บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุพันธุ์พืช

กิ่งตอนฝรั่งพันธุ์สีทองที่อายุประมาณ 3 เดือน และมีขนาดเท่ากัน

2. อุปกรณ์

2.1 โกร่งบด ใช้สำหรับบดตัวอย่างพืชในการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ และธาตุอาหาร

2.2 กรรไกรตัดแต่งกิ่ง

2.3 กระดาษกรอง Whatman No. 1

2.4 กระดาษทิชชู่

2.5 กระดาษฟอย

2.6 กระถางกระถางซีเมนต์ ขนาดความจุ 100 ลิตร ใช้สำหรับปลูกฝรั่งของการทดลองที่ 1

2.7 กระถางดินเผา ขนาดความจุ 50 ลิตร ใช้สำหรับปลูกฝรั่งของการทดลองที่ 2

2.8 กล้องถ่ายรูป ยี่ห้อ PENTAX

2.9 ขวดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.10 คัทเตอร์

2.11 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BA3100P

2.12 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BP110S

2.13 เครื่องดูดควัน (fume hood)

2.14 เครื่องปั่นผลไม้ของบริษัท Moulinex รุ่น S (643)

2.15 เครื่องวัด pH ของบริษัท Hanna Instruments

2.16 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของบริษัท Backman รุ่น DU 7500

2.17 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 อ่านค่าตั้งแต่ 0 ถึง 32 องศาบริกซ์ (°brix)

2.18 ตลับเมตร ใช้สำหรับการวัดการเจริญเติบโตด้านความสูง และความกว้างทรงพุ่มฝรั่ง

2.19 ตะกร้าใส่อุปกรณ์

2.20 ตู้เย็น สำหรับเก็บสารเคมีที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์คลอโรฟิลล์ และธาตุอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.21 ตู้อบตัวอย่างพืช

2.22 โถดูดความชื้น

2.23 ถังผสมสารละลายธาตุอาหาร ขนาดความจุ 2,000 ลิตร

2.24 ถุงพลาสติก ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างพืช

2.25 แผ่นสีมาตรฐานของ The Royal Horticutural Society, London

2.26 ฟิล์มถ่ายรูป

2.27 ฟิวเจอร์บอร์ดสำหรับทำป้ายหน่วยทดลอง

2.28 มีดปอกผลไม้

2.29 เครื่องบดตัวอย่างพืชพร้อมตะแกรงร่อน

2.30 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์ ใช้สำหรับการวัดการเจริญเติบโตด้านเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น

2.31 ถังคำขนาดความจุ 10 ลิตร สำหรับใส่สารละลายธาตุอาหารให้แก่พืช

3. วัสดุเครื่องแก้ว

3.1 Dropper

3.2 Volumetric flask ขนาด 25, 50, 100, 500, 1000 และ 2000 มิลลิลิตร

3.3 กรวยกรอง

3.4 กระบอกตวง ขนาด 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร

3.5 ขวดสีชา

3.6 ชุดเครื่องอุปกรณ์ไตเตรท

3.7 ช้อนตักสาร

3.8 ตะแกรง

3.9 แท่งแก้วคน

3.10 บิวเรต

3.11 บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร

3.12 ปิเปต

3.13 ไมโครปิเปต

3.14 หัวดูดไมโครปิเปต

3.15 หลอดทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารเคมี

4.1 Acetone 85%

4.2 NaOH

4.3 Oxalic acid

4.4 2,6-dichlorophenol indophenol, Merck

4.5 Ascorbic acid, Merck

4.6 $(NH_4)_2SO_2$, H_2SO_4

4.7 Benzoic acid

4.8 EDTA.2Na

4.9 Ethanol

4.10 H_2O_2

4.11 H_2SO_4 conc.

4.12 HCl

4.13 $HClO_4$

4.14 HNO_3

4.15 KH_2PO_4

4.16 Methyl red

4.17 $Na_2HPO_4.7H_2O$

4.18 $Na_3PO_4.12H_2O$

4.19 Phenol

4.20 sodium hyperchlorite

4.21 Sodium nitroprusside

4.22 stanous chloride ($SnCl_2.2H_2O$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ ปริมาณวิตามินซี คลอโรฟิลล์ และธาตุอาหารพืช

5.1 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้

5.1.1 การเตรียมน้ำคั้นฝรั่ง

- ทำความสะอาดผลฝรั่ง ล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง
- ชั่งตัวอย่าง 100 กรัม
- นำตัวอย่างที่ชั่งแล้วมาหั่นเป็นชิ้นๆ ใส่ลงในเครื่องบดผลไม้
- ทำการบดตัวอย่าง เพื่อเอาน้ำคั้น
- เมื่อได้น้ำคั้นแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

5.1.2 วิธีการวิเคราะห์

ดูดน้ำคั้นฝรั่ง 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น10 มิลลิลิตร ลงไปผสมเขย่าให้เข้ากัน เติมฟีนอฟ์ทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นนำสารละลายไปไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูอ่อน จึงบันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณกรด (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์) โดยคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

$$\%\,TA = \frac{A \times B \times C \times 100}{D}$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)

B = จำนวนสมมูลของกรดซิตริค (0.07)

C = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรท (มล)

D = น้ำหนักสดของตัวอย่าง (มก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 ปริมาณวิตามินซีในผล โดยวิธี indophenol (Helrich, 1990)

5.2.1 การเตรียมสารเคมี

- กรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4% โดยชั่งกรดออกซาลิก 4 กรัม ใส่ในบีกเกอร์และละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

- 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenol indophenol, Merck) เข้มข้น 0.04 % โดยเตรียมจากการชั่ง 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.04 กรัม (ชั่งด้วยเครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง) มาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำสารละลายที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิต่ำ (ตู้เย็น) ไว้ใช้ต่อไป

- กรดแอสคอบิกมาตรฐาน (ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอบิก 0.001 กรัม มาละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4% ปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรทกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenol indophenol, Merck) เข้มข้น 0.04 % จนถึงจุดยุติ แล้วบันทึกปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อใช้เป็นค่ามาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี ของตัวอย่างพืชต่อไป

5.2.2 วิธีการวิเคราะห์

นำน้ำคั้นที่ได้จากผลฝรั่งมา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยกรดออกซาลิก 0.4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเอาสารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วมา 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยกรดออกซาลิก 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ในกระบอกตวง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำสารละลายมาไตเตรทกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรทจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน วัดปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล ที่ใช้ไตเตรท และคำนวณหาปริมาณของวิตามินซีตามสูตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ปริมาณวิตามินซี} = \frac{b \times 0.001 \times 100 \times 100}{a \times c}$$

โดยที่ a = ปริมาตรของน้ำคั้นที่ใช้ 10 มิลลิลิตร

b = ปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลที่ใช้ในการไตเตรทกับสารละลายตัวอย่าง

c = ปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอลที่ใช้ในการไตเตรทกับวิตามินซีมาตรฐาน

5.3 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)

5.3.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์

สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 80% โดยเตรียมจากสารละลายอะซิโตนเข้มข้น 85% ด้วยการดูดสารละลายอะซิโตน 85% 94.12 มิลลิลิตร มาใส่ใน Volumetric flask 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาคลอโรฟิลล์ต่อไป

5.3.2 วิธีการวิเคราะห์

นำใบฝรั่งมาทำความสะอาด รอให้แห้งแล้วตัดเอาส่วนหนึ่งของใบน้ำหนัก 0.5 กรัม แล้วนำมาบดให้ละเอียดแช่ด้วยอะซิโตนเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จนได้สารละลายเป็นสีเขียว จึงนำไปวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ช่วงคลื่น 663 นาโนเมตร และ 645 นาโนเมตร แล้วบันทึกค่าที่อ่านได้ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ และ บี มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด โดยใช้สูตรของ Witham *et al.* (1971) ดังสมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ (มก. / กรัมน้ำหนักสด)} = \frac{[12.7(D_{663}) - 2.69\,(D_{645})] \times V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ บี (มก. / กรัมน้ำหนักสด)} = \frac{[22.9(D_{645}) - 4.68\,(D_{663})] \times V}{1000 \times W}$$

โดย D = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้นๆ

V = ปริมาตรของสารละลายคลอโรฟิลล์ที่ปรับปริมาตรแล้ว

W = น้ำหนักเป็นกรัมของใบฝรั่งที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารทั้งในใบและผล

5.4.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบฝรั่งตรงตำแหน่งที่ 5-6 จากยอดของฝรั่ง นำมาทำความสะอาด โดยล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง และล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ 3 ครั้ง จากนั้นนำเอาตัวอย่างไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 70 – 75 ชั่วโมง จนน้ำหนักแห้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงจึงนำเอาตัวอย่างมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.4.2 การวิเคราะห์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส (Ohyama *et al.*, 1985, 1986)

5.4.2.1 การย่อยตัวอย่างพืชด้วยวิธี H_2SO_4 wet digestion (Ohyama *et al.*, 1991)

ชั่งตัวอย่าง 0.05 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาดยาว เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างไว้ ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 คืน จึงนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นนำออกจากเตาย่อยแล้วทิ้งไว้ให้เย็น เติม H_2O_2 0.3 มิลลิลิตร ลงในทุกๆ หลอดปั่นให้เข้ากัน แล้วนำไปตั้งบนเตาย่อยที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที และเติม H_2O_2 ทุกๆ 30 นาที ทำซ้ำเติมจนกระทั่งได้สารละลายใสจึงยุติ และนำสารละลายที่ได้มาตั้งไว้ให้เย็นเติมน้ำกลั่นลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เล็กน้อย ทิ้งไว้ 1 คืน จึงนำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในขั้นตอนต่อไป

5.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ ธาตุไนโตรเจน (Indolphenol Method)

1. เตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด คือ

A reagent : ชั่ง EDTA.2Na 25 กรัม ใส่บีกเกอร์ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้ 10 N NaOH เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติมสารละลาย methyl red 20 มิลลิลิตร(methyl red 0.05 g + 60% ethanol 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

B reagent : ชั่ง KH_2PO_4 136.09 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง benzoic acid 2.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เข้ากัน ปรับอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จนละลายหมดจึงนำมารวมกัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

C reagent : ชั่ง sodium nitroprusside 0.1 กรัม ใส่ใน volumetric flask จากนั้นเติม phenol 10.25 มิลลิลิตร (นำ phenol ไปอุ่นที่ 30-40 องศาเซลเซียส จะได้ phenol ที่เป็นของเหลว) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น สารละลายนี้มีอายุการใช้งาน 2 สัปดาห์

D reagent : ชั่ง NaOH 10 กรัม, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 7.06 กรัม และ $Na_3PO_4.12H_2O$ 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม sodium hyperchlorite 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. เตรียมสารละลาย NaOH 1 N เพื่อปรับความเป็นกรดด่าง

3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยชั่ง $(NH_4)_2SO_2$ 0.474 กรัม ปรับปริมาตรโดย H_2SO_4 0.5 N เป็น 1 ลิตร ปรับระดับความเข้มข้นที่จะใช้เพื่อทำกราฟมาตรฐาน คือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 มิลิกรัมต่อลิตร

4. ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำมาไตรเตรทโดยหยด NaOH 1 N ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณของไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์) ตามสูตรต่อไปนี้

$$\%N = \frac{A \times B \times C}{10000 \times DW}$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน (พีพีเอ็ม)

$$B = \frac{\text{ปริมาตรสุดท้ายในการวิเคราะห์ (25 มล.)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์}}$$

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (50 มล.)

DW = น้ำหนักของตัวอย่างพืชที่ใช้ย่อย (0.05 กรัม)

5.4.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

โดยวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) ตามกรรมวิธีของ Ohyama *et al.* (1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดตดังนี้

1. เตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

A reagent : ชั่ง $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำมากรอง

B reagent : เตรียมกรดซัลฟูริก 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

C reagent : นำ A reagent มาผสม B reagent โดยเท B reagent ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ค่อย ๆ เท A reagent ทีละน้อย ช้า ๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เตรียมสารละลาย stanous chloride ($SnCl_2.2H_2O$) โดยชั่ง stanous chloride 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ดูดควัน) เติม HCl 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใช้ได้ 3 วัน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก KH_2PO_4 ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 มิลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติม stanous chloride 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส เพื่อคำนวณหาปริมาณธาตุฟอสฟอรัสที่มีในตัวอย่าง เช่นเดียวกับไนโตรเจน

5.4.3 การวิเคราะห์ธาตุโพแทสเซียม แคลเซียม และ แมกนีเซียม

5.4.3.1 การย่อยตัวอย่างพืชด้วยวิธี HNO_3 - $HClO_4$ wet digestion (Mizukoshi *et al.*, 1994)

ชั่งตัวอย่างพืช 0.05 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาดยาว แล้วเติมด้วย $HClO_4$ 0.4 มิลลิลิตร และ HNO_3 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน แล้วปิดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำตั้งลงเตาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองออกจนกระทั่งหมดควันจึงค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิมาที่ 210 องศาเซลเซียส จนได้ตัวอย่างที่แห้ง(ระวังอย่าให้ไหม้) และตั้งไว้ในตู้ดูดควันรอจนเย็นจึงนำมาเติม HCl (ประกอบด้วย HCl ผสมน้ำอัตรา 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปตั้งไฟที่อุณหภูมิ100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- แล้วรอให้เย็นนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ K, Ca และ Mg

5.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุโพแทสเซียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม โดยปรับให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 มิลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2. เจือจางสารละลายตัวอย่างโดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกค่าที่อ่านได้จากเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer และนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เป็นค่าคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียมที่มีในตัวอย่าง เช่นเดียวกับไนโตรเจน

5.4.3.3 วิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม

1. เตรียม lantanum oxide โดยชั่ง lantanum oxide 2.01 กรัม มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมด้วยกรด HCl 37 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อใช้เป็นสารละลายเจือจางสำหรับปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียม

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียม โดยเตรียมจาก $CaCO_3$ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 มิลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมจาก $MgCl_2$ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 มิลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. เจือจางสารละลายตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเจือจางกับสารสะลายในข้อ 1 ให้ได้ปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำเอาสารละลายที่เจือจางดังกล่าวไปด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 442.7 นาโนเมตร และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียมตามลำดับ และบันทึกค่าที่อ่านได้ จากนั้นนำไปคำนวณความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียม เช่นเดียวกับไนโตรเจน

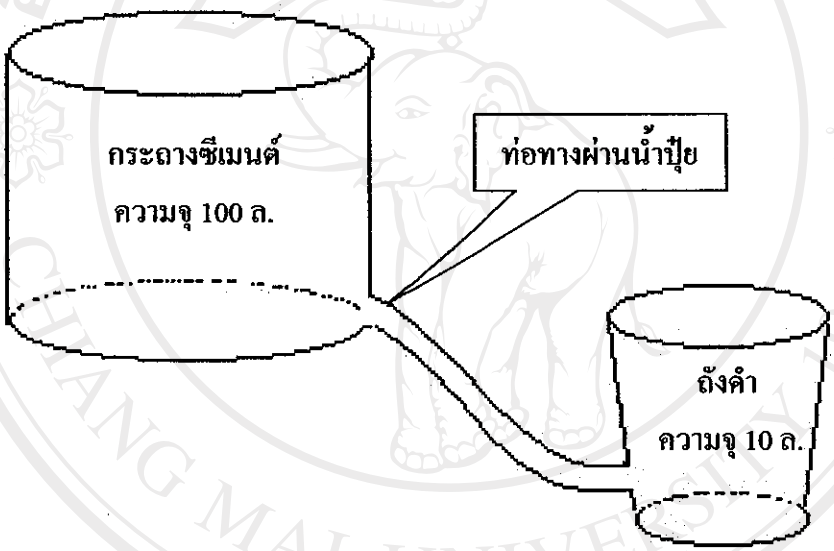
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. วิธีการทดลอง

6.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของระดับพัมมิซต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพผล

6.1.1 การเตรียมระบบการให้สารละลายธาตุอาหาร

เตรียมกระถางเทซีเมนต์ปิดแล้วเจาะรูระบายน้ำด้านข้างกระถาง 1 รู เพื่อเป็นทางให้สารละลายธาตุอาหารแก่ฝรั่งที่ปลูกในกระถาง โดยต่อท่อ PVC ขนาด ¾ นิ้ว เชื่อมต่อจากรูของกระถางออกมาใส่กระถางดำ ขนาดความจุ 10 ลิตร ที่ใช้เป็นกระถางสำหรับใส่ปุ๋ยน้ำ โดยการให้ปุ๋ยน้ำแก่ฝรั่งนั้นจะให้ในลักษณะที่เป็น Sub-irrigation (ภาพที่ 1 และ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะ กระถางปลูกและระบบการให้ปุ๋ยน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 2 แปลงทดลองฝรั่ง

6.1.2 เตรียมวัสดุปลูกโดยใช้ทรายละเอียดปลูกฝรั่งกิ่งตอนลงในแบบที่เตรียมไว้ใน ข้อ 6.1.1 ให้ธาตุอาหารพืชในรูปสารละลาย ซึ่งมีองค์ประกอบ และความเข้มข้น ดังต่อไปนี้

Cation		Anion	
ชนิด	ความเข้มข้น (meq/l)	ชนิด	ความเข้มข้น (meq/l)
Mg^{++}	5	$SO_4^{=}$	5
K^{+}	5	$H_2PO_4^{-}$	5
Ca^{++}	5	NO_3^{-}	5
รวม	15	รวม	15

ที่มา: สันติ, 2539

ส่วนธาตุอาหารรองให้ตามคำแนะนำของ Hoagland and Arnon (1952) และปรับความเป็นกรด-เป็นด่างเท่ากับ 6.5 ทำการให้ปุ๋ยน้ำประมาณ 2-3 ลิตรต่อกระถางในเวลาช่วงเช้าระหว่าง 6.30 -

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.00 น ทุกวันตลอดการทดลอง เมื่อพืชตั้งตัวได้แล้ว จึงเริ่มให้พัมมิซในรูปอาหารเสริมตามกรรมวิธีของการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้หินพัมมิซอัตรา 0 กิโลกรัมต่อทราย 100 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 ให้หินพัมมิซอัตรา 1 กิโลกรัมต่อทราย 100 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 ให้หินพัมมิซอัตรา 2 กิโลกรัมต่อทราย 100 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 ให้หินพัมมิซอัตรา 3 กิโลกรัมต่อทราย 100 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 ให้หินพัมมิซอัตรา 4 กิโลกรัมต่อทราย 100 ลิตร

วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 กรรมวิธีๆ ละ 7 ซ้ำ 1 ต้นต่อ 1 ซ้ำ

6.2 การทดลองที่ 2 ผลของอัตราการใช้พัมมิซที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ปลูกฝรั่งพันธุ์สีทองโดยใช้กิ่งตอน ปลูกในกระถางขนาดความจุ 50 ลิตร ให้ทรายละเอียดเป็นวัสดุปลูก โดยทำการตัดแต่งกิ่งก่อนการให้พัมมิซ หลังจากตัดแต่งกิ่ง 1 เดือน เมื่อฝรั่งเริ่มแตกใบอ่อนจึงให้พัมมิซตามกรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้หินพัมมิซอัตรา 0 กิโลกรัมต่อทราย 50 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 ให้หินพัมมิซอัตรา 1 กิโลกรัมต่อทราย 50 ลิตร ใส่ครั้งเดียว
กรรมวิธีที่ 3 ให้หินพัมมิซอัตรา 3 กิโลกรัมต่อทราย 50 ลิตร โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ห่างกัน 1 เดือน
กรรมวิธีที่ 4 ให้หินพัมมิซอัตรา 5 กิโลกรัมต่อทราย 50 ลิตร โดยแบ่งใส่ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 เดือน

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น ทุกๆ กรรมวิธีมีการให้สารละลายธาตุอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

7. การบันทึกผลการเจริญเติบโตและคุณภาพผลของฝรั่ง

7.1 ขนาดความสูงต้น (เซนติเมตร)

ใช้ตลับเมตรในการวัดการเจริญเติบโตด้านความสูงของต้น โดยวัดความสูงจากจุดที่กำหนด(ขอบกระถางปลูก) ถึงส่วนที่สูงสุดของต้นฝรั่งในแนวตั้งฉากกับขอบกระถางปลูก (ภาพที่ 3) ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร ซึ่งทำการวัดบันทึกการเจริญเติบโตด้านความสูงของฝรั่งในทุกๆ เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3 วิธีวัดการเจริญเติบโตด้านความสูงต้น (เซนติเมตร)

7.2 ขนาดความกว้างทรงพุ่ม (เซนติเมตร)

ใช้ตลับเมตรวัดขนาดความกว้างทรงพุ่มจากส่วนที่กว้างที่สุดเป็น 2 แนว ตั้งฉากกันแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร เพื่อใช้เป็นค่าบ่งบอกถึงการเจริญเติบโตด้านความกว้างทรงพุ่ม ซึ่งทำการวัดการเจริญเติบโตทุกๆ เดือนเช่นเดียวกับการบันทึกการเจริญเติบโตด้านความสูงต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (เซนติเมตร)

วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ บริเวณที่กำหนดโดยเหนือจากขอบกระถางประมาณ 5 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายเพื่อวัดครั้งต่อไป ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตร

7.4 จำนวนกิ่งแขนงที่เกิดใหม่

สุ่มกิ่งใดกิ่งหนึ่งขึ้นมา แล้วทำเครื่องหมายไว้เพื่อใช้ในการบันทึกการเกิดกิ่งแขนงในครั้งต่อไป จากนั้นทำการบันทึกจำนวนกิ่งแขนงที่เกิดขึ้นใหม่ และทำการบันทึกเช่นนี้ทุกๆ เดือนจนสิ้นสุดการทดลอง

7.5 จำนวนผลที่เกิดใหม่

สุ่มกิ่งใดกิ่งหนึ่งขึ้นมา แล้วทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นทำการบันทึกจำนวนผลที่เกิดใหม่ในทุกๆ เดือนจนสิ้นสุดการทดลอง

7.6 ขนาดผล (เซนติเมตร)

ใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ในการวัดขนาดผลโดยวัดด้านกว้างจากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งของส่วนที่กว้างที่สุดในแนวขวางของผล และด้านยาวทำการวัดจากขั้วผลมายังปลายผล แล้วบันทึกค่าที่อ่านได้ จากนั้นนำเอาค่าดังกล่าวมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้เป็นค่าบ่งบอกถึงขนาดของผลโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\text{ขนาดผล (ซม)} = \frac{[\text{กว้าง (ซม)} + \text{ยาว (ซม)}]}{2}$$

7.7 น้ำหนักสดของผล (กรัม)

เมื่อผลฝรั่งแก่เต็มที่ มีอายุประมาณ 100-115 วัน นับจากวันที่ดอกบานเต็มที่ จะทำการเก็บผลผลิตฝรั่งเพื่อนำมาชั่งน้ำหนักสดของผลฝรั่ง แล้วทำการบันทึกผลจากค่าที่อ่านได้ ซึ่งใช้หน่วยเป็นกรัม เพื่อใช้เป็นข้อมูลน้ำหนักสดของผลฝรั่ง โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartouius รุ่น BA3100P

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.8 น้ำหนักแห้งของผล (กรัม)

หลังจากที่อบผลฝรั่งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 70 – 75 ชั่วโมง จนการชั่งน้ำหนักแห้งไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงบันทึกเป็นข้อมูลน้ำหนักแห้งของผลฝรั่ง โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BP110S

7.9 ความแน่นเนื้อ (กิโลกรัม)

วัดความแน่นเนื้อของผลฝรั่ง โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อของผลไม้ของบริษัท Metek รุ่น Hunter spring ขนาด 10 กิโลกรัม สำหรับแทงลงไปในเนื้อฝรั่ง ซึ่งหัวของเครื่องวัดความแน่นเนื้อของผลไม้ที่ใช้ในการแทงครั้งนี้มีหัวเป็นแบบรูปกรวย เส้นผ่าศูนย์กลางหัวเท่ากับ 6.5 มิลลิเมตร และยาว 13 มิลลิเมตร โดยทำการแทงหัวของเครื่องวัดความแน่นเนื้อตรงบริเวณกลางผล จำนวน 3 ตำแหน่ง แล้วบันทึกค่าที่อ่านได้ ซึ่งมีหน่วยเป็นกิโลกรัม จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเพื่อใช้เป็นข้อมูลค่าความแน่นเนื้อของผลฝรั่งในแต่ละกรรมวิธีต่อไป

7.10 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

วัดโดยใช้เครื่อง hand refractometer ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 (0-32 °brix) โดยเอาน้ำคั้นที่ได้จากเนื้อฝรั่งมาหยดลงบนแผ่นปริซึมของเครื่อง hand refractometer จากนั้นทำการส่องเพื่ออ่านค่าที่วัดได้ และบันทึกเพื่อใช้เป็นข้อมูลปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved