บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ข้าว *(Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้ในการทดลองได้จากแปลงปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ขยายของศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 7 จังหวัดเชียงใหม่ ทำการปรับสภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีความชื้นเริ่มต้น 13 เปอร์เซ็นต์ และทำการสุ่มแบ่งเมล็ดพันธุ์ออกเป็นตัวอย่างๆ ละ 322 กรัม นำมาให้คลื่นความถี่วิทยุแก่เมล็ดพันธุ์ โดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นความถี่วิทยุที่สร้างและปรับปรุงโดย Institute of Agriculture Engineering, University of GÖttingen, Germany ที่ความถี่ 27.12 เมกะเฮิรต์ ระดับพลังงานเริ่มต้น 810 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียล เป็นระยะเวลา 3 ระดับ คือ 1, 3 และ 5 นาที

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยมี 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 ระดับอุณหภูมิในการให้คลื่นความถี่วิทยุแก่เมล็ดพันธุ์ 3 ระดับ คือ 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียล และชุดควบคุมคือไม่มีการให้คลื่นความถี่วิทยุ

ปัจจัยที่ 2 ระดับช่วงเวลา ณ อุณหภูมิในการให้คลื่นความถี่วิทยุแก่เมล็ดพันธุ์ 3 ระดับ คือ 1, 3 และ 5 นาที

จำนวน 12 กรรมวิธี

การทดลองที่ 1 ตรวจสอบคุณภาพเบื้องต้นของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

1.1 ความชื้นเมล็ดพันธุ์ (Seed Moisture Content)

ทำการตรวจสอบความชื้นเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีอบด้วยความร้อน (Hot-air oven method) (ISTA, 2006) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 5 กรัม บดให้ละเอียด แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 103±2 องศาเซลเซียส นาน 17±1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการชั่งหาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป คำนวณและแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยมาตรฐานน้ำหนักสด (wet weight basis)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักสดของเมล็ดพันธุ์} - \text{น้ำหนักแห้งของเมล็ดพันธุ์}}{\text{น้ำหนักสดของเมล็ดพันธุ์}} \times 100$$

1.2 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed Germination)

ทำการตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ระหว่างชั้นของกระดาษ 2 แผ่น (between paper method) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เพาะระหว่างกระดาษชื้น จากนั้นม้วนและนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะเมล็ดที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียล ตรวจนับความงอกครั้งแรกในวันที่ 5 และครั้งสุดท้ายในวันที่ 14 หลังเพาะ ประเมินต้นกล้าปกติ (normal seedling) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

1.3 ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed Vigor)

ทำการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated Aging Test for Seed Vigor) ตามกฎการทดสอบความแข็งแรงของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 40 กรัม ใส่ลงในตะแกรงลวดที่เตรียมไว้ เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร ในขวดโหลหรือขวดเร่งอายุ เพื่อจัดให้มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ นำตะแกรงลวดที่บรรจุเมล็ดพันธุ์ไว้แล้ว วางลงในขวดเร่งอายุแล้วปิดฝาขวดให้สนิท นำขวดเร่งอายุไปใส่ไว้ในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 42 $\pm$ 1 องศาเซลเซียล ทิ้งขวดเร่งอายุไว้ในตู้อบนาน 84 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา นำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเร่งอายุแล้วมาทดสอบความงอกมาตรฐานทันที

1.4 ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ (Seed Viability)

ทำการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเตตราโซเลียม (tetrazolium test) ตามกฎการทดสอบความมีชีวิตของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด จัดให้เมล็ดมีการดูดน้ำประมาณ 8-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียล โดยการแช่เมล็ดพันธุ์แต่ละซ้ำในน้ำกลั่นทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นนี้มาผ่าตามยาวผ่านส่วนของคัพภะแล้วนำไปแช่ในสารละลายของเกลือเตตราโซเลียม ความเข้มข้นของสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำการย้อมสีในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียล นาน 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดพันธุ์มา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการประเมินผลโดยการตรวจดูลักษณะการติดสีของคัพภะและต้นอ่อน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์

1.5 การตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธีเพาะบนอาหารวุ้น (Agar Method) ตามมาตรฐานสากลของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดใน 1% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรอง จากนั้นใช้คีมคีบ (forcep) ลนไฟฆ่าเชื้อคีบเมล็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหาร วางเมล็ดทั้งหมดจำนวน 400 เมล็ด โดยแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวน 100 เมล็ด นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาตรวจและจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะของโคโลนีที่เจริญออกมาจากเมล็ด หรือลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา ภายใต้กล้อง compound microscope คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ด ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$$

การทดลองที่ 2 ผลของคลื่นความถี่วิทยุต่อปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 แต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบผลกับเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ไม่ผ่านการให้คลื่นความถี่วิทยุ ตรวจหาปริมาณเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยวิธีเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA Method) ตามมาตรฐานสากลของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) ดังนี้

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) นำเมล็ดพันธุ์ข้าวมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดใน 1% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรอง จากนั้นใช้คีมคีบ (forcep) ลนไฟฆ่าเชื้อคีบเมล็ดวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวาง 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหาร วางเมล็ดทั้งหมดจำนวน 400

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ด โดยแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ (replication) แต่ละซ้ำทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวน 100 เมล็ด นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสง fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาตรวจและจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะของโคโลนีที่เจริญออกมาจากเมล็ด หรือลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้อง compound microscope คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ด ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อรา}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะทั้งหมด}} \times 100$$

การทดลองที่ 3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 หลังการให้คลื่นความถี่วิทยุ

โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 แต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบผลกับเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ไม่ผ่านการให้คลื่นความถี่วิทยุ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

3.1 ความชื้นเมล็ดพันธุ์ (Seed Moisture Content)

ทำการตรวจสอบความชื้นเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีอบด้วยความร้อน (Hot-air oven method) (ISTA, 2006) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 5 กรัม บดให้ละเอียด แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 103$\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 17$\pm$1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ทำการชั่งหาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป คำนวณและแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยมาตรฐานน้ำหนักสด (wet weight basis)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักสดของเมล็ดพันธุ์} - \text{น้ำหนักแห้งของเมล็ดพันธุ์}}{\text{น้ำหนักสดของเมล็ดพันธุ์}} \times 100$$

3.2 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (Seed Germination)

ทำการตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ ด้วยวิธีมาตรฐาน โดยทำการเพาะเมล็ดพันธุ์ระหว่างชั้นของกระดาษ 2 แผ่น (between paper method) ตามกฎการทดสอบความงอกของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด เพาะระหว่างกระดาษชื้น จากนั้นม้วนและนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะเมล็ดที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจนับความงอกครั้งแรกในวันที่ 5 และครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สุดท้ายในวันที่ 14 หลังเพาะ ประเมินต้นกล้าปกติ (normal seedling) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความงอก

3.3 ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Seed Vigor)

ทำการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการเร่งอายุ (Accelerated Aging Test for Seed Vigor) ตามกฎการทดสอบความแข็งแรงของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 40 กรัม ใส่ลงในตะแกรงลวดที่เตรียมไว้ เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร ในขวดโหลหรือขวดเร่งอายุ เพื่อจัดให้มีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ นำตะแกรงลวดที่บรรจุเมล็ดพันธุ์ไว้แล้ว วางลงในขวดเร่งอายุ แล้วปิดฝาขวดให้สนิท นำขวดเร่งอายุไปใส่ไว้ในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 42 $\pm$ 1 องศาเซลเซียล ทิ้งขวดเร่งอายุไว้ในตู้อบนาน 84 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา นำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเร่งอายุแล้วมาทดสอบความงอกมาตรฐานทันที

3.4 ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ (Seed Viability)

ทำการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเตเตราโซเลียม (tetrazolium test) ตามกฎการทดสอบความมีชีวิตของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ (ISTA, 2006) โดยทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวในแต่ละตัวอย่างมาจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด จัดให้เมล็ดมีการดูดน้ำประมาณ 8-16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียล โดยการแช่เมล็ดพันธุ์แต่ละซ้ำในน้ำกลั่นทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นนี้มาผ่าตามยาวผ่านส่วนของคัพภะ แล้วนำไปแช่ในสารละลายของเกลือเตตราโซเลียม ความเข้มข้นของสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำการย้อมสีในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียล นาน 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเมล็ดพันธุ์มาล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการประเมินผลโดยการตรวจดูลักษณะการติดสีของคัพภะและต้นอ่อน แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์

การทดลองที่ 4 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 หลังการให้คลื่นความถี่วิทยุ

โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบผลกับเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ไม่ผ่านการให้คลื่นความถี่วิทยุ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมในเมล็ด (Carbohydrate analysis)

ทดสอบโดยวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแป้งในเมล็ด โดยวิธี Anthrone (Yoshida *et al*., 1976)

การเตรียมสารละลาย

1. Anthrone reagent : ชั่ง Anthrone 1 กรัม เติม conc. H_2SO_4 ให้ครบ 500 มล. แล้วห่อด้วย Aluminum foil และเก็บไว้ในตู้เย็น
2. 80% Ethanol
3. Perchloric acid 9.2 N : เจือจาง 793 มล. ของ 70% $HClO_4$ ให้เป็น 1 ลิตร
4. Perchloric acid 4.6 N : เจือจาง 397 มล. ของ 70% $HClO_4$ ให้เป็น 1 ลิตร

การย่อยตัวอย่าง (Digestion)

1. ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวใส่ลงในหลอดขนาด 125 มิลลิลิตร เติม 80% Ethanol 20 มิลลิลิตร เพื่อสกัดเอาน้ำตาลและแป้งออกมา โดยนำไปวางบนอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 80 - 85 องศาเซลเซียล นาน 1 ชั่วโมง
2. นำกากที่กรองได้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล นาน 4-5 ชั่วโมง
3. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำมาวางบนอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียล นาน 15 นาที คนเป็นครั้งคราว แล้วทิ้งหลอดไว้ให้เย็น
4. เติม 2 มิลลิลิตร ของ 9.2 N $HClO_4$ พร้อมคนให้สารละลายเข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 15-20 นาที
5. แยกเฉพาะสารละลายที่ใส แล้วเติม 2 มิลลิลิตร ของ 4.6 N $HClO_4$ ลงในส่วนที่เหลือผสมให้เข้ากัน นาน 15 นาที แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 15-20 นาที อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นรวบรวมสารละลายใสปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร
6. ดูดสารละลายตัวอย่างที่สกัดและเจือจางใสแล้วมาจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบและหลอดที่มีสารมาตรฐานลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติม 10 มิลลิลิตร ของสารละลาย Anthrone ลงในแต่ละหลอดอย่างช้าๆ คนด้วยแท่งแก้วเป็นระยะ
7. นำหลอดทดสอบไปวางบนอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียล นาน 7.5 นาที เมื่อครบกำหนดทำให้เย็นทันที
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร
9. บันทึกผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียม standard glucose เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง glucose 1 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปรับให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นดูดมา 10 มิลลิลิตร (ปริมาณ glucose 0.1 กรัม) เพื่อปรับความเข้มข้นจาก glucose 0.1 กรัม ให้เป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นั่นคือ 100 ppm glucose และเตรียมความเข้มข้นของ glucose ต่างๆกัน
2. นำ standard glucose แต่ละความเข้มข้นวางบนอ่างน้ำ เติม 10 มิลลิลิตร ของสารละลาย Anthrone คนด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน
3. นำหลอดทั้งหมดวางบนอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียล นาน 7.5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร
5. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานต่อไป

4.2 ปริมาณโปรตีนรวมในเมล็ด (Protein Analysis)

เพื่อหาปริมาณของไนโตรเจนในสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในพืช โดยวิธี Kjeldahl method (Sidney, 1984)

การเตรียมสารละลาย

1.สารละลายตัวอย่างย่อย

มีส่วนผสมของ K_2SO_4 : $CuSO_4$: $5H_2O$: metallic seienium ในอัตราส่วน 50 : 10 : 1 ผสมเข้ากันแล้วนำไปลำลายใน conc.H_2SO_4 ลิตร (ตั้งบน Hot plate เพื่อให้ H_2SO_4 ร้อนและละลายไปอย่างช้า ๆ) สารที่ได้เรียกว่า Digestion Mixture

2.สารที่ใช้วิเคราะห์

2.1 Boric acid 4% :ละลายกรด Boric 40 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

2.2 Indicator : ละลาย Methyl red 1.25 กรัมใน 95% Ethanol จำนวน 900 มิลลิลิตร
: ละลาย Methyl blue 0.825 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมสาร ละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน

2.3 ส่วนผสมของ Indicator ผสมกับ Boric acid 4% ในอัตราส่วน 1 : 100

3.สารละลาย NaOH 60% ชั่ง NaOH 60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4.Standard HCl 0.1 N

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการวิเคราะห์

1.ขั้นตอนการย่อย (Digestion)

1.1 ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้ว (นำเมล็ดพันธุ์ข้าวไปบดแล้วอบแห้งก่อนนำไปชั่ง) 0.2 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask

1.2 เติม Digestion Mixture 5 มิลลิลิตร นำไปตั้งบนเตาย่อยบนตู้ดูดควัน ค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิ ย่อยจนกระทั่งได้สารละลายใส ใช้เวลาประมาณ 5-7 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ก่อนทำการย่อยนี้ ถ้าชั่งตัวอย่างใส่ flask และเติม Digestion Mixture ทิ้งไว้ค้างคืน โดยใช้กระดาษฟรอยด์ ปิดปาก flask เพื่อป้องกันไม่ให้มีสิ่งเจือปนตกลงไป แล้วสามารถนำไปทำการย่อยในวันต่อไป จะทำให้การย่อยเกิดง่ายและเร็วยิ่งขึ้น

2.ขั้นตอนการกลั่น (Distillation)

2.1 เทสารละลายใสที่ได้ในขั้นตอนแรกใส่ลงในเครื่องกลั่นทั้งหมด แล้วใช้น้ำกลั่นค่อย ๆ ล้างซ้ำกัน 2-3 ครั้ง เพื่อให้สารละลายไม่ติดค้างเหลืออยู่ (ควรใช้น้ำน้อยสุดในการล้าง)

2.2 เติม NaOH 60% ลงไปประมาณ 10 มิลลิลิตร และใส่ส่วนผสมของ Indicator จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงใน erlenmeyer flask

2.3 นำเอา flask ไปวางใต้เครื่องควบแน่นและให้ปลายเครื่องควบแน่นจุ่มอยู่ใต้ระดับผิวของสารละลายใน flask

2.4 ทำการกลั่น 5-7 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายเครื่องควบแน่นหยดลงใน flask ให้หมด แล้วใช้กลั่นเล็กน้อยล้างที่ปลาย Condenser

3.ขั้นตอนการไตเตรท (Titration)

นำสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการกลั่นทั้งหมดมาไตเตรทด้วย HCl 0.1 N จดบันทึกจำนวนมิลลิลิตร ของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรท แล้วนำไปคำนวนหา %N

$$\%N = \frac{(\text{Sample Titrate} - \text{Blank}) \times \text{Normallity of HCl} \times 14 \times 100}{\text{weight of sample} \times 1{,}000}$$

ดังนั้นค่าโปรตีนในพืช = %N x 6.25

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Total Lipid Analysis)

ทดสอบโดยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง (Continuous Extraction) (Sidney, 1984)

อุปกรณ์

1. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus)
2. Fat extraction thimble
3. เครื่องอบลมร้อน
4. ขวดก้นกลม
5. กระดาษกรองไขมัน เครื่องชั่ง

สารเคมี : n-hexane

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างสารที่อบแห้งแล้ว 3-5 กรัม บนกระดาษกรองไขมัน ทำการห่อให้สนิทอย่าให้สารตัวอย่างหกออกมา แล้วบรรจุในหลอดที่ต่อกับเครื่องกลั่น
2. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมก่อนเติม n-hexane ลงไปประมาณ ¾ ขวด ต่อเข้ากับเครื่องกลั่น
3. เปิด Hot plate ให้อุณหภูมิสูงพอที่จะกลั่นสารละลายให้ไหลกลับลงขวดได้ ประมาณ 15 รอบต่อ ชั่วโมง กลั่นนาน 5-8 ชั่วโมง
4. เอา thimble ออกแล้วกลั่นต่อจน n-hexane กลับขึ้นมาอยู่บนหลอดเกือบหมด เทออกเพื่อเก็บไว้ใช้ในครั้งต่อไป ส่วนที่เหลือคือไขมันที่สกัดได้
5. ตั้งขวดทิ้งไว้บน Hot plate 1 คืน แล้วนำเข้าตู้อบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
6. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่เพิ่มขึ้นหลังกลั่นแล้วคือ น้ำหนักของ Crude fat
7. คำนวณ % ไขมันที่คิดจากน้ำหนักแห้ง

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน (แห้ง)}}{\text{น้ำหนักวัตถุ(แห้ง)}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลข้อมูลที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิธี Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของสิ่งทดลองที่ได้โดยวิธี Least Significant Difference (LSD)