บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

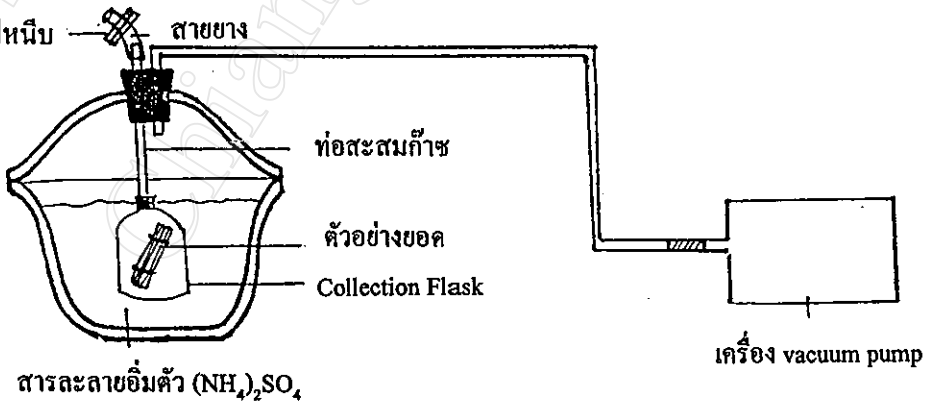
1. การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอทธิลีนในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี ทำ 9 ซ้ำ โดยกรรมวิธีคือจำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 8 , 6 , 4 และ 2 สัปดาห์โดยตัดยอดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.2-0.4 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 15 เซนติเมตร เป็นหนึ่งหน่วยการทดลอง

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้ว ริดใบทิ้งให้หมดใส่ในถุงพลาสติกแล้วเก็บในกระติกน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการพืชสวนทันทีเพื่อทำการดูดก๊าซออกจากยอด

2. การเตรียมตัวอย่าง และดูดก๊าซออกจากยอดตัวอย่าง นำยอดตัวอย่างมาตัดให้มีความยาว 10 เซนติเมตร จากนั้นใช้ยางมัดรวมกันแล้วนำไปดูดก๊าซออกจากยอดตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Saltveit (1982) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 อุปกรณ์ และวิธีการดูดก๊าซออกจากตัวอย่างพืช (Saltveit,1982)

2.1 ใช้ desiccator ขนาด 10 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น collection flask ที่มีท่อต่อติดกับฝาของ desiccator ท่อนี้มีสายยางต่ออยู่ด้านบน เพื่อใช้สำหรับเป็นที่ดูดก๊าซที่สกัดได้จากยอด เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง gas chromatograph (GC)

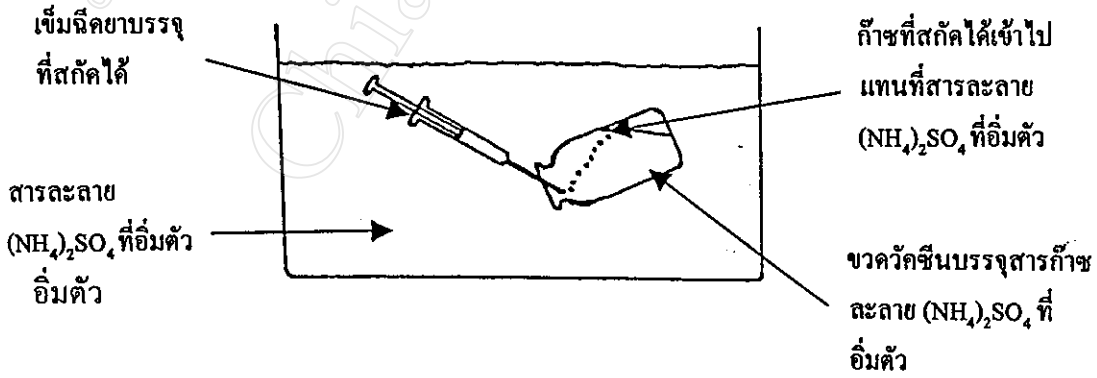
2.2 เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่อิ่มตัว โดยให้ห่างจากขอบลงไปประมาณ 1 นิ้ว (โดยสารละลายจะท่วม collection flask) แล้วใช้สายยางต่อเข้ากับท่อที่ดูดอากาศออกจาก desiccator ไปยังเครื่อง vacuum

2.3 ก่อนทำการดูดก๊าซออกจากตัวอย่าง ต้องใส่ตัวอย่างพืชลงไปใน collection flask ค่อยๆ ปิดฝา desciccator แล้วใช้ลูกยางดูดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตให้ไหลขึ้นมาตามท่อสะสมก๊าซด้านบนให้เพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วใช้คลิพป์หนีบบริเวณสายยางที่ต่อกับท่อสะสมก๊าซด้านบนให้แน่น

2.4 จากนั้นใช้กระดาษกาว (masking tape) ปิดรอบบริเวณฝา desiccator เพื่อกันไม่ให้อากาศรั่วเข้าไปใน desiccator

2.5 เริ่มดูดก๊าซออกจากยอดโดยเปิดเครื่อง vacuum ใช้แรงดูดประมาณ 600 มิลลิเมตรปรอท ก๊าซภายในยอดถูกดูดออกมาเห็นเป็นฟอง และลอยขึ้นไปสะสมอยู่บริเวณด้านบนของท่อสะสมก๊าซ (จับเวลาประมาณ 2 นาที)

2.6 ปิดเครื่อง vacuum จากนั้นใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ปักลงตรงสายยางที่ต่อกับท่อสะสมก๊าซ แล้วดูดเอาก๊าซที่ได้ทั้งหมดนำไปฉีดเก็บไว้ในขวดวัดซีนขนาด 3 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการแทนที่สารละลาย ($NH_4)_2SO_4$ (ภาพที่ 7)



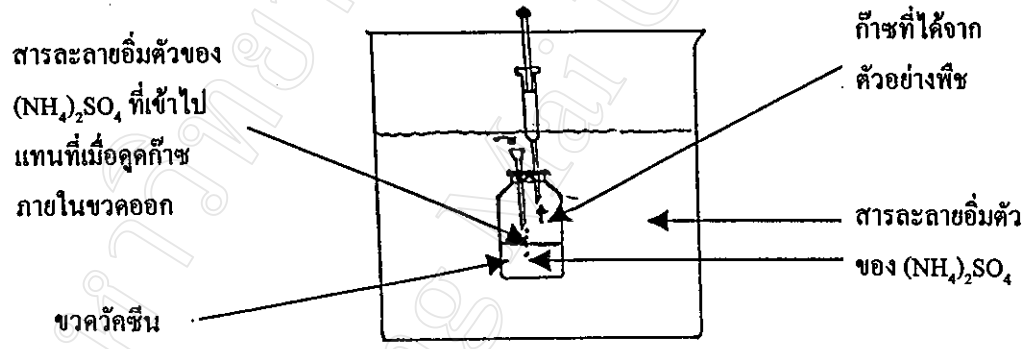
ภาพที่ 7 วิธีการเก็บก๊าซที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยการแทนที่สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว

2.7 ปิดฝาขวดวัดซีนด้วยจุกยาง และผนึกรอบบริเวณฝาจุกยางกับปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยคว่ำขวดวัดซีนลง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทธิลีนต่อไป

3. การวิเคราะห์ปริมาณเอทธิลีน

3.1 การทำกราฟมาตรฐาน โดยการเตรียมก๊าซเอทธิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 สตล โดยการเตรียมจาก stock ที่มีความเข้มข้น 100 สตล ซึ่งเตรียมจากก๊าซเอทธิลีนมาตรฐาน 99.5% ใน aerosol containers , filling pressure 8 kg/cm^3 , content 5 L (บริษัท เอส ที อี จำกัด , กรุงเทพฯ , ประเทศไทย)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทธิลีนในตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างก๊าซที่ได้จากข้อ 2.7 มาดูดเอาก๊าซออกโดยวิธีการแทนที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 วิธีการดูดก๊าซออกจากขวดโดยการแทนที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว

3.2.1. คว่ำขวดวัดซีนลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว และหงายด้านที่มีฝาจุกยางขึ้น โดยต้องระวังไม่ให้ขวดวัดซีนโผล่พ้นสารละลาย

3.2.2. ใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ปักลงบนฝาจุกยาง แล้วใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20 ปักลงบนจุกยางสำหรับใช้เป็นทางให้สารละลายจากนอกขวดไหลเข้าไปแทนที่ก๊าซที่ดูดออกไป

3.2.3. ดูดเอาก๊าซออกมาจากขวดวัดซีนปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง gas chromatograph (GC)

การฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง gas chromatograph (GC) โดยฉีดเข้าไปตรง injector port unit ของเครื่อง GC ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น GC–9A (Shimadzu , Japan) ซึ่งตรวจวัดเอทธิลีนโดยใช้

H_2- Flame ionization detector และใช้ column stainless steel ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 1.5 เมตร ซึ่งบรรจุ activated alumina 80/100 โดยใช้อุณหภูมิ injector, detector และ column 90 , 90 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4. การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกพื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph และนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณความเข้มข้นของเอทธิลีนมีหน่วยเป็น สตล ต่อ 1 ยอด ของพืชตัวอย่าง

ตัวอย่างการคำนวณ

สมมติอ่านค่าใต้กราฟได้เท่ากับ 9,803 ตารางมิลลิเมตร

กราฟมาตรฐานมีเส้นตรง คือ Y = -0.02715 + 0.00002397 (X)

โดย Y คือ ความเข้มข้นของเอทธิลีน

X คือ พื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph (ตารางมิลลิเมตร)

แทนค่า Y = -0.02715 + 0.00002397 (9803)

Y = 0.2078

แสดงว่าตัวอย่างก๊าซเอทธิลีนมีความเข้มข้น 0.2078 สตล

5. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analysis software โดยทำการเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของเอทธิลีนในยอดตัวอย่างโดยวิเคราะห์ต่อ 1 ยอด ทำการ test of AOV assumption , AOV , LSD , C.V. , linear regression และ correlation

การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทธิลีนในพืชทดลอง 3 ชนิด มีรายละเอียดของการเก็บตัวอย่างและจำนวนยอดที่เหมาะสมดังนี้

ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ ยอดลิ้นจี่ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 25 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 25 กรัม

เริ่มเก็บวันที่ 16 ตุลาคม 2542 และเก็บทุกๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 27 พฤศจิกายน 2542

ลำไยพันธุ์ดอ

โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ ยอดลำไยยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 10 กรัม

เริ่มเก็บวันที่ 22 สิงหาคม 2542 และเก็บทุกๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 3 ตุลาคม 2542

มะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลอง คือ ยอดมะปรางยาว 25 เซนติเมตร จำนวน 25 ยอด น้ำหนักสดรวมประมาณ 25 กรัม

เริ่มเก็บวันที่ 17 มิถุนายน 2543 และเก็บทุกๆ 14 วัน เก็บตัวอย่างวันสุดท้ายวันที่ 29 กรกฎาคม 2543

2. การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างในช่วงก่อนการแตกใบอ่อน

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 4 กรรมวิธี ทำ 15 ซ้ำ โดยกรรมวิธี คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 8 , 6 , 4 และ 2 สัปดาห์

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง ตัดยอดให้มีความยาว 10 เซนติเมตร จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นและผึ่งให้แห้ง แล้วนำเข้าตู้อบที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่อง Wiley intermediate mill (Artur. H. Thomas Co., Philadelphia, U.S.A) ผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh นำตัวอย่างที่ได้เก็บใส่ในถุงกระดาษ เก็บไว้ที่แห้ง และเย็นเพื่อนำไปสกัดต่อไป (Chaitrakulsup , 1981)

2. การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง โดยการทำตามวิธีของ AOAC (1984) จากนั้นใส่ลงใน moisture dish (ที่รู้น้ำหนักแล้ว) แล้วเปิดฝา moisture dish และอบที่อุณหภูมิ 135 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิดฝาแล้วนำออกจากตู้อบแล้วย้ายออกมาเก็บในโถ desiccator ทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมง และนำออกมาชั่งน้ำหนัก โดยคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\% \text{ ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งและ moisture dish ก่อนอบ} - \text{หลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างสด และ moisture dish ก่อนอบ}} \times 100$$

ตัวอย่าง การหาความชื้นในตัวอย่างหนัก 1.0007 กรัม และน้ำหนักของ moisture dish พร้อมฝาหนัก 36.9267 กรัม ดังนั้นน้ำหนักของ moisture รวมกับน้ำหนักของตัวอย่างเท่ากับ 37.9271 กรัม และหลังจากที่เข้าตู้อบแล้วอบแล้วน้ำหนักของ moisture เท่ากับ 37.8523 กรัม ดังนั้นคำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{ ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{(37.8523 - 37.9271)}{37.8523} \times 100$$

$$= 0.1976 \text{ กรัม}$$

(และถ้าใช้ตัวอย่างในการสกัด 100 กรัม) มี % ความชื้นในตัวอย่าง $= \frac{0.1976 \times 0.4020}{100}$

$$= 0.0007944 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นตัวอย่างจึงมีน้ำหนักแห้ง $= 0.4020 - 0.0007944$

$$= 0.4012 \text{ กรัม}$$

3. การสกัดตัวอย่าง ทำการสกัดตามแบบของ Chaitrakulsup (1981) โดยการชั่งน้ำหนักของตัวอย่างขึ้นอยู่กับชนิดพืชทดลอง แล้วใส่ลงไปใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติม H_2SO_4 ปิดฝาขวดโดยใช้ aluminum foil อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 6N NaOH โดยใช้กระดาษลิตมัสซึ่งเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำส่วนที่กรองได้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar (RS) โดยการใช้ Shaffer – Somogyi Copper Iodometric Titration (AOAC,1984)

4.1 การเตรียมสารละลายที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณ RS

4.1.1 สารละลาย Shaffer – Somogyi carbonate 50 reagent , KI 5 กรัม

ละลาย sodium carbonate และ potasssium tartrate อย่างละ 25 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ (ความเข้มข้น 100 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) นำมา 75 มิลลิลิตร โดยการผ่านกรวยโดยให้ปลายกรวยอยู่ใต้ผิวของสารละลาย เติม $NaHCO_3$ 20 กรัม ทำให้ละลาย และเติม KI 5 กรัม แล้วเทสารละลายทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.1N KIO_3 (ซึ่งมีความเข้มข้น 3.567 กรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร) 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร กรองทิ้งไว้หนึ่งคืนก่อนนำไปใช้

4.1.2 สารละลาย Iodide – oxalate

ละลาย KI และ $K_2C_2O_4$ อย่างละ 2.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (ทั้งนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์)

4.1.3 สารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.005N (ต้องเตรียมทุกวัน) จาก stock solution 0.1N sodium thiosulfate

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.1N sodium thiosulfate

ละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ ต้มให้เดือดนานเป็นเวลา 5 นาที และเทใส่ขวดในขณะที่ยังร้อนล้างขวดด้วยน้ำร้อนที่ต้มเดือดแล้ว เมื่อได้สารละลายเรียบร้อยแล้วให้เก็บไว้ในที่มืด และเย็น ไม่ควรนำสารละลายที่เทออกมาแล้วเทกลับลงคืนเข้าไปในขวด เพราะฉะนั้นหากต้องการใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.1N ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกวันโดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มมาแล้ว เนื่องจากสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำสลายตัวได้จึงควรเตรียมเฉพาะงานที่ทดลอง

4.2 การ standardization สารละลาย sodium thiosulfate

อบสาร $K_2Cr_2O_7$ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาชั่ง 0.20 – 0.23 กรัม โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด และนำมาใส่ในขวดสีชาหรือขวดที่หุ้มด้วย aluminum foil (g-sI flask) เติมสารละลาย KI (ความเข้มข้น 2 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติม1N HCl 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำไปไตเตรตกับสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมไว้ด้วยเครื่องไตเตรตอัตโนมัติ (automatic titration) ยี่ห้อ SCHOTT GERATE T90 รุ่น TR 151 Germany

การคำนวณ Normality ของสารละลาย sodium thiosulfate จากสูตร

$$\text{Normality} = gK_2Cr_2O_7 \times 1{,}000 / mlNa_2S_2O_3 \times 49.032$$

5. การทำกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25-2.25 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ตามแบบของ (AOAC, 1984)

โดยทำการดูดสารละลายตัวอย่างที่คาดว่ามี reducing property เท่ากับกลูโคส 0.25–2.25 มิลลิกรัม ใน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีขนาด 25 × 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Shaffer – Somogyi carbonate 50 reagent 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ reagent 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองด้วย aluminum foil

และนำสารละลายตัวอย่างกับ blank ไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที แล้วค่อยๆ ยกออกมาอย่าให้กระเทือน นำไปวางในน้ำเย็นที่ 0 องศาเซลเซียส ที่ไหลเวียนนาน 4 นาที เปิด aluminum foil เทสารละลาย iodide oxalate ลงข้างๆ หลอดอย่างช้าๆ หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม $2NH_2SO_4$ หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้ CuO_2 ละลาย แล้วนำไปแช่น้ำเย็นที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (เขย่า 2 ครั้งในขณะที่ทำให้เย็น) จากนั้นนำไปไตเตรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N $Na_2S_2O_3$ นำปริมาตรที่ได้จากการไตเตรตลบกับ blank แล้วคำนวณหาปริมาณกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกปริมาณ sodium thiosulfate ที่ใช้ในการไตเตรตกับสารละลายตัวอย่างมีหน่วยเป็นมิลลิลิตร แล้วเทียบหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณ TNC มีหน่วยเป็น mg glucose equivalent / gram dry weight

8. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ใช้โปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH Analysis software โดยวิเคราะห์ test of assumption , analysis of variance , LSD , C.V. , linear regression และ correlation

การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (TNC) ในพืชทดลอง 3 ชนิด มีรายละเอียดจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างดังนี้

ลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย ในการสกัดตัวอย่างชั่งยอดลิ้นจี่ที่บดแล้ว 0.6 กรัม

ลำไยพันธุ์ดอ ในการสกัดตัวอย่างชั่งยอดลำไยที่บดแล้ว 0.4 กรัม

มะปรางพันธุ์ทูลเกล้า ในการสกัดตัวอย่างชั่งยอดมะปรางที่บดแล้ว 0.25 กรัม

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. สวนวังน้ำค้าง อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่
2. สวนลำไยสถาบันแมคเคนเพื่อการฟื้นฟูสภาพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
3. สวนลิ้นจี่กรมพัฒนาที่ดินเขต 6 อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่

4. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5. ห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6. ห้องปฏิบัติการภาควิชาดิน และปุ๋ย คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ระหว่างเดือน สิงหาคม 2542 – เดือนธันวาคม 2543

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University