

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 2 อุณหภูมิอากาศ (องศาเซลเซียส)

เดือน	หมวดไม้ผล			สล.เขื่อนจุฬาภรณ์		
	กลางแจ้ง	ร่มมะม่วง	ร่ม	กลางแจ้ง	ร่มลิ้นจี่	ร่มป่า
	ยางพารา					
พ.ค. 2545	31.5	27.5	27.0	33.0	28.5	26.5
มิ.ย. 2545	34.5	29.5	28.5	40.5	31.5	27.5
ก.ค. 2545	31.0	29.5	29.5	32.0	28.5	28.0
ส.ค. 2545	31.0	29.5	29.5	33.0	28.0	26.0
ก.ย. 2545	30.0	29.0	29.0	32.0	29.0	26.0
ต.ค. 2545	36.0	29.0	28.0	28.0	26.0	23.0
พ.ย. 2545	34.0	29.0	28.0	27.5	25.0	26.0
ธ.ค. 2545	40.0	29.0	27.5	30.0	22.0	21.0
ม.ค. 2546	30.0	21.5	20.0	20.0	15.5	14.5
ก.พ. 2546	31.0	27.0	27.0	33.0	28.5	26.0
มี.ค. 2546	39.5	30.5	30.0	28.0	24.0	24.0
เม.ย. 2546	40.0	30.0	30.0	40.0	33.5	30.5

ตารางผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์อากาศ

เดือน	หมวดไม้ผล			สส. เชื้อนจุพากรณ์		
	กลางแจ้ง	ร่มมะม่วง	ร่ม	กลางแจ้ง	ร่มลิ้นจี่	ร่มป่า
	ยางพารา					
พ.ค. 2545	58	53	59	61	67	73
มิ.ย. 2545	43	64	54	42	61	81
ก.ค. 2545	78	81	81	55	57	60
ส.ค. 2545	78	82	81	51	70	76
ก.ย. 2545	85	85	85	55	71	73
ต.ค. 2545	43	64	57	70	73	87
พ.ย. 2545	46	64	57	73	80	76
ธ.ค. 2545	61	78	81	59	82	82
ม.ค. 2546	62	62	64	64	84	89
ก.พ. 2546	59	56	56	34	42	45
มี.ค. 2546	58	85	47	64	68	68
เม.ย. 2546	61	85	47	38	59	62

ตารางผนวกที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความชื้นดิน

เดือน	หมวดไม้ผล			สล. เชื้อนจุพากรณ์		
	กลางแจ้ง	ร่มมะม่วง	ร่ม	กลางแจ้ง	ร่มดินจี้	ร่มป่า
			ยางพารา			
พ.ค. 2545	9.20	10.16	9.42	12.84	20.18	18.16
มิ.ย. 2545	10.84	11.24	10.72	11.62	21.31	17.25
ก.ค. 2545	5.45	9.02	8.74	7.48	23.53	11.62
ส.ค. 2545	12.20	11.81	12.83	11.97	15.26	10.28
ก.ย. 2545	10.71	11.00	13.88	25.36	25.23	31.98
ต.ค. 2545	6.28	9.17	11.53	16.90	23.34	29.65
พ.ย. 2545	11.69	11.88	12.19	13.92	24.85	18.72
ธ.ค. 2545	7.52	6.46	7.92	11.78	17.58	10.91
ม.ค. 2546	7.39	5.14	4.56	10.42	17.58	10.91
ก.พ. 2546	5.97	1.16	2.46	11.70	16.68	13.20
มี.ค. 2546	11.05	8.18	9.83	14.58	19.95	19.99
เม.ย. 2546	12.81	11.78	9.89	15.92	21.62	20.34

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ธาตุอาหารก่อนปลูก

สิ่งทดลอง	Total N (%)	Available P(ppm)	K (ppm)	OM (%)	PH (1:1)
กลางแจ้งไม้ผล (0-15 ชม.)	0.028	2.00	19.68	0.60	5.28
กลางแจ้งไม้ผล(15-30 ชม.)	0.030	1.29	19.65	0.70	4.73
ร่มมะม่วง (0-15 ชม.)	0.030	3.56	22.17	0.56	4.12
ร่มมะม่วง (15-30 ชม.)	0.026	1.97	16.50	0.38	4.40
ร่มยางพารา (0-15 ชม.)	0.034	5.75	22.92	0.73	4.80
ร่มยางพารา (15-30 ชม.)	0.030	2.87	15.36	0.60	4.72
กลางแจ้งเชือน (0-15 ชม.)	0.132	4.10	117.99	2.30	5.63
กลางแจ้งเชือน (15-30 ชม.)	0.075	1.89	71.49	1.34	5.65
ร่มลิ้นจี่ (0-15 ชม.)	0.107	16.98	145.47	1.66	4.78
ร่มลิ้นจี่ (15-30 ชม.)	0.065	4.88	102.54	0.80	4.93
ร่มไม้ป่า(0-15 ชม.)	0.101	0.30	52.26	1.88	5.11
ร่มไม้ป่า (15-30 ชม.)	0.069	1.54	57.96	1.04	4.96

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ธาตุอาหารหลังปลูก

สิ่งทดลอง	Total N (%)	Available P(ppm)	K (ppm)	OM (%)	PH (1:1)
กลางแจ้งไม้ผล (0-15 ซม.)	0.039	5.80	24.40	1.06	6.20
กลางแจ้งไม้ผล(15-30 ซม.)	0.042	5.80	19.40	1.06	5.80
รุ่มมะม่วง (0-15 ซม.)	0.026	4.60	32.70	0.74	4.60
รุ่มมะม่วง (15-30 ซม.)	0.035	7.50	35.30	0.67	4.50
รุ่มยางพารา (0-15 ซม.)	0.041	7.40	32.10	0.95	5.00
รุ่มยางพารา (15-30 ซม.)	0.032	5.50	43.30	0.75	5.30
กลางแจ้งเชือน (0-15 ซม.)	0.085	12.60	146.00	1.70	4.60
กลางแจ้งเชือน (15-30 ซม.)	0.095	13.50	165.20	1.73	4.60
รุ่มลิ้นจี่ (0-15 ซม.)	0.106	313.40	136.90	1.73	4.20
รุ่มลิ้นจี่ (15-30 ซม.)	0.089	243.40	130.10	1.61	4.30
รุ่มไม้ป่า(0-15 ซม.)	0.095	3.30	70.70	1.67	5.30
รุ่มไม้ป่า (15-30 ซม.)	0.094	3.00	60.10	1.33	5.50

ตารางผนวกที่ 7 ลักษณะเนื้อดิน

สิ่งทดลอง	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Soil texture (%)
กลางแจ้ง ไม้ผล (0-15 ซม.)	70.46	23.97	5.57	Sandy Loam
รุ่มมะม่วง (0-15 ซม.)	72.75	23.17	4.08	Sandy Loam
รุ่มยางพารา (0-15 ซม.)	74.27	21.78	3.95	Loamy Sand
กลางแจ้งเชือน (0-15 ซม.)	38.61	41.93	19.46	Loam
รุ่มลิ้นจี่ (0-15 ซม.)	39.42	43.32	17.26	Loam
รุ่มไม้ป่า (0-15 ซม.)	31.48	49.85	18.67	Loam

ภาคผนวกที่ 1 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

โดยอาศัยวิธีการของ Arnon (1949) คัดแปลงโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบกาแพโดยใช้ใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ในตำแหน่งที่ 3 หรือ 4 นับจากปลายยอด จากนั้นนำใบกาแพมาหั่นให้เป็นฝอยละเอียดนำไปชั่ง โดยใช้ใบที่หั่นฝอย 1 กรัม นำตัวอย่างใบกาแพที่ชั่งได้ของแต่ละซ้ำมาบดในครกหินให้ละเอียด แล้วละลายด้วยสารละลายละลาย อะซีโตน (Acetone) 80 เปอร์เซ็นต์ นำสารละลายที่ได้ไปกรองโดยใช้กระดาษกรอง ALBET 145 สังเกตดูว่าถ้ามีสีของใบกาแพเหลืออยู่ก็ให้เติมอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์จนกระทั่งสีเขียวหมดไป สารละลายที่ได้จะมีสีเขียว แล้วนำมาปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปอ่านค่า โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) อ่านค่าที่วัดได้ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 645 นาโนเมตร และ 663 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้จากความยาวคลื่นแสงทั้งสองมาคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม โดยใช้สูตร

$$Ca = 12.7 \times D_{663} - 2.69 \times D_{645}$$

$$Cb = 22.9 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}$$

$$\text{Total chlorophyll (a+b)} = 8.02 D_{663} + 20.20 D_{645}$$

โดยที่ Ca = ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เอ (chlorophyll a) มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสดใบ

Cb = ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์บี (chlorophyll b) มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสดใบ

Total chlorophyll (a+b) = ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์รวม มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักสดใบ

D663 = ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 663 นาโนเมตร

D645 = ค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 2 วิธีการทำสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อพืช

ตามวิธีการของอัจฉรา (2538) มีขั้นตอนในการศึกษาดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่าง เลือกเก็บตัวอย่างที่สดและสมบูรณ์ ล้างตัวอย่างให้สะอาด แล้วแช่ชิ้นส่วนตัวอย่างลงในขวดที่ใส่สารที่ใช้ในการฆ่าเซลล์ (fixative) และรักษาเซลล์ (fixation) สารที่ใช้ในการฆ่าเซลล์ ทำสไลด์เนื้อเยื่อพืชถาวรคือ FAA

ส่วนประกอบของสารละลายเคมีที่ใช้ในการฆ่าเซลล์ (FAA 70 เปอร์เซนต์) ประกอบด้วย

- formaldehyde ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- galcial acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- ethyl alcohol 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

2. การดูดอากาศออกจากเซลล์ (suction) เพื่อให้ fixative และสารเคมีอื่นๆ ที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไปเข้าไปอยู่ในทุกส่วนของเซลล์ โดยใช้เครื่องดูดอากาศ (suction pump)

3. การล้าง fixative ออกจากตัวอย่าง (washing) โดยการใช้น้ำกลั่นหรือ แอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งควรมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับความเข้มข้นของ แอลกอฮอล์ที่อยู่ใน fixative

4. การคั่งน้ำออกด้วยตัวอย่าง (dehydration) สารละลายที่คั่งน้ำออกจากตัวอย่างคือ tertiary butyl alcohol (TBA) ถ้าดับความเข้มข้นจาก 1 ถึง 5 ส่วนประกอบของสารละลาย tertiary butyl alcohol (TBA) มีดังนี้

4.1 TBA เกรด 1 ประกอบด้วย

- น้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- absolute alcohol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร
- tertiary butyl alcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4.2 TBA เกรด 2 ประกอบด้วย

- น้ำกลั่น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร
- absolute alcohol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- ethyl butyl alcohol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

4.3 TBA เกรด 3 ประกอบด้วย

- น้ำกลั่น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
- absolute alcohol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- tertiary butyl alcohol ปริมาตร 35 มิลลิลิตร

4.4 TBA เกรด 4 ประกอบด้วย

- absolute alcohol ปริมาตร 45 มิลลิลิตร

- tertiary butyl alcohol ปริมาตร 55 มิลลิลิตร

4.5 TBA เกรด 5 ประกอบด้วย

- tertiary alcohol ปริมาตร 75 มิลลิลิตร

- absolute alcohol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

5. นำพาราฟินเข้าสู่เซลล์ ตัวอย่าง (infiltration) แล้วนำชิ้นส่วนที่ได้ไปทำการฝังชิ้นตัวอย่าง (embedding) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการตัด (microtoming) โดยใช้เครื่อง rotary microtome แล้วนำตัวอย่างที่ตัดเป็นริบบ้อนไปติดลงบนสไลด์

6. ขั้นตอนการย้อมสี (staining) ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการย้อมสีและขั้นตอนการย้อมสีมีดังนี้

6.1 การเตรียม safranin ใช้สูตรของ Johansen's safranin มีส่วนประกอบดังนี้

ก. safranin ปริมาตร 0.1 กรัม

ข. methyl cellosolve ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ค. alcohol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ง. sodium acetate ปริมาตร 1 กรัม

จ. formaldehyde 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ฉ. น้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายทำได้โดยละลาย safranin ใน methyl cellosolve แล้วเติม alcohol จากนั้นละลาย sodium acetate ที่ผสมน้ำกลั่นแล้วนำส่วนผสมสองส่วนนี้มารวมกัน

6.2 การเตรียมสี fast - green มีส่วนประกอบดังนี้

ก. fast - green ปริมาตร 0.5 กรัม

ข. absolute alcohol ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ค. clove oil ปริมาตร 35 มิลลิลิตร

ง. methyl cellosolve ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

การเตรียมให้รวมสารละลายอื่นๆ ให้เข้ากันก่อนจึงเทสารละลายลงในผงสี fast - green ที่ละเอียด คนจนสีละลายได้มากที่สุดแล้วแช่ไว้ 1-2 วัน จึงกรอง แล้วนำสารละลายมาใช้ได้

6.3 ขั้นตอนการย้อมสี เตรียมสารละลายทุกตัวใส่ในขวด staining jar แล้วนำแผ่นสไลด์ลงแช่สารละลายตามลำดับต่อไปนี้

1) สารละลาย xylene นาน 10 นาที

2) สารละลาย absolute alcohol ผสมกับสารละลาย xylene อัตรา 1:1 นาน 5 นาที

3) สารละลาย absolute alcohol ผสมกับสารละลาย ether อัตรา 1:1 นาน 5 นาที

- 4) สารละลาย absolute alcohol นาน 5 นาที
- 5) สารละลาย alcohol 90เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที
- 6) สารละลาย alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที
- 7) สารละลาย safranin แช่นาน 2-24 ชั่วโมง
- 8) ล้างน้ำเปล่า 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที
- 9) สารละลาย alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลาย picric acid อัตรา 1:1 นาน 10 นาที
- 10) สารละลาย absolute alcohol ผสมกับสารละลาย ammonia อัตรา 1:1 นาน 10 นาที
- 11) สารละลาย alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที
- 12) สารละลาย fast - green นาน 2 นาที
- 13) สารละลาย clove oil ผสมกับสารละลาย absolute alcohol และ สารละลาย xylene อัตรา 1:1 นาน 2 นาที
- 14) สารละลาย absolute alcohol ผสมสารละลาย xylene อัตรา 1:1 นาน 6 นาที
- 15) สารละลาย dupe xylene นาน 10 นาที

7. การพ่นกสไลด์ (mounting) สารเคมีที่ใช้ในการพ่นกสไลด์คือ gum dammar ปริมาณ 100 กรัม ผสมกับ xylene ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดปากกว้างที่มีฝาแก้วครอบและมีแท่งแก้วสั้นๆ สำหรับหยดบรรจุอยู่ด้วย

7.1 วิธีการพ่นกกระจก การพ่นกแผ่นกระจกต้องใช้อุปกรณ์ที่สำคัญ คือ เข็มเขี่ย ฟู่กัน แผ่นกระจก และแผ่นกระจกปิดที่สะอาด ตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนของการทำให้สีสดใสแล้ว นำมาพ่นกสไลด์ สารที่ใช้พ่นก และวิธีการพ่นกดำเนินการดังนี้

7.2 หยดสารที่ใช้พ่นกลงบนแผ่นกระจก 1-2 หยด โดยหยดให้ห่างจากขอบ ด้านซ้ายประมาณ 4.5-5.0 เซนติเมตร ถ้าตัวอย่างนามีขนาดใหญ่ต้องใช้สารพ่นกมากกว่าตัวอย่างขนาดเล็ก

7.3 จับแผ่นกระจกปิดทางด้านสั้นด้วยนิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือซ้าย โดยใช้นิ้วชี้กดที่สั้นด้านหนึ่ง และนิ้วหัวแม่มือกดที่สั้นด้านตรงข้าม วางแผ่นกระจกปิดลงให้ชิดกับหยดของสารพ่นก โดยให้สั้นด้านล่างวางลงก่อน เอียงแผ่นกระจกปิดทำมุม 60 องศา กับแผ่นกระจก ระวังอย่าให้สารพ่นกเปื้อนด้านบนของแผ่นกระจก

7.4 ใช้เข็มเขี่ยแผ่นกระจกปิดไว้แล้วค่อย ๆ เปลี่ยนนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ออกไปจับแผ่นกระจก จากนั้นค่อย ๆ ผ่อนเข็มเขี่ยลงทีละน้อยอย่าให้เกิดฟองอากาศจนกว่าแผ่นกระจกจะปิดแนบสนิทกัน โดยมีตัวอย่างอยู่ใต้แผ่นกระจกปิด และอยู่ตรงกลางแผ่นพอดี หากแผ่นกระจก

ปิดไม่ขนานกันกับแผ่นกระจกให้ใช้เข็มเย็บค่อย ๆ เลื่อนแผ่นกระจกที่ละน้อย แต่ต้องทำอย่างระมัดระวังเพราะจะทำให้ตัวอย่างย่นหรือยับได้

ภาคผนวกที่ 3 การหาจำนวนปากใบ

โดยวิธีการของ Majumder, et al. (1972) ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1. เลือกใบกาแฟในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ในตำแหน่งที่ 3 หรือ 4 จากปลายยอด ทำเวลาประมาณ 11.00 นาฬิกา ใช้กาวพิเศษ (Quick Fix-A waterproof adhesive) ทาลงตรงกลางแผ่นใบกาแฟด้านหลังใบ ทิ้งไว้ 5 นาที จึงลอกกาวออก

2. ทากาวที่ตำแหน่งเดิมอีกครั้งหนึ่ง ทิ้งไว้ 5 นาที ทำการลอกกาวออก นำไปติดบนแผ่นสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปยังห้องปฏิบัติการ

3. นำแผ่นกระจกที่เสร็จเรียบร้อยแล้วมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนปากใบใต้กล้องจุลทรรศน์ หน่วยทดลองละ 10 ตำแหน่ง

4. วิธีการตรวจนับ โดยใช้ Micrometer ชนิด Stage Micrometer เทียบค่ากับ Ocular Micrometer ชนิด square (ใช้นับจำนวน) ซึ่งขนาดทั้ง frame เป็น (10x10 ช่อง)

มีหน่วยเป็น mm^2 โดยเลื่อนให้ขีดของ stage ตรงกับความกว้างของ frame

1 ช่องของ Stage Micrometer กว้าง = 0.01 mm

นำจำนวนปากใบที่ตรวจนับได้ไปคำนวณ ในสูตร จะได้ จำนวนปากใบ / พื้นที่ 1 mm^2

วิธีคำนวณ

ที่กำลังขยาย 40x ถ้าความกว้างของ frame = 25 ช่องของ Stage Micrometer
 $= 25 \times 0.01 \text{ mm} = 0.25 \text{ mm}$

พื้นที่ = $(0.25)^2 = 0.0625 \text{ mm}^2$

ถ้านับตัวอย่างปากใบที่กำลังขยาย 40x ได้ เฉลี่ย 3.5 ปากใบ / 1 frame

พื้นที่ 0.0625 นับได้ = 3.5

พื้นที่ 1 mm^2 = $3.5 / 0.0625$

= 56 ปากใบ / 1 mm^2

ภาคผนวกที่ 4 การหาปริมาณคาเฟอีนในใบกาแฟ

1. การใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีน

Column : ODS II

Flow rate : 1.0 ml/min

Inject volumn : 50 μ l

Detector : UV 280 นาโนเมตร

Mobile phase : สาร A คือ 0.5 % acetic acid : deionization water 99.95 %

สาร B คือ สาร A 70 มิลลิลิตร : acetonitrile 30 มิลลิลิตร

2. การเตรียม Mobile phase

สาร A คือ 0.5 % acetic acid : deionization water 99.95 %

สาร B คือ สาร A 70 มิลลิลิตร : acetonitrile 30 มิลลิลิตร

เมื่อได้สาร A และ B กรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมคอน จากนั้นนำไป degas ด้วยเครื่องอัลตราโซนิกนาน 15 นาที

3. การเตรียม สารละลายมาตรฐาน

โดยชั่ง caffeine บริสุทธิ์มา 0.010 กรัม ละลายใน mobile phase 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานคาเฟอีน 100 ppm จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน ที่ระดับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมคอน ใส่ไวแวลต์อย่างตามลำดับ

4. การเตรียมตัวอย่าง

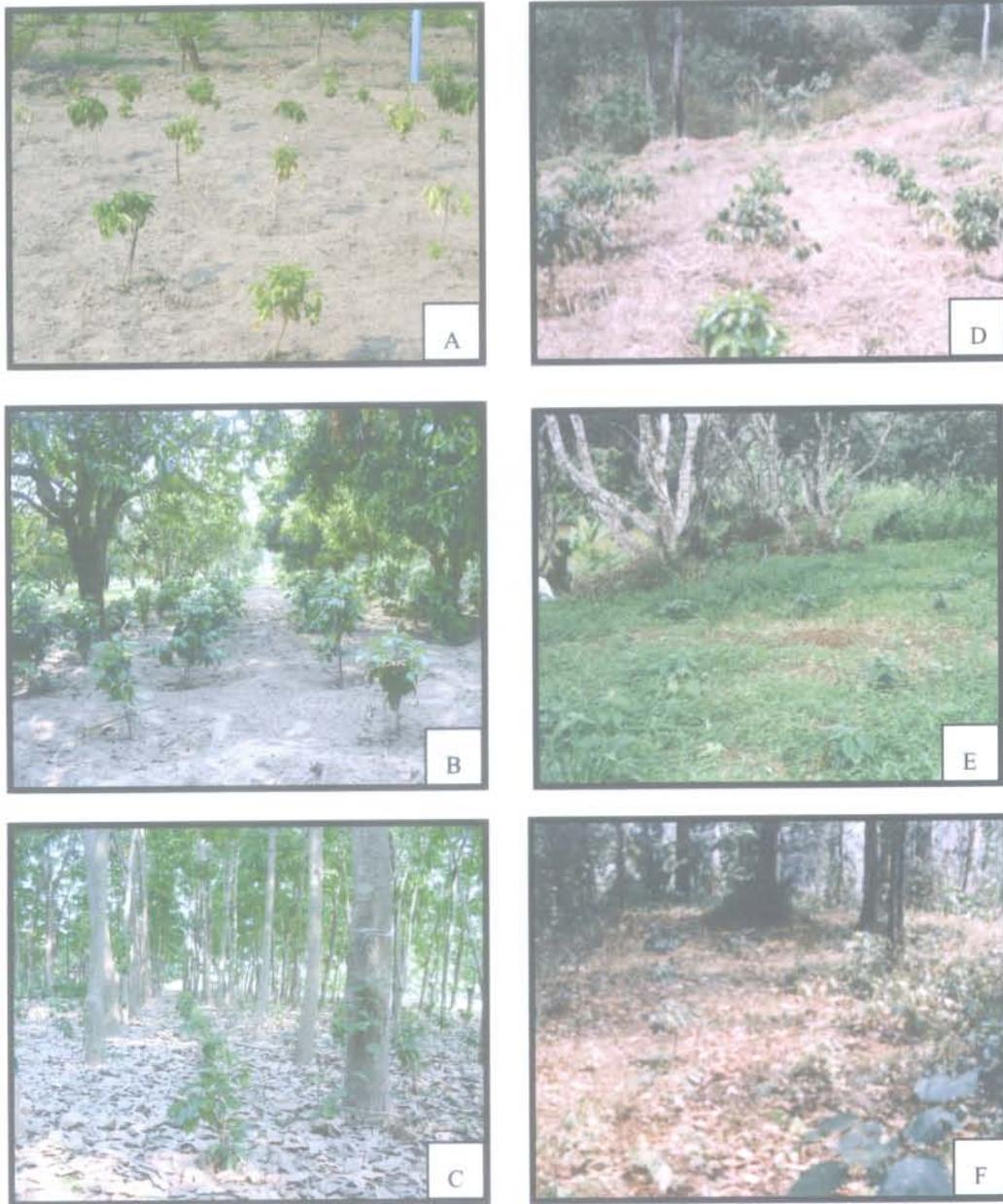
โดยใช้ใบกาแฟสด จำนวน 25 กรัม ละลายในน้ำเดือด 350 มิลลิลิตร โดยอาศัยวิธีการของ Copeland, et al., 1998 ปิดฝา กลับใบให้สัมผัสน้ำเดือดทุก 30 วินาที จำนวน 3 ครั้ง ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเปิดฝา รอให้เย็น จากนั้นกรองหยาบด้วยกระดาษกรอง Whatman # 1 แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมคอน ใส่ไวแวลต์เพื่อ inject เข้าเครื่อง (HPLC) จากนั้นเปิดเครื่อง ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคาเฟอีน โดยกำหนดอัตราการไหล 1.0 ml/ min นาน 25 นาทีต่อตัวอย่าง ที่อุณหภูมิห้อง

5. การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน โดยเครื่อง HPLC

เครื่อง HPLC ที่ใช้ในการศึกษาปริมาณคาเฟอีน คือ เครื่องมือของ Shimadzu รุ่น VP series และ column ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ column ODS II โดยใช้เวลาในการแยกสาร 20 นาที flow rate ที่ใช้คือ 1.0 ml/min และตรวจวัดด้วย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีน โดยเครื่อง HPLC จะวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม class vp โดยมีขั้นตอนการใช้งานดังนี้

1. การเปิดเครื่อง ให้เปิด pump A และ pump B ก่อนเปิดแล้วไล่เปิดเครื่องทีละตัวไปเรื่อยๆจนครบแล้วจึงเปิด SCL เป็นตัวสุดท้าย
2. การ Set up เครื่องให้ไปคลิก Class-VP แล้วไปที่ Instrument1
 - username : system
 - Password : 2001 แล้วไป login
3. คลิกที่รูป pump เพื่อจะทำการเพิ่ม flow rate ขึ้นทีละ 0.2 แล้วจึง Download
4. เลือก File แล้วเลือก method และเลือก new
5. จากนั้นให้ไปที่ method แล้วไป Instrument setup
6. ให้ไปที่ pump จะมี mode : ให้เลือก Binary Gradient แล้วกำหนด flow rate (T. flow) B.Conc และ P. max
 - แล้วคลิกที่ CTO เพื่อกำหนด Oven temp และกำหนดเป็น
 - Lamp : D2
 - Wavelength Ch 1 : 280
 - Auxiliary : 1
 - Response : 3
 - Acquisition Channel On
 - Runtime : 25
 - Acquisition Delay : 0
- แล้วต่อด้วยการตรวจสอบ SPD , SCL แต่ RID ไม่มีผลเพราะไม่ได้ใช้เสร็จแล้วจึง Download
7. เลือก file, method แล้ว Save as และ Download
8. จากนั้นให้ไปคลิกที่ instrument on / off icon เพื่อเริ่มการทำงาน แล้วคลิกที่ pump on / off icon และ Oven on/off
9. จากนั้นให้เลือก Control แล้วไปที่ Preview run จากนั้นรอนระบบเข้าสู่สมดุล ถ้าจะเพิ่มเวลาในการ run ก็เลือก Control , extend run
10. เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล (Baseline เป็นเส้นตรง) แล้วเลือก Control , single run
 - กำหนด sample ID : ชื่อ
 - Data file : ชื่อ
 - Injection volume : 10 (กำหนดปริมาตรของสารที่จะทำการฉีดเข้าเครื่องมีหน่วยเป็น pm)
 - Vial : กำหนดตำแหน่งของ Standard
11. คลิกที่ start แล้วรอน baseline นิ่ง

12. เลือก Method แล้วไปที่ integration event แล้ว width และ slope : 1000 จากนั้นจึงเปลี่ยน จาก Analysis ไปเป็น analyse แล้วจึงปิดหน้าจอ
13. เลือก define single peak icon แล้วกำหนด
 - Peak name :
 - Conc. Level : ตำแหน่ง : ความเข้มข้น
 - Unit : ppm
 - Relative : 5
 เสร็จแล้วให้ไปคลิกที่ Done
14. เลือก method ไป peaks/groups เลื่อนไปที่ level แล้วกำหนดความเข้มข้น จากนั้นเลือก fit type แล้วเปลี่ยนไปเป็น linear
15. ไป file แล้ว Sequence ตามด้วย new แล้วกำหนดค่าต่างๆดังนี้
 - Sample ID : ชื่อ (00)
 - Data file : ชื่อ (00)
 - Start vial : 0
 - End vial : vial สุดท้ายที่มีตัวอย่างสาร
 - Injection volume : 10
16. เมื่อกรอกข้อมูลเสร็จแล้วให้ไปคลิกที่ Run type แล้วคลิกที่ Begin Calibration จากนั้น OK แล้วใส่ level เฉพาะ Standard แล้วคลิกที่ช่องสุดท้ายของ Standard แล้วเลือก End Calibration
17. จากนั้นให้ไปที่ File แล้ว sequence ไป save as แล้วจึงตั้งชื่อ file
18. เมื่อทำการเสร็จแล้วจึง Control แล้วตามด้วย sequence run
19. จากนั้นก็รอกจนกว่าเครื่องจะฉีดสารได้ครบทุกตัวอย่างแล้วจึงทำการปิดเครื่อง โดยการลด Flow rate ลงทีละ 0.2 ไปจนถึง 0 แล้วค่อยคลิกที่ instrument on/off และ pump on/off
20. จากนั้นก็ทำการไล่ปิดเครื่องทีละตัวโดยปิดที่ SCL ก่อน ตามด้วยเครื่องตัวอื่นๆที่ไม่ใช่ Pump A และ B ซึ่งจะต้องปิดเป็นตัวสุดท้าย



ภาพผนวกที่ 1 แปลงปลูกกาแฟอาราบิก้าในสภาพต่าง ๆ กัน

- A คือ กาแฟที่ปลูกสภาพกลางแจ้ง ที่หมวดไม้ผล
- B คือ กาแฟที่ปลูกในร่มมะม่วง ที่หมวดไม้ผล
- C คือ กาแฟที่ปลูกในร่มยางพารา ที่หมวดไม้ผล
- D คือ กาแฟที่ปลูกสภาพกลางแจ้ง ที่สล.เขื่อนจุฬาภรณ์
- E คือ กาแฟที่ปลูกในร่มลิ้นจี่ ที่สล.เขื่อนจุฬาภรณ์
- F คือ กาแฟที่ปลูกในร่มไม้ป่า ที่สล.เขื่อนจุฬาภรณ์