

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 1) Gas chromatography spectrophotometer (GC-FPD), Agilent Technologies, model 6890N (G1540N)
- 2) High Performance Liquid Chromatography (HPLC-Post column derivitizer), Agilent Technologies, model 1100, Pickering PCX 5200
- 3) rotary evaporator
- 4) shaker
- 5) pH meter
- 6) centrifuge

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

- 1) nylon filter membrane
- 2) microsyring
- 3) column: LC-18
- 4) column (WCOT fused silica)
- 5) สารมาตรฐานในกลุ่ม organophosphate
- 6) สารมาตรฐานในกลุ่ม carbamate
- 7) สารมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำส้มควันไม้
- 8) carrier gas (แก๊ส He, N₂ 99.99%)
- 9) ethhyl acetate
- 10) acetonitrile (CH₃CN: HPLC grade)
- 11) methanol (HPLC grade)
- 12) sodium sulfate anhydrous
- 13) acetone
- 14) hexane (HPLC grade)
- 15) potassiumpermanganate
- 16) isopropanol
- 17) acetaldehyde
- 18) isoamyl alcohol

- 19) furfural
- 20) isobutanol
- 21) phenol
- 22) propanol
- 23) sodium hydroxide
- 24) potassium hydrogen phthalate
- 25) sodium carbonate
- 26) น้ำส้มควันไม้
- 27) Folin-Ciocalteu's reagent
- 28) sodium chloride
- 29) dichloromethane
- 30) syring filter nylon
- 31) Sep-Pak NH₂
- 32) Na₂SO₄
- 33) MgSO₄ anhydrous
- 34) ฟริก
- 35) ดิน

3.3 ขั้นตอนการทดลอง

1) การศึกษาสมบัติทางกายภาพของน้ำส้มควันไม้

สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ จุดเดือด ค่า pH สีและกลิ่น โดยน้ำส้มควันไม้ได้จาก
บริษัทผู้ผลิตน้ำส้มควันไม้ที่มีขายในท้องตลาด อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

2) การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำส้มควันไม้

2.1) เตรียมตัวอย่างน้ำส้มควันไม้โดย ปิเปตต์น้ำส้มควันไม้มา 5 cm³ ใส่ลงในขวดวัด
ปริมาตรขนาด 25 cm³ เติมน้ำละลาย pentanol 2.5 cm³ แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

2.2) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของ methanol, isopropanol, acetaldehyde, ethyl
acetate, isoamyl alcohol, furfural, isobutanol, phenol และ propanol ที่ความเข้มข้น 3, 5, 1, 5, 5, 1,
3, 3, และ 5 mg/l ตามลำดับ

2.3) นำสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างน้ำส้มควันไม้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas
chromatography spectrophotometer (GC-FPD), Agilent Technologies, model 6890N (G1540N)
ด้วยสภาวะเครื่อง ดังนี้

Injection temperature : 210 °C

Column flow rate : 1.1 ml/min

Column temperature	: 80 °C, hold 5 min
	: 150 °C at 5 °C, hold 10 min
	: 200 °C at 5 °C, hold 10 min
Carrier gas	: N ₂
Detector	: FID/ 210 °C

2.4) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

(1) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนอลิกเข้มข้น 1,000 mg/l โดยชั่งกรดแทนนิกมา 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 cm³

(2) เตรียมสารละลายมาตรฐานฟีนอลิกที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 250 และ 500 ppm โดยปิเปตต์สารละลายมาตรฐานฟีนอลิกมา 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 และ 5.0 cm³ ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 cm³ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

(3) ปิเปตต์น้ำกลั่นมา 60 cm³ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 cm³ เติมสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก 1 cm³ ลงไป

(4) เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's reagent ลงไป 5 cm³ เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตลงไป 15 cm³ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 cm³ ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

(5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank

(6) นำตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้มาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ตามข้อ (3)–(5) โดยใช้ตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้แทนสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก

(7) นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวอย่างน้ำส้มคว้นไม้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานฟีนอลิก

3) การตรวจการใช้อย่างเหมาะสมในการปลูกพริกของเกษตรกรในพื้นที่บ้านหัวเรือ ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี โดยสำรวจชนิดของยาฆ่าแมลง ความถี่และปริมาณการใช้ โดยใช้แบบสอบถาม (ภาคผนวก ก)

4) การเก็บตัวอย่างดิน

4.1) เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพริกทั้งแปลงทดลองและแปลงควบคุมทั้งดินก่อนปลูก ระหว่างปลูกและหลังปลูกพริก โดยเก็บตัวอย่างดินที่ 2 ระดับ คือ ดินบน (0-5 cm) กับดินล่าง (15-30 cm) ณ สวนพริกบ้านหัวเรือ หมู่ 3 ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

4.2) ใช้เครื่องเก็บตัวอย่างดิน (core sampling) สุ่มเก็บตัวอย่างดินให้ทั่วในแต่ละแปลงโดย สุ่มแบบซิกแซก (zigzag) เก็บดินในพื้นที่ 1 ไร่ จำนวน 10 จุด คือดินบน (0-5 cm) 5 จุดกับดินล่าง (15-30 cm) 5 จุด

4.3) นำดินที่ได้ในแต่ละจุดที่ระดับความลึกเดียวกันในแปลงเดียวกันมารวมกันเพื่อใช้ เป็นตัวแทนของดินในแปลงนั้น

4.4) นำตัวอย่างดินมาผึ่งให้แห้งในที่ร่มประมาณ 1 สัปดาห์ โดยเกลี่ยตัวอย่างดินลงใน ภาชนะที่สะอาด

4.5) นำตัวอย่างดินที่แห้งมาผ่านตะแกรงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร

4.6) การคลุกเคล้าดินให้เข้ากันการแบ่งดินออกเป็น 4 ส่วน เท่าๆ กัน (ภาพที่ 3.1 ก) นำ ตัวอย่างดิน 2 ส่วนรวมกัน (ภาพที่ 3.1 ข) เก็บตัวอย่างในภาชนะที่สะอาด เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.1 การสุ่มตัวอย่างดินสำหรับวิเคราะห์ (ก) การแบ่งดิน (ข) การรวมดิน

5) การหาปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟส และคาร์บาเมตตกค้างในดินและพริกชี้หนูหัวเรือ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟส และคาร์บาเมตที่ตกค้างในดินและพริกชี้หนูหัวเรือทำโดยวิเคราะห์ตัวอย่างดินก่อนปลูกพริก และตัวอย่างพริกชี้หนูหัวเรือ ซึ่งเป็นสถานะที่เกษตรกรทำการปลูกและฉีดยาฆ่าแมลงด้วยความถี่ตามปกติ การวิเคราะห์หาสารฆ่าแมลงตกค้างในดินและพริก สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟสวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography spectrophotometer (GC-FPD), Agilent Technologies, model 6890N (G1540N) และคาร์บาเมตวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC High Performance Liquid Chromatography (HPLC-Post column derivitizer), Agilent Technologies, model 1100, Pickering PCX 5200

5.1) ขั้นตอนการสกัดสารฆ่าแมลงจากพริก

(1) สุ่มตัวอย่างพริกจากแปลงทดลองและแปลงควบคุม ณ สวนพริกบ้านหัวเรือ หมู่ 3 ตำบลหัวเรือ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี สุ่มแบบ zigzag แปลงละ 5 จุด นำพริกที่ได้ในแปลงเดียวกันมารวมกันเพื่อใช้เป็นตัวแทนของพริกในแปลงนั้น สุ่มอีกครั้งโดยแบ่งพริกออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน นำตัวอย่างพริก 2 ส่วนรวมกันเก็บเพื่อวิเคราะห์ต่อไป (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างพริกที่สุ่มเก็บ

(2) ชั่งตัวอย่างพริกมา 25 ± 0.05 g เติม แอซีโตน 200 ml คนให้เข้ากันด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที เติมโซเดียมคลอไรด์ 30 g และไดคลอโรมีเทน 150 ml ผสมให้เข้ากันอีกครั้งประมาณ 1-2 นาที โดยนำไป homogenizer ที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบ/นาที กรองสารละลายที่ได้ผ่าน Na_2SO_4

(3) นำสารละลายที่ได้ไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ปรับปริมาตรด้วย เอทิลเอซิเตต (กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟส) นำไปใส่ในขวด vial เพื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง GC-FPD

(4) แบ่งสารจากกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟสใส่ใน tube แล้วนำไปประเหยจนแห้ง ปรับ ปริมาตรด้วย 1% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนโดยผ่าน Sep-Pak NH₂ นำไปประเหยจนแห้งอีกรอบ

(5) ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล:น้ำปราศจากไอออน (DI) (1:1) นำสารละลายตัวอย่างที่ ได้กรองผ่าน syring filter Nylon 0.2 μm หรือ 0.4 μm PTFE ใส่ในขวด vial สีชานำไปฉีดด้วย เครื่อง HPLC-pickering

5.2) ขั้นตอนการสกัดสารฆ่าแมลงจากดิน

(1) ชั่งตัวอย่างดินมา 10 g เติมน้ำปราศจากไอออน เติม acetonitrile 10 ml เขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 1 นาที

(2) เติม MgSO₄ anhydrous 4 g เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง shaker นำไป centrifuge ที่ ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 5 °C

(3) เก็บสารละลายส่วนที่ใสนำไปประเหยจนเกือบแห้งปรับปริมาตรด้วย acetonitrile เติม MgSO₄ anhydrous 150 mg และ PSA (amino-sorbents) 25 mg เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้รอให้ ตกตะกอน

(4) นำสารส่วนที่ได้ไปกรองผ่าน syring filter nylon 0.2 μm นำสารที่ได้ใส่ในขวด vial สีชานำไปฉีดด้วยเครื่อง Gas chromatography spectrophotometer (GC-FPD), Agilent Technologies, model 6890N (G1540N) สำหรับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟส ส่วนสารกลุ่มคาร์ บามาเตไคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC-Post column derivertizer), Agilent Technologies, model 1100, Pickering PCX 5200

6) ผลของน้ำส้มควันไม้ต่อการสลายตัวของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟส และ คาร์ บามาเตไครนและพริกขี้หนูหัวเรือ ทำการศึกษาเหมือนข้อ 3) แต่หลังจากเกษตรกรทำการฉีดยาฆ่า แมลงแล้ว รดด้วยน้ำส้มควันไม้ วิเคราะห์หาปริมาณสารฆ่าแมลงตกค้างทั้งสองกลุ่ม