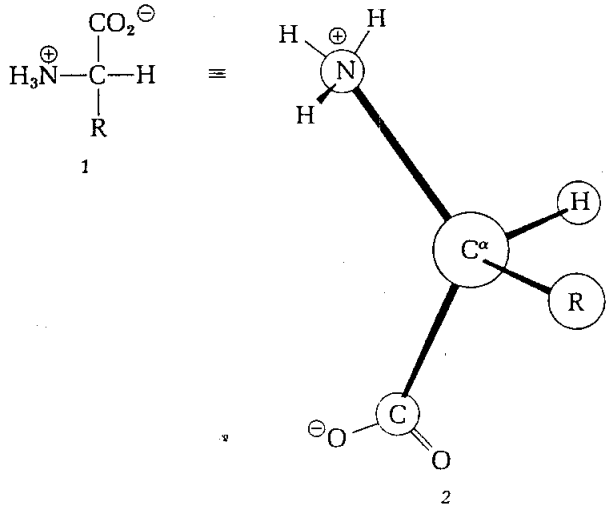
บทที่ 8
กรดอมิโน

วัตถุประสงค์ เมื่ออ่านบทนี้ตลอดจนทำแบบฝึกหัดแล้ว นักศึกษาจะต้อง

1. เขียนชื่อเต็ม ชื่อย่อ ตลอดจนโครงสร้างของกรดอมิโนชนิดต่าง ๆ ได้
2. จำแนกกรดอมิโนออกตามลักษณะโครงสร้าง และตามคุณสมบัติเกี่ยวกับการแตกตัวของ side chain ได้
3. อธิบายการเกิด zwitterion และผลของโครงรูปนี้ที่มีต่อคุณสมบัติของกรดอมิโน
4. เขียน titration curve ตลอดจนหา pI ของกรดอมิโนชนิดต่าง ๆ ได้
5. ยกตัวอย่างปฏิกิริยาที่เกิดกับหมู่ฟังก์ชั่นต่าง ๆ ของกรดอมิโน

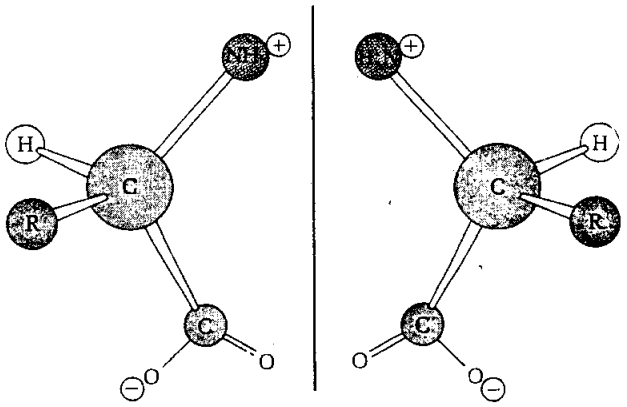
กรดอมิโนเป็นโมเลกุลหน่วยสร้างของชีวโมเลกุลประเภทหนึ่งคือโปรตีน โดยกรดอมิโนที่พบเป็นส่วนประกอบของโปรตีนจะมีด้วยกัน 20 ชนิด และการเรียงตัวเพื่อเกิดเป็นสายโพลีเปปไทด์ก็จะแตกต่างกันไปในโปรตีนแต่ละชนิดด้วย

8.1 โครงสร้างของกรดอมิโน



1 2

กรดอมิโนส่วนใหญ่ที่พบในสิ่งมีชีวิต จะเป็นชนิดอัลฟาดังแสดงในรูป โดยมีส่วนสำคัญอยู่ในโมเลกุลคือส่วนที่เป็นหมู่อัลฟาอมิโน และส่วนที่เป็นหมู่คาร์บอกซิล จากโครงสร้าง (1) จะเห็นว่าอัลฟาคาร์บอนอะตอมของกรดอมิโนทุกชนิด ยกเว้นไกลซีนซึ่งมีหมู่ R เป็นไฮโดรเจน จะเป็นคาร์บอนที่ไม่สมมาตร ทำให้คู่ไอโซเมอร์ที่เป็นเงาในกระจกของกันและกันนั้นเป็นคู่อีแนน-ทิโอเมอร์ (รูปที่ 8-1) สำหรับโครงสร้าง (2) จะแสดงลักษณะสามมิติของโมเลกุลกรดอมิโน เนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานของกรดอมิโนชนิดอัลฟานี้เหมือนกัน ดังนั้นส่วนที่จะแตกต่างกันก็คือโครงสร้างของหมู่ R ที่เป็น side chain ซึ่งส่วนนี้เองที่เป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสายโปรตีน



รูปที่ 8-1 กรดอมิโนที่เป็นคู่ในกระจกเงาซึ่งกันและกัน

8.2 การจำแนกประเภทของกรดอมิโน

กรดอมิโนสามารถที่จะถูกจำแนกออกได้หลายวิธี ในที่นี้จะกล่าวถึงเพียง 2 วิธี คือ

8.2.1 การจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพของ side chain โดยดูว่า side chain จะมีความสามารถในการให้หรือรับโปรตอนได้อย่างไรที่ physiological pH ซึ่งก็คือ pH 7.0 การจำแนกวิธีนี้จะแบ่งกรดอมิโนออกได้เป็น 4 พวก คือ

1. Nonpolar side chain group พวกนี้มี side chain เป็นชนิดที่ไม่ละลายน้ำ หรือมีลักษณะเป็นไฮโดรคาร์บอน ได้แก่ อลานีน แวลีน ลิวซีน ไอโซลิวซีน โพรลีน เฟนิลอลานีน

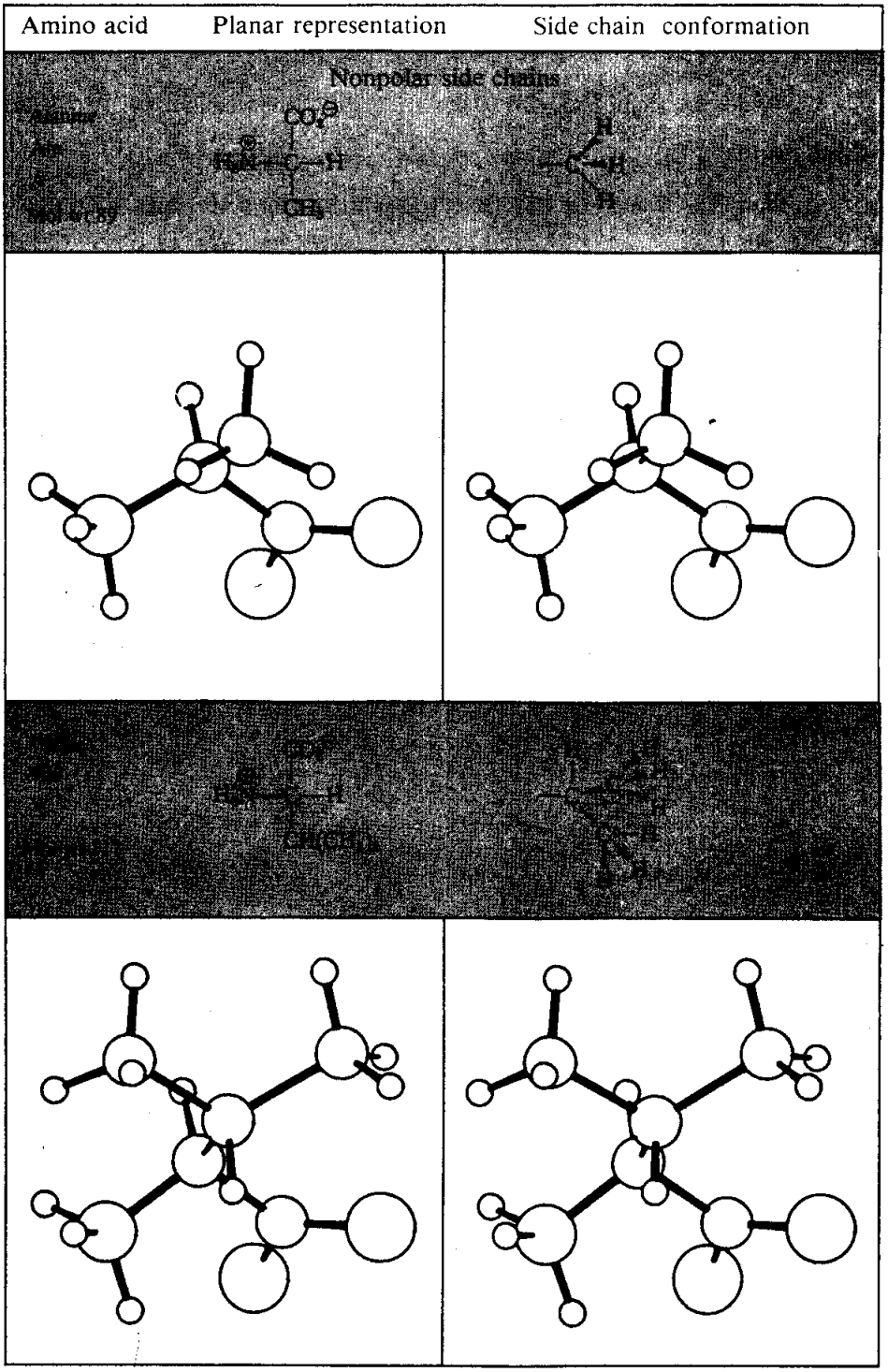
ทริปโทเฟน และเมไธโอนีน

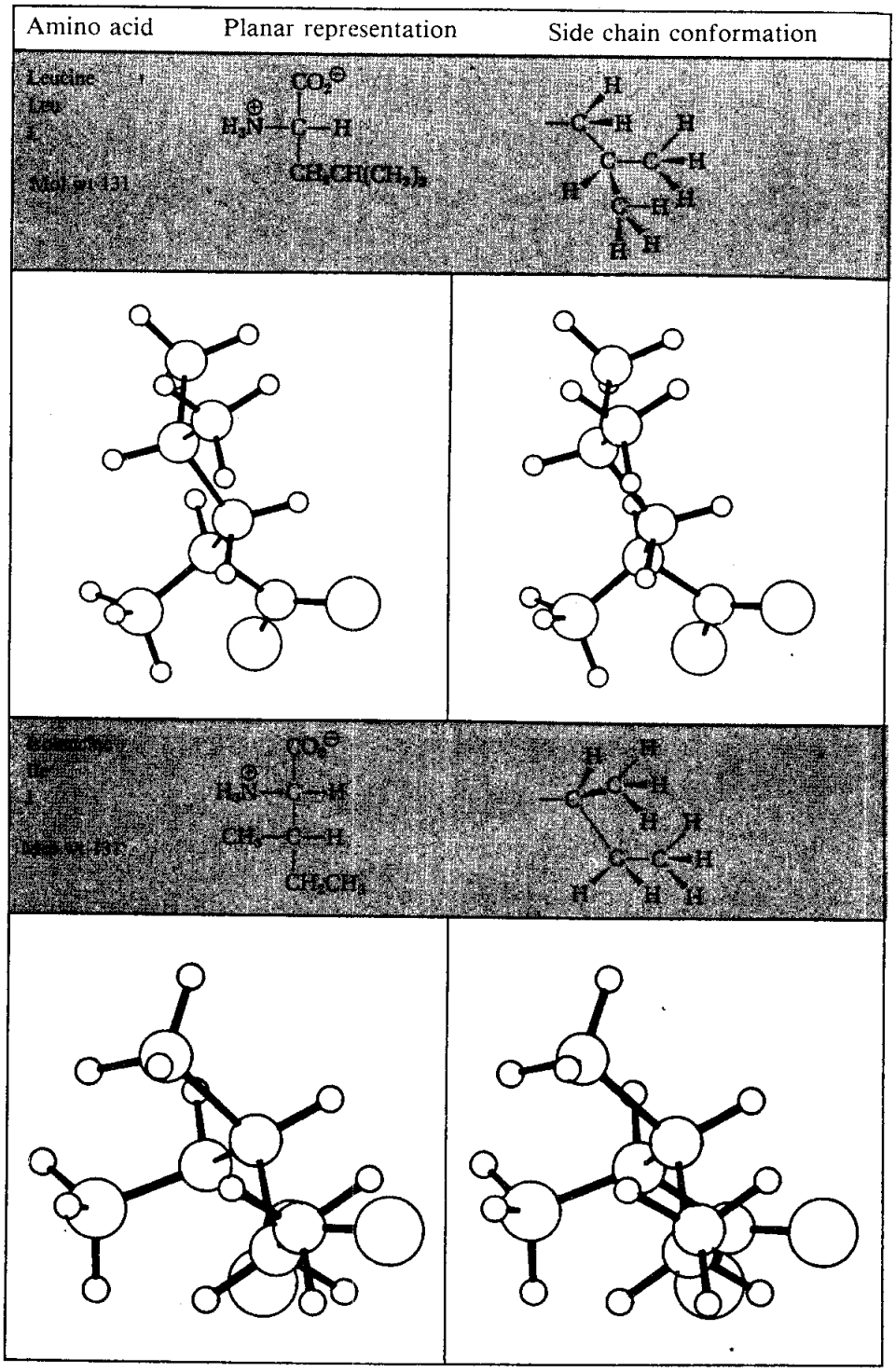
2. Polar side chain group กรดอมิโนหมู่นี้จะไม่มีประจุของ side chain เลยเมื่ออยู่ที่ pH 7.0 ได้แก่ ไกลซีน ซีรีน ธรีโอนีน ซิสเตอีน ไทโรซีน แอสพาราจีน และกลูตามีน

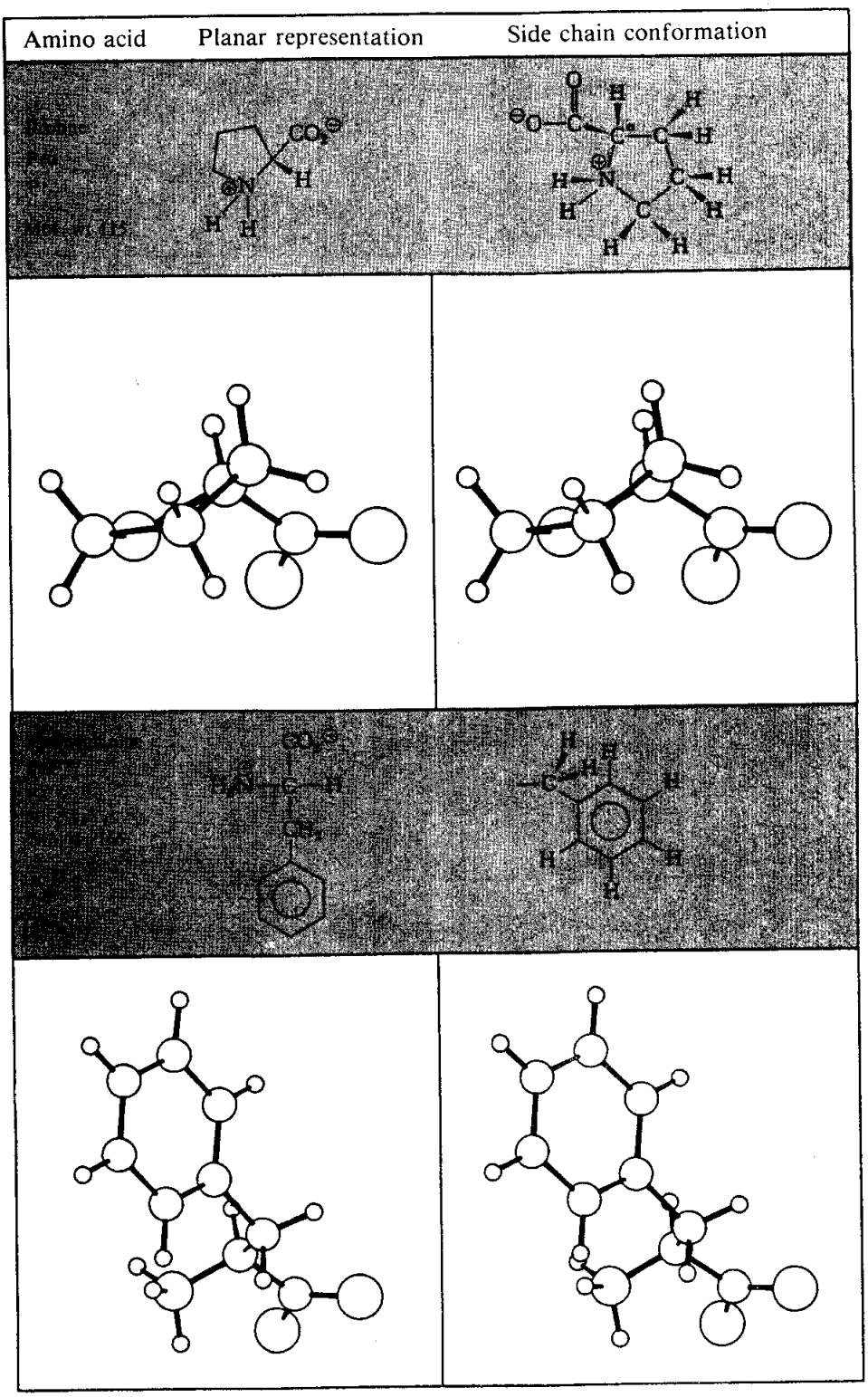
3. Acidic side chain group พวกนี้จะมีประจุของ side chain เป็นลบที่ pH 7.0 ได้แก่ กรดแอสพาติค และกรดกลูตามิค

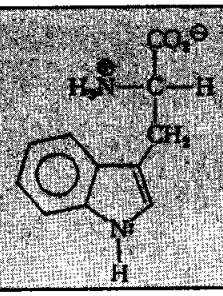
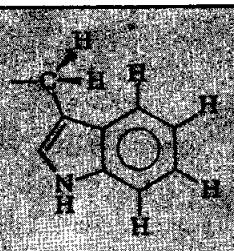
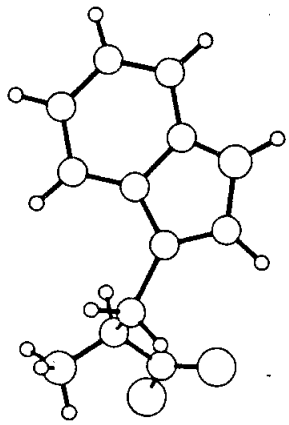
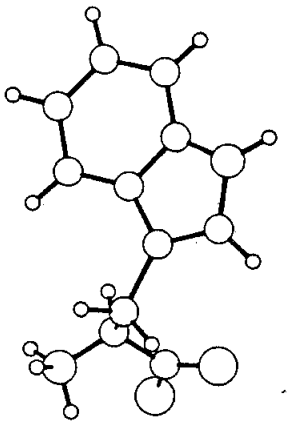
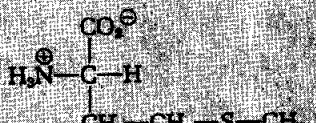
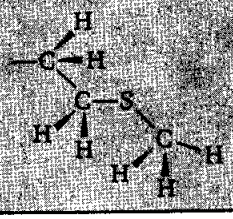
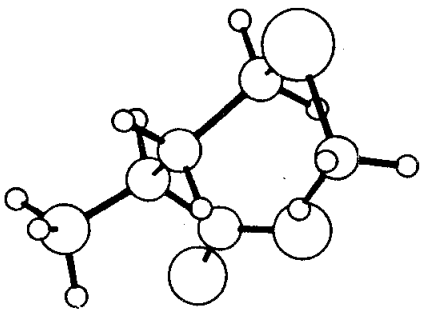
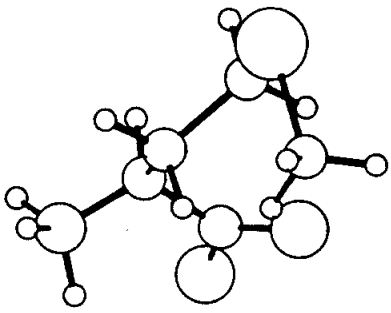
4. Basic side chain group กรดอมิโนหมู่นี้จะมีประจุของ side chain เป็นบวกที่ pH 7.0 มีสามชนิดด้วยกันคือ ไลซีน อาร์จินีน และฮิสทีดีน สำหรับฮิสทีดีนจะมีประจุเป็นบวกอย่างมากที่ pH 6.0

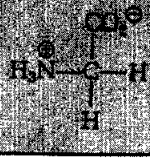
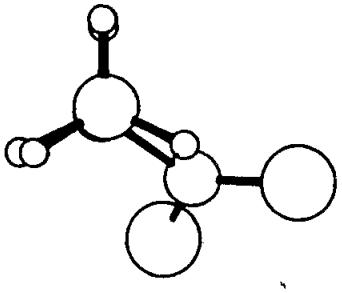
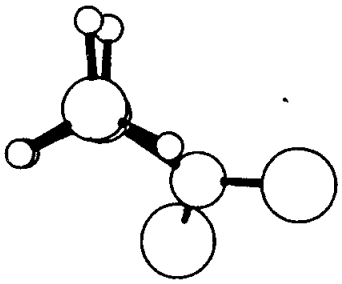
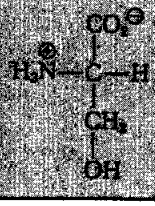
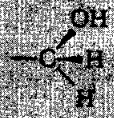
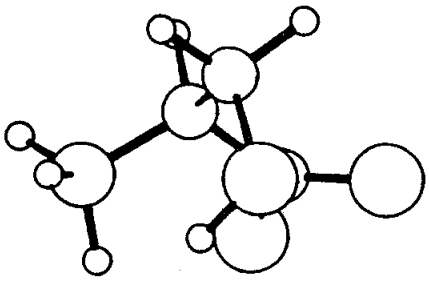
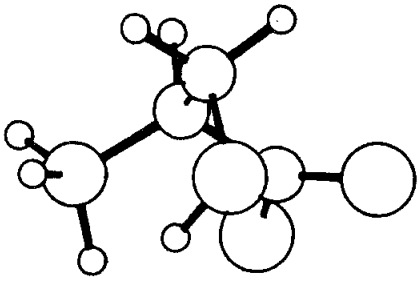
ชื่อ สูตร และโครงสร้างของกรดอมิโน แสดงไว้ในตารางที่ 8-1

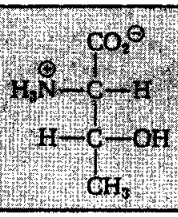
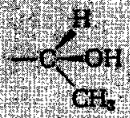
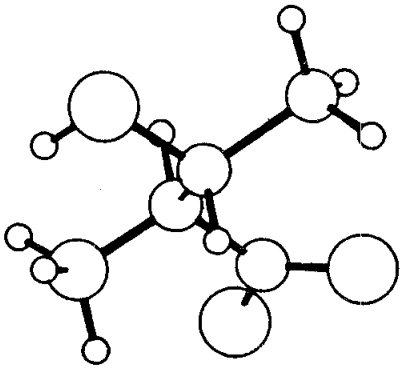
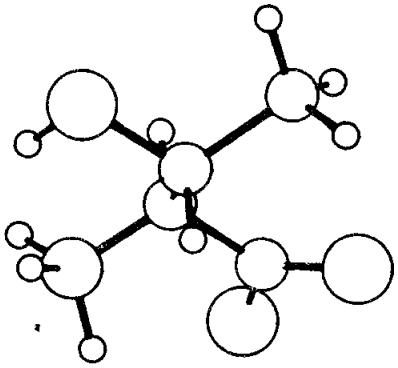
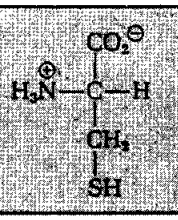
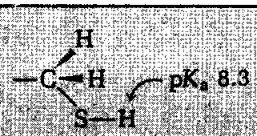
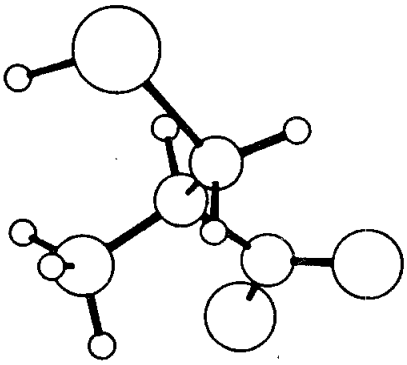
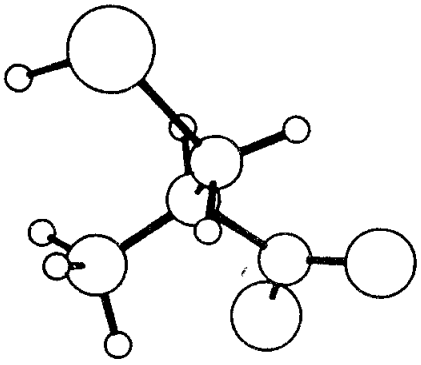


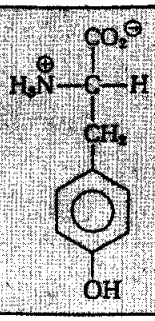
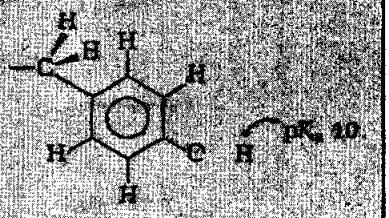
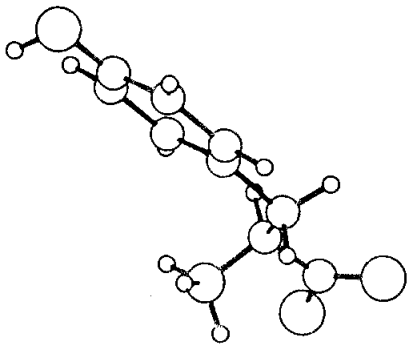
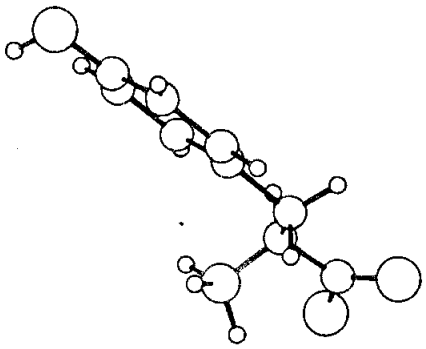
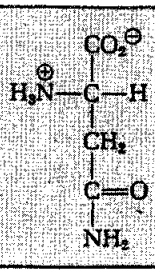
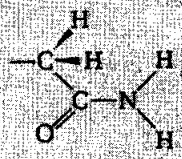
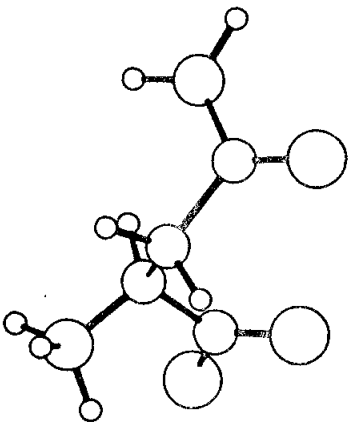
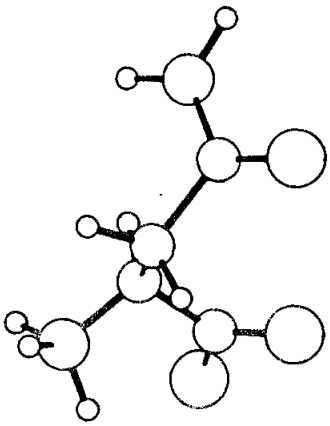

Amino acid
Planar representation
Side chain conformation

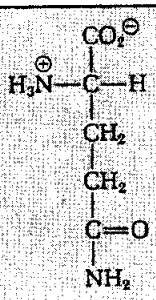
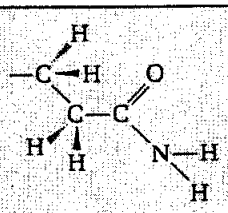
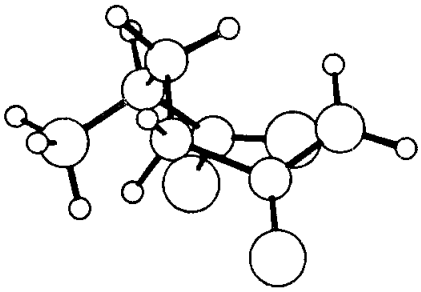
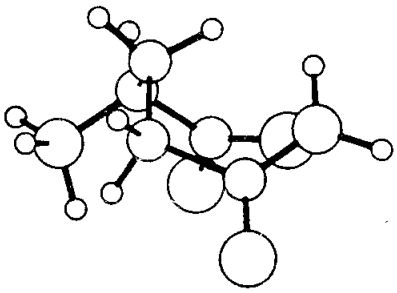
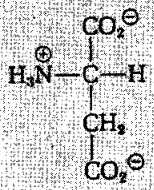
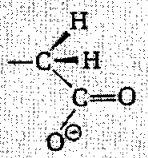
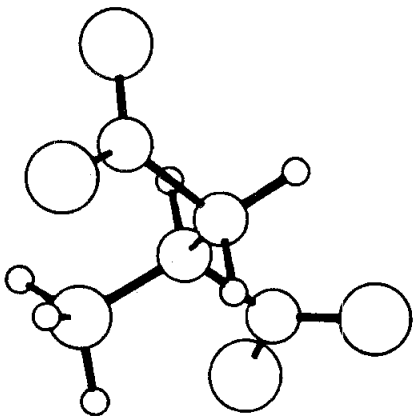
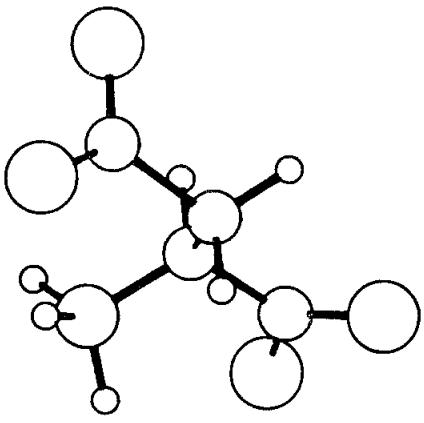

Amino acid
Planar representation
Side chain conformation

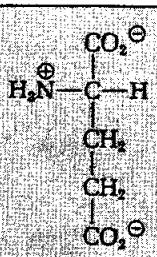
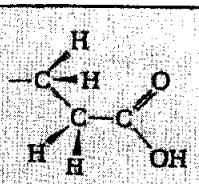
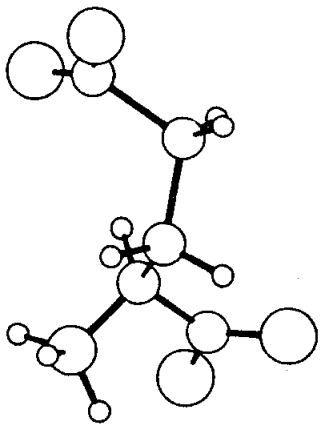
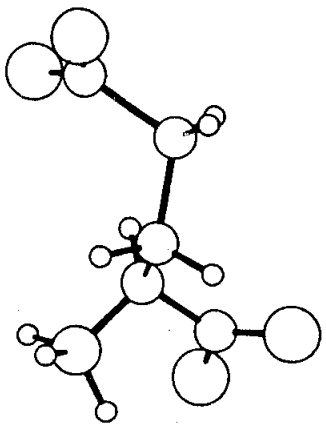
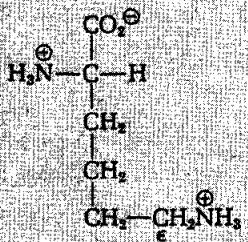
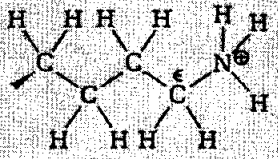
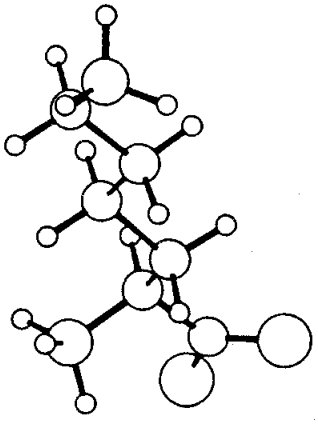
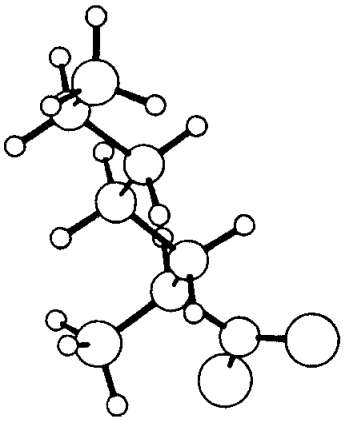
Amino acid	Planar representation	Side chain conformation
Tryptophan Trp W Mol wt 204		
		
Methionine Met M Mol wt 149		
		

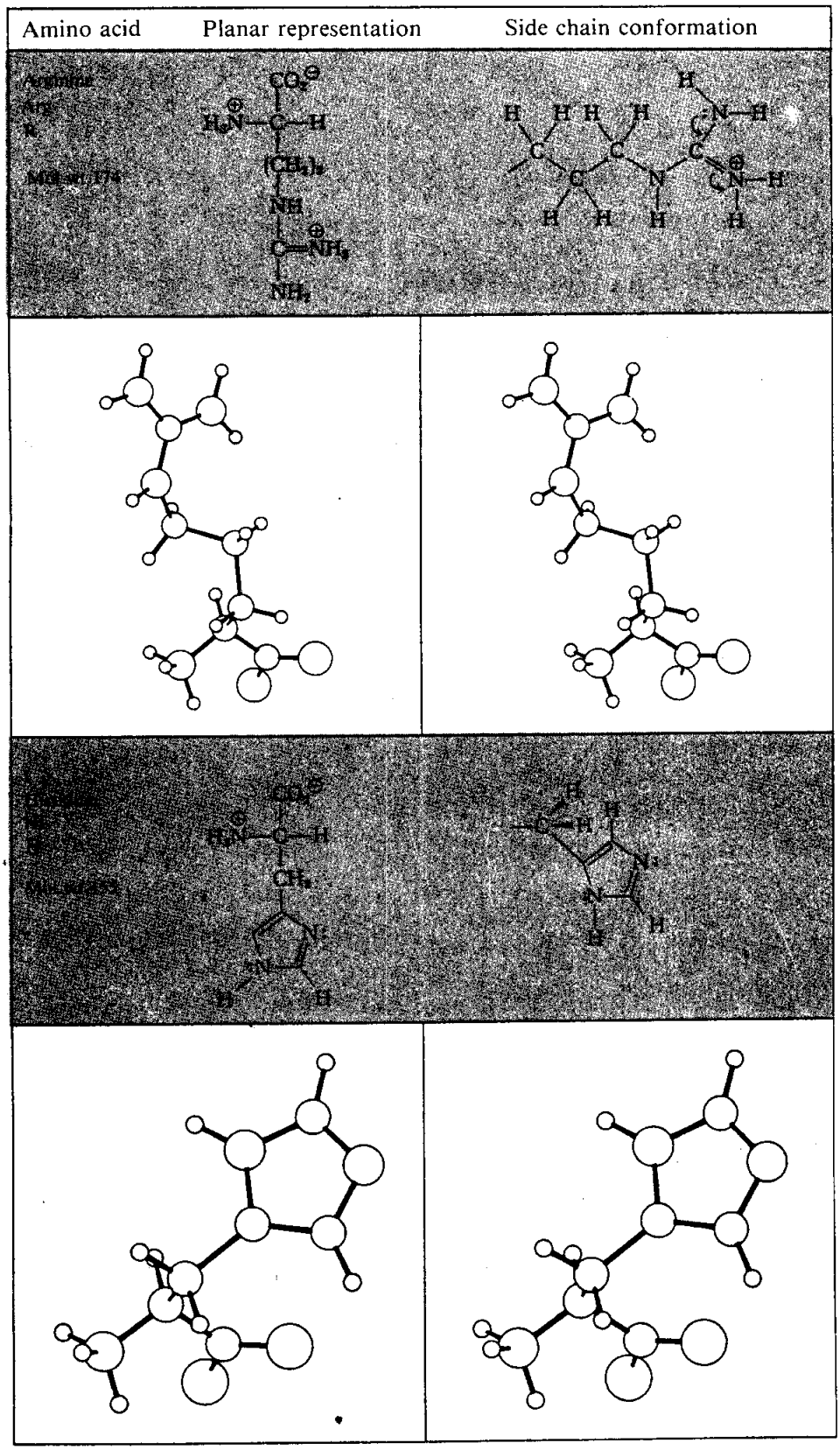
Amino acid	Planar representation	Side chain conformation
Polar side chains		
Glycine Gly G Mol wt 75		
		
		
Serine Ser S Mol wt 105		
		
		

Amino acid	Planar representation	Side chain conformation
Threonine Thr T Mol wt 119		
		
Cysteine Cys C Mol wt 121		
		

Amino acid	Planar representation	Sid chain conformation
Tyrosine Tyr Y Mol wt 181		
		
Asparagine Asn N Mol wt 132		
		

Amino acid	Planar representation	Side chain conformation
Glutamine Gln Q Mol wt 146		
		
Acidic side chains Aspartic acid Asp D Mol wt 133		
		

Amino acid	Planar representation	Side chain conformation
Glutamic acid Glu E Mol wt 147		
		
Basic side chains		
Lysine Lys K Mol wt 146		
		



ตารางที่ 8-1 ชื่อ สูตร และโครงสร้างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน ในตารางนี้จะแสดงรูปแบบของการแตกตัวที่มากที่สุดที่ pH 7.0

8.2.2 **การจำแนกตามโครงสร้างของ** side chain แบ่งออกได้เป็น 7 พวก ดังนี้

1. Aliphatic side chains กรดอมิโนหมู่นี้จะมี side chain เป็นไฮโดรคาร์บอน ยกเว้นไกลซีนอันเป็นกรดอมิโนตัวที่ง่ายที่สุด ซึ่งจะมี side chain เป็นไฮโดรเจน แต่อย่างไรก็ดี ไกลซีนก็ถูกจัดอยู่ในหมู่นี้ด้วย สำหรับกรดอมิโนตัวอื่น ๆ ของหมู่นี้จะได้แก่

อลานีน ซึ่งมี side chain เป็น เมธิล
แวลีน ซึ่งมี side chain เป็น isopropyl
ลิวซีน ซึ่งมี side chain เป็น isobutyl
และ ไอโซลิวซีน ซึ่งมี side chain เป็น sec-butyl

ลิวซีนและไอโซลิวซีนจะมีสูตรโมเลกุลเหมือนกัน และเป็นไอโซเมอร์ซึ่งกันและกันด้วย สำหรับโพรลีนจะเป็นกรดอมิโนเพียงตัวเดียวที่มีหมู่อัลฟาอมิโนอยู่ในวงแหวน ทำให้หมู่อมิโนของโพรลีนนี้เป็นเซกันดารี่เอมีน ถ้ามองในแง่เคมี โพลีนจะเป็นกรดอิมิโน (imino acid) แต่ถ้ามองในแง่ชีวเคมีแล้ว โพรลีนก็จะถูกจัดเป็นกรดอมิโนธรรมดาตัวหนึ่ง

2. hydroxylic side chains กรดอมิโนในหมู่นี้ได้แก่ ซีรีน และ ธรีโอนีน ทั้งสองตัวนี้จะมี aliphatic side chain ซึ่งมีหมู่ –OH อยู่ด้วย

3. aromatic side chains กรดอมิโนที่มีวงแหวนอโรมาติค (aromatic ring) ใน side chain มีด้วยกัน 3 ตัว คือ เฟนิลอลานีน ซึ่งเกิดจากการที่ methyl hydrogen ตัวหนึ่งของอลานีน ถูกแทนที่ด้วยหมู่เฟนิล ไทโรซีน ซึ่งเกิดจากการที่วงแหวนเฟนิล (phenyl ring) ของเฟนิลอลานีนถูกแทนที่ด้วยหมู่ phenolic hydroxyl ที่ตำแหน่ง para และทริปโทเฟน ซึ่งวงแหวนอโรมาติคของกรดอมิโนตัวนี้เป็นอนุพันธ์อันสืบเนื่องมาจาก indole

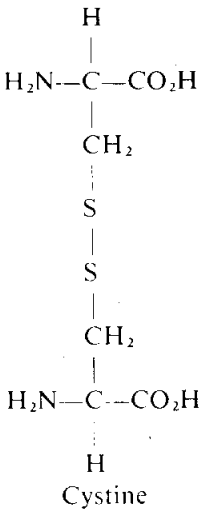
4. acidic side chains กรดอมิโนหมู่นี้ได้แก่ กรดแอสพาติคและกรดกลูตามิค ซึ่งมี side chain ลงท้ายด้วยหมู่ –COOH ที่ pH ประมาณ 7 หมู่คาร์บอกซีลิคนี้จะแตกตัว ทำให้กรดอมิโนทั้งสองนี้มักจะถูกเรียกชื่อในรูปของคาร์บอกซีเลทอิออน คือ แอสพาเตท และกลูตาเมท ตามลำดับ

5. amide side chains แอสพาราจีนและกลูตามีนเป็นเอมีดของกรดแอสพาติคและกรดกลูตามิคตามลำดับ side chain ของกรดอมิโนหมู่นี้จะเป็นกลางที่ pH 7.0

6. basic side chains ในหมู่นี้จะมีกรดอมิโน 3 ตัว ด้วยกัน ซึ่งประกอบด้วยไนโตรเจนที่มีความเป็นเบสอย่างอ่อน ๆ แต่อย่างไรก็ดี ไนโตรเจนของไลซีนและอาร์จินีนก็มีความเป็นเบส

แก่พอที่จะดึงเอาโปรตอนมาจากน้ำได้ที่ pH 7.0 ดังนั้น ที่ pH นี้ side chain ของไลซีนและอาร์จินีนจะมีประจุบวก ส่วนไนโตรเจนใน side chain ของฮิสทีดีนจะมีความเป็นเบสที่อ่อนกว่าของในกรดอมิโนสองตัวแรกนั้น ดังนั้น ที่ pH 7.0 side chain เพียงประมาณครึ่งหนึ่งของฮิสทีดีนเท่านั้นที่จะมีประจุบวก

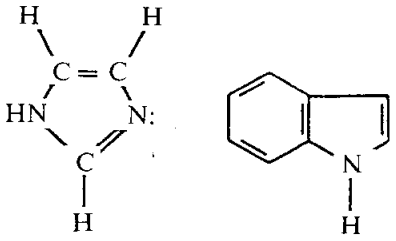
7. sulfur-containing side chains กรดอมิโนหมู่นี้ที่พบบ่อยมี 2 ตัว คือ เมไธโอนีนและซิสเตอีน ซิสเตอีนมักจะพบในรูปที่เชื่อมต่อยู่กับซิสเตอีนอีกโมเลกุลหนึ่ง โดยใช้พันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-) ทำให้เกิดเป็นกรดอมิโนซิสตีน (cystine) ขึ้น



Cystine

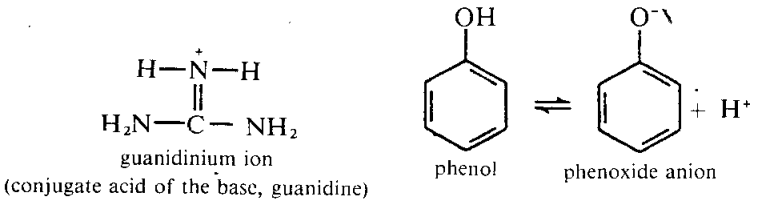
การจำแนกกรดอมิโนตามวิธีแรก (หัวข้อ 8.2.1) จะมีความเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของโปรตีนที่มีกรดอมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเช่น กรดอมิโนประเภท nonpolar side chain มักจะเป็นส่วนประกอบภายในของโปรตีนที่มีตัวทำละลายมิใช่น้ำ กรดอมิโนประเภท polar side chain สามารถทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนได้ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องในการทำพันธะกับอิออนของโลหะอีกด้วย โดยที่อีเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยว (lone pairs of electron) ของออกซิเจน ไนโตรเจน หรือซัลเฟอร์อะตอมในside chain จะเป็นตัวทำปฏิกิริยากับอิออนของโลหะ การทำพันธะชนิดนี้ มีข้อยกเว้นสำหรับกรดอมิโนตัวหนึ่งคือไกลซีน ซึ่งจะไม่เกิดพันธะ หมู่โพลาร์มักจะอยู่ที่บริเวณผิวหน้าของโปรตีนโมเลกุลและสัมผัสกับตัวทำละลายที่เป็นโพลาร์ สำหรับกรดอมิโนที่ side chain มีประจุบวกหรือลบ จะสามารถทำปฏิกิริยาอิออนิคได้กับหมู่ที่มีประจุตรงข้าม หรือหมู่โพลาร์ที่ไม่มีประจุ

side chain บางหมู่จะมีความสัมพันธ์กับสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่น่าสนใจอีกด้วย เช่น side chain ของฮิสทีดีนเป็นหมู่อิมิดาโซล ซึ่งไนโตรเจนอะตอมในหมู่นี้มีอีเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยว จึงสามารถรับโปรตอนหรือทำหน้าที่เป็นลิแกนด์ (ligand) ที่จับตัวกับอิออนของโลหะได้ side chain ของทริปโทเฟนเป็นหมู่อินโดล (indole) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารที่พบในธรรมชาติหลายชนิด



imidazole indole

side chain ของอาร์จินีนเป็นหมู่กัวนิดิเนียม (guanidinium) ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และมีคุณสมบัติเป็นเบสที่แก่กว่าแอมโมเนียถึงหนึ่งพันเท่า สุดท้ายคือ side chain ของไทโรซีนอันเป็นหมู่ฟีนอล จึงสามารถแตกตัวให้โปรตอนได้



guanidinium ion
(conjugate acid of the base, guanidine)

phenol phenoxide anion

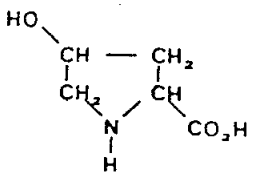
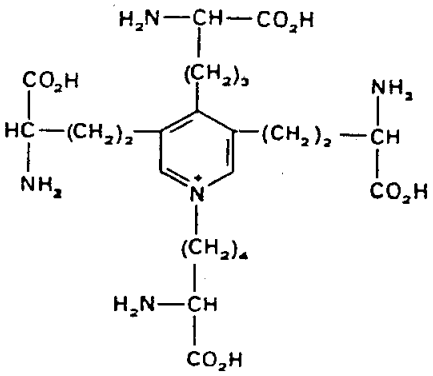
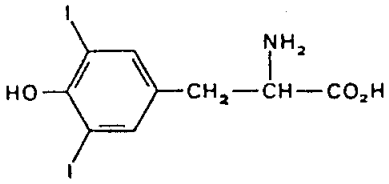
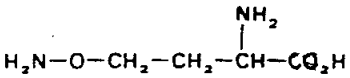
การเรียกชื่อกรดอมิโน มักจะเรียกโดยใช้ชื่อสามัญมากกว่าที่จะใช้ชื่อตามระบบ IUPAC เนื่องจากสั้นและสะดวกกว่า ตัวอย่างเช่น กรดอมิโนตัวแรกที่ถูกค้นพบได้แก่ แอสพาราจีน และที่ได้ชื่อนี้ก็เพราะสกัดได้จากโปรตีนที่พบในน้ำคั้นแอสพารากัส ส่วนไกลซีนซึ่งเป็นกรดอมิโนที่สำคัญของวุ้น (gelatin) ก็ได้ชื่อมาจากการที่มีรสหวาน (ภาษากรีก glykys แปลว่า หวาน) นอกจากนี้

ยังมีการเรียกชื่อย่อของกรดอมิโนด้วย โดยมีทั้งระบบที่ใช้อักษรย่อ 3 ตัว และระบบที่ใช้อักษรย่อ 1 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 8–2

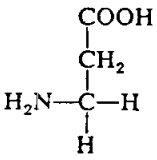
กรดอมิโน	รหัสสามตัว	รหัสตัวเดียว
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
(Asn + Asp)	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
(Gln + Glu)	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ตารางที่ 8-2 ชื่อย่อของกรดอมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน

นอกเหนือจากกรดอมิโน 20 ชนิด ที่กล่าวมาแล้ว ยังมีกรดอมิโนอีกมากกว่า 200 ชนิด ที่พบในธรรมชาติ โดยที่จะไม่ได้เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเลย กรดอมิโนเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญทางชีววิทยาคือ เป็นตัวกลางในวิถีเมตาบอลิสมต่าง ๆ หรือเป็นส่วนประกอบของชีวโมเลกุลอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โปรตีน ตัวอย่างของกรดอมิโนพวกนี้แสดงอยู่ในตารางที่ 8–3

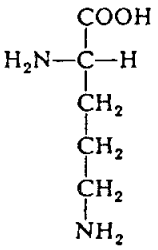
กรดอมิโน	โครงสร้าง	หน้าที่/สถานที่พบ
4-hydroxyproline		พบในโปรตีนคอลลาเจน
demosine		พบในโปรตีนอีลาสติน (elastin) ทำให้โปรตีนยืดตัวได้
3, 5-diiodotyrosine		เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมของไอโอดีนในต่อมไธรอยด์
Canaline		เป็นกรดอมิโนมีพิษที่สกัดออกมาได้จากถั่ว jack bean

β-alanine



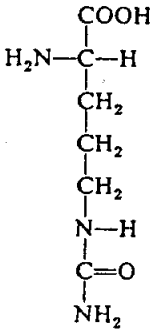
เป็นส่วนในโครงสร้างของไวตามินตัวหนึ่งคือ กรดแพนโตเธนิค (pantothenic acid)

ornithine



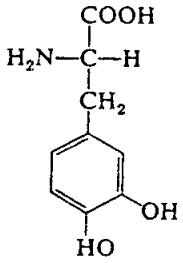
เป็นสารตัวกลางที่พบในขบวนการสังเคราะห์ยูเรีย

citrulline



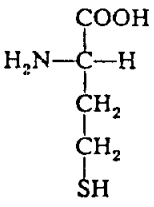
เป็นสารตัวกลางที่พบในขบวนการสังเคราะห์ยูเรีย

dihydroxyphenyl-alanine (DOPA)

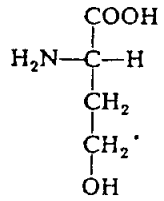


เป็นสารตัวกลางที่พบในขบวนการสังเคราะห์อดรีนาลิน (adrenalin)

homocysteine



เป็นสารตัวกลางที่พบในขบวนการสังเคราะห์เมไธโอนีน

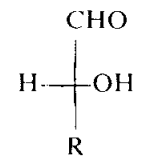
homoserine		เป็นสารตัวกลางที่พบในขบวนการสังเคราะห์ธรีโอนีน

ตารางที่ 8-3 โครงสร้างและหน้าที่ของกรดอมิโนบางชนิด ที่ไม่พบเป็นส่วนประกอบของโปรตีน

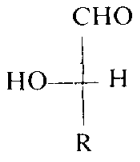
8.3 สเตียริโอไอโซเมอร์ของกรดอมิโน

ถ้าดูโครงสร้างทั่วไปของกรดอมิโน จะพบว่านอกจากไกลซีนแล้ว กรดอมิโนตัวอื่น ๆ จะมีหมู่ที่แตกต่างกัน 4 หมู่เกาะ อยู่ที่อัลฟาคาร์บอน ดังนั้น ก็จะทำให้เกิดไอโซเมอร์ขึ้นได้ โดยการที่จะดูว่าเป็นกรดอมิโนชนิด D หรือ L นั้น อาศัยกลีเซอราลดีไฮด์เป็นหลัก เช่นเดียวกับในกรณีของคาร์โบไฮเดรท ถ้าสังเคราะห์กรดอมิโนขึ้นมาในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ปฏิกิริยาที่มิได้ควบคุมทางด้านสเตียริโอเคมีแล้ว จะได้ของผสมระหว่างกรดอมิโนชนิด D และ L จำนวนเท่ากันเกิดขึ้น เรียกของผสมนี้ว่า racemic mixture หรือ racemate ตัวอย่างได้แก่ racemic mixture ของ D- และ L-alanine ซึ่งจะเขียนแทนว่า DL-alanine

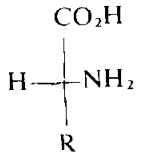
ในโปรตีนจะพบเฉพาะกรดอมิโนชนิด L และกรดอมิโนชนิด D จะไม่พบในเมตาบอลิสมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ๆ เลย พบเฉพาะในโครงสร้างหรือรวมตัวอยู่กับสารอื่นของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเท่านั้น ตัวอย่างเช่น ผนังเซลล์ของบักเตรีบางชนิดจะมี D-alanine เป็นส่วนประกอบ หรือยาปฏิชีวนะที่สกัดได้จากบักเตรี ก็จะมีกรดอมิโนชนิด D อยู่ในโมเลกุลด้วย ตัวอย่างได้แก่ gramicidin S (รูปที่ 8–2)



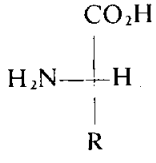
D-Glyceraldehyde



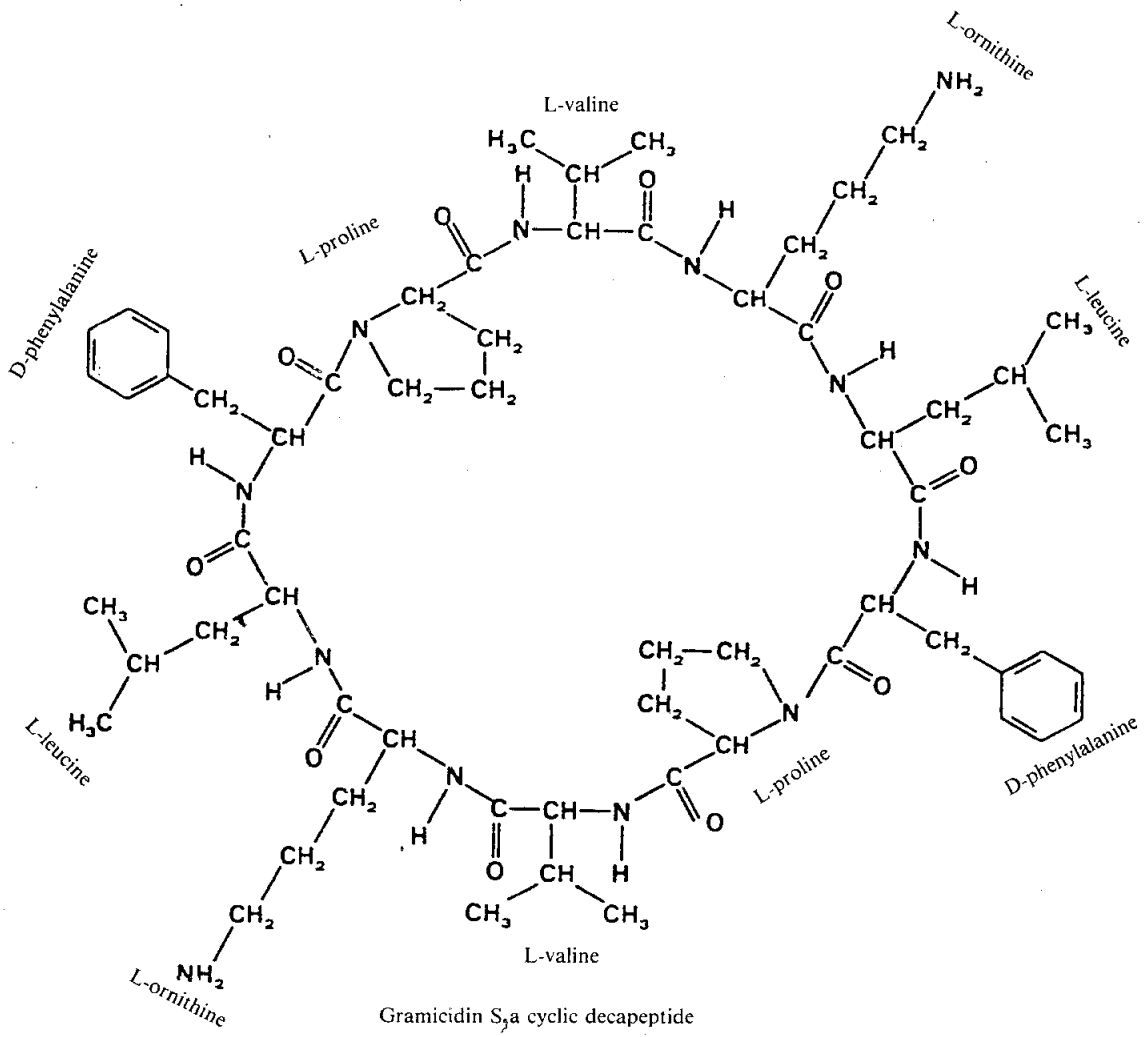
L-Glyceraldehyde



D-Amino acid



L-Amino acid

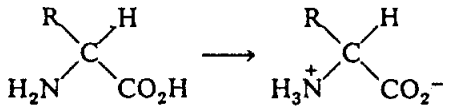


Gramicidin S, a cyclic decapeptide

รูปที่ 8-2 โครงสร้างของ gramicidin S *อันเป็นยาปฏิชีวนะที่สกัดได้จากบักเตรี ประกอบขึ้นจากกรดอมิโน 10 ตัว มาเรียงต่อกันเป็นวงปิด และพบว่ามีกรดอมิโนชนิด* D *อยู่ด้วย สิ่งที่น่าสนใจอีกประการก็คือ พบว่า* L-proline *จะมีการวางตัวที่แปลกกว่ากรดอมิโนชนิดอื่น*

8.4 คุณสมบัติในการแตกตัวของกรดอมิโน

กรดอมิโนเป็นสารประกอบที่สามารถแตกตัวได้ โดยที่โปรตอนซึ่งมีความเป็นกรดอ่อนของหมู่คาร์บอกซีลิค จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังหมู่อมิโน ซึ่งมีความเป็นเบสอ่อน แล้วทำให้เกิด internal salt ขึ้น

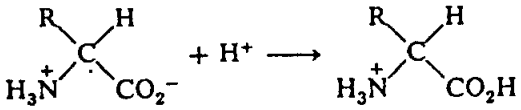


Amino acid Internal salt (zwitterion)

Internal salt ของกรดอมิโนนี้เรียกว่า Zwitterions ซึ่งกรดอมิโนที่อยู่ในสถานะเป็นของแข็งบริสุทธิ์และอยู่ในสภาพละลายน้ำที่ pH เป็นกลางส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ Zwitterions นี้

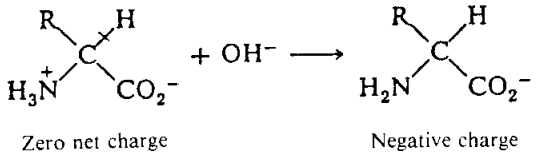
8.4.1 Isoelectric point

Zwitterion ของกรดอมิโนที่ side chain ไม่มีประจุนั้น จะมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ เนื่องจากประจุบวกที่หมู่อมิโนและประจุลบที่หมู่คาร์บอกซิลจะหักล้างกันหมด กรดอมิโนใด ๆ ก็ตามที่มีประจุบวกและลบอยู่ในสมดุลย์พอดี จะอยู่ที่ isoelectric point (pI) และ pH ที่ทำให้เกิดการสมดุลย์นี้ก็คือ isoelectric pH pI ของกรดอมิโนที่ side chain ไม่มีประจุมักจะอยู่ที่ pH ประมาณ 7 ซึ่งที่จุดนี้การละลายของกรดอมิโนจะต่ำสุด เนื่องจากมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ ถ้าค่า pH ต่ำลง กรดอมิโนจะมีการละลายมากขึ้น เนื่องจากคาร์บอกซีเลทอิออนของ Zwitterion จะรับโปรตอนจากสารละลายทำให้ประจุสุทธิเป็นบวก



Zero net charge Positive charge

ที่ pH สูงขึ้น การละลายของกรดอมิโนก็จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากโปรตอนของแอมโมเนียมอิออน จะถูกดึงออกไปจาก Zwitterion ทำให้ประจุสุทธิของกรดอมิโนเป็นลบ

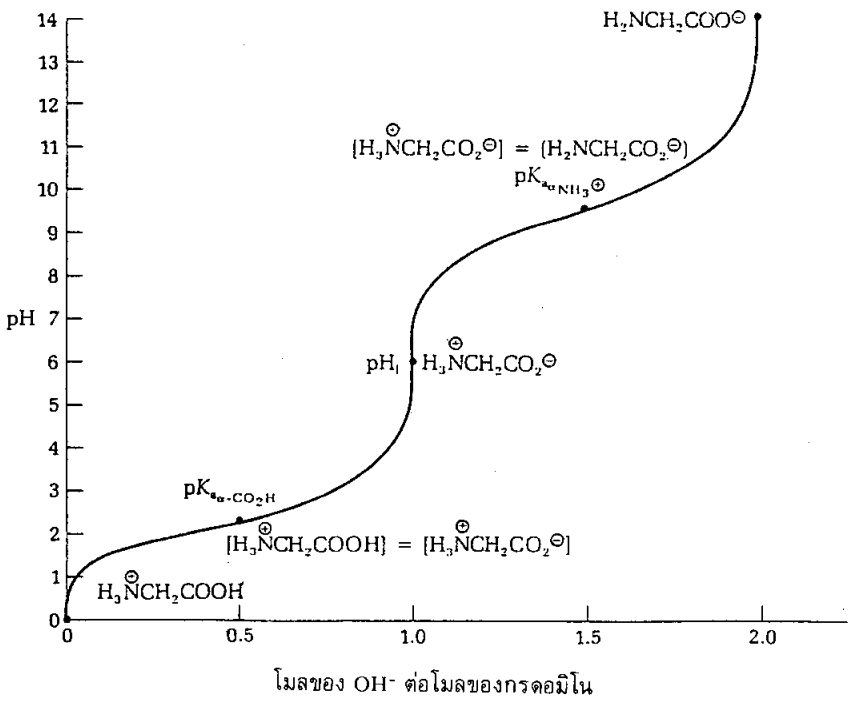


ค่า pK_a ในการแตกตัวของหมู่ฟังก์ชั่นและค่า pI ของกรดอมิโน แสดงไว้ในตารางที่ 8–4

กรดอมิโน	pK_a ของ α-COOH	pK_a ของ α-NH_3^+	pK_a ของหมู่ R	pI
อลานีน	2.35	9.69		6.0
อาร์จินีน	2.17	9.04	12.48	10.8
แอสพาราจีน	2.02	8.8		5.4
กรดแอสพาติค	2.09	9.82	3.86	3.0
ซิสเตอีน	1.71	10.78	8.33	5.0
กรดกลูตามิค	2.19	9.67	4.25	3.2
กลูตามีน	2.17	9.13		5.7
ไกลซีน	2.34	9.6		6.0
ฮิสทีดีน	1.82	9.17	6.0	7.6
ไอโซลิวซีน	2.36	9.68		6.1
ลิวซีน	2.36	9.60		6.0
ไลซีน	2.18	8.95	10.53	9.8
เมไธโอนีน	2.28	9.21		5.8
เฟนิลอลานีน	1.83	9.13		5.5
โพรลีน	1.99	10.60		6.3
ซีรีน	2.21	9.15		5.7
ธรีโอนีน	2.63	10.43		6.5
ทริปโทเฟน	2.38	9.39		5.9
ไทโรซีน	2.20	9.11	10.07	5.7
แวลีน	2.32	9.62		6.0

ตารางที่ 8-4 ค่า pK_a ที่ 25°ซ และค่า pI ของกรดอมิโนทั้ง 20 ชนิด

8.4.2 การไตเตรทกรดอมิโน เมื่อไตเตรทกรดอมิโนด้วยด่าง จะได้ titration curve ที่ซับซ้อนกว่าเมื่อไตเตรทกรดอ่อนธรรมดาด้วยด่างแก่ ทั้งนี้เพราะในโมเลกุลของกรดอมิโนจะมีหมู่ที่แตกตัวได้มากกว่า 1 หมู่ขึ้นไป ตัวอย่างการไตเตรทกรดอมิโนที่ง่ายที่สุดคือไกลซีน แสดงในรูปที่ 8-3



รูปที่ 8-3 titration curve *ของไกลซีน*

เนื่องจากไกลซีนมีหมู่ที่แตกตัวได้ 2 หมู่ ดังนั้น titration curve ของไกลซีนจะมี 2 ช่วง โดยช่วงแรกจะเป็นการไตเตรทหมู่คาร์บอกซิล และในช่วงหลังจะเป็นการไตเตรทหมู่อมิโน

ในช่วงแรกเมื่อยังไม่ได้เติมด่างนั้น ไกลซีนจะอยู่ในรูปที่มีโปรตอนเต็มที่ คือ

$$\underset{1}{H_3\overset{\oplus}{N}-CH_2-CO_2H} \rightleftharpoons \underset{2}{H_3\overset{\oplus}{N}-CH_2CO_2^{\ominus}} + H^{\oplus}$$

เมื่อค่อย ๆ เติมด่างลงไป หมู่คาร์บอกซิลจะแตกตัวเกิด zwitterion ขึ้น (โครงรูปหมายเลข 2)

$$\underset{1}{H_3\overset{\oplus}{N}-CH_2-CO_2H} + HO^{\ominus} \rightarrow \underset{2}{H_3\overset{\oplus}{N}-CH_2CO_2^{\ominus}} + H_2O$$

ที่จุดกึ่งกลางของ end-point ของช่วงแรก (คือเมื่อเติม OH^- ลงไป 0.5 อีควิวาเลนท์) นั้น ความเข้มข้นของไกลซีนในรูปแบบ (1) จะเท่ากับรูปแบบ (2) และ pH จะเท่ากับ $pK_{a_{\alpha-COOH}}$

เมื่อเติมด่างลงไปอีก titration curve จะเข้าสู่ช่วงหลัง คือ เป็นการไตเตรทหมู่ $\alpha-NH_3^+$ (โครงรูป 2) ให้กลายเป็น $\alpha-NH_2$ (โครงรูป 3) ดังสมการ

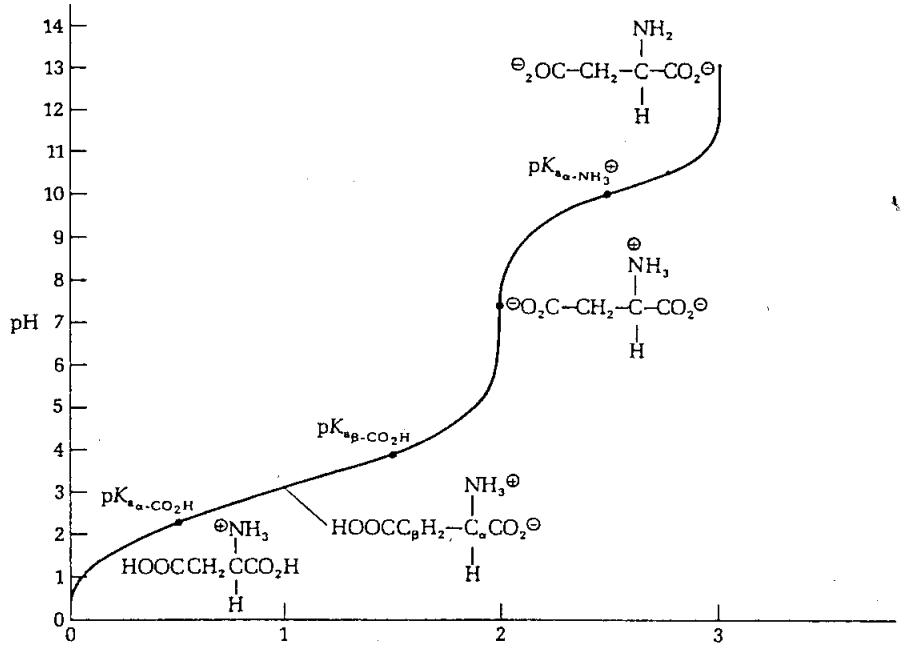
$$\underset{2}{H_3\overset{\oplus}{N}-CH_2-CO_2^{\ominus}} + HO^{\ominus} \rightarrow \underset{3}{H_2N-CH_2-CO_2^{\ominus}} + H_2O$$

และในทำนองเดียวกัน ที่จุดกึ่งกลางของ end-point ช่วงหลัง (คือเมื่อเติม OH^- ลงไปทั้งสิ้น 1.5 อีควิวาเลนท์) นั้น ความเข้มข้นของไกลซีนในรูปแบบ (2) จะเท่ากับรูปแบบ (3) และ pH จะเท่ากับ $pK_{a_{\alpha-NH_3}}$

จาก titration curve ของไกลซีนในรูปที่ 8-3 จะสามารถหาค่า pI ได้ด้วย โดย pI ของไกลซีนจะอยู่ตรง pH กึ่งกลางระหว่าง pK_a ของหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อมิโนพอดี ดังนั้น

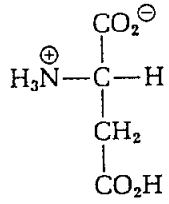
$$pI = \frac{1}{2}(pK_{a_{\alpha-COOH}} + pK_{a_{\alpha-NH_3}})$$

สมการสำหรับหาค่า pI เช่นนี้ จะใช้ได้เฉพาะกับกรดอมิโนที่เป็นกลางและไม่มีหมู่ side chain ที่แตกตัวได้เท่านั้น



รูปที่ 8-4 titration curve ของกรดแอสพาติค

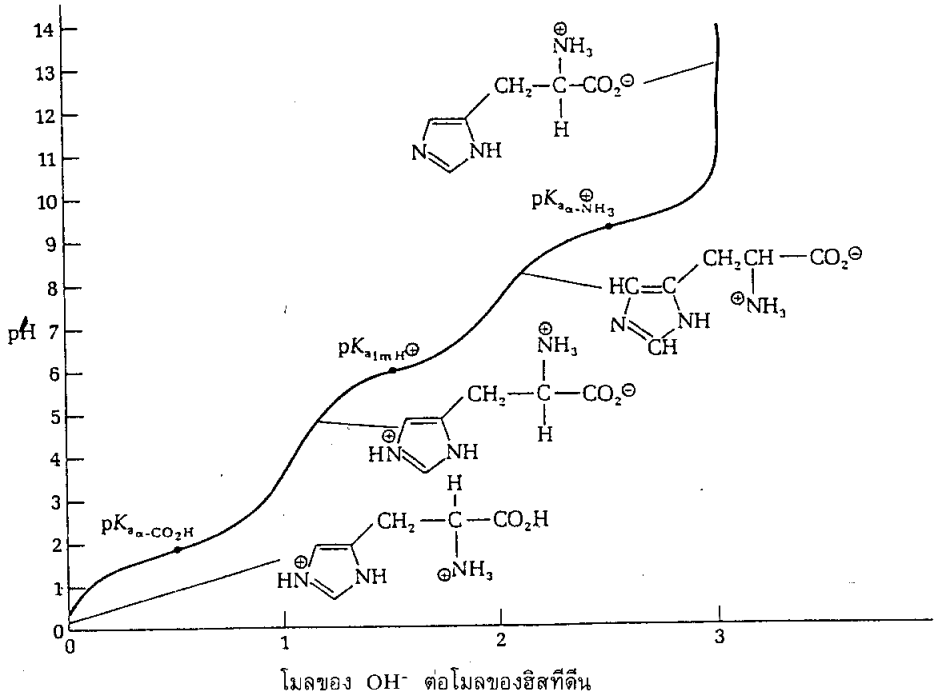
ถ้าค่า pK_a ของหมู่ที่แตกตัวได้ของกรดอมิโนอยู่ใกล้กันมาก ช่วงของ titration curve จะเหลื่อมทับกัน ตัวอย่างกรณีนี้พบในกรดแอสพาติค (รูปที่ 8–4) ซึ่งมีหมู่อัลฟาอมิโนที่ถูกเติมโปรตอน 1 หมู่ และคาร์บอกซิลอีก 2 หมู่ ซึ่งถูกเติมโปรตอนเพียงหมู่เดียว pI ของกรดแอสพาติค



Isoelectric aspartate

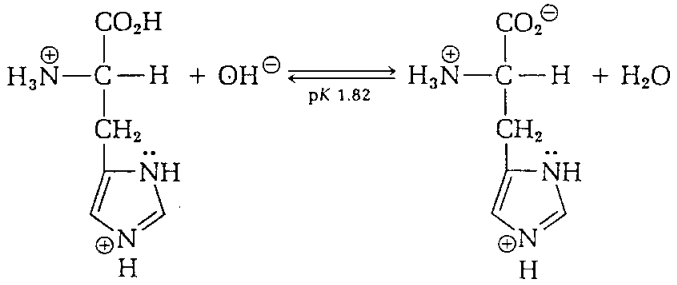
จะอยู่ตรงกึ่งกลางระหว่างค่า pK_a ของหมู่คาร์บอกซิลทั้งสอง

กรดอมิโนฮิสทีดีนจะมีหมู่ที่แตกตัวได้ 3 หมู่ เช่นกัน แต่เนื่องจากมีค่า pK_a ห่างกัน ดังนั้น titration curve จึงไม่เหลื่อมทับกัน (รูปที่ 8–5)

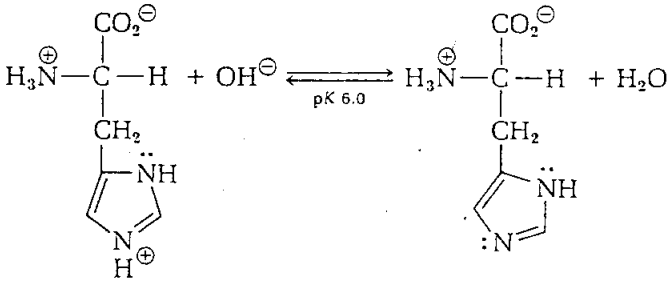


รูปที่ 8-5 titration curve *ของฮิสทีดีน*

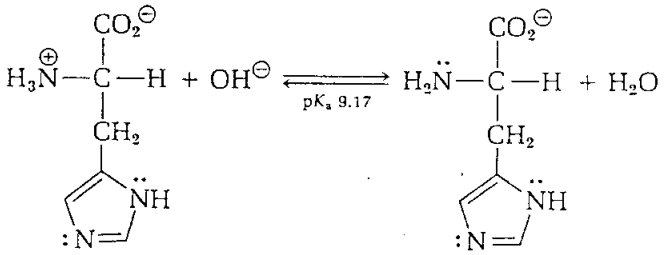
ที่ pH 1.82 หมู่อัลฟาคาร์บอกซิลจะแตกตัว ดังสมการ



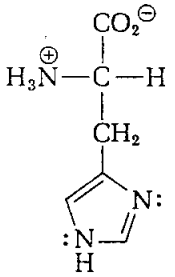
ส่วนที่ pH 6.0 จะมีการแตกตัวของอิมิดาโซเลียมอิออนที่ side chain



และที่ pH 9.17 หมู่อัลฟาอมิโนจะแตกตัว



ที่ pI ฮิสทีดีนจะอยู่ในรูปที่มีประจุลบที่อัลฟาคาร์บอกซิล ประจุบวกที่อัลฟาอมิโน ส่วนอิมิดาโซล ที่ side chain จะเป็นกลาง



Isoelectric species of histidine

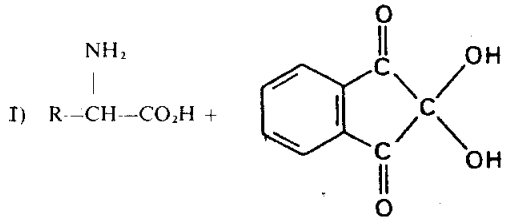
และค่า pI ของฮิสทีดีนจะหาได้จาก $pI = \frac{1}{2}(pK_{\alpha ImH^+} + pK_{\alpha\alpha-NH_3})$

8.5 คุณสมบัติทางเคมีของกรดอมิโน

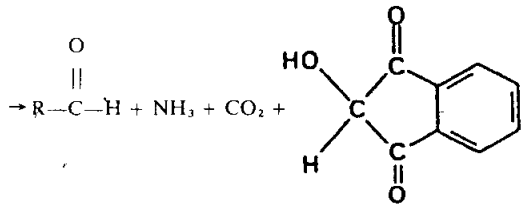
สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ คุณสมบัติเคมีของหมู่อมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ R (side chain) โดยการทดสอบหมู่อมิโนจะมีความสำคัญในการวิเคราะห์เชิงปริมาณเป็นอย่างมาก

8.5.1 ปฏิกิริยาของหมู่อมิโน ปฏิกิริยาของหมู่นี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) คือ อีเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยวของไนโตรเจนอะตอมในหมู่อมิโน จะสามารถทำพันธะได้กับรีเอเจนท์ชนิดต่าง ๆ ที่มีศูนย์กลางเป็นชนิดที่ขาดอีเล็คตรอน ตัวอย่างได้แก่

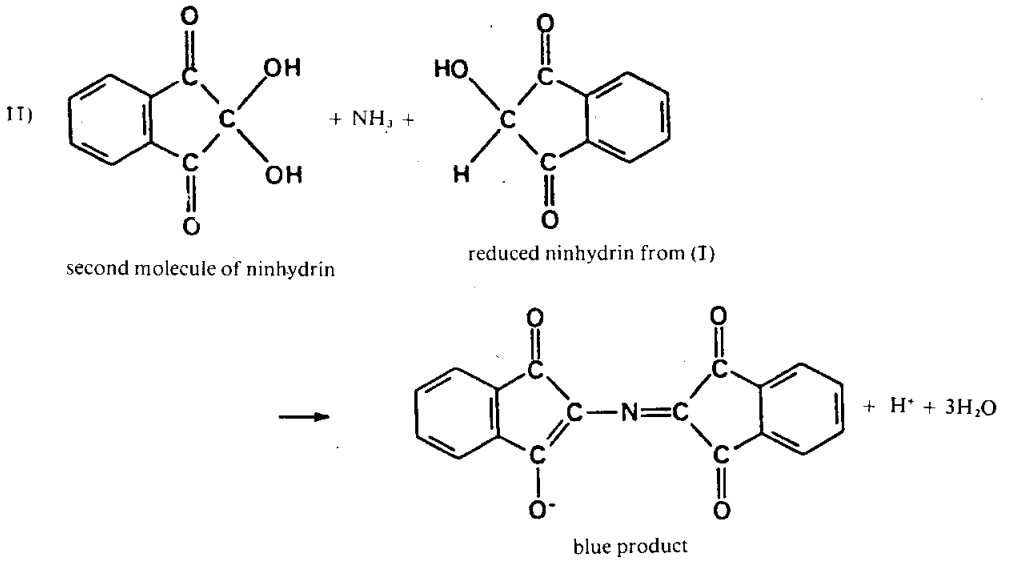
1. นินไฮดริน (ninhydrin) สามารถออกซิไดส์กรดอมิโนและเอมีนอื่น ๆ ได้ดังปฏิกิริยา



triketohydrindene hydrate (ninhydrin)

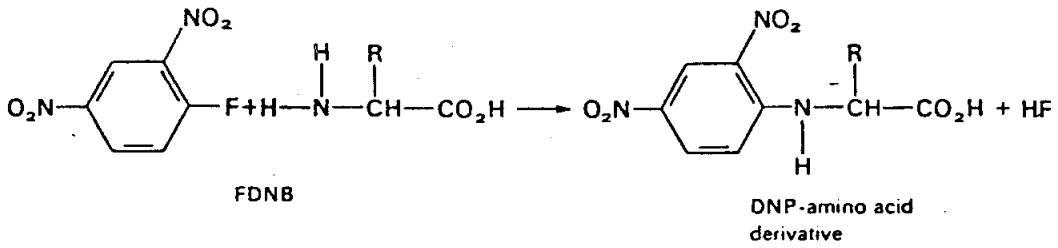


reduced ninhydrin



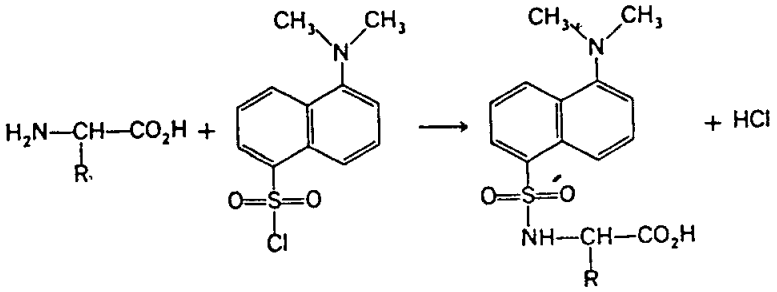
จะเห็นว่าปฏิกิริยานี้ใช้นินไฮดรินเป็นจำนวน 2 เท่าของกรดอมิโน แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีเกิดขึ้น โดยกรดอมิโนทุกตัวจะให้สีน้ำเงิน ยกเว้นโพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นกรดอิมิโนจะให้สีเหลือง ในกรณีที่ต้องการวิเคราะห์เชิงปริมาณ จะทำได้ 2 วิธี วิธีหนึ่ง คือนำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปวัดค่าการดูดแสง (absorbance) โดยผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่เรียกว่า Ruheman's Blue จะดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ส่วนผลิตภัณฑ์สีเหลืองจากโพรลีนและไฮดรอกซี–โพรลีน จะดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 440 นาโนเมตร วิธีที่สอง ทำได้โดยวัดปริมาณก๊าซคาร์บอน–ไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น

2. Sanger's reagent (1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene, FDNB) FDNB จะเข้าทำปฏิกิริยาให้หมู่ไดไนโตรเบ็นซีนแก่กรดอมิโน ทำให้ได้อนุพันธ์ของไดไนโตรเฟนิล (DNP) ที่มีสีเหลืองเกิดขึ้น



ปฏิกิริยานี้ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ นอกจากนี้ยังเป็นรีเอเจนท์ตัวหนึ่งที่ใช้ในการหาชนิดของกรดอมิโนที่อยู่ที่ปลายอมิโน (N-terminal) ของสายโพลีเปปไทด์อีกด้วย

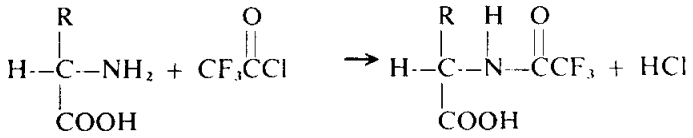
3. *แดนซิลคลอไรด์* (dansyl chloride หรือ 5-dimethylamino-naphthalenesulfonyl chloride) สารชนิดนี้มีข้อได้เปรียบกว่าสารชนิดอื่นคือ เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอมิโนแล้ว จะให้อนุพันธ์ที่เรืองแสงได้ ทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณมีประสิทธิภาพดี แม้กรดอมิโนที่ต้องการหาจะมีจำนวนน้อยมากก็ตาม ทั้งนี้โดยใช้เทคนิคของการวัดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) ที่เกิดขึ้น



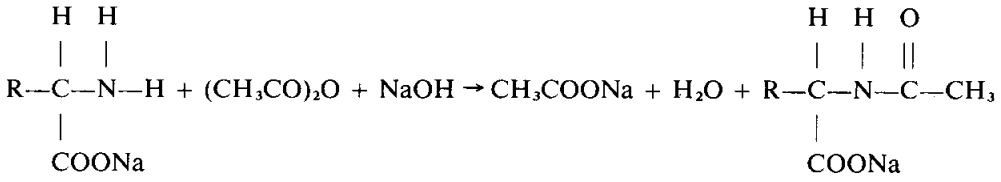
แดนซิลคลอไรด์นี้ก็เช่นเดียวกับ Sanger's reagent คือ จะใช้ในการวิเคราะห์กรดอมิโนทางปลายอมิโนของสายโพลีเปปไทด์เช่นกัน

ทั้ง FDNB และแดนซิลคลอไรด์ สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อมิโนอื่น ๆ ได้ด้วย เช่น หมู่อมิโนที่เป็น side chain ของไลซีน แต่อย่างไรก็ตาม อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นในกรณีหลังนี้ ก็สามารถที่จะถูกแยกออกจากอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของหมู่อัลฟ่าอมิโนได้ โดยใช้วิธีทางโครมาโตกราฟี่

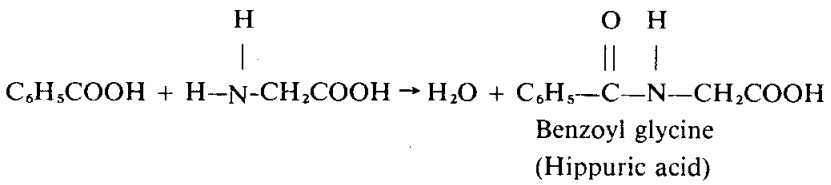
4. *ไทรฟลูออโรเซทิลคลอไรด์* (trifluoroacetyl chloride) เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอมิโนจะได้อนุพันธ์ที่ระเหยได้ ดังนั้นจึงใช้ปฏิกิริยานี้ในการเตรียมกรดอมิโนให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมสำหรับใช้กับโครมาโตกราฟี่ชนิดก๊าซ–ของเหลว (gas-liquid chromatography, GLC)



5. *การเติมหมู่เอซิล* ทำได้โดยใช้แอนไฮไดรด์ของกรด เช่น อซีติคแอนไฮไดรด์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

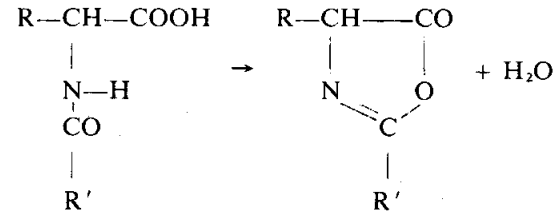


การเติมหมู่เอซิลให้กับกรดอมิโนนี้ ใช้ในปฏิกิริยากำจัดพิษของร่างกายด้วย ตัวอย่างเช่น ถ้าเกิดกรดเบ็นโซอิคซึ่งมีพิษต่อสิ่งมีชีวิตขึ้น กรดนี้จะทำปฏิกิริยากับกรดอมิโนไกลซีน แล้วได้เบ็นโซอิล–ไกลซีนเกิดขึ้น



Benzoyl glycine
(Hippuric acid)

N-acyl amino acids เมื่อละลายใน absolute H_2SO_4 จะสูญเสียน้ำไปแล้วเกิดสารประกอบที่เป็นวงแหวนขึ้นคือ azlactone หรือ oxazolone ซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์เปปไทด์

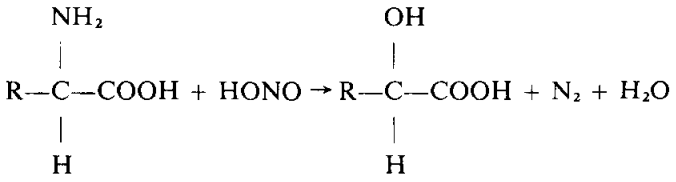


N-Acyl amino acid

Azlactone or oxazolone, an internal anhydride

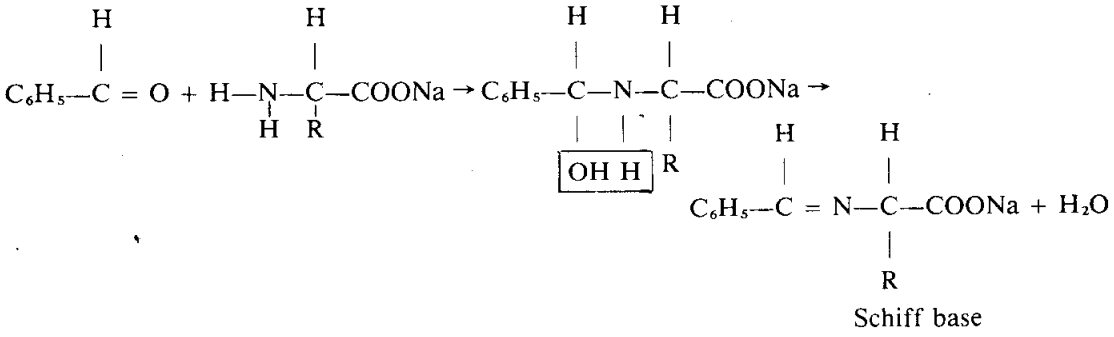
6. *การเติมหมู่เมธิล* ทำได้โดยขบวนการ exhaustive methylation โดยใช้เมธิลไอโอไดด์หรือไดเมธิลซัลเฟทในสารละลายด่าง ปฏิกิริยาจะเกิดหลายขั้นตอน จนในที่สุดได้บีเทน (betaine) ของกรดอมิโน

7. *ปฏิกิริยากับกรดไนตรัส* กรดไนตรัสจะทำปฏิกิริยากับหมู่อมิโนแล้วเกิดกรดไฮ–ดรอกซีขึ้น ในการนี้จะมีก๊าซไนโตรเจนถูกปล่อยออกมาด้วย

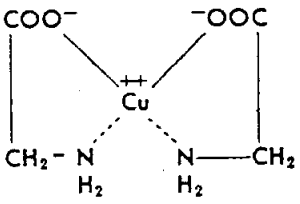


จากปฏิกิริยาจะเห็นว่าหมู่อมิโน 1 หมู่ ทำให้เกิดไนโตรเจน 1 โมเลกุล Van Slyke จึงได้นำประโยชน์นี้ไปใช้ในการหาจำนวนหมู่อมิโนอิสระในกรดอมิโน เปปไทด์ และโปรตีน ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปแล้วทำโดยให้กรดอมิโนหรือโปรตีนนั้น ๆ ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไนไตรท์และกรดอซีติค

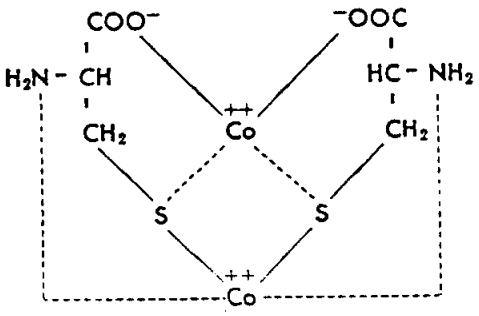
8. *ปฏิกิริยากับอโรมาติคอัลดีไฮด์เพื่อเกิดเป็น* Schiff base อโรมาติคอัลดีไฮด์จะรวมตัวกับกรดอมิโนในสภาวะที่เป็นด่าง แล้วเกิด Schiff base ขึ้นดังปฏิกิริยา



9. *ปฏิกิริยากับอิออนของโลหะหนัก* อิออนของโลหะหนัก เช่น Cu^{2+} Co^{2+} Mn^{2+} Fe^{2+} สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอมิโนแล้วเกิดคอมเพล็กซ์ขึ้นได้ โดยในการนี้จะมีหมู่อมิโนเข้าไปเกี่ยวข้องด้วย ตัวอย่างได้แก่ Copper diglycinate และ Cobalt complex ของซิสเตอีน



Copper diglycinate

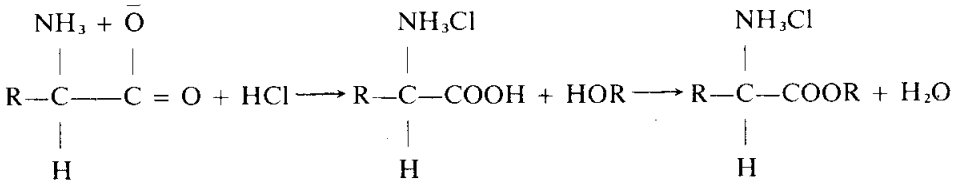


Cobalt complex of cysteine

8.5.2 ปฏิกิริยาของหมู่คาร์บอกซิล มีได้หลายแบบเช่นกัน ได้แก่

1. การเกิดเกลือและการไตเตรท ได้กล่าวถึงแล้วในหัวข้อ 8.3.2

2. การเกิดเอสเทอร์ กรดอมิโนจะทำปฏิกิริยากับอัลกอฮอล์โดยต้องมี dry HCl อยู่ด้วย แล้วได้เอสเทอร์เกิดขึ้น โดย HCl จะทำให้โครงสร้าง zwitterion ของกรดอมิโนเปลี่ยนเป็น amino acid hydrochloride ก่อน แล้วอัลกอฮอล์จึงจะเข้าทำปฏิกิริยา เอสเทอร์ไฮโดรคลอไรด์นี้จะสลายตัวในด่างอ่อน ๆ ที่อุณหภูมิต่ำแล้วได้เอสเทอร์อิสระเกิดขึ้น

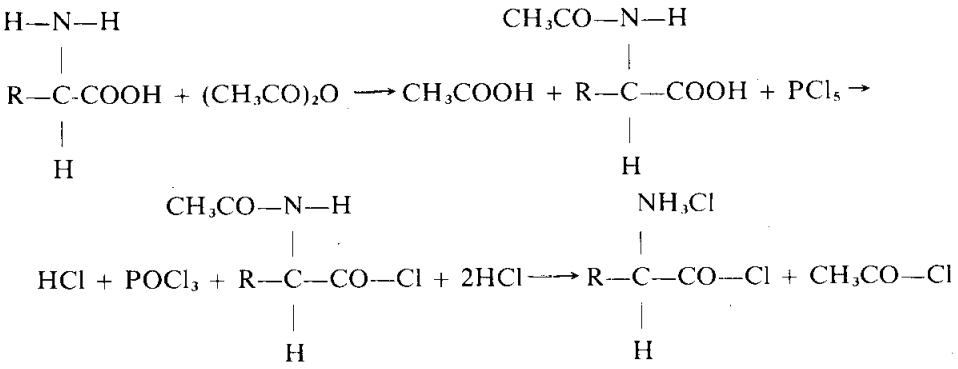


ทั้งกรดอมิโนอิสระและเอสเทอร์จะถูกรีดิวส์ให้กลายเป็นอัลกอฮอล์ได้โดยใช้ $LiAlH_4$ ที่ละลายในอีเทอร์

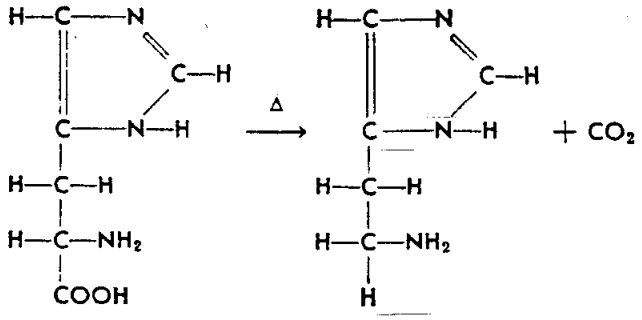
$$R{-}CH(NH_2){-}COOH + LiAlH_4 \rightarrow R{-}CH(NH_2){-}CH_2OH + H_2O$$

Amino acid — Amino alcohol

3. การเกิดอมิโนเอซิลคลอไรด์ เริ่มต้นต้องเติมหมู่อเซทิลให้กับอัลฟาอมิโนก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง แล้วจึงให้ทำปฏิกิริยาต่อไปกับ $SOCl_2$ หรือ PCl_5 เพื่อเกิดเป็นอมิโนเอซิลคลอไรด์ สำหรับหมู่อเซทิลนั้นจะถูกตัดออกได้โดยใช้ dry HCl



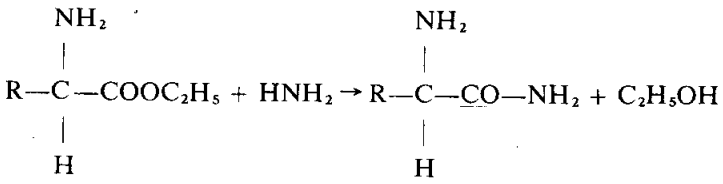
4. ดีคาร์บอกซีเลชั่น ถ้านำกรดอมิโนไปต้ม โดยมีแบเรียมไฮดรอกไซด์หรือไดเฟนิล-เอมีนอยู่ด้วย จะทำให้คาร์บอนไดออกไซด์หลุดออกแล้วเกิดเอมีนขึ้น ตัวอย่างได้แก่ดีคาร์บอกซีเลชั่นของฮิสทีดีน ดังรูป



Histidine Histamine

ในบักเตรี ขบวนการนี้จะเกิดโดยเอนไซม์ดีคาร์บอกซีเลส และเอมีนที่เกิดขึ้น เช่น ฮิสตามีนและไทรามีน (จากไทโรซีน) ก็จะใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมได้ด้วย

5. การเกิดเอมีด ทำได้โดยให้เอสเทอร์ของครดอมิโนทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียซึ่งอยู่ในรูป anhydrous หรือละลายอยู่ในอัลกอฮอล์



8.5.3 ปฏิกริยาของหมู่ R ปฏิกิริยาในกลุ่มนี้มีมากมาย ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมีของ side chain แต่ละหมู่ ดังนั้นจึงไม่สามารถจะนำมากล่าวได้หมดในที่นี้ แต่อย่างไรก็ตาม มีปฏิกิริยาหนึ่งที่จะกล่าวถึง ซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของหมู่ไธออล (thiol, –SH group) ของซิสเตอีน ทั้งนี้เพราะมีผลเกี่ยวข้องโดยตรงกับลักษณะโครงสร้างของโปรตีน

คุณสมบัตินี้ก็คือ ไธออล 2 หมู่ สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ แล้วเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ขึ้น ดังนั้นเมื่อซิสเตอีน 2 โมเลกุล มาทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ก็จะได้ซิสตีนเกิดขึ้น การเกิดพันธะไดซัลไฟด์เช่นนี้ จะพบในสายโพลีเปปไทด์บริเวณที่มีซิสเตอีนอยู่ ทำให้โปรตีนสามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิได้

$$R{-}SH + HS{-}R + (\text{oxidant}) \rightleftharpoons \underset{\text{disulfide}}{R{-}S{-}S{-}R} + (\text{oxidant} \cdot H_2)$$

สรุปเนื้อหาสาระสำคัญ

กรดอมิโนคือโมเลกุลหน่วยสร้างของโปรตีนและเปปไทด์ โดยจะมี 20 ชนิด ด้วยกันที่พบเป็นส่วนประกอบของโปรตีน โครงสร้างของกรดอมิโนจะมีคาร์บอนอะตอมที่เป็นแกนกลางทำพันธะอยู่กับหมู่อมิโน หมู่คาร์บอกซิล ไฮโดรเจนอะตอม และหมู่ R ซึ่งเป็น side chain ถ้า R เป็นไฮโดรเจนอะตอม จะได้กรดอมิโนตัวที่ง่ายที่สุด คือ ไกลซีน ซึ่ง optically inactive แต่ถ้า R เป็นหมู่อื่น ๆ จะได้คาร์บอนอะตอมที่ไม่สมมาตรเกิดขึ้น ทำให้กรดอมิโนเหล่านั้นมีคู่อีแนนทิโอเมอร์ได้ เกิดเป็นกรดอมิโนชนิด D และ L โดยเทียบกับกลีเซอราลดีไฮด์เหมือนในกรณีคาร์โบไฮเดรท ในธรรมชาติจะพบกรดอมิโนชนิด L

กรดอมิโนจะถูกจำแนกออกได้โดยยึดตามลักษณะโครงสร้าง หรือตามคุณสมบัติทางกายภาพของ side chain ซึ่งวิธีหลังจะมีความเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของโปรตีนที่มีกรดอมิโนชนิดนั้น ๆ เป็นองค์ประกอบด้วย การแบ่งทำได้โดยดูว่าที่ pH 7.0 side chain จะมีความสามารถในการรับหรือให้โปรตอนได้อย่างไร และจะแบ่งกรดอมิโนได้เป็น 4 พวก คือ พวกที่มี side chain เป็นน็อนโพลาร์ เป็นโพลาร์ เป็นกรด (คือมีประจุลบที่ pH 7.0) และเป็นเบส (คือมีประจุบวกที่ pH 7.0) การที่หมู่ฟังก์ชั่นของกรดอมิโนสามารถแตกตัวได้นั้นจะทำให้เกิดรูปแบบที่เรียกว่า zwitterion ขึ้น นอกจากนี้ side chain ก็แตกตัวได้ด้วย ทำให้ประจุสุทธิของกรดอมิโนเปลี่ยนไปได้ตาม pH pH ที่ทำให้ประจุสุทธิของกรดอมิโนเป็นศูนย์จะเรียกว่า isoelectric pH (pI) ซึ่ง ณ จุดนี้การละลายของกรดอมิโนจะต่ำสุด สำหรับกรดอมิโนที่มีหมู่อมิโน และคาร์บอกซิลเพียงอย่างละ 1 หมู่ และ side chain ก็ไม่แตกตัวนั้น จะสามารถหาค่า pI ได้จากสมการ $pI = \frac{1}{2}(pK_{a_2-COOH} + pK_{a_2-NH_3^+})$

ปฏิกิริยาเคมีของกรดอมิโนจะมีทั้งที่เกิดกับหมู่อัลฟาอมิโน อัลฟาคาร์บอกซิล ตลอดจนที่ side chain ซึ่งบางปฏิกิริยาก็จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์หาโครงสร้างของสายโพลี-เปปไทด์ด้วย เช่น Sanger's reagent หรือแดนซิลคลอไรด์จะใช้หาชนิดของกรดอมิโนที่อยู่ทางปลาย N ของสายโปรตีน

คำถามท้ายบท

1. ข้อความต่อไปนี้ถูกหรือผิด ถ้าผิดจงอธิบายด้วยว่าทำไมจึงผิด
   1.1 รูปแบบที่ไม่แตกตัวของกรดอมิโนจะมีมากเฉพาะที่ pH สูง ๆ หรือ pH ต่ำ ๆ เท่านั้น
   1.2 ลิวซีนมีความเป็นน็อนโพลาร์มากกว่าอลานีน
   1.3 หมู่ที่แตกตัวได้ของกรดอมิโนจะอยู่ในรูปที่แตกตัวเกินกว่าครึ่งหนึ่งที่ pH สูงกว่า pK_a ของหมู่นั้น

2. จากโครงสร้างของกรดอมิโนในตารางที่ 8–1 จงเติมชื่อกรดอมิโนลงในช่องว่างให้ถูกต้อง
   2.1 _____จะเปลี่ยนแปลงการงอตัวหรือโค้งตัวของสายโพลีเปปไทด์ เนื่องจากสารตัวนี้มิได้เป็นกรดอมิโนที่แท้จริง
   2.2 _____เป็นกรดอมิโนชนิดอโรมาติคที่มี side chain เป็นน็อนโพลาร์ และมีหมู่เฟนิล
   2.3 อีเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยวที่ไนโตรเจนตัวหนึ่งของวงแหวน ทำให้_____เป็นลิแกนด์ที่แรง และมีความสำคัญในการยึดอะตอมของธาตุเหล็กเอาไว้ในฮีโมโกลบิน
   2.4 _____มีบทบาทในการทำให้โครงสร้างของโปรตีนหลายชนิดมีความเสถียร โดยจะทำพันธะกับกรดอมิโนอีกโมเลกุลหนึ่งที่เป็นชนิดเดียวกันกับตัวเอง
   2.5 ตำแหน่งของคาร์บอนอะตอมในกรดอมิโนจะเรียกตามตัวอักษรกรีก โดยเริ่มจากอัลฟา–คาร์บอน สำหรับตัวที่อยู่ถัดออกมาจะเป็น β, γ, δ และ ε คาร์บอนตามลำดับ กรดอมิโนที่เบต้าคาร์บอนมีหมู่ที่มาเกาะมิใช่ไฮโดรเจนอะตอมเป็นจำนวน 2 หรือ 3 หมู่ จะเรียกว่าเป็นกรดอมิโนที่มีกิ่ง (branch) ที่เบต้าคาร์บอน กรดอมิโนประเภทนี้ได้แก่_____, _____และ_____ซึ่งถ้ามาอยู่ชิดกันในโปรตีน จะทำให้สายโพลีเปปไทด์ที่อยู่ในลักษณะเกลียวอัลฟาไม่เสถียร
   2.6 โปรตีนที่ physiological pH (pH ใกล้ ๆ 7.0) จะมี side chain ของ_____และ_____มีประจุเป็นบวกเกือบทั้งหมด ส่วน side chain ของ_____จะมีประจุบวกเพียงบางส่วนเท่านั้น

3. โปรตีนคือสายโพลีเมอร์ที่เกิดจากกรดอมิโนทำพันธะเปปไทด์เชื่อมต่อกัน ในสารละลายเอเควียสที่ pH = 7.0 โปรตีนส่วนใหญ่จะขดงอตัวเพื่อทำให้กรดอมิโนที่มี side chain ชนิดน็อนโพลาร์อยู่ข้างใน และกรดอมิโนที่มี side chain ชนิดโพลาร์หันออกข้างนอกสัมผัสกับน้ำ จากความรู้นี้และจากตารางที่ 8–1 จงตอบคำถามต่อไปนี้

3.1 กรดอมิโนต่อไปนี้จะมี side chain อยู่ข้างนอกหรือข้างในของโปรตีนก้อนกลมที่อยู่ในสารละลาย : แวลีน โพรลีน เฟนิลอลานีน กรดแอสพาติค ไลซีน ไอโซลิวซีน และฮิสทีดีน

3.2 ทำไมจึงอาจพบไกลซีนและอลานีนอยู่ข้างนอกหรือข้างในก็ได้

3.3 ทำไมจึงพบ ซีรีน ธรีโอนีน แอสพาราจีน และกลูตามีน อยู่ข้างในได้ ทั้ง ๆ ที่มี side chain เป็นโพลาร์

3.4 จะพบซิสเตอีนที่ไหน และทำไมจึงพบที่นั้น

4. แต่ละกลุ่มของกรดอมิโนที่แตกตัวได้จะอยู่ได้ใน 2 รูปแบบ คือมีประจุและไม่มีประจุ (เช่น $-COO^-$ และ $-COOH$) ดังนั้นโมเลกุลที่มีหมู่ที่แตกตัวได้ n หมู่ ก็จะอยู่ได้ใน 2^n รูปแบบ

4.1 จงเขียนรูปแบบการแตกตัวทั้ง 4 แบบ ของกรดอมิโนซีรีน

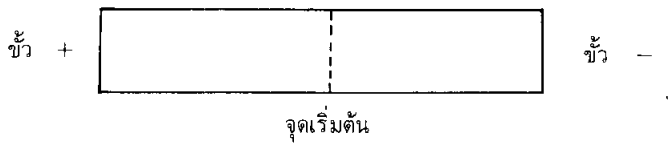
4.2 รูปแบบใดในข้อ 4.1 ที่จะมีมากที่สุดที่ pH = 1, pH = 3, pH = pI, pH = 7 และ pH = 11

5. paper electrophoresis เป็นวิธีการที่ใช้แยกกรดอมิโนหลาย ๆ ชนิดออกจากกัน โดยให้กรดอมิโนเคลื่อนที่ไปบนแผ่นกระดาษภายใต้กระแสไฟฟ้าที่ pH ต่าง ๆ กัน กรดอมิโนที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเคลื่อนไปยังขั้วลบ และกรดอมิโนที่มีประจุสุทธิเป็นลบจะเคลื่อนไปยังขั้วบวก

5.1 เมื่อนำของผสมของ อลานีน ซีรีน เฟนิลอลานีน ลิวซีน อาร์จินีน กรดแอสพาติค และฮิสทีดีน ไปทำ paper electrophoresis ที่ pH = 3.9 จงพิจารณาว่ากรดอมิโนชนิดใดจะวิ่งไปทางขั้วบวก และชนิดใดจะวิ่งไปทางขั้วลบ

5.2 กรดอมิโนที่มีประจุสุทธิเท่ากัน เช่น ไกลซีนกับลิวซีน มักจะแยกออกจากกันเล็กน้อยใน paper electrophoresis เพราะเหตุใด

5.3 ถ้ามีของผสมระหว่างอลานีน แวลีน กรดกลูตามิค ไลซีน และธรีโอนีนที่ pH = 6.0 จงวาดตำแหน่งที่จะพบกรดอมิโนแต่ละตัวนั้นเมื่อสิ้นสุดขบวนการ paper electrophoresis และพ่นน้ำยานินไฮดรินเรียบร้อยแล้ว โดยวาดลงในแผนผังนี้



6. ในบางครั้ง กรดอมิโนจะถูกใช้เป็นบัฟเฟอร์ด้วย โดยช่วง pH ที่สารมีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้นั้นจะอยู่ระหว่าง $pK_a + 1$ ถึง $pK_a - 1$

6.1 จงหาช่วงบัฟเฟอร์ของไกลซีน ฮิสทีดีน กรดแอสพาติค และไลซีน

6.2 จงเลือกกรดอมิโนเพื่อทำเป็นบัฟเฟอร์ที่ pH = 4, pH = 6, pH = 9 และ pH = 12

7. หมู่ $\varepsilon - NH_2$ ของไลซีนมี $pK_a = 10.5$

7.1 จงหาเศษส่วน (fraction) ที่หมู่นี้อยู่ในรูปที่มีโปรตอน ($-NH_3^+$) ในสารละลายเจือจางของไลซีนที่ pH = 9.5

7.2 ที่ pH = 11.0

7.3 จงอธิบายว่าทำไม pK_a ของหมู่ $\varepsilon - NH_2$ จึงสูงกว่า pK_aของหมู่อัลฟาอมิโน

8. หมู่ $\gamma - COOH$ ของกรดกลูตามิค มี $pK_a = 4.3$

8.1 จงหาเศษส่วนที่หมู่นี้อยู่ในรูปที่ไม่มีโปรตอน ($-COO^-$) ในสารละลายเจือจางของกรดกลูตามิคที่ pH = 5.0

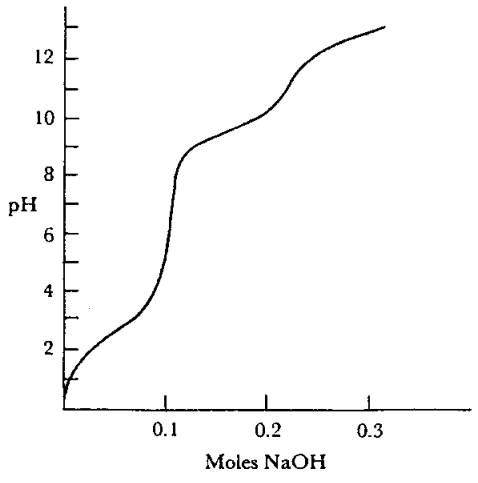
8.2 ที่ pH = 3.8

8.3 จงอธิบายว่าทำไมค่า pK_a นี้จึงสูงกว่า pK_a ของหมู่อัลฟาคาร์บอกซิล

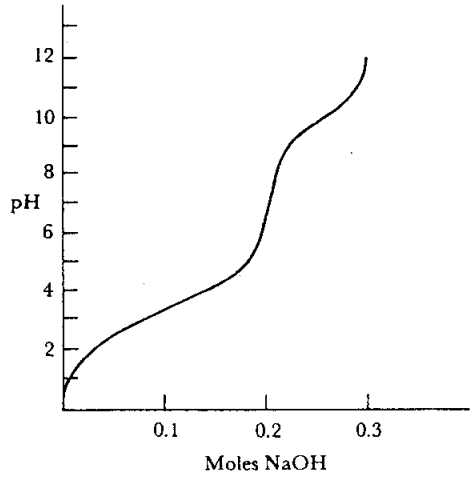
9. 9.1 ถ้ามีสารละลายที่มีอลานีนอยู่ 0.1 โมล และปรับ pH ให้เป็น 0.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค นำสารละลายนี้มาไตเตรทโดยใช้ 1 M NaOH จงวาด titration curve แสดงจุดเปลี่ยนแปลง (inflection point) ทุกจุด และจงแสดงการคำนวณในการหาจุดเพื่อวาดกราฟนั้นด้วย

9.2 จงเขียน titration curve ของสารละลายที่มีฮิสทีดีน 0.1 โมล และ pH = 0.5 แต่ไม่ต้องแสดงการคำนวณ

10. 10.1 จากตารางที่ 8 – 4 จงใช้ค่า pK_a มาพิจารณาว่า titration curve ต่อไปนี้เป็นของกรดอมิโนชนิดใด



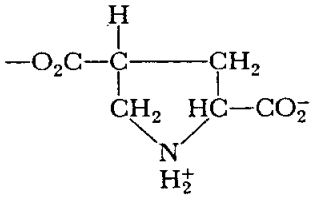
10.2 titration curve ต่อไปนี้เป็นของกรดอมิโนชนิดใด และกราฟนี้แตกต่างจากกราฟที่ท่านวาดในข้อ 9 อย่างไร



10.3 จงกล่าวถึงข้อที่เหมือนกันและข้อที่ต่างกันของ titration curve ทั้ง 4 ใน ข้อ 9 และข้อ 10.1 และ 10.2

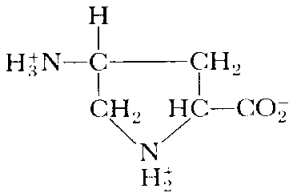
11. จากการแยกสกัดเอาคอลลาเจนออกมาจากหางของจิงโจ้ ได้พบ γ - substituted prolines 3 ชนิดด้วยกัน และจาก titration curve จะทราบค่า pK_a ของหมู่ที่แตกตัวได้ดังนี้

11.1 carboxyproline



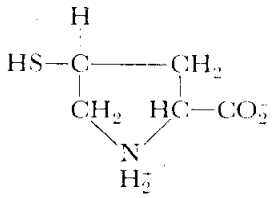
	pK_a
α -carboxyl	2.0
α - amino	10.5
γ - carboxyl	3.8

11.2 aminoproline



	pK_a
α - carboxyl	1.9
α - amino	9.8
γ - amino	10.0

11.3 sulfhydrylproline



	pK_a
α - carboxyl	1.9
α - amino	9.9
γ - sulfhydryl	9.9

จากค่า pK_a เหล่านี้ จงหาค่า pI ของกรดอมิโนทั้งสามตัวนี้