บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1 วัสดุอุปกรณ์

1.1 วัสดุพันธุ์พืช

เมล็ดคะน้าพันธุ์คะน้ายอด จำนวน 450 เมล็ด

ภาพที่ 1 เมล็ดคะน้าพันธุ์คะน้ายอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และวัสดุปลูก

1.2 วัสดุปลูก ได้แก่ ทราย และถ่านแกลบ อัตราส่วน 1:1

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 รางปลูกระบบ Dynamic Roots Floating Technique (DRF)

1.3.2 ฟองน้ำสำหรับเพาะเมล็ด

1.3.3 ปั๊มดูดสารละลายธาตุอาหาร

1.3.4 ถังขนาด 10 ลิตร (เก็บสารละลายเข้มข้น)

1.3.5 ถังขนาด 50 ลิตร (รองรับสารละลาย)

1.3.6 ถังขนาด 100 ลิตร (ผสมสารละลายธาตุอาหาร)

1.3.7 สารละลายธาตุอาหารสูตร CMU#2

1.3.8 เครื่องวัดค่าความนำไฟฟ้า (EC meter)

1.3.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.3.10 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.3.11 ถุงกระดาษเก็บตัวอย่างพืช

1.3.12 ตู้อบ

1.3.13 เครื่องบดตัวอย่างพืชของบริษัท BECTHAI รุ่น MF-10

1.3.14 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB-4

1.3.15 เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองทางเคมี เช่น บีกเกอร์ หลอดทดลอง ปิเปต ขวดปรับปริมาตร แท่งแก้วคนสาร เป็นต้น

1.3.16 Atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น 3100

1.3.17 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 วัสดุเคมี

1.4.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหาร

1.4.1.1 แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_4$)

1.4.1.2 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

1.4.1.3 โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)

1.4.1.4 แคลเซียมไนเตรต ($CaNO_3$)

1.4.1.5 แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo7H_2O$)

1.4.1.6 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)

1.4.1.7 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)

1.4.1.8 แมงกานีสคลอไรด์ ($MnSO_4.4H_2O$)

1.4.1.9 กรดบอริค (H_3BO_3)

1.4.1.10 เหล็กคีเลต (FeEDTA)

1.4.1.11 แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)

1.4.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจน

1.4.2.1 เอทธานอล (C_2H_5OH)

1.4.2.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

1.4.2.3 โซเดียมคีเลต (EDTA.2Na)

1.4.2.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

1.4.2.5 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

1.4.2.6 ฟีนอล (phenol)

1.4.2.7 โซเดียมไนโตรพลัสไซด์ (sodium nitroprusside)

1.4.2.8 กรดเบนโซอิค (benzoic acid)

1.4.2.9 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.4.2.10 เมธิลเรด (methyl red)

1.4.2.11 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

1.4.2.12 โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ ($NaClO_2$)

1.4.2.13 ไตรโซเดียมฟอสเฟต ($NaPO_4$)

1.4.2.14 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2PO_4)

1.4.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส

1.4.3.1 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)

1.4.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

1.4.3.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.4.3.4 แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7$)

1.4.3.5 สเทนัสคลอไรด์ ($SnCl_2$)

1.4.3.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม ได้แก่

1.4.4.1 กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$)

1.4.4.2 กรดไนตริก (HNO_3)

1.4.4.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.4.4.4 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

1.4.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แคลเซียมและแมกนีเซียม ได้แก่

1.4.5.1 กรดเปอร์คลอริคเข้มข้น ($HClO_4$)

1.4.5.2 กรดไนตริก (HNO_3)

1.4.5.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.4.5.4 แลนทานัมออกไซด์(LaO_2)

1.4.5.5 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

1.4.5.6 แมกนีเซียมคลอไรท์ ($MgCl_2$)

1.4.6 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไนเตรท

1.4.6.1 เอทานอล

1.4.6.2 โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)

1.4.6.3 กรดซาลิไซลิค (HCO_6H_4COOH)

1.4.6.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาแบ่งเป็น 3 การทดลองนี้

การทดลองที่ 1 ผลของระดับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารและระยะเวลาในการดูแลต้นกล้าต่อการเจริญเติบโตของผักคะน้าจีน

การทดลองที่ 1.1 ผลของระดับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหาร ต่อการเจริญเติบโตในระยะต้นกล้าของคะน้าจีน

เพาะเมล็ดผักคะน้าจีน ในฟองน้ำและให้สารละลายธาตุอาหารสูตร CMU#2 โดยปรับความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารสูตรดังกล่าวซึ่งวัดโดยใช้ค่าความนำไฟฟ้า (Electrical conductivity (EC)) เป็น 3 ระดับ ร่วมกับกรรมวิธีควบคุมดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 0.00 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร (กรรมวิธีควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 0.50 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 3 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 1.00 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 1.50 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

โดยให้พืชได้รับแต่ละกรรมวิธีนาน 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายลงปลูกในระบบ Dynamic Root Floating (DRF) ซึ่งใช้สารละลายธาตุอาหารสูตร CMU#2 ให้มีค่า EC = 2.1 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร เหมือนกันทั้ง 4 กรรมวิธี ปลูกนาน 4 สัปดาห์โดยมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

การทดลองที่ 1.2 ผลของระดับความเข้มข้นของธาตุอาหารร่วมกับระยะเวลาการดูแลในระยะต้นกล้า

เพาะเมล็ดคะน้าจีนในฟองน้ำเมื่อต้นกล้างอก เริ่มให้สารละลายธาตุอาหารสูตร CMU#2 ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลาย 2 ระดับ คือ EC = 0.5 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (ผลที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1) และ EC = 0.2 มิลลิซีเมนต์ต่อเซนติเมตร (ปรับลดความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองที่ 1.1) ร่วมกับระยะเวลาการดูแลต้นกล้า 2 ช่วงเวลา คือ 2 และ 3 สัปดาห์ ตามกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 0.5 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ร่วมกับ ระยะเวลาการดูแลต้นกล้านาน 2 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 2 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 0.2 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ร่วมกับ ระยะเวลาการดูแลต้นกล้านาน 2 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 3 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 0.5 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ร่วมกับระยะเวลาการดูแลต้นกล้านาน 3 สัปดาห์

กรรมวิธีที่ 4 ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่ EC = 0.2 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ร่วมกับ ระยะเวลาการดูแลต้นกล้า 3 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบ Factorials in CRD จำนวน 2×2 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (ต้น)

การทดลองที่ 2 ผลของระดับไนโตรเจน ต่อการเจริญเติบโตและการสะสมของไนเตรทในคะน้าจีน

เพาะเมล็ดในฟองน้ำ ให้ต้นกล้าได้รับสารละลายธาตุอาหารที่ EC = 0.5 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร นาน 3 สัปดาห์แล้วนำมาย้ายปลูกลงในระบบ DRF เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์โดยให้พืชได้รับความเข้มข้นของไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ระดับ ดังกรรมวิธีต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ระดับไนโตรเจน 142 มิลลิกรัมต่อลิตร (สารละลายสูตร CMU#2) : กรรมวิธีควบคุม

กรรมวิธีที่ 2 ระดับไนโตรเจน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรรมวิธีที่ 3 ระดับไนโตรเจน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ระดับไนโตรเจน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

ให้พืชได้รับแต่ละกรรมวิธีนาน 4 สัปดาห์ ส่วนธาตุอาหารอื่นพืชได้รับในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ

การทดลองที่ 3 ผลของระดับแมกนีเซียมและแคลเซียมที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตของคะน้าจีน

เพาะเมล็ดในฟองน้ำที่มีสารละลายธาตุอาหารที่ EC = 0.5 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร นาน 3 สัปดาห์แล้วนำมาย้ายปลูกลงรางระบบ DRF มีการให้ปริมาณธาตุแมกนีเซียม 3 ระดับ คือ 63, 94.5 และ126 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับการให้ธาตุแคลเซียม 2 ระดับ คือ 85 และ 127 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ระดับแมกนีเซียม 63 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับแคลเซียม 85 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ระดับแมกนีเซียม 63 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับแคลเซียม 127 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ระดับแมกนีเซียม 94.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับแคลเซียม 85 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ระดับแมกนีเซียม 94.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับแคลเซียม 127 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ระดับแมกนีเซียม 126 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับแคลเซียม 85 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ระดับแมกนีเซียม 126 มิลลิกรัมต่อลิตร และระดับแคลเซียม 127 มิลลิกรัมต่อลิตร

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Factorials in CRD จำนวน 3×2 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

2.2 การบันทึกผลการทดลอง

2.2.1 บันทึกการเจริญเติบโต

2.2.1.1.บันทึกผลการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์ ได้แก่

2.2.1.1.1 ความสูงของลำต้นวัดจากโคนต้นถึงจุดสูงสุดเมื่อรวบใบขึ้น (เซนติเมตร)

2.2.1.1.2 จำนวนใบต่อต้น

2.2.1.2. ปริมาณผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยว

2.2.1.2.1 น้ำหนักสด (กรัม)

2.2.1.2.2 น้ำหนักแห้ง (กรัม)

2.2.1.3 วัดปริมาณคลอโรฟิลล์โดยเครื่อง SPAD-502 : MINOLTA Chlorophyll meter

2.2.1.4 วิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทเมื่อเก็บเกี่ยว โดยวิธี Calorimetric (การทดลองที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.1.5 วิเคราะห์หาปริมาณ N , P , K , Ca , Mg , Fe , Zn และ Cu ในใบเมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิต (การทดลองที่ 2 และ 3)

2.2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหาร

2.2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มต้นคะน้าในระยะเก็บเกี่ยวล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง ก่อนที่จะล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง จากนั้นซับให้แห้งด้วยกระดาษชำระ แล้วนำไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วัน จนน้ำหนักแห้งคงที่ แล้วจึงนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืชให้ละเอียด เก็บในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงอย่างสนิทเพื่อนำไปย่อยต่อไป

2.2.2.2 การย่อยตัวอย่างพืช (Wet Acid Digestion) ดัดแปลงโดย (Ohyama *et al.,* 1985 ; 1986)

ก. การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25×200 มิลลิเมตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดทดลองขึ้นมาพักทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยโดยปรับอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ทำซ้ำจนกระทั่งสารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

ข. การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และธาตุอาหารรอง

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งบดละเอียดหนักประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25×200 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 0.4 มิลลิลิตร และกรดไนตริกเข้มข้น 0.3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกให้หมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้ง ระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจาง ($HCl : H_2O$ อัตรา 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

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

2.2.2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนใช้วิธี 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 ใส่บิกเกอร์ 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งเหล็กคน ปรับอุณหภูมิเป็น 30-40 องศาเซลเซียส จนละลายหมด นำมารวมกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

C reagent : ชั่งโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ 0.1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 (นำฟีนอลไปอุ่นที่ 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 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 แล้วนำมาไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N ลงไปเขย่าเล็กน้อยให้เปลี่ยนสี 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 Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (mg/gDW)} = \frac{\text{สาร A} \times B \times C}{1000 \times DW}$$

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

2.2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส

โดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (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 ผสมน้ำกลั่น 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 เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งทิ้งไว้ในที่มืด

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 จนครบปริมาตรจะได้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

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

2.2.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมปรับให้มีความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม 1000 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 กรดไฮโดรคลอริก 37% 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียมจากแคลเซียมคาร์บอเนตจากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียม จากแมกนีเซียมคลอไรด์จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (ข) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมโดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยสารละลายในข้อ 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) โดยใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.3.5 วิเคราะห์ปริมาณธาตุสังกะสี เหล็ก และทองแดง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของสังกะสี จาก $ZnSO_4.7H_2O$ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.05 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.05 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของทองแดง จาก $CuSO_4.5H_2O$ จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.05 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (ข) ไปวัดปริมาณพลังงานแสงที่ถูกดูดกลืนโดยอะตอมของ สังกะสี เหล็ก และทองแดง ที่ความยาวคลื่น 213.9, 248.3 และ 324.8 นาโนเมตร ตามลำดับ และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาความเข้มข้น โดยใช้สูตรคำนวณ เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

2.2.3 การวิเคราะห์ไนเตรท

การสกัดตัวอย่างพืชโดย

1. ชั่งตัวอย่างพืช 4 กรัม บดในโกร่งบด เติมเอทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ลงไปเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ให้ครบ 14.4 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายที่ได้ใส่หลอดทดลอง ปิดปากหลอดทดลองนำไปต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. นำไปตกตะกอนที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

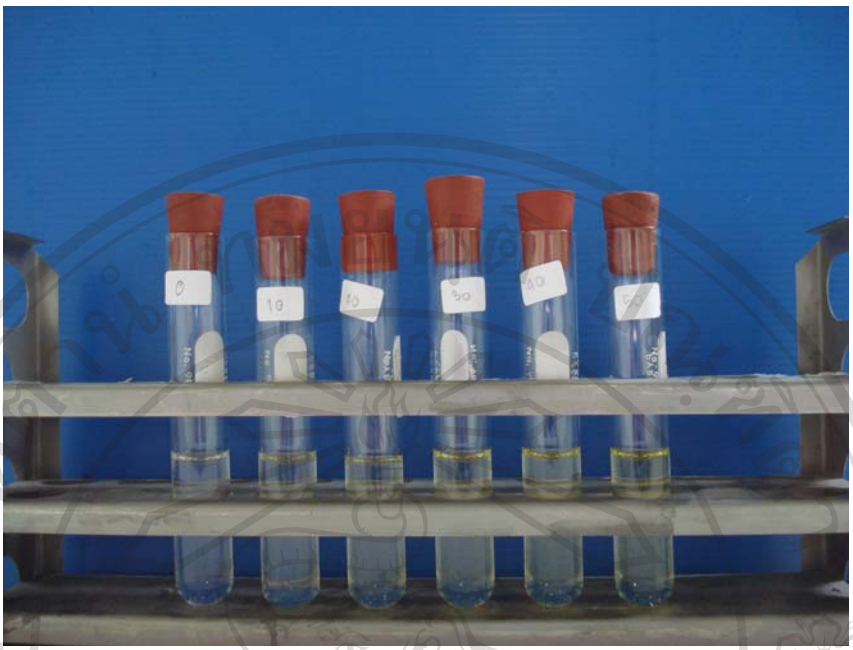
4. นำสารละลายส่วนนใสมาปรับปริมาตรด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ให้ครบ 25 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณไนเตรทโดยวิธี Calorimetric (Nishiwaki *et al*., 1994)

1. นำสารละลายมาตรฐานของไนเตรท (โซเดียมไนเตรท) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ใส่ลงในหลอดทดลอง จำนวน 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองจำนวน 50, 40, 30, 20, 10 และ 0 ไมโครลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานในการวิเคราะห์ไนเตรทหลังปรับปริมาตร

3. นำสารสกัดตัวอย่างส่วนที่ใสมาจำนวน 40 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร (ตัวเปรียบเทียบ นำเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 40 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร)

4. เติมกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด standard และ sample ส่วนหลอด blank เติมกรดซัลฟิวลิก 200 ไมโครลิตร

5. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

6. ตั้งไว้นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

7. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มัล 5 มิลลิลิตร ทุกหลอด

8. เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

9. รอประมาณ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

10. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved