บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1.วัสดุพันธุ์พืช

ต้นฝรั่งพันธุ์กลมสาลี่ อายุ 1 ปี มาจากสวนบุญชอบพันธุ์ไม้ ตำบลอ้อมใหญ่ อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

ปลูกในกระถางดินเผาขนาดความจุ 50 ลิตร ซึ่งใช้ทรายละเอียดเป็นวัสดุปลูก ทำการปลูก ณ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพที่ 1)

2. อุปกรณ์

2.1 ตลับเทป

2.2 เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์

2.3 เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (firmness tester) ของบริษัท Metek รุ่น Hunter spring ขนาด 10 กิโลกรัม หัวรูปทรงกระบอก (cylinder shape) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 มิลลิเมตร ยาว 13 มิลลิเมตร

2.4 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (hand refractometer) ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 อ่านค่าตั้งแต่ 0-32 องศาบริกซ์ (°brix)

2.5 เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius รุ่น BA3100P และแบบทศนิยม 4 ตำแหน่งของบริษัท Sartorius รุ่น BP110S

2.6 เครื่องปั่นผลไม้ (blender) ของบริษัท Moulinex รุ่น S(643)

2.7 ตู้อบ

2.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) ของบริษัท Beckman รุ่น DU7500

2.9 โกร่งบด

2.10 กระดาษกรอง Whatman No. 1

2.11 ตู้เย็น

2.12 มีดปอกผลไม้

2.13 กล้องถ่ายรูป

2.14 Crucible

2.15 ถุงสำหรับใส่ตัวอย่าง

2.16 Dessicator

2.17 เครื่องแก้ว

2.17.1 บิกเกอร์

2.17.2 Erlenmayer flask

2.17.3 Volumetric flask

2.17.4 กระบอกตวง

2.17.5 บิวเรต

2.17.6 ปิเปต

2.17.7 Dropper

2.17.8 กรวยกรอง

2.17.9 หลอดทดลอง

2.17.10 แท่งแก้วคน

2.17.11 ช้อนตักสาร

2.18 muffle farnace ของบริษัท SYBRON

2.19 สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (TA)

■ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide Merck) เตรียมความเข้มข้น 0.1 N โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้หาปริมาณวิตามินซี

■ กรดออกซาลิก(oxalic acid, Merck) เตรียมกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งกรดออกซาลิก 4.0 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นครบ 1000 มิลลิลิตร

■ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล (2,6-dichlorophenol indophenol, Merck) เข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่ง 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิต่ำ

■ กรดแอสคอบิกมาตรฐาน(ascorbic acid, Merck) ชั่งกรดแอสคอบิกมา 0.001 กรัม ละลายในกรดออกซาลิกเข้มข้น 0.4 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตเตรทกับ 2,6-ไดคลอโรฟี

นอล อินโดฟีนอล เข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์จนถึงจุดยุติ แล้วบันทึกปริมาตร 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอลที่ใช้ไป เพื่อเป็นมาตรฐานในการคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

3. วิธีการทดลอง

3.1 วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี 7 ซ้ำๆละ 1 ต้น มีระดับความเข้มข้นของโปแตสเซียม 4 ระดับ คือ 600, 800, 1000 และ 1200 meq/l ธาตุอาหารรองตามคำแนะนำของ Hoagland and Arnon (1952) ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 6.5 ทุกกรรมวิธีทำการรดสารละลายประมาณ 1-2 ลิตรให้กับต้นฝรั่งทุกวัน ในเวลาช่วงเช้าตั้งแต่ 7.00 น. ถึง 8.00 น.

3.2 ขั้นตอนการศึกษา

ก. การวัดการเจริญเติบโต ดังนี้

1. ขนาดความสูงของต้น (ซม.)

โดยใช้ตลับเทป ในการวัดความสูงของต้นจากจุดที่กำหนด (ขอบกระถาง) ถึงส่วนที่สูงที่สุดของต้น

2. ความกว้างของทรงพุ่ม (ซม.)

โดยใช้ตลับเทป ในการวัดส่วนที่กว้างที่สุดของทรงพุ่มเป็น 2 แนวตั้งฉากกันแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น (ซม.)

โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์วัด ในการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวัดบริเวณที่กำหนดโดยเหนือจากขอบกระถางประมาณ 5 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายเพื่อวัดครั้งต่อไป

ข้อมูลการเจริญเติบโตวัดและบันทึกผล เดือนละ 1 ครั้ง จำนวน 8 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคม 2541 - กรกฎาคม 2542

ข้อมูลความสูงของต้น ความกว้างของทรงพุ่ม เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น แต่ละครั้งที่วัดได้นำมาเฉลี่ยเป็นข้อมูลของแต่ละกรรมวิธี แล้วนำมาหาอัตราการเจริญเติบโตตามสูตรที่รายงานโดย Shabana *et al.* (1981)

$$R = \frac{(Xt - Xo) \times 100}{Xo}$$

โดยที่

R = อัตราการเจริญเติบโตเป็นร้อยละ

Xt = ค่าการวัดครั้งหลัง

Xo = ค่าการหวัดครั้งแรก

4. การเจริญเติบโตของผล

เมื่อมีการติดผลแล้วจึงสุ่มวัดขนาดผลด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ ทั้งด้านกว้าง(จากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งของส่วนที่กว้างที่สุดในแนวขวางของผล) และด้านยาว (จากขั้วผลมายังปลายผล) วัดขนาดผล สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ใช้หน่วยเป็นเซนติเมตรและนำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ขนาดผล} = \frac{\text{กว้าง} + \text{ยาว}}{2}$$

ข. คุณภาพผลภายหลังการเก็บเกี่ยวครั้งสุดท้ายตรวจสอบลักษณะภายนอกและภายในผลดังนี้

ตรวจสอบคุณภาพผลฝรั่ง จาก 4 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ

1.น้ำหนักผล (กรัม)

โดยการใช้เครื่องชั่งละเอียดแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartouius และบันทึกผลจากค่าที่อ่านได้

2. ขนาดผล (ซม.)

โดยการใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ ในการวัดทั้งด้านกว้าง (จากด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งของส่วนที่กว้างที่สุดในแนวขวางของผล) และด้านยาว (จากขั้วผลมายังก้นผล) และบันทึกผลจากค่าที่อ่านได้นำมาคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{ขนาดผล} = \frac{\text{กว้าง} + \text{ยาว}}{2}$$

3.ความแน่นเนื้อ (กิโลกรัม)

โดยใช้เครื่องมือวัดความแน่นเนื้อของผลไม้ของบริษัท Metek รุ่น Hunter spring ขนาด 10 กิโลกรัม ซึ่งมีหัวรูปทรงกระบอกสำหรับแทงลงไปในเนื้อฝรั่ง ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของหัวเท่ากับ 6.5 มิลลิเมตร และยาว 13 มิลลิเมตร โดยวัดบริเวณกลางผล 3 ตำแหน่ง และทำการบันทึกผลจากค่าที่อ่านได้ มีหน่วยเป็นกิโลกรัม

4. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

วัดโดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ของบริษัท ATAGO รุ่น N1 (0-32 °brix) โดยการเอาน้ำคั้นที่ได้จากเนื้อฝรั่งหยดลงบนแผ่นปริซึมของเครื่อง hand refractometer จากนั้นบันทึกผลจากค่าที่อ่านได้ มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์

5. ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้

นำน้ำคั้นที่ได้จากเนื้อฝรั่งมา 5 มล. ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป เขย่าให้เข้ากัน นำไปไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N โดยใช้ ฟีนอฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรทจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน วัดปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท นำมาคำนวณหาปริมาณกรดโดยคำนวณจากสูตร

เปอร์เซ็นต์กรด = (normality of NaOH x equi.wt. of malic acid x vol.NaOH x 100) / 5

6. ปริมาณวิตามินซี โดยวิธี indophenol (Helrich, 1990)

นำน้ำคั้นที่ได้จากผลฝรั่งมา 10 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยกรดออกซาลิก 0.4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเอาสารละลายที่ปรับปริมาตรแล้วมา 10 มล. ปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยกรดออกซาลิก 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 40 มล. ในกระบอกตวง ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. นำสารละลายมาไตเตรทกับ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ ไตเตรทจนสารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน วัดปริมาตรของ 2,6-ไดคลอโรฟีนอล อินโดฟีนอล ที่ใช้ไตเตรท และคำนวณหาปริมาณของวิตามินซีตามสูตร

$$\text{ปริมาณวิตามินซี} = (A \times B \times 1000) / C$$

A = ปริมาณ ascorbic acid ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

B = ปริมาตรของน้ำคั้นที่ได้จากเนื้อ 100 กรัม

C = ปริมาตรของน้ำคั้นที่ใช้

7. ปริมาณคลอโรฟิลล์ (มก. / กรัมน้ำหนักสด)

นำตัวอย่างใบพืชมาจำนวน 1 กรัมทำความสะอาดแล้วนำมาบดให้ละเอียด แช่ด้วยอะซิโตนเข้มข้น 80% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 จนได้สารละลายเป็นสีเขียว วัดค่า absorbance ที่ช่วงคลื่น 663 นาโนเมตรและ 645 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง วัดการดูดกลืนแสง (spectophotometer) จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม โดยใช้สูตรของ Witham *et al.*(1971) ดังสมการ

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (มก. / กรัมน้ำหนักสด)} = [12.7\,(D_{663}) - 2.69\,(D_{645})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$\text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (มก. / กรัมน้ำหนักสด)} = [22.9\,(D_{645}) - 4.68\,(D_{663})] \times \frac{V}{1000 \times W}$$

โดย D=ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนั้นๆ

V=ปริมาตรของสารละลายคลอโรฟิลล์ที่ปรับปริมาตรแล้ว

W=น้ำหนักเป็นกรัมของใบฝรั่งที่นำมาสกัดคลอโรฟิลล์

8. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในใบ

การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างใบฝรั่งตำแหน่งที่ 3 และ 4 จากยอดที่แตกออกมา (Chapman, 1960) จำนวนชุดละ 15 ใบต่อต้น นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 $^{\circ}$C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Grant and Mac Naughlain, 1968) แล้วนำมาใส่ dessicator ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปบดให้ละเอียด เก็บใส่ถุงก่อนนำไปชั่งเพื่อย่อยตัวอย่าง

-ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (มก. / ล.)

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดเรียบร้อยแล้ว 1.0000 -1.0999 ก. บันทึกน้ำหนักพืชไว้ ใช้ทศนิยม 4 ตำแหน่ง นำตัวอย่างที่ชั่งใส่ volumetric flask 250 มล. ใส่สารที่เตรียมไว้ 20 มล. (HNO_3 conc. และ $HClO_4$ conc. ในอัตรา 3:1) ทิ้งไว้ 1 คืน นำมาย่อยใช้อุณหภูมิ 50, 100 280 และเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย 320 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะมีสีเริ่มแรกจากอุณหภูมิต่ำ คือจะมีควันสีเหลืองเข้ม จนเริ่มเกิดควันสีขาว และตัวอย่างที่ได้จะเป็นสีขาวใส ยกลงทิ้งไว้ให้เย็น นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาทำการปรับสีโดยวิธี Vanadate Method (Jackson, 1967)

ตัวอย่างที่ปรับสีแล้วทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 430 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0, 4, 12, 20 จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้น (%)

โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Total P(\%)} = (\text{Sample concentration (ppm)} - \text{Blank (ppm)}) \times \frac{25}{V} \times \frac{100}{Ws}$$

เมื่อ ppm. Sample = ความเข้มข้นตัวอย่าง

ppm. Blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ

Ws = น้ำหนักของตัวอย่างพืช (ก.)

V = ปริมาตรของตัวอย่างพืชที่ใช้ (มล.)

25 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่าง (มล.)

100 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ย่อยแล้ว (มล.)

-ไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่บดจากการหาปริมาณฟอสฟอรัสมาชั่ง 0.5000 - 0.5099 กรัม ใส่ใน volumetric flask เติมสาร เติมสารที่ใช้ย่อย N 10 มล. (H_2SO_4 Conc. 1 ลิตร, K_2SO_4 100 กรัม และ Selenium (Se) 1 กรัม ผสมรวมกันตั้งบน Hot plate ค่อยเพิ่มอุณหภูมิจนเกิดสีขาวใสของสารย่อยประมาณ 400 $^{\circ}$C) จากนั้นนำไปย่อยในเครื่องย่อย (Block digestion) จนเกิดสีขาวใสแล้วนำไปกลั่น (โดยใช้ Boric acid 4% 25 มล. และ ใช้ NaOH 40% 100 มล. โดยเตรียมในเครื่องกลั่น) ทำการกลั่นด้วยเครื่อง Tecator Kjeltec system 100z จน Boric 125 มล. นำมาไตเตรทด้วย HCl 0.1 N จนเกิดสีบานเย็น-ชมพู ได้สีเท่ากับสี Blank จึงทำการหยุดไตเตรทด้วย บันทึกปริมาตรที่ใช้ของHCl 0.1 N โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Total nitrogen (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้น HCl ที่ไตเตรท x (HCl ที่ไตเตรทได้ – Blank (ppm.)) x 0.014 x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

-โปแตสเซียม

นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยหาปริมาณฟอสฟอรัสที่อยู่ใน volumetric flask 100 มล. ดูดมา 1 มล. ปรับด้วย 0.5 N 9 มล. นำไปปั่น ให้เนื้อสารเท่ากัน นำไปวัดด้วยเครื่อง Atomic Absorbtion Spectrophotometer บันทึกค่าที่อ่านได้

โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Total K (\%)} = \frac{\text{Sample concentration} - \text{Blank (ppm.)} \times 100 \times 10}{Ws}$$

เมื่อ ppm. Sample = ความเข้มข้นตัวอย่าง

ppm. Blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ

Ws = น้ำหนักของตัวอย่างพืช (ก.)

100 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ใช้ (มล.)

10 = จำนวนการ dilution (ใช้ 10 เท่า)

-แคลเซียมและแมกนีเซียม

ใช้ตัวอย่างจากหลอดทดลองของโปแตสเซียมที่เตรียมไว้มาละลายให้เจือจาง แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปอ่านค่า Ca และ Mg ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Ca (\%)} = \frac{(\text{ppm. Sample [Ca]} - \text{ppm.Blank}) \times 100 \times 40}{Ws}$$

และ

$$\text{Mg (\%)} = \frac{(\text{ppm. Sample [Mg]} - \text{ppm.Blank}) \times 100 \times 40}{Ws}$$

เมื่อ ppm. Sample = ความเข้มข้นตัวอย่าง

ppm. Blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ

Ws = น้ำหนักของตัวอย่างพืช (ก.)

100 = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่ใช้ของตัวอย่าง (มล.)

40= จำนวนการ dilution (ใช้ 40 เท่า)

9. น้ำหนักแห้งของแต่ละส่วนเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง

โดยแยกหาน้ำหนักแห้งของแต่ละส่วนของต้นพืช คือ ใบ ลำต้น และราก โดยการนำมาอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ดนัย, 2533) แล้วนำมาหาสัดส่วนระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน

ภาพที่ 1 แปลงปลูกฝรั่ง