ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ประกอบด้วยสารละลาย A และ B ดังนี้

- สารละลาย A เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมไดไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) 60.84 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร
- สารละลาย B เตรียมโดยชั่งสารไดโซเดียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4) 86.60 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลาย A และสารละลาย B ผสมกัน ปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร และนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จนได้พีเอช 7.4 จะได้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร เมื่อต้องการใช้งานสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ทำได้โดยการปิเปตต์สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 1 ชั่งสารโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 11.7000 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 ชั่งสารไดโซเดียมไฮโดรเจนออโทฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4) 21.6550 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารขั้นที่ 1 และขั้นที่ 2 มาผสมกันปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร และนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จนได้พีเอช 7.4 จะได้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้งานสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.4 ทำได้โดยปิเปตต์สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จนได้พีเอช 7.4

3. การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 1 ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) 0.0075 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอตเฟส (Na_2HPO_4) หนัก 0.0050 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

นำสารขั้นที่ 1 และขั้นที่ 2 มาผสมกันปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร และนำไปวัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) จนได้พีเอช 7.0

4. การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ดรีเอเจนต์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (Bradford, 1976)

การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ ประกอบด้วยสาร A B และ C ดังนี้

- สาร A เตรียมโดยการชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye ปริมาณ 0.025 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- สาร B เตรียมได้โดยการปิเปตต์เอทานอล (Ethanol) 95% ปริมาตร 12.5 มิลลิลิตร
- สาร C เตรียมได้โดยการปิเปตต์กรดออร์โท – ฟอสฟอริก (ortho - Phosphoric acid) 85% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

จากนั้นนำสารละลาย A B และ C ผสมกัน ปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายแบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดสีชา ทุกครั้งที่จะใช้งานต้องมีการกรองด้วยกระดาษกรองก่อนใช้งานเสมอ

5. การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Magin et al. 2000)

ใช้ร้อยละ 0 – 80 ของความอิ่มตัวเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

$$\text{จากสูตร } G = \frac{533\,(S_2 - S_1)}{100 - 0.3(S_2)}$$

เมื่อ S_1 คือ ร้อยละความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายโปรตีนเริ่มต้น

S_2 คือ ร้อยละความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายโปรตีนที่ต้องการ

G คือ ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องเติมลงไป (กรัม)

ดังนั้น ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ เท่ากับ 0.516 กรัม ที่ต้องเติมลงไปในสารละลายโปรตีน 1 มิลลิลิตร

การคำนวณเทียบบัญญัติไตรยางศ์ของปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ในการเติมลงในสารสกัดหยาบโปรตีนของข้าวสายพันธ์ล้นยุ้ง และนางพญาทองดำ ดังนี้

ข้าวสายพันธ์ล้นยุ้ง ซึ่งมีปริมาณสารสกัดหยาบโปรตีน 522 มิลลิลิตร จะคำนวณหาปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ได้ ดังนี้

$$\text{ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต} = \frac{512 \text{ กรัม} \times 0.516 \text{ มิลลิลิตร}}{1 \text{ มิลลิลิตร}}$$

$$= 269.352 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ข้าวสายพันธ์ล้นยุ้งจะต้องใช้ปริมาณเกลือแอมเนียมซัลเฟต 269.352 กรัม เติมลงในสารสกัดหยาบโปรตีน 522 มิลลิลิตร

ข้าวสายพันธ์นางพญาทองดำ ซึ่งมีปริมาณสารสกัดหยาบโปรตีน 410 มิลลิลิตร คำนวณหาปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ได้ ดังนี้

$$\text{ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต} = \frac{410 \text{ กรัม} \times 0.516 \text{ มิลลิลิตร}}{1 \text{ มิลลิลิตร}}$$

$$= 211.56 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ข้าวสายพันธ์นางพญาทองดำจะต้องใช้ปริมาณเกลือแอมเนียมซัลเฟต 211.56 กรัม เติมลงในสารสกัดหยาบโปรตีน 410 มิลลิลิตร

6. การเตรียม Bovine serum albumin (BSA)

ชั่งสารมาตรฐาน BSA 0.001 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 6.45, 12.90, 19.35 และ 25.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตต์ใส่หลอดทดลองปริมาตร 20, 40, 60 และ 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 ไมโครลิตรและเติมแบรดฟอร์ด รีเอเจนต์ปริมาตร 3,000 ไมโครลิตร (สำหรับวัดปริมาณสารสกัดหยาบโปรตีนหลังตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต)

7. การเตรียมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) ความเข้มข้น 1.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เตรียม Stok solution โดยปิเปตต์เอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรมา 14 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 986 ไมโครลิลิตร จะได้อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสความเข้มข้น 1.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

8. การเตรียมอะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ (Acetylthiocholine iodide) ความเข้มข้น 0.19 โมลาร์

เตรียม Stok solution โดยชั่งอะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ 0.2750 กรัม ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้อะซิติลไทโอโคลีนไอโอไดด์ความเข้มข้น 0.19 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

9. การเตรียมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -Amylase) ความเข้มข้น 16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งแอลฟา-อะไมเลส 0.0150 กรัม ปรับปริมาตรด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่มีส่วนผสมของ 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ความเข้มข้น 16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

10. การเตรียมสารลายอะคาร์โบส (Acarbose)

เตรียมจากยากลูโคเบย์ 1 เม็ด มีอะคาร์โบส 100 มิลลิกรัม โดยบดยากลูโคเบย์ให้ละเอียด แล้วตักใส่หลอด Centrifuge ละลายด้วย DMSO 3 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอด Centrifuge อีกหลอดแล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ให้ได้ 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายอะคาร์โบส ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการสารละลายอะคาร์โบส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ปิเปตต์สารละลายอะคาร์โบส ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

11. การเตรียมน้ำแป้ง 1%

ชั่งแป้งมันฝรั่ง 0.25 กรัม ปรับปริมาตรด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

12. การเตรียมสารละลายไอโอดีน (I_2) 1%

ชั่งไอโอดีน 0.25 กรัม เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) เล็กน้อยเพื่อละลาย ไอโอดีน จากนั้นกวนด้วย Magnetic bar ให้ละลาย แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

13. การเตรียมสาร 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์

เตรียม Stok solution โดยชั่งสาร 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) 0.0792 ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จะได้ 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

14. การเตรียมยาไรวาสติกมีน (Rivastigmine) ความเข้มข้น 24 ไมโครโมลาร์

เตรียม Stok solution โดยชั่งยาไรวาสติกมีน 0.01671 กรัม ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นกรองตะกอนออกจะได้ยาไรวาสติกมีน ความเข้มข้น 24 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร

15. การเตรียมสารละลายวานิลิน (Vanillin Reagent**)**

ชั่งวานิลิน 0.5 กรัม ละลายในกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและเติมเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

16. การเตรียมสารละลายโบโมครีซอลกรีน (Bromocresol green Reagent)

ชั่งโบโมครีซอลกรีน 0.04 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร และหยด 0.1 นอร์มอล จนมีสีฟ้าปรากฏขึ้น เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

17. การเตรียมสารละลายดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent)

- เตรียมสารละลาย A ชั่งบิทมัสไรเตรต 0.8 กรัม ละลายในกรดแกลเชียลอะซิติก 10 มิลลิลิตร ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โดยให้เติมน้ำกลั่นช้า ๆ เนื่องจากปฏิกิริยาอาจเกิดความร้อน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เตรียมสารละลาย B ชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ปิเปตต์สารละลาย A และสารละลาย B อย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริก ร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร)

18. การเตรียมสารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin Reagent)

ชั่งนินไฮดริน 0.2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

19. การเตรียมบีเอชที (Butylated Hydroxytoluene)

1) ชั่งสารมาตรฐานบีเอชที 0.001 กรัม ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบีเอชทีที่มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) จากนั้นนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตต์ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (Microcentrifuge Tube) ปริมาตร 25, 50, 100 และ 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 1000 ไมโครลิตร

20. การเตรียมสารละลาย 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์

1) ชั่ง DPPH 0.0039 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

2) ปิเปตต์สารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ มา 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยบูรพา