บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. พืชทดลอง

ส้มเขียวหวานที่ติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ ทรอยเยอร์ คลีโอพัตรา คาร์ริโซ เจซี สวิงเกิล และรัฟเลมอน อายุประมาณ 1 ปี จำนวน 180 ต้น ปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ความจุ 20 ลิตร ใช้ทรายละเอียดเป็นวัสดุปลูก และอยู่ในสภาพกลางแจ้ง (ภาพที่ 1) ให้ธาตุอาหารพืชในรูปของสารละลาย ซึ่งมีองค์ประกอบ และความเข้มข้น ดังต่อไปนี้

Cation		Anion	
ชนิด	ความเข้มข้น (meq/l)	ชนิด	ความเข้มข้น (meq/l)
Mg^{++}	5	SO_4^{-2}	5
K^{+}	5	$H_2PO_4^{-}$	5
Ca^{++}	5	NO_3^{-}	5
รวม	**15**	**รวม**	**15**

ส่วนธาตุอาหารรองให้ตามคำแนะนำของ Hoagland and Arnon (1952) และความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 6.5 ให้ธาตุอาหารในช่วงเวลาเช้าทุกวัน ตลอดการทดลอง

ภาพที่ 1 แปลงทดลองส้มเขียวหวาน

2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.2 ตู้อบและโถดูดความชื้น

2.3 เครื่องบดตัวอย่างพืช พร้อมตะแกรงร่อนขนาด 40 mesh

2.4 อุปกรณ์ไตเตรตและปิเปต

2.5 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (hand refractometer)

2.6 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

2.7 เครื่อง Micro Kjeldahl

2.8 เครื่อง Atomic Absorption

2.9 เครื่องระเหยความดันต่ำแบบหมุน (Rotary evaporator)

2.10 หม้อนึ่งความดัน

2.11 ขวดแก้วสำหรับระเหย

2.12 Capillary tube

2.13 Dropper แท่งแก้ว กรวยกรอง ปากคีบ

2.14 บีกเกอร์ ขนาด 100, 250, 500, 1000 และ 2000 ซีซี

2.15 Erlenmeyer flask ขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 ซีซี

2.16 Volumetric flask ขนาด 5, 50, 100, 500 และ 1000 ซีซี

2.17 Cylinder ขนาด 25, 50 และ 100 ซีซี

2.18 Petridish

2.19 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

2.20 กระดาษโครมาโตรแกรม Whatman เบอร์ 1 ขนาด 47 x 56 ซม.

2.21 ตลับเทปวัดความยาว ไม้บรรทัด และเวอร์เนียแคลิเปอร์

2.22 ป้ายพลาสติก กระติกน้ำแข็ง ถุงพลาสติก 5 x 7 นิ้ว

2.23 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาจากศูนย์อุตุนิยมวิทยาภาคเหนือ ในช่วงดำเนินการทดลอง ระหว่างเดือนสิงหาคม 2543 ถึง มกราคม 2545 แสดงอุณหภูมิอากาศสูงสุดและต่ำสุด ค่าเฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์ และปริมาณน้ำฝน

3. วิธีการทดลอง

3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCB)

ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ๆ ละ 6 ต้น ได้แก่ ส้มเขียวหวานที่ติดตาบนต้นตอพันธุ์ทรอยเยอร์ คลีโอพัตรา คาร์ริโซ เจซี สวิงเกิล และรัฟเลมอน

ปฏิบัติการทดลอง ณ แปลงทดลองไม้ผล ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนสิงหาคม 2543 ถึง มกราคม 2545

3.2 บันทึกข้อมูล

1. การเจริญเติบโตของส้มเขียวหวาน

บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของส้มเขียวหวาน เริ่มบันทึกเมื่อต้นอายุ 1 เดือน ภาพที่ 2 แสดงภาพต้นส้มเขียวหวานอายุ 12 เดือน

1.1 ความสูงของต้น วัดความสูงจากแนวระดับที่กำหนดไว้บนขอบกระถางจนถึงส่วนปลายสูงสุดของยอดความสูงของต้น มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

1.2 ความกว้างทรงพุ่ม วัดส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่มใน 2 แนว ตั้งฉากกัน (แนวเหนือ - ใต้ กับ แนวตะวันออก - ตะวันตก) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

1.3 สัดส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นของกิ่งพันธุ์ดีกับต้นตอ วัดส่วนของลำต้นในแนวระดับเหนือและใต้รอยต่อ 5 เซนติเมตร โดยใช้เวอร์เนียแคลิเปอร์ มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

1.3 จำนวนครั้งและจำนวนยอดที่ผลิใหม่ ตรวจนับยอดที่มีความยาวตั้งแต่ 2 เซนติเมตร ผูกป้ายทำเครื่องหมายเพื่อใช้นับในครั้งต่อไป

ข้อมูลการเจริญเติบโต วัดและบันทึกผลจำนวน 18 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2543 ถึง เดือนมกราคม 2545 นำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วจึงหาค่าการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นโดยนับจากเมื่อเริ่มทำการทดลอง

ภาพที่ 2 ส้มเขียวหวาน อายุ 12 เดือน

2. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในใบส้มเขียวหวาน

2.1 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่อยู่ในรูปโครงสร้าง (Total Non – structural Carbohydrate ; TNC)

1. การสกัด ตามวิธีการของ Smith *et al.* (1964) ดัดแปลงโดย Chaitrakulsup (1981) โดยชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับ pH ให้เป็นกลาง ด้วย 1.0 N NaOH และ 50 % HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ดูดสารละลายที่สกัดและเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ TNC

2. การวิเคราะห์ปริมาณ TNC โดยวิธีของ Nelson (Hodge and Hofreiter, 1962) นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ และสารละลาย ดี-กลูโคส เข้มข้น 0.00 - 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ทำเป็น standard) ใส่หลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Nelson' s alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้น ทำให้เย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ที่เกิดขึ้นให้ละลายจนหมด ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยใช้ค่า standard จากสารละลาย ดี-กลูโคส ซึ่งทราบความเข้มข้นแล้วเป็นตัวเปรียบเทียบ ผลที่ได้แสดงเป็น มิลลิกรัม ดี-กลูโคส / กรัมน้ำหนักแห้ง

การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ TNC และ RS

1. Nelson' s alkaline copper reagent

ละลาย anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) 25 กรัม ในน้ำ 250 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ potassium sodium tartrate ($C_4H_4KNO_6.4H_2O$) 12 กรัม แล้วใส่สารละลาย 10 % copper sulfate 40 มิลลิลิตร (ใช้ $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม ละลายน้ำจนครบ 40 มิลลิลิตร) เติม sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) อีก 16 กรัม (สารละลาย I)

ละลาย anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) 180 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร (สารละลาย II)

ผสมสารละลาย I และ II แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หลังจาก 1 สัปดาห์ กรองแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส

2. Arsenomolybdic acid reagent

ละลาย ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 50 กรัม ในน้ำ 90มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 42 มิลลิลิตร (สารละลาย III)

ละลาย disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 6 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร (สารละลาย IV)

ค่อย ๆ เติมสารละลาย IV ในสารละลาย III แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing Sugar ; RS)

โดยชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม ethanol 50 % ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เขย่าภาชนะทุก 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่สกัดและเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ RS ตามวิธีการของ Nelson (Hodge and Hofreiter, 1962) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 540 nm

3. ปริมาณธาตุอาหารในใบ (ปรีดา และคณะ, 2536)

การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มเขียวหวาน โดยใช้ใบที่แก่เต็มที่ (mature leaf) เก็บในแนว 4 ทิศของทรงพุ่ม นำมาล้างให้สะอาด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ dessicator ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด โดยใช้เครื่องบดที่มีขนาดตะแกรง 40 mesh

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

การย่อยสลายตัวอย่างพืช

ชั่งตัวอย่างพืชประมาณ 0.29 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยตัวอย่าง (digestion tube) เติมกรด H_2SO_4 5 มิลลิลิตร เติมสารเร่งปฏิกิริยา (mixd catalyst) 1.1 กรัม (ได้จากการผสม K_2SO_4 100 กรัม $CuSO_4 . 5 H_2O$ 10 กรัม และ Se 1 กรัม บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน) นำไป digest ภายใต้ fume hood ควบคุมอุณหภูมิของเครื่อง digest ให้อยู่ในช่วง 360 - 400 องศาเซลเซียส ย่อยสลายตัวอย่างพืช จนได้สารละลายใสจึงยกลง ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าสารละลายให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เทสารละลายใสส่วนบนเก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิด เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ N รวมทั้งทำ blank พร้อมกับตัวอย่าง

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

ปิเปตสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายตัวอย่าง จำนวน 15 มิลลิลิตร ใส่ลงใน distillation flask เติม 4 N NaOH จำนวน 15 มิลลิลิตร เริ่มกลั่นและจับไนโตรเจนซึ่งอยู่ในรูป NH_4 ให้ได้ปริมาตรใน erlenmeyer flask 30 มิลลิลิตร กลั่นตัวอย่างพืชรวมทั้ง blank นำสารละลายใน erlenmeyer flask ของแต่ละตัวอย่างมา titrate ด้วยกรด H_2SO_4 0.05 N จนสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ แล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

$$\%\,N = \frac{((A-B) \times C \times 14\ g\,N}{1{,}000\ meq} \times \frac{1{,}000\ mg}{g} \times 100) / \text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (g)}$$

A = มิลลิลิตรของกรด H_2SO_4 ที่ใช้ titrate

B = มิลลิลิตรของกรด H_2SO_4 ที่ใช้ titrate blank

C = ความเข้มข้นของกรด H_2SO_4

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

การย่อยสลายตัวอย่างพืช

ชั่งตัวอย่างพืชประมาณ 0.29 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมกรดผสมของไนตริก และเปอร์คลอริก 5 มิลลิลิตร ($HNO_3 + HClO_4$; 5 : 3 โดยปริมาตร) วางหลอดทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นปรับอุณหภูมิของ block เป็น 150 องศาเซลเซียส ทำการย่อยสลายต่อไปอีก 1.5 ชั่วโมง เพื่อระเหยกรด HNO_3 ออกไปจนหมด ปรับอุณหภูมิ block เพิ่มอีกครั้งหนึ่ง ไปที่ 200 องศาเซลเซียส จะมีควันสีขาวเกิดขึ้น ต้มต่ออีก 3 ชั่วโมง การย่อยสลายจึงเสร็จสมบูรณ์ นำหลอดตัวอย่างออกจากเตาเผาวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงในตู้ควัน นาน 30 - 40 นาที เติมน้ำกลั่นพร้อมทั้งเขย่า ทิ้งไว้ให้เย็น (ที่อุณหภูมิห้อง) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ค้างคืน เพื่อให้ซิลิกาตกตะกอน เทสารละลายเฉพาะส่วนที่ใสของแต่ละหลอด เก็บไว้ในขวดพลาสติกประมาณ 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาฟอสฟอรัส กำมะถัน และโปแตสเซียม ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

ใช้วิธี ammonium metavanadate การเตรียมสารเคมีในการทำให้เกิดสี มีดังนี้

1. Vanadate reagent : ละลายแอมโมเนียมวานาเดต (NH_4VO_3) 0.5 กรัม ในน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น ($HClO_4$) 70 % 80 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. Molybdate reagent : ละลาย แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6MO_7O_{34} . 4H_2O$) 12.5 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

3. Stock standard solution (1,000 ppm P) : ชั่งโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 4.393 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เตรียม Working standards ต่อไป

4. Working standards : เตรียม 100 ppm P จาก 1,000 ppm P จากนั้นเตรียม Working standards 1 ชุด ใน 100 มิลลิลิตร volumetric flask ซึ่งประกอบด้วยความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5, 10,

12.5 ppm และในแต่ละ flask เติมกรด $HClO_4$ 10 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีทำให้เกิดสี

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างและ standards 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Vanadate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมเข้าด้วยกัน และเติม Molybdate reagent อีก 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมกัน วางหลอดทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที

2. วัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 440 nm ด้วยการเทียบสีที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างพืชและ standards แล้วคำนวณ โดยใช้สูตร

$$\% P = \frac{\text{ppm (reading)} \times \text{dilution factor} \times 50 \times 10^{-6} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (g)}}$$

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปแตสเซียม

โปแตสเซียมซึ่งอยู่ในรูปสารละลายที่ได้มาจากการย่อยสลายพืช โดยวิธีการต้มด้วยกรดผสมของไนตริกและเปอร์คลอริก สามารถนำไปวัดหาค่าได้โดยตรงด้วยเครื่อง Atomic Emission Spectroscopy (AES) โดยการเปรียบเทียบค่า Emission กับของ standards มีวิธีการเตรียม standards ดังต่อไปนี้

1. Stock standard solution (1,000 ppm K) : ชั่งโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 1.9066 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติมกรด HNO_3 เข้มข้น 12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้เตรียม Intermediate standard ต่อไป

2. Intermediate standard solution (100 ppm K) ปิเปต 10 มิลลิลิตร ของ 1,000 ppm K ลงใน 100 มิลลิลิตร volumetric flask เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. Working standard solution : เตรียม Standards K 1 ชุด ใน 100 มิลลิลิตร volumetric flask ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 ppm โดยปิเปต 0, 1.5, 3 และ 6 มิลลิลิตร ของ 100 ppm K เติมกรด $HClO_4$ 70 % 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น คำนวณค่าจากสูตร

$$\% K = \frac{\text{ppm (reading)} \times \text{dilution factor} \times 50 \times 10^{-6} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (g)}}$$

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม

แคลเซียมที่อยู่ในรูปสารละลายที่ได้มาจากการย่อยสลายพืช โดยวิธีการต้มด้วยกรดผสมของไนตริกและเปอร์คลอริก นำไปวัดหาค่าได้โดยตรงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) โดยการเปรียบเทียบค่า Absorption กับ Standards มีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

1. Stock standard solution (1,000 ppm Ca) : ชั่งแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) จำนวน 2.4973 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลายอย่างช้า ๆ เติมกรดไนตริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร เพื่อช่วยละลาย เทสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. Intermediate standard solution (100 ppm Ca) : เตรียมโดย ดูดสารละลาย 1000 ppm Ca (จากข้อ 1) 10 มล. ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย

3. Working standard solution : เติมสารละลายมาตรฐาน Ca ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ppm เตรียมโดยดูดสารละลาย 100 ppm Ca (จากข้อ 2) มา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้น เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และสารละลาย $SrCl_2$ อีก 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

การวัดแคลเซียมด้วย AAS ต้องเติมสารละลาย $SrCl_2$ เพื่อช่วยในการแตกตัวเป็นอะตอม เป็นการเพิ่มความแม่นยำและถูกต้องในการวัด เตรียมโดยการชั่ง $SrCl_2.6H_2O$ จำนวน 30.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

วิธีการวัดปริมาณแคลเซียม

ดูดสารละลายที่ย่อยสลายแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $SrCl_2$ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดปริมาณด้วยเครื่อง AAS เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานชุด Working standard solution

$$\% \text{ Ca} = \frac{\text{ppm (reading) x dilution factor x 50 ml}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (g) x 10,000}}$$

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแมกนีเซียม

แมกนีเซียมที่ผ่านการย่อยสลาย ใช้วิธีต้มด้วยกรดผสมของไนตริก และเปอร์คลอริก นำไปวัดหาค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) เช่นเดียวกับแคลเซียม และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น โดยการเปรียบเทียบกับ stardards ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมและวัด ดังนี้

1. Stock standard solution (1,000 ppm Mg) : ชั่งแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) จำนวน 10.1386 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. Intermediate standard solution (100 ppm Mg) : เตรียมโดย ดูดสารละลาย 1,000 ppm Mg (จากข้อ 1) มา 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. Working standard solution : เติมสารละลายมาตรฐาน Mg เข้มข้น 0, 5, 10, และ 15 ppm Mg เตรียมโดยดูดสารละลาย 100 ppm Mg (จากข้อ 2) มา 0, 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้น เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร และสารละลาย $SrCl_2$ อีก 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวัดปริมาณแมกนีเซียม

ดูดสารละลายพืชที่ย่อยสลายแล้ว 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย $SrCl_2$ 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดปริมาณด้วยเครื่อง AAS เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานชุด Working standard solution

$$\% \text{ Mg} = \frac{\text{ppm (reading) x dilution factor x 50 ml}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช (g) x 10,000}}$$

4. วิเคราะห์คุณภาพผลผลิต

4.1 น้ำหนักของผล โดยการชั่ง มีหน่วยเป็นกรัม

4.2 ขนาดของผล วัดส่วนกว้างที่สุด และส่วนสูงที่สุดของผล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยความกว้างและความสูง มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

4.3 ความหนาของเปลือก มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

4.4 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titrable Acidity;TA) ใช้น้ำที่คั้นจากผลส้มเขียวหวานจำนวน 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ไตเตรตด้วย NaOH 0.1 N โดยใช้ pH meter เป็นตัวกำหนดจุดยุติ (end point) pH เท่ากับ 8.2 คำนวณ TA ในรูปของกรดซิตริก ใช้สูตร

$$\% \text{ TA} = \frac{\text{ปริมาณ NaOH x ความเข้มข้นของ NaOH x mol. wt. ของกรดซิตริก x 100}}{\text{ปริมาณน้ำคั้นที่ใช้}}$$

4.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Soluble Solids ; TSS) วัดโดยใช้เครื่องมือ hand refractometer จากน้ำคั้นที่ได้จากผลส้มเขียวหวาน มีหน่วยเป็น องศาบริกซ์ (^{0}brix)

5. อัตราส่วนน้ำหนักแห้ง ถอนต้นส้มเขียวหวานออกจากกระถาง แยกส่วน ใบ ลำต้น กิ่งก้าน และราก นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้งของแต่ละส่วน แล้วนำมาหาอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของส่วนเหนือดินและราก

6. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม IRRISTAT VERSION 3/93 โดยวิเคราะห์ Analysis of Variance, Coefficient of Variation (C.V.);linear regression และ correlation

7. ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

วิเคราะห์ปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินในส่วนยอดและราก โดยวิธี soybean hypocotyl bioassay (ดรุณี, 2539)

7.1 การเก็บตัวอย่าง

ยอด ตัดยอดอ่อนส้มเขียวหวาน ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่โคนกิ่ง ประมาณ 0.3-0.4 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร จำนวนซ้ำละ 30 ยอด ตัดใบทิ้งทั้งหมด เก็บใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัด

ราก เก็บรากอ่อน ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร วัดจากปลายรากโดยประมาณ น้ำหนัก 25 กรัม เก็บใส่ถุงพลาสติกแช่น้ำแข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดต่อไป

7.2 การสกัด

นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น นำมาชั่งน้ำหนัก 25 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติม ethanol 80 % 250 มิลลิลิตร ปิดภาชนะด้วยพลาสติก รัดยางและเขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จะได้สารละลายประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้น นำไปลดปริมาตรด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตรประมาณ 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 2.5 ด้วย HCl 6 N

7.3 การแยกส่วน

นำสารละลายที่ได้ไปแยกส่วนด้วยกรวยแยก (separatory funnel) ใช้ ethyl acetate 1.5 มิลลิลิตร ต่อ ตัวอย่าง 1 กรัม (จากการสกัด ใช้ตัวอย่าง 25 กรัม แช่ใน ethanol 250 มิลลิลิตร กรองได้ 200 มิลลิลิตร เนื่องจากไม่สามารถกรองได้ทั้งหมด จึงเทียบเท่ากับตัวอย่าง 20 กรัม) ดังนั้น ethyl acetate 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ สารละลายจะแยกชั้น เก็บเอาส่วนที่อยู่ชั้นล่างไว้ (water phase) จะได้ประมาณ 25 มิลลิลิตร

7.4 การทำให้บริสุทธิ์

กำจัดสิ่งเจือปนและยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibitor) โดยใช้ column chromatography นำ water phase ผ่าน column โดยใช้ burette ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร บรรจุ Dowex resin ใน burette สูงประมาณ 20 เซนติเมตร โดยจะต้องแช่ Dowex resin ในน้ำกลั่นให้ขยายตัวเต็มที่ก่อน ล้าง column ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้น ผ่าน water phase ลงใน column 10 มิลลิลิตร ควบคุมให้สารละลายหยดลงช้า ๆ ด้วยอัตราเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตร/นาที ระวังอย่าให้ Dowex resin แห้ง เมื่อสารละลายลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้า Dowex resin เริ่มล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ด้วยอัตราเร็วเดียวกันเมื่อน้ำกลั่นลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้า Dowex resin เติม ethanol 70 % (lab grade) 20 มิลลิลิตร ให้ไหลผ่าน column ในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่อ ethanol ลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้า Dowex resin เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ล้างในอัตราเร็วเดียวกัน สารละลายที่ไหลออกมาให้ทิ้งไป จากนั้น เติม 5 N NH_4OH (AR grade) 20 มิลลิลิตร และปล่อยให้ชะในอัตราเร็วประมาณ 0.5 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายที่ชะผ่านออกมา เมื่อ NH_4OH ลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้า Dowex resin เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาเมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นครั้งสุดท้าย จะได้ปริมาตรรวมกันประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้น ล้าง column เพื่อใช้ใหม่ (เพื่อผ่าน water phase ครั้งต่อไป) โดยล้างด้วย 2 N HCl (AR grade) 20 มิลลิลิตร อัตราเร็วประมาณ 2 มิลลิลิตร/นาที เมื่อกรดลดระดับลงจนใกล้จะถึงผิวหน้า Dowex resin เติมน้ำกลั่นครั้งละ 20 มิลลิลิตร จนครบ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ 40 มิลลิลิตร ไปลดปริมาตรโดยใช้เครื่องระเหยความดันต่ำแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้เหลือสารละลาย 1 มิลลิลิตร

7.5 การทำ paper chromatography

เตรียมแผ่นโครมาโตแกรมโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9 x 28 เซนติเมตร ขีดเส้นที่จุดเริ่มต้นที่จะ strip สารละลาย ใช้ดินสอดำขีดให้ห่างจากขอบล่าง 2 เซนติเมตร และจุดสุดท้ายที่สารละลายจะเคลื่อนที่ไปถึง (18 ซม. วัดจากจุดที่จะ strip สาร) นำสารละลายที่ลดปริมาตรแล้วมา strip ลงบนแผ่น chromatogram โดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 250

ไมโครลิตร (เทียบเท่าตัวอย่าง 5 กรัมสด) ทิ้งให้แถบสารแห้ง นำแผ่น chromatogram แช่ใน developing chamber ขนาด 20 x 60 x 40 เซนติเมตร ซึ่งมีตัวทำละลาย คือ isopropanol 99.7 % : NH_4OH 25 % : H_2O = 10 : 1 : 1 (v/v) โดยให้แถบสารอยู่เหนือตัวทำละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ solvent front (ใช้เวลาประมาณ 8-9 ชั่วโมง) แล้วจึงนำแผ่น chromatogram ออกมาผึ่งให้แห้ง แล้วแบ่งเป็น R_f 0.1-1.0 (ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่เหนือแถบสารจนถึงระยะ solvent front) โดยแบ่งออกเป็น 10 ส่วนเท่า ๆ กัน ส่วน R_f 0.0 จะอยู่ใต้แถบสาร

7.6 การทำ Soybean Hypocotyl Bioassay (SHB)

- นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 5 คัดเมล็ดที่สมบูรณ์ แล้วนำไปแช่น้ำ คัดเมล็ดที่จมน้ำมาใช้ โดยให้มีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 90 เมล็ด นำมาฆ่าเชื้อ โดยใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี ethanol (Lab grade) 75 % แช่เมล็ด เขย่าตลอดเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ในสารละลาย chlorox (sodium hypochloride 5.25 % a.i.) : น้ำ = 1 : 9 (โดยปริมาตร) เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

- เตรียมอาหารวุ้น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครส 15 กรัม : วุ้นผง (0.8 %) 5 กรัมต่อน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เทใส่หลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพลาสติก PP (Polypopylene) รัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

- นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ฆ่าเชื้อแล้ว มาเพาะในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น (ในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำไปไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (hypocotyls จะยาวประมาณ 12 เซนติเมตร วัดจากใต้ใบเลี้ยงจนถึงจุดที่เกิดรากเป็นจุดแรก)

7.7 การหาตำแหน่ง R_f ของสารคล้ายไซโตไคนิน (ตามแบบดรุณี, 2539)

- เตรียมอาหารวุ้นตามสูตรของ Miller (1961) ส่วนประกอบของอาหาร ตามตารางที่ 1 แต่ไม่ใส่ kinetin

- นำแผ่น chromatogram ที่แบ่ง R_f เรียบร้อยแล้วในข้อ 2.6.5 มาตัดให้ได้ R_f 0.0-1.0 นำ chromatogram แต่ละ R_f มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในขวดขนาด 4 ออนซ์ พร้อมติด label แสดง R_f ไว้ที่ข้างขวด

- เมื่อนำ chromatogram ของแต่ละ R_f ใส่ในขวดเรียบร้อยแล้ว นำอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) ที่เตรียมไว้ เทใส่ในขวดที่ใส่ chromatogram ที่ตัด R_f ใส่ไว้แล้ว ขวดละ 10 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติก polypopylene รัดด้วยยาง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

- การหาตำแหน่ง R_f ที่มี activity ของสารคล้ายไซโตไคนิน ด้วยวิธี Soybean Hypocotyl Bioassay โดยนำ hypocotyl ออกมาจากหลอดแก้ว ในตู้ Laminar air flow โดยเปิดฝาพลาสติกออก แล้วลนปากหลอดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วใช้ปากคีบที่นึ่งและเผาฆ่าเชื้อ คีบ hypocotyl ออกมาตัดใน petridish ที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ โดยใช้ใบมีดเบอร์ 11 ที่เผาฆ่าเชื้อแล้ว ตัดส่วนที่เป็นใบเลี้ยงและรากทิ้งไป แล้วย้าย hypocotyl มาวางลงใน petridish อีกอันที่มีแผ่นพลาสติกรองไว้ และใช้ใบมีดเบอร์ 11 อีกอันหนึ่ง ตัด hypocotyl เป็นชิ้น ๆ ยาวชิ้นละ 1 มิลลิลิตร ใช้ปากคีบที่เผาฆ่าเชื้อแล้วคีบ hypocotyl ที่ตัดแล้วใส่ลงในขวดอาหารที่มีแผ่น chromatogram ขวดละ 8 ชิ้น วางห่างกัน 0.3-0.4 มิลลิลิตร โดยเลือก hypocotyl ทั้งจากส่วนที่ใกล้กับบริเวณใบเลี้ยง หรือส่วนที่ใกล้กับบริเวณราก ให้เฉลี่ยกันไปในแต่ละขวด เพื่อลด C.V. ของการทดลอง ลนปากขวดที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ก่อน แล้วปิดปากขวดด้วยแผ่นพลาสติก PP รัดด้วยยาง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ)

- นำไปบ่มในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ที่มีความเข้มแสงประมาณ 1,000 lux เป็นเวลา 13 วัน แล้วจึงนำออกมาชั่งน้ำหนักสดของ hypocotyl แต่ละขวด

7.8 การทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย kinetin เข้มข้น $5x10^{-1}$, $5x10^{-2}$, $5x10^{-3}$, $5x10^{-4}$ และ $5x10^{-5}$ ส่วนต่อล้าน ใส่ลงในอาหารวุ้นสูตร Miller (1961) แล้วปิดปากขวดด้วยพลาสติก PP รัดด้วยยาง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วเลี้ยง hypocotyl ตามวิธีการเดียวกับการหาตำแหน่ง R_f

7.9 การคำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน

จากสมการเส้นตรง $Y = a + b(X)$ ที่คำนวณได้จาก linear regression analysis ของ standard curve โดยที่ Y = ความเข้มข้นของ kinetin (มก/ล)

X = น้ำหนักสดของ hypocotyl (มก)

ค่า Y ทำให้ทราบว่า ในสารละลาย 1,000 มล มีปริมาณ kinetin อยู่ Y มก

เพราะฉะนั้น อาหารวุ้น 10 มล มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 10 / 1,00 มก

จากน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 10 / 1,000 มก

การเปลี่ยนหน่วยของสารคล้ายไซโตไคนิน จาก มก เป็น µg ทำโดยการคูณด้วย 1,000

จาก น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y / 500 มก

ดังนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 1,000 / 500 µg

เพราะฉะนั้น น้ำหนักตัวอย่าง 1 กรัม มีปริมาณสารคล้ายไซโตไคนิน Y x 10 / 5 µg

7.10 การบันทึกผล

1. บันทึกน้ำหนักสดของ hypocotyl (เมื่ออายุบ่ม 13 วัน) มีหน่วยเป็น กรัมต่อ hypocotyl 8 ชิ้น
2. คำนวณหาปริมาณสารคล้ายไซโตไคนินจากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็น μg kinetin equivalent /g f. wt.
3. วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %, C.V., linear regression และ correlation

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยง hypocotyl สูตร Miller (1961)

สารเคมี	ความเข้มข้น (ส่วนต่อล้าน)
KH_2PO_4	300
KNO_3	1,000
NH_4NO_3	1,000
$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	0.35
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500
$MgSO_4.H_2O$	71.5
KCl	65.0
$MnSO_4.H_2O$	14.0
$(NH_4)_6.Mo_7O_2.4H_2O$	0.1
KI	0.75
$ZnSO_4.7H_2O$	3.8
H_3BO_3	1.6
Myoinositol	100
nicotinic acid	0.5
pyridoxine.HCl	0.2
Thiamine.HCl	0.2
Na_2EDTA	13.4
$FeSO_4.7H_2O$	9.9
Sucrose	30,000
Bacto agar	10,000
Naphthalene acetic acid	2.0
Kinetin	0.5

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University