

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citrate-phosphate buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.1 M citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 19.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
2.6	44.6	5.4
3.0	39.8	10.2
3.4	35.9	14.1
3.8	32.3	17.7
4.0	30.7	19.3
4.4	27.8	22.2
4.8	25.2	24.8
5.0	24.3	25.7
5.4	22.2	27.8
5.8	19.7	30.3
6.0	17.9	32.1
6.4	15.4	34.6
6.8	9.1	40.9
7.0	6.5	43.6

2. การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (6.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M HCl

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
7.0	46.6
7.2	44.2
7.4	41.4
7.6	38.4
7.8	32.5
8.0	26.8
8.2	21.9
8.4	16.5
8.6	12.2
8.8	8.1
9.0	5.0

3.การเตรียมสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (Carbonate–bicarbonate buffer) (Stoll and blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M anhydrous sodium carbonate (21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium bicarbonate (16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
9.2	4.0	46.0
9.4	9.5	40.5
9.6	16.0	34.0
9.7	19.5	30.5
9.8	22.0	28.0
10.0	27.5	22.5
10.2	33.0	17.0
10.4	38.5	11.5
10.5	40.5	9.5
10.6	42.5	7.5
10.7	45.0	5.0

4. การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer) (Stoll and blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M acetic acid (11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตร เป็น 1000 มิลลิลิตร หรือ $C_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ 27.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับ ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการดังตารางแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

5. การเตรียมสารละลาย Ammediol บัฟเฟอร์ (2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol)
(Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (21.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น
ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M HCl

ผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ ปรับปริมาตรเป็น
200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
10.0	2.0
9.8	3.7
9.6	5.7
9.4	8.5
9.2	12.5
9.0	16.7
8.8	22.0
8.6	29.5
8.4	34.0
8.2	37.7
8.0	41.0
7.8	43.5

6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา (stop buffer) เตรียมโดยใช้ tris-chloroacetic acid 0.1 M (1.6339 กรัม ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร) sodium acetate 0.22M (ซึ่งโซเดียมคลอไรด์ 12.87 กรัม เติมกรดอะซิติก 1.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) และ acetic acid 0.33 M ผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิด ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1

7. สารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส

7.1 การเตรียมสับสเตรตในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส

ซึ่ง soluble starch 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

7.2 การเตรียมสารละลายไอโอดีน

ซึ่งไอโอดีน 0.5% ใน 5.0% ของสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์ เติมน้ำจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมเป็น stock solution เมื่อนำมาใช้จะทำการเจือจาง stock solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อน้ำที่ผ่านการกำจัดอิออน (deionized water) แล้วซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

8. สารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

8.1 การเตรียม colloidal chitin ตามวิธีการของ (West and Cowell, 1984 อ้างโดย ทศนัย วาหะ, 2537)

ละลายไคตินผง 20 กรัม ในสารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้เติมลงในน้ำที่ผ่านการขจัดอิออน (deionized water) ที่เย็นจัด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วย 10 N NaOH เป็นผลให้เกิดตะกอนขึ้น ตั้งส่วนผสมที่ได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่น โดยการเหวี่ยงแยกที่ความเร็วและเวลาเดียวกันกับข้างต้น 3 ครั้ง สุดท้ายปรับความเข้มข้นของตะกอนให้ได้ 10% (w/v)

8.2 การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ตามวิธีการของ Somogyi-Nelson method (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, 2536)

สารละลาย copper reagent

ประกอบด้วย

1. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย ฟอสเฟต-ทาร์เทรต (phosphate-tartrate solution)

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 70.5495 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วย โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4 anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 900 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง Whatman number 4

ผสมสารละลายในข้อ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และข้อ 2 ปริมาตร 900 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน จะเรียกสารละลายนี้ว่า copper reagent

สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent

ประกอบด้วย

1. ละลาย Ammoniummolybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ละลาย Disodium Arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายในข้อ 1 และ ข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและควรเก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดสีชา

9. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมไฮยาลูโรนิคเดส

สารละลาย 10% *p*-DMAB

ชั่ง *p*-DMAB (*p*-dimethylaminobenzaldehyde) 10 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก (glacial acetic acid) 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 12.5% (v/v) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) สารละลายที่เตรียมได้ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ ให้เจือจางกับกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 1: 9 (v/v) และควรเจือจางใหม่ๆก่อนใช้