บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุพันธุ์พืช

ต้นกล้าแวนดาสันทรายบลู อายุ 1 ปี ย้ายปลูกในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 4 นิ้ว ที่ไม่มีวัสดุปลูก จำนวน 315 ต้น

ภาพที่ 1 ต้นกล้าแวนดาสันทรายบลู

1.2 วัสดุสารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายธาตุอาหาร ได้แก่

1.2.1.1 แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3)

1.2.1.2 โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)

1.2.1.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

1.2.1.4 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

1.2.1.5 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

1.2.1.6 บอริคแอซิด (H_3BO_3)

1.2.1.7 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)

1.2.1.8 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.9 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)

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

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

1.2.2.10 ฟีนอล ($C_6H_6O_6$)

1.2.2.11 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)

1.2.2.12 ไตรโซเดียมฟอสเฟต (Na_3PO_4)

1.2.2.13 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaClO)

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)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.4.3 กรดไฮโดรคลอริค (HCl)

1.2.4.4 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

1.2.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง

1.2.5.1 กรดเปอร์คลอริค ($HClO_4$)

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 ($MgCl_2$)

1.2.5.7 สารละลายมาตรฐานของเหล็ก

1.2.5.8 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$)

1.2.5.9 ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4$)

1.2.5.10 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)

1.2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

1.2.6.1. อะซีโตน (Acetone)

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 ไม้บรรทัด

1.3.2 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์

1.3.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของบริษัท HITACHI รุ่น U-2001

1.3.4 Atomic absorption spectrophotometer ของบริษัท PERKIN ELMER รุ่น 3100

1.3.5 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.3.6 เครื่องบดตัวอย่างพืช

1.3.7 ถุงพลาสติกเก็บตัวอย่างพืช

1.3.8 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี

1.3.9 ตู้อบตัวอย่างพืช

1.3.10 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB – 4

1.3.11 ขวดพลาสติก ขนาด 60 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.12 ขวดพลาสติก ขนาด 120 มิลลิลิตร

1.3.13 เครื่องแก้ว

1.3.13.1 หลอดทดลอง ขนาด 25 x 200 มิลลิลิตร

1.3.13.2 บีกเกอร์

1.3.13.3 กระบอกตวง

1.3.13.4 กรวยกรอง

1.3.13.5 ขวดปรับปริมาตร

1.3.13.6 ปิเปตแก้ว

1.3.13.7 ไมโครปิเปต

1.3.13.8 หลอดหยดสาร

1.3.13.9 แท่งแก้วคนสาร

1.3.13.10 ช้อนตักสาร

2. วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของแคลเซียมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้แวนดาสันทรายบลู

ปลูกแวนดาสันทรายบลู อายุประมาณ 1 ปี ลงในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 4 นิ้ว โดยไม่มีวัสดุปลูก นำมาวางเรียงในชั้นวางปลูก เพื่อให้พืชมีการพักฟื้นประมาณ 3 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ให้สารละลายธาตุอาหารที่มีแคลเซียมความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แคลเซียมความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 แคลเซียมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 แคลเซียมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 แคลเซียมความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 แคลเซียมความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 แคลเซียมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนธาตุอื่นพืชได้รับเท่ากันในทุกกรรมวิธี คือ ไนโตรเจน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 200 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม 100 มิลลิกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิตร กำมะถัน 13.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ทองแดง 0.025 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 0.549 มิลลิกรัมต่อลิตร เหล็ก 0.447 มิลลิกรัมต่อลิตร โมลิบดีนัม 0.038 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 0.261 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพ่นสารละลายธาตุอาหารทางใบ 20 มิลลิลิตรต่อต้นให้กับกล้วยไม้ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ สลับกับการให้น้ำ

การทดลองที่ 2 ผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้แวนดาสันทรายบลู

เตรียมพืชทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ให้สารละลายธาตุอาหารที่มีแมกนีเซียมความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แมกนีเซียมความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 2 แมกนีเซียมความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 แมกนีเซียมความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 แมกนีเซียมความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 5 แมกนีเซียมความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 6 แมกนีเซียมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนธาตุอื่นพืชได้รับเท่ากันในทุกกรรมวิธีเหมือนการทดลองที่ 1 ยกเว้นแมกนีเซียมและมีแคลเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพ่นสารละลายธาตุอาหารทางใบ 20 มิลลิลิตรต่อต้นให้กับกล้วยไม้ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ สลับกับการให้น้ำ

การทดลองที่ 3 ผลของระดับแคลเซียมและแมกนีเซียมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้แวนดาสันทรายบลู

เตรียมพืชทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน (3 x 3) + 1 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ (1 ต้นต่อซ้ำ) ให้สารละลายธาตุอาหารที่มีแคลเซียมความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแมกนีเซียม 3 ระดับ คือ 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ส่วนธาตุอื่นพืชได้รับเท่ากันในทุกกรรมวิธีเหมือนการทดลองที่ 1 ยกเว้นแมกนีเซียมและแคลเซียม โดยพ่นสารละลายธาตุอาหารทางใบ 20 มิลลิลิตรต่อต้นให้กับกล้วยไม้ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ สลับกับการให้น้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การบันทึกผลการทดลอง

2.2.1. การบันทึกการเจริญเติบโต ดังนี้

2.2.1.1 ความสูงของต้น วัดจากโคนต้นจนถึงโคนใบที่สาม นับจากใบที่อยู่ตรงปลายยอดลงมา (เซนติเมตร)

2.2.1.2 จำนวนใบต่อต้น (ใบ)

2.2.1.3 ความยาวใบ วัดจากโคนใบจนถึงปลายใบ โดยเลือกวัดใบที่ยาวที่สุดในต้น (เซนติเมตร)

2.2.1.4 ความกว้างใบ วัดจากขอบใบด้านหนึ่งจนถึงขอบใบอีกด้านหนึ่ง โดยวัดตรงกลางของใบที่ยาวที่สุดในต้น (เซนติเมตร)

2.2.1.5 ความหนาใบ วัดความหนาของใบที่ยาวที่สุด โดยวัดบริเวณกึ่งกลางใบ (เซนติเมตร)

2.2.2. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหารส่วนรากและส่วนใบ

2.2.2.1. การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มพืชระยะพ่นสารละลาย 120 วันหลังปลูก จำนวน 5 ซ้ำต่อกรรมวิธี (2 ต้นต่อซ้ำ) นำตัวอย่างที่สุ่มได้มาแยกส่วนต่าง ๆ ออกจากกัน ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง น้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นนำไปชั่ง บันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลง จึงนำมาชั่ง บันทึกน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกก่อนนำไปชั่งเพื่อใช้ย่อยและวิเคราะห์ธาตุอาหารต่อไป

2.2.2.2. การย่อยตัวอย่างพืชด้วยกรด (Wet Acid Digestion)

1. การย่อยตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ดัดแปลงโดย (Ohyama *et al*., 1985; 1986)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (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 หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2. การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และทองแดง (Mizukoshi *et al.,* 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง 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 สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2.2.2.3. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวม (Indolphenol Method)

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

1. เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่งโซเดียมดีเลต (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) คนให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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 ($(NH_4)_2SO_4$) ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานไนโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกรดซัลฟูริก 0.5 N เตรียมจากกรดซัลฟูริก 13.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. ดูดตัวอย่างที่ย่อยได้จากข้อ 2.2.2.2 (1) ปริมาตร 0.3 - 0.5 มิลลิลิตร (ขึ้นกับส่วนของพืช) เติม A reagent 0.5 มิลลิลิตร และเติม B reagent 0.5 มิลลิลิตรตามลำดับ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู แล้วนำมาไตรเตรทโดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N ลงไปเขย่าเล็กน้อยให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม C reagent 2.5 มิลลิลิตร และ D reagent 2.5 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช)} = \frac{(A \times B \times C)}{(D \times E \times 10000)} \times 10 \times \text{น้ำหนักแห้งในส่วนของพืชนั้น}$$

สาร A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

B = ปริมาตรสุดท้ายในปฏิกิริยา Indolphenol (25 มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรสุดท้ายของการย่อยตัวอย่างพืช (50 มิลลิลิตร)

D = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้ย่อย (กรัม)

E = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.4. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et. al*., 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดต 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 ลงในบีกเกอร์ ขนาด 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

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.716 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 4 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร ได้สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ

4. ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (1) ปริมาตร 1 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 (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นของไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.5. การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

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

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

3. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดความเข้มข้นของโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณโพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

2.2.2.6. 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. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (2) โดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย lantanum ให้เป็น 25 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียมจาก $CaCO_3$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลาย lanthanum ให้มีความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมจาก $MgCl_2$ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลาย lanthanum ให้มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

5. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดความเข้มข้นของแคลเซียม และแมกนีเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 422.7 และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมตามลำดับ บันทึกผลและนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) เช่นเดียวกับการหาปริมาณของไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.7 การวิเคราะห์ปริมาณของเหล็ก สังกะสี และทองแดง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของสังกะสีจาก $ZnSO_4.7H_2O$ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของทองแดงจาก $CuSO_4.5H_2O$ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

4. นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.2.2 (2) วัดความเข้มข้นของเหล็ก สังกะสีและทองแดง ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 248.3, 213.9 และ 324.8 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของเหล็ก สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และทองแดง (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

2.2.3. การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ใช้วิธีของ Whitham *et al*. (1971) โดยใช้ใบของกล้วยไม้แวนดาสันทรายบดูน้ำหนัก 1 กรัม บดในโกร่งบด ขณะทำการบดให้เติมอะซีโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ลงไปเล็กน้อย เมื่อบดละเอียดให้กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ด้วยเครื่องกรองแบบ suction pump ล้างและปรับปริมาตรด้วยอะซีโตนให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่กรองแล้วใส่ในหลอด cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณ ตามสูตร

$$\text{คลอโรฟิลล์ เอ} = (12.7\ (OD_{663}) - 2.69\ (OD_{645}))\ \times\ \frac{V}{1000W}$$

$$\text{คลอโรฟิลล์ บี} = (22.9\ (OD_{645}) - 2.69\ (OD_{663}))\ \times\ \frac{V}{1000W}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยที่ V คือ ปริมาตรของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของกล้วยไม้แวนดาสันทรายบลูที่นำมาสกัดหาคลอโรฟิลล์

OD คือ การดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นที่กำหนด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved