บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุพันธุ์พืช

หัวพันธุ์ในระยะพักตัวของปทุมมาพันธุ์ Chiangmai Pink (ภาพที่ 1) จำนวน 374 หัว มีตุ้มราก 2-4 ตุ้ม

ภาพที่ 1 หัวพันธุ์ปทุมมาพันธุ์ Chiangmai Pink

1.2 วัสดุสารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมสารละลายธาตุอาหาร ได้แก่

1.2.1.1 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)

1.2.1.2 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)

1.2.1.3 โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

1.2.1.4 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

1.2.1.5 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)

1.2.1.6 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

1.2.1.7 กรดบอริค (H_2BO_3)

1.2.1.8 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

1.2.1.9 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.10 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)

1.2.1.11 โมลิบดินัมออกไซด์ (MoO_2)

1.2.1.12 เหล็กคีเลต (FeEDTA)

1.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน ได้แก่

1.2.2.1 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

1.2.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

1.2.2.3 โซเดียมคีเลต (EDTA.2Na)

1.2.2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

1.2.2.5 เอทธานอล (C_2H_5OH)

1.2.2.6 เมธิลเรด (methyl red)

1.2.2.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.2.2.8 กรดเบนโซอิค (benzoic acid)

1.2.2.9 โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside)

1.2.2.10 ฟีนอล (phenol)

1.2.2.11 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

1.2.2.12 ไตรโซเดียมฟอสเฟต (Na_3PO_4)

1.2.2.13 โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ($NaClO_2$)

1.2.2.14 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

1.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่

1.2.3.1 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

1.2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

1.2.3.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.2.3.4 แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)

1.2.3.5 สเทนัสคลอไรด์ ($SnCl_2$)

1.2.3.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โพแทสเซียม ได้แก่

1.2.4.1 กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$)

1.2.4.2 กรดไนตริก (HNO_3)

1.2.4.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.2.4.4 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แคลเซียมและแมกนีเซียม ได้แก่

1.2.5.1 กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$)

1.2.5.2 กรดไนตริก (HNO_3)

1.2.5.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.2.5.4 แลนทานัมออกไซด์ (LaO_2)

1.2.5.5 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

1.2.5.6 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 ตลับเมตร

1.3.2 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์

1.3.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)

1.3.4 เครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้า (EC meter)

1.3.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001

1.3.6 Atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น 3100

1.3.7 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.3.8 เครื่องบดตัวอย่างพืช

1.3.9 ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่างพืช

1.3.10 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี

1.3.11 ตู้เย็น

1.3.12 ตู้อบตัวอย่างพืช

1.3.13 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB – 4

1.3.14 ขวดพลาสติก ขนาด 50 มิลลิเมตร

1.3.15 เครื่องแก้ว

1.3.15.1 หลอดทดลอง ขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร

1.3.15.2 บีกเกอร์

1.3.15.3 กระบอกตวง

1.3.15.4 กรวยกรอง

1.3.15.5 ขวดปรับปริมาตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.15.6 ปิเปต ไมโครปิเปต

1.3.15.7 หลอดหยดสาร

1.3.15.8 แท่งแก้วคน

1.3.15.9 ขวดสีชา

1.3.15.10 ช้อนตักสาร

2. วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมธาตุอาหารในปทุมมาในระยะการเจริญต่างกัน

ปลูกหัวพันธุ์ปทุมมาพันธุ์ Chiangmai Pink จำนวน 50 หัว ในถุงพลาสติกดำขนาด 6 x 12 นิ้ว ใช้วัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ดิน:ทราย:แกลบดิบ:ถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1:1:1 เป็นวัสดุปลูก รดน้ำและให้สารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมไนเตรท 61 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 37 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไนเตรท 103.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 42 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 72 กรัมต่อลิตร กรดบอริค 0.247 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.446 กรัมต่อลิตร ซิงค์ซัลเฟต 0.23 กรัมต่อลิตร คอปเปอร์ซัลเฟต 0.02 กรัมต่อลิตร โมลิบดินัมออกไซด์ 0.013 กรัมต่อลิตร และเหล็กคีเลต 0.611 กรัมต่อลิตร

สารละลายที่ได้ผสมน้ำในอัตรา 1:200 รดให้แก่พืชสัปดาห์ละครั้ง ครั้งละ 3 ลิตรต่อตารางเมตร จากนั้นสุ่มพืช 4 ซ้ำ (ต้น) เพื่อบันทึกผลการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์ และหาปริมาณธาตุอาหารตามระยะการเจริญเติบโตต่างกัน 4 ระยะ (ภาพที่ 2) ดังนี้

ระยะที่ 1 หัวพันธุ์เริ่มต้นที่ใช้ปลูก

ระยะที่ 2 ระยะเจริญเติบโตทางใบ เมื่อต้นสูง 20-25 ซม. (อายุ 8 สัปดาห์หลังปลูก)

ระยะที่ 3 ช่วงออกดอกในระยะดอกจริงดอกแรกบาน (อายุ 14 สัปดาห์หลังปลูก)

ระยะที่ 4 ระยะพักตัว (อายุ 34 สัปดาห์หลังปลูก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 2 ระยะการเจริญเติบโตต่างกัน 4 ระยะ
(ก) หัวพันธุ์เมื่อเริ่มปลูก (ข) การเจริญเติบโตทางใบ
(ค) ระยะดอกจริงดอกแรกบาน (ง) หัวเมื่อพักตัว

การทดลองที่ 2 ผลของไนโตรเจนและโพแทสเซียมต่อการเจริญเติบโตของปทุมมา

ปลูกหัวพันธุ์ปทุมมา พันธุ์ Chiangmai Pink จำนวน 324 หัว ในวัสดุปลูกที่ประกอบด้วย ทราย ขุยมะพร้าว และถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1:1 ปลูกพืชในกระบะปลูกขนาด 1x1x0.5 เมตร จำนวน 9 ต้นต่อกระบะโดยแต่ละต้นห่างกัน 25x25 เซนติเมตร (ภาพที่ 3) ระดับความลึกของหัวที่ปลูกประมาณ 10 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 3x3 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ (ต้น) หลังปลูก 50 วัน เมื่อพืชมีจำนวนใบ 1 ใบ เริ่มให้สารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วยระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 3 ระดับคือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับโพแทสเซียม 3 ระดับคือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับธาตุอาหารอื่นให้พืชได้รับในระดับความเข้มข้นดังนี้ ฟอสฟอรัส 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 42 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียม 131 มิลลิกรัมต่อลิตร โบรอน 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 0.84 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 0.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ทองแดง 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และโมลิบดินัม 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สัปดาห์ละครั้ง ครั้งละ 3 ลิตร ต่อตารางเมตร ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 50 โพแทสเซียม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 2 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 50 โพแทสเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 50 โพแทสเซียม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 100 โพแทสเซียม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 5 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 100 โพแทสเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 6 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 100 โพแทสเซียม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 7 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 200 โพแทสเซียม 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 8 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 200 โพแทสเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 9 ระดับความเข้มข้นของไนโตรเจน 200 โพแทสเซียม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ภาพที่ 3 สภาพแปลงปลูกปทุมมาการทดลองที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การบันทึกผลการทดลอง

2.2.1 การบันทึกการเจริญเติบโต

สุ่มพืชกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (ต้น) บันทึกผลการเจริญเติบโตดังนี้

2.2.1.1 ความสูงของต้น (เซนติเมตร) วัดจากจุดที่กำหนด (ขอบกระบะ) ถึงส่วนที่สูงที่สุดของต้น โดยการรวบใบขึ้น ทุก 2 สัปดาห์

2.2.1.2 จำนวนใบต่อต้น ทุก 2 สัปดาห์

2.2.1.3 จำนวนหน่อใหม่ต่อกอ

2.2.1.4 ความยาวก้านดอก (เซนติเมตร) วัดจากโคนต้นจนถึงโคนกลีบประดับล่าง (main bract)

2.2.1.5 ความยาวช่อดอก (เซนติเมตร) วัดจากโคนกลีบประดับล่างจนถึงปลายกลีบประดับบน (coma bract)

2.2.1.6 จำนวนกลีบประดับบนต่อช่อ

2.2.1.7 จำนวนหัวใหม่

2.2.1.8 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหัวใหม่

2.2.1.9 จำนวนตุ้มรากใหม่ต่อหัว

2.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหารส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน

2.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มพืชในแต่ละระยะที่ศึกษานำมาแยกส่วนของอวัยวะพืชได้แก่ หัว ตุ้มราก รากฝอย ใบ ช่อดอก หัวใหม่ ตุ้มรากใหม่ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง น้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้งจากนั้นชั่งน้ำหนักสด บันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลงแล้วนำมาเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น (desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น จึงบันทึกน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกก่อนนำไปชั่งเพื่อใช้ย่อยตัวอย่างต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.2 การย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรด (Wet Acid Digestion) ดัดแปลงโดย Ohyama *et al*. (1991)

ก. การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดทดลองขึ้นมาพักทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำซ้ำเดิมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

ข. การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม (Mizukoshi *et al.,* 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียดหนักประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 200 มิลลิเมตร เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น 0.4 มิลลิลิตร และกรดไนตริก 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกหมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้ง ระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจาง ($HCl : H_2O$ อัตรา 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร (Ohyama *et al*., 1985 ; 1986)

2.2.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจนรวม (Indolphenol Method)

1. เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่งโซเดียมคีเลต 25 กรัม ใส่บีกเกอร์ ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้ 10 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติมสารละลายเมธิลเรด 20 มิลลิลิตร (เมธิลเรด 0.05 กรัม + 60% เอทธานอล 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

B reagent : ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 136.09 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งกรดเบนโซอิค 2.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งเหล็กคน ปรับอุณหภูมิ 30-40 องศา จนละลายหมด นำมารวมกัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

C reagent : ชั่งโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ 0.1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มิลลิลิตร (นำฟีนอลไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส จะได้ฟีนอลที่เป็นของเหลว) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

D reagent : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 7.06 กรัม และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานจากแอมโมเนียมซัลเฟต ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกรดซัลฟูริก 0.5 N เตรียมจาก กรดซัลฟูริก 13.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้จากข้อ 2.2.2.2 (ก) ปริมาตร 0.3-0.5 มิลลิลิตร (ขึ้นกับส่วนของพืช) เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วนำมาไตเตรทโดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสี ละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{สาร A x B x C}}{1000 \times \text{DW}}$$

สาร A มิลลิกรัมต่อลิตร = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (ส่วนต่อล้าน)

B = อัตราส่วนการเจือจางสารตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

$$= \frac{\text{ปริมาตรสุดท้ายในการวิเคราะห์ (25 มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์}}$$

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืชในข้อ 2.2.2.2 (50 มิลลิลิตร)

DW = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et. al*., 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดต ดังนี้

1. เตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ ดังนี้

A reagent : ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต 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 ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1 ลิตร ค่อยๆ เท A reagent ทีละน้อย อย่างช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

2. เตรียมสารละลายสเทนัสคลอไรด์ โดยชั่ง สเทนัสคลอไรด์ 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควัน) เติมกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใช้ได้ 3 วัน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.716 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก 4 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

4. ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (ก) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสเทนัสคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุโพแทสเซียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมปรับให้มีความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 1,000 มิลลิกรัม ของบริษัท Merck ® ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1 ลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ จะได้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการต่อไป

2. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (ข) โดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (เปอร์เซ็นต์) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

2.2.2.3.4 วิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียม

1. เตรียมแลนทานัมออกไซด์ โดยชั่งแลนทานัมออกไซด์ 2.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร เติม กรดไฮโดรคลอริค 37 % 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียมจากแคลเซียมคาร์บอเนต จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียม จากแมกนีเซียมคลอไรด์ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.05 0.10 0.15 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (ข) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียม และแมกนีเซียมโดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยสารสะลายในข้อ 2.2.2.3.4. (1) เป็น 25 มิลลิลิตร

5. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนโดยอะตอมของแคลเซียม และแมกนีเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 442.7 นาโนเมตร และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียมตามลำดับ บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณ เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved