บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatograph)

- Hewlett Packard 5890 Series II ที่มีเครื่องตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector; FID
- Column : BPX 20, 30 m ×0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness

3.1.2 พีเอชมิเตอร์

3.1.3 เครื่องชั่ง

3.1.4 เครื่องให้ความร้อน (hotplate)

3.1.5 กระถางพลาสติก เบอร์ 18

3.1.6 ขวดแก้ว (serum bottle) ขนาด 15 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางและฝาอะลูมินัม

3.1.7 ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 2 ลิตร

3.1.8 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 และ 20 มิลลิลิตร

3.1.9 volumetric pipette ขนาด 1, 2, 5, 10 มิลลิลิตร

3.1.10 บีกเกอร์ ขนาด 25, 150, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.1.11 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร

3.1.12 กระบอกตวง ขนาด 1 ลิตร

3.1.13 กรวยกรอง

3.1.14 แท่งแก้วคน

3.1.15 ลูกยาง

3.1.16 หลอดหยด

3.1.17 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 41

3.1.18 อะลูมิเนียมฟอยล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีสำหรับการวิจัย

3.2.1 สารมาตรฐานบิวตาคลอร์ที่มีความบริสุทธิ์ 99.4 เปอร์เซ็นต์ และสูตรผสมของบิวตาคลอร์ ชนิด 60 เปอร์เซ็นต์ w/v emulsifiable concentrates;EC จากบริษัทมอนซานโต้ ไทยแลนด์ จำกัด

3.2.2 ตัวทำละลายชนิด AR grade ได้แก่ เฮกเซน, อะซีโตน, เอททิลอะซีเตด ของ JT BAKER

3.2.3 สารโพลีเมอร์โพลีไวนิลอะซีเตต จากความอนุเคราะห์ของ บริษัททีพีซี

3.2.4 ขี้ผึ้งพาราฟิน

3.2.5 ตัวดูดซับของแข็ง 4 ชนิด คือ เคโอลิไนต์ จากจังหวัดระนอง มอนต์มอริลโลไนต์ จากจังหวัดลพบุรี ซีโอไลต์ จากจังหวัดลพบุรี และพัมมิช จากจังหวัดลพบุรี

3.3 การเตรียมรีเอเจนต์

3.3.1 ขั้นตอนในการเตรียม secondary standard solution ที่มีความเข้มข้นของบิวตาคลอร์ 24,000 ppm (ส่วนในล้านส่วน w/v) : ปิเปตสูตรผสมของบิวตาคลอร์ (เอ็คโค่) ชนิด 60 เปอร์เซ็นต์ w/v 1 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมอะซีโตนจนครบ 25 มิลลิลิตร

3.3.2 ขั้นตอนในการเตรียม working standard solution ที่มีความเข้มข้นของบิวตาคลอร์ 300 ถึง 4,200 ppm (ส่วนในล้านส่วน w/v) : ปิเปตสารละลายบิวตาคลอร์เข้มข้น 24,000 ppm ตามที่ต้องการ ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยเฮกเซนให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.4 แผนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 ขั้นเตรียมการวิจัย

3.4.1.1 เตรียมสารกำจัดวัชพืชบิวตาคลอร์แบบควบคุมการปลดปล่อย (Tocker,1993) โดยผสมสารเคมีออกฤทธิ์ ขี้ผึ้งพาราฟิน โพลีไวนิลอะซีเตต เข้าด้วยกันในอัตราส่วน สารเคมีออกฤทธิ์ : (ขี้ผึ้งพาราฟิน :โพลีไวนิลอะซีเตต) เท่ากับ 1:1.5 ให้ความร้อนในช่วง 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส เติมตัวดูดซับของแข็งแต่ละชนิดลงไป โดยมีอัตราส่วนของสารเคมีออกฤทธิ์ : (ขี้ผึ้งพาราฟิน :โพลีไวนิลอะซีเตต) : ตัวดูดซับของแข็ง เท่ากับ 1:1.5 :5 จากนั้นกวนจนกระทั่งเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง

3.4.1.2 เตรียมดินใส่กระถาง โดยใช้ดินนา 1 กิโลกรัมต่อกระถาง หว่านสารกำจัดวัชพืชบิวตาคลอร์แบบควบคุมการปลดปล่อยที่เตรียมขึ้นมาลงไปบนหน้าดิน ในอัตราส่วนการใช้สารกำจัดวัชพืช 2 อัตรา คือ ใช้สารเคมีออกฤทธิ์ 180 กรัมต่อไร่ (อัตราแนะนำ) และใช้สารเคมีออกฤทธิ์ 360 กรัมต่อไร่ (สองเท่าของอัตราแนะนำ) ใส่น้ำลงไป 2 ลิตรต่อกระถาง เพื่อให้ระดับน้ำสูงจากหน้าดิน 10 เซนติเมตร ตามคำแนะนำการใช้บิวตาคลอร์ในนาข้าว (กองพฤกษศาสตร์และพืช, 2531)

3.4.1.3 เตรียมสารละลายที่ใช้สกัด (extracting solution) โดยผสมเฮกเซนและเอทธิลอะซีเตด ในอัตราส่วน 1:1 (Gerstl, 1998)

3.4.1.4 สำหรับดินนาที่นำมาใช้ในการทำวิจัย นำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของดินด้วยวิธีวิเคราะห์เชิงกลโดยไฮโดรมิเตอร์ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2526) ในขั้นแรกทำการเตรียมตัวอย่างดิน โดยแช่ตัวอย่างดินด้วย H_2O_2 แล้วร่อนดินในน้ำให้ผ่านตะแกรง 2 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้ดินผง ล้างเกลือที่ได้ออกไปจากดิน ทำให้แห้ง ชั่งตัวอย่างดินผงตามจำนวนที่กำหนดไว้ในวิธีการวิเคราะห์ แล้วทำให้เป็นสารแขวนลอยในน้ำด้วยการใส่สารช่วยการกระจายของอนุภาคดิน (dispersing agent) เช่น calgon solution 5 เปอร์เซ็นต์ (sodium hexametaphophate 50 กรัมและ sodium carbonate 8.3 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรหนึ่งลิตร สารละลายแคลกอนนี้ให้โซเดียมไอออน ซึ่งเป็นตัวช่วยการกระจายของอนุภาคดินเหนียวของดิน) ปั่นสารแขวนลอยดินด้วยเครื่องปั่นระยะเวลาหนึ่ง ถ่ายของผสมที่ได้ลงใน Bouyoucos jar หรือ sedimentation cylinder ให้หมด หย่อนไฮโดรมิเตอร์ลงไปแล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ถึงขีดกำหนดที่ปากของกระบอกตวงเขย่า แล้ววัดด้วยไฮโดรมิเตอร์เมื่อตั้งไว้ 40 วินาที และ 2 ชั่วโมง พร้อมทั้งอ่านอุณหภูมิ ค่าที่อ่านเมื่อ 40 วินาที เป็นปริมาณของกลุ่มขนาดซิลท์ ดินเหนียว และแคลกอนรวมกัน ค่าที่อ่านเมื่อ 2 ชั่วโมงเป็นปริมาณของกลุ่มขนาดดินเหนียวและแคลกอน วิธีนี้อาศัยการเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้กฎของ Stokes โดยตรง เช่น วิธีปิเปต เป็นหลักในการวัดปริมาณด้วยไฮโดรมิเตอร์ กล่าวคือ ก่อนที่จะมีการกำหนดเวลาวัดที่ 40 วินาที และที่ 2 ชั่วโมงนั้น ได้มีการหาปริมาณอนุภาคต่างๆของดินชุดหนึ่งด้วยวิธีปิเปต แล้วใช้ตัวอย่างดินชนิดเดียวกันทดลองวัดด้วยไฮโดรมิเตอร์เพื่อหาอนุภาคในกลุ่มขนาดต่างๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน จากผลการเปรียบเทียบปรากฏว่า ถ้าใช้ไฮโดรมิเตอร์วัดเมื่อ 40 วินาที หลังจากเริ่มปล่อยให้สารแขวนลอยตกตะกอน ค่าที่อ่านได้จากก้านไฮโดรมิเตอร์จะเป็นค่ารวมของปริมาณของกลุ่มขนาดซิลท์รวมกับกลุ่มขนาดดินเหนียว (และแคลกอน) ที่ใกล้เคียงหรือเท่ากันกับที่วิเคราะห์ได้โดยวิธีปิเปต และเช่นเดียวกัน ถ้าวัดเมื่อ 2 ชั่วโมงจะได้ค่าของปริมาณของกลุ่มขนาดดินเหนียวอย่างเดียว (และแคลกอน) ดังนั้นค่าที่อ่านได้จากก้านของไฮโดรมิเตอร์เมื่อหักปริมาณของ

แคลกอน สามารถนำไปคำนวณปริมาณของอนุภาคในกลุ่มขนาดทั้งสามได้โดยใช้โปรแกรมคำนวณสำเร็จรูป

3.4.1.5 แร่ดินเหนียวที่ใช้เป็นตัวดูดซับของแข็งส่งไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเครื่อง X-ray Diffractometer ที่ศูนย์เครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 ขั้นวางแผนการทดลอง

กำหนดการทดลองในการศึกษาอัตราการปลดปล่อยสารเคมีออกฤทธิ์ของสารกำจัดวัชพืชแบบควบคุมการปลดปล่อยที่มีตัวดูดซับของแข็งแตกต่างกัน โดยออกแบบการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดศึกษาอัตราการปลดปล่อยสารเคมีออกฤทธิ์ระหว่างบิวตาคลอร์ที่ใช้กันทั่วไปกับบิวตาคลอร์แบบควบคุมการปลดปล่อยที่เตรียมขึ้นในอัตราการใช้ที่แนะนำ ชุดศึกษาอัตราการปลดปล่อยสารเคมีออกฤทธิ์ระหว่างบิวตาคลอร์ที่ใช้กันทั่วไปกับบิวตาคลอร์แบบควบคุมการปลดปล่อยที่เตรียมขึ้นในอัตราการใช้สองเท่าของที่แนะนำ และชุดศึกษาค่าพีเอช โดยการทดลองนี้ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละหน่วยของการทดลอง

3.4.3 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

การวิจัยนี้เป็นการออกแบบการวิจัย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมาในน้ำกับเวลาที่ผ่านไป ซึ่งหมายความว่าจะทำการเก็บตัวอย่างดินมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคมีออกฤทธิ์ที่ตกค้างในดิน เปรียบเทียบกันระหว่างวันแรกและวันสุดท้ายที่ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเท่านั้น รวมเป็นระยะเวลา 44 วัน

3.4.3.1 เก็บตัวอย่างน้ำจากกระถาง ตามระยะเวลาที่กำหนด ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดซีรัม

3.4.3.2 เติมสารละลายที่ใช้สกัดลงไปในขวดซีรัม ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาทันทีด้วย hycar septum

3.4.3.3 นำขวดซีรัมทั้งหมดมาทำการเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.4.3.4 นำของเหลวชั้นบนที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมา โดยใช้ gas chromatography ภายใต้สภาวะในตารางที่ 3.1 โดยวิธีสร้างกราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้พีกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐานบิวตาคลอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography (GC)

อุณหภูมิ (temperature)	เครื่องตรวจวัด (Detector) 265 องศาเซลเซียส ส่วนฉีดสาร (Injector) 265 องศาเซลเซียส คอลัมน์ (Column) 235 องศาเซลเซียส
อัตราการไหลของก๊าซ (Flow rate of gases)	ฮีเลี่ยม (He) 30 mL/min อากาศ (Air) 430 mL/min ไฮโดรเจน (H_2) 33 mL/min
ระยะเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง (Analysis time)	7 นาที

3.4.3.5 นำพื้นที่ใต้พีกที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมาแล้วตกค้างอยู่ในตัวอย่างน้ำและดิน การคำนวณจะคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ในตัวอย่างในหน่วยส่วนในล้านส่วน ซึ่งเมื่อเทียบหน่วยแล้วจะเท่ากับน้ำหนักของสารต่อน้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่าง คือ ไมโครกรัมต่อกรัม หรือ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างที่เป็นของแข็ง หรือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่างน้ำ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณสารเคมีออกฤทธิ์ที่ตกค้างในตัวอย่าง} = \frac{W_{sample} \times V_{total}}{V_{sample} \times W}$$

w_{sample} = ปริมาณของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ตกค้างในตัวอย่างที่อ่านจาก calibration curve (ไมโครกรัม)

V_{total} = ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_{sample} = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้าเครื่อง (ไมโครลิตร)

W = ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร) หรือ น้ำหนักของตัวอย่างดิน (กรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3.6 เก็บตัวอย่างดินตามระยะเวลาที่กำหนด โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม 5 จุดทั่วพื้นที่ นำมาผึ่งให้แห้งแล้วอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมอะซีโตนปริมาณ 30 มิลลิลิตรลงไป ปิดปากขวดแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3.7 ปิเปตสารละลายจากขวดเก็บตัวอย่างดิน ปริมาณ 5 มิลลิลิตรลงในขวดซีรัม เติมสารละลายที่ใช้สกัดลงไปในขวดซีรัม ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาทันทีด้วย hycar septum

3.4.3.8 ทำตามขั้นตอนที่ 3.4.3.3 ถึง 3.4.3.5

3.4.3.9 การทดลองในชุดควบคุมทำตามขั้นตอนที่ 3.4.3.1 ถึง 3.4.3.5 แต่เป็นสารกำจัดวัชพืชบิวตาคลอร์ที่ใช้ในทางการค้า

3.4.4 ชุดศึกษาค่าพีเอชที่ใช้ คือ 5, 7 และ 9 เลือกสารกำจัดวัชพืชแบบควบคุมการปลดปล่อยที่เตรียมขึ้นจากตัวดูดซับของแข็งชนิดที่มีอัตราการปลดปล่อยดีที่สุด มาทำการแช่น้ำที่ค่าพีเอชต่างๆตามที่กำหนด เก็บตัวอย่างน้ำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละวัน ตามขั้นตอนที่ 3.4.3.3 ถึง 3.4.3.5

3.4.5 ทำการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมาจากบิวตาคลอร์ที่ใช้ในทางการค้ากับบิวตาคลอร์แบบควบคุมการปลดปล่อยที่มีตัวดูดซับของแข็งต่างชนิดกัน โดยใช้

3.4.5.1 ANOVA ในการวิเคราะห์หาความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมา

3.4.5.2 Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออก