ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในเตรตรีดักเตสในใบ

ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง

ล้างใบด้วยน้ำกลั่นและเช็ดใบให้แห้ง หั่นใบให้ละเอียดและนำตัวอย่างใบหนัก 0.2 กรัมใส่ในหลอดทดลอง ที่ประกอบด้วยสารละลายสกัด 2.7 มล.และ PVP 0.1 กรัม

↓

ปิดฝา เขย่าให้เข้ากันและนำไปวางไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง

↓

นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

↓

เติม Reagent A 1.80 มล.ในหลอดทดลองใหม่

↓

เติม Reagent B 0.10 มล. เขย่าให้เข้ากันและนำไปแช่ใน water bath 30 องศาเซลเซียส

↓

ดูดสารละลายจากหลอดทดลองที่ปั่นเหวี่ยง 0.8 มล. มาใส่ในหลอดใหม่ เขย่าและแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที

↓

เติม Reagent D 1 มล. เขย่า และ Reagent E 1 มล. จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

↓

ตั้งหลอดทดลองนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

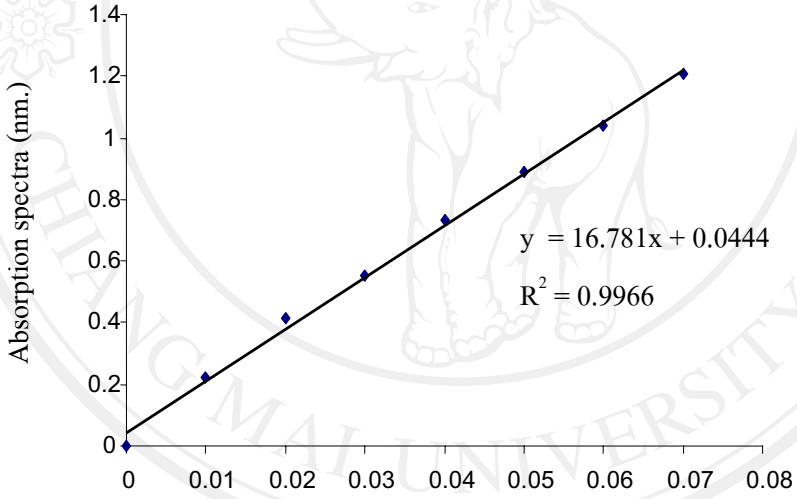
↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 540 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

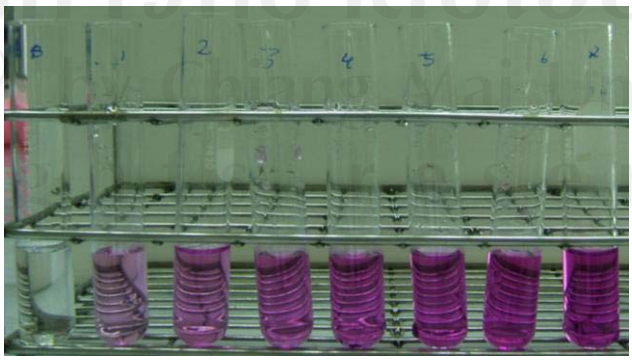
ตาราง 11 ความเข้มข้นของสารละลายไนไตรท์และค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (ABS)

Solution	Conc.	ABS
Blank	0	0.000
STD 1	0.01	0.224
STD 2	0.02	0.414
STD 3	0.03	0.554
STD 4	0.04	0.733
STD 5	0.05	0.887
STD 6	0.06	1.037
STD 7	0.07	1.205



ความเข้มเข้นของสารละลายไนไตรท์

ภาพ 18 กราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตส



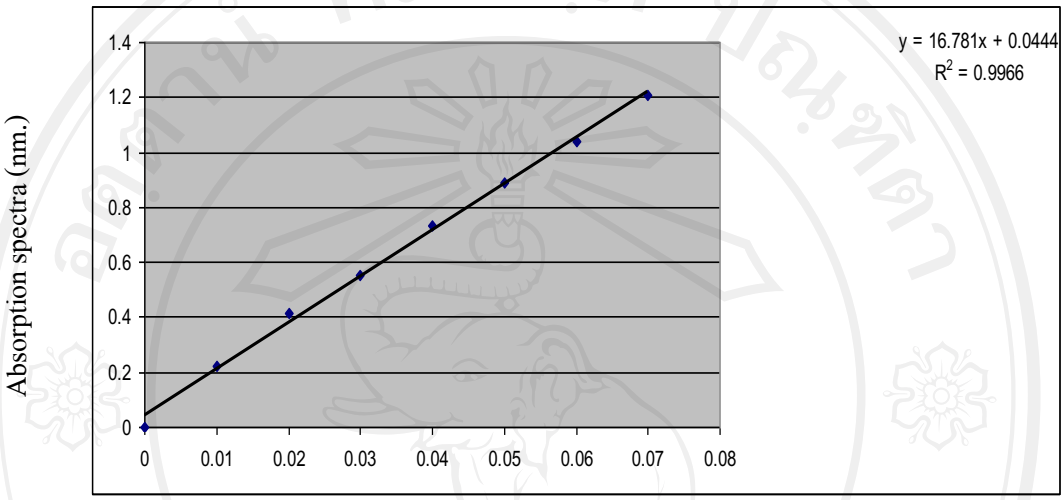
ภาพ 19 การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายตามความเข้มข้นของไนไตรท์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการคำนวณปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ในเตรตรีดักเตส

1. เปรียบเทียบความเข้มข้นของตัวอย่างจากความเข้มข้นของสารมาตรฐาน โดยใช้สูตร

   $y = ax + b$



2. เมื่อได้ค่าความเข้มข้นจากค่า x แล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำหนักสด 1 g จาก

ดูดสารละลาย 0.8	ml มีค่า	X	µmol
ถ้าใช้สารละลายที่ใช้บ่ม 2.7	ml มีค่า	$\frac{2.7\Delta X}{0.8}$	
	=	Z	µmol
เพราะฉะนั้น ชั่งตัวอย่าง 0.2	g มีค่า nitrite	Z	µmol
ถ้าชั่งตัวอย่าง 1	g มีค่า nitrite	$\frac{Z}{0.2}$	µmol
		0.2	
	=	$\frac{Z}{0.2}$	µmol/ 1g fresh weight

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ในเตรตรีดักเตส

การเตรียมสารละลายสกัด (Extraction solution)

100 mM Potassium phosphate (KH_2PO_4); M.W. = 174.18 g/l

KH_2PO_4	1	mol หนัก	174.18	g
KH_2PO_4	100×10^{-3}	mol หนัก	$100 \times 10^{-3} \times 174.18$	g
		หนัก	17.418 g/L	

40 mM Potassium nitrate (KNO_3); M.W. = 101.10 g/l

KNO_3	1	mol หนัก	101.10	g
KNO_3	40×10^{-3}	mol หนัก	$40 \times 10^{-3} \times 101.10$	g
		หนัก	4.044 g/L	

1.2% 1-propanal

โดยเตรียมจากการเติม 1-propanal 12 ml ในน้ำ 1 ลิตร

หมายเหตุ :

ให้ละลายสารที่ชั่งแต่ละตัวในน้ำกลั่นและปรับ pH เป็น 7.5 และปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

Reagent A

25 mM Potassium phosphate; M.W. = 174.18 g/l

KH_2PO_4	1	mol หนัก	174.18	g
KH_2PO_4	25×10^{-3}	mol หนัก	$25 \times 10^{-3} \times 174.18$	g
		หนัก	4.354 g/L	

10 mM Potassium nitrate (KNO_3); M.W. = 101.10 g/l

KNO_3	1	mol หนัก	101.10	g
KNO_3	10×10^{-3}	mol หนัก	$10 \times 10^{-3} \times 101.10$	g
		หนัก	1.011 g/L	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.05 mM Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate (EDTA);

M.W. = 292.25 g/l

EDTA	1	mol หนัก	292.25	g
EDTA	0.05×10^{-3}	mol หนัก	$0.05 \times 10^{-3} \times 292.25$	g
		หนัก	0.0146 g/L	

หมายเหตุ :

ให้ละลายสารที่ชั่งแต่ละตัวในน้ำกลั่นและปรับ pH เป็น 7.3 และปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

Reagent B

2.0 mM ß-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (ß-NADH); M.W. = 663.43 g/l

ß-NADH	1	mol หนัก	663.43	g
ß-NADH	2×10^{-3}	mol หนัก	$2 \times 10^{-3} \times 663.43$	g
		หนัก	1.327 g/ L	

ถ้าเตรียมในน้ำ 10 ml ต้องชั่ง ß-NADH 13.27 mg

Reagent C

3 M Hydrochloric acid (HCl); M.W. = 36.46 g/l

โดย 1 mole = 1 eq

Specific density (S.D) = 1.13 g/cm

M.W. = 36.46 g/l

Conc. = 12.08 M

Conc. = 37.00 % w/w

ถ้าต้องการ HCl 3 M ต้องเติม HCl 248.42 ml/L

Reagent D

58 mM Sulfanilamide solution; M.W. = 172.20 g/l

Sulfanilamide	1	mol หนัก	172.20	g
Sulfanilamide	58×10^{-3}	mol หนัก	$58 \times 10^{-3} \times 172.20$	g
		หนัก	9.9876 g/L	

หมายแหตุ ต้องละลาย Sulfanilamide ใน Reagent C (3M HCl) เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Reagent E

77 mM N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride solution (NED); M.W. = 259.17 g/l

NED	1	mol หนัก	259.17	g
NED	0.77×10^{-3}	mol หนัก	$0.77 \times 10^{-3} \times 259.17$	g
		หนัก	0.199 g/ L	

Reagent F (Nitrate Standard Solution)

45 mM Sodium nitrite ($NaNO_3$); M.W. = 69.00 g/l

$NaNO_3$	1	mol หนัก	69.00	g
$NaNO_3$	1.45×10^{-3}	mol หนัก	$1.45 \times 10^{-3} \times 69.00$	g
		หนัก	0.100 g/ L	

ถ้าเตรียมใน Reagent A 50 ml ต้องชั่ง $NaNO_3$ 5 mg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างจากใบ (Total Non-structural 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 ปรับปริมาตรเป็นเป็น 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 ผสมเขย่าให้เข้ากัน การใช้ Nelson's alkaline copper reagent ในแต่ละครั้งควรเตรียมใหม่เสมอ

4. Arsenomolybdic acid reagent ประกอบด้วย

4.1 ละลาย Ammonium molybdate $[(NH_4)]_6\ Mo_7O_{24} . 4H_2O$ จำนวน 25 กรัม ในน้ำกลั่น 420 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น จำนวน 21 มิลลิลิตร

4.2 ละลาย disodium hydrogen arsenate $[Na_2HAsO_2 . 7H_2O]$ จำนวน 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

4.3 นำสารละลายจากข้อ 4.2 ผสมลงในสาละลายในข้อ 4.1 แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาใช้ สารละลายที่ได้ต้องเป็นสีเหลืองเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีการพัฒนาสี

ขั้นตอนการเตรียมสาร

1. **กรดซัลฟิวริคเข้มข้น 96% (w/w) (Conc.H_2SO_4)**
2. **Hydrogen peroxide 30% (w/w)**
3. **สารเร่งการย่อยตัวอย่าง (Catalyst mixture)**
   - **ผสมสาร** K_2SO_4, $CuSO_4.5H_2O$ และ Selenium ที่บดละเอียดแล้ว ในอัตราส่วน 100:10:1
4. **สารละลายบัฟเฟอร์ (0.1M Na_2HPO_4, 5% Na-K tartrate, 5.4% NaOH)**
   ละลายสารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) จำนวน 35.89 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 600 มล. เติมสารโซเดียมโพแทสเซียมทราเตรท (Na-K tratrate) จำนวน 50 กรัม และเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จำนวน 54 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น
5. **สารละลายผสม Na-salicylate และ Na-Nitroprusside**
   ละลาย Na-salicylate จำนวน 150 กรัมและ Na-Nitroprusside จำนวน 0.3 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 600 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (เก็บไว้ในขวดสีชาและในตู้เย็น)
6. **สารละลาย Na-Hypochlorite**
   ผสมสารละลาย Na-Hypochlorite 5.25% จำนวน 6.0 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน)
7. **สารละลายสำหรับทำเจือจาง**
   ละลาย catalyst mixture 22 กรัม ใน 1 ลิตร ของกรดซัลฟูริก (1.1 M H_2SO_4)
8. **สารละลายมาตรฐานไนโตรเจน ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร**
   ละลาย ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$ จำนวน 4.715 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร
9. **สารละลายมาตรฐานไนโตรเจน 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ลิตร**
   ปิเปตสารละลายมาตรฐานไนโตรเจน ความเข้มข้น 1000 มก./ลิตร จำนวน 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มล. ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. **การเตรียมสารละลายกรดซัลฟิวริก** โดยละลาย selenium 3.5 กรัม ในกรดซัลฟิวริก 1 ลิตร โดยทำการต้มที่อุณหภูมิประมาณ 300 องศาเซลเซียส (ค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิเพื่อป้องกันการเดือดที่รุนแรง) โดยใช้ กระจกปิดปากบีกเกอร์ในขณะต้ม ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนจากสีดำเป็นสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสารละลาย สีเหลืองใส ซึ่งกระบวนการนี้ จะใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง
11. **การเตรียมสารละลายสำหรับย่อย (digestion mixture)** ละลาย Na-salicylate จำนวน 72 กรัม ในสารละลายข้อ 10 ปริมาณ 100 มล. ข้อแนะนำ ควรใช้สารลายดังกล่าวให้หมดภายใน 48 ชั่วโมง
12. **วิธีการคำนวณปริมาณไนโตรเจน** มีสูตรคำนวณดังนี้คือ

$$N \mid \ 0.714\,\Delta(a\,4\,b)\,\Delta\frac{v}{w}$$

a = concentration of nitrogen in the sample digest (mg/ l)

b = concentration of nitrogen in the blank digest (mg/ l)

v = total volume of digest (ml)

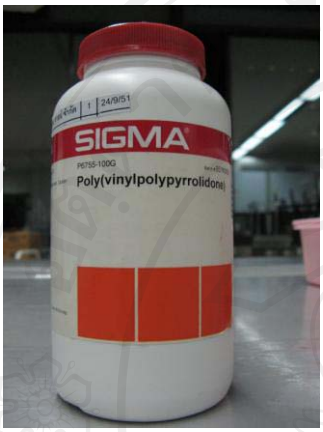
w = weight of plant material sample (g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนในใบ

ขั้นตอนการเตรียม PVP และ Sephadex

1. PVP (Polyvinylpyrrolidone ; Sigma chemical Co. Deisenhofen, germany)



1) ชั่ง PVP 50 กรัม และเติมน้ำกลั่น 500 มล.
2) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง
3) จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 100 มล.
4) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง
5) จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 100 มล.
6) คนให้เข้ากันนาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง
7) เติมน้ำกลั่นอีกครั้งให้ได้ปริมาตร 400 มล.ปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระดาษอะลูมิเนียมและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. Sephadex (DEAE Sephadex–A25 ; Sigma chemical Co.)

1) ชั่ง DEAE Sephadex 25 กรัม
2) เติม 0.1 M ammonium acetate, pH 8.5 ปริมาณ 300 ml และต้มภายในบีกเกอร์ที่มีน้ำร้อนภายใน นาน 2 ชั่วโมง
3) ทำให้เย็นนาน 2 ชั่วโมง
4) กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยผ่านกรวยกรองและเครื่องสูบ-อากาศ

5) ตัก DEAE-Sephadex ที่เหลือบนกระดาษกรองในข้อ 4 แล้วเติม 0.1 M ammonium acetate, pH 8.5 ปริมาณ 200 มล. ผสมให้เข้ากันและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูตรสารละลายที่ใช้ปลูกลำไยในสภาพไฮโดรโปนิกส์

ตาราง 15 สารละลายเริ่มต้น (stock solution) ของธาตุอาหารหลัก (Hoagland and Arnon, 1938)

สารเคมีที่ใช้	สูตรเคมี	ปริมาณ	ปริมาณน้ำ (ลิตร)
A. Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$ (15-0-0)	11.80 kg	20
B. Potassium Sulfate	K_2SO_4 (0-0-50)	660 g	20
C. Magnesium Sulfate	$MgSO_4 . 7H_2O$	6.16 kg	20
D. Potassium dihydrogen Phosphate	KH_2PO_4 (0-52-34)	1.36 kg	20
E. Ammonium nitrate (18 %)	NH_4NO_3	514 g	1
F. Fe-Chelate (13%)	Fe-EDTA	42.68 g	4

ตาราง 16 สารละลายเริ่มต้น (stock solution) ของธาตุอาหารรอง ในน้ำ 2.5 ลิตร

สารเคมีที่ใช้	สูตรเคมี	ปริมาณ (g.)
Manganese Sulfate	$MnSO_4 . H_2O$	12.45
Zinc Sulfate	$ZnSO_4 . 7H_2O$	2.65
Copper Sulfate	$CuSO_4 . 5H_2O$	2.2
Boric Acid	H_3BO_3	9.5
Ammonium Molybdate	$(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} 4H_2O$	0.175

ตาราง 17 การปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วย H_2SO_4 เป็น 1,000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้	สูตรเคมี	ปริมาตร (ml)
Sulfuric Acid	H_2SO_4	200

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 18 สภาพอากาศของจังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2550

เดือน	อุณหภูมิสูงสุด (ºC)	อุณหภูมิต่ำสุด (ºC)	ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	อุณหภูมิเฉลี่ย(ºC)
1	30.1	14.2	76	22.15
2	31.1	17.1	65	24.1
3	34.3	19	56	26.65
4	35.5	21.4	67	28.45
5	36.7	21.3	85	29
6	36	23.8	83	29.9
7	31.2	23.5	88	27.35
8	30.4	23.5	90	26.95
9	32.2	23.2	87	27.7
10	30	22.3	85	26.15
11	29.4	18.2	79	23.8
12	28.2	16.1	80	22.15

ตาราง 19 สภาพอากาศของจังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2551

เดือน	อุณหภูมิสูงสุด (ºC)	อุณหภูมิต่ำสุด (ºC)	ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	อุณหภูมิเฉลี่ย (ºC)
1	31.1	14.2	76	22.65
2	31.4	16.4	65	23.9
3	33	19.5	56	26.25
4	34.2	22.7	67	28.45
5	35.1	24.2	85	29.65
6	37.5	23.2	83	30.35
7	31.3	22	88	26.65
8	31.5	21.4	90	26.45
9	31.6	22.1	87	26.85
10	29.4	20.2	85	24.8
11	28.5	18.2	79	23.35
12	28	17.1	80	22.55

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายนฤเทพ เวชภิบาล

วัน เดือน ปี เกิด 5 กันยายน 2524

ประวัติการศึกษา

ปี 2546	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
ปี 2542	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทราชูทิศ พายัพ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
ปี 2539	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนนวมินทราชูทิศ พายัพ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

ประวัติการทำงาน

ปี 2551 - 2552	ผู้ช่วยนักวิจัย โครงการ The Uplands Program – Research for Sustainable Land Use and Rural Development in Mountainous Regions of Southeast Asia - Subproject C4.1 (Land Use Modeling in Thailand and Vietnam) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
ปี 2547 – 2552	ผู้ช่วยนักวิจัย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ 1/4 ถนนมูลเมือง ต.พระสิงห์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200
โทรศัพท์ 087-1777292
อีเมล์ maccmu@hotmail.com

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved