ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การวิเคราะห์หาโอโซนในน้ำด้วยวิธี Indigo colorimetric method

Indigo colorimetric method เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณโอโซนในน้ำ (Clesceri *et al*., 1998) โดยมีวิธีการดังนี้

เตรียมสารเคมี

1. เตรียมสาร Indigo stock solution

เติมน้ำกลั่น 500 มล. และ phosphoric acid 1 มล. ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากันและเติมสาร potassium indigo trisulfonate 770 มิลลิกรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

2. เตรียมสาร Indigo reagent I

เติมสาร Indigo stock solution 20 มล. ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร จากนั้นเติมสาร sodium dihydrogen phosphate 10 g และ phosphoric acid 7 มล. เขย่าให้เข้ากันและเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3. เติมสาร Indigo reagent I 10 มล. ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. และทำการปล่อยก๊าซโอโซนลงในน้ำที่แช่ลำไยจนครบเวลาที่ต้องการแล้วแบ่งตัวอย่างน้ำนั้นมาเติมในขวดปรับปริมาตรที่มีสาร Indigoฯ อยู่จนครบ 100 มล.เขย่าและนำไปวัดทันที

4. ทำการตรวจวัดโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 600 nm ซึ่งต้องเตรียม blank เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม โดยใช้วิธีการเดียวกับการเตรียมตัวอย่างน้ำแต่ใช้น้ำกลั่นซึ่งไม่ผ่านการปล่อยก๊าซโอโซนแทน

5. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโอโซนในน้ำ จากสูตร

$$mgO_3/L = \frac{100 \times \Delta A}{f \times b \times v}$$

โดยที่ ΔA = ค่าแตกต่างระหว่างตัวอย่างและ blank

b = path length of cell (cm)

V = ปริมาตรของตัวอย่าง (มล.)

f = 0.42

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจวัดปริมาณก๊าซโอโซนมีข้อควรระวังดังนี้

1) สาร Indigo stock solution และ Indigo reagent I มีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15°C นาน 4 เดือน และ 1 สัปดาห์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังต้องเก็บรักษาในที่มืด

2) ในระหว่างทำการตรวจวัดโอโซน ควรใช้กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์หุ้มขวดปรับปริมาตรเพื่อป้องกันไม่ให้ Indigo reagent I โดนแสง และควรตรวจวัดอย่างรวดเร็วเพราะอาจเกิดการสลายตัวของโอโซนได้

2. กิจกรรมของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส (PPO) ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีการของ Jiang (1999) และ Tian *et al*. (2002)

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง
- ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 250 และ 500 cc.
- PH-meter.
- โกร่งที่แช่เย็นเอาไว้บดไนโตรเจนเหลว
- Centrifuge (รุ่น Unicen 15 DR ของบริษัท Herolab, Germany)
- UV-Visible Spectrophotometer (Unicam UV Series 500, England.)

1.2 การเตรียมสารเคมี

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4

เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (reagent grade Scharlau, Spain.) น้ำหนัก 15.6010 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (reagent grade Scharlau, Spain.) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 โดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ปริมาตร 735 มล. เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ปริมาตร 265 มล. ปรับพีเอชสารละลายผสมให้ได้เท่ากับ 6.4

- สารละลาย catechol เข้มข้น 0.1 โมล่าร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมโดยชั่ง catechol (Sigma, U.S.A.) น้ำหนัก 5.5050 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มล. โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- ไนโตรเจนเหลว
- สารสกัด (extraction solution)

ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ + polyvinylprolidone (PVPP)(Sigma, U.S.A.)

ขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ crude enzyme

สกัดที่ 4°C โดยนำเปลือกผลลำไย 3 กรัม + ใส่ไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดในโกร่งแช่เย็น

↓

เติมสารสกัด (extraction solution) ในอัตราส่วนปริมาตรสารละลายสกัดต่อน้ำหนักเปลือกลำไย (8 ต่อ 1)

↓

(สารสกัดประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 + 1% polyvinylprolidone (PVPP)(Sigma, U.S.A.)(ใช้ปริมาตร .....?)

↓

บดให้เข้ากันอีกครั้ง และปรับปริมาตรเป็น 25 ซีซี. เก็บไว้ค้างคืนที่ 4°C

↓

ปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วย Centrifuge (รุ่น Unicen 15 DR ของบริษัท Herolab, Germany) ที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

↓

นำของเหลวใส (supernatant) ซึ่งเป็น **crude enzyme** มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ PPO และปริมาณโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ PPO

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) โดยปิเปตสารละลาย catechol เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ปริมาตร ... + ใส่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 ปริมาตร 3 มล.

↓

เติมcrude enzyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette tube ผสมกันให้ดี

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visble Spectrophotometer (Unicam UV Series 500, England) ที่ความยาวคลื่น 400 nm.

↓

คำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ แสดงหน่วยเอนไซม์ กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ (unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์โดยการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 nm. 0.001 หน่วยต่อนาที

↓

แล้วคำนวณเป็น Specific activity ของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณหน่วยเอนไซม์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

3. ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976)

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

- ขวดปรับปริมาตร
- หลอดทดลอง
- Vortex mixture (เครื่องผสม)
- UV-Visible Spectrophotometer (Unicam UV Series 500, England)

1.2 การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโปรตีนมาตรฐาน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งสารโปรตีนอัลบูมิน Bovine Serum Albumin (BSA) (Fluka, Switzerland) น้ำหนัก 0.005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

- สารละลาย Coomassie

เตรียมโดยชั่ง Coomassis brilliant bule G-250 (Fluka, Switzerland) น้ำหนัก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอล 99.5% (Merck, Germany) ปริมาตร 25 มล. เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% (Merck, Germany) ลงไป 50 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

1. การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน เข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาอย่างละ 1 ซีซี. ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดที่ 1 เป็น Blank ทำเพียงหลอดเดียว รวมทั้งหมด 19 หลอด

↓

เติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 2 ซีซี. ลงในแต่ละหลอดทดลอง ผสมกันด้วย Vortex mixture (เครื่องผสม) นาน 2-3 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (Unicam UV Series 500, England) ที่ความยาวคลื่น 595 nm.

↓

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน X เป็นปริมาณของ BSA (ไมโครกรัม) และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 596 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำ crude enzyme ปริมาตร 1 ซีซี. ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Coomassie ปริมาตร 2 ซีซี. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (Unicam UV Series 500, England) ที่ความยาวคลื่น 595 nm.

↓

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาระดับความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

4. Total phenolic compound สารประกอบฟีนอลทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีการของ Hyodo *et al*. (1976); Ketsa and Atantee (1998) และ Singleton and Rossi (1965)

1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลทั้งหมด

1.1 อุปกรณ์

- ขวดปรับปริมาตร
- หลอดทดลอง
- Vortex mixture (เครื่องผสม)
- UV-Visible Spectrophotometer(Unicam UV Series 500, England)
- โกร่งแช่เย็นเอาไว้ใส่เปลือกลำไยบด

1.2 การเตรียมสารเคมี

- ไนโตรเจนเหลว
- สารละลายฟีนอลมาตรฐาน ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งสาร gallic acid (Merck, Germany) น้ำหนัก 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ซีซี. โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

- สารละลายเอทานอล เข้มข้น 80%

เตรียมโดยตวงเอทานอล(Scharlau, Spain) 99.8% ปริมาตร 800 ซีซี. เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 998 ซีซี.

- สารละลาย Folin-Ciocaltea Reagent เข้มข้น 10%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมโดยตวง Folin-Ciocaltea Reagent (Merck, Germany) ปริมาตร 100 ซีซี. ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร โดยขวดปรับปริมาตร

- สารละลาย sodium carbonate เข้มข้น 7.5%

เตรียมโดยชั่งสารละลาย sodium carbonate(Scharlau, Spain) น้ำหนัก 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร โดยขวดปรับปริมาตร

<u>ขั้นตอนการวิเคราะห์</u>

<u>1. การสร้างกราฟมาตรฐานฟีนอล</u>

ปิเปตสารละลายฟีนอล เข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับอย่างละ 1 ซีซี.ในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดแรกเป็น Blank ทำเพียงหลอดเดียว รวมเป็น 31 หลอด

↓

เติมสารละลาย Folin-Ciocaltea Reagent เข้มข้น 10% ปริมาตร 5 ซีซี. ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่องผสม 2-3 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที

↓

เติมสารละลาย sodium carbonate เข้มข้น 7.5% ปริมาตร 4 ซีซี ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่องผสม 2-3 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชม.

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer(Unicam UV Series 500, England) ที่ความยาวคลื่น 765 nm.

↓

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน X เป็นปริมาณของ gallic acid (ไมโครกรัม) และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 765 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือก

นำเปลือกผลลำไย 3 กรัม+ใส่ไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดในโกร่งแช่เย็น

↓

เติมสารละลายเอทานอล เข้มข้น 80% ที่เย็นลงไปปริมาตร 12 ซีซี บดให้เข้ากันอีกครั้ง ปรับปริมาตรเป็น 25 ซีซี

↓

นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4° C นำของเหลวใสมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำของเหลวใสมาเจือจาง 10 เท่า นำมาเพียง 1 ซีซีใส่ในหลอดทดลอง

↓

เติมสารละลาย Folin-Ciocaltea Reagent เข้มข้น 10% ปริมาตร 5 ซีซี. ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่องผสม 2-3 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที

↓

เติมสารละลาย sodium carbonate เข้มข้น 7.5% ปริมาตร 4 ซีซี ลงในหลอดทดลอง ผสมด้วยเครื่องผสม 2-3 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชม.

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer(Unicam UV Series 500, England) ที่ความยาวคลื่น 765 nm.

↓

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลจากกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการคำนวณ

ปริมาณกรดแกลลิกที่อ่านได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดเจือจาง = a ไมโครกรัม

สารสกัดเจือจาง 1 ซีซี มีสารประกอบฟีนอล = a ไมโครกรัม

สารสกัดเจือจาง 10 ซีซี มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 ไมโครกรัม

สารสกัดจากเปลือก 1 ซีซี มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 ไมโครกรัม

สารสกัดจากเปลือก 25 ซีซี มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 x 25 ไมโครกรัม

ตัวอย่างจากเปลือก 3 กรัม มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 x 25 ไมโครกรัม

ตัวอย่างจากเปลือก 1 กรัม มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 x 25/3 ไมโครกรัม

ดังนั้นตัวอย่างจากเปลือกลำไยมีสารประกอบฟีนอล = a x 10 x 25/3 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดในรูปของกรดแกลลิก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นายมานพ หาญเทวี
วัน เดือน ปีเกิด	25 สิงหาคม 2500
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตเกษตรบางพระ
ประวัติการทำงาน	
1 พ.ค. 2528	นักวิชาการเกษตร 3 งานอำนวยการ ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร
2 ต.ค. 2530	นักวิชาการเกษตร 4 งานทดสอบ สถานีทดลองเกษตรหลวงขุนวาง
2 ต.ค. 2534	นักวิชาการเกษตร 5 งานวิชาการ สถานีทดลองเกษตรหลวงขุนวาง
11 เม.ย. 2540	นักวิชาการเกษตร 6ว กลุ่มพืชศาสตร์ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
17 พ.ย. 2542	นักวิชาการเกษตร 7ว กลุ่มพืชศาสตร์ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
ปัจจุบัน	นักวิชาการเกษตร 8ว กลุ่มวิจัย ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ - เป็นวิทยากรอบรมหลักสูตรการปลูกกาแฟอาราบิก้าในภาคเหนือ ปี 2531 และวิทยากรบรรยายการปลูกกาแฟอาราบิก้าจนถึงปัจจุบัน - ประธานคณะทำงานวิชาการ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved