บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุพันธุ์พืช

ผลลำไยพันธุ์ดอที่เก็บเกี่ยวในระยะแก่ทางการค้าชั้นมาตรฐาน A จากสวนเกษตรกรในเขตอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง นำผลลำไยมาตัดแต่งก้านออกโดยตัดให้มีก้านเหลือติดผลยาวประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร และคัดเลือกเอาเฉพาะผลลำไยที่ดีไม่มีความเสียหายและมีขนาดสม่ำเสมอกัน จากนั้นนำมาทดลองทันที

3.2 วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิสูงต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดอาการสะท้านหนาวของผลลำไย

การวางแผนการทดลอง

จึงวางแผนการทดลองแบบ 2x3x2 ปัจจัยร่วมในสุ่มสมบูรณ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ งานวิจัยนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 อุณหภูมิของน้ำร้อน 2 ระดับคือ 45 และ 50 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการจุ่มผลลำไยในน้ำร้อน 3 ระยะคือ 3, 5 และ10 นาที

ปัจจัยที่ 3 อุณหภูมิของการเก็บรักษา 2 ระดับคือ 1 และ 5 องศาเซลเซียส

ชุดควบคุม 1 คือ ไม่จุ่มในน้ำร้อน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส

ชุดควบคุม 2 คือ ไม่จุ่มในน้ำร้อน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

วิธีการ นำผลลำไยที่คัดเลือกแล้วและมีขนาดสม่ำเสมอกัน มาบรรจุในถุงตาข่ายถุงละ 2 กิโลกรัม นำไปจุ่มในน้ำร้อนปริมาตร 6 ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส นาน 3, 5 และ 10 นาที โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) แล้วนำมาจุ่มในน้ำก๊อกที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสทันทีเพื่อลดอุณหภูมิ ส่วนผลลำไยชุดควบคุมคือ ผลลำไยที่ไม่จุ่มในน้ำร้อนแต่จุ่มในน้ำอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสแล้วผึ่งให้ผิวนอกแห้ง นำผลลำไยมาบรรจุใส่กล่องกระดาษขนาดกว้างxยาวxสูง เท่ากับ 20.9x41.8x9.0 เซนติเมตร ที่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ด้านละ 2 รูรวมจำนวน 4 รู โดยแบ่งเป็น 3 ชุด คือ ชุดที่ 1 บรรจุผลลำไยกล่องละ 1.8 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 1 และ 5 องศาเซลเซียส เพื่อติดตามการสูญเสียน้ำหนักและการเน่าเสีย ส่วนชุดที่ 2 และ 3 บรรจุผลลำไยกล่องละ 2.25 กิโลกรัม นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 1 และ 5 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจอาการสะท้านหนาวของเปลือก วัดสีเปลือกด้านนอกและด้านใน วัดการรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์ กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส วัดปริมาณโปรตีน และปริมาณสารประกอบฟีนอลที่เปลือก วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และค่าพีเอชของเนื้อ ตามวิธีการต่างๆ ดังนี้

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก

ชั่งน้ำหนักผลลำไยทุก 2 วัน ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (รุ่น BA31-00P ของบริษัท Sartorius, Germany) ใช้ผลลำไยประมาณ 500 กรัมต่อซ้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนัก ณ วันที่ชั่ง})}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \times 100$$

2. เปอร์เซ็นต์การเน่าเสีย

พิจารณาจากจำนวนผลลำไยที่เน่าเสีย แล้วคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียจากจำนวนผลลำไยทั้งหมด ใช้ผลลำไย 30 ผลต่อซ้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเน่าเสีย} = \frac{\text{จำนวนผลลำไยที่เน่าเสียในวันที่ตรวจสอบ}}{\text{จำนวนผลลำไยทั้งหมด}} \times 100$$

3. อาการสะท้านหนาวของเปลือกด้านใน

บันทึกอาการสะท้านหนาวในระหว่างการเก็บรักษา โดยใช้ระบบการให้คะแนนซึ่งแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

0 = ไม่เกิดอาการสะท้านหนาว

1 = ผิวเปลือกด้านในเกิดอาการฉ่ำน้ำและ/หรือเกิดสีน้ำตาลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ของผล

2 = ผิวเปลือกด้านในเกิดอาการฉ่ำน้ำและ/หรือเกิดสีน้ำตาล 25 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3 = ผิวเปลือกด้านในเกิดอาการฉ่ำน้ำและ/หรือเกิดสีน้ำตาล 50 ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ของผล

4 = ผิวเปลือกด้านในเกิดอาการฉ่ำน้ำและ/หรือเกิดสีน้ำตาลมากกว่า 75 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์

4. สีเปลือกด้านนอกและด้านใน

วัดสีเปลือกด้านนอกและด้านในของผลลำไยโดยใช้เครื่อง Chromameter (รุ่น CR-300 ของบริษัท Minolta, Japan) บันทึกค่าในระบบ CIE 1976 ให้ค่าเป็น L*, a*, b* (ภาพที่ 7) แหล่งแสง D65 ใช้ผลลำไย 10 ผลต่อซ้ำ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ค่า L* แสดงความสว่างเมื่อมีค่าเข้าใกล้ 100 และแสดงความมืดเมื่อมีค่าเข้าใกล้ 0

ค่า a* ที่เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีแดง ค่า a* ที่เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีเขียว

ค่า b* ที่เป็นบวกแสดงว่าผลิตผลมีสีเหลือง ค่า b* ที่เป็นลบแสดงว่าผลิตผลมีสีน้ำเงิน

คำนวณหาค่า chroma ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มของสีจากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

$$chroma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

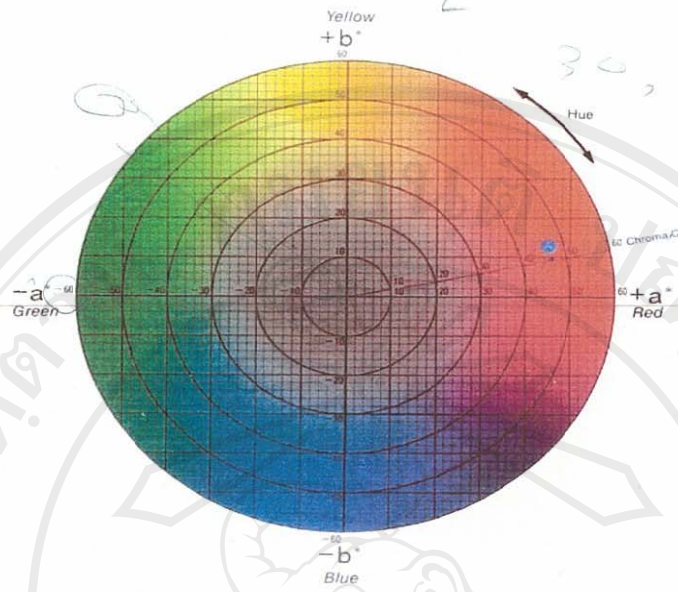
ถ้ามีค่า chroma เข้าใกล้ 0 แสดงว่าวัตถุมีสีซีดจาง ถ้า chroma มีค่าสูงแสดงว่าวัตถุมีสีเข้ม และคำนวณหาค่า hue angle (h^{o}) ที่เป็นค่าแสดงสี ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-360 องศา จากสมการดังนี้ (McGuire, 1992)

$$h^{o} = \tan^{-1} b^{*}/a^{*}$$

ค่า h^{o} เป็นค่าที่แสดงสีของวัตถุคือ

0-45 องศาแสดงสีม่วงแดงถึงสีส้มแดง	180-225 องศาแสดงสีเขียวถึงสีน้ำเงินเขียว
45-90 องศาแสดงสีส้มแดงถึงสีเหลือง	225-270 องศาแสดงสีน้ำเงินเขียวถึงสีน้ำเงิน
90-135 องศาแสดงสีเหลืองถึงสีเหลืองเขียว	270-315 องศาแสดงสีน้ำเงินถึงสีม่วง
135-180 องศาแสดงสีเหลืองเขียวถึงสีเขียว	315-360 องศาแสดงสีม่วงถึงสีม่วงแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 7 แผ่นเทียบสีของ Minolta รุ่น CR-300 (Minolta, 1976)

5. การรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์ของเปลือก

5.1 สารเคมีที่ใช้

- สารละลายแมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 0.4 โมล่าร์

เตรียมโดยชั่งแมนนิทอล (reagent grade Scharlau, Spain) น้ำหนัก 72.8680 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

5.2 วิธีการทดลอง

การรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์

ผ่าผลลำไยครึ่งผลแยกเปลือกออกจากส่วนเนื้อ นำเปลือกไปเจาะด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 15 ชิ้นต่อซ้ำ นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน (deionized) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 2 ครั้ง และซับด้วยกระดาษทิชชูเบาๆ ให้แห้ง นำมาแช่ในสารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้น 0.4 โมล่าร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบ 3 ชั่วโมงแล้วจึงนำสารละลายมาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอีเล็กโตรไลต์ ด้วยเครื่อง Conductivity meter (รุ่น NI 8819N ของบริษัท Hanna, Portugal) เทสารละลายกลับลงในฟลาส์คใบเดิม แล้วนำตัวอย่างไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ (รุ่น HL-300 ของบริษัท Hunley, Taiwan) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อความดันภายในหม้อนึ่งลดลงเท่ากับศูนย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปล่อยให้สารละลายในฟลาส์คมีอุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จึงนำมาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารอีเล็กโตรไลต์อีกครั้ง แล้วคำนวณค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์ จากสมการ ดังนี้ (McCollum and McDonald,1991)

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของสารอีเล็กโตรไลต์ = (a / b) x 100

a = ค่าการนำไฟฟ้าของสารอีเล็กโตรไลต์ที่รั่วไหลออกจากเปลือกผลลำไย

b = ค่าการนำไฟฟ้าของสารอีเล็กโตรไลต์ทั้งหมดในเปลือกผลลำไย

6. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

นำเนื้อลำไยมา 20 ผลต่อซ้ำ ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นผักและผลไม้ (รุ่น S 648 ของบริษัท Moulinex, Japan) แล้วนำน้ำปั่นของเนื้อผลลำไยมาวัดหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (รุ่น N 1 ของบริษัท ATAGO, Japan) โดยก่อนใช้ปรับค่าให้เป็นศูนย์ด้วยน้ำกลั่นทุกครั้ง ทำการวัด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

7. ค่าพีเอชของเนื้อ

นำน้ำปั่นของเนื้อผลลำไยมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter (รุ่น HI 9021 ของบริษัท HANNA Instrument HI 9021 Microprocesser) ตรวจสอบความถูกต้องของเครื่อง pH meter ก่อนใช้โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 และ 7 ทำการวัด 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

8. วัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีการของ Jiang (1999) และ Tian *et al.* (2002)

8.1 การเตรียมสารละลาย

- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4

เตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4 . 2H_2O$) ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (reagent grade Scharlau, Spain) น้ำหนัก 15.6010 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 . 2H_2O$) ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ โดยชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (reagent grade Scharlau, Spain) น้ำหนัก 8.8995 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 โดยนำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ปริมาตร 735 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ปริมาตร 265 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายผสมให้ได้เท่ากับ 6.4

- สารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์

โดยชั่ง catechol (Sigma, U.S.A.) น้ำหนัก 5.5050 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

8.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ (enzyme extraction)

สกัดเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำเปลือกผลลำไยจำนวน 3 กรัม ใส่ไนโตรเจนเหลวลงไปแล้วบดให้ละเอียดในโกร่งที่แช่เย็น เติมสารละลายสกัด (extraction solution) ในอัตราส่วนปริมาตรสารละลายสกัดต่อน้ำหนักเปลือกของผลลำไย เท่ากับ 8 : 1 ซึ่งสารสกัดนี้ประกอบด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 และ Polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Sigma, U.S.A.) 1 เปอร์เซ็นต์ บดให้เข้ากันอีกครั้ง และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วปั่นตัวอย่างให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Unicen 15 DR ของบริษัท Herolab, Germany) ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลวใส (supernatant) ซึ่งเป็น crude enzyme ไปใช้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ (assay mixture) โดยปิเปตสารละลาย catechol ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ พีเอช 6.4 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม crude enzyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน cuvette tube ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer (Unicam UV Series 500, England) ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ แสดงเป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ (unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์โดยการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร 0.001 หน่วยต่อนาที แล้วคำนวณเป็น Specific activity ของเอนไซม์ หมายถึงปริมาณหน่วยเอนไซม์ต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976)

9.1 การเตรียมสารละลาย

- สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งสารโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) (Fluka, Switzerland) น้ำหนัก 0.005 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

- สารละลาย Coomassie

เตรียมโดยชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 (Fluka, Switzerland) น้ำหนัก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอล 99.5% (Merck, Germany) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85% (Merck, Germany) ลงไป 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

9.2 การวิเคราะห์

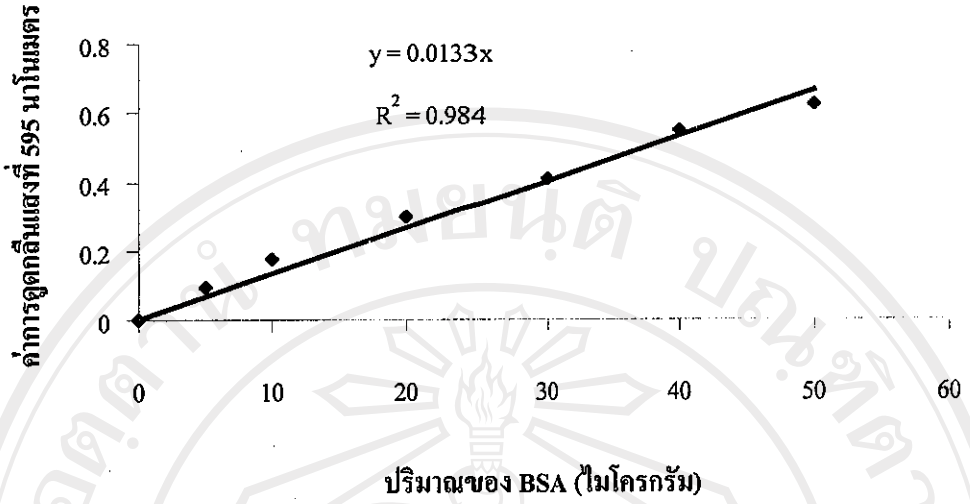
การสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีน

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดที่ 1 เป็น Blank ทำเพียงหลอดเดียว รวมเป็น 19 หลอด จากนั้นเติมสารละลาย Coomassie ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นปริมาณของ BSA ไมโครกรัม และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

โดยการนำ crude enzyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Coomassie ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาระดับความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 8)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 8 กราฟมาตรฐานโปรตีน

10. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์จากวิธีการของ Hyodo *et al.* (1978) Keta and Atantee (1998) และ Singleton and Rossi (1965)

10.1 การเตรียมสารละลาย

- สารละลายฟีนอลมาตรฐาน ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่งสาร gallic acid (Merck, Germany) น้ำหนัก 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

- สารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยตวงเอทานอล (Scharlau, Spain) 99.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 998 มิลลิลิตร

- สารละลาย Folin-Ciocaltea Reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยตวง Folin-Ciocaltea Reagent (Merck, Germany) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

- สารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต (Scharlau, Spain) น้ำหนัก 75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10.2 การวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐานฟีนอล

ปิเปตสารละลายฟีนอลมาตรฐาน ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดที่ 1 เป็น Blank ทำเพียงหลอดเดียว รวมเป็น 31 หลอด จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocaltea reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณของ gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน x เป็นปริมาณของ gallic acid มีหน่วยเป็นไมโครกรัม และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

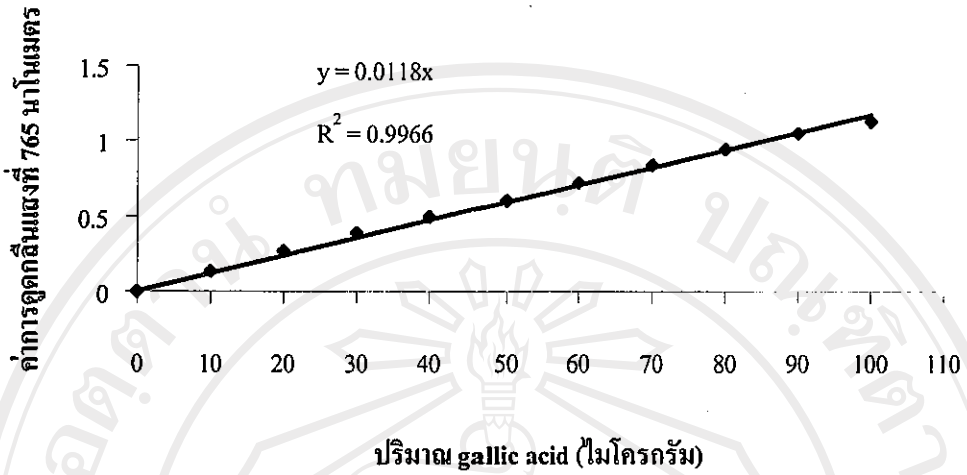
การสกัดสารจากเปลือก

โดยนำเปลือกผลลำไยจำนวน 3 กรัม ใส่ไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดในโกร่งที่แช่เย็น แล้วเติมสารละลายเอทานอล ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นลงไปปริมาตร 12 มิลลิลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายหลังการเหวี่ยงนำเฉพาะของเหลวใสไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำของเหลวใสที่สกัดได้มาเจือจางลง 10 เท่า และนำสารละลายที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocaltea reagent ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลจากกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 9 กราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอล

วิธีการคำนวณ

ปริมาณกรดแกลลิกที่อ่านได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดเจือจาง = a ไมโครกรัม

สารสกัดเจือจาง 1 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอล = a ไมโครกรัม

สารสกัดเจือจาง 10 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 ไมโครกรัม

สารสกัดจากเปลือก 1 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 ไมโครกรัม

สารสกัดจากเปลือก 25 มิลลิลิตร มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 x 25 ไมโครกรัม

ตัวอย่างเปลือกลำไย 3 กรัม มีสารประกอบฟีนอล = a x 10 x 25 ไมโครกรัม

ตัวอย่างเปลือกลำไย 1 กรัม มีสารประกอบฟีนอล = $\frac{a \times 10 \times 25}{3}$ ไมโครกรัม

ดังนั้นตัวอย่างเปลือกลำไยมีสารประกอบฟีนอล = $\frac{a \times 10 \times 25}{3}$ มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดในรูปของกรดแกลลิก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved