

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

##### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างดิน ได้แก่ ขวดพลาสติก แผ่นอลูมิเนียมเปลว (aluminum foil)
2. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatograph, GC) ที่มีตัวตรวจวัดเป็นชนิด FPD เครื่องลดปริมาตรสาร (rotary flask evaporator) และเครื่องเขย่า
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ ได้แก่ กรวยแยก กรวยกรอง กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ขวดลดปริมาตร กระดาษกรอง (Whatman no. 5) และขวดสีชา (vial)
4. สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้แก่

คลอร์ไพริฟอส 40% (w/v)	โดยมีอัตราการใช้ 25 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
ไดโครโตฟอส 33% (w/v)	โดยมีอัตราการใช้ 60 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร ความเข้มข้น 990 มิลลิกรัมต่อลิตร
ไตรอะโซฟอส 40% (w/v)	โดยมีอัตราการใช้ 50 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร
โปรฟีโนฟอส 50% (w/v)	โดยมีอัตราการใช้ 80 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร ความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อลิตร

5. สารมาตรฐานของคลอร์ไพริฟอส ไดโครโตฟอส ไตรอะโซฟอส และโปรฟีโนฟอส
6. ตัวทำละลาย (PR grade) ได้แก่ เอทิลอะซิเตท อะซิโตน และเฮกเซน

##### 3.2 ดินที่ใช้ในการทำวิจัย

ดินที่นำมาใช้ในการทดลองเก็บจากอำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นดินชุดโคราช โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ความลึก 0-15 เซนติเมตร ตัวอย่างดินที่เก็บมาได้นำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม หลังจากนั้นนำไปบดและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร และวิเคราะห์หาสมบัติต่างๆ ของดินตามวิธีการของ Carter (1993) แสดงดังตารางที่ 2 และทำการปรับพีเอชของดินเป็น 6.5-6.7 โดยการเติมปูนขาวและน้ำให้ดินมีความชื้นประมาณร้อยละ 60 ทิ้งไว้ประมาณ 4 สัปดาห์

## ตารางที่ 2 วิธีการวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ ของดิน

วิเคราะห์	วิธีการ
พีเอช	ดิน:น้ำ 1:1 วัดด้วย pH meter
ค่าความต้องการปูน (lime requirement)	Woodruff buffer method
ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูงสุดของดิน (maximum water holding capacity)	นำดินใส่ในท่อทรงกระบอกที่เจาะรูที่พื้น แล้วนำไปตั้งบนเพลาท้าวที่ใส่น้ำกลั่นสูง 0.5 เซนติเมตร ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ดินอิ่มตัวด้วยน้ำ แล้วจึงนำออกมาตั้งไว้บนกระดาษกรอง จนกระทั่งสมดุล (ไม่มีน้ำไหลออกมาภายนอกกระบอก) แล้วจึงนำดินไปหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น
ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (Organic matter)	Walkley & Black method
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Available P)	สกัดด้วย Bray II พัฒนาสีด้วย ammoniummolybdate, antimony potassium tartrate, ascorbic acid วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable K)	สกัดด้วย $\text{NH}_4\text{OAc}$ 1 M pH 7 วัดโดย Flame photometer
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N)	Micro Kjeldahl procedure
แคลเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable Ca and Mg)	สกัดด้วย $\text{NH}_4\text{OAc}$ 1 M pH 7 วัดโดย Atomic absorption spectrophotometer
เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสีที่สกัดได้ (Extractable Fe Mn Cu and Zn)	สกัดด้วย DTPA 1 วัดโดย Atomic absorption spectrophotometer
ค่าการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchang Capacity)	Ammonium acetate pH 7 และ Bucher filtration method
ปริมาณทราย ซิลต์ และดินเหนียว	Hydrometer method

ที่มา: Carter (1993)

### 3.3 การศึกษาวิธีการสกัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดิน

จากการศึกษามีวิธีการสกัดสำหรับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดิน 4 วิธี คือ

**วิธีที่ 1** สกัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดินด้วยเอทิลอะซิเตท ตามวิธีการของพงศ์พันธ์ และคณะ (2538) ซึ่งมีวิธีการสกัดดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 50 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหเอทิลอะซิเตท (PR grade) จำนวน 100 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนในอัตรา 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
2. กรองสารละลายส่วนใสผ่านโซเดียมซัลเฟต (เพื่อดูดซับน้ำ)

3. ปิเปตสารละลายที่กรองได้จำนวน 50 มิลลิลิตร ไปลดปริมาตรให้เหลือ 2 มิลลิลิตร
4. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

**วิธีที่ 2** สกัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดินด้วยอะซิโตน ซึ่งพัฒนามาจากวิธีการของ Aoyagi *et al.* (2001) มีวิธีการสกัดดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 25 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนจำนวน 50 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนในอัตรา 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
2. เติมโซเดียมคลอไรด์จำนวน 4 กรัม แล้วเขย่าต่ออีก 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน ประมาณ 30 นาที
3. กรองสารละลายส่วนใสผ่านโซเดียมซัลเฟต
4. ปิเปตสารละลายที่กรองได้จำนวน 20 มิลลิลิตร ไปลดปริมาตรให้เหลือ 2 มิลลิลิตร
5. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

**วิธีที่ 3** สกัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดินด้วยอะซิโตน ซึ่งพัฒนามาจากวิธีการของ Jiries *et al.* (2002) มีวิธีการสกัดดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 25 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนจำนวน 100 มิลลิลิตร และน้ำปราศจากไอออน 25 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนในอัตรา 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
2. นำสารละลายส่วนใสแล้วนำมาปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร โดยใช้อะซิโตน
3. เมื่อปรับปริมาตรแล้ว ปิเปตสารละลายที่ได้มาจำนวน 20 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยก
4. นำมาสกัด 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งสกัดด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่อิ่มตัว 10 มิลลิลิตร, น้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร และไดคลอโรมีเทน 30 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเป็นเวลา 2 นาที แยกชั้นของไดคลอโรมีเทนออก (ชั้นส่วนล่าง) ใส่ในกรวยแยกอีกอันหนึ่ง แล้วทำการสกัดอีกครั้ง
5. แยกชั้นของไดคลอโรมีเทน (organic phase) มากรองผ่านโซเดียมซัลเฟต และนำไปลดปริมาตรให้เหลือ 2 มิลลิลิตร
6. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

**วิธีที่ 4** สกัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดินด้วยเฮกเซนและอะซิโตน ซึ่งพัฒนามาจากวิธีการของ Tse *et al.* (2004) มีวิธีการสกัดดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 4 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจำนวน 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง
2. เติมเฮกเซน 80 มิลลิลิตร และอะซิโตน 20 มิลลิลิตร นำบีกเกอร์มาทำการสกัดด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonification) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที
3. นำสารละลายส่วนใสใส่ในกรวยแยก แล้วสกัดโดยเติมน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร จากนั้นแยกชั้นส่วนล่างใสในกรวยแยกอีกอันหนึ่ง แล้วทำการสกัดอีก 2 ครั้ง ด้วยไดคลอโรมีเทน 100 มิลลิลิตร
4. นำชั้นของไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนที่ได้มากรองผ่านโซเดียมซัลเฟต และนำไปลดปริมาตรให้เหลือ 2 มิลลิลิตร
5. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

โดยแต่ละวิธีการสกัดนั้นนำมาหาประสิทธิภาพของวิธีการจากปริมาณสารที่ตรวจพบ (% recovery) ที่มากที่สุด เพื่อที่จะนำมาเป็นวิธีสกัดสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในดินที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป ซึ่งในแต่ละวิธีจะทำการใส่สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในปริมาณที่เท่ากันทุกวิธี

### 3.4 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสลายตัวของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

การศึกษาค้นคว้าผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสลายตัวของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยใช้สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่แตกต่างกัน ในการทดลองย่อยที่ 1 ใช้สารคลอร์ไพริฟอส การทดลองย่อยที่ 2 ใช้สารไดโครอะซิฟอส และการทดลองย่อยที่ 3 ใช้สารโปรพิโนฟอส

การทดลองย่อยที่ 1 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการสลายตัวของคลอร์ไพริฟอส

**การออกแบบการทดลอง :** เป็นแบบ Factorial ประกอบด้วยปัจจัย 2 ปัจจัย คือ พีเอชของดิน เริ่มต้น 2 ระดับ คือ 4.5 และ 6.7 และระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารคลอร์ไพริฟอสในดิน 3 ระดับ คือ 35.5, 71.0 และ 106.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; CRD) มีทั้งหมด 3 ซ้ำ

**วิธีการ :** ชั่งดินที่มีพีเอช 4.5 และ 6.7 จำนวน 100 กรัม ใส่ขวดพลาสติกขนาด 200 มิลลิลิตร และเติมสารคลอร์ไพริฟอสลงในดินแต่ละพีเอช โดยให้ดินมีความเข้มข้นของสารคลอร์ไพริ

ฟอสเฟตเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 35.5, 71.0 และ 106.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วทำการปรับความชื้นดินทุกขวดด้วยน้ำกลั่นให้มีความชื้นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูงสุดของดิน (maximum water holding capacity, WHC) (ความสามารถในการอุ้มน้ำสูงสุดของดินชุดโคราช เท่ากับ 12.8 มิลลิลิตรต่อดิน 100 กรัม) ปิดปากขวดพลาสติกด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเปลวที่ถูกเจาะรูเอาไว้เพื่อการระบายอากาศที่ดี นำตัวอย่างดินมาบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตลอดระยะเวลาการทดลอง จะทำการควบคุมความชื้นของดินที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูงสุดของดิน โดยการเติมน้ำกลั่นในตัวอย่างดิน ทุก 1-2 วัน ให้มีน้ำหนักเท่ากับน้ำหนักเริ่มต้น

**การเก็บข้อมูล :** ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารคลอโรไพริฟอสที่เหลือตกค้างอยู่ในดิน (% remaining) ทุก 0, 1, 3, 5 และ 14 วันของการทดลอง ด้วยวิธีการสกัดดินที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการศึกษาในหัวข้อที่ 3.3 นำส่วนที่สกัดได้ไปตรวจวัดปริมาณสารที่เหลือตกค้างอยู่ในดิน โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph) (ภาคผนวก ก)

สำหรับการทดลองย่อยที่ 2 และ 3 ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1 โดยการทดลองย่อยที่ 2 ใช้สารไตรอะโซฟอส 3 ระดับความเข้มข้น คือ 71, 142 และ 213 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการทดลองย่อยที่ 3 ใช้สารโปรพิโนฟอส 3 ระดับความเข้มข้น คือ 142, 284 และ 426 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

### 3.5 การศึกษาผลของอินทรีย์วัตถุต่อการสลายตัวของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

การศึกษาผลของอินทรีย์วัตถุต่อการสลายตัวของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างของดินต่อการสลายตัวของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต โดยทำการศึกษาในดินชุดโคราชที่มีพีเอช 6.7 แต่มีการเปลี่ยนแปลงที่ 1 เป็นปริมาณอินทรีย์วัตถุ 3 ระดับ คือ 0 ตันต่อไร่, 1 ตันต่อไร่ และ 2 ตันต่อไร่ ซึ่งอินทรีย์วัตถุที่ใช้ คือ ปุ๋ยหมักสำหรับการเติมอินทรีย์วัตถุที่อัตรา 1 ตันต่อไร่ นั้นใช้ปริมาณปุ๋ยหมัก 0.32 กรัมต่อดิน 100 กรัม (ดิน 1 ไร่ หนักเท่ากับ 312,000 กิโลกรัม) และการเติมอินทรีย์วัตถุที่อัตรา 2 ตันต่อไร่ ใช้ปริมาณปุ๋ยหมัก 0.64 กรัมต่อดิน 100 กรัม

### 3.6 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ภาควิชาปฐพีศาสตร์และอนุรักษ์ศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่