

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุพันธุ์พืช

ต้นกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล อายุ 2 เดือน ย้ายปลูกในกระถางพลาสติกสีดำ ขนาด 5 นิ้ว โดยใช้ไฮโดรบอลเป็นวัสดุปลูก จำนวน 350 ต้น

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 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 1.2.1.6 บอริกแอซิก (H_3BO_3)
- 1.2.1.7 แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 1.2.1.8 ซิงค์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 1.2.1.9 คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 1.2.1.10 แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)
- 1.2.1.11 เหล็กอีเลด (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 โซเดียมอีเลด ($\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$)

- 1.2.2.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 1.2.2.5 เอทานอล (C₂H₅OH)
- 1.2.2.6 เมทิลเรด (methyl red)
- 1.2.2.7 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄)
- 1.2.2.8 กรดเบนโซอิก (benzoic acid)
- 1.2.2.9 โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Na₂[Fe(CN)₅NO].2H₂O)
- 1.2.2.10 ฟีนอล (C₆H₆O₆)
- 1.2.2.11 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na₂HPO₄)
- 1.2.2.12 ไตรโซเดียมฟอสเฟต (Na₃PO₄)
- 1.2.2.13 โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO)
- 1.2.2.14 แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄)
- 1.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ฟอสฟอรัส ได้แก่
 - 1.2.3.1 กรดซัลฟูริก (H₂SO₄)
 - 1.2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂)
 - 1.2.3.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
 - 1.2.3.4 แอมโมเนียมโมลิบเดต ((NH₄)₆Mo₇O₂₄)
 - 1.2.3.5 สแตนัสคลอไรด์ (SnCl₂)
 - 1.2.3.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH₂PO₄)

1.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โพแทสเซียม ได้แก่

- 1.2.4.1 กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (HClO₄)
- 1.2.4.2 กรดไนตริก (HNO₃)
- 1.2.4.3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 1.2.4.4 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

1.2.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี และทองแดง

- 1.2.5.1 กรดเปอร์คลอริก (HClO₄)
- 1.2.5.2 กรดไนตริก (HNO₃)
- 1.2.5.3 กรดไฮโดรคลอริก (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 ซิงก์ซัลเฟต (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 ถูพลาสติกเก็บตัวอย่างพืช
- 1.3.8 ป้ายชื่อพร้อมปากกาเคมี
- 1.3.9 ตู้อบตัวอย่างพืช
- 1.3.10 เตาย่อยตัวอย่างพืชของบริษัท TECHNE รุ่น DB-4
- 1.3.11 ขวดพลาสติก ขนาด 60 มิลลิลิตร
- 1.3.12 เครื่องแก้ว
 - 1.3.12.1 หลอดทดลอง ขนาด 25 x 200 มิลลิลิตร
 - 1.3.12.2 บีกเกอร์
 - 1.3.12.3 กระจกดวง
 - 1.3.12.4 กรวยกรอง

1.3.12.5 ขวดปรับปริมาตร

1.3.12.6 ปีเปตแก้ว

1.3.12.7 ไมโครปีเปต

1.3.12.8 หลอดหยดสาร

1.3.12.9 แท่งแก้วคนสาร

1.3.12.10 ช้อนตักสาร

2. วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ผลของแคลเซียมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

ปลูกกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล อายุ 6 เดือน ที่มีลำลูกกล้วย 3 ลำ ด้วยไฮโดรบอลลงในกระถางขนาด 5 นิ้ว จำนวน 90 ต้น นำมาวางเรียงในชั้นวาง รอให้พืชพักฟื้นประมาณ 1 เดือน จึงเริ่มให้สารละลายปุ๋ย วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 กรรมวิธีๆ ละ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Ca ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Ca ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Ca ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Ca ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Ca ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Ca ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของธาตุอื่นในสารละลายเป็นดังนี้ คือ ไนโตรเจน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร กำมะถัน 198 มิลลิกรัมต่อลิตร เหล็ก 0.292 มิลลิกรัมต่อลิตร โบรอน 0.038 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 0.123 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 0.043 มิลลิกรัมต่อลิตร ทองแดง 0.008 มิลลิกรัมต่อลิตร โมลิบดีนัม 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมกนีเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปุ๋ยครั้งละ 50 มิลลิลิตรต่อต้น โดยวิธีตัดรดในอัตรา 2 ครั้ง/สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

การเจริญเติบโต ได้แก่ จำนวนลำลูกกล้วย ความสูงลำลูกกล้วย (เซนติเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลางลำลูกกล้วย (เซนติเมตร) จำนวนใบต่อลำ (ใบ) ความยาวใบ (เซนติเมตร) ความกว้างใบ (เซนติเมตร) และความหนาใบ (มิลลิเมตร) สุ่มวัดผลจำนวน 10 ต้นจาก 15 ต้น ทำการวัดผลทุกลำ โดยวัดผลจากลำลูกกล้วยลำดับที่ 2 เป็นต้นไป เดือนละ 1 ครั้ง

คุณภาพดอก ได้แก่ จำนวนดอกต่อช่อ ความยาวช่อดอกทั้งหมด (เซนติเมตร) ความยาวก้านช่อดอก (เซนติเมตร) ความยาวช่อดอก (เซนติเมตร) เส้นผ่านศูนย์กลางก้านช่อดอก (มิลลิเมตร) ความกว้างของดอกแนวตั้งและแนวนอน (เซนติเมตร) และเปอร์เซ็นต์การออกดอก ทำการวัดผลทุกต้นทุกลำที่ออกดอก โดยเปรียบเทียบเป็นผลของแคลเซียมต่อดอกของลำลูกกล้วยลำดับที่ 2, 3, ..., n ภายในการทดลอง

การวิเคราะห์ธาตุอาหาร

สุ่มพืชในระยะเริ่มการทดลองก่อนให้สารละลายปุ๋ย และระยะหลังจากได้รับสารละลายปุ๋ยเป็นเวลา 10 เดือน ในแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 10 ช่อ ช่อละ 1 ต้น มาทำการวิเคราะห์ธาตุอาหาร โดยทำการแยกส่วนของพืชออกเป็นราก ใบ ลำลูกกล้วย และหน่อใหม่ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ชับและผึ่งชิ้นส่วนพืชให้แห้ง ชั่งพร้อมบันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ บันทึกน้ำหนักแห้ง และนำพืชมาวิเคราะห์ธาตุอาหาร ดังนี้

วิเคราะห์ N โดยวิธี Modified Kjeldahl Method (Ohyama et al., 1991)

วิเคราะห์ P โดยวิธี Colorimetry (Ohyama et al., 1991)

วิเคราะห์ K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn และ Mo โดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

(Mizukoshi et al., 1994)

การทดลองที่ 2 ผลของแมกนีเซียมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

เตรียมพืชทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 จึงเริ่มให้สารละลายปุ๋ย วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Mg ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Mg ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Mg ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Mg ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Mg ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ให้สารละลายธาตุอาหารที่มี Mg ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของธาตุในสารละลายอื่นเป็นดังนี้ ในโตรเจน 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร กำมะถัน 198 มิลลิกรัมต่อลิตร เหล็ก 0.292 มิลลิกรัมต่อลิตร โบรอน 0.038 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส 0.123 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี 0.043 มิลลิกรัมต่อลิตร ทองแดง 0.008 มิลลิกรัมต่อลิตร โมลิบดีนัม 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร และแคลเซียม 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปุ๋ยครั้งละ 50 มิลลิลิตรต่อต้น โดยวิธีตัดรดในอัตรา 2 ครั้ง/สัปดาห์

การบันทึกผลการทดลอง

การเจริญเติบโต คุณภาพดอก และการวิเคราะห์ธาตุอาหาร เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ โดยวิธีของ Whitham et al. (1971) หลังจากให้สารละลายปุ๋ยเป็นเวลา 10 เดือน

การทดลองที่ 3 ผลของแคลเซียมร่วมกับแมกนีเซียมต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล

เตรียมพืชทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน $(3 \times 3) + 2$ กรรมวิธี ๆ ละ 15 ซ้ำ (1 ต้นต่อซ้ำ) ให้สารละลายธาตุอาหารที่มีแคลเซียมความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 200, 100 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับแมกนีเซียม 3 ระดับ คือ 100, 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนธาตุอื่นพืชได้รับเท่ากันในทุกกรรมวิธีเหมือนการทดลองที่ 1 ยกเว้นแมกนีเซียมและแคลเซียม เปรียบเทียบกับการได้รับธาตุอาหารอื่นๆ ครบถ้วน ยกเว้นแคลเซียมและ

แมกนีเซียม (ขาดแคลเซียมและแมกนีเซียม) และการไม่ได้รับธาตุอาหาร (กรรมวิธีควบคุม) บันทึกรการเจริญเติบโต คุณภาพดอก และวิเคราะห์ธาตุอาหาร เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 การบันทึกผลการทดลอง

2.2.1. การบันทึกการเจริญเติบโต ดังนี้

2.2.1.1 จำนวนลำลูกกล้วย (ลำ)

2.2.1.2 ความสูงลำลูกกล้วย (เซนติเมตร)

วัดจากโคนลำลูกกล้วยจนถึงโคนใบที่สอง นับจากใบที่อยู่ตรงปลายยอดลงมา

2.2.1.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลำลูกกล้วย (เซนติเมตร)

วัดบริเวณกึ่งกลางลำลูกกล้วย เหนือโคนลำลูกกล้วยขึ้นมา 5 เซนติเมตร

2.2.1.4 ความยาวใบ (เซนติเมตร)

วัดใบที่สองของลำ โดยวัดจากโคนใบจนถึงปลายใบ

2.2.1.5 ความกว้างใบ (เซนติเมตร)

วัดส่วนที่กว้างที่สุดของใบที่สองของลำ โดยวัดจากขอบใบด้านหนึ่งจนถึงขอบใบอีกด้านหนึ่ง

2.2.1.6 ความหนาใบ (มิลลิเมตร)

วัดความหนาของใบ บริเวณเดียวกับที่วัดความกว้างของใบ

2.2.1.7 จำนวนใบ (ใบ)

2.2.2 คุณภาพดอก ดังนี้

2.2.2.1 ความยาวช่อดอกทั้งหมด (เซนติเมตร)

วัดจากโคนช่อดอกจนถึงช่อดอกสุดท้าย

2.2.2.2 ความยาวก้านช่อดอก (เซนติเมตร)

วัดจากโคนช่อดอกจนถึงช่อดอกแรก

2.2.2.3 ความยาวช่อดอก (เซนติเมตร)

วัดจากช่อดอกแรกจนถึงช่อดอกสุดท้าย

2.2.2.4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางก้านช่อดอก (มิลลิเมตร)

วัดเหนือโคนช่อดอกขึ้นมา 10 เซนติเมตร

2.2.2.5 ความกว้างดอกแฉกตั้งและแฉนวนอน (เซนติเมตร)

วัดความกว้างดอกแฉกตั้งและแฉนวนอน ในดอกที่ 2 นับจากโคนช่อขึ้นไป

2.2.2.6 จำนวนดอก (ดอก)

2.2.2.7 เปอร์เซ็นต์การออกดอก (เปอร์เซ็นต์)

คิดเปอร์เซ็นต์การออกดอกจากจำนวนต้นภายในกรรมวิธี

2.2.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหาร

2.2.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มพืชหลังจากให้สารละลายธาตุอาหารเป็นระยะเวลา 10 เดือน จำนวน 10 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำตัวอย่างที่สุ่มได้มาแยกส่วนออกจากกัน ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง น้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นนำไปชั่ง บันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ จึงนำมาชั่งบันทึกน้ำหนักแห้ง แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียด เก็บใส่ถุงพลาสติกก่อนนำไปชั่งเพื่อใช้ย่อยและวิเคราะห์ธาตุอาหารต่อไป

2.2.3.2 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 วันต่อมา นำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง 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 วันต่อมา นำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

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

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (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 ทิ้งไว้ จนตัวอย่างแห้ง ระวังอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายเจือจาง ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2.2.3.3. การวิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจนรวม (Indolphanol Method)

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

1. เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณไนโตรเจน จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

A reagent : ชั่งโซเดียมทีเลด ($\text{EDTA}\cdot 2\text{Na}$) 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 10 โดยใช้ 10 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นตัวปรับ pH จากนั้นเติม สารละลายเมทิลเรด (methylred) 20 มิลลิลิตร (เมทิลเรด 0.05 กรัม + 60% เอทานอล 20 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

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

C reagent : ชั่งโซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (sodium nitroprusside) 0.1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติมฟีนอล (phenol) 10.25 มิลลิลิตร (นำฟีนอลไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ใต้ฟีนอลที่เป็นของเหลว) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 สัปดาห์

D reagent : ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 10 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 7.06 กรัม และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 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 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน โดยชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0.471 กรัม ละลายด้วยกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 0.5 N แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร ขนาด 1 ลิตร จนครบปริมาตร ได้สารละลายมาตรฐานในโตรเจนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายไปเจือจางตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกรดซัลฟูริก 0.5 N เตรียมจากกรดซัลฟูริก 13.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. ดูตัวอย่างที่ย่อยได้จากข้อ 2.2.3.2 (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 ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง 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 จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณในโตรเจน (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช)

$$= \frac{(A \times B \times C) \times 10 \times \text{น้ำหนักแห้งในส่วน of พืช}}{(D \times E \times 10000)}$$

สาร A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนจากกราฟมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อลิตร)

- B = ปริมาตรสุดท้ายในปฏิกิริยา IndolphenoI (25 มิลลิลิตร)
 C = ปริมาตรสุดท้ายของการย้อมตัวอย่างพืช (50 มิลลิลิตร)
 D = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างที่ใช้อยู่ (กรัม)
 E = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

2.2.3.4. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et. al.*, 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟตและอนุกรมโมลิบเดต ดังนี้

1. เตรียมสารละลายที่ใช้ตรวจสอบปริมาณฟอสฟอรัสจำนวน 3 ชนิดดังนี้

A reagent : ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) 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 วันต่อมามานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาตั้งไว้ในที่มืด

2. เตรียมสารละลายสแตนด์ตาร์ด ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) โดยชั่งสแตนด์ตาร์ด 0.25 กรัม เติลงในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้เย็น) 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 2.2.3.2 (1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติม C reagent ขวดละ 1 มิลลิลิตร และ

เติมสแตนดาร์ดไธม 0.2 มิลลิกรัม ตามลำดับ ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิกรัม ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของฟอสฟอรัส (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับการหาความเข้มข้นของไนโตรเจน

2.2.3.5. การวิเคราะห์ปริมาณโพแทสเซียม

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียมที่มีความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.3.2 (2) โดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิกรัม
3. นำสารละลายดังกล่าวไปวัดความเข้มข้นของโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณ โพแทสเซียม (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

2.2.3.6. การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม และแมกนีเซียม

1. เตรียม lanthanum oxide โดยชั่ง lanthanum oxide 2.01 กรัม ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิกรัม จากนั้นเติม HCl 37% 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิกรัม
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.3.2 (2) โดยใช้สารตัวอย่าง 1 มิลลิกรัม จากนั้นเจือจางด้วยสารละลาย lanthanum ให้เป็น 25 มิลลิกรัม
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแคลเซียมจาก CaCO_3 จากนั้นปรับปริมาณด้วยสารละลาย lanthanum ให้มีความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
4. เตรียมสารละลายมาตรฐานของแมกนีเซียมจาก MgCl_2 จากนั้นปรับปริมาณด้วยสารละลาย 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

2.2.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณของเหล็ก สังกะสี และทองแดง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของเหล็ก จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของสังกะสีจาก $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานของทองแดงจาก $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน
4. นำสารละลายตัวอย่างจากข้อ 2.2.3.2 (2) วัดความเข้มข้นของเหล็ก สังกะสีและทองแดง ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 248.3, 213.9 และ 324.8 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของเหล็ก สังกะสี และทองแดงตามลำดับ บันทึกผล และนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และทองแดง (มิลลิกรัมต่อส่วนของพืช) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์

ใช้วิธีของ Whitham *et al.* (1971) โดยใช้ใบของกล้วยไม้หวายเอื้องสกุล น้ำหนัก 1 กรัม บดในโถรงบด ขณะทำการบดให้เติมอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ลงไปเล็กน้อย เมื่อบดละเอียดให้ กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ด้วยเครื่องกรองแบบ suction pump ต้างและปรับปริมาตร ด้วยอะซิโตนให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร นำสารละลายที่กรองแล้วใส่ใน หลอด cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 นา โนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บันทึกค่าที่ได้แล้วนำไปคำนวณ ตาม สูตร

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

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

โดยที่ V คือ ปริมาตรของสารละลายที่นำมาหาปริมาณคลอโรฟิลล์

W คือ น้ำหนักของกล้วยไม้หวายแวนดาพันธุ์ที่นำมาสกัดหา
คลอโรฟิลล์

OD คือ การดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
(spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นที่กำหนด