บทที่ 1
คาร์โบไฮเดรท

คาร์โบไฮเดรทจัดเป็นสารประกอบจำพวก polyhydroxy aldehydes หรือ polyhydroxy ketones แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ โมโนแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์ และโพลี-แซคคาไรด์

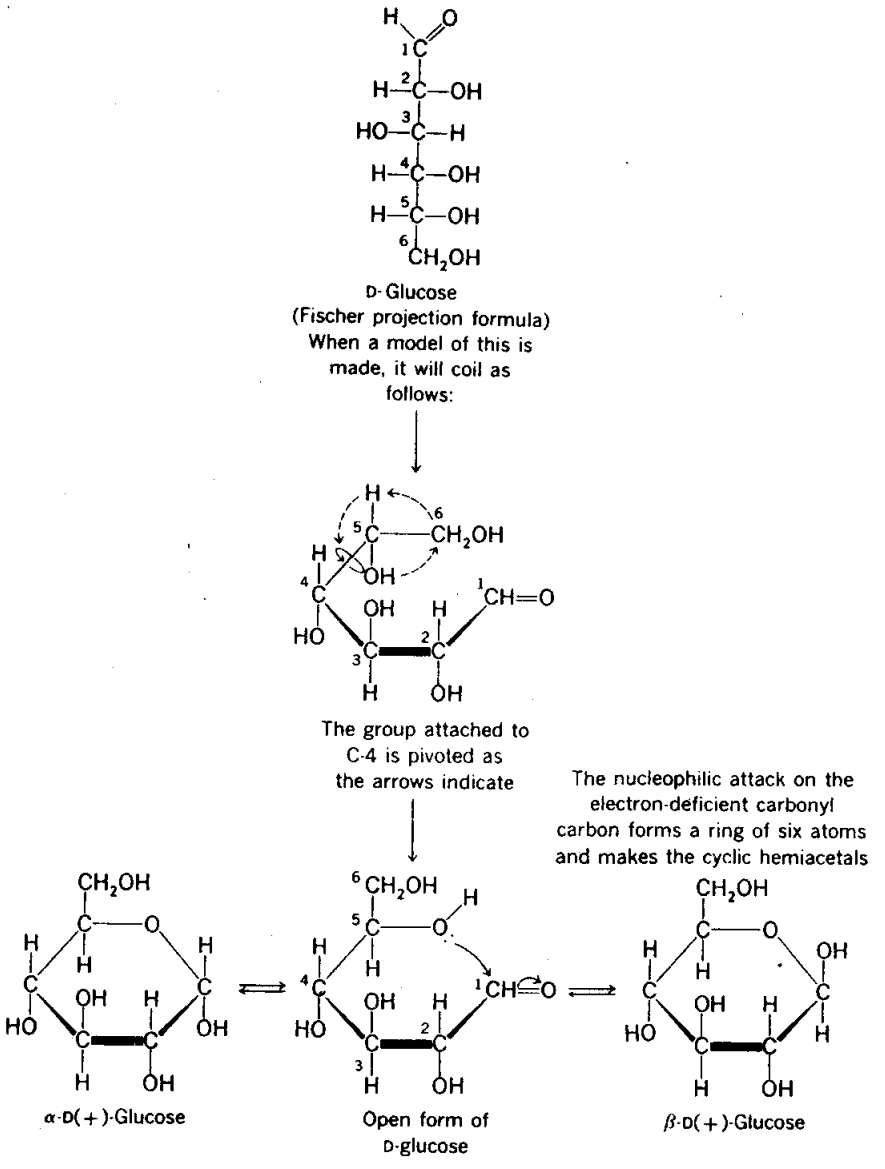
1. **โมโนแซคคาไรด์** เป็นโมเลกุลที่เล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรท ไม่สามารถจะถูกย่อยสลายต่อไปได้ มีโครงสร้างทั่ว ๆ ไป คือ $(CH_2O)_n$ อาจมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็น 3, 4, 5 หรือ 6 ก็ได้ การเรียกชื่อมักเรียกตามจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นไตรโอส (triose) เตทโตรส (tetrose) เปนโตส (pentose) เฮ็กโซส (hexose) ตามลำดับ โมโนแซคคาไรด์ที่มีหมู่อัลดีไฮด์จัดเป็นอัลโดส (aldose) ถ้ามีหมู่คีโตนจัดเป็นคีโตส (ketose) โมโนแซคคาไรด์ที่มีความสำคัญที่สุดคือเฮ็กโซส ตัวอย่างเช่น กลูโคส (glucose) ซึ่งเป็นอัลโดส, ฟรุคโตส (fructose) ซึ่งเป็นคีโตส

กลูโคสเมื่อเป็นสารละลายจะมีโครงสร้างเป็นแบบสายโซ่เปิด (open-chain) อยู่ในสมดุลย์กับโครงสร้างชนิดเป็นวง (ring structure) ซึ่งมี 2 แบบคือ แบบอัลฟาและแบบบีต้า (ดูรูปที่ 1.1)

2. **โอลิโกแซคคาไรด์** ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 2-10 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic bond) โอลิโกแซคคาไรด์ที่สำคัญคือ พวกไดแซคคาไรด์ซึ่งประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ 2 หน่วย ที่พบทั่ว ๆ ไป คือ ซูโครส (sucrose) แลคโตส (lactose) และมาลโตส (maltose) โอลิโกแซคคาไรด์เมื่อถูกย่อยสลายจะให้หน่วยย่อย ๆ ของโมโนแซคคาไรด์

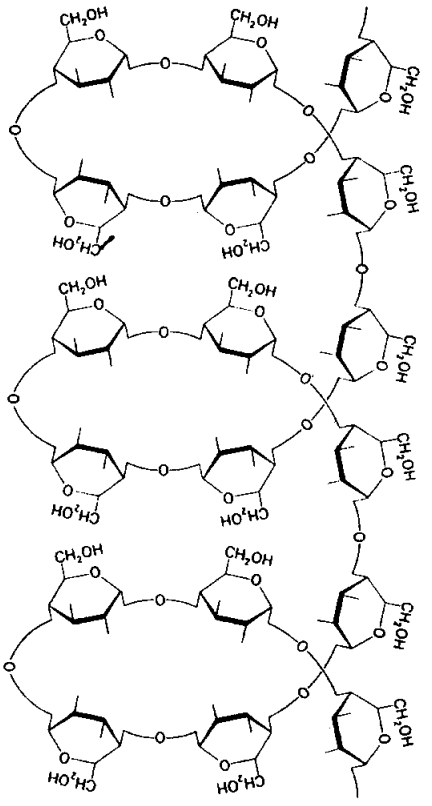
3. **โพลีแซคคาไรด์** ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์หลาย ๆ หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิค ถูกย่อยสลายได้ด้วยกรดหรือเอ็นไซม์บางชนิด โพลีแซคคาไรด์ที่สำคัญได้แก่ แป้ง (starch), ไกลโคเจน (glycogen) และเซลลูโลส (cellulose)

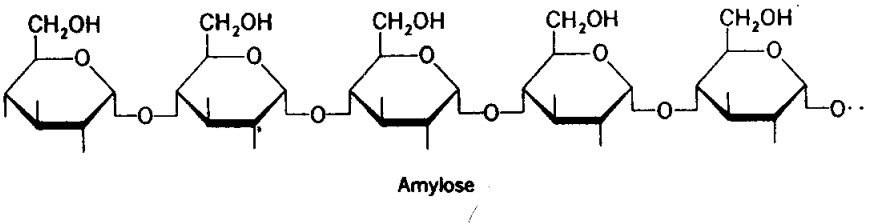
แป้ง เป็นคาร์โบไฮเดรทที่สะสมในพวกพืชชั้นสูง ประกอบด้วยกลูโคสหลาย ๆ หน่วยเกาะกันแบบ α-(1, 4) เป็นสายยาว มี amylose และ amylopectin เป็นองค์ประกอบ พันธะระหว่างหน่วยของกลูโคสใน amylose เป็นแบบ α-(1, 4) ส่วนใน amylopectin นั้นมีทั้งพันธะแบบ α-(1, 4) และ α-(1, 6) มีการแตกกิ่งก้านสาขาและน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า amylose (ดูรูปที่ 1.2 และ 1.3)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างกลูโคสแบบสายโซ่เปิดและโครงสร้างชนิดเป็นวง

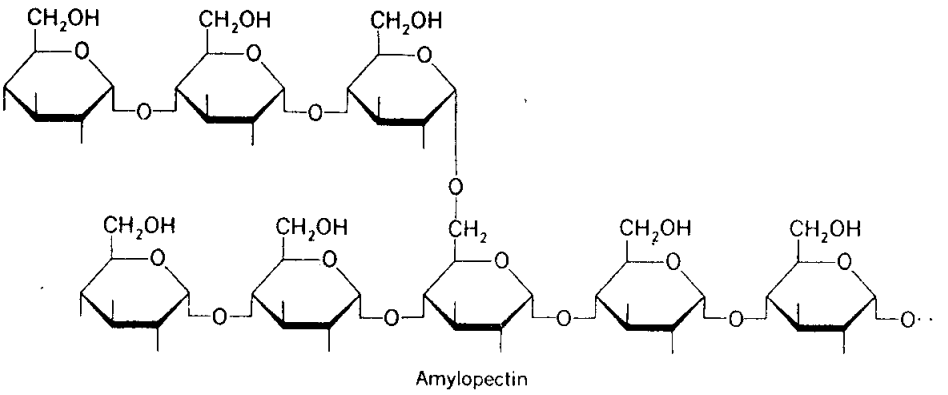
ไกลโคเจน เป็นคาร์โบไฮเดรทที่สะสมมากในเนื้อเยื่อของคนและสัตว์ ลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลคล้าย amylopectin แต่มีการแตกสาขามากกว่าและโมเลกุลใหญ่กว่า amylopectin

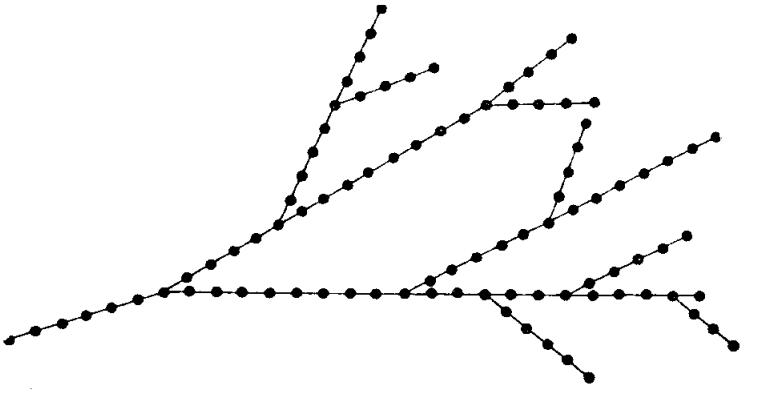




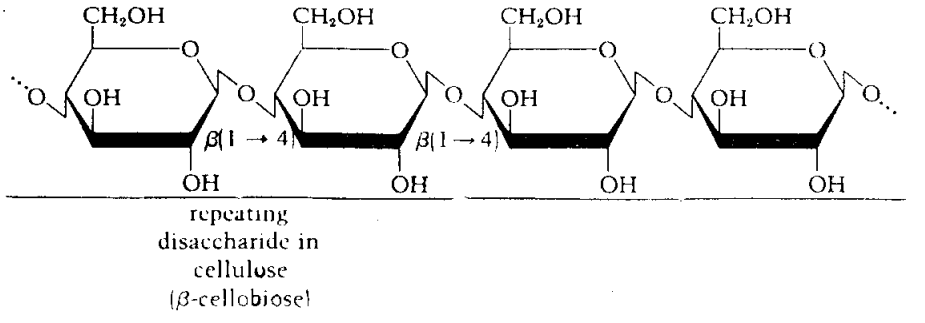
รูปที่ 1.2 โครงสร้าง amylose แบบเส้นตรงและแบบเป็นเกลียว

เซลลูโลส เป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสที่ต่อกันแบบ β (1, 4) พันธะแบบนี้ถูกย่อยสลายได้ด้วยเอ็นไซม์ cellulase ค่อนข้างจะทนทานต่อการย่อยด้วยกรดธรรมดา ผลจากการย่อยสลายจะได้ไดแซคคาไรด์ที่ชื่อ cellobiose (ดูรูปที่ 1.4)



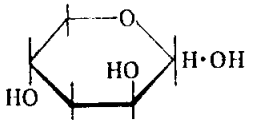
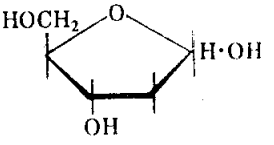
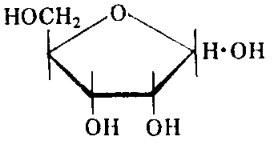
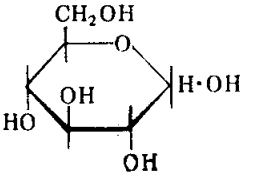
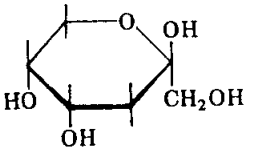
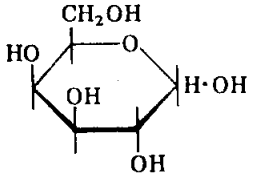


รูปที่ 1.3 โครงสร้าง amylopectin, โพลีเมอร์ของกลูโคสซึ่งมีการแตกกิ่งก้านสาขา



รูปที่ 1.4 โครงสร้างเซลลูโลส

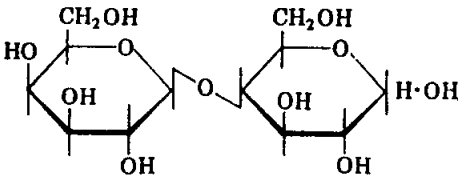
ตารางที่ 1.1 ธรรมชาติ แหล่งที่มาและหน้าที่ของน้ำตาลบางชนิด

สูตรโครงสร้างของน้ำตาล	แหล่งที่มาและหน้าที่
เพนโตส	
L-Arabinose 	อยู่ในรูปเพนโตซานซึ่งพบได้ในยางไม้ และอยู่ในรูปไกลโคไซด์ของพวก tubercle bacilli แบคทีเรียสามารถหมัก (ferment) น้ำตาลนี้ได้ หน้าที่ของน้ำตาลชนิดนี้ในคนเรายังไม่ทราบแน่นอน
2-Deoxy-D-ribose 	เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) ซึ่งเป็นสารถ่ายทอดกรรมพันธ์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด
D-Ribose 	เป็นส่วนประกอบที่จำเป็นของโครงสร้างอาร์-เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังพบได้ในโมเลกุลของ ATP, FAD, NAD^+ และ $NADP^+$
เฮ็กโซส	
D-Glucose 	เป็นน้ำตาลที่พบมากที่สุด ถูกลำเลียงและขนส่งไปตามกระแสเลือดและเกิดการออกซิไดซ์ภายในเซลล์ เพื่อให้ได้พลังงานออกมา
D-Fructose  (β-form)	เป็นน้ำตาลที่หวานที่สุด พบในผลไม้ น้ำผึ้งและในน้ำอสุจิ (seminal fluid)
D-Galactose 	พบมากในไกลโคลิปิดของเนื้อเยื่อประสาทและที่เยื่อหุ้มเซลล์ของคลอโรพลาสต์ ถ้าเป็นกาแลค-โตซามีนจะพบมากในเอ็นและกระดูกอ่อน

สูตรโครงสร้างของน้ำตาล	แหล่งที่มาและหน้าที่

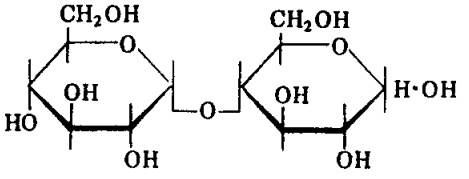
ไดแซคคาไรด์

Lactose
(β-D-galactosyl-1,4-D-glucose)



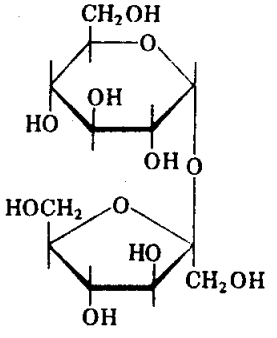
พบมากในน้ำนมของพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และอาจพบได้ในปัสสาวะของสตรีมีครรภ์

Maltose
(α-D-glucosyl-1,4-D-glucose)



เป็นผลิตผลจากการย่อยแป้งด้วยเอ็นไซม์ amylase พบได้ในข้าวมอลท์และเมล็ดพืชที่กำลังเจริญเติบโต

Sucrose
(α-D-glucosyl-β-1,2-D-fructose)



เป็นน้ำตาลที่ไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ พบมากในน้ำอ้อยและหัวผักกาด (beet)

ตารางที่ 1.2 โฮโมโพลีแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ชนิดเดียวกันทั้งหมด

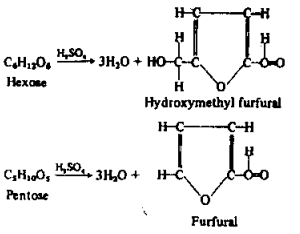
ชนิด	โครงสร้าง	ที่มาและหน้าที่
โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรทสะสม (storage polysaccharide)		
แป้ง (α-D-Glucose)	ประกอบด้วย amylose และ amylopectin ด้วยอัตราส่วน 1 : 4	เป็นคาร์โบไฮเดรท สะสมในพวกพืชเช่น มันฝรั่ง, ข้าวและธัญพืช
amylose (α-D-Glucose)	เป็นเส้นยาวที่ต่อกันแบบ α1-4 น้ำหนักโมเลกุล ~50,000	มีอยู่ในแป้งประมาณ 20%
amylopectin (α-D-Glucose)	มีทั้งพันธะแบบ α1-4 และ α1-6 น้ำหนักโมเลกุล 0.2×10^6-1.0×10^6	พบในแป้งประมาณ 80%
ไกลโคเจน α-D-Glucose)	รูปร่างมีกิ่งก้านเหมือนต้นไม้ คล้ายกับ amylopectin แต่แตกแขนงมากกว่า น้ำหนักโมเลกุล 1×10^6-3×10^6	เป็นคาร์โบไฮเดรท สะสมในพวกสัตว์ พบมากที่ตับและกล้ามเนื้อ
อินนุลิน (β-D-Fructose)	ฟรุคโตสต่อเชื่อมกันแบบ β 1-2 น้ำหนักโมเลกุล ~ 5,000	เป็นคาร์โบไฮเดรท สะสมในพืช เช่น ในดอกรักเร่ หัว artichoke
โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรทโครงสร้าง (structural polysaccharide)		
เซลลูโลส (α-D-Glucose)	เป็นเส้นยาวต่อแบบ β 1-4	พบตามผนังเซลล์ของพืช, แบคทีเรียและสาหร่ายบางชนิด
chitin (β D-N Acetyl glucosamine)	เป็นเส้นยาวต่อแบบ β 1-4	พบตามโครงร่างภายนอก (exoskeleton) ของพวกแมลง และของพวก crustacea เช่น ปูและกุ้ง

ส่วน heteropolysaccharide ประกอบด้วยโมโนแซคคาร์ไรด์สองชนิดหรือมากกว่าสอง และมักจะมีโปรตีนรวมอยู่ด้วย แต่จะไม่ขอกล่าวไว้ในที่นี้

คุณสมบัติทางเคมีของคาร์โบไฮเดรท

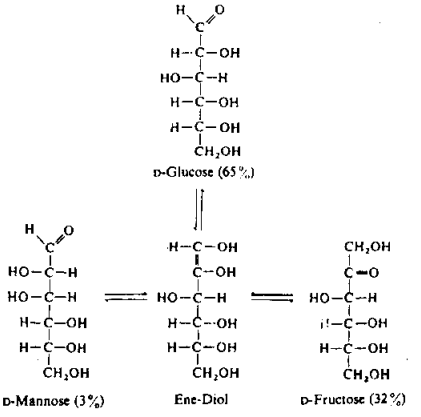
1. เมื่อคาร์โบไฮเดรทอยู่ในสารละลายของกรดเข้มข้น

กรดเข้มข้นจะสามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิคให้แตกออก ทำให้โมเลกุลของคาร์โบไฮเดรทสลายกลายเป็นโมโนแซคคาไรด์ และจากนั้นก็จะดึงน้ำออกจากโมเลกุลของโมโนแซคคาไรด์ให้สาร furfural หรืออนุพันธ์ของ furfural



2. เมื่อคาร์โบไฮเดรทอยู่ในสารละลายของด่างเจือจาง

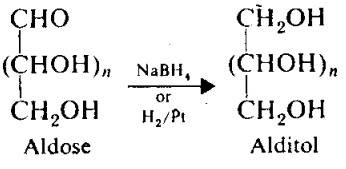
น้ำตาลกลูโคสในสารละลายด่างเจือจาง จะเกิดการจัดตัวรอบคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 และที่ 2 ใหม่ ให้น้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลแมนโนสโดยผ่านตัวกลาง ene-diol น้ำตาลทั้ง 3 ตัวในสารละลายด่างนี้จะอยู่ในสภาวะที่สมดุลย์กัน



3. คุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์

น้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์หรือหมู่คีโตนที่เป็นอิสระจะมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ไอออนของ Cu^{+2}, Bi^{+2}, Ag^{+1}, $Fe(CN)_6^{-3}$ ตัวอย่างเช่นน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส มาลโตส แมนโนส ฯลฯ เป็นต้น แต่น้ำตาลซูโครสหรือ methyl glycoside ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกลูโคสจะไม่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ เพราะที่คาร์บอนอะตอมที่ 1 ไม่มีหมู่อัลดีไฮด์อิสระ

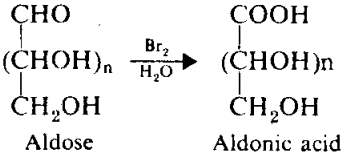
4. การรีดัคชั่นที่หมู่อัลดีไฮด์



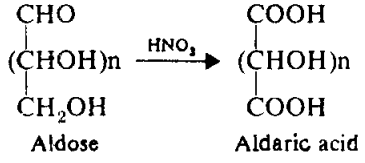
อาจจะใช้สาร Sodium borohydride ($NaBH_4$) หรือ H_2/Pt ในการรีดิวซ์หมู่อัลดีไฮด์ให้เป็นอัลกอฮอลล์เช่น กลูโคสหรือแมนโนสถ้าถูกรีดิวซ์จะให้น้ำตาลอัลกอฮอลล์ซอร์บิทอล (Sorbitol) และแมนนิทอล (Mannitol) ตามลำดับ หรือกลีเซอราลดีไฮด์ (glyceraldehyde) ถูกรีดิวซ์เป็นกลีเซอรอล (glycerol) เป็นต้น

5. การเกิดออกซิเดชั่นโดยใช้สารออกซิไดซิ่ง

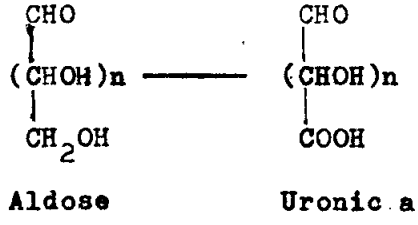
น้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ได้สารต่างกันออกไปถ้าใช้สารออกซิไดซิ่งต่าง ๆ กันเช่นถ้าใช้ Cu^{+2} หรือ Ag^{+1} ดังในข้อ 3. ซึ่งเป็นสารออกซิไดซิ่งอย่างอ่อน ที่ pH เป็นกลางหมู่อัลดีไฮด์เท่านั้นที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลิค สารที่ได้เรียกว่า aldonic acid น้ำโบรมีนหรือเอ็นไซม์ก็ให้ผลเช่นเดียวกันนี้



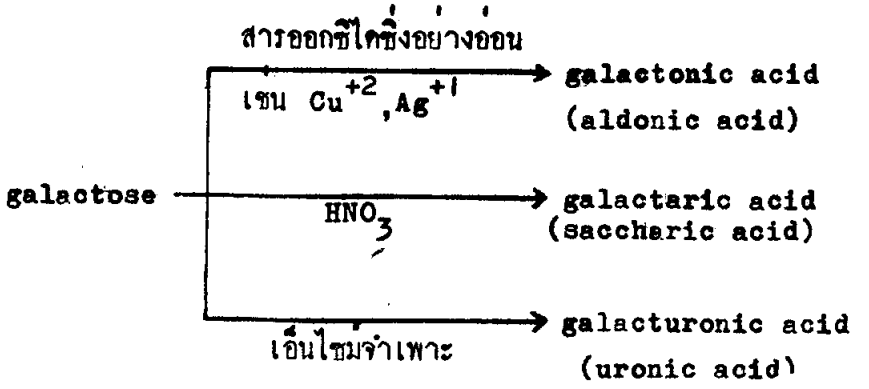
ถ้าใช้สารออกซิไดซิ่งที่แรงขึ้นไปเป็น HNO_3 ทั้งหมู่อัลดีไฮด์และหมู่อัลกอฮอลล์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 จะถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลิค สารที่ได้เรียก aldaric acid (ชื่อเดิมคือ saccharic acid หรือ glycaric acid) ซึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลิค 2 หมู่ภายในโมเลกุลนั้น ๆ

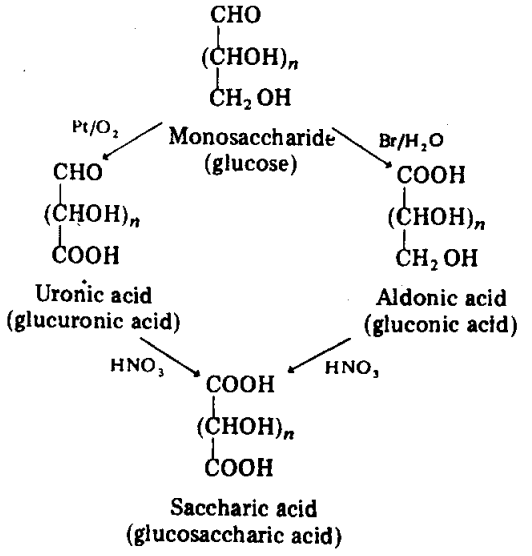


ถ้าใช้เอ็นไซม์ที่จำเพาะในการออกซิไดซ์เฉพาะหมู่ 1-อัลกอฮอลล์ (primary alcohol) จะให้สาร uronic acid

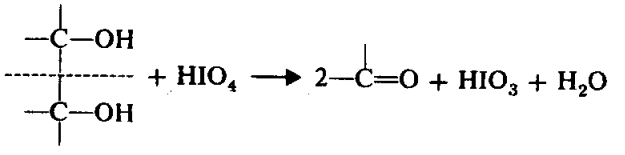


เท่าที่กล่าวมาจะเห็นได้ชัดจากการเปลี่ยนแปลงของกาแลคโตสและกลูโคส

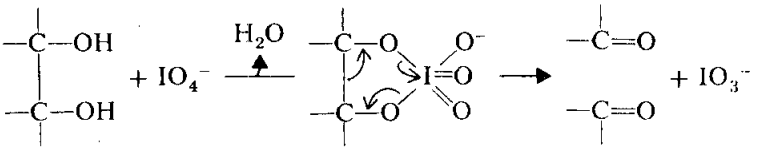




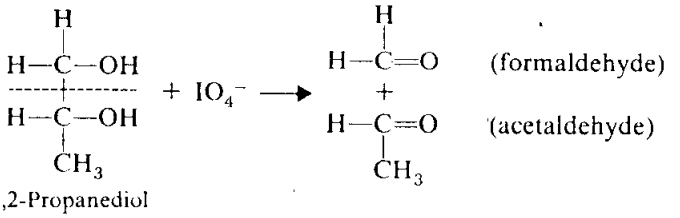
สารออกซิไดซิ่งอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากเกี่ยวกับการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรทคือ periodic acid, HIO_4 สารนี้จะตัดพันธะที่เชื่อมระหว่างคาร์บอนอะตอมของสารพวก polyhydroxy เมื่อคาร์บอนอะตอมเหล่านั้นมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ใกล้กัน ให้ผลิตผลเป็นสารประกอบคาร์บอนิล เช่น อัลดีไฮด์ คีโตนหรือกรด



กลไกการเกิดที่ควรจะเป็น

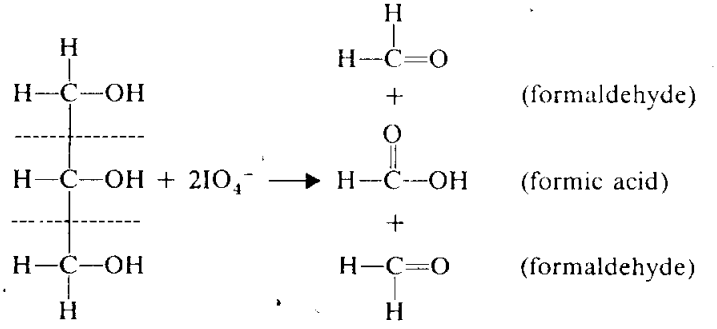


ตัวอย่างเช่น

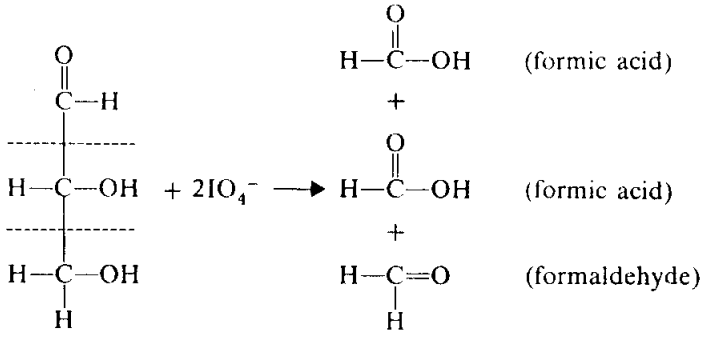


1,2-Propanediol

ถ้ามีหมู่ —CHOH อยู่ติดต่อกันตั้งแต่ 3 หมู่ขึ้นไป หมู่ —CHOH ตรงกลางจะให้ผลิตผลเป็น formic acid

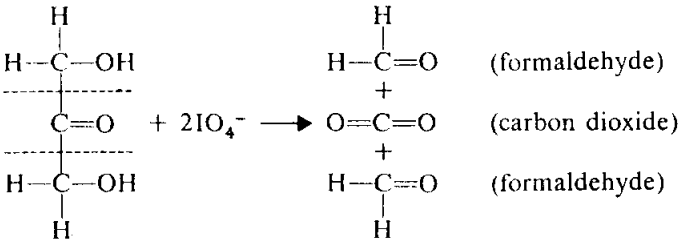


การออกซิไดซ์คงยังเกิดขึ้นได้หากว่าหมู่ OH อยู่ใกล้กับหมู่คาร์บอนิลของอัลดีไฮด์หรือคีโตน

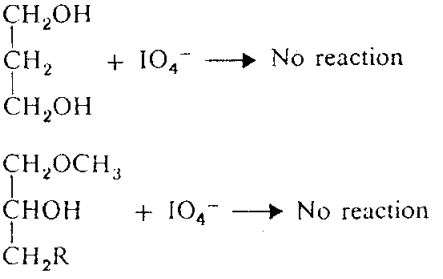


Glyceraldehyde

ถ้าเป็น dihydroxyacetone จะให้ผลิตผลเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย

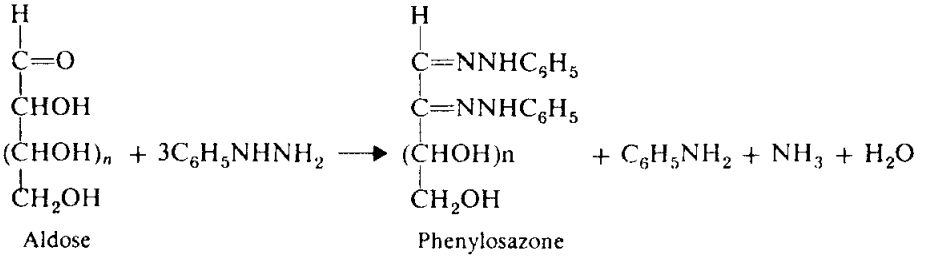


Periodic acid จะไม่ทำปฏิกริยากับสารที่หมู่ OH อยู่แยกห่างจากกันโดยมีหมู่ $-CH_2$ คั่นกลางหรือสารที่มีหมู่ OH อยู่ใกล้กับหมู่อีเธอร์

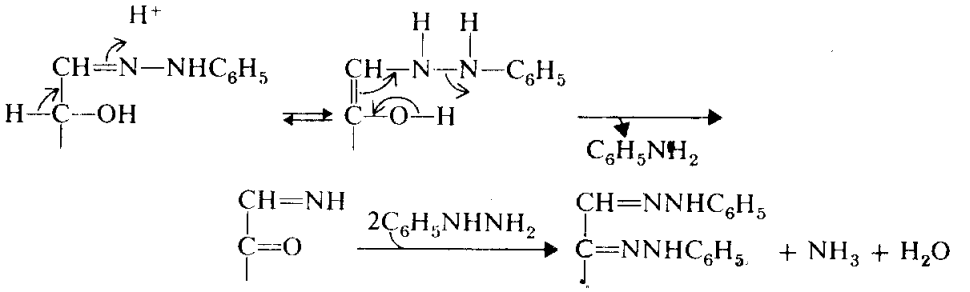


6. ปฏิกริยาการเกิดโอซาโซน (Osazone)

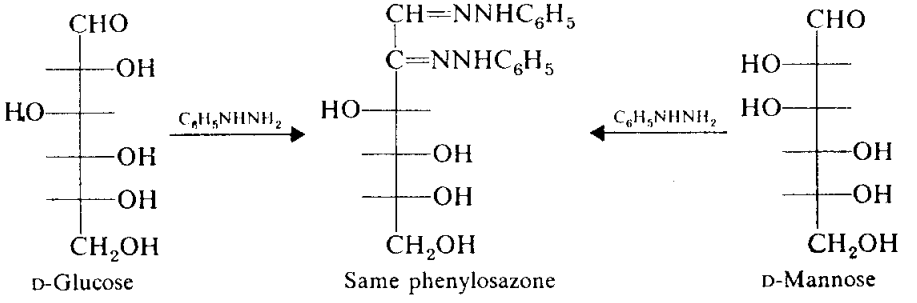
หมู่อัลดีไฮด์ของอัลโดสจะทำปฏิกริยากับ hydroxylamine ให้ผลิตผลอ๊อกไซม์ (oxime) และทำปฏิกริยากับ phenylhydrazine ให้ผลิตผลเป็นโอซาโซน



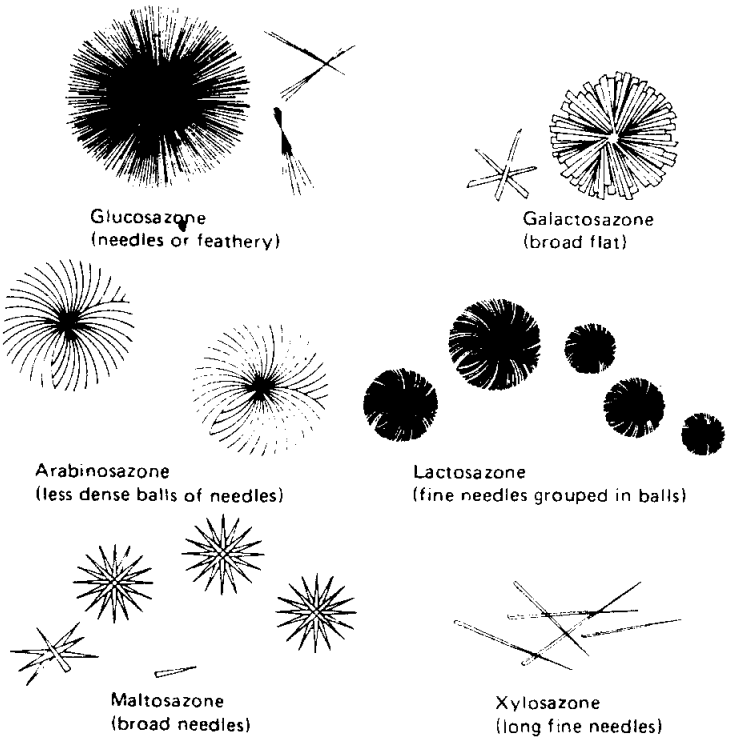
กลไกการเกิดโอซาโซนไม่เป็นที่แน่นอนนัก แต่คาดว่าน่าจะขึ้นอยู่กับหมู่ $\geq C = N-$ ซึ่งคุณสมบัติคล้ายหมู่ $\geq C = O$ มาก และต้องใช้ phenylhydrazine ถึงสามโมล



น้ำตาลต่าง ๆ ให้ผลึกโอซาโซนที่มีลักษณะไม่เหมือนกัน และใช้เวลาในการเกิดผลึกไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาล ทำให้มีประโยชน์แก่การวิเคราะห์น้ำตาลมาก ผลึกโอซาโซนของกลูโคส แมนโนสและฟรุคโตสจะลักษณะเหมือนกัน ซึ่งเป็นข้อยกเว้นเพราะน้ำตาลทั้ง 3 นี้มีการจัดตัวภายในโมเลกุลต่างกันเฉพาะคาร์บอนอะตอมที่ 1 และ 2 เท่านั้น เมื่อเกิดเป็นผลึกโอซาโซนปรากฏว่าน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดมีการจัดตัวภายในโมเลกุลเหมือนกันหมดทุกอะตอมของคาร์บอน



การใช้จุดหลอมละลาย (melting point) ของผลึกโอซาโซนบอกความแตกต่างของชนิดน้ำตาลไม่ค่อยได้ผลดีนัก เพราะผลึกโอซาโซนของน้ำตาลต่าง ๆ มีจุดหลอมละลายใกล้เคียงกันมาก ทางที่ดีควรเปลี่ยนผลึกโอซาโซนนี้ไปเป็นอนุพันธ์อื่นก่อนแล้วค่อยหาจุดหลอมละลาย ซึ่งจะทำให้บอกชนิดของน้ำตาลได้ถูกต้องยิ่งขึ้น (ดูรูปที่ 1.5)

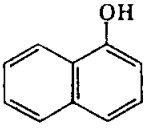


รูปที่ 1.5 รูปผลึก Osazone ดูจากกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายอย่างต่ำ

การทดลอง

การทดลองที่ 1.1 Molisch Test

หลักการ เป็นการทดสอบทั่ว ๆ ไปว่ามีคาร์โบไฮเดรทหรือไม่ โดยใช้กรดเข้มข้นทำปฏิกริยาย่อยสลายและดึงน้ำออกจากโมเลกุลคาร์โบไฮเดรทได้สาร furfural หรืออนุพันธ์ hydroxymethyl furfural ซึ่งจะไปรวมตัวกับสารละลาย Molisch ที่มี α-naphthol เป็นองค์ประกอบ ได้เป็นวงแหวนสีม่วงแดงที่ตรงรอยต่อระหว่างชั้นของคาร์โบไฮเดรทซึ่งอยู่บนและชั้นของกรด H_2SO_4 เข้มข้น-ซึ่งอยู่ล่าง



α-Naphthol

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)
แป้ง เด็กซ์ทริน กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส กาแลคโตส ไซโลส มาลโตส แลคโตส และซูโครส

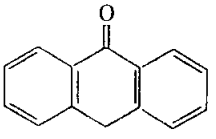
*สารละลาย Molisch

กรด H_2SO_4 เข้มข้น

วิธีการ เทสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 2 มล. เติมสารละลาย Molisch ลงไป 1-3 หยด เขย่าให้เข้ากันดีเอียงหลอดประมาณ 45° ค่อย ๆ รินกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1-3 มล. ลงไปข้าง ๆ หลอด กรดเข้มข้นนี้จะลงไปอยู่ที่ก้นหลอด **ห้ามเขย่า** ให้สังเกตวงแหวนสีม่วงแดงที่เกิดขึ้นตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารทั้งสองถ้าหากว่าสารที่ทดสอบนั้นเป็นคาร์โบไฮเดรทจริง

การทดลองที่ 1.2 Anthrone Test

หลักการ เหมือนการทดลอง 1.1 เพียงแต่ว่าอนุพันธ์ของ furfural ที่ได้จะไปทำปฏิกริยากับสาร anthrone ให้สารประกอบที่มีสีน้ำเงินเขียว หลักการนี้ถ้าทำให้ละเอียดและมีความถูกต้องมากพอจะสามารถหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทได้ โดยการนำไปวัดการดูดแสงที่ 620 นาโนเมตร แต่ถ้าคาร์โบไฮเดรทนั้นมีโปรตีนซึ่งมี tryptophan ปนอยู่มากจะทำให้ผลผิดพลาด เพราะในกรณีนี้จะได้สีแดงแทนที่จะได้สีน้ำเงินเขียว



Anthrone

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

สารละลาย anthrone (2 กรัม/ลิตร ในกรด H_2SO_4 เข้มข้น)

วิธีการ ผสมสารละลายคาร์โบไฮเดรท 5 หยดให้เข้ากันดีกับสารละลาย anthrone 2 มล. สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

---

*มีวิธีการเตรียมสารละลายนี้ในตอนท้ายของบท

การทดลองที่ 1.3 Iodine Test

หลักการ คาร์โบไฮเดรทโมเลกุลใหญ่ ๆ สามารถให้สีกับไอโอดีนได้ สีที่เกิดขึ้นจะเข้มหรือจางอย่างไรขึ้นกับ ขนาดโมเลกุลและการจัดตัวของโมเลกุลคาร์โบไฮเดรทว่ามีกิ่งก้านสาขามากน้อยเพียงใด ถ้าเป็นคาร์โบไฮเดรทที่โมเลกุลใหญ่และไม่ค่อยจะแตกสาขา จะให้สีน้ำเงินที่เข้มกว่าคาร์โบไฮเดรทที่มีโมเลกุลใหญ่แต่ทว่ามีการแตกสาขามากมาย amylose จะให้สีน้ำเงินเข้มจนเกือบดำกับไอโอดีน amylopectin ให้สีน้ำเงินเข้ม ส่วนไกลโคเจนจะให้สีน้ำตาลแดง ไดแซคคาไรด์และโมโนแซคคาไรด์นั้นโมเลกุลเล็กไม่ให้สีกับไอโอดีน

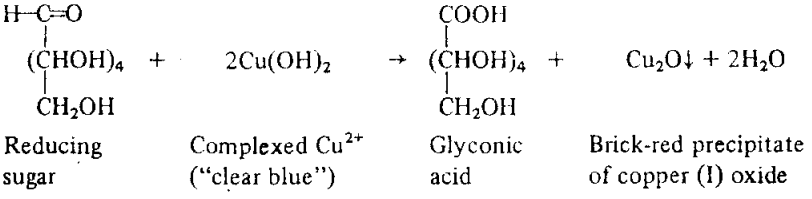
สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

สารละลายไอโอดีนเจือจาง

วิธีการ เตรียมหลอดทดลองที่มีสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดไว้หลอดละ 2 มล. หยดสารละลายไอโอดีนเจือจางลงไป 3-5 หยด สังเกตผลที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 1.4 Benedict Test

หลักการ เป็นการตรวจสอบน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ออกไซด์ของโลหะในสภาวะที่เป็นด่าง สารละลาย Benedict คือคิวปริคซัลเฟตในด่างอย่างอ่อน จะถูกรีดิวซ์เป็น Cu^{+1} และให้ตะกอนคิวปรัสออกไซด์ ตะกอนอาจมีสีเหลือง, เขียว, ส้ม, แดงหรือน้ำตาลส้ม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลและอัตราเร็วของการตกตะกอน น้ำตาลส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติอันนี้ยกเว้นซูโครส ส่วนคาร์โบไฮเดรทที่โมเลกุลใหญ่เช่นแป้งและเด็กซ์ทรินนั้น ความใหญ่ของโมเลกุลจะบดบังส่วนปลายซึ่งมีหมู่อัลดีไฮด์อิสระที่สามารถแสดงคุณสมบัตินี้เสีย ทำให้ไม่สามารถแสดงคุณสมบัติในการรีดิวซ์ออกมาให้ปรากฏ



สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

*สารละลาย Benedict

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เตรียมสารละลาย Benedict ใส่หลอดทดลองไว้หลอดละ 5 มล. เติมสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 1 มล. นำหลอดทดลองทั้งหมดไปแช่ในอ่างน้ำเดือดประมาณ 2-5 นาที สังเกตว่าหลอดใดมีตะกอนเกิดขึ้นบ้างและตะกอนนั้นสีอะไร

การทดลองที่ 1.5 Barfoed Test

หลักการ เป็นการตรวจสอบน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ โดยใช้คิวปริคซัลเฟตเช่นกันแต่ในสภาวะกรดอ่อน ซึ่งทำให้โมโนแซคคาไรด์รีดิวซ์ Cu^{+2} ให้ตะกอนคิวปรัสออกไซด์, Cu_2O ได้เร็วกว่าไดแซคคาไรด์ ดังนั้นจึงใช้การทดสอบอันนี้จำแนกบอกความแตกต่างระหว่างโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ ตะกอนคิวปรัสออกไซด์ที่ได้จากการทดลองนี้มีความหนาแน่นน้อยกว่าตะกอนที่ได้จากการทดลองที่ 1.4 น้ำตาลซูโครสอาจแสดงคุณสมบัติในการรีดิวซ์ได้ถ้าตั้งทิ้งไว้นานพอเพราะน้ำตาลซูโครสจะถูกย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลกลูโคสในสารละลายที่เป็นกรด ซึ่งน้ำตาลทั้งสองนี้ต่างก็มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ในตัวเอง

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

*สารละลาย Barfoed

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ การทดลองนี้ทำเช่นเดียวกับ Benedict Test ใช้สารละลาย Barfoed ใส่หลอดทดลองไว้หลอดละ 5 มล. เติมสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 1 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 2-5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 1.6 Silver mirror Test

หลักการ วิธีการนี้ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการรีดิวซ์ของคาร์โบไฮเดรท โดยให้คาร์โบไฮเดรทไปรีดิวซ์สารประกอบของโลหะเงิน (silver complex) กลายเป็นโลหะเงิน (silver metal หรือ silver mirror) เกาะอยู่ด้านในหลอดแก้ว สารประกอบของโลหะเงินอาจจะเตรียมสำเร็จเป็นสารละลาย Tollen หรืออาจเตรียมในหลอดทดลองก็ได้

$$AgNO_3 + NH_4OH \longrightarrow NH_4NO_3 + AgOH\downarrow$$

ตะกอนสีน้ำตาล

$$2\ AgOH \xrightarrow{\text{แสง}} Ag_2O + H_2O$$

$$Ag_2O + 4\ NH_3 \longrightarrow 2\ Ag(NH_3)_2^+ \cdot OH^-$$

silver diammonium hydroxide

$$R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}H + Ag(NH_3)_2^+ \longrightarrow Ag\downarrow + R\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}OH$$

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

5% $AgNO_3$

2% NH_4OH

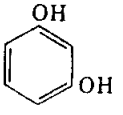
อ่างน้ำเดือด

วิธีการ การทดลองนี้หลอดทดลองจะต้องสะอาดปราศจากเคลือบไขใด ๆ ทั้งนั้น มิฉะนั้นแล้ว silver mirror ที่เกิดขึ้นจะไม่เกาะผนังด้านในของหลอดแก้ว ควรจะใช้อะซีโตนชะล้างหลอดทดลองอีกครั้งก่อนทำการทดลอง เมื่อหลอดสะอาดดีแล้วใส่ 5% $AgNO_3$ ลงไป 1 มล. ตามด้วย 2% NH_4OH จนกระทั่งได้ตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้น ให้เติม 2% NH_4OH ต่อไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งตะกอนสีน้ำตาลหายไปจนหมด แสดงว่าขณะนั้นเราได้เตรียมสารประกอบโลหะเงินไว้ในหลอดทดลองเรียบร้อยแล้ว เติมสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอดซึ่งมีสารประกอบโลหะเงินอยู่แล้ว หลอดละ 1 มล. นำไปแช่ไว้ในอ่างน้ำเดือดประมาณ 5 นาที ถ้าหลอดใดมี silver mirror เกิดขึ้น ก็แสดงว่าคาร์โบไฮเดรทในหลอดทดลองนั้นมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์

การทดลองที่ 1.7 Seliwanoff Test

หลักการ ใช้กรดเข้มข้นที่ร้อนไปดึงน้ำออกจากโมเลกุลคาร์โบไฮเดรทเพื่อให้เกิดสาร furfural หรืออนุพันธ์ของ furfural จากนั้นสารนี้ก็จะไปรวมตัวกับสารละลาย Seliwanoff ซึ่งมี resorcinol เป็นองค์ประกอบ ให้ผลิตผลเป็นสารละลาย สีแดง, ส้ม หรือส้มแดง ผลการทดลองนี้ใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างอัลโดเฮ็กโซสและคีโตเฮ็กโซสได้ เนื่องจากว่าอัลโดเฮ็กโซสนั้นถูกดึงน้ำออกจากโมเลกุลได้ช้ากว่าคีโตเฮ็กโซส และให้ผลิตผลเป็นเพียงสีชมพูจาง ๆ แต่มีข้อแม้ว่าถ้าใช้อัลโดเฮ็กโซสที่มีความเข้มข้นสูงหรือว่าให้ความร้อนแก่อัลโดเฮ็กโซสนานเกินควร จะทำให้ตีความหมายผลการทดลองผิดพลาดไปได้ เนื่องจากในกรณีดังกล่าวอัลโดเฮ็กโซสจะให้ผลออกมาเหมือนคีโตเฮ็กโซส สำหรับเปนโตสจะให้สีเขียวหรือสีน้ำเงิน

Resorcinol (*m*-dihydroxybenzene):



ฟรุคโตสไม่ว่าจะอยู่ในสภาพโพลีแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์ก็จะถูกย่อยสลายด้วยกรดให้เป็นโมโนแซคคาไรด์ และให้ผลบวกต่อปฏิกริยานี้

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

*สารละลาย Seliwanoff

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เตรียมหลอดทดลองที่มีสารละลาย Seliwanoff ไว้หลอดละ 5 มล. หยดสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 5-6 หยด ต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 2-5 นาที พิจารณาดูผลที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 1.8 Foulger Test

หลักการ เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบคีโตเฮ็กโซสอีกวิธีหนึ่ง โดยให้กรดเข้มข้นร้อนทำปฏิกริยากับคาร์โบไฮเดรท เมื่อได้สาร hydroxymethyl furfural ออกมาจะรวมตัวกับสารละลาย Foulger ได้สารสีน้ำเงินเกิดขึ้น

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

*สารละลาย Foulger

กรด HCL เข้มข้น

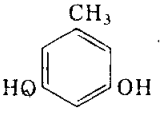
อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เตรียมสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดไว้อย่างละ 2 มล. เติมกรด HCL เข้มข้น 1 มล. และสารละลาย Foulger 1 มล. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 2-5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลง

การทดลองที่ 1.9 Bial Test

หลักการ ใช้ตรวจสอบน้ำตาลเปนโตสและนิวคลีโอไทด์ที่มีเปนโตส หลังจากนำเปนโตสไปต้มกับกรดเข้มข้นแล้ว furfural ที่ได้จะไปทำปฏิกริยากับสารละลาย Bial ซึ่งมี orcinol และ $FeCl_3$ เป็นองค์ประกอบ ให้ผลิตผลเป็นสารละลายสีน้ำเงินเขียว

Orcinol (3,5-dihydroxytoluene)



การทดลองนี้ไม่จำเพาะต่อเปนโตสเท่านั้น ไตรโอส เฮปโตสบางตัวและ uronic acid ก็ให้ผลเช่นกัน ส่วนเฮ็กโซสให้อนุพันธ์ของ furfural คือ hydroxymethyl furfural เมื่อทำปฏิกริยากับ orcinol จะให้สีเหลืองออกน้ำตาล

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

*สารละลาย Bial

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เตรียมสารละลายคาร์โบไฮเดรทแต่ละชนิดไว้อย่างละ 1 มล. เติมสารละลาย Bial ลงไปหลอดละ 3 มล. นำไปแช่ไว้ในอ่างน้ำเดือด 2-3 นาที สังเกตผลที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 1.10 การเกิดโอซาโซน (Osazone Formation)

หลักการ Phenylhydrazine จะทำปฏิกริยากับน้ำตาลที่มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ได้ผลึกสีเหลืองของโอซาโซน ซึ่งมีลักษณะของผลึกและจุดหลอมละลายที่เฉพาะตัว โมโนแซคคาไรด์จะให้ผลึกโอซาโซนไวกว่าไดแซคคาไรด์ การเกิดโอซาโซนใช้เวลาต่างกันเรียงตามลำดับจากบนสุด (เร็วสุด) ลงมาดังนี้

น้ำตาล	เวลาที่ใช้ในการเกิดผลึกโอซาโซน (นาที)	จุดหลอมเหลว (°ซ)
ฟรุคโตส	2	205
กลูโคส	4	205
แมนโนส	4	205
ไซโลส	7	163
อราบิโนส	10	166
กาแลคโตส	20	206
แลคโตส	ผลึกละลายในน้ำร้อน	200 (สลายตัว)
มาลโตส	ผลึกละลายในน้ำร้อน	208
ซูโครส	ไม่เกิดผลึก	-

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ

Phenylhydrazine hydrochloride

sodium acetate

glacial acetic acid

อ่างน้ำเดือด

กระดาษกรอง

วิธีการ เตรียมหลอดทดลองให้ครบตามชนิดของคาร์โบไฮเดรทไว้ แต่ละหลอดนั้นให้ใส่ phenylhydrazine hydrochloride 0.5 กรัม sodium acetate 1.0 กรัม glacial acetic acid 2 หยด จากนั้นเติมสารละลายคาร์โบไฮเดรทลงไปทุก ๆ หลอด หลอดละ 3 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือด 1 นาที เพื่อให้ละลายดียิ่งขึ้น หลังจากนั้นควรจะกรองถ้าสารละลายที่ได้ไม่ใส (แต่ถ้าใสแล้วก็ไม่ต้องกรอง) นำหลอดทดลองที่มีสารละลายสีเหลืองใสนี้ไปต้มในอ่างน้ำเดือด 30 นาที ระหว่างนั้นคอยเฝ้าสังเกตดูให้ดีว่าหลอดใดเกิดผลึกบ้าง และใช้เวลานานเท่าใดในการตกผลึก หลอดใดเกิดผลึกแล้วให้นำออกจากอ่างน้ำเดือด ส่วนที่เหลือถ้าหากว่าภายใน 30-45 นาทียังไม่ตกผลึกออกมา ให้นำหลอดทดลองนั้นไปแช่น้ำแข็งและคอยดูผล หลังจากที่ได้ผลึกแล้วทำผลึกให้แห้ง นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะผลึกของน้ำตาลแต่ละชนิด

การทดลองที่ 1.11 Galactaric (mucic) acid Test

หลักการ การออกซิไดซ์คาร์โบไฮเดรทบางชนิดด้วย HNO_3 จะให้ผลิตผลที่เป็น dicarboxylic acid ซึ่ง dicarboxylic acid ของคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ กันนี้มีความสามารถในการละลายน้ำ

แตกต่างกัน dicarboxylic acids ที่ได้จากการออกซิไดซ์แลคโตสและกาแลคโตสเท่านั้นที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงสามารถใช้คุณสมบัติดังกล่าวบอกความแตกต่างน้ำตาล 2 ชนิดนี้จากคาร์โบไฮเดรทอื่น ๆ ได้

สารเคมี สารคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ ที่เป็นของแข็ง
กรด HNO_3 เข้มข้น
อ่างน้ำเดือด

วิธีการ ชั่งสารคาร์โบไฮเดรทที่ต้องการตรวจสอบมาอย่างละ 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดแก้วทนไฟ เติมน้ำกลั่น 1 มล. และกรด HNO_3 เข้มข้น 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดประมาณ 1½-2 ชั่วโมงในตู้ควัน เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ค้างคืน สังเกตว่าหลอดแก้วใดมีผลึกเกิดขึ้นบ้าง นำผลึกบางส่วนไปตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำ ส่วนที่เหลือนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะผลึก

การทดลองที่ 1.12 Fermentation Test

หลักการ Fermentation หรือการหมักเป็นขบวนการที่ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลบางชนิดไปเป็นเอธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้บรรยากาศที่ปราศจากออกซิเจน ถ้ามีการหมักเกิดขึ้น ปริมาตรของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะต้องเพิ่มขึ้น

สารเคมี สารละลายคาร์โบไฮเดรทชนิดต่าง ๆ
สารละลายยีสต์ (100 กรัม/ลิตร)
0.1 M NaF
Vial

วิธีการ การทดลองนี้ประกอบด้วยหลอดทดลอง 10 หลอด

หลอดที่ 1 เติมสารละลายยีสต์ลงไปประมาณ ⅓ ของหลอด แล้วเติมน้ำกลั่นจนกระทั่งเต็มหลอด

หลอดที่ 2 เติมสารละลายยีสต์ลงไปประมาณ ⅓ ของหลอด แล้วเติมสารละลายกลูโคสจนกระทั่งเต็มหลอด

หลอดที่ 3 เติมสารละลายยีสต์ลงไปประมาณ ⅓ ของหลอด แล้วเติมสารละลายกลูโคสจนเกือบเต็มหลอด และเติม 0.1 M NaF จนกระทั่งเต็มหลอด

หลอดที่ 4 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายฟรุคโตสแทนสารละลายกลูโคส

หลอดที่ 5 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายแมนโนสแทนสารละลายกลูโคส

หลอดที่ 6 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายไซโลสแทนสารละลายกลูโคส

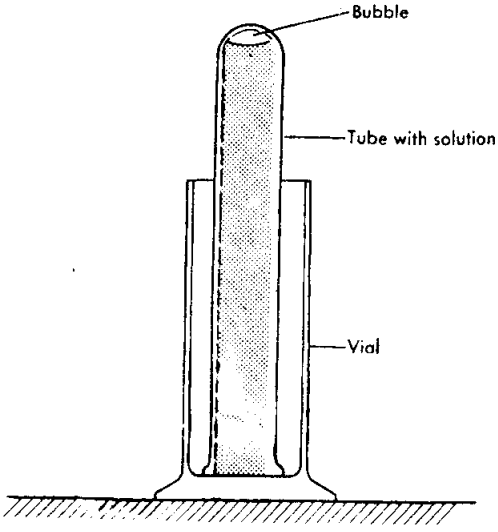
หลอดที่ 7 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายซูโครสแทนสารละลายกลูโคส

หลอดที่ 8 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายมาลโตสแทนสารละลายกลูโคส

หลอดที่ 9 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายแลคโตสแทนสารละลายกลูโคส

หลอดที่ 10 ทำเหมือนหลอดที่ 2 แต่ใช้สารละลายกาแลคโตสแทนสารละลายกลูโคส

เตรียม Vial ไว้ให้ครบตามจำนวนหลอดแก้วเพื่อจัด incubation chamber ดังรูป



รูปที่ 1.6 Incubation chamber

วิธีการจัดทำดังนี้

1. หลอดแก้วแต่ละหลอดจะมีสารละลายเต็มเปี่ยม ถือหลอดเหล่านั้นให้ตรง ๆ ในแนวดิ่ง
2. คว่ำ vial ลงไปบนหลอดแก้วแต่ละหลอด
3. จับ vial และหลอดแก้วให้แน่น
4. หงาย vial ลงล่าง และหลอดแก้วขึ้นบนดังรูป ถ้าทำถูกต้องจะมีฟองอากาศอยู่ก้นหลอดตอนบนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

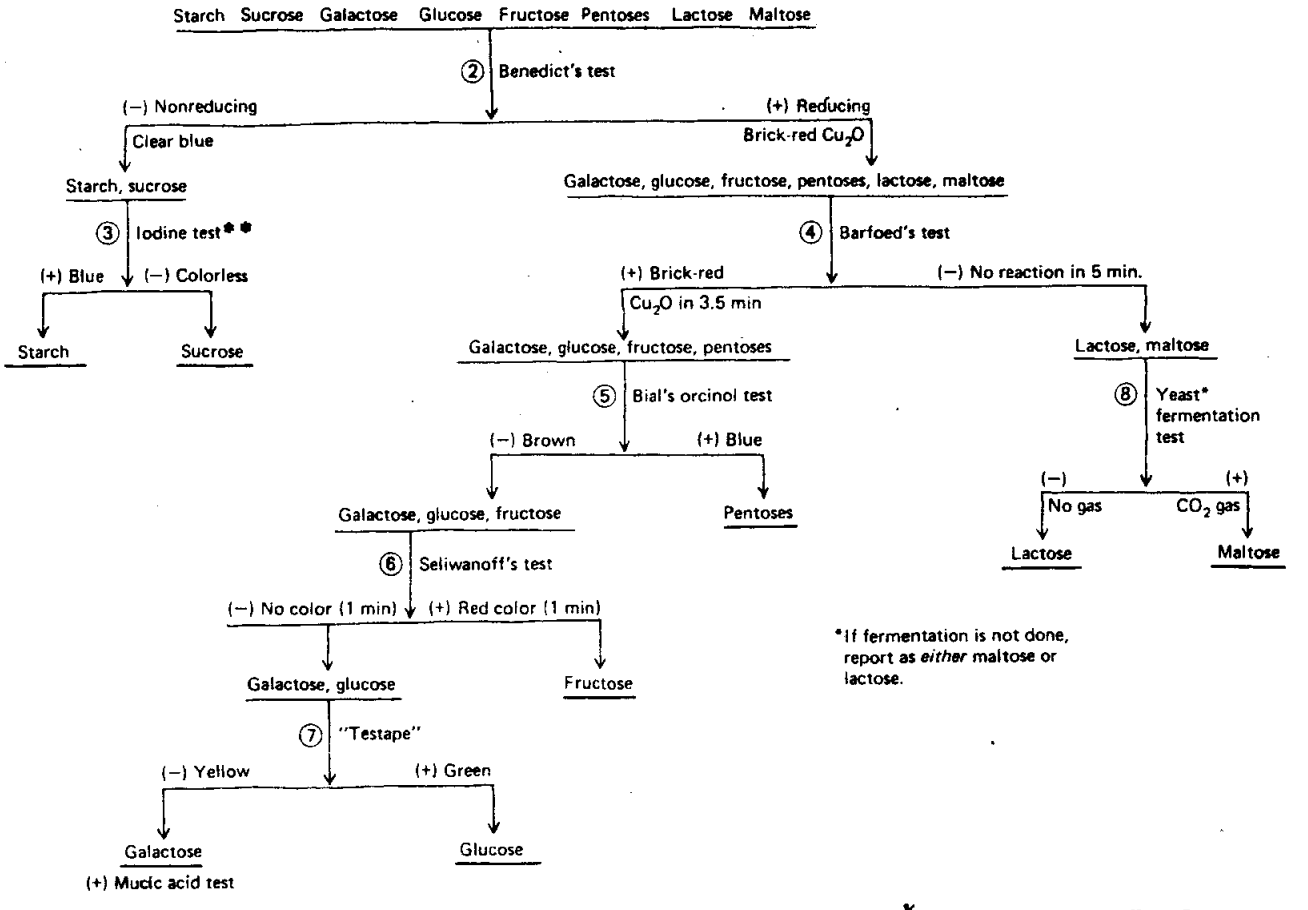
เสร็จแล้วนำ incubation chamber ทั้ง 10 ชุดไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ คอยสังเกตทุก ๆ 15 นาที ว่าปริมาตรฟองอากาศเพิ่มขึ้นหรือไม่ ถ้าเวลาผ่านไปแล้ว 3 ชม. ไม่มีก๊าซเกิดขึ้นให้ถือว่ายีสต์ใช้น้ำตาลนั้นเป็นอาหารไม่ได้ ถ้าเวลาผ่านไปกว่า 3 ชม. แล้วจึงเห็นมีฟองก๊าซเกิดขึ้นอาจเกิดจากการกระทำของแบคทีเรียไม่ใช่ยีสต์ สารละลายน้ำตาลใดที่มี HgI_2 เป็นยาฆ่าเชื้อหรือใส่เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ยีสต์ไม่สามารถที่จะใช้เป็นอาหารได้

สำหรับหลอดที่ 3 นั้นต้องการให้สังเกตดูผลของ NaF ที่มีต่อขบวนการหมักของยีสต์ NaF จะไปจับกับไอออน Mg^{+2} ซึ่งเป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์ชนิดหนึ่งในขบวนการหมักหรือขบวนการไกลโคไลซิส เอ็นไซม์นั้นชื่อ enolase มีผลทำให้เอ็นไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกริยาได้เหมือนเดิม ซึ่งจะส่งผลกระทบกระเทือนถึงขบวนการหมักด้วย

ตารางที่ 1.3 การทดสอบคาร์โบไฮเดรทที่ใช้หลักการเดียวกัน

ชนิดการตรวจสอบ	ชนิดของกรด	ตัวทำปฏิกริยา	ความจำเพาะ	สีสารประกอบที่เกิดขึ้น
Anthrone	H_2SO_4 เข้มข้น	anthrone	คาร์โบไฮเดรท ทุกชนิด	สีน้ำเงินเขียว
Molisch	H_2SO_4 เข้มข้น	α-naphthol (α-Hydroxy naphthalene)	คาร์โบไฮเดรท ทุกชนิด	วงแหวนสีม่วงแดง
Seliwanoff	HCL เข้มข้น	Resorcinol (m-Hydroxy phenol)	คีโตเฮ็กโซส	แดงหรือส้มหรือส้มแดง
Bial	HCL เข้มข้น	Orcinol (3, 5-Dihydro-xytoluene)	เปนโตส	สีน้ำเงินเขียว
Foulger	HCL เข้มข้น	urea , stanous - chloride	คีโตเฮ็กโซส	สีน้ำเงิน

รูปที่ 1.7 แผนผังแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรทประเภทต่าง ๆ



**ถ้าเป็น (+) สีน้ำตาล แสดงว่าเป็นไกลโคเจน
ถ้าเป็น (−) ไม่มีสี อาจเป็นซูโครสหรืออินนุลิน

ตารางที่ 1.4 การบันทึกผลการตรวจสอบคาร์โบไฮเดรท

วิธีทดสอบ \ คาร์โบไฮเดรท	แป้ง	เด็กซ์ทริน	กลูโคส	ฟรุคโตส	แมนโนส	กาแลคโตส	ไซโลส	มาลโตส	แลคโตส	ซูโครส
1. Molisch										
2. Anthrone										
3. Iodine										
4. Benedict										
5. Barfoed										
6. Silver mirror										
7. Seliwanoff										
8. Foulger										
9. Bial										
10. Osazone										
11. Mucic acid										
12. Yeast fermentation										

รายงานเป็นเครื่องหมาย + สำหรับการตรวจสอบที่ให้ผลบวก (positive test)

รายงานเป็นเครื่องหมาย – สำหรับการตรวจสอบที่ให้ผลลบ (negative test)

การทดลองที่ 1.13 การหาปริมาณกลูโคสโดยใช้เอ็นไซม์ glucose oxidase

(β-D-Glucose : oxygen oxidoreductase, 1.1.3.4)

หลักการ การเร่งปฏิกริยาของเอ็นไซม์ glucose oxidase เป็นดังนี้

$$\beta\text{-D-Glucopyranose} + FAD \rightleftharpoons \text{D-Glucono-1,5-lactone} + FADH_2$$

$$\text{D-Glucono-1,5-lactone} + H_2O \longrightarrow \text{D-Gluconic acid}$$

$$FADH_2 + O_2 \rightleftharpoons H_2O_2 + FAD$$

$$\beta\text{-D-Glucopyranose} + H_2O + O_2 \longrightarrow \text{D-Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$\text{Chromogen} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Dye} + H_2O.$$

chromogen ในที่นี้คือ o-tolidine ในสภาพรีดิวซ์จะไม่มีสี แต่เมื่อถูกออกซิไดซ์ โดย H_2O_2 จะกลายเป็นสีน้ำเงิน ปฏิกริยาเกิดได้ไวที่อุณหภูมิห้องแต่สีที่ได้ไม่ถาวร ดังนั้นการอ่านค่าการดูดแสงต้องพยายามทำภายในเวลาที่เท่ากัน ส่วนใหญ่ใช้เวลาประมาณ 8-10 นาที การออกซิไดซ์นี้จำเพาะต่อกลูโคสมาก ดังนั้นจึงใช้บอกความแตกต่างระหว่างกลูโคสกับฟรุคโตส หรือระหว่างกลูโคสกับอัลโดสชนิดอื่น ๆ ได้ สารละลาย glucose oxidase หรือสารละลาย o-tolidine ประกอบด้วย glucose oxidase, peroxidase และ o-tolidine (มีรายงานว่า o-tolidine สามารถทำให้เกิดโรคมะเร็งได้ เพราะฉะนั้นจึงควรระมัดระวังเป็นพิเศษ อย่าปิเปตต์สารนี้ด้วยปากเป็นอันขาด)

สารเคมี สารละลาย $ZnSO_4$ (100 กรัม/ลิตร)

สารละลาย Na_2SO_4 (93 มิลลิโมล/ลิตร)

สารผสม $ZnSO_4$-Na_2SO_4 ใช้สารละลาย $ZnSO_4$ 55 มล. ผสมกับสารละลาย Na_2SO_4 จนกระทั่งปริมาตรเป็น 1 ลิตร

NaOH 0.5 M

acetate buffer 0.15 M pH 5

เอ็นไซม์ glucose oxidase (750 ไมโครกรัม/มล.) เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

เอ็นไซม์ peroxidase (1 มก./มล.) เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

o-tolidine (10 กรัม/ลิตร ใน absolute EtOH) เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลาย glucose oxidase หรือสารละลาย o-tolidine ประกอบด้วย

acetate buffer	150 มล.
เอ็นไซม์ glucose oxidase	1 มล.
เอ็นไซม์ peroxidase	1 มล.
o-tolidine	1 มล.

เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4ซ จะสามารถใช้ไปได้นานหลายอาทิตย์

สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (0.1 กรัม/ลิตร) เตรียมแล้วใช้ทันที

วิธีการ ปิเปตต์สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณกลูโคสมา 0.1 มล. (เลือดหรือสารอื่นก็ได้) เติมสารผสม $ZnSO_4$-Na_2SO_4 ลงไป 1.8 มล. และ 0.5 M NaOH 0.1 มล. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ปิเปตต์ส่วนของเหลว (supernatant) ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเป็นปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดที่ 1 เพื่อทำปฏิกริยาต่อไป หลอดที่ 2 ใส่น้ำกลั่น 1 มล. เพื่อใช้ในการปรับศูนย์ (set zero) หลอดที่ 3 เป็นสารละลายกลูโคสมาตรฐานปริมาตร 1 มล. นำทั้ง 3 หลอดมาเติมสารละลาย-glucose oxidase หรือสารละลาย o-tolidine หลอดละ 5 มล. เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปอ่านค่าการดูดแสงที่ 625 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดแสงของหลอดที่ 1 กับหลอดที่ 3 ก็สามารถทราบปริมาณกลูโคสในหลอดที่ 1 ได้ หรืออาจจะทำ calibration curve ก็ได้

การตรวจสอบแบบนี้อาจใช้ Testape หรือ Clinistix ซึ่งให้ผลเร็วกว่ามาก Testape นั้นเป็นกระดาษเซลลูโลสที่มีเอ็นไซม์ glucose oxidase, เอ็นไซม์ peroxidase และ o-tolidine ในตัว เพียงแต่หยดสารละลายน้ำตาลกลูโคสลงไปจะเห็นผลภายในเวลา 1 นาที

Polarimetry

สารประกอบใดมีคาร์บอนอะตอมที่ไม่สมมาตร (asymmetric carbon atom) หนึ่งอะตอมหรือมากกว่าหนึ่งขึ้นไป จะสามารถหมุนระนาบของ polarised light ได้ไม่ว่าสารประกอบนั้นจะอยู่ในสถานะที่เป็นผลึกหรือเป็นสารละลายก็ตาม จัดว่าสารมีคุณสมบัติ optically active

การวัดคุณสมบัติดังกล่าวนี้โดยเครื่องมือ polarimeter เราเรียกว่า polarimetry

สารใดที่หมุนระนาบ polarised light ไปทางขวา จัดเป็น dextrorotatory ใช้สัญญลักษณ์(d) หรือ (+) สารใดที่หมุนระนาบ polarised light ไปทางซ้าย จัดเป็น levorotatory ใช้สัญญลักษณ์ (l)หรือ (−) คำว่า dextro−, levo− แสดงความสัมพันธ์กับ optical rotation เท่านั้น มิได้เกี่ยวข้องกับไอซอมเมอร์ D− หรือ L− ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางโครงสร้างเคมีแต่อย่างใด

ขนาดและทิศทางของการหมุนระนาบของ polarised light ขึ้นอยู่กับ

1. ธรรมชาติของสารนั้น
2. ความเข้มข้นของสารละลาย
3. ความยาวของทางเดินแสงที่ผ่านสารละลายนั้นไป (path length)
4. ตัวทำละลาย
5. ความยาวคลื่นของแสงที่ใช้
6. อุณหภูมิ

ตัวแปรเปลี่ยนเหล่านี้ถูกรวบรวมเข้าเป็นสูตร

$$[\alpha]^{t}_{\lambda} = \frac{\alpha}{l \times c}$$

เมื่อ $[\alpha]$ = specific rotation ของสาร

α = rotation ที่อ่านได้จากการทดลอง

λ = ความยาวคลื่นแสง ปรกติใช้ Sodium D-line ซึ่งความยาวคลื่น 589 นาโนเมตร

t = อุณหภูมิที่ทำการทดลอง ปรกติทำการทดลองที่ 20°ซ

l = ความยาวทางเดินแสงที่ผ่านสารละลาย วัดเป็นเดซิเมตร (dm) ซึ่งเท่ากับความยาวของหลอดใส่สารละลายในเครื่องมือ polarimeter ส่วนใหญ่ค่า l = 2 เดซิเมตร

c = ความเข้มข้นของสารละลาย เป็น กรัม/มล.

ค่า specific rotation $[\alpha]^{20}_{D}$ จัดเป็นค่าคงที่ฟิสิกัล (physical constant) มาตรฐานที่ใช้ในการตรวจหาน้ำตาลต่าง ๆ หากรู้ชนิดของน้ำตาลและรู้ค่า $[\alpha]^{20}_{D}$ ก็สามารถนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลนั้นได้

ตารางที่ 1.5 ค่า specific rotation ของ eguilibrium mixture ของสารละลายน้ำตาลในน้ำ

D-Arabinose	−105	D-Xylose	+19.0	Sucrose	+66.5
D-Fructose	−92.0	D-Glucose	+52.7	D-Galactose	+84.0
D-Mannose	+14.2	Lactose	+55.3	Maltose	+136

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า เมื่อนำ D − Glucose ไปละลายน้ำ จะเกิดสมดุลย์ระหว่าง

$$\alpha - D(+)\text{Glucose} \rightleftharpoons D(+)\text{Glucose} \rightleftharpoons \beta - D(+)\text{Glucose}$$

$[\alpha]^{20}_{D} = 112.2°$ $[\alpha]^{20}_{D} = 52.7°$ $[\alpha]^{20}_{D} = 18.7°$

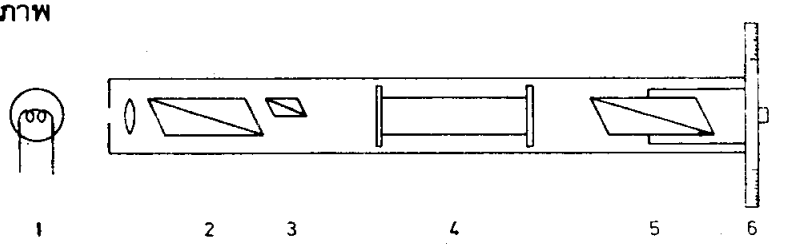
ถ้าทำการแยกไอซอมเมอร์ D− และ L− และทำให้บริสุทธิ์จะพบว่าส่วนประกอบทางเคมีของไอซอมเมอร์ทั้ง 2 นี้ไม่ต่างกัน แต่คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพนั้นแตกต่างกันออกไป ดังจะเห็นได้จากการเปรียบเทียบในตาราง

ตารางที่ 1.6 คุณสมบัติของ α − D − Glucose และ β − D − Glucose

Property	*α-D-Glucose*	*β-D-Glucose*
Specific rotation $[\alpha]^{25}_{D}$	+112.2°	+18.7°
Melting point, °C	146	150
Solubility in H_2O, g per 100 ml	82.5	178
Relative rate of oxidation by glucose oxidase	100	< 1.0

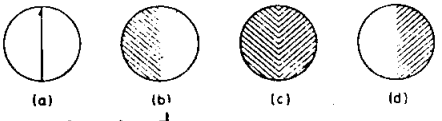
ถ้านำ commercial D – Glucose (dextrose) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น α – D – Glucose มาละลายน้ำ ให้เป็นสารละลาย ขณะเริ่มต้นมีไอซอมเมอร์ α เพียงอย่างเดียว แล้วจึงมีการเปลี่ยนแปลงไปสู่ภาวะสมดุลย์ ซึ่งจะประกอบไปด้วย 1) ไอซอมเมอร์ α ประมาณหนึ่งในสาม 2) ไอซอมเมอร์ β ประมาณสองในสาม 3) D – Glucose แบบสายโซ่เปิด มีปริมาณเล็กน้อยมาก (traces amount) ค่า optical rotation จะเปลี่ยนแปลงไปตามเวลาเช่นกัน จนกระทั่งได้ค่า optical rotation ที่ภาวะสมดุลย์ซึ่งเป็นค่าคงที่ $[\alpha]_D^{20} = 52.7°$ การเปลี่ยนแปลงอันนี้เรียกว่า Mutarotation การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้ในสิ่งมีชีวิตจะถูกเร่งปฏิกริยาโดยเอ็นไซม์ mutarotase แต่ถ้าเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีธรรมดาจะใช้ด่างปริมาณเล็กน้อยเป็นตัวเร่งแทน

เครื่องมือที่ใช้ศึกษาเกี่ยวกับ optical activity ของสารคือ Polarimeter ซึ่งมีส่วนประกอบย่อย ๆ ดังในภาพ



รูปที่ 1.8 Polarimeter

1. แหล่งกำเนิดของ monochromatic light ปรกติใช้ sodium lamp
2. Polariser เป็น Nicol prism หรือ polaroid ซึ่งจะทำให้เกิดระนาบของ polarised light
3. เครื่องมือสำหรับหมุนระนาบของแสงที่ผ่านออกมาประมาณ 10° มักจะเป็น Nicol prism อันเล็ก
4. หลอดใส่ละลายที่จะตรวจสอบ
5. Analyser ซึ่งคล้ายกับ polariser สามารถหมุนได้ถึง 90° ทั้งสองทิศทาง
6. เครื่องมือวัดองศาของการหมุนซึ่งติดอยู่กับ analyser



รูปที่ 1.9 แสดงภาพตัวอย่างที่ปรากฏบน eyepiece ของ polarimeter

ภาพ a สว่างมากที่สุด แสดงว่า analyser อยู่ในแนวเดียวกับ polariser

ภาพ b สว่างเพียงครึ่งเดียว แสดงว่า analyser ทำมุม 45° กับ polariser

ภาพ c มืดหมดทั้งวงกลม แสดงว่า analyser ทำมุ 90° กับ polariser

ภาพ d สว่างเพียงครึ่งเดียว แสดงว่า analyser ทำมุม 45° กับ polariser แต่ทิศทางตรงข้ามกับภาพ b

การทดลองที่ 1.14 Mutarotation ของ D – Glucose

หลักการ ผลึก D – Glucose มี 2 รูปแบบ ไอซอมเมอร์ α และ β ถ้านำผลึก 2 แบบนี้มาละลายน้ำจะให้ค่า specific rotation +112.2° และ +18.7° ตามลำดับ ถ้าตั้งสารละลายทั้งสองอย่างนี้ไว้ ต่างก็จะเกิด mutarotation ทำให้ได้สารละลายผสมทั้งรูปแบบ α และรูปแบบ β ที่ภาวะสมดุลย์ แสดงค่า specific rotation +52.7°

สารเคมี α – D – Glucose ที่ปราศจากน้ำ (anhydrous)

β – D – Glucose ที่ปราศจากน้ำ (anhydrous)

Na_2CO_3 0.1 M

Polarimeter

นาฬิกาจับเวลา

วิธีการ เปิด sodium-lamp ไว้ก่อนประมาณ 10 นาทีเพื่อเป็นการอุ่นเครื่องก่อนใช้เครื่องมือ Mutarotation ในน้ำกลั่น : ล้างหลอดใส่สารละลายของเครื่องมือ polarimeter ให้สะอาด เติมน้ำกลั่นให้เต็ม พยายามอย่าให้มีฟองอากาศ ปิดจุกเกลียวให้แน่น หมุน analyser จนกระทั่งความเข้มของแสงในครึ่งวงกลมทั้ง 2 มืดเท่ากัน อ่านสเกลบนเครื่องมือวัดองศาไว้ วิธีการนี้เป็นการปรับศูนย์ (adjust zero) เครื่องมือ เมื่อปรับศูนย์ได้แล้วเทน้ำออก ทำหลอดให้แห้งเตรียมไว้ใช้ต่อไป

เตรียมสารละลาย 10% α – D – Glucose ในขวดปริมาตรขนาด 100 มล. อย่างรวดเร็ว เติมสารนี้ลงในหลอดใส่สารละลายที่เตรียมไว้ให้เต็ม วัด optical rotation โดยการหมุน analyser ไปจนกระทั่งความเข้มแสงของครึ่งวงกลมทั้ง 2 มืดเท่ากัน บันทึกค่าขององศาและทิศทางที่หมุนไป การวัดต้องกระทำโดยเร็วและใช้นาฬิกาจับเวลาที่ศูนย์ไว้ (zero time) วัด rotation ทุก 10 นาที สำหรับครึ่งชั่วโมงแรก ต่อจากนั้นวัดทุก 20 นาทีจนกระทั่งได้ค่าคงที่ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงค่า specific rotation กับเวลา

ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้กับ 10% β – D – Glucose Mutarotation ในด่าง :

ในการเตรียมสารละลาย 10% α – D – Glucose หรือ 10% β – D – Glucose ในขวดปริมาตร 100 มล. นั้นให้เติม 1 มล. ของ 0.1 M Na_2CO_3 ลงไปด้วย แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มล. นำไปอ่านค่า specific rotation โดยรวดเร็ว อ่านค่าทุก ๆ 2 นาทีในช่วง 10 นาทีแรก ต่อจากนั้นอ่านค่าทุก ๆ 5 นาทีจนกระทั่งได้ค่าคงที่ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงค่า specific rotation กับเวลา เปรียบเทียบกับกราฟที่ได้จากการทดลองเมื่อไม่มีด่าง

การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย Molisch :

   เป็นสารละลาย 5% α-naphthol ในเอธานอล ชั่งสาร α-naphthol 5 กรัม ละลายด้วยเอธานอลให้เป็น 100 มล. สารละลายนี้ควรจะเตรียมใช้ใหม่ ๆ

2. สารละลาย Benedict :

   ก) ชั่ง Sodium citrate 173 กรัม และ Na_2CO_3 ที่ปราศจากน้ำ 100 กรัม ละลายน้ำกลั่นเป็น 850 มล.

   ข) ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 17.3 กรัม ละลายน้ำกลั่นเป็น 100 มล. แล้วเทสารละลายในข้อ ข. นี้ผสมกับสารละลายในข้อ ก. คนให้เข้ากันดีปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3. สารละลาย Barfoed :

   ก) ชั่งสาร copper acetate 66 กรัม

   ข) ปิเปตต์ glacial acetic acid 10 มล. ใส่ลงในบีคเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 200 มล. คนให้เข้ากันดี แล้วนำสารละลายที่ได้นี้ไปละลาย copper acetate ที่ชั่งไว้ในข้อ ก. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

4. สารละลาย Seliwanoff :

   ชั่งสาร resorcinol 0.5 กรัม ละลายในกรด HCL เข้มข้น 330 มล. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

5. สารละลาย Foulger :

   ก) เตรียมกรด H_2SO_4 40% โดยใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้น 400 มล. เทลงในบีคเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 600 มล. คนให้เข้ากันดี

   ข) ชั่งสาร urea 400 กรัม ละลายด้วย 800 มล. ของ 40% H_2SO_4 ที่เตรียมไว้ เติม stanous chloride 20 กรัม นำไปต้มจนใส เติม 40% H_2SO_4 ที่เหลือจนกระทั่งปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร

6. สารละลาย Bial :

   ก) เตรียม 1% $FeCl_3$ โดยชั่ง $FeCl_3$ 0.05 กรัมละลายน้ำกลั่นเป็น 5 มล.

   ข) ชั่งสาร orcinol 3 กรัม ละลายในกรด HCL เข้มข้น 1 ลิตร เติม 1% $FeCl_3$ ที่เตรียมไว้ลงไป 3 มล.

คำถามท้ายบท

1. ผลที่ได้จาก Seliwanoff Test บอกความแตกต่างระหว่างซูโครสกับฟรุคโตสได้หรือไม่? เพราะเหตุใด?

2. อินนุลิน เป็นโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของฟรุคโตส อยากทราบว่าถ้านำสารนี้ไปทำ Seliwanoff Test จะได้ผลเป็นอย่างไร?

3. ถ้านำมาลโตส, แลคโตสและซูโครส ไปตรวจสอบโดย Benedict Test น้ำตาล 3 ชนิดนี้ให้ผลแตกต่างกันอย่างไร?

4. ในสารละลาย Benedict ประกอบด้วย ก) $CuSO_4$ ข) Na_2CO_3 ค) sodium citrate ให้บอกหน้าที่ของสารเหล่านี้

5. Benedict Test มีสภาวะของปฏิกริยาหรือสารเคมีอะไรที่แตกต่างไปจาก Barfoed Test บ้าง?

6. เพราะเหตุใดบางครั้งน้ำตาลซูโครสจึงให้ผลบวก เมื่อตรวจสอบโดย Barfoed Test

7. ถ้านำแป้งไปตรวจสอบ Benedict Test จะให้ผลอย่างไร และทำไมจึงเป็นเช่นนั้น?

8. ทำไมน้ำตาลซูโครสจึงไม่สามารถรีดิวซ์ Cu^{+2} ในสารละลาย Benedict?

9. ให้บอกว่าน้ำตาลต่อไปนี้ หมายถึงน้ำตาลชนิดใดที่ท่านรู้จัก

dextrose .....

levulose .....

grape sugar .....

saccharose .....

cane sugar .....

milk sugar .....

10. จงเขียนปฏิกริยาการเกิดโอซาโซนและการเกิด silver mirror

11. วุ้น agar เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาจากสาหร่ายทะเล (seaweed) ให้ผลบวกต่อ mucic acid test แสดงว่าส่วนประกอบในวุ้น agar นี้เป็นอะไร?

12. ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลตัวใดเป็นสารอาหารได้บ้าง?

13. น้ำตาลที่เป็นไอซอมเมอร์ D – จะหมุนระนาบ polarised light ไปทางขวาเสมอไป ใช่หรือไม่?

14. เอ็นไซม์ glucose oxidase จะสามารถออกซิไดซ์ α – D-Glucose หรือ β – D – Glucose ได้เร็วกว่ากัน?

15. สารละลายของกรดอะมิโนลูซีนไอซอมเมอร์ L – (3.0 กรัม/50 มล. ของ 6 N HCL) ในหลอดใส่สารละลายขนาด 20 ซม. ของเครื่องมือ polarimeter ให้ค่า optical rotation +1.81° จงหาค่า specific rotation ของสารละลายนี้ (**คำตอบ** +15.1°)

16. สารละลายน้ำตาลอะราบิโนสไอซอมเมอร์ L – ที่ภาวะสมดุลย์ระหว่างรูปแบบ α และ β ให้ค่า optical rotation +23.7° ที่ 25°ซ หลอดใส่สารละลายยาว 10 ซม. ให้หาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลตัวนี้ ค่า $[\alpha]_D^{25}$ สำหรับสารละลายที่ภาวะสมดุลย์เท่ากับ +105° (**คำตอบ** 0.225 กรัม/มล.)