ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ก

รูปที่ ก-1 ลิ้นจี่สายพันธุ์กวางเจา

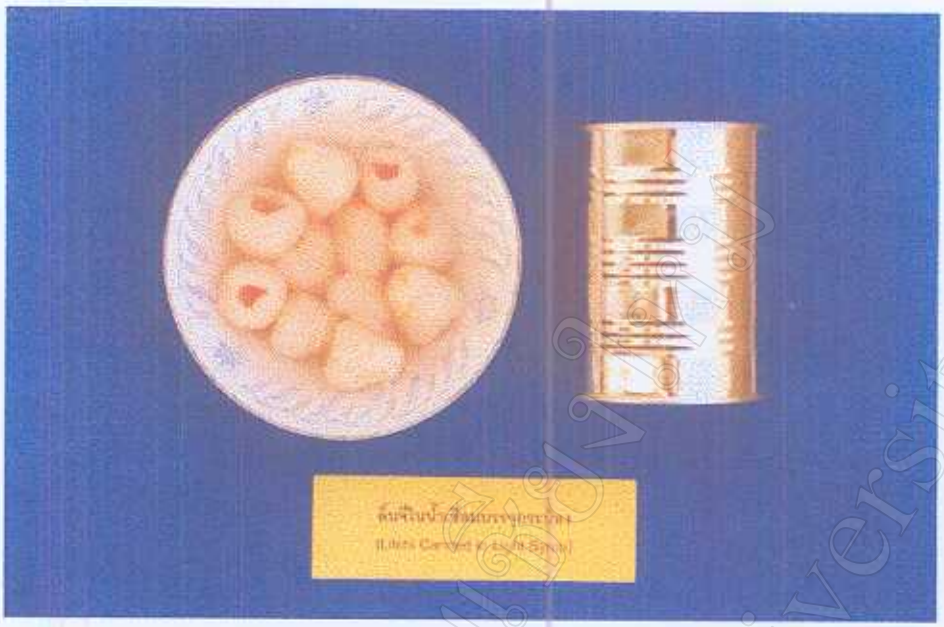
รูปที่ ก-2 ลิ้นจี่สายพันธุ์จักรพรรดิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

รูปที่ ก-3 ลิ้นจี่สายพันธุ์โอเฮียะ

รูปที่ ก-4 ลิ้นจี่สายพันธุ์ฮงฮวย

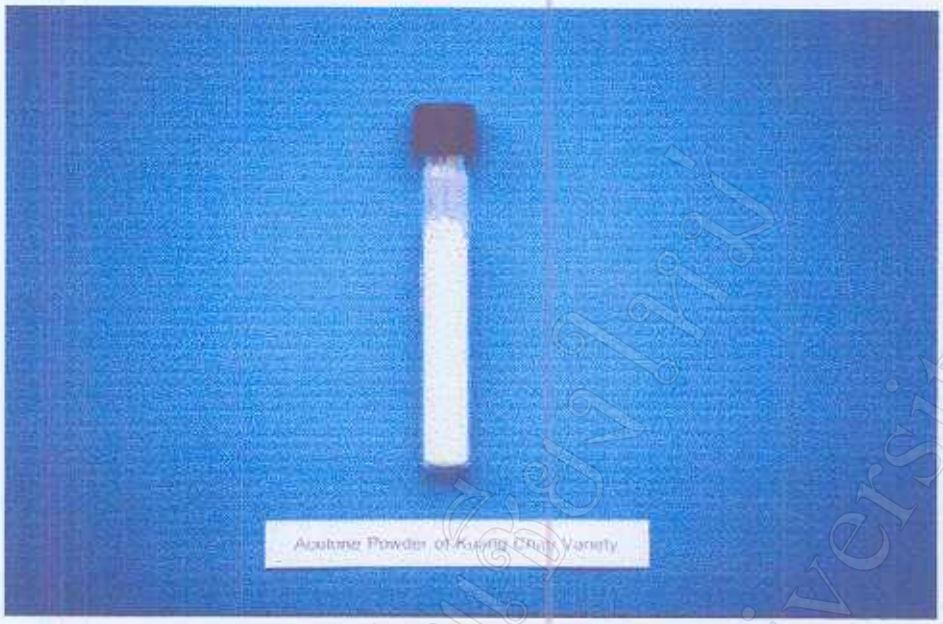
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



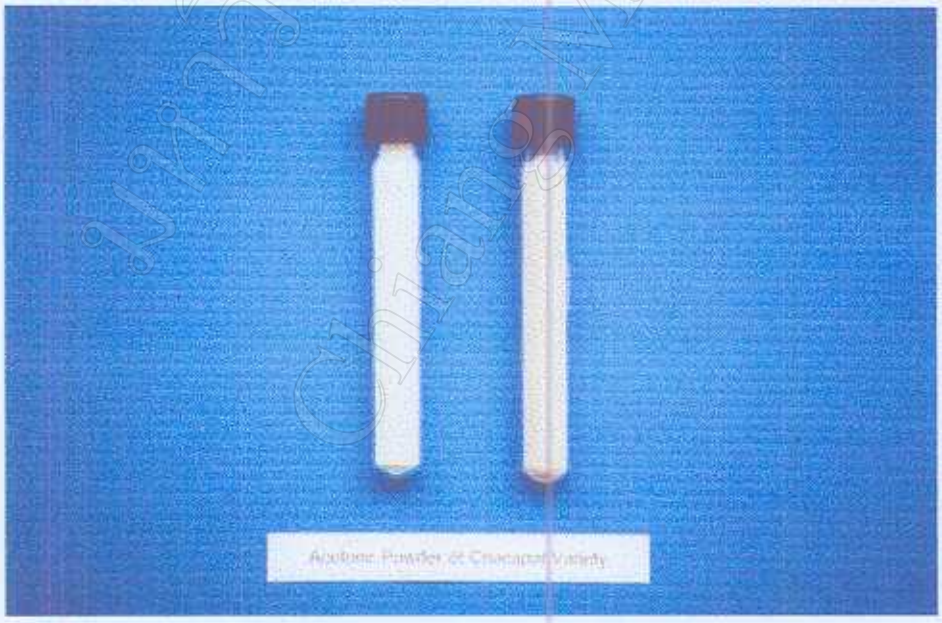
รูปที่ ก-5 ลิ้นจี่ในน้ำเชื่อมบรรจุกระป๋อง

รูปที่ ก-6 ลิ้นจี่แช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

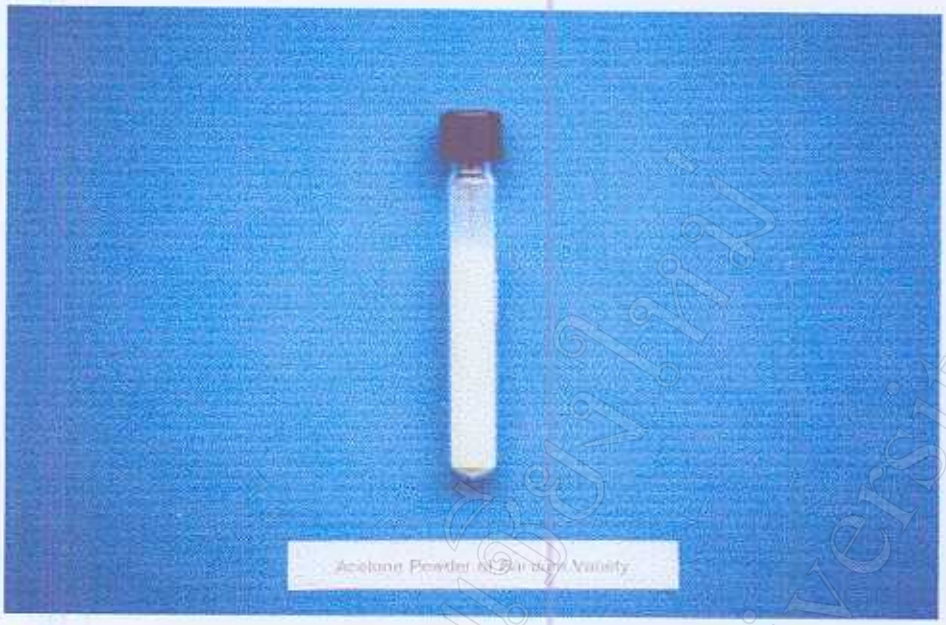


รูปที่ ก-7 ตัวอย่างโปรตีนสกัดของลิ้นจี่สายพันธุ์กวางเจา

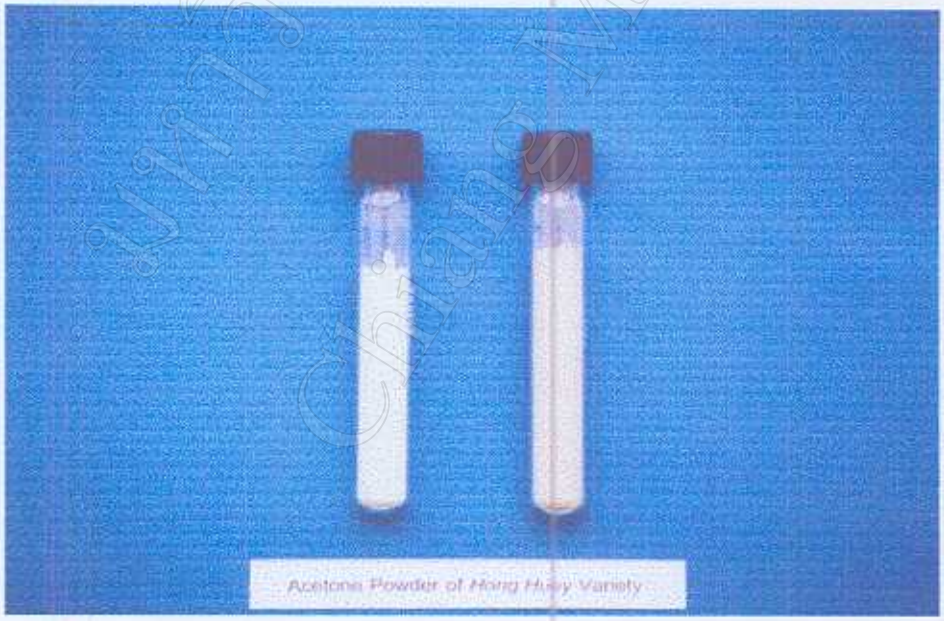


รูปที่ ก-8 ตัวอย่างโปรตีนสกัดของเนื้อและเปลือกลิ้นจี่สายพันธุ์จักรพรรดิ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

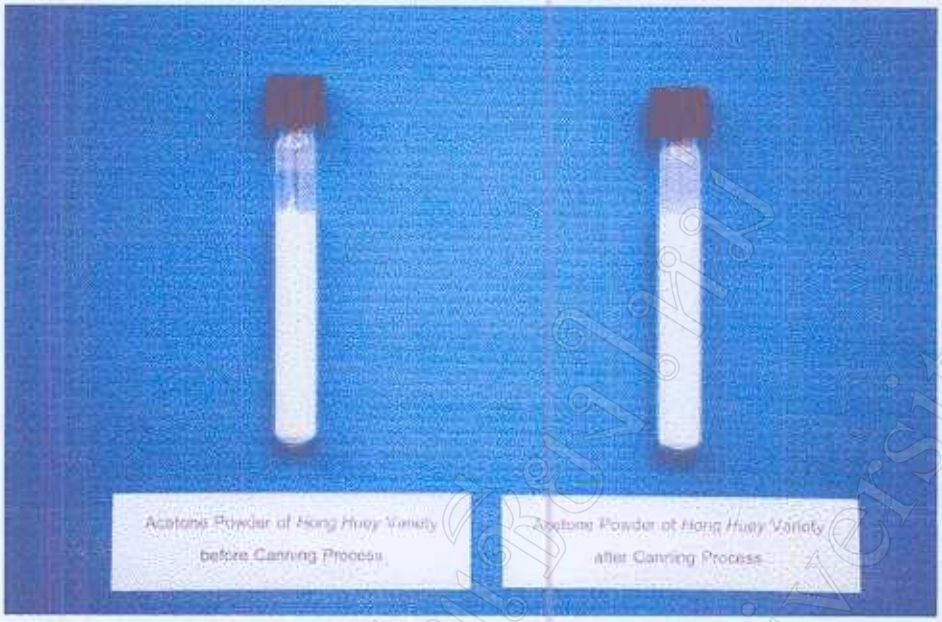


รูปที่ ก-9 ตัวอย่างโปรตีนสกัดของลิ้นจี่สายพันธุ์โอเฮียะ

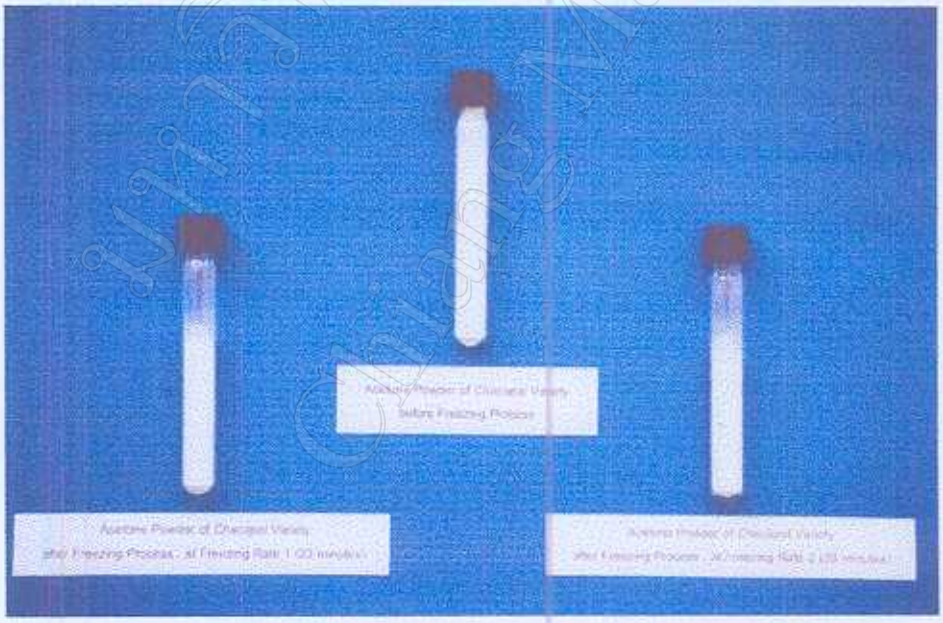


รูปที่ ก-10 ตัวอย่างโปรตีนสกัดของเนื้อและเปลือกลิ้นจี่สายพันธุ์ฮงฮวย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ ก-11 ตัวอย่างโปรตีนสกัดของลิ้นจี่สายพันธุ์ฮงฮวย
ก่อนและหลังกระบวนการแปรรูปบรรจุกระป๋อง



รูปที่ ก-12 ตัวอย่างโปรตีนสกัดของลิ้นจี่สายพันธุ์จักรพรรดิ์
ก่อนและหลังกระบวนการแช่เยือกแข็ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพ

ภาคผนวก ข-1 การวัดค่าเนื้อสัมผัส (Texture) โดยวัดค่าแรงเฉือน (Shear force) ตามวิธีของ Instron Coperation (1993)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

นำผลลิ้นจี่มาเจาะเอาเมล็ดออก ด้วยเครื่องเจาะเมล็ด แกะเปลือก แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อให้ได้ขนาดใกล้เคียงกัน จากนั้นนำไปวัดค่าเนื้อสัมผัส

หมายเหตุ สำหรับลิ้นจี่แช่แข็งจะต้องนำมาละลายน้ำแข็งให้หมดก่อน โดยวางไว้ในอุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งลิ้นจี่คืนสภาพ มีลักษณะเหมือนผลสด จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ตามวิธีการวัดค่าเนื้อสัมผัส

การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาวัดค่าเนื้อสัมผัส ด้วยเครื่องวัดค่าเนื้อสัมผัส Instron : Model 5565 โดยติดตั้งอุปกรณ์ของเครื่อง Instron สำหรับวัดค่าแรงเฉือน ซึ่งมีอัตราเร็วในการเฉือนเท่ากับ 200 มิลลิเมตรต่อนาที ระยะทางในการเคลื่อนลงของเครื่องเท่ากับ 1 เซนติเมตร แรงกระทบกลับร้อยละ 60 บันทึกค่าที่วัดได้ออกมาเป็นค่าของ Shear Peak Load ในหน่วยของนิวตัน

ภาคผนวก ข-2 การวัดค่าสีระบบ Hunter ตามวิธีของ Minolta Camera Co., Ltd. (1991)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อลิ้นจี่มาตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องปั่นผสม Blender, National : Model MX-T31 GN ที่ความเร็วระดับ 5 เป็นเวลา 1 นาที

การวิเคราะห์

วัดค่าสีของตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 50 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องวัดสี Minolta Camera : Model CR 300 ทำการวัดสีตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ในรูปค่าสีระบบ Hunter โดย

ค่าสี L* เป็นค่าของความสว่าง (Lightness)
เริ่มจากสีขาว (L* = 100) ไปจนถึงสีดำ (L* = 0)

a* เป็นค่าสีแดงและสีเขียว (Redness/Greenness)

b* เป็นค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness/Blueness)

ก่อนทำการวัดสีทุกครั้งทำการ Standardize โดยใช้แผ่นสีขาวมาตรฐาน (White blank ; Illuminant D65 10° ; Y = 94.10 , X = 0.3157 and Y = 0.3324) กับแผ่น Aperture ขนาด 50 มิลลิเมตร บันทึกผลเป็นค่า L* , a* และ b* (Minolta, 1991)

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ภาคผนวก ข-3 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีของ International Federation of Fruit Juice Producers (1962)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อลิ้นจี่มาตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องปั่นผสม Blender, National : Model MX-T31 GN ที่ความเร็วระดับ 5 เป็นเวลา 1 นาที นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง pH-meter, Horiba : Horiba D-12 Model D-12E 526002 โดยปรับค่ามาตรฐานในการวัดด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.01 และ 7.00 ตามลำดับ ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข-4 การหาปริมาณกรดทั้งหมด (Total Titratable Acids) ตามวิธีของ International Federation of Fruit Juice Producers (1962)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งเนื้อลิ้นจี่ จำนวน 100 กรัม นำมาตีป่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M วัดปริมาตร และชั่งน้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมา Standardize หาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ด้วยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอลฟ์ธาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

การวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและทิ้งไว้ให้เย็น จำนวน 50 มิลลิลิตร
2. นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า และแท่งกวนผสมแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer and Magnetic bar) พร้อมกับวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter, Horiba : Horiba D-12 Model D-12E 526002) ในระหว่างการไตเตรท
3. ไตเตรทจนกระทั่งได้จุดยุติที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 (สำหรับคิดเทียบเป็นกรดทาร์ทาริก) และ 8.1 (สำหรับคิดเทียบเป็นกรดซิตริก และกรดมาลิก) จดปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท เพื่อนำมาคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมด โดยคิดเทียบเป็น กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิก ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การคำนวณ

$$\text{Citric acid} = \frac{\text{ml.NaOH} \times \text{n.-NaoH} \times \text{meq. Citric acid} \times 100}{\text{ml. sample}}$$

$$\text{Malic acid} = \frac{\text{ml.NaOH} \times \text{n.-NaoH} \times \text{meq. Malic acid} \times 100}{\text{ml. sample}}$$

$$\text{Tartaric acid} = \frac{\text{ml.NaOH} \times \text{n.-NaoH} \times \text{meq. Tartaric acid} \times 100}{\text{ml. sample}}$$

เมื่อ ml. NaOH = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท หน่วยเป็น มิลลิลิตร

n.-NaOH = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท หน่วยเป็น นอร์มัล

meq. Citric acid = มิลลิสมมูลย์ของกรดซิตริก มีค่าเท่ากับ 0.064 กรัม

meq. Malic acid = มิลลิสมมูลย์ของกรดมาลิก มีค่าเท่ากับ 0.067 กรัม

meq. Tartaric acid = มิลลิสมมูลย์ของกรดมาลิก มีค่าเท่ากับ 0.075 กรัม

ml. sample = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข-5 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solids : °Brix) ตามวิธีของ International Federation of Fruit Juice Producers (1991)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อลิ้นจี่มาตีป่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M แล้วแยกตะกอนออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4500 rpm เป็นเวลา 15 นาที กรองน้ำลิ้นจี่ที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ด้วย Hand Refractometer N 1-32 °Brix บันทึกค่าที่ได้เป็นหน่วยองศาบริกซ์ (°Brix) จากนั้นนำค่าองศาบริกซ์ที่วัดได้มาปรับค่ามาตรฐานกับปริมาณกรดทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง เพื่อหาค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ตาราง ข-1

<u>หมายเหตุ</u> ก่อนทำการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ด้วย Hand Refractometer N 1-32 °Brix ต้องปรับค่ามาตรฐานด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง

ตาราง ข-1 ตารางปรับค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

ปริมาณกรดทั้งหมด	ค่าปรับมาตรฐาน (องศาบริกซ์)
0.2	0.04
0.4	0.08
0.6	0.12
0.8	0.16
1.0	0.20
1.2	0.24
1.4	0.28
1.6	0.32
1.8	0.36
2.0	0.39
2.2	0.43
2.4	0.47
2.6	0.51
2.8	0.55
3.0	0.58
3.2	0.62
3.4	0.66
3.6	0.70
3.8	0.74
4.0	0.78

ที่มา : International Federation of Fruit Juice Producers (1991)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข-6 การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Test Kit) ตามวิธีของ Boehringer Mannheim (1998)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งเนื้อลิ้นจี่ จำนวน 100 กรัม นำมาตีป่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M วัดปริมาตร และชั่งน้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้

สารเคมีสำเร็จรูป

- สารละลายขวดที่ 1 ประกอบด้วย Citrate buffer, pH approx. 4.6 ; β-fructosidase, approx. 720 U ; Stabilizers
- สารละลายขวดที่ 2 ประกอบด้วย Triethanolamine buffer, pH approx. 7.6 ; NADP, approx. 110 mg ; ATP,approx. 260 mg ; Magnesium sulfate ; Stabilizers
- สารละลายขวดที่ 3 ประกอบด้วย Hexokinase, approx. 320 U ; glucose-6-phosphate dehydrogenase, approx. 160 U
- สารละลายขวดที่ 4 ประกอบด้วย Phosphoglucose isomerase suspension, approx. 420 U

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การวิเคราะห์

เจือจางตัวอย่าง โดยปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น ดังนั้นตัวอย่างจะมีค่า Dilution Factor เท่ากับ 100 แล้วดำเนินการทดลองตามวิธีวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

Pipette into cuvettes	Blank sucrose Sample	Sucrose sample	Blank D-glucose / D-fructose Sample	D-glucose / D-fructose sample
สารละลายขวดที่ 1*	0.2 มิลลิลิตร	0.2 มิลลิลิตร	-	-
ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์	-	0.1 มิลลิลิตร	-	0.1 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส				
สารละลายขวดที่ 2	1 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.8 มิลลิลิตร	1.7 มิลลิลิตร	2 มิลลิลิตร	1.9 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A_1)				
สารละลายขวดที่ 3	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A_2)				
สารละลายขวดที่ 4	-	-	0.02 มิลลิลิตร	0.02 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (A_3)				

หมายเหตุ * สารละลายขวดที่ 1 จะต้องทำให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

การคำนวณ

$$\Delta A = (A_2\text{-}A_1)_{\text{sample}} - (A_2\text{-}A_1)_{\text{blank}}$$

ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ระหว่าง $\Delta A_{\text{total D-glucose}}$ (จาก Sucrose sample) และ $\Delta A_{\text{D-glucose}}$ (จาก D-glucose sample) คือ $\Delta A_{\text{Sucrose}}$

สำหรับ D-fructose ความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ $(A_3\text{-}A_2)$ ของ Blank D-glucose / D-fructose Sample และ D-glucose / D-fructose Sample คือ $\Delta A_{\text{D-fructose}}$

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส (กรัม ต่อ ลิตร)

$$\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส} = \frac{5.441}{6.3} \times \Delta A_{\text{D-glucose}} \times \text{Dilution Factor}$$

$$\text{ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส} = \frac{5.477}{6.3} \times \Delta A_{\text{D-fructose}} \times \text{Dilution Factor}$$

$$\text{ปริมาณน้ำตาลซูโครส} = \frac{10.34}{6.3} \times \Delta A_{\text{Sucrose}} \times \text{Dilution Factor}$$

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส (กรัม ต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส หรือ ซูโครส (กรัม ต่อ ลิตร)} \times \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ (กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่ (กรัม ต่อ มิลลิลิตร)} \times \text{น้ำหนักของลิ้นจี่ (กรัม)}}$$

ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่

$$=$$ น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม) / ปริมาตรของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ข-7 การหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ AOAC (1990)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อลิ้นจี่มาตีป่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องปั่นผสม Blender, National : Model MX-T31 GN ที่ความเร็วระดับ 5 เป็นเวลา 1 นาที

การเตรียมสารเคมี

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 : ชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 50 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2 : ชั่ง กรดบอริก จำนวน 2 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โมล่าร์ (สำเร็จรูป)
- สารละลายเมธิลเรดอินดิเคเตอร์ : ประกอบด้วยเมธิลเรด จำนวน 0.016 กรัม และบรอมโมครีซอลกรีน จำนวน 0.083 ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยเอธานอล
- คะตะลิสต์ผสม (Catalyst mixture) : ประกอบด้วยโซเดียมซัลเฟต ชนิดปราศจากน้ำ จำนวน 96 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต จำนวน 3.5 กรัม และเซเลเนี่ยมไดออกไซด์ จำนวน 0.5 กรัม ผสมให้เข้ากัน

การวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 5 กรัม ใส่ใน Kjeldahl digestion flask บันทึกน้ำหนักที่ได้จริงเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีน เติมคะตะลิสต์ผสม จำนวน 8 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยโดยใช้เครื่องย่อยโปรตีน (Digester, Buchi : Model 430, Switzerland) ในระหว่างการย่อยค่อย ๆ เพิ่มความร้อนทีละน้อย ทำการย่อยจนกระทั่งได้ส่วนผสมเป็นของเหลวใส

2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำ Kjeldahl digestion flask ไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่นโปรตีน (Distillation unit, Buchi : Model 323, Switzerland) โดยที่ปลาย Condenser ของเครื่องกลั่นโปรตีนจุ่มอยู่ต่ำกว่าระดับของสารละลายบอริก ความเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวน 50 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายเมธิลเรดลงไป 2-3 หยด

3. เติมน้ำกลั่น จำนวน 125 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl digestion flask เพื่อลดความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก และลดความรุนแรงของปฏิกิริยาเมื่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 75 มิลลิลิตร ถูกปล่อยลงใน Kjeldahl digestion flask หลังจากที่เติมน้ำกลั่นแล้ว

4. นำไปกลั่นจนได้สิ่งที่กลั่นได้ออกมาอย่างน้อย 300 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นล้างปลาย Condenser ของเครื่องกลั่นโปรตีน ใส่ลงในฟลาสค์ แล้วนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โมล่าร์ จนถึงจุดยุติ

5. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรท เพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง

<u>หมายเหตุ</u> ทำการวิเคราะห์ Blank ด้วยวิธีการวิเคราะห์เดียวกันควบคู่กันไปด้วย โดยใช้คะตะลิตส์ผสมกับกรดซัลฟูริกเข้มข้นเท่านั้น (ในการไตเตรท Blank จะใช้สารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.05 โมล่าร์ ไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร)

การคำนวณ

ปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม)

$$= [(A-B) \times N \times 0.014 \times 6.25 \times 100] / W$$

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ หน่วยเป็น มิลลิลิตร

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรทกับ Blank หน่วยเป็น มิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของกรดซัลฟูริกที่ใช้ในการไตเตรท

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ หน่วยเป็น กรัม

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข-8 การหาปริมาณสารประกอบเพคติน ในรูปของเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ (Water soluble pectin) **เพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต** (Ammonium-oxalate soluble pectin) **เพคตินละลายได้ในด่าง** (Alkali soluble pectin) **และเพคตินทั้งหมด** (Total pectin) **ตามวิธีของ** International Federation of Fruit Juice Producers (1964)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งเนื้อลิ้นจี่ จำนวน 100 กรัม นำมาตีปั่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M วัดปริมาตร และชั่งน้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้

การเตรียมสารเคมี

- เอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 (Absolute alcohol)
- เอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 63 : ตวงเอธานอล (Absolute alcohol) จำนวน 63 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล่าร์ : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ จำนวน 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น
- สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 : ชั่ง แอมโมเนียม-ออกซาเลต จำนวน 0.75 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น
- สารละลาย Anti-foaming reagent
- สารละลาย Alcoholic-Carbazole ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 : ชั่ง คาร์บาซอล จำนวน 0.1 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยเอธานอล

<u>หมายเหตุ</u> สารละลาย Alcoholic-Carbazole ควรเตรียมใหม่ (Freshly prepared) ก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้ง

การเตรียมตะกอนของสารประกอบเพคติน (Precipitation of Pectic substances)

1. ปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลาย Anti-foaming reagent จำนวน 1-2 หยด

2. เติมเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จำนวน 25 มิลลิลิตร ลงในหลอด Centrifuge คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้ว

3. นำหลอด Centrifuge ไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่มีอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้แท่งแก้วคนเป็นบางครั้ง

4. เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำหลอด Centrifuge ออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แล้วล้างแท่งแก้วด้วยเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 จำนวน 10 มิลลิลิตร

5. นำไปตกตะกอน โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

6. เทของเหลวทิ้งไป แล้วนำตะกอนที่ได้มาเติมเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 63 ที่มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จำนวน 40 มิลลิลิตร คนตะกอนให้ละลายด้วยแท่งแก้ว แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 3-6

7. นำตะกอนที่ได้มาทำซ้ำข้อ 6 อีกครั้งหนึ่ง แล้วจะได้ตะกอนของสารประกอบเพคติน

การสกัดเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ (Water soluble pectin)

1. นำตะกอนของสารประกอบเพคตินที่ได้จากการเตรียมตะกอนโดยวิธีการข้างต้น มาเติมน้ำกลั่น จำนวน 35 มิลลิลิตร คนตะกอนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า และแท่งกวนผสมแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer and Magnetic bar) เป็นเวลา 10 นาที

2. จากนั้นนำไปตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยง โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3. เก็บของเหลวที่ได้ ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำตะกอนมาทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 1-2 อีกครั้งหนึ่ง

4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล่าร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในของเหลวที่เก็บได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้เพคตินที่ละลายได้ในน้ำ

5. นำตะกอนที่ได้ไปสกัดเพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลตต่อไป

การสกัดเพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต (Ammonium-oxalate soluble pectin)

1. เติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต จำนวน 35 มิลลิลิตร ในตะกอนของเพคตินที่ได้จากการสกัดเพคตินที่ละลายได้ในน้ำข้างต้น คนตะกอนให้เข้ากันด้วย เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า และแท่งกวนผสมแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer and Magnetic bar) เป็นเวลา 10 นาที

2. นำไปตกตะกอน โดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3. เก็บของเหลวที่ได้ ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำตะกอนมาทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 1-2 อีกครั้งหนึ่ง

4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล่าร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในของเหลวที่เก็บได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง เขย่าให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้เพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต

5. นำตะกอนที่ได้ไปสกัดเพคตินที่ละลายได้ในด่างต่อไป

การสกัดเพคตินที่ละลายได้ในด่าง (Alkali soluble pectin)

1. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล่าร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นจำนวน 30 มิลลิลิตร ในตะกอนของเพคตินที่ได้จากการสกัดเพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลตข้างต้น คนตะกอนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็กไฟฟ้า และแท่งกวนผสมแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer and Magnetic bar) เป็นเวลา 10 นาที

2. เทตะกอน และของเหลวทั้งหมด ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างตะกอนออกจากหลอด Centrifuge ให้หมด แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น

3. เขย่า และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำของเหลวที่กรองได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเพคตินที่ละลายได้ในด่าง

การวิเคราะห์

นำเพคตินที่ละลายได้ในน้ำ เพคตินที่ละลายได้ในแอมโมเนียมออกซาเลต และเพคตินที่ละลายได้ในด่าง ซึ่งสกัดได้จากวิธีการข้างต้น มาวิเคราะห์หาปริมาณเพคติน ตามขั้นตอนดังนี้

1. ใช้หลอดทดลองขนาดใหญ่เตรียมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

หลอด	สารเคมี
A	เติมตัวอย่างเพคตินที่เตรียมได้ จำนวน 1 มิลลิลิตร + 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Alcoholic-Carbazole
B	เติมตัวอย่างเพคตินที่เตรียมได้ จำนวน 1 มิลลิลิตร + 0.5 มิลลิลิตร ของเอธานอล
C	เติมน้ำกลั่น จำนวน 1 มิลลิลิตร + 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Alcoholic-Carbazole
D	เติมน้ำกลั่น จำนวน 1 มิลลิลิตร + 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Alcoholic-Carbazole

2. หลังจากเตรียมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ตามข้อ 1 เรียบร้อยแล้ว เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 6 มิลลิลิตร โดยใช้สูบชักดูดสาร (Dispensette) (พยายามปล่อยกรดซัลฟูริกให้หมดภายใน 7 วินาที)

3. ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องเหวี่ยงผสม (Vortex) จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำหลอดทดลองออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ประมาณ 15 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร

6. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพคติน ที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ galacturonic acid monohydrate

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- เตรียม Stock Solution ของสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate : ชั่ง galacturonic acid monohydrate จำนวน 120.5 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล่าร์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น สารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate ที่เตรียมได้ จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร
- เจือจางสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate จาก Stock Solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 40, 50, 60 และ 80 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate จาก Stock Solution จำนวน 10, 20, 40, 50, 60 และ 80 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น
- นำสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำตามขั้นตอนเดียวกันกับวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น
- นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาหาสมการเชิงเส้นตรง เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีอยู่ในตัวอย่าง

ตัวอย่างสมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$$Y = a(X) \pm C$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณสารประกอบเพคติน (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)

a คือ ค่าความชันของสมการ

X คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้หลังจากที่ลบค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่นแล้ว

C คือ ค่าคงที่ของสมการ

<u>หมายเหตุ</u> ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate ก่อนที่จะนำไปหาสมการเชิงเส้นตรงจะต้องลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน galacturonic acid monohydrate

= ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด A - ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด B – ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด C – ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด D

การคำนวณ

ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

= ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด A - ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด B - ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด C - ค่าการดูดกลืนแสงของหลอด D

แทนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างลงในสมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วรายงานผลเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ปริมาณสารประกอบเพคตินที่มีในตัวอย่าง (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)

$$= \frac{\text{ปริมาณสารประกอบเพคตินที่ได้จากกราฟมาตรฐาน (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)} \times 100}{\text{15 มิลลิลิตร ของน้ำลิ้นจี่ที่สกัดได้}}$$

ปริมาณสารประกอบเพคติน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณสารประกอบเพคติน (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)} \times \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่ (กรัม ต่อ มิลลิลิตร)} \times \text{น้ำหนักของลิ้นจี่ (กรัม)} \times \text{Dilution Factor}}$$

ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่

$$= \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม)} / \text{ปริมาตรของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (มิลลิลิตร)}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก ข-9 การหาปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid) โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Test Kit) ตามวิธีของ Boehringer Mannheim (1997)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งเนื้อลิ้นจี่ จำนวน 100 กรัม นำมาตีป่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M วัดปริมาตร และชั่งน้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้

การเตรียมสารเคมี

- กรดเมตาฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 1 : ชั่งกรดเมตาฟอสฟอริก จำนวน 1 กรัม ละลาย และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น

สารเคมีสำเร็จรูป

- สารละลายขวดที่ 1 ประกอบด้วย Sodiumphosphate / Citrate buffer, pH approx. 3.5 ; MTT [3-(4,5-dimethylthylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ; Stabilizers
- สารละลายขวดที่ 2 ประกอบด้วย PMS (5-methylphenazinium methosulfate)
- Ascorbate oxidase spatulas , approx. 17 U AAO

การวิเคราะห์

เจือจางตัวอย่าง โดยปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยกรดเมตาฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 1 ดังนั้น ตัวอย่างจะมีค่า Dilution Factor เท่ากับ 10 จากนั้นดำเนินการทดลองตามวิธีวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

Pipette into cuvettes	Sample blank	Sample
สารละลายขวดที่ 1*	1 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.5 มิลลิลิตร	1.5 มิลลิลิตร
ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์	0.1 มิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร
Ascorbate oxidase spatula**	1 ชิ้น	-
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที ในระหว่างนี้คน Sample blank cuvettes ทุก ๆ 2 นาที จึงแยกเอา Ascorbate oxidase spatula ออก แล้วนำ Sample blank and Sample cuvettes ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร (A_1)		
สารละลายขวดที่ 2***	0.1 มิลลิลิตร	0.1 มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากันโดยใช้ plastic spatula แล้วตั้งทิ้งไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 578 นาโนเมตร (A_2)		

หมายเหตุ * สารละลายขวดที่ 1 จะต้องทำให้มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

** Ascorbate oxidase spatula ใช้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น

*** ระบบของปฏิกิริยาจะมีความไวต่อแสงมากหลังจากที่เติมสารละลายขวดที่ 2 ดังนั้นก่อนที่จะเติมสารละลายขวดที่ 2 ควรวาง Cuvettes ให้พ้นจากแสง หรือคลุม Cuvettes ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

การคำนวณ

$$\Delta A = (A_2\text{-}A_1)_{\text{sample}} - (A_2\text{-}A_1)_{\text{blank}}$$

สูตรคำนวณหาปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid) (กรัม ต่อ ลิตร)

ปริมาณวิตามินซี = $0.2814 \times \Delta A \times$ Dilution Factor

ปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid) (กรัม ต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณวิตามินซี (L-Ascorbic acid) (กรัม ต่อ ลิตร)} \times \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่ (กรัม ต่อ มิลลิลิตร)} \times \text{น้ำหนักของลิ้นจี่ (กรัม)}}$$

ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่

= น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม) / ปริมาตรของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (มิลลิลิตร)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาคผนวก ข-10 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอล (Folin-Ciocalteu method : FC) ตามวิธีของ Poffet (1997)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งเนื้อลิ้นจี่ จำนวน 100 กรัม นำมาตีป่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M วัดปริมาตร และชั่งน้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้

การเตรียมสารเคมี

- สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent สำเร็จรูป
- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว : ชั่ง โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 100 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์

1. เจือจางตัวอย่าง โดยปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น ดังนั้นตัวอย่างจะมีค่าDilution Factor เท่ากับ 10
2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นจำนวน 75 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที
4. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัว จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 720 นาโนเมตร

6. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอล

<u>หมายเหตุ</u> ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำกลั่น (Blank) ด้วยวิธีการวิเคราะห์เดียวกันควบคู่กันไปด้วย เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอล

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- เตรียม Stock Solution ของสารละลายมาตรฐาน Catechin : ชั่ง Catechin จำนวน 0.05 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยเอธานอล (Absolute alcohol) สารละลายมาตรฐาน Catechin ที่เตรียมได้ จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 500 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร
- เจือจางสารละลายมาตรฐาน Catechin จาก Stock Solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200, 300 และ 400 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Catechin จาก Stock Solution จำนวน 2.5, 5, 10, 15 และ 20 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยเอธานอล
- นำสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำตามขั้นตอนเดียวกันกับวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น พร้อมทั้งวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำกลั่นควบคู่กันไปด้วย
- นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาหาสมการเชิงเส้นตรง เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในตัวอย่าง

ตัวอย่างสมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$$Y = a(X) \pm C$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)

a คือ ค่าความชันของสมการ

X คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่วัดได้หลังจากที่ลบค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่นแล้ว

C คือ ค่าคงที่ของสมการ

การคำนวณ

แทนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างลงในสมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วรายงานผลเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ปริมาณสารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอล (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)} \times \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่ (กรัม ต่อ มิลลิลิตร)} \times \text{น้ำหนักของลิ้นจี่ (กรัม)} \times \text{Dilution Factor}}$$

ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่

$$= \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม)} / \text{ปริมาตรของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (มิลลิลิตร)}$$

ภาคผนวก ข-11 การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonols with vanillin method : FV) ตามวิธีของ Poffet (1997)

วิธีวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งเนื้อลิ้นจี่ จำนวน 100 กรัม นำมาตีป่น แล้วแยกกากออก ด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แบบแยกกาก Juicer, National : Model MJ-68M วัดปริมาตร และชั่งน้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้

การเตรียมสารเคมี

- กรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 70 : ตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น จำนวน 70 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น
- สารละลาย Vanillin-Sulfuric reagent : ชั่งวานิลิน จำนวน 1 กรัม ละลาย และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70

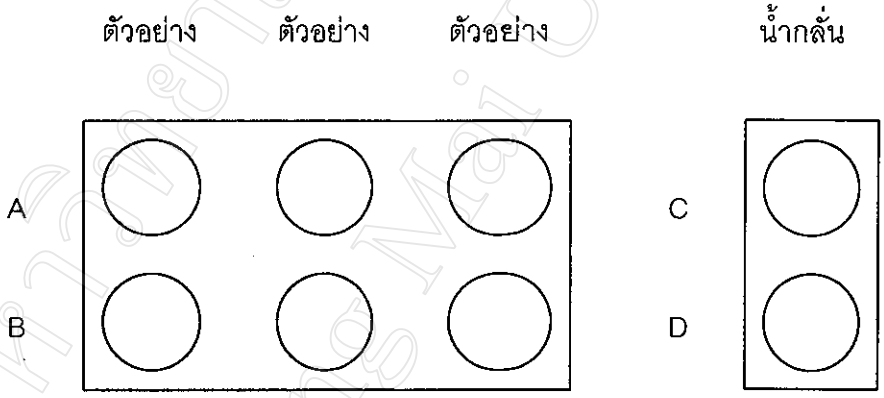
การวิเคราะห์

1. เจือจางตัวอย่าง โดยปิเปตตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น ดังนั้นตัวอย่างจะมีค่า Dilution Factor เท่ากับ 25
2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่แช่อยู่ในอ่างน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย Vanillin-Sulfuric reagent จำนวน 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที (ในขั้นตอนนี้ให้ทำ Blank ของตัวอย่างด้วย เพื่อลบสีของตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในตัวอย่าง เพียงแต่เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 แทนสารละลาย Vanillin-Sulfuric reagent)
3. ผสมสารละลายที่อยู่ในหลอดทดลองด้วย เครื่องเหวี่ยงผสม (Vortex) แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอีก 30 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5. บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอล

<u>หมายเหตุ</u> ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำกลั่น (Blank) ด้วยวิธีการวิเคราะห์เดียวกันควบคู่กันไปด้วย เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์



A ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ หรือสารละลายมาตรฐาน + สารละลาย Vanillin-Sulfuric

B ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ หรือสารละลายมาตรฐาน + กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 70

C ประกอบด้วย น้ำกลั่น + สารละลาย Vanillin-Sulfuric reagent

D ประกอบด้วย น้ำกลั่น + กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 70

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

- เตรียม Stock Solution ของสารละลายมาตรฐาน Catechin : ชั่ง Catechin จำนวน 0.01 กรัม ละลาย และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใน Volumetric flask ด้วยน้ำกลั่น สารละลายมาตรฐาน Catechin ที่เตรียมได้ จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 100 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร
- เจือจางสารละลายมาตรฐาน Catechin จาก Stock Solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 และ 1.6 มิลลิกรัม ต่อ ลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Catechin จาก Stock Solution จำนวน 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำกลั่น
- นำสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำตามขั้นตอนเดียวกันกับวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น พร้อมทั้งวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำกลั่นควบคู่กันไปด้วย
- นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาหาสมการเชิงเส้นตรง เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง

<u>หมายเหตุ</u> ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน (A) ก่อนที่จะนำไปหาสมการเชิงเส้นตรง จะต้องลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่นที่เติมสารละลาย Vanillin-Sulfuric reagent (C) และค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่นที่เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 70 (D)

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน

= ค่าการดูดกลืนแสงของ A - ค่าการดูดกลืนแสงของ C - ค่าการดูดกลืนแสงของ D

ตัวอย่างสมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

$$Y = a(X) \pm C$$

เมื่อ Y คือ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)

a คือ ค่าความชันของสมการ

X คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

C คือ ค่าคงที่ของสมการ

การคำนวณ

ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

= ค่าการดูดกลืนแสงของ A - ค่าการดูดกลืนแสงของ B - ค่าการดูดกลืนแสงของ C+D

แทนค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างลงในสมการเชิงเส้นที่ได้จากกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง แล้วรายงานผลเป็น มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม)

$$= \frac{\text{ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัม ต่อ ลิตร)} \times \text{น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม)}}{\text{ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่ (กรัม ต่อ มิลลิลิตร)} \times \text{น้ำหนักของลิ้นจี่ (กรัม)} \times \text{Dilution Factor}}$$

ความหนาแน่นของน้ำลิ้นจี่

= น้ำหนักของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (กรัม) / ปริมาตรของน้ำลิ้นจี่ที่ได้ (มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค-1 เซรุ่มของผู้ทดสอบ (Patients' sera)

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูนของงานวิจัยนี้ ใช้ผู้ทดสอบที่มีอาการแพ้ลิ้นจี่ทางคลีนิค จำนวน 18 คน จาก University Hospital Eppendorf, Department of Dermatology and Allergology, Hamburg, Germany ซึ่งการคัดเลือกผู้ทดสอบจะอาศัยการทดสอบบนพื้นฐานของวิธี EAST (Enzyme Allergosorbent Test) และประวัติทางการแพทย์ โดยเซรุ่มของผู้ทดสอบที่นำมาใช้ทดสอบปฏิกิริยาทางอิมมูนจะเป็น EAST-class $\geq$ 2 กล่าวคือ สามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับ IgE และสารก่อภูมิแพ้ของลิ้นจี่ได้ โดยวิธีการทดสอบ EAST (Allergopharma, Reinbek, Germany) และใช้เซรุ่มของผู้ทดสอบที่ไม่มีประวัติการแพ้อาหาร (non-atopic) เป็นตัวควบคุม

ภาคผนวก ค-2 การสกัดโปรตีน (Protein extracts) **ตามวิธีของ** Vieths *et al.*, (1992)

ใส่ Acetone ที่มีอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จำนวน 400 มิลลิลิตร
ลงในขวด Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร

↓

ใส่เนื้อผลไม้จำนวน 200 กรัมลงในขวด Duran
แล้วลดอุณหภูมิไม่ให้สูงกว่า - 40 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำแข็งแห้ง

↓

นำเนื้อผลไม้ไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นความเร็วสูง (Homogenizer)
โดยควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงกว่า - 40 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ข้ามคืนที่ - 20 องศาเซลเซียส

↓

จากนั้นนำมากรองโดยใช้เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump)

↓

ล้างส่วนที่กรองได้ (Cake) ด้วย Acetone ที่มีอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส
จำนวน 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นล้าง Cake ครั้งสุดท้ายด้วย Acetone และ
Diethyl ether ที่มีอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส อย่างละ 25 มิลลิลิตร อีก 1 ครั้ง

↓

นำ Cake ที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried)

↓

จะได้ Acetone powder จากนั้นนำไปเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท
ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ภาคผนวก ค-3 การเตรียมโปรตีนสกัดจาก Acetone Powder

ชั่ง Acetone Powder จำนวน 2 กรัม ละลายใน 0.01 M-potassium phosphate buffer จำนวน 30 มิลลิลิตร (PBS, pH 7.4) แล้วตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปทำให้ตกตะกอนโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 60 นาที จึงนำไปกรอง แบ่งส่วนใสที่กรองได้ออกเป็นชุด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้แห้ง (Lyophilized) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจสอบ

ภาคผนวก ค-4 การตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้

การตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้ตามวิธีของ Vieths *et al.*, (1992) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. **การแยกองค์ประกอบของสารก่อภูมิแพ้หรือโปรตีนสกัดด้วย** Electrophoresis คือ การใช้กระแสไฟฟ้าแยกองค์ประกอบของแอนติเจนออกจากกันในแผ่นวุ้น องค์ประกอบของแอนติเจนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่เร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับขนาดน้ำหนักโมเลกุล ประจุรวมของแอนติเจนชนิดนั้น ๆ

- **การแยกองค์ประกอบของสารก่อภูมิแพ้ หรือโปรตีนสกัด โดยใช้** Sodiumdodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE)

ในการแยกองค์ประกอบของสารก่อภูมิแพ้ หรือโปรตีนสกัด ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการดังกล่าวข้างต้น จะใช้ SDS-PAGE ที่เตรียมได้จาก Acrylamide gel ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 และใช้ NuPAGE® vertical electrophoresis system ตามวิธีการของ Manufacturer's recommendations (Novex, San Diego, CA, USA)

โปรตีนสกัดจะถูกนำมาละลายใน Tris-HCl / SDS buffer (pH 6.8) ที่มี β-mercaptoethanol ความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/v) และต้มจนเดือดเป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำไปแยกองค์ประกอบโดยใช้ Electrophoresis

การแยกองค์ประกอบโดยใช้ NuPAGE® vertical electrophoresis system (Novex, San Diego, CA, USA) จะใช้ตัวอย่างโปรตีนประมาณ 20 μg / ครั้ง และใช้กระแสไฟฟ้า 200 V (constant voltage) จาก Power Ease 500 power supply (Novex, San Diego, CA, USA) เป็นเวลา 35 นาที จากนั้นเจลจะถูกย้อมด้วย Silver ตามวิธีการของ Heukeshoven and Denrick (1986) เพื่อตรวจสอบโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล หรือใช้ตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้โดยวิธี Immunoblotting

2. **การตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้หรือโปรตีนสกัดโดยวิธี** Immunoblotting คือ การตรวจหาสารก่อภูมิแพ้หรือโปรตีนสกัดที่จำเพาะกับแอนติบอดีของผู้ทดสอบที่มีอาการแพ้ลิ้นจี่ทางคลีนิคบนแผ่น Nitrocellulose membrane

- **การถ่ายซับโปรตีนที่แยกได้จาก SDS-PAGE ลงบนแผ่น** Nitrocellulose membrane

ในการตรวจสอบสารก่อภูมิแพ้หรือโปรตีนสกัดโดยวิธี Immunoblotting สารก่อภูมิแพ้หรือโปรตีนสกัดที่ถูกแยกองค์ประกอบอยู่บนเจลใน NuPAGE® vertical electrophoresis system จะถูกเคลื่อนย้ายด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoretic transfer) ลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane (NC membrane 0.2 μm, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany) ที่มีขนาด 0.8 mA/cm^2 เป็นเวลา 80 นาที โดยใช้ชุดอุปกรณ์ NovaBlot semidry blotting apparatus (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) ตามวิธีของ Kyhse-Andersen (1984) พร้อมกับระบบบัฟเฟอร์แบบไม่ต่อเนื่อง ตามวิธีของ Vieths *et al.*, (1992) จากนั้นนำแผ่น Nitrocellulose

membrane ไปทำให้แห้ง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตัดเป็นชิ้นขนาด 2 มิลลิเมตร ก่อนนำไปตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูน

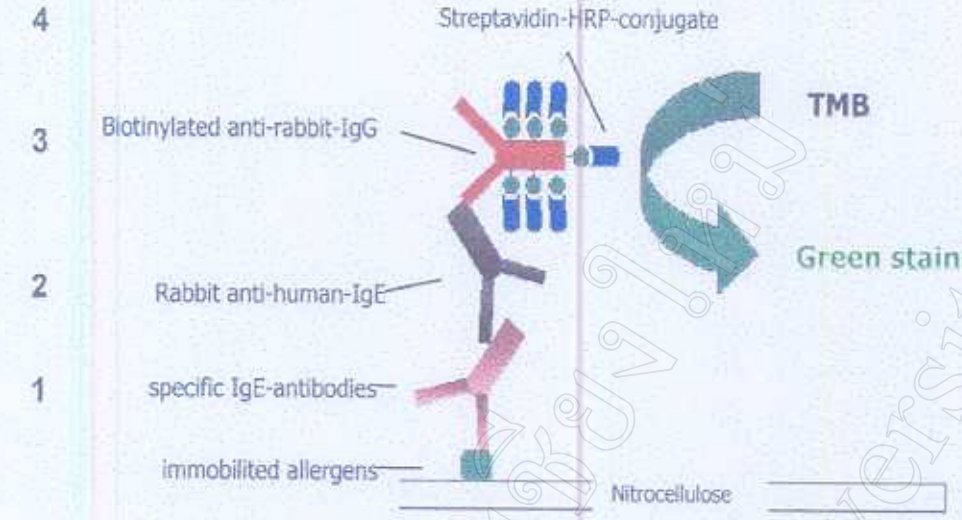
- **การตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูนระหว่างสารก่อภูมิแพ้กับ IgE ที่จำเพาะ ตามวิธีของ** Vieths *et al.*, (1992) **และวิธีการของ** Moller *et al.*, (1997)

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูน ระหว่างสารก่อภูมิแพ้กับ IgE จำเพาะที่ได้จากเซรุ่มของผู้ทดสอบที่มีอาการแพ้ทางคลีนิค สามารถสรุปได้ดังรูปที่ ค-1 โดยขั้นตอนของการตรวจสอบมีดังนี้

นำชิ้น Nitrocellulose membrane ที่ตัดเป็นชิ้นมาเคลือบด้วยสารละลายหางนมผง (Skimmed milk powder solution) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 2 ครั้ง ก่อนนำไปบ่มกับเซรุ่มของผู้ทดสอบที่มีอาการแพ้ทางคลีนิค แล้วปล่อยทิ้งไว้ 1 คืน (1) จากนั้นนำมาบ่มกับ Rabbit anti-human-IgE เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (2) แล้วจึงนำมาบ่มกับ Biotinylated goat anti-rabbit-IgG อีก 1 ชั่วโมง (3) ก่อนนำไปบ่มกับ Streptavidin-horseradish peroxidase เป็นเวลา 20 นาที (4) แล้วจึงทำการย้อมสี (Staining) เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใช้ 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine และ Dioctylsodiumsulphosuccinate เป็นขั้นตอนสุดท้าย (5)

<u>หมายเหตุ</u> ในการตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูนโดยวิธีนี้จะใช้ชิ้น Nitrocellulose membrane ที่ตัดเป็นชิ้นมาเคลือบด้วยสารละลายหางนมผง (Skimmed milk powder solution) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 2 ครั้ง มาบ่มกับเซรุ่มของผู้ทดสอบที่ไม่มีอาการแพ้อาหาร เพื่อตรวจสอบการทำปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (Unspecific binding) ควบคู่ไปด้วย

สำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพ การเคลื่อนย้ายโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าจากเจลลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane รวมทั้งการแยกองค์ประกอบของโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งเทียบกับแผ่นน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Molecular weight marker) (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) จะถูกย้อมสีด้วย Colloidal gold (Bio-Rad, Munich, Germany) ตามวิธีของ Danscher and Noorgard (1983)



รูปที่ ค-1 ขั้นตอนการตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูน ระหว่างสารก่อภูมิแพ้กับ IgE ที่จำเพาะ ตามวิธีของ Vieths *et al.*, (1992) **และวิธีการของ** Moller *et al.*, (1997)

ภาคผนวก ค-5 Enzyme Allergosorbent Test (EAST) Inhibition

ในการทดลองนี้นอกจากจะตรวจสอบปฏิกิริยาทางอิมมูนของสารก่อภูมิแพ้กับ IgE ที่จำเพาะแล้ว ยังทำการตรวจสอบปฏิกิริยาการยับยั้งของสารก่อภูมิแพ้อีกด้วย โดยนำเซรุ่มของผู้ทดสอบมาบ่มในบัฟเฟอร์ PBS ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นเตรียมสารละลายตัวยับยั้ง โดยนำชุดเจือจาง 10 เท่าของสารสกัดตัวยับยั้ง (Inhibitor extracts) จากลิ้นจี่ และผลิตภัณฑ์ของลิ้นจี่มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 6 ระดับ โดยเริ่มจากความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร มาเตรียมให้เป็นความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร โดยใช้บัฟเฟอร์ PBS เป็นตัวเจือจาง ซึ่งจะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ในขั้นตอนของการวิเคราะห์จะใช้แผ่น Lychee allergen disk มาบ่มกับเซรุ่มที่เจือจางแล้ว 50 ไมโครลิตร และสารละลายตัวยับยั้ง 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีแสง จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน PBS บัฟเฟอร์ เป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาบ่มกับ Anti-human IgE alkaline phosphatase

conjugate (Allergopharma, Reinbek, Germany) และ PBS บัฟเฟอร์ ทิ้งไว้ข้ามคืนในสภาวะที่ไม่มีแสง แล้วนำแผ่น Lychee allergen disk มาล้างอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่จะนำไปหาแอคติวิตีของ Phosphatease โดยการย้อมสีด้วย p-nitrophenylphosphate (PNPP) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เพื่อดูประสิทธิภาพการยับยั้งของสารก่อภูมิแพ้

<u>หมายเหตุ</u> บัฟเฟอร์ PBS ที่ใช้สำหรับบ่มประกอบด้วย Bovine surum albumin (BSA) ร้อยละ 0.3 และ Tween 20 ร้อยละ 0.1

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศุภรัตน์ ศิริสกุลวัฒน์	
วัน เดือน ปี เกิด	6 กันยายน 2519	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2537	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี จังหวัดพิษณุโลก
	พ.ศ. 2541	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University