บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1.การเตรียมวัสดุและอุปกรณ์การทดลอง

3.1.1 วัสดุพันธุ์พืช

คัดเลือกต้นกล้าซิมบิเดียมซูปเปอร์ฟรีค อายุ 6 เดือน มีขนาดความสูงต้นเฉลี่ย 11 เซนติเมตร ดังภาพที่ 2

ภาพที่ 2 ต้นกล้าซิมบิเดียมซูปเปอร์ฟรีคก่อนทำการทดลอง

3.1.2 วัสดุปลูก

เปลือกสน

3.1.3 วัสดุสารเคมี

1) ปุ๋ยละลายช้า (ออสโมโค้ท) สูตร 14-14-14

2) ปุ๋ยทางใบ (ปุ๋ยเกร็ด) สูตร 20-20-20

3.1.3.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมสารละลายธาตุอาหาร ดังนี้

ธาตุอาหารหลัก ได้แก่

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)

แคลเซียมไนเตรท [$(CaNO_3)_2 .4H_2O$]

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl_2)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.2H_2O$)

ธาตุอาหารรอง ได้แก่

บอริคแอซิค (H_3BO_3)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)

แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$)

เหล็กคีเลต (FeEDTA)

3.1.3.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน ได้แก่

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

โซเดียมคีเลต (EDTA.2Na)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

เอทธานอล (C_2H_5OH)

เมธิลเรด (methyl red)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

กรดเบนโซอิค (benzoic acid)

โซเดียมไนโตรพลัสไซด์ ($Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$)

ฟีนอล ($C_6H_6O_6$)

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

ไตรโซเดียมฟอสเฟต (Na_3PO_4)

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

3.1.3.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

สเทนัสคลอไรด์ ($SnCl_2$)

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.1.3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โพแทสเซียม ได้แก่

กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$)

กรดไนตริก (HNO_3)

กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

3.1.3.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง

กรดเปอร์คลอริค ($HClO_4$)

กรดไนตริก (HNO_3)

กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

แลนทานัมออกไซด์ (LaO_2)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

สารละลายมาตรฐานของเหล็ก

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)

3.1.4 อุปกรณ์

3.1.4.1 กระถางขนาด 4 นิ้ว

3.1.4.2 เครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้า (EC meter)

3.1.4.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.1.4.4 เครื่องวัดอุณหภูมิแบบกระเปาะเปียกและแห้ง

3.1.4.5 มีดและกรรไกร

3.1.4.6 ไม้บรรทัด

3.1.4.7 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์

3.1.4.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4.9 Atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น 3100

3.1.4.10 เครื่องวัดพื้นที่ใบของบริษัท LI-COR รุ่น LI-3100

3.1.4.11 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.4.12 เครื่องบดตัวอย่างพืช

3.1.4.13 ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่างพืช

3.1.4.14 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี

3.1.4.15 ถุงกระดาษสีน้ำตาลอบตัวอย่างพืช

3.1.4.16 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB-4

3.1.4.17 ขวดพลาสติก ขนาด 60 มิลลิลิตร

3.1.4.18 ถังพลาสติก ขนาด 50 ลิตร

3.1.4.19 ตู้อบตัวอย่างพืช

3.1.4.20 เครื่องแก้ว

3.1.4.21 หลอดทดลอง

3.1.4.22 บีกเกอร์

3.1.4.23 กระบอกตวง

3.1.4.24 กรวยกรอง

3.1.4.25 ขวดปรับปริมาตร

3.1.4.26 ปิเปตแก้ว

3.1.4.27 ไมโครปิเปต

3.1.4.28 หลอดหยดสาร

3.1.4.29 แท่งแก้วคนสาร

3.1.4.30 ช้อนตักสาร

3.1.4.31 ขวดสีชาบรรจุสาร

3.1.4.32 บัวรดน้ำ

3.1.4.33 ขันตักน้ำมีด้ามจับ

3.1.5 โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ

3.1.5.1 โปรแกรม SPSS (การทดลองที่ 1)

3.1.5.2 โปรแกรม SXW (การทดลองที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของสูตรปุ๋ยและอัตราการให้ปุ๋ยต่อการเติบโต

คัดเลือกกล้วยไม้ซิมบิเดียมซูปเปอร์ฟรีค อายุ 6 เดือน มีขนาดความสูงต้นเฉลี่ย 11 เซนติเมตร ปลูกในกระถางขนาด 4 นิ้ว โดยใช้เปลือกสนเป็นวัสดุปลูก โดยทั้งสองการทดลองปลูกในโรงเรือนที่ป้องกันน้ำฝนได้ วางแผนการทดลองแบบ Factorials in CRD จำนวน (5x3)+1 (ตารางที่ 2) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น มีจำนวน 2 ปัจจัย ปัจจัยแรกคือ สูตรปุ๋ย 5 สูตรซึ่งประกอบด้วยธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม แตกต่างกันคือ

1) 200: 100: 200 มิลกรัมต่อลิตร (สูตร 501)

2) 100: 100: 100 มิลกรัมต่อลิตร (สูตร 502)

3) 200: 150: 200 มิลกรัมต่อลิตร (สูตร 503)

4) 100: 150: 200 มิลกรัมต่อลิตร (สูตร 504)

5) ปุ๋ยละลายช้า 14-14-14 อัตรา 15 กรัมต่อต้น ทุก 3 เดือน รวมกับปุ๋ยเกร็ดสูตร 20-20-20 อัตรา 5 กรัมต่อลิตร (F5) เป็นปุ๋ยสูตรของเกษตรกร

ปัจจัยที่สองคือ อัตราในการให้สารละลาย 3 ระยะคือ 1) ให้สารละลายวันเว้นวัน 2) ให้สารละลาย 3 วันต่อครั้ง และ 3) 6 วันต่อครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือไม่ให้สารละลายธาตุอาหาร (รดน้ำอย่างเดียว)

ตารางที่ 2 แสดงกรรมวิธีการให้สารละลายร่วมกับอัตราการให้ปุ๋ย

กรรมวิธีที่	สิ่งทดลอง
กรรมวิธีที่ 1	สูตรปุ๋ย 501 ร่วมกับการให้สารละลาย วันเว้นวัน
กรรมวิธีที่ 2	สูตรปุ๋ย 501 ร่วมกับการให้สารละลาย 3 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 3	สูตรปุ๋ย 501 ร่วมกับการให้สารละลาย 6 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 4	สูตรปุ๋ย 502 ร่วมกับการให้สารละลาย วันเว้นวัน
กรรมวิธีที่ 5	สูตรปุ๋ย 502 ร่วมกับการให้สารละลาย 3 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 6	สูตรปุ๋ย 502 ร่วมกับการให้สารละลาย 6 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 7	สูตรปุ๋ย 503 ร่วมกับการให้สารละลาย วันเว้นวัน
กรรมวิธีที่ 8	สูตรปุ๋ย 503 ร่วมกับการให้สารละลาย 3 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 9	สูตรปุ๋ย 503 ร่วมกับการให้สารละลาย 6 วันต่อครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 10	สูตรปุ๋ย 504 ร่วมกับการให้สารละลาย วันเว้นวัน
กรรมวิธีที่ 11	สูตรปุ๋ย 504 ร่วมกับการให้สารละลาย 3 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 12	สูตรปุ๋ย 504 ร่วมกับการให้สารละลาย 6 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 13	วิธีของเกษตรกรร่วมกับปุ๋ยทางใบให้ วันเว้นวัน
กรรมวิธีที่ 14	วิธีของเกษตรกรร่วมกับปุ๋ยทางใบให้ 3 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 15	วิธีของเกษตรกรร่วมกับปุ๋ยทางใบให้ 6 วันต่อครั้ง
กรรมวิธีที่ 16	ชุดควบคุม (รดน้ำอย่างเดียว)

บันทึกการทดลอง

บันทึกการเติบโตทุก 1 เดือน ได้แก่

1) ความสูงของต้น วัดจากโคนต้นถึงปลายใบที่จุดสูงสุด เมื่อรวบใบขึ้น (เซนติเมตร)

2) ความสูงของทรงพุ่ม วัดจากโคนต้นถึงจุดสูงสุด ไม่รวบใบ (เซนติเมตร)

3) ความกว้างของทรงพุ่ม วัดส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่มจากปลายใบด้านหนึ่งถึงปลายใบอีกด้านหนึ่ง (เซนติเมตร)

4) ความยาวใบ วัดจากโคนใบถึงปลายใบ (เซนติเมตร)

5) ความกว้างใบ (เซนติเมตร)

6) จำนวนใบต่อต้น

7) จำนวนใบต่อกอ

8) จำนวนหน่อต่อต้น

9) บันทึกพื้นที่ใบ ความหนาใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

10) วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืชในต้น ได้แก่ ไนโตรเจนโดยวิธี Modified Kjeldahl method (Ohyama *et al*., 1991) วิเคราะห์ฟอสฟอรัส โดยวิธี Colorimetry (Ohyama *et al*., 1991) และ โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก สังกะสี และทองแดง โดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry (Mizukoshi *et al*., 1994)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 ผลของการขาดธาตุอาหารพืชต่อการเติบโต

คัดเลือกกล้วยไม้ซิมบิเดียมซูปเปอร์ฟรีค อายุ 6 เดือน มีขนาดความสูงต้นเฉลี่ย 11 เซนติเมตร ปลูกในกระถางขนาด 4 นิ้ว โดยใช้เปลือกสนเป็นวัสดุปลูก ให้สารละลายธาตุอาหารพืชตามกรรมวิธีต่างกัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ประกอบด้วย ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองครบถ้วน จำนวน 13 ธาตุ (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ขาดไนโตรเจน (-N)

กรรมวิธีที่ 3 ให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ขาดฟอสฟอรัส (-P)

กรรมวิธีที่ 4 ให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ขาดโพแทสเซียม (-K)

กรรมวิธีที่ 5 ให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ขาดแคลเซียม (-Ca)

กรรมวิธีที่ 6 ให้สารละลายธาตุอาหารพืชที่ขาดแมกนีเซียม (-Mg)

ให้พืชได้รับสารละลายธาตุอาหารทุก 3 วัน ต้นละ 100 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 10 เดือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 6 กรรมวิธีๆ ละ 15 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น

บันทึกการเติบโตทุก 1 เดือน ได้แก่

1) บันทึกการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2) บันทึกอาการผิดปกติเมื่อเกิดการขาดธาตุอาหาร

3.3 สถานที่ใช้ดำเนินการวิจัย

1) ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) กลุ่มกำแพงหิน ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่ อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่

3.4 ระยะเวลาดำเนินการ

ตั้งแต่เดือนกันยายน 2551-ธันวาคม 2552

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร

สุ่มเก็บตัวอย่างการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 โดยสุ่มพืชเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำตัวอย่างพืชที่สุ่มได้มาแยกส่วนเหนือดินและรากออกจากกัน ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง น้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นนำไปชั่งบันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลง จึงนำมาชั่งบันทึกน้ำหนัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แห้ง แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกก่อนนำไปชั่งเพื่อใช้ย่อยและวิเคราะห์ธาตุอาหารต่อไป

3.6. การย่อยตัวอย่างพืช

3.6.1. สำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (Ohyama *et al.*, 1986) ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม บันทึกน้ำหนักไว้ จากนั้นนำตัวอย่างที่ชั่งได้ใส่ลงในหลอดทดลองจากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดทดลองขึ้นมาพักทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำซ้ำเหมือนเดิมจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร แล้วจึงเทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 สำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และทองแดง ย่อยตัวอย่างพืชโดยวิธี HNO_3-$HClO_4$ wet digestion (Mizukoshi *et al.*, 1994) ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม บันทึกน้ำหนักไว้ จากนั้นนำตัวอย่างที่ชั่งได้ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$) 0.4 มิลลิลิตร และกรดไนตริก (HNO_3) 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกให้หมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้ง ระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจาง ($HCl:H_2O$ อัตราส่วน 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และทองแดงด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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

3.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจน (Indolphenol Method) (Ohyama *et al*., 1985; 1986)

1) เตรียมสารละลายเคมีที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด

A reagent ชั่งโซเดียมคีเลต (EDTA.2Na) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้ 10 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติมสารละลายเมธิลเรด (methylred) 20 มิลลิลิตร (เมธิลเรด 0.05 กรัม 60% เอทธานอล 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

B reagent ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 136.09 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งกรดเบนโซอิค (benzoic acid) 2.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องคน ปรับอุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส จนละลายหมดนำมารวมกันแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

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

D reagent ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 7.06 กรัม และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต ($Na_3PO_4.12H_2O$) 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (sodium hyperchlorite) 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2) เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N (ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร)

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานจากแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4) วิธีวิเคราะห์ ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้จากข้อ 3.5.1.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตรตามลำดับ แล้วนำมาไตรเตรท โดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้สีเปลี่ยน จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามกฎของ Beer's-Lambert's Law ของไนโตรเจนที่ทำไว้ จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (%) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(A \times B \times C)}{(DW \times 10000)}$$

A (ppm) = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (ppm)

B = อัตราส่วนการเจือจางตัวอย่างในปฏิกิริยา Indolphenol

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

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช

DW = น้ำหนักตัวอย่างอบแห้งที่ใช้สกัด (กรัม)

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) ตามกรรมวิธีของ Ohyama *et. al*. (1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟตและอนุมูลโมลิบเดต ดังนี้

1) เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสจำนวน 3 ชนิดดังนี้

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

B reagent เตรียมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 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 ค่อยๆ เท A reagent ทีละน้อย อย่างช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

2) เตรียมสารละลายสเทนัสคลอไรด์ ($SnCl_2.2H_2O$) โดยชั่งสเทนัสคลอไรด์ 0.25 กรัม เทลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควัน) เติมกรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใช้ได้ 3 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4) ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร และเติมสเทนัสคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (%) เช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นของไนโตรเจน

3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2) เจือจางสารละลายตัวอย่างจากการย่อยโดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร

3) นำสารละลายดังกล่าวไปวัดความเข้มข้นของโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โพแทสเซียม (%) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

3.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียม

1) เตรียม lantanum oxide โดยชั่ง lantanum oxide 2.01 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม HCl 37% 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียมจาก $CaCO_3$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลาย lanthanum ให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมจาก $MgCl_2$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลาย lanthanum ให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4) เจือจางสารละลายตัวอย่างจากการย่อยตัวอย่างพืช สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม แมกนีเซียมโดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย lanthanum oxide เป็น 25 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5) นำสารละลายดังกล่าวไปวัดความเข้มข้นของแคลเซียม และแมกนีเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 442.7 และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมตามลำดับ บันทึกผลและนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม (%) เช่นเดียวกับการหาปริมาณของไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

3.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณของเหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2) เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมงกานีส จาก $MnSO_4.4H_2O$ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4) เตรียมสารละลายมาตรฐานของทองแดงจาก $CuSO_4.5H_2O$ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

5) นำสารละลายตัวอย่างจากการย่อยตัวอย่างพืช ไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืน โดยอะตอมของเหล็ก แมงกานีส ทองแดงและสังกะสี ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 248.3, 279.5, 324.8 และ 213.9 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของเหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี ตามลำดับ บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และทองแดง (%) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved