ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 การวิเคราะห์ Monomeric Anthocyanin โดยวิธี pH differential method (อ้างอิงจาก Giusti และ Wrolstad, 2001)

1. <u>การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 1.0</u>

ชั่ง KCl 1.86 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000.00 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 950 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าพีเอชจนได้ค่าเท่ากับ 1.0 จากนั้นถ่ายสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.400 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 4.5

ชั่ง $CH_3CO_2Na.3H_2O$ 54.43 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 950 มิลลิลิตร ทำการปรับค่าพีเอชจนได้ค่าเท่ากับ 4.5 จากนั้นถ่ายสารละลายใส่ในขวดวัดปริมาตร 1000.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

3. การสกัดโมโนเมอริกแอนโทไซยานินจากเมล็ดข้าวด้วยน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างข้าว 2.500 กรัม ใส่ลงในกระบอกพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 50.00 มิลลิลิตร ตวงน้ำปราศจากไอออน ด้วยกระบอกตวงปริมาตร 24.00 มิลลิลิตร นำไปแช่ใน water bath ควบคุมภูมิของสารละลายไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เขย่าตัวอย่างทุกๆ 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ให้มีปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโมโนเมอริกแอนโทไซยานิน

4. การวิเคราะห์ปริมาณโมโนเมอริกแอนโทไซยานิน

ปิเปตสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด ขวดที่ 1 เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

0.025 โมลาร์ (พีเอช 1.0) และขวดที่ 2 เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.400 โมลาร์ (พีเอช 4.5) ปรับปริมาตรให้ได้ 25.00 มิลลิลิตร

นำสารละลายขวดที่ 1 (พีเอช 1.0) ไปสแกนสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด และความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของโมโนเมอริกแอนโทไซยานินในสารละลายสามารถคำนวณได้จากสมการ (1)

$$A = (A\lambda_{max} - A_{700})_{pH1.0} - (A\lambda_{max} - A_{700})_{pH4.5} \quad (1)$$

จากนั้นคำนวณหาปริมาณโมโนเมอริกแอนโทไซยานิน จากสมการ (2)

ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/L) = (AxMWxDFx1000)/(εx1)

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการคำนวณจากสมการ (1)

MW = มวลโมเลกุลของชนิดโมโนเมอริกแอนโทไซยานิน

1 = 1 cm

DF = Dilution factor

ε = Molar absorptivity

วิธีคำนวณปริมาณโมโนเมอริกแอนโทไซยานิน จากมิลลิกรัมต่อลิตรเป็นมิลลิกรัมต่อ 25 มิลลิลิตร

โมโนเมอริกแอนโทไซยานิน (mg/ 25 ml) = โมโนเมอริกแอนโทไซยานิน(mg/L) x 25 / 1000

วิธีคำนวณปริมาณโมโนเมอริกแอนโทไซยานิน จากมิลลิกรัมต่อ 25 มิลลิลิตรเป็นมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

โมโนเมอริกแอนโทไซยานิน (mg/ 100 g) = โมโนเมอริกแอนโทไซยานิน (mg/ 25 ml) x 100 / น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ภาคผนวก 2 การหาปริมาณ Total Nitrogen ในพืช

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Kjeldahl digestion Flask (50 หรือ 100 มิลลิลิตร)
2. Kjeldahl digestion apparatus

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. Kjeldahl distillation apparatus
4. Micro – burette, capacity 5 หรือ 10 มิลลิลิตร
5. Erlenmayer Flask 125 มิลลิลิตร
6. Beaker 600 มิลลิลิตร และ 2000 มิลลิลิตร
7. Volumetric Flask 1000 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Sulfuric acid (H_2SO_4) concentrate.
2. Sodium hydroxide (NaOH) 10 N

   ชั่ง NaOH (Flake) 400 กรัม ใส่ใน Beaker 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 1000 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้ NaOH ละลายหมด รินใส่ขวดปิดจุกให้แน่นทิ้งไว้หลายๆ วัน เพื่อให้ Na_2CO_3 ตกตะกอน และค่อยๆ ดูด (Siphon) เอาสารละลายที่ใสๆ ไว้ในขวดที่มีจุกปิดสนิท เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายดูด CO_2 จากบรรยากาศ
3. Indicator solution

   ละลาย methyl red 0.066 กรัม และ bromoresol green 0.099 กรัม ใน Ethanol 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดมีจุกปิดสนิท
4. Boric acid – indicator solution (2% H_3BO_3)

   ชั่ง Boric acid (H_3BO_3) 20 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปอุ่นเพื่อให้ Boric acid ละลายหมด (ในขณะอุ่นควรจะคนด้วยแท่งแก้ว) รินใส่ Volumetric Flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปอีกประมาณ 600 มิลลิลิตร (โดยการใช้น้ำกลั่นชะล้าง Beaker ที่ใส่ H_3BO_3 ทีละน้อย) ตั้งสารละลายไว้ให้เย็น เติม Mixed indicator ลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับสีของสารละลายนี้ด้วย NaOH 0.1 N และ HCl 0.1 N โดยการหยดลงไปทีละน้อยจนสารละลายเป็นสีม่วงปนแดง (pH ของสารละลายประมาณ 5.0) ตรวจสอบสีของสารละลายนี้ว่าใช้ได้หรือไม่ โดยนำเอาสารละลาย Boric acid – indicator ประมาณ 15 มิลลิลิตร ค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงไปเป็นสีเขียวทันที เมื่อปริมาตรของสารละลายกับน้ำกลั่นเท่ากัน ถ้าสีของสารละลายไม่เปลี่ยนหรือเปลี่ยนเร็วเกินไป ก็ปรับด้วย NaOH 0.1 N และ HCl 0.1 N แล้วตรวจสอบจนกว่าจะได้ตามต้องการ แล้วปรับให้มีปริมาตร 1 ลิตร
5. Sodium Hydroxide (NaOH) 0.1 N

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลาย NaOH 4.0 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร (Standardized หาความเข้มข้นที่แท้จริงโดยใช้ Potassium Hydrogen Pathalate)

6. HCl 0.1 N
7. Potassium sulfate – catalyst mixture

   Salicylic acid 10 กรัม, K_2SO_4 100 กรัม, $CuSO_4 . 5H_2O$ 10 กรัม, Se 1 กรัม บดให้เข้ากัน
8. Sulfuric acid 0.05 N หรือ Hydrochloric acid 0.05 N

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้ว 0.2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl digestion Flask (พยายามอย่าให้ตัวอย่างพืชติดอยู่ที่คอ Flask อาจจะใช้ Onion skin paper ห่อตัวอย่าง) ใส่ Potassium sulfate – catalyst mixture 1.1 กรัม เติม conc. H_2SO_4 (commercial grade) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำเข้าเตาย่อยโดยใช้อุณหภูมิต่ำๆ ประมาณ 1 ชั่วโมงจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงจนกว่าตัวอย่างจะใช้ได้ (clear) ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ตัวอย่างจะเป็นสีขาวขุ่นๆ และไม่มีควันของกรดซัลฟุริคปนอยู่

เมื่อตัวอย่างใช้ได้แล้ว นำออกจากเตาย่อยทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร (อย่าเติมน้ำกลั่นลงไปในขณะที่ flask ยังร้อนอยู่) เขย่าให้เข้ากัน นำไปกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีการต่อไปนี้

ถ่ายตัวอย่างที่ย่อยแล้ว ใส่ในถ้วยสำหรับใส่ตัวอย่าง ใช้น้ำกลั่นล้าง digestion flask ประมาณ 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่า ไม่มีตัวอย่างเหลืออยู่ใน digestion flask

นำ Erlenmayer Flask 125 มิลลิลิตร ซึ่งมี Boric acid – indicator บรรจุอยู่ 15 มิลลิลิตร มารองรับใต้ condenser ของเครื่องกลั่น พยายามให้ปลายของ condenser อยู่ใกล้ Boric acid มากที่สุด เปิดก๊อกที่เชื่อมต่อระหว่างถ้วยใส่ตัวอย่างกับ distillation chamber เบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างไหลสู่ distillation chamber ช้าๆ จนหมด แล้วใช้น้ำกลั่นฉีดล้างจนแน่ใจว่าตัวอย่างไหลสู่ distillation chamber หมด ปิดก๊อก ใส่ 10 N NaOH ประมาณ 20 มิลลิลิตร ในถ้วยใส่ตัวอย่าง และเปิดก๊อกเบาๆ เพื่อให้ด่างเข้าไปผสมกับตัวอย่างใน distillation chamber ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างด่างในถ้วยให้หมดแล้วปิดก๊อก ทำการกลั่นจนกว่าปริมาตรของสารใน Erlenmayer Flask เพิ่มขึ้นถึงขีด 50 มิลลิลิตร นำมา titrate กับ standard 0.05 N H_2SO_4 จดปริมาตรของ standard H_2SO_4 ที่ใช้ เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณ Total Nitrogen ในตัวอย่างพืช จากสูตร

$$\% N = \frac{(\text{ml. } H_2SO_4 \text{ for Sample} - \text{ml. } H_2SO_4 \text{ for Blank}) \times N \times 0.014 \times 100}{\text{wt. of Plant gm.}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววรรณภา ก๋าถ้วย
วัน เดือน ปี เกิด	16 มิถุนายน 2531
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนวังเหนือวิทยา ปีการศึกษา 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย สายวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ โรงเรียนวังเหนือวิทยา ปีการศึกษา 2549 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2553
ทุนการศึกษา	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved