5 หยด เขย่า เติมสารละลายไอโอดีนหลอดละ 5 หยด เขย่า สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 20 นาที บันทึกผลการทดลอง

***น้ำยาเบเนดิกต์: คือสารละลายด่างของคิวปริกคอมแพล็กซ์กับโซเดียมซิเทรต เตรียมโดย โซเดียมไบคาร์บอเนต 100 กรัม + โซเดียมซิเตรต 173 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. กรอง เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 178 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

รายงานผลการทดลอง

บทปฏิบัติการที่ 1 เรื่อง การทดสอบคาร์โบไฮเดรต วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1.1-1.6

น้ำตาล / การทดลองที่		กลูโคส	ฟรักโตส	อะราบิโนส	มอลโตส	ซูโครส
1.1 การทดสอบโมลิสช์						
1.2 การทดสอบเซลิวานอฟฟ์	ใช้น้ำตาลน้อย					
	ใช้น้ำตาลมาก					
1.3 การทดสอบไบอัล						
1.4 การทดสอบอะนีลีนอะซิเตต						
1.5 การทดสอบเฟห์ลิง						
1.6 การทดสอบเบเนดิกต์						

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1.7 การทดสอบน้ำตาลรีดิวส์จากการสลายโพลีแซ็กคาร์ไรด์

คาร์โบไฮเดรต	**แป้ง**	**เซลลูโลส**
เวลาที่ใช้สลาย (นาที)		
ผลการทดสอบเบเนดิกต์		

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1.8 การทดสอบไอโอดีน

สาร / **นาทีที่**	**แป้ง**	**กลูโคส**

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 2

การแยกและการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตเชิงคุณภาพ

การทดลองที่ 2.1 การวิเคราะห์ชนิดสารตัวอย่างตามแบบแผนการทดสอบคาร์โบไฮเดรต

หลักการ สารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ อาจเป็นสารละลายหรือเป็นของแข็ง ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 1-2 ชนิด ในการวิเคราะห์จะต้องนำสารตัวอย่างมาทดสอบปฏิกิริยาต่าง ๆ ตามแบบแผนการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทุกขั้นตอน

สารที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำยาโมลิสช์
- กรดกำมะถันเข้มข้น
- สารละลายไอโอดีน
- น้ำยาเบเนดิกต์
- กรดเกลือเข้มข้น
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น
- น้ำยาเซลิวานอฟฟ์
- น้ำยาไบอัล
- สารตัวอย่างน้ำตาล 1 ชนิด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร/กลุ่ม

วิธีการทดลอง ทดลองโดยใช้สารตัวอย่างน้ำตาลที่ได้รับแจกของแต่ละกลุ่มนำมาทดสอบตามวิธีในบทปฏิบัติการที่ 1 โดยทดลองตามแบบแผนการวิเคราะห์สารตัวอย่างคาร์โบไฮเดรตดังนี้

1. การทดสอบโมลิสช์ ถ้าผลการทดสอบเป็น **บวก** ไม่จำเป็นว่าต้องมีคาร์โบไฮเดรตอยู่เสมอไป ถ้าผลการทดสอบเป็น **ลบ** แสดงว่าไม่มีคาร์โบไฮเดรต

2. การทดสอบไอโอดีน ถ้ามีสีน้ำเงิน ม่วงแดง แดง แสดงว่ามีโพลีแซ็กคาร์ไรด์ ถ้ามีสีให้ทดสอบขั้นต่อไป (*ถ้าไม่มีสี ยืนยันการทดลองโดยการทดสอบเบเนดิกส์*)

3. การทดสอบเบเนดิกซ์

3.1 ถ้าผลการทดสอบเป็น **ลบ** อาจเป็นน้ำตาลซูโครส นำสารตัวอย่างมา 3 มล. เติมกรดเกลือเข้มข้น 1-2 หยด ต้มให้เดือด 1 นาที ทำให้เย็น ทำให้เป็นกลางด้วยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น แล้วมาทดสอบเบเนดิกต์ ถ้าผลการทดสอบเป็น **บวก** แสดงว่าเป็นซูโครส ทดลองยืนยันด้วยการ

3.2 ทดสอบเซลิวานอฟฟ์ ถ้าผลการทดสอบเป็น **บวก** แสดงว่าอาจเป็นกลูโคส ฟรักโทส กาแล็กโทส เพนโทส มอลโทส และแล็กโทส

3.2.1 ทดสอบกับน้ำยาเซลิวานอฟฟ์ ถ้าผลการทดสอบเป็น บวก แสดงว่าเป็นฟรักโทส ถ้าผลการทดสอบเป็น ลบ แสดงว่าเป็นกลูโคส กาแล็กโทส หรือเพนโทส

3.2.1.1 ทดสอบน้ำยาไบอัล ถ้าผลการทดสอบเป็นบวก แสดงว่าเป็นเพนโทส

หมายเหตุ -แป้งอาจตกตะกอนโดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวปริมาตรเท่ากับสารละลายน้ำแป้ง

การทดลองที่ 2.2 การแยกและวิเคราะห์น้ำตาลด้วยโครมาโทกราฟฟีแบบกระดาษ

หลักการ การแยกน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟฟีทำได้ทั้งโครมาโทรกราฟฟีแบบกระดาษและแบบชั้นบาง โครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษมีสองแบบคือ แบบเดสเซนดิงให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากข้างบนลงข้างล่าง แบบแอสเซนดิงให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากข้างล่างขึ้นข้างบน ตำแหน่งน้ำตาลที่แยกได้บนกระดาษสามารถหาได้โดยให้ทำปฏิกิริยากบน้ำยาไดโนโตรซาลิไซเลต แล้ววิเคราะห์หาค่า R_f โดยเทียบกับ R_f ของสารละลายมาตรฐานในที่นี้ใช้วิธีการแยกโดยแอสเซนดิง ใช้ตัวทำละลายผสมสูตรหนึ่ง คือ เอ็นบิวทานอล: ไพริดีน: น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 6 : 4 : 3 ซึ่งจะได้ค่า R_f เฉลี่ยของน้ำตาลเป็นดังนี้ แล็กโทส 0.22 มอลโทส 0.28 กาแล็กโทส 0.36 ฟรักโทส 0.41 กลูโคส 0.46 และไซโลส 0.52

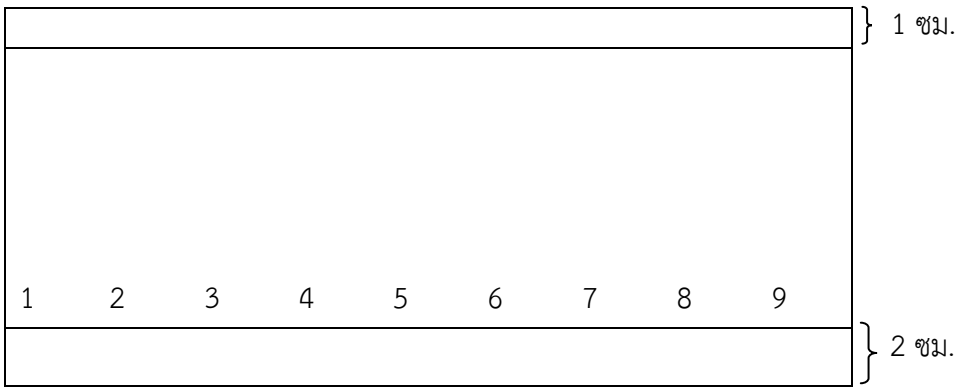
สารที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำผมไม้คั้นสด ๆ เช่น น้ำส้ม น้ำสับปะรด น้ำแตงโม หรือ น้ำองุ่น (เลือก 2-3 ชนิด)
- สารละลายน้ำตาลมาตรฐานเข้มข้น 2% (กลูโคส, ฟรักโตส, กาแล็กโทส, แล็กโทส, มอลโตส)
- สารตัวอย่างผสม เข้มข้น 2%
- ตัวทำละลาย (เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์:น้ำกลั่น, 60:40:30 หรือ เอ็น-โพรพานอล: เอธิลอะซิเตต: น้ำกลั่น, 35:5:10)
- สารละลายไดโนโตรซาลิไซเลต*

วิธีการทดลอง

1. เตรียมน้ำผลไม้โดยปอกเปลือก ชั่งส่วนที่เป็นเนื้อ 10 กรัม ห่อด้วยผ้าขาวบางคั้นน้ำผลไม้ลงในบีกเกอร์เก็บไว้ทดสอบ

2. ล้างมือให้สะอาดตัดกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ขนาด 15 x 26 ซม. วางลงบนกระดาษรองพื้นที่สะอาด (อย่าจับตรงกลางกระดาษกรองน้ำตาลจากเหงื่อที่มือจะติดกระดาษไปด้วย) ขีดเส้นขนานทางด้านยาวของกระดาษห่างจากขอบกระดาษด้านล่าง 2 ซม. และห่างจากขอบด้านบน 1 ซม. โดยใช้ดินสอทำเครื่องหมายบนเส้นที่ขีด ให้แต่ละจุดห่างกัน 2 ซม. ใช้เป็นจุดตำแหน่งหยดสารมาตรฐาน สารตัวอย่างผสม และน้ำผลไม้ ดังรูป



3. ใช้หลอดแคปิลลารี ดูดสารสารละลายมาตาฐาน สารตัวอย่างผสม และน้ำผลไม้หยดลงบนจุดที่ทำเครื่องหมายไว้ ให้แต่ละจุดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.6 ซม. ควรหยดแล้วปล่อยให้แห้งแล้วค่อยหยดซ้ำอีก 5-7 ครั้ง ปล่อยให้สารที่หยดทุกจุดแห้งสนิท

4. ม้วนกระดาษตามขวางให้เป็นรูปทรงกระบอก แล้วเย็บขอบให้จรดกันด้วยลวดเย็บกระดาษ (*อย่าเย็บกระดาษให้ซ้อนทับกัน*) นำไปวางในขวดโหลปิดฝาที่อิ่มตัวด้วยไอตัวทำละลาย ระวังไม่ให้จุดที่หยดสารอยู่ใต้ระดับตัวทำละลาย ปล่อยให้ตัวทำละลายชะน้ำตาลขึ้นมาจนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นมาถึงขีดขอบกระดาษด้านบน ยกกระดาษกรองออกจากบีกเกอร์ ผึ่งให้แห้ง พ่นด้วยสารละลายไดไนโตรซาลิไซเลต นำไปอบที่อุณหภูมิ 60-80 $^{\circ}$C เป็นเวลา10 นาที

5. ใช้ดินสอขีดรอบจุดที่ปรากฏ วัดระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ และระยะทางที่สารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานเคลื่อนที่ คำนวณหาค่า R_f ของน้ำตาลในสารตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน สรุปชนิดน้ำตาลในน้ำผลไม้ และสารตัวอย่างผสม

6. การหาค่า R_f

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

***สารละลายไดไนโตรซาลิไซเลต**: ละลายไดไนโตรซาลิไซเลต 0.5 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4% 100 มล.

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 2 เรื่อง การแยกและวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตเชิงคุณภาพ วันที่ทำการทดลอง.....
ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....
ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....
.....
.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2.1 การวิเคราะห์สารตัวอย่างตามแบบแผนการทดสอบคาร์โบไฮเดรต

สารตัวอย่าง วิเคราะห์หา	**การทดสอบ โมลิสช์**	**การทดสอบ ไอโอดีน**	**การทดสอบ เซลิวานอฟฟ์**	**การทดสอบ ไบอัล**
สารตัวอย่าง				

สรุปสารตัวอย่างที่วิเคราะห์คือ.....
.....
.....
.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....
.....
.....
.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2.2

การแยกและการวิเคราะห์ตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟฟีแบบกระดาษ

น้ำตาล	**ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)**	**ระยะทางที่น้ำตาลเคลื่อนที่ (ซม.)**	**ค่า R_f ของน้ำตาล**
กลูโคส ฟรักโทส มอลโทส แล็กโทส กาแล็กโทส น้ำผลไม้..... จุดที่ 1 จุดที่ 2 จุดที่ 3 น้ำผลไม้..... จุดที่ 1 จุดที่ 2 จุดที่ 3 สารตัวอย่างผสม จุดที่ 1 จุดที่ 2 จุดที่ 3			

สรุปน้ำตาลที่อยู่ในน้ำผลไม้ที่นำมาวิเคราะห์คือ.....

.....

สรุปน้ำตาลที่อยู่ในสารตัวอย่างผสมคือ.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 3
การแยกและการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตเชิงปริมาณ

การทดลองที่ 3.1 การปริมาณแล็กโทสในน้ำนมด้วยวิธีฟีนอล-กรดกำมะถัน

หลักการ ในน้ำนมวัวมีน้ำตาลแล็กโทสเป็นองค์ประกอบอยู่ 4-6 % ส่วนในน้ำนมคนมีน้ำตาลแล็กโทส 2-3 % แล็กโทสเป็นไดแซ็กคาร์ไรด์ที่ประกอบด้วยกาแล็กโทสและกลูโคสต่อกันด้วยข้อต่อเบตา (1-4) ในการหาปริมาณแล็กโทสในน้ำนมโดยวิธีฟีนอล-กรดกำมะถัน เพราะไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ทำได้สะดวก กรดกำมะถันดึงน้ำออกจากน้ำตาลกลายเป็นอนุพันธ์เฟอร์ฟิวรัลซึ่งรวมกับฟีนอลเกิดเป็นสารมีสี ความเข้มข้นของสีขึ้นกับปริมาณน้ำตาล จึงหาปริมาณน้ำตาลโดยใช้หลักการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

สารที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำนมวัว
- สารละลายฟีนอล 5%
- กรดกำมะถันเข้มข้น
- สารละลายแล็กโทสมาตรฐาน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยนำน้ำนมวัวเจือจาง 1: 125 1: 250 และ 1: 500 ด้วยน้ำกลั่น (หลอดที่ 5 6 และ 7)

2. เตรียมหลอดทดลอง 7 หลอดใส่สารตามลำดับ 1-4 ตามในตารางต่อไปนี้

หลอดที่ / สารที่เติม (มล.)	หลอดเปรียบเทียบ	แลกโตสมาตรฐาน			น้ำนมวัวเจือจาง		
		10 มก.%	20 มก.%	30 มก.%	1: 125	1: 250	1: 500
	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5	หลอดที่ 6	หลอดที่ 7
น้ำกลั่น	0.1	-	-	-	-	-	-
สารตัวอย่าง	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ฟีนอล 5%	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
กรดกำมะถันเข้มข้น	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

3. ให้เติมสารข้อ 1-2 ให้ครบทั้ง 7 หลอดก่อน แล้วค่อยเติมฟีนอล 5% ให้ครบทั้ง 7 หลอดจึงเติมกรดกำมะถันเข้มข้น (ทำด้วยความระมัดระวัง) เขย่าสารละลายแต่ละหลอดให้ผสมกันตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งจุดศูนย์ (blank)

4. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร กับปริมาณแล็กโทสหน่วย มก.% (ใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของหลอดที่ 1-4 ในการเขียนกราฟอ่านค่าปริมาณน้ำตาลแล็กโทสในหลอดที่ 5-7 จากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลแล็กโทสในนม

วิธีคำนวณ

คาร์โบไฮเดรตในน้ำนมวัว = (a) x (Dilution factor) มก.%

โดยที่ a คือ ปริมาณน้ำตาลแลกโตสในสารตัวอย่าง (มก.%) ที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

Diulion factor คือ ค่าสารตัวอย่างที่เจือจางคิด (เท่า)

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 3 เรื่อง การแยกและวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตเชิงปริมาณ วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

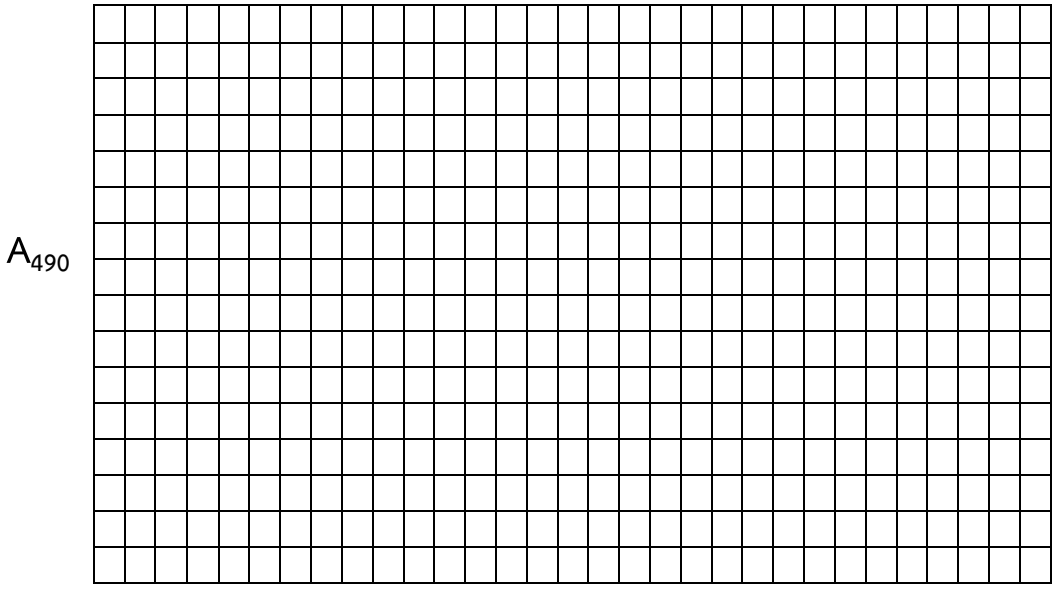
.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 3.2 การหาปริมาณแล็กโทสในน้ำนมด้วยวิธีฟีนอล-กรดกำมะถัน

หลอดที่ / สารที่เติม (มล.)	หลอดเปรียบเทียบ	แลกโตสมาตรฐาน			น้ำนมวัวเจือจาง		
		10 มก.%	20 มก.%	30 มก.%	1: 125	1: 250	1: 500
	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5	หลอดที่ 6	หลอดที่ 7
น้ำกลั่น	0.1	-	-	-	-	-	-
สารตัวอย่าง	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ฟีนอล 5%	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
กรดกำมะถันเข้มข้น	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
A_{490}							

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{490} และปริมาณแลกโตส



การคำนวณ

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

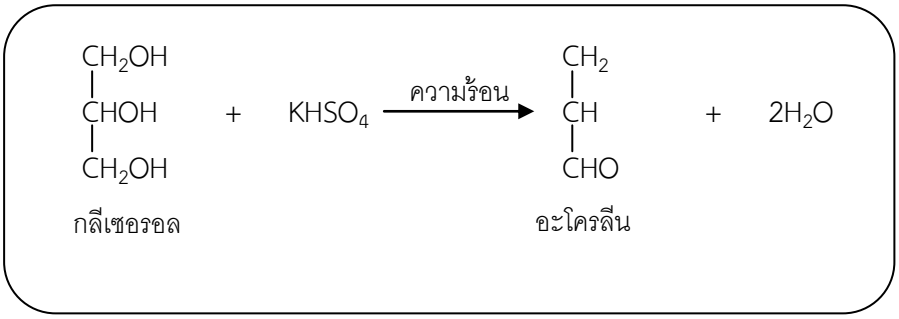
.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 4
การทดสอบลิปิด

การทดลองที่ 4.1 การทดลองอะโครลีน (Acrolein test)

หลักการ การทดสอบอะโครลีน เป็นการทดสอบกลีเซอรอล โดยอาศัยหลักที่ว่า กลีเซอรอลอิสระหรือเป็นเอสเทอร์ของไขมัน จะทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไบซัลเฟตที่อุณหภูมิสูง (100-200° ซ.) สูญเสียน้ำ 2 โมเลกุล กลายเป็นก๊าซอะโครลีน ซึ่งมีกลิ่นดังสมการ



สารที่ใช้ในการทดลอง

- กลีเซอรอล
- กรดสเตียริก
- โคเลสเตอรอล
- น้ำมันพืช
- โพแทสเซียมไบซัลเฟต

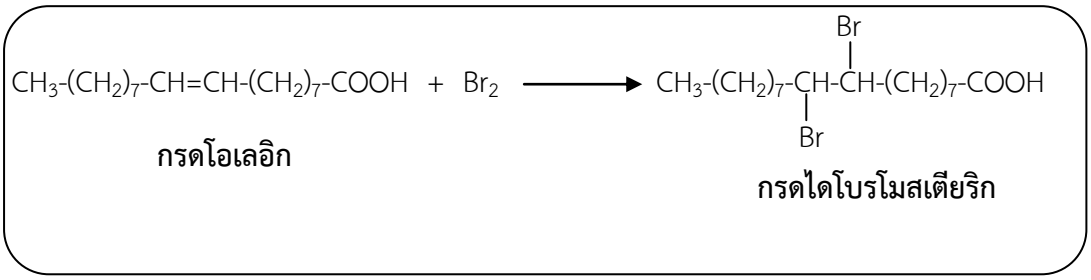
วิธีการทดลอง

ใส่กลีเซอรอลลงในหลอดทดลอง 1-2 หยด เติมโพแทสเซียมไบซัลเฟตประมาณ 1 กรัม เผาหลอดทดลองให้ร้อนโดยใช้ตะเกียงบุนเสน ดมกลิ่นก๊าซที่ระเหยออกมา (ปฏิกิริยานี้ถ้าให้ความร้อนเร็วและรุนแรงเกินไปจะได้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ซึ่งอาจทำให้เข้าใจผิดว่าเป็นกลิ่นของอะโคลีน ให้ใช้น้ำกลั่นแทนกลีเซอรอลเป็นหลอดเปรียบเทียบ)

ทดลองซ้ำโดยใช้น้ำมันพืช กรดสเตียริก และโคเลสเตอรอล แทนกลีเซอรอล ตามลำดับ แล้วเปรียบเทียบกลิ่นก๊าซที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 4.2 การทดสอบความไม่อิ่มตัวของลิปิด (Unsaturation test)

หลักการ กรดไขมันที่ประกอบเป็นโครงสร้างของลิปิดแบ่งออกเป็นสองชนิด คือ ชนิดอิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัวซึ่งมีพันธะคู่ พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสามารถทำปฏิกิริยากับสารพวกฮาโลเจน โดยจะฟอกจางสีฮาโลเจน (โบรมีน และไอโอดีน) จึงใช้สมบัติข้อนี้ทดสอบว่าลิปิดที่ศึกษามีพันธะคู่ในโมเลกุล



สารที่ใช้ในการทดลอง

- กรดโอเลอิก
- กรดสเตียริก
- น้ำมันพืช
- คลอโรฟอร์ม
- สารละลายโบรมีน 10% ในคลอโรฟอร์ม (หรือใน CCl_4)

วิธีการทดลอง

ใส่คลอโรฟอร์ลงในหลอดทดลอง 1 มล. เติมกรดโอเลอิกลงไป 2 หยด ค่อย ๆ หยดสารละลายโบรมีนลงไปที่ละหยด ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดทดลองด้วยฝ่ามือ ลิปิดที่มีพันธะคู่จะฟอกจางสีโบรมีนได้พอพันธะคู่เหล่านั้นหมด สีของโบรมีนจะคงอยู่ นับจำนวนหยดที่หยดลงไปจนสีคงตัว

ทดลองซ้ำโดยใช้กรดสเตียริก และน้ำมันพืช แทนกรดโอเลอิกตามลำดับเปรียบเทียบจำนวนหยดของโบรมีนที่ใช้สำหรับลิปิดแต่ละชนิด

การทดลองที่ 4.3 การทดสอบเปอร์ออกไซด์

หลักการ ลิปิดที่เก็บไว้นานอาจเหม็นหืนได้ เนื่องจากพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวถูกออกซิไดส์ด้วยออกซิเจนในอากาศที่ให้เปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะแตกตัวต่อไปเป็นอัลดีไฮด์หรือคีโตน ทำให้มีกลิ่นหืน เปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถทดสอบได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไอโอไดด์ จะได้ไอโอดีนเกิดขึ้น ซึ่งมีสีเหลืองปนน้ำตาล

สารที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำมันพืชใหม่
- น้ำมันพืชเก่า (น้ำมันพืชที่เปิดขวดใช้แล้ว)
- น้ำมันทอดไก่
- คลอโรฟอร์ม
- เมธานอล
- กรดน้ำส้มเข้มข้น
- สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 10%

วิธีการทดลอง

เติมคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลอง 0.5 มล. เติมเมทานอลลงไป 0.5 มล. เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำมันพืชเก่าลงไป 10 หยด เขย่า เติมกรดน้ำส้มเข้มข้น 2 มล. โพแทสเซียมไอโอไดด์ 10% 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที สังเกตความเข้มของสีไอโอดีนที่เกิดขึ้น

ทดลองซ้ำโดยใช้น้ำมันพืชใหม่ น้ำมันพืชเก่า และน้ำมันทอดไก่ แล้วเปรียบเทียบความเข้มของสีไอโอดีนที่เกิดขึ้นในลิปิดชนิดต่าง ๆ

การทดลองที่ 4.4 ปฏิกิริยาซาลโควสกิ (Salkowski's reaction)

หลักการ ปฏิกิริยาซาลโควสกิเป็นปฏิกิริยาการทดสอบโคเลสเตอรอล โดยอาศัยหลักที่ว่าเมื่อเติมกรดกำมะถันลงไปในสารละลายโคเลสเตอรรอลซึ่งละลายในคลอโรฟอร์มจะได้สารละลายแยกเป็นสองชั้น คือชั้นคลอโรฟอร์มจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน และชั้นกรดซึ่งมีสีเขียวเรืองแสงและมีวงแหวนระหว่างชั้นสารละลายทั้งสองถ้าเป็นโคเลสเตอรรอลจะให้วงแหวนสีน้ำตาลแดง ถ้าเป็นเออร์โกสเตอรอลจะให้วงแหวนสีแดงเข้ม

สารที่ใช้ในการทดลอง

- โคเลสเตอรอล
- เออร์โกสเตอรอล
- คลอโรฟอร์ม
- กรดกำมะถันเข้มข้น

วิธีการทดลอง

เติมคลอโรฟอร์มลงในหลอดทดลองที่แห้งสนิท 1 มล. เติมโคเลสเตอรอล 10 มก. เขย่าให้ละลาย เอียงหลอดทดลองเล็กน้อย ค่อย ๆ เติมกรดกำมะถันเข้มข้นลงไป 1 มล. ทางด้านข้างหลอดทดลองเพื่อให้ละลายแยกเป็นสองชั้น ตั้งทิ้งไว้สักครู่สังเกตสีวงแหวนตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารละลาย

ทดลองซ้ำโดยใช้เออร์โกสเตอรอลแทนโคเลสเตอรอล แล้วเปรียบเทียบสีของวงแหวนระหว่างรอยต่อชั้นสารละลาย

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 4 เรื่อง การทดสอบลิปิด วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 4.1 การทดสอบอะโครลีน

ลิปิดที่ใช้ทดลอง	กลิ่นก๊าซที่เกิดขึ้น
กลีเซอรอล **น้ำมันพืชใหม่** **น้ำมันพืชเก่า** **น้ำมันทอดไก่** **กรดสเตียริก** **โคเลสเตอรอล**	

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 4.2 การทดสอบความไม่อิ่มตัวของลิปิด

ลิปิดที่ใช้ทดลอง	จำนวนหยดโบรมีนที่ใช้	องศาความไม่อิ่มตัว
กรดโอเลอิก **กรดสเตียริก** **น้ำมันพืช**		

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 4.3 การทดสอบเปอร์ออกไซด์

สารตัวอย่างลิปิด	ความเข้มข้นของสีไอโอดีนที่เกิดขึ้น
น้ำมันพืชเก่า น้ำมันพืชใหม่ น้ำมันทอดไก่	

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 4.4 ปฏิกิริยาซาลโควสกิ

สารตัวอย่างลิปิด	ปฏิกิริยาซาลโควสกิ
โคเลสเตอรอล เออร์โกสเตอรอล	

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 5
การแยกและวิเคราะห์ลิปิดเชิงคุณภาพ

การทดลองที่ 5.1 การหาค่าเลขแซพอนิฟิเคชัน (Saponification) ของไขมัน

หลักการ เลขแซพอนิฟิเคชัน คือ "จำนวนมิลลิกรัมของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับไขมันหรือน้ำมัน 1 กรัม" ไขมันแต่ละชนิดมีค่าเลขแซพอนิฟิเคชันไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ 1 กรัม ตัวอย่างเช่น

ลิปิด	เลขแซพอนิฟิเคชัน
น้ำมันงา	188-195
น้ำมันถั่วลิสง	188-196
น้ำมันมะกอก	190-195
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	190-198
น้ำมันหมู	192-200
เนย	222-232
น้ำมันมะพร้าว	245-265

การหาค่าเลขแซพอนิฟิเคชัน นิยมทำโดยการต้มลิปิดที่รู้น้ำหนักแน่นอนกับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานเกินกว่าที่จะใช้ทำปฏิกิริยาพอดีกับลิปิด หลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว หาปริมาณโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เหลือโดยนำไปไทเทรตกับกรด แล้วคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับลิปิด 1 กรัม

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารตัวอย่างลิปิด
- ฟีนอล์ฟทาลีน
- สารละลายกรดเกลือมาตรฐาน 0.5 โมลาร์
- สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ในเอทิลแอลกอฮอล์

วิธีการทดลอง

1. ชั่งไขมันหรือน้ำมันด้วยเครื่องชั่งละเอียดประมาณ 1.5 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. ใช้ขวดรูปชมพู่อีกใบหนึ่งใส่น้ำกลั่น 1.5 มล. เป็นขวดเปรียบเทียบโดยทดลองควบคู่กันไปตลอดเวลา
2. นำขวดทั้งสองไปเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ในเอทิลแอลกอฮอล์ (จากบิวเรตหน้าห้อง) 25 มล. รีฟลักซ์ในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที เขย่าขวดเป็นครั้งคราว
3. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด แล้วไทเทรตกับการละลายกรดเกลือมาตรฐาน 0.5 โมลาร์ บันทึกปริมาณกรดเกลือที่ใช้ไทเทรต

ทดลองซ้ำโดยใช้ลิปิดตัวอย่างที่กำหนดให้ แล้ววิเคราะห์ว่าเป็นลิปิดชนิดใด

วิธีคำนวณ

คำนวณหาค่าเลขแซพอนิฟิเคชันของลิปิดตัวอย่าง โดยยึดถือหลักว่า กรดเกลือมาตรฐาน 0.5 โมลาร์ 1 มล. ทำปฏิกิริยาพอดีกับโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 28.05 มก.ตามสมการ

เลขแซพอนิฟิเคชัน = จำนวน มก. ของ KOH ที่ปฏิกิริยากับลิปิด 1 กรัม

$$= \frac{0.5 \times 56.1 \times (\text{ข-ก})}{\text{น.น.ลิปิด หน่วยกรัม}}$$

และสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของลิปิดได้จากสมการ

$$\text{น้ำหนักโมเลกุลของลิปิด} = \frac{168,000}{\text{เลขแซพอนิฟิเคชั่น}}$$

สมมติว่า ในขวดสารตัวอย่างใช้กรดเกลือ 0.5 โมลาร์ไทเทรต = ก มล.

ในขวดเปรียบเทียบใช้กรดเกลือ 0.5 โมลาร์ไทเทรต = ข มล.

และน้ำหนักโมเลกุลของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ = 56.1 กรัม/โมล

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 5 เรื่อง การแยกและวิเคราะห์ลิปิดเชิงคุณภาพ วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

.....

บันทึกผลการทดลองที่ 5.1 การหาค่าเลขแซพอนิฟิเคชันของไขมัน

น้ำหนักของลิปิดที่ใช้ทดลอง.....กรัม ชื่อลิปิด.....

ปริมาตรกรดเกลือ 0.5 โมลาร์ที่ใช้ไทเทรตในขวดสารตัวอย่าง.....มล.

ปริมาตรกรดเกลือ 0.5 โมลาร์ที่ใช้ไทเทรตในขวดเปรียบเทียบ.....มล.

$$\text{เลขแซพอนิฟิเคชันของไขมัน} = \frac{0.5 \times 56.1 (\quad - \quad)}{\text{น้ำหนักลิปิดตัวอย่าง}}$$

=

น้ำหนักลิปิดตัวอย่าง.....กรัม

ปริมาตรกรดเกลือ 0.5 โมลาร์ที่ใช้ไทเทรตในขวดสารตัวอย่าง .....มล.

ปริมาตรกรดเกลือ 0.5 โมลาร์ที่ใช้ไทเทรตในขวดเปรียบเทียบ.....มล.

$$\text{เลขแซพอนิฟิเคชันของลิปิดตัวอย่าง} = \frac{0.5 \times 56.1 (\quad - \quad)}{}$$

=

ดังนั้นลิปิดตัวอย่างที่ใช้น่าจะเป็น.....

สรุปผลการทดลอง.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

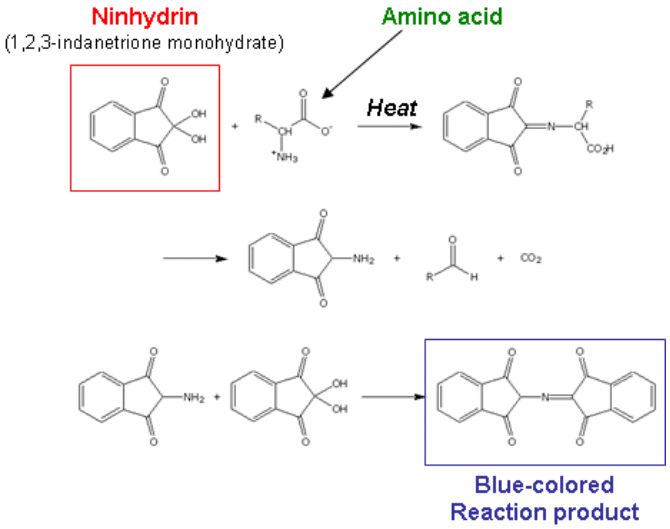
.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 6
การทดสอบกรดอะมิโนและโปรตีน

การทดลองที่ 6.1 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin reaction)

หลักการ ปฏิกิริยานินไฮดริน เป็นปฏิกิริยาการทดสอบกรดอะมิโนอิสระและกรดอะมิโนในเปปไทด์หรือโปรตีน โดยให้กรดอะมิโนทำปฏิกิริยากับนินไฮดรินที่อุณหภูมิสูง ๆ จะเกิดอัลดีไฮด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนียและสารสีน้ำเงิน (ยกเว้นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนได้สารสีเหลือง) ตามสมการต่อไปนี้



เปปไทด์ และโปรตีนทั้งหลายเกิดปฏิกิริยาเหมือนกันนี้ แต่จะไม่เกิดคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย อาจใช้ปฏิกิริยานี้วิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนโดยวัดความเข้มข้นของสิ่งที่เกิดขึ้นเทียบกับสีจากกรดอะมิโนมาตรฐาน

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลาย อะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 5.0*
- สารละลายไกลซีน 0.1%
- สารละลายไทโรซีน 0.1%
- สารละลายฟีนิลอะลานีน 0.1%
- สารละลายโพรลีน 0.1%
- สารละลายไข่ขาวเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1.5 % สิบเท่า
- น้ำยานินไฮดริน 0.2% ในเอธานอลใหม่ๆ**

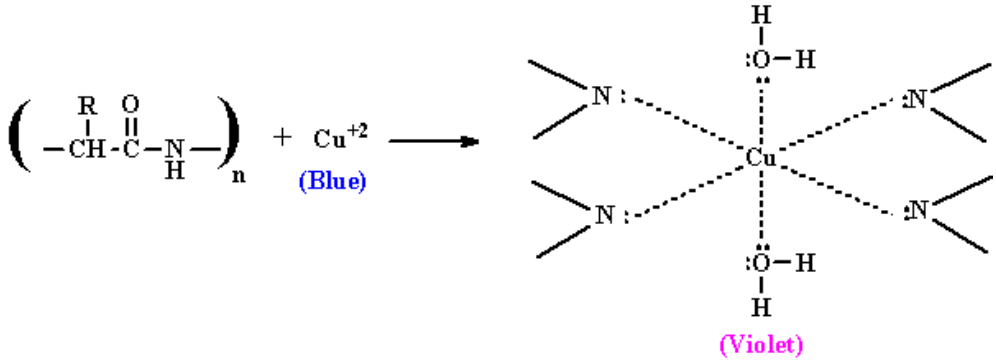
วิธีการทดลอง

ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0 ลงในหลอดทดลองสามหลอด หลอดละ 2 มล. หลอดที่หนึ่งเติมสารละลายไกลซีน 1 มล. หลอดที่สองเติมสารละลายไข่ขาว 1 มล. หลอดที่สามเติมน้ำกลั่น 1 มล. แล้วเติมน้ำยานินไฮดรินลงไปหลอดละ 1 มล. นำหลอดทั้งสามไปอุ่นในอ่างน้ำเดือดประมาณ 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายในหลอดทั้งสาม บันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 6.2 ปฏิกิริยาไบยูเรต (Biuret reaction)

หลักการ ปฏิกิริยาไบยูเรต เป็นปฏิกิริยาการทดสอบสารที่ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ตั้งแต่สองแห่งขึ้นไป ใช้ทดสอบโปรตีนทั่วไปและผลิตภัณฑ์การไฮโดรไลส์โปรตีนที่ยังมีโมเลกุลใหญ่ เช่นโปรตีโอส เปปโทน และเปปไทด์ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในสารละลายด่างซึ่งจะให้สีม่วงครามกับโปรตีน แต่สารที่ได้จากการไฮโดรไลส์โปรตีนจะให้สีต่างกันออกไป ตั้งแต่ม่วงจนถึงชมพู ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลว่าถูกไฮโดรไลส์เป็นโมเลกุลใหญ่หรือเล็ก อาจใช้ปฏิกิริยานี้ติดตามการไฮโดรไลส์โปรตีนได้

การเกิดสีในปฏิกิริยาไบยูเรต เกิดจากคิวปริกไอออนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไนโตรเจนสี่อะตอม ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสารชื่อ ไบยูเรต จึงเรียกว่าปฏิกิริยาไบยูเรตและอาจใช้ปฏิกิริยานี้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลาย โดยวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเทียบกับสีที่เกิดจากโปรตีนมาตรฐาน



สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.001 mg/ml
- สารละลาย 10% NaOH
- สารละลาย 1% $CuSO_4$
- สารละลายไกลซีน 0.1%
- สารละลายไข่ขาวเจือจางด้วย 1.5 % NaCl 10 เท่า

---

*สารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.0 เตรียมโดยผสมกรดอะซีติกเข้มข้น 5.6 มล. กับน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ละหยด คนอยู่เรื่อยๆ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

**น้ำยานินไฮดริน เตรียมโดยละลายนินไฮดริน 0.2 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 100 มล.

*** สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.001 mg/ml เตรียมโดย ชั่งสารละลาย BSA 0.1 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. นำมาเจือจาง 100 เท่า โดยใส่น้ำกลั่น 99 มล.

วิธีการทดลอง

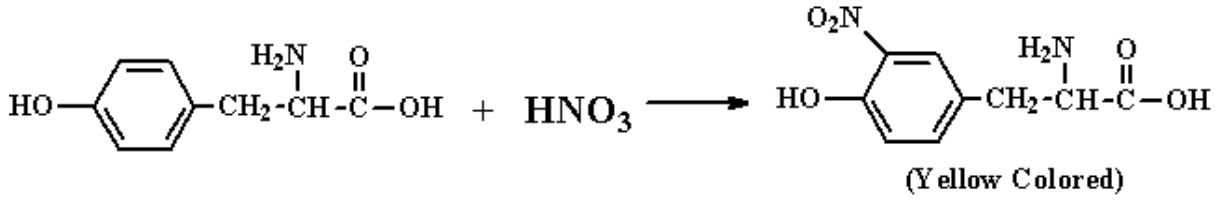
ใส่สารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.001 mg/ml ลงในหลอดทดลอง 2 มล. เติมสารละลาย 10% NaOH 1 มล. แล้วเติมสารละลาย 1% $CuSO_4$ 5 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี บันทึกผลการทดลอง

ทดลองซ้ำโดยใช้ซีรัมเจือจางด้วยน้ำกลั่นสิบเท่า สารละลายไกลซีน 0.1 % และสารละลายไข่ขาวเจือจางด้วย 1.5% NaCl 1 มล. แทนสารละลาย BSA ตามลำดับ

การทดลองที่ 6.3 ปฏิกิริยาแซนโทโปรเตอิก (Xanthoproteic reaction)

หลักการ เมื่อให้โปรตีนบางชนิด เช่น โปรตีนที่ผิวหนังทำปฏิกิริยากับกรดดินประสิวเข้มข้น จะเกิดสีเหลือง ถ้าทำปฏิกิริยากับด่างสีจะเข้มขึ้นจนกลายเป็นสีส้ม ปฏิกิริยานี้เกิดจากการไทเทรตหมู่เบนซีนของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริพโตเฟนซึ่งจะให้สารสีเหลือง เมื่อเติมด่างจะให้เกลือที่มีสีส้ม

ดังนั้นปฏิกิริยานี้จึงให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับโปรตีนที่มีกรดอะมิโนฟีอะลานีน ไทโรซีน หรือทริพโตเฟนอยู่ในโมเลกุล



ปฏิกิริยา Xanthoproteic ของกรดอะมิโน Tyrosine

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลายไทโรซีน 0.1%
- กรดดินประสิวเข้มข้น (HNO_3 conc.)
- แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH)
- สารละลายฟีนอล 0.1%
- สารละลายไข่ขาวเจือจางด้วย NaCl 1.5% สิบเท่า

วิธีการทดลอง

ใส่สารละลายไทโรซีน 0.1% ลงในหลอดทดลอง 2 มล. เติมกรดดินประสิวเข้มข้น 1 มล. อุ่นในอ่างน้ำร้อน 2-3 นาที ทำสารละลายให้เย็นโดยนำไปหล่อน้ำจากก๊อกน้ำเติม NH_4OH จนสารละลายมีฤทธิ์เป็นด่าง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี บันทึกผลการทดลอง

ทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายไข่ขาวเจือจางด้วย 1.5% NaCl 10 เท่า และสารละลายฟีนอล 0.1% แทนไทโรซีน ตามลำดับ

การทดลองที่ 6.4 ปฏิกิริยาซาคากุชิ (Sakaguchi's reaction)

หลักการ ปฏิกิริยาซาคากุชิ เป็นปฏิกิริยาทดสอบโปรตีน ที่มีกรดอะมิโน อาร์จีนีน อยู่ในโมเลกุลโดยอาศัยหลักการที่ว่า แอลฟาแนพทอล และโซเดียมไฮโปโบรไมต์ในสภาพด่างจะทำปฏิกิริยากับหมู่กวานิดิเนียมของอาร์จินีนได้สารสีแดงชมพู

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลายอาร์จินีน 0.1 %
- สารละลาย 10%NaOH
- น้ำยาแอฟา-แนพทอล*
- น้ำยาโซเดียมไฮโปโบรไมต์**
- สารละลายยูเรีย 40%
- สารละลายไกลซีน 0.1%
- สารละลายไข่ขาวเจือจางด้วย 1.5%NaCl 10 เท่า

วิธีการทดลอง

ใส่สารละลายอาร์จินีน 0.1% ลงในหลอดทดลอง 2 มล. เติม 10%NaOH 5 หยดและเติมน้ำยาแอลฟา-แนพทอล 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งแล้วเติมน้ำโซเดียมไฮโปโบรไมต์ 3 หยด เขย่าให้ผสมกันประมาณ 30 นาที เติมสารละลายยูเรีย 40% 3 หยด เพื่อกำจัดไฮโปโบรไมต์ที่เหลืออยู่ ทำให้สารละลายมีสีคงตัว สังการเปลี่ยนแปลงบันทึกผลการทดลอง

ทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายไกลซีน 0.1% 1 มล. ซีรัมเจือจางด้วยน้ำกลั่นสิบเท่า 1 มล. หรือสารละลายไข่ขาวเจือจางสิบเท่าด้วย 1.5% NaCl 1 มล. แทนสารละลายอาร์จินีน ตามลำดับ

---

*น้ำยาแอลฟา-แนพทอล คือสารละลายแอลฟา-แนพทอล 1% ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% (เตรียมวันทดลอง)

**น้ำยาโซเดียมไฮโปโบรไมต์ เตรียมโดยการเติมโบรมีน 1 มล. ลงใน NaOH 1 โมลาร์ 100 มล.

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 6 เรื่อง การทดสอบกรดอะมิโนและโปรตีน วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

.....

ตารางบันทึกการทดลองที่ 6.1 ปฏิกิริยานินไฮดริน

สารมาตรฐาน	การเปลี่ยนแปลง	+/-

ตารางบันทึกการทดลองที่ 6.2 ปฏิกิริยาไบยูเรต

สารมาตรฐาน	การเปลี่ยนแปลง	+/-

ตารางบันทึกการทดลองที่ 6.3 ปฏิกิริยา Xanthoproteic

สารมาตรฐาน	การเปลี่ยนแปลง	+/-

ตารางบันทึกการทดลองที่ 6.4 ปฏิกิริยาซาคากุชิ

สารมาตรฐาน	การเปลี่ยนแปลง	+/-

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

คำถามท้ายการทดลอง

1. สามารถใช้วิธีการใดตรวจสอบ Phenylalanine ในสารตัวอย่าง
2. ปฏิกิริยาใดสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง กวานิน และ Thyptophan ได้
3. เราสามารถแยกกรดอะมิโน Aromatic กับกรดอะมิโนอื่น ๆ ได้อย่างไร

บทปฏิบัติการที่ 7

การวิเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนเชิงคุณภาพ

การทดลองที่ 7.1 การวิเคราะห์ธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน

หลักการ โปรตีนมีธาตุองค์ประกอบโดยเฉลี่ยเป็นธาตุคาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และกำมะถันอยู่ร้อยละ 53,23,16,7 และ 1 โดยน้ำหนักตามลำดับ

เมื่อเผาสารตัวอย่างโปรตีน ถ้าได้กลิ่นผมไหม้ แสดงว่ามีธาตุไนโตรเจน ผลิตภัณฑ์ไหม้เกรียม แสดงว่ามีธาตุคาร์บอน และถ้ามีหยดน้ำเกิดขึ้น แสดงว่ามีธาตุออกซิเจน และไฮโดรเจน เมื่อเผาสารตัวอย่างโปรตีนกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะสลายตัวให้ก๊าซแอมโมเนีย แสดงว่ามีธาตุไนโตรเจน และไฮโดรเจน

เมื่อต้มสารตัวอย่างโปรตีน หรือกรดอะมิโนที่มีกรดกำมะถันเป็นองค์ประกอบกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กำมะถันจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบอินออร์แกนนิกซัลไฟด์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเลดอะซีเตต ได้เลดซัลไฟด์เป็นตะกอนสีดำ (ปฏิกิริยานี้จะไม่ได้ผลสำหรับเมไทโอนีน เพราะกำมะถันในไทโออีเทอร์ไม่เปลี่ยนเป็นอินออแกนิกซัลไฟด์)

สารที่ใช้ในการทดลอง

- ผงอัลบูมิน
- ผงโซเดียมไฮดรอกไซด์
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 %
- สารละลายเลดอะซีเตต 5 %
- สารละลายซิสเตอีน 0.1 %
- สารละลายไกลซีน 0.1 %
- สารละลายไข่ขาวเจือจางด้วย 1.5 % NaCl 10 เท่า

วิธีการทดลอง

1. วิเคราะห์ธาตุไนโตรเจน คาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจน

ใส่ผงอัลบูมินเล็กน้อยลงในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาด ค่อยๆ เผาช้าๆ สังเกตกลิ่น ลักษณะและสีของสาร บันทึกผลการทดลอง

2. วิเคราะห์ธาตุไนโตรเจนและไฮโดรเจน

ใส่ผงอัลบูมินเล็กน้อยในหลอดทดลอง เติมผงโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปปริมาณ 2 เท่า ของอัลบูมิน เผาช้าๆ ดมกลิ่นก๊าซที่เกิดขึ้น นำกระดาษลิตมัตสีแดงชื้นมาอังที่ปากหลอดทดลอง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลง บันทึกผลการทดลอง

3. วิเคราะห์ธาตุกำมะถัน

ใส่ผงอัลบูมินเล็กน้อยลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 % 5 มล. อุ่นในอ่างน้ำร้อน 5 นาที เติมสารละลายเลดอะซิเตต 5 % 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง บันทึกผลการทดลองทดลองซ้ำโดยใช้กรดอะมิโนซิสเตอีน 0.1 % สารละลายไกลซีน น้ำปัสสาวะ 2 มิลลิลิตร และไข่ขาวเจือจางสิบเท่า ด้วย 1.5 % NaCl แทนอัลบูมิน ตามลำดับ

การทดลองที่ 7.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ

หลักการ หลักการของโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ ได้กล่าวแล้วในบทปฏิบัติการที่ 2 ในการทดลองนี้เป็นการแยก และวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ แบบวิธีแอสเซนดิง คือให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากข้างล่างขึ้นข้างบน เพราะทำได้โดยใช้อุปกรณ์อย่างง่าย

การแยกกรดอะมิโนด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษแบบมิติเดียวไม่สามารถแยกกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันออกจากกันได้ เช่น ลูซีน และไอโซลูซีนต้องใช้แยกแบบ 2 มิติ

การวิเคราะห์จุดต่างๆ ที่ได้หลังจากทำโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษว่าเป็นกรดอะมิโนชนิดไหน อาจใช้วิธีเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานที่แต้มไว้บนกระดาษแผ่นเดียวกัน หรืออาจใช้วิธีเปรียบเทียบกับค่า R_f ของจุดกรดอะมิโนจากหนังสืออ้างอิงที่นักวิทยาศาสตร์อื่นๆ ศึกษาไว้ก็ได้

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลายแอสปาติก 0.5 %
- สารละลายลูซีน 0.5 %
- สารละลายโพรลีน 0.5 %
- สารละลายฟีนิลอะลานีน 0.5 %
- สารละลายกรดอะมิโนผสม (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2-3 ชนิด)
- น้ำปัสสาวะที่ทำให้เข้มข้นขึ้น 2 เท่า โดยต้มระเหย (ถ้ามีตะกอนให้กรองออก)
- ตัวทำละลายผสม เอ็น-บิวทานอล:กรดอะซิติก:น้ำ ในอัตราส่วน 35:5:10 โดยปริมาตร
- สารละลายนินไฮดริน 0.2 % ในอะซิโตน (มีถุงมือไว้พ่นสารด้วย)

วิธีการทดลอง

1. ตัดกระดาษกรองโครมาโตกราฟฟีวอทแมนเบอร์ 1 ขนาด 11 x 19 ซม. ใช้ดินสอดำขีดเส้นตามแนวยาวกระดาษ โดยให้ห่างจากขอบล่างกระดาษ 2 ซม. เป็นเส้นเริ่มต้น และห่างจากขอบบน 1 ซม. แบ่งเส้นเริ่มต้นเป็น 6 จุด ด้วยดินสอดำ เว้นระยะให้ห่างกันประมาณ 2 ซม. แล้วเขียนชื่อกรดอะมิโนที่จะแต้มลงไปด้วยดินสอดำ

2. แต้มสารต่อไปนี้ลงที่จุดแต่ละจุด โดยให้ขนาดของรอยแต้มมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 0.5 ซม.

จุดที่ 1 แต้มสารละลายกรดแอสปาร์ติก 0.5 %

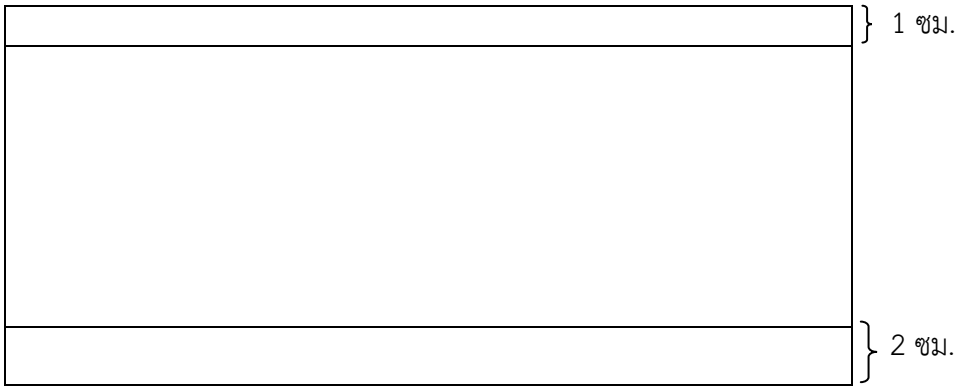
จุดที่ 2 แต้มสารละลายลูซีน 0.5 %

จุดที่ 3 แต้มสารละลายฟีนิลอะลานีน 0.5 %

จุดที่ 4 แต้มสารละลายโพรลีน 0.5 %

จุดที่ 5 แต้มสารละลายกรดอะมิโนผสม

จุดที่ 6 แต้มน้ำปัสสาวะเข้มข้น



3. นำกระดาษกรองมาเย็บชนกันด้านข้างเป็นทรงกระบอก โดยเว้นช่องระหว่างขอบกระดาษเล็กน้อย และให้กระดาษเสมอกัน เทตัวทำละลายผสม ลงในบีกเกอร์หรือถังแก้ว ให้ระดับตัวทำละลายสูงประมาณ 0.5 - 1 ซม. ใช้แผ่นกระจกหรือกระจกนาฬิกาปิดปากบีกเกอร์ เพื่อให้บรรยากาศภายในบีกเกอร์อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย

4. เมื่อรอยแต้มในข้อ 2 แห้งแล้วเปิดกระจกออก ค่อยๆ หยิบกระดาษกรองทรงกระบอกใส่ในบีกเกอร์ ให้ตั้งตรง ใช้กระจกปิดปากบีกเกอร์ (ต้องให้เส้นเริ่มต้นอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย) ทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายซึมผ่านกระดาษกรองขึ้นมาจนถึงขอบกระดาษด้านบน จึงเอากระดาษกรองออก คลี่ออกผึ่งให้แห้ง

5. เมื่อกระดาษแห้งแล้ว นำไปจุ่มหรือพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน ตากให้แห้ง นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จะสังเกตเห็นจุดสีม่วงตรงบริเวณที่มีกรดอะมิโนอยู่ ใช้ดินสอวงจุดเหล่านั้นไว้

6. คำนวณหาค่า R_f ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ค่า R_f ของลูซีน ฟินิลอะลานีน โพรลีน และกรดแอสปาร์ติก ควรเป็น 0.59 0.49 0.23 และ 0.09 ตามลำดับ

7. วิเคราะห์หากรดอะมิโนในกรดอะมิโนผสมจุดที่ 5 โดยเปรียบเทียบค่า R_f จากกรดอะมิโนจุดที่ 1-4 ส่งกระดาษโครมาโตแกรมที่ทดลองได้พร้อมรายงานผลการทดลอง

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 7 เรื่อง การวิเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนเชิงคุณภาพ วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

.....

ผลการทดลองที่ 7.1

ก. ผลการเผาอัลบูมิน

.....

.....

ข. ผลการเผาอัลบูมิน

.....

.....

ค. ผลการวิเคราะห์กำมะถัน

.....

.....

สรุปธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนอัลบูมินคือ.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

ตารางบันทึกการทดลองที่ 7.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ

กรดอะมิโน	**ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (ซม.)**	**ระยะทางที่กรดอะมิโนเคลื่อนที่ (ซม.)**	**ค่า R_f ของกรดอะมิโน**
ลูซีน			
ฟีนิลอะลานีน			
โพรลีน			
กรดแอสปาร์ติก			
สารตัวอย่างผสม จุดที่ 1..... จุดที่ 2..... จุดที่ 3.....			
น้ำปัสสาวะ จุดที่ 1..... จุดที่ 2..... จุดที่ 3..... จุดที่ 4..... จุดที่ 5.....			

สรุปกรดอะมิโนที่มีอยู่ในสารตัวอย่างผสมคือ.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 8
การวิเคราะห์โปรตีนเชิงปริมาณ

การทดลองที่ 8.1 การหาปริมาณโปรตีนในสารละลาย

หลักการ การทดลองหาปริมาณโปรตีนในสารละลายอาจทำได้หลายวิธี แต่ในการทดลองนี้เลือกใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก โดยใช้ปฏิกิริยาไบยูเรต คืออาศัยปฏิกิริยาระหว่างพันธะเปปไทด์กับสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตในด่าง เกิดสารสีม่วงอมคราม ความเข้มของสีขึ้นกับปริมาณพันธะเปปไทด์หรือโปรตีนในสารละลาย จึงหาปริมาณด้วยการวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (โดยใช้เครื่องวัดการดูดแสง) เทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

สารที่ใช้ในการทดลอง

- สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA ความเข้มข้น 0.001 mg/ml)
- สารละลายโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์
- น้ำยาไบยูเรต

วิธีการทดลอง

1. ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐาน น้ำกลั่น และน้ำยาไบยูเรต ลงในหลอดทดลอง 6 หลอด ตามปริมาณในตารางต่อไปนี้ สำหรับหลอดที่ 7, 8 ใส่สารตัวอย่างโปรตีนที่จะวิเคราะห์ 0.5 มล.

หลอด / สาร	1	2	3	4	5	6	7	8
โปรตีนมาตรฐาน (มล.)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	-	-	-
โปรตีนที่วิเคราะห์ (มล.)	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5
น้ำกลั่น (มล.)	1.0	0.8	0.6	0.4	0	0.5	0.5	0.5
ปริมาณน้ำยาไบยูเรต (มล.)	4	4	4	4	4	4	4	4

2. เขย่าสารละลายแต่ละหลอดให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที วัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งจุดศูนย์ ถ้าค่าการดูดแสงที่ได้ในหลอดที่ 7 สูงกว่า 0.8 หรือต่ำกว่า 0.50 ควรใช้โปรตีนตัวอย่างที่วิเคราะห์ให้เจือจางหรือเข้มข้นมากกว่า ตามลำดับ

3. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดแสงที่ 570 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีนมาตรฐานจากหลอดที่ 1-6

4. อ่านปริมาณโปรตีนในหลอดที่ 7, 8 จากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาโปรตีนในสารตัวอย่าง

---

*สารละลายโปรตีนมาตรฐาน : BSA ความเข้มข้น 0.001 mg/ml ถ้าไม่มีโปรตีนบริสุทธิ์ อาจใช้ซีรัมเจือจางแทน (ปกติในซีรัมมีโปรตีนประมาณ 75 มก./มล.)

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 8 เรื่องการวิเคราะห์โปรตีนเชิงปริมาณ วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

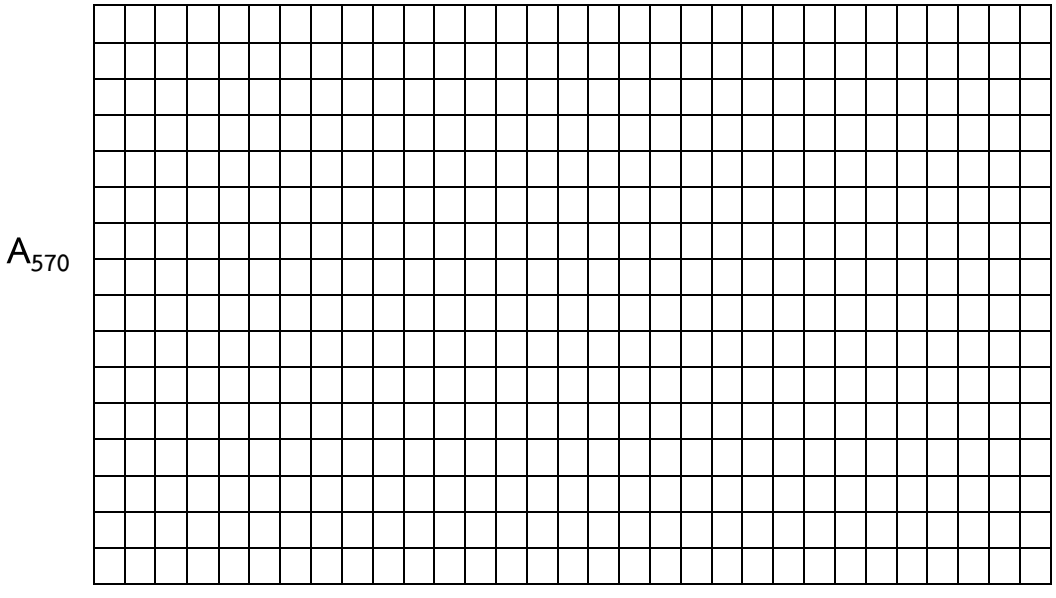
.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 8.1 การหาปริมาณโปรตีนในสารละลาย

ตามปริมาณในตารางต่อไปนี้ สำหรับหลอดที่ 7, 8 ใส่สารตัวอย่างโปรตีนที่จะวิเคราะห์ 0.5 มล.

หลอดที่ / สาร (มล.)	1	2	3	4	5	6	7	8
โปรตีนมาตรฐาน	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-	-
โปรตีนที่วิเคราะห์	-	-	-	-	-	-	0.5	0.5
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0.5	0.5
ปริมาณน้ำยาไบยูเรต	4	4	4	4	4	4	4	4
A_{570}								
ปริมาณโปรตีน (มก.%)								

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{570} และปริมาณโปรตีน (มก.%)



การคำนวณ

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

บทปฏิบัติการที่ 9
การทดสอบเอนไซม์จากแหล่งต่าง ๆ

การทดลองที่ 9.1 การทดสอบเอนไซม์ยูรีเอส (Urease)

หลักการ เอนไซม์ยูรีเอสพบมากในถั่วบางชนิด เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของยูเรียด้วยน้ำให้แอมโมเนียกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

$$NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Urease}} 2NH_3 + CO_2$$

เมื่อแอมโมเนียละลายในน้ำจะแตกตัวให้ NH^{4+} กับ OH^- ซึ่งทำให้สารละลายเป็นด่าง ในการทดลองนี้จึงทดสอบเอนไซม์ยูรีเอสในเมล็ดถั่วต่าง ๆ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นตัวบ่ง pH เพื่อสังเกตดูการเพิ่ม pH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์

สารที่ใช้ในการทดลอง

- เมล็ดถั่วสดๆ ควรใช้เมล็ดถั่วเขียว, ถั่วเหลือง และเมล็ดแตงโมสด
- สารละลายยูเรีย 1%
- สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1%

วิธีการทดลอง

1. นำเมล็ดถั่วแต่ละชนิดประมาณ 2 กรัม มาบดให้ละเอียดในที่บดยา แล้วเทลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นลงไป 8 มล. เขย่าแรง ๆ 1-2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที เพื่อให้เศษถั่วนอนก้น เก็บสารละลายน้ำถั่วสำหรับใช้เป็นสารละลายเอนไซม์

สารละลายฟินอล์ฟทาลีน 1 % : ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 100 มล. แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มล. คนให้ทั่ว ถ้ามีตะกอนกรองด้วยกระดาษกรอง

2. เตรียมหลอดทดลองสองหลอดสำหรับน้ำถั่วแต่ละชนิดบรรจุสารละลายดังนี้

หลอดที่ / สาร (มล.)		1	2
ยูเรีย	(มล.)	2	-
น้ำกลั่น	(มล.)	-	2
ฟีนอล์ฟทาลีน	(หยด)	3	3
น้ำถั่ว	(หยด)	5	5

เติมน้ำถั่วเป็นอันดับสุดท้ายแล้วเขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเปรียบเทียบสีในหลอดทดลองเป็นคู่ ๆ สำหรับถั่วเขียว, ถั่วเหลือง, และเมล็ดแตงโมสด

3. นำน้ำถั่วแต่ละชนิดประมาณ 10-15 หยด ไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาทีปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปทดสอบเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2

การทดลองที่ 9.2 การทดสอบเอนไซม์โปรตีเอส (Protease)

หลักการ เอนไซม์โปรตีนเอสสามารถย่อยโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สั้น ๆ ตามสมการ

$$\text{--NH-CHR}_m\text{-CO-NH-CHR}_n\text{-CO--} + H_2O \underset{}{\overset{\text{pH 5-8}}{\rightleftharpoons}} \begin{matrix}\text{--NH-CHR}_m\text{-COO}^- \\ + \\ {}^+\text{NH}_3\text{-CHR}_n\text{-CO--}\end{matrix}$$

ตัวอย่างของเอนไซม์โปรตีนเอสในธรรมชาติ ได้แก่ เอนไซม์ papain และ เอนไซม์ chymopapain ในยางมะละกอ นอกจากนั้นในก้านและผลสับปะรดก็มีเอนไซม์ bromelain สำหรับในยาเม็ดช่วยย่อยอาหารส่วนมากจะมีเอนไซม์โปรตีนเอสชนิด papain หรือ pepsin

เอนไซม์โปรตีนเอสมีความสามารถในการทำให้นมเกาะเป็นก้อน โปรตีนในนมที่สำคัญในปฏิกิริยานี้คือ casein ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในสภาพเป็นไมเซลล์ เมื่อพันธะเปปไทด์ในโปรตีนนี้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ไมเซลล์จะสลายตัวทำให้โมเลกุลของโปรตีนเรียงตัวกันใหม่ในลักษณะที่มีอนุภาคใหญ่ขึ้น แล้วรวมตัวเกาะกันตกเป็นตะกอนลงมา

สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต 0.3 โมลาร์ pH 5.5: ผสมกรดอะซิติกเข้มข้น 16.7 มล. กับน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH.ให้ได้ 5.5 โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทีละหยดขณะที่คนอยู่เรื่อย ๆ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

สารที่ใช้ในการทดลอง

- เนื้อสับปะรดฉ่ำ ๆ ประมาณ 50 กรัม
- นมสด
- สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซีเตต 0.3 โมลาร์ pH 5.5* (0.3 M sodium acetate buffer, pH 5.5)
- สารละลายซิสเตอีน 0.1 โมลาร์ (0.1 M cysteine (NH_2-CH-(CH_2-SH)-COOH)
- สารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ 0.01 โมลาร์ (0.01 M $HgCl_2$)
- กรดไอโอโดอะเซติก 0.05 โมลาร์ (0.05 M Iodoacetic acid (I-CH_2-COOH)
- สารละลาย EDTA 0.1 โมลาร์ (0.1 M ethylene diaminetetraacetic acid)

วิธีการทดลอง

1. นำเนื้อสับปะรดฉ่ำ ๆ ประมาณ 50 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ห่อด้วยผ้ากรองแล้วบีบเอาน้ำออกใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เจือจางเอนไซม์จากน้ำสับปะรดที่หลาย ๆ ความเข้มข้น โดยปิเปตบัฟเฟอร์ 2 มล. ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด เติมสารละลายเอนไซม์ 2 มล. จากหลอดแรกลงในหลอดที่สองทำเช่นนี้ต่อไปจนถึงหลอดที่ 5 จะได้สารละลายเอนไซม์ในห้าหลอดถูกเจือจาง 1:2, 1:4 , 1:8, 1:16 และ 1:32 เท่า

3. ตวงนมสด 5 มล. ลงในหลอดทดลองทั้งห้าหลอด เติมสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันลงไป 0.5 มล. ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สำรวจดูว่านมในแต่ละหลอดตกตะกอนบ้างหรือไม่ โดยค่อย ๆ เอียงหลอดทดลองสังเกตตะกอน

4. เลือกหลอดทดลองที่มีปริมาณเอนไซม์น้อยที่สุดจากน้ำสับปะรด ที่ยังสามารถทำให้นมตกตะกอน เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางเท่าหลอดนี้อีก 10 มล. เพื่อศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ และเตรียมหลอดทดลองอีก 5 หลอด บรรจุด้วยสารละลายดังต่อไปนี้

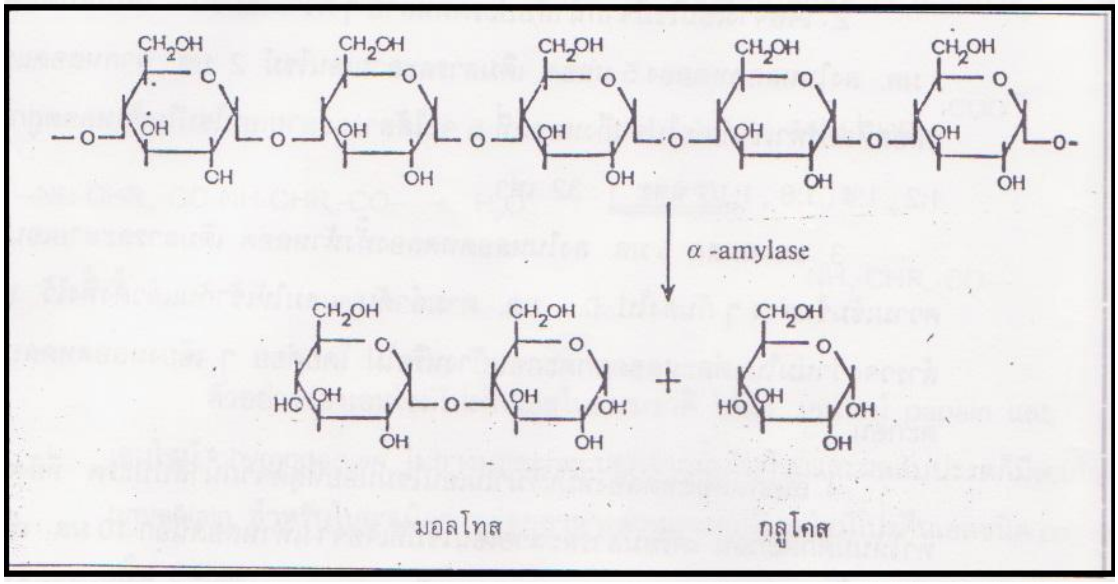
หลอดที่	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
เอนไซม์ (มล.)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
บัฟเฟอร์ (มล.)	0.5	0.4	0.4	-	-
กรดไอโอโดอะเซติก (มล.)	-	0.2	-	0.2	-
HgCl2 (มล.)	-	-	0.2	-	0.2
← ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที →					
EDTA (มล.)	-	-	-	0.2	0.2
Cysteine (มล.)	-	-	-	0.2	0.2
← ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที →					

ควรเขย่าให้สารละลายผสมกันหลังจากเติมสารแต่ละชนิด เติมนมสด 5 มล. ลงไปในแต่ละหลอด เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วจึงสังเกตผล

การทดลองที่ 9.3 การทดสอบเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส (α – amylase)

หลักการ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากน้ำลาย สามารถย่อยพันธะประเภท α-(1,4) ในแป้งได้ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นมอลโทส และกลูโคส ดังรูปที่ 9.1

หมู่รีดิวส์ของมอลโทสและกลูโคสสามารถทำปฏิกิริยากับ 3.5 - ไดไนโตรซาลิไซเลตให้สารที่มีสีน้ำตาลแดง ซึ่งจะดูดแสงที่ 470 นาโนเมตร



รูปที่ 9.1 การทำงานของไซม์แอลฟาอะไมเลส

สารที่ใช้ในการทดลอง

- น้ำลาย
- สารละลายแป้งมัน 2%
- สารละลาย 3.5 - ไดไนโตรซาลิไซเลต
- 0.02 M sodium phosphaste buffer
- 0.01 M NaCl , pH 6.8***

วิธีการทดลอง

1. ล้างปากให้สะอาดเก็บน้ำลายในบีกเกอร์ที่แห้ง ปิเปตน้ำลาย 1.0 มล. ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9.0 มล.

2. ปิเปตสารละลาย 3.5- ไดไนโตรซาลิไซเลต ลงไปในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 0.5 มล.

3. เตรียมหลอดทดลองอีก 5 หลอด บรรจุสารละลายดังนี้

หลอดที่	1	2	3	4	5
แป้งมัน (มล.)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
บัฟเฟอร์ (มล.)	1.0	0.75	0.5	0.25	-
เอนไซม์เจือจาง (มล.)	-	0.25	0.5	0.75	1.0

เติมเอนไซม์เป็นอันดับสุดท้าย ผสมให้เข้ากันแล้วเริ่มจับเวลาทันที (ควรใส่เอนไซม์ในแต่ละหลอดในระยะเวลาห่างกัน 1 นาที จะทำการทดลองได้ทัน)

4. เมื่อครบ 5 นาที ปิเปตสารในแต่ละหลอด 0.5 มล. ลงในหลอดที่ใส่ 3,5 –ไดไนโตรซาลิไซเลต ที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ตามลำดับ นำแต่ละหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปอีกหลอดละ 4 มล. วัดค่าการดูดแสงที่ 470 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งจุดศูนย์ (ค่าการดูดแสงควรอยู่ระหว่าง 0.3-0.6 หน่วย ถ้าทุกหลอดให้ค่าการดูดแสงสูงหรือต่ำกว่านี้ ต้องเตรียมเอนไซม์ใหม่ให้มีความเข้มข้นน้อยลงหรือเพิ่มขึ้นตามลำดับ)

---

*สารละลายแป้งมัน 2% ตวง 0.02 M Sodium phosphate – 0.01 M NaCl, pH 6.8 จำนวน 330 มล. เติมแป้งมัน 10 กรัม แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด (คนเรื่อย ๆ) เมื่ออุณหภูมิ 80°C นำมาเติมบัฟเฟอร์ อีก 170 มล. (ต้องเตรียมใหม่ ๆ ในวันทดลอง)

** สารละลาย 3,5 ไดไนโตรซิลิไซเลต ละลายกรด 3,5ไดไนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ 200 มล. ละลายโซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรต 300 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล. แล้วค่อย ๆ เติมสารละลายนี้ลงในสารละลาย 3,5ไดไนโตรซาลิไซเลตให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ถ้ามีตะกอนให้กรอง

***0.02 M Sodium Phosphate buffer -0.01 M NaCl, pH 6.8: ผสม 0.2 M Sodium phosphate buffer, ph 6.8 จำนวน 100 มล. กับน้ำกลั่น 850 มล. ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.59 กรัมลงไป แล้วทำปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 1 ลิตร

รายงานผลการทดลอง

ปฏิบัติการที่ 9 เรื่องการทดสอบเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ วันที่ทำการทดลอง.....

ชื่อ.....รหัส.....สาขาวิชา.....

ชื่อผู้ร่วมปฏิบัติการ.....รหัส.....กลุ่มปฏิบัติการที่.....

จุดมุ่งหมายการทดลอง .....

.....

.....

ผลการทดลองที่ 9.1 การทดสอบเอนไซม์ยูรีเอส

สารตัวอย่าง	หลอดที่ 1(มียูเรีย)	หลอดที่ 2(ไม่มียูเรีย)
น้ำถั่วเขียว (ไม่ต้ม)		
น้ำถั่วเขียว (ต้ม)		
น้ำถั่วเหลือง (ไม่ต้ม)		
น้ำถั่วเหลือง (ต้ม)		
น้ำเมล็ดแตงโม (ไม่ต้ม)		
น้ำเมล็ดแตงโม (ต้ม)		

หมายเหตุ ให้บันทึกผลการทดลองโดยใช้เครื่องหมาย+แทนผลการทดลองที่เป็นบวก และใช้-แทนผลการทดลองที่เป็นลบ

ผลการทดลองที่ 9.2 การทดสอบเอนไซม์โปรตีเอส

สารละลายเอนไซม์เจือจาง	เอนไซม์จากสับปะรด
1 : 2	
1 : 4	
1 : 8	
1 : 16	
1 : 32	

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองด้วยเครื่องหมาย +, ++, +++, ...

ศึกษาการยังยั้งเอนไซม์ Bromelain จากสับปะรด

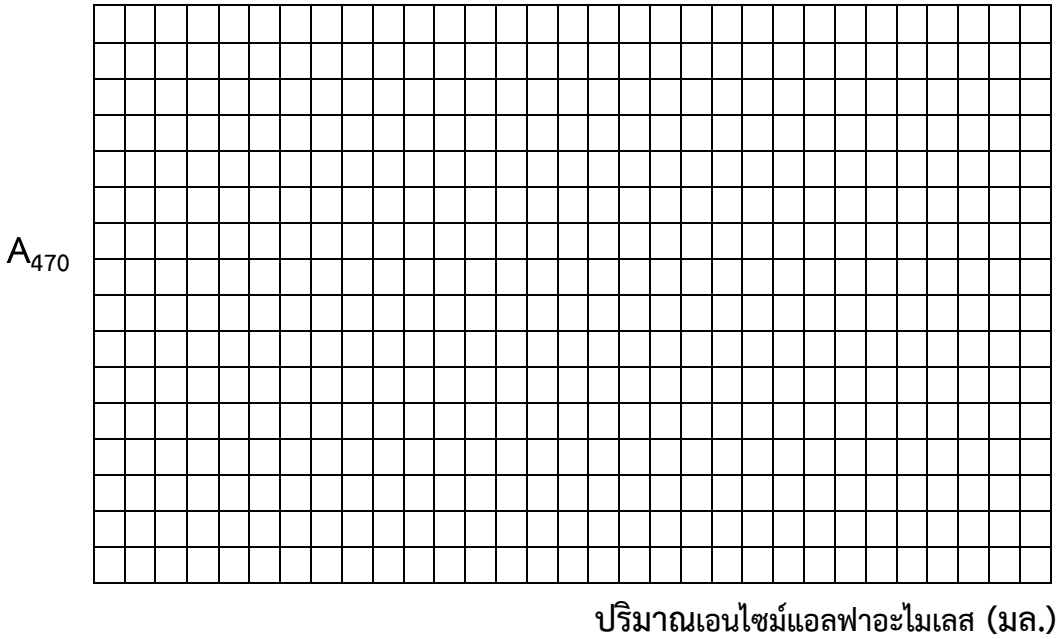
หลอดที่	ปริมาณตะกอน
1. Control 2. เติม Iodoacetic acid 3. เติม $HgCl_2$ 4. เติม Iodoacetic acid + EDTA + Cysteine 5. เติม $HgCl_2$ + EDTA + Cysteine	

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองด้วยเครื่องหมาย +, ++, +++, ...

ผลการทดลองที่ 9.3 การทดสอบเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

หลอดที่	1	2	3	4	5
เอนไซม์เจือจาง (มล.)	-	0.25	0.50	0.75	1.0
A_{470}					

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{470} และปริมาณเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส



สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....