



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

## ภาคผนวก 1

การวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol-sulphuric method ของ Dubois *et al.* (1956)

## วิธีการทดลอง

สุ่มพืชจากการทดลองที่ ในระยะการเจริญเติบโตต่างกันจำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี  
 ระยะที่ 1 ต้นเอื้องดินใบหมากที่มีความสูง 20 ซม (อายุประมาณ 2 เดือน)  
 ระยะที่ 2 ต้นเอื้องดินใบหมากที่มีความสูง 40 ซม (อายุประมาณ 3 เดือน)  
 ระยะที่ 3 ต้นเอื้องดินใบหมากที่อยู่ในระยะดอกแรกบาน (อายุประมาณ 5 เดือน)  
 ระยะที่ 4 ต้นเอื้องดินใบหมากที่อยู่ในระยะดอกบานหมดทั้งช่อ (อายุประมาณ 7-8 เดือน)  
 นำพืชที่สุ่มได้มาแยกส่วนต่างๆ คือ ลำต้นและใบ หัว ดอกล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น  
 จำนวน 2 ครั้ง ซับให้แห้งก่อนนำมาวิเคราะห์สารต่างๆตามวิธีการดังนี้

## การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล

ชั่งตัวอย่างสด 4 ก สกัดด้วย ethyl alcohol 80 % นำไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่อง  
 หมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายใส่ลงในขวดปรับ  
 ปริมาตรขนาด 50 มล ล้างตะกอนด้วย ethyl alcohol 80% 2 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล  
 ด้วย 80 % ethyl alcohol สารสกัดส่วนนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล กากที่เหลือนำไปอบแห้งเพื่อใช้  
 วิเคราะห์แป้ง

การวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol-sulphuric method ของ Dubois *et al.* (1956)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานจากน้ำตาลเดกโตสที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.04 และ 0.08 ก/ 100 มล
2. เตรียมสารละลายฟีนอล 5 %
3. คูดสารสกัดจากข้อ จำนวน 100 ไมโครล ใส่ในหลอดแก้ว
4. เติมน้ำกลั่น 1 มล
5. เติมฟีนอล 5% 1 มล
6. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มล
7. นำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่องปั่น (vertex)

8. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วเขย่าอีกครั้ง จากนั้นนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีเพื่อลดอุณหภูมิลง
9. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร
10. ในแต่ละตัวอย่างต้องทำ blank โดยการดูดสารละลายตัวอย่าง 100 มกม (เท่ากับ ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มล แล้วทำตามตั้งแต่ขั้นตอนที่ 6
11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของตัวอย่างมาลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank ของแต่ละตัวอย่าง (ถ้าใกล้เคียง 0 มากสามารถตัดทิ้งได้) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วแทนค่าลงในสูตรการหาความเข้มข้นของน้ำตาล

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล} = \frac{X \times D \times F}{FW} \text{ ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักสด}$$

X = ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

D = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย ethyl alcohol 80 % ( 50 มล)

FW = น้ำหนักที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย ethyl alcohol 80 % ( 4 ก)

## ภาคผนวก 2

### วิธีการวิเคราะห์แป้ง โดยวิธี Anthrone ของ JSPN (1990)

#### การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์แป้ง

ซึ่งกากอบแห้งที่ได้จากข้อ 0.25 ก ใ้ลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาดใหญ่ เติมน้ำกลั่น 1.25 มล นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ยกออกมา เติมกรดเปอร์คลอริก 8.14 N ปริมาตร 1.62 มล ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่ว นาน 5 นาที จากนั้นคนเป็นครั้ง คราว นาน 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มล นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล ระวังอย่าให้ตะกอนลงไป ตะกอนที่เหลือให้ทำซ้ำในขั้นตอนตั้งแต่เติมกรดเปอร์คลอริกอีกครั้ง นำสารสกัดที่สกัดได้ไปปรับ ปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 มล จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองและเก็บใน ขวดพลาสติก

### การวิเคราะห์แ่ง โดยวิธี Anthrone ของ JSPN (1990)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 0, 10 และ 20 สดล
2. เจือจางสารสกัดในข้อ ปริมาตร 50 เท่า
3. นำสารละลายที่เจือจางได้มา 2.5 มล ใส่ในหลอดเซนต์ปีวีสที่ตั้งไว้ใน  
กล่องน้ำแข็ง
4. เติมสารละลาย anthrone 5 มล
5. ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น แล้วรินน้ำลงไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100  
องศาเซลเซียส นาน 7.5 นาที
6. นำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ
7. นำออกมาตั้งไว้รอนกระทั่งอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัด  
การดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร
8. ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน

### การคำนวณ

ปริมาณแ่ง สดล (X) = ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน x 0.9

ปริมาณแ่งต่อน้ำหนักแห้ง =  $\frac{X \times F \times d}{1000 \times D}$  มก/กรัม น้ำหนักแห้ง

X = ปริมาณแ่ง(สดล)

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอน hydrolysis

d = จำนวนเท่าที่เจือจาง

D = น้ำหนักแห้งที่นำมาสกัด(ก)

## ภาคผนวก 3

ตารางภาคผนวก 1 องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารในการทดลองที่ 3

Tr	N	P	K	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	CaNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KNO <sub>3</sub>	KCl
1	100	50	100	13	17	18.5	13	9.5
2	100	50	200	2.6	17	18.5	39	9.5
3	100	50	300	2.6	17	18.5	39	28.5
4	100	70	100	10.3	17	26	13	9.5
5	100	70	200	0	17	26	39	9.5
6	100	70	300	0	17	26	39	28.5
7	200	50	100	41.4	17	18.5	13	9.5
8	200	50	200	31.2	17	18.5	39	9.5
9	200	50	300	31.2	17	18.5	39	28.5
10	200	70	100	34.8	34	26	13	9.5
11	200	70	200	28.6	17	26	39	9.5
12	200	70	300	28.6	17	26	39	28.5

## ภาคผนวก4

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียมและแคลเซียม

วิธีการทดลอง

สุ่มตัวอย่างพืชจากการทดลองที่ 3 ซึ่งได้รับสารละลายธาตุอาหารต่างกัน โดยทำการสุ่มในช่วงระยะออกดอก จำนวน 4 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำตัวอย่างพืชที่สุ่มได้มาแยกเป็น ใบ ราก ลำลูกกล้วยและ ดอก ล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง น้ำกลั่น 3 ครั้ง ชับให้แห้งจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักสด บันทึกข้อมูลไว้ แล้วนำตัวอย่างพืชไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนจึงบันทึกน้ำหนักแห้ง

วิธีการย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรด (Wet Acid Digestion) ดัดแปลงโดย Ohyama *et al.*, (1985 ;1986 )

วิธีการย่อยตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียด 0.05 ก ใส่ลงในหลอดทดลองเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มล ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปป้อนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืน และวันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดออก วางทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลอดละ 0.3 มล ป้อนให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิเป็น 230 องศาเซลเซียส จับเวลา 30 นาที สังเกตสีของสารละลาย หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 มล แล้วนำไปย่อยต่อ ทำซ้ำเติมจนกระทั่งสารละลายใสจึงหยุด จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 5 มล ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล ใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Indolphanol Method

เตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน

สารละลาย A ชั่ง EDTA.2Na 25 ก ละลายในน้ำกลั่น 500 มล จากนั้นเติมสารละลายระหว่างเอทานอล 60 % และเมทธีเรด 0.25 % จำนวน 20 มล ปรับ pH ให้เป็น 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ล

สารละลาย B ชั่ง  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  136.09 ก และกรดเบนโซอิก 2.7 ก ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ล

สารละลาย C ชั่งโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ 100 มล ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มล ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ล เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 สัปดาห์

สารละลาย D ชั่ง  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.06 ก  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  31.8 ก และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 ก ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 มล แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ล เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 สัปดาห์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0-0.5 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

ดูดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว 0.5 มล เติมสารละลาย A 0.5 มล และ สารละลาย B 0.5 มล นำมาไตเตรท โดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้สีเปลี่ยน จากนั้น เติมสารละลาย C 2.5 มล และสารละลาย D 2.5 มล ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผลแล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ตามสูตรคือ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มก/กรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{สาร A (ppm)} \times \text{B} \times \text{C}}{1000 \times \text{DW}}$$

A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มก/ล)

B = ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา (25 มล)

C = ปริมาตรสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ใช้ (50 มล)

D = น้ำหนักแห้ง



การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et al.*, 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดต ดังนี้

เตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์

A reagent : ชั่ง  $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$  25 ก ละลายในน้ำกลั่น 200 มล จากนั้นนำมากรองโดยใช้ระบบสุญญากาศช่วย

B reagent :เตรียมกรดซัลฟูริก 20 มล ผสมน้ำกลั่น 200 มล ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มล

C reagent : นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มล ค่อยๆเท A reagent ทีละน้อย ช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมามานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล เก็บไว้ในขวดสีชา

เตรียมสารละลาย stannous chloride โดยชั่ง stannous chloride ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.25 ก เติลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควัน) โดยเติม HCl 5 มล ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มล

เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

ดูดสารละลายตัวที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว 0.5 มล ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มล และเติม stannous chloride 0.2 มล ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มล ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (มกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับการหาปริมาณ ไนโตรเจน



## ภาคผนวก 5

การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม แมกนีเซียมและแคลเซียม(Mizukoshi *et al.*, 1994)

การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม (Mizukoshi *et al.*, 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งบดละเอียด 0.05 ก ใส่หลอดทดลอง เดิม  $\text{HClO}_4$  0.4 มล และ  $\text{HNO}_3$  0.5 มล ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ  $\text{NO}_2^-$  ออกหมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมน้ำละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก( $\text{HCl}$  1:  $\text{H}_2\text{O}$  4 มล) หลอดละ 1 มล ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่  $\text{Cl}^-$  ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มล เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุโพแทสเซียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วโดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มล จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มล
3. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณธาตุโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760.5 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณธาตุโพแทสเซียม (มก ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณหาเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม

1. เตรียม lanthanum oxide โดยชั่ง lanthanum oxide 2.01 ก ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มล เติมน้ำ  $\text{HCl}$  37 % 10 มล ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียม จาก  $\text{CaCO}_3$  จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมจาก  $MgCl_2$  จากนั้น ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. เจือจางสารละลายตัวอย่างผ่านการย่อยแล้ว สำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียม โดยใช้สารตัวอย่าง 1 มล จากนั้นเจือจางด้วยสารละลายข้อ 1 เป็น 25 มล

5. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนโดยอะตอมของแคลเซียม และแมกนีเซียมด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 442.7 นาโนเมตร และ 285.2 นาโนเมตรสำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียมตามลำดับ บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม (มกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณหา เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายอภิวัฒน์ หาญธนพงศ์  
 ที่อยู่ติดต่อได้ 153/75 ถ. ประตูน้า ต. เวียงเหนือ อ. เมือง จ. ลำปาง 52000  
 วัน เดือน ปี เกิด 26 พฤศจิกายน 2521

## ประวัติการศึกษา

วุฒิ	สถานศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนอัสสัมชัญลำปาง จ.ลำปาง	2537
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนอัสสัมชัญลำปาง จ.ลำปาง	2540
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่	2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved