บทที่ 3
วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ผลลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิ์ (*Litchi chinensis* Sonn. cv Chakkrapat) ซื้อจากสวนเกษตรกร ในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549 โดยใช้ผลลิ้นจี่ที่มีระยะแก่ทางการค้า ผิวมีสีแดง 90-100% ดังรูปที่ 3.1 นำผลลิ้นจี่มาตัดก้านออกโดยตัดให้มีก้านเหลือติดผลยาว ประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร และคัดเลือกเอาเฉพาะผลลิ้นจี่ที่ดี ไม่มีความเสียหาย และมีขนาดสม่ำเสมอกัน จากนั้นมาทดลองทันที

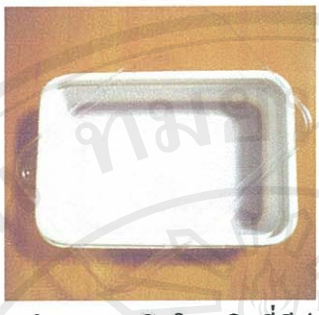
รูปที่ 3.1 ผลลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิ์ที่ซื้อจากสวนเกษตรกร ในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

3.2 วิธีการทดลอง

นำผลลิ้นจี่ (ชุดละ 30 ผล) แช่ในสารละลายกรด 3 ชนิด คือ สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 2.0%, สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 2.0%, สารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.0% และแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที และใช้ผลลิ้นจี่ที่ไม่ได้แช่เป็นชุดควบคุม ผึ่งให้เปลือกนอกแห้ง บรรจุใส่ในกล่องพลาสติกใสชนิดที่มีฝาปิดสนิทขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 4 x 6 x 1.5 นิ้ว (รูปที่ 3.2) แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นเวลา 20 วัน ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ ๆ ละ10 ผล และสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์คุณภาพทุกๆ 5 วัน โดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวเคมี



รูปที่ 3.2 กล่องพลาสติกใสชนิดที่มีฝาปิดสนิท

การเตรียมสารละลายกรด

ก) สารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 2.0% เตรียมโดยชั่งกรดซิตริก (citric acid, Food Grade, เวชวิทย์; Thailand) จำนวน 14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร สารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 2.19

ข) สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 2.0% เตรียมโดยชั่งกรดทาร์ทาริก (tartaric acid, Merck; Germany) จำนวน 14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร สารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 2.07

ค) สารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 2.0% เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก (oxalic acid, AR Grade, Fisher scientific; U.K.) จำนวน 14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร สารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 1.70

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ย และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple-range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.4.1 เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

การวิเคราะห์การสูญเสียน้ำหนักใช้ผลลิ้นจี่ชุดเดียวกันตลอดการทดลอง โดยชั่งน้ำหนักผลลิ้นจี่ที่บรรจุอยู่ในกล่องทุกๆ 5 วัน ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance

Dielhemim : HF-3000G; Switzerland) น้ำหนักที่ชั่งได้เป็นน้ำหนักผลลิ้นจี่รวมกับกล่องบรรจุ (น้ำหนักผลลิ้นจี่ + น้ำหนักกล่องบรรจุ) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักวันเริ่มต้น - น้ำหนัก ณ วันที่ชั่ง}}{\text{น้ำหนักวันเริ่มต้น}} \times 100$$

3.4.2 การวัดสีเปลือกด้านนอกของผลลิ้นจี่

วัดสีเปลือกด้านนอกผลลิ้นจี่ผลละ 2 จุด โดยใช้ผลลิ้นจี่ 10 ผลต่อซ้ำ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้เครื่อง Colorimeter (Colorimeter, Hunterlab : ColorQuest II, U.S.A.) บันทึกค่าในระบบ CIE 1976 ซึ่งแสดงค่าเป็น L*, a* และ b*

โดยค่า L* = The lightness factor (value)

ค่า L* เป็นค่าแสดงสีขาว - ดำ ถ้า L* มีค่าเป็นศูนย์ หมายถึงวัตถุมีสีดำ หาก L* มีค่าเป็น 100 หมายถึงวัตถุมีสีขาว

a* และ b* = The chromaticity coordinates

ค่า a* เป็นค่าแสดงถึงสีแดงและสีเขียว ถ้า a* มีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีแดง หาก a* มีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีเขียว

ค่า b* เป็นค่าแสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน ถ้า b* มีค่าเป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีเหลือง หาก b* มีค่าเป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีน้ำเงิน

นำ a* และ b* มาคำนวณหาค่า Chroma (C*) และ Hue angle (H°) จากสมการ

$$\text{Chroma} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$\text{Hue angle} = (\tan^{-1}(b^*/a^*)/6.2832) \times 360 \text{ ถ้า } a^* > 0 \text{ และ } b^* > 0$$

ค่า Chroma เป็นค่าแสดงถึงความเข้มของสี ถ้าค่า Chroma มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีซีดจาง (เทา) หากค่า Chroma มีค่ามากขึ้นแสดงว่า วัตถุนั้นมีความเข้มสีเพิ่มมากขึ้น

ค่า Hue angle เป็นค่าแสดงถึงสีแท้จริงที่ปรากฏให้เห็น เป็นมุมตกกระทบของค่า a* ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา Hue angle แต่ละช่วงองศาแสดงสีแตกต่างกันดังนี้

0-45 องศา แสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง
45-90 องศา แสงสีส้มแดงถึงสีเหลือง
90-135 องศา แสดงสีเหลืองถึงเหลืองเขียว
135-180 องศา แสดงสีเหลืองเขียวถึงเขียว
180-225 องศา แสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงิน
225-270 องศา แสดงสีน้ำเงินเขียวถึงน้ำเงิน
270-315 องศา แสดงสีน้ำเงินถึงม่วง
315-360 องศา แสดงสีม่วงถึงม่วงแดง
(McGuire, 1992)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 การวิเคราะห์หาความชื้นของเปลือกผลลิ้นจี่

การวิเคราะห์หาความชื้นของเปลือกผลลิ้นจี่ใช้วิธีการอบแห้งที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียสจนได้น้ำหนักคงที่ (ลักขณาและนิธิยา, 2544)

อบ moisture can ให้แห้งสนิทในตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert; Um 100-800, Germany) ประมาณ 20-30 นาที ทำให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของ moisture can ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance, Satorius : CP224S; Germany)

ชั่งตัวอย่างเปลือกของผลลิ้นจี่ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัม (สุ่มมาจากเปลือกผลลิ้นจี่ 10 ผล) ใส่ลงใน moisture can ที่ผ่านการอบแห้งและทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบลมร้อนควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 100-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง นำออกมาจากตู้อบลมร้อน ปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ ซึ่งค่าที่ได้จะต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งหาน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณหาน้ำหนักที่หายไป ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \times 100$$

3.5 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.5.1 ค่าพีเอชของเปลือกผลลิ้นจี่

นำเปลือกผลลิ้นจี่มา 2 กรัม บดเปลือกผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Consort : C830; Belgium) และก่อนใช้เครื่องวัดพีเอชทุกครั้งจะต้องผ่านการปรับค่ามาตรฐานโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 4.0 และ 7.0 (Buffer solution, Merck; Germany) ตามลำดับ ทำการวัดค่าพีเอชของเปลือกผลลิ้นจี่ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองที่ได้

3.5.2 ค่าพีเอชของเนื้อผลลิ้นจี่

นำเนื้อผลลิ้นจี่ทั้ง 10 ผลต่อซ้ำ ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่น (Blender, Nationl; Japan) แล้วนำมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Consort : C830; Belgium) และก่อนใช้เครื่องวัดพีเอชทุกครั้งจะต้องผ่านการปรับค่ามาตรฐานโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานพีเอช 4.0 และ 7.0 (Buffer solution, Merck; Germany) ตามลำดับ ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

นำน้ำปั่นของเนื้อผลลิ้นจี่ที่ได้จากข้อ 3.5.2 มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer, Atago : Model N1; Japan) ซึ่งวัดค่าได้ระหว่าง 0-32% โดยก่อนใช้ทุกครั้งได้ปรับค่าให้เป็น 0 ด้วยน้ำกลั่นและวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.5.4 ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้

วัดปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างเนื้อของผลลิ้นจี่ โดยวิธีการไทเทรตและคำนวณผลในรูปของกรดมาลิก ตามวิธี AOAC (2000)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH, AR grade, Merck; Germany) จำนวน 4.0 กรัม โดยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance, Ohaus : Prision Standard; U.S.A.) ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือด และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายด่างที่ได้ไปเปรียบเทียบความเข้มข้นกับสารละลายมาตรฐาน potassium hydrogen phthalate (potassium hydrogen phthalate, $C_8H_5KO_4$, AR grade, Merck; Germany) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล เพื่อหาความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายด่าง

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจากข้อ 3.5.2 จำนวน 5 กรัม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับน้ำกลั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer, Gallenkemp; Netherland) นำสารละลายตัวอย่างไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล วัดค่าพีเอชของสารละลายที่ไทเทรตจนเครื่องวัดพีเอช (pH Meter, Consort : C830; Belgium) อ่านค่าพีเอชได้ 8.1 จึงยุติ บันทึกปริมาตรของสารละลายด่างที่ใช้ ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดมาลิก มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ โดย milliequivalent weight of malic acid = 0.067

$$\%\text{กรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้} = \frac{\text{ความเข้มข้น NaOH (N) x ปริมาตร NaOH (ml) x 0.067 x 100}}{\text{น้ำหนักของเนื้อลิ้นจี่ (g)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.5 ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีในตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ โดยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลาย indophenol dye (Ranganna, 1977)

การเตรียมสารละลาย

ก) กรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดออกซาลิก (oxalic acid, AR grade, Fisher Scientific; UK.) จำนวน 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ข) 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ (indophenol dye) เตรียมโดยชั่ง 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenol indophenol, Merck; Germany) จำนวน 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำ

ค) สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ชั่งกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, Merck; Germany) จำนวน 0.05 กรัม ละลายในสารละลายกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ดังนั้น สารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐานมีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน 10 มิลลิลิตรไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ แล้วบันทึกปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ใช้ไป (สมมุติเท่ากับ a มิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

วิธีวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างเนื้อลิ้นจี่ที่ปั่นเป็นเนื้อเดียวกันจากข้อ 3.5.2 จำนวน 1 กรัม ใส่ลงในฟลาสค์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมกรดออกซาลิกความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ จนถึงจุดยุติ ซึ่งสารละลายในฟลาสค์มีสีชมพูคงตัวประมาณ 15 วินาที บันทึกปริมาตรสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ใช้ (สมมุติเท่ากับ b มิลลิลิตร) ทำการไทเทรตซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยใช้ปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอลที่ใช้ไปโดยเปรียบเทียบกับสารละลาย 2,6-ไดคลอโรฟีนอลอินโดฟีนอล ที่ใช้กับสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน วิธีคำนวณมีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมมุติปริมาตร indophenol dye a มิลลิลิตรไทเทรตพอดีกับวิตามินซีมาตรฐาน เท่ากับ 1 มิลลิกรัม

ดังนั้นสารละลายตัวอย่างใช้ indophenol dye เท่ากับ b มิลลิตร แสดงว่า
ปริมาตร indophenol dye b มิลลิลิตรไทเทรตกับวิตามินซี เท่ากับ (1xb)/a = c มิลลิกรัม

นั่นคือ เนื้อตัวอย่าง 1 กรัม มีวิตามินซี เท่ากับ c มิลลิกรัม

3.5.6 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากเปลือกของผลลิ้นจี่

การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานิน ทำโดยการสกัดสารแอนโทไซยานินด้วยสารละลายเอทานอลิกไฮโดรคลอริก แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร (Ranganna, 1977)

การเตรียมสารละลาย

ก) กรดไฮดรอคลอริก ความเข้มข้น 1.5 นอร์มัล เตรียมโดยใช้กรดไฮดรอคลอริก (hydrochloric acid, HCl, Fisher scientific; U.K.) ปริมาตร 62.17 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

ข) เอทานอลิกไฮโดรคลอริก (เอทานอล : กรดไฮโดรคลอริก) ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (Ethanol 95%, Food Grade, สยามเอทานอล, Thailand) ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก 1.5 นอร์มัล ในอัตราส่วน 85 : 15 แล้วเก็บรักษาไว้ในขวดสีชา

วิธีวิเคราะห์

นำเปลือกผลลิ้นจี่จำนวน 0.25 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดที่มีสารละลายเอทานอลิกไฮโดรคลอริกปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันสักครู่ ปิดฝาขวด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเอาเปลือกลิ้นจี่ออกด้วยกระดาษกรอง Whatmam No.1 และนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมาปรับปริมาตรด้วยเอทานอลิกไฮดรอคลอริก ให้มีปริมาตรทั้งหมด 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลิกไฮโดรคลอริกเป็นตัวปรับศูนย์ (blank) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดตามสูตร

$$\text{Total absorbance} = \frac{\text{Absorbance at 535 nm x final volume}}{\text{Weight}} \times 100$$

$$\text{Total anthocyanin content} = \frac{\text{Total absorbance}}{98.2} \quad \text{(Ranganna,1977)}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.7 สารประกอบฟีนอลทั้งหมด

วิเคราห์หาสารประกอบฟีนอลทั้งหมด โดยการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80% แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (Singleton and Rossi, 1965; Ketsa and Atantee, 1998)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% เตรียมโดยตวงเอทานอลความเข้มข้น 95% จำนวน 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 95 มิลลิลิตร

ข) Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% เตรียมโดยปิเปตต์ Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu reagent, Fluka, Switzerland) จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ค) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส (sodium carbonate anhydrous, Carlo Erba, Germany) จำนวน 7.5 กรัม แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ง) สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งกรดแกลลิก (gallic acid, AR Grade, Merck, Germany) จำนวน 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% จำนวน 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ลงไปหลอดละ 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลองที่ได้ ทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (Ketsa and Atantee,1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

ชั่งเปลือกผลลิ้นจี่จำนวน 3.0 กรัม ใส่ในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลว บดเปลือกผลลิ้นจี่ให้ละเอียดเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้น 80% ที่เย็นลงไปจำนวน 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันดี เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง ด้วยความเร็ว 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวใส ซึ่งเป็นสารละลายที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ (Ketsa and Atantee, 1998)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำสารละลายใสที่สกัดได้มาเจือจาง 100 เท่าโดยปริมาตร ด้วยการนำสารละลายที่สกัดได้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วปิเปตต์มาจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ลงไปหลอดละ 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด โดยการเปรียบเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสดของเปลือกผลลิ้นจี่ (Singleton and Rossi,1965)

การคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำค่าที่อ่านได้จากสารประกอบฟีนอลมาตรฐานที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน รูปที่ 3.3 คำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$$y = 0.123x - 0.1184$$

โดย y = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้

x = ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเป็นไมโครกรัมในสารละลายเจือจาง (100 เท่า) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเปลือกผลลิ้นจี่ต่อกรัมน้ำหนักสด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด x/1000 มิลลิกรัม

สารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด $\frac{(x/1000) \times 10}{0.5}$ = a มิลลิกรัม

สารประกอบฟีนอลที่ใช้วิเคราะห์ได้มาจากการเจือจาง 100 เท่าโดยใช้สารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จึงมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด a มิลลิกรัม

สารละลายที่สกัดได้ทั้งหมดมีปริมาตร 12 มิลลิลิตร แสดงว่า

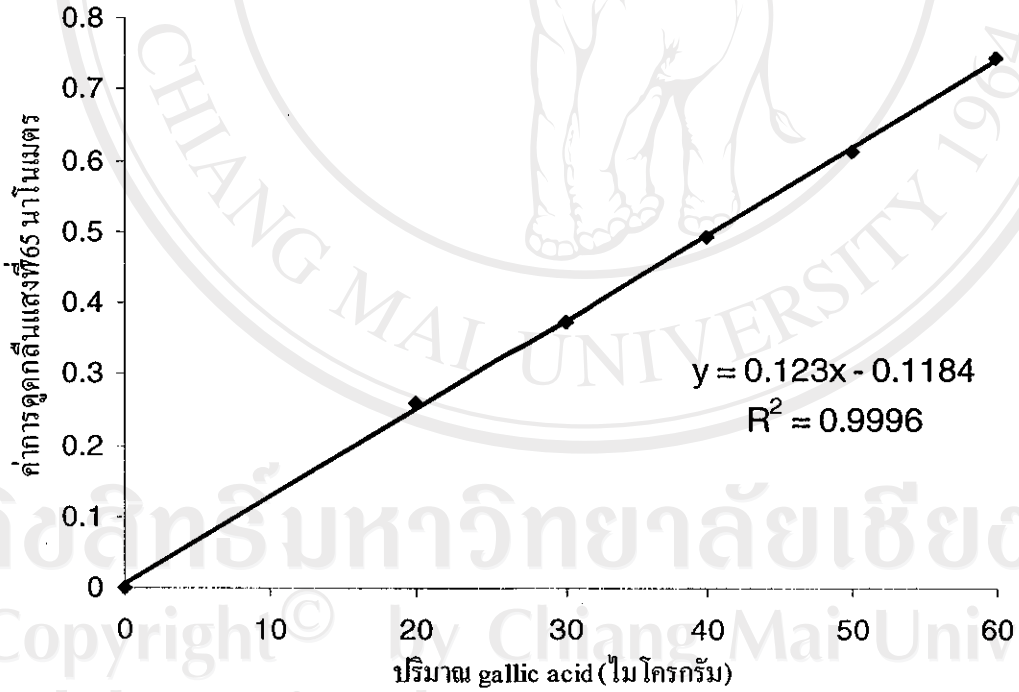
สารละลายที่สกัดได้มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด $a \times 12 = z$ มิลลิกรัม

สารประกอบฟีนอลได้มาจากตัวอย่างเปลือกผลลิ้นจี่ 3 กรัม

แสดงว่า เปลือกผลลิ้นจี่ 3.0 กรัม มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ z มิลลิกรัม

เปลือกผลลิ้นจี่ 1.0 กรัม มีสารประกอบฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ z/3 มิลลิกรัม

รายงานผลปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด เป็นหน่วยมิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสด



รูปที่ 3.3 กราฟสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมี

3.6.1 การสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และพอลีฟีนอลออกซิเดส

สกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและพอลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 (Flurkey and Jen, 1978)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, NaCl, Merck; Germany) จำนวน 11.7467 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (disodium hydrogen phosphate, $Na_2HPO_4.2H_2O$, AR Grade, Merck; Germany) จำนวน 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต (sodium dihydrogen phosphate, $NaH_2PO_4.H_2O$, AR Grade, Merck; Germany) จำนวน 7.8005 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ง) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.2 เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ค) จำนวน 100 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายจากข้อ ข) พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายผสมมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.2

จ) สารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์ คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ง) จำนวน 25 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายจากข้อ ก) จำนวน 12.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีวิเคราะห์

ชั่งเปลือกผลลิ้นจี่จำนวน 3.0 กรัม ใส่ในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดเปลือกผลลิ้นจี่ให้ละเอียด จากนั้นเติมสารสะลายสำหรับสกัดเอนไซม์ คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไปจำนวน 12 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่าง : ปริมาตรสารละลายสำหรับสกัดเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่ากับ 1:3) บดเปลือกของผลลิ้นจี่กับสารละลายที่ใช้สกัดเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge, Hettich Zentrifugen : Rotina 46R; Germany) ความเร็ว 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) นำไปใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.6.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

วิธีวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สารกัวอะคอลเป็นสับสเทรต ในขณะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์คือเตตระกัวอะคอล (สีน้ำตาล) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (Flurkey and Jen, 1978)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโซเดียมแอซีเทตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมแอซีเทตแอนไฮดรัส (sodium acetate, CH_3COONa, AR Grade, Merck; Germany) จำนวน 0.8377 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) กรดแอซีติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตต์กรดแอซีติก (glacial acetic acid, AR Grade, Merck; Germany) จำนวน 0.57 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ค) สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0 เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ก) จำนวน 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายจากข้อ ข) พร้อมคนสารละลายผสมตลอดเวลาจนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.0

ง) สารละลายกัวอะคอลความเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งกัวอะคอล (guaiacol, AR Grade, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.25 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

จ) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% (hydrogen peroxide 30%, AR Grade, Calo Erba, Germany) จำนวน 3.33 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ฉ) สารละลายสับสเทรตของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 (ซึ่งประกอบด้วยกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1%) เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ง) จำนวน 125 มิลลิลิตรและสารละลายจากข้อ จ) จำนวน 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

* สารละลายในข้อ ง) จ) และ ฉ) ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง

วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.1 จำนวน 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวตต์ที่มีสารละลายสับสเทรต จากข้อ จ) จำนวน 2.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermo Spectronic : Biomate5; U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อ่านค่าทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 1 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นหน่วย/ นาที/ มิลลิกรัมโปรตีน

3.6.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้สารละลายสับสเทรตที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Flurkey and Jen, 1978)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 9.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ข) สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 6.97 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 เตรียมโดยนำสารละลายจากข้อ ข) จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พร้อมคนสารละลายผสมให้เข้ากันตลอดเวลา จนสารละลายมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

ง) สารละลายแคทีคอลความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ เตรียมโดยชั่ง 4-เมทิลแคทีคอล (4-methylcatechol, AR Grade, Sigma, Germany) จำนวน 2.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

ปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.1 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในคิวเวตต์ที่มีสารละลายสับสเทรต ที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.5 จากข้อ ค) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และสารละลายแคทีคอลจากข้อ ง) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermo Spectronic : Biomate5; U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อ่านค่าทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 8 นาที นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.5 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดสเป็นหน่วย/ นาที/ มิลลิกรัมโปรตีน

3.6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี dye binding ตามวิธีของ Bradfort (1976)

การเตรียมสารละลาย

ก) สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.6.1 จ)

ข) สารละลายโปรตีนมาตรฐานเตรียมโดย

- Stock solution ความเข้มข้น 1% เตรียมโดยชั่งโปรตีนมาตรฐาน (Bovine serum albumin, AR Grade, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.2500 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- Working solution ความเข้มข้น 0.02% (200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เตรียมโดยปิเปตต์สารละลาย stock solution จำนวน 500 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ด้วยสารละลายจากข้อ ก)

ค) สารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 เตรียมโดยชั่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Fluka, Switzerland) จำนวน 0.0125 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95% จำนวน 12.5 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก (*ortho*-phosphoric acid, Merck, Germany) จำนวน 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปิเปตต์สารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.02% (working solution) จำนวน 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดแต่ละหลอด โดยให้ปริมาตรรวมทั้งหมดในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 จากข้อ ค) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตต์สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.6.1 จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 จากข้อ ค) ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

วิธีการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 จะได้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ A หน่วย

สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 0.10 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ A หน่วย
สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ A×10 = Bหน่วย
แสดงว่า สารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ B หน่วย/มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส

กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.5 จะได้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ C หน่วย

สารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่ 0.30 มิลลิลิตร มีกิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ C หน่วย
สารละลายที่สกัดได้ 1 มิลลิลิตรมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ C×1/0.30 = D หน่วย

แสดงว่า สารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ D หน่วย/มิลลิลิตร

วิธีการคำนวณหาปริมาณของโปรตีน

นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน รูปที่ 3.4 คำนวณหาสูตรสมการเส้นตรงได้ ดังนี้

$$y = 0.1268x - 0.1193$$

โดย y = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้

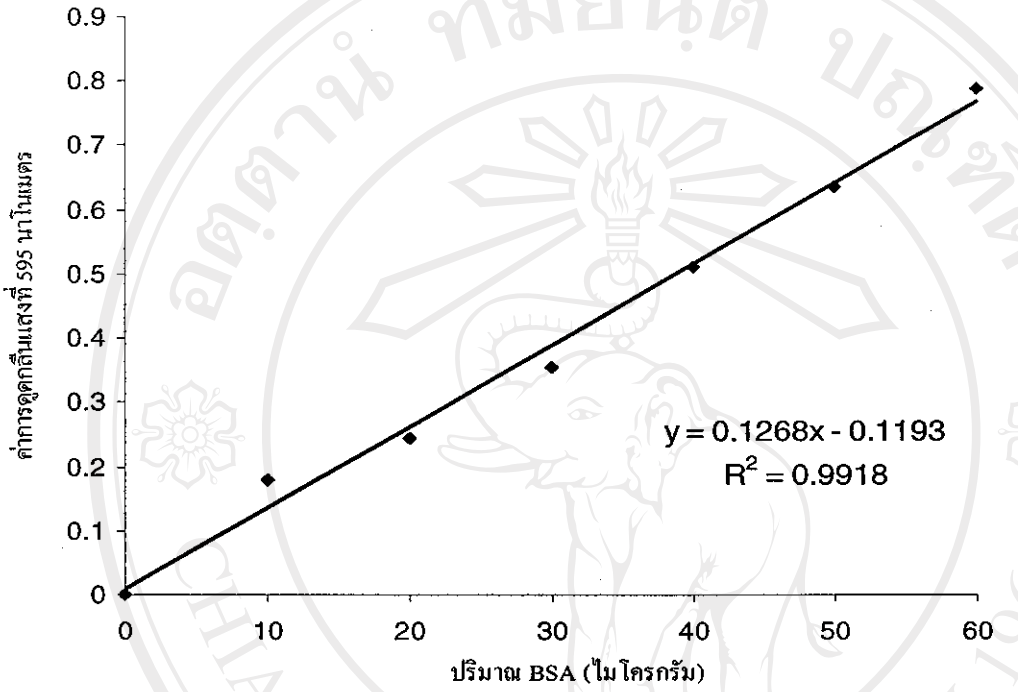
x = ปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ (ไมโครกรัม)

จากนั้นนำค่า x ที่ได้มาคำนวณหาโปรตีนในสารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่ นั่นคือสารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่ 200 ไมโครลิตร มีโปรตีนที่ละลายได้เท่ากับ E ไมโครกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่ 1 ไมโครลิตร มีโปรตีนที่ละลายได้ เท่ากับ E/200 = F ไมโครกรัม

แสดงว่าสารละลายที่สกัดได้จากเปลือกผลลิ้นจี่มีโปรตีนเท่ากับ F ไมโครกรัม/ไมโครลิตร หรือ เท่ากับ F มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานโปรตีน

วิธีการคำนวณหา specific activity ของเอนไซม์

$$\text{specific activity ของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์}}{\text{ปริมาณของโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม}}$$

$$\text{specific activity ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม}} = B/F$$

$$\text{specific activity ของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส}}{\text{ปริมาณโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม}} = D/F$$

ค่า specific activity ของเอนไซม์มีหน่วยเป็น หน่วย/มิลลิกรัมของโปรตีน/นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved