



ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก 1

วิธีการวิเคราะห์ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส

การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับวิเคราะห์ธาตุอาหาร

สุ่มพืชในระยะเวลาเจริญเติบโตต่างๆ กัน ทุกเดือน จนครบวงจรการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด รวม 4 ชนิด ชนิดละ 4 ซ้ำ สำหรับต้นเอื้องพร้าว และข้างผสมไขลงที่สุ่มได้ นำมาแยกส่วนต่าง ๆ คือ หัวเทียม ใบ ดอก และราก ส่วนลิ้นมังกรและอัสสุเทพแยกส่วนต่างๆ คือ หัว ใบ ดอก และราก นำแต่ละส่วนมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจำนวน 2 ครั้งและตามด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักสด บันทึกข้อมูลไว้ แล้วนำตัวอย่างพืชไปอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ จนกระทั่งน้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนจึงบันทึกน้ำหนักแห้ง

การย่อยตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์ไนโตรเจนและฟอสฟอรัสด้วยกรด (Wet Acid Digestion)

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

ชั่งตัวอย่างพืชอบแห้งที่บดละเอียด 0.05 ก ใส่ลงในหลอดทดลองเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 มล ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปปั่นให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 คืน และวันต่อมามานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 180 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำหลอดออก วางทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์หลอดละ 0.3 มล ปั่นให้เข้ากัน นำมาย่อยต่อโดยปรับอุณหภูมิเป็น 230 °ซ จับเวลา 30 นาที สังเกตสีของสารละลาย หากสารละลายยังไม่ใสให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 มล แล้วนำไปย่อยต่อ ทำซ้ำเค็มจนกระทั่งสารละลายใสจึงหยุด จากนั้นทิ้งให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 5 มล ทิ้งไว้ 1 คืนวันต่อมามานำมาปรับปริมาตรให้ได้ 50 มล ใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี Indolphenol Method

เตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ไนโตรเจน

สารละลาย A ชั่ง EDTA.2Na 25 ก ละลายในน้ำกลั่น 800 มล จากนั้นเติมสารละลายระหว่างเอทานอล 60% และเมทธิเรด 0.25% จำนวน 20 มล ปรับ pH ให้เป็น 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ล

สารละลาย C ชั่งโซเดียมไนโตรพลัสไซด์ 100 มล ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมฟีนอล 10.25 มล ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C ได้นาน 2 สัปดาห์

สารละลาย D ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.43 กรัม $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 31.8 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 10 มล แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C ได้นาน 2 สัปดาห์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก แอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

ดูดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว 0.3 มล เติมสารละลาย A 0.5 มล และ สารละลาย B 0.5 มล นำมาไตเตรท โดยหยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ลงไป เขย่าเล็กน้อยให้สีเปลี่ยนจากสีชมพู เป็นสีเหลือง จากนั้น เติมสารละลาย C 2.5 มล และสารละลาย D 2.5 มล ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 3 ชั่วโมง สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร บันทึกผลแล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานตามกฎของ Beer's-Lambert's Law จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน (มก/กรัมน้ำหนักแห้ง) ตามสูตรคือ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช (มก/กรัมน้ำหนักแห้ง)} = \frac{\text{สาร A (ppm)} \times B \times C}{10000 \times DW}$$

A = ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (มก/ล)

B = ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา (25 มล)

C = ปริมาตรสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ใช้ (50 มล)

D = น้ำหนักแห้ง

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสโดยการวัดการดูดกลืนแสงของสารที่มีสี (colorimetry) (Ohyama *et al.*, 1991) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต และอนุมูลโมลิบเดท ดังนี้

เตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์

สารละลาย A : ชั่ง $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$ 25 ก ละลายในน้ำกลั่น 200 มล จากนั้นนำมากรองโดยใช้ระบบสุญญากาศช่วย

สารละลาย B : เตรียมกรดซัลฟูริก 20 มล ผสมน้ำกลั่น 200 มล ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มล

สารละลาย C : นำ สารละลาย A มาผสม สารละลาย B โดยเท สารละลาย B ลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มล ค่อยๆ เท สารละลาย A ที่ละน้อย ช้าๆ ทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล เก็บไว้ในขวดสีชา

เตรียมสารละลาย stannous chloride โดยชั่ง stannous chloride ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25 ก เติมน้ำในขวดสีชา (ควรเตรียมในตู้ควีน) โดยเติม HCl 5 มล ละลายให้หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 20 มล

เตรียมสารละลายมาตรฐานของฟอสฟอรัสจาก KH_2PO_4 ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

ดูดสารละลายตัวที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้ว 1 มล ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติมน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อย เติมสารละลาย C ขวดละ 1 มล และเติม stannous chloride 0.2 มล ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มลตั้งทิ้งไว้ 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟอสฟอรัส จากนั้นนำค่าที่คำนวณได้มาคำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส (มกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) เช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจน

ภาคผนวก 2

วิธีการวิเคราะห์โพแทสเซียม (Mizukoshi *et al.*, 1994)การย่อยตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โพแทสเซียม (Mizukoshi *et al.*, 1994)

ชั่งตัวอย่างพืชที่อบแห้งบดละเอียด 0.05 g ใส่หลอดทดลอง เติม HClO_4 0.4 มล และ HNO_3 0.5 มล ตามลำดับ ปั่นให้เข้ากัน ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100°C เพื่อไล่ควันสีเหลืองของ NO_2^- ออกหมด จึงปรับเพิ่มอุณหภูมิ เป็น 100°C ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งระงับอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมสารละลายเจือจางของไฮโดรคลอริก ($\text{HCl} : \text{H}_2\text{O}$ 4 มล) หลอดละ 1 มล ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มล เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์โพแทสเซียม

เตรียมสารละลายมาตรฐานของโพแทสเซียม ปรับให้มีความเข้มข้นตามลำดับคือ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มก/ล เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วโดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มล จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มล

นำสารละลายดังกล่าวไปวัดปริมาณธาตุโพแทสเซียม ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760.5 นาโนเมตร บันทึกผล แล้วนำค่าที่อ่านได้มาคำนวณหาปริมาณธาตุโพแทสเซียม (มก ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยใช้สูตรคำนวณหาเช่นเดียวกับการหาปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างพืช

ภาคผนวก 3

การวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol-sulphuric method ของ Dubois *et al.* (1956)

การเตรียมตัวอย่างพืช

สุ่มพืชในระยะเวลาเจริญเติบโตต่าง ๆ กัน ทุกเดือน จนครบวงจรการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด รวม 4 ชนิด ชนิดละ 4 ซ้ำ สำหรับต้นเอื้องพร้าวและช้างผสมโขลงที่สุ่มได้มาแยกส่วนต่าง ๆ คือ หัวเทียม ใบ ดอก และราก ส่วนลิ้นมังกรและอัสสุเทพแยกส่วนต่าง ๆ คือ หัว ใบ ดอก และราก นำแต่ละส่วนมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาจำนวน 2 ครั้งและตามด้วยน้ำกลั่นจำนวน 2 ครั้ง ซับให้แห้งก่อนนำมาวิเคราะห์สารต่าง ๆ ตามวิธีการดังนี้

การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์น้ำตาล

ชั่งตัวอย่างสด 4 ก สกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 80% นำไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนสารละลายใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 50 มล ล้างตะกอนด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 80% 2 ครั้ง จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล ด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 80% สารสกัดส่วนนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล ภาคที่เหลือนำไปอบแห้งเพื่อใช้วิเคราะห์แป้ง

การวิเคราะห์น้ำตาลโดยวิธี Phenol-sulphuric method ของ Dubois *et al.* (1956)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานจากน้ำตาลเคคโตสที่ระดับความเข้มข้น 0 0.04 และ 0.08 ก/ 100 มล

2. เตรียมสารละลายฟีนอล 5 %

3. ดูดสารสกัด 10 ไมโครล ใส่ในหลอดแก้ว

4. เติมน้ำกลั่น 1 มล

5. เติมฟีนอล 5% 1 มล

6. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มล (ใส่อย่างรุนแรง เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์)

7. นำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่องปั่น (vortex)

8. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วเขย่าอีกครั้ง จากนั้นนำไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ

นาน 10 นาที เพื่อลดอุณหภูมิลง

9. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตร
10. ในแต่ละตัวอย่างต้องทำ blank โดยการดูดสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครล (ไมโครลิตร) (เท่ากับปริมาณสารสกัดตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มล แล้วทำตามขั้น ตอนที่ 6-91
11. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของตัวอย่างมาลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank ของแต่ละตัวอย่าง (ถ้าใกล้เคียง 0 มาก สามารถตัดทิ้งได้) นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วแทนค่าลงในสูตรการหาความเข้มข้นของน้ำตาล

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล} = \frac{X \times D \times F}{FW} \text{ มก./กรัม น้ำหนักสด}$$

X = ค่าความเข้มข้นที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

D = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 80% (50 มล)

FW = น้ำหนักที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ 80% (4 ก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก 4

วิธีการวิเคราะห์แป้ง โดยวิธี Anthrone ของ JSPN (1990)

การสกัดพืชเพื่อวิเคราะห์แป้ง

ชั่งกากอบแห้งที่เหลือจากการสกัดน้ำตาล 0.5 ก ใส่ลงในหลอดเซนต์ปีวส์ขนาด 15 มล เติมน้ำกลั่น 2.5 มล นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C นาน 15 นาที ยกลงมาเติมกรดเปอร์คลอริก 8.14 N ปริมาตร 3.625 มล ใช้แท่งแก้วคนให้ทั่ว นาน 5 นาที คนเป็นครั้งคราว นาน 15 นาที เติมน้ำกลั่น 8 มล นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนของเหลวลงในขวดปริมาตรขนาด 50 มล ระวังอย่าให้ตะกอนลงไป ตะกอนที่เหลือให้ทำซ้ำในขั้นตอนตั้งแต่เติมกรดเปอร์คลอริกอีกครั้ง นำสารสกัดที่สกัดได้ไปปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 50 มล จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองและเก็บในขวดพลาสติก

การวิเคราะห์แป้ง โดยวิธี Anthrone ของ JSPN (1990)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 มก ต่อลิตร
2. เจือจางสารสกัดที่ได้จากกากพืชอบแห้ง ปริมาตร 25 เท่า
3. นำสารละลายที่เจือจางได้มา 2.5 มล ใส่ในหลอดเซนต์ปีวส์ที่ตั้งไว้ในกล่องน้ำแข็ง
4. เติมสารละลาย แอนโธรน 5 มล
5. ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น แล้วรีบนำลงไปในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C นาน 7.5 นาที
6. นำไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมิ
7. นำออกมาตั้งไว้รอจนกระทั่งอุณหภูมิใกล้เคียงอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร
8. ค่าที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน แล้วแทนค่าลงในสูตรหาความเข้มข้นของแป้ง

ปริมาณแป้ง (มก ต่อลิตร) (X) = ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐาน $\times 0.9$

$$\text{ความเข้มข้นของแป้งต่อน้ำหนักแห้ง} = \frac{X \times F \times d}{1000 \times D} \text{ มก/ กรัม น้ำหนักแห้ง}$$

X = ความเข้มข้นของแป้ง (มก ต่อลิตร)

F = ปริมาตรที่ใช้ในขั้นตอน hydrolysis

d = จำนวนเท่าที่เจือจาง

D = น้ำหนักแห้งที่นำมาสกัด (ก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก 5

ตารางภาคผนวก 1 องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารในการทดลองที่ 2

Tr	N	P	K	NH ₄ NO ₃ (ก/ล)	CaNO ₃ (ก/ล)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (ก/ล)	KNO ₃ (ก/ล)	KCl (ก/ล)
1	100	50	100	13	17	18.5	13	9.5
2	100	50	200	2.6	17	18.5	39	9.5
3	100	50	300	2.6	17	18.5	39	28.5
4	100	70	100	10.3	17	26	13	9.5
5	100	70	200	0	17	26	39	9.5
6	100	70	300	0	17	26	39	28.5
7	200	50	100	41.4	17	18.5	13	9.5
8	200	50	200	31.2	17	18.5	39	9.5
9	200	50	300	31.2	17	18.5	39	28.5
10	200	70	100	34.8	34	26	13	9.5
11	200	70	200	28.6	17	26	39	9.5
12	200	70	300	28.6	17	26	39	28.5

องค์ประกอบของสารละลายธาตุอาหารในการทดลองที่ 2 ที่เพิ่มเข้าไปในทุกกรรมวิธี

MgSO ₄ ·7H ₂ O	25	ก/ล (กรัม/ลิตร)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50	ก/ล
H ₃ BO ₃	0.022	ก/ล
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.05	ก/ล
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.019	ก/ล
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.003	ก/ล
(NH ₄) ₆ Mo7H ₂ O	0.005	ก/ล
FeEDTA	0.146	ก/ล

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

นางสาววัชรภรณ์ ชนะเคน

วัน เดือน ปี เกิด

5 สิงหาคม พ.ศ. 2522

ประวัติการศึกษา

- สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษา โรงเรียนปิยะมหาราชาลัย
ปีการศึกษา 2538
- สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษา โรงเรียนปิยะมหาราชาลัย
ปีการศึกษา 2540
- สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการเกษตร)
สาขาพืช มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปีการศึกษา 2544

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้

3 หมู่ 7 ถนนชยางกูร ตำบลคอนนางหงส์
อำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม 48110

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved