

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ $1 + (4 \times 3 \text{ Factorial in completely randomized design})$

คือ การไม่ใช้สารพาโคลบิวทราโซล (control) และ

การใช้สารพาโคลบิวทราโซล ซึ่งแบ่งเป็น 2 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของสาร 4 ระดับ คือ 100, 200, 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนครั้งของการให้สาร 3 ระดับ คือ 3 ครั้ง 4 ครั้ง และ 5 ครั้ง

วิธีการ

1. เตรียมเพาะต้นกล้าเขరుชาเล็มอาร์ติโชก (แก่ต้น # 1) โดยตัดหัวให้เป็นชิ้น ๆ ให้แต่ละชิ้นมีตา 2-3 ตา เพาะลงในถาดเพาะ จนต้นกล้ามีอายุได้ 15 วัน มีความสูง 5-7 เซนติเมตร หรือมีใบจริง 3-5 ใบ จึงย้ายลงปลูกในกระถาง กระถางละ 1 ต้น
2. เตรียมดินผสม และภาชนะปลูกทดลอง โดยใช้กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 12 นิ้ว จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 กระถาง ดินผสมประกอบด้วย ดินร่วน : มูลวัว : จีเลื่อยเก่าที่ใช้เพาะเห็ดแล้วในอัตราส่วน 2:1:1 ผสมปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตรเสมอ 15:15:15 จำนวน 1 กิโลกรัมต่อวัสดุปลูก 1 ลูกบาศก์เมตร

3. การดูแลรักษา

3.1 การให้น้ำ

โดยการใช้สายยางพ่นให้เป็นฝอยวันละ 1 ครั้ง

3.2 การใส่ปุ๋ย

การให้ปุ๋ยใช้ปุ๋ยยูเรีย 2 ครั้ง กระถางละ 1 ช้อนโต๊ะ (4 กรัม) โดยการโรยรอบ ๆ ต้น เมื่ออายุได้ 20 และ 25 วัน ใส่ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15 3 ครั้ง ครั้งละ 5 กรัม ต่อกระถาง เมื่ออายุได้ 30, 35 และ 45 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 8-24-24 โดยการผสม น้ำรดอัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร รดต้นละ 200 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เมื่ออายุได้ 55 และ 60 วัน เมื่อพบอาการใบ เหลืองหรือที่ยอดของทริตเมนต์ที่ทราบสารด้วยความเข้มข้นสูง ซีดลงจึงได้ให้ปุ๋ยสูตร 30-20-10 โดยการผสมน้ำฉีดพ่นอัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 3 ครั้ง เมื่ออายุได้ 73, 79 และ 81 วัน

3.3 การป้องกันกำจัดศัตรู

ฉีดยากันราเบนเลท 2 ครั้ง เมื่อพบอาการโรคใบไหม้เมื่ออายุได้ 77 วัน และ 83 วัน

การให้สารพาโคลบิวทราโซล

ในกลุ่มที่ใช้สารเริ่มให้สารเมื่อต้นอายุได้ 15 วัน หลังย้ายปลูกโดยการให้ครั้งที่ 1 ให้ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ต่อกระถาง ครั้งที่ 2 ให้เมื่อต้นอายุได้ 25 วัน หลังย้ายปลูก ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ครั้งที่ 3 ให้เมื่อต้นอายุได้ 35 วัน ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ต่อกระถาง สำหรับการให้ครั้งที่ 4 และ 5 ให้เมื่อต้นอายุได้ 45 และ 55 วัน ปริมาณ 200 มิลลิลิตร ต่อต้น

การให้สารทำโดยการผสมสารตามความเข้มข้นของแต่ละทรีทเมนต์ แล้วราดโคนต้นหลังการรดน้ำแล้ว 30 นาที ส่วนทรีทเมนต์ที่เป็นควบคุมจะราดด้วยน้ำเปล่าตามปริมาณเช่นเดียวกับสารพาโคลบิวทราโซล

การบันทึกข้อมูล

เริ่มทำการบันทึกข้อมูลหลังการย้ายปลูกลงกระถางได้ 15 วัน หรือต้นมีอายุได้ 30 วัน

1. วัดความสูงของต้นโดยใช้ไม้บันทัด (หน่วยเป็นเซนติเมตร) วัดจากโคนต้นเหนือดินไปจนถึงปลายยอดที่รวบใบขึ้นของลำต้นหลัก สุ่มวัดซ้ำละ 3 ต้น ทุก 10 วัน
2. วัดขนาดของใบโดยวัดความกว้าง ความยาวของใบ และความยาวของก้านใบ โดยใช้เวอร์เนีย (หน่วยเป็นเซนติเมตร) โดยสุ่มวัดจากใบที่อยู่ถัดจากยอดลงมาตำแหน่งที่ 3 และ 4 สุ่มวัดซ้ำละ 3 ต้น ทุก 10 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว ความกว้างของใบวัดที่ส่วนของใบบริเวณที่กว้างที่สุด ความยาวของใบวัดจากบริเวณรอยต่อของก้านใบ กับตัวใบจนถึงปลายใบ (leaf apex) ความยาวของก้านใบวัดจากรอยต่อของก้านใบกับตัวใบถึงบริเวณที่ก้านใบติดกับลำต้น
3. พื้นที่ใบวัดโดย การตัดพื้นที่ใบ 1 ตารางเซนติเมตร ไปชั่งน้ำหนัก แล้วเทียบกับน้ำหนักของใบทั้งใบ (นฤดม. 2532) ทำการศึกษาทุก 10 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยว
4. วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ล้างใบ เมื่อต้นอายุ 15 วัน หลังย้ายปลูกปฏิบัติทุก 10 วัน จนกระทั่งเก็บเกี่ยวโดยเก็บตัวอย่างใบตำแหน่งที่ 3 และ 4 จากยอด ซ้ำละ 2 ต้น นำมาบดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใช้ตัวอย่างใบพืช 0.2 กรัม เติมนอะซีโตน 85 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษ กรอง เบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไปวัดหาปริมาณคลอโรฟิลล์โดยใช้ spectrophotometer (ยี่ห้อ Pharmacia Biotech รุ่น Na Vaspec II) คลอโรฟิลล์เอ ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คลอโรฟิลล์บี ความยาวคลื่น 642 นาโนเมตร (สมบุญ และ คณะ , 2538 ; AOAC, 1999) ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดคำนวณจากสูตร $\text{Total chlorophyll} = \text{chlorophyll A (660 nm)} + \text{chlorophyll B (642 nm)}$
5. อายุการออกดอก และดอกบาน โดยนับวันที่ดอกแรกของลำต้นหลักเริ่มปรากฏให้เห็น จนกระทั่งต้นหลักออกดอก 50 % ของจำนวนในแต่ละซ้ำ การบานของดอกจะนับวันที่กลีบ ดอก

รอบนอก (ray flower) คลี้ออก และมีสีเหลืองปรากฏ และ ดอกวงใน (disc folwer) บาน 50% ที่ก ข้อมูลจำนวนดอกต่อต้นเมื่อสิ้นสุดการออกดอก

6. นับจำนวนต้นแขนงในแต่ละกระถางเมื่อวันเก็บเกี่ยว โดยนับทุกต้นแล้วคำนวณค่าเฉลี่ย

7. หาน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ของลำต้นส่วนเหนือดิน และใต้ดิน โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน หรือเมื่อน้ำหนักคงที่ สุ่มศึกษาซ้ำละ 2 ต้น

8. นับจำนวนหัว และ หาน้ำหนักของหัว (Tuber) โดยแยกขนาด เป็น 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2 เซนติเมตรลงมา ขนาดกลางเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 2.1-3.5 เซนติเมตร และขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 3.5 เซนติเมตรขึ้นไป

9. หาน้ำหนักแห้งของหัวโดยสุ่มซ้ำละ 3 ต้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หรือเมื่อน้ำหนักคงที่

10. นำหัวไปวิเคราะห์หาสาร พาโคลบิวทราโซลที่ตกค้างในหัว สุ่มซ้ำละ 2 ต้น ใช้เทคนิค GC-MS คัดแปลงจาก อนุวัฒน์ และคณะ, 2007 และ 2008 ดังนี้

การวิเคราะห์หาปริมาณพาโคลบิวทราโซล

1. การสกัดสารพาโคลบิวทราโซล

1.1 การสกัดสารพาโคลบิวทราโซล

1. ชั่งตัวอย่างอาร์ติโชกแห้ง (ความชื้น 8.18%) 10 กรัม ($\pm$ 0.001 กรัม) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. สกัดสารตัวอย่างด้วย acetonitrile โดยเติม acetonitrile ลงไป 100 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (INFORSAG Rittergasse 27 CH-4163 Bottmingen) ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

3. นำมากรองแบบสุญญากาศด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman Cat No. 1001 090) ทำการชะสารทุกครั้งด้วย acetonitrile

4. นำสารละลายที่สกัดได้มา ระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (30 องศาเซลเซียส, < 150 มิลลิบาร์) จนปริมาตรของสารละลายเหลือน้อยกว่า 1 มิลลิลิตร

5. ถ่ายสารละลายลงในขวดสีชาขนาด 2 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 2 มิลลิลิตร acetonitrile

6. ปิดฝาแล้วนำไปปิดด้วยแผ่นพาราฟิน นำใส่ถุงแล้วเก็บในตู้เย็น เพื่อเตรียมนำไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป

1.2 การหาเปอร์เซ็นต์คืนกลับ

1.2.1 ชั่งตัวอย่างอาร์ติโชกแห้ง (ความชื้น 8.18%) 10 กรัม (± 0.001 กรัม) ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แลวเติมสารละลายมาตรฐาน พาโคลบิวทราโซลโดยให้ความเข้มข้นเป็น 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวอย่าง

1.2.2 ทำการสกัดเพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง GC-MS ดังวิธีการข้างต้น

2. การวิเคราะห์หาปริมาณพาโคลบิวทราโซลด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

สภาวะของเครื่อง GC-MS (Shimadzu 17A/QP5050)

ชนิดของคอลัมน์ : แคปิลลารีคอลัมน์ HP-5ms (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μ m film thickness)

ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ : ก๊าซฮีเลียม ที่มีความบริสุทธิ์ ร้อยละ 99.999

อัตราการไหล 1.16 ml/min

อุณหภูมิของช่องฉีดสาร (injector temperature) : 300 °C

ระบบการนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ : splitless mode

ปริมาตรของสารตัวอย่าง (Injection volume) : 1 μ l

โปรแกรมอุณหภูมิของ GC (oven temperature program) มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นที่ 2 เพิ่มอุณหภูมิเป็น 280 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม 20 องศาเซลเซียส

ต่อนาที

ขั้นที่ 3 คงไว้ที่อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที

อุณหภูมิอินเตอร์เฟซ (Interface temperature) : 300 °C

Ion source : electron impact ionization ,EI

Determination mode : selected ion monitoring

Selected ions (m/z) : 125, 167, 236

การวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเครื่อง GC-MS

นำขวดที่มีสารละลายตัวอย่างทำการฉีดสารละลายตัวอย่าง ด้วยไมโครไซลิงก์ เข้าสู่เครื่อง GC ที่อินเจ็คเตอร์ ซึ่งมีอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เพื่อให้สารระเหยเป็นไอ โดยมีเฟสเคลื่อนที่ คือ ฮีเลียมเป็นตัวพาไอของสารทั้งหมดจากอินเจ็คเตอร์ผ่านเข้าสู่คอลัมน์ สารต่างชนิดกัน จะมีการกระจายตัวอยู่ระหว่างเฟสของเหลวที่เป็นฟิล์มเคลือบอยู่ภายในคอลัมน์และเฟส เคลื่อนที่

เป็นฮีเลียมก๊าซตัวพาด้วยอัตราที่ต่างกัน โดยมีอุณหภูมิของ GC เป็นปัจจัย ทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นได้ สารที่ถูกหน่วงน้อยที่สุดจะออกมาจากคอลัมน์ก่อน และสารตัวอื่นที่ถูกหน่วงมากกว่า ก็จะออกตามมาตามลำดับแล้ว ผ่านเข้าสู่อินเทอร์เฟซระหว่างเครื่อง GC กับเครื่อง MS ซึ่งทำหน้าที่เป็นดีเทคเตอร์แล้วคอมพิวเตอร์จะประมวลผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม

การคำนวณปริมาณของสารพาคีโลบิวทราโซล

การคำนวณปริมาณสารในตัวอย่างโดยใช้การเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคเทียบกับสารมาตรฐานพาคีโลบิวทราโซล และการเปรียบเทียบค่า retention time ของตัวอย่าง กับ retention time ของสารละลายมาตรฐาน

การคำนวณเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์คืนกลับสามารถหาได้จากสารมาตรฐานพาคีโลบิวทราโซลที่เติมลงไปในตัวอย่ง ก่อนการสกัด

การคำนวณหาค่า Method detection limit (MDL)

Method Detection Limit (MDL) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัด โดยคำนวณจาก 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนของ peak area จากกราฟมาตรฐานแล้วนำค่าที่ได้กลับไปแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐาน เพื่อเปลี่ยนเป็นความเข้มข้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษา มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้โปรแกรม SAS