บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมใบยาสูบเวอร์ยิเนีย พันธุ์ Coker 347 เพื่อใช้ในการเลี้ยงมอดยาสูบ

นำใบยาสูบแห้ง (ภาพ 3.1) ที่จำหน่ายเป็นการค้า โดยมีการคัดเกรดแล้วว่าเป็นใบยาสูบ หมู่ B คือ ใบยากลางลำต้นหรือสูงกว่านั้นของต้นยาสูบ ใบยาสูบมีปลายใบแหลม ใบมักพับหรือจีบย่น เนื้อหนากว่าใบยาหมู่อื่น ๆ และมีตำหนิอันเกิดจากการกระทบกระทั่งกับดินน้อยหรือไม่มีเลย เป็นใบยาสูบมีคุณภาพตามมาตรฐานโรงงานยาสูบ โดยนำใบยาสูบแช่แข็ง 2-3 วัน เพื่อกำจัดแมลงที่อาจติดมาด้วย จากนั้นทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของใบยาสูบเพิ่มขึ้นจนเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงแมลง

การเตรียมใบยาสูบเวอร์ยิเนียเพื่อใช้ในการทดลองมอดยาสูบ และการตรวจคุณภาพใบยาสูบ

นำใบยาสูบเวอร์ยิเนีย ที่เป็นใบยาหมู่ B ที่ผ่านการคัดเกรดตามมาตรฐานโรงงานยาสูบ ความชื้น 10-11 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการทดลองโดยไม่นำมาผ่านกรรมวิธีใด ๆ เหมือนการเตรียมใบยาสูบเพื่อใช้ในการเลี้ยง และการทดลองมอดยาสูบ

ภาพ 3.1 ใบยาสูบเวอร์ยิเนีย Coker 347

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณมอดยาสูบในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดลอง

การเพาะเลี้ยงมอดยาสูบ ที่เก็บตัวอย่างจากใบยาสูบแห้ง นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาถึงวงจรชีวิต และพฤติกรรม การเตรียมมอดยาสูบระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย เพื่อการทดสอบ และเลี้ยงในใบยาสูบแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส โดยใบยาสูบและยาเส้นที่นำมาเลี้ยงต้องผ่านการแช่แข็ง 2-3 วัน แล้วพักไว้ 1 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงแมลง เพื่อ เป็นการกำจัด ไม่ให้มีแมลงอื่น ๆ ติดมาด้วย เลี้ยงมอดยาสูบในขวดโหลแก้วฝาปิดตาข่ายถี่ ขนาด 500 กรัม (ภาพ 3.2) โดยใส่มอดยาสูบตัวเต็มวัยลงไป 100 ตัว ต่อ 1 โหล จากนั้น ทุก ๆ 5 วัน ทำการร่อนแมลงเพื่อแยกระยะไข่ และตัวเต็มวัยออกจากกัน โดยแยกตัวเต็มวัยออกจากยาสูบ ซึ่งยาสูบที่แยกได้จะมีไข่ของมอดยาสูบปะปนอยู่ด้วย นำยาสูบแห้งที่ร่อนแมลงออกพร้อมฝุ่นผงที่ผ่านตะแกรงนำกลับมาใส่ขวดโหลเดิม ซึ่งมอดยาสูบแต่ที่เจริญเติบโตจะมีอายุใกล้เคียงกัน

ในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ทำในทำนองเดียวกันกับระยะไข่ โดยหลังจากคัดแยกไข่แล้ว ปล่อยให้แมลงเจริญเติบโตเป็นระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย หลังจากปล่อยไข่ทิ้งไว้เป็นเวลา 6-10 วัน, 21-28 วัน และ 30-43 วัน ตามลำดับ

ภาพ 3.2 ขวดโหลแก้วมีฝาปิดเป็นตาข่ายถี่ ขนาดบรรจุ 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุใบยาสูบแห้งเวอร์ยิเนียประมาณ 100 กรัม เพื่อใช้เลี้ยงแมลง (ซ้าย) ฝาปิดเป็นตาข่ายถี่ (ขวา)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

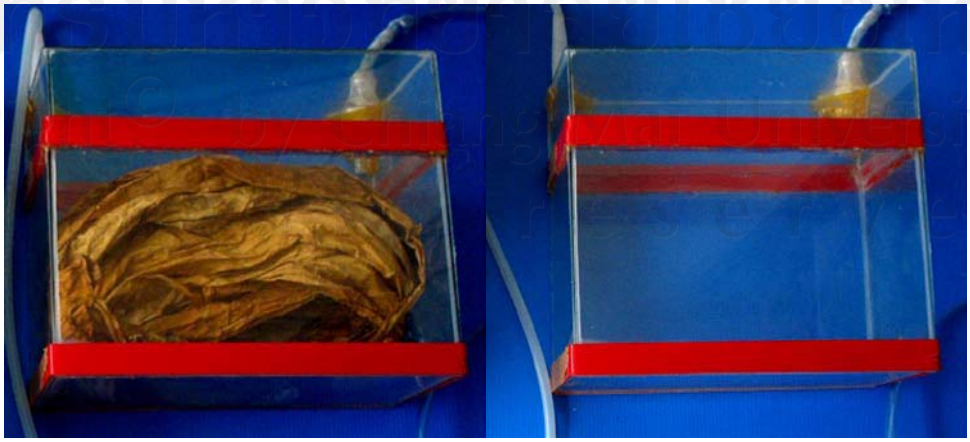
เครื่องผลิตโอโซน (ozone generator)

เครื่องผลิตโอโซน (ozone generator) รุ่น WAO – 2501(Asiatech Industry IN) มีหัวปล่อยก๊าซ 1 หัว ใช้พลังงานกระแสไฟฟ้าสลับ 220 โวลต์ ความถี่ 50 Hz พลังงานไฟฟ้า 18 วัตต์ ซึ่งเครื่องนี้สามารถผลิตโอโซนได้ 60 ppm (ภาพ 3.3)

ภาพ 3.3 เครื่องผลิตโอโซน

ozone chamber

ภาชนะทำจากแก้วหรือวัสดุที่ทำจากพลาสติกอื่น ๆ มีขนาดกว้าง 12.5 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร สูง 21 เซนติเมตร (ภาพ 3.4)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.4 ภาชนะที่ใช้บรรจุใบยาสูบ และมอดยาสูบ เพื่อนำไปผ่านโอโซน

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้โอโซนในการกำจัดมอดยาสูบในแต่ละวัย

1.1 ทดสอบการใช้โอโซนโดยตรงกับมอดยาสูบในแต่ละวัย

จุดประสงค์ของการทดลอง เพื่อศึกษาหาเปอร์เซ็นต์การตายของมอดยาสูบในแต่ละวัยที่มีต่อโอโซนมากที่สุด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาความเข้มข้นของโอโซน และเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดมอดยาสูบอย่างสมบูรณ์ต่อไป การทดลองนี้จะเลือกความเข้มข้นของโอโซนต่ำสุดเพื่อหาจุดเริ่มต้นของการตายของมอดยาสูบเพื่อสามารถจำแนกหาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงในระยะต่าง ๆได้ ใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm โดยดัดแปลงจากการทดลองของ Kells *et al*. (2001)

1. ระยะไข่

นำไข่ของมอดยาสูบที่มีอายุ 2-5 วัน จำนวน 50 ฟอง ใส่ลงในภาชนะทำจากแก้วหรือวัสดุที่ทำจากพลาสติกอื่น ๆ มีขนาดกว้าง 12.5 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร สูง 21 เซนติเมตร (ozone chamber) หลังจากนั้นนำไปผ่านโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมอดยาสูบที่ผ่านการรมโอโซน นำมาใส่ขวดโหลพักไว้เป็นเวลา 7 วัน หาเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่

2. ระยะหนอน

นำหนอนของมอดยาสูบ จำนวน 50 ตัว ใส่ลงใน ozone chamber หลังจากนั้นนำไปรมโอโซนเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1 แต่ตรวจนับหนอนของมอดยาสูบที่ตายหลังเสร็จสิ้นการรมด้วยโอโซนได้ทันที และหลังจากผ่านการรมโอโซน 24 ชั่วโมง

3. ระยะดักแด้

ทำการเตรียมแมลงเช่นเดียวกันกับการทดลองในข้อ 2 โดยการปล่อยให้ไข่พัฒนาเป็นตัวหนอน และดักแด้ประมาณ 21 - 28 วัน จึงนำภาชนะที่บรรจุใบยาสูบนี้ไปรมโอโซนเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1 โดยจะดักแด้ที่ผ่านการรมโอโซนแต่ละช่วงเวลานำมาใส่ขวดโหลพักไว้เป็นเวลา 7 วัน เพื่อปล่อยให้ดักแด้พัฒนาเป็นตัวเต็มวัย จึงทำการตรวจนับแมลงที่รอดชีวิต

4. ระยะตัวเต็มวัย

ใส่ตัวเต็มวัยของมอดยาสูบลงไป 50 ตัว ใส่ลงใน ozone chamber แล้วจึงนำไปรมโอโซนเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 1 ตรวจนับมอดยาสูบที่ตายหลังผ่านโอโซนได้ทันที และหลังจากที่ผ่านการรมโอโซน 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทุกการทดลองทำ 4 ซ้ำ ทำการนับจำนวนแมลงที่รอดหลังจากนำไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยที่ผ่านการรมโอโซน หาเปอร์เซ็นต์การตาย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านโอโซน และชุดที่ผ่านโอโซน นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของมอดยาสูบแต่ละระยะ ด้วยวิธี Least Significant Difference, LSD

1.2 ทดสอบการใช้โอโซนกับมอดยาสูบแต่ละวัยในใบยาสูบ

1. ระยะไข่

นำใบยาสูบ 10 กรัม ใส่ใน ozone chamber พร้อมกับไข่ของมอดยาสูบ 50 ฟอง ที่อยู่กระจายทั่วใบยาสูบ นำไปผ่านโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำใบยาสูบพร้อมกับไข่ของมอดยาสูบมาใส่กล่องพลาสติกทิ้งไว้ 7 วัน เพื่อรอให้ไข่ฟักตรวจนับเปอร์เซ็นต์ไข่ที่ฟักออกมา

2. ระยะหนอน

นำใบยาสูบ 10 กรัม และตัวหนอนมอดยาสูบจำนวน 50 ตัว ใส่ใน ozone chamber ทิ้งไว้ 1 วัน เพื่อให้หนอนเข้ากัดกินใบยาสูบ นำไปทำการทดลองโดยผ่านโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับตัวหนอนมอดยาสูบที่รอดชีวิต และจำนวนที่ตายทันทีหลังผ่านโอโซน

3. ระยะดักแด้

นำใบยาสูบ 10 กรัม และนำดักแด้มอดยาสูบจำนวน 50 ตัว ใส่ใน ozone chamber นำไปทำการทดลองโดยผ่านโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน แล้วทำการนับดักแด้ที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยได้

4. ระยะตัวเต็มวัย

นำใบยาสูบ 10 กรัม และนำตัวเต็มวัยมอดยาสูบจำนวน 50 ตัว ใส่ใน ozone chamber นำไปทำการทดลองโดยผ่านโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนตัวเต็มวัยของมอดยาสูบที่รอดชีวิตที่ตายทันทีหลังผ่านโอโซน 24 ชั่วโมง

ทุกการทดลองทำ 4 ซ้ำ ทำการนับจำนวนแมลงที่รอดหลังจากนำไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยที่ผ่านการรมโอโซน หาเปอร์เซ็นต์การตาย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านโอโซน และชุดที่ผ่านโอโซน นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของมอดยาสูบแต่ละระยะ ด้วยวิธี Least Significant Difference, LSD

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การหาระยะเวลาในการใช้โอโซนในการกำจัดมอดยาสูบที่มีอัตราการตายต่ำสุดจากการทดลองแรก โดยทดลองกับมอดยาสูบระยะที่ มีอัตราการตายต่ำสุด ใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm เป็นเวลาต่างๆ เช่น 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มาทดสอบกับมอดยาสูบระยะที่มีอัตราการตายต่ำที่สุดจากการทดลอง 1.1 (แมลงระยะที่ทนทานที่สุด) เพื่อให้ได้อัตราการตายของมอดยาสูบที่สมบูรณ์ (100 เปอร์เซ็นต์)

ทุกการทดลองทำ 4 ซ้ำ ทำการนับจำนวนแมลงที่รอดหลังจากนำไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยที่ผ่านการรมโอโซน หักลบกับจำนวนแมลงที่เริ่มต้น เพื่อหาจำนวนแมลงที่ตาย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านโอโซน และชุดที่ผ่านโอโซน นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของมอดยาสูบแต่ละเวลาด้วยวิธี Least Significant Difference, LSD

การทดลองที่ 3 ประสิทธิภาพของโอโซนในการกำจัดมอดยาสูบในใบยาสูบแห้งชนิดต่าง ๆ

จุดประสงค์ของการทดลอง เพื่อศึกษาหาประสิทธิภาพของโอโซนในการกำจัดแมลงในยาสูบชนิดต่าง ๆ และระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะทำให้มอดยาสูบตายอย่างสมบูรณ์ โดยทำการทดลองกับมอดยาสูบระยะที่ทนทานที่สุด

3.1 การรมโอโซนเพื่อกำจัดมอดยาสูบที่เลี้ยงด้วยใบยาสูบแห้ง

นำมอดยาสูบระยะที่มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำสุด จำนวน 50 ตัว ใส่ในภาชนะร่วมกับใบยาสูบน้ำหนัก 100 กรัม รมโอโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm ที่เวลา 4, 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับแมลงที่รอดชีวิต ทั้งชุดควบคุม (กรรมวิธีที่แมลงไม่ผ่านการรมด้วยโอโซน) นับจำนวนแมลงที่รอดชีวิตหักลบกับจำนวนแมลง 50 ตัว เพื่อให้ได้จำนวนแมลงที่ตายจากการรมด้วยโอโซน หากพบแมลงตายในชุดควบคุม (ไม่ผ่านโอโซน) นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่แท้จริง (corrected mortality) ด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925)

$$\text{corrected mortality} = \frac{\%\ \text{tested mortality} - \%\ \text{control mortaltity}}{100 - \%\ \text{control mortality}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทุกการทดลองทำ 4 ซ้ำ นำจำนวนแมลงที่ตายจากการรมโอโซน ในระยะเวลา 4 , 8, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ ค่า Median Lethal time (LT_{50}) เพื่อให้ได้ระยะเวลาที่ดีที่สุดในการกำจัดมอดยาสูบในแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม LOGIT PC

3.2 การรมโอโซนเพื่อกำจัดมอดยาสูบที่เลี้ยงด้วยใบยาสูบแห้งอัดมัด และยาเส้น

ทดลองเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3.1 โดยใช้ใบยาสูบอัดมัดใส่ในกระสอบขนาดเล็กจำลองตามสภาพการเก็บรักษาภายในโรงเก็บจริง มีขนาดกว้าง 6 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร สูง 6 เซนติเมตร โดยมีน้ำหนักรวม 100 กรัม (ภาพ 3.5) และการทดลองในยาเส้นฝอยที่มีน้ำหนัก 100 กรัม (ภาพ 3.6)

ภาพ 3.5 ใบยาสูบอัดมัดใส่ในกระสอบขนาดเล็กจำลองการเก็บรักษาภายในโรงเก็บ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 3.6 ยาเส้น

การทดลองที่ 4 การวัดคุณภาพใบยาสูบทางกายภาพ และทางเคมีบางประการ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของใบยาสูบ และยาเส้น จากการทดลองที่ 3.2 มาตรวจสอบคุณภาพที่เปลี่ยนแปลง ดังนี้

1. การวิเคราะห์หาปริมาณนิโคติน (nicotine) และปริมาณคลอไรด์ (chloride) ส่งตรวจที่สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิ่ง (reducing sugar) และปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar)

3. ตรวจสอบสี โดยใช้เครื่องวัดสี Colorimeter (Color Quest XE, USA)

การตรวจวัดคุณภาพใบยาสูบ

วัดคุณภาพของใบยาสูบ ที่ได้รับการผ่านโอโซนที่ความเข้มข้น ที่ 60 ppm ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สามารถกำจัดมอดยาสูบได้สมบูรณ์ที่สุด โดยเปรียบเทียบกับใบยาสูบชนิดเดียวกัน จากกลุ่มเดียวกัน ที่ไม่ได้ผ่านโอโซน โดยใบยาสูบที่ใช้ทดสอบมีความชื้นเริ่มต้น 11 เปอร์เซ็นต์ สุ่มตัวอย่างใบยาสูบ ตัวอย่างละ 100 กรัม ทุกกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ โดยวัดคุณสมบัติของใบยาสูบดังต่อไปนี้

1. การวัดคุณสมบัติทางกายภาพของใบยาสูบ

1.1 วิเคราะห์ความชื้น (ASAE, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์ความชื้นใบยาสูบโดยนำตัวอย่างมาบดให้เป็นผงละเอียด นำไปชั่งแล้วทำการ อบตัวอย่างยาสูบพร้อมกล่องอลูมิเนียม (can) ด้วยความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 101 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง คำนวณหาความชื้นจากสูตร

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(B - C) \times 100}{(B - A)}$$

เมื่อ A = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา

B = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา และยาสูบก่อนอบ

C = น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา และยาสูบหลังอบ

1.2 วัดสีของใบยาสูบ

การวัดสีของใบยาสูบโดยใช้เครื่องมือวัดสี Hunter Lab รุ่น Color Quest XE โดยใช้ใบยาสูบประมาณ 9 ใบ ซึ่งหลักการของเครื่อง Color Quest XE ใช้หลักการตกกระเจิงของแสง ค่าที่ได้จากเครื่องมือเป็นค่า L*, a*, b*

ค่า L* เป็นค่าที่แสดงถึงความสว่าง (lightness) ที่มีค่าเท่ากับ 0 แสดง ถึง วัตถุเข้าใกล้สีดำหรือมีสีมืดที่สุด หาก L* มีค่าเท่ากับ 100 วัตถุมีสีขาว หรือสว่างที่สุด

ค่า a* เป็นค่าที่แสดงความเป็นสีแดง หรือความเป็นสีเขียว โดยที่ค่า a* เป็นบวก แสดงถึงวัตถุมีสีแดง หากสีมีค่าเป็นลบ แสดงถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b* เป็นค่าที่แสดงความเป็นสีเหลือง หรือสีน้ำเงิน โดยที่ค่า b* เป็นบวก แสดงถึงวัตถุมีสีเหลือง หากมีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

โดยค่า a* และ b* มีค่าอยู่ระหว่าง -60 ถึง +60

ค่าดัชนีความขาว (Whiteness Index) = $100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$

2. การวัดคุณสมบัติทางเคมี

2.1 ปริมาณนิโคติน (nicotine) และคลอไรด์ (chloride)

การวิเคราะห์นิโคติน และคลอไรด์ ในใบยาสูบพันธุ์เวอร์ยิเนีย ที่ผ่านการใช้โอโซนเทียบกับใบยาสูบที่ไม่ผ่านโอโซน ด้วยเครื่อง segmented flow automate analyzer เป็นเครื่องสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในใบยา โดยระบบอัตโนมัติแบบ continuous flow analyzer จำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4 ช่องทาง ใช้ระบบฉีดสารละลายมาตรฐานเทียบกับตัวอย่างเข้ามาผสมกับสารเคมีในหน่วยทำปฏิกิริยาเคมี โดยการไหลของสารเข้าทำ ปฏิกิริยากันอย่างต่อเนื่อง ปฏิกิริยาดังกล่าวถูกแบ่งออกเป็นส่วน ๆ ด้วยฟองอากาศ (SFA, Segmented Flow Analysis) เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้นเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนไหลผ่านไปยังเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน และประมวลผลเป็นปริมาณความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยสามารถทำ การวิเคราะห์ nicotine , total reducing sugars , ammonia และ chloride ได้พร้อมกัน โดยนำตัวอย่างส่งวิเคราะห์กองดิน และปุ๋ย สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง

2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิ่ง (reducing sugar)

วิธีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิ่ง (reducing sugar) วิเคราะห์ตามวิธีของ Nelson's reducing sugar (Hodge and Hofreiter, 1962)

2.2.1 นำใบยาสูบเวอร์ยิเนียก่อน และหลังผ่านโอโซน มาบดให้ละเอียดจนเป็นผงจากนั้นนำมาชั่ง 0.05 กรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25 × 150 มิลลิลิตร แล้วเติมเอทานอล (ethanol) 85 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยลูกแก้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเขย่าหลอดทดลองทุก ๆ 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ระหว่างเอทานอลกับน้ำตาล หลังจากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.2.2 นำสารละลายที่สกัดได้จากข้อ 2.2.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วทำ blank ควบคู่ไปด้วย โดยเติมน้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง เติม Nelson's alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที หลังจากนั้นแช่หลอดในน้ำเย็นจนสารละลายในหลอดเย็นลงซึ่งจะเกิดตะกอนของ CuO_2 ละลายหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.3 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.2.2 ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดจากค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (spectronic 21) ของ blank ให้อ่านค่าได้เท่ากับศูนย์ก่อน นำค่า OD (Optical Density คือ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่อง spectrophotometer) ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งโดยเทียบกับสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของ D – glucose ผลการวิเคราะห์ที่ได้เทียบกับมิลลิกรัมของ D – glucose

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved