บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง (Mandarins cv. Sai Nam Pueng)

สารเคมี

1. α-Amylase (Fluka®, 86250)
2. Acetic acid (Labscan®, A8401)
3. Ammonium acetate (CH_3COONH_4) (Merck®, 1.01116.1000)
4. Ammonium metavanadate (NH_4VO_2) (Ajax Finechem®, A45)
5. Ammonium molybdate ($(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}\ .\ 4H_2O$) (Ajax Finechem®, A46)
6. Ammonium sulfate ($[NH_4]_2SO_4$) (Ajax Finechem®, A1217)
7. Anthrone (Fluka®, 10740)
8. Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) (Ajax Finechem®, A79)
9. Azomethine ($C_{17}H_{12}\ NNaO_8\ S_2$) (Merck®, 1.11962.0010)
10. Calciumchoride-dihydrat ($CaCl_2$) (Ajax Finechem®, A835282)
11. D-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax Finechem®, A783)
12. di – Sodium hydrogen orthophosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$) (Ajax Finechem®, A478)
13. Disodium hydrogen arsenate ($Na_2HAsO_2\ .7H_2O$) (Sigma, S9663)
14. Express sugar (วานากา®, Thailand)
15. Hydrochloric acid 37% (HCl) (Lab-Scan®, A8601)
16. Hydrogen peroxide 30% (H_2O_2) (Merck®, 8.22287.1000)
17. Invertase (Sigma®, I4504)
18. Lanthanium oxide (La_2O_3) (Ajax Finechem®, 1539)
19. Nitric acid (HNO_3) (Lab-Scan®, A8203)
20. Nitrolotriacetic acid ($C_6H_9NO_6$) (Fluka®, 72560)
21. p-Hydroxybenzoicacid (Fluka®, 54600)
22. Potassium acetate ($CH_3\ COOK$) (Ajax Finechem®, 352)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

23. Selenium Black (Se) (Merck®, 1.07714.0050)
24. Sodium hypochlorite (NaOCl) (J.T.Baker®, 9416-01)
25. Sodium - nitroprusside ($Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$) (J.T.Baker®, 3792-04)
26. Sodium potassium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) (Ajax Finechem®, A416)
27. Sodium salt EDTA ($C_{10}H_{14}Na_2N_2O_8$) (Fisher®, 6381-92-6)
28. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Ajax Finechem®, 476)
29. Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) (Merck®, A836892)
30. Sodium hydroxide 97% (NaOH) (Lab-Scan®, K2004)
31. Sodium nitrite ($NaNO_2$) (Ajax Finechem®, A492)
32. Sodium salicylate [$C_6H_4(OH)COONa$] (Ajax Finechem®, A1513)
33. Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4) (Ajax Finechem®, A503)
34. Starch (Fisher®, 9005-25-8)
35. Sulfuric acid 98% (H_2SO_4) (Lab-Scan®, A8301)
36. Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Ajax Finechem®, A530)

อุปกรณ์

1. Beaker ขนาด 50 100 250 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร
2. Cuvette แก้ว (Starna®, England)
3. Hotplate (CE Combination®, Thailand)
4. Magnetic bar
5. Micropipette ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Pipettman Gilson®, Germany)
6. กรวยกรอง
7. กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 5 (Whatman®, England)
8. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Fujifilm® E550, JAPAN)
9. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 50 100 มิลลิลิตร (ISO LAB®, Germany)
10. ขวดพลาสติกขนาด 60 และ100 มิลลิลิตร
11. เครื่อง Ultrasonic bath (D.S.C. Group®, Thailand)
12. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo®, Switzerland)
13. เครื่องบดตัวอย่าง (Philips® HR 2021, China)
14. เครื่องพ่นยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Shimadzu® UV-1601, JAPAN)
16. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) (Sartorius Professional Meter® PP-50, Taiwan)
17. เวอร์เนียร์ (Digital verneer caliper, Mitutoyo®, JAPAN)
18. เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer®3100, JAPAN)
19. เครื่องหมุนเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (KUBOTA®, JAPAN)
20. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
21. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert®, Germany)
22. เตาย่อยตัวอย่าง (MS Scientific Instrument®, Thailand)
23. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert®, Germany)

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

พืชทดลอง คือ ส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง อายุ 4 ปี ตัดแต่งทรงพุ่มแบบเปิดกลางพุ่ม วางแผนแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) มีทั้งหมด 7 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นน้ำประปา (Control)
กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารน้ำตาลทางด่วน (วานากา®) ความเข้มข้น 225 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารน้ำตาลทางด่วน (วานากา®) ความเข้มข้น 450 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 พ่นน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ความเข้มข้น 225 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 5 พ่นน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) ความเข้มข้น 450 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 6 พ่นน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 225 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 7 พ่นน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 450 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเตรียมต้น

2.1 การเลือกต้น ทำการทดลองที่แปลงส้มสวนสันทราย อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้ต้นส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง อายุ 4 ปี ตัดแต่งทรงพุ่มแบบเปิดกลางพุ่ม (ภาพ 8) จำนวน 28 ต้น

2.2 การบำรุงต้น ใส่ปุ๋ยคอก 10 กิโลกรัมต่อต้น และปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 บำรุงต้น 200 กรัมต่อต้น หว่านรอบโคนต้น และให้น้ำโดยระบบมินิสปริงเกอร์ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง ครั้งละ 1-2 ชั่วโมง

ภาพ 7 ต้นส้ม อายุ 4 ปี ที่ใช้ในการทดลอง

3. การพ่นสารละลายน้ำตาลทางใบ

พ่นสารละลายตามกรรมวิธีต่าง ๆ ทุกสัปดาห์ จำนวน 6 ครั้ง หลังจากตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะติดผล

4. การเก็บตัวอย่าง (Sample collection)

สุ่มเก็บตัวอย่างก่อนจากการพ่นสารทุก 1 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างใบที่โตเต็มที่ล่าสุด (MRM) ล้างด้วยน้ำกลั่นและนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างใบมาบดให้ละเอียดเก็บรักษาไว้ที่โถดูดความชื้น (desicator) เพื่อรอการวิเคราะห์หาปริมาณ TNC น้ำตาลรีดิวส์ น้ำตาลซูโครส และธาตุอาหารในใบ โดยจะเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 หลังกรรมวิธี

5. การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่โครงสร้างจากใบ (Total nonstructural carbohydrate; TNC)

5.1 การเตรียมสาร reagent

1. Nelson’s reagent A

เตรียมสารละลาย Anhydrous sodium carbonate จำนวน 25 กรัม Sodium potassium tartrate จำนวน 25 กรัม Sodium bicarbonate จำนวน 20 กรัม และ Anhydrous sodium sulfate จำนวน 200 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็นเป็น 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Nelson’s reagent B

เตรียมสารละลาย Copper sulfate จำนวน 15 กรัม ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมกรด Sulfuric เข้มข้น จำนวน 2 หยด คนให้เกลือ Sopper sulfate ละลายจนหมด

3. Nelson’s alkaline copper reagent

นำ Nelson’s reagent A จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมกับ Nelson’s reagent B จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ผสมเขย่าให้เข้ากัน การใช้ Nelson’s alkaline copper reagent แต่ละครั้งควรเตรียมใหม่

4. Arsenomolybdic acid reagents

4.1 ละลาย Ammonium molybdate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24} . 4H_2O$] จำนวน 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรด sulfuric เข้มข้น จำนวน 21 มิลลิลิตร

4.2 ละลาย Disodium hydrogen arsenate [$Na_2HAsO_4 . 7H_2O$] จำนวน 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

4.3 นำสารละลายข้อ 4.2 ผสมลงไปในสารละลายในข้อ 4.1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาใช้สารละลายที่ได้ต้องเป็นสีเหลืองเท่านั้น

5.2 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ไม่อยู่ในรูปโครงสร้าง

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย D-glucose เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบขนาด 10 มิลลิลิตร รวม 10 หลอด เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175, 0.2, 0.225 และ0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ใช้สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ใส่หลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร เติม Nelson’s alkaline copper reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยนำไปวางในน้ำเย็น แล้วเติมสารละลาย Arsenomolybdic acid reagents 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) จากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ glucose (แกน X) กับค่า absorbance (แกน Y)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิธีการสกัด

การสกัด TNC จากตัวอย่างพืช จะใช้สารละลายกรดเจือจาง (0.2 N H_2SO_4) ตามวิธีการของ Smith *et al.* (1964) ดัดแปลงโดย สุจริต (2531) โดยชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งสนิทและบดละเอียดแล้ว 0.10 กรัม เติม 0.2 N H_2SO_4 40 มิลลิลิตร ปิดปากภาชนะด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ แล้วอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน hot air oven หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ปรับค่า pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH 0.1 และ 2 N กับ H_2SO_4 0.5 และ 5% แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตรเพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณ TNC ในตัวอย่าง

นำสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่าง ในข้อ 3 ใส่ในหลอดทดสอบ 1 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานนำค่า absorbance (A) ที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำไว้แล้วคำนวณเป็นปริมาณมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ D-glucose ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

5. วิธีการคำนวณ

$$TNC = \frac{\text{(mg) glucose equivalent x 50}}{\text{Wt. of sample x vol. make}}$$

6. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ ซูโครส และแป้งในใบ

6.1 วิธีการเตรียมสารเคมี

1. Anthrone reagent

ละลาย Anthrone (97 %) 0.2 กรัม ในสารละลาย H_2SO_4 100 มิลลิลิตร (เติมH_2SO_4 500 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 30-40 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราวจนได้สารละลายใส (การเตรียมสารต้องเตรียมใช้ภายใน 12 ชั่วโมง)

2. PAHBAH (p-Hydroxybenzoic hydrazide)

2.1 ละลาย p-Hydroxybenzoic hydrazide 0.5 กรัม ในสารละลาย alkaline 100 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียม alkaline ทำโดยนำ Tri-sodiumcitrate hydrate 14.7 กรัม ผสมกับ $CaCl_2$ 1.47 กรัม ใน Volume ขนาดเล็กก่อน จากนั้นเติม NaOH 20 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

3. Invertase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ละลาย Invertase 12.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

4. α - amylase

ละลาย α - amylase 12.5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

6.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. Glucose

ละลาย Glucose 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. Sucrose

ละลาย Sucrose 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. Starch

ละลาย Starch 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6.3 วิธีการสกัดตัวอย่างพืช

การสกัดตัวอย่างพืช ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้ง 300 มิลลิกรัมใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ 1 ชั่วโมง และเขย่าเป็นครั้งคราว หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวียงที่ความเร็วรอบ 3,600 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกใช้ส่วน Supernatant ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลซูโครส ส่วนที่เป็นเศษชิ้นส่วน (pellet) ที่ถูกแยกออกมาจาก Supernatant ใช้วิเคราะห์หาปริมาณแป้ง

6.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

ดูดสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกตวงขนาด 150 x 25 มิลลิเมตร หลังจากนั้น เติมน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติมสารละลาย PAHBAH (p-hydroxybenzoic hydrazide) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลังจากนั้นต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เท่ากัน แล้วนำไปวัดค่าวัดความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวส์ โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

6.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครส

ดูดสารละลายมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกตวง ขนาด 150 x 25 มิลลิเมตร หลังจากนั้น เติม Invertase 0.4 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติมสารละลาย PAHBAH (p-hydroxybenzoic hydrazide) 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลังจากนั้นต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลอดเขย่าให้เท่ากัน แล้วนำไปวัดค่าวัดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

6.6 การวิเคราะห์หาปริมาณแป้ง

เทส่วน Supernatant ที่เหลือจากการวิเคราะห์ น้ำตาลรีดิวส์ และน้ำตาลซูโครสออกให้หมดแล้วนำเศษชิ้นส่วน (pellet) ที่เหลือจากการสกัดละลายในน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรต้ม 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (20 องศาเซลเซียส) แล้วเติม Acetate buffer 0.5 มิลลิลิตร และ α- amylase 0.3 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาต้มในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นโดยนำไปแช่ในน้ำ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นเทส่วน supernatant ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ดูดสารมา 1 มิลลิลิตรใส่ในกระบอกตวงแก้วที่บรรจุด้วย Antrone 5 มิลลิลิตร ที่วางไว้ในแข็ง omogenized สารละลายโดยจะต้องแช่น้ำแข็งด้วย แล้วนำไปต้ม 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที วัดความเข้มข้นของแป้งโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

7. ปริมาณธาตุอาหารในใบ

7.1 การเตรียมสารย่อยตัวอย่าง

1. ชั่ง Selenium 3.5 กรัมละลายใน H_2SO_4 1 ลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตั้งบน Hot plate อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (จนสารละลายใส) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็นเก็บไว้ในขวดสีชา

2. ชั่ง salicylic 7.2 กรัม ละลายในสารข้อ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนสารละลายให้เข้ากัน

7.2 การย่อยตัวอย่างพืช

ชั่งตัวอย่างพืช 0.500 กรัม ใส่หลอดแก้วย่อยตัวอย่าง และเติมสารละลายสำหรับย่อยตัวอย่าง จำนวน 7 มิลลิลิตร เขย่าให้ตัวอย่างใบ จากนั้นนำไปใส่ในหลุมเตาย่อยตัวอย่าง แล้วปรับอุณหภูมิเริ่มต้นเป็น 100 °C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาหลอดออกมาตั้งไว้ให้เย็นภายนอกเตาย่อย แล้วจึงเติม Hydrogen peroxide 30% ครั้งละ 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง รอให้การทำปฏิกิริยาของ Hydrogen peroxide 30% ลดลง (ประมาณ 10 วินาที) ก่อนที่จะเติมครั้งต่อไป จากนั้นจึงนำหลอดแก้วกลับไปไว้ในหลุมเตาย่อยตัวอย่าง แล้วจึงปรับอุณหภูมิตาม ตาราง 1 จนกระทั่งการย่อยเสร็จสมบูรณ์จะได้สารละลายใส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 การปรับอุณหภูมิเตาย่อยตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนรวม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม

อุณหภูมิ (°C)	**ระยะเวลา**
170	2 ชั่วโมง
220	1 ชั่วโมง
270	1 ชั่วโมง
320	1 ชั่วโมง
370	1 ชั่วโมงหรือเมื่อเปลี่ยนเป็นสารละลายใส

ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วจึงปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 แล้วเก็บไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป (ควรเก็บสารละลายตัวอย่างในตู้เย็นถ้าหากยังไม่วิเคราะห์ทันที)

7.3 การวิเคราะห์ไนโตรเจนรวมพืชด้วยวิธีการพัฒนาสี

- ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 5.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้สารละลายผสมกัน
- เติมสารละลาย Sodium salicylate และ Sodium - nitroprusside จำนวน 4.0 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้สารละลายผสมกัน
- เติมสารละลาย Sodium hypochlorite 2.0 มิลลิลิตร เขย่าผสมสารละลายให้เข้ากัน
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45-60 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 650 นาโนเมตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไนโตรเจนมาตรฐาน (ภาพ 24) ซึ่งใช้สูตรคำนวณดังนี้คือ

$$N = (a-b) \times \frac{v}{w}$$

a = ความเข้มข้นของไนโตรเจนในตัวอย่าง (mg/ l)

b = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (blank) ที่ไม่มีไนโตรเจน (mg/ l)

v = ปริมาตรทั้งหมดของตัวอย่าง (ml)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 12.3 (0.1 M Na_2HPO_4.5% Na-K tartrate, 5.4% NaOH)

ละลาย Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4. $7H_2O$) จำนวน 26.8 กรัมในน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Sodium potassium tartrate (Na-K tatrate) จำนวน 50 กรัม และเติม Sodium hydroxide จำนวน 54.0 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารละลายซาลิไซเลทและโซเดียมไนโตรปรัสไซด์

ละลาย Sodium salicylate จำนวน 150 กรัม และ Sodium nitroprusside จำนวน 0.3 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (เก็บไว้ในขวดสีชาและในตู้เย็น)

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรด์

ผสมสารละลาย Sodium hypochlorite 5.25 % จำนวน 6.0 กรัม กับน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกวัน)

7.4 วิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสในพืชด้วยวิธีการพัฒนาสี

สารเคมี

1. Mixed reagent

1.1 ละลาย Ammonium vanadate 1.25 กรัม ในน้ำอุ่น 200 มิลลิลิตร เติม HNO_3 ลงไป 158.42 มิลลิลิตร

1.2 ละลาย Ammonium molybdate tetrahydrate 25 กรัม ในน้ำอุ่น 300 มิลลิลิตร

1.3 ผสมสารละลาย 1.1 และ 1.2 เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส ความเข้มข้น 100 ppm

ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate จำนวน 0.4390 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร เติม HNO_3 ที่เข้มข้นลงไป 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการ

ใช้ Volumetric pipette ดูดสารละลายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างพืชจำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม mixed reagent 5 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร แล้วเขย่าทิ้งไว้ 20 นาที ทำการวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดโดยเครื่องวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงคลื่น 470 นาโนเมตร

การเตรียม Standard curve

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 ppm โดยดูดสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 ppm มาจำนวน 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม mixed reagent 5 มิลลิลิตรใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ทำการวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดโดยเครื่องวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงคลื่น 470 nm โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$P = (a-b) \times \frac{v}{w}$$

a = ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในตัวอย่าง (mg/ l)

b = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (blank) ที่ไม่มีฟอสฟอรัส (mg/ l)

v = ปริมาตรทั้งหมดของตัวอย่าง (ml)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

7.5 การวิเคราะห์ธาตุโพแทสเซียม

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอพชัน (AAS) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย โพแทสเซียม มาตรฐาน (ภาพ 26) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้คือ

$$K = (a-b) \times \frac{v}{w}$$

a = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในตัวอย่าง (mg/ l)

b = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (blank) ที่ไม่มีโพแทสเซียม (mg/ l)

v = ปริมาตรทั้งหมดของตัวอย่าง (ml)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7.6 การวิเคราะห์ธาตุแคลเซียม

ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมกับใส่ 5% Lanthanum chloride solution ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอพชัน (AAS) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแคลเซียมมาตรฐาน (ภาพ27) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้คือ

$$Ca = (a-b) \times \frac{v}{w}$$

a = ความเข้มข้นของแคลเซียมในตัวอย่าง (mg/ l)

b = ความเข้มข้นของตัวอย่าง (blank) ที่ไม่มีแคลเซียม (mg/ l)

v = ปริมาตรทั้งหมดของตัวอย่าง (ml)

w = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

วิธีการเตรียม 5% Lanthanum chloride solution

1. ชั่ง Lanthanum oxide (La_2O_3) 58.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไฮโดรคลอลิค 36 % (HCl) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

7.7 การวิเคราะห์ธาตุโบรอน

สารเคมี

1. สารละลาย Azomethine H สารละลาย Azomethine H 0.9 กรัม และ ascorbic acid 2.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (เก็บในมืดและอุณหภูมิต่ำ มีอายุอย่างน้อย 1 สัปดาห์)

2. สารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer – masking solution)

ละลาย ammonium acetate 300 กรัม, potassium acetate 30 กรัม, nitrilotriacetic acid 12 กรัม, sodium salt EDTA 30 กรัม, แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หลังจากปรับปริมาตรแล้วให้เติม acetic acid 150 มิลลิลิตร

3. สารละลายมาตรฐานโบรอน 100 ppm

ละลาย Boric acid 0.5716 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สารละลายมาตรฐานโบรอนสำหรับทำ Calibration curve (Working standard)

เตรียมสารละลายมาตรฐานบอริก ความเข้มข้น 10 ppm โดยดูดสารละลายมาตรฐานโบรอน 100 ppm จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เตรียมสารละลายมาตรฐานบอริก ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 ppm โดยดูดสารละลายมาตรฐานโบรอน ความเข้มข้น 10 ppm จำนวน 0.5, 1, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำยาสกัด

วิธีการสกัดโบรอนในพืช

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม
2. เติม CaO_2 100 มิลลิกรัม
3. ตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส จนเป็นสีดำ
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เผา 500 องศาเซลเซียส 90 นาที
5. ทิ้งไว้ให้เย็น
6. เติม H_2SO_4 0.5 M (25 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
7. ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
8. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ในขวดพลาสติก
9. ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอน (Azomethine H method)

วิธีการ

1. ดูดสารละลายที่สกัดได้ 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด

2. หลอดที่ 1 เติมสารละลาย azomethine-H จำนวน 0.75 มิลลิลิตรและเติมสารละลายบัฟเฟอร์จำนวน 0.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

3. สำหรับหลอดที่ 2 เป็น blank ของหลอดที่ 1 ดำเนินการเหมือนหลอดที่ 1 แต่ใช้น้ำกลั่นแทน azomethine-H

4. การเตรียม Standard curve ดูดสารละลายมาตรฐานโบรอน จาก Working standard แต่ละความเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแล้วดำเนินการเช่นเดียวกับ ข้อ 2.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การเก็บข้อมูลทางกายภาพ

8.1 วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ โดยใช้เครื่อง chlorophyll meter รุ่น SPAD-502 ยี่ห้อ Minolta ก่อนการพ่นสารทุกสัปดาห์ สุ่มใบที่โตเต็มที่ล่าสุด (most recent mature leaves, MRM) จำนวน 4 ใบต่อต้น โดยวัด 3 ตำแหน่งของใบ คือ ส่วนโคน ส่วนกลาง และส่วนปลายใบ

8.2 วัดเปอร์เซ็นต์การออกดอกและติดผล ทำการวัดเปอร์เซ็นต์การออกดอกหลังจากดอกส้มเข้าสู่ระยะดอกบาน โดยทำตารางขนาด 1 x1 เมตร นับยอดทั้งหมดและยอดที่ออกดอกมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การออกดอก เปอร์เซ็นต์การติดผลนับจำนวนดอกแต่ละยอดในระยะดอกบาน และเมื่อเข้าสู่ระยะติดผลนับจำนวนผลที่ติดแล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การติดผล

9. ระยะเวลาในการทำการทดลอง

มกราคม – ธันวาคม 2552

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved