บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของวันที่แตกต่างกันในการทดลองกราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ก๊าซเอทิลีนโดยวิธี gas chromatography

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความเที่ยงตรงของกราฟมาตรฐานเมื่อทำในวันที่ต่างกัน

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. **วางแผนการทดลอง** แบบ 2 x 5 ปัจจัยร่วม ในสุ่มในบล็อคอย่างสมบูรณ์ ทำ 5 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 คือ วันที่ทำการทดลอง 2 วัน คือ 15 มกราคม และ 20 มกราคม 2541 ปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน 5 ระดับ คือ 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ส่วนต่อล้าน โดยหนึ่งหน่วยการทดลองคือปริมาณก๊าซเอทิลีนมาตรฐานที่ฉีดเข้าไปในเครื่อง gas chromatograph 1 มิลลิลิตร

2. **การเตรียมก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน** เตรียมก๊าซเอทิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1 และ 10 ส่วนต่อล้าน คือ เตรียม stock ที่ความเข้มข้น 15.46 ส่วนต่อล้าน (ดังรูปที่ 7) โดยเตรียมจากก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน 99.5% ใน Aerosol Containers, Filling Pressure 8 kg/cm^3, Content 5 L ของบริษัท เอส ที อี จำกัด

เมื่อเตรียม stock แล้วก็จะนำมาเตรียมก๊าซเอทิลีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 ส่วนต่อล้าน คำนวณได้จากสูตร

$$n_1v_1 = n_2v_2$$

$$15.46 \text{ สตล} \times v_1 = 10 \text{ สตล} \times 28.46 \text{ มล}$$

$$v_1 = 18.4 \text{ มล}$$

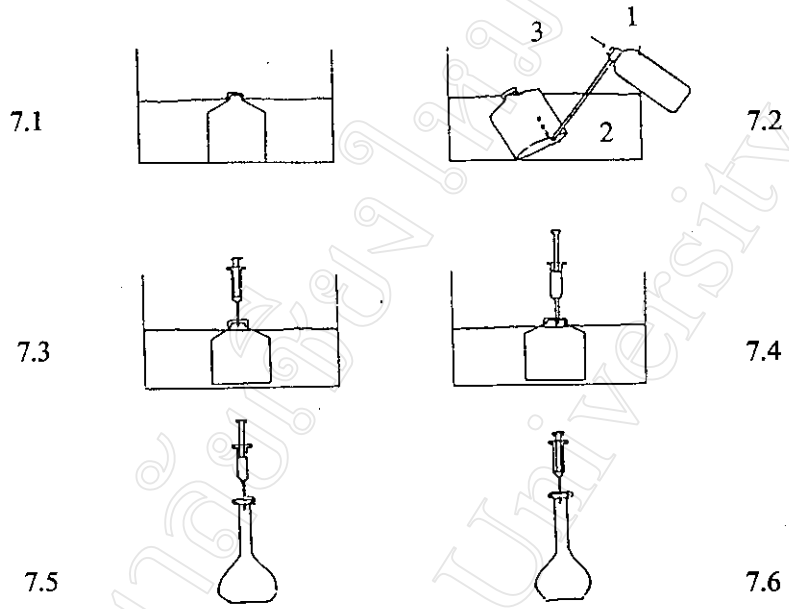
โดยที่ n_1 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทิลีนที่เป็น stock

n_2 คือ ความเข้มข้นของก๊าซเอทิลีนที่ต้องการเตรียม

v_1 คือ ปริมาตรของก๊าซเอทิลีนที่เป็น stock (ปริมาตรของ volumetric flask ขนาด 250 มล ; 261.81 มล)

v_2 คือ ปริมาตรของก๊าซเอทิลีนมาตรฐานที่ต้องการ (ปริมาตรของ erlenmayer flask ขนาด 25 มล ; 28.46 มล)

ดังนั้นจึงดูดก๊าซเอทิลีนมาจาก stock (15.46 ส่วนต่อล้าน) จาก volumetric flask ขนาด 250 มล ปริมาตร 261.81 มล (คำนวณจากน้ำหนักของ volumetric flask ที่บรรจุน้ำเต็ม-น้ำหนักของ volumetric flask เปล่า , 356.55 กรัม - 94.74 กรัม) ดูดมา 18.4 มล ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 20 มล แล้วฉีดใส่ลงใน erlenmayer flask ที่มีจุกยางปิดปากขวดอยู่ขนาด 25 มล ปริมาตร 28.46 มล (คำนวณเช่นเดียวกับปริมาตรของ volumetric flask) จะได้ก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน 10 ส่วนต่อล้าน (ดังรูปที่ 8)



รูปที่ 7 วิธีการเตรียมก๊าซเอทิลีนมาตรฐานที่ใช้เตรียมเป็น stock จากก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน 99.5%

7.1 นำขวดที่ตัดก้นออกและมีฝาจุกยางปิดปากขวดวางลงในอ่างน้ำ ตะแคงให้น้ำเข้าไปภายในขวดจนเต็ม ไม่มีอากาศเหลือภายในขวด

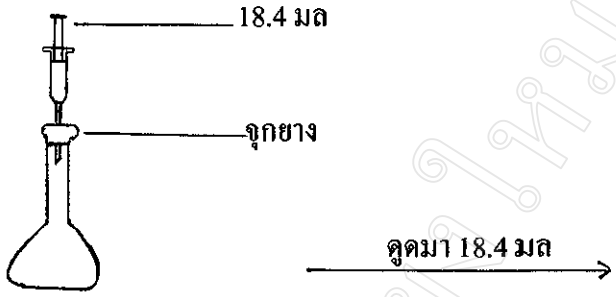
7.2 นำขวดก๊าซเอทิลีนมาตรฐานที่สวม syringe adaptor (ตำแหน่งที่ 1) เพื่อใช้สำหรับถ่ายก๊าซเอทิลีนจากกระป๋องไปยังขวดที่เตรียมตามรูปที่ 1 เมื่อสอดส่วนปลายของ syringe adaptor ตรงตำแหน่งก้นขวดที่ตัดปลายออกแล้ว (ตำแหน่งที่ 2) จากนั้นกดด้านบนของกระป๋อง (ตำแหน่งที่ 3) ก๊าซเอทิลีนมาตรฐานจากกระป๋องจะออกมาแทนที่น้ำและเข้าไปอยู่ภายในขวดและลอยขึ้นไปสะสมอยู่บริเวณใต้จุกยาง

7.3 นำเข็มฉีดยามาเสียบผ่านจุกยางปิดปากขวด

7.4 ดึงก้านเข็มฉีดยาเพื่อดูดก๊าซเอทิลีนมาตรฐานออกจากขวด

7.5 นำเข็มฉีดยาจากข้อ 7.4 มาเสียบผ่านจุกยางปิดปากขวดของ volumetric flask ที่ใช้สำหรับเป็นขวด stock

7.6 นำเข็มฉีดยาที่ดูดเอาก๊าซเอทิลีนมาตรฐานจากข้อ 7.5 มาฉีดตรงบริเวณจุกยางของขวด volumetric flask ที่ใช้สำหรับเป็นขวด stock



ขวด stock ความเข้มข้น 15.46 สตล (volumetric flask 250 มล ปริมาตร 261.81 มล)

Standard ethylene ความเข้มข้น 10 สตล (erlenmayer flask 25 มล ปริมาตร 28.46 มล)

รูปที่ 8 การเตรียมก๊าซเอทิลีนมาตรฐานความเข้มข้น 10 สตล จากขวด stock

สำหรับความเข้มข้นอื่นๆ ก็ทำเช่นเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้น 1 ส่วนต่อล้านจะดูดมาจาก stock ของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน (14.37 ส่วนต่อล้าน) มา 1.98 มล ฉีดใส่ลงใน erlenmayer flask (ปริมาตร 28.43 มล) ความเข้มข้น 0.1 ส่วนต่อล้านจะดูดมาจาก stock ของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน (ความเข้มข้น 1 ส่วนต่อล้าน ซึ่งเตรียมจาก stock ของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน 14.26 ส่วนต่อล้าน) มา 3.71 มล ฉีดใส่ลงใน erlenmayer flask (ปริมาตร 37.03 มล) ความเข้มข้น 0.01 ส่วนต่อล้านจะดูดมาจาก stock ของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0.1 ส่วนต่อล้านซึ่งเตรียมจาก stock ของก๊าซเอทิลีนมาตรฐาน 1 ส่วนต่อล้าน) มา 5.70 มล ฉีดใส่ลงใน erlenmayer flask (ปริมาตร 57.39 มล)

3. **การวิเคราะห์ก๊าซเอทิลีน** วิเคราะห์ก๊าซเอทิลีนโดยฉีดตัวอย่างก๊าซ 1 มิลลิลิตร เข้าไปตรง injector port unit ของเครื่อง gas chromatograph (GC) ยี่ห้อ SHIMADZU GC-14B รุ่น ACC-1400 ซึ่งตรวจวัดปริมาณเอทิลีนโดยใช้ H_2 – flame ionization detector (FID) และใช้ column stainless steel ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว ยาว 2 เมตร ซึ่งบรรจุ Porapak N 80-100 โดยใช้อุณหภูมิ injector , detector และ column 90 , 90 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4. **ระยะเวลาทำการทดลอง** มกราคม 2541

5. **การบันทึกผลการทดลอง** บันทึกพื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph โดยมีหน่วยเป็นตารางมิลลิเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นต่างๆ

6. **การวิเคราะห์ผลการทดลอง** วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, LSD, Polynomial Contrast, CV, Linear regression และ Correlation

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของความยาวยอดที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

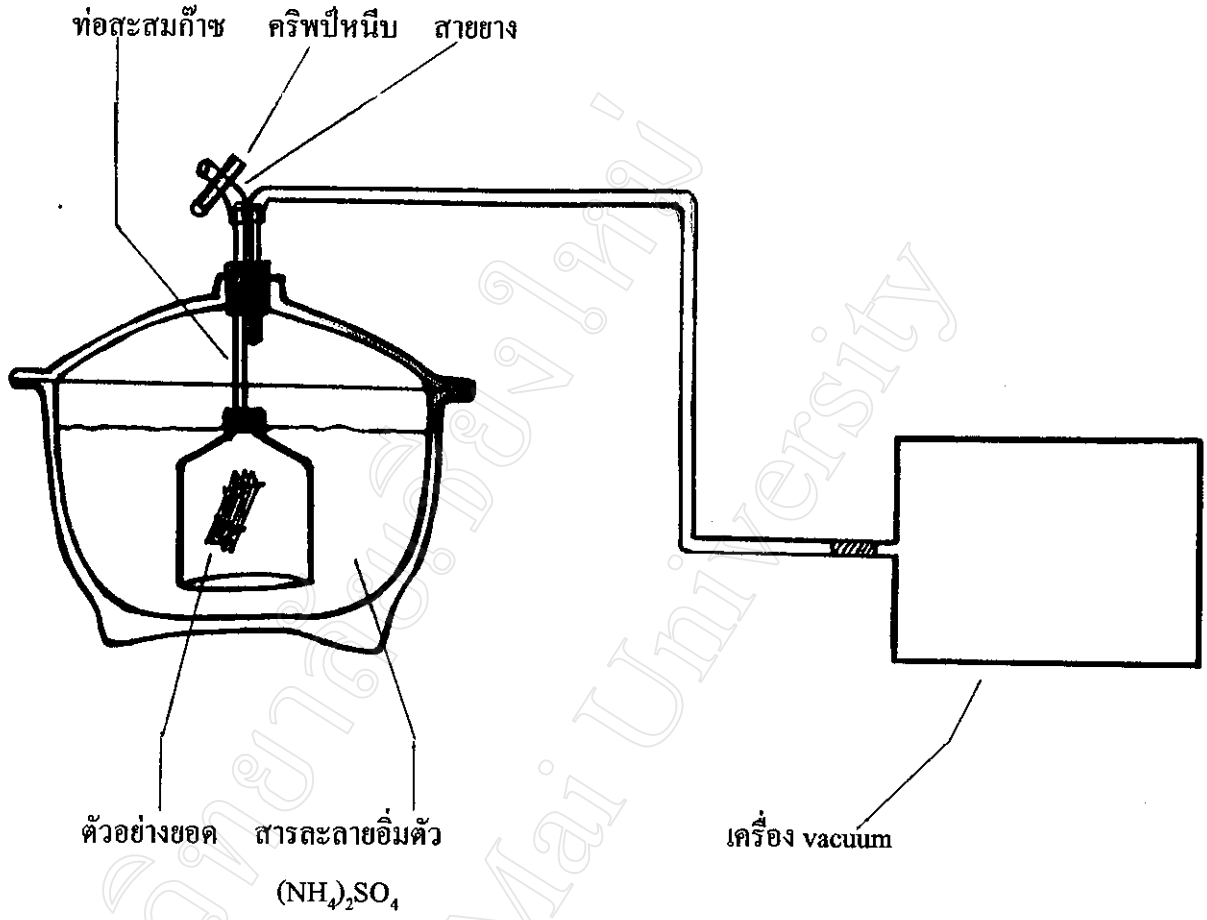
วัตถุประสงค์ เพื่อหาขนาดของความยาวยอดลิ้นจี่ที่เหมาะสมในการใช้วิเคราะห์ปริมาณก๊าซเอทิลีน

วิธีการทดลอง

1. **การวางแผนการทดลอง** วางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 7 ซ้ำ มี 3 วิธีการ ยอดมะปรางความยาว 5 , 7.5 และ 10 เซนติเมตร โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลองคือยอดมะปรางน้ำหนักประมาณ 10 กรัม

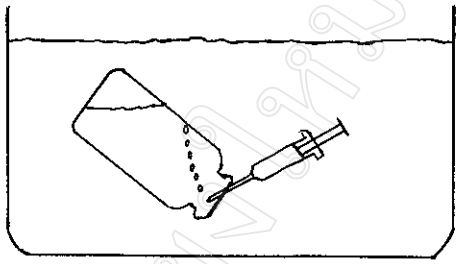
2. **การเก็บตัวอย่างยอดลิ้นจี่** ตัดยอดลิ้นจี่ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.2-0.3 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 1200 ยอด ริดใบทิ้งให้หมดแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกแช่ในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการทันที เพื่อทำการดูดก๊าซออกจากยอดลิ้นจี่

3. **การเตรียมตัวอย่างและการดูดก๊าซออกจากยอดลิ้นจี่** นำยอดลิ้นจี่มาตัดให้มีความยาว 10 เซนติเมตร แต่ละหน่วยการทดลอง ใช้ยอด 10 ยอด (น้ำหนักสดประมาณ 10 กรัม) ส่วนความยาว 7.5 เซนติเมตรแต่ละหน่วยการทดลองใช้ 15 ยอด (น้ำหนักสดประมาณ 10 กรัม) และสำหรับความยาว 5 เซนติเมตร แต่ละหน่วยการทดลองใช้ 20 ยอด (น้ำหนักสดประมาณ 10 กรัม) แต่ละหน่วยการทดลองใช้ยางรัดมัดรวมกัน แล้วนำไปดูดก๊าซออกจากยอดตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Saltveit (1982) โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการดูดก๊าซออกจากตัวอย่างใช้ desiccator ขนาด 10 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็น collection flask ที่มีท่อต่อติดกับฝาของ desiccator ท่อนี้จะมีสายยางต่ออยู่ด้านบนเพื่อใช้สำหรับเป็นที่ดูดก๊าซที่สกัดได้จากยอดเพื่อจะนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เมื่อจะดูดก๊าซออกจากตัวอย่าง ต้องเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่อิ่มตัว (ซึ่งเป็นสารละลายที่ดูดซับเอทิลีนน้อยมาก) โดยให้ห่างจากขอบลงไปประมาณ 1 นิ้ว (โดยสารละลายจะท่วม collection flask ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ค่อยๆ ปิดฝา desiccator แล้วใช้ลูกยางดูดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต (ตำแหน่งที่ 1) ให้ไหลขึ้นมาตามท่อสะสมก๊าซจนเต็มแล้วใช้คลิพปีนีบบริเวณสายยางที่ต่อกับท่อด้านบนให้แน่น จากนั้นใช้กระดาษกาว (masking tape) ปิดรอบบริเวณฝา desiccator เพื่อกันไม่ให้อากาศรั่วเข้าไปใน desiccator แล้วใช้สายยางต่อเข้ากับท่อที่ดูดอากาศออกจาก desiccator ไปยังเครื่อง vacuum (ดังรูปที่ 9)



ภาพที่ 9 อุปกรณ์และวิธีการดูดก๊าซออกจากตัวอย่างพืช

เริ่มดูดก๊าซออกจากยอดโดยเปิดเครื่อง vacuum โดยใช้แรงดูดประมาณ 600 มิลลิเมตรปรอท ก๊าซภายในยอดจะออกมาเป็นฟองและลอยขึ้นไปสะสมอยู่บริเวณด้านบนของท่อสะสมก๊าซ จับเวลาประมาณ 2 นาทีก็ปิดเครื่อง vacuum จากนั้นใช้ syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ปักลงตรงสายยางที่ต่อกับท่อสะสมก๊าซ แล้วดูดเอาก๊าซที่ได้ทั้งหมดนำไปฉีดเก็บไว้ในขวดวัคซีนขนาด 3 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการแทนที่สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ (ดังรูปที่ 10)



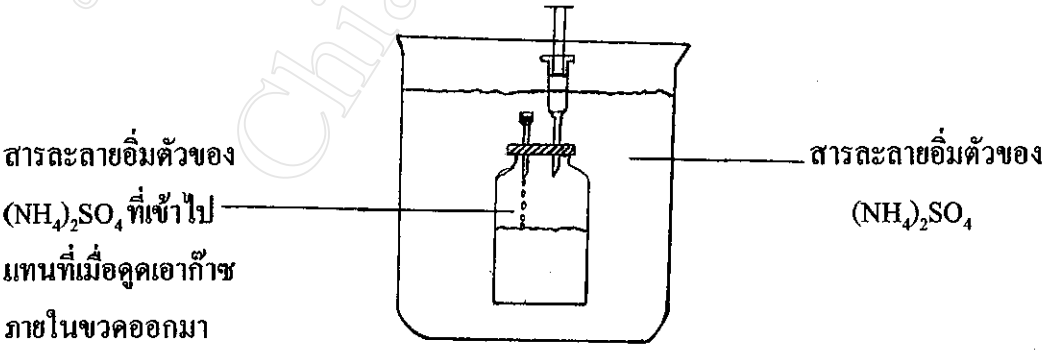
รูปที่ 10 วิธีการเก็บก๊าซที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยการแทนที่สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว

จากนั้นปิดฝาขวดวัคซีนด้วยจุกยางและผนึกรอบบริเวณฝาจุกกับปากขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง(26 ± 2 °ซ) โดยคว่ำขวดวัคซีนลงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนต่อไป

4. **การวิเคราะห์เอทิลีน**

4.1 ทำกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมก๊าซเอทิลีนมาตรฐานวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนในตัวอย่าง นำตัวอย่างก๊าซจากข้อ 3 มาดูดเอาก๊าซออกโดยใช้วิธีการแทนที่สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว (ดังรูปที่ 11)



รูปที่ 11 วิธีการดูดก๊าซออกจากขวดโดยการแทนที่สารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ ที่อิ่มตัว

คว่ำขวดวัคซีนลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่มีสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวแล้วหงายด้านที่มีฝาจุกยางขึ้นโดยจะต้องระวังไม่ให้ขวดโผล่พ้นสารละลาย จากนั้นใช้ syringe ขนาด 1 ซีซี ปักลงบนจุกยาง แล้วใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20 อีกอันหนึ่งปักลงบนจุกยางสำหรับให้เป็นทางให้สารละลายจากนอกขวดไหลเข้ามาแทนที่ตัวอย่างก๊าซที่ดูดออกไป จากนั้นใช้ syringe ดูดเอาก๊าซออกมาจากขวดวัคซีน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง gas chromatograph (วิธีการเหมือนการทดลองที่1)

5. **ระยะเวลาทำการทดลอง** กุมภาพันธ์ – มีนาคม 2540

6. **การบันทึกผลการทดลอง** บันทึกพื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณความเข้มข้นเอทิลีนออกมามีหน่วยเป็นส่วนต่อล้าน

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

สมมุติอ่านค่าพื้นที่ใต้กราฟได้เท่ากับ 938.5 ตารางมิลลิเมตร = X

และกราฟมาตรฐานมีเส้นตรง คือ $Y = 0.00016554 + 0.00013222 (X)$ โดย Y คือความเข้มข้นของเอทิลีน (สตล) และ X มีพื้นที่ใต้กราฟที่อ่านได้จากเครื่อง gas chromatograph (ตารางมิลลิเมตร)

แทนค่า $Y = 0.00016554 + 0.00013222 (938.5)$

$Y = 0.1242$ สตล

$\therefore$ แสดงว่าตัวอย่างก๊าซมีความเข้มข้นเอทิลีน 0.1242 สตล

7. **การวิเคราะห์ผลการทดลอง** วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยโปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH analytical software โดยวิเคราะห์ test of AOV assumption, AOV, LSD, CV., Linear regression และ Correlation

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของความยาวยอดที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

วัตถุประสงค์ เพื่อหาขนาดของความยาวยอดมะปรางที่เหมาะสมในการใช้วิเคราะห์ปริมาณก๊าซเอทิลีน

วิธีการทดลอง

1. **การวางแผนการทดลอง** วางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 7 ซ้ำ มี 3 วิธีการ คือ ยอดมะปรางความยาว 5 , 7.5 และ 10 เซนติเมตร โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลองคือยอดมะปรางน้ำหนักประมาณ 10 กรัม

2. **การเก็บตัวอย่างยอดมะปราง** ตัดยอดมะปรางที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) ประมาณ 0.3-0.5 เซนติเมตร ยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 1200 ยอด ริดใบทิ้งให้หมดแล้วเก็บใส่ถุง

พลาสติกแช่ในกระติกน้ำแข็ง จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการทันที เพื่อทำการดูดก๊าซออกจากยอดมะปราง

3. **การเตรียมตัวอย่างและการดูดก๊าซออกจากยอดมะปรางและการวิเคราะห์เอทิลีน** เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ข้อ 3-4

4. **ระยะเวลาทำการทดลอง** กุมภาพันธ์ – มีนาคม 2540

5. **การบันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง** เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ข้อ 6-7

การทดลองที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทิลีนในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณเอทิลีนในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **วางแผนการทดลอง** แบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 7 ซ้ำ มี 5 วิธีการ ใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์เป็นวิธีการ โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ยอดลิ้นจี่ความยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักประมาณ 10 กรัม

2. **การเก็บตัวอย่าง** เก็บตัวอย่างยอดลิ้นจี่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคนกิ่ง) 0.2-0.3 เซนติเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 20 ยอดเป็นหนึ่งตัวอย่าง เก็บ 15 ต้น โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 17 ตุลาคม 2540 ถึง 12 ธันวาคม 2540 เก็บทุก 7 วัน เมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วรีดใบทิ้งให้หมดใส่ในถุงพลาสติก แช่ในกระติกน้ำแข็งนำกลับมาที่ห้องปฏิบัติการ ตัดยอดลิ้นจี่ให้เหลือความยาว 10 เซนติเมตร แล้วนำไปดูดก๊าซออกจากตัวอย่างตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Saltveit (1982) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ข้อ 3

3. **การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีน การบันทึกผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง** เหมือนการทดลองที่ 2 ข้อ 4-7

การทดลองที่ 5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทิลีนก่อนการแตกใบอ่อนในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

วัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณเอทิลีนในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้าก่อนแตกใบอ่อน

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **วางแผนการทดลอง** แบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ มี 5 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 ก่อนแตกใบอ่อน 4 สัปดาห์ (เก็บตัวอย่างวันที่ 19 กรกฎาคม 2540)

วิธีการที่ 2 ก่อนแตกใบอ่อน 3 สัปดาห์ (เก็บตัวอย่างวันที่ 26 กรกฎาคม 2540)

วิธีการที่ 3 ก่อนแตกใบอ่อน 2 สัปดาห์ (เก็บตัวอย่างวันที่ 2 สิงหาคม 2540)

วิธีการที่ 4 ก่อนแตกใบอ่อน 1 สัปดาห์ (เก็บตัวอย่างวันที่ 9 สิงหาคม 2540)

วิธีการที่ 5 วันที่แตกใบอ่อน (เก็บตัวอย่างวันที่ 16 สิงหาคม 2540)

2. **การเก็บตัวอย่างยอดมะปราง** เก็บตัวอย่างต้นละ 30 ยอดเป็น 1 หน่วยการทดลอง รวม 15 ต้น (วิธีการเก็บตัวอย่างทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ข้อ 3)

3. **การเตรียมตัวอย่างและการดูดก๊าซออกจากยอด การวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนและการทำกราฟมาตรฐาน การบันทึกผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง** เหมือนการทดลองที่ 2 ข้อ 3-6

การทดลองที่ 6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวย

วิธีดำเนินการทดลอง

1. **วางแผนการทดลอง** แบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 6 ซ้ำ มี 5 วิธีการ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 0 , 1 , 2 , 3 และ 4 สัปดาห์เป็นวิธีการ มีหนึ่งหน่วยการทดลองคือยอดลิ้นจี่ยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักประมาณ 10 กรัม

2. **การเก็บตัวอย่าง** ตัดยอดลิ้นจี่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคน) 0.3 – 0.5 เซนติเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอดเป็นหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้เวลาที่เก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 4

3. **การเตรียมตัวอย่าง** ตัดยอดลิ้นจี่ให้มีความยาว 10 เซนติเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่นผึ่งให้แห้ง นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปบดด้วยเครื่อง Wiley intermediate mill ผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ใส่ลงในถุงกระดาษเก็บไว้ในที่แห้งและเย็นเพื่อนำไปสกัดต่อไป (ธวัชชัย , 2524)

4. **การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง** ตามแบบของ AOAC (1984) ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ใส่ลงใน moisture dish (ที่รู้น้ำหนักแห้งแล้ว) ปิดฝาเขย่าให้ตัวอย่างกระจายสม่ำเสมอ นำเข้าตู้อบและเปิดฝา อบที่อุณหภูมิ 135 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปิดฝา นำออกจากตู้อบแล้วย้ายออกมาเก็บไว้ให้เย็นในโถ desiccator ทิ้งไว้อย่างน้อย 12 ชั่วโมงเพื่อให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่างจากสูตร

$$\% \text{ ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งและ moiture dish (ก่อนอบ – หลังอบ)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งและ moiture dish ก่อนอบ}} \times 100$$

<u>ตัวอย่าง</u> การหาความชื้นในตัวอย่างหนัก 1.0009 กรัม และน้ำหนักของ moisture dish พร้อมฝา = 22.1658 กรัม ดังนั้นน้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักของ moisture dish รวม 23.1667 กรัม หลังจากที่อบแล้วน้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักตัวอย่างและน้ำหนักของ moisture dish เท่ากับ 23.0436 กรัม ดังนั้นสามารถคำนวณความชื้นในตัวอย่าง ดังนี้

$$\% \text{ ความชื้นในตัวอย่าง} = \frac{23.1667 - 23.0436}{23.1667} \times 100$$

$$= 0.5314\ \%$$

$\therefore$ ถ้าใช้ตัวอย่างในการสกัด 100 กรัม จะมี % ความชื้น = 0.5314

ใช้ตัวอย่าง 0.4435 กรัม จะมี % ความชื้น $= \frac{0.5314 \times 0.4435}{100}$

$$= 0.002356\ \%$$

ดังนั้น ตัวอย่างจะมีน้ำหนักแห้ง = 0.4435 – 0.002356 = 0.4411 กรัม

5. การสกัดตัวอย่าง ตามแบบของธวัชชัย (2524) ชั่งตัวอย่าง 0.4 กรัมด้วยเครื่องชั่งละเอียด ใส่ลงใน erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.2N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วย aluminum foil นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบมาทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 6N NaOH โดยดูการเปลี่ยนสีของกระดาษลิตมัสจากแดงเป็นน้ำเงิน จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 แล้วนำส่วนที่กรองได้ประมาณ 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติกและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปวิเคราะห์ต่อไป

6. การวิเคราะห์ปริมาณ Reducing Sugar (RS) ใช้ Shaffer – Somogyi Copper Iodometric Titration (AOAC , 1984)

6.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ RS

6.1.1 สารละลาย Shaffer – Somogyi carbonate 50 reagent , 5 กรัม KI

ละลาย sodium carbonate และ potassium sodium tartrate อย่างละ 25 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตรในบีกเกอร์ขนาด 2 ลิตร เติมสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ (ความเข้มข้น 100 กรัมในน้ำ 1 ลิตร) 75 มิลลิลิตรผ่านกรวยโดยให้ปลายกรวยอยู่ใต้ผิวของสารละลาย เติม $NaHCO_3$ 20 กรัม ทำให้ละลาย และเติม KI 5 กรัม เทสารละลายทั้งหมดลงใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร เติม 0.100N KIO_3 (ความเข้มข้น 3.567 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร) 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และกรองเก็บไว้หนึ่งคืนก่อนนำไปใช้

6.1.2 สารละลาย Iodide-oxalate

ละลาย KI และ $K_2C_2O_4$ อย่างละ 2.5 กรัมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกสัปดาห์)

6.1.3 สารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate

เตรียมสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.005 N (เตรียมทุกวัน) จาก stock solution 0.1N sodium thiosulfate

<u>การเตรียมสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.1N</u>

ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 25 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ค่อยๆ ต้มให้เดือดนาน 5 นาที และเทใส่ขวดขณะที่ยังร้อน ล้างขวดด้วยน้ำร้อนที่ต้มเดือดแล้ว เก็บสารละลายไว้ในที่มืดและเย็น ไม่ควรนำสารละลายที่ใช้แล้วเทกลับคืนลงขวด ถ้าต้องการใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 0.1 N ต้องเตรียมทุกวันโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว (สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำจะสลายตัว ควรเตรียมเฉพาะที่จะให้งาน)

6.1 การ standardization สารละลาย sodium thiosulfate

ชั่ง $K_2Cr_2O_7$ (ซึ่งอบที่ 100 °ซ นาน 2 ชั่วโมงแล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง) 0.20 - 0.23 กรัมโดยใช้เครื่องชั่งละเอียด และใส่ในขวดสีชาหรือขวดหุ้ม aluminum foil (g-sI flask) เติมสารละลาย KI (ความเข้มข้น 2 กรัมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร) เติม 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1N HCl 20 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเก็บในที่มืด 10 นาที ไตเตรทกับสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่เตรียมไว้ด้วยเครื่องไตเตรทอัตโนมัติ (autometic titration) ยี่ห้อ SCHOTT GERATE T90 รุ่น TR 151

คำนวณ Normality ของสารละลาย sodium thiosulfate จากสูตร

Normality = g $K_2Cr_2O_7$ x 1000 / ml $Na_2S_2O_3$ x 49.032

6.2 การทำกราฟมาตรฐาน

ทำกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 – 0.75 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.75 มิลลิกรัม / 5 มิลลิลิตรเป็น stock solution และคำนวณความเข้มข้นออกมาเป็นส่วนต่อล้าน (สตล) โดย

สารละลาย 5 มิลลิลิตร มีกลูโคส 2.75 มิลลิกรัม

สารละลาย 1,000 มิลลิลิตร จะมีกลูโคส $\frac{2.75 \times 1000}{5}$ = 550 มิลลิกรัม

ซึ่งสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 550 มิลลิกรัม / 1,000 มิลลิลิตร คือ ความเข้มข้น 550 ส่วนต่อล้าน

∴ สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 , 0.75 , 1.25 , 1.75 และ 2.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ก็สามารถคำนวณความเข้มข้นออกมาเป็นส่วนต่อล้าน โดยวิธีการเดียวกันได้ดังนี้

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 50 ส่วนต่อล้าน

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 150 ส่วนต่อล้าน

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 250 ส่วนต่อล้าน

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 350 ส่วนต่อล้าน

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร คือความเข้มข้น 450 ส่วนต่อล้าน

เตรียม stock ของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (กลูโคส 2.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร) โดยจะเตรียม 1,000 มิลลิลิตร ชั่งน้ำตาลกลูโคสมา 550 มิลลิกรัม (0.5500 กรัม) ด้วยเครื่องชั่งละเอียด นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

จากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 – 2.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร โดยทุกความเข้มข้นจะเตรียม 100 มิลลิลิตร จาก stock solution การคำนวณปริมาณของสารละลาย stock ของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการ คำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

โดย C_1 = ความเข้มข้นของ stock สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่จะเตรียม

V_1 = ปริมาณของ stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่จะเตรียม

ดังนั้น เมื่อต้องการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 2.25 มิลลิกรัม ใน 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 450 ส่วนต่อล้าน) โดยเตรียม 100 มิลลิลิตร จะต้องดูดจากสารละลาย stock มา

$$550 \text{ สตล} \times V_1 = 450 \text{ สตล} \times 100 \text{ มล}$$

$$V_1 = \frac{450 \times 100}{550}$$

$$V_1 = 81.8 \text{ มล}$$

ดังนั้น จะต้องดูด stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานมา 81.8 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน โดยเมื่อเตรียมสารละลาย 100 มิลลิลิตรจะต้องดูดมาจาก stock สารละลายกลูโคสมาตรฐานดังนี้

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 63.6 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 1.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 45.4 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 27.3 มิลลิลิตร

สารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีกลูโคส 0.25 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ดูดจาก stock 9.1 มิลลิลิตร

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ทำ 5 ซ้ำ แล้วนำไปวิเคราะห์ Linear regression และ correlation

6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

ดูดสารละลายตัวอย่างที่คาดว่าจะมี Reducing property เท่ากับกลูโคส 0.25 – 0.75 มิลลิกรัมใน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด test tube ขนาด 25 x 200 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Shaffer – Somogyi carbonate 50 reagent 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่น

5 มิลลิลิตร ใส่ reagent 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองด้วยกระดาษฟอยล์ นำไปต้มให้เดือดนาน 15 นาที ค่อยๆ ยกออกมาไม่ให้กระเทือน นำไปวางในน้ำเย็นที่ 0 °ซ ที่ไหลเวียนนาน 4 นาที เปิดกระดาษฟอยล์ เทสารละลาย Iodide oxalate ลงข้างๆ หลอดช้าๆ หลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2N H_2SO_4 หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้ CuO_2 ละลาย นำไปทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็น 0 °ซ นาน 5 นาที เขย่า 2 ครั้งในขณะที่ทำให้เย็น จากนั้นนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.005 N $Na_2S_2O_3$ โดยใช้เครื่องไตเตรทอัตโนมัติ (automatic titration) ยี่ห้อ SCHOTT GERATE T90 รุ่น TR 151

นำปริมาตรที่ได้จากการไตเตรทลบกับ blank แล้วคำนวณหาปริมาณกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. การบันทึกผล บันทึกปริมาณ sodium thiosulfate ที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร แล้วเทียบหาปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณ TNC มีหน่วยเป็น mg glucose equivalent / gram dry weight

8. การวิเคราะห์ผล ใช้โปรแกรม Statistix 3.5 ของ NH Analytical software โดยวิเคราะห์ Test of AOV Assumption, Analysis of variance, LSD, CV., Polynomial contrast, Linear regression และ correlation

การทดลองที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณคาร์โบไฮเดรตในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

วัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในช่วงก่อนการแตกใบอ่อนในยอดมะปรางพันธุ์ทูลเกล้า

วิธีดำเนินการทดลอง

1. วางแผนการทดลอง แบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 8 ซ้ำ มี 5 วิธีการ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการแตกใบอ่อน 0 , 1 , 2 , 3 และ 4 สัปดาห์เป็นวิธีการ โดยมีหนึ่งหน่วยการทดลองคือยอดมะปรางยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอด น้ำหนักประมาณ 10 กรัม

2. การเก็บตัวอย่าง ตัดยอดมะปรางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง (วัดที่โคน) 0.2 – 0.3 เซนติเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร จำนวน 10 ยอดเป็นหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้เวลาที่เก็บตัวอย่างเหมือนการทดลองที่ 5

3. การเตรียมตัวอย่าง การหาน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง การสกัดตัวอย่าง การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผลการทดลอง เหมือนการทดลองที่ 6 ข้อ 3 - 8