



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

การวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่ใช่โครงสร้าง (total nonstructural carbohydrate; TNC)

การเตรียม reagent

1. Nelson's reagent A

เตรียมสารละลาย anhydrous sodium carbonate จำนวน 25 กรัม, sodium potassium tartrate จำนวน 25 กรัม, sodium bicarbonate จำนวน 20 กรัม และ anhydrous sodium sulfate จำนวน 200 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. Nelson's reagent B

เตรียมสารละลาย copper sulfate จำนวน 15 กรัม ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น จำนวน 2 หยด จนจนกระทั่งเกิดสี copper sulfate ละลายจนหมด

3. Nelson's alkaline copper reagent

นำ Nelson's reagent A จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Nelson's reagent B จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ผสมเขย่าให้เข้ากัน การใช้ Nelson's alkaline copper reagent แต่ละครั้ง ควรเตรียมใหม่เสมอ

4. Arsenomolybdic acid reagent

4.1 ละลาย ammonium molybdate $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ จำนวน 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น จำนวน 21 มิลลิลิตร

4.2 ละลาย disodium hydrogen arsenate $[\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ จำนวน 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

4.3 นำสารละลายจากข้อ 4.2 ผสมลงไปนในสารละลายในข้อ 4.1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาใช้สารละลายที่ได้ต้องเป็นสีเหลืองเท่านั้น

วิธีการสกัด

การสกัด TNC จากตัวอย่างพืช จะใช้สารละลายกรดเจือจาง (0.2 N H_2SO_4) ตามวิธีการของ Smith *et al.* (1964) ตัดแปลงโดย สุจริต (2531) โดยชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงใน hot air oven หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 0.1, 1 และ 2 N NaOH กับ 0.5 และ 5% H_2SO_4 แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตรเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน โดยใช้ปีเปตดูดสารละลาย D-glucose เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบขนาด 10 มิลลิลิตร รวม 10 หลอด เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิทยา, 2537)

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ใช้สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี ปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปแช่ water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยนำไปวางในน้ำเย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าอีกครั้งหนึ่ง (จะได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกน Y)

2. การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในตัวอย่าง

นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่ในหลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน นำค่า absorbance (A) ที่ได้ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้ว คำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

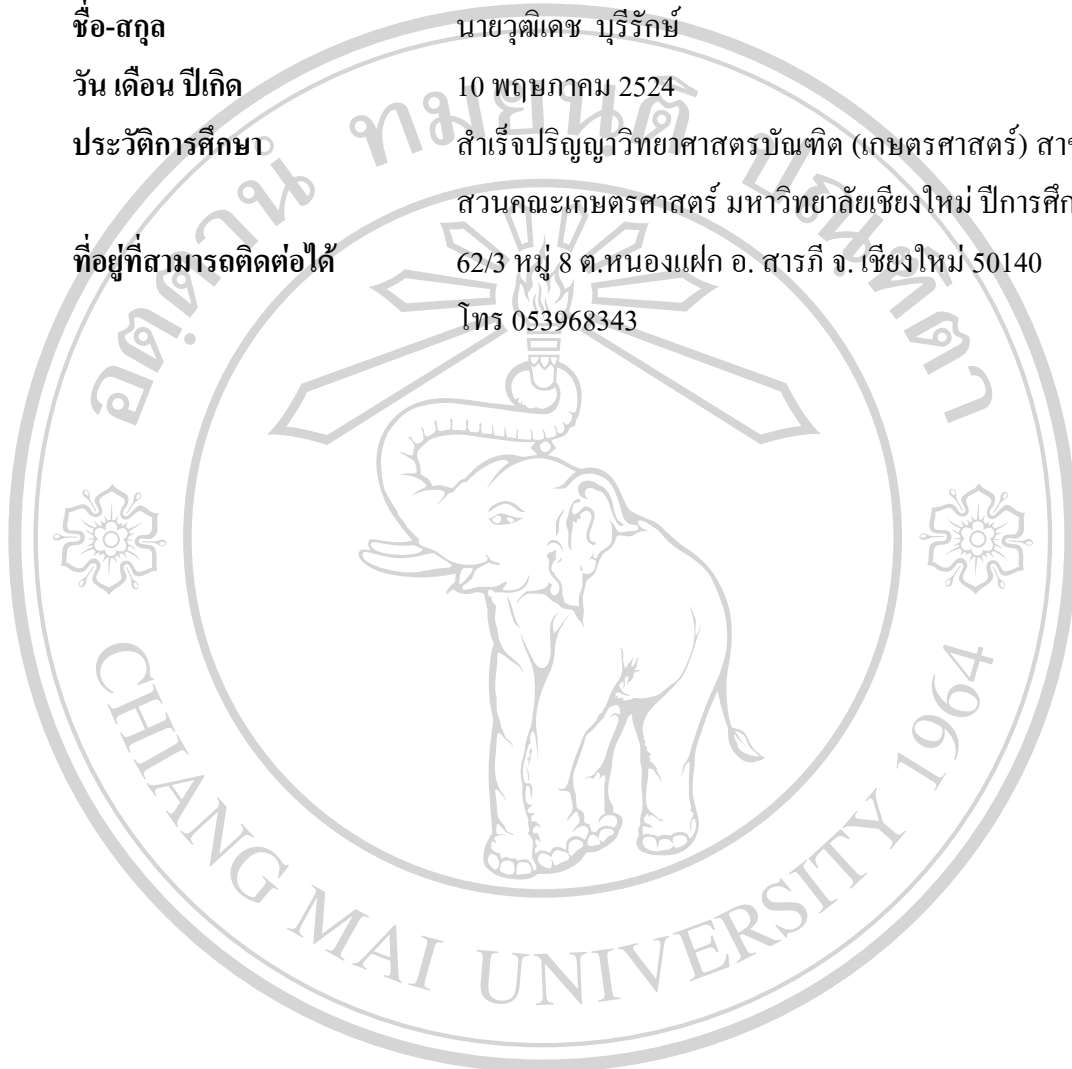
3. วิธีการคำนวณ

$$\text{TNC} = \frac{\text{mg glucose equivalent} \times \text{vol make}}{\text{wt. of sample} \times \text{vol take}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายวุฒิเดช บุรีรัมย์
 วัน เดือน ปีเกิด 10 พฤษภาคม 2524
 ประวัติการศึกษา สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545
 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 62/3 หมู่ 8 ต.หนองแฝก อ. สาทิง จ. เชียงใหม่ 50140
 โทร 053968343



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved