

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองเปรียบเทียบคุณภาพของกาแฟที่มีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์กับปุ๋ยเคมี โดยวางแผนการทดลองเป็นแบบ randomized complete block design (RCBD) ประกอบไปด้วยกรรมวิธีทดลอง 3 กรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีการใส่ปุ๋ย

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีตามกรรมวิธีที่เกษตรกรใช้

ครั้งที่ 1 ปลายเดือนพฤษภาคม – มิถุนายน ปุ๋ยสูตร 27-0-0 ปริมาณ 120 ก/ตัน

ครั้งที่ 2 เดือนสิงหาคม ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปริมาณ 120 ก/ตัน

ครั้งที่ 3 เดือนตุลาคม ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปริมาณ 120 ก/ตัน

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ตามกรรมวิธีที่เกษตรกรใช้

ครั้งที่ 1 ปลายเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ 7 กก/ตัน

ครั้งที่ 2 เดือนสิงหาคม ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ 7 กก/ตัน

ครั้งที่ 3 เดือนตุลาคม ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ 7 กก/ตัน

โดยบล็อก 3 บล็อกคือระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 600 700 และ 800 เมตร ในแต่ละระดับชั้นความสูงหรือในแต่ละบล็อกได้มีกรรมวิธีทั้ง 3 กรรมวิธี ซึ่งข้อมูลของแต่ละกรรมวิธีหรือแต่ละบล็อกได้ทำการสุ่มต้นกาแฟ 4 ต้นจากภายในพื้นที่ 200 ตารางเมตร

การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาณธาตุอาหารในดินก่อนและหลังการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดินสุ่มเก็บตัวอย่างดินแปลงกาแฟที่ทำการทดลองซึ่งเป็นดินล่าง 15-30 เซนติเมตร บรรจุในถุงพลาสติก

1.1 pH โดยใช้ pH meter (Peter, 2000)

1.1.1 วิธีการวิเคราะห์

pH ของดิน โดยชั่งดินตัวอย่างที่บดและผ่านการร่อนด้วยตะแกรงทองเหลืองขนาด 2 มิลลิเมตรแล้ว
จำนวน 10 กรัมในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร(ตราส่วนของดิน:น้ำ = 1:1) คน
ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH-meter

1.2 Organic Matter (OM) โดยวิธี Walkley and Black (ทศนีย์, 2542)

1.2.1 สารเคมี

1.2.1.1 สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมท ($K_2Cr_2O_7$) 1 N เตรียมโดย
สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส
นาน 2 ชั่วโมงจำนวน 49.04กรัมในน้ำกลั่นเทลงในขวดปริมาตรขนาด
1000 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

1.2.1.2 เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 0.5 N เตรียมโดยสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
140 กรัม ลงในน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15
มิลลิลิตรทิ้งไว้ให้เย็นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.2.1.3 โอฟีแนนโทรลีนเฟอรัสซัลเฟตอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยละลายโอฟี
แนนโทรลีน 1.48 กรัมและเฟอรัสซัลเฟต 0.70 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตร
ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.2.1.4 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)

1.2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.1.2.1 ชั่งตัวอย่างดินที่ร่อนผ่านตะแกรง 0.5 มิลลิลิตรจำนวน 0.5 กรัม ใส่
ในขวดชมพู 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมท
($K_2Cr_2O_7$) 1 นอโมล จำนวน 10 มิลลิลิตรโดยใช้ volumetric pipette เขย่า
ขวดเบาๆจากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นจำนวน 20 มิลลิลิตร ลง
ไปอย่างรวดเร็ว เขย่าขวดชมพูเบาๆ เพื่อให้ น้ำยากับดินผสมเข้ากันดี
ประมาณ 1-2 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ทำปฏิกิริยา 30 นาทีแล้วเติมน้ำกลั่น
50 มิลลิลิตรนำไปไทเทรตกับเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) 0.5 นอโมลโดยหยด
โอฟีแนนโทรลีนเฟอรัสซัลเฟตอินดิเคเตอร์ลงไป 5 หยด เขย่าขวดชมพู
นำไปไทเทรตจนถึงสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลปนแดง
บันทึกปริมาตรที่ใช้แล้วคำนวณหาความเข้มข้นตามสูตร

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้

V_1 = ปริมาตรของ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้

N_2 = ความเข้มข้นของ $FeSO_4$ ที่ใช้ไทเทรต

V_2 = ปริมาตร FeSO_4 ที่ใช้ไทเทรต

และคำนวณหาปริมาณอินทรีย์วัตถุในตัวอย่างดิน โดยใช้สูตร

$$\% \text{ organic carbon} = \frac{(\text{me } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{me } \text{FeSO}_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33 \times \text{MF}}{\text{น้ำหนักดิน(กรัม)}}$$

$$\% \text{ organic matter} = \% \text{ organic carbon} \times 1.72$$

$$\text{MF} = (100 - \% \text{ moisture})/100$$

V = ปริมาตรของ FeSO_4 ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

$N. \text{FeSO}_4$ = ความเข้มข้นจริงของ FeSO_4

0.003 = น้ำหนักของ one equivalent carbon (กรัม)

1.33 = oxidation factor

MF = moisture factor

1.3 Total Nitrogen (N) โดยวิธี Kjeldahl method (พัชรี, 2549)

1.3.1 สารเคมี

1.3.1.1 กรด H_2SO_4 เข้มข้น (98%) LR grade

1.3.1.2 mixed catalyst เตรียมโดย ผสม $\text{K}_2\text{SO}_4 : \text{CuSO}_4 : \text{Se}$ ในอัตราส่วน 100 : 10 : 1 (อัตราส่วนโดยน้ำหนัก)

1.3.1.3 mixed indicator เตรียมโดยละลาย methyl red 0.066 กรัม และ bromocresol green 0.099 กรัม ใน 95% ethanol ประมาณ 80 cm^3 ปรับสีของอินดิเคเตอร์ให้เป็นสีเขียวด้วย 0.1 M NaOH แล้วเติม 95% ethanol จนได้ปริมาตร 100 cm^3

1.3.1.4 สารละลายกรดบอริก และอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยละลาย H_3BO_3 60 กรัม ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1800 cm^3 ใน erlenmeyer flask ขนาด 2000 cm^3 คนด้วยเครื่องคนแม่เหล็กจน H_3BO_3 ละลายหมด เติมอินดิเคเตอร์ผสมในข้อ 3 ลงไป 2.5 cm^3 แล้วปรับปริมาตรเป็น 2000 cm^3

1.3.1.5 สารละลาย 40% NaOH ใส่น้ำกลั่นประมาณ 1800 cm^3 ลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 cm^3 นำไปวางในอ่างน้ำเย็น เพื่อช่วยระบายความร้อน เติม NaOH ลงไปครั้งละ 5-10 กรัม พร้อมทั้งคนให้สารละลายหมดก่อนจึงเติมเพิ่มลง ไปใหม่จนครบ 800 กรัม ทั้งไว้ให้เย็นจึงเติมน้ำกลั่นเพิ่มจนสารละลายมีปริมาตรรวมเป็น 2000 cm^3

1.3.1.6 สารละลายกรด HCl เตรียมโดยปีเปตกรด HCl เข้มข้น (37% ความหนาแน่น 1.19 g/cm^3) 4.14 cm^3 ใส่ใน volumetric flask ขนาด 2000 cm^3 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้กรดความเข้มข้น 0.025 M

1.3.1.7 สารละลายมาตรฐาน tris-(hydroxymethyl) amino methane เตรียมโดยนำสารดังกล่าวไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมงเพื่อไล่ความชื้น จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น ชั่ง tris- มา 0.3028 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 cm^3

1.3.2 วิธีการวิเคราะห์

1.3.2.1 ชั่งดินตัวอย่างละ 2.50 กรัม ใส่ใน digestion tube ระวังอย่าให้ดินเปื้อนด้านข้างหลอด หากดินเปื้อนให้ฉีดน้ำกลั่น เล็กน้อยเพื่อดึงดินลงไปก้นหลอด ระวังอย่าให้ดินแฉะ และใช้หลอดเปล่า 1 หลอดเป็น sample blank

1.3.2.2 เติม mixed catalyst ลงไปประมาณ 2 กรัม

1.3.2.3 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น ลงไป 15 cm^3 แล้วเขย่าหลอดให้ส่วนผสมทั้งหมดคลุกเคล้ากัน

1.3.2.4 นำไปย่อยใน digestion block ค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิจนถึงจุดเดือดของกรด (อุณหภูมิประมาณ 380 องศาเซลเซียส) ย่อยจน ได้สารละลายใส และไม่มีอิมพัลส์เคลือบเม็ดดิน (เม็ดดินไม่ถูกย่อย) จากนั้นย่อยต่อไปอีกประมาณ 30 นาที

1.3.2.6 เติมสารละลายกรดบอริก (เตรียมได้จากข้อ 4) 10 cm^3 ลงใน conical flask ขนาด 250 cm^3 จำนวน 3 ใบ

1.3.2.7 นำตัวอย่างที่ย่อยแล้วจากข้อ 4 ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่น ก่อนเริ่มกลั่น เติมสารละลาย $40\% \text{ NaOH}$ ลงไป 40 cm^3 (เติมจากเครื่องกลั่น) และใช้กรดบอริกจากข้อ 5 จับแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น สีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว

1.3.2.8 นำกรดบอริกที่ได้จากข้อ 6 ไปไทเทรตด้วยสารละลาย 0.025 M HCl จนสีของอินดิเคเตอร์เปลี่ยนกลับไปเป็น สีชมพู ความเข้มข้นของสีจะอ่อนลงกว่าเดิม เนื่องจากอินดิเคเตอร์เจือจางลง

1.3.2.9 ปีเปตสารละลายมาตรฐาน tris 10 cm^3 ใส่ใน conical flask ขนาด 125 cm^3 จำนวน 2 ใบ หยดอินดิเคเตอร์ลงไป 2 หยด แล้วไทเทรตด้วย 0.025 M HCl

ความเข้มข้นที่แท้จริงของ HCl คำนวณได้จาก

$$N_1 = N_2 V_2 / V_1$$

N_1 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของกรด HCl (M)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน tris (M)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน tris (cm^3)

V_1 = ปริมาตรเฉลี่ยของกรด HCl ที่ใช้ในการไทเทรตข้อ 8 (cm^3)

ความเข้มข้นของไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างดินคำนวณได้จาก

$$\% \text{ total N} = 1.4 N_1 V / W$$

N_1 = ความเข้มข้นที่แท้จริงของกรด HCl (M)

V = ปริมาตรของกรด HCl ที่ใช้ในการไทเทรตข้อ 7 (cm^3)

W = น้ำหนักของตัวอย่างดินที่ใช้ (กรัม)

1.4 Total Phosphorus (P) โดยวิธี Bray II (สุวรรณ2555)

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในดิน

1.4.1 สารเคมี

1.4.1.1 น้ำยาสกัด Bray II เตรียมจากสารละลายแอมโมเนียมฟลูออไรด์ (NH_4F) 2.22 กรัมในน้ำกลั่น 1900 มิลลิลิตรเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ลงไป 17 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายเข้ากันทิ้งไว้ให้เย็นปรับค่าความเป็นกรด ด่างให้อยู่ระหว่าง 1.5-1.6 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร

1.4.1.2 สารพัฒนาสี โดยชั่งกรดแอสคอร์บิก 1.5 กรัม ละลายในสารละลายสต็อกแอมโมเนียมโมลิบเดต 100 มิลลิลิตร

1.4.1.3 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 50 ppm ชั่งโพแทสเซียมไดไฮเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.2195 กรัม ที่อบแห้งอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง ละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก 3.5 M 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายนี้ไว้ในขวดแก้ว

1.4.2 วิธีการวิเคราะห์

1.4.2.1 ชั่งตัวอย่างดิน 2.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 125 มิลลิลิตรเติมน้ำยาสกัด Bray II 25 มิลลิลิตรด้วยปิเปต ปิดขวดรูปชมพู่ด้วยจุกยางแล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่า เขย่านาน 1 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์

1.4.2.2 คูณสารละลายที่กรองได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำในขวดวัด ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเขย่า เติมน้ำสารละลายกรดบอริก (H_2BO_3) 15 มิลลิลิตร แล้วเขย่า จากนั้นเติมน้ำผสมในการปรับสี 5 มิลลิลิตร เขย่าให้ สารละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยสารละลายกรดบอริก (H_2BO_3) ให้เป็น 15 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าแล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (mg/kg)

$$\text{Available P} = (\text{mg/kg sample} - \text{mg/kg blank}) \times \frac{25}{V} \times \frac{25}{W_s}$$

เมื่อ mg/kg sample = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน

mg / kg blank = ความเข้มข้นของตัวเปรียบเทียบ

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

Ws = น้ำหนักของตัวอย่างดิน (กรัม)

1.5 Total Potassium (K) โดยวิธี AAS (สุวรรณ 2555)

1.5.1 สารเคมี

1.5.1.1 แอมโมเนียมอะซิเตท (NH_4OAC 1 นอโมล, ค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 7) โดยชั่งแอมโมเนียมอะซิเตท 154.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติมน้ำในขวดปรับปริมาตรขนาด 2 ลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร ปรับค่า ความเป็นกรดต่าง ให้เป็น 7.01 ± 0.05

1.5.1.2 สารละลายมาตรฐาน โพแทสเซียม 1000 ppm โดยชั่งโพแทสเซียม คลอไรด์ (KCl) ที่อบแห้งแล้วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง 1.9066 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

1.5.2 วิธีการวิเคราะห์

1.5.2.1 นำตัวอย่างดินที่สกัดแล้วมาทำให้เจือจาง 10 เท่าด้วยแอมโมเนียมอะซิเตท (NH_4OAC) 1 นอโมล

1.5.2.2 นำเอาตัวอย่างดินและตัวเปรียบเทียบไปวัดหาปริมาณ โพแทสเซียม และโซเดียม ใช้ FES-mode โดยเครื่อง ASS จากนั้นนำมาคำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณโพแทสเซียม} = (\text{mg/kg blank}) \times \frac{25}{\text{ปริมาณทั้งหมด}} \times \frac{1}{\text{น้ำหนักดิน ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้}}$$

1.6 Exchangeable Calcium (Ca) และ Exchangeable Magnesium (Mg) โดยวิธี NH_4OAc pH7/AAS (สุวรรณ,2555)

1.6.1 สารเคมี

1.6.1.1 สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตรต (NH_4OAc) 1 M pH 7.0 ละลาย 1,140 ml glacial acetic acid (99.5%) ใน น้ำกลั่น ประมาณ 16 L เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) เข้มข้น 1,380 ml แล้วเติมน้ำกลั่นจนสารละลายทั้งหมดมีปริมาตรประมาณ 19 L ผสมให้เข้ากันดีแล้วปรับ pH ของสารละลายด้วย NH_4OH หรือ glacialacetic acid ให้ได้ pH เท่ากับ 7.0 จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20 L

1.6.1.2 สารละลายมาตรฐานแคลเซียมเข้มข้น 1000 mg L^{-1} ละลายแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3 , อบที่ 1500°C) 2.498 กรัมด้วยกรดเกลือเล็กน้อยเพียงพอที่ละลาย CaCO_3 หหมดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

1.6.1.3 สารละลายมาตรฐานแคลเซียมเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mg L^{-1} ปีเปิดสารละลายมาตรฐานแคลเซียมเข้มข้น $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ 10 ml ใส่ในขวดปริมาตรและทำให้เป็น 100 ml ด้วยสารละลาย SrCl_2 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ จะได้สารละลายมาตรฐานแคลเซียม 100 mg L^{-1} หลังจากนั้นปีเปิดสารละลายนี้ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 ml ใส่ในขวดปริมาตรและทำให้เป็น 100 มล. ด้วยสารละลาย SrCl_2 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ จะได้สารละลายมาตรฐานแคลเซียมเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 mg L^{-1} ตามลำดับ

1.6.1.4 สารละลายมาตรฐานแมกนีเซียมเข้มข้น 1000 mg L^{-1} ละลายแมกนีเซียม 1.000 g ด้วยกรดเกลือเพียงพอที่ละลายหมดทิ้งไว้ให้เย็นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

1.6.1.5 สารละลายมาตรฐานแมกนีเซียมเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 mg L^{-1} ปีเปิดสารละลายมาตรฐานแมกนีเซียมเข้มข้น 1000 mg L^{-1} 10 ml ใส่ในขวดปริมาตรและทำให้เป็น 100 ml ด้วยสารละลาย SrCl_2 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ จะได้สารละลายมาตรฐานแมกนีเซียมเข้มข้น 100 mg L^{-1} หลังจากนั้นปีเปิดสารละลายนี้ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ใส่ในขวดปริมาตรและทำให้เป็น 100 ml ด้วยสารละลาย SrCl_2 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ จะได้สารละลายมาตรฐานแมกนีเซียมเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 mg L^{-1} ตามลำดับ

1.6.1.6 สารละลายสตรอนเชียมคลอไรด์ (SrCl_2) เข้มข้น $1,500 \text{ mg L}^{-1}$
ละลายสตรอนเชียมคลอไรด์ ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 4.6 g ในน้ำกลั่นและปรับ
ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 L

1.6.2 วิธีการวิเคราะห์

1.6.2.1 ชั่งตัวอย่างที่ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 mmหนัก 5 g ใส่ใน
erlenmeyer flask ขนาด 125 ml

1.6.2.2. เติม 1 M NH_4OAc pH 7.0 ประมาณ 50 ml เขย่าให้เข้ากันดีตั้งทิ้งไว้
ค้างคืน

1.6.2.3. กรองดินโดยใช้ buchner funnel ค่อยๆล้างตัวอย่างดินบนกรวยอีก
3-4 ครั้งด้วย สารละลาย NH_4OAc ครั้งละประมาณ 10 ml

1.6.2.4. นำสารละลายที่กรองได้ปรับปริมาตรเป็น 100 ml เก็บไว้สำหรับ
วิเคราะห์ปริมาณ exchangeable Ca^{++} , Mg^{++} ต่อไป

1.6.2.5. เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายสตรอนเชียมคลอไรด์
 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$

1.6.2.6. วัดค่าความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมของสารละลาย
ตัวอย่างด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer โดยกำหนดความ
ยาวคลื่นในการวัดแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็น 422.6 และ 285.2 นาโน
เมตรตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานมาตรฐานแคลเซียม
และแมกนีเซียม

1.6.2.7. คำนวณหาปริมาณ exchangeable Ca^{++} และ Mg^{++}

วิธีคำนวณ Ca^{++} หรือ Mg^{++} , $\text{cmolc kg}^{-1} = \frac{\text{ค่าที่อ่านได้} (\text{mg L}^{-1}) \times 2 \times \text{df}}{\text{น.น. กรัมสมมูลย์ของ } \text{Ca}^{++} \text{ หรือ } \text{Mg}^{++}}$

น.น. กรัมสมมูลย์ของ Ca^{++} หรือ Mg^{++}

df = dilution factor

2. ปริมาณธาตุอาหารไนโบกาเฟก่อนและหลังการทดลอง

โดยกำหนดจำนวนต้นที่จะเก็บแล้วกำหนดการเก็บใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature leaf) คู่ที่ 3 และ 4

2.1 Total Nitrogen (N)

2.1.1 สารเคมี

2.1.1.1 บอริกแอซิดอินดิเคเตอร์ (boric acid indicator) อินดิเคเตอร์ผสม

โดยละลายบรอมครีโซลกรีน (bromocresol green) 0.5 กรัม และเมทิลเรด
(methyl red) 0.1 กรัม ในเอซิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 100 มิลลิลิตรกรดบอริก (H_3BO_3) โดยละลายกรดบอริก 40 กรัมใน

น้ำร้อน 700 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมอินดิเคเตอร์ผสมปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในกรดบอริก (H_3BO_3) โดยละลายกรดบอริก 40 กรัมในน้ำร้อน 700 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร

2.1.1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40 % โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 400 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.1.1.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4)

2.1.1.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

2.1.2 วิธีการวิเคราะห์

2.1.2.1 การย่อยตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างใบกาแฟที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน วันต่อมานำมาย่อยที่เตาย่อยตัวอย่าง ปรับอุณหภูมิที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำหลอดทดลองขึ้นมาพัก ให้เย็นแล้วเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันนำมาย่อยโดยปรับอุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หากสารละลายยังไม่ใส ให้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำไปย่อยต่อที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำเช่นเดิมจนสารละลายใสหลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืนวันต่อมานำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับวิเคราะห์ต่อไปการกลั่น เปิดเครื่องกลั่นและล้างเครื่องกลั่น 1 ครั้งด้วยน้ำกลั่น

2.1.2.2 เติมบอริกแอซิดอินดิเคเตอร์ประมาณ 15 มิลลิลิตรลงในขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตรนำไปวางไว้ที่ปลายของเครื่องกลั่นโดยให้ปลายจุ่มอยู่ในเติมบอริกแอซิดอินดิเคเตอร์

2.1.2.3 เปิดสารละลายตัวอย่างใบกาแฟที่ได้ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก (Conc. H_2SO_4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดกลั่น

2.1.2.4 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 40 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตรกลั่นเป็นเวลา 4 นาที

2.1.2.4 การไทเทรต ไทเทรตสารละลายจากการกลั่นด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอโมล จนสีสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง

บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างใบกาแฟ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(V_s - V_b) \times N \times 0.14 \times V_d \times 100}{W \times V_a}$$

V_s = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

V_b = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ใช้ไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นกรดซัลฟิวริกมาตรฐาน (0.02 นอโมล)

V_d = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้จากการย่อยสลาย (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

2.2 Phosphorus (P) วิธี Molybdenum-blue Method

2.2.1 สารเคมี

2.2.1.1 สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.02 นอโมล โดยละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 1 นอโมล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.2.1.2 สารละลายวานาเดต (vanadate reagent) ละลายแอมโมเนียมวานาเดต (NH_4VO_3) 0.25 กรัมในน้ำเดือด 50 มิลลิลิตรทิ้งไว้ให้เย็น

2.2.1.3 เติมกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) ความเข้มข้น 70 % ปริมาตร 40 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ เป็น 500 มิลลิลิตร

2.2.1.4 สารละลายโมลิบเดต (molybdate reagent) ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) 6.25 กรัมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร

2.2.1.5 สารละลายมาตรฐานที่มีฟอสฟอรัสความเข้มข้น 100 ppm ทำให้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ให้แห้งในเคสซิเคเตอร์โดยละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.0439 กรัมในน้ำและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร (เก็บในตู้เย็น)

2.2.1.6 กรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (HClO_4)

2.2.1.7 กรดไนตริก (HNO_3)

2.2.1.8 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

2.2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.2.1 การย่อยตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างใบกาแฟอบแห้งที่บดละเอียดประมาณ 0.05 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น (HClO_4) 0.4 มิลลิลิตรและกรดไนตริก (HNO_3) 0.5 มิลลิลิตรตามลำดับป้อนให้เข้ากันปิดหลอดด้วยพาราฟิล์มทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศา

เซลเซียส เพื่อไล่ควันทิ้งเหลือของ NO_2^- ออกให้หมดจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 210 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนตัวอย่างแห้งอย่าให้ไหม้ นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว เติมสารละลายเจือจาง ($\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 1:4) หลอดละ 1 มิลลิลิตรปั่น ให้เข้ากันจากนั้นนำมาตั้งบนเตาที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อไล่ Cl^- ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เทใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2.2.2.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างใบกาแฟที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรด ผสม (HNO_3 และ HClO_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง

2.2.2.3 เติมสารละลายวานาเดต ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.2.4 เติมสารละลายโมลิบดีนัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.2.5 วางหลอดทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที

2.2.2.6 วัดความเข้มของสีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

2.2.2.7 หาความเข้มข้นมาตรฐานของฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐาน โดยนำ ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหา ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างใบกาแฟ

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างใบกาแฟ (ppm)} = \frac{(C \times V_f) \times V_d}{W \times V_a}$$

$$\text{ปริมาณฟอสฟอรัสในตัวอย่างใบกาแฟ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(C \times V_f) \times V_d \times 10^{-4}}{W \times V_a}$$

C = ความเข้มข้นฟอสฟอรัสจากกราฟมาตรฐาน (ppm)

V_f = ปริมาตรสุดท้าย (15 มิลลิลิตร)

V_d = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้จากการย่อยสลาย (50 มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช (มิลลิลิตร)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (5 มิลลิลิตร)

2.3 การวิเคราะห์ Potassium (K) โดยวิธี AAS

2.3.1 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1.1 การย่อยตัวอย่างใบกาแฟใช้วิธีเช่นเดียวกับการย่อยตัวอย่างใบกาแฟ เพื่อหาธาตุฟอสฟอรัส

2.3.1.2 ปรับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 0.5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วย volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.3.1.3 วัดการเปล่งแสงของสารละลายตัวอย่าง ด้วยเครื่อง AAS ที่ความยาวคลื่น 766.5 นาโนเมตร

2.3.1.4 หาความเข้มข้นของโพแทสเซียมจากกราฟมาตรฐานโดยนำค่าการเปล่งแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.3.1.5 คำนวณหาปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่างใบกาแฟ

$$\text{ปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่างพืช (ppm)} = \frac{(C_s \times C_b) \times V_d}{W}$$

$$\text{ปริมาณโพแทสเซียมในตัวอย่างพืช(\%)} = \frac{(C_s \times C_b) \times V_d \times 10^{-4}}{W}$$

C_s = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมสารละลายตัวอย่างพืชจากกราฟมาตรฐาน (ppm)

C_b = ความเข้มข้นของโพแทสเซียมใน blank จากกราฟมาตรฐาน (ppm)

V_d = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ได้จากการย่อยสลาย (50 มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างพืช (กรัม)

3.ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยอินทรีย์ก่อนใช้ทุกครั้ง

pH โดยใช้ pH meter

Organic Matter (OM) โดยวิธี Walkley & Black

Total Nitrogen (N) โดยวิธี Kjeldahl

Phosphorus (P) โดยวิธี Molybdenum-blue Method

Potassium (K) Iron (Fe) Manganese (Mn) Copper (Cu) Zinc (Zn) โดยวิธี AAS ซึ่ง

กระบวนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืช

4. จำนวนกิ่งให้ผลทั้ง lateral และ sublateral บันทึกทุก 1 เดือน

5. ผลผลิตต่อพื้นที่ = จำนวนต้น/พื้นที่ × ผลผลิต/ต้น (จำนวนต้น = พื้นที่ทั้งหมด/ระยะปลูก) บันทึกทุกครั้งที่มีการเก็บผลผลิต

6. ผลผลิตต่อต้น = จำนวนผล/ต้น × น้ำหนักผล (จำนวนผล/ต้น = จำนวนข้อให้ผล/ต้น × จำนวนผล/ข้อ) บันทึกทุกครั้งที่มีการเก็บผลผลิต



ภาพที่ 3 กาแฟสุกที่พร้อมเก็บเกี่ยว

7. ลักษณะสารกาแฟ สีของสารกาแฟ การซึม กลิ่น/รส เนื้อกาแฟ ความเป็นกรด โดยการทำสารกาแฟเป็นวิธีเปียก (wet method or parchment method) และระดับการคั่วเป็นแบบ อ่อน กลาง เข้ม



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4 การหมักกาแฟ (ก) และการขัดเมือกและทำความสะอาดเมล็ดกาแฟ (ข)

7.1 การเตรียมตัวอย่างกาแฟคั่วบดโดยนำกาแฟคั่วบดที่ freeze dry ไว้แล้ว มาละลายในน้ำ deionized โดยให้ความเข้มข้น $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ แล้วกรองด้วย filter membrane จะได้น้ำตัวอย่างที่พร้อมจะฉีดเข้าเครื่องนำค่าที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับ standard ของสาร epicatechin (EC), epigallocatechingallate (EGCG), epigallocatechin (EGC)

7.2 การเตรียม mobile phase โดย $\text{Conc. H}_2\text{SO}_4$ 0.453 มิลลิลิตรกับ ethyl acetate 20 มิลลิลิตร และเติมน้ำ deionized 860 มิลลิลิตรเข้าด้วยกันแล้วกรองด้วย filter membrane หลังจากนั้นเติม acetonitrile 120 มิลลิลิตร จะได้ mobile Phase ที่มี pH ประมาณ 1.85 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร 5.3 condition ของ HPLC โดย column ODS2 $5 \mu - \text{C}_{18}$ $4.6 \times 250 \text{ mm}$ และ detector UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

8. ปริมาณสาร caffeine ซึ่งระดับการคั่วเป็นแบบอ่อน กลาง เข้ม (อดิเรก, 2553)

การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในสารกาแฟอบกาแฟ

8.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

8.1.1 เครื่องซั่งอิเล็กทรอนิกส์ ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

8.1.2 เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการทดลอง

8.1.3 น้ำ deionized

8.1.4 ตู้อบ (Hot air oven)

8.1.5 กระดาษกรองไนลอนเมมเบรน (nylon membrane) ขนาด $0.45\ \mu\text{m} \times 47\ \mu\text{m}$

8.1.6 Syringe filter Nylon ขนาด $0.45\ \mu\text{m} \times 13\ \mu\text{m}$

8.1.7 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatographic; HPLC) ยี่ห้อ shimadzu รุ่น LC-10AD

8.1.8 column HPLC (Platinum™ C₁₈Rocket™, 53 นาโนเมตร $\times$ 7 นาโนเมตร $\times$ 3 ไมโครเมตร)

8.1.9 ตัวกรองสารก่อนเข้า column (platinum™ C₁₈ all-guard™ cartridges)

8.2 สารเคมี

8.2.1 acetonitrile for HPLC

8.2.2 trifluoroacetic acid

8.2.3 caffeine standard

8.3 วิธีการวิเคราะห์

8.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณคาเฟอีนในสารกาแฟ โดยนำน้ำสกัดกาแฟ มากรองด้วย filter member ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ ไมโครเมตร จะได้น้ำตัวอย่างที่พร้อมจะฉีดเข้าเครื่อง HPLC นำค่าที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของสารกาแฟอื่น

8.3.2 การเตรียมสาร mobile phase โดยตวง acetonitrile 130 มิลลิลิตร กับน้ำ deionized 870 มิลลิลิตร และเติม trifluoroacetic acid 0.1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน แล้วกรองด้วย filter nylon membrane ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$ ไมโครเมตร จะได้ mobile phase ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

8.2.3 สภาพของ HPLC โดย column platinum™ C₁₈ rocket™, 53 นาโนเมตร $\times$ 7 นาโนเมตร $\times$ 3 ไมโครเมตร และ detector UV ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้อัตราการไหล 2.2 มิลลิลิตรต่อนาที

9. ปริมาณสาร epicatechin (EC), epigallocatechingallate (EGCG), epigallocatechin (EGC)

สถานที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. พื้นที่ทดลอง สวนกาแฟบริษัท ชาสยาม จำกัด และ พื้นที่จริงของเกษตรกร หมู่บ้านห้วยตาด ตำบลอินทนิล อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

2. ห้องปฏิบัติการกลางคณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เริ่มตั้งแต่เดือน มิถุนายน 2555 ถึง มิถุนายน 2556