บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 พืชทดลอง

ต้นมะม่วงพันธุ์มหาชนกอายุประมาณ 7-8 ปี ขนาดต้นกว้าง 2.5 เมตร และยาว 3.0 เมตร จำนวนทั้งหมด 20 ต้น (ภาพที่ 2) ที่มีการออกดอกและติดผลสม่ำเสมอใกล้เคียงกัน ของเกษตรกร ณ บ้านดงน้ำเย็น อำเภอแม่อาย จังหวัดเชียงใหม่

ภาพที่ 2 ต้นมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่ใช้ในการทดลอง

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น 1620 C ของบริษัท Precisa Instruments AG ประเทศสวิตเซอแลนด์

3.2.2 ตู้อบ ยี่ห้อ binder รุ่น F240 No. 88085 ของบริษัท Binder ประเทศเยอรมัน

3.2.3 เครื่องบดตัวอย่างพืช ยี่ห้อ KiKa-werke รุ่น MF 10 ของบริษัท KMBH & Co. KG 1 ประเทศเยอรมัน พร้อมตะแกรงร่อน ขนาด 35 เมช

3.2.4 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) รุ่น PB-11 ของบริษัท Sartorius

3.2.5 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (hand refractometer) รุ่น PAL-1 ของบริษัท ATAGO ประเทศญี่ปุ่น อ่านค่าได้ตั้งแต่ 0-52 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.6 วัดโดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (fruit hardiness tester) รุ่น FHR-1 ของบริษัท NIPPON OPTICAL WORKS ประเทศญี่ปุ่น ขนาด 1 กิโลกรัม หัววัดรูปทรงกระบอก (cylinder shape) เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

3.2.7 เครื่องวัดสี (chomameter) ของบริษัท Minolta รุ่น CR-300 ประเทศญี่ปุ่น หัววัด CR-310 เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร

3.2.8 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2001 ประเทศญี่ปุ่น

3.2.9 เครื่องเหวี่ยง ของบริษัท Hettich zentrifugen รุ่น D-78532 ประเทศสวิตเซอแลนด์

3.2.10 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.2.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

3.3 วิธีการทดลอง

ทำการศึกษาผลของสารคล้ายบราสซิน (บริษัทชัยวัฒน์ธน จำกัด , ประเทศไทย สารออกฤทธิ์ 0.4 %) ต่อการเจริญเติบโตทางกายภาพและชีวเคมีขอ งผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี และ 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 4 ต้น) จำนวนทั้งหมด 20 ต้น ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (Control)

กรรมวิธีที่ 2 ใช้สารคล้ายบราสซินที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm

กรรมวิธีที่ 3 ใช้สารคล้ายบราสซินที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ppm

กรรมวิธีที่ 4 ใช้สารคล้ายบราสซินที่ระดับความเข้มข้น 1.0 ppm

กรรมวิธีที่ 5 ใช้สารคล้ายบราสซินที่ระดับความเข้มข้น 1.5 ppm

โดยฉีดพ่นให้ทั่วทั้งต้นมะม่วงภายหลังจากดอกมะม่วงบานเต็มที่แล้ว 30 วัน (ภาพที่ 3) จากนั้นฉีดพ่นสารคล้ายบราสซินซ้ำทุก ๆ 14 วัน จำนวนทั้งหมด 6 ครั้ง จนกระทั่งเมื่อผลอายุ 135 วันหลังดอกบานเต็มที่ และทำการเก็บเกี่ยวผลมะม่วงจำนวน 4 ผลต่อต้น โดยสุ่มเก็บผลรอบต้น ทุกๆ 21 วัน จำนวนทั้งหมด 7 ครั้ง โดยการเก็บผลครั้งที่ 7 เมื่อผลอายุ 156 วันหลังดอกบานเต็มที่ ทำการเก็บผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก จำนวน 8 ผลต่อต้น โดยแบ่งนำไปเก็บข้อมูลทางกายภาพและทางเคมี พร้อมทำการวิเคราะห์ทันทีจำนวน 4 ผลต่อต้น และนำผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกจำนวน 4 ผลต่อซ้ำที่เหลือ นำไปบ่มโดยใช้กระดาษหนังสือพิมพ์คลุมและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกมีสีเหลืองและสุกงอมประมาณ 15-20 วันหลังเก็บเกี่ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 ลักษณะผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกเมื่ออายุ 30 วันหลังดอกบานเต็มที่ ซึ่งเป็นระยะที่ ฉีดพ่นสารคล้ายบราสซิน ครั้งที่ 1

3.4 การบันทึกผลการทดลอง

3.4.1 ลักษณะทางกายภาพของผล เริ่มทำการบันทึกลักษณะทางกายภาพ เมื่อผลอายุ 30 วันหลังดอกบานเต็มที่ และจนกระทั่ง 156 วันหลังดอกบานเต็มที่

การสุ่มตัวอย่าง : เก็บเกี่ยวผลมะม่วงจากทุกกรรมวิธี ต้นละ 4 ผลต่อซ้ำ รวมกรรมวิธีละ 16 ผล โดยสุ่มเก็บผลมะม่วงรอบต้น และบันทึกผลในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

3.4.1.1 ขนาดของผล ทำการวัดความกว้าง ความยาว และความหนาของผลมะม่วง หน่วยเป็นเซนติเมตร(ภาพที่4)

ภาพที่ 4 แสดงการวัดขนาดของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกทางด้าน ความกว้าง ความยาว และความหนา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.2 ขนาดของเอ็นโดคาร์บ ทำการวัดความกว้าง และความยาวของผลมะม่วง โดยใช้ digital vernier แสดงผลเป็นเซนติเมตร (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 5 แสดงการวัดขนาดของเอ็นโดคาร์บของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกทางด้านความกว้าง และความยาว

3.4.1.3 ขนาดของเมล็ด ทำการวัดความกว้าง ความยาว และความหนาของผลมะม่วง หน่วยเป็นเซนติเมตร (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 6 แสดงการวัดขนาดของเมล็ดของผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกทางด้าน ความกว้าง ความยาว และความหนา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.4 น้ำหนักผลสด ชั่งน้ำหนักผลแต่ละผล หน่วยเป็นกรัม

3.4.1.5 น้ำหนักแห้ง นำเนื้อมะม่วงที่ชั่งน้ำหนักสดแล้ว ใส่ถุงกระดาษ นำไปอบที่ตู้อบลมร้อน ที่ 70 องศาเซลเซียส นานจนกว่ามะม่วงจะแห้งสนิท จากนั้นนำมาใส่ชั่งน้ำหนักแห้งของผล หน่วยเป็นกรัม

คำนวณสูตรเพื่อหาปริมาณน้ำในเนื้อผลและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งในเนื้อผล ดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำของเนื้อผล} = \frac{(\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง})}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

$$\text{น้ำหนักแห้งในเนื้อผล} = \frac{\text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

3.4.1.6 สีเปลือกและสีเนื้อ

วัดสีเปลือกและสีเนื้อของผลที่มีอายุตั้งแต่ 30-156 วันหลังดอกบานเต็มที่ และเมื่อผลสุก ทำการวัดสีเปลือกด้านข้างผลทั้งสองด้านทุกผล คือ ด้านที่โดนแสงและไม่โดนแสง ซึ่งขณะเก็บผลมะม่วงให้ทำเครื่องหมายด้านที่โดนแสงไว้ แล้ววัดสีทั้งสองด้าน โดยใช้ เครื่องวัดสี (chomameter) รุ่น CR-300 หัววัด CR-310 เส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ของบริษัท Minolta โดยวัด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ หัว กลาง และท้ายผล วัดสีเนื้อทั้ง 2 ด้านทุกผลโดยเฉือนเปลือกแต่ละด้านของผลออกลึก 2 มิลลิเมตร แล้ววัดสีทั้งสองด้าน ค่าที่ได้จะแสดงในโครงสร้างของสี 3 มิติ ใน CIE 1976 L* a* b* Color Space โดยมีรายละเอียดดังนี้ (ภาพที่ 7)

L* = The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงค่าความสว่าง

- มีค่าความสว่างมากเมื่อเข้าใกล้ 100
- มีค่าความมืดเมื่อมีค่าเข้าใกล้ 0

a*, b* = The chromaticity coordinates (hue, chroma)

ค่า a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า chroma - มีค่าเข้าใกล้ 0 หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา)

- มีค่าเข้าใกล้ 60 หมายถึง วัตถุมีสีเข้ม

ค่า hue angle (h°) เป็นค่าที่แสดงสีแท้จริงของวัตถุในช่วงมุม 0-360 องศา

สามารถคำนวณจากสมการ ได้ดังนี้ (McGuire, 1992)

THETA = (arctangent (b*/a*)/6.2832*360)

ถ้า a > 0 และ b > 0; ค่า h° = THETA + 90

ถ้า a < 0 และ b > 0; ค่า h° = THETA + 180

ถ้า a < 0 และ b < 0; ค่า h° = THETA + 270

ถ้า a > 0 และ b < 0; ค่า h° = THETA + 360

ค่า h° เป็นค่าที่แสดงช่วงสีของวัตถุ คือ

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง

45-90 องศา แสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง

90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว

135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว

180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน

225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน

270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง

315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง

ภาพที่ 7 โครงสร้างของสี 3 มิติ ใน CIE 1976 L* a* b* Color Space

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.7 ความแน่นเนื้อ วัดโดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (fruit hardeness tester) รุ่น FHR-1 ของบริษัท NIPPON OPTICAL WORKS ขนาด 1 กิโลกรัม หัววัดรูปทรงกระบอก (cylinder shape) เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร วัดความแน่นเนื้อทั้งสองด้านของ มะม่วง โดยเฉือนเปลือกออกลึก 2 มิลลิเมตรของแต่ละด้าน มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

3.4.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

3.4.2.1 ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solids, TSS)

โดยคั้นน้ำจากเนื้อผลหยดลงบน เครื่องวัด digital refractometer รุ่น PAL-1 อ่านค่า TSS ที่ได้ซึ่งมีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

3.4.2.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable Acidity, TA)

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 N โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

นำน้ำมะม่วงมา 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดและเป็นด่าง จนสารละลายมีความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 8.2 แล้วจึงคำนวณหาปริมาณ TA ในรูปของกรดซิตริก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N) x ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (ml) x 0.064 x 100}}{\text{ปริมาตรน้ำคั้นมะม่วง 20 (ml)}}$$

หมายเหตุ : * milliequivalent weight of citric acid (anhydrous) = 0.064

3.4.2.3 อัตราส่วนระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ต่อปริมาณกรดที่ไทเทรต (Total Soluble Solids : Titratable Acidity, TSS : TA) โดยนำผลลัพธ์ ข้อ 3.4.2.1 หารด้วยผลลัพธ์ ข้อ 3.4.2.2

3.4.2.4 วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ในเปลือก โดยดัดแปลงจากวิธีของ Witham *et al*. (1986) โดยใช้เปลือกผลหั่นละเอียด 1 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่เติม acetone 15 มิลลิลิตร แช่ไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำสารที่กรองได้ทั้งหมดมาปรับปริมาตรด้วย acetone ให้ได้ 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร โดยใช้ acetone เป็น blank นำค่า absorbance ที่วัดได้ไปแทนค่าในสูตร หาปริมาณคลอโรฟิลล์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด บันทึกค่าที่ได้แล้วนำมาคำนวณหา ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ

$$= [(12.7 \times \text{absorbance at } 663) - (2.69 \text{ absorbance at } 645)] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี

$$= [(22.9 \text{ absorbance at } 645) - (4.68 \text{ absorbance at } 663)] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด

$$= [(20.2 \text{ absorbance at } 645) + (8.02 \text{ absorbance at } 663)] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

โดยที่ V คือ ปริมาณอะซิโตนที่ใช้ (25 มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักเปลือกมะม่วง (1 กรัม)

3.4.2.5 วิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานิน (total anthocyanin content) ในเปลือก (นิศากร, 2548)

- เตรียมกรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 1.5 นอร์มอล เตรียมโดยการใช้กรดไฮโดรคลอลิก (HCl) ปริมาตร 62.63 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

- เตรียมเอทาโนลิกไฮโดรคลอลิก (เอทธานอล : กรดไฮโดรคลอลิก) เตรียมโดยนำเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และกรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 1.5 N ผสมกันในอัตราส่วน 85:15 แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ (10 องศาเซลเซียส)

- นำผิวผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก บริเวณที่มีสีแดงหนัก 0.25 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในสารละลายเอทาโนลิกไฮโดรคลอลิกปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันสักครู่ ปิดฝาด้วย aluminum foil แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมากรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมาปรับปริมาตรด้วยสารละลายเอทาโนลิกไฮโดรคลอลิก ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายเอทาโนลิกไฮโดรคลอลิกเป็นตัวปรับศูนย์ (blank) บันทึกค่าที่ได้ แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมด ดังนี้

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{Absorbance at 535 nm} \times V \times 100}{W}$$

$$\text{Total anthocyanin content (mg/100 g fresh weight)} = \frac{\text{Total absorbance}}{98.2}$$

โดยที่ V คือ ปริมาตรของสารละลายที่นำมาหาปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิลิตร)

W คือ น้ำหนักของผิวผลมะม่วงพันธุ์มหาชนกที่นำมาหาปริมาณแอนโทไซยานิน (กรัม)

3.4.2.6 วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม (total carotenoid) ในเปลือกโดยใช้วิธีการ ของ Pawelzik (2006) โดยทำการชั่งเปลือกมะม่วงที่สับละเอียด 1 กรัม แช่ตัวอย่างเปลือกมะม่วงในสารไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนตัวอย่างพืชด้วยความเร็วและแรงนาน 2 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดนาน 16 ชั่วโมง กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 หลังจากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 665, 649 และ 480 นาโนเมตร แล้วนำค่า absorbance ที่ได้ไปแทนค่าในสูตร เพื่อหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักตัวอย่างสด สูตรที่ใช้คำนวณมีดังนี้

Chlorophyll a = [(12.19 x Absorbance at 665 nm)] - [(3.45 x Absorbance at 649 nm)] µg/g FW

Chlorophyll b = [(21.99 x Absorbance at 649 nm)] - [(5.32 x Absorbance at 665 nm)] µg/g FW

Total Chlorophyll = Chlorophyll a + b

$$\text{Total carotenoid} = \frac{(1{,}000 \times \text{Absorbance at 480 nm}) - (2.14 \times \text{Chlorophyll a}) - (70.16 \times \text{Chlorophyll a})}{220}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.2.7 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง ในเนื้อผล (Total Nonstructural Carbohydrate , TNC)

ก. เตรียม Nelson's reagent A โดยละลาย

- anhydrous Na_2CO_3	25	กรัม
- sodium potassium tartrate	25	กรัม
- $NaHCO_3$	20	กรัม
- anhydrous Na_2SO_4	200	กรัม

ลงในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

ข. เตรียม Nelson's reagent B โดยละลาย

- copper sulphate ($CuSO_4 5H_2O$)	15	กรัม
- เติม sulfuric acid เข้มข้น (H_2SO_4 Conc.)	2	หยด

ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มิลลิลิตร

ค. เตรียม Nelson's alkaline copper reagent โดยผสม

- Nelson's reagent A	20	มิลลิลิตร
- Nelson's reagent B	0.8	มิลลิลิตร

ให้เข้ากัน (เตรียมแล้วต้องใช้ทันที)

ง. เตรียม arsenomolybdic acid reagent โดย

- ละลาย ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}4H_2O$) 25 กรัม ใน น้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วเติม sulfuric acid เข้มข้น (H_2SO_4 Conc.) 21 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น
- ละลาย disodium hydrogen arsenate ($Na_2Has\ 7H_2O$) 3 กรัม ใน น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร
- นำสารละลายทั้งสองผสมและเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในขวดสีชา วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ก่อนนำมาใช้สารละลายที่ได้ต้องมีสีเหลืองเท่านั้น

นำเนื้อมะม่วงอบจนแห้งสนิท ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ใช้เวลาอย่างน้อย 72 ชั่วโมง) และบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 35 เมช เก็บตัวอย่างแห้งที่ร่อนแล้วใส่ถุงกระดาษ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป และก่อนทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพืช ให้นำตัวอย่างแห้งที่เตรียมไว้ไปอบอีกครั้งหนึ่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นก่อน หลังจากนั้นจึงนำมาชั่งเพื่อวิเคราะห์หา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณ TNC ซึ่งทำการวิเคราะห์ในรูปของ TNC โดยใช้วิธีการสกัดของ Smith *et al.* (1964) และหาปริมาณ TNC โดยใช้วิธีการของ Nelson's reducing sugar procedure (A.O.A.C., 1984)

การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในเนื้อผลมะม่วง โดยชั่งเนื้อผลมะม่วงที่อบแห้งสนิทและบดแล้ว 0.05 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำออกจากตู้อบตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (เขย่าด้วย Vortex Genie-2) ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH ปริมาตร 0.1, 1, 3, 5, 7 และ 10 N และ 50 เปอร์เซ็นต์ HCl โดยใช้ magenic stirrer แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 ใส่ขวดพลาสติกปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ TNC ต่อไป ตามวิธีการของ Nelson' s reducing sugar (Hodge and Hofrreiter, 1962)

เตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคสโดย ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส (ดี -กลูโคส 0.1 กรัมในน้ำกลั่น100 มิลลิลิตร) 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นของแต่ละหลอดเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อดี-กลูโคสต่อมิลลิลิตร ทำ blank โดยการดูดน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Nelson' s alkaline copper reagent ลงในหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันแล้วปิดฝาด้วยแผ่นอลูมิเนียม นำไปวางในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็น เมื่อหลอดเย็นแล้วเติมน้ำยา arsenomolybdic acid reagent ลงไปในหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอน Cu_2O ละลายจนหมด แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 7 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายไปอ่านค่า absorbance (A) ด้วย spectrophotometer ที่ wavlength 540 นาโนเมตร โดยปรับค่า absorbance ของ blank ให้เท่ากับ 0 แล้ววัดค่า absorbance ของ standard glucose สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกน X)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ทำโดยดูดสารละลายผ่านการสกัดหลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นจึงทำตามวิธีการขั้นตอนของ Nelson's reducing sugar (Hodge and Hofrreiter, 1962) เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส นำค่า absorbance ของตัวอย่าง (sample) ที่วัดได้ เปรียบเทียบกับค่าของ D-glucose จาก standard curve ที่สร้างขึ้น โดยผลการทดลองที่ได้ แสดงหน่วยเป็นมิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

มีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{T NC} = \frac{\text{(mg glucose equivalent) x (volume make)}}{\text{weight of sample x volume take}} \text{ mg D-glucose/g dry weight}$$

3.4.2.8 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar, TS) ในเนื้อผล ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Dubois *et al*. (1956) ดูดสารละลายที่สกัดได้จากการวิเคราะห์ปริมาณ TNC ตามข้อ 3.4.2.7 1 มิลลิลิตร ใส่ 0.1 N HCl 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำเย็น เติม 0.1 NaOH 0.5 มิลลิลิตร ดูดสารผสมนั้น 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธีการของ Nelson's reducing sugar (Hodge and Hofrreiter, 1962)

3.4.2.9 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (Reducing Sugar, RS) ในเนื้อผล ดัดแปลงวิธีของ Khalafalla และ PalzKill (1990) นำตัวอย่างแห้งบดละเอียดจากข้อ 3.4.2.7 ชั่งน้ำหนัก 0.05 กรัม เติม ethanol 50 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 20 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เขย่าด้วยขวดรูปชมพู่ทุกๆ 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายสกัดนี้ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล RS ด้วยวิธีการของ Nelson's reducing sugar (Hodge and Hofrreiter, 1962)

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

1. สวนมะม่วงพันธุ์มหาชนกของ คุณสมศักดิ์ ดวงดี อำเภอท่าตอน จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการสาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.6 ระยะเวลาที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 และสิ้นสุดการศึกษาในเดือนตุลาคม 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved