บทที่ 3
การแยกและวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบวิธีการอย่างง่ายในการแยกและสกัดคาร์โบไฮเดรตจากพืชตัวอย่าง
2. เพื่อให้ทราบวิธีตรวจสอบทางคุณภาพวิเคราะห์ของคาร์โบไฮเดรตหรืออนุพันธ์ที่สกัดแยกมาได้
3. เพื่อให้สามารถอธิบายหลักการและวิธีการในการวิเคราะห์ทางปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสารละลาย
4. เพื่อศึกษาปฏิกิริยาทางเคมีของคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด

บทนำ

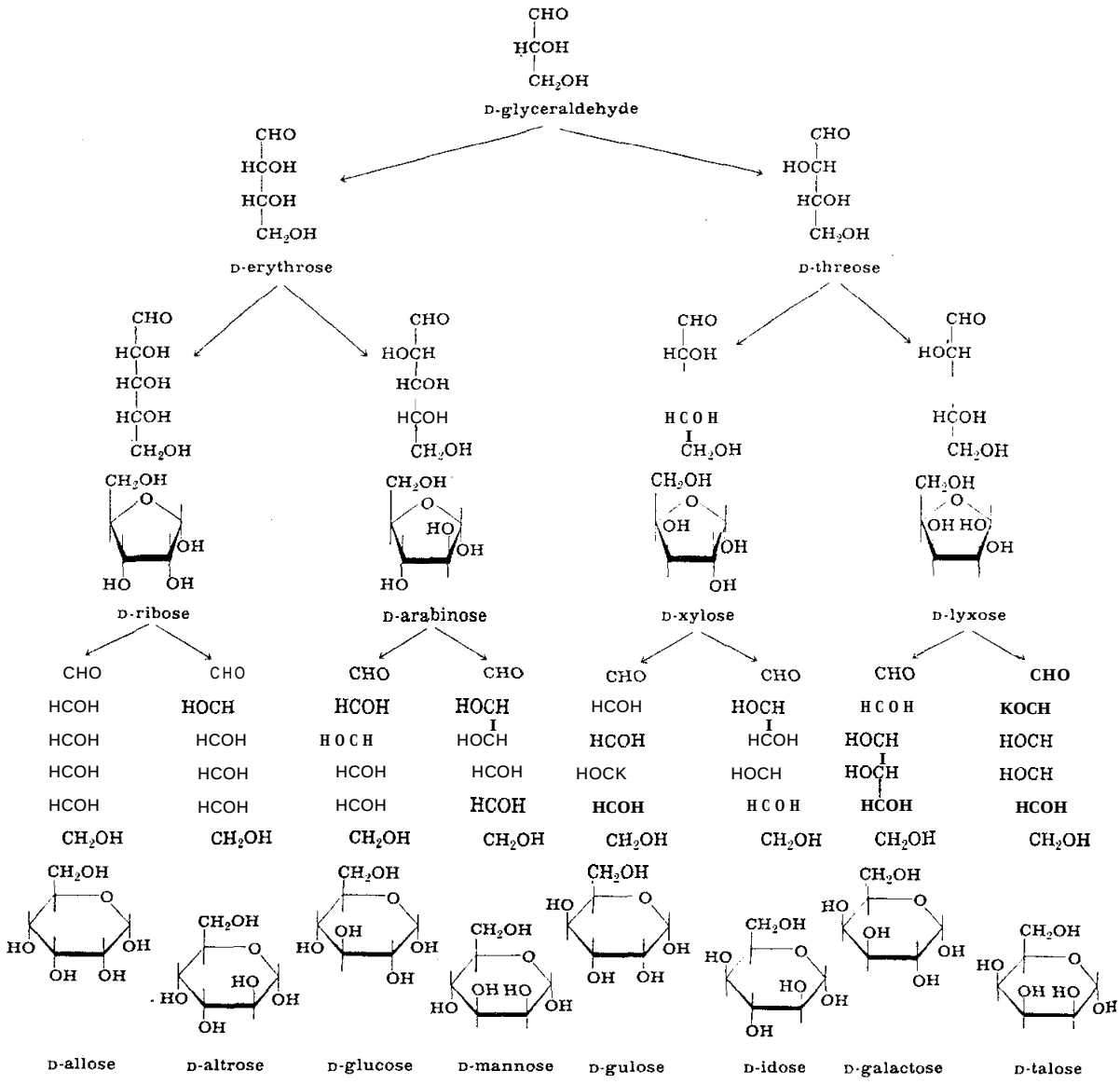
คาร์โบไฮเดรตถูกจัดเป็นสารประกอบกลับคืนที่พบมากที่สุด มีสูตร empirical เป็น $C_x(H_2O)_y$ หรือ "hydrates of carbon" ประกอบด้วยหน่วยพื้นฐานเป็นพวก polyhydroxy aldehydes หรือ ketones และอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้อง คาร์โบไฮเดรตสามารถจำแนกออกได้ 3 ประเภทดังนี้

1. Monosaccharides มีสูตรทั่วไปเป็น $(CH_2O)_n$ โดย n มีค่าเท่ากับ 3-7 ประกอบด้วย หมู่ hydroxyl อย่างน้อย 2 หมู่และหมู่ฟังก์ชันนัล 1 หมู่เป็น aldehyde หรือ ketone โดยอาจจะเรียกชื่อตามหมู่ฟังก์ชันนัลว่า "aldose" หรือ "ketose" นอกจากนี้ยังสามารถเรียกชื่อตามจำนวนคาร์บอนได้ คือ triose (C=3),tetrose(C=4),pentose(C=5), hexose(C=6)และheptose(C=7) สูตรโครงสร้างแหล่งที่พบของ monosaccharidesได้สรุปในรูปที่ 3.1 - 3.2 และ ตารางที่ 3.1 ตามลำดับ

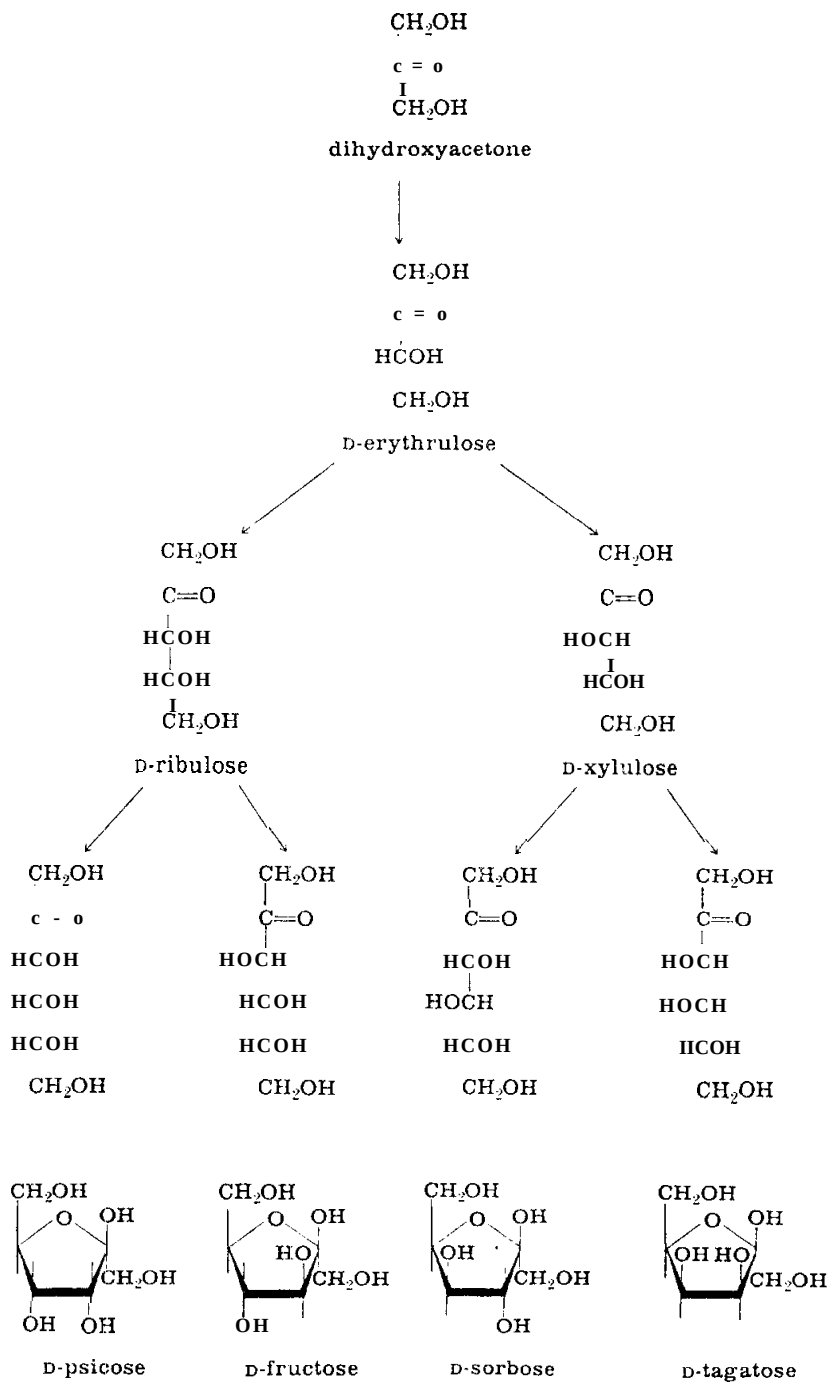
2. Oligosaccharides เกิดจาก monosaccharides 2-15 หน่วยต่อเชื่อมกันด้วยพันธะcovalent Oligosaccharides ชนิดที่พบมากในธรรมชาติ คือ พวก disaccharides ซึ่งประกอบด้วย monosaccharides 2 หน่วยมาต่อกัน เช่น sucrose (น้ำตาลทราย หรือ cane sugar),maltose และ lactose (สูตรโครงสร้างแสดงในรูปที่3.3) แหล่งที่พบและความสำคัญของ disaccharides แต่ละตัวได้สรุปในตารางที่ 3.1

3. Polysaccharides ประกอบด้วย monosaccharides จำนวน 100-1,000 หน่วยมาต่อกันเป็นสายยาว ถ้าเป็น monosaccharides หรืออนุพันธ์ชนิดเดียวกัน จะเรียกว่า "homopolysaccharides" เช่น แป้ง(starch),glycogen,cellulose และ chitin

เป็นต้น แต่ถ้าประกอบด้วย monosaccharides หรือ อนุพันธ์มากกว่า 1 ชนิด จะเรียกว่า "heteropolysaccharides" เช่น hyaluronic acid, heparin และ murein เป็นต้น คุณสมบัติและแหล่งที่พบ polysaccharides ชนิดต่างๆ ได้สรุปในตารางที่ 3.2 ส่วนโครงสร้างของ polysaccharides บางตัวได้แสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.1 แสดงสูตรโครงสร้างของ monosaccharides พวก"aldose"



รูปที่ 3.2 แสดงสูตรโครงสร้างของ monosaccharides พวก"ketose"

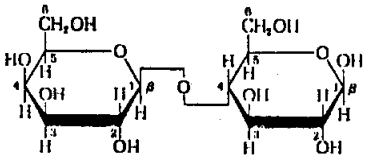
ตารางที่ 3.1 แสดงแหล่งที่พบและความสำคัญของ monosaccharides และ disaccharides ที่พบทั่วไป

ชนิดของคาร์โบไฮเดรต	แหล่งที่พบและความสำคัญ
monosaccharides	
Pentoses	
L - Arabinose	พบในยางไม้และการหมักของ bacteria บางชนิดโดยพบในรูปของ pentosans
D - Arabinose	พบในส่วน glycoside ของเชื้อวัณโรค (tubercle bacilli)
D - Ribose	เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ RNA และยังพบใน coenzymes พวก NAD, FAD และ ATP
2-Deoxy-D-ribose	เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของ DNA
Hexoses	
D - Glucose	เป็นสารอาหารที่สำคัญในการให้พลังงานของสิ่งมีชีวิต
D - Fructose	จัดเป็นน้ำตาลที่หวานที่สุด พบใน ผลไม้, น้ำผึ้ง และ น้ำอสุจิ (seminal fluid)
D - Galactose	เป็นส่วนประกอบของ glycolipids ที่พบในเนื้อเยื่อประสาท (nervous tissue)
Disaccharides	
Lactose	พบในน้ำนมและปัสสาวะของหญิงมีครรภ์
Maltose	ได้จากการย่อยสลายแป้ง (starch) ด้วยเอ็นไซม์ amylase และพบในธัญญพืชที่กำลังงอกและข้าวบาลี (malt)
Sucrose	พบในพืช โดยเฉพาะอ้อยและหัวบีท (beet)

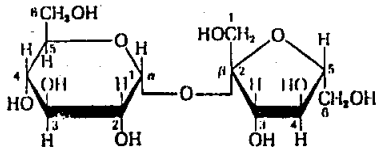
ตารางที่ 3.2 แสดงคุณสมบัติบางประการและแหล่งที่พบของ polysaccharides

Polysaccharidec	ชนิดของmonosac.	คุณสมบัติและแหล่งที่พบ
Starch	∝-D-glucose	-ประกอบด้วย amylose(เป็นสายยาวของ glucose ที่ต่อกันด้วยพันธะแบบ ∝ 1-4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000)และ amylopectin (เป็นสายยาวและกิ่งของglucose ที่ต่อกันด้วยพันธะแบบ ∝ 1-4 และ ∝1-6 มีน้ำหนักโมเลกุล = $2x10^5$-$1x10^6$)ในอัตราส่วน 1 : 4 -เป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมในพืชพวกมัน,ข้าวและธัญญพืช
Glycogen	∝-D-glucose	-ประกอบด้วย glucose ที่ต่อมากันด้วยพันธะแบบ ∝ 1-4 และ ∝1-6 ทำให้เป็นสายยาวและกิ่งที่แตกแขนงมากมายมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $1x10^6$-$3x10^6$ -เป็นคาร์โบไฮเดรตสะสมในสัตว์โดยเฉพาะในตับและกล้ามเนื้อ
Cellulose	β -D-glucose	-เป็นสายยาวของ glucose ที่ต่อกันด้วยพันธะแบบ β 1-4 -เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ พืช,สาหร่ายและ bacteria
Chitin	β -D-N-acetyl-glucosamine	-เป็นสายยาวของอนุพันธ์ glucose ที่ต่อกันด้วยพันธะแบบ β 1-4 -พบมากในเปลือกหรือกระดอง(exoskeleton)ของกุ้ง,ปูและแมลงต่างๆ
Hyaluronic acid	D-glucuronic-acidและN-acetyl-D-glucosamine	-พบใน synovial fluid รอบข้อต่อ(joints) เพื่อทำหน้าที่เป็นตัว หล่อลื่น (lubricant)
Heparin	D-glucuronic-acidและN-acetyl-D- glucosamine sulfate	-ทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant)พบ ตามผนังเส้นเลือดและปอด
Chondroitin sulfate	D-glucuronic-acidและN-acetyl-D- galacto-sulfate	-พบในเนื้อเยื่อผิวหนังและกระดูกอ่อน

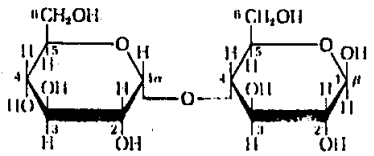
Lactose (β form) [O-β-D-galactopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranose]



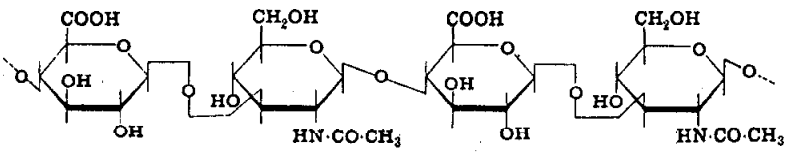
Sucrose [O-β-D-fructofuranosyl-(2 → 1)-α-D-glucopyranoside]



Maltose (β form) [O-α-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-glucopyranose]

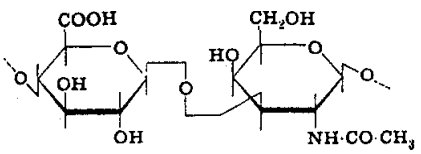


รูปที่ 3.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ disaccharides

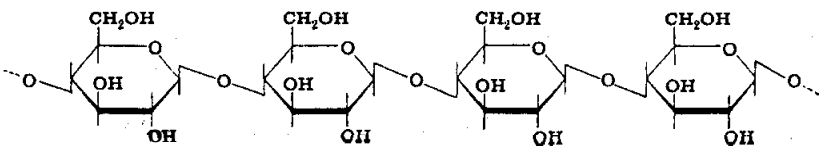


D-Glucuronic acid | N-Acetyl-D-glucosamine | D-Glucuronic acid | N-Acetyl-D-glucosamine

Hyaluronic acid.

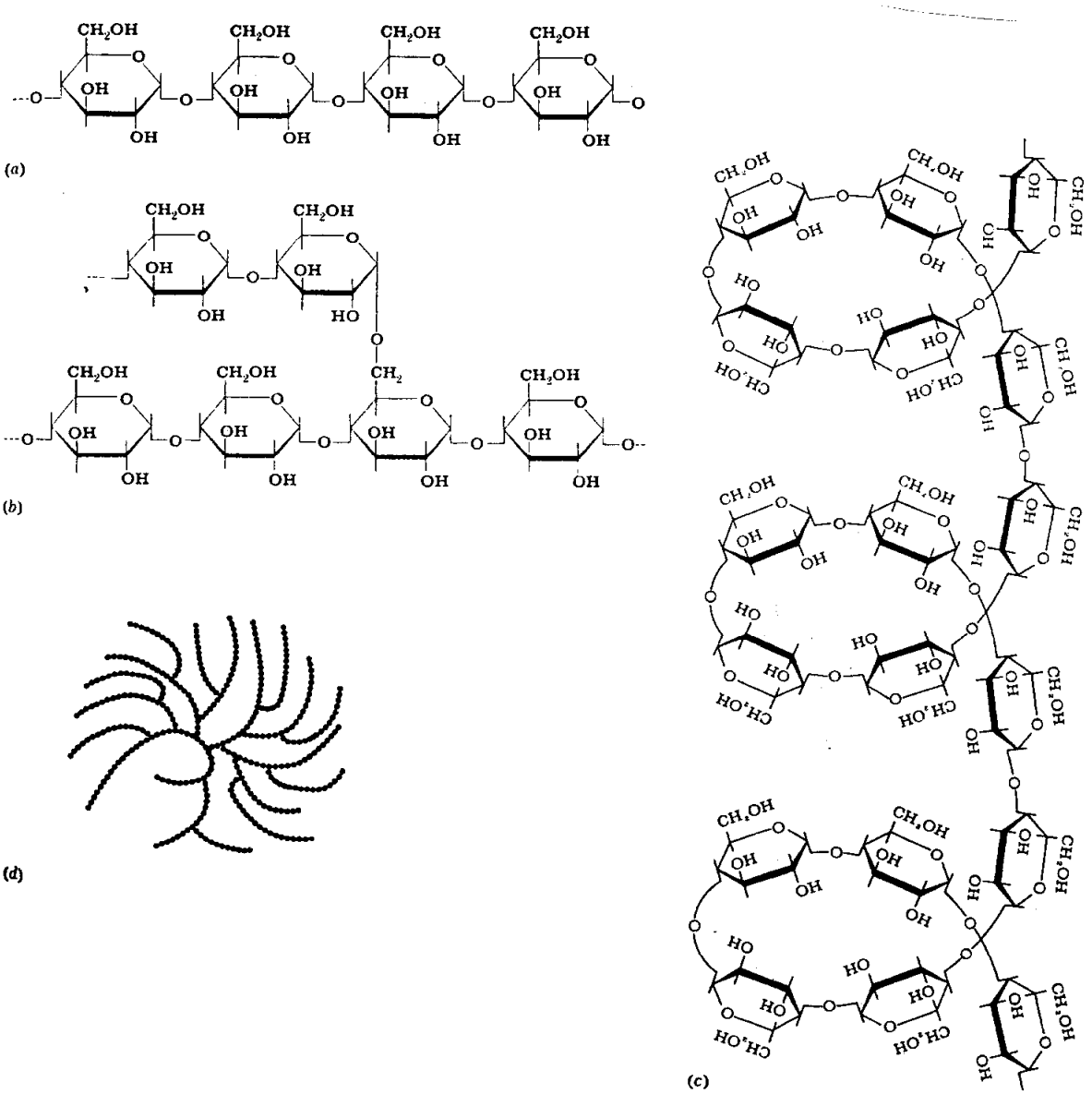


Chondroitin. In chondroitin sulfate one or other of the —OH groups shown in color is esterified with a sulfate group.



Cellulose

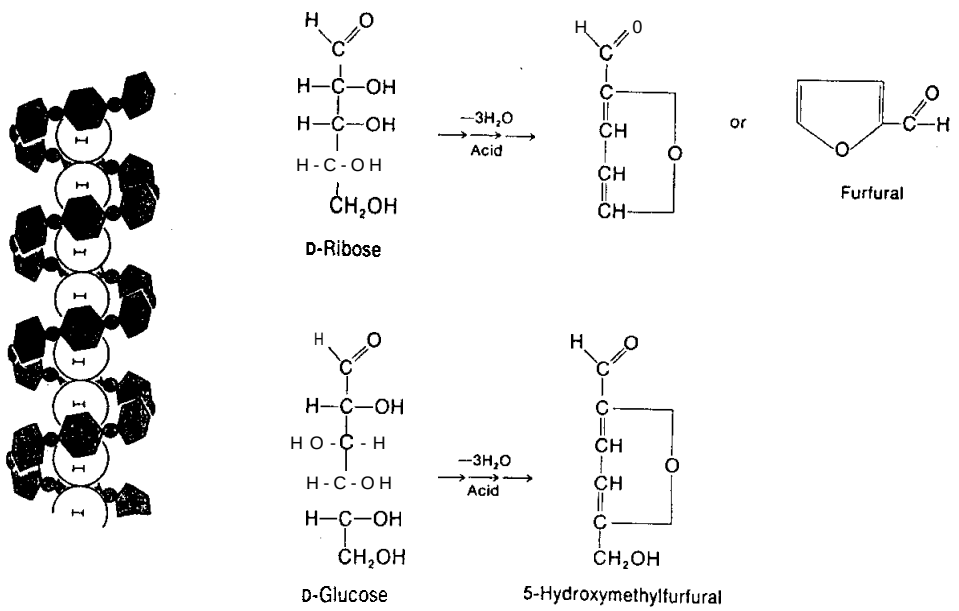
รูปที่ 3.4 แสดงสูตรโครงสร้างของ polysaccharides บางตัว



รูปที่ 3.5 แสดงสูตรโครงสร้างของ amylose สายตรง (a) amylopectin สายกิ่ง(b), amylose สายเกลียว (c),โมเลกุลของ amylopectin และ glycogen (d)

ปฏิบัติการในบทนี้จะนำพืชหัวประเภทมันชนิดต่างๆ มาทำการแยกและสกัดคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตจำพวก starch หรือแป้งที่มีราคาถูก และปลูกได้ง่ายในประเทศ โดยทั่วไปแล้ว มันจะมีแป้งประมาณ 10-30 % นอกนั้นจะเป็นองค์ประกอบอื่นๆ เช่น น้ำ,น้ำตาลและโปรตีน เป็นต้น โครงสร้างของแป้งประกอบด้วยamylose และ amylopectin [ดูรูปที่ 3.5 (a) ,(b)และ(c)ประกอบ] ในปริมาณ 10-20 % และ 80-90 % ตามลำดับ

แป้งที่แยกออกมาได้ สามารถทดสอบด้วยการใช้สารละลายไอโอดีนในการย้อมสี โดยโมเลกุลของ I_2 จะแทรกตัวเข้าไปตรงส่วนที่เป็นแกนของเกลียว amylose ทำให้เกิดสีน้ำเงินขึ้น (ดูรูปที่ 3.6ประกอบ)



รูปที่3.6 แสดงการรวมตัวของ amylose กับ I_2 และปฏิกิริยาการเกิด furfural หรือ อนุพันธ์ของ furfural (5-hydroxymethylfurfural)ของน้ำตาล pentose และ hexose

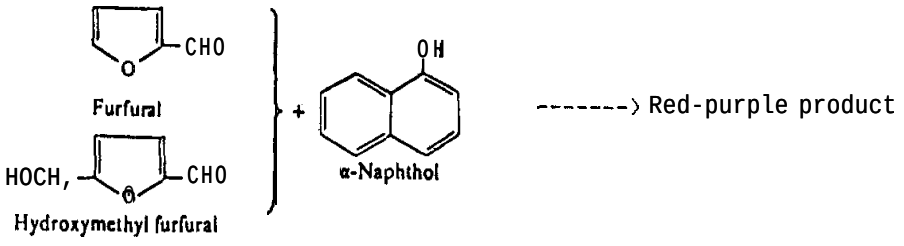
ส่วนพวก amylopectin หรือ glycogen ซึ่งมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา ดังแสดงในรูปที่ 3.5(d) เมื่อย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีนจะให้สีน้ำตาลแดงแทน เนื่องจากรูปร่างของโมเลกุลแบบเกลียวมีความยาวไม่เพียงพอต่อการเข้าแทรกของไอโอดีน และจะไม่เกิดสีของสารละลายไอโอดีนกับ พวก disaccharide และ monosaccharide คาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเหล่านี้สามารถทำการทดสอบได้โดยอาศัยคุณสมบัติ 2 ประการคือ

1. <u>การเกิด furfural หรือ อนุพันธ์ของ furfural</u>

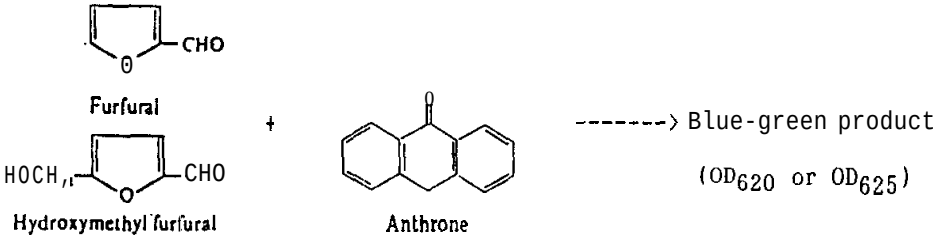
เมื่ออยู่ในสารละลายกรดเข้มข้น พันธะ glycosidic จะถูกทำลาย ทำให้โมเลกุลของคาร์โบไฮเดรตสลายกลายเป็น monosaccharide จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของmonosaccharide ให้ผลิตภัณฑ์เป็นพวกfurfural หรืออนุพันธ์ของfurfural ขึ้นอยู่กับชนิดของmonosaccharide นั้นๆ เช่น D-ribose ซึ่งเป็น pentose จะถูกดึงน้ำออกมาได้ผลิตภัณฑ์เป็น furfural ส่วน D-glucose ซึ่งเป็น hexose จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-hydroxymethyl furfural (ดูรูปที่ 3.6 ประกอบ)

สารfurfural และ 5-hydroxymethyl furfural ที่เกิดขึ้นนี้ สามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบ phenolic ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา (reagent) และสารตั้งต้น จึงใช้เป็นวิธีในการทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้ ดังนี้

1.1 Molisch test เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบว่ามีคาร์โบไฮเดรตหรือไม่ reagentที่ใช้คือ α-naphthol (α-hydroxynaphthalene)โดยให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วงแดงเกิดขึ้น ดังสมการ

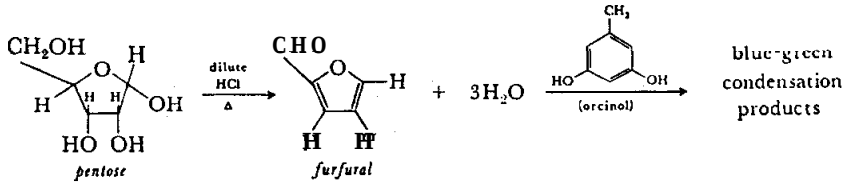


1.2 Anthrone test เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบ hexose , aldopentose และอนุพันธ์ของ hexose Reagent ที่ใช้คือ anthrone ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงินเขียว และสามารถนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 หรือ 625 mm. เพื่อหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตดังกล่าวได้



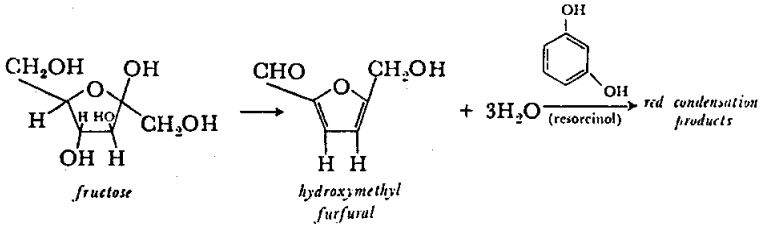
Anthrone test นี้ อาจเกิดความผิดพลาดได้ ถ้าคาร์โบไฮเดรตที่จะทดสอบมีโปรตีนที่มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนชนิด tryptophan ปนอยู่ปริมาณมาก จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงกับ anthrone แทน

1.3 Bial test เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบ hexose และ pentose โดยจะเกิดปฏิกิริยากับ orcinol (3,5-dihydroxytoluene) ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงินเขียวเกิดขึ้น ดังสมการ



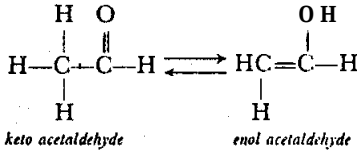
ปฏิกิริยานี้ไม่จำเพาะต่อ pentose เท่านั้น triose,heptose บางตัวและ uronic acid สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ผลเช่นเดียวกัน ส่วน hexose สามารถเกิดปฏิกิริยาให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลเหลืองแทน

1.4 Seliwanoff test เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบ hexose โดยจะเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีแดงกับresorcinol (m-hydroxyphenol) และอัตราเร็วในการเกิดผลิตภัณฑ์ของพวก ketohexose จะไวกว่าพวกaldohexose



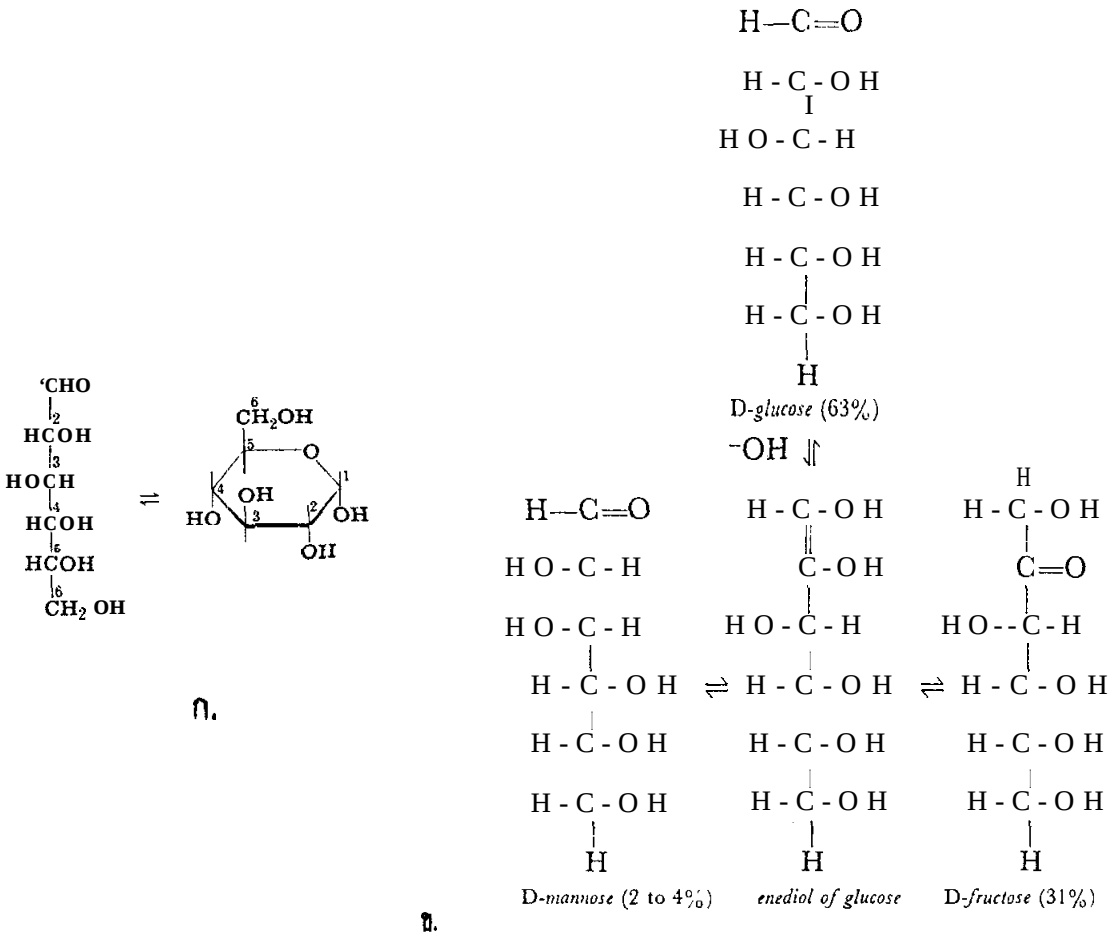
2. <u>การเป็น reducing agent</u>

เมื่ออยู่ในสารละลายเบส สารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชั่น carbonyl ในโมเลกุล จะเกิดปฏิกิริยาการจัดตัวใหม่ของคาร์บอนอะตอมกลับไปมา ระหว่างรูปแบบ 2 ชนิด คือ keto และ enol เรียกลักษณะการเกิดสมดุลแบบนี้ว่า "tautomerism"



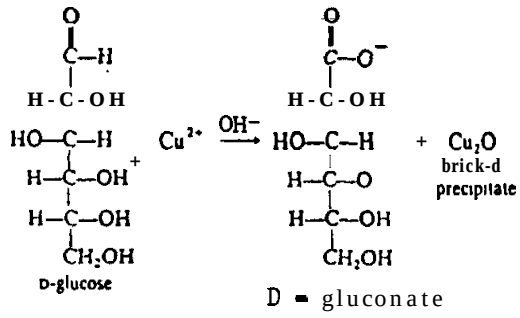
ดังนั้น คาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะ monosaccharide ที่มีโครงสร้างเป็นแบบวง ชนิด pyranose และ furanose สามารถเกิดสมดุลดังข้างต้นได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น D-glucose มักจะมีโครงสร้างเป็นรูปวง pyranose เมื่ออยู่ในสารละลายเบสจะเกิด tautomerism ทำให้

วงเปิดออกเป็นสายยาวดังแสดงในรูป 3.7 (ก) จากนั้นโครงสร้างสายยาวจะเกิด tautomerism ผ่านสารตัวกลางชนิดหนึ่งที่มีรูปแบบเป็น enol form ที่เรียกว่า 1,2-enediol intermediate แล้วจึงเกิดเป็นmonosaccharide อีก 2 ตัวที่มีรูปแบบเป็นแบบ keto form ของ D-fructose และ D-mannose ดังแสดงในรูปที่ 3.7 (ข) monosaccharideที่เกิดขึ้นในลักษณะโครงสร้างสายยาวนั้นจะมีหมู่ aldehydeหรือketone อิสระซึ่งสามารถแสดงคุณสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ได้ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



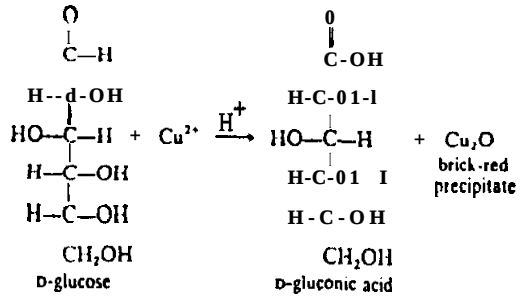
<u>รูปที่ 3.7</u> แสดงการ เกิด tautomerism ของ D-glucose ที่มีโครงสร้าง เป็นรูปวง pyranose และสายยาว (ก) และของ D-glucose, D-fructose และ D-mannose โดยผ่านสารตัวกลาง 1,2 enediol (U)

2.1 สามารถทำปฏิกิริยากับ Benedict's reagent (สารละลาย cupric citrate ในสารละลายเบส)จะให้ตะกอนแดงของ cuprous oxide

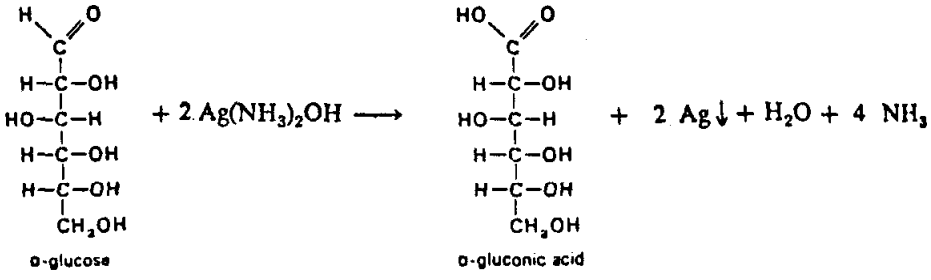


<u>หมายเหตุ</u> ปฏิกิริยานี้ไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์ สารประกอบ aldehyde อื่นๆ และสารจำพวก formic acid, hydrazobenzene, phenols, phenylhydrazine, pyrogallol และ uric acid สามารถให้ผลบวกกับ Benedict's reagent ได้เช่นกัน

2.2 สามารถทำปฏิกิริยากับ Barfoed's reagent (สารละลาย cupric acetateในกรดน้ำส้มเจือจาง)จะให้ตะกอนแดงของ cuprous oxide โดย monosaccharide ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า disaccharide จะเข้าทำปฏิกิริยาได้เร็วกว่า แต่ถ้าให้ความร้อนกับปฏิกิริยาไปนานๆ พวก disaccharide จะให้ตะกอนแดงได้ เช่นกัน

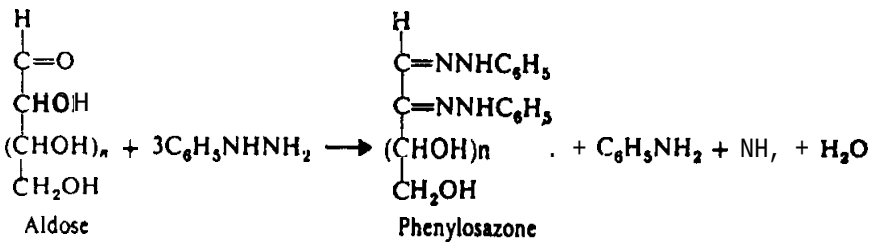


2.3 สามารถทำปฏิกิริยากับ Tollen's reagent (สารละลาย $AgNO_3$ ใน NH_4OH)จะให้โลหะเงินเกิดขึ้น โดยเคลือบอยู่ด้านในหลอดแก้วที่ใช้ทดสอบ



<u>หมายเหตุ</u> โลหะเงินที่เกิดขึ้นควรจะกำจัดทิ้งเมื่อเสร็จสิ้นการทดลองแล้วโดยใช้ 6M HNO_3

2.4 สามารถทำปฏิกิริยากับ phenylhydrazine ให้ผลึกสีเหลืองของ osazone เกิดขึ้น โดย monosaccharide จะเกิดปฏิกิริยาเร็วกว่า disaccharide



2.5 สามารถทำปฏิกิริยากับ 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)ในสารละลายเบส เมื่อนำไปต้มจะได้สารละลายสีส้มแดงของ 3-amino-5-nitrosalicylic acid เกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm.

2.6 สามารถทำปฏิกิริยากับ o-toluidine (2-methylaniline) ในสารละลายกรด เมื่อนำไปต้มจะได้สารละลายสีน้ำเงินเขียวเกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 620-650 nm.

2.7 สามารถทำปฏิกิริยากับ สารละลาย ferricyanide ที่มีสีเหลือง ได้สารละลายของ ferrocyanide ที่ไม่มีสีในสภาวะที่เป็นเบส ซึ่งสามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ณ ความยาวคลื่น 420 nm.

2.8 สามารถทำปฏิกิริยากับ Copper solution (สารละลาย Cu^{2+}ในเบส)ได้ผลิตภัณฑ์เป็น cuprous oxide จากนั้นจึงเติม Nelson's reagent ลงไป ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm.

การทดลองจะแบ่งออกเป็น 4 ตอน คือ

ตอนที่ 1 เป็นการสกัดแยกแป้งจากหัวมัน

ตอนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแป้งที่สกัดแยกได้จากตอนที่ 1

ตอนที่ 3 เป็นการทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ จากตอนที่ 2 และแหล่งอื่นเปรียบเทียบกับสารละลายคาร์โบไฮเดรตที่ทราบชนิด

ตอนที่ 4 เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ glucose จากแหล่งต่างๆ เปรียบเทียบกับค่ามาตราฐาน

ตอนที่ 1 การสกัดแยกแป้งจากมัน

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง

1. Knife และ plastic plate 1 ชุด
2. Mortar และ pestle 1 ชุด
3. Centrifuge tube 2 หลอด
4. Watch glass 2 อัน
5. Vial 2 ขวด
6. Cylinder ขนาด 50 ml. 1 ใบ
7. Wash bottle 1 ขวด
8. Brush 1 อัน
9. ถุงพลาสติก ขนาด 4 X 5 นิ้ว 2 ใบ
10. หัวมัน 2 ชนิด

เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน

1. Centrifuge และ two-pan balance
2. Oven
3. Toploading balance (rough)

วิธีการทดลอง

1. นำหัวมันมาปอกเปลือกออก แบ่งมา 5 g.ล้างให้สะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บรรจุใส่ถุงพลาสติก
2. เติมน้ำกลั่นลงไป 20 ml. ปิดปากถุงให้แน่น บดให้ละเอียด (ระวังอย่าให้ถุงพลาสติกฉีกหรือมีรอยรั่ว)
3. เทส่วนใสทิ้ง(พยายามเก็บส่วนกากให้ได้มากที่สุด)จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 20 ml. ปิดปากถุงให้แน่น บดให้ละเอียด
4. เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำกากทั้งหมดใส่ centrifuge tube ติดฉลากกลุ่มให้เรียบร้อย นำไป centrifuge ที่ 2,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
5. เทส่วนใสทิ้ง ตะกอนที่ได้นำมาเกลี่ยบน watch glassแล้ว นำไปอบให้แห้งใน oven (50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง)
6. เมื่อแห้งแล้ว ปล่อยทิ้งไว้สักระยะหนึ่ง นำไปชั่งหาน้ำหนัก แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดเทียบเท่าผงแป้งด้วย mortar และ pestle จากนั้นบรรจุเก็บใส่ใน vial ติดฉลากให้เรียบร้อย

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของแป้งที่สกัดแยกได้จากตอนที่ 1

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง

1. Beakerขนาด250 ml.& 600 ml.อย่างละ 1ใบ
2. Erlenmeyer flask ขนาด 50 ml. 1 ใบ
3. หลอดทดลอง ขนาด 16X150 mm. 14 หลอด
8. Dropper 1 อัน
9. Vial 4 ขวด
10. Capillary tube 4 แท่ง

4. Serological pipette ขนาด 2 ml. 2 อัน
5. Watch glass 1 อัน
6. Rubber bulb และ tip 1 ชุด
7. Cylinder ขนาด 50 ml.&10 ml.อย่างละ1ใบ
11. Spatula 1 อัน
12. Stirring rod 1 แท่ง
13. Wash bottle 1 ขวด
14. Brush 1 อัน

<u>สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. 6 M HCl พร้อม beaker ขนาด 100 ml. 1 ใบ
2. 3 N NaOH พร้อม beaker ขนาด 100 ml. 1 ใบและ dropper 2 อัน
3. สารละลาย iodine
4. 1% แป้งข้าวโพดใน 0.4 N NaOH พร้อม transfer pipette ขนาด 1ml. 1 อัน
5. 1% แป้งข้าวเหนียวใน 0.4 N NaOH พร้อม transfer pipette ขนาด 1ml.1 อัน
6. 0.4 N NaOH พร้อม beaker ขนาด 100 ml. จำนวน 1 ใบ และ serological pipette 1 อัน

<u>เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. Hot plate และ ceramic plate
2. Toploading balance (2 decimal points)

<u>วิธีการทดลอง</u>

ก.<u>ทดสอบความหนืดของสารละลายแป้ง</u>

1.ชั่งผงแป้งชนิดที่ 1 และ 2 0.01 g. ใส่ vial 1และ 2 ตามลำดับจากนั้นเติม 0.4 N NaOH ลงไป vial ละ 1 ml. คนให้ละลาย

2.Pipette สารละลายแป้งข้าวโพด , สารละลายแป้งข้าวเหนียว อย่างละ 1 ml. ลงใน vial 3 และ 4

3.นำcapillary tube จำนวน 4 แท่ง เมื่อวัดความสูงได้ 2 cm.ให้ทำเครื่องหมายเอาไว้ จากนั้นนำแต่ละแท่งใส่ลงใน vial 1,2,3,4

4.จับเวลาในการเคลื่อนที่ของสารจนถึงเครื่องหมายที่ขีดไว้ บันทึกผลการทดลอง

ข.<u>การสลายแป้งด้วยสารละลายกรด</u>

1.ชั่งผงแป้งที่ได้จากตอนที่ 1 0.5-1.0 g. ใส่ลงใน beaker ขนาด 250 ml.เติมน้ำกลั่น 25-50 ml.(เพื่อทำให้เป็น2 % W/V)

2.นำไปต้มบน hot plate คนจนละลาย แล้วจึงตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.Pipette น้ำแป้งใส่หลอดทดลอง จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 ml. ติดฉลากแต่ละหลอดว่าเป็น"Sample 1" แล้วจึงแบ่งใส่ watch glass 2-3 หยด ทดสอบด้วย

สารละลาย iodine 1 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง

4.ตวงน้ำแป้ง 20 ml. ใส่ Erlenmeyer flask จากนั้นนำไปวางในน้ำเดือด แล้วเติม 6 M HCl ลงไป 2 ml. ผสมให้เข้ากัน ต้มเป็นเวลา 2 นาที

5.Pipetteของเหลว ออกมาจากflaskใส่หลอดทดลองที่มี 3 N NaOH หลอดละ 1 หยด จำนวน 3 หลอด ๆ ละ 1 ml. ติดฉลากแต่ละหลอดว่าเป็น "Sample 2"แล้วจึงแบ่งใส่ watch glass 2-3 หยด ทดสอบด้วยสารละลาย iodine 1หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง

6.เติม 6 M HCl ลงไป 2 ml. ผสมให้เข้ากัน ต้มเป็นเวลา 2 นาที

7.Pipetteของเหลวออกมาจากflaskใส่หลอดทดลองที่มี 3 N NaOH หลอดละ 2 หยด จำนวน 3 หลอดๆ ละ 1 ml. ติดฉลากแต่ละหลอดว่าเป็น "Sample 3" แล้วจึงแบ่งใส่ watch glass 2-3 หยด ทดสอบด้วยสารละลาย iodine 1 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง

8.เติม 6 M HCl ลงไป 2 ml. ผสมให้เข้ากัน ต้มเป็นเวลา 2 นาที

9.Pipetteของเหลวออกมาจากflaskใส่หลอดทดลองที่มี 3 N NaOH หลอดละ 3 หยด จำนวน 3 หลอดๆ ละ 1 ml. ติดฉลากแต่ละหลอดว่าเป็น "Sample 4" แล้วจึงแบ่งใส่ watch glass 2-3 หยด ทดสอบด้วยสารละลาย iodine 1 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ น้ำแป้งมักจะมีการรวมตัวกันตกตะกอนลงมาเมื่อตั้งทิ้งไว้ จึงควรผสมให้เข้ากันทุกครั้งเมื่อต้องการถ่ายเทออกไปใช้

ตอนที่ 3 การทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง

1. Beakerขนาด 100 ml.และ 600 ml.อย่างละ 1 ใบ
2. หลอดทดลอง ขนาด 16X150 mm. จำนวน 16 หลอด พร้อม rack
3. Test tube holder 1 อัน
4. Transfer pipette ขนาด 1 ml. 1 อัน
5. Rubber bulb และ tip 1 ชุด
6. Stirring rod 1 แท่ง
7. Wash bottle 1 ขวด
8. Brush 1 อัน

<u>สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. **1% Xylose , 1% Glucose , 1% Fructose , 1% Sucrose , 1% Starch, 1% ลูกอมชนิดที่ 1 และ 1% ลูกอมชนิดที่ 2 พร้อมtransfer pipetteขนาด 1 ml. จำนวน 2อัน ต่อสาร 1 ชนิด**
2. Seliwanoff's reagent พร้อมทั้งbeaker ขนาด 250 ml. จำนวน 1 ใบ และ serological pipette ขนาด 10 ml. จำนวน 2 อัน (วางไว้ในตู้ควัน)
3. Barfoed's reagent พร้อม burette และ beaker ขนาด 250 ml.
4. Benedict's reagent พร้อม burette และ beaker ขนาด 250 ml.

<u>เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. Hot plate และ ceramic plate

<u>วิธีการทดลอง</u>

ก. <u>Seliwanoff's test</u>

1.Pipette น้ำกลั่น,1% Xylose,1% Glucose,1% Fructose ,1% Sucrose, 1% Starch,1% ลูกอมชนิดที่ 1 และ 1% ลูกอมชนิดที่ 2 อย่างละ 1 ml.ลงในหลอดทดลองที่ 1-8 ตามลำดับ

2.เติม Seliwanoff's reagent ลงในหลอดทดลองที่ 1-8 และ Sample 1,2,3, 4 จากตอนที่ 2 หลอดละ 9 ml.

3.ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทุก 1 นาที บันทึกผลการทดลอง

<u>หมายเหตุ</u> ให้ระมัดระวังในการใช้ Seliwanoff's reagent เนื่องจากมีส่วนประกอบของ 6 M HCl รวมอยู่ด้วย จึงควรทดลองในตู้ควัน

ข. <u>Barfoed's test</u>

1.Pipette น้ำกลั่น,1% Xylose,1% Glucose,1% Fructose ,1% Sucrose, 1% Starch,1% ลูกอมชนิดที่ 1 และ 1% ลูกอมชนิดที่ 2 อย่างละ 1 ml.ลงในหลอดทดลองที่ 1-8 ตามลำดับ

2.เติม Barfoed's reagent ลงในหลอดทดลองที่ 1-8 และ Sample 1,2,3,4 จากตอนที่ 2 หลอดละ 5 ml.

3.ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทุก 1 นาที บันทึกผลการทดลอง

ค. Benedict's test

1.Pipette น้ำกลั่น,1% Xylose,1% Glucose,1% Fructose ,1% Sucrose, 1% Starch,1% ลูกอมชนิดที่ 1 และ 1% ลูกอมชนิดที่ 2 อย่างละ 1 ml.ลงในหลอดทดลองที่ 1-8 ตามลำดับ

2.เติม Benedict's reagent ลงในหลอดทดลองที่ 1-8 และ Sample 1,2,3,4 จากตอนที่ 2 หลอดละ 5 ml.

3.ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปต้มในน้ำเดือด 2 นาที บันทึกการเปลี่ยนแปลง

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์หาปริมาณ glucose

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง

1. Beakerขนาด 100 ml.และ 600 ml.อย่างละ 1ใบ
2. Serological pipette ขนาด 10 ml. จำนวน 1 อัน
3. Rubber bulb และ tip 1 ชุด
4. หลอดทดลอง ขนาด 16X150 mm. จำนวน 9 หลอด พร้อม rack
5. Stirring rod 1 แท่ง
6. Wash bottle 1 ขวด
7. Brush 1 อัน
8. Aluminium foil ขนาด 1x1 นิ้ว จำนวน 10 แผ่น
9. Test tube holder 1 อัน

สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน

1. สารละลาย glucose มาตราฐาน (Std.Glucose) ความเข้มข้น 0.5 mg/ml สารละลายน้ำผึ้งตัวอย่าง (Unknown 1) และสารละลาย Syrup ตัวอย่าง (Unknown 2) พร้อม serological pipette ขนาด 1 ml.จำนวน 2 อัน ต่อ 1 สาร
2. Nelson's reagent พร้อม burette และ beaker ขนาด 250 ml.
3. Copper solution พร้อม burette และ beaker ขนาด 250 ml.

เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน

1. Hot plate และ ceramic plate
2. Spectrophotometer พร้อม cuvette

<u>วิธีการทดลอง</u>

1.Pipette สารในปริมาตรต่าง ๆ กัน ลงในหลอดทดลองที่ 1-9 ตามตารางข้างล่างนี้

หลอดที่ / สาร	ปริมาตรที่ใช้ (ml.)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.5	0.3	-	0.5	-	0.5	-
Std.Glucose 0.5mg/ml	-	0.2	0.5	0.7	1.0	-	-	-	-
Unknown 1	-	-	-	-	-	0.5	1.0	-	-
Unknown 2	-	-	-	-	-	-	-	0.5	1.0

2.ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Copper solution ลงไปหลอดละ 1 ml.

3.ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองด้วย aluminium foil นำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

4.เติม Nelson's reagent ลงไปหลอดละ 1 ml. เขย่าให้ตะกอนละลาย

5.เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 3 ml. ผสมให้เข้ากัน

6.นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm. โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank บันทึกผลการทดลอง

<u>การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. <u>สารละลาย iodine</u>

ละลาย potassium iodide 3 g.ในน้ำกลั่น 100 ml. จากนั้นเติมเกล็ด iodine ลงไป 0.06 g.

2. <u>Seliwanoff's reagent</u>

ละลาย resorcinol 1 g. ใน 6M HCl 1000 ml. จากนั้นเทลงใน beakerที่มีน้ำกลั่น 1000 ml. ผสมให้เข้ากัน

3. <u>Barfoed's reagent</u>

ละลาย copper acetate 132 g.ในน้ำกลั่น 2000 ml. จากนั้นเติม glacial-acetic acid ลงไป 9 ml. ผสมให้เข้ากัน

4. <u>Benedict's reagent</u>

ก.ละลาย sodium citrate 346 g.และ sodium carbonate 200 g. ในน้ำกลั่น 1,700 ml.

ข.ละลาย copper sulfate .5 H_2O 34.6 g. ในน้ำกลั่น 300 ml.

ผสม ก. และ ข. ให้เข้ากัน

5. <u>Copper solution</u>

ก.ละลาย sodium carbonate 12.5 g., potassium sodium tartrate 12.5 g., sodium hydrogen carbonate 10 g. และ sodium sulfate 100 g. ในน้ำกลั่น 350 ml.

ข.ละลาย copper sulfate .5 H_2O 7.5 g. ในน้ำกลั่น 50 ml. จากนั้นเติม H_2SO_4 conc.1 หยด

ผสม ก. และ ข. ให้เข้ากัน

6. <u>Nelson's reagent</u>

ก.ละลาย ammonium molybdate 17 g. ในน้ำกลั่น 300 ml. จากนั้นค่อย ๆ เติม H_2SO_4 conc. จำนวน 14 g. พร้อมกับคนไปด้วยขณะเติม

ข.ละลาย sodium arsenate .7 H_2O 2 g. ในน้ำกลั่น 17 ml.

ผสม ก. และ ข. ให้เข้ากัน

รายงานผลการทดลอง

เรื่อง การแยกและวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ

ชื่อผู้ทดลองและเขียนรายงาน_____รหัส_____เลขที่_____

ชื่อผู้ร่วมทดลอง 1._____รหัส_____เลขที่_____

2._____รหัส_____เลขที่_____

กลุ่มที่____section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง 1. _____

2. _____

ตอนที่ 1 ผลการสกัดแยกแป้งจากหัวมัน

ชื่อสารตัวอย่าง	_____	_____
ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้	_____g.	_____ g.
ปริมาณแป้งที่ได้	_____g.	_____ g.
% Yield	_____	_____

ตอนที่ 2 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแป้งที่สกัดแยกได้จากตอนที่ 1

2.1 ความหนืดของสารละลายแป้ง

	1% แป้งข้าวโพด	1% แป้งข้าวเหนียว	1%สารตัวอย่าง....	1%สารตัวอย่าง....
เวลาที่ใช้				

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

2.2 <u>การสลายแป้งด้วยสารละลายกรด</u>

ชื่อสารตัวอย่าง	_____	_____
ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้	_____g.	_____ g.
ปริมาณน้ำที่ใช้	_____ml.	_____ ml.

สาร	ผลที่สังเกตได้
สารตัวอย่าง_____	
Sample 1	_____
Sample 2	_____
Sample 3	_____
Sample 4	_____
สารตัวอย่าง_____	
Sample 1	_____
Sample 2	_____
Sample 3	_____
Sample 4	_____

<u>สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

ตอนที่ 3 การทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ จากตอนที่ 2 และแหล่งอื่น

สาร	Seliwanoff's test		Barfoed's test		Benedict's test	
	ผลที่สังเกตได้	ระดับความเข้ม	ผลที่สังเกตได้	ระดับความเข้ม	ผลที่สังเกตได้	ระดับความเข้ม
น้ำกลั่น						
1%Xylose						
1%Glucose						
1%Fructose						
1%Sucrose						
1% Starch						
1%ลูกอมชนิดที่1						
1%ลูกอมชนิดที่2						
สารตัวอย่าง.. Sample 1						
Sample 2						
Sample 3						
Sample 4						
สารตัวอย่าง.. Sample 1						
Sample 2						
Sample 3						
Sample 4						

+ แสดงผลpositive ซึ่งมีระดับความเข้มจากน้อยไปมาก ดังนี้ +1,+2,+3และ+4 ตามลำดับ

- แสดงผล negative

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ตอนที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ glucose จากแหล่งต่าง ๆ

หลอดที่ / สาร	ปริมาตรที่ใช้และปริมาณค่าต่าง ๆ								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
น้ำกลั่น	1.0ml	0.8ml	0.5ml	0.3ml	-	0.5ml	-	0.5ml	-
Std.Glucose 0.5mg/ml	-	0.2ml	0.5ml	0.7ml	1.0ml	-	-	-	-
unknown 1	-	-	-	-	-	0.5ml	1.0ml	-	-
unknown 2	-	-	-	-	-	-	-	0.5ml	1.0ml
OD_{540}									
ปริมาณสาร(ug)									
ความเข้มข้น (mg/100 ml)	-	-	-	-	-				

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD $_{540}$ และ ปริมาณ glucose (ug.)

Unknown 1 ความเข้มข้นของ glucose หลอดที่ 6 = _____mg/100 ml หรือ mg %

ความเข้มข้นของ glucose หลอดที่ 7 = _____mg/100 ml หรือ mg %

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ glucose ใน Unknown 1 = _____mg/100 ml หรือ mg %

Unknown 2 ความเข้มข้นของ glucose หลอดที่ 8 = _____mg/100 ml หรือ mg %

ความเข้มข้นของ glucose หลอดที่ 9 = _____mg/100 ml หรือ mg %

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ glucose ใน Unknown 2= _____mg/100 ml หรือ mg %

<u>วิธีคำนวณหาความเข้มข้นของ glucose ใน unknown</u>

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

คำถาม

1.ปริมาณของ amylose และ amylopectin ในแป้ง มีผลอย่างไรต่อน้ำแป้ง

2.เหตุใด iodine solutionจึงให้สีน้ำเงินกับน้ำแป้ง แต่ให้สีน้ำตาลแดงกับสารละลาย glycogen

3.จงอธิบายวิธีการสกัดแยก polysaccharide อื่นมา 1 ตัวอย่าง

4.จงบอกผลที่ควรเกิดขึ้นเมื่อนำ sacrose , lactose และ maltose มาทดสอบด้วย Benedict's test เพราะเหตุใด

5.ถ้านักศึกษาทำการทดสอบ Sample 1,2,3,4 จากตอนที่ 2 กับ Molisch's test จะให้ผลการทดลองอย่างไรบ้าง เพราะเหตุใด

6.การทราบปริมาณ glucose ในสารตัวอย่าง นักศึกษาคิดว่ามีความสำคัญอย่างไร

7.นอกจากการใช้ Copper solution และ Nelson's reagent ในการหาปริมาณ glucose นักศึกษาคิดว่ามีวิธีการอื่น ๆ ที่ใช้หาได้หรือไม่ จงอธิบาย