



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

การวิเคราะห์ตัวอย่างพืช

การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ได้อยู่ในรูปโครงสร้าง (Total Nonstructural Carbohydrate) (สุจริต, 2531)

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 คนจนกระทั่งเกลือ copper sulfate ละลายหมด

3. Nelson's alkaline copper reagent

ได้จากการนำ Nelson's reagent A จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Nelson's reagent B จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ผสมเข้าให้เข้ากัน การใช้ Nelson's alkaline copper reagent ในแต่ละครั้งควรเตรียมใหม่เสมอ

4. Arsenomolybdic acid reagent ประกอบด้วย

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 ผสมลงในสารละลายในข้อ 4.1 เข้าให้เข้ากัน แล้วเก็บไปไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาใช้สารละลายที่ได้ต้องเป็นสีเหลืองเท่านั้น

วิธีการสกัด total nonstructural carbohydrate (TNC) จากตัวอย่างพืช

ใช้วิธี acid extraction ตามวิธีของ Smith *et al.* (1964) อ้างโดยสุจริต (2531) ซึ่งมีวิธีการ คือนำตัวอย่างพืชอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง มาบดและร่อนผ่านตะแกรง 40

mesh เก็บไว้ในโถดูดความชื้น เมื่อต้องการนำมาใช้ เก็บตัวอย่างที่ได้ใส่ถุงกระดาษแล้วเก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป และก่อนที่จะนำตัวอย่างพืชที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ ให้นำตัวอย่างพืชไปอบอีกครั้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

การสกัด ชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิท และบดละเอียดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H₂SO₄ 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบทิ้งไว้เย็น (เขย่าด้วย Vortex Genie-2) กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH และ 50 % HCl แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บใส่ในขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ TNC ต่อไป

วิธีการวิเคราะห์ TNC (สุจริต, 2531)

การวิเคราะห์ TNC โดยวิธีของ Nelson's reducing procedure ตามวิธีของ Hodge and Hofreiter (1996) ที่ดัดแปลงโดย สุจริต (2531) ซึ่งใช้วิธีการเปรียบเทียบเป็นปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมของ D-glucose) ในการวิเคราะห์ใช้สารละลาย D-glucose (equivalent) ตั้งแต่ 0.00-0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent เขย่า และปิดด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์ นำไปวางไว้ในน้ำเคือคานาน 20 นาที จากนั้นนำไปวางไว้ในน้ำเย็นเมื่อหลอดทดลองเย็น ให้เติม arsenomolybolic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนละลาย แล้วเติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่า absorbance (%A) ที่ให้ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นนำมาทำกราฟมาตรฐาน

แล้วนำค่าที่วัดได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกน Y)

การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในตัวอย่างพืช

นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่หลอดทดสอบปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำตามขั้นตอนดังเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐาน นำค่า absorbance (A) ที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้ แล้วคำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

วิธีการคำนวณ

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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

นายกมล พงษ์เขียว

วันเดือนปีเกิด

14 กุมภาพันธ์ 2524

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสารภีพิทยาคม
จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541สำเร็จการศึกษาระดับประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง สาขาวิชาพืชศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง จังหวัดลำปาง ปีการศึกษา
2543สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์) สถาบัน
เทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตลำปาง จังหวัดลำปาง ปีการศึกษา 2545

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

84 หมู่ 12 ตำบลสันทราย อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ 50140

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved