ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวกที่ 1 การทำ microtome section (ดัดแปลงจากภูวดล, 2528)

1. การฆ่าและคงสภาพเนื้อเยื่อ (killing and fixing) นำชิ้นส่วนในข้อ 3.3.1 ที่ตัดหรือแยกแล้วไปแช่น้ำยาฆ่าและคงสภาพเซลล์คือ formalin-acetic acid alcohol (FAA) 95% โดยใช้

ethyl alcohol 95% (lab. grade)	50	มิลลิลิตร
glacial acetic acid (lab. grade)	5	มิลลิลิตร
formalin (lab. grade)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	35	มิลลิลิตร

ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้ว (vial) โดยใส่น้ำยาให้ท่วมชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืช

2. การดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ นำชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน FAA 95% เข้าเครื่องดูดอากาศ (suction pump) เพื่อดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อ และช่วยให้น้ำยาซึมเข้าไปทั่วถึง โดยใช้ vacuum ที่ 600 mg.Hg นาน 1 ชั่วโมง จนกว่าฟองอากาศจะออกหมด โดยสังเกตได้จากการที่เนื้อเยื่อจมลงก้นขวดและไม่มีฟองอากาศผุดขึ้นมา จากนั้นทิ้งไว้ในสภาพสูญญากาศ 24 ชั่วโมง
3. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) นำชิ้นส่วนพืชแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) และ ethyl alcohol ที่มีระดับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 5 ระดับคือ 50, 70, 85, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) แต่ละระดับใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 100% ให้ผสมสี erythrosin ลงไปเล็กน้อยเพื่อให้ชิ้นส่วนติดสีมองเห็นได้ชัดเจน

ตารางภาคผนวกที่ 1 ระดับความเข้มข้นของส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ในการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

Composition	Approximated total percentage of alcohol (%)				
	50	70	85	95	100
Distilled water (ml)	50	30	15	-	-
95% ethyl alcohol (ml)	40	50	50	45	-
tertiary butyl alcohol (ml)	10	20	85	55	75
100% ethyl alcohol (ml)	-	-	-	-	25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การแทนที่แอลกอฮอล์ (infiltration) แช่ชิ้นส่วนที่ดึงน้ำออกแล้วใน TBA 100% 3 ครั้งๆ ละ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในส่วนผสมของ TBA 100% กับ paraffin oil ในอัตราส่วน 1:1 นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายชิ้นส่วนของพืชลงในขวดแก้ว (vial) ที่มี paraffin oil เพียงอย่างเดียวนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอา paraplast แข็งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 60°ซ ทิ้งไว้ ประมาณ 12 ชั่วโมงจะได้

เป็น paraplast เหลว แล้วนำเนื้อเยื่อใส่ลงไปในขวดที่มี paraplast เหลว จากนั้นเก็บรักษาไว้ในตู้อบ ณ อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

5. การฝังเนื้อเยื่อ (embedding) นำเนื้อเยื่อมาฝังใน paraplast เหลว โดยหล่อเหมือนวัตถุในแม่พิมพ์ paraplast เหลวก็จะแข็งตัว และทำหน้าที่ยึด-ห่อหุ้มให้ชิ้นส่วนพืชสามารถรับคมมีดได้เต็มที่ และไม่ให้เนื้อเยื่อบางส่วนหลุดออกไปขณะที่ตัด วิธีการคือ พับกระดาษเป็นรูปพิมพ์ หรือที่อาจเรียกว่า กระทง (boat) นำกระทงมาวางบนโต๊ะที่มีความราบเรียบ ก่อนวางกระทงควรใช้กระดาษรองโต๊ะก่อน จากนั้นวางกระทงลงไป แล้วเท paraplast เหลวลงในกระทง ให้ระดับ paraplast เหลวต่ำกว่าขอบกระทงเล็กน้อย ใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน ไล่ฟองอากาศที่เกิดขึ้นใน paraplast เหลวให้หมดโดยเร็ว พอ paraplast เหลวแข็งตัวสูงขึ้นมาประมาณ 1 ใน 4 ของทั้งหมด หรือประมาณ 2 มิลลิเมตร รีบนำชิ้นส่วนพืชลงใน paraplast เหลว (กระทง) ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟไล่ฟองอากาศออกให้หมดอีกครั้ง และพร้อมกับการจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อในระนาบที่สามารถนำไปตัดได้ตามจุดประสงค์ ปล่อยให้ paraplast เหลวแข็งตัว หลังจากนั้นแกะกระดาษออก จะได้รูป paraplast เป็นเหลี่ยมข้างในเป็นเนื้อเยื่อ ก่อนนำไปตัดต้องนำแท่ง paraplast ที่ embedding ไปตกแต่งโดยให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าให้ตรงกลางเป็นชิ้นส่วนพืช โดยมี paraplast ล้อมรอบหนาเท่าๆ กันทุกด้าน หลังจากนั้นก็นำแท่ง paraplast ไปติดกับแท่งไม้ที่มีขนาด 1.5x1.5x1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยแท่งไม้นี้มีคุณสมบัติในการตัดแท่ง paraplast ด้านหนึ่ง และอีกด้านหนึ่งไว้สำหรับยึดติดกับตัวเครื่องพร้อมที่จะตัด
6. การตัดเนื้อเยื่อด้วย rotary microtome (Leitz Wetzlar ของบริษัท Scicrope Instrument Co. IA, U.S.A.) นำชิ้นส่วนพืชที่ฝังใน paraplast มาแต่งเป็นแท่งสี่เหลี่ยมเล็กๆ แล้วนำไปติดบนแท่นไม้ โดยใช้ paraplast เป็นตัวเชื่อม แล้วนำไปตัดด้วย rotary microtome ให้มีความหนาประมาณ 13 ไมครอน จะได้แถบ paraplast ribbon ที่มีชิ้นส่วนพืชติดอยู่
7. การนำแถบ paraplast ติดบนกระจกสไลด์ (affixation) ใช้ hapt's adhesive 2% โดยเตรียมจากไข่ขาว 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 98 มิลลิลิตร ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วหยดน้ำยา 1-2 หยด ทาบนกระจกสไลด์ โดยใช้พู่กันเกลี่ยบริเวณที่จะติดเนื้อเยื่อ นำแถบ paraplast ที่ตัดไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ปล่อยให้แห้ง วางทิ้งไว้ 3-4 วัน ก่อนทำการปิดสไลด์
8. นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีตามขั้นตอนต่อไปนี้ (แต่ละขั้นตอนจะแช่สไลด์นานประมาณ 3-5 นาที)

8.1) xylene
8.2) xylene + ethyl alcohol 100% อัตรา 1:1
8.3) ether + ethyl alcohol 100% อัตรา 1:1
8.4) ethyl alcohol 95%
8.9) ล้างด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง
8.10) ethyl alcohol 30%
8.11) ethyl alcohol 50%
8.12) ethyl alcohol 70%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8.5) ethyl alcohol 70%

8.6) ethyl alcohol 50%

8.7) ethyl alcohol 30%

8.8) สี hematoxylin นานประมาณ 3-10 นาที

8.13) ethyl alcohol 95%

8.14) ethyl alcohol 100%

8.15) xylene + ethyl alcohol 100% อัตรา 1:1

8.16) xylene

9. ปิดสไลด์ด้วย cover slip โดยใช้ Canada balsam หยดบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด นำแผ่น cover slip ปิดทับลงไปไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้จนแห้งสนิทประมาณ 1-2 วัน
10. นำสไลด์ที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยด้วยกล้อง photomicroscope (Olympus รุ่น PM-30, Olympus Optical Co.Ltd. Tokyo, Japan) ใช้ฟิล์มขนาด 35 มิลลิเมตร ในการถ่ายภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวกที่ 2 สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรตได้

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, Merck) ความเข้มข้น 0.1 normal เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์มา 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณน้ำตาล

- Carrez I เตรียมโดยชั่ง zinc acetate dihydrate, Merck มา 21.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมกรดอะซีติก (glacial) 3 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- Carrez II เตรียมโดยชั่งโปแตสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ มา 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- Fehling's solution No.1 เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$, Kanto) มา 69.278 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- Fehling's solution No.2 เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ มา 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมโปแตสเซียมทาร์เตรต ($NaH_4KC_4O_6.4H_2O$, Merck) (Rochell salt) 346 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- Fehling's solution No.1 และ Fehling's solution No.2 ต้องเตรียมแยกกันและเก็บใส่ขวดสีชา เมื่อต้องการใช้ให้ผสมสารละลายทั้งสองนี้ในปริมาตรเท่ากัน (1:1) ทันทีก่อนใช้

- สารละลายเมทธิลีนบลู เตรียมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งเมทธิลีนบลู (Merck) 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เตรียมความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck) 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผวนที่ 2 Invert Sugar Table for 10 ml. Fehling's Solution

ml. of sugar solution required	Solutions containing besides invert sugar:									
	No sucrose		1 g sucrose per 100 ml.		5 g sucrose per 100 ml.		10 g sucrose per 100 ml.		25 g sucrose per 100 ml.	
	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.
15	50.5	336	49.9	333	47.6	317	46.1	307	43.4	289
16	50.6	316	50.0	312	47.6	297	46.1	288	43.4	271
17	50.7	298	50.1	295	47.6	280	46.1	271	43.4	255
18	50.8	282	50.1	278	47.6	264	46.1	256	43.3	240
19	50.8	267	50.2	264	47.6	250	46.1	243	43.3	227
20	50.9	254.5	50.2	251.0	47.6	238.0	46.1	230.5	43.2	216
21	51.0	242.9	50.2	239.0	47.6	226.7	46.1	219.5	43.2	206
22	51.0	231.8	50.3	228.2	47.6	216.4	46.1	209.5	43.1	196
23	51.1	222.2	50.3	218.7	47.6	207.0	46.1	200.4	43.0	187
24	51.2	213.3	50.3	209.8	47.6	198.3	46.1	192.1	42.9	179
25	51.2	204.8	50.4	201.6	47.6	190.4	46.0	184.0	42.8	171
26	51.3	197.4	50.4	193.8	47.6	183.1	46.0	176.9	42.8	164
27	51.4	190.4	50.4	186.7	47.6	176.4	46.0	170.4	42.7	158
28	51.4	183.7	50.5	180.2	47.7	170.3	46.0	164.3	42.7	152
29	51.5	177.6	50.5	174.1	47.7	164.5	46.0	158.6	42.6	147
30	51.5	171.7	50.5	168.3	47.7	159.0	46.0	153.3	42.5	142
31	51.6	166.3	50.6	163.1	47.7	153.9	45.9	148.1	42.5	137

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผวนที่ 2 Invert Sugar Table for 10 ml. Fehling's Solution (ต่อ)

ml. of sugar solution required	Solutions containing besides invert sugar:									
	No sucrose		1 g sucrose per 100 ml.		5 g sucrose per 100 ml.		10 g sucrose per 100 ml.		25 g sucrose per 100 ml.	
	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.	Invert sugar factor*	mg. Invert sugar per 100 ml.
32	51.6	161.2	50.6	158.1	47.7	149.1	45.9	143.4	42.4	132
33	51.7	156.6	50.6	153.3	47.7	144.5	45.9	139.1	42.3	128
34	51.7	152.2	50.6	148.9	47.7	140.3	45.8	134.9	42.2	124
35	51.8	147.9	50.7	144.7	47.7	136.3	45.8	130.9	42.2	121
36	51.8	143.9	50.7	140.7	47.7	132.5	45.8	127.1	42.1	117
37	51.9	140.2	50.7	137.0	47.7	128.9	45.7	123.5	42.0	114
38	51.9	136.6	50.7	133.5	47.7	125.5	45.7	120.3	42.0	111
39	52.0	133.3	50.8	130.2	47.7	122.3	45.7	117.1	41.9	107
40	52.0	130.1	50.8	127.0	47.7	119.2	45.6	114.1	41.8	104
41	52.1	127.1	50.8	123.9	47.7	116.3	45.6	111.2	41.8	102
42	52.1	124.2	50.8	121.0	47.7	113.5	45.6	108.5	41.7	99
43	52.2	121.4	50.8	118.2	47.7	110.9	45.5	105.8	41.6	97
44	52.2	118.7	50.9	115.6	47.7	108.4	45.5	103.4	41.5	94
45	52.3	116.1	50.9	113.1	47.7	106.0	45.4	101.0	41.4	92
46	52.3	113.7	50.9	110.6	47.7	103.7	45.4	98.7	41.4	90
47	52.4	111.4	50.9	108.2	47.7	101.5	45.3	96.4	41.3	88
48	52.4	109.2	50.9	106.0	47.7	99.4	45.3	94.3	41.2	86
49	52.5	107.1	51.0	104.0	47.7	97.4	45.2	92.3	41.1	84
50	52.5	105.1	51.0	102.0	47.7	95.4	45.2	90.4	41.0	82

* mg. of invert sugar corresponding to 10 ml. of Fehling's solution.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณแอนโธไซยานิน

- กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.5 normal เตรียมโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 62.107 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

- เอทธาโนลิกไฮโดรคลอริก (เอทธานอล : ไฮโดรคลอริก) ใช้เอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก 1.5 normal ผสมกันในอัตราส่วน 85:15 แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิต่ำ (4^{o}ซ)

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณวิตามินซี

- กรดออกซาลิก (oxalic acid, Merck) กรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก มา 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenol indophenol, Merck) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล มา 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman No. 1 แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ (4^{o}ซ)

- กรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอร์บิก 0.05 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปิเปตสารละลายมา 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรตกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ แล้วบันทึกปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวเบญจมาศ อินทรส

วัน เดือน ปีเกิด 22 กรกฎาคม 2521

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

20 หมู่ 11 ตำบลบ้านแม อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ 50120

โทร 053-835650

ประวัติการศึกษา

วุฒิ	สถานศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนสันป่าตองวิทยาคม	2539
วท.บ.(เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved