# ตอนที่ 1

# 1 การทดลองทางชีวเคมี

- ❑ บทนำ
- ❑ ความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ
- ❑ ข้อปฏิบัติโดยทั่วไป
- ❑ การเขียนรายงานการทดลอง
- ❑ การนำเสนอข้อมูล
- ❑ หน่วย
- ❑ ความเข้มข้นของสารละลาย
- ❑ การเจือจางสาร
- ❑ pH และบัฟเฟอร์
- ❑ อุปกรณ์ในการวัดปริมาตร
- ❑ เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมี
  - เครื่องวัด pH
  - เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์
- ❑ การแยกสารทางชีวเคมี

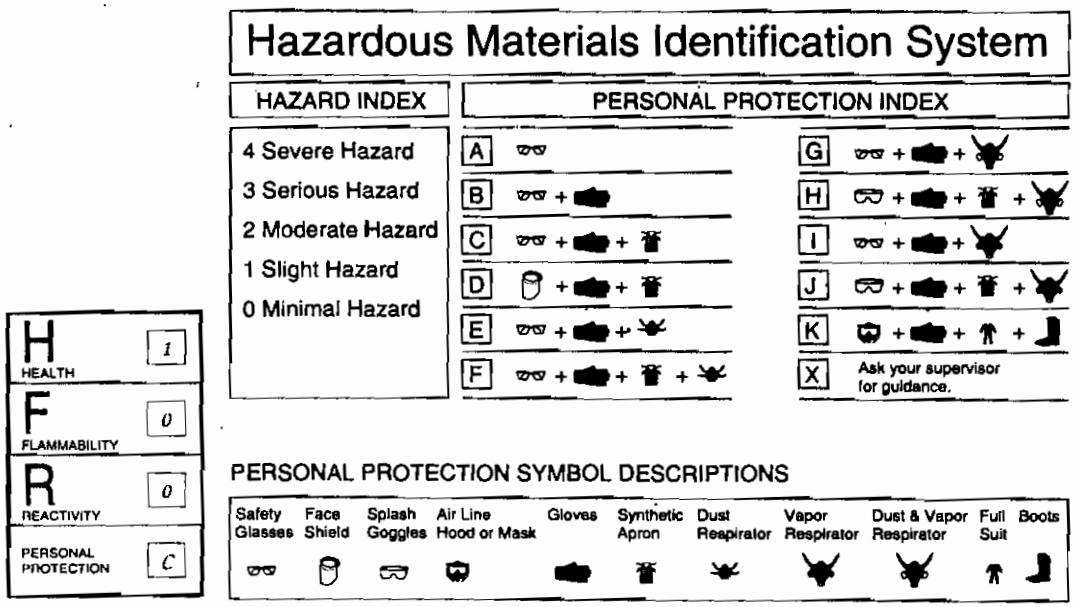
## บทนำ

การทดลองทางชีวเคมีเป็นการทดลองเพื่อศึกษาโครงสร้าง คุณสมบัติ และหน้าที่ของชีวโมเลกุล รวมทั้งศึกษาปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต และกลไกการควบคุมภายในเซลล์ การทดลองทางชีวเคมีนั้นมีหลักการเช่นเดียวกับการทดลองทางวิทยาศาสตร์โดยทั่วไป แต่มีรายละเอียดบางประการที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากเป็นการทดลองเกี่ยวกับสารชีวโมเลกุล ซึ่งมีสภาพธรรมชาติ และปฏิกิริยาที่เกิดในสิ่งมีชีวิตมีลักษณะเฉพาะตัว จึงจำเป็นต้องระวังเป็นพิเศษ โดยทั่วไปปริมาณของสารที่ใช้ทำการทดลองทางชีวเคมีจะมีปริมาณน้อย เช่น ปริมาณในหน่วยมิลลิกรัม ไมโครกรัม หรือในหน่วยที่น้อยกว่านี้ ดังนั้นจึงมีเทคนิคในการทดลองทางชีวเคมี ซึ่งต้องศึกษาและให้ความระมัดระวัง และพยายามหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของสารที่จะมีผลต่อการทดลอง รวมทั้งการรักษาความสะอาดของอุปกรณ์ และเครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลอง เพื่อให้การทดลองได้ผลที่ถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision)

## ความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ

การรักษาความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากในการทดลองแต่ละครั้ง นักศึกษาอาจต้องใช้สารเคมีที่มีอันตราย มีการใช้ความร้อน เปลวไฟ หรือการใช้ก๊าซ รวมทั้งการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ซึ่งมีวิธีการใช้และเทคนิคที่แตกต่างกัน ดังนั้นผู้ทดลองต้องมีความรู้ความเข้าใจ มีความระมัดระวัง ร่วมกันรักษาระเบียบและคำแนะนำที่มีในห้องปฏิบัติการอย่างเคร่งครัด

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีหลายชนิด บางชนิดมีอันตราย ก่อนที่จะนำมาใช้ต้องศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับสารเคมีนั้นให้ละเอียด โดยศึกษาจากเอกสารคู่มือของบริษัทผู้ผลิต หรือเอกสารซึ่งติดอยู่ที่ภาชนะบรรจุ รวมทั้งเอกสารที่แนบมาพร้อมกับสารเคมีนั้น ว่ามีการให้ข้อมูลเกี่ยวกับสารเคมีไว้อย่างไรบ้าง เช่น แสดงในรูปแบบ Hazardous Materials Identification System (HMIS) ดังรูปที่ 1.1 หรือข้อมูลด้าน Material Safety Data Sheets (MSDS) เป็นต้น




**รูปที่ 1.1** แสดง (A) Hazardous Materials Identification System (HMIS) สำหรับซูโครส (B) Hazard index และ Personal protection index

## ข้อปฏิบัติโดยทั่วไป

1. นักศึกษาต้องอ่านคู่มือปฏิบัติการในเรื่องที่จะทำการทดลองในแต่ละครั้งมาล่วงหน้า โดยทำความเข้าใจในเนื้อหาและทฤษฎี ขั้นตอนการทดลอง และข้อควรระวังต่างๆ ให้นักศึกษาเขียนแผนการทดลองใส่สมุดทุกครั้ง เพื่อสามารถดำเนินการทดลองได้อย่างมีระบบ และจัดลำดับการทดลองก่อน–หลัง รวมทั้งรักษาเวลาให้อยู่ในเวลาปฏิบัติการที่กำหนดไว้

2. นักศึกษาต้องสวมเสื้อปฏิบัติการขณะทำการทดลองทุกครั้ง เพื่อป้องกันสารเคมีที่อาจหกหรือกระเด็นใส่ตัว

3. นักศึกษาควรจัดเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ให้พร้อมก่อนทำการทดลอง รวมทั้งศึกษาวิธีการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ โดยเฉพาะอุปกรณ์และเครื่องมือที่ไม่คุ้นเคย นักศึกษาควรฝึกทักษะก่อนที่จะใช้ในการทดลองนั้นๆ

4. ควรรักษาความสะอาดของอุปกรณ์ เครื่องมือ โต๊ะปฏิบัติการ และบริเวณของห้องปฏิบัติการ เนื่องจากการปนเปื้อนของสารที่มีผลต่อการวิเคราะห์เพียงเล็กน้อย จะทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้

5. ควรใช้สารอย่างประหยัด โดยคำนวณทุกครั้งว่าการทดลองนั้นใช้สารแต่ละชนิดปริมาณเท่าใดก่อนที่จะเตรียมสารหรือแบ่งไปจากส่วนกลาง

6. ห้ามเคลื่อนย้ายสารที่ใช้ร่วมกันไปจากส่วนกลาง ไม่ทำให้สารปนเปื้อน โดยเฉพาะสารที่ใช้ร่วมกัน อย่าสับเปลี่ยนอุปกรณ์ในการตวงสารแต่ละชนิด ในกรณีที่สารที่ใช้ร่วมกันไม่มีที่ตวงวัด ให้นักศึกษานำบีกเกอร์มาแบ่งจากส่วนกลางไปใช้ ห้ามนำปิเปตต์ของตนมาดูดสารจากส่วนกลาง เพราะจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ และอย่าทำสารเคมีหกถ้าทำหกให้รีบทำความสะอาดทันที

7. เมื่อใช้สารเคมีที่ระเหยง่ายหรือเป็นพิษ ควรทำปฏิบัติการในตู้ดูดควัน

8. ขณะทำการทดลองให้นักศึกษาสังเกตปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากการทดลองอย่างละเอียดและบันทึกผลการทดลองที่ได้ทันที ให้ตั้งคำถามเกี่ยวกับปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นและพยายามหาคำตอบจากทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง ถ้ามีข้อสงสัยให้ถามอาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง

9. เมื่อพบว่าเครื่องมือหรืออุปกรณ์ชำรุด ต้องรายงานให้อาจารย์หรือเจ้าหน้าที่ผู้ควบคุมปฏิบัติการทราบ อย่าแก้ไขด้วยตนเองเด็ดขาด

10.นักศึกษาต้องระวังอุบัติเหตุที่อาจเกิดขึ้นจากการทดลอง เมื่อเกิดอุบัติเหตุต้องรีบรายงานให้อาจารย์ผู้ควบคุมปฏิบัติการทราบทันที และทำการรักษาอย่างถูกวิธี

11. เมื่อทำการทดลองเสร็จต้องทำความสะอาดอุปกรณ์หรือเครื่องแก้วทันที ไม่ควรทิ้งไว้เพราะเมื่อสารแห้งติดกับภาชนะ จะทำความสะอาดได้ยาก

**หมายเหตุ** สิ่งที่นักศึกษาแต่ละกลุ่มต้องจัดเตรียมไว้ประจำตู้ปฏิบัติการ ได้แก่ กระดาษกราฟ น้ำยาล้างเครื่องแก้ว ผ้าเช็ดโต๊ะ กระดาษทิชชู และปากกาเขียนแก้ว

## การเขียนรายงานการทดลอง

รายงานการทดลองประกอบด้วยหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. บทนำ กล่าวถึงทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

2. วัตถุประสงค์ เขียนวัตถุประสงค์ของการทดลองแต่ละเรื่องโดยแยกเป็นข้อๆ

3. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ที่ใช้ในการทดลองเรื่องนั้นๆ

4. วิธีการทดลอง วิธีการทดลองที่นักศึกษาปฏิบัติจริงในห้องทดลอง ซึ่งได้จากหนังสือปฏิบัติการ และข้อแนะนำเพิ่มเติมก่อนทำการทดลอง

5. ผลการทดลอง บันทึกแสดงการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา ค่าที่อ่านได้จากเครื่องมือและการคำนวณผลการทดลอง โดยแสดงผลในรูปแบบที่สื่อความหมายได้ชัดเจน และสามารถทำความเข้าใจได้ง่าย

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง อธิบายถึงหลักสำคัญของการทดลอง สรุปถึงผลการทดลองที่ได้ และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ทำได้จริงกับผลตามทฤษฎี

7. เอกสารอ้างอิง เอกสารที่ใช้ประกอบการทดลองและเอกสารที่นำมาใช้ในการเขียนรายงานการทดลอง โดยเขียนในรูปแบบของการเขียนบรรณานุกรมที่ถูกต้อง

## การนำเสนอข้อมูล

เมื่อทำการทดลองจนได้ผลการทดลองแล้ว ผู้ทำการทดลองจะต้องนำเสนอข้อมูลที่ได้ในรูปแบบที่ผู้อ่านสามารถทำความเข้าใจได้ดี

การนำเสนอข้อมูล (data presentation) มีความสำคัญในการแสดงผลการทดลอง ข้อมูลที่ได้สามารถนำเสนอในรูปแบบต่างๆ เช่น ตาราง กราฟ รูปภาพ หรือรูปแบบอื่นๆ ตามความเหมาะสม

1. ตาราง (table)

ตารางคือการนำข้อมูลหรือตัวเลขมาใส่ในกรอบที่มีเส้นแบ่งชัดเจน ตารางที่ดีควรมีรูปแบบดังนี้ ตารางมีความเป็นระเบียบทั้งแนวนอนและแนวตั้ง มีการจัดรูปแบบตาราง

ให้เปรียบเทียบข้อมูลได้ง่าย ถ้าข้อมูลเป็นตัวเลขไม่ควรเป็นตัวเลขหลายหลัก และควรมีคำอธิบายข้อมูลในตารางไว้ส่วนท้ายของตาราง เพื่อชี้ให้เห็นจุดสำคัญของข้อมูล

**2. กราฟ (graph)**

การนำเสนอข้อมูลด้วยกราฟเหมาะกับการแสดงความสัมพันธ์ของข้อมูลหรือแนวโน้มของข้อมูล กราฟจะช่วยให้ผู้อ่านสามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น การเขียนกราฟมีข้อมูลที่นำมาเขียนกราฟอยู่ 2 ชนิด คือ 1) ข้อมูลที่ควบคุม (independent variable) นิยมเขียนบนแกนนอน (แกน x) 2) ข้อมูลที่มีการเปลี่ยนแปลง (dependent variable) เมื่อเปลี่ยนแปลงข้อมูลที่ควบคุม จะทำให้ค่าของข้อมูลนี้เปลี่ยนไป มักเขียนบนแกนตั้ง (แกน y) รูปแบบของกราฟมีดังนี้

**2.1 กราฟแท่ง (bar graph)** เหมาะกับการนำเสนอข้อมูลแบบไม่ต่อเนื่อง กราฟแท่งแต่ละอันมีความกว้างเท่ากัน ส่วนที่แตกต่างกันคือความสูงของกราฟ ซึ่งแสดงความแตกต่างของข้อมูล

**2.2 ฮิสโตแกรม (histogram)** คือกราฟแท่งที่ไม่มีช่องว่างระหว่างกราฟ ใช้นำเสนอข้อมูลแบบต่อเนื่อง โดยให้แกนตั้งแสดงความถี่ของการจำแนก และแกนนอนแสดงการจำแนก

**2.3 โพลีกอน (polygon)** เป็นกราฟที่มีการดัดแปลงมาจากฮิสโตแกรม โดยนำฮิสโตแกรมมาหาจุดกึ่งกลางของแท่งกราฟ แล้วลากเส้นผ่านจุดแต่ละจุด

**2.4 กราฟเส้น (line graph)** การนำข้อมูลดิบมานำเสนอในรูปแบบกราฟเส้นทำให้ผู้อ่านข้อมูลสามารถพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลได้ง่ายขึ้น

**2.5 ไดอะแกรมกระจาย (scatter diagram)** เป็นการแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรสองตัวแปรซึ่งแทนด้วยจุด จุดแต่ละจุดไม่มีการลากเส้น เพื่อพิจารณาการกระจายตัวของข้อมูล

กราฟที่ดีต้องมีชื่อกราฟ แกนตั้งและแกนนอนมีความหมายชัดเจนและมีหน่วยกำกับ สเกลของแต่ละแกนมีระยะแบ่งที่อ่านง่ายและครอบคลุมทั้งค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด ถ้าค่าบนกราฟไม่ได้เริ่มต้นที่ค่าศูนย์ ควรใช้เครื่องหมายกำกับที่แกนกราฟ เช่น ใช้ขีดขนาน 2 ขีดในแนวทแยงมุมหรือใช้ขีดหักมุม หากมีข้อมูลหลายชนิดแสดงในกราฟเดียวกัน ควรใช้เครื่องหมายของจุดที่แตกต่างกันหรือสีที่แตกต่างกัน พร้อมกำกับคำอธิบายอย่างชัดเจน

การเขียนกราฟสามารถนำข้อมูลมาเขียนบนกระดาษกราฟด้วยตนเอง หรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เนื่องจากการแสดงข้อมูลด้วยกราฟโดยทั่วไปนั้นจะไม่ปรากฏค่าจริงของตัวแปรแต่ละค่า ในกรณีที่ต้องการทราบค่าจริงหรือความแตกต่างที่ละเอียดขึ้น ต้องย้อนกลับไปพิจารณาจากข้อมูลดิบเพิ่มเติม

3. รูปภาพ

การแสดงรูปภาพเพื่อประกอบข้อมูลหรือคำอธิบาย จะทำให้ผู้อ่านทำความเข้าใจในเนื้อหาได้ง่ายขึ้น

## หน่วย

การทดลองทางวิทยาศาสตร์ซึ่งมีการวัดค่าต่างๆ ต้องแสดงค่าในหน่วยสากลเพื่อให้เข้าใจตรงกัน โดยทั่วไปใช้หน่วยในระบบ *Système International d' Unités* (SI units) เช่น วัดความยาวในหน่วยเมตร (meter; m) วัดมวลในหน่วยกิโลกรัม (kilogram; kg) วัดเวลาในหน่วยวินาที (second; s) วัดอุณหภูมิในหน่วยเคลวิน (Kelvin; K) ดังตารางที่ 1.1 หน่วยในระบบ SI บางหน่วยมีชื่อเรียกพิเศษ เช่น หน่วยบอกปริมาณพลังงาน คือ $m^2 \cdot kg/s^2$ แทนด้วยจูล (joule) นอกจากนี้ยังมีหน่วยแบบอื่นนอกเหนือจากหน่วยในระบบ SI ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ เช่น วัดความยาวในหน่วยนิ้ว (inch; in.) วัดน้ำหนักในหน่วยปอนด์ (pound; lb) หรือวัดอุณหภูมิในหน่วยเซลเซียส (Celsius; $^{\circ}C$) เป็นต้น

หน่วยที่ใช้วัดค่าสามารถแสดงในระดับต่างๆ ตามปริมาณที่มากหรือน้อย โดยใช้คำนำหน้า (prefix) ดังตารางที่ 1.2 เติมที่ด้านหน้าของหน่วยต่างๆ เช่น หน่วยเป็นมิลลิเมตร (millimeters; mm) ไมโครโมล (micromoles; μmol) เป็นต้น

หน่วยที่ใช้บอกมวลโมเลกุล (molecular mass) ของสารชีวโมเลกุล นิยมบอกในหน่วยดาลตัน (Daltons; Da) ดาลตัน คือ 1/12 ของอะตอมของ $^{12}C$ ตารางที่ 1.3 แสดงมวลโมเลกุลในหน่วยดาลตันของโปรตีนชนิดต่างๆ

**ตารางที่ 1.1** หน่วยในระบบ SI

| ชนิดของการวัดค่า | หน่วย | สัญลักษณ์ที่ใช้แทน |
|---|---|---|
| ความยาว (Length) | เมตร (meter) | m |
| มวล (Mass) | กิโลกรัม (kilogram) | kg |
| เวลา (Time) | วินาที (second) | s |
| อุณหภูมิ (Temperature) | เคลวิน (Kelvin) | K |
| กระแสไฟฟ้า (Electric current) | แอมแปร์ (ampere) | A |
| กัมมันตภาพรังสี (Radioactivity) | เบคเคอเรล (Becquerel) | Bq |

**ตารางที่ 1.2** คำนำหน้าหน่วยเพื่อแสดงการวัดค่าในระดับต่างๆ

| ปริมาณ | คำนำหน้า (prefix) | สัญลักษณ์ที่ใช้แทน | ปริมาณ | คำนำหน้า (prefix) | สัญลักษณ์ที่ใช้แทน |
|---|---|---|---|---|---|
| $10^{18}$ | exa | E | $10^{-1}$ | deci | d |
| $10^{15}$ | peta | P | $10^{-2}$ | centi | c |
| $10^{12}$ | tera | T | $10^{-3}$ | milli | m |
| $10^{9}$ | giga | G | $10^{-6}$ | micro | μ |
| $10^{6}$ | mega | M | $10^{-9}$ | nano | n |
| $10^{3}$ | kilo | k | $10^{-12}$ | pico | p |
| $10^{2}$ | hecta | h | $10^{-15}$ | femto | f |
| 10 | deca | da | $10^{-18}$ | atto | a |

**ตารางที่ 1.3** แสดงมวลโมเลกุลของโปรตีน

| ชนิดของโปรตีน (แหล่งที่มาของโปรตีน) | มวลโมเลกุล (kilo Daltons; kDa) |
|---|---|
| Lipase (milk) | 6.7 |
| Ribonuclease A (bovine pancreas) | 12.6 |
| Cytochrome c (bovine heart) | 13.4 |
| Myoglobin (horse heart) | 16.9 |
| α–Chymotrypsin (bovine pancreas) | 21.6 |
| Concanavalin B (jack bean) | 42.5 |
| Cytochrome oxidase (*P. aeruginosa*) | 89.8 |
| Lactate dehydrogenase H (chicken) | 150.0 |
| Fibrinogen (human) | 340.0 |
| Glutamate dehydrogenase (bovine liver) | 1015.0 |

## ความเข้มข้นของสารละลาย

ความเข้มข้นของสารละลาย (concentration) หมายถึง ปริมาณของสาร (solute) ที่ละลายในตัวทำละลาย (solvent) โดยทั่วไปแสดงปริมาณสารต่อปริมาตรรวม (total volume) เช่น เมื่อสารหนัก 1 กรัม (gram; g) นำมาละลายในตัวทำละลายให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร (liter; l) ดังนั้นสารมีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (g/l) สาร 1 มิลลิโมล (millimole; mmol) นำมาละลายในตัวทำละลายปริมาตรเป็น 1 ลิตร ดังนั้นสารมีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (millimolar; mM) หน่วยบอกความเข้มข้นที่ใช้อีกแบบหนึ่ง คือเปอร์เซ็นต์ของสารในตัวทำละลาย นิยมใช้ในกรณีที่ไม่ทราบมวลโมเลกุลของสาร มี 2 แบบ คือเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักต่อปริมาตร (percent weight to volume; %w/v) และเปอร์เซ็นต์ของปริมาตรต่อปริมาตร (percent volume to volume; %v/v) เช่น 1 %w/v คือ สารหนัก 1 กรัม ละลายในตัวทำละลายปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร หรือ 1 %v/v คือ สารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายในตัว

ทำละลายปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีหน่วยบอกความเข้มข้นในรูปอัตราส่วน เช่น อัตราส่วนของ 1 ส่วนในล้านส่วน (parts per million; ppm) หรืออัตราส่วนของ 1 ส่วนใน 10 ล้านส่วน (parts per billion; ppb) เป็นต้น

## การเจือจางสาร

การเจือจางสาร (dilution) เป็นการทำให้ความเข้มข้นของสารละลายลดลง โดยนำสารตั้งต้นปริมาตรหนึ่งมาเติมตัวทำละลาย สารละลายใหม่ที่ได้จะมีความเข้มข้นลดลง คำนวณได้จากสูตร

$$m_1v_1 = m_2v_2$$

เมื่อ $m_1$ คือความเข้มข้นของสารละลายก่อนการเจือจาง

$v_1$ คือปริมาตรของสารละลายก่อนการเจือจาง

$m_2$ คือความเข้มข้นของสารละลายที่ได้หลังการเจือจาง

$v_2$ คือปริมาตรของสารละลายหลังการเจือจาง

**ตัวอย่างที่ 1** นำสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มา 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 90 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารละลายที่ได้คือ

$$\begin{aligned} m_1v_1 &= m_2v_2 \\ (0.2\ M)\ (10\ ml) &= m_2\ (100\ ml) \\ m_2 &= [(0.2\ M)\ (10\ ml)]\ /\ 100\ ml \\ &= 0.02\ M \end{aligned}$$

สามารถหาความเข้มข้นของสารละลายหลังจากเจือจาง โดยหาจากค่าการเจือจาง (dilution factor; $D_f$) ดังนี้

$$m_2 = m_1 / D_f$$

โดยค่าการเจือจาง ($D_f$) คือ ปริมาตรของสารละลายหลังการเจือจางหารด้วยปริมาตรสารละลายก่อนการเจือจาง ($V_2 / V_1$)

**ตัวอย่างที่ 2** นำสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มา 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 90 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เท่ากับเจือจางไป 10 เท่า (100 มิลลิลิตร / 10 มิลลิลิตร) ค่าการเจือจาง ($D_f$) คือ 10 ดังนั้นสารละลายที่เจือจางมีความเข้มข้น 0.02 M โดยคำนวณจากสูตร

$$m_2 = m_1 / D_f$$
$$m_2 = 0.2\ M / 10$$
$$m_2 = 0.02\ M$$

**การเจือจางหลายครั้ง** (multiple dilutions) หาความเข้มข้นภายหลังการเจือจางโดยคำนวณจากสูตร $m_2 = m_1 / D_{f\ รวม}$

**ตัวอย่างที่ 3** ถ้าเจือจางสารละลายทั้งหมด 3 ครั้ง ดังนี้ การเจือจางครั้งที่ 1 นำสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ มา 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายเจือจางที่ได้มา 2 มิลลิลิตร เจือจางต่อเป็นครั้งที่ 2 โดยเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร และครั้งที่ 3 นำสารละลายเจือจางจากครั้งที่ 2 มา 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร ดังนั้นค่าการเจือจางครั้งที่ 1, 2, 3 และค่าการเจือจางรวม ($D_{f1}$, $D_{f2}$, $D_{f3}$ และ $D_{f\,รวม}$) มีค่าเป็น

$$D_{f1} = 100\ ml / 10\ ml = 10$$
$$D_{f2} = 50\ ml / 2\ ml = 25$$
$$D_{f3} = 10\ ml / 5\ ml = 2$$
$$D_{f\,รวม} = 10 \times 25 \times 2 = 500$$

ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายสุดท้ายภายหลังการเจือจางจำนวน 3 ครั้ง คือ

$$m_2 = m_1 / D_{\text{รวม}}$$
$$m_2 = 0.2\ M / 500$$
$$= 0.0004\ M$$
$$= 400\ \mu M$$

**การเจือจางตามลำดับ** (serial dilution) เป็นการเจือจางสารละลายเป็นขั้นๆ จากสารละลายที่มีความเข้มข้นมากทำให้มีความเข้มข้นลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำโดยปิเปตต์น้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางลงในหลอดทดลองสำหรับการเจือจางแต่ละหลอด ด้วยปริมาตรที่เท่ากันทุกหลอด เช่น 9.0 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารละลายตัวอย่างใส่หลอดที่ 1 ด้วยปริมาตรค่าหนึ่ง เช่น 1.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน สารละลายในหลอดที่ 1 มีปริมาตรรวมเป็น 10.0 มิลลิลิตร ดังนั้นเป็นการเจือจางจากสารตัวอย่างตั้งต้นเท่ากับ 10 เท่า (10.0 มิลลิลิตร / 1.0 มิลลิลิตร) ค่าการเจือจางคือ 10 เมื่อปิเปตต์สารละลายที่เจือจางจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ดังนั้นหลอดที่ 2 เจือจางไป 100 เท่า จากสารละลายตั้งต้น ทำการเจือจางเช่นเดียวกันในหลอดที่ 3, 4, 5, ... โดยปิเปตต์สารละลายครั้งละ 1 มิลลิลิตรจากหลอดที่ 2 ใส่หลอดที่ 3, หลอดที่ 3 ใส่หลอดที่ 4, หลอดที่ 4 ใส่หลอดที่ 5, ... ตามลำดับ ดังนั้นการเจือจางสารละลายตั้งต้น จากหลอดที่ 1-5 จึงเป็น 10, 100, 1000, 10000 และ 100000 ตามลำดับ การเจือจางอาจใช้อัตราส่วนอื่นตามความเหมาะสม สำหรับการทดลองแต่ละการทดลอง

**เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด**

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (\% error)} = \frac{|\text{ค่าจากการทดลอง} - \text{ค่าจริง}|}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

## pH และบัฟเฟอร์

การทดลองทางชีวเคมีโดยทั่วไปมีความจำเป็นต้องควบคุม pH ของสารละลายเพื่อรักษาสภาพธรรมชาติของสาร หรือควบคุมให้สารนั้นอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

**pH** หมายถึงความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน โดยกำหนดให้

$$pH = -\log [H^+]$$

$$= \log \frac{1}{[H^+]}$$

ปริมาณของไฮโดรเจนไอออนในสารละลายขึ้นอยู่กับชนิดของกรด และความเข้มข้นของกรด

$$HA \text{ (acid)} \rightleftharpoons H^+ + A^- \text{ (conjugate base)}$$

น้ำบริสุทธิ์สามารถแตกตัวได้ดังนี้

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ โมลต่อลิตร

$$pH = -\log [H^+]$$

$$= -\log 10^{-7}$$

$$= 7$$

สมการของเฮนเดอซัน-ฮาสเซลบาค (Henderson – Hasselbalch equation) ใช้ในการคำนวณค่า pH คือ

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

**บัฟเฟอร์** (buffer) คือสารละลายที่ทำหน้าที่รักษาระดับของ pH บัฟเฟอร์มีส่วนผสมของกรดอ่อนกับเกลือของกรดอ่อน หรือด่างอ่อนกับเกลือของด่างอ่อน ความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ (buffer capacity) คือจำนวนโมลต่อลิตรของ $[H^+]$ หรือ $[OH^-]$ ที่เติมลงไปในสารละลายแล้วทำให้ค่า pH เปลี่ยนไป 1 หน่วย ความสามารถของบัฟเฟอร์ในการต่อต้านการเปลี่ยนแปลง pH จะมีค่ามากที่สุดในช่วง pH ที่ใกล้เคียงกับค่า $pK_a$

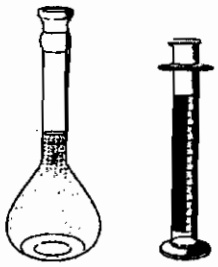
การเลือกใช้บัฟเฟอร์ต้องพิจารณาถึงปัจจัยที่สำคัญต่างๆ เมื่อต้องการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ให้เลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์นั้น ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่ใช้จะใช้ความเข้มข้นต่ำสุด และเลือกบัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และสารชีวโมเลกุล มีเอนไซม์หลายชนิดที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เช่น carboxypeptidase, urease, kinase และ dehydrogenase หรือบอเรทบัฟเฟอร์สามารถสร้างพันธะโคเวเลนท์กับ monosaccharides และ oligosaccharides

## อุปกรณ์ในการวัดปริมาตร

การทดลองทางชีวเคมีเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำ อุปกรณ์สำหรับการวัดปริมาตรมีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง ในการวัดปริมาตรจึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับปริมาตรที่ต้องการ และใช้อย่างถูกวิธี อุปกรณ์ในการวัดปริมาตรมีดังนี้

1. **ขวดวัดปริมาตร** (volumetric flask) มีลักษณะเป็นขวดก้นกลม คอขวดยาวและแคบ มีขีดบอกปริมาตรที่คอขวด ดังรูปที่ 1.2 ใช้วัดปริมาตรเพียงค่าเดียว หรือใช้สำหรับเตรียมสาร มีขนาดต่างๆ กันตั้งแต่ 1 มิลลิลิตร จนถึง 1 ลิตร

2. **กระบอกตวง** (graduated cylinder) มีลักษณะเป็นกระบอกทรงกลม มีขีดบอกปริมาตรหลายค่า ดังรูปที่ 1.2 ใช้ตวงสารให้ได้ปริมาตรตามต้องการ โดยดูจากขีดบอกปริมาตรที่กำกับไว้ที่กระบอกตวง



**รูปที่ 1.2** ขวดวัดปริมาตร (ด้านซ้าย) และกระบอกตวง (ด้านขวา)

**3. ปิเปตต์** (pipette หรือ pipet) การวัดปริมาตรของสารละลาย หรือถ่ายโอนสารละลายที่ใช้ในการทดลองทางชีวเคมีนั้นมีการใช้ปิเปตต์อยู่เสมอ เนื่องจากการทดลองทางชีวเคมีส่วนใหญ่ใช้สารปริมาณน้อย ชนิดและขนาดของปิเปตต์มีให้เลือกใช้หลายแบบตามความเหมาะสมของงาน ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดและขนาดของปิเปตต์ให้เหมาะสมกับปริมาตรที่ต้องการ รวมทั้งการใช้ปิเปตต์อย่างถูกวิธี จะทำให้การทดลองมีความคลาดเคลื่อนน้อยลง แบ่งชนิดของปิเปตต์ได้ดังนี้

3.1 ปิเปตต์แบบทั่วไป (graduated pipet) ปิเปตต์ที่มีลักษณะเป็นหลอดแก้ว มีขีดบอกปริมาตรบนหลอดแก้ว แบ่งเป็น 2 แบบ

3.1.1 Volumetric pipet ปิเปตต์ที่มีขีดบอกปริมาตรเพียงขีดเดียว ใช้ในการวัดปริมาตรเพียงค่าเดียว ดังรูปที่ 1.3 เช่น ปิเปตต์ขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปตต์ขนาด 20 มิลลิลิตร เป็นต้น เมื่อใช้ปิเปตต์แบบนี้ดูดสารละลาย ให้ปล่อยสารละลายออกจากปิเปตต์สู่ภาชนะรองรับ ขั้นตอนสุดท้ายต้องสัมผัสปลายปิเปตต์กับภาชนะ เพื่อให้สารละลายหยดที่เหลือออกมา จึงได้ปริมาตรตามต้องการ

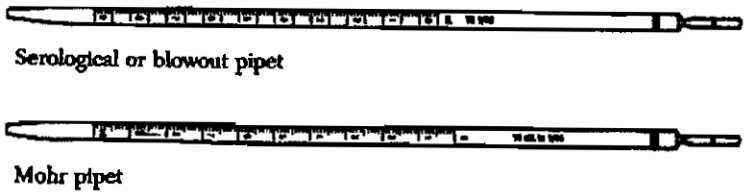
Volumetric pipet

**รูปที่ 1.3** Volumetric pipet

3.1.2 Measuring pipet ปิเปตต์ที่มีขีดบอกปริมาตรหลายขีดกำกับอยู่ตลอดความยาวของปิเปตต์ สามารถใช้วัดปริมาตรสารละลายปริมาณต่างๆ แบ่ง measuring pipet ออกเป็น 2 ชนิด คือ

3.1.2.1 Serological pipet หรือเรียก blowout pipet ปิเปตต์ชนิดนี้มีขีดบอกปริมาตรจนถึงปลายปิเปตต์ ดังรูปที่ 1.4 เมื่อใช้ดูดสารละลายต้องปล่อยสารละลายจนหมดปิเปตต์ โดยเป่าสารละลายหยดสุดท้ายออกจากปิเปตต์ด้วยลูกยาง

3.1.2.2 Mohr pipet ปิเปตต์ชนิดนี้มีขีดบอกปริมาตรทั้งหมดไม่ถึงปลายปิเปตต์ ดังรูปที่ 1.4 เมื่อใช้ดูดสารละลายตามปริมาตรที่ต้องการ แล้วให้ปล่อยสารละลายออกจากปิเปตต์จนถึงระดับของขีดบอกปริมาตร ห้ามเป่าสารละลายออกจากปิเปตต์ เช่น ปิเปตต์ขนาด 10 มิลลิลิตร มีขีดบอกระดับ 10 มิลลิลิตร ที่ปิเปตต์




**รูปที่ 1.4** Measuring pipet ทั้ง 2 ชนิด

ข้อควรระวังในการเลือกใช้ปิเปตต์แบบทั่วไป คือเลือกใช้ปิเปตต์ที่มีขนาดเหมาะสมกับปริมาตรที่ต้องการ ไม่ควรใช้ปิเปตต์ขนาดใหญ่กับการวัดปริมาตรน้อยๆ การอ่านค่าบนปิเปตต์ต้องให้สารละลายอยู่ในระดับสายตา ขณะที่ปิเปตต์สารละลายต้องระวังอย่าให้มีฟองอากาศเข้าสู่ปิเปตต์ เพราะจะทำให้ปริมาตรไม่ถูกต้อง

3.2 ปิเปตต์แบบอัตโนมัติ (automatic pipet) นิยมใช้วัดปริมาตรน้อยๆ จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าไมโครปิเปตต์ (micropipet) ใช้กับปริมาตร 0.001 มิลลิลิตร ถึง 5 มิลลิลิตร (1 ไมโครลิตร ถึง 5,000 ไมโครลิตร) ซึ่งมีความแม่นยำสูง ปิเปตต์แบบนี้ใช้ระบบลูกสูบและใช้ร่วมกับที่สวมปิเปตต์ (pipet tip หรือ disposable tip) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ใช้สำหรับบรรจุสารละลาย ปิเปตต์แบบอัตโนมัติแบ่งเป็น 2 ประเภท

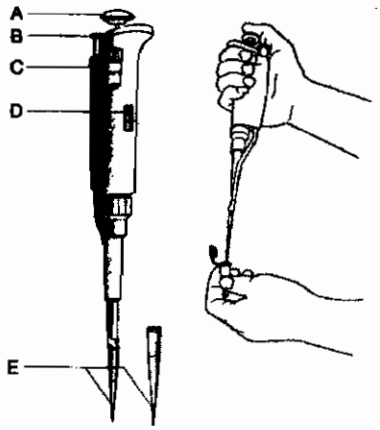
3.2.1 ปิเปตต์อัตโนมัติแบบปริมาตรคงที่ (fix volume automatic pipet) ปิเปตต์แต่ละอันจะมีปริมาตรคงที่ ไม่สามารถปรับเปลี่ยนปริมาตรได้ เช่น ปิเปตต์ขนาด 50 ไมโครลิตร, 100 ไมโครลิตร หรือ 1,000 ไมโครลิตร เป็นต้น

3.2.2 ปิเปตต์อัตโนมัติแบบปรับปริมาตรได้ (vary volume automatic pipet) ปิเปตต์อัตโนมัติประเภทนี้สามารถเปลี่ยนแปลงปริมาตรที่ต้องการดูดในแต่ละครั้งได้ โดยปิเปตต์มีปุ่มปรับปริมาตร (adjustment knob) ที่ส่วนบนของปิเปตต์ บริษัทต่างๆ ที่ผลิตปิเปตต์อัตโนมัติขึ้นนั้น มีการตั้งชื่อจำเพาะทางการค้าขึ้น เช่น Pipetman ผลิตโดย Rainin Instruments, Eppendorf® pipettor ผลิตโดยบริษัท Brinkman Instruments และ Integrapette® ผลิตโดยบริษัท Integrated Instrument Services เป็นต้น ปิเปตต์อัตโนมัติโดยทั่วไปมีขนาดในการวัดปริมาตรต่างๆ กัน เช่น Pipetman มีขนาด คือ P-2, P-10, P-20, P-100, P-200, P-1000 และ P-5000 ดังตารางที่ 1.4 ปิเปตต์ P-2 วัดปริมาตรไม่เกิน 2 ไมโครลิตร ปิเปตต์ P-10 วัดปริมาตรไม่เกิน 10 ไมโครลิตร หรือปิเปตต์ P-5000 วัดปริมาตรไม่เกิน 5,000 ไมโครลิตร ที่สวมปิเปตต์ผลิตขึ้นให้สวมพอดีกับปลายของปิเปตต์แต่ละชนิด โดยแยกออกเป็นสีต่างๆ เช่น สีขาวใช้กับปิเปตต์ P-10 สีเหลืองใช้กับปิเปตต์ P-20 ถึง P-200 สีฟ้าใช้กับปิเปตต์ P-1000 เป็นต้น ขนาดที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมีโดยทั่วไปคือ P-20, P-200 และ P-1000

เมื่อใช้ปิเปตต์อัตโนมัติให้ปรับปริมาตรที่ต้องการที่ปุ่มบนตัวปิเปตต์ ดังรูปที่ 1.5 จากนั้นสวมส่วนปลายปิเปตต์เข้ากับที่สวมปิเปตต์ให้แน่น กดปุ่มลูกสูบที่ปลายด้านบนลงมาให้ถึงจังหวะแรก แล้วจุ่มปลายที่สวมปิเปตต์ลงสู่สารละลายที่ต้องการดูด ค่อยๆ ปล่อยปุ่มลูกสูบกลับคืนสู่ระดับเดิม สารละลายที่มีปริมาตรตามที่ตั้งค่าไว้จะถูกดูดเข้ามายังที่สวมปิเปตต์ ย้ายปิเปตต์อัตโนมัติมาสู่ภาชนะใหม่ที่ต้องการใส่สารละลาย โดยให้ปลายที่สวมปิเปตต์สัมผัสอยู่กับภาชนะ กดปุ่มลูกสูบลงมายังจังหวะแรก สารละลายจะไหลออก ให้ปล่อยสารละลายหยดสุดท้ายที่อยู่ส่วนปลายที่สวมปิเปตต์ออกให้หมด โดยกดปุ่มลูกสูบลงอีกเล็กน้อยสู่จังหวะที่สอง จะได้สารละลายปริมาตรตามต้องการ

**ตารางที่ 1.4** Pipetman ขนาดต่างๆ

| ขนาดของ Pipetman | ปริมาตรที่ปรับได้ (µl) | ปริมาตรที่เหมาะสมในการวัด (µl) |
|---|---|---|
| P–2 | 0 ถึง 2 | 0.1 ถึง 2 |
| P–10 | 0 ถึง 10 | 0.5 ถึง 10 |
| P–20 | 0 ถึง 20 | 2 ถึง 20 |
| P–100 | 0 ถึง 100 | 10 ถึง 100 |
| P–200 | 0 ถึง 200 | 50 ถึง 200 |
| P–1000 | 0 ถึง 1000 | 100 ถึง 1000 |
| P–5000 | 0 ถึง 5000 | 500 ถึง 5000 |




**รูปที่ 1.5** ส่วนต่างๆ ของปิเปตต์อัตโนมัติ : (A) ปุ่มกด, (B) ที่ปลด tip, (C) ที่ปรับปริมาตร, (D) ตัวเลขบอกปริมาตร, (E) tip และการประกอบ tip เข้ากับปิเปตต์ รูปด้านขวามือ แสดงวิธีการถือปิเปตต์ และการใส่สารลงสู่หลอด microtube

ข้อควรระวังเกี่ยวกับส่วนประกอบของปิเปตต์อัตโนมัติ

1. ภายในตัวปิเปตต์ซึ่งประกอบด้วยกระบอกสูบและลูกสูบ ต้องทากรีซ (grease) ที่บริเวณ o – ring เพื่อให้กระบอกสูบเป็นสูญญากาศ

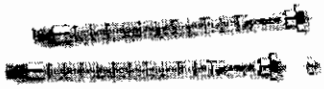
2. ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติด้วยความระมัดระวัง อย่าทำตกพื้น

3. ขณะที่ใช้ไม่ควรดูดสารละลายเข้าไปในกระบอกลูกสูบ และควรตรวจสอบกระบอกสูบอยู่เสมอว่ามีของเหลวตกค้างอยู่ภายในหรือไม่

4. ภายหลังการใช้งาน ควรถอดที่สวมปิเปตต์ออก เก็บปิเปตต์อัตโนมัติในแนวตั้งให้ปลายอยู่ด้านล่าง

5. ปิเปตต์อัตโนมัติมีความแม่นยำในการวัดปริมาตรค่อนข้างสูง ส่วนความถูกต้องในการวัดปริมาตรขึ้นอยู่กับการใช้ที่ถูกวิธี และการตรวจสอบ (calibrate) อย่างสม่ำเสมอ ถ้าพบว่าวัดปริมาตรผิดพลาดไป ควรส่งให้บริษัทผู้จำหน่ายนำกลับไปตรวจสอบ

**4. เข็มฉีดยาแก้ว** (glass syringe) เช่น Hamilton syringe จากบริษัท Courtesy of Hamilton Co. ดังรูปที่ 1.6 ตัวหลอดทำจากแก้ว ลูกสูบเป็นโลหะซึ่งสัมผัสพอดีกับผิวแก้วด้านใน ใช้วัดปริมาตรน้อยๆ ได้ดี เช่น 1 ไมโครลิตร ตัวเข็มเป็นโลหะแหลมและยาว เหมาะกับงานที่มีพื้นที่ในการใส่สารละลายน้อย เช่น การฉีดสารเข้าเครื่อง GC, HPLC และการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นต้น วิธีการใช้คือ เริ่มแรกให้จุ่มปลายเข็มฉีดยาลงในสารละลายแล้วค่อยๆ ดึงตัวดูดขึ้นและกดลงหลายๆ ครั้ง เพื่อให้ตัวเข็มและภายในหลอดแก้วเปียกสารละลาย จากนั้นดูดสารละลายตามปริมาตรที่ต้องการ โดยให้ระดับลูกสูบตรงกับขีดบอกปริมาตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ถ้ามีฟองอากาศให้ปล่อยทิ้งโดยดูดซ้ำและกดตัวดูดอย่างเร็ว ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นดูดสารละลายใหม่ตามปริมาตรที่ต้องการ เมื่อใช้งานเสร็จต้องทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นทันที ถ้าปล่อยให้แห้ง เกลือหรือสารออร์กานิคที่มีในสารละลายจะแห้งติดที่ตัวเข็มและหลอดแก้ว ทำให้ใช้งานอีกไม่ได้



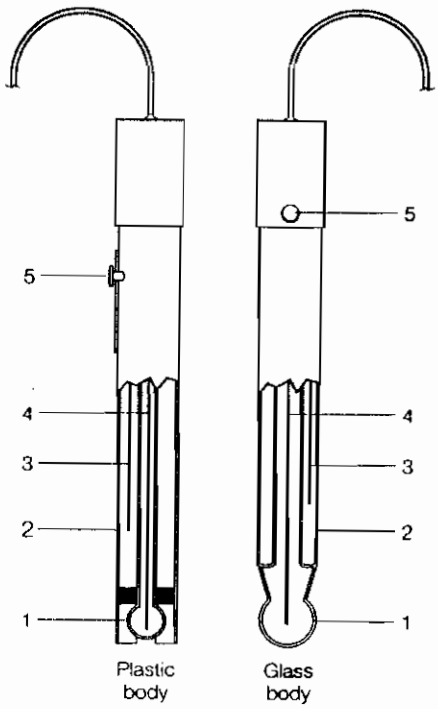
**รูปที่ 1.6** เข็มฉีดยาแก้ว

# เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชีวเคมี

- **เครื่องวัด pH**

เครื่องวัด pH (pH meter) ใช้วัดความเป็นกรด–เบสของสารละลาย เครื่องวัด pH ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. อิเล็กโทรด (electrode) อิเล็กโทรดมีลักษณะเป็นแท่ง มีกระเปาะที่ส่วนปลาย ทำจากแก้วชนิดพิเศษที่ยอมให้ $H^+$ ซึมผ่านได้ แต่ไม่ยอมให้ไอออนชนิดอื่นผ่าน ภายในหลอดแก้วบรรจุสารละลายอยู่ ตัวอิเล็กโทรดทำจากวัสดุ 2 ชนิด คือ พลาสติก (plastic body) และแก้ว (glass body) ดังรูปที่ 1.7




Electrodes are housed in either plastic or an all-glass body configuration. They can be either single cells or as shown in the diagram, combined into one body for ease of use. Regardless of the configuration, there are several features common to all electrodes.

1. Sensing membrane glass: Performs actual measurement.
2. Reference junction: Acts as a liquid path electrical conductor.
3. Internal reference: Supplies a constant equilibrium voltage.
4. pH internal element: Supplies a voltage based on the pH value of the sample.
5. Reference fill hole: Used to replace the reference electrolyte solution.

**รูปที่ 1.7** ส่วนต่างๆ ของอิเล็กโทรด

2. ตัวเครื่องวัด pH ทำหน้าที่วัดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นที่อิเล็กโทรดซึ่งจุ่มอยู่ในสารละลาย ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าดังสมการ

$$E = 2.303 \frac{RT}{F} \log \frac{[H_1^+]}{[H_2^+]}$$

E คือความต่างศักย์ไฟฟ้า

R คือค่าคงที่ของก๊าซ (gas constant)

T คืออุณหภูมิสัมบูรณ์ (absolute temperature)

F คือค่าคงที่ของฟาราเดย์ (Faraday constant)

$[H_1^+]$ คือความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในอิเล็กโทรด

$[H_2^+]$ คือความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายนอกอิเล็กโทรด

- **เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์**

สเปกโทรโฟโทมิตรี (spectrophotometry) เป็นเทคนิคที่ใช้คุณสมบัติของสารในการดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า หรือคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง เพื่อนำมาวิเคราะห์ในเชิงปริมาณและคุณภาพ เมื่อแสงผ่านสารละลายที่มีสารซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ ความเข้มของแสงที่ผ่านออกมาจากสารละลายจะลดลง เมื่อมีเครื่องมือที่วัดพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนหรือที่ผ่านออกมาจะสามารถวิเคราะห์สารได้ เพราะสารแต่ละชนิดมีความสามารถในการดูดกลืนแสงไม่เท่ากัน

**กฎของเบียร์–แลมเบิร์ต (The Beer–Lambert Law)**

นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Johann H. Lambert และ Wihelm Beer ได้เสนอกฎเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแสงที่ถูกดูดกลืนกับปริมาณของสาร โดยเสนอกฎที่เรียกว่า กฎของเบียร์ – แลมเบิร์ต โดยกล่าวว่า "ปริมาณของแสงเดี่ยวที่ถูกดูดกลืน จะเป็นสัดส่วนกับจำนวนโมเลกุลของสารที่สามารถดูดกลืนแสง ซึ่งอยู่ในระยะทางที่แสงวิ่งผ่าน"

ดังนั้นปริมาณของแสงที่สารดูดกลืนเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสาร และระยะทางที่แสงวิ่งผ่านสารละลาย โดยเขียนความสัมพันธ์ได้ดังสมการ

$$\log I_0 / I = \varepsilon lc = A$$

$I_0$ คือความเข้มข้นของแสงคลื่นเดี่ยวที่ผ่านออกมาเมื่อไม่มีสารที่สามารถดูดกลืนแสงอยู่

I คือความเข้มข้นของแสงคลื่นเดี่ยวที่ผ่านออกมาเมื่อมีสารที่สามารถดูดกลืนแสงอยู่ด้วย

ε คือค่าคงที่เฉพาะตัวของสารที่ดูดกลืนแสง (molar absorption coefficient) ณ ความยาวคลื่นแสงค่าหนึ่ง และในตัวทำละลายชนิดหนึ่ง โดยสารมีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ระยะทางที่แสงผ่าน I เซนติเมตร (หน่วยเป็น $M^{-1}$ $cm^{-1}$)

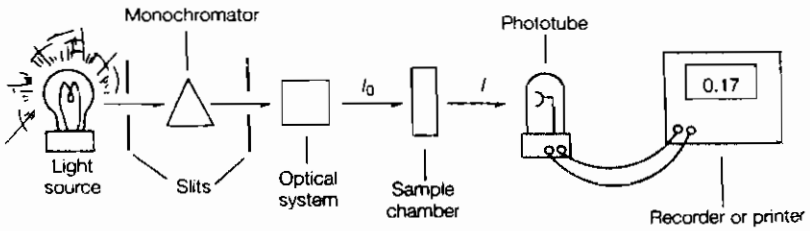
c คือความเข้มข้นของสารที่ดูดกลืนแสงในตัวทำละลายที่ไม่ดูดกลืนแสง (หน่วยเป็น M )

l คือระยะทางที่แสงผ่านสารละลาย (หน่วยเป็น cm)

A คือค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

ค่า $I_0/I$ เรียกว่า transmittance (T) มักเขียนในรูป %T

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่เปลี่ยนพลังงานแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้า เพื่อบ่งบอกถึงปริมาณแสงที่สารดูดกลืน หรือปริมาณแสงที่ผ่านสารละลายออกมา องค์ประกอบของเครื่อง ดังรูปที่ 1.8 มีรายละเอียดดังนี้




**รูปที่ 1.8** แผนผังในการทำงานของเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

1. แหล่งกำเนิดแสง (light source) เป็นหลอดชนิดไฮโดรเจน หรือดิวทีเรียมซึ่งให้แสงที่ความยาวคลื่น 200–340 นาโนเมตร สำหรับเครื่อง UV spectrophotometer และหลอดทังสเตน ซึ่งให้แสงความยาวคลื่น 340–900 นาโนเมตร สำหรับเครื่อง visible spectrophotometer

2. อุปกรณ์คัดเลือกลำแสงที่ความยาวคลื่นเดี่ยว (monochromator) ทำหน้าที่คัดเลือกลำแสง ลำแสงที่คัดเลือกจะผ่านระบบเพิ่มความเข้มแสง และกำหนดทิศทางให้แสงวิ่งผ่านสารละลาย

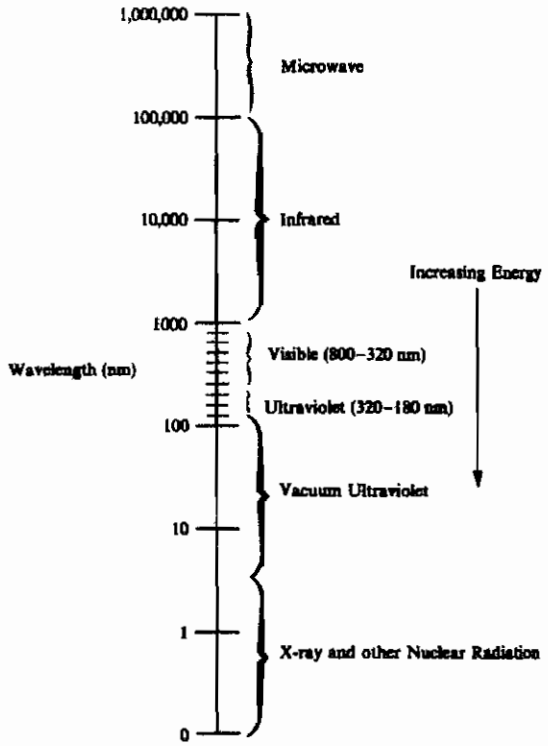
3. หลอดใส่สารละลายตัวอย่าง (sample chamber หรือ sample cell) หรือเรียกว่าคิวเวตต์ (cuvette) วัสดุที่ใช้เป็นควอทซ์ แก้ว หรือวัสดุอื่นที่แสงสามารถผ่านได้ เช่น พลาสติกที่ทำจาก polystyrene หรือ polymethacrylate รูปร่างของคิวเวตต์เป็นทรงกลมเหมือนหลอดทดลอง หรือมีรูปร่างสี่เหลี่ยมที่มีค่า l = 1 เซนติเมตร มีความจุต่างๆ กัน ตามความเหมาะสมกับปริมาณสารละลายที่ต้องการนำมาวัด คิวเวตต์ที่เป็นพลาสติกมีราคาถูก แต่ไม่ทนต่อสารละลายกรดหรือเบส พลาสติกที่ทำจาก polystyrene ใช้กับแสงที่มีความยาวคลื่น 350–800 นาโนเมตร ส่วนพลาสติกที่ทำจาก polymethacrylate ใช้กับแสงที่มีความยาวคลื่น 280–800 นาโนเมตร คิวเวตต์แก้วไม่สามารถใช้กับความยาวคลื่นที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเลต เพราะแก้วดูดกลืนแสงช่วงอัลตราไวโอเลต จึงต้องใช้คิวเวตต์แก้วในช่วงความยาวคลื่นที่มากกว่า 340 นาโนเมตร ส่วนคิวเวตต์ควอทซ์สามารถใช้ได้ทั้งในช่วงอัลตราไวโอเลตและแสงที่ตามองเห็น (200–800 นาโนเมตร) ราคาของคิวเวตต์ควอทซ์แพงกว่าคิวเวตต์แก้ว

4. เครื่องรับสัญญาณ (photodetector) เมื่อมีสัญญาณแสงชนิดความยาวคลื่นเดี่ยววิ่งผ่านสารละลาย แสงบางส่วนจะถูกดูดกลืนไว้ ส่วนที่ผ่านออกมาจะมากระทบกับเครื่องรับสัญญาณ โดยทั่วไปใช้ phototube หรือ photomultiplier tube (PMT) เมื่อรับสัญญาณแล้วจะมีการขยายสัญญาณ และเปลี่ยนรูปของพลังงานแสงเป็นพลังงานไฟฟ้า ส่งต่อไปยังตัวบันทึกข้อมูล

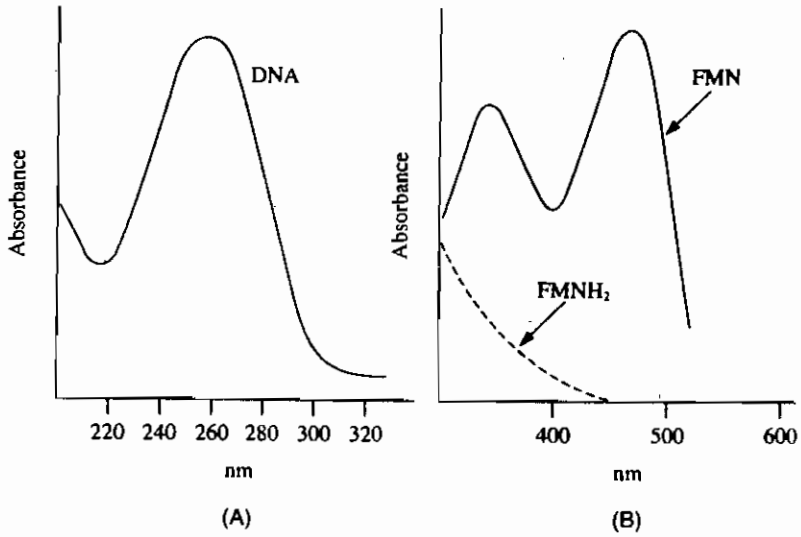
5. ตัวบันทึกข้อมูล (recorder or printer) ทำหน้าที่อ่านสัญญาณ และบันทึกค่าเป็นค่าการดูดกลืนแสง (A) หรือ %T ในแบบ analog หรือ digital

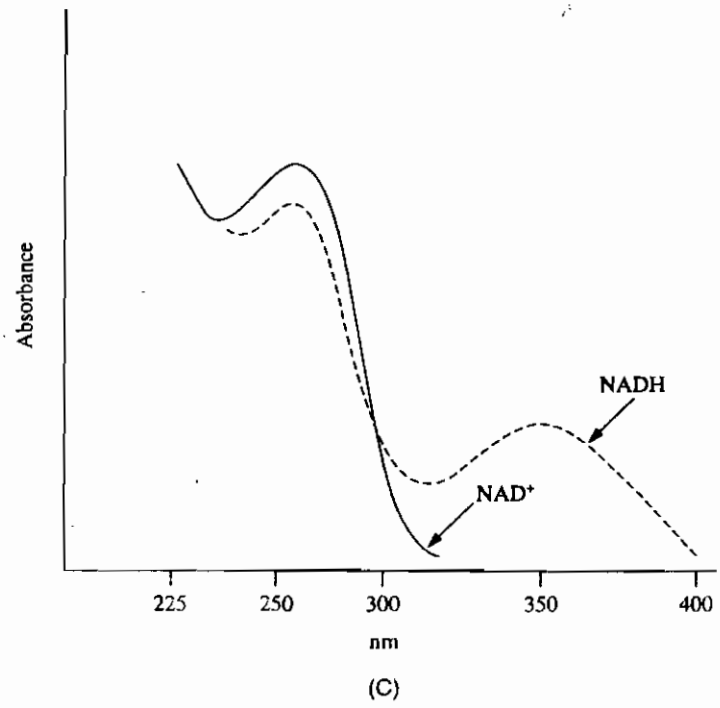
## ประโยชน์ของเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สเปกตรัมของสาร (electromagnetic spectrum) ดังรูปที่ 1.9 ซึ่งแสดงถึง x–ray (x–ray crystallography) อัลตราไวโอเลต (UV, 180–320 นาโนเมตร) ช่วงแสงที่ตามองเห็น (VIS, 320–800 นาโนเมตร) อินฟราเรด และไมโครเวฟ โดยเฉพาะช่วง UV–VIS spectrum มีประโยชน์ในการศึกษาสารชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ($\lambda_{max}$ = 260 nm) ดังรูปที่ 1.10 ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จึงมีประโยชน์ในการหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ




**รูปที่ 1. 9** electromagnetic spectrum




**รูปที่ 1.10** UV – VIS absorbance spectra ของ (A) DNA (B) FMN และ $FMNH_2$ (C) $NAD^+$ และ NADH

จากกฎของเบียร์ – แลมเบิร์ต ค่าการดูดกลืนแสงของสารนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร จึงมีวิธีในการหาความเข้มข้นของสารได้ 3 วิธี คือ

**วิธีที่ 1** ในกรณีที่ทราบค่า ε ของสาร ค่า A ของสารนั้นสามารถคำนวณได้ เมื่อทำการทดลองดังตัวอย่างคือ การหาความเข้มข้นของสารละลายยูราซิล เมื่อนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร อ่านค่าได้ค่าเท่ากับ 0.65 โดยใช้คิวเวตต์ชนิดที่มีระยะทางที่แสงผ่านเท่ากับ 1 เซนติเมตร ในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายเท่ากับ 0.07 ความเข้มข้นของสารละลายยูราซิลคำนวณได้ดังนี้ (เมื่อ $\varepsilon = 8.2 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$)

$$A = \varepsilon l c$$

$$A = (\text{absorbance of solvent + sample}) - (\text{absorbance of solvent})$$

$$A = 0.65 - 0.07 = 0.58$$

$$\varepsilon = 8.2 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$$

$$l = 1\ cm$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon l} = \frac{0.58}{(8.2 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1})(1\ cm)} = 7.1 \times 10^{-5}\ M$$

**วิธีที่ 2** ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างได้มาจากการคำนวณ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ดังตัวอย่างเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งมีความเข้มข้น 1% (w/v) เมื่อนำมาวัดค่าที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้คิวเวตต์ 1 เซนติเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 24.9 ดังนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของไทโรซิเนสที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 0.25 จึงมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01% หรือ 0.1 mg/ml

$$\frac{A_{std}}{C_{std}} = \frac{A_x}{C_x}$$

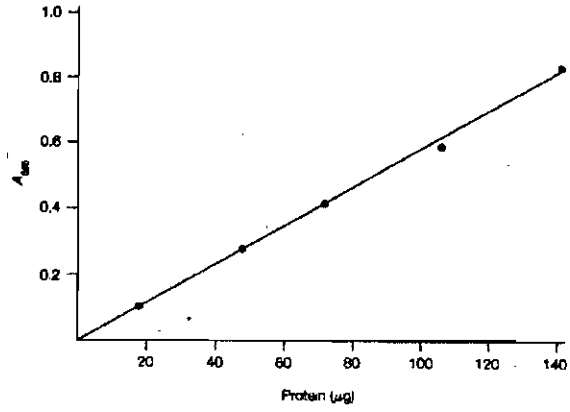
$$\frac{24.9}{1\%} = \frac{0.25}{C_x}$$

$$C_x = 0.01\% = 0.1\ mg/ml$$

**วิธีที่ 3** คำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น เช่น การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford โดยเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้มีปริมาณต่างๆ (ใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 200 μg/ml) แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับสารที่ใช้ทดสอบตามวิธี Bradford วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ดังตารางที่ 1.5 ทั้งนี้ทำปฏิกิริยากับสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปพร้อมกัน จากข้อมูลที่ได้จากสารมาตรฐานนำมาพล็อตกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 1.11 แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างมาเทียบหาปริมาณโปรตีนต่อไป

**ตารางที่ 1.5** ผลการวัด $A_{595}$ ในการหาปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford

| โปรตีน | $A_{595}$ |
|---|---|
| ปริมาณโปรตีนมาตรฐาน(μg) 18 | 0.10 |
| 48 | 0.30 |
| 74 | 0.42 |
| 108 | 0.58 |
| 140 | 0.82 |
| สารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.1 ml | 0.10 |
| สารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.2 ml | 0.22 |

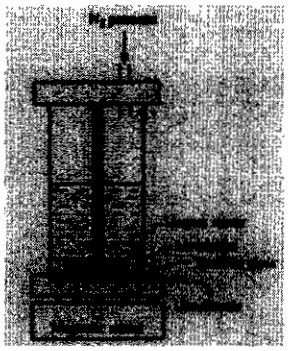



**รูปที่ 1.11** กราฟมาตรฐานของโปรตีน ในการหาปริมาณโปรตีนตามวิธี Bradford

# การแยกสารทางชีวเคมี

การศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในเซลล์สิ่งมีชีวิต ซึ่งมีกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นพร้อมๆ กัน และมีสารหลายชนิดที่มีผลต่อปฏิกิริยานั้น เป็นการยากที่จะทำความเข้าใจ ดังนั้นต้องอาศัยเทคนิคในการแยกสาร และทำการศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง เพื่อนำข้อมูลไปอธิบายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจริงในเซลล์สิ่งมีชีวิต การแยกสารให้ได้ส่วนต่างๆ ออกมาเป็นกลุ่ม และแยกให้ได้สารแต่ละชนิดที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอ เพื่อนำมาศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติ องค์ประกอบ โครงสร้าง ปริมาณสาร กลไกการทำงาน และหน้าที่ของสารนั้นๆ รวมทั้งการแยกสารเพื่อนำสารไปใช้ประโยชน์ โดยคำนึงถึงสภาพธรรมชาติ แอคติวิตี และปริมาณที่ต้องการ

เทคนิคที่ใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุลมีหลายวิธี ได้แก่ การกรองแบบ ultrafiltration ดังรูปที่ 1.12 การทำไดอะไลซิส (dialysis) การเซนตริฟิวจ์ (centrifugation) โครมาโทกราฟี (chromatography) หรืออิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นต้น การเลือกใช้วิธีในการแยกสารขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสาร เช่น โครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล รูปร่าง หรือประจุ ในการแยกสารแต่ละชนิดอาจใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรือหลายวิธีร่วมกันตามความเหมาะสม การเลือกใช้วิธีใดในการแยกสาร ต้องพิจารณาถึงการรักษาลักษณะและคุณสมบัติเดิมของสารไว้ให้มากที่สุด คือทำให้มีความใกล้เคียงกับขณะที่สารนั้นอยู่ในเซลล์ และการแยกแต่ละครั้งควรให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมในการนำไปใช้หรือทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



**รูปที่ 1.12** อุปกรณ์ในการทำ ultrafiltration

**ขั้นตอนการแยกสาร**

การแยกสารทางชีวเคมีโดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอน คือ

1. การทำให้เซลล์แตก (disruption) เป็นการทำให้เซลล์แตกโดยให้เกิดความเสียหายน้อยที่สุด วิธีการทำให้เซลล์แตก ได้แก่ การบด (grinding) การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) การใช้มีดตัด (blender) การปิเปตต์สารละลายขึ้นลง (pipetting) การใช้แรงดันสูง (high pressure) การใช้คลื่นความถี่สูง (ultrasonication) การใช้แรงดันออสโมติก (osmotic pressure) การใช้เอนไซม์ เช่น ไลโซไซม์ เซลลูเลส ไคติเนส การใช้ความเย็นและความร้อนสลับกัน และการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทิลอะซิเทต โทลูอีน

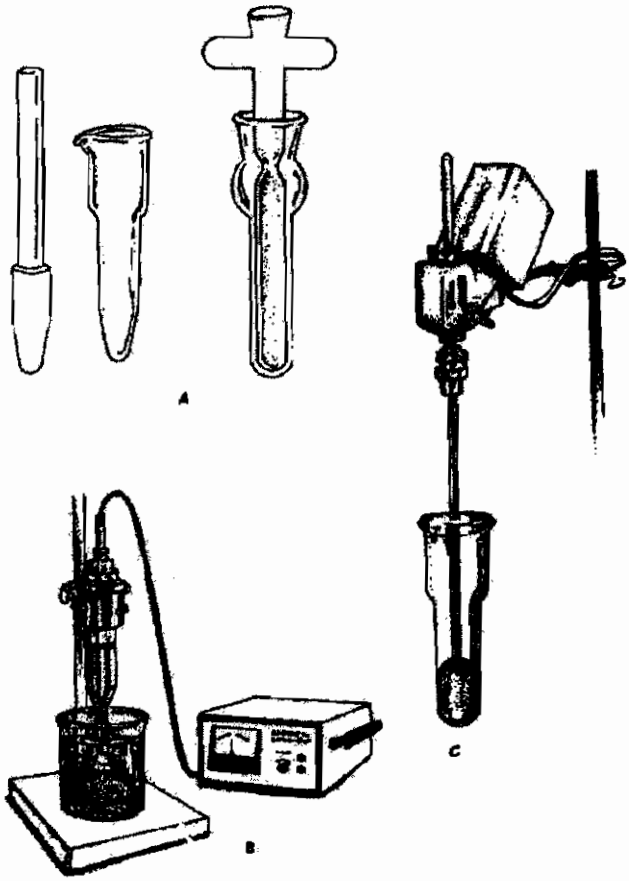
การบดทำโดยใส่สารลงในครกบด (morta) อาจใช้ทราย อลูมินา หรือเศษแก้วที่ป่นแล้วใส่ลงไปเพื่อช่วยในการบด การใช้วิธีบดนี้มักทำให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งที่ต้องการแยก

การทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ homogenizer ดังรูปที่ 1.13 (A,C) homogenizer ประกอบด้วยหลอดแก้วทรงกระบอกและที่บดซึ่งสวมพอดีกับหลอดแก้ว ที่บดมีส่วนปลาย (teflon plunger) ที่ยาว เมื่อทำการดึงที่บดขึ้น–ลง เนื้อเยื่อจะถูกพาให้เคลื่อนที่ไปตามที่ว่างเพียงเล็กน้อยระหว่างหลอดแก้วกับที่บด ทำให้เนื้อเยื่อแตกออกโดยมีความเสียหายน้อย homogenizer ใช้กับเนื้อเยื่ออ่อน เช่น ตับ สมอง และไต

การใช้คลื่นความถี่สูง ดังรูปที่ 1.13 (B) เมื่อเซลล์ได้รับคลื่นความถี่สูงเซลล์จะแตก แต่การใช้คลื่นความถี่สูงจะทำให้เกิดความร้อน จึงต้องใช้ภาชนะแก้วทนความร้อนและแช่ภาชนะแก้วในน้ำแข็งตลอดเวลา

2. การแยกสาร (separation) ที่ต้องการออกจากส่วนต่างๆ ของเซลล์ หรือการแยกสารเป็นกลุ่มที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน (fractionation) เช่น การเซนตริฟิวจ์โดยอาศัยหลักการของการแยกสารตามค่าสัมประสิทธิ์การตกตะกอนด้วยวิธี differential centrifugation

3. การวิเคราะห์สาร (analysis) โดยใช้วิธีการตรวจสอบ (assay) ที่เหมาะสมกับโครงสร้างและคุณสมบัติของสาร เช่น การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry การวิเคราะห์เอนไซม์โดยการหาเอนไซม์แอคติวิตี (enzyme activity) หรือแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity)




**รูปที่ 1.13** เครื่องมือในการทำให้เซลล์แตก (A) hand–operated homogenizer (B) sonicator (C) homogenizer ที่ประกอบเข้ากับมอเตอร์

**วิธีตรวจสอบสารที่ต้องการแยก**

วิธีการตรวจสอบสาร (assay) ที่ผ่านกระบวนการแยกนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากทำให้ทราบว่าได้สารที่ต้องการหรือไม่ มีความบริสุทธิ์เพียงใด การเลือกใช้วิธีในการตรวจสอบต้องพิจารณาถึงความจำเพาะ (specificity) และความว่องไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเป็นสำคัญ รวมทั้งความสามารถในการวัดค่าเชิงปริมาณ (quantitative) วิธีการตรวจสอบสารมีดังนี้

1. การดูดกลืนแสง ใช้ตรวจสอบการดูดกลืนแสงของสารที่ต้องการแยก เช่น การตรวจสอบโปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก แต่อาจไม่จำเพาะ เนื่องจากมีสารอื่นๆ ที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกันซึ่งปะปนมาในสารละลาย

2. อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่แยกสารที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า เหมาะสมในการใช้ติดตามการแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก

3. การทำงานของเอนไซม์ ในกรณีที่แยกเอนไซม์ การตรวจสอบโดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบที่ดี เนื่องจากมีความจำเพาะ ความว่องไว และสามารถวัดค่าเชิงปริมาณได้

4. เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน

5. หน้าที่ทางชีวภาพ เป็นการตรวจสอบการทำงานของสารที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต เช่น สารที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในสัตว์ทดลอง

6. ส่วนประกอบทางเคมี เป็นการหาองค์ประกอบของสารเพื่อบ่งบอกว่าเป็นสารประเภทใด

7. การใช้สารกัมมันตภาพรังสี (radioactive) ซึ่งสามารถให้สัญญาณกับเครื่องตรวจจับสารกัมมันตภาพรังสี หรือทำให้เกิดปฏิกิริยากับแผ่นฟิล์ม

การแยกสารอาจจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการแยกหลายขั้นตอน การติดตามผลการแยกในแต่ละขั้นตอนมีความสำคัญ คือทำให้ทราบว่าต้องทำการแยกสารต่อไปหรือไม่ และชี้แนะว่าต้องใช้เทคนิคใดในการแยกต่อไป การติดตามผลการแยกยังทำให้ทราบว่าสารที่แยกในขั้นตอนนั้นมีความบริสุทธิ์ขึ้นกี่เท่า และมีการสูญเสียสารไปเท่าใด

การทดลองที่ 1.1

# การตรวจสอบปิเปตต์อัตโนมัติ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์ให้นักศึกษาสามารถใช้ปิเปตต์อัตโนมัติได้อย่างถูกวิธี ทราบวิธีการตรวจสอบความถูกต้อง และความแม่นยำในการวัดปริมาตรของปิเปตต์อัตโนมัติ

## อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องชั่งละเอียด

ปิเปตต์อัตโนมัติขนาด P-100 และ P-1000

ที่สวมปิเปตต์ (pipet tip) สำหรับปิเปตต์ขนาด P-100 และ P-1000

น้ำกลั่นชนิด deionized water (DI water)

## วิธีการทดลอง

**ตอนที่ 1 การตรวจสอบปิเปตต์ขนาด P-100**

1. นำบีกเกอร์ที่แห้งสนิทไปชั่งโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของบีกเกอร์

2. นำปิเปตต์อัตโนมัติขนาด P-100 มาปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร

3. ใส่ที่สวมปิเปตต์เข้ากับปลายปิเปตต์ให้แน่น จากนั้นดูดน้ำกลั่นเข้าสู่ที่สวมปิเปตต์

4. ปล่อยน้ำกลั่นลงสู่บีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ชั่งบีกเกอร์พร้อมน้ำกลั่นและหาน้ำหนักของน้ำกลั่น บันทึกผลการทดลอง

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 – 4 อีก 2 ครั้ง

6. คำนวณเพื่อเปลี่ยนน้ำหนักของน้ำกลั่นให้เป็นปริมาตร โดยน้ำมีความหนาแน่น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรของน้ำกลั่นที่ได้ต้องไม่แตกต่างจากที่ตั้งไว้เกิน 1% จึงถือว่าปิเปตต์อัตโนมัติสารมารถนำไปใช้งานได้

**ตอนที่ 2 การตรวจสอบปิเปตต์ขนาด P-1000**

1. นำบีกเกอร์ที่แห้งสนิทไปชั่งโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของบีกเกอร์

2. นำปิเปตต์อัตโนมัติขนาด P-1000 มาปรับปริมาตรเป็น 1000 ไมโครลิตร

3. ใส่ที่สวมปิเปตต์เข้ากับปลายปิเปตต์ให้แน่น จากนั้นดูดน้ำกลั่นเข้าสู่ที่สวมปิเปตต์

4. ปล่อยน้ำกลั่นลงสู่บีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ชั่งบีกเกอร์พร้อมน้ำกลั่นและหาน้ำหนักของน้ำกลั่น บันทึกผลการทดลอง

5. ทำการทดลองซ้ำข้อ 1 – 4 อีก 2 ครั้ง

6. ทำการทดลองอีกชุดทำนองเดียวกับข้อ 1 – 5 แต่ปรับปริมาตรของปิเปตต์ P-1000 เป็น 100 ไมโครลิตร

**หมายเหตุ** ก่อนที่นักศึกษาจะทำการทดลอง นักศึกษาต้องศึกษาภาคทฤษฎีที่อธิบายข้อมูลของปิเปตต์อัตโนมัติ และวิธีการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติให้เข้าใจก่อน

**การวิเคราะห์ผลการทดลอง**

**ตอนที่ 1 การตรวจสอบปิเปตต์ขนาด P-100**

1. บันทึกน้ำหนักของน้ำกลั่นที่ได้

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 1 ($x_1$) =.....

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 2 ($x_2$) =.....

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 3 ($x_3$) =.....

2. น้ำหนักของน้ำกลั่นเฉลี่ย ($x_{avg}$)

$$x_{avg} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3}$$

=.....

3. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (% error)

$$\% \text{ error} = \frac{\left| x_{avg} - 0.100 \text{ g} \right|}{0.1 \text{ g}} \times 100$$

=.....

4. คำนวณค่าเบี่ยงเบน (mean deviation)

$$\text{mean deviation} = \frac{\sum \left| x_i - x_{avg} \right|}{3}$$

=.....

**ตอนที่ 2 การตรวจสอบปิเปตต์ขนาด P-1000**

1. บันทึกน้ำหนักของน้ำกลั่นที่ได้

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 1 ($x_1$) =.....

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 2 ($x_2$) =.....

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 3 ($x_3$) =.....

2. น้ำหนักของน้ำกลั่นเฉลี่ย ($x_{avg}$)

$$x_{avg} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3}$$

=.....

3. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (% error)

$$\% \text{ error} = \frac{\left| x_{avg} - 1.0 \text{ g} \right|}{1.0 \text{ g}} \times 100$$

=.....

4. คำนวณค่าเบี่ยงเบน (mean deviation)

$$\text{mean deviation} = \frac{\sum \left| x_i - x_{avg} \right|}{3}$$

=.....

5. บันทึกน้ำหนักของน้ำกลั่นในการใช้ปิเปตต์ขนาด P-1000 ปิเปตต์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 1 ($x_1$) =.....

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 2 ($x_2$) =.....

น้ำหนักของน้ำกลั่นครั้งที่ 3 ($x_3$) =.....

6. น้ำหนักของน้ำกลั่นเฉลี่ย ($x_{avg}$)

$$x_{avg} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3}$$

=.....

7. คำนวณเปอร์เซ็นต์ความผิดพลาด (% error)

$$\% \text{ error} = \frac{\left| x_{avg} - 0.1 \text{ g} \right|}{0.1 \text{ g}} \times 100$$

=.....

8. คำนวณค่าเบี่ยงเบน (mean deviation)

$$\text{mean deviation} = \frac{\sum \left| x_i - x_{avg} \right|}{3}$$

=.....

**คำถาม**

1. **ปิเปตต์ที่นักศึกษานำมาทดสอบขนาดใดมีความถูกต้องในการวัดปริมาตร**

.....

.....

.....

2. **ปิเปตต์ที่นักศึกษานำมาทดสอบขนาดใดมีความแม่นยำในการวัดปริมาตร**

.....

.....

.....

3. **นักศึกษาจะเลือกใช้ปิเปตต์ขนาดใดในการปิเปตต์ปริมาตร** 100 ไมโครลิตร **เพราะอะไร**

.....

.....

.....

การทดลองที่ 1.2

# การใช้สเปกโทรโฟโทมิเตอร์ในการวิเคราะห์สาร

## 1. การศึกษาการดูดกลืนแสงของ PNP ในสภาวะกรดและเบส

*p* – nitrophenol (PNP) มีสูตรเคมี คือ $O_2N–C_6H_4–OH$ เมื่อ PNP อยู่ในรูป ionized form จะมีสี เมื่อปรับ pH ของสารละลาย จะทำให้ PNP อยู่ในรูป ionized form หรือ protonated form ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ เปลี่ยนแปลงไป

### อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M ซึ่งมีค่า pH 5 และ pH 10

0.1 mM PNP

### วิธีการทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอด ปิเปตต์สารละลาย 0.1 mM PNP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองทั้ง 2 หลอด

2. ปิเปตต์บัฟเฟอร์ pH 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดที่ 1 และปิเปตต์บัฟเฟอร์ pH 10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่ 2 ผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. นำสารละลายทั้ง 2 หลอด ไปศึกษาการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 360 ถึง 500 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าความยาวคลื่น (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) เพื่อดูลักษณะของ absorbance spectra ที่ pH ทั้งสองค่า

## 2. การหาค่า $pK_a$ ของ PNP

การทดลองนี้ทำเพื่อหาค่า $pK_a$ ของ PNP ซึ่งได้จากข้อมูลในการดูดกลืนแสงของ PNP ที่ pH ต่างๆ

### อุปกรณ์และสารเคมี

**อุปกรณ์**

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

**สารเคมี**

บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 M มีค่า pH = 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 และ 10

0.1 mM PNP

### วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์สารละลาย 0.1 mM PNP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด จำนวน 8 หลอด

2. ปิเปตต์บัฟเฟอร์ pH 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่ 1 ส่วน pH 6, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 และ 10 ใส่หลอดที่เหลือหลอดละ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารละลายให้เข้ากัน

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย โดยเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับ PNP ในรูป protonated form และ unprotonated form ซึ่งได้จากการทดลองที่ 1 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของ PNP กับค่า pH ของสารละลาย PNP และหาค่า $pK_a$

## 3. การหาปริมาณ PNP

การทดลองนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ PNP และความเข้มข้นของ PNP ในสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน PNP ซึ่งทราบความเข้มข้น

### อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

สารละลายมาตรฐาน 0.1 mM PNP

สารละลายตัวอย่าง PNP (A, B, C หรือ D)

บัฟเฟอร์ pH 10.0

### วิธีการทดลอง

1. เจือจางสารละลายมาตรฐาน PNP ด้วยบัฟเฟอร์ pH 10 ให้ปริมาตรรวมเป็น 4 มิลลิลิตร และให้มีความเข้มข้นของ PNP เป็น 10, 20, 30, 50 และ 75 ไมโครโมลาร์

2. วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ความยาวคลื่นที่ได้จากการทดลองที่ 1

3. เจือจางสารละลาย PNP ตัวอย่างที่ได้ (A, B, C หรือ D) ด้วยบัฟเฟอร์ pH 10.0 ในอัตราส่วน 1:3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเช่นเดียวกับข้อ 2

4. เขียนกราฟมาตรฐานที่พล็อตระหว่างปริมาณ PNP และค่าการดูดกลืนแสง

5. คำนวณหาปริมาณ และความเข้มข้นของสาร PNP ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

## 4. การวิเคราะห์ pH โดยใช้วิธี colorimetric

การทดลองนี้ใช้คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารละลาย PNP ที่ pH ต่างๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์ pH ของสารละลาย PNP ตัวอย่าง

### อุปกรณ์และสารเคมี

#### อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

#### สารเคมี

0.1 M Tris base

0.1 M HCl

0.1 mM PNP

### วิธีการทดลอง

1. เตรียมบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris – HCl pH 7.4, 7.8 และ 8.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิเปตต์บัฟเฟอร์แต่ละ pH ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่

2. ปิเปตต์ 0.1 mM PNP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอดในข้อ 1 ผสมสารละลายให้เข้ากัน

3. นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ได้จากการทดลองที่ 2 วิเคราะห์ pH ของสารละลายแต่ละหลอด

4. วัด pH ของสารละลายด้วยเครื่องวัด pH เพื่อตรวจสอบผลการวิเคราะห์ pH

คำถาม

1. จงเขียนโครงสร้างของ *p*–nitrophenolate ion form ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นเบส

.....

.....

.....

2. เหตุใดจึงใช้ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในการหาปริมาณของ PNP

.....

.....

.....

3. PNP มีค่า $pK_a$ เท่าใด

.....

.....

.....

4. การวิเคราะห์ pH ของสารละลาย PNP ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ สารละลาย PNP มี pH เท่าใด แตกต่างจากค่าที่ได้จากเครื่องวัด pH หรือไม่

.....

.....

.....