ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างจากใบ (Total nonstructural carbohydrate; TNC)

การเตรียมสาร reagent

1. Nelson's reagent A

เตรียมสารละลาย Anhydrous sodium carbonate จำนวน 25 กรัม sodium potassium tartrate จำนวน 25 กรัม sodium bicarbonate จำนวน 20 กรัม และanhydrous sodium sulfate จำนวน 20 กรัม

2. Nelson's reagent B

เตรียมสารละลาย Copper sulfate จำนวน 15 กรัม ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น จำนวน 2 หยด คนให้เกลือ copper sulfate ละลายจนหมด

3. Nelson's alkaline copper reagent

นำ Nelson's reagent A จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Nelson's reagent B จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ผสมเขย่าให้เข้ากัน การใช้ Nelson's alkaline copper reagent แต่ละครั้งควรเตรียมใหม่

4. Arsenomolybdic acid reagents

4.1 ละลาย ammonium molybdate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$. $4H_2O$] จำนวน 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น จำนวน 21 มิลลิลิตร

4.2ละลาย disodium hydrogen arsenate [Na_2HasO_4. $7H_2O$] จำนวน 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

4.3นำสารละลายข้อ 4.2 ผสมลงไปในสารละลายในข้อ 4.1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาใช้สารละลายที่ได้ต้องเป็นสีเหลืองเท่านั้น

วิธีการสกัด

การสกัด TNC จากตัวอย่างพืช จะใช้สารละลายกรดเจือจาง (0.2 N H_2SO_4) ตามวิธีการของ Smith *et al.* (1964) โดยชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิทและบดละเอียดแล้ว 0.10 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน hot air oven หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ปรับค่า pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH 0.1 และ 2 N กับ H_2SO_4 0.5 และ 5% แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตรเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

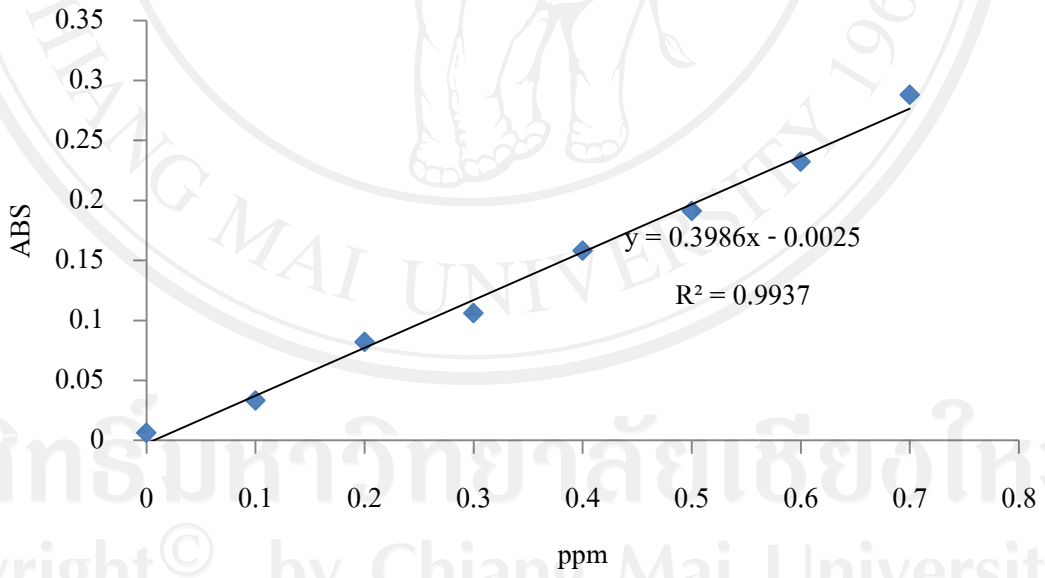
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย D-glucose เข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ใช้สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร เติม Nelson's alkaline copper reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยนำไปวางในน้ำเย็น แล้วเติมสารละลาย Arsenomolybdic acid reagents 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกน Y)



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้าง (TNC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในตัวอย่าง

นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างใส่ในหลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานนำค่า absorbance (A) ที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่

ทำไว้แล้วคำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

วิธีการคำนวณ

$$TNC = \frac{\text{(mg) glucose equivalent} \times \text{vol make}}{\text{Wt. of sample} \times \text{vol take}}$$

vol make = ปริมาตรสุดท้ายหลังจากปรับ pH ให้เป็น 7 (50 มิลลิลิตร)

vol take = ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ทดสอบค่าการดูดกลืนแสง (1 มิลลิลิตร)

การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ดัดแปลงโดย Ohyama *et al*., 1985; 1986)

วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดทดลองขึ้นมาพักทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำซ้ำเติมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม (Indolphenol Method) (Ohyama *et al*., 1985; 1986)

1. การเตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

- A reagent ซั่งโซเดียมคีเลต (EDTA.2Na) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้ 10 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติมสารละลาย เมทิลเรด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(methylred) 20 มิลลิลิตร (เมทิลเรด 0.05 กรัม + 60% เอทานอล 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

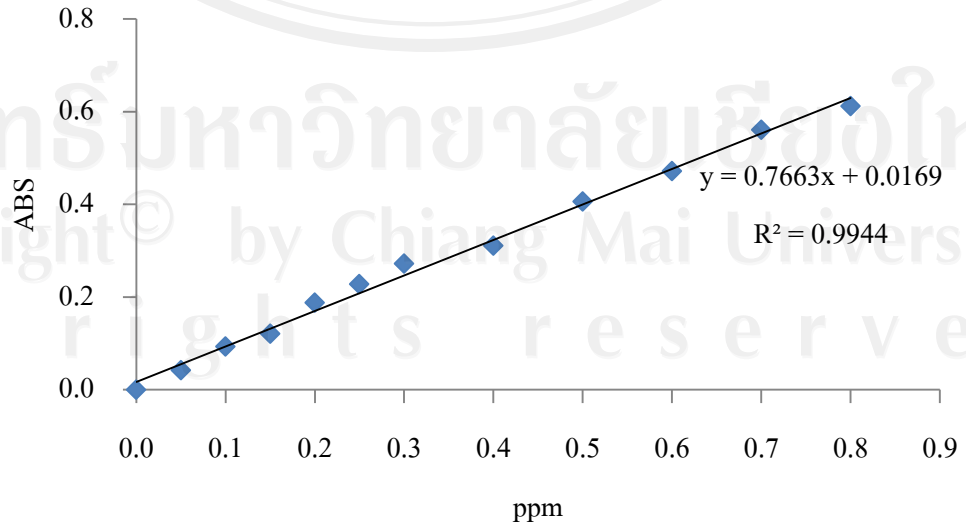
• B reagent ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 136.09 กรัม ใส่ บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งกรดเบนโซอิค (benzoic acid) 2.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปปั่นโดยใช้ stirrer ปรับอุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส จนละลายหมดนำมารวมกันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

• C reagent ชั่งโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ (sodium nitroprusside) 0.1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) จากนั้นเติมฟีนอล (phenol) 10.25 มิลลิลิตร (นำฟีนอลไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จะได้ฟีนอลที่เป็นของเหลว) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

• D reagent ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 7.06 กรัม และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต ($Na_3PO_4.12H_2O$) 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (sodium hyperchlorite) 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N (ชั่งโซเดียม ไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร)

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานจากแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวด



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณไนโตรเจนรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้น ที่ต้องการ โดยกรดซัลฟูริก 0.5 N เตรียมจากกรดซัลฟูริก 13.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้จากข้อ 2 ปริมาตร 0.3 - 0.5 มิลลิลิตร (ขึ้นกับส่วนของพืช) เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วนำมาไตรเตรทโดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N ลงไป เขย่าเล็กน้อย ให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืชตัวอย่างที่ใช้ย่อย) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืชตัวอย่างที่ใช้ย่อย)} = \frac{A \times B \times C}{D \times E \times 10000} \times 10$$

A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = ปริมาตรสุดท้ายในปฏิกิริยา Indolphenol (25 มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (50 มิลลิลิตร)

D = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

E = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

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

1. เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสจำนวน 3 ชนิดดังนี้

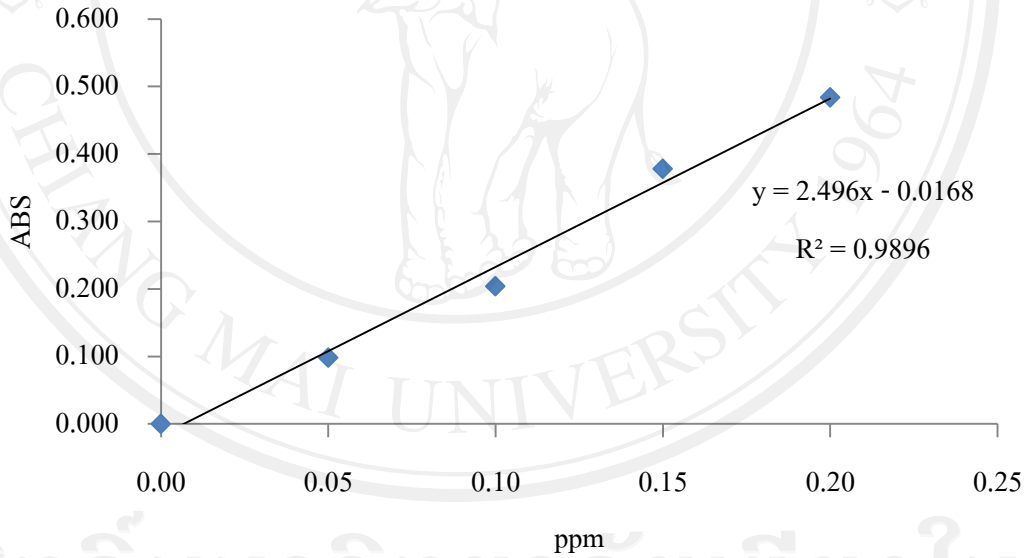
- A reagent ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรอง
- B reagent เตรียมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- C reagent นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร ค่อย ๆ เท A reagent ทีละน้อย อย่างช้า ๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

2. เตรียมสารละลายสเทนัสคลอไรด์ ($SnCl_2.2H_2O$) โดยชั่งสเทนัสคลอไรด์ 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควัน) เติมกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใช้ได้ 3 วัน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.716 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 4 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร ได้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ



ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณฟอสฟอรัส

4. ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติมสเทนัสคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืชตัวอย่างที่ใช้ย่อย) และเปลี่ยนหน่วย (กรัมต่อพืชตัวอย่าง 1 กรัม) เช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นของไนโตรเจน

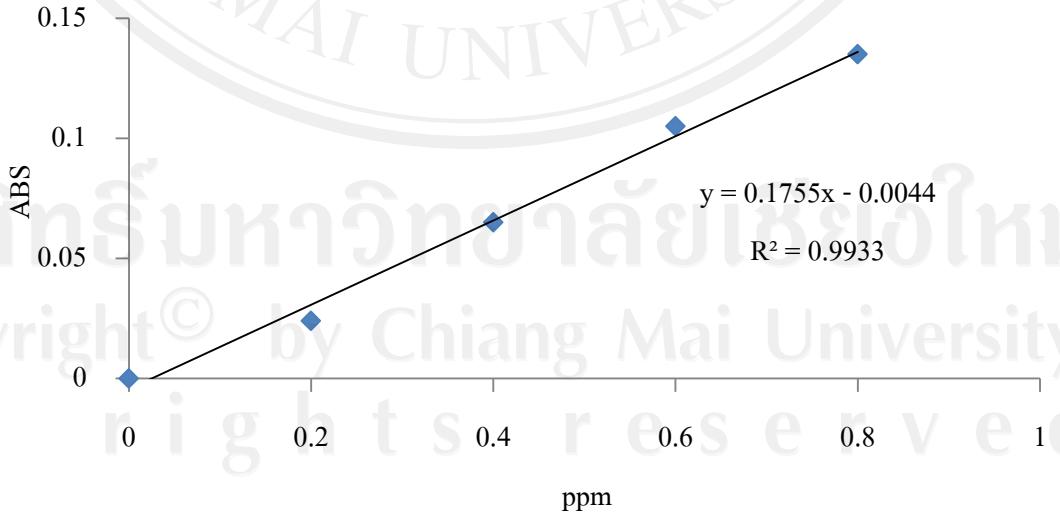
การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม (Mizukoshi *et al.*, 1994)

วิธีการสกัด

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$) 0.4 มิลลิลิตร และกรดไนตริก (HNO_3) 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO^{2-} ออกให้หมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้ง ระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจาง ($HCl:H_2O$ อัตราส่วน 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมที่มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, และ0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

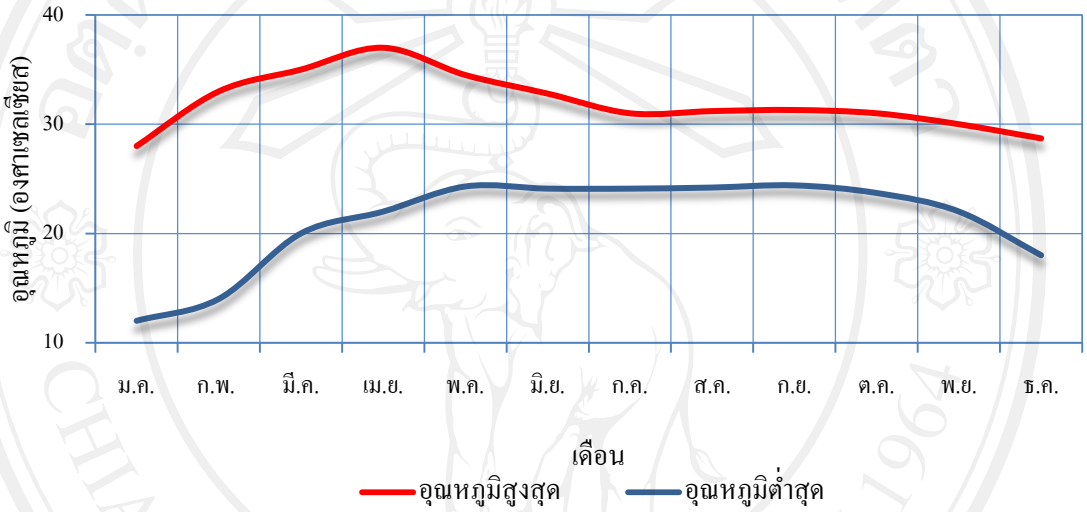


ภาพภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานในการวัดปริมาณโพแทสเซียม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

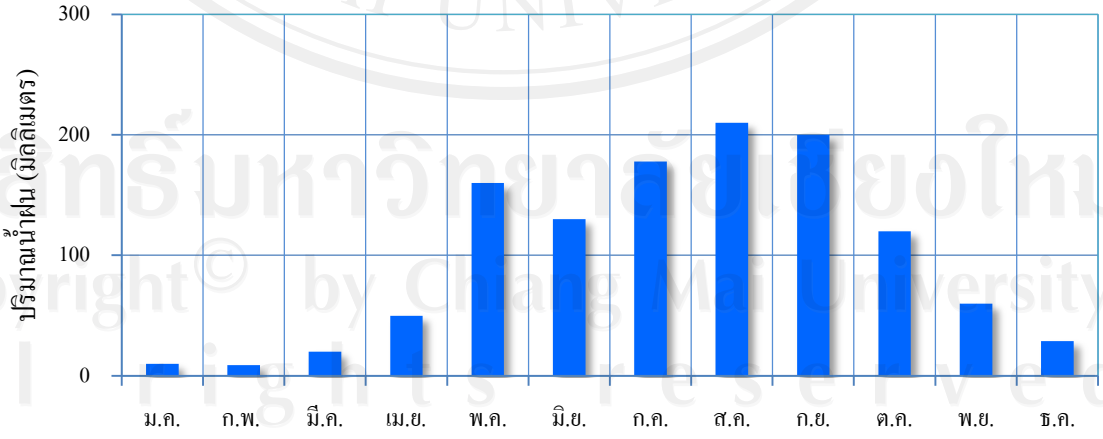
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างที่สกัดไว้ โดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดความเข้มข้นของโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืชตัวอย่างที่ใช้ย่อย) และเปลี่ยนหน่วย (กรัมต่อพืชตัวอย่าง 1 กรัม) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน



ภาพภาคผนวกที่ 5 อุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ยแต่ละเดือนในรอบปี พ.ศ. 2553

ที่มา : ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่



ภาพภาคผนวกที่ 6 ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยรายเดือนในรอบปี พ.ศ. 2553

ที่มา : ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นาย จริญญา ปัญญาแก้ว
วัน เดือน ปี เกิด	20 ตุลาคม 2528
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาโรงเรียนจักรคำคณาทร จังหวัดลำพูน ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved