บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.เครื่อง electrothermal atomic absorption spectrometer (ETAAS)
Spectra AA 220Z,VARIAN,U.S.A

2. เตาอบ รุ่น 1375 GX Sheldon manusactur,Inc,U.S.A

3.เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น TE214S,Germany

4. Hot plate Fisher scientific , U.S.A

5. pH-meter HANNA INSTRUMANTS,MAURITIUS

6. ไมโครปิเปต RAININ,U.S.A ขนาด 2 ml

7. บีกเกอร์

8.ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 ml

9. ปิเปต 1.0 และ 10.0 ml

10.กระจกนาฬิกา

11. กรวยกรอง

12. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 ขนาด 55 mm

13. ขวดปรับปริมาตร 25,50,100,250 ml

14.ครกบด (motar)

15. ขวด polyethylene

16.ช้อนตักสาร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2 สารเคมี

1.Vanadium Oxide (V_2O_5) , Guarantee analysis ,Germany

2.Hydrochloric (HCl) 37 % , AR Merck ,Germany

3.Nitric acid (HNO_3) 65 % , AR Grade,Fluka,Austria

4. ปุ๋ยสูตร 16-20-0 (ใส่เมื่อต้นข้าวหลังปลูก 20 และ 45 วัน)

3.3 **สภาวะของเครื่อง** Electrothermal atomic absorption spectrometer (ETAAS) **ที่ใช้ในการวิเคราะห์**

ตารางที่ 3.1 สภาวะของเครื่องที่ ETAAS ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวานาเดียม

สภาวะของเครื่อง GFAAS ในการหาปริมาณวานาเดียม	รายละเอียด
Wavelength (nm)	318.5 nm
Lamp current (mA)	20.0 mA
Slit width (nm)	0.5R nm
Background correction	Bc Off
Measurement Mode	PROMT Area
Smoothing	20 point

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงสภาวะที่เหมาะสม ในกระบวนการทำให้ธาตุวานาเดียมแตกตัวเป็นอะตอมอิสระด้วยเทคนิค Electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS)

Step no.	Temp (^{o}C)	Time (sec)	Argon Gas Flow (L/min)	Step
1	85	5.0	0.5	Drying
2	95	40.0	0.5	
3	120	10.0	0.5	
4	1000	5.0	0.5	Ashing
5	1000	1.0	0.5	
6	1000	2.0	0	
7	2700	1.3	0	Atomization
8	2700	2.0	0	
9	2700	2.0	0.5	Tube cleaning

3.4 การเตรียมดินก่อนปลูก

บริเวณที่ปลูกข้าวใช้แปลงนาข้าวของศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อ.วังทอง จ.พิษณุโลก โดยทำแปลงย่อยขนาด 3×4 เมตร จำนวน 20 แปลงย่อย แล้วทำการกำหนด Treatment ลงแปลงย่อยโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT Version 93 จาก International RICE Research Institute ซึ่งให้ ชุดที่ 1 (Control) คือ ไม่มีการใส่วานาเดียมลงไปในแปลงนาข้าว ส่วนชุดที่ 2 (T_2) ชุดที่ 3 (T_3) ชุดที่ 4 (T_4) และ ชุดที่ 5 (T_5) มีการใส่วานาเดียมที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 ppm. และ มีการเติมปุ๋ยสูตร 16:20:0 (N:P:K) ลงไปในแปลงนาข้าวหลังปลูก 30 วัน ปริมาณ 0.13 กิโลกรัม/แปลง และแปลงนาข้าวหลังปลูก 60 วัน ปริมาณ 0.06 กิโลกรัม/แปลง แบบหว่านโดยตรงลงในแปลงปลูกข้าวแต่ละแปลง แล้วทำการวัด pH ดินก่อนปลูก และดินหลังปลูก 30 60 90 100 110 และ 119 วัน

ตารางที่ 3.3 การศึกษาปริมาณการสะสมวานาเดียมในข้าวต้นอ่อนพันธุ์ กข 47 ด้วยเทคนิค Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry โดยสุ่มแปลงปลูกข้าวด้วยโปรแกรมทางสถิต IRRISTAT Version 93 จาก International RICE Research Institute (T= Treatment R= Replicate)

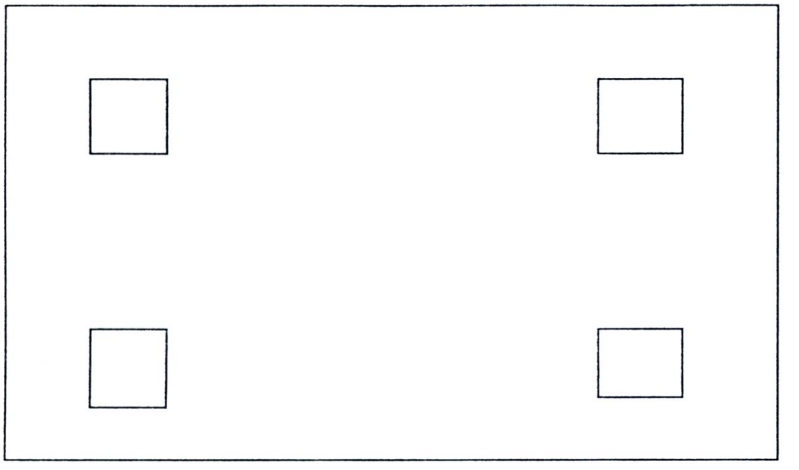
T_2R_3	T_1R_4
T_3R_3	T_3R_4
T_5R_3	T_4R_4
T_1R_3	T_5R_4
T_4R_3	T_2R_4
T_5R_1	T_3R_2
T_4R_1	T_5R_2
T_3R_1	T_1R_2
T_2R_1	T_2R_2
T_1R_1	T_4R_2

3.5 การเตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวก่อนปลูก

นำเมล็ดพันธุ์ข้าว กข 47 จากศูนย์วิจัยข้าวจังหวัดพิษณุโลก แช่น้ำไว้ 2 คืน แล้วนำมาห่อด้วยผ้าข้าวบางที่ชุ่มน้ำอีก 1 คืนเพื่อให้รากงอก หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวไปหว่านในแปลงเพาะต้นกล้านาน 22 วัน ต้นกล้าโตเต็มที่พร้อมที่จะนำไปปักดำ

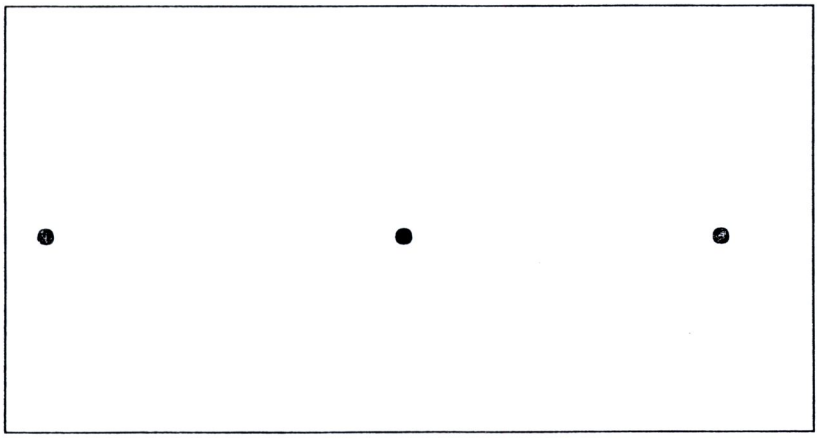
3.6 การปลูกข้าว ฉีดพ่นสารวานาเดียมและการเก็บตัวอย่าง

1. นำต้นกล้าอายุ 22 วัน มาทำการปักดำในแปลงโดยแต่ละต้นห่างกันประมาณ 20 cm. เมื่อข้าวอายุได้ 30 วัน ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 16-20-0 (N:P:K) (โดยการหว่าน) ปริมาณ 0.13 กิโลกรัม/แปลง เก็บตัวอย่าง 4 ต้น/แปลง (4 จุด จุดละ 1 ต้น) เมื่อข้าวอายุ 60-69 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ประมาณ 0.06 กิโลกรัม/แปลง แล้วทำการเก็บตัวอย่างอีกครั้ง เช่นเดิม เมื่อข้าวอายุ 90 วันทำการฉีดพ่นสารละลายวานาเดียมเนื่องจากดอกข้าวบานเต็มที่หมดทั้งแปลง เก็บตัวอย่างอีก 2 ครั้งเมื่อข้าว 100 และ 110 วัน และเกี่ยวข้าวที่ระยะเวลา 119 วัน



รูปที่ 3.1 จุดสี่เหลียม.คือ ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างข้าวในแปลง

2. เก็บตัวอย่างดินที่แปลงนาข้าวก่อนปลูก หลังปลูก 30 วัน และ 60 วัน โดยเก็บแปลงย่อย แปลงละ 3 จุด



รูปที่ 3.2 จุดสีดำ คือ ตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดิน

3.7 การทดลองและการวิเคราะห์หาธาตุวานาเดียม

3.7.1. การวัดค่า pH ของดิน

นำตัวอย่างดินไปตากลมให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด ชั่งดินมา 1.0 g เติมน้ำกลั่นลงไป 25 ml คนให้ละลายเข้ากันมากที่สุด วัดค่า pH ด้วย pH-meter บันทึกข้อมูล แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (จาก 3 จุดเก็บตัวอย่าง/แปลงย่อย) แต่ละแปลง

3.7.2 **การเตรียมตัวอย่างดินและข้าว**

3.7.2.1 **การเตรียมสารละลาย**

การเตรียมรีเอเจนต์สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณการสะสมของวานาเดียมในตัวอย่างดินและข้าว โดยเตรียมกรดไนตริกเข้มข้น ผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ในอัตราส่วน (3:7)

3.7.2.2 **การเตรียมตัวอย่างโดยการย่อยแบบเปียก** (Wet digestion)

เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry จึงต้องมีการเตรียมสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปของสารละลายดังนี้

3.7.2.3 **การเตรียมสารละลายแบลงค์**(Blank solution)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (สารละลายแบงค์) มีขั้นตอนในการเตรียยมสารละลายเช่นเดียวกันกับการย่อยแบบเปียก แต่จะไม่มีการใส่ตัวอย่างข้าว นำไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 7 ml และกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 3 ml (โดยอ้างวิธีการย่อยตัวอย่างดินจาก Casarett และคณะ (1980) .*Toxicology*.2 nd ed. New York: Macmilan Publishing) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยกระจกนาฬิกาแล้วนำไปให้ความร้อนบนเครื่องให้ความร้อน(Hot plate)อุณหภูมิประมาณ 70-80 C ประมาณ 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 – 5 ml ปรับปริมาตรให้เป็น 25 ml แล้วนำไประเหยเอากรดออกให้เหลือปริมาตร 1-3 ml แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วเก็บไว้ในขวดพลาสติก (Polyethylene)เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.7.2.4 **การเตรียมตัวอย่างดิน**

ชั่งตัวอย่างดิน 0.5000 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่เติมสารละลาย(Reagent A) กรดไนตริกเข้มข้น ผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ในอัตราส่วน (3:7) 10.0 ml ปิดด้วยกระจกนาฬิกา แล้วนำไปย่อยบนเครื่องให้ความร้อน (Hot plate)อุณหภูมิประมาณ 70-80 C เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 5 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 – 5 ml ปรับปริมาตรเป็น 25 ml แล้วนำไประเหยเอากรดออกให้เหลือปริมาตร 1-3 ml หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วเก็บไว้ในขวดพลาสติก (Polyethylene)เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.7.2.5 **การเตรียมตัวอย่างข้าว**

ชั่งตัวอย่างส่วนต่างๆของข้าว (ราก , ลำต้น , ใบ) ที่ตัดละเอียด มาประมาณ 0.2000 g ใส่ในขวดรูปชมพู่เติมสารละลาย (Reagent A) 10 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยกระนาฬิกานำไปย่อยบนเครื่องให้ความร้อน (Hot plate) โดยให้ความร้อนอุณหภูมิประมาณ 70-80 C เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 5 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 – 5 ml ปรับ

ปริมาตรให้เป็น 25 ml นำไประเหยกรดออกให้เหลือปริมาตร 1-3 ml แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml แล้วเก็บไว้ในขวดพลาสติก(Polyethylene)เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.8 การหาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ETAAS

3.8.1 การหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Detection limit)

ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน(สารละลายแบงค์)มา 1 ตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำจำนวน 10 ครั้ง นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ ดังสมการ

$$D.L. = 3x\ SD_{blank} / Slope$$

เมื่อ

D.L. คือ ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ (Detection limit)

SD_{blank} คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณแบลงค์

Slope คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน

3.8.2 การหาร้อยละการกลับคืน (% Recovery)

การหาร้อยละการกลับคืน (% Recovery) หลังจากการวิเคราะห์ ให้เตรียมสารละลายตัวอย่าง จาก ดิน และข้าวทั้งหมด 4 ความเข้มข้น มาทำการย่อยโดย ตามขั้นตอนดังนี้

ทำการชั่งตัวอย่างดิน 0.5000 g และตัวอย่างข้าว 0.2000 g ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 25 mL โดยขวดลำดับที่ 2,3,4 เติมสารละลายมาตรฐานวานาเดียม ที่ความเข้มข้น1,3,4 ppm ปริมาตร 1 mL และเติม reagent A 10 mL แล้วนำไปย่อยบนเครื่องให้ความร้อน(Hot plate)อุณหภูมิประมาณ 70- 80 C เวลา 30 นาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 ปรับปริมาตรให้เป็น 20 mL แล้วไประเหยเอากรดออกให้เหลือปริมาตร 2-3 mL หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 mL เก็บไว้ในขวดพลาสติก (Polyethylene) (อย่างน้อยความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ) การหาร้อยละการกลับคืนหาได้จากสมการ

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้} - \text{ความเข้มข้นเดิมในตัวอย่าง}}{\text{ความเข้มข้นที่เติมลงไป}} \times 100$$

3.8.3 การคำนวณหาร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percent Relative Standard Deviation : %RSD)

ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่หาได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ นี้มักจะแสดงเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation : SD)

การหาความแม่นยำโดยหาค่า %RSD อาจจะหาได้จากการวิเคราะห์ CRM หรือทำการ recovery ก็ได้ ซึ่งอ้างจากเอกสาร

$$\%\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ

%RSD = เปอร์เซ็นต์ของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percent Relative Standard Deviation)

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยเบี่ยงเบนมาตรฐาน