บทที่ 3

การแยกและวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ทราบวิธีการอย่างง่ายในการสกัดคาร์โบไฮเดรตจากพืชตัวอย่าง
2. เพื่อให้สามารถอธิบายหลักการและวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้
3. เพื่อให้ทราบวิธีการวิเคราะห์คุณภาพของคาร์โบไฮเดรต หรืออนุพันธ์ที่สกัดแยกออกมาได้
4. เพื่อศึกษาปฏิกิริยาทางเคมีของคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิด

ทฤษฎีเบื้องต้น

คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นสารชีวโมเลกุลที่สำคัญ และเป็นสารที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ ซึ่งได้มาจากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยเป็นสารที่มีหมู่คาร์บอนิล (carbonyl, -C-) และไฮดรอกซิล (hydroxyl, -OH) ในโมเลกุลเดียวกัน คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กที่สุดเรียกว่า มอโน-แซ็กคาไรด์ (monosaccharide) หรือ simple carbohydrate

มอโนแซ็กคาไรด์ มีสูตรโครงสร้างทั่วไปคือ $C(H_2O)_n$ โดยค่า n จะมีค่าตั้งแต่ 3 – 9 ซึ่งถูกเรียกชื่อตามจำนวนคาร์บอนอะตอม (ตารางที่ 3.1) ตัวอย่างที่สำคัญ ได้แก่ น้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอม เรียกว่า น้ำตาลเพนโตส (pentose) เช่น ดีออกซีไรโบส ไรโบส ไซโลส และ อะราบิโนส น้ำตาลที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอม เรียกว่า น้ำตาลเฮกโซส (hexose) เช่น กลูโคส ฟรุกโตส และกาแลกโตส เป็นต้น นอกจากนี้มอโนแซ็กคาไรด์ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ตามหมู่ที่ทำหน้าที่จำเพาะในโมเลกุล (functional group) ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มอัลโดส (aldose) หมายถึงน้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde, -H-C=O) เป็นองค์ประกอบ เช่น กลูโคส และกาแลกโตส เป็นต้น และกลุ่มคีโตส (ketose) หมายถึง น้ำตาลที่มีหมู่คีโตน (ketone, -C=O) เป็นองค์ประกอบ เช่น ฟรุกโตส เป็นต้น (ตารางที่ 3.2) น้ำตาลอัลโดสมีหมู่อัลดีไฮด์จึงทำให้มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ (reducing property) ส่วนน้ำตาลคีโตสจะมีคุณสมบัติในการรีดิวซ์ได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสารละลายด่างอ่อน ซึ่งจะทำให้คีโตสเปลี่ยนเป็นอัลโดส โดยปฏิกิริยา “base-catalyzed tautomerization”

ตารางที่ 3.1 แสดงมอโนแซ็กคาไรด์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 3 – 9 ที่พบในร่างกายมนุษย์

จำนวนคาร์บอนอะตอม	ชื่อทั่วไป	ตัวอย่างน้ำตาล
3	Triose	Glyceraldehyde, Dihydroxyacetone
4	Tetrose	Erythrose
5	Pentose	Ribose, Ribulose, Xylulose
6	Hexose	Glucose, Galactose, Mannose, Fructose
7	Heptose	Sedoheptulose
9	Nonose	Neuraminic acid also called sialic acid

คุณสมบัติทางกายภาพของมอโนแซ็กคาไรด์มีรสหวาน ละลายน้ำได้ดี เมื่อนำมอโนแซ็ก- คาไรด์มาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) จะได้น้ำตาลโมเลกุลที่มีสายยาวขึ้น เรียกว่า โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharides) ซึ่งมีมอโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2 - 9 หน่วยที่พบมากในธรรมชาติ คือ ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharides) ซึ่งประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ 2 หน่วยมาต่อกัน จัดเป็น simple carbohydrate เช่นกัน และมีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนมอโนแซ็กคาไรด์ ตัวอย่างเช่น ซูโครส แลกโตส และมอลโตส เป็นต้น และเมื่อมอโนแซ็กคาไรด์จำนวนมากกว่า 100 หน่วยขึ้นไปมาต่อกันจนเกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน เรียกว่า พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ทำหน้าที่เป็นสารสะสมพลังงาน และยังทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง หรือองค์ประกอบที่สำคัญของทั้งเซลล์พืชและสัตว์ เช่น แป้ง ไกลโคเจน เซลลูโลส ไคทิน คอนดรอยตินซัลเฟต (chondroitin sulfate) เป็นต้น

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์ชนิดเดียว เรียกพอลิแซ็กคาไรด์นี้ว่า โฮโม-พอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) เช่น แป้ง เซลลูโลส ซึ่งเป็น copolymer ของมอโนแซ็ก- คาไรด์กลูโคส และพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยมอโนแซ็กคาไรด์มากกว่าหนึ่งชนิด เรียกว่า เฮเทอร์โรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) เช่น hyaluronic acid ซึ่งเป็น copolymer ของมอโนแซ็กคาไรด์ *N*-acetyl glucosamine และ glucuronic acid

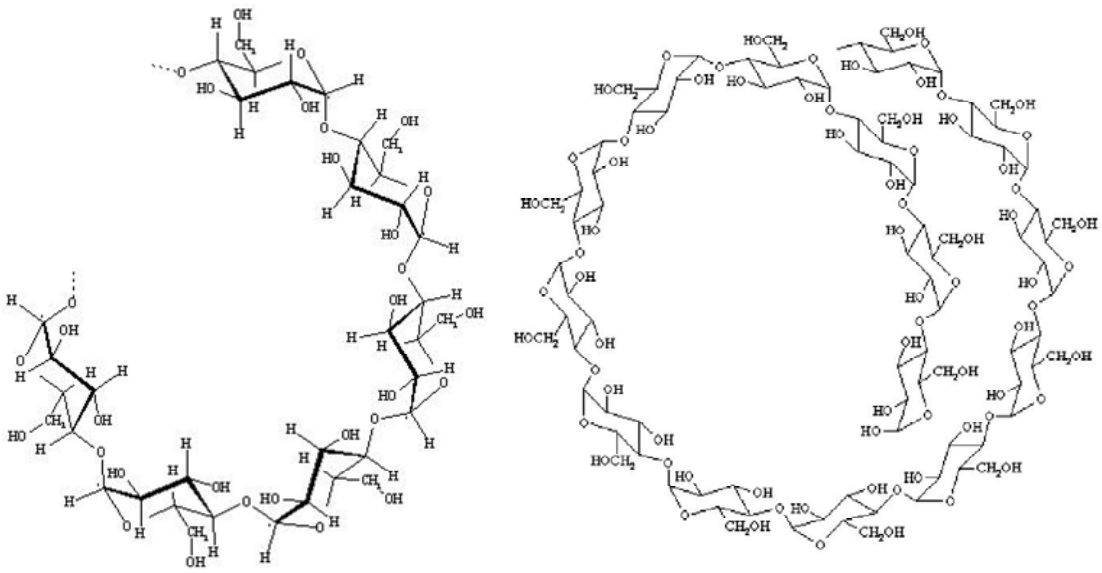
ตารางที่ 3.2 แสดงการจำแนกชนิดและความสำคัญของมอโนแซ็กคาไรด์

ชื่อน้ำตาล	ชนิด จำแนกตามคาร์บอนอะตอม	ชนิด จำแนกตามหมู่ฟังก์ชัน	แหล่งที่พบ	ความสำคัญและการนำไปใช้ประโยชน์
ไรโบส (D-ribose)	เพนโตส	อัลโดส	กรดนิวคลิอิก	เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลิอิก และ โคเอนไซม์ เช่น NAD^+, ATP, NADP, FAD และเป็นสารอินเทอร์มีเดียตในวิถีเพนโตสฟอสเฟต
ไลโซส (D-lyxose)	เพนโตส	อัลโดส	กล้ามเนื้อหัวใจ	เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มไรโบฟลาวิน
ไซโลส (D-xylose)	เพนโตส	อัลโดส	โปรทีโอไกลแคน ไกลโคสอะมิโนไกลแคน และยางของต้นไม้	เป็นส่วนประกอบของ ไกลโคโปรตีน
ไรบูโลส (D-ribulose)	เพนโตส	คีโตส	เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา เมแทบอลิซึม	เป็นสารอินเทอร์มีเดียตในวิถีเพนโตสฟอสเฟต
ไซลูโลส (D-xylulose)	เพนโตส	คีโตส	สารอินเทอร์ มีเดียตในวิถีกรดยูโรนิก	วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่พร่องเอนไซม์ในการรีดิวซ์ไซลูโลสให้เป็นไซลิทอล

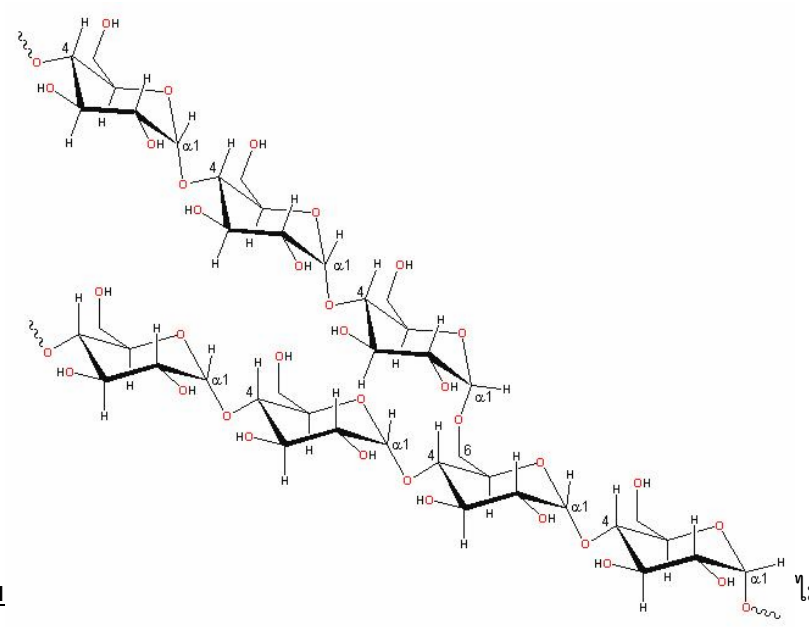
ตารางที่ 3.2 (ต่อ) แสดงการจำแนกชนิดและความสำคัญของมอโนแซ็กคาไรด์

ชื่อน้ำตาล	ชนิด จำแนกตามคาร์บอนอะตอม	ชนิด จำแนกตามหมู่ฟังก์ชัน	แหล่งที่พบ	ความสำคัญและการนำไปใช้
กลูโคส (D-glucose)	เฮกโซส	อัลโดส	น้ำผลไม้จากการย่อยสลายแป้ง น้ำตาลอ้อย มอลโตส และแลกโตส	เป็นน้ำตาลที่สำคัญที่สุดในการเป็นแหล่งพลังงาน ใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคเบาหวาน
กาแลกโตส (D-galactose)	เฮกโซส	อัลโดส	จากการสลายน้ำตาลแลกโตสต่อมน้ำนมของหญิงที่ให้นมบุตร	เป็นส่วนประกอบของ ไกลโคลิปิด และ ไกลโคโปรตีน ที่พบในเยื่อประสาท
แมนโนส (D-mannose)	เฮกโซส	อัลโดส	จากการสลายแมนแนน และยางไม้	เป็นส่วนประกอบของสารกลุ่มไกลโคโปรตีน
ฟรุกโตส (D-fructose)	เฮกโซส	คีโตส	น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง การย่อยสลายน้ำตาลอ้อย และอินูลิน	เปลี่ยนเป็นกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน ใช้วินิจฉัยโรคทางพันธุกรรมที่พร่องเอนไซม์ในการเปลี่ยนพรุกโตสใหเป็นกลูโคส

ในปฏิบัติการนี้นักศึกษาจะได้ศึกษาการสกัดแป้งจากพืชหัวประเภทมันต่างๆ เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรทสะสมพลังงานจำพวกแป้งที่มีราคาถูก โครงสร้างของแป้งประกอบ ด้วยอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) ในอัตราส่วน 10-20 เปอร์เซ็นต์ และ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) อะไมโลสประกอบด้วยกลูโคสมากกว่า 1,000 หน่วย ต่อกันด้วย α-D-linkage ระหว่างคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 และ 4 (C1 และ C4) ซึ่งการเชื่อมด้วย α-D-glucosidic linkage ทำให้อะไมโลสมีการจัดตัวแบบเกลียวเฮลิกซ์ (helix) (รูปที่ 3.1)



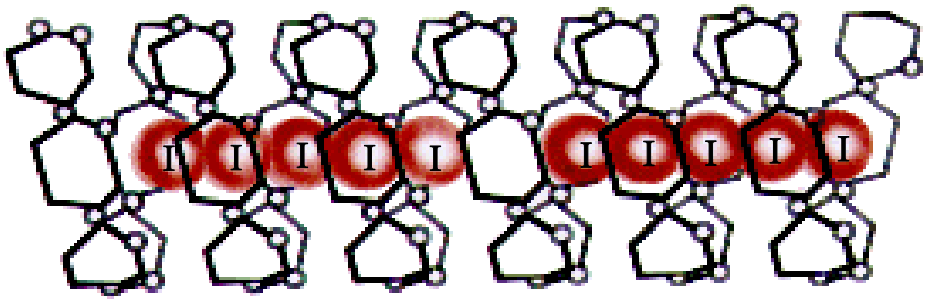
(ก) (ข)

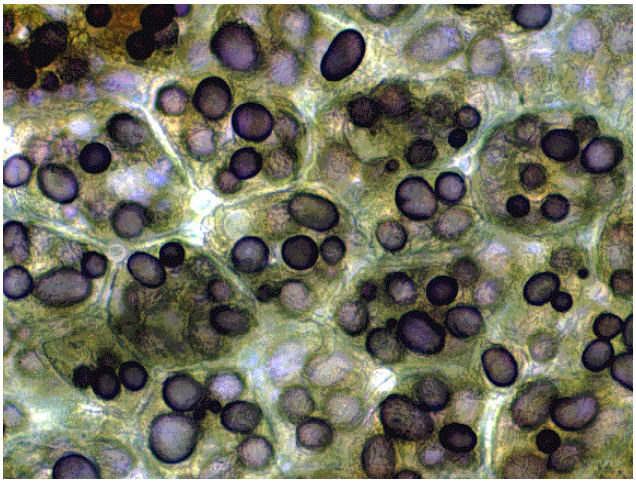


รูปที่ 3.1 ไมโล

เพกติน (ค)

แป้งที่สกัดได้ สามารถทดสอบด้วยการใช้สารละลายไอโอดีน โดยโมเลกุลของ I_2 จะแทรกตัวเข้าไปตรงส่วนที่เป็นแกนของเกลียวอะไมโลส ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินขึ้น (รูปที่ 3.2) ส่วนพวก อะไมโลเพกติน หรือไกลโคเจน (glycogen) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นกิ่งก้านสาขา เมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีนจะให้สีน้ำตาลแดง เนื่องจากรูปร่างของโมเลกุลแบบเกลียวมีความยาวไม่เพียงพอต่อการเข้าแทรกของไอโอดีน





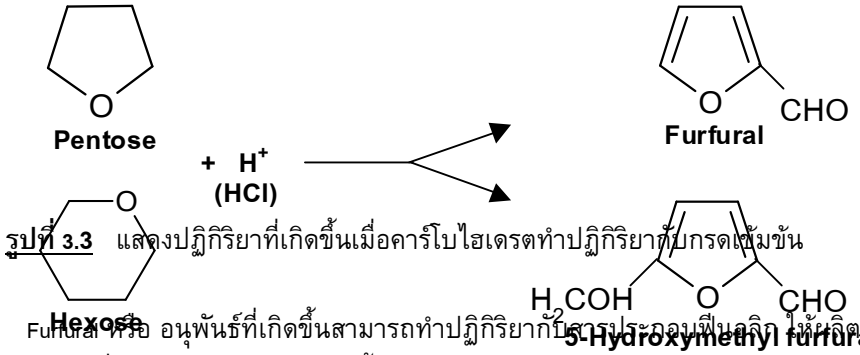
(ข)

<u>รูปที่ 3.2</u> แสดงการรวมตัวของอะไมโลสกับ I_2 (ก) และเมล็ดแป้งเมื่อทดสอบด้วยไอโอดีน (ข)

ทั้งมอโนแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์ จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายไอโอดีน แต่ว่าคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเหล่านี้สามารถทำการทดสอบได้โดยอาศัยคุณสมบัติ 2 ประการคือ

1. **<u>การเกิด furfural หรืออนุพันธ์ของ furfural</u>**

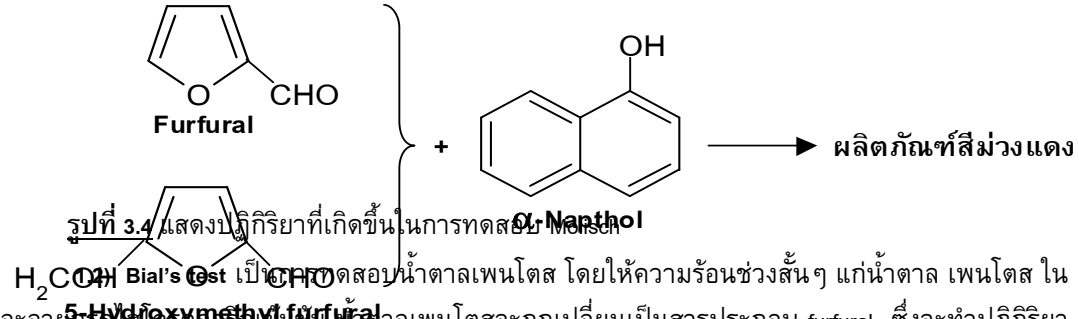
เมื่อคาร์โบไฮเดรตทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้น พันธะไกลโคซิดิกจะถูกทำลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการดึงน้ำออกจากโมเลกุลได้สารประกอบ furfural หรืออนุพันธ์ของ furfural ขึ้นอยู่กับชนิดของมอโนแซ็กคาไรด์นั้นๆ เช่น น้ำตาลเพนโตส จะถูกดึงน้ำออกมาได้ผลิตภัณฑ์เป็น furfural ส่วนน้ำตาลเฮกโซส จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ furfural (รูปที่ 3.3)



<u>รูปที่ 3.3</u> แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อคาร์โบไฮเดรตทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้น

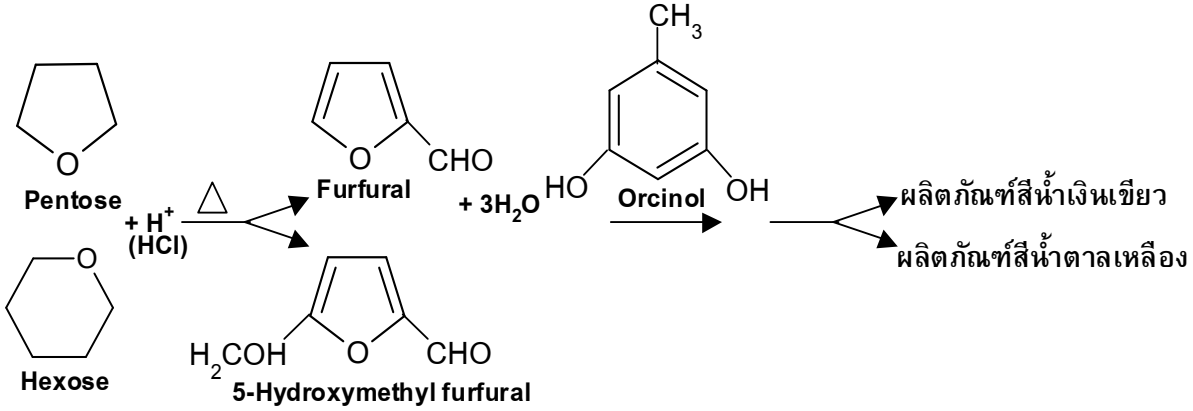
Furfural หรือ อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีต่างๆ กัน ขึ้นอยู่กับสารที่เข้าทำปฏิกิริยา และสารตั้งต้น จึงใช้เป็นวิธีทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้ ดังนี้

1.1) Molisch's test เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบว่ามีคาร์โบไฮเดรตหรือไม่ คาร์โบไฮเดรตทุกชนิดให้ผลบวกต่อการทดสอบนี้ เมื่อใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรตได้ furfural หรืออนุพันธ์ของ furfural และเมื่อเติมสารละลาย Molisch ซึ่งมีสารกลุ่มฟีนอล คือ α-naphthol เป็นองค์ประกอบจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง หรือม่วงแดงปรากฏตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย (รูปที่ 3.4)



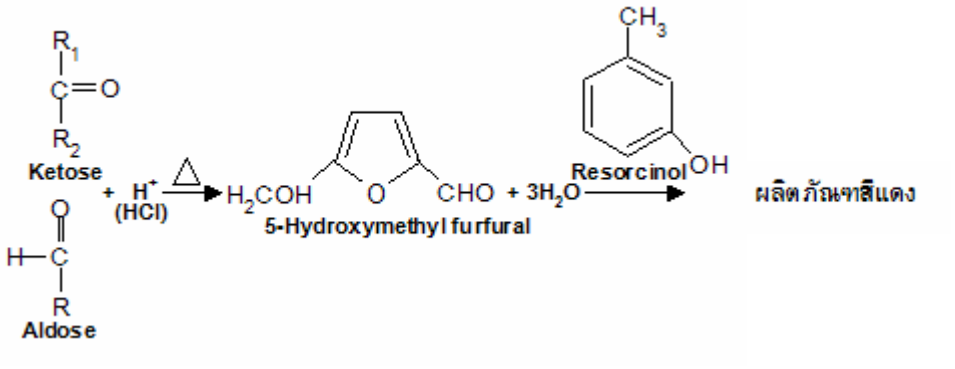
<u>รูปที่ 3.4</u> แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบ Molisch

1.2) Bial's test เป็นการทดสอบน้ำตาลเพนโตส โดยให้ความร้อนช่วงสั้นๆ แก่น้ำตาล เพนโตส ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น น้ำตาลเพนโตสจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบ furfural ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ orcinol ในสารละลาย Bial เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีเขียวแกม น้ำเงิน แต่ว่าปฏิกิริยานี้ไม่จำเพาะต่อเพนโตสเท่านั้น ไตรโอส เฮพโตสบางตัว และกรดยูโรนิก สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ผลเช่นเดียวกัน ส่วนเฮกโซสจะเกิดปฏิกิริยาให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลเหลือง (รูปที่ 3.5)



รูปที่ 3.5 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบ Bial

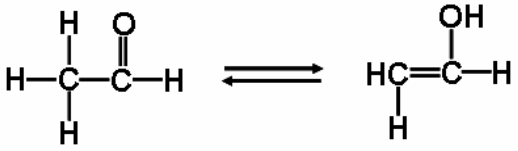
1.3) Seliwanoff's test เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบเฮกโซส โดยให้ความร้อนกับสารละลายในกรดไฮโดรคลอริก น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบ furfural ได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยากับ resorcinol ในสารละลาย Seliwanoff เกิดเป็นสารประกอบสีแดง ทั้งน้ำตาลคีโตสและน้ำตาลอัลโดส สามารถทำปฏิกิริยากับ resorcinol ได้เช่นเดียวกัน แต่น้ำตาลคีโตส จะมีอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบ Seliwanoff

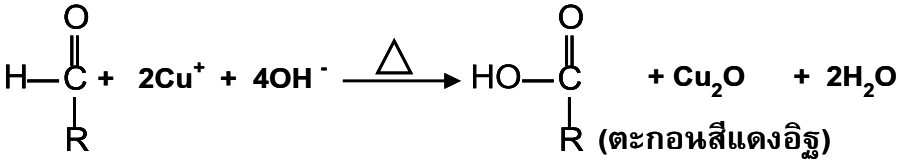
1. การเป็น reducing agent

คาร์โบไฮเดรตที่มีหมู่อัลดีไฮด์ และคีโตนอิสระจะมีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ สามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ได้ เมื่อคาร์โบไฮเดรตอยู่ในสารละลายเบส จะเกิดการจัดตัวใหม่ของคาร์บอนอะตอม ทำให้วงเปิดออกเป็นสายยาว และจะมีหมู่อัลดีไฮด์ หรือคีโตนอิสระเกิดขึ้น เกิดปฏิกิริยาการจัดตัวใหม่ของคาร์บอนอะตอมกลับไปกลับมาระหว่างรูปแบบ 2 ชนิด คือ คีโตและอีนอล (รูปที่ 3.7) คาร์โบไฮเดรตส่วนมากมีคุณสมบัตินี้ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส มอลโตส และแมนโนส เป็นต้น ยกเว้นเพียงชนิดเดียว คือ ซูโครส เนื่องจากคาร์บอนอะตอมที่ 1 ไม่มีหมู่ อัลดีไฮด์อิสระ โดยคุณสมบัติของการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ สามารถทดสอบได้ด้วยวิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้



รูปที่ 3 keto acetaldehyde enol acetaldehyde

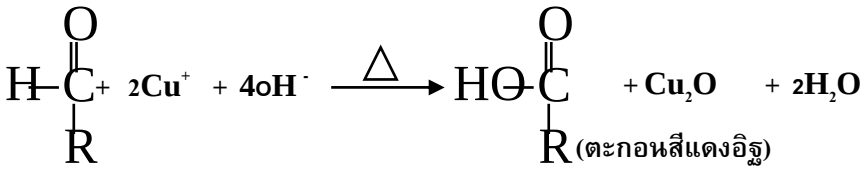
2.1) Benedict's test เป็นวิธีทดสอบน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ และไดแซ็กคาไรด์ทุกชนิด ยกเว้นน้ำตาลซูโครส โดยเมื่อต้มคาร์โบไฮเดรตกับสารละลาย Benedict ในภาวะที่เป็นด่าง น้ำตาลจะใช้หมู่อัลดีไฮด์ในการรีดิวซ์ Cu^{2+} ในสารละลาย Benedict เกิดเป็นตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O ดังสมการ แต่หากให้ความร้อนไม่มากพอ ตะกอนที่ได้อาจเป็นสีเหลือง สีเขียว หรือสีแดง (รูปที่ 3.8)



รูปที่ 3.8 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบ Benedict

Reducing sugar

2.2) Barfoed's test เป็นวิธีทดสอบน้ำตาลมอโนแซ็กคาไรด์ เช่น น้ำตาลเพนโตส หรือน้ำตาลเฮกโซส ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าไดแซ็กคาไรด์ จึงสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้เร็วกว่า โดยมอโนแซ็กคาไรด์สามารถรีดิวซ์ Cu^{2+} ในสารละลาย Barfoed ในภาวะที่เป็นกรดอ่อนๆ ให้กลายเป็นตะกอนสีแดงอิฐของ Cu_2O น้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้ได้เช่นกัน หากให้ความร้อนกับปฏิกิริยาไปนานๆ (รูปที่ 3.9)



Reducing sugar

รูปที่ 3.9 แสดงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบ Barfoed

การทดลอง

ตอนที่ 1 การสกัดแป้งจากพืชตัวอย่าง

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. กระจกนาฬิกา (watch glass)
2. โกร่งและที่บด (mortar, pestle)
3. ขวด vial
4. เครื่องชั่ง (balance)
5. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (kitchen blender)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
7. ตู้อบความร้อน (hot air oven)
8. โถดูดความชื้น (desicator)
9. แท่งแก้ว (stirring rod)

10. บีกเกอร์ (beaker)
11. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube)

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. พืชตัวอย่าง
2. น้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

1. นำพืชตัวอย่างที่ปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนัก 100 กรัม ใส่ในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียด
2. เทส่วนที่ปั่นได้ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นลงไป คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้ตะกอนตกลงมา หลังจากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2-3 รอบ เพื่อเป็นการล้างตะกอนเม็ดแป้ง
3. เทสารที่ได้ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ หลอดละเท่าๆ กัน เป็นคู่
4. นำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้
5. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดเซนตริฟิวจ์เดิมที่มีตะกอนแป้ง แล้วใช้แท่งแก้วคนให้ทั่ว นำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็วรอบเดิมเพื่อล้างตะกอนเม็ดแป้ง
6. ชั่งกระจกนาฬิกา จดน้ำหนักที่ได้ เทตะกอนแป้งที่ได้ลงบนกระจกนาฬิกา เกลี่ยตะกอนที่ได้ให้ทั่ว นำไปอบให้แห้งในตู้อบความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
7. เมื่อแห้งแล้วปล่อยให้เย็นลงในโถดูดความชื้น นำกระจกนาฬิกาที่มีแป้งอบแห้งแล้วนำไปชั่งนำน้ำหนักที่ได้ ลบด้วยน้ำหนักกระจกนาฬิกาเปล่าที่ชั่งไว้ในตอนแรกจะได้น้ำของแป้งที่สกัดได้ จากนั้นทำการบดแป้งที่ได้ให้ละเอียดด้วยโกร่ง แล้วเก็บใส่ในขวด vial ติดฉลากกลุ่มให้เรียบร้อยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

<u>ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ส่วนประกอบของแป้งที่สกัดแยกได้จากตอนที่ 1</u>
<u>วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. กระจกนาฬิกา (watch glass)
2. ขวด vial
3. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
4. เตาและแผ่นกระจายความร้อน (hot plate, wire gauze)
5. นาฬิกาจับเวลา (timer)
6. บีกเกอร์ (beaker)
7. ปิเปตต์ (pipette)
8. ไม้บรรทัดวัดระยะทาง (ruler)
9. ลูกยาง (rubber bulb)
10. หลอดคาปิลลารี (capillary tube, heparin zed capillary)
11. หลอดหยด (dropper)

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 โมลาร์
2. แป้งตัวอย่าง

3. แป้งที่สกัดได้
4. น้ำกลั่น
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 3 นอร์มอล
7. สารละลายไอโอดีน (I_2)

วิธีการทดลอง

2.1) <u>การสลายแป้งด้วยกรด</u>

1. ชั่งตัวอย่างแป้งที่เตรียมได้ เพื่อเตรียมเป็นสารละลายแป้ง 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ชั่งแป้ง 2.5 กรัม) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. นำไปต้มบน hot plate คนจนแป้งละลาย (สังเกตได้จากสารละลายแป้งจะใสขึ้น) ทิ้งไว้ให้เย็น
3. ปิเปตต์ต์น้ำแป้งที่ได้ใส่หลอดทดลอง 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร ติดฉลากเป็นสารตัวอย่างที่ 0 (S_0)
4. ปิเปตต์ต์น้ำแป้งจากข้อ (2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 2 นาที
5. ปิเปตต์ส่วนใสออกมาจากขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (4) ใส่หลอดทดลอง 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 นอร์มอล หลอดละ 2 หยด ติดฉลากเป็น "S_1" แล้วแบ่งส่วนใสจากขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (4) ใส่ กระจกนาฬิกา 2-3 หยด ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน 1 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง
6. เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงไปอีกในขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (4) ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 2 นาที
7. ปิเปตต์ส่วนใสออกมาจากขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (6) ใส่หลอดทดลอง 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 นอร์มอล หลอดละ 2 หยด ติดฉลากเป็น " S_2" แล้วแบ่งส่วนใสจากขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (6) ใส่ กระจกนาฬิกา 2-3 หยด ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน 1 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง
8. เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงไปอีกในขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (6) ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 2 นาที
9. ปิเปตต์ส่วนใสออกมาจากขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (8) ใส่หลอดทดลอง 3 หลอดๆ ละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 3 นอร์มอล หลอดละ 2 หยด ติดฉลากเป็น " S_3" แล้วแบ่งส่วนใสจากขวดรูปชมพู่ในข้อที่ (8) ใส่ กระจกนาฬิกา 2-3 หยด ทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน 1 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง

<u>*หมายเหตุ</u> ทำการสลายแป้งด้วยกรดจนกว่าจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ถ้าทำถึง S_3 แล้วยังเกิดการเปลี่ยนแปลง ให้ทำการทดลองต่อไปแล้วเก็บบันทึกผลการทดลองเป็น S_4, S_5 เรื่อยไป

2.2) <u>การทดสอบความหนืดของสารละลายแป้ง</u>

1. ชั่งผงแป้งที่เตรียมได้ และบดให้ละเอียดแล้วปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ขวด vial เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คนให้ละลาย
2. ชั่งผงแป้งตัวอย่าง 2 ชนิด ชนิดละ 0.1 กรัม ใส่ขวด vial เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คนให้ละลาย เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

3. นำหลอดคาปิลลารีใส่ลงในขวด vial ขวดละ 1 แท่ง (ให้หันด้านที่มีสีขึ้นด้านบน)
4. จับเวลา 30 นาที บันทึกผลระยะทางที่สารละลายแป้งแต่ละชนิดเคลื่อนที่ได้

***ข้อควรระวัง** การบดแป้งไม่ละเอียดเพียงพอ และละลายไม่หมดจะทำให้เกิดการอุดตันได้

ตอนที่ 3 การทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ของสารตัวอย่างที่เตรียมได้

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เตาแก๊ส และหม้อต้มน้ำ
2. บีกเกอร์ (beaker)
3. ปิเปตต์ต์ (pipette)
4. แร็ก (rack)
5. ลูกยาง (rubber bulb)
6. หลอดทดลอง (test tube)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. สารละลาย Benedict
3. สารละลาย Bial
4. สารละลาย Seliwanoff
5. สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส (glucose)
6. สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของซูโครส (sucrose)
7. สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของไซโลส (xylose)
8. สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของแป้ง (starch)
9. สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ของฟรุกโตส (fructose)
10. สารละลายลูกอมชนิดที่ 1

วิธีการทดลอง

3.1) Seliwanoff's test

วัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบคีโตเฮกโซส (keto-hexose) และอัลโดเฮกโซส (aldo-hexose)

1. ปิเปตต์น้ำกลั่น 1% ไซโลส 1% กลูโคส 1% ฟรุกโตส 1% ซูโครส 1% แป้ง และ 1% ลูกอมชนิดที่ 1 ปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 ตามลำดับ
2. เติมสารละลาย Seliwanoff ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 และแป้งที่สลายแล้วจากการทดลองในข้อ (2) (S_0-S_n) ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น บันทึกผล

3.2) Bial's test

วัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบสารตัวอย่างที่มีน้ำตาลเพนโตส (pentose) เป็นองค์ประกอบ

1. ปิเปตต์น้ำกลั่น 1% ไซโลส 1% กลูโคส 1% ฟรุกโตส 1% ซูโครส 1% แป้ง และ 1% ลูกอมชนิดที่ 1 ปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 ตามลำดับ
2. เติมสารละลาย Bial ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 และแป้งที่สลายแล้วจากการทดลองในข้อ (2) (S_0-S_n) ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น บันทึกผล

3.3) Benedict's test

วัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบสารตัวอย่างที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)

1. ปิเปตต์น้ำกลั่น 1% ไซโลส 1% กลูโคส 1% ฟรุกโตส 1% ซูโครส 1% แป้ง และ 1% ลูกอมชนิดที่ 1 ปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 ตามลำดับ
2. เติมสารละลาย Benedict ลงในหลอดทดลองที่ 1-7 และแป้งที่สลายแล้วจากการทดลองในข้อ (2) (S_0-S_n) ปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น บันทึกผล

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส โดยวิธี Somagyi-Nelson

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เตาแก๊ส และหม้อต้มน้ำ
2. ปิเปตต์ (pipette)
3. ฟอยล์ (aluminium foil)
4. แร็ก (rack)
5. ลูกยาง (rubber bulb)
6. หลอดทดลอง (test tube)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. สารละลายคอปเปอร์ (copper solution)
3. สารละลายน้ำตาลกลูโคสตัวอย่าง
4. สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. สารละลาย Nelson

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์สารในปริมาณต่างๆ กัน ลงในหลอดทดลองที่ 1-9 ในปริมาตรตามตารางข้างล่าง

หลอดที่ / สาร	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)						
	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'	7-7'
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-	0.5
สารละลายมาตรฐานกลูโคส	-	0.2	0.4	0.6	0.8	-	-

ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร							
สารละลายกลูโคสตัวอย่าง	-	-	-	-	-	1.0	0.5

***หมายเหตุ** n-n' หมายถึง การทำซ้ำ (duplicate)

2. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ ลงไปปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองด้วยฟอยล์ นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
4. เติมสารละลาย Nelson ลงไปปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตกตะกอนละลาย
5. เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นชุดทดลองเปรียบเทียบบันทึกผลการทดลอง

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. **สารละลายไอโอดีน**

   -เตรียมสารละลาย KI ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในน้ำกลั่น

   -เติมเกล็ดไอโอดีน (I_2) เข้มข้น 0.07 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

2. **สารละลาย Seliwanoff**

   -เตรียมสารละลาย resorcinol เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 โมลาร์

   -นำสารละลาย resorcinol ที่เตรียมได้ไปเจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

3. **สารละลาย Bial**

-เตรียมสารละลาย orcinol เข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 โมลาร์

-เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

-นำสารละลายที่เตรียมได้ไปเจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

4. **สารละลาย Benedict**

-เตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_6O_6.H_20$) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น

-เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น

-ผสมสารละลายทั้ง 2 เข้าด้วยกัน ในอัตราส่วน 6 ต่อ 1

5. **สารละลายคอปเปอร์**

-เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โพแทสเซียสโซเดียมทาร์เทรต ($KNaC_4H_4O_6{\cdot}4H_2O$) เข้มข้น 3.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น

-เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 2 หยดต่อ 100 มิลลิลิตร

-ผสมสารละลายทั้ง 2 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 7 ต่อ 1

6. **สารละลาย Somagyi-Nelson**

-เตรียมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ให้มีความเข้มข้นเป็น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ให้ทำการคนไปด้วยขณะเติม

-เตรียมสารละลายโซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำกลั่น

-ผสมสารละลายทั้ง 2 เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 18 ต่อ 1

รายงานผลการทดลอง

เรื่อง การแยกและวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ

ชื่อผู้ทดลองและเขียนรายงาน_____รหัส_____

ชื่อผู้ร่วมทดลอง 1. _____ รหัส_____

2. _____ รหัส_____

กลุ่มที่_____section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง 1. _____

2. _____

.....

ตอนที่ 1 ผลการสกัดแยกแป้งจากพืชตัวอย่าง

ชื่อพืชตัวอย่าง	_____	
ปริมาณพืชตัวอย่างที่ใช้	_____	กรัม
ปริมาณแป้งที่ได้	_____	กรัม
% Yield	_____	%

ตอนที่ 2 ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของแป้งที่สกัดแยกได้จากตอนที่ 1

2.1) การสลายแป้งด้วยสารละลายกรด

ชื่อสารตัวอย่าง	_____	
ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้	_____	กรัม
ปริมาณน้ำที่ใช้	_____	มิลลิลิตร
ปริมาณกรดที่ใช้รวม	_____	มิลลิลิตร

สารตัวอย่าง	ผลการทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน
S_0	.....
S_1	.....
S_2	.....
S_3	.....
S_4	.....
:	.....
S_n	.....

2.2 <u>การทดสอบความหนืดของสารละลายแป้ง</u>

ชื่อสารตัวอย่าง	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ภายใน 30 นาที (เซนติเมตร)
.....	.....
.....	.....
.....	.....
.....	.....

<u>ตอนที่ 3</u> การทดสอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ จากตอนที่ 2 และจากแหล่งอื่น

สารตัวอย่าง	Seliwanoff's test		Bial's test		Benedict's test	
	ผลที่สังเกต	ระดับความเข้ม	ผลที่สังเกต	ระดับความเข้ม	ผลที่สังเกต	ระดับความเข้ม
น้ำกลั่น	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% ไซโลส	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% กลูโคส	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% ฟรุกโตส	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% ซูโครส	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% แป้ง	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% ลูกอมชนิดที่ 1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
1% ลูกอมชนิดที่ 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
สารตัวอย่าง .....S_0	.....	.....	.....	.....	.....	.....
....S_1	.....	.....	.....	.....	.....	.....
....S_2	.....	.....	.....	.....	.....	.....
....S_3	.....	.....	.....	.....	.....	.....
....S_n	.....	.....	.....	.....	.....	.....
สารตัวอย่าง ....S_0	.....	.....	.....	.....	.....	.....

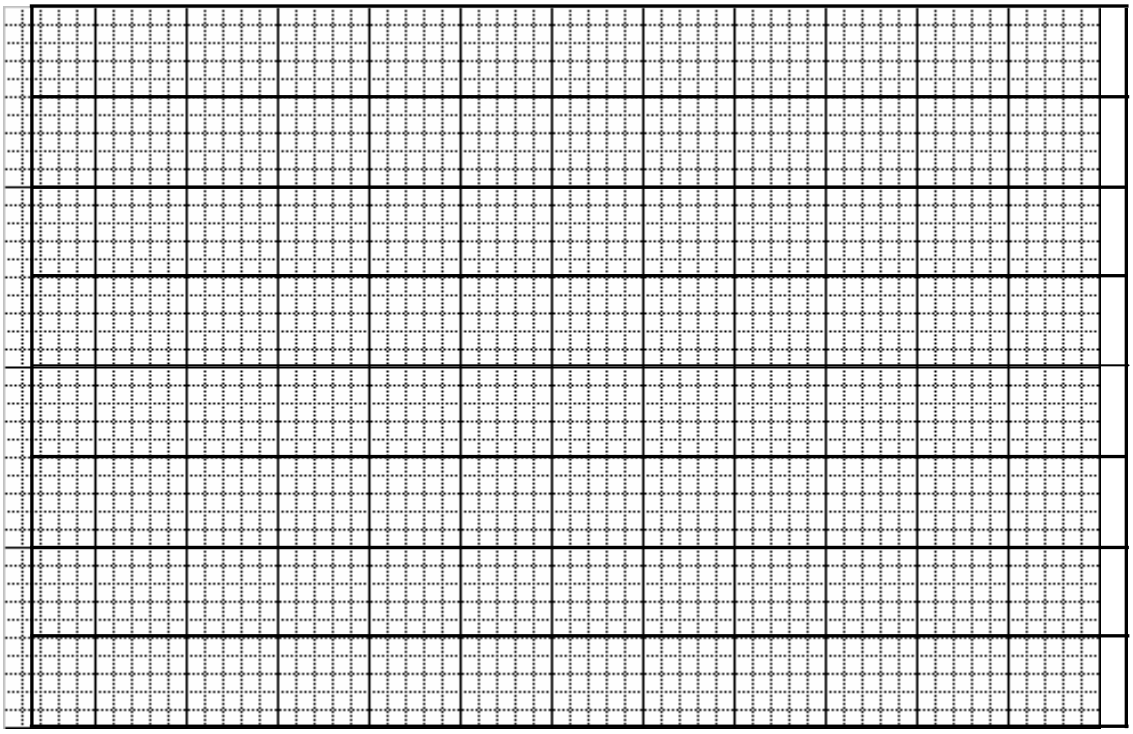
….S_1	……	……...	…….	……...	……	…….
….S_2	……	……...	…….	……...	……	…….
….S_3	……	……...	…….	……...	……	…….
….S_n	……	……...	…….	……...	……	…….

***หมายเหตุ**

+ แสดงผล positive ซึ่งมีระดับความเข้มจากน้อยไปมาก ดังนี้ +1, +2, +3 และ +4 ตามลำดับ
- แสดงผล negative

ตอนที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสจากแหล่งต่าง ๆ

หลอดที่ / สาร	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)						
	1	2	3	4	5	6	7
น้ำกลั่น	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.5	-
สารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	-	0.2	0.4	0.6	0.8	-	-
สารละลายตัวอย่าง	-	-	-	-	-	0.5	1.0
ค่า OD_{540} ที่อ่านได้							
ปริมาณกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม)	0	20	40	60	80	-	-
ปริมาณสาร (ไมโครกรัม)	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	-	-	-	-	-	.....	.....



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{540} และปริมาณกลูโคส (ไมโครกรัม)

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{540} และปริมาณกลูโคส (ไมโครกรัม)

สารละลายกลูโคสตัวอย่าง

ความเข้มข้นของกลูโคสหลอดที่ 6 = ... มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของกลูโคสหลอดที่ 7 = ... มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายกลูโคสตัวอย่าง

= ..... มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

<u>วิธีคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสตัวอย่าง</u>

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

คำถามท้ายบท

1. สัดส่วนของอะไมโลสกับอะไมโลเพกติน มีผลต่อคุณสมบัติของแป้งอย่างไร จงอธิบาย
2. นักศึกษามีวิธีการทดสอบแป้งซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ได้โดยวิธีการใด วิธีการดังกล่าวมีหลักการอย่างไร และวิธีการดังกล่าวสามารถใช้ทดสอบคาร์โบไฮเดรตที่เป็นมอโน- แซ็กคาไรด์ได้หรือไม่ อย่างไรจงอธิบาย
3. จากการทดสอบคาร์โบไฮเดรตดังต่อไปนี้ คือ อะราบิโนส แมนโนส ไซลูโลส น้ำตาลอ้อย และน้ำผึ้ง ด้วยวิธีการของ Bial, Seliwanoff และ Benedict จะให้ผลการทดสอบเป็นอย่างไรบ้าง
4. ในปฏิบัติการ นักศึกษาใช้วิธีการใดในการสลายแป้ง (hydrolysis) วิธีการดังกล่าวมีหลักการอย่างไร
5. ในปฏิบัติการ นักศึกษาใช้วิธีการใดในการหาปริมาณกลูโคส จงอธิบายหลักการของวิธีการดังกล่าวพอสังเขป และการหาปริมาณกลูโคส มีความสำคัญอย่างไรในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์