

บทที่ ๒

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ



การศึกษาการดูดซึมและการกระจายของตะกั่วและสังกะสีในพืชผักบางชนิดใน
วิทยานิพนธ์ มีขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัยดังนี้

การเตรียมพืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลองมี ๒ ชนิดคือ โหระพา (Ocimum basilicum L.) และ
ผักกวางตุ้ง (Brassica chinensis L.)

การเตรียมพืชทดลองทำโดย ล้างเมล็ดพันธุ์ผักกวางตุ้ง และเมล็ดโหระพาด้วย
น้ำกลั่น แช่เมล็ดในน้ำกลั่นนาน ๑๒ ชั่วโมง นำเมล็ดมาเพาะใน vermiculite
รดด้วยน้ำกลั่นให้เปียกจนทั่ว เมื่อดันอ่อนเริ่มออกรดด้วยสารละลายของธาตุอาหารตามสูตร
ของ Hoagland (Dunn and Arditti, 1968) จนอายุครบ ๑๔ วันหลังงอก จากนั้น
ย้ายต้นอ่อนลงปลูกในสารละลายของธาตุอาหารตามสูตรของ Hoagland โดยตรงนาน
๑๕ วัน คัดเลือกต้นที่มีการเจริญเติบโตเป็นปกติและมีขนาดเท่ากันโดยประมาณเพื่อนำไปใช้ในการ
การทดลอง

การเตรียมสารละลายของธาตุอาหารและสารละลายของโลหะหนัก

องค์ประกอบและวิธีเตรียม stock solution ของสารละลายของธาตุอาหาร
ตามสูตรของ Hoagland (Dunn and Arditti, 1968)

เตรียมตะกั่วหรือสังกะสีในรูปของสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง
ตะกั่วหรือสังกะสีกับ chelating agent คือ disodium ethylenediamine-
tetraacetic acid ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) โดยมีองค์ประกอบและวิธีเตรียม Stock
solution ของสารละลายดังนี้

Pb - EDTA ประกอบด้วย Pb ๑๐ มก./มล.

ละลาย disodium ethylenediaminetetraacetate ๑๗.๘๖ กรัมในน้ำ
กลั่นประมาณ ๔๐๐ มล. ละลาย $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ๑๕.๘๔ กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ ๔๐๐ มล.
นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม ๑ ลิตร พ่นอากาศทิ้งไว้ค้างคืน

Zn - EDTA ประกอบด้วย Zn ๕ มก./มล.

ละลาย disodium ethylenediaminetetraacetate ๒๔.๔๗ กรัมในน้ำ-
กลั่นประมาณ ๔๐๐ มล. ละลาย $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ๒๑.๘๔ กรัมในน้ำกลั่นประมาณ ๔๐๐
มล. นำสารละลายทั้งสองมาผสมกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม ๑ ลิตร พ่นอากาศทิ้ง
ไว้ค้างคืน

เตรียมสารละลายของธาตุอาหารให้มีตะกั่วหรือสังกะสีเจือปนอยู่ในความเข้มข้น
๔ ระดับดังตาราง

ระดับความเข้มข้นของโลหะหนัก		มล.ของ stock solution ของสารละลาย	
(ppm.) ในสารละลายของธาตุอาหาร		โลหะหนัก/สารละลายของธาตุอาหาร ๑ ลิตร	
ตะกั่ว	สังกะสี	ตะกั่ว	สังกะสี
๐	-	๐	-
๑	-	๐.๑	-
๑๐	-	๑.๐	-
๑๐๐	-	๑๐.๐	-

ระดับความเข้มข้นของโลหะหนัก มล.ของ Stock Solution ของสารละลาย
(ppm.) ในสารละลายของธาตุอาหาร โลหะหนัก/สารละลายของธาตุอาหาร ๑ ลิตร

ตะกั่ว	สังกะสี	ตะกั่ว	สังกะสี
-	๑	-	๐.๒
-	๑๐	-	๒.๐
-	๕๐	-	๑๐.๐

ปรับ pH ของสารละลายของธาตุอาหารหลังเติมตะกั่วหรือสังกะสีให้เป็น ๖
ด้วยกรดเกลือ ๑ เปอร์เซ็นต์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ๑ เปอร์เซ็นต์

การปลูกพืชทดลองและการเก็บผล

แบ่งพืชทดลองแต่ละชนิดออกเป็น ๒ กลุ่ม กลุ่มหนึ่งใช้ทดลองกับสารละลายของ
ธาตุอาหารที่มีตะกั่ว อีกกลุ่มหนึ่งใช้ทดลองกับสารละลายของธาตุอาหารที่มีสังกะสี โดยแต่ละ
กลุ่มทำการทดลอง ๒ ซ้ำ ใช้พืชทดลอง treatment ละ ๑๒ ต้น

เก็บผลการทดลอง ๔ ระยะคือ ในวันเริ่มต้นการทดลอง หลังการทดลองแล้ว
๑๐ ๒๐ และ ๓๐ วัน โดยเก็บพืชทดลองจาก treatment ละ ๓ ต้นต่อครั้ง

แยกส่วนต้นกับรากของพืชทดลองออกจากกัน ล้างรากด้วยน้ำประปามากเกินพอ
เพื่อให้ส่วนใหญ่ของตะกั่วหรือสังกะสีจากสารละลายที่ติดอยู่ภายนอกรากหลุดออกไปกับน้ำแล้ว
จึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๓ ครั้ง ส่วนต้นและใบล้างด้วยน้ำประปา ๑ ครั้ง และน้ำกลั่น
๓ ครั้ง อบแห้งที่อุณหภูมิ ๘๐ องศาเซลเซียส ๓ วัน นำมาบดด้วยเครื่องบด Wiley Mill
ความถี่ของตะแกรงขนาด ๒๕ mesh

วัดผลการเจริญเติบโตของพืชทดลองโดยการชั่งน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งต่อ ๓ ต้น
แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยต่อต้น และวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วและสังกะสีที่ถูกดูดซึมเข้าไปสะสม
ในส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยวิธี colorimetric dithizone determination (AOAC, 197)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในพืช

ก. สารเคมีที่ใช้

๑. สารละลาย ash acid ประกอบด้วย $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ๔๐ กรัม กับ $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ๒๐ กรัม ละลายในน้ำกลั่นมีปริมาตรรวม ๑๐๐ มล.

๒. สารละลายกรดซिटริก ละลายกรดซिटริกในน้ำกลั่นโดยให้ ๑ มล. ของสารละลาย มีกรดซिटริกอยู่ ๐.๕ กรัม

๓. Stock Solution ของสารละลายไดไฮโซน ละลายไดเฟนิลไฮโอคาร์บาโซน (diphenylthiocarbazone) ในคลอโรฟอร์มโดยให้ ๑ มล. ของคลอโรฟอร์มมีไดเฟนิลไฮโอคาร์บาโซน ๑ มก. stock solution นี้ใช้สำหรับเตรียมสารละลายไดไฮโซนที่เจือจางลง โดยการเติมคลอโรฟอร์มให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

๔. ของผสมแอมโมเนีย-ไซยาไนด์ ประกอบด้วย ๑๐๐ มล. ของสารละลายโพตัสเซียมไซยาไนด์ ๑๐ เปอร์เซ็นต์ กับแอมโมเนียไฮดรอกไซด์เข้มข้นในปริมาณที่จะให้แอมโมเนีย ๑๙.๑ กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม ๕๐๐ มล.

๕. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก-กรดซिटริก ประกอบด้วย ๑๐๐ มล. ของสารละลายกรดซिटริก และ ๕๐ มล. กรดเกลือเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร ๒๕๐ มล.

๖. Stock solution และสารละลายมาตรฐานของตะกั่ว ละลายตะกั่วในเตรต ๑.๕๘๘๕ กรัมในกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ เจือจางให้มีปริมาตร ๑ ลิตร จะได้ stock solution ของตะกั่วซึ่งมีตะกั่ว ๑ มก./มล. นำ stock solution มาเจือจาง ๑๐๐ เท่าด้วยกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ จะได้สารละลายมาตรฐานของตะกั่วที่มีความเข้มข้นของตะกั่วในกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ เป็น ๑๐ ไมโครกรัม/มล.

ข. วิธีเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว

๑. ชั่งพืชที่บดละเอียดแล้วหนัก ๐.๐๐๕-๒.๐๐ กรัม โดยกำหนดให้มีตะกั่วอยู่ประมาณ ๑๐-๑๐๐ ไมโครกรัมต่อตัวอย่าง เเผาในถ้วยเคลือบ (porcelain dish) ในเตาเผา (muffle furnace) ที่อุณหภูมิประมาณ ๓๐๐ องศาเซลเซียส นาน ๓ ชั่วโมง
๒. ทิ้งให้เย็นลง เติมสารละลาย ash aid ๒ มล. ทำให้แห้งด้วย steam bath
๓. เผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ ๔๕๐-๕๐๐ องศาเซลเซียส นาน ๕ ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้เถ้าสีขาว
๔. ทิ้งให้เย็นลง เติมกรดเกลือเข้มข้น ๒ มล. และน้ำกลั่นประมาณ ๑๐ มล. นำไปต้มบน steam bath จนได้สารละลายใสไม่มีสี เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วเทใส่ภาชนะรองรับ ล้างส่วนที่ยังตกค้างอยู่ในถ้วยเคลือบด้วยกรดเกลือเข้มข้น สารละลายกรดเกลือ-กรดซัลฟิวริก และสารละลายแอมโมเนียมซีเตรด ๔๐ เปอร์เซ็นต์อย่างละ ๒ มล. ตามลำดับบน steam bath แล้วล้างตามด้วยน้ำกลั่นอีก ๒-๓ ครั้ง
๕. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกลงในสารละลายที่ได้ ๑๐ มล. จากนั้นเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นทีละน้อย ๆ โดยทำให้สารละลายเป็นอยู่เสมอจนสารละลายมีฤทธิ์เป็นด่างต่อลิตมัส (pH 7.5) แล้วจึงเติมสารละลายโพตัสเซียมไซยาไนด์ ๑๐ เปอร์เซ็นต์ ๕ มล.
๖. ใช้สารละลายไดโรโซนที่มีความเข้มข้นเหมาะสม (๑๖ ๘ หรือ ๔ ppm.) ครั้งละ ๒๐ มล. สกัดแยกตะกั่วออกจากสารละลายโดยเติมลงเขย่ากับสารละลายในกรวยแยกนาน ๒๐-๓๐ วินาที รอให้ของเหลวแยกชั้น ไซของเหลวชั้นล่างออกเก็บไว้ สกัดสารละลายชั้นบนซ้ำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนสารละลายไดโรโซนที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้สกัดแยกตะกั่วไม่เปลี่ยนสี
๗. นำส่วนที่ได้จากการสกัดมาเติมกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ ๒๕ มล. เขย่า ๑ นาที วางทิ้งไว้ให้แยกชั้นนาน ๒-๓ นาที ไซชั้นสีเขียวออกใส่กรวยแยกอีกอันหนึ่งแล้วเติมกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ ๒๕ มล. เขย่า ๑ นาที วางทิ้งไว้ให้แยกชั้นนาน ๒-๓

นาที่ ไซซึนสีเซียวทึง ไซสารละลายในกรวยแยกอันแรกเก็บแล้วไซสารละลายในกรวยแยกอันที่สองล้างกรวยแยกอันแรก จะได้สารละลายของตะกั่วที่มีอยู่ในพืชในรูปที่ละลายอยู่ในกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ปริมาตร ๕๐ มล. ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วตามวิธีเดียวกันกับวิธีทำ standard curve เพื่อหาปริมาณตะกั่ว

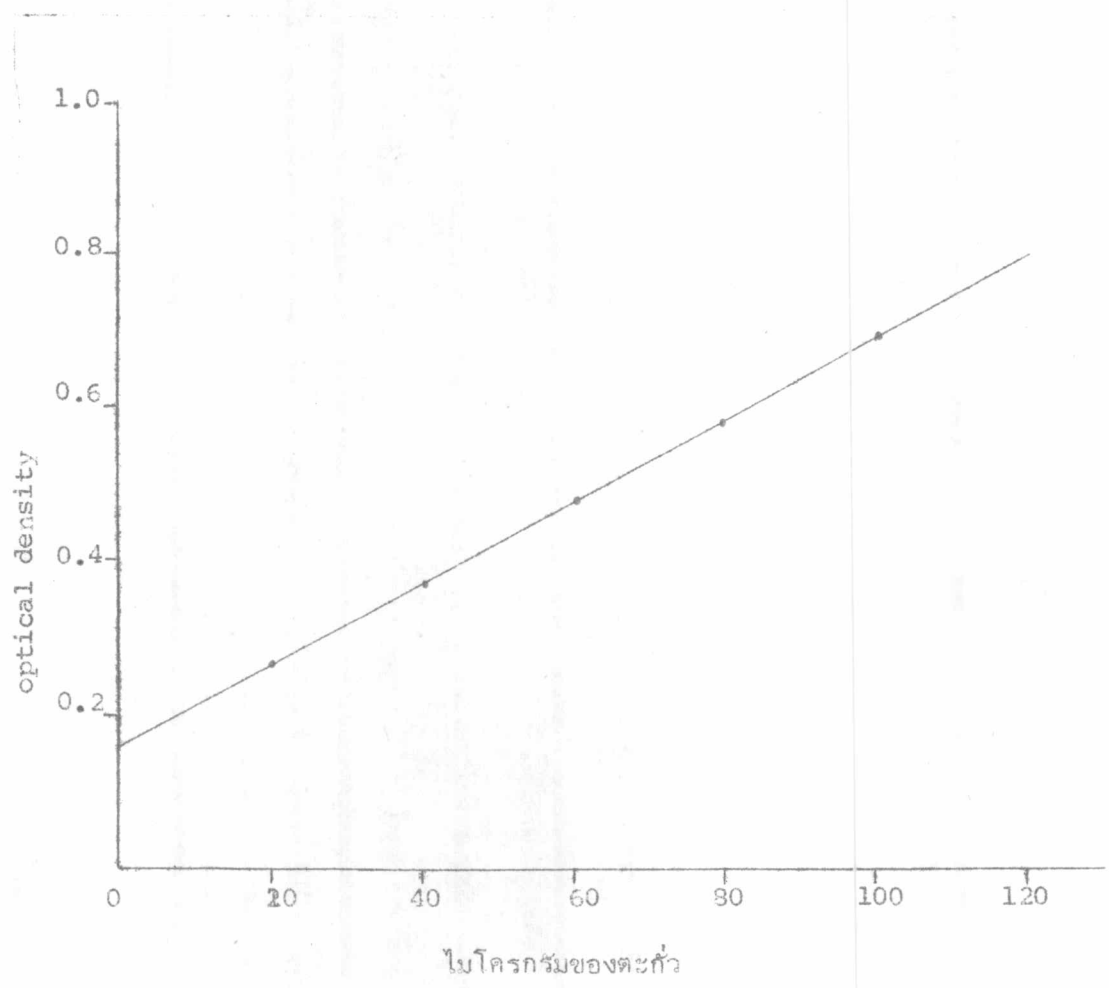
ค. การทำ standard curve ของปริมาณตะกั่ว

๑. นำสารละลายมาตรฐานของตะกั่วมาเจือจางด้วยกรดไนตริก ๑ เปอร์เซ็นต์ ให้มีปริมาณตะกั่วอยู่ในสารละลาย ๐ ๑๐ ๒๐ ๓๐ ๔๐ ๕๐ ๖๐ ๗๐ ๘๐ ๙๐ และ ๑๐๐ ไมโครกรัมตามลำดับ โดยให้มีปริมาตร ๕๐ มล.

๒. เติมคลอโรฟอร์มบริสุทธิ์ ๒-๓ มล. ลงในสารละลาย เขย่า ๓๐ วินาที วางทิ้งไว้ ๒-๓ นาทีให้ของเหลวแยกชั้น ไซซึนคลอโรฟอร์มทึง

๓. เติมของผสมแอมโมเนีย-ไซวาไนค์ ลงในสารละลาย ๑๐ มล. ตามด้วยสารละลายไดไฮโซนที่มีความเข้มข้น ๑๐ ppm. ๓๐ มล. ทันทึ เขย่า ๑ นาที วางทิ้งไว้ ๒-๓ นาทีให้ของเหลวแยกชั้น

๔. ไซของเหลวชั้นล่างออกมาวัดค่า optical density ด้วย spectronic ๘๘ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง ๕๑๐ nanometer โดยใช้คลอโรฟอร์มบริสุทธิ์ตั้งค่า optical density ให้เป็นศูนย์ นำค่า optical density ที่วัดได้มาเขียนเป็น standard curve ได้ดังนี้



Standard Curve ของปริมาณตะกั่ว (๐-๑๐๐ ไมโครกรัม)

จุดตัดของเส้นกราฟบนแกน y มีค่า ๐.๑๕๒๔

ความชันของเส้นกราฟมีค่า ๐.๐๐๔๕

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสีในพืช

ก. สารเคมีที่ใช้

๑. สารละลายทองแดงซัลเฟต ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ๕ กรัมในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม ๑ ลิตร
๒. สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$ ๒๒๕ กรัมในน้ำกลั่นประมาณ ๕๐๐ มล. ทำให้มีฤทธิ์เป็นด่างต่อฟีนอล เรดด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น แล้วเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์อีก ๗๕ มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น ๒ ลิตร ก่อนนำมาใช้จะต้องทำสารละลายที่เตรียมไว้ให้ปราศจากสังกะสีและโลหะอื่นเสียก่อนโดยใช้ดีเพนดิไฮโอคาร์บาโซน คาร์บอนเตตระคลอไรด์และคลอโรฟอร์มเป็นตัวสกัด
๓. สารละลายไตรเมซิลไกลออกไซม์ ละลายไตรเมซิลไกลออกไซม์ ๒ กรัมในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ๑๐ มล. เติมน้ำกลั่น ๒๐๐-๓๐๐ มล. กรองด้วยกระดาษกรองแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น ๑ ลิตร
๔. สารละลายแอลฟา-ไนโตรโซ-เบต้า-เนฟธอล ละลายแอลฟา-ไนโตรโซ-เบต้า-เนฟธอล ๐.๒๕ กรัมในคลอโรฟอร์มให้มีปริมาตรเป็น ๕๐๐ มล.
๕. สารละลายไตรไฮโซน ละลายไตรเพนไฮโอคาร์บาโซน ๐.๐๕ กรัมในแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ๒ มล. กับน้ำกลั่น ๑๐๐ มล. สกัดด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์จนชั้นคาร์บอนเตตระคลอไรด์มีสีเขียวใส กรองส่วนของสารละลายไตรไฮโซน (สารละลายไตรไฮโซนควรเตรียมเฉพาะสำหรับใช้ในแต่ละครั้ง ไม่ควรเตรียมทิ้งไว้นาน ๆ เพราะจะเสื่อมสภาพ)
๖. stock solution และสารละลายมาตรฐานของสังกะสี ละลายสังกะสีบริสุทธิ์ ๐.๕ กรัม ในกรดเกลือที่มีความเข้มข้นประมาณ ๐.๑ นอร์มอล เจือจางด้วยกรดเกลือ ๐.๐๕ นอร์มอลให้มีปริมาตรเป็น ๑ ลิตร จะได้ stock solution ของสังกะสี ซึ่งมีสังกะสี ๐.๕ มก./มล. นำส่วน stock solution มาเจือจาง ๑๐๐ เท่า

จะได้สารละลายมาตรฐานของสังกะสีที่มีปริมาณสังกะสี ๕ ไมโครกรัม/มล.

ข. วิธีเตรียมตัวอย่างพืชเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสังกะสี

๑. ชั่งพืชแห้งที่บดละเอียดแล้วหนัก ๐.๐๑-๒.๐๐ กรัม โดยกำหนดให้มีสังกะสีอยู่ในช่วงไม่เกิน ๒๐ ไมโครกรัมต่อแต่ละตัวอย่าง เติมกรดไนตริกเข้มข้น ๒๐ มล. ลงในถ้วยเคลือบที่มีพืชแห้งอยู่ นำไปเผาบน sand bath ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ ๓๐๐ องศาเซลเซียส
๒. เมื่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรุนแรงเริ่มลดลง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ๒ มล. แล้วเผาต่อ จากนั้นค่อยเติมกรดไนตริกเข้มข้นครั้งละ ๒ มล. เป็นระยะ ๆ เพื่อป้องกันการไหม้ เผาจนสารละลายใสไม่มีสีหรือมีสีจาง ๆ
๓. เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้นลงในสารละลาย ๐.๕ มล. เผาต่อจนควันของกรดเปอร์คลอริกหมดไป ทิ้งให้เย็นลง เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร ๒๐ มล.
๔. หยดเมธิล เรด ๒ หยดลงในสารละลาย เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ๑ มล. และเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นจนสารละลายแสดงฤทธิ์เป็นด่างต่อ เมธิล เรด แล้วจึงเติมกรดเกลือเข้มข้น ๐.๕ มล.
๕. ผ่ากระดาษไฮโดรเจนซัลไฟด์ลงในสารละลายจนเกิดการตกตะกอนขึ้นอย่างสมบูรณ์ กรองตะกอนออกด้วยกระดาษกรอง
๖. ต้มสารละลายบน steam bath นานประมาณ ๓๐ นาที กลิ่นกาซไฮโดรเจนซัลไฟด์จะหมดไป เติมน้ำโบรมีนอิ่มตัว ๕ มล. ต้มต่ออีกประมาณ ๓๐ นาที โบรมีนจะหมดไปจากสารละลาย
๗. ทิ้งให้สารละลายเย็นลง ปรับ pH ของสารละลายให้มีฤทธิ์เป็นกลางต่อฟีนอลเรดด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น แล้วทำให้มีฤทธิ์เป็นกรดเล็กน้อยด้วยกรดเกลือเจือจาง (๐.๐๕ นอร์มอล)

๘. เติมสารละลายแอมโมเนียเมตรต ๕ มล. ลงในสารละลาย และ
เติมสารละลายไดเมทิลไกลออกไซม์ ๒ มล. สารละลายแอลฟา-ไนโตรโซ-เบต้า-เนพธอล
๑๐ มล. เขย่า ๒ นาที ไซของเหลวชั้นล่างทิ้ง สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม ๑๐ มล. ไซชั้น
คลอโรฟอร์มทิ้ง

๙. เติมสารละลายไดไฮโซน ๒ มล. คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ๑๐
มล. ลงในสารละลาย เขย่านาน ๒ นาที วางทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดของเหลวชั้นบนออกทิ้ง
ใช้น้ำกลั่นประมาณ ๒๕ มล. ล้างด้านข้างของกรวยแยกที่บรรจุสารละลายแล้วดูดของเหลว
ชั้นบนทิ้ง

๑๐. เติมกรดเกลือที่มีความเข้มข้น ๐.๐๔ นอร์มอล ปริมาตร ๒๕ มล.
ลงในสารละลายนี้ เขย่า ๑ นาที วางทิ้งให้แยกชั้น ไซของเหลวชั้นล่างทิ้ง นำสารละลาย
ที่เหลือมารีเตราะห์หาปริมาณสังกะสี โดยวิธีเดียวกันกับการทำ standard curve เพื่อ
หาปริมาณสังกะสี

ค. การทำ standard curve ของปริมาณสังกะสี

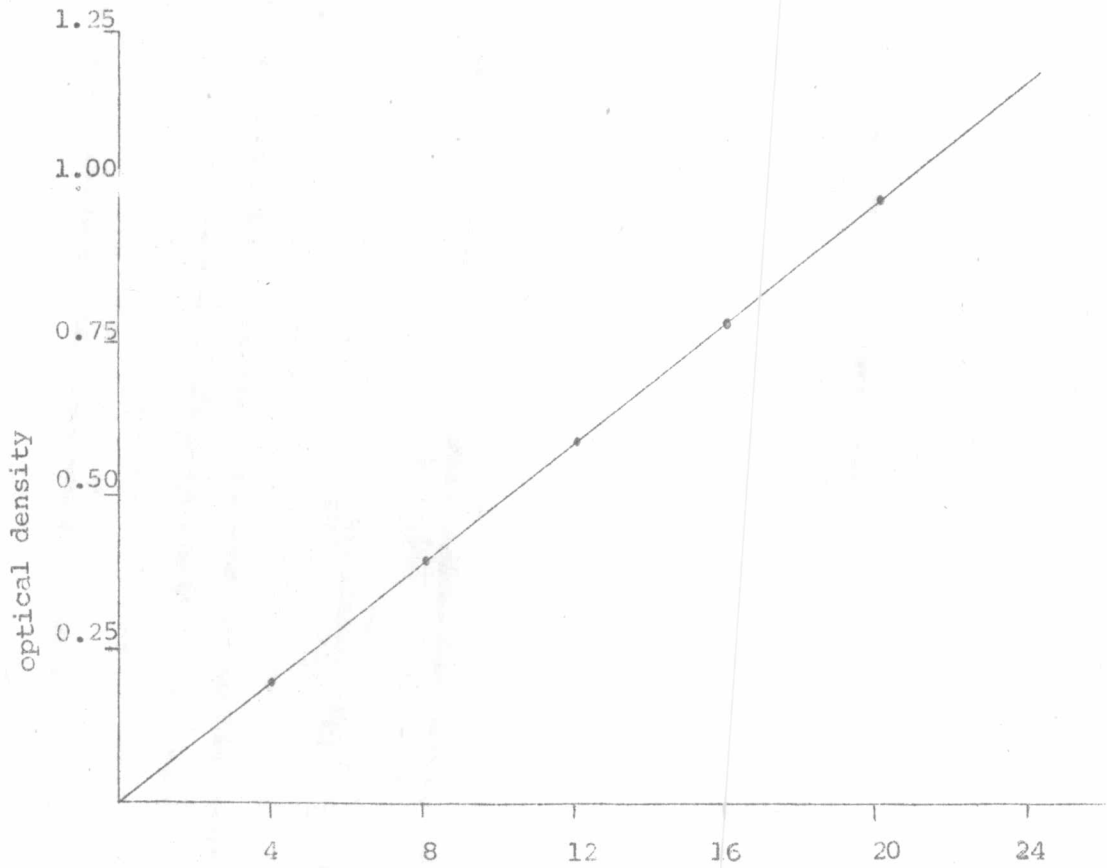
๑. นำสารละลายมาตรฐานของสังกะสีมา เจือจางด้วยกรดเกลือที่มี
ความเข้มข้น ๐.๐๔ นอร์มอล ให้มีปริมาณสังกะสีอยู่ในสารละลาย ๐ ๕ ๑๐ ๑๕ และ
๒๐ ไมโครกรัมตามลำดับ โดยให้มีปริมาตร ๒๕ มล.

๒. เติมซีเตรตบัฟเฟอร์ ๕ มล. และคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ๑๐ มล.
ลงในสารละลาย

๓. เติมสารละลายไดไฮโซน ๒๐ หยดลงในสารละลาย เขย่า ๒ นาที
ทิ้งให้ของเหลวแยกชั้น

๔. นำของเหลวชั้นล่างมา ๕ มล. เจือจางด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์
๑๐ มล.

๕. นำส่วนที่ได้ไปวัดหาค่า optical density ด้วย Spectronic
๘๘ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง ๕๔๐ nanometer โดยใช้
reagent blank ตั้ง optical density ให้เป็นศูนย์ นำค่า optical density
ที่วัดได้มาเขียนเป็น standard curve ได้ดังนี้



ไมโครกรัมของสังกะสี

Standard Curve ของปริมาณสังกะสี (๐-๒๐ ไมโครกรัม)

จุดตัดของเส้นกราฟบนแกน y มีค่า ๐

ความชันของเส้นกราฟคือ ๐.๐๕๐๔