เล่ม 2

ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2555

สปผ.

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ISBN : 978-974-436-842-3

เล่ม 2

ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2555

สปผ.

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2555 เล่ม 2

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ISBN : 978-974-436-842-3

คณะผู้จัดทำ

ที่ปรึกษา:

ณัญจณา	ลือตระกูล	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ยศพร	จันทชุม	หัวหน้ากลุ่มบริหารโครงการวิจัย

รวบรวมข้อมูล:

ให้พร	กิตติกูล	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ณัฐธิดา	ทองนาค	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย

จัดทำรูปเล่ม:

ปัญจพร	เลิศรัตน์	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สุปรานี	มั่นหมาย	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สรัตนา	เสนาะ	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
ให้พร	กิตติกูล	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ณัฐธิดา	ทองนาค	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ศิลดา	ประนาโส	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
พกาสินี	คล้ายมาลา	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

จำนวนพิมพ์: 250 เล่ม

พิมพ์เมื่อ: ตุลาคม 2556

สถานที่ติดต่อ: กลุ่มบริหารโครงการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 0 2579 1577-8 ต่อ 2101-5
โทรสาร 0 2579 1577

พิมพ์ที่: โพสต์เทค กรุงเทพฯ (โทรศัพท์ 02 982 8035)

คำนำ

เอกสาร “ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2555 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร” ได้จัดทำขึ้นโดยกลุ่มบริหารโครงการวิจัยร่วมกับ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร และศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรขอนแก่น วัตถุประสงค์ของการจัดทำเอกสารครั้งนี้เพื่อเผยแพร่ผลการปฏิบัติงานที่ได้ดำเนินการในรอบปีงบประมาณ 2555 ของสำนักฯ

เอกสารผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2555 ของสำนักฯ มีทั้งหมด 2 เล่ม โดยเอกสารเล่มนี้เป็นเอกสารเล่มที่ 2 เนื้อหาภายในเล่มเป็นการรายงานผลการปฏิบัติงานด้านวิจัยและพัฒนาของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร จำนวน 12 เรื่อง กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี จำนวน 6 เรื่อง และกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา จำนวน 10 เรื่อง ตามลำดับ

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ขอขอบคุณกลุ่มบริหารโครงการวิจัยและนักวิชาการจากกลุ่มวิจัยและศูนย์ฯ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือด้านการประสานงาน รวบรวมและส่งข้อมูลผลการปฏิบัติงานให้กลุ่มบริหารโครงการวิจัยตลอดจนร่วมจัดทำรูปเล่มจนสำเร็จ ในการนี้สำนักฯ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเกิดประโยชน์แก่ผู้บริหาร นักวิชาการ อาจารย์ นักศึกษา และตลอดจนผู้ที่สนใจในการนำความรู้ไปปรับใช้และต่อยอดงานวิจัยในอนาคตหรือใช้ในธุรกิจและชีวิตส่วนตัวของท่านนอกจากนี้ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพ ประสิทธิผล ของการใช้จ่ายงบประมาณแผ่นดินอันจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติเป็นส่วนรวมด้วย

(นางณัญจณา ลือตระกูล)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
ตุลาคม 2556

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร	
1. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Propanil โดย : พิเชษฐ์ ทองละเอียด	1
2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด โดย : วิสุทธิ เชวงศรี	12
3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Alpha-cypermethrin โดย : จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม	24
4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิด ในทุเรียน โดยวิธี QuEChERS ด้วยเทคนิค Gas Chromatograph โดย : ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล	35
5. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Captan และ Folpet ในผลไม้ โดย : ปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย	47
6. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม phenylurea ในผลไม้ โดย : วิทยา บัวศรี	58
7. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน โดยใช้ Gas Chromatography/Mass Spectrometry โดย : มลิสา เวชยานนท์	72
8. การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Chlormequat และ Mepiqua ในผลไม้โดยใช้ Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry โดย : วิษณุ แจ้งใบ	82
9. ผลกระทบของสารพิษกลุ่ม Organophosphorus ชนิด chlopytigod; ความสัมพันธ์ของ Detoxifying enzymes กับการเกิดรอยโรคของเนื้อเยื่อของปลาตะเพียนขาวสกุล *Puntius gonionotus* โดย : สิริพร เหลืองสุชนกุล	96

สารบัญ

เรื่อง หน้า

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

10. ผลงานบริการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี 104
    โดย : กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี
11. ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์โดยเทคนิค NIRS 113
    โดย : จิติมา ยถาภูธานนท์
12. ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเมล็ดพืชโดยเทคนิค NIRS 124
    โดย : จิติมา ยถาภูธานนท์
13. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAAในพืช 133
    โดย : นันทกานต์ ขุนโหร
14. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช 140
    โดย : นันทกานต์ ขุนโหร
15. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์น้ำตาลในพืช 146
    โดย : สาธิดา โพธิ์น้อย

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา

16. ศึกษาการตอบสนองของมันสำปะหลังต่อการจัดการธาตุอาหารในกลุ่มดินเหนียว : ชุดดินโชคชัย 156
    โดย : สมฤทัย ตันเจริญ
17. ศึกษาการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อนในพื้นที่ดินร่วน – ร่วนปนทราย 168
    โดย : บรรณพิชญ์ สัมฤทธิ์
18. การปรับปรุงดินด้วยวัสดุอินทรีย์ ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมี เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพผลผลิตมันสำปะหลังระยะยาวในดิน 3 ชุดดิน 180
    โดย : สมควร คล้องช้าง
19. ศักยภาพการดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินต่างๆ สำหรับใช้ในการประเมินการใช้ปุ๋ยโพแทชอย่าง แม่นยำเฉพาะพื้นที่ 198
    โดย : ศิริขวัญ ภู่นา
20. การวิจัยพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูง 211
    โดย : ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง

สารบัญ

เรื่อง หน้า

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา

21. ศึกษาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม 218
โดย : ศฬิษา สังวิเศษ

22. การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต 223
โดย : ศฬิษา สังวิเศษ

23. ศึกษาวิธีการสกัดสารละลายเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของสารสกัด 229
โดย : ประไพ ทองระอา

24. ทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตในห้องปฏิบัติการ 235
โดย : สุปรานี มั่นหมาย

25. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของแหนแดง เพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ 243
โดย : ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต

ผลการปฏิบัติประจำปีงบประมาณ 2554
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

26 . การใช้ผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติลดการใช้ chlorpyrifos ในพริก 251
โดย : พรรณีกา อัตตนนท์

27. วิจัยเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดพืชหนอนตายหยาก หางไหล ว่านน้ำระดับโรงงานต้นแบบ 261
โดย : พรรณีกา อัตตนนท์

28. การศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ Atrazine, Ametryn, Alachlor และ 2,4-D Dimethyl ammonium 275
โดย : จิราพรรณ ทองหยอด

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Propanil

Method Validation of Propanil in Formulation

พิเชษฐ์ ทองละเอียด ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

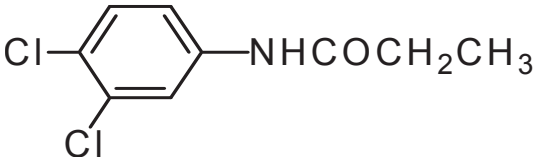
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดวัชพืช Propanil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายการเกษตร ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เนื่องจากวิธีการนี้ให้ค่า Range ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 มีความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) เท่ากับ 0.568 และการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.681, 0.798 และ 0.590 ตามลำดับ ตรวจสอบRobustness/ Ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 1.058 และ 1.324 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex และตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการจากค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ที่ 0.4, 1.0, และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเป็นร้อยละ 99.1, 100.2 และ 100.5 ซึ่งอยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC วิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายการเกษตร Propanil ที่เป็นงานประจำและต้องการผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

คำนำ



Propanil เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กำจัดวัชพืชพวกใบแคบ เช่น หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC 3',4' – dichloropropionanilide มีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น N – (3,4 – dichlorophenyl) propanamide มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_9H_9Cl_2NO$ มีน้ำหนักโมเลกุล 218.1 มีจุดหลอมเหลว 91.5 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด 351 องศาเซลเซียส เป็นคริสตัลไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้ 130 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ละลาย

isopropanol, dichloromethane ได้มากกว่า 200 กรัมต่อลิตร จะเกิดขบวนการ hydrolysis ในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างสูงและจะสลายตัวในน้ำอย่างรวดเร็วด้วยแสง คงสภาพได้ดีในช่วง pH ปกติ คือ pH 4, 7, 9

ในด้านวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีอ้างอิงใน Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators Vol.13 ซึ่งระบุใช้ pack column ซึ่งในปัจจุบันได้มีการผลิต Capillary column ขึ้นมาใช้แทนประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ก็ดีกว่า และมีความสะดวก เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่น (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล จึงจำเป็นต้องศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นพร้อมตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง GLC ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP – 5) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
3. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 100% dimethylpolysiloxane (DB – 1) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
5. Ultrasonic bath
6. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. ปิเปตชนิด type A ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. กรวยแก้วก้านยาว
10. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Propanil 99.5 %
2. สารเข้มข้น Propanil (Technical grade, TC) 95.8 % AI
4. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สูตร Emulsifiable concentrates (EC) 36 % AI
5. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Propanil

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นด้วย HP – 5 capillary column ดังนี้

อุณหภูมิ Oven	:	220	องศาเซลเซียส		
Injector	:	250	องศาเซลเซียส		
Detector	:	250	องศาเซลเซียส		
สภาวะ Injector	:	split ratio 50 :1			
ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H_2	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
		Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N_2	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน propanil หนัก 10 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) 2 ซ้ำ (C_A, C_B) ใส่ขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสาร Technical grade

ชั่งสาร Technical grade ที่คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วหนัก 25 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) 15 ซ้ำ (T_1 - T_{15}) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสภาวะการใช้งาน และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1% แล้วฉีดสารละลายเพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ดังนี้

C_A, $T_{1\text{-}1}$, $T_{1\text{-}2}$, C_B, $T_{2\text{-}1}$, $T_{2\text{-}2}$, C_A, ...

2.4 การคำนวณ

2.4.1 ค่า response factor

$= W \times P / A$

W = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็น มิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของ Propanil ในสารมาตรฐาน หน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์

A = peak area ของ Propanil ในสารละลายมาตรฐาน

2.4.2 ปริมาณ Propanil ในสาร Technical grade

M = As x f / Ws

As = peak area ของ Propanil ในสารละลาย Technical grade

Ws = น้ำหนักสาร Technical grade หน่วยเป็น มิลลิกรัม

M = ปริมาณ Propanil ในสาร Technical grade หน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range / Linear) ของวิธีการ

3.1 หาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Propanil ครอบคลุมช่วงการใช้งาน รวม 6 ความเข้มข้นหนัก 10.4, 52.0, 104.0, 156.0, 208.0 และ 260 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Propanil (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.1.4 พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Propanil 6 ความเข้มข้น หนัก 20.8, 52.0, 83.2, 104.0, 124.8 และ 156.0 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Propanil (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.2.5 พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

4. ตรวจสอบความแม่น (Precision) ของวิธีการ

4.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (Repeatability)

4.1.1 ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 27, 69 และ 97 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ ที่เตรียม (ข้อ 4.1.1) เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาด

เคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินค่า HORRAT โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

4.1.3 การคำนวณ

$$HORRAT = \%RSD_{exp.} / \%RSD_{Horwitz}$$

$$\%RSD_{Horwitz} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{intra-lab.}$$

4.2 ตรวจสอบความทำซ้ำ (Intermediat reproducibility)

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ขึ้นใหม่ตามข้อ 4.1.1 (ต่างวันกัน) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และประเมินค่า HORRAT ของปริมาณ Propanil จากข้อ 4.1.2 และ 4.2 ดังนี้

$$HORRAT = \%RSD_{exp.} / \%RSD_{Horwitz}$$

$$\%RSD_{Horwitz} = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{inter-lab.}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

5. ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ

5.1 ตรวจสอบ Robustness

5.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณ Propanil ที่สภาวะการใช้งาน ใช้คอลัมน์ชนิด HP – 5 (5% phenyl methyl siloxane)

5.1.1.1 เตรียมสารละลายของสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน หนัก 20.8, 52.0, 83.2, 104.0, 124.8 และ 156.0 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใน Acetone 100 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องเพื่อสร้างกราฟ

5.1.1.2 ชั่งสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC คลุกเคล้าแล้ว หนัก 27, 69 และ 97 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Propanil ที่สภาวะคอลัมน์ DB – 1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Propanil ที่สภาวะคอลัมน์ DB – 1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.1 ปรับเปลี่ยนสภาวะคอลัมน์ DB – 1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.2 ฉีดสารละลายของสาร Technical grade (ข้อ 5.1.1.1) เพื่อสร้างกราฟ

5.1.2.3 ฉีดสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC (ข้อ 5.1.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Propanil ที่สภาวะคอลัมน์ DB – 1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.3 การประเมินค่า HORRAT

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 5.1.1.2 และ 5.1.2.3 มาคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HORRAT ตามข้อ 4.2

5.2 ตรวจสอบ Ruggedness

5.2.1 เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ตามข้อ 4.1.1 และเตรียม Technical grade (ข้อ 3.2.2) เพื่อสร้างกราฟ โดยมีการวิเคราะห์ต่างวันกันแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4)

5.2.2 นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ของผลิตภัณฑ์สูตร EC จากข้อ 5.2.1 นำมาร่วมคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HORRAT ตามข้อ 4.2

6. ตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech (5 mg AI / ml)

ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว หนัก 1,305 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 2, 5 และ 10 มิลลิลิตรใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของสาร Technical grade ที่มีความเข้มข้นของ Propanil เป็น 0.4, 1.0 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้น

6.3 เตรียมสารละลาย Stock Sample (1 mg AI / ml)

ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 2,777 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ตามลำดับ ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.4 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) มา 10 มิลลิลิตร 10 ซ้ำใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร รวม 10 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Propanil

6.5 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 3, 5 และ 7 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) อยู่ 10 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ รวม 30 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4 – 6.5) มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = (A_{spike} - A_{origin}) \times 100 / A_{add}$$

A_{spike} = ปริมาณ Propanil ในสารละลาย Spike

A_{origin} = ปริมาณ Propanil ในสารละลาย Origin

A_{add} = ปริมาณ Propanil ที่เติมลงในสารละลาย Spike

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลการทดลอง และวิจารณ์

จากการประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลการทดลองดังนี้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง เมื่อตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้ผลการคำนวณค่า response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ย ไม่เกินร้อยละ 1 และตรวจหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 95.8

ผลการศึกษาช่วงของการวัด (Range) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตารางที่ 1. แสดงผลการตรวจสอบช่วงของการวัด

การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.10 - 2.50 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ** Propanil	
mg/ml	Area
0.10	19.2396
0.50	111.3786
1.00	227.3481
1.50	342.7628
2.00	448.9636
2.50	576.4564

เมื่อพิจารณาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.10 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) 0.9997

ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตารางที่ 2. แสดงผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง Linearity

การหา Linearity **ที่ความเข้มข้น** 0.20 - 1.50 **มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ** Propanil	
mg/ml	Area
0.20	45.7245
0.50	112.1729
0.80	180.3414
1.00	225.3167
1.20	272.2258
1.50	342.3279

เมื่อพิจารณาค่า Linearity ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.20 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) 0.9998

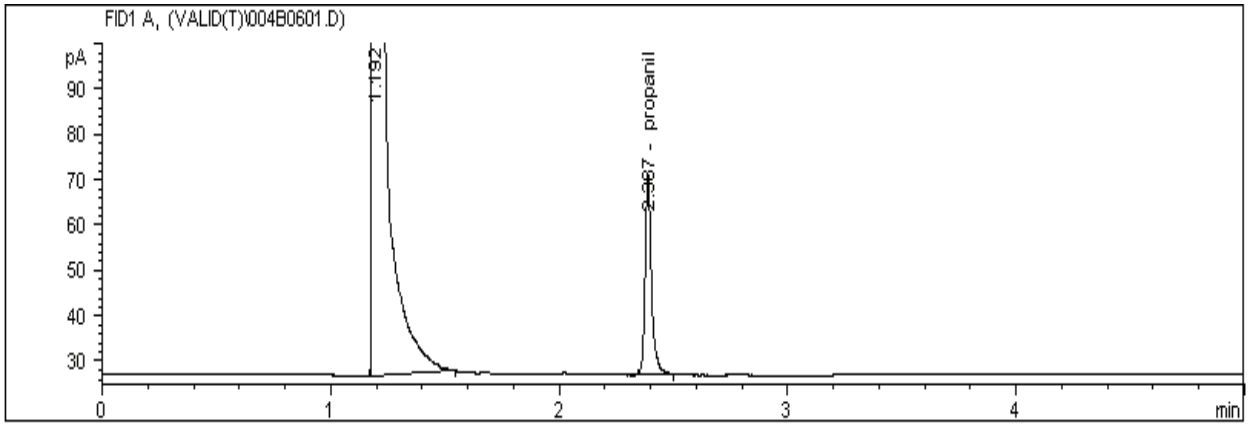
ในด้านความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC พบว่า การทวนซ้ำ (Repeatability) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.305 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.875 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.568 ส่วนการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.37, 0.43 และ 0.32 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 1.05, 1.23 และ 0.910 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.681, 0.798 และ 0.590 ตามลำดับ

การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการ พบว่า Robustness มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.59 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 1.63 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.058 ตามลำดับ และพบว่า Ruggedness มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.74 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 2.04 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.324 ตามลำดับ

กรณีความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืช EC ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเป็นร้อยละ 99.1, 100.2 และ 100.5

ตารางที่ 3. การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ Recovery ของผลิตภัณฑ์สูตร EC

N	AI content (mg / 25 ml)								
	Concn. (0.4 mg / ml)			Concn. (1.0 mg / ml)			Concn. (1.4 mg / ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	8.48	18.68	10.00	8.20	33.20	25.00	8.43	43.21	35.00
2	8.12	18.01	10.00	8.38	33.48	25.00	8.48	43.12	35.00
3	8.17	18.24	10.00	8.22	32.87	25.00	8.42	43.56	35.00
4	8.52	18.37	10.00	8.23	34.00	25.00	8.54	42.95	35.00
5	8.31	18.34	10.00	8.11	33.10	25.00	8.41	44.15	35.00
6	8.44	18.16	10.00	8.12	33.01	25.00	8.58	43.50	35.00
7	8.26	17.75	10.00	8.21	32.97	25.00	8.38	44.02	35.00
8	8.13	17.81	10.00	8.24	32.79	25.00	8.46	44.12	35.00
9	8.23	18.33	10.00	8.12	33.21	25.00	8.30	43.56	35.00
10	8.26	18.42	10.00	8.20	34.10	25.00	8.29	43.85	35.00
Mean	8.29	18.21	10.00	8.20	33.27	25.00	8.43	43.60	35.00
SD	0.14	0.29		0.08	0.45		0.09	0.43	
%RSD	1.73	1.57		0.96	1.36		1.10	0.98	
%Recov			99.19			100.28			100.50



รูปภาพที่ 1 แสดง Chromatogram ของสารมาตรฐาน Propanil

วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ตามที่ระบุใน Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators เป็นการใช้ Pack column ในการแยกสาร และการศึกษาทดลองนี้ได้พัฒนาใช้ Capillary column ซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสารสูงกว่าแทน และปรับเปลี่ยนปริมาณการใช้สารมาตรฐานเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการ โดยหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นสูงก่อน เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารมาตรฐานซึ่งมีราคาแพงมาก ในขั้นตอนต่างๆ โดยเฉพาะการตรวจสอบความถูกของวิธีการ ที่ต้องมีการใช้สารมาตรฐานเติมลงในสารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 30 ซ้ำ และผลของการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆ สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล วิธีการนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ Propanil ของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดโรคพืช โดยใช้เทคนิควิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ที่มีตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย HP-5 capillary column ซึ่งมีสภาวะการใช้งาน ดังนี้

อุณหภูมิ Oven	:	220	องศาเซลเซียส		
Injector	:	250	องศาเซลเซียส		
Detector	:	250	องศาเซลเซียส		
สภาวะ Injector	:	split ratio 50 :1			
ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H_2	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
		Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N_2	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การเตรียมสารละลายเพื่อการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Propanil ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ Propanil 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่างให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

3. วิธีการนี้มีค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0.1 - 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998

4. ความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC เมื่อทดสอบค่าการทวนซ้ำ (Repeatability) ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.875 และ 0.568 ตามลำดับ การทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) สัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) ได้เป็น 1.05, 12.3 และ 0.91 ตามลำดับ ค่า HORRAT เท่ากับ 0.681, 0.798 และ 0.590 ซึ่งยอมรับได้ เนื่องจากไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

5. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการพบว่ายอมรับได้ เนื่องจากเมื่อนำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ของ Robustness และ Ruggedness ได้เป็น 1.058 และ 1.324 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

6. ความถูก (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเป็นร้อยละ 99.1, 100.2 และ 100.5 อยู่ในช่วง 98 - 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC

การนำไปใช้ประโยชน์

เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ Propanil ของห้องปฏิบัติการเพื่อการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO17025 ต่อไป

วิธีที่ทำการศึกษานี้สามารถนำไปถ่ายทอดให้กับหน่วยงานอื่นๆ ทั้งหน่วยงานของราชการ และเอกชนในการวิเคราะห์ Propanil เพื่อความเป็นมาตรฐานเดียวกันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

Gunter Zweig. and Joseph Sherma. 1972. Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators. Vol.13

Kidd, H. and D. R. James (Eds). 1993. The Agrochemicals Handbook. 3rd. ed. Methods Royal Society of Chemistry, England.

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด

Method Validation of Organophosphorous, Pyrethroid and Endosulfan Residues in Mangosteen

วิสุทธิ เชวงศรี ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร ชนิตา ทองแซม

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous, Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด โดยวิธีทดสอบจากการประยุกต์ของ วิธีการของ Steinwandter (1985) โดยการสกัดด้วย acetone, dichloromethane และ sodium chloride ทำการ clean up โดยใช้ส่วนผสมของ sorbent ชนิด PSA และ SAX (1 : 1) ชะด้วย hexane : dichloromethane 4 : 1 และ 1 : 1 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas chromatograph ทำการพิสูจน์ความใช้ได้ ของวิธีการโดยการใช้เทคนิค fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กลุ่ม Organophosphorous ที่ทำการทดสอบมี 18 ชนิด Pyrethroid 7 ชนิด และ Endosulfan 3 ชนิด พารามิเตอร์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ linearity/range, accuracy, precision, LOD และ LOQ ผลการวิเคราะห์พบว่า linearity/range ของสารทั้ง 3 กลุ่ม มีค่า correlation coefficient > 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การทดสอบกลุ่ม Organophosphorous, Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด พบว่ามีค่า Range อยู่ในช่วง 0.01 - 2.00, 0.005 - 0.5 และ 0.005 - 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การพิสูจน์ accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือมี ค่า %recovery อยู่ในช่วง 70 - 120 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 สำหรับค่า LOD อยู่ระหว่าง 0.005 - 0.02, 0.002 - 0.02 และ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ อยู่ระหว่าง 0.01- 0.05, 0.005 - 0.1 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

คำนำ

จากการจัดตั้งองค์การการค้าโลก (WTO) ในปี พ.ศ.2538 มีความตกลงที่เกี่ยวข้องกับสุขอนามัยและคุณภาพของอาหาร 2 ฉบับ คือ ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary & Phytosanitary Measure) และความตกลงว่าด้วยอุปสรรคทางเทคนิคต่อการค้า (Agreement on Technical Barrier to Trade, TBT) ที่ให้ประเทศสมาชิกกำหนด หรือใช้บังคับมาตรการเท่าที่จำเป็นในการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และพืชซึ่งประเทศสมาชิกได้มีการนำปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตผลิตภัณฑ์การเกษตรและสิ่งแวดล้อม มาใช้เป็นมาตรการกีดกันทางการค้าสำหรับประเทศที่ส่งสินค้าเกษตรเป็นสินค้าออก ดังนั้นประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตร รวมทั้งประเทศไทยจำเป็นต้องปรับปรุงกฎระเบียบ และข้อกำหนดต่างๆ

ที่เกี่ยวกับสุขอนามัย และมาตรการว่าด้วยอุปสรรคทางเทคนิคต่อการค้า ให้มีความสอดคล้องกับมาตรฐานขององค์การระหว่างประเทศ เช่น codex, ISO เพื่อแสดงความเท่าเทียมกัน ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบห้องปฏิบัติการที่มีเป้าหมายใหญ่ คือ การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ (Method development) ให้เป็นมาตรฐาน ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) และทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ (Proficiency testing) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับได้ และเพื่อขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ (Laboratory accreditation) ตามมาตรฐานสากล (ISO/IEC17025, 2005) สำหรับงานวิจัยนี้ จะเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของสารพิษตกค้างกลุ่ม triazophos ในมะม่วง โดย parameter ที่ใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการได้แก่ linearity/rang, accuracy, precision, LOD และ LOQ (กนกพร และทิพวรรณ, 2547 และสถาบันอาหาร, 2547) ทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล และสามารถใช้ในการขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ส่งออกต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องสกัดชนิดปั่นความเร็วสูง (Homogenizer) เครื่องระเหยสารละลายชนิด Flash evaporator, Nitrogen evaporator ตู้อบอุณหภูมิสูง เครื่องชั่งชนิด 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่งและเครื่องบดตัวอย่าง (Food processor)

2. เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipet, auto pipet, erenmeyer flask, lab bottle, flat bottle flask และ glass syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร

3. สารเคมีชนิด Analytical grade ได้แก่ acetone, dichloromethane, acetonitrile, sodium chloride และ sodium sulfate anhydrous เผาที่ 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator

4. สารเคมีชนิด pesticide grade ได้แก่ hexane, dichloromethane, sorbent ชนิด PSA และ SAX

5. สารมาตรฐานกลุ่ม Organophosphorous 18 ชนิด ได้แก่ DDVP, Mevinphos, Dimethoate, Diazinon, Parathion - methyl, Pirimiphos - methyl, Fenitrothion, Malathion, Chlorpyrifos, Parathion - ethyl, Pirimiphos - ethyl, ethidathion, Prothiophos, Profenophos, Ethion, Triazophos, EPN, Phosalone กลุ่ม Pyrethroid 7 ชนิด ได้แก่ Bifenthrin, Lambda-cyhalothin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvalerate, และ Deltamethtrin ส่วน Endosulfan 3 ชนิด ประกอบด้วย Alpha - Endosulfan, Beta - Endosulfan และ Endosulfan sulfate

6. เครื่องตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Gas chromatograph (GC) ชนิด Electron capture detector (ECD) และ Flam Photometric detector (FPD)

วิธีการ

1. การเตรียมสารมาตรฐาน

1.1 เตรียม stock standard solution 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 เตรียม Mixed Standard Solution 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 เตรียม Intermediate Mixed Standard Solution 1, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4 เตรียม working standard solution เพื่อทำ Calibration curve

โดยเตรียมจากสารละลายมาตรฐาน Mixed Standard Solution ที่มีความเข้มข้น 1, 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นในสารละลายเท่ากับความเข้มข้นของวัตถุอันตรายในตัวอย่าง คือ 0.01, 0.02 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2. การเตรียมตัวอย่าง

หั่นผลมังคุดรวมทั้งเปลือกให้มีขนาดเล็กลง โดยเอาขั้วและจุกทิ้งไปแล้วนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง food processor

3. การสกัดตัวอย่าง

การสกัด ใช้วิธีประยุกต์ของ Steinwandter 1985 ดังนี้

3.1 ชั่งตัวอย่างมังคุด 25 ± 0.1 กรัม ใน lab bottle ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2 เติม acetone 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วย homogenizer ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

3.3 เติม sodium chloride 8 กรัม และ dichloromethane 40 มิลลิลิตร ปั่นอีก 1 นาที

3.4 เทสารละลายส่วนใสใน lab bottle ที่มี Na_2SO_4 anhydrous ประมาณ 30 กรัม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที

3.5 แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย ethyl acetate (PR) แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous ด้วยเครื่อง GC ชนิด FPD

4. การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up)

4.1 การเตรียม column โดยใช้ syringe column ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่อุดปลาย column ด้วยสำลี ปิดทับด้วย sodium sulfate ประมาณ 1 เซนติเมตร เติมส่วนผสมของ sorbent ชนิด PSA และ SAX (1:1) ปริมาณ 1 กรัม และปิดทับด้วย sodium sulfate ประมาณ 1 เซนติเมตร

4.2 ล้าง column ด้วย hexane 5 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย ตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร นำมาลดปริมาตรให้แห้ง และละลายด้วย hexane: dichloromethane 4:1 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เทใส่ column รองรับไว้

4.4 ชะต่อด้วย hexane: dichloromethane 4:1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และชะต่อด้วย hexane: dichloromethane 1:1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร รองรับรวมกัน

4.5 นำส่วนที่รองรับได้ไปลดปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย hexane นำไปตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างกลุ่ม Pyrethroid และ Endosulfan ด้วยเครื่อง GC ชนิด ECD

5. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC)

5.1 สภาวะการใช้งานเครื่อง GC มีดังนี้

5.1.1 เครื่อง GC ชนิด FPD ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 6890N

Column : DB 5.625 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร สารเคลือบหนา 0.50 ไมโครเมตร

Inlet : mode : splitless, temperature 250 ºC , pressure 15.96 Psi
Purge flow 40 ml/min, purge time 0.75 min, total flow 46.1 ml/min
Saver gas 20.0 ml/min, Saver time 2.0 min

Gas type : He

Detector : temperature 250 ºC
Hydrogen flow 150 ml/min, air flow 110 ml/min

Mode : constant column + make up flow, combine flow 60 ml/min

Make up gas : N_2

Oven program : 70 ºC (1 min) 15 ºC/min → 180 ºC (4 min) 15 ºC/min → 250 ºC (5 min) 5 ºC/min → 270 ºC (12 min) run time 38 min

Carrier gas : He flow 3.5 ml/min

5.1.2 เครื่อง GC ชนิด ECD ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 6890N

Column : Ultra-1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 25 เมตร สารเคลือบหนา 0.17 ไมโครเมตร

Inlet : mode : splitless, temperature 250 ºC, pressure 9.63 Psi
Purge flow 40 ml/min, purge time 0.75 min, total flow 45.3 ml/min
Saver gas 20.0 ml/min, Saver time 2.0 min

Gas type : He

Detector : temperature 300 ºC

Mode : constant column + make up flow, combine flow 60 ml/min

Make up gas : N_2

Oven program : 70 ºC (1 min) 15 ºC/min → 180 ºC (4 min) 15 ºC/min → 250 ºC (5 min) 5 ºC/min → 270 ºC (12 min) run time 38 min

Carrier gas : He flow 2.2 ml/min

6. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

6.1 การหา linearity และ range

6.1.1 spike สารละลายมาตรฐาน ลงในตัวอย่างมังคุด ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0.005, 0.01 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 1 ซ้ำ

6.1.2 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ peak (แกน y) และความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง (แกน x)

6.1.3 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง ซึ่งมีค่า correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995 จะได้ linearity และ range

6.1.4 พิสูจน์ linearity และ range โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 6.1.1 - 6.1.3 แต่ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่า correlation coefficient (r) จะต้องอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ คือ $\geq$0.995

6.2 การหา accuracy และ precision

6.2.1 การหา accuracy

1) ทำการ spike สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างมังคุดให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ กลาง สูง ซึ่งมีความเข้มข้น 0.02, 0.1 และ 0.5 แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดสอบ 7 ซ้ำ คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืน (% recovery)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)}}{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมลงไป (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)}} \times 100\%$$

หลักเกณฑ์การยอมรับของ accuracy คือมีค่า %recovery ในช่วง 70 – 120 เปอร์เซ็นต์ (FAO/WHO, 1997; Dogheim *et al*., 1999; Kuet and Sent, 2004)

6.2.2 การหา precision

นำผลที่ได้จากการหา accuracy มาหา precision โดยหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย %RSD(relative standard deviation) และหาค่า HORRAT

$$\%\text{RSD} = \frac{\text{S D} \times 100}{\overline{X}}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz' s Ratio)} = \frac{\%\text{RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times c^{(1-0.5 \log c)}$$

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

หลักเกณฑ์การยอมรับของ precision คือที่ระดับความเข้มข้น 0.01- 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า %RSD ไม่เกิน 20 และที่ระดับความเข้มข้น 0.1 - 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม %RSD ไม่เกิน 15 ตามตารางที่ 1 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 1. เกณฑ์ยอมรับของการพิสูจน์ accuracy จาก %Recovery และ การพิสูจน์ precision โดยประเมินจาก %RSD

Concentration (mg/kg)	Repeatability (%RSD)	Mean Recovey Range (%)
$\leq$ 0.001	35	50 - 120
> 0.001 - 0.01	30	60 - 120
> 0.01 - 0.1	20	70 - 120
>0.1 - 1	15	70 - 110
>1	10	70 - 110

(Quality Control Precedures for Pesticide Residues Analysis Document No. SANCO/10476/2003, 5-February-2004)

6.3 การหา Limit of detection (LOD) และLimit of quantitation (LOQ)

6.3.1 การหา LOD

ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ประมาณค่า LOD โดย LOD เท่ากับ 3 × SD (SD = Standard deviation) ปรับค่า LOD จากการคำนวณมา spike ในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาคำนวณ signal/noise ของแต่ละสาร ซึ่งจะต้องมีค่า $\geq$ 3

6.3.2 การหา LOQ

ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่ของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ประมาณ ค่า LOQ โดย LOQ เท่ากับ 10 × SD ปรับค่า LOQ จากการคำนวณมา spike ในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาตรวจสอบ accuracy และ precision ซึ่งต้องผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 - กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. Linearity และ range

ผลการวิเคราะห์จากวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous 18 ชนิด ที่ 7 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า linearity ของวิธีวิเคราะห์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.9982 - 1.0000 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด คือมีค่า $r \geq 0.995$ และมี range ในช่วง 0.01 - 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับกลุ่ม Pyrethroid 7 ชนิด และ Endosulfan 3 ชนิด ทดสอบที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า Pyrethroid 6 ชนิด มีค่า r อยู่ระหว่าง 0.9960 - 0.9985 และมีค่า range ในช่วง 0.01 - 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น bifenthrin และ Endosulfan มีค่า r ระหว่าง 0.9984 - 0.9993 และ range ในช่วง 0.005 - 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2)

2. Accuracy และ Precision

การทดสอบ accuracy และ precision ที่ 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ 0.02, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ได้ผลการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมาตรฐานตามตารางที่1 ซึ่งให้ผลดังนี้

2.1 กลุ่ม Organophosphorous มีค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 78 - 105, %RSD 2.27 - 11.98 และ HORRAT 0.15 - 0.87 (ตารางที่ 3)

2.2 กลุ่ม Pyrethroid มีค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 77 - 108 %RSD 4.33 - 17.07 และ HORRAT 0.37 - 1.09 (ตารางที่ 3)

2.3 Endosulfan ซึ่งประกอบด้วย alph - endosulfan, beta - endosulfan, และ endosulfan sulfate, มีค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 74 - 91 %RSD 5.00 - 11.19 และ HORRAT 0.43 - 0.73 (ตารางที่ 3)

3. LOD และ LOQ

จากการ spike ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ประมาณค่า LOD เท่ากับ 3 x SD และ LOQ เท่ากับ 10 x SD ปรับค่า LOD และ LOQ จากการคำนวณ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ได้ผลการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมาตรฐาน คือ LOD มีค่า signal/noise ratio ≥ 3 และ LOQ ผ่านการพิสูจน์ Accuracy และ Precision ซึ่งให้ผลดังนี้

3.1 กลุ่ม Organophosphorous มีค่า LOD 0.005 – 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม signal/noise ratio อยู่ในช่วง 3 - 12 มีค่า LOQ มีค่าระหว่าง 0.01 - 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยได้ค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 71 - 107 %RSD 3.08 - 14.13 และมีค่า HORRAT 0.15 - 0.67 (ตารางที่ 4)

3.2 กลุ่ม Pyrethroid มีค่า LOD 0.002 - 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม signal/noise ratio อยู่ในช่วง 3 - 6 มีค่า LOQ มีค่าระหว่าง 0.005 - 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยได้ค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 78 - 99 %RSD 10.15 - 25.6 และมีค่า HORRAT 0.53 - 1.09 (ตารางที่ 4)

3.3 Endosulfan มีค่า LOD 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม signal/noise ratio อยู่ในช่วง 10 - 20 มีค่า LOQ เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยได้ค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 77 - 82 %RSD 19.74 - 22.5 และมีค่า HORRAT 0.84 - 0.96 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2. Linearity และ range ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด

Pesticide	Correlation(r)	Rang (mg/kg)
DDVP	0.9995	0.01 - 2
Mevinphos	0.9998	0.01 - 2
Dimethoate	0.9996	0.01 - 2
Diazinon	0.9998	0.01 - 2
Parathion-methyl	0.9998	0.01 - 2
Pirimiphos- methyl	0.9999	0.01 - 2
Fenitrothion	0.9999	0.01 - 2
Malathion	1.0000	0.01 - 2
Chlorpyrifos	0.9986	0.01 - 2
Parathion-ethyl	0.9999	0.01 - 2
Pirimiphos- ethyl	1.0000	0.01 - 2
Methidathion	0.9995	0.01 - 2
Prothiophos	0.9999	0.01 - 2
Profenophos	0.9996	0.01 - 2
Ethion	0.9997	0.01 - 2
Triazophos	0.9992	0.01 - 2
EPN	0.9992	0.01 - 2
Phosalone	0.9982	0.01 - 2
bifenthrin	0.9984	0.005 - 0.5
Lamda-Cyhalothin	0.9975	0.01 - 0.5
Permethrin	0.9985	0.01- 0.5
Cyfluthrin	0.9985	0.01 - 0.5
Cypermethrin	0.9960	0.01 - 0.5
Fenvalerate	0.9985	0.01 - 0.5
Deltamethtrin	0.9983	0.01 - 0.5
alpha - Endosulfan	0.9991	0.005 - 0.5
Beta - Endosulfan	0.9988	0.005 - 0.5
Endosulfan sulfate	0.9993	0.005 - 0.5

ตารางที่ 3. Accuracy และ Precisionจากค่าเฉลี่ยของ %recovery %RSD และ HORRAT (H) ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด

Pesticide	0.02 mg/kg			0.1 mg/kg			0.5 mg/kg		
	Accuracy	Precision		Accuracy	Precision		Accuracy	Precision	
	% recovery	% RSD	H	% recovery	% RSD	H	% recovery	% RSD	H
DDVP	104	3.67	0.19	89	3.16	0.21	96	3.22	0.27
Mevinphos	105	5.56	0.29	81	5.33	0.36	103	10.25	0.87
Dimethoate	97	5.79	0.30	83	4.18	0.28	89	3.10	0.26
Diazinon	98	5.58	0.29	97	2.54	0.17	96	2.65	0.23
Parathion-methyl	103	4.15	0.21	93	3.02	0.20	101	2.80	0.24
Pirimiphos- ethyl	99	4.48	0.24	94	2.29	0.15	100	2.48	0.21
Fenitrothion	101	4.68	0.24	94	2.83	0.19	101	2.80	0.24
Malathion	105	8.55	0.45	94	2.91	0.20	100	2.46	0.21
Chlorpyrifos	105	4.17	0.22	101	2.38	0.16	101	2.64	0.22
Parathion-ethyl	104	5.80	0.30	95	2.44	0.16	100	2.73	0.23
Pirimiphos- ethyl	102	6.55	0.34	97	2.56	0.17	100	2.54	0.22
Methidathion	95	6.58	0.35	91	3.09	0.21	96	2.80	0.24
Prothiophos	98	6.99	0.37	94	2.47	0.16	100	2.41	0.21
Profenophos	96	6.64	0.35	92	2.77	0.18	89	2.46	0.21
Ethion	101	5.90	0.31	98	2.65	0.18	99	2.42	0.21
Triazophos	95	5.47	0.29	94	2.88	0.19	85	2.30	0.19
EPN	102	10.07	0.53	99	2.41	0.16	84	2.27	0.19
Phosalone	89	11.98	0.63	95	4.68	0.31	78	2.56	0.21
Bifenthrin	96	10.78	0.57	84	8.71	0.58	94	5.44	0.46
Lamda-yhalothin	89	10.75	0.57	86	10.47	0.70	87	5.44	0.46
Permethrin	106	9.28	0.78	91	15.91	1.06	88	4.33	0.37
Cyfluthrin	99	10.15	0.53	90	6.54	0.44	92	11.25	0.96
Cypermethrin	97	13.06	0.69	79	14.69	0.98	108	4.34	0.37
Fenvalerate	89	17.07	0.90	89	7.18	0.48	97	8.04	0.69
Deltamethtrin	82	11.88	0.62	91	16.31	1.09	77	6.18	0.53
alpha-Endosulfan	91	12.04	0.63	83	8.99	0.60	89	5.11	0.44
Beta-Endosulfan	86	10.87	0.57	74	10.33	0.69	84	5.19	0.44
Endosulfan sulfate	89	11.19	0.59	79	10.89	0.73	87	5.00	0.43

ตารางที่ 4. LOD และLOQ ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด

pesticide	LOD (mg/kg)	S/N	LOQ (mg/kg)	%recovery	%RSD	HORRAT
DDVP	0.01	10	0.02	104	3.67	0.19
Mevinphos	0.01	7	0.02	105	5.56	0.29
Dimethoate	0.01	8	0.02	97	5.79	0.30
Diazinon	0.01	9	0.02	98	5.58	0.29
Parathion-methyl	0.01	12	0.02	103	4.15	0.21
Pirimephos-methyl	0.005	5	0.01	101	4.85	0.23
Fenitrothion	0.005	3	0.01	98	14.3	0.67
Malathion	0.005	3	0.01	96	3.08	0.15
Chlorpyrifos	0.005	9	0.01	107	6.17	0.29
Parathion-ethyl	0.005	3	0.01	94	4.24	0.20
Pirimephos- ethyl	0.005	4	0.01	105	8.44	0.40
Methidathion	0.01	7	0.02	95	6.58	0.35
Prothiophos	0.005	5	0.01	84	6.75	0.32
Profenofos	0.01	4	0.02	96	6.64	0.35
Ethion	0.005	4	0.01	86	3.61	0.17
Triazophos	0.01	4	0.02	95	5.47	0.29
EPN	0.02	4	0.05	79	5.63	0.33
Phosalone	0.02	3	0.05	71	8.04	0.48
Bifenthrin	0.002	6	0.005	81	25.6	1.09
Lambda-cyhalothrin	0.002	3	0.005	78	12.86	0.55
Permethrin	0.02	4	0.1	91	15.91	1.06
Cyfluthrin	0.01	4	0.02	99	10.15	0.53
Cypermethrin	0.01	4	0.02	97	13.06	0.69
Fenvalerate	0.01	5	0.02	89	17.07	0.90
Deltamethrin	0.01	3	0.02	82	11.88	0.62
Alpha-endosulfan	0.002	20	0.005	82	19.74	0.84
Beta-endosulfan	0.002	11	0.005	77	22.5	0.96
Endosulfan-sulfate	0.002	10	0.005	79	21.92	0.94

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous 18 ชนิด, Pyrethroid 7 ชนิด และ Endosulfan 3 ชนิดในมังคุด โดยวิธีทดสอบจากการประยุกต์ของวิธีการของ Steinwandter (1985) โดยการสกัดด้วย acetone, dichloromethane และ sodium chloride ทำการ clean up โดยใช้ส่วนผสมของ sorbent ชนิด PSA และ SAX (1:1) ชะด้วย hexane : dichloromethane 4 : 1 และ 1 : 1 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas chromatograph ผลการวิเคราะห์พบว่า linearity/range ของสารทั้ง 3 กลุ่ม มีค่า correlation coefficient > 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การทดสอบกลุ่ม Organophosphorous, Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด พบว่ามีค่า Range อยู่ในช่วง 0.01 - 2.00, 0.005 - 0.5 และ 0.005 - 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การพิสูจน์ accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70 - 120 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 สำหรับค่า LOD อยู่ระหว่าง 0.005 - 0.02, 0.002 - 0.02 และ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ อยู่ระหว่าง 0.01 - 0.05, 0.005 - 0.1 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในงานบริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างรวมทั้งใช้ในงานวิจัย
2. ใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025
3. ถ่ายทอดวิธีการวิเคราะห์ให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8
4. เสนอผลงานวิจัยเพื่อให้ผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. **Method Validation**. เอกสารประกอบการฝึกอบรมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

วิสุทธิ เชวงศรี, รัชนี สุวภาพ และปิยะศักดิ์ อรรคบุตร. 2551. **การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Triazole ในมะม่วง**. ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2551. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

สถาบันอาหาร. 2547. **การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี**. เอกสารประกอบการอบรม. ณ โรงแรมมิราเคิล กรุงเทพฯ.

Codex. 1995. ***Codex Alimentarius*** volumn 3. Residues of Veterinary Drugs in Food.

Dogheim, S.M., S.A.G. Alla, A.M.E. Marsafy and S.M. Fahmy. 1999. Monitoring pesticide residues in Egyptain. fruit and vegetable in 1995 **J. AOAC** Int. 82 : 948 – 955.

European Commission (EC). 2000. Guidance Document on Residue Analytical Methods. **SANCO**/825/00 rev6 20/06/00. 16p.

FAO/WHO. 1997. FAO manual on the submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue level in food and feed. **Food and Agricultural Organization of the United Nation.** Rome.

Food and Drug Administration (FDA). 2005. Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Method. **ORA Laboratory Procedure**. USA.

Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to Validate Pesticide Residue Method Performance. *In* Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus (eds), **the Royal Society of Chemistry** 2000, U.K. 305p.

ISO/IEC 17025. 2005. General Requirement for the Competener of Testing and Calibration Laboratories. 280.

Kuet A.C.L. and L. Seng. 2004. Solid phase Extraction Clean up Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in vegetables. **Malaysian Journal of chemistry** 6 : 029 - 038.

Keith, L., H, W. Crummett., J. Deegan., R.A. Libby., J.K. Taylor. and G. Wentler. 1983. Principle of Environmental Analysis. **J Anal. Chem**. 55 : 2210 - 2218.

Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min. On-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residue and Industrial Chemicals. **Fresenius Z. Anal Chem.** 314 : 129 - 130.

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Alpha - cypermethrin

Method Validation of Alpha - cypermethrin in Pesticide Formulations

จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม ยุพดี จิตรไพศาล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Alpha – cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง สูตรผสมชนิด EC ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยมีตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) ด้วยแคพิลลารี่คอลัมน์ HP - 5 (30 m × 0.32 mm (id.) 0.25 µm film thickness) ใช้ He เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C เวลา13 นาที อุณหภูมิการฉีด 270 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µl วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.21 - 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.42 - 1.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) พิจารณาจาก %Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเท่ากับ 98.96, 100.36 และ 100.48 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC %Recovery เท่ากับ 98 - 102 ความเที่ยง (Precision) ได้ค่าเท่ากับ 1.876, 1.941 และ 1.780 ตรวจสอบค่า Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.599, 1.805 และ 0.366 ตรวจสอบค่า Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.043, 0.655 และ 0.656 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ได้ที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

คำนำ

สารป้องกันและกำจัดแมลง alpha – cypermethrin เป็นสารกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (pyrethriods) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตาย ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น (*S*) - α - cyano - 3 - phenoxybenzyl (1*R*, 3*R*) - 3 - (2, 2 - dichlorovinyl) - 2, 2 - dimethylcyclopropanecarboxylate การวิเคราะห์ปริมาณ สารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol.H โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC – FID ใช้ Capillary column ชนิด DB – 1 ขนาด 30 m x 0.25 mm i.d. ความหนา 0.25 µm อุณหภูมิคอลัมน์ 235 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการฉีดสาร 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจจับ 300 องศาเซลเซียส ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาอัตรา 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ di - (2 - ethylhexyl) phthalate เป็นสารมาตรฐานภายใน และใช้

tetrahydrofuran เป็นตัวทำละลาย มีค่า LD_{50} (rat) เท่ากับ 1,650 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่มีความเป็นพิษสูงกว่า acetone มีค่า LD_{50} (rat) เท่ากับ 5,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ซึ่งใช้ตัวทำละลายในวิธีที่พัฒนาขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin 10% w/v EC โดยใช้เทคนิค GC – FID ที่ใช้ Capillary column ที่ทันสมัยในการแยกสาร สามารถให้ผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือ ถูกต้องแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ซึ่งเป็นข้อกำหนด ข้อที่ 5.4.2 ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร ขนาด 25, 50, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน alpha - cypermethrin ความบริสุทธิ์ 99.0%
2. สารเข้มข้น (Technical material) ของ alpha - cypermethrin 95% min. Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ alpha - cypermethrin 10 % w/v EC
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. **การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์** alpha – cypermethrin **สูตร** 95% min Tech.

เพื่อใช้สารเข้มข้นนี้แทนสารมาตรฐานที่มีราคาแพง และมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งกระบวนการตรวจสอบต้องเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น จึงใช้สารปริมาณมาก โดยวิธีวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง GC - FID

Capillary column : HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm)

Oven temperature	: 250 ºC
Injector temperature	: 270 ºC
Detector temperature	: 270 ºC
Split injection	: Split ratio 50 : 1
Carrier gas	: Helium 2.0 ml/min
Injection volume	: 1 µl
Run time	: 13 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน alpha – cypermethrin

ชั่งสารมาตรฐาน alpha – cypermethrin ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม (±1.0 มิลลิกรัม) จำนวน 2 ซ้ำ (C_A,C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin

ชั่งสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 10 มิลลิกรัม (± 1.0 มิลลิกรัม) จำนวน 10 ซ้ำ (TC_1-TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC – FID

เมื่อปรับตั้งสภาวะของเครื่อง GC – FID เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1% จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ตามลำดับ ดังนี้

C_A, TC_1, TC_2, C_B, TC_3, TC_4, C_A,.....

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสูตรสารเข้มข้น

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

$$f = \frac{S \times P}{H_S}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน alpha – cypermethrin หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน alpha – cypermethrin

จากนั้นคำนวณค่า %RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า %RPD แตกต่างกันไม่เกิน 3% จากสูตร

$$\% \text{ RPD} = \frac{(\text{f of maximum - f of minimum}) \times 100}{\text{f of average}}$$

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha - cypermethrin (\% w/w)} = \frac{f_{avr.} \times H_W}{W}$$

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin หน่วยเป็นมิลลิกรัม

$f_{avr.}$ = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin 10% (W/V) EC

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 ชั่งสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.21, 0.42, 1.04, 2.08, 2.50 และ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC – FID ที่เตรียมสภาวะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC – FID

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย alpha – cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 3 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ ความเข้มข้น 0.4 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC – FID

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย alpha – cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r)$\geq$0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอนเพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 2,523.1 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone จนหลายๆ ครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.399 0.999 และ 1.599 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC – FID

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งผลิตภัณฑ์ alpha – cypermethrin 10%w/v EC ปริมาณ 10,000.4 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC – FID ได้ค่า O

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin จากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 3, 5 และ 8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง GC - FID ได้ค่า F

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{F - O \times 100}{C}$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร alpha – cypermethrin ในสารละลาย fortified sample (มก./25 มล.)

O คือ ปริมาณสาร alpha – cypermethrin ในสารละลาย original sample (มก./25 มล.)

C คือ ปริมาณ added sample (มก.)

ค่าความแม่น ต้องได้ % Recovery อยู่ในช่วง 98 - 102% ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอนเพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 1,261.6 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.399, 0.999 และ 1.599 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC – FID

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ alpha – cypermethrin 10 %w/v EC

เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ alpha - cypermethrin 10%w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 125, 250 และ 375 มิลลิกรัม (± 5.0 มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

2.3.4 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\text{\% RSD ที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี}}$$

เมื่อ % RSD (relative standard deviation) $= \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความแข็ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่ง ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันอีกอันหนึ่ง และภายใต้สภาวะเงื่อนไขเดิม

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha – cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ alpha – cypermethrin 10% w/v EC

เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ alpha – cypermethrin 10% w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 250, 500 และ 750 มิลลิกรัม (± 5.0 มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin

โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC – FID เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\%\ \text{RSD ที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี}}$$

เมื่อ % RSD (relative standard deviation) = $\frac{SD}{\bar{X}} \times 100$

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2554 ถึงเดือน กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูตร 95% min Tech เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.1

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้น 0.21 - 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.42 - 1.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

การตรวจสอบค่าความแม่น (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin 10% w/v EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ คำนวณค่า % Recovery เท่ากับ 98.96, 100.36 และ 100.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง %Recovery เท่ากับ 98 - 102 พิจารณาตามเกณฑ์ที่มีปริมาณสารในตัวอย่างไม่เกิน 10% ค่าความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถครอบคลุมช่วงที่ใช้งานการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นหมายความว่า ถ้าผู้วิเคราะห์เตรียมสารละลายตัวอย่างสูงกว่าหรือต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้งานจริง สามารถให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องเช่นกัน

ตารางที่ 1. การตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Active ingredient content (mg/25 ml)								
	Concn.(0.5 mg/ml)			Concn.(1.0 mg/ml)			Concn.(1.5 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	11.034	21.481	9.9913	11.034	37.076	24.978	11.034	47.449	34.969
2	11.034	21.331	9.9913	11.034	37.099	24.978	11.034	47.355	34.969
3	11.034	21.275	9.9913	11.034	37.158	24.978	11.034	47.085	34.969
4	11.034	21.271	9.9913	11.034	37.024	24.978	11.034	47.267	34.969
5	11.034	20.889	9.9913	11.034	36.582	24.978	11.034	46.822	34.969
6	11.034	20.884	9.9913	11.034	36.117	24.978	11.034	45.839	34.969
7	11.034	20.511	9.9913	11.034	36.571	24.978	11.034	46.033	34.969
8	11.034	20.814	9.9913	11.034	36.028	24.978	11.034	45.612	34.969
9	11.034	20.422	9.9913	11.034	35.694	24.978	11.034	45.891	34.969
10	11.034	23.113	9.9913	11.034	35.726	24.978	11.034	45.714	34.969
% Recovery		98.96			100.36			100.48	

ค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.66, 10.62 และ 10.60 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% $RSD_{exp.}$) เท่ากับ 3.499, 2.062 และ 3.321 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จากทฤษฎี (% $RSD_{Horwitz.}$) เท่ากับ 1.866 และคำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 1.876, 1.105 และ 1.780 (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 2. การตรวจสอบ Precision ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	133.0	10.96	269.1	10.60	328.9	10.09
2	117.4	10.02	246.7	10.55	406.6	10.80
3	125.4	10.51	241.7	10.22	408.6	10.80
4	125.5	10.22	246.8	10.41	340.8	10.36
5	139.1	10.33	263.9	10.93	443.8	10.41
6	132.9	10.76	399.1	10.85	486.5	10.01
7	117.5	10.84	241.8	10.51	329.0	10.79
8	125.6	10.87	375.4	10.79	406.7	10.95
9	114.1	10.86	314.0	10.78	408.7	10.86
10	139.2	11.21	239.0	10.53	340.9	10.93
Mean	-	10.66	-	10.62	-	10.60
SD		0.373		0.219		0.352
$\%RSD_{exp.}$		3.499		2.062		3.321
Horwitz		1.866		1.866		1.866
HORRAT		1.876		1.105		1.780

สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness/Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.27 และ 10.02 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) สำหรับ Robustness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.599, 1.805 และ 0.366 Ruggedness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 1.043, 0.655 และ 0.656 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2 แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)	
	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness
1	10.86	10.02	10.88	10.08	10.12	9.96
2	10.85	10.63	10.33	9.91	9.96	10.08
3	10.80	9.95	10.35	9.95	9.99	10.02
4	10.61	10.16	9.88	10.05	10.06	10.01
5	10.70	9.94	9.95	9.84	9.92	9.96
6	10.86	10.18	9.86	9.82	9.93	10.06
7	10.67	10.08	10.30	9.86	9.97	10.37
8	10.71	10.04	9.92	9.76	9.92	10.01
9	10.70	10.14	9.80	9.69	9.92	10.02
10	10.49	10.05	9.93	9.91	9.94	9.94
Mean	10.73	10.12	10.12	9.89	9.97	10.04
SD	0.120	0.197	0.341	0.121	0.068	0.123
% $RSD_{exp.}$	1.118	1.947	3.369	1.223	0.682	1.225
Horwitz	1.866	1.866	1.866	1.866	1.866	1.866
HORRAT	0.599	1.043	1.805	0.655	0.366	0.656

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) มีตัวตรวจจับ (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย Capillary column ชนิด HP - 5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm) มีสภาวะเครื่องการใช้งานที่ Oven temperature, Injector temperature, Detector temperature เท่ากับ 250, 270 และ 270 ºC ตามลำดับ Split ratio 50 : 1 Helium 2.0 ml/min, Injection volume 1 µl, Run time 13 min

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.42 – 1.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

alpha – cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง พบว่า ได้ค่า %recovery เท่ากับ 98.96, 100.36 และ 100.48 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98 – 102% สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10%

สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.876, 1.941 และ 1.780 การตรวจสอบค่าความแข็ง Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha – cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน เวลา (reproducibility) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.685 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.818 เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT ≤ 2

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ alpha - cypermethrin ตามแหล่งจำหน่าย

2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธีตามมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. **Method Validation.** เอกสารประกอบการฝึกอบรมกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (อัดสำเนา)

สถาบันอาหาร. 2547. **การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี** เอกสารประกอบการอบรม สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. (อัดสำเนา)

Anonymous. 1993. **The Agrochemicals Handbook 3rd. ed.** The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.

Dobrat W. and A Martijn H. 1988. **CIPAC Handbook Vol. H: Analysis of Technical and Formulated Pesticides.** Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, The Black Bear Press, England.

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิด ในทุเรียนโดยวิธี QuEChERS ด้วยเทคนิค Gas Chromatograph

Validation of QuEChERS method for determination of organophosphorus pesticide residues in durian using gas chromatography with FPD

ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล ศศิมา มั่งนิมิตร์ วิทยา บัวศรี

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) วัตถุมีพิษจำนวน 29 ชนิด ในทุเรียน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ QuEChERS ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ด้วยเครื่อง Gas Chromatography/ECD – FPD ตาม parameter ที่ทดสอบ ทำการทดลองในทุเรียนที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ 5 ระดับ คือ 0.01, 0.025, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากผลการทดสอบการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิดในทุเรียน พบว่าวัตถุมีพิษจำนวน 29 ชนิด มีความเหมาะสมในการทดสอบ โดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง (Accuracy) และมีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ Range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้นมีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.997 – 1.0 พบว่าวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟ 29 ชนิด อยู่ในช่วง 0.01 – 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า % การวิเคราะห์ย้อนกลับระหว่าง ≤ 49 – 152%, 60 – 108%, 81 – 148%, 89 – 132% และ 88 – 116% ตามลำดับมีค่า LOD ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วัตถุมีพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ etroprophos, phorate, chlorpyrifos – methyl, parathion – methyl, malathion, chlorpyrifos, parathion – ethyl, methidathion, prothiophos, ethion และ triazophos วัตถุมีพิษ 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม dichlovos, omethoate, dicrotophos, dimethoate, diazinon, pirimiphos – methyl, fenitrothion, pirimiphos – ethyl, EPN, phosalone และ coumaphos วัตถุมีพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ acephate, monocrotophos, phosphamidon, phenthoate และ profenophos วัตถุมีพิษจำนวน 2 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ methamidophos และ azinphos – methyl

คำนำ

ในปัจจุบันได้มีการคำนึงถึงเรื่องสุขภาพอนามัยและสิ่งแวดล้อมจากการใช้สาร chlorinated solvents จึงเกิดวิธีการวิเคราะห์ใหม่ๆ ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารดังกล่าวในการสกัด โดยใช้สารอื่นที่เป็น non – halogen – containing และ solvent mixtures เช่น ethyl acetate : acetonitrile และ cyclohexane : ethyl acetate เป็นต้น จากความต้องการวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถใช้กับพืชและวัตถุมีพิษหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว รวมทั้งคุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์สูง ลดขั้นตอนและแรงงานคนในการสกัดตัวอย่าง ใช้สารเคมีและเครื่องแก้วน้อย ในปี 2002 Michelangelo Anastassiades และคณะได้ พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ และตั้งชื่อว่า QuEChERS Method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ในปี 2003 ได้เผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of AOAC International หลังจากนั้นห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง CVUA Stuttgart ประเทศเยอรมัน (The pesticide residue laboratory of the CVUA Stuttgart, Germany) ได้นำวิธีนี้มาใช้สำหรับงานประจำในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ และได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency test) กับ EU – PT 4 ในส้ม (2002) ซึ่งให้ผลทดสอบที่ดีเยี่ยมต่อมา Steven J Lehotay และคณะ ได้มีการดัดแปลงและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้โดยการขยายขอบข่ายทั้งชนิดของสารและพืช โดยใช้ buffering salts เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกลับคืนได้ของสารที่วิเคราะห์ (Recoveries) ที่ pH มีผลต่อสาร analytes โดยใช้ acetate buffering ในการปรับค่า pH ประมาณ 6 ในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ และได้ตีพิมพ์ในวารสาร AOAC 2007.01 Anastassiades และคณะ ได้พัฒนาวิธีการนี้โดยใช้ citrate salts สำหรับเป็น buffering ในการตรวจวิเคราะห์สารที่วิเคราะห์ได้ยากในพืช และได้ตีพิมพ์และเผยแพร่ใน the European Standard EN 15662 ปี 2008

ปัจจุบันวิธี QuEChERS เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการนิยมอย่างแพร่หลายในกลุ่มประเทศยุโรป สหรัฐอเมริกา และประเทศต่างๆ นำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ และความสามารถของวิธีการในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และใช้ตรวจวิเคราะห์ที่เป็นงานประจำทั้งภาครัฐและเอกชน วิธีนี้จะใช้ Acetonitrile เป็นสารในการสกัด มีข้อดีคือสามารถใช้ได้ทั้ง GC และ HPLC ในขั้นตอนการสกัดจะใช้ Magnesium sulfate anhydrous เพื่อใช้ในการ partition และเพิ่มประสิทธิภาพของ recoveries (การวิเคราะห์ย้อนกลับ) สำหรับในขั้นตอนของการ clean – up (การขจัดสิ่งปนเปื้อน) Magnesium sulfate anhydrous จะทำหน้าที่เป็นสารที่ดูดน้ำ Sodium Chloride ช่วยในการลดความเป็น Polar ของ co – extractales และสามารถลด recoveries ของสารวิเคราะห์ที่เป็น polar (polar analytes) Primary Secondary Amine (PSA) ใช้ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน พวก organic acids, sterols และกลุ่มของน้ำตาลและไขมันบางชนิด และ C_{18} ใช้ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน พวก hydrophobic interferants เช่น ไขมัน

การดำเนินกิจกรรมต่างๆ ในยุคปัจจุบันหลายๆ กรณี ต้องอาศัยผลการวัดจากห้องปฏิบัติการเป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจ เช่น การเฝ้าระวังกระบวนการผลิต การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การยืนยันความเป็นไปตามข้อกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของสินค้า การเฝ้าระวังความเป็นอันตรายต่อคนและสภาวะแวดล้อม รวมถึงการใช้มาตรการสุขอนามัยทางการค้าในตลาดโลก ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้องและเป็นที่น่าเชื่อถือนั้น วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นำมาใช้ต้องมีการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (method

validation) เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน (ทิพวรรณ, 2549) การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะที่ต้องศึกษา ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ช่วงของการใช้งาน (working range) ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาปริมาณได้โดยมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Limit of Quantitation, LOQ) ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด เนื่องจากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร จำเป็นต้องติดตามและเตรียมความพร้อมที่จะต้องปฏิบัติให้ได้ตามกฎเกณฑ์ต่างๆ ดังนั้นจึงพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในทุเรียน ด้วยเทคนิค GC เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน สามารถในการตรวจวัดหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่มีอยู่ปริมาณน้อยในตัวอย่างได้ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร (Polypropylene, LP, ITALIA)

1.2 centrifuge tubes ขนาด 10 – 15 มิลลิลิตร (Polypropylene,LP, ITALIA)

1.3 graduated centrifuge tubes ขนาด 10 – 15 มิลลิลิตร (Pyrex)

1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง

1.5 ตู้อบ และเตาเผา

1.6 เครื่องบดสับตัวอย่าง (food processor)

1.7 vortex mixer

1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมด้วย adapter สำหรับ tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 10 – 15 มิลลิลิตร

1.9 อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย (auto pipette)ขนาด 20 – 200 ไมโครลิตร 0.1 – 1 มิลลิลิตร 0.5 – 5 มิลลิลิตร และ 1 – 10 มิลลิลิตร อุปกรณ์ดูดจ่ายสารเคมีจากขวด (dispenser) ขนาด 25 มิลลิลิตร

1.10 เครื่องลดปริมาตรโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตนเจน (nitrogen evaporator)

1.11 เครื่อง Gas Chromatograph ซึ่งมีหัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector : FPD ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890

2. สารเคมี

2.1 acetonitrile, ชนิด pesticide grade J.T. Baker

2.2 magnesium sulfate - dried(powder, Fisher) เผาที่ 500 ^{0}C นาน 5 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่ตู้ดูดความชื้น

2.3 Octadecyl C_{18} J.T. Baker

2.4 acetic acid (HOAc) : glacial

2.5 anhydrous sodium acetate (NaOAc) (powder - Merck)

2.6 primarry-secondary – amine (PSA) sorbent: particle size 40 µm (Varian part No.12213024)

2.7 toluene ชนิด pesticide grade J.T. Baker

2.8 helium gas : purity 99.999% และ N_2 gas

3. สารมาตรฐาน

สารละลายผสมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด ได้แก่ methamidophos, dichlovos, acephate, omethoate, etroprophos, dicrotophos, monocrotophos, phorate, dimethoate, diazinon, phosphamidon, chlorpyrifos – methyl, parathion – methyl, pirimiphos – methyl, fenitothion, malathion, chlorpyrifos, parathion – ethyl, pirimiphos – ethyl, phenthoate, methidathion, prothiophos, profenophos, ethion, triazophos, EPN, Phosalone, azinphos – methyl และ coumaphos

1. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างทุเรียนประมาณ 10 กิโลกรัม นำเนื้อและเปลือก มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (food processor) คลุกเคล้าให้เข้ากันดีก่อนชั่งตัวอย่างละ 10 ± 0.1 กรัม ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เป็น analytical sample เพื่อนำไปสกัดหาสารพิษตกค้าง ในตัวอย่าง (blank) ซึ่งจะนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ – 20 °C สำหรับใช้ในครั้งต่อไป

2. การสกัดและการ clean up ตัวอย่าง

2.1 การสกัดตัวอย่าง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ Variation of QuEChERS – Method for Avocado (fatty matrix in presence of water). Community Reference Laboratory for Single Residue Methods. CVUA Stuttgart Germany และ (Anastassiades, M. 2007) ดังนี้

2.1.1 ชั่งตัวอย่างทุเรียนตัวอย่างละ 5 ± 0.1 กรัมใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.1.2 เติม น้ำ 6.5 มิลลิลิตร และสารละลาย acetonitile จำนวน 10 มิลลิลิตร

2.1.3 เติม Disodium hydrogencitrate sesquihydrate จำนวน 0.5 กรัม

2.1.4 เติม Trtisodium citrate dehydrate จำนวน 1 กรัม

2.1.5 เติม anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$) จำนวน 4 กรัม และ Sodium Chloride จำนวน 1 กรัม ปิดฝา

2.1.6 เขย่าด้วยมือ และเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที

2.1.7 นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 5 นาที

2.2 การ clean up ทำความสะอาดตัวอย่าง โดย Dispersive-SPE Cleanup

2.2.1 ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง จำนวน 4 มิลลิลิตร ด้วย autopipette ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร

2.2.2 ที่ ใส่ PSA 100 มิลลิกรม และ ODS C_{18} 100 มิลลิกรัม ไว้แล้ว ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุด นาน 1 นาที

2.2.3 นำไป centrifuge ด้วย ที่ระดับความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 5 นาที

2.2.4 ดูดสารละลาย 0.6 มิลลิลิตร ใส่ใน GC-vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC/FPD ปริมาณ 2 µl เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของวัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

3. การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC/FPD

3.1 การตั้งสภาวะของเครื่อง GC/FPD 6890 โดยใช้

FPD Column: DB – 5ms; 30 m. length (i.d.) 0.25 mm 0.25 µm. film thickness ปรับสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

3.1.1 oven : temperature: 100°C initial temp ramped to 175°C (25°C/min), 225°C (5°C/min), 290°C (25°C/min runtime) hold 10 min, runtime = 21.6 min

3.1.2 carrier gas : Helium, flow 1.5 ml/min, Mode: Constant flow

3.1.3 injector : injection temperature 250°C, inlet : EPC Mode : pulsed splitless, injection pulse pressure 56.40 psi until 0.75 min,

3.1.4 injection volume 2 µl

3.2 การทำ Calibration curve

ปรับสภาพเครื่องให้อยู่ในสภาพพร้อมจะใช้งาน นำสารละลาย working standard solution ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC/FPD เพื่อทำ calibration curve เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน โดย plot กราฟระหว่างพื้นที่ใต้ peak (peak area) ในแกน y และความเข้มข้นของสารในแกน x ซึ่ง calibration curve เป็นกราฟเส้นตรง (linear line) มีค่า correlation ของ linear regression (R^2) ไม่น้อยกว่า 0.995

3.3 การตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารพิษตกค้าง

ฉีดสารสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่า retention time ของ peak ตัวอย่างกับ peak ของสารมาตรฐานเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน (qualitative data analysis) นำมาคำนวณปริมาณโดยเทียบพื้นที่ใต้ peak ระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารสกัดตัวอย่าง (quantitative data analysis)

4. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

4.1 Accuracy

เป็นการวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษลงในตัวอย่างที่ไม่มีวัตถุมีพิษที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (sample blank) และทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้ (% recovery) ทำการทดลองในตัวอย่างทุเรียนที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ 7 ระดับ คือ 0.01, 0.025 0.05, 0.10, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ 7 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยประเมิน accuracy จาก % recovery โดยเกณฑ์การยอมรับ Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ Codex, 1995

4.2 Precision

เป็นการวัดความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (repeatability) ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ใช้วิธีวิเคราะห์ เครื่องมือและผู้วิเคราะห์ชุดเดียวกัน ซึ่งทำการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับความ

เข้มข้น ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาหา %RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ค่า precision ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

4.3 Limit of quantitation (LOQ)

LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุมีพิษในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยง (precision) ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

4.4 Limit of detection (LOD)

LOD เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามรถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ต้องมีค่าอัตราส่วนของ Signal/Noise ของแต่ละสารมากกว่า 3

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุเรียนที่นำมาใช้ในการทดลอง** (blank)

ผลการวิเคราะห์ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างของกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวม 29 ชนิด ในตัวอย่างทุเรียนที่นำมาใช้ทดสอบ

2. **ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์**

2.1 Linearity และ Range ผลการวิเคราะห์ พบว่า range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.997 – 1 พบว่าวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 24 ชนิด อยู่ในช่วง 0.01 – 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้นวัตถุมีพิษ 6 ชนิด ได้แก่ methamidophos acephate, omethoate, monocrotophos, azinphos – methyl อยู่ในช่วง 0.025 – 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2.2 Accuracy และ Precision ทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (%recovery) โดยเกณฑ์ยอมรับของ accuracy ที่ความเข้มข้นของวัตถุมีพิษในตัวอย่าง $>$ 0.01mg/kg $\leq$ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70 – 120 (Codex, 1995) precision มีค่า %RSD $\leq$ 20 และ HORRAT $\leq$ 2

ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของวัตถุมีพิษกลุ่ม จำนวน 29 ชนิด ในตัวอย่างทุเรียน (ตารางที่ 1.1 และ 1.2) %recovery ของผลวิเคราะห์ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (%recovery อยู่ในช่วง 70 – 120) จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ etroprophos, phorate, chlorpyrifos – methyl, parathion – methyl, malathion chlorpyrifos, parathion ethyl, methidathion, prothiophos, ethion, และ triazophos มี %recovery ในช่วง 77 – 110% และค่า precision มี %RSD ในช่วง 1.1 – 7.7 และ HORRAT ในช่วง 0.1 – 0.4

ผลการวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับระดับความเข้มข้น 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 11 ชนิด (ตารางที่ 1) ได้แก่ dichlovos, omethoate, dicrotophos, dimethoate, diazinon, pirimiphos – methyl, fenitrothion, pirimiphos – ethyl, EPN, phosalone และ coumaphos ค่า accuracy มี %recovery ในช่วง 71 – 96% ค่า precision

%RSD ในช่วง 9.0 – 13.7 และ HORRAT ในช่วง 0.5 – 0.8 ยกเว้น methamidophos และ azinphosmethyl ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

วัตถุมีพิษจำนวน 5 ชนิด ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ acephate, monocrotophos, phosphamidon, phenthoate และ profenophos %recovery ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า accuracy มี %recovery ในช่วง 98 – 114% ค่า precision %RSD ในช่วง 5.2 – 8.8 และ HORRAT ในช่วง 0.3 – 0.6

วัตถุมีพิษ methamidophos ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า accuracy มี %recovery เท่ากับ 90% ค่า precision %RSD เท่ากับ 4.0 และ HORRAT เท่ากับ 0.38

วัตถุมีพิษ azinphos – methyl ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า accuracy มี %recovery เท่ากับ 113% ค่า precision %RSD เท่ากับ 10.1 และ HORRAT เท่ากับ 0.94

2.3 Limit of Detection (LOD) จากการวิเคราะห์ fortified samples วัตถุมีพิษจำนวน 24 ชนิดในทุเรียนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 7 ซ้ำ คำนวณอัตราส่วนของ Signal/Noise ของแต่ละสารต้องมีค่ามากกว่า 3 ค่า LOD ของวัตถุมีพิษจำนวน 24 ชนิดที่ใช้วิธีการทดสอบนี้เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ dichlovos, etroprophos, dicrotophos, phorate, dimethoate, diazinon, phosphamidon, chlorpyrifos – methyl parathion – methyl, pirimiphos – methyl, fenitrothion, malathion, chlorpyrifos, parathion – ethyl, pirimiphos - ethyl, phenthoate, methidathion, prothiophos, profenophos, ethion, triazophos, EPN, phosalone และ coumaphos วัตถุมีพิษ จำนวน 5 ชนิด มีค่า LOD เท่ากับ 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ methamidophos, acephate, omethoate, monocrotophos และ azinphos – methyl

2.4 Limit of Quantitation (LOQ) จากการทำ fortified samples วัตถุมีพิษจำนวน 29 ชนิด ในตัวอย่างทุเรียนที่ระดับความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ มีผลการทดสอบดังนี้ (ตารางที่1)

วัตถุมีพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ etroprophos, phorate, chlorpyrifos – methyl, parathion – methyl, malathion, chlorpyrifos, parathion – ethyl, methidathion, prothiophos, ethion และ triazophos

วัตถุมีพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ dichlovos, omethoate, dicrotophos, dimethoate, diazinon, pirimiphos – methyl, fenitrothion, pirimiphos – ethyl, EPN, phosalone และ coumaphos

วัตถุมีพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ acephate, monocrotophos, phosphamidon, phenthoate และ profenophos

สำหรับวัตถุมีพิษ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ methamidophos และ azinphos – methyl มีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ทำการทดลองในทุเรียนที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ 5 ระดับ คือ 0.01, 0.025, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากผลการทดสอบการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิด

ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของวัตถุมีพิษกลุ่ม จำนวน 29 ชนิด ในตัวอย่างทุเรียน Range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.997 – 1.0 มีค่า % การวิเคราะห์ย้อนกลับ ระหว่าง $\leq$ 49 – 152%, 60 – 108%, 81 – 148%, 89 – 132% และ 88 – 116% ตามลำดับ มีค่า LOD ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วัตถุมีพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ etroprophos, phorate, chlorpyrifos – methyl, parathion – methyl, malathion, chlorpyrifos, parathion – ethyl, methidathion, prothiophos, ethion และ triazophos

วัตถุมีพิษ 11 ชนิดมีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ dichlovos, omethoate, dicrotophos, dimethoate, diazinon, pirimiphos – methyl, fenitrothion, pirimiphos – ethyl, EPN, phosalone และ coumaphos

วัตถุมีพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ acephate, monocrotophos phosphamidon, phenthoate และ profenophos วัตถุมีพิษจำนวน 2 ชนิดมีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้แก่ methamidophos และ azinphos – methyl

การนำไปใช้ประโยชน์

1. นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับ นักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย นิสิต และนักศึกษา ที่จะทำการพัฒนาและปรับวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีการที่ดีและเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

2. นำไปถ่ายทอดให้แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 เพื่อเป็นการพัฒนาและเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร

3. นำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว

4. จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐ และเอกชน นำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อติสุข และ ทิพวรณ นิ่งน้อย. 2547. **Method Validation**, เอกสารการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ดุษฎี มั่นความดี และอุมาพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation), เอกสารการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. **แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว**. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.

Anastassiades,M. 2007. prEN 15662: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS (/MS) following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS method Brussels, Belgium, European Commitee for Standardization.

Community Reference Laboratory for Single Residue Methods. 2010. Variation of QuEChERS-Method for Avocado (fatty matrix in presence of water). CVUA Stuttgart, Schaflandstr. Fellbanch, Germany Codex. 1995. Codex Alimentarius volume3. Residues of Veterinary Drugs in Food.

European Commission (EC). 2000. Guidance Document on Residue Analysis Method. SANCO/825/00 rev. 620/06/00. 16p.

Food Standard Agency. 2004. Food Standard Agency Information Bulletin on Methods of Analysis and Sampling for Foodstuffs. Institute of Food Research,UK. http://www.food.gov.uk.

Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to validate Pesticide Residue Method Performance. In: Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus (eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

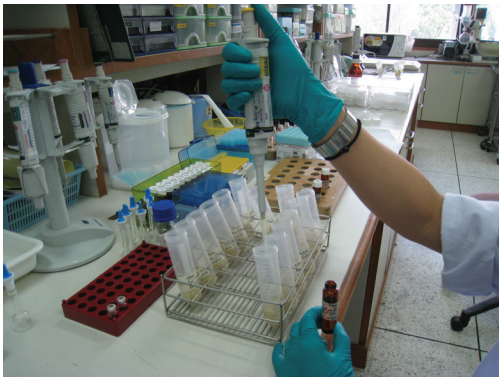
Lehotay, S. J. 2007. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partition with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. **J. AOAC** Int. 90, 485-520.

ตารางที่ 1. ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด ในทุเรียน

		Linear	Correlation	LOD	LOQ	Accuracy (%Recovery)						Precision (%RSD)						Precision (HORRAT)					
No.	Pesticide	Range	coefficient	(mg/kg)	(mg/kg)	Concentration (mg/kg)						Concentration (mg/kg)						Concentration (mg/kg)					
		(ng)				0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0
1	methamidophos	0.025-	0.999	0.025	0.5	98	70	81	81	90	88	-	-	-	-	4.5	1.6	-	-	-	-	0.4	0.1
2	diclovos	0.01-	0.999	0.01	0.025	87	78	95	96	104	106	22.9	9.0	4.2	4.6	4.3	5.4	1.1	0.5	0.3	0.3	0.4	0.5
3	acephate	0.025-	0.999	0.025	0.05	-	69	98	71	110	94	-	14.6	8.8	2.5	6.3	4.0	-	0.7	0.5	0.2	0.5	0.4
4	omethoate	0.025-	0.997	0.025	0.025	-	78	97	74	112	109	-	11.8	10.4	5.0	5.2	4.0	-	0.6	0.6	0.3	0.5	0.4
5	etroprophos	0.01-	0.999	0.01	0.01	77	81	93	113	105	105	9.2	6.9	4.1	3.7	3.8	1.0	0.4	0.4	0.2	0.3	0.3	0.1
6	dicrotophos	0.01-	0.999	0.01	0.025	152	81	89	90	111	110	12.0	9.5	5.5	4.2	5.1	2.4	0.6	0.5	0.3	0.3	0.4	0.2
7	monocrotophos	0.025-	1	0.025	0.05	-	66	111	74	118	114	-	-	6.8	6.5	8.3	3.4	-	-	0.4	0.4	0.7	0.3
8	phorate	0.01-	0.999	0.01	0.01	111	77	94	108	105	104	11.5	8.8	6.8	6.0	3.6	1.4	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3	0.1
9	dimethoate	0.01-	0.999	0.01	0.025	112	87	106	97	112	109	23.5	12.6	8.8	6.4	5.8	2.5	1.1	0.7	0.5	0.4	0.5	0.2
10	diazinon	0.01-	0.999	0.01	0.025	93	80	95	113	106	104	22.5	13.7	8.2	5.4	3.9	0.9	1.1	0.7	0.5	0.4	0.3	0.1
11	phosphamidon	0.01-	0.999	0.01	0.05	-	61	114	100	117	116	12.3	10.3	6.1	8.8	6.6	4.9	0.6	0.5	0.4	0.6	0.6	0.5
12	chlorpyrifos-methyl	0.01-	0.998	0.01	0.01	98	97	95	103	107	109	8.0	13.7	5.8	6.8	4.7	3.8	0.4	0.7	0.3	0.5	0.4	0.4
13	parathion-methyl	0.01-	0.999	0.01	0.01	81	76	102	105	111	111	16.8	6.4	7.6	4.3	5.8	9.3	0.8	0.3	0.5	0.3	0.5	0.9
14	pirimifos-methyl	0.01-	0.995	0.01	0.025	137	96	91	114	105	104	133.0	8.8	8.2	5.0	4.3	1.5	6.6	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1
15	fenitothion	0.01-	0.999	0.01	0.025	135	95	98	106	109	108	78.0	9.9	7.8	5.6	6.0	6.0	3.9	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6
16	malathion	0.01-	0.998	0.01	0.01	87	97	99	117	110	107	16.0	9.8	8.8	7.7	5.4	1.3	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1
17	chlorpyrifos	0.01-	0.999	0.01	0.01	78	93	92	110	103	106	7.4	6.6	10.0	6.2	4.6	2.9	0.3	0.4	0.6	0.4	0.4	0.3
18	parathion-ethyl	0.01-	0.999	0.01	0.01	89	108	97	116	106	105	18.2	12.5	9.2	7.2	4.9	4.5	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4
19	pirimiphos-ethyl	0.01-	0.999	0.01	0.025	120	92	105	115	104	106	12.9	12.7	10.0	3.2	4.1	18.6	0.6	0.7	0.6	0.2	0.4	1.8
20	phenthoate	0.01-	0.998	0.01	0.05	91	87	104	112	110	107	22.9	20.7	9.7	9.2	5.1	1.0	1.1	1.1	0.6	0.6	0.4	0.1
21	methidathion	0.01-	0.998	0.01	0.01	94	100	108	94	114	111	15.8	11.3	5.5	10.2	6.6	1.7	0.7	0.6	0.3	0.7	0.6	0.2
22	prothiophos	0.01-	0.999	0.01	0.01	102	85	87	97	97	98	16.3	21.7	5.9	12.2	8.1	0.9	0.8	1.2	0.4	0.8	0.7	0.1
23	profenophos	0.01-	0.999	0.01	0.05	107	92	100	99	110	109	33.8	20.5	5.2	12.0	6.0	1.7	1.6	1.1	0.3	0.8	0.5	0.2
24	ethion	0.01-	0.999	0.01	0.01	102	88	101	100	107	104	4.5	5.2	9.6	5.4	5.5	0.8	0.2	0.3	0.6	0.4	0.5	0.1

ตารางที่ 1. (ต่อ)

No.	Pesticide	Linear Range (ng)	Correlation coefficient	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Accuracy (%Recovery) Concentration (mg/kg)						Precision (%RSD) Concentration (mg/kg)						Precision (HORRAT) Concentration (mg/kg)					
						0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0
25	triazophos	0.01-	0.999	0.01	0.01	107	83	108	99	112	110	10.6	14.0	7.2	11.1	6.0	3.0	0.5	0.7	0.4	0.7	0.5	0.3
26	EPN	0.01-	0.998	0.01	0.025	49	71	95	98	106	108	39.6	8.7	6.2	11.6	7.4	3.4	1.7	0.4	0.4	0.8	0.6	0.3
27	phosalone	0.01-	0.999	0.01	0.025	113	84	111	90	114	113	37.3	11.1	4.7	15.1	6.9	3.1	1.8	0.6	0.3	1.0	0.6	0.3
28	azinphos-methyl	0.025-	0.999	0.025	0.5	-	80	148	67	133	114	-	7.4	9.0	23.0	10.6	6.6	-	0.4	0.6	1.5	0.9	0.6
29	coumaphos	0.01-	0.998	0.01	0.025	-	89	99	89	115	109	41.6	14.0	10.6	7.6	7.9	2.7	2.1	0.7	0.6	0.5	0.7	0.3

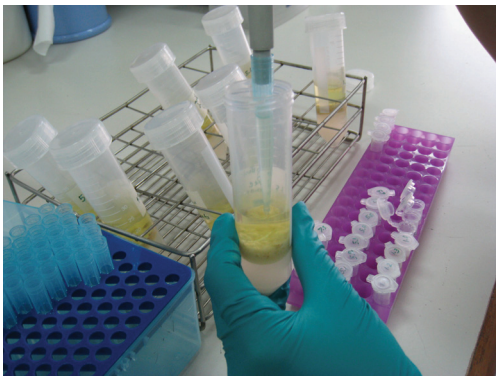


ภาพที่ 1 เติม Mix Standard Solution ลงในตัวอย่าง

ภาพที่ 2 เติมสารละลายสกัดตัวอย่าง

ภาพที่ 3 สกัดสารตัวอย่างด้วยเครื่อง vortex

ภาพที่ 4 สกัดตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง



ภาพที่ 5 ดูดสารละลายสำหรับ Clean up

ภาพที่ 6 เครื่อง GC/MSสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Captan และ Folpet ในผลไม้

Method Development and Validation for Pesticide Residue Analysis in Captan and Folpet

ปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย สมสมัย ปาลกูล ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ วิษณุ แจ้งใบ
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง captan และ folpet ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน และสลายตัวได้ง่ายที่ pH สูง (Base-Labile Compound) และอุณหภูมิสูง จำเป็นต้องทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง จากการทดลองพบว่าการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันช่วยลดการสลายตัวของสาร captan และ folpet และทำให้ตัวอย่างมีเนื้อตัวอย่างที่ละเอียดมากยิ่งขึ้นเหมาะแก่การนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี QuEChERS และเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติการใช้และไม่ใช้น้ำแข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นได้ศึกษาการเติม Analysis Protectants (APs) ในขั้นตอนสุดท้ายก่อนฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องพบว่า เมื่อใช้ APs กับตัวอย่างส่งผลให้ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ดีขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้นเดียวกันของ captan และ folpet พบว่าเมื่อละลายสารมาตรฐานในตัวทำละลาย EtOAc ผสม APs ส่งผลให้พื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้น 86 และ 81% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับเมื่อละลายสารมาตรฐานใน matrix โดยจากการทดลองพบว่า matrix effect มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณ captan และ folpet จึงสามารถใส่ APs แทน matrix เพื่อสะดวกในการทดสอบงานที่ทำเป็นประจำ และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัด พบว่า %Recovery ของการวิเคราะห์ปริมาณ captan และ folpet โดยวิธี Stienwandter (1985) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 81 และ 81 และวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 83 และ 75 ตามลำดับ

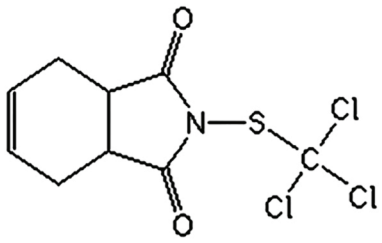
คำนำ

ปัจจุบันการส่งสินค้าเกษตรออกไปยังต่างประเทศโดยเฉพาะในสหภาพยุโรปจะมีการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักผลไม้ตามมาตรฐานด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช หรือ Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS) ซึ่งเป็นมาตรการที่กำหนดขึ้นเพื่อใช้ควบคุมสินค้าเกษตรและอาหาร ในกรณีถ้ากลุ่มประเทศนำเข้ามีการตรวจวัดสารชนิดนั้นๆ แต่ประเทศผู้ส่งออก ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์สารชนิดนั้นได้ นำมาสู่การกีดกันทางการค้า

จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างให้มีความถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

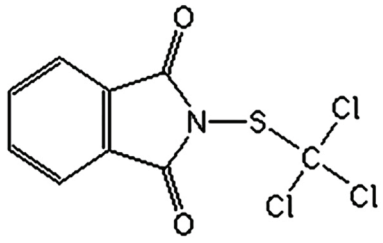
captan เป็นสารกำจัดเชื้อรา dicarboximide ที่ให้ผลในทางป้องกัน รักษาและกำจัดโรคพืชให้หมดสิ้น พิษเฉียบพลันทางปาก (หนู) 9,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางผิวหนัง มากกว่า 4,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใช้กำจัดโรคสแคป โรคเน่าดำ โรคเน่าสีน้ำตาล ในพืชพวก องุ่น แอสพารากัส ถั่วลันเตา ส่วน folpet เป็นสารกำจัดเชื้อรา phthalimide มีพิษเฉียบพลันทาปาก มากกว่า 10,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางผิวหนัง มากกว่า 22,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ป้องกันโรคพืชประเภท โรคใบจุด โรคราแป้ง โรคสเคป โรคมีลาโนส ใช้ในส้ม พืชตระกูลแตง องุ่น พืชผักและไม้ผลทั่วไป (C D S Tomlin, 2006)

โดย captan และ folpet เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (Fungicide) เป็นสารประกอบมีโครงสร้างที่คล้ายกันและเป็นวัตถุอันตรายประเภทสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและ pH สูง (Base-labile pesticide) โดยสลายตัวให้สารชนิดอื่นดังภาพที่ 3 ซึ่งการสลายอาจเกิดในหลายขั้นตอนได้แก่ ขั้นการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนสุดท้ายของการสกัด ขั้นตอนการฉีดใน liner ของ GC (Anastassiades, 2003) ตัวอย่างการแก้ไข เช่น ในขั้นตอนสุดท้ายของการสกัดด้วยวิธี QuEChERS หลังการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA pH ของสารสกัดจะสูง แก้ไขโดยเติม Formic acid (5% in ACN) 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เพื่อปรับเป็น pH~5 จะช่วยลดการสลายตัวของสารได้ หรือใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อช่วยลดอุณหภูมิในขณะปั่นตัวอย่างให้ละเอียด (http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/basel abilecaptan.pdf)



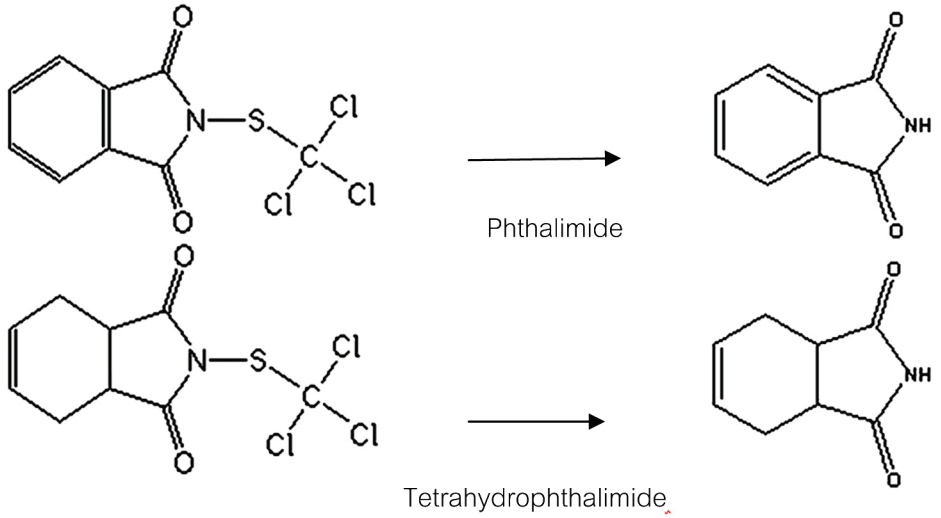
ภาพที่ 1. captan ($C_9H_8Cl_3NO_2S$)

(C D S Tomlin, 2006)



ภาพที่ 2. folpet ($C_9H_4Cl_3NO_2S$)

(C D S Tomlin, 2006)



ภาพที่ 3. การสลายตัวของ captan และ folpet

อีกวิธีที่ช่วยปรับปรุงผลการวิเคราะห์ของ GC คือการเติม Analysis Protectants (APs) โดยทั่วไปการวิเคราะห์โดย GC มีปัจจัยที่ต้องพิจารณา ได้แก่ ปริมาตรที่ฉีด อุณหภูมิ การขยายตัวของสารละลาย อัตราการไหลของสาร ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะช่วยลดจำนวน active sites ในคอลัมน์ ทำให้โครมาโตรแกรมของสารมีลักษณะพีคสูงและแคบ ทำให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ส่วนผสมของ APs ที่นิยมใช้ได้แก่ sorbital (ช่วยป้องกันสารออกช้า), 3 – ethoxy – 1,2 – propanediol (ป้องกันสารออกก่อน), D – (+) gluconic acid – δ – lactone (ป้องกันสารออกก่อนและออกเร็วเกิน), Shikimic acid (ป้องกันสารที่สลายตัวง่ายเหมาะกับ captan และ folpet) (http://quechers.cvua-stuttgart. De /pdf/basel abilecaptan.pdf)

ผลจากการที่ captan และ folpet สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงและ pH สูง ทำให้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้จำเป็นต้องพัฒนาเพื่อหาวิธีที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการสลายตัว ซึ่งส่งผลกระทบต่อการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ captan และ folpet โดยการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC – MSD ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์ ขั้นสูงที่มีความถูกต้องสูง และพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ด้วยการลดการสลายตัวของสารโดยการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและใช้ Analysis Protectants (APs) ช่วยในขั้นตอนฉีดตัวอย่าง จึงทำให้สามารถวิเคราะห์ captan และ folpet ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำดียิ่งขึ้น ป้องกันความผิดพลาดได้

วิธีดำเนินการ

7.1. สารเคมี

1.1 สารมาตรฐาน captan ความบริสุทธิ์ 98.5%

1.2 สารมาตรฐาน folpet ความบริสุทธิ์ 98.5%

1.3 acetone, A.R. grade

1.4 dichloromethane, A.R. grade

1.5 ethylacetate P.R. grade

1.6 acetronitrile P.R. grade

1.7 sodium sulfate anhydrous, A.R. grade เผาที่ 450 °C นาน 4 ชั่วโมงแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 130 °C ก่อนใช้งานตั้งทิ้งให้เย็นใน desiccator

1.8 sodium chloride, A.R. grade

1.9 $MgSO_4$ A.R. gradeเผาที่ 550 °C นาน 5 ชั่วโมงแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 130 °C ก่อนใช้งานตั้งทิ้งให้เย็นใน desiccator

1.10 PSA (primary secondary amine),

1.11 GCB (graphitized carbon)

1.12 trisodium citratedihydrate

1.13 disodium hydrogen citrate 1.5 hydrate

1.14 sorbital

1.15 3-ethoxy-1,2-propanediol

1.16 D - (+) gluconic acid - δ - lactone

1.17 shikimic acid

7.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 ขวดแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างพร้อมฝาขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2 เครื่องชั่งชนิด 2 และ 4 ตำแหน่ง ที่ได้รับการสอบเทียบแล้ว

2.3 กรวยกรองทำด้วยแก้ว (funnel)

2.4 กระบอกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร (cylinder)

2.5 ขวดก้นแบน ขนาด 250 มิลลิลิตร (flat bottom flask)

2.6 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 5 มิลลิลิตร (volumetric flask)

2.7 ขวดบรรจุตัวอย่างสำหรับฉีดเครื่อง GC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.8 Homogenizer, Ultra Turrax รุ่น T 25 Basic, ยี่ห้อ Ika Labortechnik

2.9 Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

2.10 Auto-pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร

2.11 เครื่องลดปริมาตร (Rotary Vacuum Evaporator), รุ่น V-800 ยี่ห้อ Buchi

2.12 เครื่อง GC/MS รุ่น 6890

2.13 Capillary column ชนิด DB 5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

7.3 วิธีการ การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง captan และ folpet ในตัวอย่างองุ่น

7.3.1. ศึกษาผลการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างโดยการ spike สารลงในตัวอย่างองุ่นเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนนำไปปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง (อัตราส่วน1:1) (Richard *et al*., 2007) และไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง และวิเคราะห์ทางสถิติ Paired t-test (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2007)

7.3.2. ศึกษาผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธีคือวิธี Stienwandter (1985) และวิธี QuEChERS (Anastassiades *et al.,* 2003) ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการทำได้โดย การ spike สารลงในตัวอย่างองุ่นเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนนำไปปั่นแล้วเปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธี คือ วิธี Stienwandter (1985) และวิธี QuEChERS (Anastassiades *et al.,* 2003) วิธีละ 6 ซ้ำและการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) โดยการนำไปประเมิน HORRAT ใช้เกณฑ์ Horwitz's ratio < 2 และ %RSD จากภาคผนวก 2.

วิธีการที่ 1 ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Steinwandter (1985) ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในขวดแก้วสกัดด้วย acetone AR grade 50 มิลลิลิตร sodium chloride 8 กรัม และ dichloromethane AR grade 40 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วสูงนาน 1 นาที เทสารละลายลงในขวดที่มีฝาปิด และเติม sodium sulfate 1 ช้อนโต๊ะ คนให้เข้ากัน ปิดฝาตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วกรองสารละลาย ผ่าน sodium sulfate 50 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรสารละลายโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator อุณหภูมิ water bath 40 องศาเซลเซียส ลดปริมาตร

จนแห้งพอดีและปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate PR grade 5 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของวัตถุมีพิษด้วยเครื่อง GC-MS

วิธีการที่ 2 จากวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ใน centrifuge tube เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือนาน 1 นาที และเติม tri sodium citratedihydrate 1 กรัม, disodium hydrogen citrate 1,5 hydrate 0.5 กรัม, magnesium sulfate 4 กรัมและ sodium chloride 1 กรัม เขย่าด้วย Vortex mixture 1 นาที นำไป centrifuge นาน 2 นาที แบ่งสารละลายส่วนใสมา 5 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร กำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA 0.125 กรัม และ $MgSO_4$ 0.75 กรัม GCB 0.05 กรัม ปิดฝาและเขย่าทันทีด้วย Vortex mixture 1 นาที นำไป centrifuge นาน 5 นาที แบ่งสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่ขวด vial และเติม 5% Formic acid 10 ไมโครลิตร กรองผ่าน PTFE syringe Filters ขนาด 0.2 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

7.3.3. ศึกษา matrix effect และขั้นตอนการเปรียบเทียบการเติม Analysis Protectants (APs) ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่อง GC – MS โดยดูความแตกต่างจาก %RPD (NATA , 2012)

% ความแตกต่าง %RPD=((x1 – X2)/((x 1+ x 2)/2)) x 100

โดย %RPD มากกว่า 10% ถือว่าแตกต่างกัน

ขั้นตอนการเตรียม Analysis Protectants (APs)

ชั่ง 3 – ethoxy – 1, 2-propanediol 2 กรัมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม D – (+) – gluconic – acidlactone เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติม Sorbitol เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม shikimic acid เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile : water (7:3 v:v) เก็บที่ 4°C

การใช้งาน เติมในสารสกัดหรือสารละลายก่อนฉีดเข้าเครื่องโดยใช้อัตราส่วน 30 มิลลิลิตรต่อสารสกัดหรือสารละลาย 1 มิลลิลิตร

7.3.4 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC – MS

เครื่อง GC – MS รุ่น 6890N Hewlette – Packard (Agillent technologies) ต่อกับ 5973N mass selective detectors

- คอลัมน์ชนิด capillary DB 5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตรความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ใช้ฮีเลียมเป็น Carrier gas ควบคุมความดันคงที่ โดยใช้โปรแกรม RT – Lock
- Oven อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 50 ºC(1 นาที);25 ºC/min to 12; 10 ºC/นาที to 300 ºC (1 นาที) ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ 22.5 นาที
- Inlet ใช้แบบ Splitless
- ปริมาณสารที่ฉีด 1 ไมโครลิตร
- ใช้ mode SIMในการตรวจวัด

สำหรับ Folpet Rt: 9.12 Target ion: 147, Qualifier ion: 76, 104 และ Captan Rt: 9.38 Target ion: 79, Qualifier ion: 151, 80

ระยะเวลา ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการวิเคราะห์

1. เปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างองุ่นที่ผ่านการ spike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และนำมาปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้น้ำแข็งแห้งและไม่ใช้น้ำแข็งแห้งให้ผลดังแสดงภาพที่ 4 พบว่าเมื่อปั่นด้วยน้ำแข็งแห้งให้เนื้อตัวอย่างมีความละเอียดมากกว่า และเมื่อเปรียบเทียบ %recovery ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อใช้น้ำแข็งแห้งก่อนทำการวิเคราะห์โดยวิธี Stienwandter (1985) ให้ผล %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 81 และ 81 และเมื่อไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 75 และ 75 การวิเคราะห์โดยวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งให้ผล Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 83 และ 75 เมื่อไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 71 และ 66

เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ Paired t-test พบว่าเมื่อนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบการใช้น้ำแข็งแห้งกับไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง วิธี Stienwandter (1985) ให้ค่า t ของ captan และ folpet เท่ากับ 5.67 และ 4.11 การวิเคราะห์โดยวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) ให้ค่า t ของ captan และ folpet เท่ากับ 11.61 และ 6.93 เปรียบเทียบกับค่า t_{cri} (n=6 ,α=0.5)=2.45 ดังนั้นการใช้น้ำแข็งแห้งและไม่ใช้น้ำแข็งแห้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2. เปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างวิธี Stienwandter (1985) และวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) ในตัวอย่างที่ได้จากการ spike สารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและนำมาปั่นให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้น้ำแข็งแห้งพบว่าวิธี Stienwandter (1985) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 81 และ 81 และวิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) มี %Recovery ของ captan และ folpet เฉลี่ย 83 และ 75 ตามลำดับ

การประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) โดยการนำไปประเมิน HORRAT ใช้เกณฑ์ Horwitz's ratio< 2 และ %RSD จากภาคผนวก 2

กรณีใช้น้ำแข็งแห้ง การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง captan และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985) มีค่า % RSD 6.00 และ HORRAT 0.5 วิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) มีค่า %RSD 2.93 และ HORRAT 0.24 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง folpet และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985)มีค่า %RSD 4.58 และ HORRAT 0.38 วิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) มีค่า%RSD 5.27และ HORRAT 0.43

กรณีไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง captan และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985) มีค่า %RSD 16.07 และ HORRAT 1.33 วิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) มีค่า %RSD 3.43 และ HORRAT 0.28 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง folpet และสกัดโดยวิธี Stienwandter (1985) มีค่า %RSD 6.21 และ HORRAT 0.51 วิธี QuEChERS, Anastassiades (2003) มีค่า %RSD 5.53และ HORRAT 0.44

3. เปรียบเทียบการเติม Analysis Protectants (APs) ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าพื้นที่ใต้พีคที่ความเข้มข้นเดียวกันของ folpet และ captan ให้ผลดังภาพที่ 5 พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลาย EtOAc ให้พีคที่ folpet

และ captan มี %RPD สูงกว่า CAN 130% และ 104% และเมื่อเติม APs ใน EtOAc พื้นที่ใต้พีคมี %RPD เพิ่มขึ้น 81% และ 86%

และเมื่อพิจารณา matrix effect ดังภาพที่ 6 โดยการเปรียบเทียบความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กราฟของ folpet พบว่า สารมาตรฐานที่ละลายใน matrix ได้สมการ y = 700056x และสารมาตรฐานที่ละลายใน EtOAc ได้สมการ y = 230114x ได้ %RPD ของความชันมีค่าเท่ากับ 101 และกราฟของ captan สารมาตรฐานที่ละลายใน matrix ได้สมการ y = 692990x และ สารมาตรฐานที่ละลายใน EtOAc ได้สมการ y = 247229x ได้ %RPD ของความชันมีค่าเท่ากับ 95 ดังนั้น matrix effect มีผลต่อการวิเคราะห์ folpet และ captan ในตัวอย่างองุ่น

และเมื่อเติม APs พบว่า ทั้ง folpet และ captan มีพื้นที่ใต้พีคของ สารมาตรฐานที่ละลายใน solvent + AP, สารมาตรฐานที่ละลายใน matrix และสารมาตรฐานที่ละลายใน matrix + APs มีค่าใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างจากสารมาตรฐานที่ละลายใน solvent ซึ่งมีค่าต่ำกว่ามาก

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้น้ำแข็งแห้งให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่า เนื่องจากการปั่นตัวอย่างเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน อาจทำให้เกิดความร้อนทำให้ปริมาณ folpet และ captan ลดลงและเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติการใช้และไม่ใช้น้ำแข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากการทดลองการใช้น้ำแข็งแห้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้ผลดีกว่าการไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง และผลการเปรียบเทียบวิธีสกัดระหว่างวิธี QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2003) และวิธี Stienwandter(1985) จากการ spike สารมาตรฐานลงไปตัวอย่างร่วมกับการใช้น้ำแข็งแห้งและเติม APs พบว่าผล %Recoveryของทั้งสองวิธีผ่านเกณฑ์และใกล้เคียงกันยกเว้น Folpet ที่การสกัดโดยวิธี QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2003) และจากผลการวิเคราะห์เมื่อประเมินความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (precision) จากค่า %RSD และ HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดดังนั้นการใช้น้ำแข็งแห้งและการเติม APs ช่วยทำให้ผลการวิเคราะห์ดีขึ้น

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้หาปริมาณ folpet และ captan ในงานวิเคราะห์ตัวอย่างโดยทั่วไปได้
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างในพืชอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2007.**เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรนักวิเคราะห์มืออาชีพสาขาเคมี**.4 – 35

Anastassiades M., Lehotay S. J., Stajnbahe D. and Schenck F.J., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for The Determination of Pesticide Residues in Produce, **J. AOAC Int., 86**, 412-431.

Anastassiades M., Katerina M., and Lehotay S. J., 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatrographic analysis of pesticide, J. **Chromatography A., 1015**, 163 –184.

Anonymous, 2010. From web site http://www.crl.pesticides.eu/library/docs/srm/meth Captanfolpet eurlsrm.pdf (10 November 2011)

Anonymous, 2010. from web site: http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/baselabilecaptan.pdf (9 November 2012)

AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOACI\eCam\Single-Lab_Validation_47.doc. from web site: http://www.aoac.org/AgMaterials/additives/aoac_slv.pdf

C D S Tomlin, 2006. The Pesticide Manual. Fourteenth Edition, BCPC, UK

NATA, 2012. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test Methods. June 2012. National Association of Testing Authorities(NATA), AUS

Richard J. F., Michael T.H., Roy M, Dawn F., Frank S., Arpad A., and Peter J B., 2007. Measurement uncertainty associated with sample processing of oranges and tomatoes for pesticide residue analysis. **J. Agric. Food Chem., 55**, 1062-1070

Steinwandter H, 1985. Universal 5 Min on – line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius **Z. Anal. Chem., 322**, 752-754

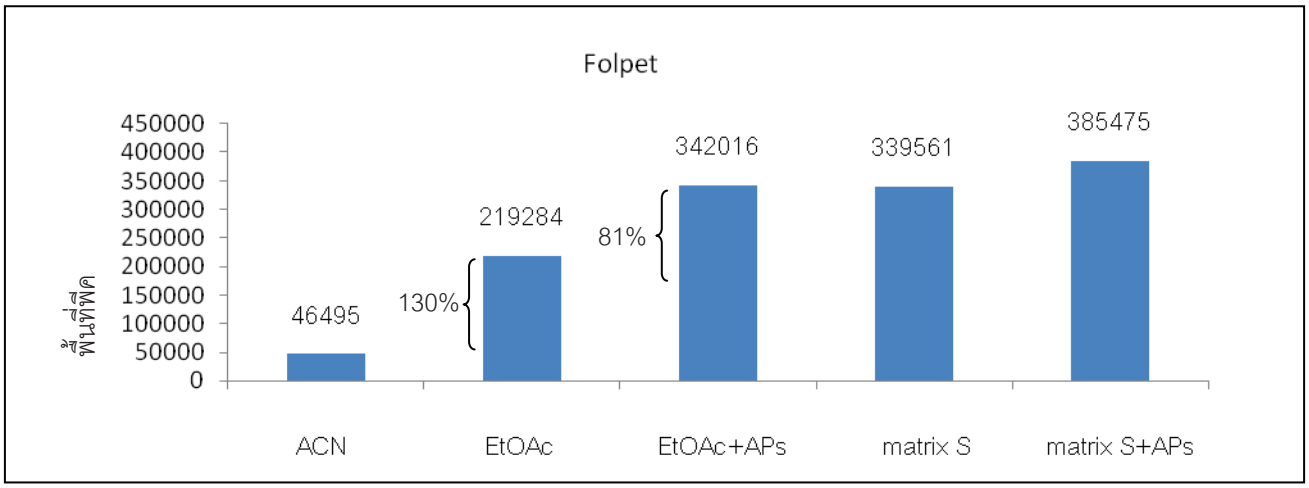
ไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง

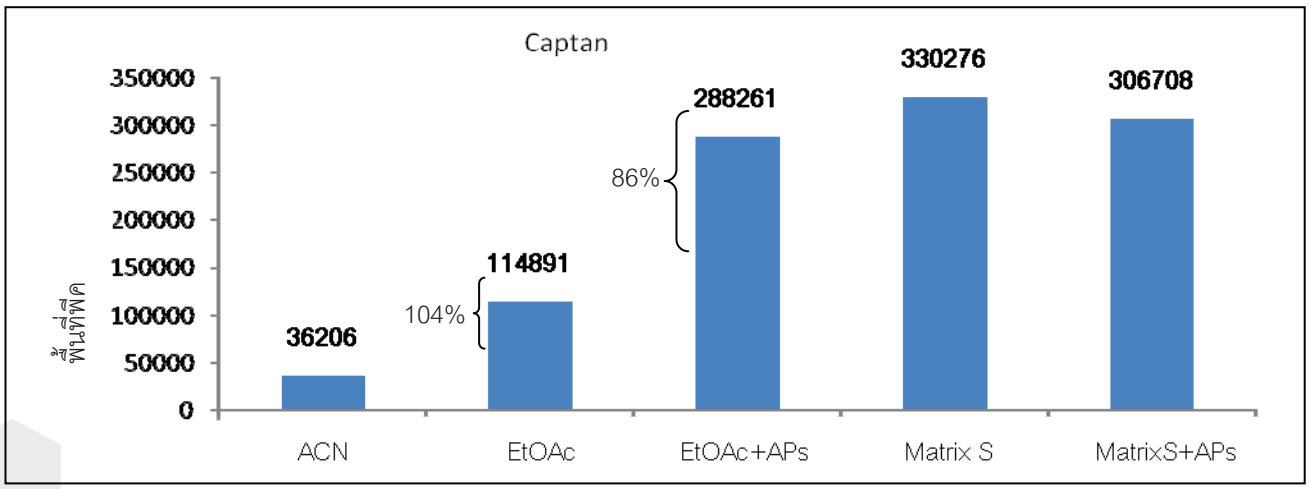
ใช้น้ำแข็งแห้ง

ภาพที่ 4. เปรียบเทียบการปั่นตัวอย่างองุ่นแบบใช้น้ำแข็งแห้งและไม่ใช้น้ำแข็งแห้งที่เวลาเท่ากัน

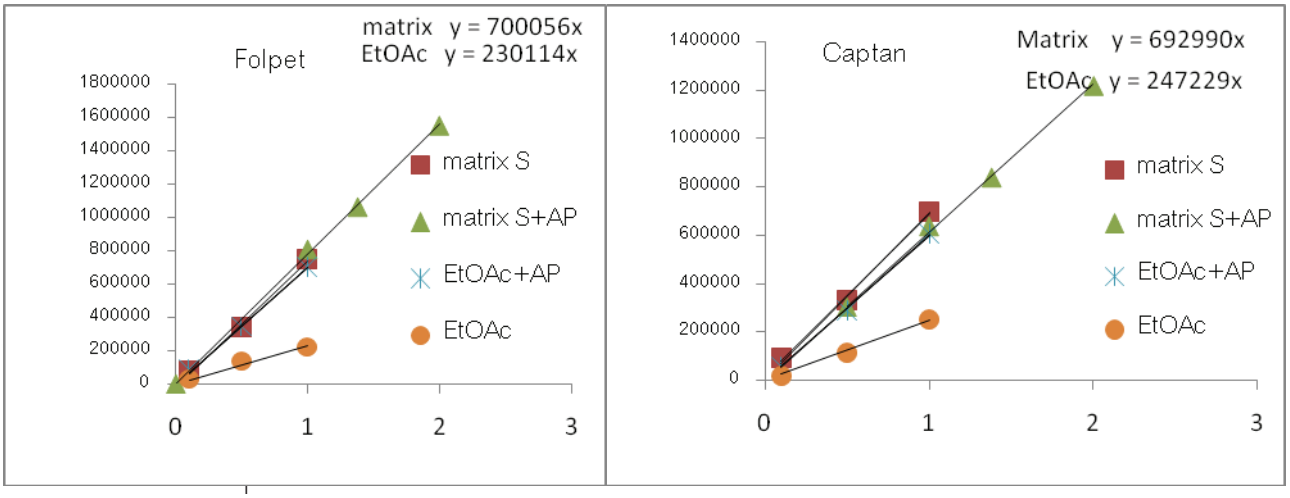
ตารางที่ 1 . แสดงค่า%Recovery ของการวิเคราะห์

	ใช้น้ำแข็งแห้ง		ไม่ใช้น้ำแข็งแห้ง	
	Stienwandter	QuEChERS	Stienwandter	QuEChERS
% Captan	74-86	80-84	62-98	66-72
Mean	81	83	75	71
%RSD	6.00	2.93	16.07	3.43
HORRAT	0.5	0.24	1.33	0.28
%Folpet	76-86	72-82	68-82	60-70
Mean	81	75	75	66
%RSD	4.58	5.27	6.21	5.53
HORRAT	0.38	0.43	0.51	0.44





ภาพที่ 5. แสดงค่าพื้นที่พีคของ captan และ folpet ความเข้มข้นเดียวกัน ในตัวทำละลายต่างชนิดกัน



ภาพที่ 6. แสดงค่าพื้นที่พีคของ captan และ folpet ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวทำละลายต่างชนิดกัน

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1. เกณฑ์การยอมรับ %RSD ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer-Verified Method, 2002

Unit	RSD_r (%)
100%	1
10%	1.5
1%	2
0.1%	3
100 ppm	4
10 ppm (µg/g)	6
1 ppm	8
10 ppb (µg/kg)	15

ภาคผนวก 2. เกณฑ์การยอมรับ% Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer-Verified Method, 2002

Analyte (%)	Unit	Mean Recovery (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0.1	0.1%	95-105
0.01	100 ppm	90-107
0.001	10 ppm	80-110
0.0001	1 ppm	80-110
0.00001	100 ppb	80-110
0.000001	10 ppb	60-115
.0000001	1 ppb	40-120

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืช กลุ่ม phenylurea ในผลไม้

Development and method validation of phenylurea herbicides in fruit

วิทยา บัวศรี ศศิมา มั่งนิมิตร์ ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มฟีนิลยูเรีย (phenylurea) ในผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERs, SweEt Method และ Steinwandter (1985) โดยเลือกวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี การสกัดสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERs (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งสกัดตัวอย่างสับปะรดด้วย acetonitrile, magnesium sulfate และ Sodium chloride นำส่วนที่สกัดได้ไปทำการขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย primary secondary amine (PSA) และ magnesium sulfate แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV detector ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการใช้เทคนิค fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กลุ่ม phenylurea ที่ทำการตรวจสอบได้แก่ diuron และ isoproturon พารามิเตอร์ ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, limit of quantitation (LOQ) และ limit of detection (LOD)

ผลการตรวจสอบพบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า correlation of determination (R^2) = 0.99974 – 0.99998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01 – 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา %recovery อยู่ในช่วง 81.6 – 106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 2.07 – 3.81 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.14 – 0.32 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Key word: phenylurea, QuEChERs Method, SweEt Method, Steinwandter Method

คำนำ

ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษ การเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร มีภารกิจสำคัญในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้ ผลิตผล ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซึ่งเป็นเครื่องมือในการคุ้มครองผู้บริโภคทั้งภายในประเทศ การส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ และเพื่อปกป้องสิ่งแวดล้อม อีกทั้งการดำเนินการค้าระหว่างประเทศโดยเฉพาะสินค้าเกษตรในปัจจุบันจำเป็นต้องดำเนินการตามมาตรการและข้อจำกัดต่างๆ ที่กำหนดขึ้นโดยหน่วยงานหรือองค์กรนานาชาติ การวิเคราะห์และทดสอบจะเป็นตัวการสำคัญในการที่จะดำเนินการตามมาตรการนั้นๆ ให้ได้ผลดี และนำไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิผลตรงตามวัตถุประสงค์ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร เป็นผู้นำด้านคุณภาพการทดสอบตัวอย่างทางการเกษตร จึงได้เริ่มจัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005 “ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ” มาตั้งแต่ปี 2546 และนำข้อกำหนดทุกข้อมาใช้ปฏิบัติงานในทุกงานทดสอบ โดยได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการแล้วนั้น ซึ่งต้องดำเนินการรักษาสภาพขอบข่ายการทดสอบที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานดังกล่าวแล้ว ยังต้องเพิ่มขอบข่ายการทดสอบให้ได้รับการรับรองฯ ต่อไป การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม phenylurea ในผลไม้ เป็นการดำเนินกิจกรรมเพื่อแสดงถึงความมั่นใจได้ว่า ผลการทดสอบที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการนั้น ถูกต้องแม่นยำ และเชื่อถือได้ทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ โดยวิธีการวิเคราะห์จำเป็นต้องมีการเลือกใช้วิธีทดสอบที่เหมาะสม และผ่านการตรวจสอบความใช้ได้มาแล้ว

ห้องปฏิบัติการจะต้องใช้วิธีมาตรฐาน (standard method) เท่านั้น หากมีการปรับวิธีการหรือคิดค้นขึ้นเองจำเป็นต้องนำมาทดสอบเพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ตาม parameter ที่กำหนด ได้แก่ linearity/working range, accuracy, precision, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) โดยทำการทดสอบในจำนวน/ระดับความเข้มข้น และจำนวนซ้ำที่กำหนด เมื่อผ่านเกณฑ์ยอมรับตาม parameter ที่กำหนดแล้วจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาใช้ได้ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งสามวิธี คือ QuEChERs method, SweEt method และ Steinwandter method (1985) เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ที่ได้รับการนิยมอย่างแพร่หลายในกลุ่มประเทศยุโรปและสหรัฐอเมริกาในขณะนี้ โดยนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ และทดสอบความสามารถของวิธีการในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง (collaborative study)

QuEChERs method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) โดย Anastassiades และคณะ ได้พัฒนาวิธี QuEChERS ซึ่งเป็นวิธีการสกัดตัวอย่างที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถใช้กับพืชและวัตถุมีพิษหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว รวมทั้งให้คุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์สูง ลดขั้นตอนและแรงงานคนในการสกัดตัวอย่าง ใช้สารเคมีและเครื่องแก้วน้อย (Anastassiades *et al.,* 2003) วิธีการ SweEt method เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาโดย Dr. Tuija Pihlström และคณะ ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศสวีเดน โดยเน้นที่การลดการใช้สารเคมีให้ใช้น้อยที่สุดและเลือกสารที่มีผลกระทบน้อยต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม

(Tuija Pihlström *et al.,* 2007) วิธีที่ปรับจาก Steinwandter method โดยเป็นวิธีการที่กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ทำการปรับขึ้นและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการกลุ่ม organophosphorus, pyrethroid, endosulfan, carbamate ในตัวอย่างมะม่วง และ abamectin ในตัวอย่างพริก และใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามมาตรฐาน ISO/IEC17025: 2005 ของกลุ่มงานฯ (Steinwandter, 1985)

วิธีดำเนินการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Teflon centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. Micro centrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. Auto sampler vials for HPLC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. Auto pipette ขนาด 0.1-1 มิลลิลิตร
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง
6. เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor) และ Vortex mixer
7. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder
8. เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษ HPLC UV detector

สารเคมี

1. สารมาตรฐานกลุ่มกำจัดวัชพืช กลุ่ม phenylurea ได้แก่ diuron, isoproturon
2. Acetonitrile, Hexane, Methanol, Ultrapure water, และ Toluene ชนิด Pesticide grade (J.T baker)
3. Anhydrous Magnesium sulfate (ACS powder-Fisher) เผาที่ 500°C นาน 5 ชั่วโมง
4. Sodium chloride (NaCl) ชนิด Analytical grade (Merck)
5. SPE sorbent ชนิด Primary-Secondary-Amine (PSA varian)
6. Graphite Carbon Black (GCB)

วิธีการ

1. วางแผนการดำเนินการ

ศึกษาข้อมูลและวิธีการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบทดสอบค่าที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ ได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

2. เตรียมสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution กลุ่มกำจัดวัชพืช

2.1.1.1 เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานกลุ่มกำจัดวัชพืช โดยชั่งสารมาตรฐานให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำค่า %purity มาคำนวณกลับเป็นน้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ toluene PR grade เป็นตัวทำละลาย

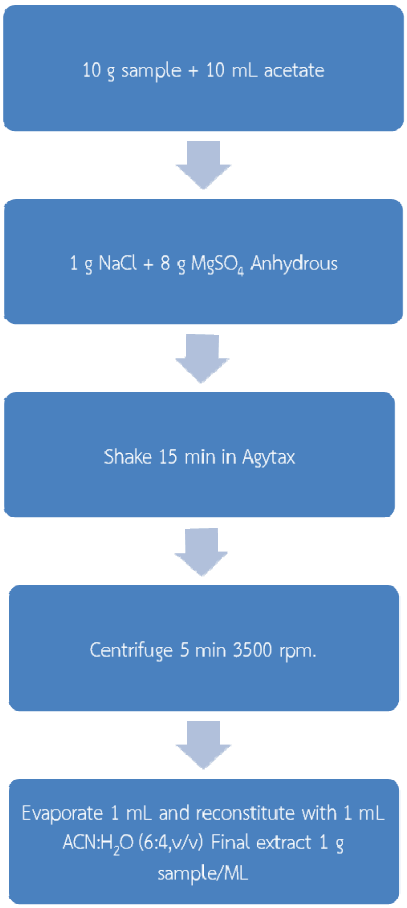
2.1.1.2 เตรียม intermediate solution ของสารละลายมาตรฐานกลุ่มกำจัดวัชพืชแต่ละชนิด จากข้อ 2.1.1.1 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลาย

2.1.1.3 เตรียม mix herbicide spike solution จาก intermediate solution ให้ได้ความเข้มข้นของ mix herbicide spike solution เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

2.1.1.4 เตรียม mix calibration standard solution เตรียมจากเจือจาง mix herbicide spike solution ด้วยสารสกัดสับปะรดใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้นระดับ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. การสกัดตัวอย่าง

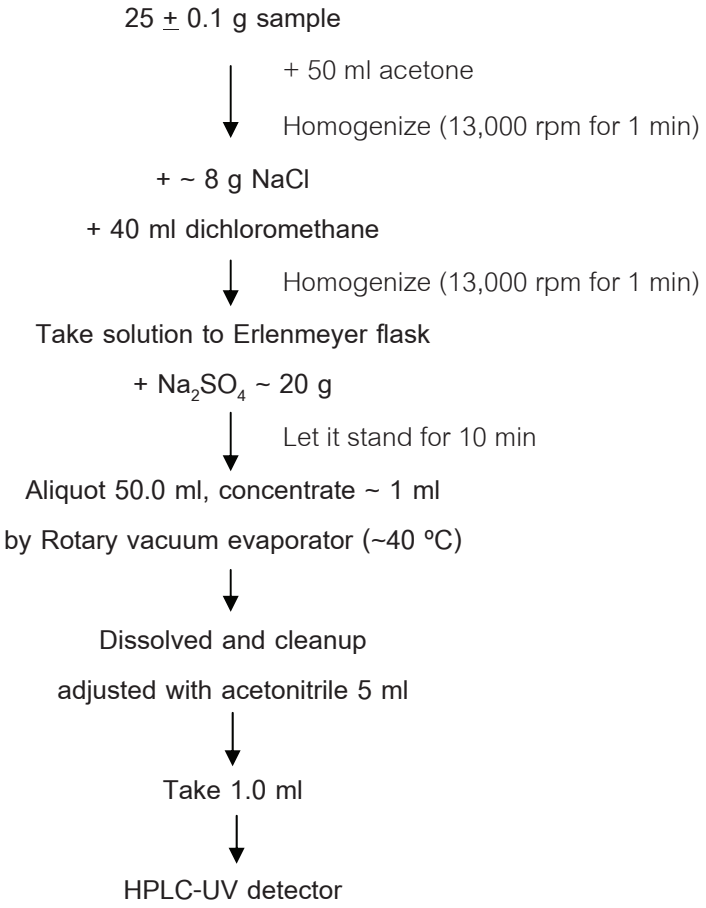
3.1 วิธี SweEt method ใช้ขั้นตอนวิธีการการสกัดตัวอย่าง ตามแผนภาพที่ 1 New advances in Ethyl Acetate Method Tuija Pihlström, Gun Blomkvist, Paula Friman, Ulla Pagard and Bengt - Göran Österdahl, Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, Volume 389, Number 6, Pages 1773-1789



แผนภาพที่ 1. ขั้นตอนวิธี SweEt method

3.2 **วิธีการที่ปรับจาก** Steinwandter method (1985) โดยกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ใช้ขั้นตอนวิธีการการสกัดตัวอย่าง ตามแผนภาพที่ 2 ซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของกลุ่มงานฯ โดยได้รับการรับรองการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม organophosphorus, pyrethroid, endosulfan, carbamate ในตัวอย่างมะม่วง และ abamectin ในตัวอย่างพริก

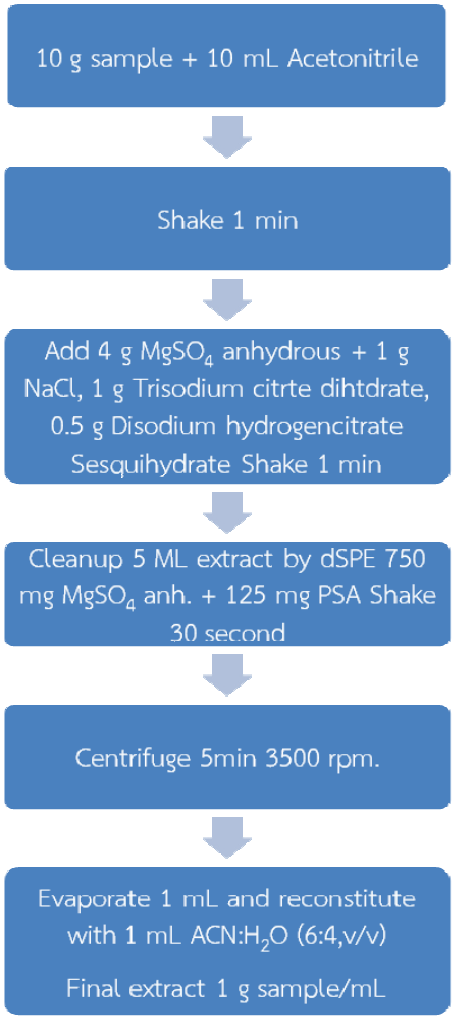
Steinwandter, H. 1985. Universal 5 Min on – line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem (1985) 322 : 752-754.



แผนภาพที่ 2. ขั้นตอนวิธีการที่ปรับจาก Steinwandter method

3.3 **วิธี** QuEChERs method ใช้ขั้นตอนวิธีการการสกัดตัวอย่าง ตามแผนภาพที่ 3

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaher. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive solid – Phase Extraction” for determination” of Pesticide Residue in Produce. AOAC. Int.86, 412 - 431



แผนภาพที่ 3. ขั้นตอนวิธี QuEChERs method

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากทั้งสามวิธีการที่บรรจุอยู่ในขวด HPLC – vial นำไปด้วยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV – detector

Instrument condition:

HPLC-UV parameter for phenylurea

Instrument: HPLC binary pump with a UV variable wavelength detector

Detector :	UV at 254 nm
Column :	RP Select B (5 µm)
Mobile phase :	Isocratic 65% ACN, 35% H_2O
Flow rate :	1 mL per min
Injection volume :	20 µL
Column temperature :	40 ^{o}C
Stop time :	12 min

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

กำหนดการตรวจสอบ parameter ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) (ISO/IEC17025:2005) ได้แก่

4.1 linearity/working range

linearity เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารมา plot เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ส่วน range เป็นค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่อยู่ใน linearity ซึ่งมีค่า accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการทดสอบ linearity/working range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างอย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ

4.2 accuracy/precision

การทดสอบ accuracy โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (%recovery) ของวัตถุมีพิษที่เติมลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับ คือ สูง กลาง และต่ำ ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยนำผลการวิเคราะห์ accuracy มาหา %RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบ %RSD ที่ได้จากการทดลองกับ Predicted Horwitz RSD ของ repeatability ซึ่ง Predicted Horwitz RSD มีสูตรคำนวณ (Food Standard Agency, 2004) (Horwitz, 2000) ดังนี้

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66x2^{(1-0.5\log C)}$$

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของวัตถุมีพิษในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์ (เช่น 0.5 mg/kg, $C= 0.5x10^{-6}$)

4.3 Limit of Detection (LOD) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องพิสูจน์ accuracy และ precision โดยค่า LOD = 3SD และ ค่าสัญญาณการวัดต้องมีค่า signal to noise ratio $\geq$ 3 ทำการประมาณค่า LOD จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ

4.4 Limit of Quantitation (LOQ) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยค่า LOQ = 10 SD (SD ; standard deviation ของความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำการทดสอบ) ทำการประมาณค่า LOQ จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ

ระยะเวลา ตุลาคม 2554 - กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรดซึ่งเป็นตัวแทนของผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERs, SweEt Method และ Steinwandter (1985) โดยเลือกวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ และตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง HPLC UV detector โดยตรวจสอบ parameter ต่างๆ ได้แก่ linearity, working range, LOD, LOQ, precision และ accuracy โดยมีเกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

parameter	criteria
linearity	$R^2 \geq 0.995$
working range	$R^2 \geq 0.995$ % recovery = 50-120 ($\leq$ 1 µg/kg) = 60-120 (> 1 ug/kg $\leq$ 0.01 ug/kg)
LOD	LOD = 3SD และ S/N $\geq$ 3
LOQ	LOQ = 10 SD
precision	HORRAT $\leq$ 2

ตารางที่ 1. (ต่อ) เกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

Parameter	criteria	
accuracy	conc. (mg/kg)	% recovery
	≤ 1µg/kg	50-120
	> 1µg/kg ≤0.1 mg/kg	60-120
	> 0.01mg/kg ≤0.1 mg/kg	70-110
	> 1 mg/kg	70-110

ที่มา : Codex, 1995

5.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี SweEt Method (Ethly Acetate)

ตัวอย่างตัวอย่าง ซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea

ผลการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea 2 ชนิด ได้แก่ diuron และ isoproturon แบ่งตาม parameter ต่างๆ (ตารางที่ 2 และ 3) และเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) สรุปได้ดังนี้

5.1.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 7 – 8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า มีค่า Correlation of Determination (R^2) = 0.99985 – 0.99997 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า $R^2 \geq 0.995$ (FDA, 2005) และ %recovery 70.3-105.4 (ตารางที่ 2) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %recovery ในช่วง 70 – 110 (Codex, 1995)

5.1.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า %recovery ในช่วง 72.0 – 106.8 มี %RSD ในช่วง 1.89 – 3.78 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.11 – 0.29 (ตารางที่ 3) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %recovery ในช่วง 70 – 110 และมีค่า HORRAT ≤ 2 (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 2. ผลการทดสอบ linearity/working range ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 7 – 8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Name	range (mg/kg)	R^2	no. of level	%recovery	
				min	max
1. diuron	0.01-2.0	0.99997	7	70.3	105.4
2. isoproturon	0.01-2.0	0.99985	7	71.8	100.2

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Name	conc. (mg/kg)											
	0.025				0.05				0.2			
	%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT
1. diuron	75.5	102.9	2.32	0.13	73.4	99.9	2.49	0.15	72.0	93.7	3.51	0.27
2. isoproturon	75.8	106.8	2.96	0.16	74.1	98.7	1.89	0.11	72.8	93.4	3.78	0.29

5.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธีที่ปรับจากวิธีการของ Steinwandter method (1985)

ตัวอย่างตัวอย่าง ซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea

ผลการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea 2 ชนิด ได้แก่ diuron และ isoproturon แบ่งตาม parameter ต่างๆ (ตารางที่ 4 และ 5) และเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) สรุปได้ดังนี้

5.2.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 7 – 8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า มีค่า Correlation of Determination (R^2) = 0.99981 – 0.99995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า $R^2 \geq 0.995$ (FDA, 2005) และ %recovery 72.3 – 101.2 (ตารางที่ 4) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %recovery ในช่วง 70 – 110 (Codex, 1995)

5.2.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า %recovery ในช่วง 71.0 – 107.6 มี %RSD ในช่วง 0.89 – 3.88 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.05-0.30 (ตารางที่ 5) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %recovery ในช่วง 70 – 110 และมีค่า HORRAT ≤ 2 (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 4. ผลการทดสอบ linearity/working range ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 7 – 8 ระดับ ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Name	range (mg/kg)	R^2	no. of level	%recovery	
				min	max
1. diuron	0.01-2.0	0.99981	7	72.3	110.4
2. isoproturon	0.01-2.0	0.99995	7	74.8	101.2

ตารางที่ 5. ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Name	conc. (mg/kg)											
	0.025				0.05				0.2			
	%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT
1. diuron	74.5	106.2	2.86	0.16	74.5	96.9	0.89	0.05	71.0	94.5	3.05	0.23
2. isoproturon	73.2	107.6	2.97	0.16	74.1	97.8	3.18	0.19	78.2	97.3	3.88	0.30

5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea **ในสับปะรด ด้วยวิธี** QuEChERs method

ตัวอย่างตัวอย่าง ซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea

ผลการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea 2 ชนิด ได้แก่ diuron และ isoproturon แบ่งตาม parameter ต่างๆ (ตารางที่ 6 - 8) และเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) สรุปได้ดังนี้

5.3.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 7 – 8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่ามีค่า Correlation of Determination (R^2) = 0.99974 – 0.99998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า $R^2 \geq 0.995$ (FDA, 2005) และ %recovery 81.6 – 109.1 (ตารางที่ 6) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %recovery ในช่วง 70 – 110 (Codex, 1995)

5.3.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่ามีค่า %recovery ในช่วง 81.6 – 106.8 มี %RSD ในช่วง 2.07 – 3.81 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.14 – 0.32 (ตารางที่ 7) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %recovery ในช่วง 70 – 110 และมีค่า HORRAT ≤ 2 (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 6. ผลการทดสอบ linearity/working range ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 7 – 8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Name	range (mg/kg)	R^2	no. of level	%recovery	
				min	max
1. diuron	0.01-2.0	0.99974	7	81.6	109.1
2. isoproturon	0.01-2.0	0.99998	7	85.9	101.2

ตารางที่ 7. ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Name	conc. (mg/kg)											
	0.025				0.05				0.2			
	%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT
1. diuron	94.2	106.8	3.81	0.23	94.1	100.5	2.07	0.14	81.6	94.1	3.81	0.32
2. isoproturon	96.3	105.2	2.64	0.16	93.3	100.3	2.26	0.15	81.8	93.4	3.60	0.31

5.3.3 LOD และ LOQ ค่า LOD จากการคำนวณตามข้อ 4.3 และมีการปรับระดับความเข้มข้นในตัวอย่างและทำการทดสอบ พบว่า LOD มีระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า signal to noise ratio (S/N) อยู่ในช่วง 5.8 – 6.8 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.4 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับคือมีค่า signal to noise ratio $\geq$ 3 ค่า LOQ จากการคำนวณตามข้อ 4.4 และมีการปรับระดับความเข้มข้นในตัวอย่างและทำการทดสอบ พบว่าค่า LOQ มีค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มี %recovery ในช่วง 84.7 – 101.2 มี %RSD ในช่วง 5.04 – 6.31 และค่า HORRAT ในช่วง 0.24 – 0.30 ซึ่งที่ระดับ LOQ มีค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับและได้ทำการหาค่า signal to noise ratio (S/N) อยู่ในช่วง 8.5 – 13.5 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.4 และ 12.2 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8. ผลการทดสอบ LOD และ LOQ ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 10 ซ้ำ

Name	LOD conc. (mg/kg)	signal/noise			LOQ conc. (mg/kg)	%recovery		precision		signal/noise		
		min	max	average		min	max	%RSD	HORRAT	min	max	average
1. diuron	0.005	5.8	6.8	6.4	0.01	84.9	98.3	5.04	0.24	8.5	10.2	9.4
2. isoproturon	0.005	6.6	7.5	7.1	0.01	84.7	101.2	6.31	0.30	10.7	13.5	12.2

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี SweEt Method (Ethly Acetate) พบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า Correlation of Determination (R^2) = 0.99985 – 0.99997 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01 – 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา %recovery อยู่ในช่วง 72.0 – 106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 1.89 – 3.78 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.11 – 0.29 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธีที่ปรับจากวิธีการของ Steinwandter method (1985) พบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.99981 – 0.99995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01 – 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา %recovery อยู่ในช่วง 81.6 – 106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 0.89 – 3.88 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.05 – 0.30 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี QuEChERs method พบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า Correlation of Determination (R^2) = 0.99974 – 0.99998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01 – 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา %recovery อยู่ในช่วง 81.6 – 106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 2.07 – 3.81 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.14 – 0.32 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ทั้งสามวิธีการสกัด จะเห็นได้ว่าการสกัดสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERs method ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยได้เลือกวิธีการนี้มาเพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถสรุปข้อมูลผลการพิสูจน์ความใช้ได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9. สรุปความสามารถของวิธีในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ที่ผ่านพิสูจน์ความใช้ได้ในตัวอย่างสับปะรด

name	Pineappie		
	conc. (mg/kg)		
	LOD	LOQ	range
1. diuron	0.005	0.01	0.01-2
2. isoproturon	0.005	0.01	0.01-2

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง phenylurea ในผลไม้

2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร

3. ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง

4. จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐและเอกชนนำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

เอกสารอ้างอิง

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaher. D. and Schenck F.J. 2003. ***Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive solid – Phase Extraction" for determination" of Pesticide Residue in Produce.*** AOAC. Int. 86, 412 – 431.

Steinwandter, H. 1985. ***Universal 5 Min on – line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals.*** Fresenius Z. Anal. Chem (1985) 322 : 752 – 754.

Tuija Pihlström, Gun Blomkvist, Paula Friman, Ulla Pagard and Bengt-Göran Österdahl, ***Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection,*** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 389 (6) : 1773 - 1789

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน โดยใช้ Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Analytical method development of organophosphorus, organochlorines and pyrethroids compound in soil by Gas Chromatograph/Mass Spectrometry

มลิสา เวชยานนท์ ประกิจ จันทร์ติ๊บ

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดินโดยใช้เครื่อง Gas chromatography/Mass spectrometry พัฒนาจาก In house method TM – T04 – I02 base on AOAC 1995 ของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph และแบ่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษด้วยตัวตรวจวัดที่แตกต่างกันมากกว่าหนึ่งชนิด พัฒนาเป็นวิธีรวมที่สามารถตรวจได้ทั้ง 3 กลุ่มในคราวเดียว ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเหมาะกับเครื่องมือที่มีในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ดินทรายเป็น sample blank ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สกัดด้วย ethyl acetate 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker นาน 5 ชั่วโมง กรองและลดปริมาตรสารสกัด กำจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย SPE ชนิด carbon black ขนาด 500 มิลลิกรัม ความจุ 6 มิลลิลิตร ใช้ตัวชะ (eluting agent) เป็นสารผสมชนิด dichloromethane : hexane (1:1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้าย 2 มิลลิลิตร ผลการทดสอบสารพิษทั้ง 3 กลุ่มอยู่ในเกณฑ์กำหนดระหว่าง 80 – 118 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำวิธีการนี้ไปทดสอบในดินร่วนและดินเหนียว พบว่าวิธีการทดสอบนี้สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษทั้ง 3 กลุ่มในตัวอย่างดินทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ ซึ่งให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดระหว่าง 70 – 120 เปอร์เซ็นต์

รหัส 03-06-54-06-01-01-02-54

คำนำ

การตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน เดิมใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ใช้ตัวตรวจวัดที่แตกต่างกัน กลุ่ม organophosphorus ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC ชนิด Flame Photometric Detector กลุ่ม organochlorines และ pyrethroids ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC ชนิด Electron capture detector ซึ่งทำให้เสียเวลาและใช้แรงงานในการเตรียมตัวอย่างเป็นอย่างมาก ทั้งนี้ วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในปัจจุบันล้วนต้องการความถูกต้อง และแม่นยำ มีความน่าเชื่อถือ ประกอบกับจะต้องมีความสะดวกและรวดเร็ว รวมทั้งจะต้องประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โดยจะต้องมีความเหมาะสมกับวัสดุและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการพัฒนา วิธีการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines and pyrethroids ในดิน โดยใช้เครื่อง Gas chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) ของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร จึงเป็นการพัฒนาวิธีทดสอบที่ใช้เครื่องมือขั้นสูงที่มีอยู่ใน ห้องปฏิบัติการ และปรับเปลี่ยนสารเคมีที่ใช้ เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ ลดขั้นตอนและประหยัด ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุที่ใช้ในการสกัด ได้แก่ beaker, cylinder, Erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for auto sampler, micro centrifuge tube และ glass funnel เครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารละลายของสารมาตรฐานและทดสอบ standard calibration curve ได้แก่ auto pipette, volumetric pipette และ volumetric flask

2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่างๆ

2.1 สารเคมี analytical grade ได้แก่ anhydrous sodium sulfate (anh. Na_2SO_4), acetone, acetonitrile, dichloromethane, ethyl acetate, hexane, SPE ชนิด carbon black, สารเคมีชนิด pesticide grade ได้แก่ ethyl acetate

2.2 สารพิษมาตรฐาน pesticide grade กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 16 ชนิด ประกอบด้วย aldrin, alpha BHC, alpha endosulfan, beta endosulfan, dieldrin, endosulfan sulfate, endrin, gamma BHC, heptachlor, heptachlor epoxide, o,p'–DDE, o,p'–DDT, o,p'–TDE, p,p'–DDE, p,p'–DDT และ p,p'–TDE กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 10 ชนิด ประกอบด้วย chlorpyrifos, diazinon, EPN, ethion, malathion, methidathion, parathion methyl, pirimiphos methyl, profenofos และ triazophos กลุ่มไพรีทรอยด์ 7 ชนิด ประกอบด้วย bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, lamda cyhalothrin และ permethrin

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

เครื่องชั่งละเอียด เครื่อง shaker เครื่องลดปริมาตร rotary evaporator เครื่อง nitrogen evaporator เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) และเครื่อง Gas Chromatograph/Mass spectrometry (GC/MS) รุ่น 5973

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน stock standard solution ของสารพิษแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียม working standard solution ให้ได้สารละลายของสารมาตรฐานผสมของแต่ละกลุ่มให้มีความเข้มข้นประมาณ 0.01 – 2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการสกัดตัวอย่างตามวิธีทดสอบ In house method TM – T04 – I02 base on AOAC 1995 เพิ่มขั้นตอนการขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) และปรับเปลี่ยนชนิดของสารเคมีตัวชะ (eluting agent) เป็นสารสารผสมต่างๆ ได้แก่ dichloromethane: hexane (1:1), dichloromethane: acetone (1:1), acetone: hexane (1:1), acetonitrile: toluene (1:1)

2.1 ขั้นตอนการสกัด ชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ใส่ Erlenmeyer flask เติม ethyl acetate 75 มิลลิลิตร เขย่าด้วย shaker นาน 5 ชั่วโมง กรองผ่าน anh. Na_2SO_4 ใส่ใน round bottom flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย ethyl acetate 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง กรองและเก็บรวมกับครั้งแรก นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator ให้สารสกัดเกือบแห้ง ล้าง round bottom flask ด้วย ethyl acetate (PR) เก็บสารละลายใส่ graduated tube ลดปริมาตรด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 2 มิลลิลิตร

2.2 การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) นำสารสกัดในข้อ 2.1 ไป clean up ตามวิธีทดสอบ 2 วิธีการ ได้แก่

วิธีที่ 1 clean up ด้วย carbon black โดยชั่ง carbon black ใส่ micro centrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาณหลอดละ 30, 50 และ 80 มิลลิกรัม จำนวนหลอดละ 3 ซ้ำ ดูดสารสกัดจากข้อ 2.1 ใส่ micro centrifuge tube เขย่าประมาณ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS

วิธีที่ 2 clean up ด้วย SPE ชนิด carbon black ขนาด 500 มิลลิกรัม ความจุ 6 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสารตัวชะ (eluting agent) เป็นสารผสมชนิดต่างๆ ได้แก่ dichloromethane: hexane (1:1) dichloromethane: acetone (1:1), acetone : hexane(1:1), acetonitile : toluene (1:1) ปริมาตรละ 10 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรให้ได้ 2 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS

2.3 เลือกวิธีการที่ดีที่สุดจากการทดสอบในข้อ 2.2 โดยคำนวณผลการทดสอบจากเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืนมาของสาร (% recovery) กำหนดเกณฑ์การยอมรับที่ 70 – 120 เปอร์เซ็นต์ นำวิธีการที่เลือกนี้ไปทดสอบกับดินร่วนและดินเหนียว

3. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph/Mass spectrometry (GC/MS) เครื่อง GC/MS ชนิด Single Quadrupole ยี่ห้อ Agilent รุ่น MSD 5973 ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

Mode	: pulsed splitless, SIM mode
GC column	: column DB 5 – MS capillary, 30 m x 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness
Injector	: 230 °C
MS Transfer Line	: 280 °C, MS Quad temperature : 150 °C, Ms source : 230 °C
Oven program	: 100 °C (1 นาที) $\xrightarrow{15\ ^\circ C/นาที}$ 180 °C (1 นาที) $\xrightarrow{3\ ^\circ C/นาที}$ 200 °C (0 นาที) $\xrightarrow{1\ ^\circ C/นาที}$ 210 °C (0 นาที) $\xrightarrow{15\ ^\circ C/นาที}$ 290 °C (5 นาที)

Carrier gas : helium flow 1.4 มิลลิลิตร/นาที

Injection volume : 1 ไมโครลิตร

ระยะเวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบการวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus 10 ชนิด organochlorines 16 ชนิด และ pyrethroids 7 ชนิดในดิน โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก In house method base on AOAC 1995 ของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ใช้ดินทรายเป็นตัวแทนของการทดสอบ สกัดด้วย ethyl acetate เพิ่มขั้นตอนการกำจัด สิ่งปนเปื้อนด้วยผง carbon black ที่ปริมาณต่างๆ พบว่าใช้ปริมาณ 30 มิลลิกรัม มีค่าผลการทดสอบ recovery ของสารพิษกลุ่ม organophosphorus อยู่ระหว่าง 89 – 117 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด 70 – 120 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นสารพิษชนิด triazophos ที่มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ สารพิษชนิด malathion และ parathion methyl ที่มีค่าสูงกว่าที่กำหนด ส่วนสารพิษกลุ่ม organochlorines มีค่าอยู่ระหว่าง 88 – 113 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น o,p' – DDE ที่สูงกว่าเกณฑ์ ทั้งนี้น่าจะเกิดจากปริมาณ carbon black ที่ใช้ไม่เพียงพอที่จะกำจัดสิ่งเจือปนในดินได้ทั้งหมด ทำให้กระทบต่อสารพิษบางชนิด และเมื่อเพิ่มปริมาณ carbon black เป็น 50 มิลลิกรัม พบว่าผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์ recovery ของสารพิษบางชนิดในกลุ่ม organophosphorus และกลุ่ม organochlorines มีค่าสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด เช่นเดียวกับที่เพิ่มปริมาณ carbon black เป็น 80 มิลลิกรัม แต่ปริมาณที่เพิ่มสูงสุดนี้ทำให้สารพิษชนิด triazophos ที่อยู่ในกลุ่ม organophosphorus มีค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ลดต่ำลงมาก อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณของ carbon black ที่ใช้สำหรับกำจัดสิ่งปนเปื้อนนี้ไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบสารพิษในกลุ่ม pyrethroids ที่มีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนดระหว่าง 84 – 120 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

การทดสอบโดยการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย Solid Phase Extraction ชนิด carbon black 500 มิลลิกรัม 6 มิลลิลิตร เปลี่ยนชนิดของตัวชะ (eluting agent) เป็นสารผสมต่างๆ พบว่าตัวชะชนิดสารผสมระหว่าง dichloromethane: hexane (1:1) และ dichloromethane: acetone (1:1) มีค่า recovery ของการทดสอบสารพิษทั้ง 3 กลุ่ม organophosphorus อยู่ในเกณฑ์กำหนด มีสารพิษชนิด lambda cyhalothrin ในกลุ่ม pyrethroids เพียงชนิดเดียวที่ผลการทดสอบการชะตัวอย่างด้วย dichloromethane: acetone (1:1) แล้วมีค่า recovery สูงกว่าเกณฑ์ ทั้งนี้ด้วยคุณสมบัติของสารผสมทั้งสองชนิดที่มีความแรงใกล้เคียงกัน แต่สารผสมของ dichloromethane: acetone (1:1) จะมีความแรงมากกว่าจึงทำให้ความสามารถในการชะสารพิษออกมาได้มากกว่า ประกอบกับสารพิษในแต่ละกลุ่มมีความเป็นประจุ (polar) ที่ต่างกัน ทำให้ผลการทดสอบมีเปอร์เซ็นต์ recovery สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ 2)

สำหรับการใช้ตัวชะที่เป็นสารผสมระหว่าง acetone: hexane (1:1) และ acetonitrile: toluene (1:1) พบว่าเปอร์เซนต์ recovery ของสารพิษทั้ง 3 กลุ่ม ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์กำหนดในการทดสอบตัวชะด้วยสารผสมชนิด acetone : hexane (1:1) ยกเว้นสารพิษชนิด triazophos ที่อยู่ในกลุ่ม organophosphorus และ สารพิษชนิด p,p' – DDT ที่อยู่ในกลุ่ม organochlorines ที่มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด สำหรับการทดสอบตัวชะด้วย acetonitrile: toluene

(1:1) พบว่าสารพิษส่วนใหญ่ในกลุ่ม organochlorines มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์กำหนด ทั้งนี้สารพิษที่อยู่ในกลุ่มนี้เป็นชนิดที่ไม่มีประจุ (non polar) ทำให้ประสิทธิภาพในการทดสอบใช้สารผสมตัวชะนี้ จึงไม่ดีเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามสารผสมตัวชะนี้ให้ผลการทดสอบกับสารพิษกลุ่ม organophosphorus และกลุ่ม pyrethroids มีค่าเปอร์เซ็นต์อยู่ในเกณฑ์กำหนด ยกเว้นสารพิษชนิด malathion ที่มีค่าสูงกว่าเกณฑ์ (ตารางที่ 3)

เลือกวิธีการสกัดและใช้ตัวชะที่ให้ประสิทธิภาพผลการทดสอบที่อยู่ในเกณฑ์กำหนด มีผลกระทบในการทดสอบน้อยที่สุด โดยเลือกใช้วิธีการสกัดด้วย ethyl acetate เลือกวิธีกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE ชนิด carbon black 500 มิลลิกรัม 6 มิลลิลิตร ใช้สารผสมตัวชะเป็นชนิด dichloromethane: hexane (1:1) ทดสอบกับดินเหนียวและดินร่วน พบว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของการทดสอบกับดินเหนียวและดินร่วนของสารพิษทั้ง 3 กลุ่ม มีค่าเปอร์เซ็นต์ recovery อยู่ในเกณฑ์กำหนดระหว่าง 70 – 120 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดสอบสารพิษส่วนใหญ่ในดินร่วน และการทดสอบสารพิษกลุ่ม organochlorines ในดินเหนียว จะมีค่ามากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้องค์ประกอบของเนื้อดินทั้ง 2 ชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลกระทบต่อการทดสอบที่ต่างไปด้วย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1. %recovery ของผลการทดสอบปริมาณ carbon black ที่ใช้ในการ clean up

pesticides	ปริมาณ carbon black 30 mg				ปริมาณ carbon black 50 mg				ปริมาณ carbon black 80 mg			
	Rep 1	rep 2	rep 3	average	rep 1	rep 2	rep 3	average	rep 1	rep 2	rep 3	average
organophosporus												
chlorpyrifos	89.11	89.20	89.11	89.14	83.26	72.16	75.86	77.09	68.46	72.16	64.75	68.46
diazinon	105.00	108.21	99.98	104.40	98.80	94.10	87.04	93.31	79.98	76.45	82.33	79.59
EPN	98.16	89.00	96.24	94.47	99.12	97.20	111.64	102.65	83.73	83.73	86.61	84.69
ethion	125.00	110.00	90.59	108.53	93.82	97.06	80.88	90.59	75.49	86.27	77.64	79.80
malathion	117.25	124.89	142.00	128.05	128.00	135.00	140.00	134.33	125.30	146.63	133.30	135.08
methidathion	100.00	108.00	135.00	114.33	120.00	125.00	128.00	124.33	153.26	124.35	119.64	132.42
parathion methyl	115.00	129.00	130.20	124.73	112.25	129.49	132.73	124.82	114.92	110.07	105.21	110.07
pirimiphos methyl	119.83	128.45	102.76	117.02	102.76	77.07	89.92	89.92	83.49	80.63	96.34	86.82
profenofos	121.00	120.72	122.50	121.41	82.26	76.34	92.32	83.64	97.05	95.87	94.69	95.87
triazophos	69.87	68.23	69.54	69.21	54.24	55.00	73.42	60.89	26.00	25.00	28.00	26.33
organochlorines												
aldrin	117.03	90.03	82.95	96.67	82.95	106.10	86.81	91.96	66.88	64.30	69.45	66.88
alpha BHC	126.00	100.62	86.01	104.21	86.01	90.88	73.03	83.31	71.41	81.14	64.91	72.49
alpha endosulfan	114.21	88.83	85.03	96.02	86.29	90.95	88.41	88.55	69.37	68.53	68.53	68.81
beta endosulfan	140.71	108.73	84.97	111.47	85.89	71.27	76.29	77.82	72.64	68.53	70.35	70.51
dieldrin	119.92	93.47	88.18	100.52	86.41	89.94	93.47	89.94	67.90	69.66	66.13	67.90
endosulfan sulfate	115.20	103.14	84.47	100.94	85.80	87.14	84.47	85.80	77.80	75.58	72.02	75.13
endrin	115.69	130.51	93.14	113.11	94.00	91.99	91.13	92.37	79.92	79.05	69.00	75.99
gamma BHC	143.99	109.82	87.86	113.89	85.42	86.64	78.10	83.38	70.77	61.01	61.01	64.27
heptachlor	124.36	126.27	88.09	112.91	86.62	95.43	99.84	93.97	71.94	76.35	73.41	73.90
heptachlor epoxide	124.47	97.62	86.64	102.91	87.86	91.52	100.06	93.15	70.77	61.01	73.22	68.33
o,p'-DDE	126.27	124.36	126.35	125.66	89.61	93.69	103.87	95.72	73.32	81.47	65.17	73.32
o,p'-DDT	109.00	118.24	86.11	104.45	86.11	103.33	97.59	95.68	74.63	77.41	80.37	77.47
o,p'-TDE	116.25	104.08	93.13	104.49	95.86	112.30	104.08	104.08	76.69	68.47	79.43	74.87
p,p'-DDE	121.23	103.83	94.21	106.42	94.21	101.90	90.37	95.49	76.91	82.68	74.99	78.19

ตารางที่ 1. (ต่อ) %recovery ของผลการทดสอบปริมาณ carbon black ที่ใช้ในการ clean up

Pesticides	ปริมาณ carbon black 30 mg				ปริมาณ carbon black 50 mg				ปริมาณ carbon black 80 mg			
	rep 1	Rep 2	rep 3	average	rep 1	rep 2	rep 3	average	rep 1	rep 2	rep 3	average
p,p'-DDT	88.69	87.64	89.56	88.63	74.39	70.01	73.30	72.57	70.01	74.39	65.64	70.01
p,p'-TDE	124.00	109.83	114.00	115.94	141.72	132.86	145.26	139.95	108.06	106.29	104.52	106.29
pyrethroids												
bifenthrin	127.26	97.90	96.26	107.14	97.90	96.26	76.68	90.28	83.21	79.95	89.74	84.30
cyfluthrin	82.56	80.98	85.24	82.93	100.49	102.37	101.90	101.59	91.49	94.29	101.27	95.68
cypermethrin	98.99	82.49	110.13	97.21	101.88	96.93	97.76	98.86	88.70	86.60	83.81	86.37
deltamethrin	115.99	92.33	101.87	103.40	100.72	97.67	95.76	98.05	93.45	90.16	86.87	90.16
fenvalerate	119.65	123.24	117.10	120.00	120.64	113.20	109.47	114.44	96.11	94.87	80.84	90.61
lamda cyhalothrin	127.11	96.38	96.38	106.63	97.78	104.76	92.19	98.24	85.91	84.51	83.11	84.51
permethrin	113.14	85.21	97.08	98.48	98.48	94.99	96.38	96.61	110.96	101.28	98.30	103.52

ตารางที่ 2. %recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารผสมตัวชะชนิด dichloromethane: hexane และ dichloromethane: acetone ในดินทราย ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

pesticide	dichloromethane : hexane (1:1)					dichloromethane :acetone (1:1)				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD
organophosphorus										
chlorpyrifos	88.81	85.11	86.96	86.96	2.13	76.23	74.01	73.08	74.44	2.17
diazinon	109.39	89.39	104.68	101.15	10.34	85.86	91.74	82.33	86.65	5.49
EPN	90.46	95.27	88.54	91.43	3.80	95.27	88.54	80.84	88.22	8.19
ethion	90.59	92.74	91.66	91.66	1.18	87.35	80.88	84.12	84.12	3.85
malathion	130.63	109.30	114.64	118.19	9.39	109.30	85.00	85.31	93.20	14.96
methidathion	109.65	102.34	134.02	115.33	14.38	97.47	85.28	99.90	94.22	8.31
parathion methyl	124.64	111.69	106.83	114.38	8.05	100.36	82.55	97.12	93.34	10.16
pirimiphos methyl	102.76	96.34	77.07	92.06	14.52	89.92	96.34	77.07	87.78	11.18
profenofos	111.85	101.20	109.48	107.51	5.20	78.12	91.73	100.12	89.99	12.34
triazophos	83.91	90.20	100.69	91.60	9.26	95.00	90.00	100.53	95.18	5.53
organochlorines										
aldrin	81.67	86.81	81.67	83.38	3.56	76.52	70.09	76.84	74.49	5.11
alpha BHC	82.77	77.90	74.65	78.44	5.21	81.14	79.52	73.03	77.90	5.51
alpha endosulfan	85.45	80.80	84.60	83.62	2.96	79.95	76.99	77.83	78.26	1.95
beta endosulfan	83.15	79.49	84.97	82.54	3.38	83.60	79.49	83.15	82.08	2.75
dieldrin	90.82	78.48	88.18	85.82	7.57	86.41	74.95	82.00	81.12	7.13
endosulfan sulfate	79.58	77.36	78.25	78.39	1.43	90.25	88.03	88.92	89.06	1.26
endrin	89.12	84.23	83.94	85.76	3.39	91.99	89.12	90.27	90.46	1.60
gamma BHC	84.20	96.40	69.55	83.38	16.12	75.66	73.22	82.98	77.28	6.57
heptachlor	80.75	76.35	85.16	80.75	5.45	79.28	66.07	91.03	78.79	15.85
heptachlor epoxide	85.42	80.54	90.30	85.42	5.71	80.54	84.20	84.20	82.98	2.55
o,p'-DDD	90.39	82.17	93.13	88.56	6.44	87.65	87.65	90.39	88.56	1.79

ตารางที่ 2. (ต่อ) %recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารผสมตัวชะชนิด dichloromethane: hexane และ dichloromethane: acetone ในดินทราย ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

pesticide	dichloromethane : hexane (1:1)					dichloromethane :acetone (1:1)				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD
o,p'-DDE	87.58	81.47	91.65	86.90	5.90	83.50	105.91	95.72	95.04	11.80
o,p'-DDT	86.11	86.11	80.37	84.19	3.94	91.85	80.37	109.07	93.76	15.41
p,p'-DDD	79.72	92.12	79.72	83.85	8.54	97.43	81.49	109.83	96.25	14.76
p,p'-DDE	94.21	82.68	80.75	85.88	8.48	90.37	111.52	76.91	92.93	18.77
p,p'-DDT	78.77	96.27	76.58	83.87	12.87	96.27	90.80	91.89	92.99	3.11
pyrethroids										
bifenthrin	91.37	84.84	89.74	88.65	3.83	89.74	106.05	88.11	94.63	10.49
cyfluthrin	88.28	83.12	83.59	85.00	3.36	112.70	111.76	110.35	111.61	1.06
cypermethrin	89.09	81.67	86.62	85.79	4.41	113.43	108.07	109.31	110.27	2.55
deltamethrin	87.75	84.32	95.38	89.15	6.35	114.84	124.00	123.62	120.82	4.29
fenvalerate	96.07	93.83	80.50	90.14	9.34	112.32	122.88	95.32	110.17	12.62
lamda cyhalothrin	90.10	84.51	83.11	85.91	4.30	136.89	125.72	130.60	131.07	4.27
permethrin	90.10	85.21	89.40	88.23	3.00	105.46	111.75	102.67	106.63	4.36

ตารางที่ 3. %recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารผสมตัวชะชนิด acetone: hexane และ acetonitrile: toluene ในดินทราย ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

pesticide	acetone : hexane (1:1)					acetonitrile : toluene (1:1)				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD
organophosphorus										
chlorpyrifos	111.01	85.11	101.76	99.29	13.22	85.11	115.00	86.96	95.69	17.51
diazinon	99.98	90.57	99.98	96.84	5.61	89.39	98.80	82.33	90.17	9.16
EPN	95.27	83.73	81.80	86.93	8.38	98.16	98.16	105.86	100.73	4.41
ethion	99.21	81.96	92.74	91.30	9.55	118.62	81.96	105.68	102.09	18.21
malathion	93.31	109.30	98.64	100.42	8.11	125.30	132.23	135.96	131.17	4.13
methidathion	109.65	82.85	107.21	99.90	14.84	109.65	119.40	129.14	119.40	8.16
parathion methyl	67.98	90.64	90.64	83.09	15.75	100.36	100.36	103.59	101.44	1.84
pirimiphos methyl	77.07	100.25	78.56	85.29	15.21	89.92	102.76	109.18	100.62	9.75
profenofos	95.87	86.00	110.00	97.29	12.40	101.79	100.01	98.24	100.01	1.78
triazophos	64.12	62.93	65.26	64.10	1.82	115.38	113.28	106.99	111.88	3.90
organochlorines										
aldrin	78.45	75.24	82.31	78.67	4.50	69.45	64.95	79.74	71.38	10.62
alpha BHC	86.01	77.90	105.49	89.80	15.79	69.78	68.16	81.14	73.03	9.69
alpha endosulfan	84.60	79.10	85.87	83.19	4.32	70.64	66.84	66.41	67.96	3.43
beta endosulfan	83.60	79.04	77.66	80.10	3.88	69.44	66.70	70.35	68.83	2.76
dieldrin	84.65	76.71	81.12	80.83	4.92	72.30	71.42	74.07	72.60	1.86
endosulfan sulfate	77.36	76.47	80.02	77.95	2.37	66.69	65.80	67.58	66.69	1.33
endrin	95.15	84.23	81.93	87.10	8.11	76.47	73.02	72.16	73.88	3.09
gamma BHC	66.00	78.10	69.00	71.03	8.87	70.77	64.67	58.57	64.67	9.43
heptachlor	91.03	76.35	83.69	83.69	8.77	70.47	67.54	63.13	67.05	5.51
heptachlor epoxide	87.86	79.32	103.72	90.30	13.71	73.22	68.33	62.23	67.93	8.10

ตารางที่ 3. (ต่อ) %recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารผสมตัวชะชนิด acetone: hexane และ acetonitrile: toluene ในดินทราย ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

pesticide	acetone : hexane (1:1)					acetonitrile : toluene (1:1)				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	%RSD
o,p'DDD	95.86	87.65	82.17	88.56	7.78	76.69	71.21	79.43	75.78	5.52
o,p'-DDE	91.65	81.47	109.98	94.37	15.31	73.32	69.25	79.43	74.00	6.93
o,p'-DDT	91.85	80.37	97.59	89.93	9.75	74.63	74.63	97.59	82.28	16.11
p,p'-DDD	113.37	95.66	115.15	108.06	9.97	90.35	81.49	113.37	95.07	17.31
p,p'-DDE	94.21	84.60	90.37	89.73	5.39	78.83	74.99	76.91	76.91	2.50
p,p'-DDT	65.64	48.13	54.70	56.16	15.75	57.98	55.79	63.45	59.07	6.68
pyrethroids										
bifenthrin	68.53	70.16	79.95	72.88	8.48	75.05	71.79	89.74	78.86	12.12
cyfluthrin	76.90	76.26	65.00	72.72	9.20	77.48	72.32	86.87	78.89	9.35
cypermethrin	86.62	76.40	61.87	74.96	16.59	75.48	77.13	80.02	77.54	2.96
deltamethrin	62.57	79.00	69.00	70.19	11.79	74.40	79.74	76.69	76.94	3.48
fenvalerate	72.98	75.22	71.49	73.23	2.56	93.09	78.36	63.30	78.25	19.03
lamda cyhalothrin	75.00	59.37	78.22	70.86	14.23	81.72	74.73	76.13	77.52	4.77
permethrin	76.00	71.94	67.05	71.66	6.25	74.03	85.23	107.56	88.94	19.19

ตารางที่ 4. %recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารผสมตัวชะชนิด dichloromethane: hexane ดินร่วนและดินเหนียว ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

pesticides	ดินร่วน					ดินเหนียว				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD
organophosphorus										
chlorpyrifos	77.71	70.31	70.31	72.77	5.87	84.25	80.21	87.65	84.04	4.43
diazinon	123.07	110.25	120.28	117.87	5.72	110.21	95.24	87.2	97.55	11.97
EPN	84.69	76.99	82.76	81.48	4.92	80.25	70.63	65.35	72.08	10.48
ethion	115.36	116.47	127.25	119.69	5.49	120.56	118.26	121.56	120.13	1.41
malathion	113.24	101.24	107.56	107.35	5.59	114.85	95.2	85.21	98.42	15.32
methidathion	109.74	120.72	107.24	112.57	6.37	95.62	124.3	124.65	114.86	14.51
parathion methyl	124.36	112.01	107.25	114.54	7.71	119.52	119.63	120.28	119.81	0.34
pirimiphos methyl	125.69	113.02	112.58	117.10	6.36	112.01	100.32	121	111.11	9.33
profenofos	124.05	110.26	119.47	117.93	5.96	130.24	100.25	112.54	114.34	13.18
triazophos	76.34	65.24	68.54	70.04	8.14	65.35	72.25	73.01	70.20	6.01
organochlorines										
aldrin	106.75	96.46	102.89	102.03	5.09	100.62	92.25	100.36	97.74	4.87
alpha BHC	120.09	107.11	120.09	115.76	6.47	100.35	95.35	84.65	93.45	8.58
alpha endosulfan	107.45	95.60	101.52	101.52	5.83	101.32	92.12	84.35	92.60	9.17
beta endosulfan	120.36	115.13	124.26	119.92	3.82	96.35	114.24	105.24	105.28	8.50
dieldrin	111.10	98.76	109.34	106.40	6.28	68.21	67.53	75.28	70.34	6.10
endosulfan sulfate	117.37	104.03	112.92	111.44	6.09	112.38	103.26	98.76	104.80	6.62
endrin	114.24	117.24	113.20	114.89	1.83	104.36	104.57	113.24	107.39	4.72
gamma BHC	119.68	114.70	122.03	118.80	3.15	82.65	95.34	75.36	84.45	11.97

ตารางที่ 4. (ต่อ) % recovery ของผลการทดสอบโดยใช้สารผสมตัวชะชนิด dichloromethane: hexane ดินร่วนและดินเหนียว ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 – 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

pesticides	ดินร่วน					ดินเหนียว				
	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD	rep 1	rep 2	rep 3	average	% RSD
Heptachlor	105.24	123.33	120.83	116.47	8.42	69.54	84.37	67.54	73.82	12.46
heptachlor epoxide	117.14	104.94	106.24	109.44	6.12	110.25	100.68	85.42	98.78	12.68
o,p'-DDE	118.13	101.83	117.65	112.54	8.24	110.62	100.25	124.12	111.66	10.72
o,p'-DDT	120.36	114.81	124.03	119.73	3.88	113.36	110.01	96.34	106.57	8.46
o,p'-TDE	113.69	124.39	118.56	118.88	4.51	110.25	98.63	114.25	107.71	7.53
p,p'-DDE	123.05	111.52	119.21	117.93	4.98	95.35	102.35	114.72	104.14	9.42
p,p'-DDT	114.36	123.35	120.36	119.36	3.84	120.35	110.24	114.26	114.95	4.43
p,p'-TDE	118.24	120.46	121.34	120.01	1.33	104.32	96.37	104.25	101.65	4.50
pyrethroids										
bifenthrin	117.47	104.42	107.68	109.86	6.18	98.64	104.42	95.36	99.47	4.61
cyfluthrin	102.37	89.22	100.49	97.36	7.30	102.37	89.22	100.49	97.36	7.30
deltamethrin	103.01	91.57	99.20	97.93	5.95	103.01	81.25	99.20	94.49	12.30
fenvalerate	108.73	99.79	104.26	104.26	4.29	101.13	108.65	92.35	100.71	8.10
lamda cyhalothrin	115.94	101.97	108.95	108.95	6.41	101.36	95.63	113.28	103.42	8.71
permethrin	103.37	92.19	96.38	97.31	5.80	103.37	92.19	96.38	97.31	5.80

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดแมลงกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography/Mass spectrometry พบว่าใช้ ethyl acetate เป็นสารสกัด และผ่านการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE ชนิด carbon black ให้ผลการทดสอบของสารพิษส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์กำหนด และสามารถยอมรับได้ รวมทั้งสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษทั้ง 3 กลุ่มนี้ ในตัวอย่างดินชนิดอื่นๆ ได้

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดินของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
2. เป็นข้อมูลสนับสนุนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เพื่อนำไปสู่การขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus, organochlorines และ pyrethroids ในดิน

เอกสารอ้างอิง

ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ และปฏิมาภรณ์ สังห์น้อย. 2552. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 53 ชนิด อย่างรวดเร็วด้วยวิธี QuECheRS โดยใช้ GC/MS – PTV Inlet. กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร, สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

AMADEO R.FERNANDEZ ALBA. 2004. Chromatographic – Mass spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide residues. Comprehensive Analytical Chemistry volume XLIII.

AOAC Peer – Verified Methods. Nov. 1993.

AOAC Official Method. 1995. Organophosphorus Pesticide. General Multiresidue Method. 970.52

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Chlormequat และ Mepiquat ในผลไม้โดยใช้ Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometry

Development of Method for Analysis Chlormequat and Mepiquat in Fruit by Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometry

วิษณุ แจ้งใบ สมสมัย ปาลกูล ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ ปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

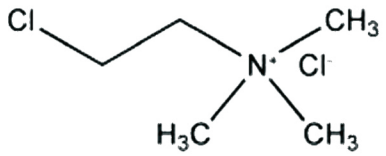
.....

บทคัดย่อ

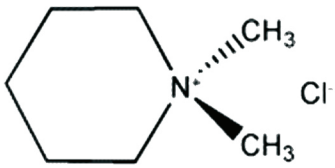
งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด Chlormequat chloride และ Mepiquat chloride ซึ่งเป็นสารสำหรับชะลอการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatograph/Tandem Mass Spectrometry ต่อกับคอลัมน์ชนิด Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) และใช้สารละลาย Ammonium formate buffer เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 3.75 กับสารละลาย Acetonitrile เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ จากการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดในตัวอย่างมะม่วงที่พัฒนามาจากวิธี QuPPe – Method (Anastassiades *et al.,* 2011) โดยเปรียบเทียบสารละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันในการสกัดพบว่าสารละลาย 1% Formic acid ใน Acetonitrile ให้ผลร้อยละการกลับคืน (%Recovery, n=3) ของ Chlormequat และ Mepiquat เท่ากับ 104 และ 98 โดยมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 6.66 และ 3.52 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าสารละลายชนิดอื่นที่ใช้ในการสกัด และเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาได้กับวิธี QuEchERS (Anastassiades *et al.,* 2003) ด้วยวิธีทางสถิติ t - test ให้ผลการทดสอบของทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดสอบผลของ Matrix effect พบว่าในกรณีที่ใช้ Internal standard (ISTD) ผลของ Matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพของวัตถุมีพิษทั้ง 2 ชนิด แต่ในกรณีที่ใช้ External standard (ESTD) ผลของ Matrix ไม่มีผลต่อ Mepiquat แต่มีผลต่อ Chlormequat เพื่อป้องกันผลที่เกิดจาก Matrix effect จึงต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานใน Matrix ในกรณีที่ใช้ ESTD ดังนั้นเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีในการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ในขั้นตอนต่อไป จะดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ให้มีความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

คำนำ

สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) มีคุณสมบัติหลักในการชะลอการแบ่งเซลล์และการยืดตัวของเซลล์บริเวณใต้ปลายยอดของกิ่งพืช ทำให้พืชได้รับสารมีความสูงน้อยกว่าปกตินั่นคือสารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการสร้างหรือการทำงานของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน ควบคุมความสูงและขนาดทรงพุ่มของพืชเช่นในไม้ดอกไม้ประดับควบคุมความสูงให้มีขนาดกะทัดรัดเหมาะแก่การปลูกในกระถางหรือลดความสูงของต้นทำให้ปล้องสั้นลงในพืชไร่ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการติดผลและคุณภาพผล เพิ่มการออกดอก สารในกลุ่มนี้ได้แก่ คลอมีควอท (Cholormequat), ดามิโนไซด์ (Daminozide), แอนไซมิโดล (Ancymidol), เมพิควอทคลอไรด์ (Mepiquat chloride) และพาโคลบิวทราโซล (Paclobutrazol) (แหล่งที่มา: http://www.thaikasetsart.com) ข้อมูลพื้นฐานความเป็นพิษจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ระบุความเป็นพิษของ Chlormequat และ Mepiquat จัดอยู่ในกลุ่มอันตรายเล็กน้อย มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 670 และ 1,490 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (WHO, 2009) ในสหภาพยุโรปได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (MRL) ชนิด Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (MRL EU, 2013) สำหรับประเทศญี่ปุ่นกำหนดค่า MRL ของ Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงเท่ากับ 0.05 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (MRL Japan, 2012) สำหรับประเทศไทยและ Codex ไม่มีการกำหนดค่า MRL สำหรับสูตรโครงสร้างทางเคมีของวัตถุมีพิษทั้งสองชนิดแสดงดังภาพที่ 1 และ 2



ภาพที่ 1. สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Chlormequat chloride



ภาพที่ 2. สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Mepiquat chloride

จากการทบทวนวรรณกรรมของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat โดยส่วนใหญ่จะใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด Mass spectrometry โดยมีผู้ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อธิบายไว้ดังนี้

Esparza *et al.*,(2009) ได้ตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และใช้คอลัมน์ชนิด Atlantis HILIC ขนาด 150 มิลลิเมตร × 2.1 มิลลิเมตร 3 ไมโครเมตร โดยใช้หลักการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ gradient อัตราส่วนระหว่าง Acetonitrile กับ Ammonium formate buffer pH 3.75 การไหล 0.4 ไมโครลิตรต่อนาที ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่า 4 นาทีต่อตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างผักผลไม้ น้ำผลไม้ อาหาร

เด็ก กาแฟ เบียร์ เป็นต้น โดยในขั้นตอนการสกัดใช้ SPE C18 ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด

Oscar *et al.,* (2004) ทำการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Quaternary ammonium จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Paraquat, Diquat, Difenzoquat, Chlormequat และ Mepiquat ด้วยเทคนิค LC - MS/MS 2 แบบ ได้แก่ Triple quadrupole และ Time of fight (TOF) ใช้คอลัมน์ Kromasil ขนาด 200 มิลลิเมตร × 2.1 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร และใช้การชะสารออกจากคอลัมน์แบบ gradient โดยใช้ Mobile phase ระหว่าง 20 มิลลิโมลาร์ HFBA ใน 100 มิลลิโมลาร์ Formic acid /Ammonium formate buffer (pH 3.3) กับ Acetonitrile ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำดื่ม โดยใช้วิธีการสกัดเป็นแบบ On – line SPE preconcentration

Anastassiades *et al.,* (2011) พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่มีสภาพความขั้วเป็นขั้วสูง ได้แก่ Paraquat Diquat Chlormequat Mepiquat Daminozide Cyromazine ETU PTU Trimesium เป็นต้น ซึ่งตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC - MS/MS และใช้คอลัมน์ชนิด Obelisc R 2.1 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร 100A และใช้ Ammonium formate buffer กับ acetonitrile เป็น mobile phase เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ สำหรับวิธีการสกัดตัวอย่างใช้ 1% Formic acid ใน Methanol ในการสกัด และไม่มีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ในผลไม้ โดยใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC - MS/MS และใช้คอลัมน์ชนิด Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) เพื่อให้มีความว่องไวสูงและมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นรวมถึงการหาวิธีการเตรียมตัวอย่างมีความสะดวกรวดเร็ว ประหยัดและให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารมาตรฐานวัตถุมีพิษได้แก่ Chlormequat chloride Mepiquat chloride Chlormequat chloride 1, 1, 2, 2 - D4 ความบริสุทธิ์ 98 - 99% และสารละลายมาตรฐาน Mepiquat iodide D3 (methyl D3) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารเคมี ได้แก่ Acetonitrile (HPLC grade) Methanol (HPLC grade) Formic acid Ammonium formate Water (HPLC grade)

3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 2 และ 5 ตำแหน่ง Centrifuge, Food processor Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร Micro pipette ขนาด 100 - 1,000 ไมโครลิตร

4. เครื่องแก้วต่างๆ ในห้องปฏิบัติการเช่น volumetric flask บีคเกอร์ กระบอกตวง Centrifuge tube (Teflon) ขนาด 50 มิลลิลิตร

5. เครื่องมือตรวจวัดวัตถุมีพิษชนิด Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ต่อกับเครื่อง Tandem mass spectrometry

6. ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาทดลอง ได้แก่ มะม่วง

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารและวางแผนการทดลอง

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Chlormequat chloride Mepiquat chloride Chlormequat chloride 1, 1, 2, 2 - D4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1,000, 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetonitrile ส่วนสารละลายมาตรฐาน Mepiquat iodide D3 (methyl D3) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารมาตรฐานที่เตรียมแล้วมา Mixed standard และเตรียมกราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.005 - 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การตั้งสภาวะเครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

- คอลัมน์ชนิด HILIC ความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.10 มิลลิเมตร ขนาดของอนุภาคภายใน 2.6 ไมครอน

- การชะสารออกจากคอลัมน์เป็นแบบ gradient โดยที่สาร A เป็น Ammonium acetate buffer เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 3.75 ส่วนสาร B เป็น Acetonitrile อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 1

- ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 2 ไมโครลิตร

- อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส

4. การตั้งสภาวะเครื่อง Tandem mass spectrometry Source parameter

- Gas Temp 325°C

- Gas Flow 10 (l/min)

- Nebulizer 45 psi

- Capillary 4000 V

5. การหาความเข้มข้นของ Ammonium formate buffer ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย Ammonium formate buffer ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 50 mM และปรับ pH 3.75 ด้วย Formic acid ใช้สารละลาย buffer เป็น Mobile phase คู่กับสารละลาย Acetonitrile ในการชะสารออกจากคอลัมน์ เปรียบเทียบผลของพื้นที่ใต้พีค ความสูงของพีค และค่า Retention time (RT) ของวัตถุมีพิษแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นของ buffer ที่แตกต่างกัน

6. ขั้นตอนการสกัด

6.1 ขั้นตอนการสกัดพัฒนาจากวิธี Quppe – Method (Anastassiades, 2011) โดย เปรียบเทียบผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการสกัด จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

1. 1% Formic acid ในน้ำ
2. 1% Formic acid ใน Methanol
3. 1% Formic acid ใน Acetonitrile

ชั่งตัวอย่างมะม่วง 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard (Chlormequat และ Mepiquat) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นเติมสารละลายที่ใช้ในการสกัด (ทดสอบสารละลายแต่ละชนิดๆ ละ 3 ซ้ำ) จำนวน 10 มิลลิลิตร และเติม Mixed Internal Standard (Chlormequa t - D4 และ Mepiquat

- D3) เข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm จากนั้นเทสารละลายใสกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน ลงในขวดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC - MS/MS

6.2 เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาจากวิธี QuPPe-Method กับวิธี QuEChERS ทำการเปรียบเทียบผลของวิธีการทดสอบประสิทธิภาพที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 กับวิธี QuREChERs (Anastassiades *et al.,* 2003) โดยขั้นตอนการสกัดด้วยวิธี QuEChERS ทำโดยชั่งตัวอย่างมะม่วง 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเติม Mixed ISTD ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม Acetonitrile 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ $MgSO_4$ 4 กรัม NaCl 1 กรัม Na_3Citrate dehydrate 1 กรัม และ Na_2HCitrate sesquihydrate 0.5 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารผสมระหว่าง PSA 125 มิลลิกรัม กับ$MgSO_4$ 750 มิลลิกรัม นำไป vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในขวดเติม 5% Formic acid ใน Acetonitrile ปิดฝาแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC - MS/MS

7. การเปรียบเทียบการใช้ Internal standard กับ External standard

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ และเติม ISTD ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสกัดสารตัวอย่างด้วย 1% Formic acid ใน Acetonitrile และเตรียมสารละลายมาตรฐานใน Acetonitrile เพื่อใช้เป็น Calibration curve ตรวจวิเคราะห์หา %Recovery และนำผลของ %Recovery มาเปรียบเทียบระหว่างการคำนวณโดยใช้วิธี ISTD และ ESTD

8. การทดสอบ Matrix effect

ทำการทดสอบและเปรียบเทียบระหว่าง Matrix match calibration curve กับ Standard calibration curve ของสาร Chlormequat chloride และ Mepiquat chloride โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ชุด โดยที่ชุดแรกเตรียมใน Acetonitrile ส่วนชุดที่สองเตรียมในสารละลาย Matrix ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่เหมาะสม และเติม ISTD ลงในสารละลายมาตรฐานทั้งสองชุด ตรวจวิเคราะห์สารทั้งสองชุดด้วยเครื่อง LC - MS/MS นำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ประเมินผลของ Matrix จากความชันของกราฟทั้งสอง โดยค่าผลต่างของความชันต้องมีค่าความแตกต่างไม่เกิน 10% จากนั้นพิจารณาผลของ Matrix ในกรณีที่ใช้ ESTD พิจารณาจากค่าความชันจากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้น และใช้หลักการประเมินเช่นเดียวกับการใช้ ISTD

ระยะเวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลอง

ผลของความเข้มข้น Ammonium formate buffer

สารละลาย Ammonium formate buffer ใช้เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ร่วมกับสารละลาย Acetonitrile เพื่อให้วิธีมีค่าความว่องไวสูง (Sensitivity) จึงต้องมีการหาความเข้มข้นของ buffer ที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของ buffer ที่ความเข้มข้นในช่วง 5 - 50 mM ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ Buffer เพิ่มขึ้นความแรงของ ionic strange ก็สูงขึ้นมีผลทำให้พื้นที่ใต้พีค ความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับ และสารจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว แต่ข้อจำกัดของการใช้ buffer คือเมื่อความเข้มข้นของ buffer เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เกิดเกลือของ buffer ซึ่งจะทำให้ความดันของคอลัมน์สูงขึ้นและอาจเกิดการอุดตันได้ง่าย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ Ammonium formate buffer ที่ความเข้มข้น 50 mM

ผลของสารละลายชนิดต่าง ๆที่ใช้ในการสกัด

จากการพัฒนาวิธี QuPPe - method โดยวิธีนี้ใช้สารละลาย 1% Formic acid ใน Methanol เป็นตัวสกัดและไม่มีการกำจัดสารปนเปื้อน ดังนั้นจึงมีการเปรียบเทียบสารละลายจำนวน 3 ชนิด ที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกันในการสกัดตัวอย่างมะม่วง ได้แก่ น้ำ Methanol และ Acetonitrile โดยที่สารละลายแต่ละชนิดจะถูกเตรียมใน Formic acid เข้มข้น 1% ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดแสดงดังตารางที่ 4 จากตารางพบว่าสารละลายที่ใช้ในการสกัดแต่ละชนิดให้ผลของ %Recover อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (80-110%) (AOAC, 2002) แต่สารละลายแต่ละชนิดมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ที่แตกต่างกันโดยที่สารละลาย 1%Formic acid ใน Acetonitrile มีค่า %RSD น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายอีกสองชนิด สำหรับปัญหาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้สารละลาย 1% Formic acid ในน้ำและ Methanol เป็นตัวสกัดในขั้นตอนของการกรองตัวอย่างจะกรองได้ยากเพราะสารละลายที่ได้จะขุ่นและมีตะกอนแขวนลอยซึ่งจะแตกต่างจากสารละลายตัวอย่างที่ใช้ 1% Formic acid ใน Acetonitrile เป็นตัวสกัดซึ่งสารละลายตัวอย่างที่ได้จะใส กรองได้ง่าย และผลจากการเพิ่มความเข้มข้นของกรด formic เป็น 5% ในสารละลายที่ใช้สกัด ให้ผล % Recovery ที่ไม่แตกต่างจากการใช้กรด 1% ดังนั้นความเข้มข้น 1% ของกรดเพียงพอสำหรับในการสลายพันธะ (Bond Breaking) ของสารที่ตรวจวิเคราะห์ที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ถูกสกัดออกมาอยู่ในสารละลายที่ใช้สกัด ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1% Formic acid ใน Acetonitrile เป็นสารละลายในการสกัดตัวอย่าง

ผลของการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาจาก วิธี QuPPe -Method **กับวิธี** QuEChERS

วิธีที่พัฒนามาจาก QuPPe - Method มีลักษณะคล้ายกับวิธี QuEChERS แต่จะแตกต่างกันที่วิธี QuPPe - Method จะเตรียม Acetonitrile ในกรด แต่วิธี QuEChERS จะใช้สารละลาย Acetonitrile ในการสกัดและใช้เกลือของ Buffer ในขั้นตอนการสกัด และมีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA และ Graphitized Carbon (GCB) ผลจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดทั้งสองวิธีแสดงผลดังตารางที่ 5 เมื่อนำข้อมูลของ %Recovery มาประเมินความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยที่ n=5 พบว่า Chlormequat และ Mepiquat มีค่า t_{cal} เท่ากับ 2.31 และ 2.29 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า $t_{critical}$ จากตาราง (t table - critical values) มีค่า

เท่ากับ 2.571 จะเห็นได้ว่าค่า t_{cal} ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า $t_{critical}$ ดังนั้นวิธีการสกัดทั้งสองวิธีให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการเปรียบเทียบการใช้ Internal standard (ISTD) กับ External standard (ESTD)

จากการเปรียบเทียบผลของ %Recovery ที่ระดับวามเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 6) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทำ Calibration curve ใน Acetonitrile จากผลการทดสอบที่ได้โดยการใช้ ISTD พบว่า Mepiquat ให้ผล %Recovery อยู่ในช่วง 99-108% และ Chlormequat อยู่ในช่วง 93 - 99% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับผลของ %Recovery ที่ได้จากการใช้ ESTD พบว่า Mepiquat อยู่ในช่วง 94 - 99% แต่ Chlormequat อยู่ในช่วง 45 - 55% ซึ่งจากการใช้ ESTD ไม่มีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพของ Mepiquat แต่มีผลต่อ Chlormequat ดังนั้น จึงต้องมีการศึกษาผลของ Matrix ในหัวข้อต่อไป

ผลของ Matrix effect

จากการทดสอบผลของ Matrix effect โดยการเตรียม Calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005 - 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลาย ISTD เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรในทุกความเข้มข้น โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด ซึ่งชุดแรกเตรียมใน Acetonitrile และชุดที่สองเตรียมใน Matrix ผลจากการเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคกับอัตราส่วนของความเข้มข้นแสดงดังภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟที่ได้ของวัตถุมีพิษทั้งสองชนิดที่เตรียมใน Acetonitrile และ Matrix มีค่าความชันไม่แตกต่าง และเมื่อนำค่าความชันที่ได้มาคำนวณค่าความแตกต่าง (%RPD) (ตารางที่ 7) พบว่า Chlormequat มีค่าความแตกต่างของความชันเท่ากับ 4.04% และ Mepiquat มีค่าเท่ากับ 3.56% ซึ่งมีค่า %RSD ไม่เกิน 10% (NATA, 2012) และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งแสดงว่า Matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบ

สำหรับผลการทดสอบ Matrix โดยใช้วิธี ESTD ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการใช้ ISTD แต่เขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นแสดงดังภาพที่ 4 จากการประเมินความแตกต่าง (%RPD) ระหว่างค่าความชันของสารมาตรฐานที่เตรียมใน Acetonitrile กับ Matrix (ตารางที่ 8) พบว่า Mepiquat และ Chlormquat มีค่า %RPD เท่ากับ 5.87% และ 49.68% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดสอบ Matrix มีผลต่อการทดสอบ Chlormequat ซึ่งมีค่าความแตกต่างกันมากกว่า 10%

ดังนั้นจากการศึกษาผลของ Matrix effect ทำให้ทราบว่าถ้าในกรณีตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษทั้งสองชนิดโดยใช้วิธี ISTD ไม่จำเป็นต้องเตรียมสารมาตรฐานใน Matrix เพื่อทำ Calibration curve เพราะ Matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบ แต่ถ้าใช้วิธี ESTD ต้องเตรียม Calibration curve ในสารละลาย Matrix เพื่อป้องกันการเกิดผลของ Matrix ที่มีต่อ Chlormequat

สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ต่อกับคอลัมน์ชนิด HILIC และใช้ Ammonium formate buffer เข้มข้น 50 mM pH 3.75 กับ สารละลาย Acetonitrile เป็น Mobile phase สำหรับขั้นตอนในการสกัดได้พัฒนามาจากวิธี QuPPe - Method โดยใช้สารละลาย 1% Formic acid ใน Acetonitrile เป็นตัวสกัดสารตัวอย่างซึ่งให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาได้ กับวิธี QuEChERS ด้วยวิธีทางสถิติ t - test ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดโดยใช้ 1% Formic acid ใน Acetonitrile ในการสกัดตัวอย่าง จากการศึกษาผล Matrix effect

พบว่า Matrix มีผลต่อ Chlormequat ในกรณีที่ใช้วิธี ESTD แต่ผลของ Matrix ไม่มีผลในกรณีที่ใช้วิธี ISTD ดังนั้นถ้าใช้วิธี ISTD ในการตรวจวิเคราะห์ไม่จำเป็นต้องเตรียมสารมาตรฐานใน Matrix แต่ถ้าใช้วิธี ESTD ต้องเตรียมสารมาตรฐานใน Matrix เพื่อไม่ให้เกิดผลของ Matrix effect และให้ผลของการตรวจวิเคราะห์ที่ความถูกต้องมากที่สุด ผลจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ทำให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษทั้งสองชนิดที่เหมาะสม ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจะดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งสองชนิด เพื่อให้มีความถูกต้อง และแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

การนำไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ Chlormequat chloride และ Mepiquat Chloride ที่เหมาะสมในตัวอย่างผลไม้ และเป็นแนวทางสำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่มีสภาพความเป็นขั้วชนิดอื่นและวิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อยื่นขอขยายขอบข่ายในการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการระบบ ISO/IEC 17025 ตลอดจนนำวิธีนี้ไปเผยแพร่กับหน่วยในสังกัดกรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 2009 Commonity Reference Laboratory for Single Residue Method.Version 2:1 - 11 Alder L. and J.R. Startin (2005). Determination of chlormequat and Mepiquat in Foods by Liquid Chlormatography/Mass Spectrometry or Liquid Chromatography/Tandem Mass Chromatography: Interlaboratory Study. **J. of AOAC International 88** : 1762 - 1776.

Anonymous. 2012 Maximum Residue Limits Under Positive List System, Food Sanitation Law : Japan.

Anonymous.2013 EU Pesticides Database. From web site http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7288577&CFTOKEN =96827652&jsessionid=08045fc97da7246e303aTR. (15 January 2013).

Anonymous.2013 From web site http://www.thaikasetsart.com. (15 January 2013) AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002 - 11 - 07, \AOACI\eCam\Single-Lab_Validation_47.doc. From web site: http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf

M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D.Stajnbaher, F.J. Schenck., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, **J. AOAC Int., 86**, 412 - 431.

M. Anastassiades, D.I.Kolberg, D.Mack, I.Sigalova, D.Roux and D.Fugel (2011). Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination.version 6:1 - 37

N. Oscar , E.Moyano and M.T. Galceran (2004). Time-of-Flight High Resolution Versus Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Quaternary Ammonium Herbicides in Drinking Water. **Anal. Chim.Acta. 525**:183 - 190.

NATA Technical Note 17. 2012. Guideline for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Method.

World Health Organization (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides byHazard and Guidelines to Classification.

X. Esparza, E. Moyano and M.T. Galceran (2009). Analysis of Chlormequat and Mepiquat by Hydrophilic Interaction Chromatographhy Coupled to Tandem Mass Spectrometry in Food Sample. J. of **Chromatography A 1216** : 4402 - 4406.

ตารางที่ 1. แสดงอัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

เวลา (นาที)	**อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)**	**สารละลาย A (เปอร์เซ็นต์)**	**สารละลาย B (เปอร์เซ็นต์)**
0.5	0.4	20	80
1	0.4	40	60
3	0.4	60	40
5	0.4	60	40
6	0.4	20	80
8	0.4	20	80

ตารางที่ 2 แสดง Parameter ต่างๆ ของ Mass spectrometry ที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด

Compound	Precursor	Product ion 1	Product ion 2	Dwell time	Fragmentor	Collision
Chlormequat Chloride	122.1	63.1	59.2	100	100	5
Chlormequat-D4(ISTD)	126.1	59.3	58.1	100	100	5
Mepiquat Chloride	114.2	98.1	58.1	100	135	10
Mepiquat-D3(ISTD)	117.2	101.03	98.3	100	100	10

ตารางที่ 3. ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Ammonium formate buffer

Ammonium formate buffer	Chlormequat			Mepiquat		
	RT (min)	Peak Hight	Peak Area	RT (min)	Peak Hight	Peak Area
5 mM	2.309	622	3607	3.027	334	2856
10 mM	2.288	635	3576	2.976	340	2869
20 mM	2.018	736	3401	2.618	466	2764
50 mM	1.886	775	3684	2.402	511	2720

ตารางที่ 4. แสดงผลการเปรียบเทียบร้อยละการกลับคืนของการใช้สารละลายในการสกัดตัวอย่างที่แตกต่างกัน

Extract solvent	Spike (mg/kg)	Chlormequat Chloride %Rec (n=3)	%RSD	Mepiquat Chloride %Rec (n=3)	%RSD
1% Formic acid in Water	0.05	101	7.37	93	10.12
1% Formic acid in Methanol	0.05	110	8.50	99	7.30
1% Formic acid in Acetonitrile	0.05	104	6.66	98	3.52

ตารางที่ 5. การเปรียบเทียบผลของ % Recovery ที่ได้จากการสกัดด้วย 1% Formic acid ใน Acetonotrile กับวิธี QuEChERS

No.	Chlormequat		Mepiquat	
	1% Formic acid in Acetonitrile	QuEChERS	1% Formic acid in Acetonitrile	QuEChERS
1	95	102	105	88
2	99	101	113	97
3	107	88	106	109
4	94	96	104	101
5	98	104	97	96
Mean	98.60	98.20	105.00	98.20
SD	5.13	6.42	5.70	7.66
%RSD	5.20	6.54	5.43	7.80

ตารางที่ 6. การเปรียบเทียบผลของ %Recovery ระหว่างการใช้ Internal Standard และ External standard

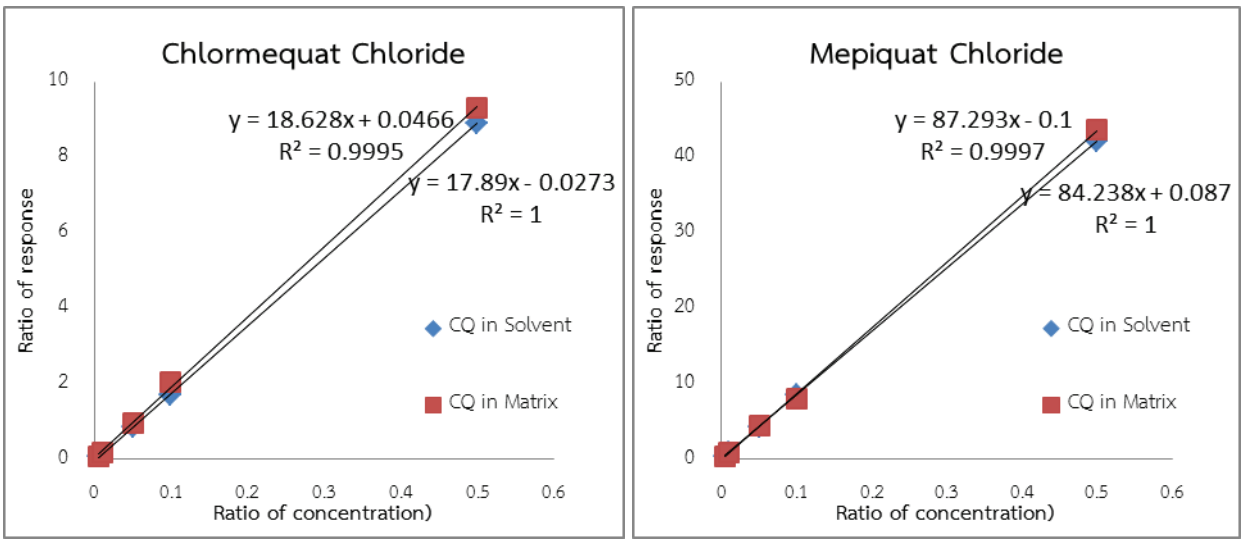
No.	%Recovery			
	Used ISTD		Used ESTD	
	Chlormequat	Mepiquat	Chlormequat	Mepiquat
1	108	97	45	97
2	102	93	52	94
3	99	99	55	99
Mean	103	96	51	97
SD	4.58	3.06	5.13	2.52
%RSD	4.45	3.17	10.13	2.60

ตารางที่ 7. ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชันของสารมาตรฐานที่เตรียมใน Solvent และ Matrix โดยใช้วิธี ISTD

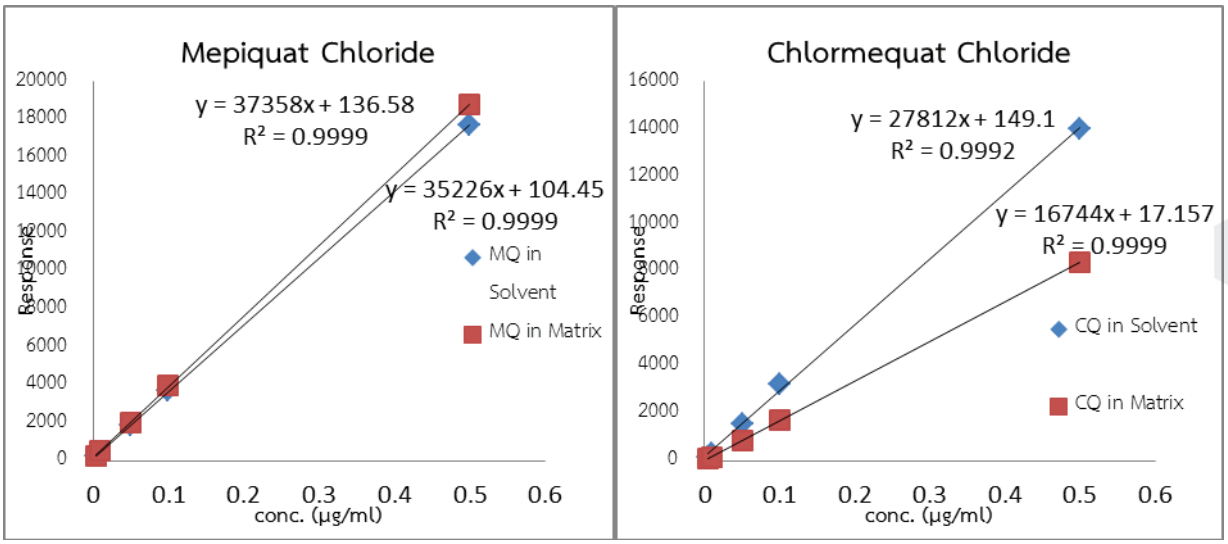
Pesticide	Equation	Slope	%RPD
Chlormequat in solvent	y = 17.89x - 0.0273	17.89	4.04
Chlormequat in matrix	y = 18.628x + 0.0466	18.628	
Mepiquat in solvent	y = 84.238x + 0.087	84.238	3.56
Mepiquat in matrix	y = 87.293x - 0.1	87.293	

ตารางที่ 8. ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชันของสารมาตรฐานที่เตรียมใน solvent และ Matrix โดยใช้วิธี ESTD

Pesticide	Equation	Slope	%RPD
Chlormequat in solvent	y = 27812x + 149.1	27812	49.68
Chlormequat in matrix	y= 16744x + 17.157	16744	
Mepiquat in solvent	y = 35226x + 104.45	35226	5.87
Mepiquat in matrix	y = 37358x + 136.58	37358	



ภาพที่ 3. แสดง Calibration curve ของ Chlormequat และ Mepiquat ใน Solvent และ Matrix โดยวิธี ISTD



ภาพที่ 4. แสดง Calibration curve ของ Chlormequat และ Mepiquat ใน solvent และ matrix โดยวิธี ESTD

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1. เกณฑ์การยอมรับ Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer - Verified Method, 2002

ความเข้มข้นของ Analyte ในตัวอย่าง	Recovery, %
100%	98-102
10%	98-102
1%	97-103
0.1%	95-105
100ppm	90-107
10ppm	80-110
1ppm	80-110
100ppb	80-110
10ppb	60-115
1ppb	40-120

ภาคผนวก 2. เกณฑ์การยอมรับ %RSD ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer - Verified Method, 2002

Unit	RSD_r (%)
100%	1
10%	1.5
1%	2
0.1%	3
100 ppm	4
10 ppm (mg/g)	6
1 ppm	8
10 ppb (mg/g)	15

ผลกระทบของสารพิษกลุ่ม Organophosphorus ชนิด chlopyrifos ; ความสัมพันธ์ของ detoxifying enzymes กับการเกิดรอยโรคของเนื้อเยื่อของปลาตะเพียนขาวสกุล *Puntius gonionotus*

Effect of chlorpyrifos on *Puntius gonionotus* ; Relationship of detoxifying enzymes change and Histopathological cause

สิริพร เหลืองสุชนกุล ผกาสินี คล้ายมาลา มลิสา เวชยานนท์

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาผลกระทบของสารพิษกลุ่ม organophosphorus ชนิด chlorpyrifos ในสัตว์น้ำ โดยดำเนินการทดลองในปลาตะเพียนขาวสกุล *Puntius gonionotus* ในสภาวะจำลอง ทดสอบโดยให้สารพิษ chlorpyrifos ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ กลาง และสูง (0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลองพบว่าสารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยที่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ระดับต่ำ (0. 05 มิลลิกรัมต่อลิตร) การทำงานของเอนไซม์ Ethoxyresorufin – *O* – Deethylase จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase จะถูกยับยั้งอย่างชัดเจน แต่การทำงานของเอนไซม์ Glutathione – *S* – transferase จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ระดับสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เท่านั้น ส่วนการเกิดรอยโรค (histopathological causes) ในเนื้อเยื่อปลาตะเพียนขาวสามารถพบได้ในทุกระดับความเข้มข้นของ cholrpyrifos โดยในเหงือกปลาพบว่ามีการรวมตัวเซคันดารีลาเมลลา เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์เอพิทีเลียน ในตับพบการเปลี่ยนแปลงคือการเกิดช่องว่างหรือแวคิลโอลในไซโตพลาสซึมของเซลล์และการหดตัวของโครมาตินในนิวเคลียส ในไตพบการเปลี่ยนแปลงคือการหดตัวของโกลเมอรูลัส และการตายของเซลล์บุท่อดิสตอลและพรอกซิมอล ทั้งนี้ความผิดปกติรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงจะพบในปลาตะเพียนขาวที่ได้รับสารในระดับความเข้มข้นสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร)

รหัสโครงการ 03-06-54-05-04-04-01-54

คำนำ

ปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ถูกต้อง หรือใช้ในปริมาณมากเกินกำหนด มากกว่าหนึ่งชนิด หรือใช้เป็นระยะเวลายาวนานเกินไปนั้น ผลจากปัญหาที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม เช่น สัตว์น้ำ ซึ่งการตรวจหาผลกระทบของสารพิษในสัตว์น้ำที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันนอกจากการตรวจหาปริมาณการสะสมของสารพิษตกค้างแล้วยังมักใช้เทคนิคการตรวจวัดเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกระบวนการเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษ (Biotransformation ซึ่งมีความจำเพาะต่อชนิดต่อสารพิษที่สิ่งมีชีวิตได้รับ ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม Cytochrome – P450 (CYP1A) Glutathione – *S* – transferase (GST) และ Acetylcholinesterase (AChE) (Deniele Werck – Reichhart. 2001; Milan, 2001; Ron van der Oost, 2003) และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ได้แก่ การเกิดรอยโรคในในเนื้อเยื่อ (Histopathology)

chlorpyrifos จัดเป็นสารกำจัดแมลงอยู่ในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน chlorpyrifos มีความสามารถในการกำจัดแมลงช่วงกว้าง มีความเป็นพิษสูง และตกค้างยาวนาน องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ chlorpyrifos อยู่ในประเภทความเป็นพิษลำดับที่ II (อันตรายปานกลาง) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบของ chlorpyrifos ต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ได้แก่ ปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus* เพื่อหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์กลุ่ม detoxifying enzyme ต่อการเกิดรอยโรคในเนื้อเยื่อของปลาตะเพียนขาวเมื่อได้รับสารพิษ chlorpyrfos ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ ปริมาณต่ำ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลาง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร)

วิธีดำเนินการ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์กลุ่ม Detoxifying enzymes ได้แก่ di – Potassium hydrogen phosphate, Potassium dihydrogen phosphate, Ethoxy resorufin, ß – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced NADPH), 1 – chloro – 2, 4 – dinitrobenzene (CDNB), Glutathione reduced (GSH), Acetylthiocholine iodide, 5,5 – Dithiobis – 2 – nitrobenzoic acid (DTNB), Bio – Quan solution, BSA standard protien, Primary Secondary Amine (PSA) และ Glycerol

1.2 สารเคมีสำหรับศึกษาการเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อ ได้แก่ Ethanol, Xylene, lithium carbonate, Eosin, Hematoxylin, parafin, permount, และ gelatin

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องแก้ว

2.1 Gas chromatograph accessories ได้แก่ column, liner, o-ring, septum, injection syringe

2.2 spectrophometer และ spectrofluorometer accessories ได้แก่ cuvette, 96 – well plate

2.3 Micropipette และ pipette tips

2.4 ลูกปลาตะเพียนขาว สกุล *Puntius gonionotus*

2.5 ตู้เลี้ยงปลาและชุดอุปกรณ์เลี้ยงปลา

2.6 หลอดปั่นตกตะกอน ขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

2.7 เครื่องแก้ว ได้ บีกเกอร์ กระบอกตวง กรวยกรอง หลอดทดลอง และขวดทดลอง

2.8 ชุดอุปกรณ์ย้อมสีเนื้อเยื่อ แผ่นสไลด์แก้ว และกระจกปิดสไลด์

3. เครื่องมือ

3.1 Spectrophometer

3.2 Spectrofluorometer

3.3 Ultracentrifuge

3.4 เครื่องตัดเนื้อเยื่อ Microtome

3.5 กล้องจุลทรรศน์ Microscope

3.6 Slide warmer

3.7 Wax dispenser

3.8 pH meter

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเปลี่ยนแปลงของ specific enzymes และการเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อปลาตะเพียนขาว

โดยทดสอบให้ chlorpyrifos ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ สูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลาง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่ำ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยใช้ปลาจำนวน 10 ตัว เป็นระยะเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำปลาตะเพียนมาผ่าเอาสมองและตับมาล้างด้วยสารละลาย physiological saline pH 7.4 เพื่อล้างเลือดและสิ่งสกปรกอื่นๆ จากนั้นชั่งตัวอย่างก่อนสกัด 0.5 กรัม นำชิ้นตัวอย่างที่ชั่งแล้วมาบดในสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ หลังบดนำไปปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายดังกล่าวออกเป็น 2 ส่วน โดยตัวอย่างตับให้แบ่งออกเป็นสองส่วนได้แก่

- ส่วนที่ 1 centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใส่ด้านบน นำไปตรวจวัดเอนไซม์ GST อ้างอิงวิธีการของ Habig *et al.* (1974)

- ส่วนที่ 2 centrifuge ด้วยความเร็ว 43,000 g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใส่ไปด้านบนไป centrifuge ต่อด้วยความเร็ว 100,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายใส่ด้านบนทิ้งไป เติมสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และนำไปตรวจวัดเอนไซม์ EROD อ้างอิงและปรับปรุงจากวิธีของ Pohl and Fouts (1980)

- ส่วนตัวอย่างสมองปลาให้นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ด้านบนตรวจเอนไซม์ วัด AChE อ้างอิงและปรับปรุงจากวิธีของ Ellman *et al.* (1961)

4.2 การสกัดสารพิษ chlorpyrifos ในเนื้อปลา ใช้วิธีการของ FEEI SUN (2000)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบด 10 กรัม ใส่ขวดปริมาตร 125 มิลลิลิตร เติม acetonitrile 50 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้เครื่อง homogenizer 1 นาที กรองผ่านกระดาษกรองด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum pump) ใส่ใน Erlenmeyer flask ล้างขวดใส่ตัวอย่างด้วย acetonitrile 100 มิลลิลิตร ตวงแบ่งสารสกัด 50 มิลลิลิตร ใส่ใน round bottom flask นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง เติม acetonitrile 15 มิลลิลิตร นำไปขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) โดยใช้ Solid Phase

Extraction; SPE ชนิด C18 ต่อกับ SPE ชนิด florisil ที่บรรจุเพิ่มด้วย anh. sodium sulfate 2 กรัม เป็นคอลัมม์สำหรับขจัดสิ่งปนเปื้อน ล้างคอลัมม์ด้วย acetonitrile 6 มิลลิลิตร โหลดตัวอย่างใส่คอลัมม์และปรับอัตราการไหล 3 หยดต่อวินาที ใส่ใน graduated tube ลดปริมาตรสารสกัดด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตร ด้วย ethyl acetate (PR) ให้ได้ 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส โดยใช้เครื่อง GC ชนิด FPD

4.3 การเตรียมเนื้อเยื่อปลาด้วยวิธีการทางไมโครเทคนิคเพื่อศึกษารอยโรค มีขั้นตอนดังนี้

4.3.1 ตัดชิ้นเนื้อเยื่อตับ เงือก และไตปลาตะเพียนขาว หนาขนาด 5 มิลลิเมตร

4.3.2 แช่ใน neutral buffer formalin

4.3.3 แช่ในน้ำยา Bouin's fluid 48 ชั่วโมง

4.3.4 กำจัดน้ำในเนื้อเยื่อออกด้วย ethanol (50, 70, 95, และ 100%) และ xylene

4.3.5 ทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย lithium carbonate solution

4.3.6 ฝังชิ้นเนื่อเยื่อในบล๊อก paraplast

4.3.7 นำบล๊อกเนื้อเยื่อไปตัดหนา 5 ไมครอน ด้วยเครื่อง microtome

4.3.8 นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัด ติดบนสไลด์ และนำไปย้อมสี Harris' Haematoxylin และ Eosin

4.3.9 ปิดสไลด์และนำไปตรวจดูความผิดปกติของเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE), Ethoxyresorufin – *O* – Deethylase(EROD) และ Glutathione – *S* – transferase(GST)

จากการทดลองให้สารพิษ chlorpyrifos ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) กลาง (0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสูง (5 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลองที่ประกอบด้วยน้ำ ตะกอน ปลาตะเพียนขาว (ตารางที่ 1) พบว่าการสะสมของสารพิษ chlopyrifos ในปลาเพิ่มขึ้น แปรผันตามระดับความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos เช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ EROD และ GST จะเพิ่มขึ้น และ AChE จะถูกยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบความชัดเจนของการเปลี่ยนแปลงพบว่าเอนไซม์ EROD จะมีการเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างชัดเจนที่สุด ซึ่งในภาวะที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ แต่สามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ อาจบ่งบอกได้ถึงความจำเพาะ (specific) ของเอนไซม์ต่อสารพิษ

ตารางที่ 1. ผลของ chlorpyrifos ที่มีต่อปลาตะเพียนขาว หลังจากให้ chlorpyrifos เป็นเวลา 3 วัน ในสภาวะระบบนิเวศน์จำลอง (จำนวนปลา 10 ตัว)

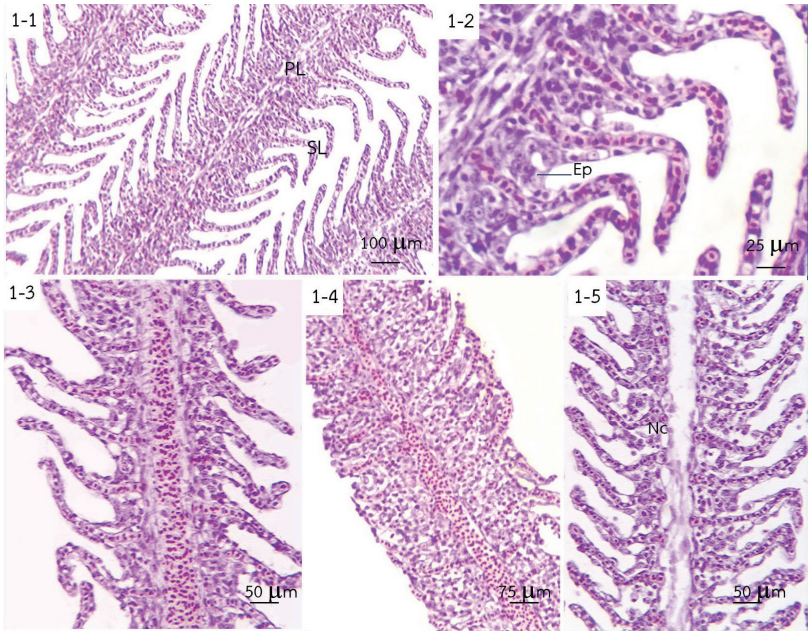
	0 มก./ลิตร (ชุดควบคุม)	**0.05 มก./ลิตร (ระดับต่ำ)**	**0.5 มก./ลิตร (ระดับกลาง)**	**5 มก./ลิตร (ระดับสูง)**
chlorpyrifos ในปลาตะเพียนขาว (มก./กก.)	ไม่พบ*	0.377 ± 0.03	0.939 ± 0.044	1.398 ± 0.097
AChE** (มิลลิโมล/นาที/มก.โปรตีน)	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.13 ± 0.01
GST*** (มิลลิโมล/นาที/มก.โปรตีน)	1.66 ± 0.20	2.18 ± 0.14	2.91 ± 0.33	4.36 ± 0.45
EROD**** (นาโนโมล/นาที/มก.โปรตีน)	0.81 ± 0.011	4.399 ± 0.086	8.585 ± 0.072	14.101 ± 0.12

* ค่าที่วัดได้ต่ำกว่า 0.01 มก./ลิตร

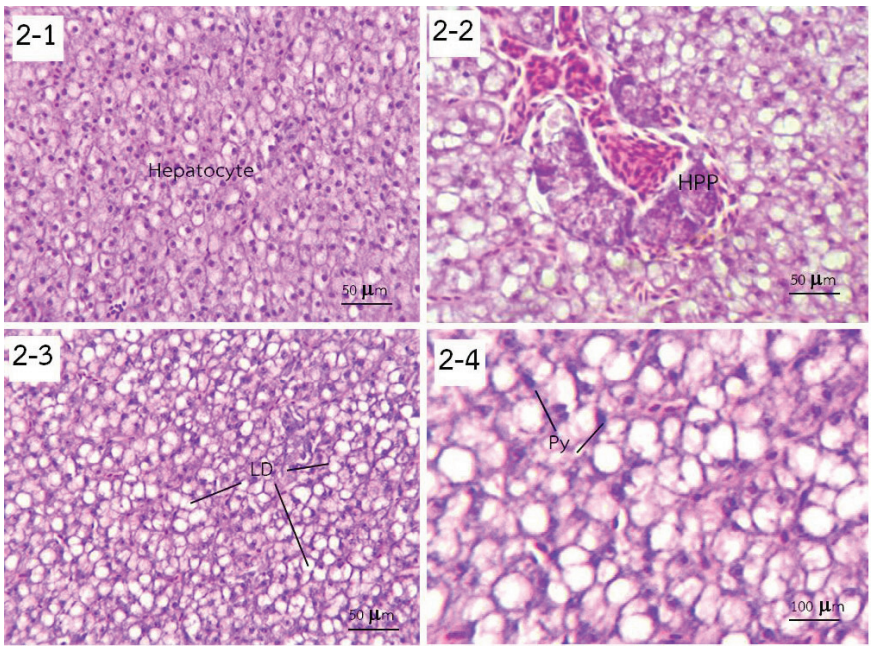
** AChE ; Acetylcholinesterase enzyme actvity

*** GST ; Glutathione-*S*-Transferase enzyme activity

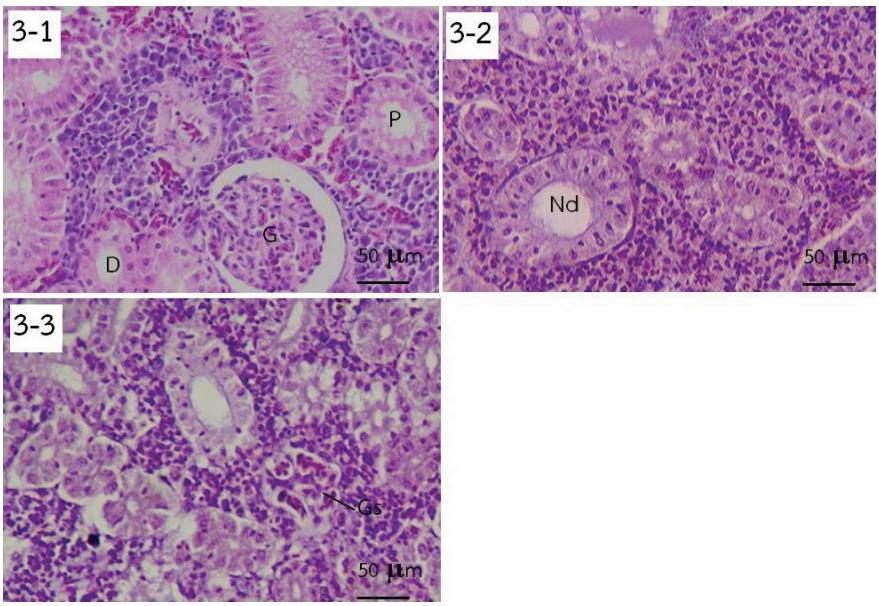
**** EROD ; Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase enzyme activity



ภาพที่ 1. แสดงเนื้อเยื่อเหงือกปลาตะเพียนขาว ชุดควบคุม (1 - 1 และ 1 - 2) ชุดทดลองที่ให้ chlorpyrifos 0.05, 0.5, และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (1 - 3, 1 - 4, และ 1 - 5)(PL : Primary lamellae ; SL : Secondary lamellae ; Ep : epithelial cell)



ภาพที่ 2. แสดงเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (2 – 1และ 2 – 2) และชุดทดลองที่ให้ chlorpyrifos 0.05, 0.5, และ 5 มิลลิกรัมลิตร (2 – 3 และ 2 – 4) Hepatocyte (เซลตับ) ; HPP : Hepatopancrease ; LD : vacuolation ; Py : Pyknotic nucleus)



ภาพที่ 3. แสดงเนื้อเยื่อไตปลาตะเพียนขาว ชุดควบคุม (3 – 1) และชุดทดลองที่ให้ chlorpyrifos 0.05, 0.5, และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (3 – 2 และ 3 – 3)(D : distal tubule ; G : glomerulus ; P: proximal tubule ; Nd : tubule)

2. ผลของสารพิษ chlorpyrifos ต่อการเกิดรอยโรค (histopathological change) ในเนื้อเยื่อปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus*

การเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อเหงือกของปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อเหงือกปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (ภาพที่ 1 – 1 และ 1 – 2) กับชุดทดลองที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชั้นเซลล์ epithelial ของชั้นเหงือกทุติยภูมิ (secondary lamellae; SL) เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1 – 3) จนเชื่อมติดกันระหว่างชั้นเหงือกทุติยภูมิ (secondary lamellae; SL) (ภาพที่ 1 – 4) และเกิดการตายของเซลล์ของ epithelial (necrotic epithelial cell) (ภาพที่ 1 – 5) ซึ่งพบในเหงือกปลาตะเพียนที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อตับของปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (ภาพที่ 2 – 1 และ 1 – 2) กับชุดทดลองที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชั้นเซลล์ตับ (hepatocyte) มีขนาดของแวคิโอลใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 2 – 3) ในตับปลาตะเพียนที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่านิวเคลียสของเซลล์ตับหดตัวลง (pyknotic nucleus) (ภาพที่ 2 – 4) และพบการตายของเซลล์ตับ (necrotic hepatocytes) มากขึ้น

การเกิดรอยโรคบนเนื้อเยื่อไตของปลาตะเพียนขาว *P. gonionotus* โดยเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อไตปลาตะเพียนขาวชุดควบคุม (ภาพที่ 3 – 1) กับชุดทดลองที่ได้รับสารพิษ chlorpyrifos 0.05, 0.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าท่อ proximal และ distal ความกว้างมากขึ้น (dilation) และเซลล์บุท่อบวมขึ้น (hydropic swelling) และหลุดออกจากฐาน (ภาพที่ 3 – 2) และพบการหดตัวลงโกเมอรูลัส (Glomerulus shrinkage) และการตายของเซลล์ hemopoitic cell (ภาพที่ 3 – 3)

สรุปผลการทดลอง

1. สารพิษ chlorpyrifos มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด โดยเพิ่มการทำงานของ Ethoxyresorufin – *O* – Deethylase และยับยั้งการทำงานของ Acetylcholinesterse อย่างเด่นชัดได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของสารพิษ chlorpyrifos ต่ำๆ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่การกระตุ้นทำงานของ Glutathione – *S* – transferase จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นของสารพิษ Chlorpyrifos สูงๆ เท่านั้น

2. สารพิษ chlorpyrifos ทำให้เกิดรอยโรคในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ของปลาตะเพียนขาว โดยการเกิดรอยโรคจะปรากฏให้เห็นที่ความเข้มข้นสารพิษ chlorpyrifos ตั้งแต่ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จนถึงระดับรุนแรงมาก (พบการตายของเซลล์เนื้อเยื่อ) ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ผลกระทบของสารพิษ chlorpyrifos โดยตรวจหาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ (Ethoxyresorufin – *O* – Deethylase, Acetylcholinesterase, Glutathione – *S* – transferase) สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ความเข้มข้นของสารพิษต่ำ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่ผลกระทบต่อปลาตะเพียนขาวจากการตรวจหารอยโรคที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อเหงือก ตับ และไต ปรากฏให้เห็นตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำ (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังนั้นการวัดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม P450 ; EROD จึงเหมาะสมที่สุดสำหรับการวัดผลกระทบต่อปลาตะเพียนขาว

การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาตัวชี้วัดด้านพิษวิทยา (Biomarker) เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องมือใช้ในการตรวจติดตามผลกระทบจากวัตถุมีพิษทางการเกษตรที่มีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

ASTM Standard on Biological Effects and Environmental Fate, 2008. (reapproved edition)

Back C.A. 1965. “Method of soil analysis: part I physical and mineralogical properties”. **American Society of Agronomy**, Madison, Wisconsin, USA.

Deniele Werck - Reichhart, Alain Hehn and Luc Didierjean. 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance; a review.**Trend in plant science.5(3)** ;116 - 123

Ellman, G.L., Courtney,K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **J. Biochemistry and Pharmacology. 7** :88 - 95

Feel Sun, Feng - Yi Lin, Sue-Sun Wong and Gwo - Chen Li. 2000. Determination of Organochlorine and Nitrogen-Containing Pesticide Residues in Fish with Different Fat Content. **food and drug analysis.8(2)** :103-111

Holfman D.J. and the others. 1995. Handbook of Ecotoxicology. CRC Press Inc.

Milan Jokanovic. 2001. Biotransformation of Organophosphorus compounds. **Toxicology. 166** :139 - 160

Muhammad Zafar, Yasmin Mussaddeq, Shamin Akhter and Aneesa Sutan. 2003. Weight - length and Condition Factor Relationship of thaila, Catla catla from Rawal Dam Islamabad, Pakistan. Pakistan **Biological Sciences. 6(17)** :1532-1534

Ron Van Der Oost, Jonny Beyer and Nico P.E. Vermeulen. 2003. Fish bioaccumulation and Biomarkers in environmental risk assessment: a review. Envi. **Toxico.&Pharmaco. 13** :57 - 149

Takashima F. and Hibiya T. 1995. **An atlas of fish histology**: Normal and pathological Features. 195 pp.

ผลงานบริการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

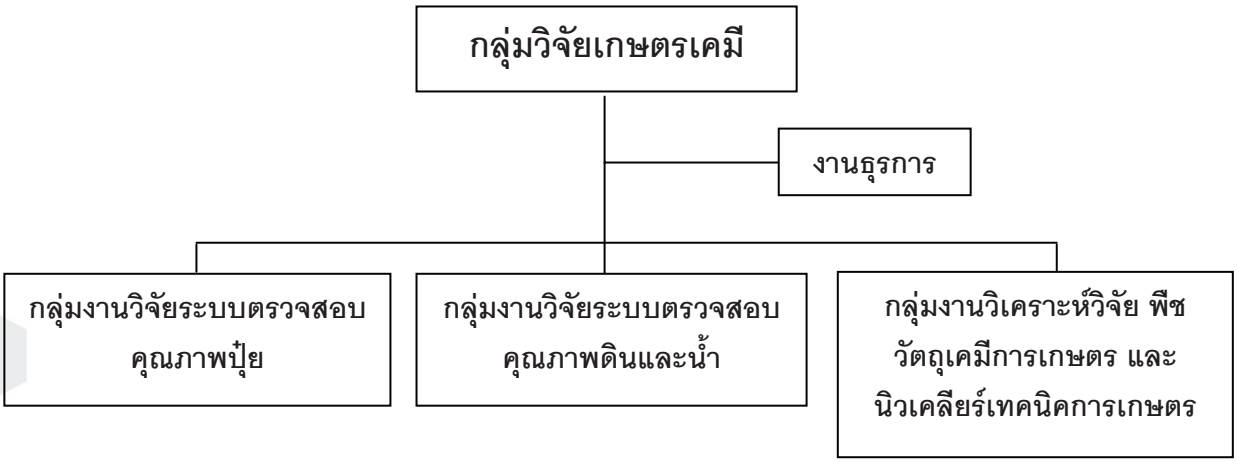
กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

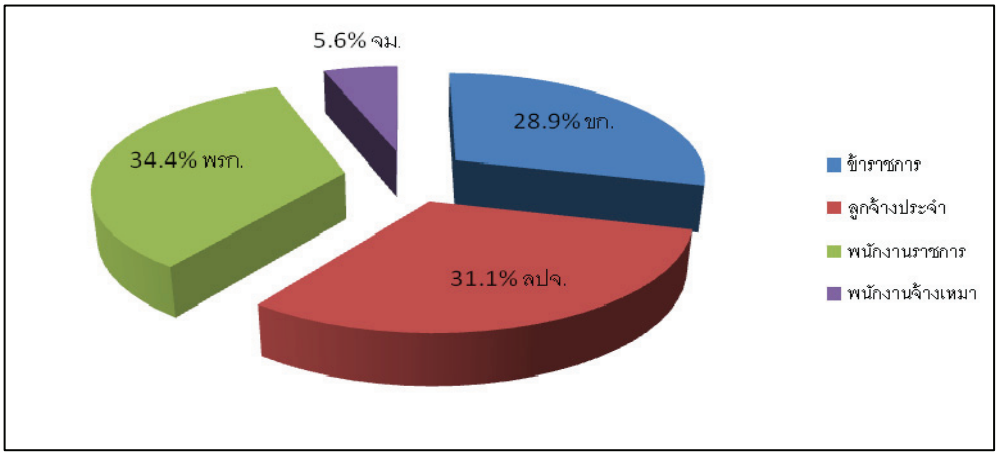
ภารกิจกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

ศึกษา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนาวิชาการเกษตรที่เกี่ยวกับ ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช วัตถุเคมีการเกษตร และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ให้บริการวิเคราะห์ ตรวจสอบ ให้คำแนะนำ และรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับ ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช วัตถุเคมีการเกษตร และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งให้คำปรึกษาประสานงานและร่วมดำเนินงานวิจัยกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และปฏิบัติงานอื่นที่ได้รับมอบหมาย

โครงสร้างหน่วยงาน



อัตรากำลัง



ภาพที่ 1. อัตรากำลังของกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี รวม 90 คน

1. **กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย** มีหน้าที่

ศึกษา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย เกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ ปริมาณธาตุอาหารและคุณภาพอื่นๆ ของปุ๋ย ให้บริการวิเคราะห์ ตรวจสอบ และรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับปุ๋ย รวมทั้งให้คำปรึกษาประสานงานและร่วมดำเนินงานวิจัยกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ภารกิจด้านวิเคราะห์บริการ

1.1 **งานบริการตามพระราชบัญญัติปุ๋ย** เป็นการวิเคราะห์เพื่อควบคุมตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550

กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย เป็นห้องปฏิบัติการที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ห้องปฏิบัติการทดสอบด้านปุ๋ยเคมี ในขอบข่ายแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสเฟตทั้งหมด และโพแทชที่ละลายน้ำได้ ทำหน้าที่ วิเคราะห์ ตรวจสอบ เพื่อควบคุมคุณภาพปุ๋ยที่ผลิต จำหน่าย และนำเข้าจากต่างประเทศ ในปี พ.ศ. 2555 มีการนำเข้าปริมาณมากกว่า 6 ล้านตัน มูลค่า กว่า 7 หมื่นล้านบาท วัตถุประสงค์ของการให้บริการวิเคราะห์เพื่อ

1) การขึ้นทะเบียน ก่อนการนำเข้าหรือการผลิต ผู้ประกอบการจะต้องนำตัวอย่างปุ๋ยส่งวิเคราะห์ แล้วนำใบรายงานผลวิเคราะห์ประกอบการขึ้นทะเบียน ที่สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร เมื่อได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนแล้วจึงจะผลิตหรือนำเข้าปุ๋ยนั้นได้

2) เป็นข้อมูลในการขออนุญาตการนำเข้าปุ๋ยและกำหนดพิกัดอัตราภาษีอากร

3) เป็นหลักฐานในการดำเนินคดีแก่ผู้ที่กระทำความผิด

ตารางที่ 1. ผลการดำเนินงานของกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย ในปี พ.ศ. 2555

วิเคราะห์บริการด้าน	ตัวอย่างที่ได้รับ		ผลวิเคราะห์		ค่าธรรมเนียม
	ตัวอย่าง	รายการ	ตัวอย่าง	รายการ	บาท
ปุ๋ย	8,689	64,100	9,317	68,843	5,280,600

1.2 **การปฏิบัติงานตามประกาศกรมวิชาการเกษตรซึ่ง กรมฯ ได้อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติปุ๋ยฯ**

ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติปุ๋ย(ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ได้มีผลบังคับใช้และมีบทบัญญัติ เรื่อง การกำหนดห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยที่อธิบดีกำหนดโดยความเห็นชอบของคณะกรรมการปุ๋ย กลุ่มงานฯ ได้ดำเนินการดังนี้

1) ยกร่างคำสั่งแต่งตั้งคณะทำงานตรวจประเมินห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย

2) จัดทำแนวทาง วิธีการตรวจประเมินตามประกาศกรมวิชาการเกษตรเรื่อง การกำหนดห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย ตามมาตรา 36(11) และมาตรา 36/2(10) แห่งพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

3) ทดลองปฏิบัติงานตามแนวทาง วิธีการตรวจประเมินที่กำหนดพร้อมแก้ไขปัญหาอุปสรรคในการดำเนินงาน

4) เปิดรับสมัครห้องปฏิบัติการที่ประสงค์จะขอการรับรองเป็นห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย

1.3 การพัฒนาและสร้างมาตรฐานการวิเคราะห์ปุ๋ยของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยกรมวิชาการเกษตร เพื่อพัฒนาห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย สำนักงานวิจัยและพัฒนาเขตที่ 1 – 8 (สวพ. เขตที่ 1 - 8) ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยที่พนักงานเจ้าหน้าที่ฯ ในพื้นที่สุ่มเก็บได้ เตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย สวพ. 1 – 8 เพื่อขอการรับรองระบบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 จัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยกรมวิชาการเกษตร และตรวจติดตามให้ทุกห้องปฏิบัติการมีมาตรฐานการวิเคราะห์ปุ๋ยเป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยกรมฯ มอบหมายให้ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร (สปผ.) เป็นแกนในการดำเนินการ ให้ความรู้การตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยทั้งระบบ ตั้งแต่การรับตัวอย่าง เตรียมตัวอย่าง การวิเคราะห์ การจัดเก็บ การควบคุมดูแลตัวอย่างและข้อมูล รวมทั้ง สวพ. เขตที่ 1 – 8 ให้พนักงานเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องมาศึกษาดูงานและฝึกงานที่กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สปผ.

ในปี พ.ศ. 2555 สวพ. เขตที่ 1, 3 และ 4 ได้รับการรับรอง และ สวพ. เขตที่ 7, 8 ยื่นขอการรับรอง ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เมื่อเดือนกันยายน 2555 โดยมี นักวิชาการกลุ่มงานฯ ร่วมเป็นทีมตรวจติดตามคุณภาพภายใน

นอกจากนั้น กลุ่มงานฯ ได้จัดทำตัวอย่างทดสอบที่ไม่แจ้งค่า (Blind sample) ตามโครงการจัดทำมาตรฐานห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย ส่งให้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยของส่วนกลาง และ สวพ. เขตที่ 1 – 8 ทุก 2 เดือน แล้วนำผลการวิเคราะห์มาประเมินตามเกณฑ์กำหนด พร้อมแจ้งผลให้ห้องปฏิบัติการทั้ง 9 ทราบเพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 2. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1, 3, 4 รับมอบหนังสือรับรอง

1.4 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายใน (Internal Reference Material, IRM)

การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายใน โดยการนำตัวอย่างปุ๋ยมาทำการคลุกเคล้าจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน และประเมินผลทางสถิติ รวมถึงทดสอบความเสถียรของตัวอย่างปุ๋ย และกำหนดค่าอ้างอิง ตามแนวทาง ISO Guide 34 – 35

กลุ่มงานฯ ได้จัดทำตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงภายในที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความเสถียร จำนวน 8 สูตร (1,476 ตัวอย่าง) ได้แก่ ตัวอย่างปุ๋ยเชิงผสมชนิดปั้นเม็ด จำนวน 3 สูตร คือ 8 – 24 – 24, 13 – 13 – 21 และ 15 – 7 – 18 ชนิดคลุกเคล้า จำนวน 3 สูตร คือ 16 – 16 – 8, 16 – 8 – 8 และ 18 – 46 – 0 และชนิดเกล็ด จำนวน 2 สูตร คือ 19 – 19 – 19 และ 10 – 52 – 17 ตัวอย่างละ 5,000 กรัม เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยในส่วนกลางและส่วนภูมิภาค เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงรับรองที่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศในราคา 20,000 บาท/100 กรัม สามารถลดการนำเข้าตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงไปแล้ว คิดเป็นเงิน 8 ล้านบาท

ปี พ.ศ. 2555 แจกจ่ายตัวอย่างอ้างอิงภายในเพื่อใช้สำหรับควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ปุ๋ยของส่วนกลาง และ สวพ. เขตที่ 1 – 8 จำนวน 120 ตัวอย่าง น้ำหนัก 4,800 กรัม สามารถประหยัดงบประมาณการจัดซื้อตัวอย่างอ้างอิงได้ 960,000 บาท

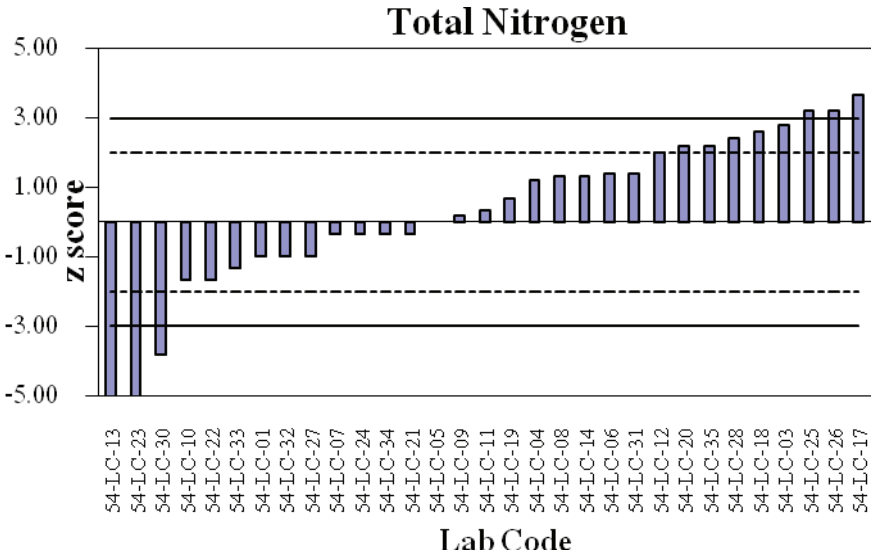
และแจกจ่ายตัวอย่างอ้างอิงภายในเพื่อใช้สำหรับควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ปุ๋ยของภาคเอกชน จำนวน 52 ตัวอย่าง น้ำหนัก 2,080 กรัม คิดเป็นเงิน 416,000 บาท

ภาพที่ 3. ตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงภายใน

1.5 การจัดทำโครงการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย

กิจกรรมทดสอบความชำนาญ หรือเปรียบเทียบผล ระหว่างห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย ปัจจุบันยังไม่มีหน่วยงานใดรับผิดชอบดำเนินการ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย จึงได้เริ่มศึกษา จัดทำ วิธีการและขั้นตอนต้นแบบในการจัดกิจกรรมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย และจัดกิจกรรมทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยในประเทศไทยขึ้นในปี พ.ศ. 2550 ตามแนวทางของ ISO/IEC 17043 โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อเป็นกิจกรรมนำร่องในการสร้างเครือข่ายห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยทั้งภาคราชการ และเอกชน และนำผลการประเมินไปเป็นข้อมูลในการขอรับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และได้ดำเนินการมาทั้งสิ้นจำนวน 5 ครั้ง

สำหรับปี พ.ศ. 2555 มีห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยเข้าร่วมกิจกรรมเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ จำนวน 46 ราย แบ่งเป็นหน่วยงานราชการ 16 ราย เอกชน 30 ราย



ภาพที่ 4. การประเมินกิจกรรมเปรียบเทียบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการโดยใช้ Z – score

2. **กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ** มีหน้าที่

ศึกษา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนาระบบตรวจสอบ คุณภาพดินและน้ำ เกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์ และคุณภาพอื่นๆ ของดินและน้ำ ให้บริการวิเคราะห์ ตรวจสอบ และรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับ ดินและน้ำ รวมทั้งให้คำปรึกษาประสานงานและร่วมดำเนินงานวิจัยกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ภารกิจด้านวิเคราะห์บริการ

2.1 **ด้านการวิเคราะห์ดิน** กลุ่มงานฯ ให้บริการวิเคราะห์ดิน ให้คำแนะนำและประเมินความอุดมสมบูรณ์ของดินว่าเหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืชหรือไม่ ควรปรับปรุงบำรุงดินอย่างไร สามารถใช้ปุ๋ยและวัสดุปรับปรุงดินที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้สามารถเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตพืช

2.2 **ด้านการวิเคราะห์น้ำ** กลุ่มงานฯ ให้บริการวิเคราะห์น้ำด้านการเกษตรเพื่อให้ผู้ใช้บริการสามารถนำผลที่ได้ไปใช้พิจารณาเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำให้เหมาะสมกับพืชที่ปลูก หรือเลือกปลูกพืชให้เหมาะกับคุณภาพน้ำที่มีอยู่ และสามารถวางแผนการปลูกพืชให้เหมาะสมกับคุณภาพน้ำ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการแนะนำเกษตรกรเพื่อการปรับปรุงคุณภาพน้ำ การเฝ้าระวังและ เตือนภัยสถานการณ์คุณภาพน้ำ

ตารางที่ 2. ผลการดำเนินงานของกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ ในปี พ.ศ. 2555

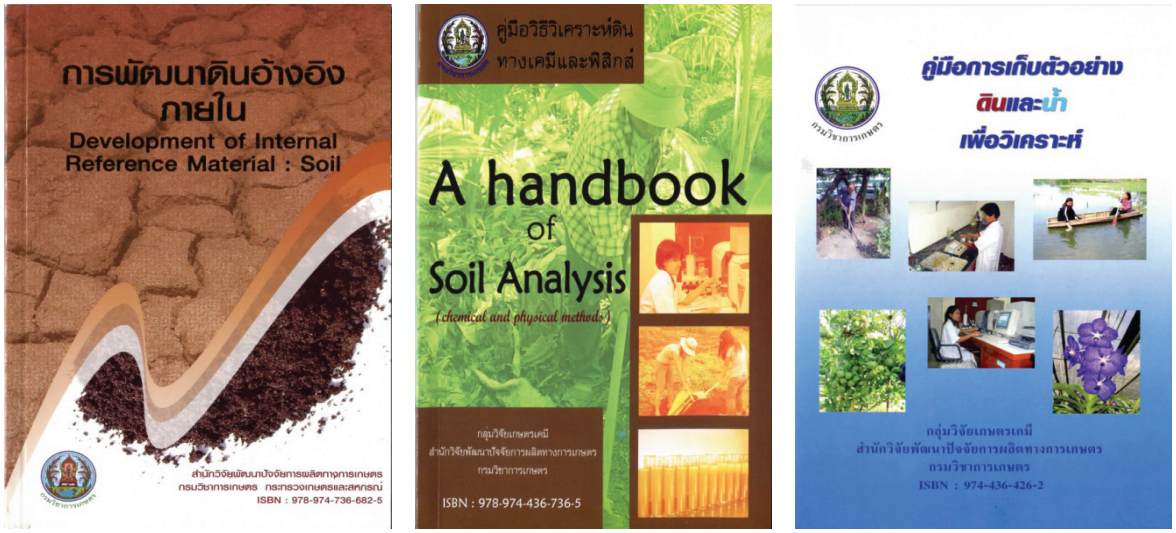
วิเคราะห์บริการด้าน	ตัวอย่างที่ได้รับ		ผลวิเคราะห์		ให้คำแนะนำ	ค่าธรรมเนียม
	ตัวอย่าง	รายการ	ตัวอย่าง	รายการ	ราย	บาท
ดิน	1,144	3,485	1,241	4,481	37	110,875
น้ำ	410	6,353	438	6,937	50	
รวม	**1,554**	**9,838**	**1,679**	**11,418**	**87**	

2.3 **การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายใน** โดยการนำตัวอย่างดินในสภาพธรรมชาติประมาณ 80 – 100 กิโลกรัม ซึ่งปราศจากสิ่งปนเปื้อนเช่น ปุ๋ย ปูน ยา หรือสิ่งที่จะทำให้สมบัติของดินผิดจากสภาพเดิมตามธรรมชาติทำการคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบความเสถียร และหาค่ากำหนด (Assign value) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เตรียมข้างต้นควบคู่กับวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน

กลุ่มงานฯ ได้จัดทำตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน และมีความเสถียร จำนวน 2 ชุด คือ ชุดดินลพบุรี และชุดดินสตึก เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์รวมทั้งแจกจ่ายให้หน่วยราชการอื่น เช่น ห้องปฏิบัติการศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย ภาคที่ 1 – 4 สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดิน สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตร รวมจำนวนตัวอย่างดินอ้างอิงภายในประมาณ 5,000 กรัม ช่วยให้ประหยัดงบประมาณ คิดเป็นเงิน 175,000 บาท

ภาพที่ 5. ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน

2.4 **เผยแพร่เอกสารวิชาการ** เช่น คู่มือการเก็บตัวอย่างดินและน้ำเพื่อวิเคราะห์ คู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์ และคู่มือการพัฒนาดินอ้างอิงภายใน รวมทั้งหมด 504 เล่ม



ภาพที่ 6. เอกสารวิชาการ

3. **กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร** มีหน้าที่

ศึกษา วิเคราะห์ วิจัยและพัฒนาด้านพืชและวัตถุเคมีการเกษตร เกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณธาตุอาหารในพืชและคุณภาพอื่นๆ ของพืชและวัตถุเคมีการเกษตร ศึกษาวิจัยและพัฒนานิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร ให้บริการวิเคราะห์ ตรวจสอบ และรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับ พืชและวัตถุเคมีการเกษตร รวมทั้งให้คำปรึกษาประสานงานและร่วมดำเนินงานวิจัยกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

ภารกิจด้านวิเคราะห์บริการ

3.1 **ด้านการวิเคราะห์วัตถุเคมีการเกษตร** ให้บริการวิเคราะห์ ตรวจสอบ เพื่อควบคุมคุณภาพวัตถุเคมีทางการเกษตรและสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ผลิต จำหน่าย และนำเข้าจากต่างประเทศ เป็นการควบคุมตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535

3.2 **ด้านการวิเคราะห์พืช** ให้บริการวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืชเพื่อ เป็นข้อมูลในการประเมินความสมบูรณ์หรือ ความต้องการธาตุอาหารของพืชเพื่อประกอบการให้ปุ๋ยอย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม ตามความต้องการของพืช ช่วยลดต้นทุนและเพิ่มผลผลิต ซึ่งประชากรของประเทศไทยส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม จากเหตุผลดังกล่าวจึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อเศรษฐกิจของประเทศ

ตารางที่ 3. ผลการดำเนินงานของกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร ในปี พ.ศ. 2555

วิเคราะห์บริการด้าน	ตัวอย่างที่ได้รับ		ผลวิเคราะห์		ค่าธรรมเนียม
	ตัวอย่าง	รายการ	ตัวอย่าง	รายการ	บาท
พืช	1,623	6,936	1,623	6,936	63,000
วัตถุเคมี	265	364	196	289	268,000
รวม	**1,888**	**7,300**	**1,819**	**7,225**	**331,000**

3.3 แก้ปัญหาการเกิดช่อดอกพลาสติกในมะม่วง ในปี พ.ศ. 2553 กลุ่มงานฯ ได้รับทราบปัญหาการเกิด “ช่อดอกพลาสติก” จาก อุปนายกสมาคมชาวสวนมะม่วงไทยในจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมีพื้นที่ปลูกมะม่วงประมาณ 100,000 ไร่ โดยที่มีพื้นที่ความเสียหาย ประมาณ 10,000 ไร่ ที่ อำเภอสามร้อยยอด อำเภอกุยบุรี และที่จังหวัด ฉะเชิงเทรา ทั้ง 2 จังหวัด เป็นแหล่งปลูกมะม่วงขนาดใหญ่ลำดับต้นๆ ของประเทศโดยที่มะม่วงจะติดดอกแต่จะไม่ติดผล หรือผลที่ได้เป็นกระเทย ซึ่งต่อมาผลจะร่วง หรือถ้าติดอยู่ก็จะด้อยคุณภาพ

กลุ่มงานฯ ได้ประสานความร่วมมือกับกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ ดำเนินการศึกษาในช่วงระหว่างปี 2553-2555 โดยเก็บตัวอย่างดิน และใบมะม่วงในสวนของเกษตรกรรายต่างๆ มาทำการวิเคราะห์เพื่อประเมินความอุดมสมบูรณ์ของดิน และใบ ตามหลักวิชาการ และได้ร่วมมือกับเกษตรกรในการจัดทำแปลงสาธิตในการจัดการธาตุอาหารและการบรรยายให้ทราบถึงปัญหาที่เกิดจากสมดุลของธาตุอาหารผิดปกติ แนวทางในการป้องกันตลอดจนแนวทางในการจัดการธาตุอาหารที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ เนื่องจากเดิมเกษตรกรคิดว่าสาเหตุมาจากโรค บางรายโค่นทิ้งแล้วปลูกใหม่ ซึ่งเมื่อระยะเวลาผ่านไป ก็พบปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นอีกเช่นเดิม

ในปีงบประมาณ 2555 ได้ออกเดินทางปฏิบัติราชการในแหล่งปลูกทั้ง 2 จังหวัด ประมาณ 10 ครั้ง ผลสัมฤทธิ์เบื้องต้นประเมินจากความพึงพอใจของเกษตรกรที่เห็นความแตกต่างเกิดขึ้นในเบื้องต้นอย่างชัดเจน เช่น แปลงของ นายภมร สถานที่ตั้งอยู่ อำเภอกุยบุรี ซึ่งเกิดอาการช่อดอกพลาสติกทั้งสวนโดยได้มีการสาธิตการจัดการธาตุอาหารเป็นระยะ เกษตรกรได้เห็นความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจน

ภาพที่ 7. ช่อดอกพลาสติกในมะม่วง

ภาพที่ 8. เกษตรกรและอุปนายกสมาคมชาวสวนมะม่วงไทยประชุมรับฟังการบรรยายจากนักวิชาการ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์โดยเทคนิค NIRS

The Study of Organic Matter analysis method in Organic Fertilizer by Near Infrared Spectroscopy

จิติมา ยถาภูธานนท์ สงกรานต์ มะลิสอน

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ที่ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ปลอดภัยจากสารเคมี และตัวอย่างไม่ถูกทำลาย โดยใช้เทคนิคคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ Near Infrared Spectroscopy (NIRS) ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งใช้หลักการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดซับแสงกับค่าที่วิเคราะห์ทางเคมีที่ได้จากห้องปฏิบัติการ ปุ๋ยอินทรีย์ จำนวน 199 ตัวอย่าง ถูกสแกนด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์คลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ โดยวัดสเปคตร้าในช่วงจำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4,000 – 12,500 cm^{-1} การวิเคราะห์ถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน Partial Least Square (PLS) regression ถูกนำมาใช้ในการคำนวณเพื่อสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration)

ผลการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย ที่ประยุกต์วิธีของ Walkley and Black พบว่าค่าการกระจายตัวของข้อมูล (Range, R) เท่ากับ 1.15 – 48.37 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 26.96 เปอร์เซ็นต์ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) เท่ากับ 11.35 เปอร์เซ็นต์

ผลการประเมินปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้เทคนิค NIRS พบว่าได้สมการที่ใช้ในการทำนายผลระดับปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ สมการที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.87 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในกลุ่ม calibration set (Standard error of calibration, SEC) เท่ากับ 5.57 เปอร์เซ็นต์ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในกลุ่ม validation set (Standard error of prediction, SEP) เท่ากับ 6.13 เปอร์เซ็นต์ สมการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) สูง และมีค่า SEC หรือ SEP ต่ำ ซึ่งต่ำกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการหรือ SD (11.35) แสดงว่าสมการนี้สามารถใช้ประเมินค่าอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า Regression coefficient สูงอยู่ที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร (Wavenumber) 7,020 และ 5,785 cm^{-1} ซึ่งสัมพันธ์กับอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์

ผลการวิจัยที่ได้นำเทคนิค NIR Spectroscopy มาใช้พบว่าสามารถใช้เทคนิค NIRS ประเมินหาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำนวนคลื่นแสงที่เหมาะสมในการประเมินอยู่ในช่วงตั้งแต่ 5,000 – 10,000 cm^{-1}

คำนำ

กรมวิชาการเกษตร มีบทบาทที่สำคัญในการกำกับดูแลผู้ผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้า นำเข้า ส่งออก ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 กำหนดให้ผู้รับใบอนุญาตผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้าต้องมีหลักฐานผลการวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ทุกครั้งที่ผลิตขึ้นก่อนออกจำหน่าย เพื่อเป็นการรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกรให้ได้ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพ สำหรับเกณฑ์การขึ้นทะเบียนปุ๋ยอินทรีย์นั้น สมบัติที่สำคัญประการหนึ่งคือ ปริมาณอินทรียวัตถุ กำหนดให้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 ของน้ำหนัก ผู้ผลิต จึงต้องส่งตัวอย่างปุ๋ยมาวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ ปัจจุบันวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ใช้วิธีมาตรฐาน ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี (คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์, 2551) ที่ประยุกต์ใช้วิธีของ Walkley and Black (1934) โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น กรดโครมิก ทราบผลใช้เวลาประมาณ 16 ชั่วโมง การวิเคราะห์ทางเคมีในการหาปริมาณอินทรียวัตถุนี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ต้องใช้สารเคมีที่มีอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญและมีทักษะทางด้านเคมี งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และลดการใช้สารเคมี โดยใช้เทคนิคคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ Near Infrared Spectroscopy ซึ่งเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เพื่อให้ได้ทางเลือกของวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ที่มีความรวดเร็ว ปลอดภัยจากสารเคมี โดยอยู่บนพื้นฐานของความถูกต้องแม่นยำ

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค NIR Spectroscopy มาใช้อย่างมีประสิทธิภาพในการประเมินหาปริมาณคาร์บอนและธาตุอาหาร ในปุ๋ยคอก (J.B. Reeves *et al.,* 2000; J.S.Van Kessel *et al.,* 1999) soluble solids ในแคนตาลูป (Dull *et al.,* 1989) ค่าองค์ประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์บก (Boever *et al.,* 1994) ปริมาณแป้ง ปริมาณโปรตีนความชื้นเมล็ดในธัญพืช เป็นต้น เทคนิค NIRS สามารถแสดงผลลายพิมพ์ทางเคมีของสารอินทรีย์ได้อย่างแม่นยำ ทำนายสัดส่วนของอินทรีย์คาร์บอนในดิน และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด การตรวจสอบกระบวนการย่อยสลายในดินและในเศษวัสดุอินทรีย์ นอกจากนั้นมีรายงานการใช้ NIRS ในการสอบเทียบ (Calibrate) องค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดในปุ๋ยหมัก ได้แก่คาร์บอนทั้งหมด อินทรีย์คาร์บอน อัตราส่วน C:N ซัลเฟอร์ โพแทซเซียม และ pH (Malley *et al.,* 2005)

เทคนิค NIRS ใช้หลักการหาความสัมพันธ์ การดูดซับแสงในช่วง Near Infrared ช่วงความยาวคลื่น (Wavelength) นาโนเมตร ตั้งแต่ 800 – 2,500 nm หรือ ช่วงคลื่นแสง (Wave number region) ต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4,000 – 12,500 cm^{-1} ของสารที่ต้องการประเมิน และค่าวิเคราะห์ทางเคมีของสารที่ต้องการประเมิน เพราะสารแต่ละชนิดเมื่อได้รับแสงจะมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงได้ไม่เท่ากัน เมื่อตัวอย่างดูดซับแสง NIR จะทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสั่นและดูดซับพลังงานที่แตกต่างกัน ทำให้ผลที่แสดงออกมาบอกถึงความแตกต่างได้ เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, 2555) จึงนำค่าการดูดซับแสงมาวิเคราะห์ผล สามารถประเมินลักษณะที่

ต้องการได้ ทั้งวิธีการนี้เป็นวิธีประเมินที่ใช้เวลาสั้นกว่าการวิเคราะห์ทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ NIR เป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็วทราบผลภายในเสี้ยววินาที ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดเวลา ลดต้นทุนในการใช้สารเคมี และรักษาสิ่งแวดล้อม

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร มีภารกิจหลัก คือ การให้บริการวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรให้มีความถูกต้อง แม่นยำ และฉับไวในระดับสากล จึงมีการพัฒนางานวิจัย และพัฒนานวัตกรรมเพื่อเปลี่ยนแปลงจากระบบการวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายและเป็นจำนวนมากๆ เพื่อให้ได้วิธีที่ทันสมัย เป็นที่ยอมรับและทันต่อการเปลี่ยนแปลงของโลก โดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และลดการใช้สารเคมี นับเป็นการประหยัดเวลา ลดต้นทุนในการใช้สารเคมีและรักษาสภาพแวดล้อมในระยะยาว ซึ่งจะตรงกับความต้องการของโลกในอนาคต ที่ต้องการรักษาสภาพสิ่งแวดล้อม เพราะการใช้สารเคมีน้อยลง

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้เทคนิค NIR เพื่อให้ได้ทางเลือกของวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ที่ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ปลอดภัยจากสารเคมี และตัวอย่างไม่ถูกทำลาย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและวัสดุวิทยาศาสตร์
    - 1.1 เครื่องบดตัวอย่างปุ๋ย
    - 1.2 เครื่องแบ่งตัวอย่างปุ๋ยขนาดเล็ก (Riffle)
    - 1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
    - 1.4 Burette, Erlenmeyer flask, Cylinder, Pipette, Beaker
    - 1.5 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่จำเป็นใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์
2. สารเคมี
    - 2.1 Ammonium ferrous sulfate ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$), AR grade
    - 2.2 O- phenanthroline indicator ($C_{18}H_8N_2.H_2O$), AR grade
    - 2.3 Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), AR grade
    - 2.4 Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
    - 2.5 Sulfuric acid 98% (H_2SO_4), AR grade
3. ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ชนิดแห้ง
4. เครื่อง NIR spectrophotometer
5. อุปกรณ์การอัดตัวอย่าง และอุปกรณ์พร้อมคลิปสำหรับวางหัววัด

วิธีการ ดำเนินการ 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์

เตรียมตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์, 2551) ที่มีปริมาณอินทรียวัตถุ ตั้งแต่ 1 – 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณอินทรียวัตถุ ต่ำ กลาง สูง ที่กระจายตัวและครอบคลุมค่าของตัวอย่างในอนาคต จำนวน 199 ตัวอย่าง โดยผึ่งตัวอย่างปุ๋ยให้แห้งในที่ร่ม เทตัวอย่างปุ๋ยใส่ถุงพลาสติก เขย่า และคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วเทตัวอย่างทั้งหมดใส่เครื่องแบ่งตัวอย่างปุ๋ยขนาดเล็ก (Riffle) ซึ่งแบ่งได้ 4 ส่วน ส่วนละเท่าๆ กัน นำตัวอย่าง 1 ส่วน ไปบดด้วยเครื่องบด ร่อนตัวอย่างที่บดแล้วผ่านตะแกรงขนาด 20 เมช เทตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกซิบ ไล่อากาศออกให้หมด ปิดถุงให้สนิท เพื่อป้องกันความชื้นจากภายนอก เขียนป้ายหมายเลขตัวอย่าง ทุกตัวอย่างมีการเตรียมให้มีสภาพใกล้เคียงกันให้มากที่สุด เป็นการลด Sample error ให้เหลือน้อยที่สุดตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาในห้องที่มีอุณหภูมิเดียวกับเครื่องตรวจวัดคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRs spectroscopy) ก่อนการตรวจวัดสเปคตรัม

2. วิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณอินทรียวัตถุด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ (ประยุกต์ใช้วิธีของ Walkley and Black, 1934)

2.1 การเตรียม Reagent

2.1.1 สารละลายมาตรฐาน Potassium dichromate (Oxidizing agent) ความเข้มข้น 1.0 N

ชั่ง Potassium dichromate ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จำนวน 49.0247 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร คนให้ละลายหมด เทและล้างใส่ Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

2.1.2 สารละลาย Ammonium ferrous sulfate (Reducing agent) ความเข้มข้น 0.5 N

ชั่ง Ammonium ferrous sulfate จำนวน 196.07 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 600 มิลลิลิตร คนให้ละลายหมด ถ่ายและล้างใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม 98 เปอร์เซ็นต์ H_2SO_4 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.1.3 สารละลาย O-phenanthroline ammonium ferrous sulfate indicator

ชั่ง O – phenanthroline จำนวน 0.74 กรัม และ Ammonium ferrous sulfate จำนวน 0.35 กรัม ใส่ Beaker ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด

2. 2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยจำนวน 0.1xxx กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2.2 ปิเปตสารละลาย Potassium dichromate ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างปุ๋ย

2.2.3 เติม 96 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริคปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงไปในตัวอย่างปุ๋ย อย่างช้าๆ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน 16 ชั่วโมง (ตั้งทิ้งค้างคืน)

2.2.4 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย O – phenanthroline ammonium ferrous sulfate 0.5 มิลลิลิตร

2.3 วิธีไตเตรท

นำสารละลายตัวอย่างมาไตเตรท ด้วยสารละลาย Ammonium ferrous sulfate จนได้สารละลายสีเขียว และเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลปนแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ บันทึกผล

- หมายเหตุ ทำ Blank โดยไม่ใส่ตัวอย่างปุ๋ย เตรียมและวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างปุ๋ย

2.4 การคำนวณหาปริมาณอินทรียวัตถุของปุ๋ยอินทรีย์

$$\% \text{ อินทรียคาร์บอน(OC)} = \frac{0.3896 \times N \times B\ (C-D)}{\text{น้ำหนักตัวอย่างปุ๋ย(กรัม)} \times C}$$

B = ปริมาตรของ $K_2Cr_2O_7$ ที่เติมลงไปในตัวอย่าง และ Blank (มิลลิลิตร)

C = ปริมาตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ Titrate พอดีกับ $K_2Cr_2O_7$ ใน Blank (มิลลิลิตร)

D = ปริมาตรของ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ที่ Titrate พอดีกับ $K_2Cr_2O_7$ ในตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นเป็น Normal ของสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$

% อินทรียวัตถุ (OM) = %OC x 1.7241 (Equivalent to soil)

3. วัดสเปคตรัมของปุ๋ยอินทรีย์ ด้วยเครื่อง NIR Spectrometer รุ่น Vector 33 ผลิตโดย บริษัท Brucker Optics ประเทศเยอรมันนี พร้อมด้วยหัววัด Fiber Optic Probes ปุ๋ยอินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัด NIR สเปคตรัม แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) สร้างและปรับปรุงสมการโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler (Camo, Oslo Norway) โดยตรวจวัดในช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4,000 – 12,500 cm^{-1} เพื่อเก็บสเปคตรัมโดย scan ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อให้ได้สเปคตรัมที่มีข้อมูลเกิดจากปุ๋ยอินทรีย์ที่วัดให้มากที่สุด และไม่มีข้อมูลการดูดซับแสงที่ไม่เกี่ยวข้องกับค่าที่ต้องการวัด จึงต้องทำการอัดตัวอย่างให้แน่นเท่าๆ กันด้วยอุปกรณ์สำหรับอัดตัวอย่าง และวัดที่ระดับความลึกเท่ากันทุกตัวอย่าง โดยใช้อุปกรณ์พร้อมคลิปสำหรับวางหัววัดให้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันขณะวัด พร้อมทำความสะอาดเมื่อเปลี่ยนตัวอย่าง เพื่อลด Operation error ให้เหลือน้อยที่สุด พร้อมกรอกค่าวิเคราะห์ทางเคมี ลงในสเปคตรัมของแต่ละตัวอย่าง

4. การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) เพื่อทำนายค่าทางเคมีที่ต้องการโดยสร้าง Calibration พร้อมกับเลือก Calibration ที่เหมาะสมไปใช้งานโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance กับปริมาณสาร โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร เพื่อหาสมการมาใช้ในการทำนายผล และตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation) ทำการ Validate โดยใช้กลุ่มตัวอย่าง นอกกลุ่ม Calibration

5. พัฒนาสมการที่จะนำไปประเมินค่าอินทรียวัตถุในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ โดยการปรับแต่งข้อมูลที่เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน Partial Least Square (PLS) regression แก้ไข Slope/Bias ของสมการทำนาย

6. ทำการหาประสิทธิภาพของ Calibration ที่สร้างขึ้น โดยการหาแหล่ง Error ของการวิเคราะห์ หาค่าผิดพลาดจากการวิเคราะห์

7. สรุปและเขียนรายงาน

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์และการตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมี

ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ จำนวน 199 ตัวอย่าง ที่ใช้ในงานทดลองนี้เป็นปุ๋ยอินทรีย์ที่เกษตรกร และผู้ผลิตปุ๋ยอินทรีย์ บริษัท ห้างร้าน และสหกรณ์ ส่งมาขอรับบริการตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ มีปริมาณอินทรียวัตถุ ตั้งแต่ 1 – 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นปุ๋ยอินทรีย์ปั้นเม็ด ปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ มูลโค มูลไก่ มูลสุกร มูลค้างคาว รำข้าว ฟางข้าว หญ้าชานอ้อย แกลบ กากน้ำตาล และกากตะกอนโรงงานน้ำตาล

การตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation วัดการกระจายของข้อมูลโดยหาค่าพิสัย (Range) ที่มีปริมาณอินทรียวัตถุระหว่างค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย (Average) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation : SD) ผลการวัดค่าการกระจายของข้อมูลแสดงในตารางที่ 1 พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation มีค่าพิสัย 1.15 – 48.37 และ 1.13 – 48.25 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย 26.96 และ 26.86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 11.35 และ 11.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการประเมินปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy

การตรวจวัดสเปคตรัมของปุ๋ยอินทรีย์

ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปริมาณอินทรียวัตถุต่างๆ กัน ถูกนำมาตรวจวัด NIR สเปคตรัม โดยตรวจวัดที่ช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4,000 – 12,500 cm^{-1} พบว่าค่าการดูดซับแสง (log1/R) ของปุ๋ยอินทรีย์ แสดงให้เห็นเป็นสเปคตรัมเริ่มต้นของปุ๋ยอินทรีย์แบ่งตามปริมาณอินทรียวัตถุ (ภาพที่ 1) และในการวิเคราะห์มีการปรับแต่งสเปคตรัมโดยใช้วิธี Second derivative pre-treatment การทำ Second derivative spectra ของปุ๋ยอินทรีย์แสดงในภาพที่ 2 ผลการทดลองแสดงถึงช่วงการดูดซับคลื่นแสงที่สำคัญของอินทรียวัตถุ ได้แก่ ช่วงดูดซับแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร 7,020 cm^{-1} และ 5,785 cm^{-1} จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนถึงช่วงการดูดซับแสงของอินทรียวัตถุซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Osborne *et al.,* (1993) และ Williams (2007)

สมการประเมินปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ (Calibration equation)

ผลการสร้างสมการถดถอยเพื่อทำนายปริมาณอินทรียวัตถุของตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ในกลุ่ม calibration set และกลุ่ม validation set แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าผลการปรับแต่งสเปคตรัมของทั้งสองวิธีให้ความแม่นยำของสมการใกล้เคียงกัน โดยสมการจาก original spectra ของปุ๋ยอินทรีย์ ที่ความยาวคลื่น 5,000 – 10,000 cm^{-1} จะมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.87, ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในกลุ่ม calibration set

(SEC) เท่ากับ 5.57 เปอร์เซ็นต์ มีปัจจัย (F) ที่เกี่ยวข้อง 8 ปัจจัย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในกลุ่ม validation set (SEP) เท่ากับ 6.13 เปอร์เซ็นต์ มีปัจจัย (F) ที่เกี่ยวข้อง 10 ปัจจัย จากสมการ จะเห็นว่าช่วงคลื่นแสง 8,800 - 5,299 cm^{-1} เหมาะสมที่จะใช้ในการประเมินปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ โดยมีค่า SEC และค่า SEP ต่ำกว่าค่า SD (11.35) จากการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในห้องปฏิบัติการ แสดงว่า สมการทำนายนี้สามารถใช้ประเมินค่าอินทรียวัตถุได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การปรับแต่งสเปคตรัมโดย การทำ Second derivative spectra ของปุ๋ยอินทรีย์ที่แสดงในภาพที่ 2 แสดงถึงช่วงการดูดซับคลื่นแสงที่สำคัญของอินทรียวัตถุ ได้แก่ ช่วงดูดซับแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร 7,020 cm^{-1} และ 5,785 cm^{-1} ซึ่งที่จำนวนคลื่นแสงนี้มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณอินทรียวัตถุ ดังนั้นการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการสร้างสมการทำนายจะทำให้สามารถใช้ข้อมูลสเปคตรัมที่จำเป็นในการทำนายค่าปริมาณอินทรียวัตถุได้อย่างแม่นยำผลการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สมการที่สร้างในตัวอย่างกลุ่ม calibration set และ validation set แสดงในภาพที่ 3 และภาพที่ 4 ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาระบบการตรวจสอบความแม่นยำถูกต้องสูงด้วยเทคนิค NIR สำหรับการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ควรจะกำหนดให้วัดสเปคตร้าในช่วงจำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 5,000 – 10,000 cm^{-1} โดยจะต้องมีการปรับแต่งสเปคตรัมด้วย การทำ Second derivative สามารถใช้ในการประเมินหาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้เทคนิคการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ ที่สามารถลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และเป็นทางเลือกในการวิเคราะห์ อีกทั้งวิธีนี้เป็นวิธีประเมินที่ใช้เวลาสั้นกว่าการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการ NIR เป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็วทราบผลภายในเสี้ยววินาที ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดเวลา ลดต้นทุนในการใช้สารเคมี และรักษาสิ่งแวดล้อม

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำเทคนิค NIR Spectroscopy ไปใช้ในการประเมินหาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำ โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง เป็นประโยชน์มากต่อการให้บริการวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ รวมทั้งทำให้ประหยัด เวลา สารเคมี และงบประมาณของประเทศได้ และสามารถพัฒนาผลงานวิจัยนี้ในการตรวจสอบคุณสมบัติอื่นๆ ของปุ๋ยอินทรีย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์. 2551. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ISBN 978 – 974 – 436 – 679 – 5

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ISBN 978 – 616 – 278 – 009 – 7 กรุงเทพฯ.

ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง การขอขึ้นทะเบียน การออกใบสำคัญการขึ้นทะเบียน การขอแก้ไขรายการทะเบียน และการแก้ไขรายการทะเบียนปุ๋ยชีวภาพ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 พ.ศ.2551. (27 มิถุนายน 2551). ราชกิจจานุเบกษา.เล่มที่ 125 (ตอนพิเศษ 108 ง). หน้า 17-20.

Boever, J.L., B.G. Cottyn, J.M. Vanacker and Ch.V. Boucque. 1994. The use of nirs to predict the Chemical composition and the energy value of compound feeds for cattle. **Anim. Feed Sci. Technol. 51**:243 - 253.

Dull, G.G., G.S. Birth, D.A. Smittle and R.G. Leffler.1989. Near infrared analysis of soluble solids in intact cantaloupe. **J. Food Sci. 54**:393-39

J.B. Reeves, III and J.S. Van Kessel. Determination of ammonium-N moisture, total C and total N in dairy manures using a near infrared fibre-optic spectrometer. J.B. Reeves, III and J.S. Van Kessel, **J. Near Infrared Spectrosc. 8**, 151 - 160 (2000)

J.S. Van Kessel, R.B. Thomson and J.B. Reeves, III, **J.Prod. Agri.*c.* 28**, in press (1999).

Malley D.F., Williams1 P., J. McLaughlin and T. Atkinson. Rapid Analysis of Moisture, Organic Matter and Carbonate in Peat Cores from Northern Ontario by Near-infrared Spectroscopy. 50th Annual Manitoba Soil Science Society Meeting, 8-9 February 2005, Holiday Inn South, Winnipeg Manitoba

Osborne, B.G. T. Fearn and P.H. Hindle 1993. Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK

Walkley, A. and I.A. Black. 1934. An Examination Digestion Method for Determining Soil Organic Matter and Propose Modification of the Chromic Acid Titration Method. **Soil Sci. 37**:29 - 37

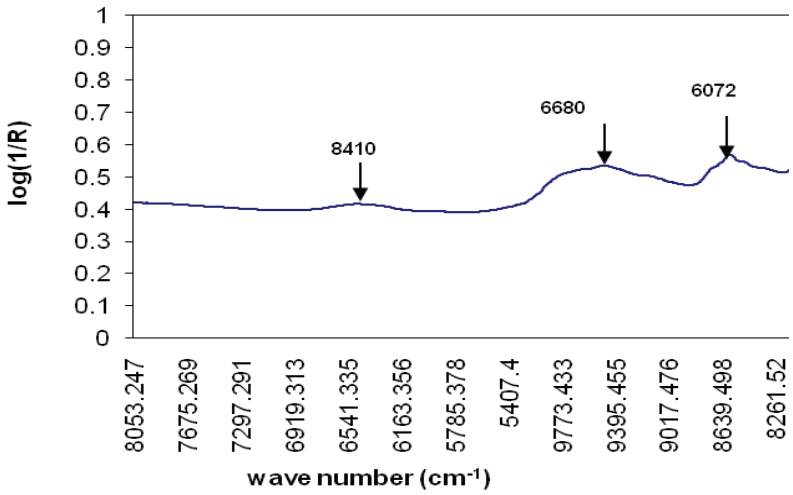
Williams, P. 2007. in Near Infrarad Spectroscopy in Food Science and Technology, Ed by Y. Ozaki, W. Fred McClure and A.A. Christy. Wiley Interscience, A John wiley & Sons, Inc., USA. p. 165

ตารางที่ 1. ตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของปริมาณอินทรียวัตถุในกลุ่มตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation

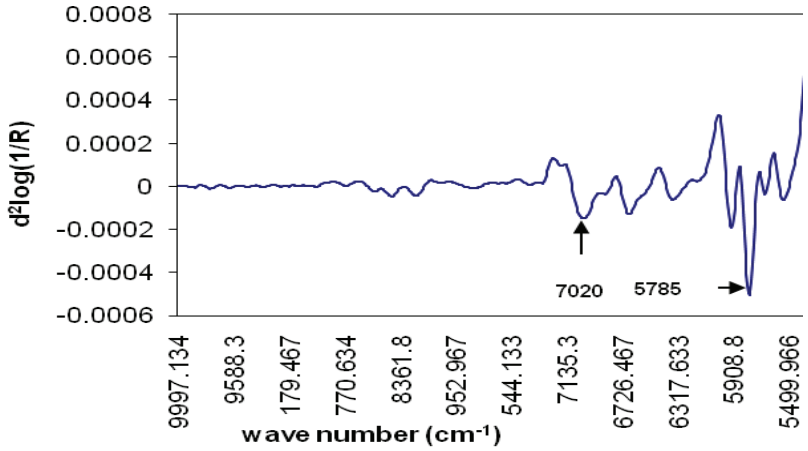
สมการ	จำนวนตัวอย่าง	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	SD	หน่วย
Calibration	100	1.15-48.37	26.96	11.35	%
Validation	99	1.13-48.25	26.86	11.19	%

ตารางที่ 2. ผลการปรับแต่งสเปคตรัมในการสร้างสมการ Calibration ของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์

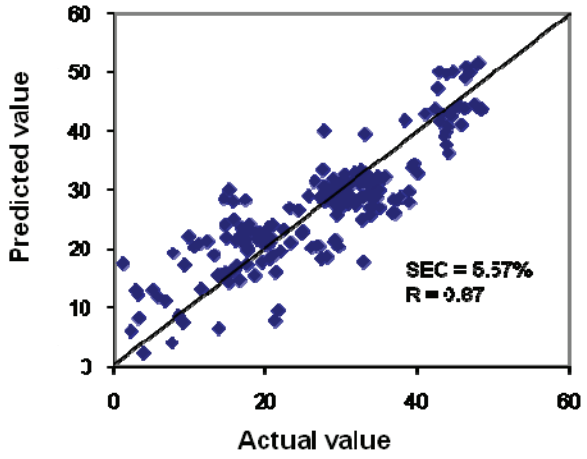
ช่วงคลื่นแสง (cm^{-1})	การปรับแต่งสเปคตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์	R	SEC	SEP	Bias	F
8,800-5,299	สเปคตรัมเริ่มต้น (Original)	0.87	5.57	5.74	0.40	8
8,997-5,299	สเปคตรัมเดอริเวทีฟลำดับที่สอง (Second derivative)	0.87	5.57	6.13	0.37	10



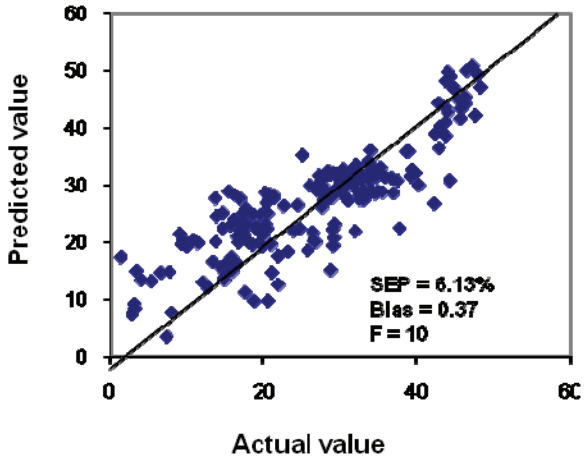
ภาพที่ 1. สเปคตรัมเริ่มต้นของปุ๋ยอินทรีย์แบ่งตามปริมาณอินทรียวัตถุต่างๆ กัน ตรวจวัดที่ช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตรตั้งแต่ 10,000 – 5,000 cm^{-1}



ภาพที่ 2. สเปคตรัมของการทำเดอริเวทีฟ ลำดับที่สอง (Second derivative spectra) ของปุ๋ยอินทรีย์แบ่งตามปริมาณอินทรียวัตถุต่างๆ กัน ลูกศรชี้ช่วงการดูดซับแสงของอินทรียวัตถุ (7,020 cm^{-1}และ 5,785 cm^{-1})



ภาพที่ 3. สมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์โดยเทคนิค NIRS และค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 4. ทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการประเมินจากสมการของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์โดยเทคนิค NIRS และค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเมล็ดพืชโดยเทคนิค NIRS

The Study of Protein Analysis method in Grain Crop by Near Infrared Spectroscopy

จิติมา ยถาภูธานนท์ จุลศักดิ์ บุญรัตน์ สุภานันท์ จันทร์ประอบ

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนหรือปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองที่ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ปลอดภัยจากสารเคมี และตัวอย่างไม่ถูกทำลาย โดยใช้เทคนิคคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ Near Infrared Spectroscopy (NIRS) ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินค่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองซึ่งใช้หลักการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดซับแสงกับค่าที่วิเคราะห์ทางเคมีที่ได้จากห้องปฏิบัติการ เมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 156 ตัวอย่าง ถูกสแกนด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์คลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ โดยวัดสเปคตร้าในช่วงจำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4,000 – 12,500 cm^{-1} การวิเคราะห์การถดถอยแบบพาร์เชียลลีส์ทสแควร์ (PLS regression) ถูกนำมาใช้ในการคำนวณสมการคาร์เบรชั่น

ผลการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Kjeldahl method พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation มีค่าการกระจายตัวของข้อมูล (Range, R) เท่ากับ 33.86 – 47.19 และ 35.70 – 45.69 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย 40.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) เท่ากับ 2.82 และ 2.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการประเมินปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค NIRS พบว่าได้สมการที่ใช้ในการทำนายผลระดับปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง สมการที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) เท่ากับ 0.89 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม calibration set (SEC) เท่ากับ 0.7439 เปอร์เซ็นต์ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation set (SEP) เท่ากับ 1.0851 เปอร์เซ็นต์ สมการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) สูง และมีค่า SEC หรือ SEP ต่ำ ซึ่งต่ำกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการหรือ SD (2.82) แสดงว่า สมการนี้สามารถใช้ประเมินค่าโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า Regression coefficient สูงอยู่ที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร (Wavenumber) 5988 และ 515 cm^{-1} ซึ่งสัมพันธ์กับโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง

ผลการวิจัยที่ได้นำเทคนิค NIR Spectroscopy มาใช้พบว่าสามารถใช้ประเมินหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำนวนคลื่นแสงที่เหมาะสมในการประเมินอยู่ในช่วง ตั้งแต่ 9091-4003 cm^{-1}

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่มีความมั่นคงทางอาหารของประเทศรองจากข้าว การใช้ประโยชน์หลักจากเมล็ดถั่วเหลืองในประเทศไทยเป็นการใช้ประโยชน์จากปริมาณโปรตีน ไม่ว่าจะใช้เป็นอาหารสำหรับคน สัตว์ และอุตสาหกรรม ซึ่งในปัจจุบันถั่วเหลืองยังมีโปรตีนในเมล็ดต่ำ โดยพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เกษตรกรนิยมปลูก มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดประมาณ 38 – 40 เปอร์เซ็นต์ (สมศักดิ์, 2543) การพัฒนาคุณภาพของถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และพัฒนาคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองให้มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นหนึ่งในแผนแม่บทการพัฒนาถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มมูลค่าการผลิต และเพิ่มคุณภาพทางโภชนาการ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ร่วมกับกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ได้ดำเนินการในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูง โดยการวิจัยและพัฒนาแบบบูรณาการ เพื่อทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น และสนับสนุนการผลิตตามแผนยุทธศาสตร์ของประเทศ

เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เทคนิคนี้เป็นวิธีที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำ ใช้เวลาสั้น ไม่ใช้สารเคมี ตัวอย่างไม่ถูกทำลาย สามารถใช้ประเมินได้เฉพาะองค์ประกอบที่เป็นอินทรีย์สารเท่านั้น เช่น ปริมาณแป้ง ปริมาณโปรตีนในข้าวสาลี ความชื้นเมล็ด เป็นต้น โดยใช้หลักการหาความสัมพันธ์การดูดซับแสงในช่วง Near Infrared คือ 800 – 2,500 nm หรือ 4,000 – 12,500 cm^{-1} ของสารที่ต้องการประเมิน และการวิเคราะห์สารที่ต้องการจากห้องปฏิบัติการ เพราะสารแต่ละชนิดเมื่อได้รับแสงจะมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงได้ไม่เท่ากัน เมื่อตัวอย่างดูดซับแสง NIR จะทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสั่นและดูดซับพลังงานที่แตกต่างกัน และนำค่าการดูดซับแสงมาวิเคราะห์ผล จะสามารถประเมินลักษณะที่ต้องการได้ (เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, 2555) ทั้งวิธีการนี้เป็นวิธีประเมินที่ไม่ทำลายตัวอย่าง และใช้เวลาสั้นกว่าการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ ทราบผลภายใน 2 – 3 นาที ให้ผลวิเคราะห์ ถูกต้อง แม่นยำ วิธีการนี้ได้ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น การประเมินค่า ปริมาณโปรตีนในข้าว ข้าวสาลี เป็นต้น

ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้ได้ถั่วเหลืองพันธุ์ดีพันธุ์ใหม่ที่มีโปรตีนในเมล็ดถั่วสูงขึ้นนี้ ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์โปรตีนสูงในรุ่นต่างๆ จะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเมล็ดด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1970) ในห้องปฏิบัติการทางเคมี ที่ผ่านขั้นตอนการ อบ บด และใช้กรดเข้มข้นในการย่อย กลั่น ทราบผลใช้เวลาประมาณไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณโปรตีนนี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ต้องใช้สารเคมีที่มีอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และลดการใช้สารเคมี โดยใช้เทคนิคคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ Near Infrared Spectroscopy ซึ่งเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้ทางเลือกของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดพืช ที่มีความรวดเร็วทราบผลภายใน 2 – 3 นาที ปลอดภัย และไม่ต้องทำลายเมล็ดถั่วสายพันธุ์นั้นๆ สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไปปรับปรุงพันธุ์ในรุ่นต่อๆ ไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์
   - Volumetric flask ขนาด 250 และ 2,000 มิลลิลิตร
   - Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
   - Volume pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
   - บิกเกอร์ ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
2. สารเคมี
   - H_2SO_4 (96 % AR grade) K_2SO_4 และ $CuSO_4$
   - สารละลาย 40% NaOH (w/v) AR grade
   - Mixed indicator (methyl red และ bromcresol green)
   - สารละลาย 0.4% H_3BO_3 (w/v)
   - Na_2CO_3 (AR grade)
   - สารละลาย 0.01 N HCl
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
   - เครื่อง NIR spectrometer
   - เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
   - เครื่องกลั่นแบบ semi-micro distillation

วิธีการ

ดำเนินการ 7 ขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลือง เพื่อใช้ในงานทดลอง เตรียมตัวอย่างถั่วเหลือง ที่มีปริมาณโปรตีน ตั้งแต่ 33.86 – 47.19 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณโปรตีน ต่ำ กลาง สูงที่กระจายตัวและครอบคลุมค่าของตัวอย่างในอนาคต จำนวน 156 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างเป็น 2 ส่วน สำหรับวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธี Kjeldahl และวิธี NIR โดยแผ่หรือกระจายตัวอย่างทั้งหมดบนแผ่นพลาสติกที่สะอาด และผสมคลุกเคล้ากันแบ่งตัวอย่างเป็น 4 ส่วน นำ 2 ส่วนที่อยู่ตรงข้ามมาคลุกเคล้ากันแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ทางเคมี นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 – 65 ^{0}C 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่อบจนแห้งแล้วบดด้วยเครื่องบดสเตนเลส (stainless) ร่อนตัวอย่างที่บดแล้วผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เขียนป้ายหมายเลขตัวอย่าง ทุกตัวอย่างมีการเตรียมให้มีสภาพใกล้เคียงกันให้มากที่สุด เป็นการลด Sample error ให้เหลือน้อยที่สุดตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาในห้องที่มีอุณหภูมิเดียวกับเครื่อง NIR ก่อนการตรวจวัดสเปคตรัม

2. วิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ Kjeldahl (AOAC, 1970)
   - ชั่งเมล็ดถั่วที่บดแล้ว 1.000 กรัม ใส่ในกระดาษ B2 ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย
   - เติม catalyst K_2SO_4 กับ $CuSO_4$ ประมาณ 3 กรัม และเติม H_2SO_4 เข้มข้น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ที่ 600 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน

- นำไปย่อยในเครื่องย่อย จนกระทั่งสารละลายในหลอดใสเป็นสีเขียว

- ดูดสารละลายที่ผ่านการย่อยแล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องกลั่นชนิด semi – micro distillation เติม 40 เปอร์เซ็นต์ NaOH 5 มิลลิลิตร นำ Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลาย 0.3 เปอร์เซ็นต์ H_3BO_3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปวางใต้ก้าน condenser โดยให้ปลายก้าน condenser จุ่มอยู่ใต้สารละลาย เปิดระบบกลั่น ใช้เวลากลั่นประมาณ 10 นาที

- นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.01 N HCl บันทึกปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้ โดยดูจุดยุติจากสารละลายสีเขียวเริ่มเป็นสีชมพูอ่อน

- ทำ blank โดยใช้กระดาษ B2

- นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{N \times (a-b) \times 250 \times 100 \times 14}{1000 \times 10 \times wt}$$

N = ความเข้มข้นของ HCl

a = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรท ตัวอย่าง

b = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรท blank

wt = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

ปริมาณโปรตีน (%) = %N x 6.25

3. วัดสเปคตรัมของถั่วเหลืองด้วยเครื่อง NIR Spectrometer วัดค่าการดูดซับแสงโดยใช้เทคนิค NIR Spectroscopy แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) สร้างและปรับปรุงสมการโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) ถั่วเหลืองถูกนำมาใช้ในการตรวจวัด NIR สเปคตรัม โดยเทตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองใส่ลงใน Petridis ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร โดยตรวจวัดในช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4000 – 12500 cm^{-1} เพื่อเก็บสเปคตรัมโดย scan ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้สเปคตรัมที่มีข้อมูลเกิดจากถั่วเหลืองที่วัดให้มากที่สุดและไม่มีข้อมูลการสะท้อนแสงที่ไม่เกี่ยวข้องกับค่าที่ต้องการวัด พร้อมกรอกค่าวิเคราะห์ทางเคมี ลงในสเปคตรัมของแต่ละตัวอย่าง

4. การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) เพื่อทำนายค่าทางเคมีที่ต้องการโดยสร้าง Calibration พร้อมกับเลือก Calibration ที่เหมาะสมไปใช้งานโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance กับปริมาณสาร โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร เพื่อหาสมการมาใช้ในการทำนายผล และตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation) ทำการ Validate โดยใช้กลุ่มตัวอย่าง นอกกลุ่ม Calibration

5. พัฒนาสมการที่จะนำไปประเมินค่าโปรตีนในตัวอย่างถั่วเหลือง โดยการปรับแต่งข้อมูลที่เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน Partial Least Square (PLS) regression แก้ไข Slope/Bias ของสมการทำนาย

6. ทำการหาประสิทธิภาพของ Calibration ที่สร้างขึ้น โดยการหาแหล่ง Error ของการวิเคราะห์ หาค่าผิดพลาดจากการวิเคราะห์

7. สรุปและเขียนรายงาน

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 - กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตัวอย่างถั่วเหลืองและการตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมี

ตัวอย่างถั่วเหลืองจำนวน 156 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณโปรตีน ตั้งแต่ 33.86 – 47.19 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองที่ใช้ในงานทดลองนี้เป็นถั่วเหลือง ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โครงการเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองโปรตีนสูง ของสถาบันวิจัยพืชไร่ ที่บูรณาการงานปรับปรุงพันธุ์กับงานตรวจวิเคราะห์โปรตีนในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ในรุ่นต่างๆ ตามขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ เป็นถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสี ถั่วเหลืองสายพันธุ์ก้าวหน้า ถั่วเหลืองสายพันธุ์ดีเด่น จากแปลงเปรียบเทียบเบื้องต้น เปรียบเทียบมาตรฐาน และเปรียบเทียบในไร่เกษตรกรของจังหวัดเชียงใหม่ ลพบุรี และสุโขทัย การตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน Kjeldahl (AOAC, 1970). ของกลุ่มตัวอย่างถั่วเหลืองที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation วัดการกระจายของข้อมูลโดยหาค่าพิสัย (Range) ที่มีปริมาณอินทรียวัตถุระหว่างค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย (Average) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation : SD) ผลการวัดค่าการกระจายของข้อมูลแสดงในตารางที่ 1 พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation มีค่าพิสัย 33.86 – 47.19 และ 35.70 – 45.69 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย 40.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.82 และ 2.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการประเมินปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy

การตรวจวัดสเปคตรัมของถั่วเหลือง

ตัวอย่างถั่วเหลือง ที่มีปริมาณโปรตีนต่างๆกัน ถูกนำมาตรวจวัด NIR สเปคตรัม โดยตรวจวัดที่ช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4000 – 12500 cm^{-1} พบว่าค่าการดูดกลืนแสง (log1/R) ของถั่วเหลือง แสดงให้เห็นเป็นสเปคตรัมเริ่มต้นของถั่วเหลือง แบ่งตามปริมาณโปรตีน (ภาพที่ 1) และในการวิเคราะห์มีการปรับแต่งสเปคตรัมโดยใช้วิธี Second derivative pre-treatment การทำ Second derivative spectra ของถั่วเหลือง แสดงในภาพที่ 2 ผลการทดลองแสดงถึงช่วงการดูดซับคลื่นแสงที่สำคัญของโปรตีน ได้แก่ ช่วงดูดซับแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร 5988 และ 5155 cm^{-1} จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนถึงช่วงการดูดซับแสงของโปรตีนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Osborne *et al.* (1993) และ Jilie *et al.*, (2007)

สมการประเมินปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง (Calibration equation)

ผลการสร้างสมการถดถอยเพื่อทำนายปริมาณโปรตีนของตัวอย่างถั่วเหลือง ในกลุ่ม calibration set และกลุ่ม validation set แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าผลการปรับแต่งสเปคตรัมของทั้งสองวิธีให้ความแม่นยำของสมการใกล้เคียงกัน โดยสมการจาก original spectra ของถั่วเหลือง ที่ความยาวคลื่น 9,091 – 4,003 cm^{-1} จะมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) เท่ากับ 0.89, ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม calibration set (SEC) เท่ากับ 0.7439 เปอร์เซ็นต์ มีปัจจัย (F) ที่เกี่ยวข้อง 8 ปัจจัย ค่าความคลาดเคลื่อน

มาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation set (SEP) เท่ากับ 1.0851 เปอร์เซ็นต์ มีปัจจัย (F) ที่เกี่ยวข้อง 8 ปัจจัย จากสมการ จะเห็นว่า ช่วงคลื่นแสง 10000 – 5000 cm^{1} เหมาะสมที่จะใช้ในการประเมินปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยมีค่า SEC และค่า SEP ต่ำกว่าค่า SD (2.82) จากการวิเคราะห์โปรตีนในห้องปฏิบัติการ แสดงว่าสมการทำนายนี้สามารถใช้ประเมินค่าโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การปรับแต่งสเปคตรัมโดย การทำ Second derivative spectra ของถั่วเหลืองที่แสดงในภาพที่ 2 แสดงถึงช่วงการดูดซับคลื่นแสงที่สำคัญของโปรตีน ได้แก่ ช่วงดูดซับแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร 5988 และ 5155 cm^{-1} ซึ่งที่จำนวนคลื่นแสงนี้มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณโปรตีน ดังนั้นการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการสร้างสมการทำนายจะทำให้สามารถใช้ข้อมูลสเปคตรัมที่จำเป็นในการทำนายค่าปริมาณโปรตีนได้อย่างแม่นยำ ผลการทำนายปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยใช้สมการที่สร้างในตัวอย่างกลุ่ม calibration set และ validation set แสดงในภาพที่ 3

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาระบบการตรวจสอบความแม่นยำถูกต้องสูงด้วยเทคนิค NIR สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนในถั่วเหลือง ควรจะกำหนดให้วัดสเปคตร้าในช่วงจำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 9091 – 4003 cm^{-1} โดยจะต้องมีการปรับแต่งสเปคตรัมด้วยการทำ Second derivative สามารถใช้ในการประเมินหาปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนในถั่วเหลือง ที่สามารถลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และเป็นทางเลือกในการวิเคราะห์ อีกทั้งวิธีนี้เป็นวิธีประเมินที่ใช้เวลาสั้นกว่าการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการ NIR เป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็วทราบผลภายในเสี้ยววินาที ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดเวลา ลดต้นทุนในการใช้สารเคมี และรักษาสิ่งแวดล้อม

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำเทคนิค NIR Spectroscopy ไปใช้ในการประเมินหาปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำ โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง เป็นประโยชน์มากต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง รวมทั้งทำให้ประหยัด เวลา สารเคมี และงบประมาณของประเทศได้ และสามารถพัฒนาผลงานวิจัยนี้ในการคัดเลือกหรือตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้โดยไม่ต้องทำลายเมล็ดพันธุ์นั้นๆ ก่อให้เกิดประโยชน์แก่วงการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พันธุ์ดี พันธุ์ใหม่ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ISBN 978-616-278-009-7 กรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2543. **งานวิจัยและพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย**. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. 77 หน้า.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.), Official Methods of Analysis, Eleventh Edition, Benjamin Franklin Station Washington, D.C. (1970). pp. 1015.

Osborne, B.G. T. Fearn and P.H. Hindle. 1993. Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK

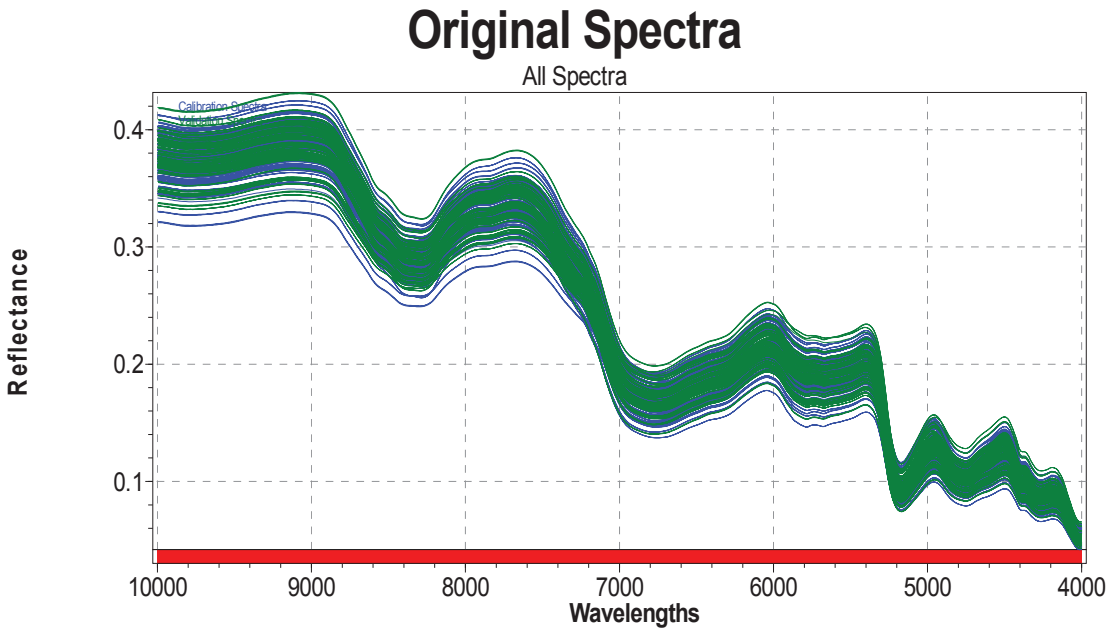
Jilie K. and Shaoning Y.U., Fourier Transform Infrared Spectroscopic of Protein Secondary StructuresActa Biochimica et Biophysica Sinica 2007, 39(8): 549 – 559

ตารางที่ 1. ตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของปริมาณโปรตีนในกลุ่มตัวอย่างถั่วเหลือง ที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation

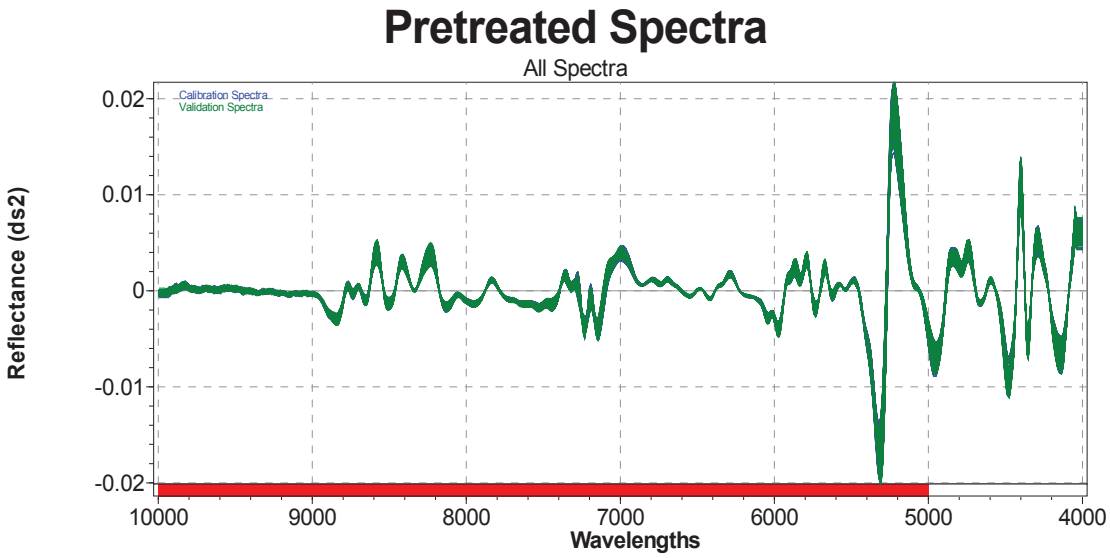
สมการ	จำนวนตัวอย่าง	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	SD	หน่วย
Calibration	104	33.86 – 47.19	40.61	2.82	%
Validation	52	35.70 – 45.69	40.61	2.59	%

ตารางที่ 2. ผลการปรับแต่งสเปคตรัมในการสร้างสมการ Calibration ของปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง

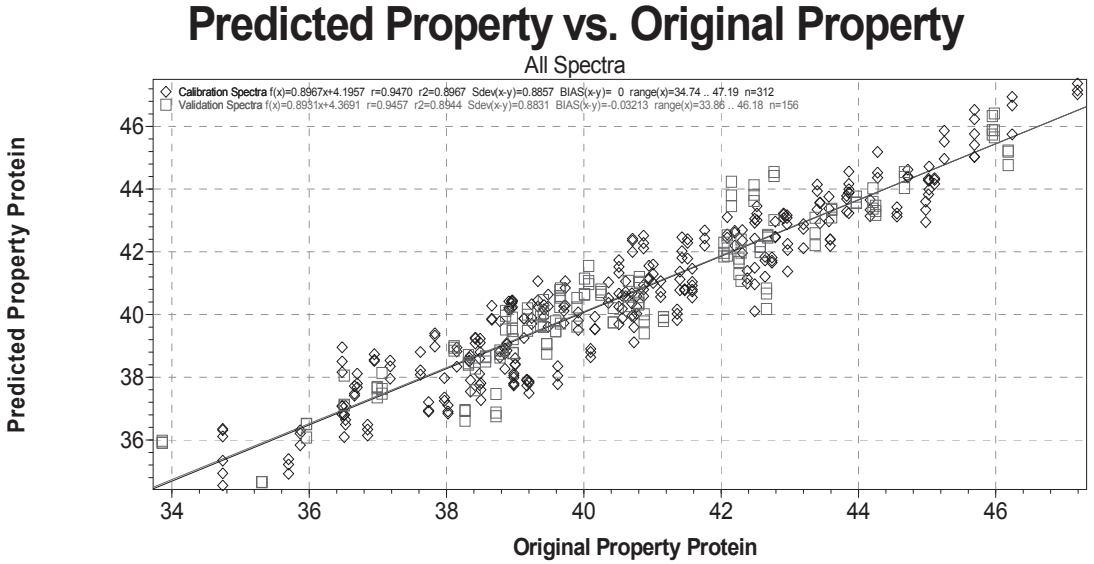
ช่วงคลื่นแสง(cm^{-1})	การปรับแต่งสเปคตรัม ด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์	R^2	SEC	SEP	Bias	F
9091-4003	สเปคตรัมเริ่มต้น (Original)	0.8967	0.7439	1.0851	0.0421	8
9091-4003	สเปคตรัมเดอริเวทีฟลำดับที่สอง (Second derivative)	0.8944	0.8857	0.8831	0.0321	8



ภาพที่ 1. สเปคตรัมเริ่มต้นของถั่วเหลือง แบ่งตามปริมาณโปรตีนต่างๆ กัน ตรวจวัดที่ช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตรตั้งแต่ 4,000 – 10,000 cm^{-}



ภาพที่ 2. สเปคตรัมของการทำเดอริเวทีฟ ลำดับที่สอง (Second derivative spectra) ของถั่วเหลือง แบ่งตามปริมาณโปรตีนต่างๆ กัน (b) ลูกศรชี้ช่วงการดูดกลืนแสงของโปรตีน (5988 และ 5155 cm^{-1})



ภาพที่ 3. สมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) และทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยเทคนิค NIRS และค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืช

Method Validation of IAA in Plant

นันทกานต์ ขุนโหร มนต์ชัย อินทร์ท่าอิฐ จุลศักดิ์ บุญรัตน์

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืช เพื่อห้องปฏิบัติการใช้วิธีที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล โดยห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี ปี 2555 จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืช โดยเครื่อง HPLC พบว่า ค่า LOD และ LOQ มีค่า 0.017 และ 0.029 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่า Range คือช่วงที่เป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.05 – 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร การตรวจสอบ Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 Accuracy อยู่ในช่วง 80 – 110 Precision มีค่า HORRAT 1.89 < 2 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืชดังกล่าวสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการต่อไป

คำนำ

การเจริญเติบโตของพืชถูกควบคุมโดยปัจจัยภายนอกและภายใน ปัจจัยภายนอก ได้แก่ สิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น แสง น้ำ ปริมาณธาตุอาหารในดิน สำหรับปัจจัยภายในมีทั้งพันธุกรรมและสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตซึ่งเรียกว่า ฮอร์โมนพืช (Plant Hormone) โดยฮอร์โมนพืชจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืชอย่างเด่นชัดแม้จะมีความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้นส่วนในล้านส่วน และมีความแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อพืช

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชในปัจจุบันมีหน่วยงานที่ทำการวิเคราะห์ไม่มากนักในขณะที่ยังมีความต้องการการบริการของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในงานวิจัยต่างๆ กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร เป็นหน่วยงานที่ให้บริการเชิงวิชาการ จำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน ดังนั้นการวิเคราะห์ต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพ คุณภาพและมาตรฐาน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์
   - Volumetric flask สีชา ขนาด 10, 50 และ 100 มิลลิลิตร
   - Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร
   - บิกเกอร์ ขนาด 10, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
   - Nylon membrane 0.45 ไมโครลิตร

- Syringe filter
- Syringe
- Vial ขนาด 4 มิลลิลิตรสีชา
- หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
- หลอดหยด

2. สารเคมี
   - Methanol HPLC grade
   - Methanol AR grade
   - Diethyl ether
   - Acetic acid
   - Ammonium acetate
   - Potassium dihydrogenphosphate
   - Di-potassium hydrogenphosphate
   - Polyvinylpolypyrolidon
   - Indole acetic acid
   - Nitrogen gas
   - Indole acetic acid 99.0%
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
   - เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง
   - High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) – Intelligent Fluorescence Detector
   - Ultrasonic bath
   - Filtration apparatus
   - Oven
   - เครื่องปั่นเหวี่ยง

วิธีการ

ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

- Column μBondapak 10 μm, C 18, 3.9 x 300 mm.
- Guard column μBondapak 5 μm C 18
- Temperature 35°C
- Fluorescence Detector λex 280 nm λem 350 nm
- Mobile phase 45% MeOH/0.02 Ammonium acetate in acetic acid
- Flow rate 1.0 ml/min.
- Injection Volume 10 μl

เตรียมสารละลาย Mobile phase (45% MeOH/0.02 M ammonium acetate in acetic acid)

- ชั่ง Ammonium acetate 1.5416 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่น HPLC 900 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม Acetic acid 16.75 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น HPLC
- ตวง Methanol HPLC grade 450 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วปรับด้วยสารละลายที่เตรียมข้างต้น

เตรียมสารละลาย Phosphase buffer

- ชั่ง Potassium dihydrogenphosphate 13.6 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง
- ชั่ง di-Potassium hydrogenphosphate 17.41 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ละลายด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง ลงใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง
- นำสารละลาย Potassium dihydrogenphosphate ใส่ลงในบิกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมสารละลาย di – Potassium hydrogenphosphate ลงในสารละลาย Potassium dihydrogenphosphate จนกระทั่ง pH อยู่ที่ 6.2
- เก็บสารละลายที่ได้ในที่มืดและควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4°C

การเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัด IAA

- นำสารละลาย Technical grade ปริมาตรตามที่กำหนด ใส่ลงใน Phosphate buffer 15 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 °C นาน 20 ชั่วโมง
- นำสารละลายที่ได้ เติม Polyvinylpolypyrolidon ประมาณ 10 มิลลิกรัม เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- แยกสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 2.5 – 3.0 ด้วย 4 M acetic acid แล้วจึงเติม diethyl ether ½ ส่วนของปริมาตรตัวอย่าง เขย่านาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- ดูดสารละลายส่วนบนเพื่อนำไประเหยแห้ง แล้วเติม diethyl ether ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำสารละลายที่ได้ไประเหยภายใต้ก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง แล้วจึงทำละลายด้วย Mobile phase ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- กรองผ่าน Syringe filter 0.45 µm แล้วนำเข้าเครื่อง HPLC

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืช

1. หาเปอร์เซนต์ ที่แน่นอนของสาร Technical grade ของ IAA

1.1 ชั่งสารมาตรฐาน IAA 99.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก 20.20 มิลลิกรัม 2 ซ้ำ (S1,S2) ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol

1.2 ปิเปตสารละลาย 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol

1.3 ปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase

1.4 กรองผ่าน Syringe filter 0.45 µm แล้วนำเข้าเครื่อง HPLC

1.5 ชั่งสาร Technical grade 98 เปอร์เซ็นต์ประมาณ 20.xx กรัม (20 ซ้ำ TC1 – TC20) จากนั้นทำเช่นเดียวกับสารมาตรฐาน

1.6 ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ S1,TC1,TC1,S2,TC2,TC2,S1,TC3,TC3,S2……TC20

1.7 คำนวณค่า Response factor (fi) ตามสูตร

$$fi = \frac{Hs}{S \times P}$$

fi = ค่า response factor ของสารมาตรฐาน

Hs = พื้นที่ใต้ peak ของ IAA ในสารมาตรฐาน

S = น้ำหนักของ IAA ในสารมาตรฐาน

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน IAA 99.0 เปอร์เซนต์ w/w

1.8 คำนวณ เปอร์เซนต์ Technical grade จากสูตร

$$\% \text{ Technical grade} = \frac{Hw}{f \times w}$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ IAA ในสารละลาย Technical grade

F = ค่าเฉลี่ย response factor

W = น้ำหนักของ IAA ในสารละลาย Technical grade

1.9 นำค่าเปอร์เซ็นต์ Technical grade ที่ได้ทั้ง 20 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอน ของ Technical gradeIAA

2. การหาค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection : LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation : LOQ)

2.1 ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ โดยที่ signal/noise $\geq$ 3 ลงใน Phosphate buffer และทำตามขั้นตอนการสกัด IAA ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ

2.2 นำผลที่ได้มาประเมิน ค่า LOD และ LOQ โดย

LOD = X + 3SD

LOQ = X + 10SD

X = ค่าเฉลี่ยปริมาณ IAA ของสารละลาย

3. การตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Range)

3.1 ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 , 0.6, 0.7, 0.8 และ 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด IAA

3.2 Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) กับ response (y)(พื้นที่ใต้ peak) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

4. ตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

4.1 เลือกความเข้มข้นจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้น Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) กับ response (y)(พื้นที่ใต้ peak) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากค่า Correlation Coefficient (r) $\geq$ 0.995

5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

5.1 ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.1มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด IAA 10 ซ้ำ เป็น sample blank

5.2 ปิเปตสารละลาย Technical grade ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และปิเปตสารละลายมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรนำไปผ่านขั้นตอนการสกัด IAA เป็น (spike sample)

5.3 วัดด้วยเครื่อง HPLC-Fluorescence เพื่อนำมาประเมินค่า Accuracy โดยคำนวณจาก %recovery ดังสูตร

$$\% \text{ recovery} = (X2 - X1)/C \times 100$$

โดย X1 = spike sample

X2 = sample blank

C = Conc. Standard

6. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้อง มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย SD และ %RSD ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์

ตัวอย่างการคำนวณ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{Mean}$$

เกณฑ์ยอมรับ precision ของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\text{ RSD Experiment}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \leq 2 \text{ (Horwitz } et\ al.\text{, 1980)}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$$

C = Concentration ratio

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืชโดยเครื่อง HPLC ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้ ปริมาณ IAA ของสาร Technical grad เมื่อเทียบกับสารเคมีมาตรฐานเท่ากับ 99.0 เปอร์เซนต์ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limit of Detection : LOD) และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantitation : LOQ) มีค่า 0.017 และ 0.029 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับค่า Range คือช่วงที่เป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.05 – 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร การตรวจสอบ Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 เปอร์เซนต์ recovery ที่ spike สารมาตรฐานมีค่า 83.42 ซึ่งมีค่าที่ยอมรับได้อยู่ที่ 80 - 110 การประเมินความแม่นยำ (Precision) โดยใช้ HORRAT เท่ากับ 1.89 (ตารางที่1)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืชโดยเครื่อง HPLC มีค่า Accuracy อยู่ในช่วง 80 – 110 และค่า Precision มีค่า HORRAT $\leq$ 2 ซึ่งค่า Accuracy และ ค่า Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ IAA ในพืชโดยเครื่องHPLC เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ แต่เนื่องจากในการทดสอบกับการตัวอย่างพืชคือมะม่วง ปริมาณ IAA ที่มีในแต่ละยอดมีปริมาณน้อยมาก หากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตรจะทำการวิเคราะห์ จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างพืชอย่างน้อย 15 ยอดต่อตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง

การนำไปใช้ประโยชน์

ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

จิตรา ชัยวิมล. 2545. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ "การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี"** กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

สุพิศสา ทองเขียว. 2551. **การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Indole acetic acid และ Indole butyric acid ในผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช โดยใช้ HPLC**. ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2551 เล่มที่ ½ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

ตารางที่ 1. แสดงผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

รายการตรวจสอบ	ผลการตรวจสอบ
LOD	$0.017\ \mu g.ml^{-1}$
LOQ	$0.029\ \mu g.ml^{-1}$
Range	$0.05\text{-}0.9\ \mu g.ml^{-1}$
Correlation coefficient (Linearity)	0.9998 ($\geq$0.995)
% Recovery (Accuracy)	83.42 % (80-110)
HORRAT (Precission)	1.89 ($\leq$ 2) (ยอมรับ)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช

Method Validation of Nitrogen in Plant

นันทกานต์ ขุนโหร สุภานันท์ จันทร์ประอบ จุลศักดิ์ บุญรัตน์

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช เพื่อให้ได้วิธีที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล ทำการตรวจสอบโดยใช้วิธีที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตรดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ AOAC, 1970 วิธีการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น Vapodest 33 โดยทำการศึกษาหาความถูกต้อง (Accuracy/Trueness) ความแม่นยำ (Precision) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (Limit of Detection : LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantitation : LOQ) จากการวิเคราะห์ Standard Reference Material (SRM) 1573a Tomato leaves พบว่าวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจน ยี่ห้อ Gerhardt มีค่าความถูกต้อง (Accuracy/Trueness) ที่ประเมินจากการเปรียบเทียบผลทดสอบกับวิธีมาตรฐาน อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ความแม่นยำ (Precision) ประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) พบว่ามีค่า HORRAT 0.24 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (Horwitz's ratio<2) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ (LOD) และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (LOQ) 0.176 และ 0.261 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับค่าที่ตรวจสอบต่างๆ ของทั้งสองวิธีอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืชทั้งสองวิธีดังกล่าวสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการต่อไป

คำนำ

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยเป็นองค์ประกอบของเซลล์ และสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมน การทราบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในพืช เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สามารถประเมินความอุดมสมบูรณ์ของดิน เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาการใช้ปุ๋ยเพื่อเพิ่มผลผลิต การวิเคราะห์พืชจึงมีบทบาทสำคัญในงานวิจัยและการทดลองทางด้านการเกษตร ดังนั้นการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีประสิทธิภาพ ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำ จึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำและมีการควบคุมคุณภาพให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์
    - Volumetric flask ขนาด 250 และ 2,000 มิลลิลิตร
    - Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
    - Volume pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
    - บิกเกอร์ ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
    - กระดาษ B2
2. สารเคมี
    - H_2SO_4 (96% AR grade)
    - K_2SO_4และ $CuSO_4$
    - สารละลาย 40% NaOH (w/v) AR grade
    - Mixed indicator (methyl red และ bromcresol green)
    - สารละลาย 0.4% H_3BO_3 (w/v)
    - Na_2CO_3 (AR grade)
    - สารละลาย 0.01 N HCl
3. วัสดุอ้างอิงรับรอง
    - Standard Reference Material (SRM) 1573a Tomato leaves
    - Glycine
4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
    - เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
    - เครื่องกลั่นแบบ semi-micro distillation
    - เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ยี่ห้อ Gerhardt ประกอบด้วย

      Vapodest 33

      Kjeltherm

      Serubber Unit turbosog

      Vortex cyclone mixer

วิธีการ

1. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

1.1 ทดสอบวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (SRM) และreagent blank โดยเครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt และวิธีมาตรฐาน

1.2 หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบที่หักค่า reagent blank ของวิธีการกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt ($\overline{X}_1$) และวิธีมาตรฐาน ($\overline{X}_2$)

1.3 ประเมิน ความถูกต้อง (Accuracy)โดยเปรียบเทียบ ($\overline{X}_1$) และ ($\overline{X}_2$)

2. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

2.1 นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้อง มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน SD และ %RSD ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์

ตัวอย่างการคำนวณ

$$\%_{RSD} = \frac{SD \times 100}{Mean}$$

เกณฑ์ยอมรับ precision ของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\text{\% RSD Experiment}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \leq 2 \text{ (Horwitz et al, 1980)}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$$

C = Concentration

3. หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limited of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ)

2.1 วิเคราะห์ sample blank โดยใช้กระดาษ B_2 10 ซ้ำ

2.2 หาค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) และค่า SD ของผลการทดสอบ

2.3 คำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$LOD = \overline{X} + 3SD$

$LOQ = \overline{X} + 10SD$

$\overline{X}$ = ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนของกระดาษ B2

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 - กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช วิธีการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt โดยการหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) ความแม่นยำ (Precision) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limited of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ) ใช้วิธีวิเคราะห์ตามคู่มือคู่มือการวิเคราะห์พืช กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยเคมีสรีรวิทยาพืช กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี วิเคราะห์ วัสดุอ้างอิงรับรอง Standard Reference Material (SRM) 1573a Tomato leaves พบว่า

1. การหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) โดยวิธีการเปรียบเทียบผลทดสอบกับวิธีมาตรฐานทำการวิเคราะห์ 10 ผลวิเคราะห์วิธีที่ทดสอบมีค่าระหว่าง 2.88 - 2.93 เปอร์เซนต์ และวิธีมาตรฐาน มีค่าระหว่าง 2.85 - 2.96 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 1) นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อประเมิน Accuracy โดยใช้ t - test ตามสูตร

$$t = \frac{[\bar{x}_1 - \bar{x}_2]}{\sqrt{\left[\left(\frac{SD_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{SD_2^2}{n_2}\right)\right]}}$$

$$t = \frac{[2.90-2.87]}{\sqrt{\left[\left(\frac{0.0158^2}{10}\right) + \left(\frac{0.0326^2}{10}\right)\right]}}$$

$$= \quad 0.011$$

เกณฑ์การยอมรับ คือ $t < t_c$

$df = n_1+n_2 -2 \quad =18$

tc ที่ df =18 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ คือ 2.10 แสดงว่าผลการวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

2. การหาค่าความแม่นยำ (precision) โดยคำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz's Ratio (ตติย, 2548)

$$\% \text{ RSD} = (SD/\bar{x}) \times 100$$
$$= (0.0158/2.90) \times 100$$
$$= 0.54$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$
$$= 0.66 \times 2^{(1-\log 0.029)}$$
$$= 2.24$$

$$C = \text{concentration ratio} = 2.90/100 = 0.029$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\text{RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = 0.54/2.24 = 0.24$$

เกณฑ์การประเมิน Horrat $\leq$ 2 แสดงว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ

3. หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limited of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ)

ผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนใน Sample blank (กระดาษ B2) 10 ซ้ำ มีค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) 0.14 เปอร์เซ็นต์ และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.012 (ตารางที่ 2)

$$\text{LOD} = \overline{X} + 3\,SD = 0.14 + 0.036 = 0.176\ \%$$

$$\text{LOQ} = \overline{X} + 10\,SD = 0.14 + 0.121 = 0.261\ \%$$

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืชโดยใช้เครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt พบว่าวิธีมีค่า Accuracy ผ่านเกณฑ์การยอมรับ และค่า Precision มีค่า HORRAT $\leq$ 2 มีค่า LOD และ LOQ มีค่า 0.176 และ 0.261 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยใช้เครื่องกลั่นยี่ห้อ Gerhardt เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ

การนำไปใช้ประโยชน์

ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตรและเผยแพร่ให้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในพืช

เอกสารอ้างอิง

จิตรา ชัยวิมล. 2545. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ "การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี"** กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

ไพลิน เหล็กคง. 2546. **เอกสารวิชาการคู่มือการวิเคราะห์พืช**. กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยเคมีสรีรวิทยาพืช. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

Jan-Åke Persson. 2008. **Handbook for Kjeldahl digestion**. 4th ed. CA Andersson, Malmoe, Sweden.

ตารางที่ 1. ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision)

ซ้ำที่	วิธีมาตรฐาน Kjedahl	การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นยี่ห้อ Gerhardt
1	2.86	2.89
2	2.96	2.89
3	2.85	2.91
4	2.86	2.89
5	2.88	2.88
6	2.87	2.91
7	2.87	2.93
8	2.86	2.88
9	2.86	2.90
10	2.85	2.88
ค่าเฉลี่ย	2.87	2.90
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0326	0.0158

ตารางที่ 2. แสดงค่าที่วิเคราะห์ได้ของ sample blank

ซ้ำที่	% N การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นยี่ห้อ Gerhardt
1	1.5
2	1.3
3	1.3
4	1.2
5	1.3
6	1.5
7	1.5
8	1.3
9	1.5
10	1.5
ค่าเฉลี่ย	0.139
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0121

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์น้ำตาลในพืช

Method Validation on Analysis of sugar in plant

สาธิดา โพธิ์น้อย สุพิศสา ทองเขียว

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

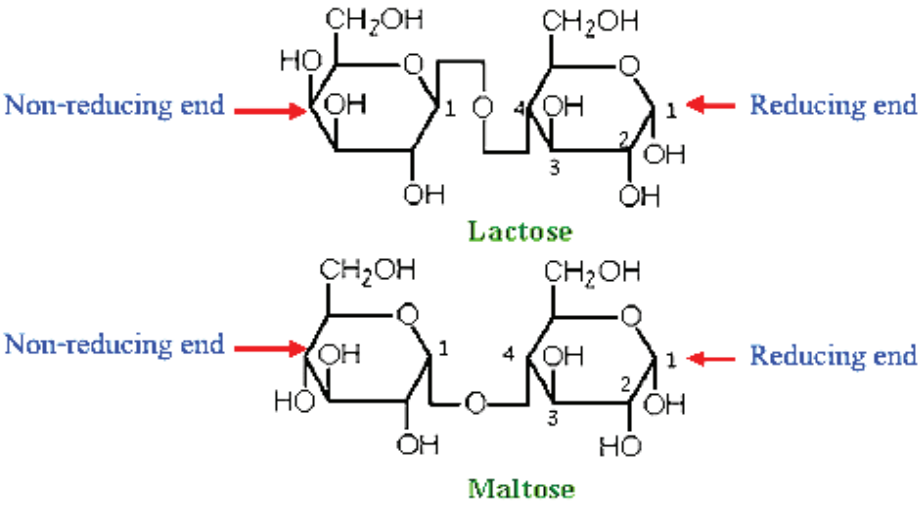
.....

บทคัดย่อ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจสอบคือน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการตรวจสอบในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี Somogyi – Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร และวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph พบว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี Somogyi – Nelson ด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 500 นาโนเมตร มีค่า LOD เท่ากับ 1.26, LOQ เท่ากับ 4.21 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีช่วงของการวิเคราะห์อยู่ที่ 15 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) มีค่าเท่ากับ 0.99867 ความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์พิสูจน์จาก %recovery ที่ความเข้มข้น 30, 60 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 100.30, 99.69 และ 100.49 ตามลำดับ มีค่าความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ซ้ำคิดจาก %RSD ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เท่ากับ 1.61, 1.49 และ 1.44 ตามลำดับ เมื่อนำไปคิดค่าการยอมรับด้วย Horwitz's Ratio จากการใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกันได้ค่า HORRAT เท่ากับ 2.0, 1.88 และ 1.82 ตามลำดับ จากผลการทดสอบทุกค่าเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสากลยอมรับ แต่การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph ยังไม่สามารถทำได้ เนื่องจากต้องใช้สารเคมีที่มีราคาสูงและตัวอย่างที่ต้องทำให้มีความบริสุทธิ์ก่อนนำมาวิเคราะห์ ทำให้ไม่คุ้มค่าต่อการวิเคราะห์ยังต้องมีการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีการต่อไป

คำนำ

น้ำตาลรีดิวส์ (reducting sugar) คือ น้ำตาลที่มีกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโตน (ketone) ที่เป็นอิสระถูกออกซิไดส์ ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) อย่างอ่อน ตัวอย่างของน้ำตาลพวกนี้ ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ทุกชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) (พิมพ์เพ็ญ, 2554) ตัวอย่างสูตรโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1. สูตรโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์

การทดสอบว่าน้ำตาลชนิดใดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หรือไม่สามารถทดสอบได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารละลายเบเนดิกส์ (Benedict, s reagent) หรือสารละลายเฟฮ์ลิง (Fehling, s reagent) โดยหมู่แอลดีไฮด์หรือคีโทหรือเฮมิอะซีทาลโอเอชของน้ำตาลจะไปรีดิวซ์โลหะคือ Cu^{2+} ที่เป็นส่วนประกอบในสารละลายเบเนดิกส์หรือสารละลายเฟฮ์ลิงให้เป็น Cu^{+} เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดงที่มีสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ได้แก่ มอโนแซ็กคาไรด์ทุกชนิด ไดแซ็กคาไรด์พวกมอลโทสและแลกโทส (นิรนาม, 2554)

มะเขือเทศ (รูปฟักทอง) เป็นผักพื้นบ้านที่มีลักษณะเหมือนมะเขือเทศโดยทั่วไป แต่อุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหาร ผลมะเขือเทศขนาดปานกลางจะมีปริมาณวิตามินซีครึ่งหนึ่งของส้มโอทั้งผล มะเขือเทศผลหนึ่งจะมีวิตามิน เอ 1 ใน 3 ของวิตามินเอที่ร่างกายต้องการในหนึ่งวัน นอกจากนี้มะเขือเทศยังมีโปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียมและแร่ธาตุอื่นๆ อีกหลายชนิด มะเขือเทศนับเป็นพืชผักที่มีความสำคัญมากในเขตต่างๆ ของโลกหลายประเทศผลใช้บริโภคสดปรุงอาหารคาวหวานและใช้ทำซุป (soup) เซื่อม ดอก แคทซับ (catsup) ซ๊อสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศ (juice) และมะเขือเทศผง ต้องใช้มะเขือเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี (นิรนาม, 2555) ในมะเขือเทศมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 2.8 เปอร์เซ็นต์น้ำตาลต่อส่วนที่บริโภคได้

เนื่องจากกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์ฯ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมีให้บริการทางด้านการวิเคราะห์ธาตุอาหารและคุณค่าทางโภชนาการของพืช รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งมีวิธีมาตรฐานหลายวิธีแต่การวิเคราะห์โดยวิธี Somogyi – Nelson (Nelson, 1994) เป็นวิธีที่ใช้สารปริมาณน้อย และไม่ยุ่งยากในการเตรียม ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานสากลยอมรับ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์โดยวิธี Somogyi – Nelson (Nelson, 1994) โดยนำมาเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี aldital acetate ด้วยเครื่อง gas chromatography ที่สามารถแยกชนิดของน้ำตาลได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เครื่อง UV/Vis spectrophotometer รุ่น Cary 3E, เครื่อง gas chromatography รุ่น 6890N ที่มีตัวตรวจจับชนิด flam ionization detector (FID), เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น TA 201, เครื่องเขย่าผสมสารเคมี (Vortex mixer) เตาให้ความร้อน, หลอดทดลองขนาด 2, 5, 10 และ 15 มิลลิลิตร, ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร, ขวดแก้วสีชา ขนาด 2.5 ลิตร, ปีกเกอร์ ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร, ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 1 มิลลิลิตร

สารเคมี (สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson)

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

เตรียมโดย ละลาย Sodium potassium tartate 12 กรัม Na_2CO_3 anhydrous 24 กรัม $NaHCO_3$ 16 กรัม และ $NaSO_4$ anhydrous 144 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และเติมสารละลายที่มี $CuSO_4.5H_2O$ 4 กรัม และ Na_2CO_4 36 กรัม ผสมให้เข้ากันปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 – 2 วัน กรอง (หากมีตะกอน) เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent)

เตรียมโดย ละลาย $(NH_4)MoO_4.4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร เติมกรด H_2SO_4 42 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2HaS_2SO_4.7H_2O$ 3 กรัม ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 – 2 วันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กรอง (หากมีตะกอน) เก็บใส่ขวดสีชา

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 เตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เข้มข้น 0 15 30 60 90 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่น ใส่สารละลายมาตรฐานลงในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติมสารละลายเนลสัน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง

3.2 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยเจือจางให้อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีข้อ 3.1

สารเคมี (สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี aldital acetate)

Myo – Inositol สำหรับเป็น Internal standard (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ deionized หรือน้ำกลั่น), 72% (w/w) H_2SO_4 25% NH_4OH, $NaBH_4$(solid), dimethylsulfoxide(DMSO), acetic acid anhydride, 1 – methylimidazole, Dichloromethane, anhydro – sodium sulfate (Na_2SO_4), 18M acetic acid

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช (มะเขือเทศ รูปฟักทอง)

1.1 นำตัวอย่าง มะเขือเทศที่ทำความสะอาดแล้วมาอบที่ อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดเก็บใส่ขวด เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

1.2 ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 80% 20 มิลลิลิตร ปิดปากฟลาสด้วย อลูมิเนียมฟอยล์ อบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.3 กรองใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เก็บเพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไป

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช แบ่งเป็น 2 วิธี คือ วิธี Somogyi – Nelson และ วิธี aldital acetateทั้งสองวิธีใช้สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ 98 เปอร์เซนต์ (โดยน้ำหนัก)

2.1 วิธี Somogyi – Nelson พารามิเตอร์ที่ตรวจสอบมีดังนี้

2.1.1 การตรวจสอบช่วง (range) ของวิธี

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 15 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับ ความเข้มข้นของน้ำตาล พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงที่ให้ค่า Correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.1.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของวิธี

เลือกความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงจากค่า range มา 6 ความเข้มข้น เตรียมสารมาตรฐานน้ำตาล 6 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล พิจารณาค่า correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.1.3 การตรวจสอบขีดจำกัดของการทดสอบ LOD และ LOQ

เลือกช่วงของความเข้มข้นต่ำสุด คือ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ด้วยความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร แล้วหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOD คือ 3SD และ LOQ คือ 10SD

2.1.4 การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) และ ความเที่ยง (precision) ของวิธี

เลือกความเข้มข้นจากค่า range มา 3 ค่า ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง การทดลองนี้เลือกที่ความเข้มข้น 30 60 และ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson ด้วยเครื่อง UV/Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

คำนวณความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้เพื่อหาค่า accuracy จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = (x2 - x1)/C \times 100$$

โดย x2 = ค่าที่วิเคราะห์ได้

x1 = ค่าจริง

C = ความเข้มข้นที่เติม

คำนวณ precision จาก ค่า mean, SD และ %RSD ของแต่ละชุดความเข้มข้น จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\text{RSD Experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

$$\text{เมื่อ \% RSD} = \frac{\text{SDx100}}{\text{mean}}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log c)}$$

C = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์

2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ด้วยวิธี aldital acetate

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) เตรียมสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ประมาณ 50 มิลลิกรัม และชั่ง myo – inosital ประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดขนาด 4 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษสำหรับชั่งสาร

2) Dimethylsulfoxide (DMSO)

เท molecular sieve ลงในขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร สูงประมาณ 2 – 3 เซนติเมตร ค่อยๆ เท dimethylsulfoxise ลงไปประมาณ 200 มิลลิลิตร ปิดฝาตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน (ห้ามเขย่าหรือเคลื่อนย้าย)

3) 72% w/w H_2SO_4

ตวงน้ำ deionized ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เทใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร แล้วตวงกรดซัลฟูริกเข้มข้น 98% ปริมาตร 665 มิลลิลิตร (ใช้กระบอกตวงคนละตัวกับการตวงน้ำ) ค่อยๆ เทกรดลงในบีกเกอร์ที่ใส่น้ำ 300 มิลลิลิตร (บิกเกอร์ ต้องวางอยู่ในอ่างน้ำแข็งป้องกันไม่ให้เกิดความร้อนหรือการระเบิดในระหว่างที่เทกรดลงไป) เทครั้งละประมาณ 100 มิลลิลิตร และในระหว่างเทต้องคนอยู่ตลอด หาค่า specific gravity (ค่าที่ปรับคือจะต้องได้ 1.6385 ที่ 15 องศาเซลเซียส หรือ 1.6338 ที่ 20 องศาเซลเซียส หากสูงเกินไปแสดงว่ามี H_2SO_4 มากเกินไปต้องเติมน้ำ จนได้ค่า specific gravity ที่กำหนดไว้)

4) $NaBH_4$

ชั่ง $NaBH_4$ ประมาณ 2 กรัม เติม Dimethylsulfoxide 100 มิลลิลิตร นำเข้าตู้อบ 105 องศาเซลเซียส 10 นาที เอาออก ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ดูว่าละลายหมดค่อยนำออกจากตู้อบ)

2.2.2 วิธีการวิเคราะห์ (hydrolysis of cell wall)

1) ชั่งสารมาตรฐาน monosaccharides ทั้งหมดประมาณ 1.0 – 2.0 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ (น้ำหนักต่างกันเล็กน้อย)

2) ชั่งตัวอย่างประมาณ 20 – 30 มิลลิกรัม (S1) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ

3) นำสารมาตรฐานและตัวอย่างไปเติม 0.25 มิลลิลิตร 72% H_2SO_4 (จากข้อ 3) ผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 45 นาที

4) เติมน้ำ 6.93 มิลลิลิตร เพื่อเจือจาง 72% H_2SO_4 ให้เหลือประมาณ 4% นำไปย่อยด้วย หม้อต้มความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5) ทำให้เย็นด้วยน้ำแข็งแล้วเติม myo – inosital 0.05 มิลลิลิตร (ที่ชั่งมา 200 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ) นำสารข้างต้นมาปรับ pH โดยปิเปตสารตัวอย่างมา 500 ไมโครลิตร ใส่ในขวด ขนาด 4 มิลลิลิตร เติม 28 – 30% NH_4OH ประมาณ 40 ไมโครลิตร แล้วทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส ปรับจนได้ pH 4 – 6 ด้วยการเติม ตัวอย่าง หรือ NH_4OH ทีละน้อย (reduction of monosaccharide)

6) นำหลอดทดลองจากขั้นตอนที่ 1 มาเติม sodiumborohydride ($NaBH_4$) (จากข้อ 4) 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป reduce ใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเขย่า นาน 90 นาที หรือจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน (ในการปฏิบัติใช้วิธีแรก) จากนั้นเติม 18 M acetic acid 0.1 มิลลิลิตร เพื่อไล่ $NaBH_4$

7) เติม 1 – methylimidazole 0.2 มิลลิลิตร และ acetic anhydride 2 มิลลิลิตร ผสมด้วย vortex mixer ปล่อยให้เย็นประมาณ 10 – 20 นาที จนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร เพื่อไล่ acetic anhydride ปล่อยให้เย็นประมาณ 10 – 20 นาทีจนถึงอุณหภูมิห้อง

8) เติม dichloromethane ตั้งทิ้งไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ (ค้างคืน ห้ามเคลื่อนย้าย) ปิเปต dichloromethane ที่อยู่ชั้นล่างมาประมาณ 2 – 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 4 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Na_2SO_4 ประมาณ 0.3 มิลลิเมตร จากก้นขวด ปิดฝาเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (ดูว่า Na_2SO_4 ดูดน้ำออกหมดหรือไม่ จากลักษณะตะกอนของ Na_2SO_4 เมื่อแน่ใจว่าไม่มีน้ำเหลืออยู่แล้ว ให้ดูดสารละลายใสใส่ในขวดปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรโดยการพ่นแก๊สไนโตรเจนให้เหลือประมาณ 100 ไมโครลิตร

9) เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิน้อยกว่า 5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์โดย GC

2.2.3 การเตรียมเครื่องมือก่อนการวิเคราะห์

การ set condition ของเครื่อง GC ดังนี้

Detector	:	Flame ionized detector
Carrier gas	:	Helium
Column	:	TB 17 (Rtx – 17) capillary column (30 m x 0.25 mm (id))
Column oven temp	:	150 °C -210°C
Injector temp	:	230 °C
Detector temp	:	230 °C
Injection volume	:	1 μL
Runtime	:	24 นาที

2.2.4 การตรวจสอบช่วง (range) ของวิธี

จากสารมาตรฐานกลูโคส ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 นำมาปรับให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเตรียม std curve ให้อยู่ในช่วง 0 ถึง 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์ตามวิธีการข้อ 2.2.2

2.2.5 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ของวิธี

นำสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 นำมาปรับให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม std curve และ เตรียม ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงจาก ค่า correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.2.6 การตรวจสอบขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์ได้ (LOQ)

ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจสอบคือน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการตรวจสอบในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี Somogyi – Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 520 นาโนเมตร (ภาพที่ 1)

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (range) ของวิธี พบว่า การวิเคราะห์มีช่วงของความเป็นเส้นตรงคลอบคลุมความเข้มข้นที่ 15 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2) และเมื่อตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงของความเข้มข้น 30 – 120 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่า correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.9987 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ที่ค่า r ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

เมื่อทำการตรวจสอบขีดจำกัดต่ำสุดที่เครื่องสามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานผลของวิธีการวิเคราะห์ (LOQ) จากการใช้ความเข้มข้นที่ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดสอบและนำมาหา SD จากนั้นนำมาประเมิน LOD จาก 3SD และประเมิน LOQ ที่ 10SD พบว่ามีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 1.26 และ 4.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การตรวจสอบความแม่น (accuracy) ของการวิเคราะห์พิสูจน์จาก %recovery ที่ความเข้มข้น 30 60 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า %recovery เท่ากับ 100.30, 99.69 และ 100.49 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง 98 – 102 % (ตารางที่ 1)

นอกจากนี้ต้องมีการทดสอบความเที่ยง (precision) ซึ่งเป็นการทดสอบเพื่อหาความเที่ยงของการวิเคราะห์ซ้ำทั้งจากเครื่องมือ วิธีการและผู้ทดสอบ โดยคำนวณจาก %RSD ที่ 3 ระดับความเข้มข้น เช่น เดียวกับการตรวจสอบความแม่น (accuracy) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มี %RSD เท่ากับ 1.61, 1.49 และ 1.44 ตามลำดับ เมื่อนำไปคิดค่าการยอมรับด้วย Horwitz's Ratio จากการใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกันได้ค่า HORRAT เท่ากับ 2.00, 1.88 และ 1.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องได้ค่า HORRAT น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 2

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ชนิดของน้ำตาลที่ตรวจสอบคือน้ำตาลรีดิวซ์ ทำการตรวจสอบในผักพื้นบ้าน (มะเขือเทศรูปฟักทอง) ด้วยวิธี aldital acetate โดยใช้เครื่อง GC chromatograph ยังไม่สามารถทำได้เนื่องจากเมื่อดำเนินการตรวจสอบและวัดค่าโดยใช้สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส พบว่า โครมาโทแกรมที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เพราะมีโครมาโทรแกรมอื่นนอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคส และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส พื้นที่ใต้พีคของทุกพีค เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 3) ทำให้ไม่สามารถรู้ได้ว่า พีคใดเป็นชนิดของน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate ต้องใช้สารเคมีหลายชนิด และมีสารเคมีที่นำเข้าได้ยากคือ dimethylsulfoxide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีและลดขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างจึงใช้สารทำ derivatives (MBTFA) เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นน้ำตาล free sugars ในรูปของ aldital acetate ให้สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี GC ได้ แต่เนื่องจากสารตัวนี้มีราคาแพงและมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการนำมาต้องใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate จึงต้องมีการพัฒนาวิธีเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมให้สามารถแยกชนิดของน้ำตาล ก่อนที่จะนำมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในพืช ด้วยวิธี Somogyi – Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 520 นาโนเมตร โดยทำการตรวจสอบช่วงของการวัด (range) ตรวจสอบค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) การทดสอบความเที่ยง (precision) และการตรวจสอบความแม่น (accuracy) จากการใช้เครื่องมือ บุคคล และเวลาเดียวกัน จากผลการทดสอบทุกค่าเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสากลยอมรับ แต่การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph ต้องมีการพัฒนาวิธีเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมให้สามารถแยกชนิดของน้ำตาล ก่อนที่จะนำมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในพืช ด้วยวิธี Somogyi – Nelson และนำมาวัดด้วยเครื่อง UV/spectrophotometer ที่ 520 นาโนเมตร สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ เป็นฐานข้อมูลให้กับนักวิจัย นักศึกษา และผู้ที่สนใจต่อไป

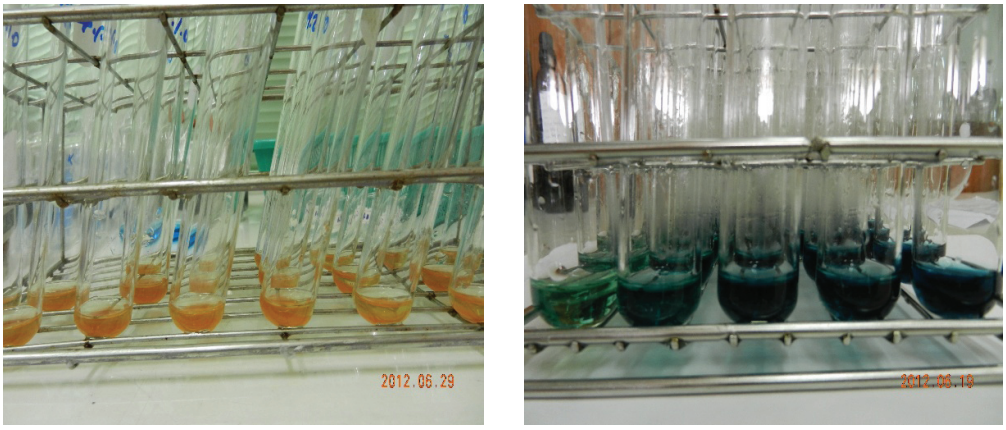
เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2554. http://science.srru.ac.th/org/sci – elearning/courseonline/4022503/ chapter 3 – disac.htm. 21 พฤษภาคม 2554.

นิรนาม. 2555. ความสำคัญของมะเขือเทศ. coursewares.mju.ac.th:81/e – learning47/ section2/.../chapter 02.pdf. 21 พฤษภาคม 2554.

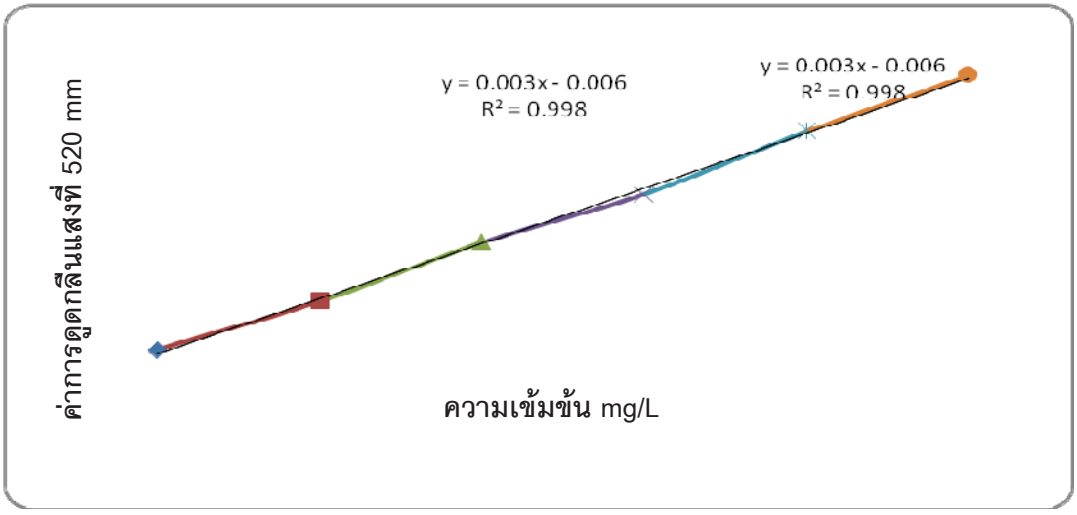
พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2554. น้ำตาลรีดิวซ์. http://www.foodnetworksolution.com. 21 พฤษภาคม 2554.

Laurence D. Melton and Bronwen G. Smith. 2001. Determination of Neutral Sugars by Gas Chromatography of their Alditol Acetates. Food Analytical chemistry. E3.2.1 – E3.2.13



(ก) (ข)

ภาพที่ 1. ลักษณะของตัวอย่างจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi – Nelson (ก) ลักษณะตัวอย่างหลังเติมสารละลายคอปเปอร์และนำไปต้ม 10 นาที (ข) ลักษณะตัวอย่างที่เติมสารละลายเนลสันก่อน นำไปวัดที่ 520 nm



ภาพที่ 2. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ 0 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

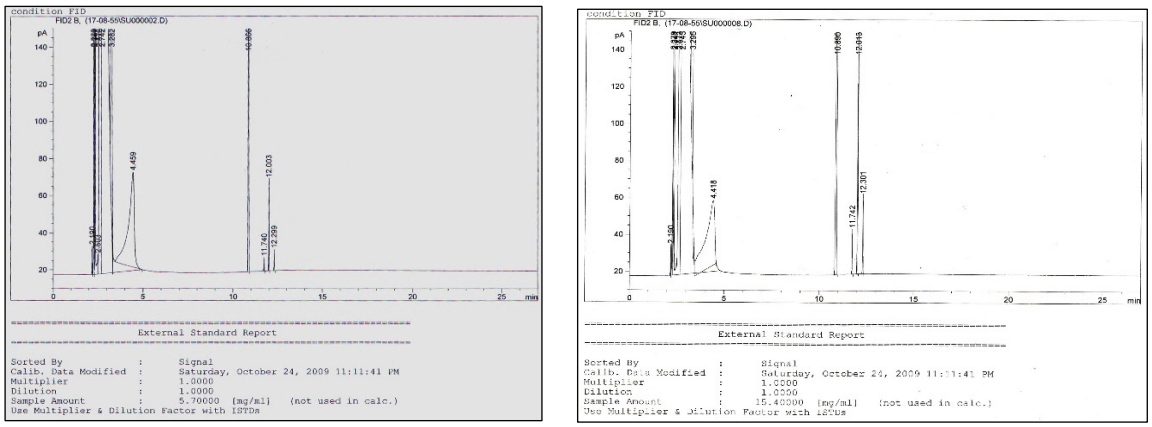
ตารางที่ 1. การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วย วิธี Somogyi – Nelson จาก %recovery

ครั้งที่	ความเข้มข้น (mg/L)		
	30	60	150
1	102.9	101.33	102.33
2	98.67	98.71	100.67
3	100.67	98.09	101.00
4	100.19	101.9	99.40
5	99.33	99.52	102.00
6	101.76	100	99.67
7	98.57	98.29	98.33
mean	100.3	99.69	100.49
sd	1.82	1.48	1.44
%rsd	1.61	1.49	1.43

ตารางที่ 2. การตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Somogyi – Nelson จากการนำ %Rsd มาประเมินด้วย Horrate

Conc. (mg/l)	%RSD Experimental	Predicted Horwitz RSD	HORRAT*
30	1.61	0.79	2.00
60	1.49	0.79	1.88
150	1.44	0.79	1.82

HORRAT* $\leq$ 2 (AOAC)



ภาพที่ 3. ลักษณะโครมาโทรแกรมของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี aldital acetate วัดด้วยเครื่อง gas chromatograph

ศึกษาการตอบสนองของมันสำปะหลังต่อการจัดการธาตุอาหาร ในกลุ่มดินเหนียว : ชุดดินโชคชัย

Response of Cassava to Nutrient Management on Clay Soil : Chok Chai Series

สมฤทัย ตันเจริญ[1] วัลลีย์ อมรพล[2] กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ[3]
อนุสรณ์ เทียนศิริฤกษ์[1] ศิริขวัญ ภู่นา[1] อนันต์ ทองภู[1]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาการตอบสนองของมันสำปะหลังต่อการจัดการธาตุอาหารในกลุ่มดินเหนียว เพื่อให้ได้ข้อมูลการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของมันสำปะหลังพันธุ์ก้าวหน้าที่ปลูกบนดินเหนียวชุดดินโชคชัย สำหรับนำไปใช้ในการให้คำแนะนำการใช้ปุ๋ยเฉพาะพื้นที่กับมันสำปะหลังอย่างมีประสิทธิภาพ โดยวางแผนการทดลองแบบ Split plot 3 ซ้ำ ปัจจัยหลัก เป็นพันธุ์มันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ที่เกษตรกรนิยม (พันธุ์ห้วยบง 60) และพันธุ์ก้าวหน้า คือ พันธุ์ระยอง 11 ปัจจัยรอง เป็นการตอบสนองต่อปุ๋ย 3 ชนิด คือ 1) ไนโตรเจน 4 อัตรา คือ 0, 8, 16 และ 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ 2) ฟอสฟอรัส 3 อัตรา คือ 0, 8 และ 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ 3) โพแทสเซียม 4 อัตรา คือ 0, 8, 16 และ 24 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ รวมทั้งหมด 9 กรรมวิธี โดยมี 16 – 8 – 16 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ เป็นปุ๋ยสูตรกลางเพื่อเปรียบเทียบ ใช้ระยะปลูก 0.7 x 1 เมตร ขนาดแปลงทดลองย่อย 7 x 8 เมตร พื้นที่เก็บเกี่ยว 5.6 x 6 เมตรต่อแปลงทดลองย่อย ดำเนินการที่ไร่เกษตรกร อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ปี 2554 – 2555

ผลการทดลอง พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนถึง 16 กิโลกรัม N ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 6,274 กิโลกรัมต่อไร่ ในขณะที่พันธุ์ระยอง 11 ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนถึง 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 6,009 กิโลกรัมต่อไร่ การตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัสมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ระยอง 11 ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 6,278 และ 6,389 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ และการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม พบว่า มันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมถึง 16 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 6,274 กิโลกรัมต่อไร่ ในขณะที่พันธุ์ระยอง 11 ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่ 8 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสด เฉลี่ย 6,219 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งแสดงว่ามันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 มีศักยภาพในการให้ผลผลิตมันสำปะหลังสูงกว่าพันธุ์ระยอง 11 และเมื่อคำนวณจุดคุ้มทุนแล้วพบว่า การใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 8 และ 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ ปุ๋ยฟอสฟอรัส 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ และโพแทสเซียม 8 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ให้ค่า MRR คุ้มค่ากับการลงทุน

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 01-07-54-02-01-05-01-54

[1] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

[3] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกมันสำปะหลังเป็นอันดับ 1 ของโลก โดยมีพื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2554 เท่ากับ 7.4 ล้านไร่ ได้ผลผลิตหัวสด 21.9 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ย 3.08 ตันต่อไร่ มีมูลค่า 5.87 หมื่นล้านบาท ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลผลิตเฉลี่ยค่อนข้างต่ำ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ปัจจุบันการผลิตมันสำปะหลังมีการเปลี่ยนแปลงไป เกษตรกรต้องการปลูกมันสำปะหลังเพื่อให้ได้ผลผลิตและมีรายได้สูงขึ้น โดยมีการปลูกมันสำปะหลังกันหลากหลาย ทั้งในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำถึงสูง เกษตรกรจึงต้องมีการใช้ปุ๋ยเคมีในอัตราที่แตกต่างกันไป ซึ่งหากใช้ปุ๋ยในอัตราที่ไม่เหมาะสม อาจจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตโดยไม่จำเป็น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีวิธีการจัดการที่ดีเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตให้ได้ผลผลิต 5 ตันต่อไร่ ตามเป้าหมายของรัฐบาล ซึ่งจะต้องพิจารณาทั้งในด้านของการพัฒนาพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง การเลือกพื้นที่ปลูกที่เหมาะสมกับแต่ละพันธุ์ การปรับปรุงความอุดมสมบูรณ์ของดินโดยการจัดการธาตุอาหารอย่างแม่นยำตรงตามระดับความอุดมสมบูรณ์ของดินและความต้องการของพืช จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาหาอัตราปุ๋ยเคมีที่เหมาะสมสำหรับมันสำปะหลังพันธุ์ก้าวหน้าในกลุ่มดินเหนียวชุดดินโชคชัย (Ci) สำหรับนำไปใช้ในการให้คำแนะนำการใช้ปุ๋ยแบบเฉพาะพื้นที่กับมันสำปะหลังอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับแนะนำเกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มันสำปะหลัง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ระยอง 11
2. ปุ๋ยเคมี ได้แก่ ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต (21 เปอร์เซ็นต์ N และ 24 เปอร์เซ็นต์ S), ปุ๋ยไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (18 เปอร์เซ็นต์ N และ 46 เปอร์เซ็นต์ P_2O_5) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (60 เปอร์เซ็นต์ K_2O)
3. อุปกรณ์ต่างๆ สำหรับเก็บตัวอย่างพืช เช่น ถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างพืช เครื่องชั่งน้ำหนัก
4. เครื่องวัดหาปริมาณแป้งแบบ Riemann scale
5. เครื่องมือต่างๆ สำหรับวิเคราะห์ดินและพืช ได้แก่ Spectrophotometer pH meter และ Flame Photometer
6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ดินและพืช

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Split plot มี 3 ซ้ำ

Main plot ประกอบด้วย มันสำปะหลัง 2 พันธุ์ คือ

1) พันธุ์ห้วยบง 60 2) พันธุ์ระยอง 11

Sub plot ประกอบด้วย การตอบสนองต่อปุ๋ย 9 กรรมวิธี ดังนี้

1) 0 - 8 - 16 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่ 2) 8 - 8 - 16 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่
3) 24 - 8 - 16 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่ 4) 16 - 0 - 16 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่
5) 16 - 8 - 16 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่ 6) 16 - 16 - 16 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่
7) 16 - 8 - 0 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่ 8) 16 - 8 - 8 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่
9) 16 - 8 - 24 กิโลกรัม N - P_2O_5 - K_2O ต่อไร่

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ก่อนเริ่มการทดลองเก็บตัวอย่างดินรวม (Composite Sample) ก่อนปลูกที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร และ 20 – 50 เซนติเมตร วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและปริมาณธาตุอาหารในดิน แล้วทำการปลูกมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ คือพันธุ์ห้วยบง 60 (เกษตรกรในพื้นที่นิยมปลูก) และพันธุ์ระยอง 11 ในดินเหนียวชุดดินโชคชัย ที่ไร่เกษตรกร ตำบลตะแบกบาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ขนาดแปลงทดลองย่อย 7 x 8 เมตร และระยะปลูก 0.7 x 1 เมตร ปลูกมันสำปะหลังเมื่อ 5 เมษายน 2554 ใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธี (Treatment) โดยผสมปุ๋ยรวมกัน ใส่ปุ๋ยที่อายุ 2 เดือน โดยผสมปุ๋ยรวมกันตามตำรับการทดลอง ใส่ด้านข้างต้นของมันสำปะหลังแล้วกลบปุ๋ย กำจัดวัชพืชตามความจำเป็น โดยไม่ปล่อยให้วัชพืชมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง เก็บเกี่ยวผลผลิตมันสำปะหลังเมื่อเดือน 18 – 20 มีนาคม 2555 ในพื้นที่ 5.6 x 6 เมตร วัดปริมาณแป้งด้วยเครื่องวัดแบบ Riemann scale คำนวณผลผลิตหัวสด ผลผลิตแป้ง และค่าดัชนีการเก็บเกี่ยว เก็บตัวอย่างต้น ใบ หัว และเหง้า เพื่อวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในส่วนต่างๆ วิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม irristat เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และเปรียบเทียบผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ โดยใช้อัตราผลตอบแทนส่วนเพิ่ม (marginal rate of return, MRR) ตามวิธีของอารันต์และธนรักษ์ (2534) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

MRR (%) = (กำไรที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการใช้ปุ๋ย ÷ ต้นทุนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการใช้ปุ๋ย) x 100

โดยมีหลักเกณฑ์ว่า การลงทุนมีความคุ้มทุน เมื่อค่า MRR เท่ากับหรือมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์

การบันทึกข้อมูล

1. ผลวิเคราะห์ดินที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร และ 20 – 50 เซนติเมตร ก่อนปลูก วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพของดิน ได้แก่ ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ปริมาณอินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ เนื้อดิน และความหนาแน่นรวมของดิน

2. บันทึกความสูง เก็บเกี่ยวผลผลิตหัวสดในพื้นที่ 5.6 x 6 เมตร คำนวณผลผลิตต่อไร่ และสุ่มตัวอย่างหัวสดมา 5 กิโลกรัมต่อแปลงทดลองย่อย เพื่อหาปริมาณแป้งในหัวสด โดยเครื่องวัดแบบ Riemann scale เมื่อทราบปริมาณแป้งในหัวสด สามารถคำนวณผลผลิตแป้งโดยใช้สูตรดังนี้

ผลผลิตแป้ง (กก./ไร่) = ผลผลิตหัวสด x (ปริมาณแป้งในหัวสด) /100

ระยะเวลา เดือนมีนาคม 2554 – เมษายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง ไร่เกษตรกร ตำบลตะแบกบาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

ผลการทดลองและวิจารณ์

สมบัติของดินชุดดินโชคชัย

ผลวิเคราะห์สมบัติของดินชุดโชคชัยก่อนทำการทดลองที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร และ 20 – 50 เซนติเมตร พบว่า ชุดดินโชคชัยมีเนื้อดินเป็นดินเหนียว มีความหนาแน่นรวมของดิน 1.28 และ 1.30 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ดินมีปฏิกิริยาดินค่อนข้างเป็นกรด มีค่า pH 4.5 และ pH 4.4 ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลางเท่ากับ

1.60 เปอร์เซ็นต์ และ 1.50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ปานกลางเท่ากับ 10.0 และ 6.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ต่ำมีค่าเท่ากับ 42 และ 33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การเจริญเติบโตและผลผลิตของมันสำปะหลัง

การตอบสนองของ N P K ต่อการเจริญเติบโต

ผลการทดลองจากการปลูกมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ระยอง 11 ในฤดูฝนปี 2554 ในดินเหนียวชุดดินโชคชัย พบว่าให้ความสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 146 – 189 เซนติเมตร

การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน พบว่า การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อความสูงของมันสำปะหลัง คือการใช้ปุ๋ย 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ ให้ความสูงเฉลี่ยมากที่สุด 188 เซนติเมตร ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 16 กิโลกรัม N ต่อไร่ และการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 8 กิโลกรัม N ต่อไร่ ซึ่งให้ความสูงเฉลี่ย 178 เซนติเมตร และ 170 เซนติเมตร ตามลำดับ

การตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่าการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสทั้ง 3 ระดับ ไม่มีผลต่อความสูงของมันสำปะหลัง โดยมีความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 178 – 189 เซนติเมตร

การตอบสนองต่อปุ๋ยโพแทสเซียม พบว่าการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมไม่มีผลต่อความสูงของมันสำปะหลังโดยให้ความสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 176 – 186 เซนติเมตร แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการไม่ใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่มีความสูงเฉลี่ยต่ำสุด 159 เซนติเมตร และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังกับการใส่ปุ๋ยอัตราต่างๆ ต่อความสูง (ตารางที่ 2)

การตอบสนองของ N P K ต่อผลผลิตหัวสด

การปลูกมันสำปะหลังทั้ง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ระยอง 11 ในดินเหนียวชุดดินโชคชัย พบว่าให้ผลผลิตหัวสดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพันธุ์ห้วยบง 60 ให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ยสูงสุด 5,718 กิโลกรัมต่อไร่ และพันธุ์ระยอง 11 ซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 4,965 กิโลกรัมต่อไร่

การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน พบว่า การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนมีผลต่อผลผลิตหัวสดของมันสำปะหลัง คือ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนถึง 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุดเฉลี่ย 5,980 กิโลกรัมต่อไร่ ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 16 กิโลกรัม N ต่อไร่ ซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 5,556 กิโลกรัมต่อไร่ แต่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 8 กิโลกรัม N ต่อไร่ ซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 5,275 กิโลกรัมต่อไร่ และการไม่ใช้ปุ๋ยไนโตรเจนซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ยต่ำสุด 4,635 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ

การตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่าการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุดเฉลี่ย 6,324 กิโลกรัมต่อไร่ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ 8 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ยต่ำสุด 5,556 กิโลกรัมต่อไร่ และการไม่ใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส ซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 5,632 กิโลกรัมต่อไร่

การตอบสนองต่อปุ๋ยโพแทสเซียม พบว่ามันสำปะหลังมีการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมถึง 16 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสดสูงสุดเฉลี่ย 5,556 กิโลกรัมต่อไร่ ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่ 8 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ซึ่งให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 5,389 กิโลกรัมต่อไร่ แต่แตกต่างกับการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่

24 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 4,733 กิโลกรัมต่อไร่ และการไม่ใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่ให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ยต่ำสุด 4,552 กิโลกรัมต่อไร่ และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังกับการใส่ปุ๋ยอัตราต่างๆ ต่อผลผลิตหัวสด (ตารางที่ 3)

การตอบสนองของ N P K ต่อเปอร์เซ็นต์แป้ง

การปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 และพันธุ์ระยอง 11 ในดินเหนียวชุดดินโชคชัยให้เปอร์เซ็นต์แป้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 19.0 – 26.6 เปอร์เซ็นต์

การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน พบว่าการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนทุกระดับในดินเหนียวชุดดินโชคชัย ให้เปอร์เซ็นต์แป้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนถึง 8 กิโลกรัม N ต่อไร่ ให้เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 26.6 เปอร์เซ็นต์

การตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่าการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส 8 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ให้เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 24.2 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ และการไม่ใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส โดยให้เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 26.1 เปอร์เซ็นต์ และ 26.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การตอบสนองต่อปุ๋ยโพแทสเซียม พบว่า การใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม 8 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ให้เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 26.2 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม 16 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ 24 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ และการไม่ใส่ปุ๋ยโพแทสเซียม โดยให้เปอร์เซ็นต์แป้งเฉลี่ย 24.2 เปอร์เซ็นต์ 22.4 เปอร์เซ็นต์ และ 19.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังกับการใส่ปุ๋ยอัตราต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์แป้ง (ตารางที่ 4)

การตอบสนองของ N P K ต่อผลผลิตแป้ง

การปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 และ พันธุ์ระยอง 11 ในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย พบว่า ให้ผลเป็นไปในทางเดียวกันกับการให้ผลผลิตหัวสด โดยพันธุ์ห้วยบง 60 ให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ยสูงสุด 1,457 กิโลกรัมต่อไร่ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับพันธุ์ระยอง 11 ซึ่งให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 1,198 กิโลกรัมต่อไร่

การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน พบว่ามันสำปะหลังตอบสนองต่อการให้ผลผลิตแป้งสูงสุด เมื่อมีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนถึง 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตแป้งสูงสุดเฉลี่ย 1,555 กิโลกรัมต่อไร่ ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 8 กิโลกรัม N ต่อไร่ ที่ให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 1,412 กิโลกรัมต่อไร่ และการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 16 กิโลกรัม N ต่อไร่ ที่ให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 1,378 กิโลกรัมต่อไร่ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับและการไม่ใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตแป้ง 1,134 กิโลกรัมต่อไร่

การตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่า การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ให้ผลผลิตแป้งสูงสุดเฉลี่ย 1,667 กิโลกรัมต่อไร่ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ 8 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ซึ่งให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ยต่ำสุด 1,378 กิโลกรัมต่อไร่ และการไม่ใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส ซึ่งให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 1,463 กิโลกรัมต่อไร่

การตอบสนองต่อปุ๋ยโพแทสเซียม พบว่าตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่ 8 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 1,420 กิโลกรัมต่อไร่ ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่ 16 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตแป้ง

เฉลี่ย 1,378 กิโลกรัมต่อไร่ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมที่ 24 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ โดยให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 1,070 กิโลกรัมต่อไร่ และการไม่ใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม ซึ่งให้ผลผลิตแป้งเฉลี่ย 849 กิโลกรัมต่อไร่ และไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์มันสำปะหลังกับการใส่ปุ๋ยอัตราต่างๆ ต่อผลผลิตแป้ง (ตารางที่ 5)

ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ

การปลูกมันสำปะหลังเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง จำเป็นจะต้องมีการจัดการที่ดี และมีการลงทุนเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการใช้ปัจจัยการผลิตเพิ่มขึ้น ปุ๋ยอัตราสูงจะให้ผลผลิตสูง แต่อาจจะไม่ใช่อัตราที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นจึงต้องคำนวณรายได้ และจุดคุ้มทุน เพื่อประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้พันธุ์ และอัตราปุ๋ยที่เหมาะสม หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตหัวสด จากการคำนวณรายได้ พบว่าการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ทำให้ได้กำไรสุทธิเฉลี่ยสูงสุดเป็นเงิน 6,023 บาทต่อไร่ ส่วนพันธุ์ระยอง 11 มีกำไรสุทธิเฉลี่ยต่ำสุด 4,626 บาทต่อไร่

การใช้ปุ๋ยไนโตรเจน พบว่าการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 8 กิโลกรัม N ต่อไร่ มีกำไรสุทธิเฉลี่ย 5,588 บาทต่อไร่ และมีกำไรเพิ่มขึ้นสูงสุด 1,203 บาทต่อไร่ มีค่า MRR เท่ากับ 332 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุ้มค่ากับการลงทุนมากที่สุด และหากมีเงินลงทุนมากสามารถเลือกใช้การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ มีกำไรสุทธิสูงสุดเฉลี่ย 6,193 บาทต่อไร่ และมีกำไรเพิ่มขึ้น 662 บาทต่อไร่ มีค่า MRR 173 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าคุ้มค่ากับการลงทุน

การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส พบว่า การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ มีกำไรสุทธิสูงสุดเฉลี่ย 6,748 บาทต่อไร่ และมีกำไรเพิ่มขึ้นสูงสุด 1,217 บาทต่อไร่ มีค่า MRR เท่ากับ 211 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุ้มค่ากับการลงทุน

การใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม พบว่าการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม 8 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ มีกำไรสุทธิเฉลี่ยสูงสุด 5,769 บาทต่อไร่ และมีกำไรเพิ่มขึ้นสูงสุด 2,076 บาทต่อไร่ มีค่า MRR 351 เปอร์เซ็นต์ คุ้มค่ากับการลงทุนมากที่สุด (ตารางที่ 6)

สรุปผลการทดลอง

การปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย ปี 2554 – 2555 ให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ยสูงสุด 5,718 กิโลกรัมต่อไร่ ขณะที่พันธุ์ระยอง 11 ให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ย 4,965 กิโลกรัมต่อไร่ และการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ให้เปอร์เซ็นต์แป้ง และผลผลิตแป้งเฉลี่ยสูงสุด 25.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1,457 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจน 24 กิโลกรัม N ต่อไร่ ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุดเฉลี่ย 5,980 กิโลกรัมต่อไร่ การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสที่ 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ และปุ๋ยโพแทสเซียม 16 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ให้ผลผลิตหัวสดสูงสุดเฉลี่ย 6,324 และ 5,556 กิโลกรัมต่อไร่

จากการคำนวณรายได้ พบว่า การปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ห้วยบง 60 ทำให้ได้กำไรสุทธิเฉลี่ยสูงสุดเป็นเงิน 6,023 บาทต่อไร่ ส่วนพันธุ์ระยอง 11 มีกำไรสุทธิเฉลี่ย 4,626 บาทต่อไร่ การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่ 8 กิโลกรัม N ต่อไร่ มีกำไรสุทธิเฉลี่ย 5,588 บาทต่อไร่ และมีกำไรเพิ่มขึ้นสูงสุด 1,203 บาทต่อไร่ มีค่า MRR เท่ากับ 332 เปอร์เซ็นต์ การใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัส 16 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ มีกำไรสุทธิสูงสุดเฉลี่ย 6,748 บาทต่อไร่ การใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม 8 K_2O ต่อไร่ มีกำไรสุทธิเฉลี่ยสูงสุด 5,769 บาทต่อไร่ และมีกำไรเพิ่มขึ้นสูงสุด 2,076 บาทต่อไร่ ซึ่งคุ้มค่ากับการลงทุนมากที่สุด

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยให้คำแนะนำ และถ่ายทอดให้เกษตรกรและนักวิชาการเกษตร ทราบถึงการใช้ปุ๋ยเฉพาะพื้นที่กับมันสำปะหลังอย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2553/2554**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 201 หน้า www.http://oae.go.th

อารันต์ พัฒโนทัย และ ธนรักษ์ เมฆขยาย. 2534. จากข้อมูลผลการทดลองสู่คำแนะนำเกษตรกร คู่มือการอบรมทาง **เศรษฐศาสตร์** ฝ่ายเศรษฐศาสตร์ ศูนย์วิจัยการปรับปรุงข้าวโพด และข้าวสาลีนานาชาติ. กรุงเทพมหานคร. 88 หน้า.

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. **Soil Science 59**: 39 – 45.

Peech, M. 1965. Soil pH by grass electrode pH meter, pp. 914 – 925. In C.A. Black, D. D. Evans, R.L. White, L.E.Ensminger,F.E. Clark,and R.C.Dinsuer (eds). Method of soil Analysis Part 2 : Physical and menerological Propertics, Inching Statistics of Measurement and Sampling American Society of Agronomy Inc., Pubisher Madison,USA.

Thomas, G.W. 1982. Exchangeable cation. In A.L. Page et al (ed.). Method of soil analysis. Second edition. Agronomy 9: 159 – 166. American Society of Agronomy. Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A.

Walkley, A. and I. A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science 37**: 29 – 37.

ตารางที่ 1. ผลวิเคราะห์สมบัติของดินชุดโชคชัยก่อนทำการทดลอง ปี 2554 – 2555

ระดับความลึกจากผิวดิน (ซม.)	เนื้อดิน[1/]	ความหนาแน่นรวมของดิน (ก./ลบ.ซม.)	pH[2/] (1:1)	อินทรียวัตถุ[3/] (%)	ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์[4/] (มก./กก.)	โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้[5/] (มก./กก.)
0–20	ดินเหนียว	1.28	4.5	1.60	10.0	42
20–50	ดินเหนียว	1.30	4.4	1.50	6.7	33

1/ Hydrometer method

2/ Peech (1965) อัตราส่วนดินต่อน้ำ = 1 ต่อ 1

3/ Walkley and Black (1934)

4/ Bray and Kurtz (1945)

5/ Thomas (1982)

ตารางที่ 2. ผลของปุ๋ยเคมีต่อความสูง (เซนติเมตร) ของมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่ปลูกในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา ปี 2554 – 2555

อัตราปุ๋ย (F) N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่	พันธุ์มันสำปะหลัง (V) ห้วยบง 60	พันธุ์มันสำปะหลัง (V) ระยอง 11	ค่าเฉลี่ย
ไนโตรเจน (กก./ไร่)			
0-8-16	171	122 c	146 c
8-8-16	194	146 abc	170 abc
16-8-16	204	152 abc	178 ab
24-8-16	206	170 a	188 a
ฟอสฟอรัส (กก./ไร่)			
16-0-16	204	172 a	189 a
16-8-16	204	152 abc	178 ab
16-16-16	211	165 ab	188 a
โพแทสเซียม (กก./ไร่)			
16-8-0	192	126 bc	159 bc
16-8-8	188	183 a	186 ab
16-8-16	204	152 abc	178 ab
16-8-24	197	155 abc	176 ab
ค่าเฉลี่ย	**196**	**155**	**175**

CV. (a) = 13.3 % CV.(b) = 12.3 % **พันธุ์** (V) = *, **ปุ๋ย** (F) = *, V x F = NS

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3. ผลของปุ๋ยเคมีต่อผลผลิตหัวสด (กิโลกรัมต่อไร่) ของมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่ปลูกในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา ปี 2554 – 2555

อัตราปุ๋ย (F)	**พันธุ์มันสำปะหลัง** (V)		**ค่าเฉลี่ย**
N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่	**ห้วยบง 60**	**ระยอง 11**	
ไนโตรเจน (กก./ไร่)			
0-8-16	5,426 a	3,844 cd	4,635
8-8-16	6,065 a	4,486 bcd	5,275
16-8-16	6,274 a	4,838 a-d	5,556
24-8-16	5,951 a	6,009 ab	5,980
ฟอสฟอรัส (กก./ไร่)			
16-0-16	5,710 a	5,554 abc	5,632
16-8-16	6,274 a	4,838 a-d	5,556
16-16-16	6,278 a	6,369 a	6,324
โพแทสเซียม (กก./ไร่)			
16-8-0	5,569 a	3,535 d	4,552
16-8-8	4,558 a	6,219 a	5,389
16-8-16	6,274 a	4,838 a-d	5,556
16-8-24	5,635 a	3,832 cd	4,733
ค่าเฉลี่ย	5,718	4,965	5,342

CV. (a) = 28.0 % CV.(b) = 17.5 % **พันธุ์** (V) = NS ,**ปุ๋ย** (F) = *, V x F = NS

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4. ผลของปุ๋ยเคมีต่อปริมาณแป้ง (เปอร์เซ็นต์) ของมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่ปลูกในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา ปี 2554 – 2555

อัตราปุ๋ย (F)	**พันธุ์มันสำปะหลัง** (V)		**ค่าเฉลี่ย**
N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่	**ห้วยบง 60**	**ระยอง 11**	
ไนโตรเจน (กก./ไร่)			
0-8-16	25.9 a	22.6 abc	24.2
8-8-16	26.5 a	26.8 a	26.6
16-8-16	28.7 a	19.7 bc	24.2
24-8-16	27.2 a	24.8 a	26.0
ฟอสฟอรัส (กก./ไร่)			
16-0-16	25.9 a	26.4 a	26.1
16-8-16	28.7 a	19.7 bc	24.2
16-16-16	25.5 a	27.2 a	26.3
โพแทสเซียม (กก./ไร่)			
16-8-0	19.3 a	18.6 c	19.0
16-8-8	24.8 a	27.5 a	26.2
16-8-16	28.7 a	19.7 bc	24.2
16-8-24	25.9 a	18.8 c	22.4
ค่าเฉลี่ย	25.5	23.6	24.6

CV. (a) = 23.3 % CV.(b) = 12.8 % **พันธุ์** (V) = NS ,**ปุ๋ย** (F) = **, V x F = *

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 5. ผลของปุ๋ยเคมีต่อผลผลิตแป้ง (กิโลกรัมต่อไร่) ของมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่ปลูกในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา ปี 2554 – 2555

อัตราปุ๋ย (F)	**พันธุ์มันสำปะหลัง** (V)		**ค่าเฉลี่ย**
N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่	**ห้วยบง 60**	**ระยอง 11**	
ไนโตรเจน (กก./ไร่)			
0-8-16	1,396 ab	872 c	1,134
8-8-16	1,608 ab	1,215 abc	1,412
16-8-16	1,796 a	959 bc	1,378
24-8-16	1,623 ab	1,487 ab	1,555
ฟอสฟอรัส (กก./ไร่)			
16-0-16	1,457 ab	1,469 ab	1,463
16-8-16	1,796 a	959 bc	1,378
16-16-16	1,605 ab	1,730 a	1,667
โพแทสเซียม (กก./ไร่)			
16-8-0	1,049 b	650 c	849
16-8-8	1,110 b	1,729 a	1,420
16-8-16	1,796 a	959 bc	1,378
16-8-24	1,466 ab	674 c	1,070
ค่าเฉลี่ย	1,457	1,198	1,327

CV. (a) = 36.9% CV.(b) = 23.2% **พันธุ์** (V) = NS , **ปุ๋ย** (F) = **, V x F = **

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 6. ต้นทุน รายได้ กำไรสุทธิ กำไรเพิ่ม ต้นทุนเพิ่ม และอัตราผลตอบแทนส่วนเพิ่ม (MRR) เมื่อจำหน่ายมันสำปะหลังในรูปหัวสดของการปลูกมันสำปะหลัง 2 พันธุ์ ที่ปลูกในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา ปี 2554 – 2555

ตำรับการทดลอง	ต้นทุน (บาท/ไร่)	รายได้ (บาท/ไร่)	กำไรสุทธิ (บาท/ไร่)	กำไรเพิ่ม (บาท/ไร่)	ต้นทุนเพิ่ม (บาท/ไร่)	MRR (%)
พันธุ์มันสำปะหลัง(V)						
ห้วยบง 60	5,231	11,254	6,023	-	-	-
ระยอง 11	4,929	9,555	4,626	-	-	-
ปุ๋ย(F) N-P_2O_5-K_2Oกก./ไร่						
ไนโตรเจน (กก./ไร่)						
0-8-16	4,588	8,973	4,385			
8-8-16	4,950	10,538	5,588	1,203	362	332
16-8-16	5,263	10,794	5,531	-	313	-
24-8-16	5,646	11,839	6,193	662	383	173
ฟอสฟอรัส (กก./ไร่)						
16-0-16	4,934	11,169	6,236	-	-	-
16-8-16	5,263	10,794	5,531	-	329	-
16-16-16	5,840	12,587	6,748	1, 217	577	211
โพแทสเซียม (กก./ไร่)						
16-8-0	4,368	8,061	3,693	-	-	-
16-8-8	4,959	10,728	5,769	2,076	591	351
16-8-16	5,263	10,794	5,531	-	304	-
16-8-24	5,172	8,949	3,777	-	-	-

ปี 2555 ราคาหัวมัน 2.10 บาท/กก. (แป้ง 30%) คิดลดลง % ละ 0.03 บาท/กก.

ค่าขุดและค่าขนส่งหัว 0.40 บาท/กก. ค่าปลูกและค่าใส่ปุ๋ย ดูแลรักษา 1,720 บาท/ไร่

ปุ๋ย 46 – 0 – 0 ราคา 11.80 บาท/กก. ปุ๋ย 18 – 46 – 0 ราคา 20.00 บาท/กก.

ปุ๋ย 0 – 0 – 60 ราคา 18.30 บาท/กก.

ศึกษาการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อน ในพื้นที่ดินร่วน – ร่วนปนทราย

Study the Response of Baby Corn to Fertilizer in Loamy - Sandy Loam Soils

บรรณพิชญ์ สัมฤทธิ์[1/] ชัชธนพร เกื้อหนุน[1/] สมควร คล้องช้าง[1/] ศุภกาญจน์ ล้วนมณี[2/]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ศึกษาการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อนในพื้นที่ดินร่วน – ร่วนปนทราย ที่ไร่เกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี รวม 2 ฤดูปลูก บนชุดดินคล้ายกำแพงแสน (Fine – loamy, mixed, semiactive, isohyperthermic Typic Haplustalfs) โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี 10 กรรมวิธี 3 ซ้ำ คือกรรมวิธีที่ 1) ใส่ปุ๋ยเคมี 0 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P–1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 2) 0.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 3) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 4) 1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 5) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 0 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 6) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 0.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 7) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 8) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 0 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 9) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 0.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K กรรมวิธีที่ 10) 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K ผลการศึกษา พบว่าในฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554 ผลการวิเคราะห์ดินก่อนปลูกดินมีปริมาณอินทรียวัตถุ 1.48 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 58.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 63.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ปริมาณความต้องการไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โดยการวิเคราะห์ดินก่อนปลูก 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 20 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ส่วนในฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555 ผลการวิเคราะห์ดินก่อนปลูกพบว่าดินมีปริมาณอินทรียวัตถุ 2.25 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 72 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้คำแนะนำโดยการวิเคราะห์ดินก่อนปลูก 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ มีค่าเท่ากับ 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ผลการศึกษาการเจริญเติบโตผลผลิตและการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อน พบว่า

[1/] กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

ในฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554 การใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงเฉลี่ยที่อายุ 30 วัน อยู่ในช่วง 75.4 – 92.7 เซนติเมตร ความสูงเฉลี่ยที่อายุ 44 วัน อยู่ในช่วง 120.8 – 136.6 เซนติเมตร จำนวนฝักต่อไร่เฉลี่ยอยู่ในช่วง 21,121 – 29,016 ฝักต่อไร่ น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1,648.8 – 2,148.5 กิโลกรัมต่อไร่ น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือกเฉลี่ยอยู่ในช่วง 322.0 – 442.7 กิโลกรัมต่อไร่ น้ำหนักสดต้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4,150.2 – 4,495.0 กิโลกรัมต่อไร่

ในฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555 พบว่ากรรมวิธีที่ให้จำนวนฝัก และน้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือกเฉลี่ยสูงสุด คือ การใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) จำนวน 29,061 ฝักต่อไร่ และ 524.9 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ รองลงมาได้แก่การใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 2 – 10 จำนวน 27,845 ฝักต่อไร่ และ 487.5 กิโลกรัมต่อไร่ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก พบว่ากรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมี 0 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกต่ำสุด คือ 1,804.6 กิโลกรัมต่อไร่ และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีอื่นๆ สำหรับกรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) มีแนวโน้มให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกสูงสุด คือ 2,430.4 กิโลกรัมต่อไร่ สำหรับคำแนะนำปริมาณความต้องการปุ๋ยในพื้นที่ดินร่วน – ร่วนปนทรายที่ทำการศึกษาในชุดดินคล้ายกำแพงแสน ที่มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง คือ การใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดินอัตรา 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่)

คำนำ

ในปัจจุบันข้าวโพดฝักสดจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย รัฐบาลมีการส่งเสริมการเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ของข้าวโพดให้สูงขึ้น โดยการใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ทันสมัย การปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่สามารถให้ผลผลิตสูง การใส่ปุ๋ย การควบคุมโรคและแมลง เพื่อให้พื้นที่ทางการเกษตรมีศักยภาพสูงสุดในการผลิตพืช ประเทศไทยส่งออกข้าวโพดฝักอ่อนเป็นอันดับ 1 ของโลก โดยในปี 2548 ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกข้าวโพดฝักอ่อนรวม 81,693 ตัน เป็นมูลค่า 2,436 ล้านบาท สำหรับพื้นที่ปลูกในปี 2550 – 2553 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวโพดฝักอ่อน 225,483 – 224,804 ไร่ ผลผลิตรวม 260,200 – 260,294 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 1,333 – 1,214 กิโลกรัมต่อไร่ แหล่งปลูกข้าวโพดฝักอ่อนที่สำคัญในภาคกลาง ได้แก่ ลพบุรี สระบุรี สิงห์บุรี ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ภาคเหนือ ได้แก่ กำแพงเพชร เชียงราย พิจิตร ลำพูน ข้าวโพดฝักอ่อนเป็นพืชที่ใช้ระยะเวลาในการปลูกค่อนข้างสั้นตั้งแต่วันปลูกจนถึงเก็บฝักอ่อนหมด จะใช้เวลาไม่เกิน 60 วัน ถ้าพื้นที่เพาะปลูกนั้นมีการจัดการดินและน้ำอย่างเหมาะสมจะสามารถปลูกข้าวโพดฝักอ่อนได้ 4 – 5 ครั้ง หมุนเวียนติดต่อกันตลอดทั้งปี ลักษณะดินที่เหมาะสมสำหรับการปลูกข้าวโพดฝักอ่อนควรเป็นดินร่วน หรือดินร่วนเหนียวปนทราย หรือดินร่วนปนทรายมีความอุดมสมบูรณ์สูง มีอินทรียวัตถุไม่น้อยกว่า 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้มากกว่า 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การระบายน้ำและถ่ายเทอากาศดี ระดับหน้าดินลึก 25 – 30 เซนติเมตร และมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 5.5 – 6.8

ความต้องการธาตุอาหารของข้าวโพดโดยเฉพาะธาตุอาหารหลัก พบว่า ธาตุไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อข้าวโพดตลอดอายุการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะแรกของการเจริญเติบโตจนถึงการสร้างเมล็ด ระยะที่ข้าวโพดต้องการธาตุไนโตรเจนมากที่สุด คือ ระยะที่ข้าวโพดออกดอกตัวผู้และตัวเมีย (สันติ และคณะ, 2544) ธาตุอาหารฟอสฟอรัส

ก็จัดว่าเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตไม่น้อยกว่าธาตุไนโตรเจน จากการศึกษา พบว่า ข้าวโพดตอบสนองต่อปุ๋ยฟอสฟอรัสตลอดฤดูปลูกเช่นกัน แต่มีความต้องการในระยะเริ่มแรกของการเจริญเติบโตมากกว่าในระยะอื่นๆ พวงเล็ก และนงลักษณ์ (2543) ได้ศึกษาการดูดใช้ธาตุอาหารของข้าวโพดฝักอ่อนในสภาพสวนและสภาพไร่ พบว่า ข้าวโพดฝักอ่อนมีการดูดใช้ธาตุไนโตรเจนสูงสุด รองลงมาเป็นโพแทสเซียม ส่วนฟอสฟอรัสจะถูกนำไปใช้ในปริมาณน้อยมาก ดังนั้น การใส่ปุ๋ยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้พืชดูดใช้เพื่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิต

เนื่องจากข้าวโพดฝักอ่อนแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะประจำพันธุ์ และมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน ดังนั้นการนำข้าวโพดฝักอ่อนต่างสายพันธุ์กันไปปลูกในพื้นที่ที่มีสภาพดินและสภาพภูมิอากาศเดียวกันอาจให้ผลผลิตต่างกัน ขึ้นอยู่กับศักยภาพของแต่ละพันธุ์ ในขณะเดียวกันการปลูกข้าวโพดฝักอ่อนสายพันธุ์เดียวกันในพื้นที่ที่มีสภาพดินและสภาพภูมิอากาศต่างกัน การให้ผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อนในแต่ละพื้นที่ก็จะแตกต่างกันด้วย ทั้งนี้เนื่องจากดินในแต่ละพื้นที่มีศักยภาพต่างกันทั้งในด้านของลักษณะทางกายภาพ เช่น เนื้อดิน ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความหนาแน่นรวมของดิน และลักษณะทางเคมี ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อน ดังนั้นหากทราบถึงความต้องการธาตุอาหารและการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อนที่เหมาะสมกับสายพันธุ์และพื้นที่ปลูก ก็สามารถให้คำแนะนำในการจัดการธาตุอาหารพืชในการผลิตข้าวโพดฝักอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ปุ๋ยเคมี ได้แก่ ยูเรีย (46 – 0 – 0) ทริปเปิลซูเปอร์ฟอสเฟต (0 – 46 – 0) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (0 – 0 – 60) สารกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืช เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดฝักอ่อนพันธุ์ ซี.พี.B.468 ถุงตาข่ายขนาด 50 x 75 เซนติเมตร ถุงกระดาษ ถุงพลาสติก สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช จอบ เสียม พลั่วมือ กระบอกเก็บดิน ระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ดิน

วิธีการ

ทำการสำรวจและคัดเลือกพื้นที่ โดยดำเนินการทดลองในชุดดินคล้ายกำแพงแสน (Fine – loamy, mixed, semiactive, isohyperthermic Typic Haplustalfs) และเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร จากแปลงที่คัดเลือกแบบสุ่มทั่วทั้งแปลง ทำการวิเคราะห์สมบัติดินขั้นพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ทำการปลูกข้าวโพด 2 ฤดูกาลปลูกใน 2 ปี โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี 10 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1) ใส่ปุ๋ยเคมี ***0 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N*** – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K

กรรมวิธีที่ 2) ใส่ปุ๋ยเคมี ***0.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N*** – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K

กรรมวิธีที่ 3) ใส่ปุ๋ยเคมี ***1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K***

กรรมวิธีที่ 4) ใส่ปุ๋ยเคมี ***1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N*** – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K

กรรมวิธีที่ 5) ใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – ***0 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P*** – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K

กรรมวิธีที่ 6) ใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – ***0.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P*** – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K

กรรมวิธีที่ 7) ใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – ***1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P*** – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K

กรรมวิธีที่ 8) ใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – ***0 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K***

กรรมวิธีที่ 9) ใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – ***0.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K***

กรรมวิธีที่ 10) ใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N – 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P – ***1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K***

ไถเตรียมดินและปรับระดับพื้นที่ให้เหมาะสมสำหรับทำการทดลองโดยเตรียมแปลงย่อยขนาด 4.5 x 6.0 เมตร จำนวน 30 แปลงย่อย แล้วทำการปลูกข้าวโพดฝักอ่อน จำนวน 3 เมล็ดต่อหลุม ปล่อยให้ต้นข้าวโพดโตประมาณ 10 วัน ถอนแยกให้เหลือ 2 ต้นต่อหลุม โดยเลือกต้นที่สมบูรณ์ที่สุด โดยใช้ระยะปลูก 0.5 x 0.5 เมตร (แปลงละ 9 แถวๆ ละ 24 ต้น) โดยตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมจะทำการใส่รองพื้นก่อนปลูก ส่วนตำรับการทดลองที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนจะทำการแบ่งใส่ 2 ครั้ง คือรองพื้นก่อนปลูกและเมื่ออายุได้ 30 วัน โดยใส่สองข้างของแถวปลูกพร้อมพรวนดินกลบ ดูแลกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืช วัดความสูงของต้นข้าวโพดเมื่ออายุ 30 และ 44 วัน เมื่อข้าวโพดเริ่มให้ช่อดอกตัวผู้ทำการตัดช่อดอกทิ้ง (detasseling) เก็บเกี่ยวข้าวโพดเมื่อไหมพ้นจากปลายฝักประมาณ 1 – 2 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวทุกวันจนไม่สามารถให้ฝักอ่อนได้ บันทึกข้อมูลจำนวนฝัก ผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกและปอกเปลือก น้ำหนักสดต้น

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง 1. ไร่เกษตรกร ตำบลตระคร้ำเอน อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พิกัด 47 0582481^{E}, 15 44450^{N}

2. กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินก่อนทดลอง

เก็บตัวอย่างดินสุ่มทั่วแปลงที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตรจากผิวดิน เพื่อวิเคราะห์หาสมบัติทางกายภาพ พบว่าดินมีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ซึ่งอยู่ในกลุ่มดินร่วน เนื้อละเอียดปานกลาง มีการแจกกระจายของอนุภาคขนาดทราย ทรายแป้ง และดินเหนียว เท่ากับ 49, 26 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความหนาแน่นรวมอยู่ในระดับปานกลาง คือ 1.58 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร โดยวิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยข้าวโพดฝักสดในแต่ละกรรมวิธี (กรมวิชาการเกษตร, 2553) ดังแสดงตารางที่ 1

ฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554 ปลูกในช่วงเดือนมิถุนายน – สิงหาคม ผลการวิเคราะห์ดิน พบว่าดินมีปฏิกิริยาดิน เป็นด่างเล็กน้อย (pH 7.6) มีปริมาณอินทรียวัตถุ 1.48 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 58.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 63.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้คำแนะนำปริมาณความต้องการไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โดยการวิเคราะห์ดินก่อนปลูกมีค่าเท่ากับ 20 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) โดย 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N คือ 20 กก. N ต่อไร่ 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P คือ 4 กก. P_2O_5 ต่อไร่ และ 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K คือ 10 กก. K_2O ต่อไร่

ฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555 ปลูกในช่วงเดือนมกราคม – มีนาคม ผลการวิเคราะห์ดินพบว่าพบว่าดินมีปฏิกิริยาดินเป็นด่างเล็กน้อย (pH 7.6) ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุ 2.25 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 72 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้คำแนะนำปริมาณความต้องการไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โดยการวิเคราะห์ดินก่อนปลูกมีค่าเท่ากับ 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) โดย 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ N คือ 15 กก. N ต่อไร่ 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ P คือ 4 กก. P_2O_5 ต่อไร่ และ 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ K คือ 10 กก. K_2O ต่อไร่

จากผลวิเคราะห์ดินก่อนปลูกฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555 พบว่ามีปริมาณอินทรียวัตถุสูงขึ้นคือจาก 1.48 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.25 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในการปลูกฤดูที่ 1 ปี 2554 เป็นช่วงฤดูฝน คือ ช่วงเดือนมิถุนายน – สิงหาคม ปริมาณอินทรียวัตถุจะมีความผันแปรขึ้นกับปริมาณฝนที่ตก การที่ฝนตกมากพืชพรรณเจริญเติบโตดี อินทรียวัตถุในดินมีค่ามากตามไปด้วย (อภิศักดิ์, 2543) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการเจริญเติบโตของการปลูกฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554 ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าน้ำหนักสดต้นเฉลี่ยสูงถึง 4,150 – 4,495 กิโลกรัมต่อไร่ ส่งผลให้ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุสูงขึ้นคือจาก 1.48 เปอร์เซ็นต์ เป็น 2.25 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้อินทรียวัตถุในดินยังได้มาจากรากของพืชอีกด้วย (วิโรจ, 2531) ปริมาณไนโตรเจนรวมมีความสัมพันธ์กับปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ความเป็นประโยชน์ของไนโตรเจนในดินขึ้นกับการเปลี่ยนรูปของไนโตรเจนอินทรีย์เป็นไนโตรเจนอนินทรีย์เพียงอย่างเดียว (Mengesha, 2004) จึงส่งผลให้การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2553) ในฤดูปลูกที่ 2 ลดลงจากในฤดูปลูกที่ 1 ที่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 20 กก. N ต่อไร่ เหลือเพียง 15 กก. N ต่อไร่

ตารางที่ 1. แสดงการใส่ปุ๋ยเคมีในแต่ละกรรมวิธีของการปลูกฤดูปลูกที่ 1 และ 2

กรรมวิธี	ฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554	ฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555
กรรมวิธีที่ 1	**0**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	**0**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 2	**10**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	**7.5**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 3	**20-4-10** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	**15-4-10** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 4	**30**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	**22.5**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 5	20-**0**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	15-**0**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 6	20-**2**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	15-**2**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 7	20-**6**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	15-**6**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 8	20-4-**0** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	15-4-**0** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 9	20-4-**5** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	15-4-**5** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
กรรมวิธีที่ 10	20-4-**15** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	15-4-**15** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่

2. การเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อน

2.1 ฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554

2.1.1 ความสูงของต้นข้าวโพด อายุ 30 วัน

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 75.4 – 92.7 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2

2.1.2 ความสูงของต้นข้าวโพด อายุ 44 วัน

พบว่า การใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกันกับความสูงของต้นข้าวโพดที่อายุ 30 วัน โดยมีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 120.8 – 136.6 เซนติเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2

2.1.3 จำนวนฝัก

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนฝักต่อไร่เฉลี่ยอยู่ในช่วง 21,121 – 29,016 ฝักต่อไร่ ดังแสดงในตารางที่ 2

2.1.4 น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยทั้งเปลือกอยู่ในช่วง 1,648.8 – 2,148.5 กิโลกรัมต่อไร ดังแสดงในตารางที่ 2

2.1.5 น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือก

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยหลังปอกเปลือกอยู่ในช่วง 322.0 – 442.7 กิโลกรัมต่อไร ดังแสดงในตารางที่ 2

2.1.6 น้ำหนักสดต้น

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีทั้ง 10 กรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักสดต้นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4,150.2 – 4,495.0 กิโลกรัมต่อไร ดังแสดงในตารางที่ 2

2.2 ฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555

2.2.1 ความสูงของต้นข้าวโพด อายุ 30 วัน

พบว่ากรรมวิธีที่ 8 การใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 0 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวโพดที่อายุ 30 วันสูงสุด คือ 103.7 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 9 การใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 5 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ซึ่งให้ความสูงเฉลี่ยต่ำสุด คือ 83.8 เซนติเมตร แต่ทั้งสองกรรมวิธีนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น

2.2.2 ความสูงของต้นข้าวโพด อายุ 44 วัน

พบว่ากรรมวิธีที่ 10 การใส่ปุ๋ยเคมี 15-4-15 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้ความสูงเฉลี่ยของต้นข้าวโพดที่อายุ 44 วันสูงสุด คือ 124.8 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 9 การใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 5 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ซึ่งให้ความสูงเฉลี่ยต่ำสุด คือ 106.4 เซนติเมตร แต่ทั้งสองกรรมวิธีนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น

2.2.3 จำนวนฝัก

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน กรรมวิธีที่ 3 การใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้ผลผลิตจำนวนฝักต่อไร่สูงสุด คือ 29,061 ฝักต่อไร่ และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 1 การใส่ปุ๋ยเคมี 0 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ซึ่งไม่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และให้ผลผลิตต่ำสุด คือ 21,983 ฝักต่อไร่

2.2.4 น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก

พบว่ากรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมี 0 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกต่ำสุด คือ 1,804.6 กิโลกรัมต่อไร่ และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมี 7.5 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมี 22.5 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยเคมี 15-0-10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 2 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 8 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 0 (กก.N –

P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) กรรมวิธีที่ 9 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 5 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) และกรรมวิธีที่ 10 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 15 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) โดยให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกอยู่ที่ 2,169.4 2,430.4 2,174.8 2,122.3 2,291.0 2,259.7 2,169.9 และ 2,137.6 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) มีแนวโน้มให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกสูงสุด คือ 2,430.4 กิโลกรัมต่อไร่

2.2.5 น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือก

พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมี 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดิน กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือกสูงสุด คือ 524.9 กิโลกรัมต่อไร่ และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมี 0 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ซึ่งไม่มีการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน และกรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 0 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ซึ่งไม่มีการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัส และให้ผลผลิตต่ำสุดคือ 384.1 และ 369.4 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ

2.2.6 น้ำหนักสดต้น

พบว่า กรรมวิธีที่ 8 ใส่ปุ๋ยเคมี 15 – 4 – 0 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้น้ำหนักสดต้นสูงสุด คือ 3,294.9 กิโลกรัมต่อไร่ และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 1 ใส่ปุ๋ยเคมี 0 – 4 – 10 (กก. N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้น้ำหนักสดต้นต่ำสุด คือ 2,336.5 กิโลกรัมต่อไร่ แต่ทั้งสองกรรมวิธีนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น

ตารางที่ 2. ผลของการจัดการปุ๋ยต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อน ฤดูปลูกที่ 1 ปี 2554

กรรมวิธี	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)		น้ำหนักฝักอ่อนสด (กก./ไร่)		จำนวนฝัก	น้ำหนักสด
	30 วัน	44 วัน	ทั้งเปลือก	ปอกเปลือก	(ฝัก/ไร่)	ตอซัง (กก./ไร่)
1) **0**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	87.7 a	129.3 a	1,964.8 a	361.8 a	24,776 a	4,302.5 a
2) **10**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	86.2 a	132.4 a	1,903.5 a	402.4 a	26,391 a	4,168.8 a
3) **20-4-10** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	79.1 a	129.0 a	1,790.3 a	361.3 a	24,658 a	4,319.3 a
4) **30**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	81.2 a	126.9 a	1,648.8 a	323.4 a	22,130 a	4,329.9 a
5) 20-**0**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	88.6 a	130.0 a	1,940.7 a	375.7 a	27,775 a	4,349.3 a
6) 20-**2**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	79.7 a	120.8 a	1,713.4 a	342.4 a	23,219 a	4,477.9 a
7) 20-**6**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	85.1 a	127.3 a	1,862.9 a	377.4 a	24,758 a	4,295.1 a
8) 20-4-**0** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	93.4 a	136.6 a	2,148.5 a	442.7 a	29,016 a	4,395.3 a
9) 20-4-**5** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	75.4 a	122.0 a	1,525.2 a	322.0 a	21,121 a	4,150.2 a
10) 20-4-**15** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	92.7 a	135.2 a	2,120.0 a	410.0 a	27,759 a	4,495.0 a
เฉลี่ย	84.9	128.9	1,862	371.9	25,160	4,328
CV (%)	11.7	6.6	18.3	17.9	19.3	5.1

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันทางด้านสดมภ์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3. ผลของการจัดการปุ๋ยต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อน ฤดูปลูกที่ 2 ปี 2555

กรรมวิธี	ความสูงเฉลี่ย (ซม.)		น้ำหนักฝักอ่อนสด (กก./ไร่)		จำนวนฝัก	น้ำหนักสด
	30 วัน	44 วัน	ทั้งเปลือก	ปอกเปลือก	(ฝัก/ไร่)	ตอซัง (กก./ไร่)
1) **0**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	93.5 ab	111.2 ab	1,804.6 b	384.1 cd	21,983 c	2,336.5 b
2) **10**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	97.1 ab	119.1 ab	2,169.4 a	462.4 abc	25,730 abc	2,914.6 ab
3) **20-4-10** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	90.8 ab	113.8 ab	2,430.4 a	524.9 a	29,061 a	2,672.5 ab
4) **30**-4-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	88.2 ab	113.1 ab	2,174.8 a	464.8 abc	25,266 abc	2,724.9 ab
5) 20-**0**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	98.5 ab	120.6 ab	2,122.3 a	369.4 d	23,404 c	2,806.7 ab
6) 20-**2**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	89.9 ab	109.6 ab	2,291.0 a	487.5 ab	27,845 ab	2,728.9 ab
7) 20-**6**-10 กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	93.0 ab	113.1 ab	2,093.4 ab	438.3 a-d	24,389 bc	3,054.7 ab
8) 20-4-**0** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	103.7 a	119.5 ab	2,259.7 a	474.9 abc	24,879 abc	3,294.9 a
9) 20-4-**5** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	83.8 b	106.4 b	2,169.9 a	465.4 abc	26,075 abc	2,686.7 ab
10) 20-4-**15** กก.N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่	101.2 ab	124.8 a	2,137.6 a	403.4 bcd	23,119 c	3,140.0 ab
เฉลี่ย	94.0	115.1	2,165	447.5	25,175	2,836
CV (%)	9.9	7.8	8.0	10.7	9.0	15.8

หมายเหตุ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันทางด้านสดมภ์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

จากผลการศึกษาการจัดการปุ๋ยในแบบต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อนนั้น (ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3) พบว่าทั้ง 2 ฤดูกาลปลูก มีความแตกต่างกันในเรื่องการเจริญเติบโตและผลผลิต คือ ในการปลูกครั้งที่ 1 ปี 2554 มีน้ำหนักสดต้นเฉลี่ยอยู่ที่ 4,328 กิโลกรัมต่อไร่ สูงกว่าในการปลูกครั้งที่ 2 ปี 2555 ที่มีน้ำหนักสดต้นเฉลี่ยมีเพียง 2,836 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นผลมาจากฤดูกาลธรรมชาติ โดยในการปลูกครั้งที่ 1 ปี 2554 ปลูกในช่วงเดือนมิถุนายน – สิงหาคม ซึ่งเป็นฤดูฝน ส่วนการปลูกครั้งที่ 2 ปี 2555 ปลูกในช่วงเดือนมกราคม – มีนาคม ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่มีฝนตก การที่มีปริมาณน้ำฝนมากนั้นย่อมส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ดีกว่า เนื่องเป็นผลมาจากในขณะที่ฝนตกการเกิดฟ้าแลบ (lightning) แก๊สไนโตรเจน (N_2) ในอากาศจะถูกออกซิไดส์ให้กลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) และไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งจะละลายในน้ำฝนตกลงมายังผิวดินแล้วช่วยเพิ่มธาตุไนโตรเจนให้แก่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) ซึ่งเป็นการเพิ่มเติมไนโตรเจนลงไปอีกจากที่ใส่ลงไปแล้วในแต่ละกรรมวิธี และในขณะเดียวกันดินที่ทำการศึกษาเป็นดินร่วน ร่วนปนทราย มีการระบายอากาศดีไนโตรเจนส่วนใหญ่อยู่ในรูปไนเทรต ซึ่งพืชก็สามารถเจริญเติบโตได้ดีแม้จะได้รับเฉพาะรูปไนเทรตเพียงอย่างเดียว (ยงยุทธ, 2546) หากพืชได้รับปุ๋ยไนโตรเจนที่สูงจะช่วยยืดอายุใบแก่ และยังกระตุ้นให้พืชเติบโตต่อไปอีกในด้านลำต้น และใบ (Yoshida *et al.*, 1969) ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้การปลูกครั้งที่ 1 ปี 2554 มีผลการเจริญเติบโตที่สูง และส่งผลให้การศึกษาทางด้านผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อนไม่แตกต่างกันทางสถิติด้วย จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้ทราบว่าการปลูกข้าวโพดฝักอ่อนในช่วงที่มีฝนตก จะมีการเจริญเติบโตดีกว่าช่วงที่ไม่มีฝน แต่การปลูกในช่วงที่ไม่มีฝนจะให้ผลผลิตสูงกว่าช่วงที่มีฝนตก ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 พบว่า ในการปลูกครั้งที่ 2 ปี 2555 จำนวนฝัก

เฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกและปอกเปลือกเฉลี่ย เท่ากับ 25,175 ฝักต่อไร่ 2,165.3 และ 447.5 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการปลูกครั้งที่ 1 ปี 2554 ซึ่งมีจำนวนฝักเฉลี่ย น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกและปอกเปลือกเฉลี่ย เท่ากับ 25,160 ฝักต่อไร่ 1,861.8 และ 371.9 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลนี้ในการตัดสินใจในการเลือกช่วงเวลาในการปลูกได้

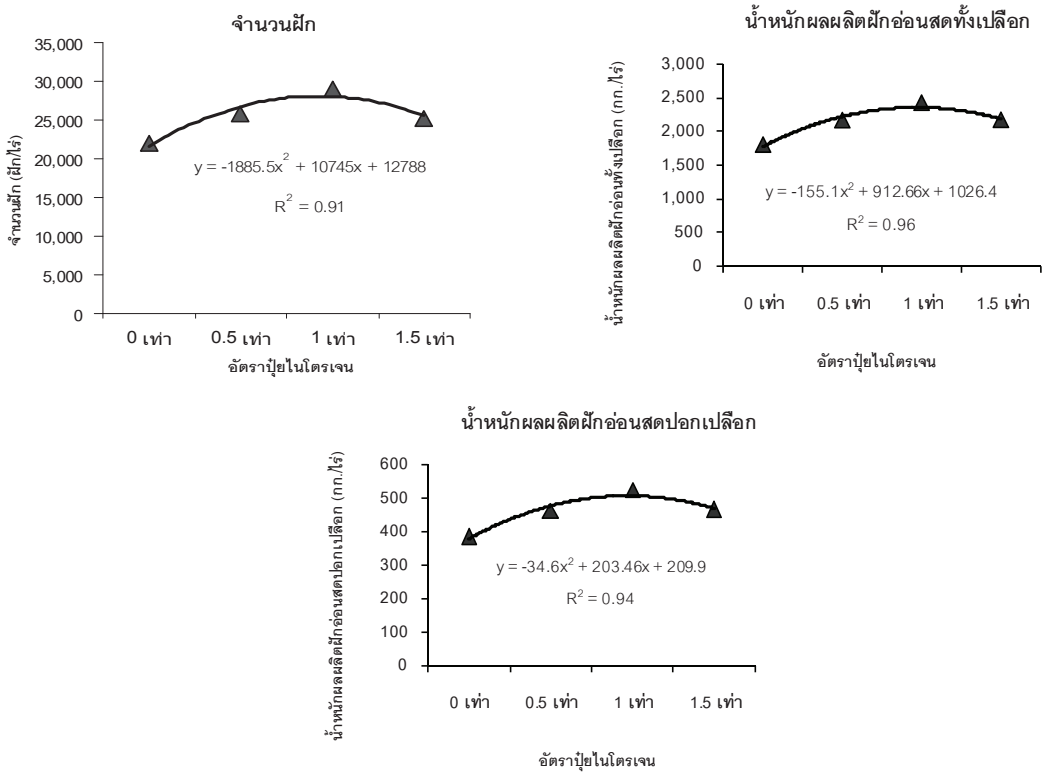
3. การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ต่อผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อน

พบว่าผลการทดลองเห็นผลชัดเจนในเรื่องของการตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในการปลูกครั้งที่ 2 ปี 2555 โดยเฉพาะเรื่องผลผลิต คือ จำนวนฝัก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือก พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมี ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ที่ระดับสูงขึ้นจากค่าวิเคราะห์ดินจะส่งผลให้ผลผลิตลดลง จากการศึกษากราฟการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อนระหว่างผลผลิต (แกน y) กับปริมาณปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมใน 4 อัตรา คือ 0, 0.5, 1 และ 1.5 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดิน (แกน x) ดังแสดงในภาพที่ 1, 2 และ 3 พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O) ต่อไร่ ซึ่งเป็นปุ๋ยอัตรา 1 เท่าของค่าวิเคราะห์ดิน เพียงพอต่อการให้ผลผลิตของข้าวโพดฝักอ่อน ส่งผลให้ผลผลิต คือ จำนวนฝัก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือกสูงสุด คือ 29,061 ฝักต่อไร่ 2,430.4 กิโลกรัมต่อไร่ และ 524.9 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ จากกราฟจะเห็นได้ว่าหากใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในอัตรา 1.5 เท่าของค่าวิเคราะห์ดิน คือ ส่งผลให้ผลผลิตข้าวโพดฝักอ่อนลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังนี้

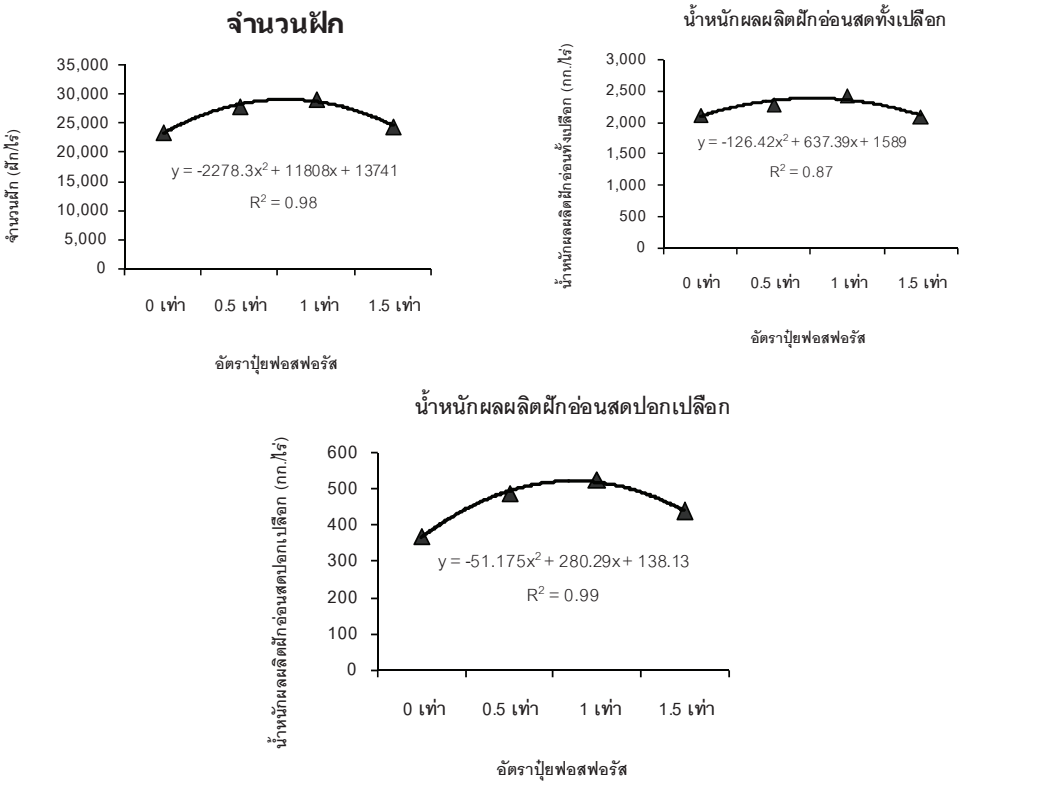
การตอบสนองของปุ๋ยไนโตรเจน ที่ระดับ 1.5 เท่าของค่าวิเคราะห์ N 22.5 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) พบว่า จำนวนฝักต่อไร่ลดลงจากการให้ปุ๋ย 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดิน 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O) จากที่เคยได้ผลผลิตฝัก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือก 29,061 ฝักต่อไร่ 2,430.4 กิโลกรัมต่อไร่ และ 524.9 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ เหลือเพียง 25,266 ฝักต่อไร่ 2,174.8 กิโลกรัมต่อไร่ 464.8 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การตอบสนองของปุ๋ยฟอสฟอรัส ที่ระดับ 1.5 เท่าของค่าวิเคราะห์ P 15 – 6 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) พบว่า จำนวนฝักต่อไร่ลดลงจากการให้ปุ๋ย 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดิน 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) จากที่เคยได้ผลผลิตฝัก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือก 29,061 ฝักต่อไร่ 2,430.4 กิโลกรัมต่อไร่ และ 524.9 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ เหลือเพียง 24,389 ฝักต่อไร่ 2,093.4 กิโลกรัมต่อไร่ และ 438.3 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

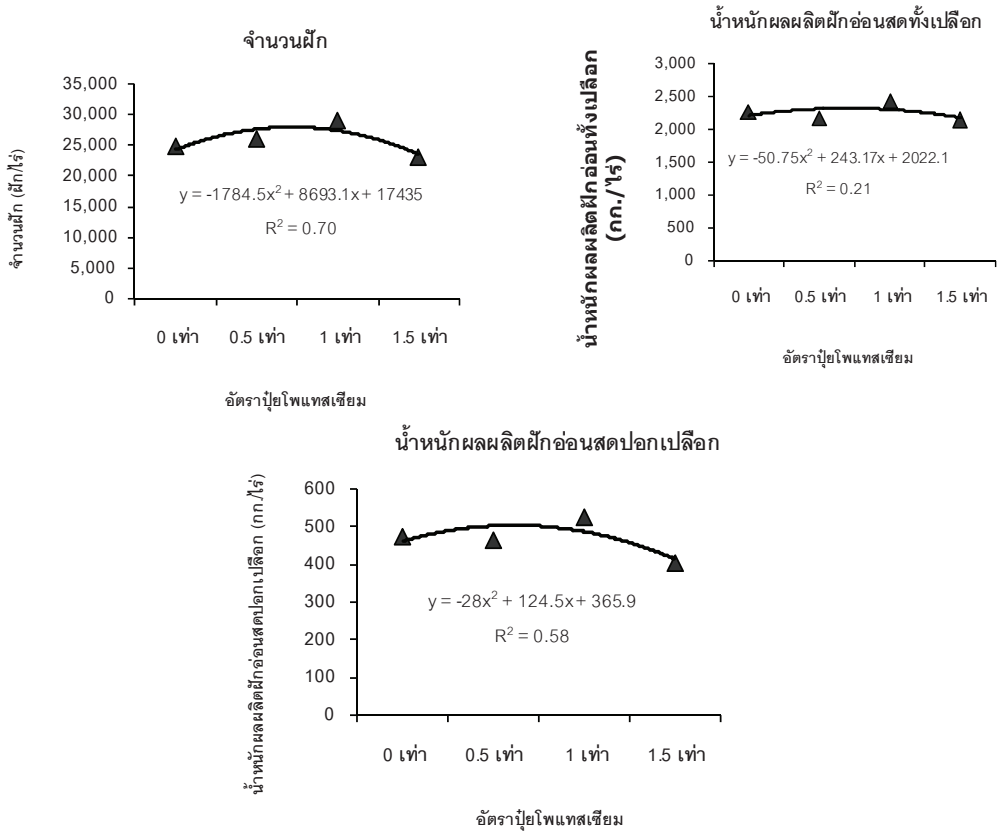
การตอบสนองของปุ๋ยโพแทสเซียม ที่ระดับ 1.5 เท่าของค่าวิเคราะห์ K 15 – 4 – 15 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) พบว่า จำนวนฝักต่อไร่ลดลงจากการให้ปุ๋ย 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดิน 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) จากที่ได้ผลผลิตฝัก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือก น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดปอกเปลือก 29,061 ฝักต่อไร่ 2,430.4 กิโลกรัมต่อไร่ และ 524.9 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ เหลือเพียง 23,119 ฝักต่อไร่ 2,137.6 กิโลกรัมต่อไร่ และ 403.4 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 1. แสดงการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนของผลผลิตข้าวโพดฝักอ่อน ปี 2555



ภาพที่ 2. แสดงการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยฟอสฟอรัสของผลผลิตข้าวโพดฝักอ่อน ปี 2555



ภาพที่ 3. แสดงการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมของผลผลิตข้าวโพดฝักอ่อน ปี 2555

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยของข้าวโพดฝักอ่อนในพื้นที่ดินร่วน-ร่วนปนทราย ซึ่งศึกษาที่ไร่เกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี มีการปลูก 2 ฤดูกาลปลูก บนชุดดินคล้ายกำแพงแสน ซึ่งมีลักษณะดินอยู่ในกลุ่มดินร่วนเนื้อละเอียดปานกลาง มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลางและเป็นแหล่งปลูกข้าวโพดฝักอ่อนแหล่งใหญ่ พบว่า

1. การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในอัตรา 15 – 4 – 10 (กก.N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่) ให้น้ำหนักผลผลิตฝักอ่อนสดทั้งเปลือกและปอกเปลือก และจำนวนฝักสูงสุด ซึ่งเป็นการใช้ปุ๋ย 1 เท่าตามค่าวิเคราะห์ดินตามคำแนะการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจสำหรับข้าวโพดฝักสดของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งเพียงพอแล้วกับดินลักษณะดินร่วน - ร่วนปนทรายที่ทำการศึกษา

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในชุดดินต่างๆ ที่มีการปลูกข้าวโพดฝักอ่อนแบบต่อเนื่องระยะยาว เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติและการให้ผลผลิตของดิน

3. ในพื้นที่ที่มีการทำการเกษตรอย่างต่อเนื่อง มีการปลูกพืชอยู่ตลอดส่งผลให้ดินมีอินทรียวัตถุในดินเพิ่มขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการวิเคราะห์ดินก่อนปลูกอยู่เสมอๆ เพื่อประเมินสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดิน และสามารถกำหนดปริมาณปุ๋ยที่ใส่ลงไปได้ และเพียงพอต่อการเจริญเติบโตและสามารถให้ผลผลิตที่สูง

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ไปขยายผลหรือปรับใช้กับชุดดินอื่นที่มีลักษณะของดินคล้ายคลึงกัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับนักวิชาการเกษตรสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยด้านดินและปุ๋ยได้อย่างถูกหลักวิชาการ และสามารถให้คำแนะนำการจัดการดินและการใช้ปุ๋ยแก่เกษตรกรได้อย่างถูกต้อง

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2553. **คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ**. กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. **ปฐพีวิทยาเบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

พวงเล็ก โมรากุล และนงลักษณ์ วิบูลสุข. 2543. การประเมินสมบัติทางเคมีของดินที่ปลูกข้าวโพดฝักอ่อนในจังหวัดราชบุรี. **ผลงานวิจัยฉบับเต็ม**. กลุ่มงานวิจัยเคมีดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2546. **ธาตุอาหารพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

วิโรจ อิ่มพิทักษ์. 2531. **การจัดการดิน เล่ม 1**. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สันติ ธีราภรณ์ ดิสสพันธุ์ ธรรมาภิรมย์ มงคล พานิชกุล และ สุทัย วุธรา. 2544. การตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจนของข้าวโพดฝักอ่อนลูกผสม 3 พันธุ์. **การประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 30**. 20 สิงหาคม 2544. ณ โรงแรมเนวาด้า แกรนด์. จังหวัดอุบลราชธานี.

อภิศักดิ์ โพธิ์ปั้น. 2543. **ดินเขตร้อน**. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

Mengesha, Y.G.S. 2004. **Modeling of Nitrogen and Phosphorus Fertilizer Recommendations for Maize (Zea Mays L.) Grown on Alfisols of Northwestern Ethiopia**. Ph.D. dissertation, Kasetsart University.

Yoshida, S., S.A. Tadano and E.A. Ramirez. 1969. Effects of silica and nitrogen supply on some leaf characteristic of the rice plant. **Plant and Soil** 31 : 48-56.

การปรับปรุงดินด้วยวัสดุอินทรีย์ ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยเคมี เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพผลผลิตมันสำปะหลังระยะยาวในดิน 3 ชุดดิน

Cassava Long – Term Fertility Trials in 3 Soils Series

สมควร คล้องช้าง [1] กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ[2] เสาวรี บำรุง[3] วัลลีย์ อมรพล[4] อนุศาสตร์ สุ่มมาตย์[3]
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของประเทศในปี 2553 มีประมาณ 7.56 ล้านไร่ ส่วนใหญ่จัดเป็นดินทราย ดินร่วนทราย มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ อยู่ในสภาพต้องอาศัยน้ำฝนซึ่งมีปัญหาต่อการผลิตพืช และมันสำปะหลังเป็นพืชความหวังของเกษตรกรด้อยโอกาสที่เพาะปลูกมันสำปะหลังมาอย่างต่อเนื่องมากกว่า 50 ปี มีการบำรุงรักษาดินที่ไม่เหมาะสม และประกอบกับลักษณะพื้นที่เป็นลอนคลื่นมีความลาดเอียง ยิ่งเป็นการเพิ่มการสูญหายหน้าดินจากการพัดพาของน้ำฝน คุณภาพดินเสื่อมโทรม ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังจึงลดต่ำลงมาก

การทดลองระยะยาวของการใส่วัสดุอินทรีย์สับกลบต้นใบมัน ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพผลผลิตมันสำปะหลังในดิน 3 ชุดดิน เพื่อให้ได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินปลูกมันสำปะหลัง การเจริญเติบโต และผลผลิตที่มีคุณภาพ ดำเนินการในปีแรกเมื่อปี 2518 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จังหวัดระยอง เป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ชุดดินห้วยโป่ง (Clayey, mixed, Typic Paleudults) ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เป็นดินร่วนทราย ชุดดินโคราช (Fine-loamy, siliceous, Oxic Paleustults) และปี 2519 จัดทำการทดลองเพิ่มอีก 1 แห่ง ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น เป็นดินร่วนทราย ชุดดินยโสธร (Fine-loamy, siliceous, Oxic Paleustults) วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ซึ่งประกอบด้วย 0 – 0 – 0, 16 – 0 – 0, 16 – 8 – 0, 16 – 0 – 16, 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ของ $N – P_2O_5 – K_2O$, 16 – 8 – 16 + ปุ๋ยอินทรีย์ อัตรา 1 ตันต่อไร่, 16 – 8 – 16 + สับกลบต้นใบมันสำปะหลัง อัตรา 3 ตันต่อไร่ และ 0 – 0 – 0+ สับกลบต้นใบมันสำปะหลัง อัตรา 3 ตันต่อไร่ ผลการศึกษาในฤดูปลูกปี 2554/55 พบว่าผลการทดลอง 37 ปี อย่างต่อเนื่องที่ จังหวัดระยอง และ จังหวัดนครราชสีมา และการทดลอง 36 ปีที่ จังหวัดขอนแก่น ทั้ง 3 สถานที่ปลูก แสดงผลชัดเจนของการตอบสนองต่อปุ๋ย การไม่ใช้ปุ๋ยกับมันสำปะหลังส่งผลให้ทั้งการเจริญเติบโตและผลผลิตลดลงมาก รวมทั้งสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินปลูกก็เกิดการเสื่อมโทรม โดยเฉพาะดินร่วนทรายชุดดินยโสธร จังหวัดขอนแก่น ซึ่งให้ผลผลิตหัวมันสด 1.01, 2.64 และ 0.92 ตันต่อไร่ ตามลำดับสำหรับวิธีการใช้ปุ๋ยเมื่อไม่ใช้ปุ๋ยโพแทชจะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังซึ่งลดลงมากกว่าวิธีการไม่

[1] กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

[3] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา

[4] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง

ใช้ปุ๋ยฟอสเฟต หรือไนโตเจนส่วนวิธีการไถกลบต้นใบมันสำปะหลังอัตรา 3 ตันต่อไร่ มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตที่ดีขึ้น การใช้ปุ๋ยกับมัน สำปะหลังที่สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูง 5 – 7.5 ตันต่อไร่ ควรใช้ปุ๋ยเคมีอย่างครบถ้วนของอัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ของ N – P_2O_5 – K_2O ร่วมกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1 ตันต่อไร่ หรือใช้ร่วมกับการไถกลบต้นใบมันสำปะหลังอัตรา 3 ตันต่อไร่ ก็สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตที่มีคุณภาพสูงกว่าวิธีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างครบถ้วนชนิดเดียว อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ และเป็นวิธีการที่รักษาหรือเพิ่มสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินอย่างยั่งยืน กล่าวโดยสรุปคือการผลิตมันสำปะหลังอย่างบูรณาการด้วยการใช้ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมอย่างเหมาะสมผสมผสานกับการไถกลบเศษซากพืช หรือวัสดุอินทรีย์ชนิดอื่น

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญของโลกและเป็นประเทศส่งออกผลิตภัณฑ์รายใหญ่ ในรูปของมันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมัน ประมาณร้อยละ 70 ของผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังสามารถนำรายได้เข้าประเทศปีละมากกว่า 3 หมื่นล้านบาท และปัจจุบันโลกเกิดการขาดแคลนพลังงาน ซึ่งมันสำปะหลังเป็นพืชความหวังเพื่อผลิตเอทานอลสำหรับทดแทนน้ำมันเบนซินซึ่งมีราคาแพงขึ้น และจะยิ่งขาดแคลนเพิ่มขึ้น (มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2545)

ปัจจัยปัญหาหลักในการผลิตมันสำปะหลังอย่างบูรณาการ ประกอบด้วย

1. ทรัพยากรดิน เป็นปัจจัยหลักพื้นฐาน
2. พันธุ์มันสำปะหลังที่เหมาะสมกับสภาพนิเวศน์เกษตรแต่ละท้องที่
3. ทรัพยากรน้ำ
4. ปัจจัยอื่นๆ ที่สามารถชักนำให้เกษตรตื่นตัวหันมาดูแลปรับปรุงบำรุงทั้งดินและพืชเพื่อเพิ่มผลผลิต คือ ราคาผลผลิตที่สูง และตรงข้ามกันค่าการลงทุนต้องต่ำ โดยเฉพาะปัจจัยที่ช่วยเพิ่มผลผลิตอันได้แก่ ปุ๋ยทรัพยากรดิน จัดเป็นปัจจัยหลักพื้นฐานในการผลิตมันสำปะหลัง พื้นที่สำหรับปลูกมันสำปะหลังของประเทศในปี 2553 ประมาณ 7.56 ล้านไร่ (www.oae.go.th/) พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือประมาณ 4.0 ล้านไร่ ครึ่งหนึ่งของประเทศ ที่เหลือก็กระจายไปในภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคเหนือตอนล่าง คุณสมบัติของดินร้อยละ 90 เป็นดินเนื้อหยาบ พวกดินทราย ดินร่วนทราย เป็นดินกรดมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ มีปริมาณอินทรียวัตถุ และธาตุอาหารพืชหลักที่เป็นประโยชน์ต่อพืชน้อย ความสามารถในการอุ้มน้ำได้น้อย เม็ดดินมีความเสถียรต่ำ มีปริมาณดินเหนียวต่ำ (ปิยะ, 2537) เนื่องจากสภาพพื้นที่เป็นลอนคลื่นมีความลาดเอียง และดินมีความอ่อนไหวต่อการเกิดการพังทลายสูญเสียมวลดินบนได้ง่าย จากกระบวนการกษัยการดิน (สมเจตน์, 2537) เมื่อต้องการผลิตพืช เช่นมันสำปะหลัง หรือพืชชนิดอื่นให้ได้ผลดี และมีความยั่งยืน จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีวิธีการปฏิบัติที่ถูกต้องและอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อปรับปรุงบำรุงรักษาดินให้มีความสามารถในการให้การเจริญเติบโตกับพืชสมบูรณ์ดีและผลผลิตพืชสูงเป็นที่น่าพอใจอยู่เสมอ

ทำไมดินปลูกมันสำปะหลังจึงเกิดการเสื่อมโทรมความอุดมสมบูรณ์ แท้จริงแล้วไม่ว่าจะเป็นพืชชนิดใดเมื่อมีการจัดการ ดิน น้ำ ธาตุอาหารพืช และการจัดการพืชไม่เหมาะสม ย่อมทำให้ดินเสื่อมความอุดมสมบูรณ์ลงเรื่อยๆ มีสาเหตุมาจากหลายประการ ได้แก่

1. ปลูกมันสำปะหลังโดยมีการปรับปรุงบำรุงดินไม่เหมาะสม มีการใช้ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ในปริมาณน้อยไม่เหมาะสม ไม่เพียงพอกับความต้องการของพืช ดินจะเสื่อมโทรมเร็วมาก

2. การจัดการดิน น้ำ และธาตุอาหารพืช ไม่เหมาะสม มีผลทำให้เกิดการสูญเสียดินและน้ำ ในปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง

3. การจัดการพืช พันธุ์ วิธีการปลูกและระบบการปลูกพืชที่ไม่เหมาะสม ทำให้เกิดผลต่อการลด ควบคุมหรือชลอการสูญเสียน้ำ ดินและธาตุอาหารพืช รวมทั้งการอนุรักษ์ และเพิ่มพูนปริมาณอินทรียวัตถุในดิน

การใช้ปุ๋ยเคมีกับมันสำปะหลัง ก็เพื่อแก้ปัญหาดินขาดธาตุอาหารพืช เป็นการแก้ปัญหาระยะสั้นๆ ไม่ยั่งยืน ต้องมีการผสมผสานกับวิธีการปรับปรุงดินโดยการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ วัสดุอินทรีย์ ระบบการปลูกพืชที่เหมาะสมที่จะมีผลต่อการเพิ่มธาตุอาหารในดิน เช่น ไนโตรเจน และเพิ่มอินทรียวัตถุให้แก่ดิน ซึ่งเป็นหนทางลดการใช้ปุ๋ยเคมีที่มีราคาแพงทางหนึ่งโดยผลผลิตพืชไม่ลด ผลการทดลองระยะยาวมากกว่า 10 ปี สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังได้เด่นชัด เมื่อใช้ปุ๋ยเคมีในสัดส่วนที่สมดุลอัตรา 8 – 8 – 8 กิโลกรัมต่อไร่ และเกิดผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 2 ตันต่อไร่ หรือร่วมกับการไถกลบซากต้นใบมันสำปะหลังลงดินหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ผลที่ตามมาคือความอุดมสมบูรณ์ของดินเพิ่มขึ้น (โชติ, 2529 : ชุมพล, 2543 : 2546, Hagens, 1990) ช่วงระยะต่อมาการใช้ปุ๋ยเคมีสัดส่วนที่สมดุล อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ เหมาะสมกับมันสำปะหลัง (ชุมพล, 2540) จึงพิจารณาว่าจำเป็นต้องพัฒนาระบบดังกล่าวต่อไป

การจัดการป้องกันเพื่อลดการชะล้างหน้าดิน อันเป็นปัจจัยวิกฤติในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สภาพพื้นที่มีความลาดเอียง การปลูกมันสำปะหลังต้นฤดูฝนมีการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อให้มันสำปะหลังมีการเจริญสมบูรณ์ดีจะได้มีทรงพุ่มครอบคลุมหน้าดิน เพื่อการลดการกระแทกผิวดินของเม็ดฝน (โชติ, 2522 : ชุมพล, 2542) เป็นวิธีการเพิ่มผลผลิตและลดการชะล้างหน้าดิน วิธีการจัดระยะปลูกมันสำปะหลังแคบๆ หรือปลูกพืชระยะปลูกแคบๆ เช่น ถั่วต่างๆ หญ้าแฝก ปลูกขวางแนวความลาดเอียงของพื้นที่ สามารถลดการชะล้างหน้าดิน (สมเจตน์, 2537 : ปิยะ, 2537) สุดท้ายความอุดมสมบูรณ์ของดินค่อยๆ เพิ่มขึ้น ผลลัพธ์คือมันสำปะหลังเจริญเติบโตสมบูรณ์ดี ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็นที่พอใจ

พันธุ์มันสำปะหลังที่นำมาปลูกเป็นพันธุ์ที่ทางราชการแนะนำ เพื่อเหมาะสมกับเฉพาะพื้นที่ มีการงอกดี เจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง ได้แก่พันธุ์ระยอง 5 ระยอง 72 ระยอง 90 ระยอง 7 ระยอง 9 ระยอง 11 เกษตรศาสตร์ 50 และพันธุ์ห้วยบง 60 ประการสำคัญคือมีการตอบสนองต่อปุ๋ยสูง การทดลองมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนพันธุ์พืชเป็นช่วงๆ ที่เหมาะสม (โอภาษ และคณะ, 2539)

สำหรับทรัพยากรน้ำ เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกในเขตเกษตรน้ำฝน จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปลูกให้พืชได้รับน้ำมากที่สุด เป็นเวลานานที่สุดเท่าที่จะมากได้ เพื่อละลายธาตุอาหารให้รากพืชดูดใช้ได้เต็มที่ ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีและให้ผลผลิตสูง ฉะนั้นถ้าหากสามารถจัดการให้น้ำกับมันสำปะหลังในช่วงอายุไม่เกิน 8 เดือน เฉพาะช่วงฝนแล้งหรือฝนทิ้งช่วงเป็นเวลานาน ก็จะทำให้มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตที่ดีและมีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ

ราคาผลผลิตก็เป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งที่จะชักนำให้มีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเหมาะสมกับความต้องการของพืช และใช้ปุ๋ยอินทรีย์ หรือวัสดุอินทรีย์ร่วมด้วย เมื่อราคาผลผลิตเป็นที่พอใจ ปัจจุบันราคาหัวมันสดเท่ากับ 2.00 บาทต่อกิโลกรัม เพื่อเป็นการผลิตมันสำปะหลังอย่างยั่งยืนของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลัง

การทดลองระยะยาวทั้ง 3 สถานที่ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และการไถกลบต้นใบมันสำปะหลัง ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิตมันสำปะหลัง และสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินปลูกมันสำปะหลังและเพื่อเป็นแนวทางพัฒนาเทคโนโลยีการใช้ปุ๋ยอย่างเป็นระบบในสัดส่วนที่เหมาะสมในเชิงเศรษฐกิจการเกษตรอย่างยั่งยืน

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. พื้นที่แปลงทดลองเดิม 3 สถานที่ ได้แก่ ดินร่วนทราย ที่ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดนครราชสีมา และดินร่วนเหนียวปนทราย จังหวัดระยอง
2. ต้นพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 และเกษตรศาสตร์ 50 มีอายุมากกว่า 10 เดือน
3. ปุ๋ยเคมีแอมโมเนียมซัลเฟต (21%N, 24%S) ทริปเปิ้ลซูเปอร์ฟอสเฟต (45%P_2O_5, 13.6%Ca) โพแทสเซียมคลอไรด์ (60%K_2O, 47%Cl)
4. ปุ๋ยอินทรีย์ ตราหมอดิน (2%N, 2%P_2O_5, 4%K_2O)
5. ต้นใบมันสำปะหลัง หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิต

วิธีการทดลอง

แผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี ได้แก่

1. Control (0 – 0 – 0)
2. ไนโตรเจน (16 – 0 – 0)
3. ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส (16 – 8 – 0)
4. ไนโตรเจน โพแทสเซียม (16 – 0 – 16)
5. ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม (16 – 8 – 16)
6. ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม + ปุ๋ยอินทรีย์ อัตรา 1 ตันต่อไร่
7. ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม + สับกลบต้นใบสด อัตรา 3 ตันต่อไร่
8. 0 – 0 – 0 + สับกลบต้นใบสด อัตรา 3 ตันต่อไร่

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเตรียมดินปฏิบัติการเช่นเดียวกันทุกฤดูปลูก คือหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ชั่งน้ำหนักสดต้นใบ และหัวมันสำปะหลังทุกกรรมวิธี วัดเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวมันสด แล้วขนย้ายต้นใบในกรรมวิธี ไม่มีการไถกลบต้นใบออกนอกแปลงทดลองทั้งหมด เหลือต้นใบเฉพาะกรรมวิธีไถกลบต้นใบกลับลงดินที่เดิม ชั่งน้ำหนักสด 3 ตันต่อไร่ (กรรมวิธีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม + ต้นใบมันสด และกรรมวิธีต้นใบมันสดเป็นกรรมวิธีที่ 7 และ 8 ตามแผนการทดลอง) แล้วสับย่อยให้มีขนาดเล็กและสั้นเพื่อง่ายต่อการไถกลบลงดิน ทำการไถพรวนดิน 2 ครั้ง วัดแบ่งแปลงย่อยซ้ำที่เดิม มีขนาดแปลงย่อย 8 x 10 เมตร มีช่องทางเดินระหว่างแปลงย่อยห่าง 1 เมตร ขุดร่องระบายน้ำเพื่อป้องกันการไหลบ่าของน้ำฝนผ่านแปลงทดลองย่อย

เก็บตัวอย่างดินก่อนปลูกหรือหลังเก็บเกี่ยว

แบบดินรวมแต่ละกรรมวิธี (Composite treatment) ที่ระดับดินชั้นไถพรวน (ดินบน) ลึก 0 – 20 เซนติเมตร และดินลึก 20 – 40 เซนติเมตร (ดินล่าง) เพื่อวิเคราะห์สถานะความอุดมสมบูรณ์ของดิน หาค่า

1. pH ของดิน อัตราส่วน ดิน : น้ำ = 1:1
2. OM. ตามวิธีของ Walkley and Black (1934)
3. P – Bray II โดยวิธี Bray II (0.03 N NH_4F + 0.1N HCL)
4. Exch. K โดยวิธีสกัดดินในสารละลาย 1 N ammonium acetate pH 7 วัดค่า โพแทสเซียม ด้วยเครื่อง Flame Atomic Absorption Spectophotometer

วิธีการปลูกมันสำปะหลัง

ปลูกมันสำปะหลังแบบปักตั้ง ระยะปลูก 1 x 1 เมตร ด้วยท่อนพันธุ์ ระยอง 11 บนชุดดินห้วยโป่งและชุดดินโคราช และเกษตรศาสตร์ 50 บนชุดดินยโสธร ซึ่งตัดยาว 20 เซนติเมตร ปลูกหลุมละหนึ่งต้น ช่วงต้นฤดูฝนขณะดินมีความชื้นเพียงพอ ช่วงเดือนพฤษภาคม ของปี และทำการปลูกซ่อมต้นตาย เพื่อให้ต้นปลูกซ่อมเติบโตเท่าเทียมต้นเดิม

วิธีการใส่ปุ๋ยมันสำปะหลัง

1. ปุ๋ยอินทรีย์ ทำการหว่านพร้อมปลูกแล้วเกลี่ยกลบ หลังการเก็บตัวอย่างดิน ชั่งแบ่งใส่อัตรา 1 ตันต่อไร่

2. ปุ๋ยเคมี ชั่งแบ่งปริมาณตามกำหนดแต่ละกรรมวิธี ทั้งปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสเฟต และโพแทช ใส่ครั้งเดียวทั้งหมดหลังปลูก 1 – 2 เดือน หลังการกำจัดวัชพืชและเมื่อดินมีความชื้นพอเหมาะในหลุมที่เจาะสองข้างต้นมันสำปะหลังแล้วกลบปุ๋ย

การปฏิบัติดูแลรักษา

มันสำปะหลังเป็นพืชมีอายุการเก็บเกี่ยวยาวมากกว่า 10 เดือน มีความจำเป็นต้องดูแลรักษาให้ต้นมันสำปะหลังเจริญเติบโตเป็นปกติและได้รับอิทธิพลของปุ๋ยเต็มที่สม่ำเสมอตลอดการเจริญเติบโต ปัจจัยสำคัญ คือ วัชพืชจะเป็นตัวแย่งน้ำและธาตุอาหารพืชกับมันสำปะหลัง ต้องกำจัดวัชพืชตลอดฤดูปลูกด้วยแรงงานคน 3 – 4 ครั้ง หรือตามความจำเป็น บันทึกการเจริญเติบโตของต้นมันสำปะหลัง โดยวัดความสูงต้นมันสำปะหลังที่อายุ 3, 6 และ 11 – 12 เดือน ขณะเก็บเกี่ยวผลผลิต และสภาพความอุดมสมบูรณ์ของต้นใบมันสำปะหลัง

การเก็บเกี่ยวผลผลิตมันสำปะหลัง

เมื่อมันสำปะหลังอายุ 11 – 12 เดือนหลังปลูก ตรวจนับจำนวนต้นเก็บเกี่ยวของแต่ละแปลงย่อย ขุดด้วยแรงงานคน ตัดหัวออกจากต้นมันสำปะหลังเก็บรวบรวมจำนวนหัว และต้นใบ เพื่อชั่งน้ำหนักสด และสุ่มหัวมันสดเพื่อวัดเปอร์เซ็นต์แป้งโดยวิธีชั่งในน้ำทุกแปลงย่อย โดยเว้นแถวริมรอบนอกทั้งสี่ด้านของแปลงย่อยไว้วัดน้ำหนักปฏิบัติเช่นเดียวกันทุกฤดูปลูก

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลคุณสมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูกทุกฤดูปลูก มีค่า pH (1:1), OM, P – Bray II และ Exch. K

2. ข้อมูลคุณสมบัติทางกายภาพของดิน เฉพาะปี 2558/59 มีค่าเสถียรของเม็ดดิน (MWD) ความหนาแน่นรวมของดิน (BD) การซึมซาบน้ำของดิน (Hydraulic conductivity) น้ำที่เป็นประโยชน์ (Available water) และการกักเก็บน้ำของดิน (Water retention) เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร และ 25 – 40 เซนติเมตร ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต

3. ข้อมูลคุณสมบัติทางชีวภาพของดิน เฉพาะปี 2558/59 มีค่าปริมาณจุลินทรีย์นับได้ทั้งหมด (Total viable count) ปริมาณแบคทีเรีย ปริมาณเชื้อรา ปริมาณไรโซเบียม และปริมาณไมโคไรซ่า เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตรก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต

4. ข้อมูลปริมาณธาตุอาหารพืชในต้น – ใบ – หัว มันสำปะหลัง มีธาตุอาหารหลัก เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทชเซียม

5. ข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นมันสำปะหลัง ความสูงต้นมันสำปะหลัง น้ำหนักต้นใบมันสด เปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสด จำนวนต้นเก็บเกี่ยวทุกแปลงย่อย

6. ข้อมูลสภาพแวดล้อม ปริมาณน้ำฝนทุกฤดูปลูก

รวบรวมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ทางสถิติ ค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ผล โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ทางสถิติ IRRISTAT

ระยะเวลา เดือน เมษายน 2554 – พฤษภาคม 2559 (5 ฤดูปลูก)

สถานที่ทำการทดลอง ซ้ำพื้นที่เดิม 3 แปลงการทดลอง (3 เขตนิเวศน์เกษตร)

1. ดินชุดดินยโสธร: Yt (Oxic Paleustults, fl, sili) เป็นดินร่วนทราย ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น เริ่มดำเนินการปี 2519 พื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 186 เมตร ฝนเฉลี่ย 1,000 – 1,200 มิลลิเมตรต่อปี
2. ดินชุดดินโคราช: Kt (Oxic Paleustults, fl, sili a) เป็นดินร่วนทรายที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา เริ่มดำเนินการปี 2518 พื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 234 เมตร ฝนเฉลี่ย 900 – 1,100 มิลลิเมตรต่อปี
3. ดินชุดดินห้วยโป่ง: Hp (Typic Paleudults, C, mixed) เป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จังหวัดระยอง เริ่มดำเนินการปี 2518 พื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 43 เมตร ฝนเฉลี่ย 1,300 – 1,500 มิลลิเมตรต่อปี

ผลการทดลองและวิจารณ์

สำหรับการทดลองปุ๋ยระยะยาว ในฤดูปลูกปี 2554/55 เป็นการปลูกซ้ำที่เดิมเป็นปีที่ 36 บนชุดดินยโสธร ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และเป็นปีที่ 37 บนชุดดินห้วยโป่ง ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง และบนชุดดินโคราช ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครราชสีมา ผลการศึกษาพบว่า

1. ผลผลิตมันสำปะหลัง

1.1 ผลผลิตหัวมันสด จากผลการทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 36 – 37 ปี มันสำปะหลังตอบสนองต่อปุ๋ยชัดเจน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ทั้ง 3 สถานที่การทดลอง และเป็นไปทำนองเดียวกันกับฤดูปลูกปี 2549 – 53 (5 ปี)

ในดินชุดดินยโสธร จังหวัดขอนแก่น และดินชุดดินห้วยโป่ง จังหวัดระยอง ผลผลิตหัวมันสดลดลงอย่างมากในวิธีการที่ไม่ใช้ปุ๋ย หรือวิธีการไม่ใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม หลังจากนั้นหัวมันสดก็ลดต่ำต่อเนื่องในดินชุดดินยโสธร สำหรับดินชุดดินโคราชไม่ตอบสนองต่อปุ๋ยที่ใช้มากนัก และหัวมันสดผันแปรไปตามฤดูปลูกอันเนื่องจากความปรวนแปรของ

ฝนหรือฝนทิ้งช่วง การใช้ปุ๋ย ไนโตรเจน โพแทสเซียม และ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ผลผลิตหัวมันสดสูงกว่าการใช้ปุ๋ย ไนโตรเจน หรือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซึ่งไม่มีการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม เป็นไปทำนองเดียวกันทั้ง 3 ชุดดิน ดินชุดดินยโสธรเพิ่มมากที่สุด 477 และ 693% น้ำหนักหัวสด 4.39 และ 6.38 ตันต่อไร่ รองลงมาดินชุดดินห้วยโป่งเพิ่ม 408 และ 482% น้ำหนักหัวสด 4.12 และ 4.87 ตันต่อไร่ ตามลำดับและเพิ่มน้อยที่สุดในดินชุดดินโคราช (ตารางที่ 2, 8) ดังนั้น ธาตุโพแทสเซียมจึงเป็นตัวจำกัดที่สำคัญอันดับแรกและตัวจำกัดอันดับสองเป็นธาตุ ไนโตรเจน

วิธีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างสมดุลอัตรา 16 – 8 – 16 กก.ของ N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตันต่อไร่ หรือร่วมกับการไถกลบต้นใบมันสด 3 ตันต่อไร่ มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีที่สุดและมีผลผลิตหัวมันสดสูงสุด 4.80 – 7.56 ตันต่อไร่ และสูงกว่าวิธีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างสมดุล อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัม ของ N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ มีผลผลิตหัวสดเท่ากับ 4.33 – 6.38 ตันต่อไร่ ดินชุดดินยโสธรเพิ่ม 129 และ 105% ดินชุดดินห้วยโป่งเพิ่ม 67 และ 76% ดินชุดดินโคราชเพิ่ม 32 และ 18% ตามลำดับ (ตารางที่ 2, 8) สำหรับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ หรือการไถกลบต้นใบมันสด อย่างต่อเนื่องเป็นวิธีการปรับปรุงสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินและการปลูกด้วยมันสำปะหลังพันธุ์ใหม่ ทำให้ผลผลิตหัวมันสดเพิ่มขึ้นมากกว่า

วิธีการไถกลบต้นใบมันสดอัตรา 3 ตันต่อไร่ ทั้งใส่และไม่ใส่ร่วมกับปุ๋ยเคมี มันสำปะหลังมีผลผลิตหัวมันสดสูงกว่าการไม่ไถกลบตันใบมันสด ในดินชุดดินยโสธรเพิ่ม 105 และ 425% ดินชุดดินห้วยโป่ง เพิ่ม 76 และ 298% และดินชุดดินโคราชเพิ่มน้อย 18 และ 110% (ตารางที่ 8)

1.2 ผลผลิตแป้งมัน เป็นข้อมูลพิจารณาด้านคุณภาพของผลผลิต เมื่อหัวมันสดสูง มีเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวสดสูง ย่อมมีผลผลิตแป้งสูงด้วย และผลผลิตแป้งต่ำต่อเมื่อหัวมันสดต่ำและมีเปอร์เซ็นต์แป้งต่ำ มีความสัมพันธ์ตรงกันกับการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ดี จึงมีผลผลิตสูง ผลผลิตแป้งก็สูงตาม ในชุดดินยโสธร ชุดดินห้วยโป่ง และชุดดินโคราช ให้ผลผลิตแป้งเท่ากับ 0.17 – 0.38, 0.27 – 0.45 และ 0.84 – 1.18 ตันต่อไร่ ตามลำดับ เมื่อไม่ใช้ปุ๋ยและใช้ปุ๋ยไนโตรเจน และ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส อัตรา 16 – 0 – 0 และ 16 – 8 – 0 กิโลกรัมต่อไร่ (ไมมีการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียม) และเมื่อใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมเป็นวิธีการใช้ ไนโตรเจน โพแทสเซียม และ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ในอัตรา 16 – 0 – 16 และ 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ มีผลผลิตแป้งมันเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 0.93 และ 1.31 ตันต่อไร่ ในดินชุดดินยโสธร เพิ่มขึ้นร้อยละ 547 และ 771 ตามลำดับ ในดินชุดดินห้วยโป่งมีผลผลิตแป้งมันเพิ่มสูงขึ้นเท่ากับ 1.03 และ 1.15 ตันต่อไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 381 และ 426 ตามลำดับ และดินชุดโคราชเพิ่มสูงเท่ากับ 1.23 และ 1.23 ตันต่อไร่ เพิ่มขึ้นร้อยละ 146 และ 146 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 8)

วิธีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างสมดุล ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตันต่อไร่ หรือร่วมกับการไถกลบต้นใบมันสด 3 ตันต่อไร่ ผลผลิตแป้งมีปริมาณสูงสุดมากกว่าวิธีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างสมดุล ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ในดินชุดดินยโสธรเท่ากับ 1.53 และ 1.54 ตันต่อไร่ คิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 900 และ 906 ตามลำดับ ดินชุดดินห้วยโป่งเท่ากับ 1.47 และ 1.48 ตันต่อไร่ คิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 544 และ 548 ตามลำดับ และดินชุดดินโคราชเท่ากับ 1.51 และ 1.43 ตันต่อไร่ คิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 180 และ 170 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 8)

วิธีการไถกลบต้นใบมันสดอัตรา 3 ตันต่อไร่ มีผลผลิตแป้งมันสูงกว่าวิธีการไม่ใช้ปุ๋ย มีผลผลิตแป้งเท่ากับ 0.78, 0.80 และ 0.88 ตันต่อไร่ คิดเพิ่มขึ้นร้อยละ 459, 296 และ 105 ในดินชุดดินยโสธร ดินชุดดินห้วยโป่ง และดินชุดดินโคราช ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ 8)

ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มผลผลิตหัวมันสด และเปอร์เซนต์แป้งด้วยการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมแต่ตรงข้ามกันการใช้ไนโตรเจนชนิดเดียวทำให้ลดลง ขณะที่การใช้ฟอสฟอรัสมีผลไม่มากต่อผลผลิตและแป้งมัน

2. การเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง

จากการทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 37 ปี ในดินชุดดินโคราชจังหวัดนครราชสีมาและดินชุดดินห้วยโป่ง จังหวัดระยอง และเป็นเวลา 36 ปี ในดินชุดดินยโสธร จังหวัดขอนแก่น มันสำปะหลังตอบสนองต่อปุ๋ยที่ใช้แต่ละฤดูปลูกชัดเจน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติทั้ง 3 สถานที่การทดลอง

มวลน้ำหนักต้นใบมันสำปะหลัง ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อไม่มีการใช้ปุ๋ย มีน้ำหนักเท่ากับ 0.47, 1.5 และ 0.52 ตันต่อไร่ ในดินชุดดินยโสธร ชุดดินโคราช และชุดดินห้วยโป่ง ตามลำดับ และวิธีการใช้ปุ๋ยไม่สมดุลของธาตุอาหารหลัก เช่น ใช้ไนโตรเจน (ไนโตรเจน) อัตรา 16 กิโลกรัมต่อไร่ใช้ไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส) อัตรา 16-8-0 กิโลกรัมต่อไร่ มีมวลน้ำหนักต้นใบมันสำปะหลังใกล้เคียงไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการไม่ใส่ปุ๋ยเฉพาะในดินชุดดินยโสธรและชุดดินห้วยโป่ง แต่ดินชุดดินโคราชมวลน้ำหนักต้นใบมากกว่าการไม่ใช้ปุ๋ย เมื่อมีการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทช (ไนโตรเจน โพแทสเซียม) อัตรา 16 – 0 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ใช้ปุ๋ยธาตุอาหารหลักครบสมบูรณ์ (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม) อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ มีมวลน้ำหนักต้นใบเพิ่มมากขึ้นในดินทั้ง 3 ชุดดิน เนื่องจากธาตุโพแทสเซียมและไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีมีมวลน้ำหนักต้นใบมากที่สุดจากวิธีการใช้อย่างต่อเนื่องของปุ๋ยเคมีมีธาตุอาหารสมดุล (ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม) อัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ผสมผสานกับปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตันต่อไร่ หรือใช้ผสมผสานกับการไถกลบต้นใบมันสด 3 ตันต่อไร่ ในดินทั้ง 3 ชุดดิน สำหรับการไถกลบต้นใบมันสด 3 ตันต่อไร่ อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2542 มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตดีขึ้น ฉะนั้นเมื่อมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีย่อมส่งผลต่อผลผลิตสูงและดีกว่า (ตารางที่ 5)

การเจริญเติบโตด้านความสูงเมื่อตอนเก็บเกี่ยว (12 เดือน) เมื่อไม่มีการใช้ปุ๋ยพบว่ามันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด เมื่อมีการใช้ปุ๋ย 16 – 0 – 16 หรือ 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ N – P_2O_5 – K_2O มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีขึ้น เนื่องจากธาตุโพแทสเซียมและไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง และมันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดีที่สุดจากวิธีการใช้อย่างต่อเนื่องของปุ๋ยเคมี 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ N – P_2O_5 – K_2O ผสมผสานกับปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตันต่อไร่ หรือใช้ผสมผสานกับการไถกลบต้นใบมันสด 3 ตันต่อไร่ อย่างต่อเนื่อง โดยทั้ง 3 ชุดดินให้ความสูงระหว่าง 184 – 264 เซนติเมตร (ตารางที่ 7) และเป็นไปในทำนองเดียวกันทั้งชุดดินยโสธร ชุดดินโคราช และชุดดินห้วยโป่ง

3. การวิเคราะห์ผลตอบแทนเชิงเศรษฐกิจจากการใช้ปุ๋ย

การวิเคราะห์ผลตอบแทนเชิงเศรษฐกิจการใช้ปุ๋ย เป็นการวิเคราะห์ส่วนเพิ่ม โดยคำนวณอัตราผลตอบแทนส่วนเพิ่ม (Marginal Rate of Return, MRR) ระหว่างวิธีการต่างๆ ดำเนินการเป็นขั้นๆ จากวิธีการต้นทุนน้อยสุดไปหาวิธีการต้นทุนสูงขึ้นไปลำดับ โดยพิจารณาจากต้นทุนเพิ่มและรายได้เพิ่ม ซึ่งอัตราผลตอบตอบแทนต่ำสุด

ที่ยอมรับได้มีค่าเท่ากับ 50% (อารันต์, 2534) ฉะนั้นอัตราผลตอบแทนส่วนเพิ่ม (MRR) มากกว่า 50% ย่อมแสดงถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจการใช้ปุ๋ยกับพืช จากผลการทดลองพบว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอัตรา 16 – 0 – 16, 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่, การใช้ปุ๋ยเคมีอัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1 ตันต่อไร่ และการใช้ปุ๋ยเคมีอัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับไถกลบต้นใบมันสดอัตรา 3 ตันต่อไร่ ให้ผลตอบแทนคุ้มค่าทางเศรษฐกิจทำนองเดียวกันทั้ง 3 ชุดดินทดลอง และการไถกลบต้นใบสดอย่างเดียว 3 ตันต่อไร่ ชุดดินยโสธร ชุดดินห้วยโป่ง ให้ผลตอบแทนส่วนเพิ่ม (MRR) ร้อยละ 399 และ 267 ตามลำดับ ชุดดินโคราชมีค่าต่ำกว่าอัตราผลตอบแทนต่ำสุดที่ยอมรับได้ (ตารางที่ 9)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สถานการเสื่อมโทรมของดินร่วนปนทรายชุดดินยโสธรมากที่สุด มากกว่าดินร่วนเหนียวปนทรายชุดห้วยโป่ง และสำหรับดินร่วนทรายชุดดินโคราชเสื่อมโทรมน้อย เมื่อเพาะปลูกมันสำปะหลังไม่มีการใช้ปุ๋ย หรือการใช้ปุ๋ยไม่เหมาะสม ใช้เฉพาะไนโตรเจน หรือใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและปุ๋ยฟอสเฟต อย่างต่อเนื่องนานกว่า 35 ปี มันสำปะหลังแคระแกร็นลำต้นเล็ก ให้ผลผลิตต่ำมาก

2. การใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเหมาะสมอัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ อย่างต่อเนื่องนานกว่า 35 ปี มันสำปะหลังมีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ดี ผลผลิตมีปริมาณเท่าเดิมหรือเพิ่มขึ้นเหมือนกันทั้ง 3 ชุดดิน เป็นวิธีการที่แนะนำ

3. การผลิตมันสำปะหลังอย่างยั่งยืน มันสำปะหลังเจริญเติบโตสมบูรณ์ดี ผลผลิตที่มีคุณภาพ 5 – 7 ตันต่อไร่ ด้วยการใช้ปุ๋ยอย่างผสมผสานของปุ๋ยเคมีอัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1 ตันต่อไร่ หรือร่วมกับการไถกลบต้นใบมันสดอัตรา 3 ตันต่อไร่ เป็นวิธีการที่แนะนำ

4. ดินสะสมปริมาณธาตุอาหารฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมเพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้ปุ๋ยฟอสเฟต ปุ๋ยโพแทชทุกๆปี ในการเพาะปลูกมันสำปะหลัง

5. การใช้ปุ๋ยอย่างผสมผสานของปุ๋ยเคมีอัตรา 16 – 8 – 16 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์อัตรา 1 ตันต่อไร่ หรือร่วมกับการไถกลบต้นใบมันสดอัตรา 3 ตันต่อไร่ ทุกๆ ปี นานกว่า 35 ปี สามารถปรับปรุง หรือเพิ่มสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดิน ทั้งด้านเคมี กายภาพ และชีวภาพ

6. ผลตอบแทนคุ้มค่าการลงทุนจากการใส่ปุ๋ยกับมันสำปะหลัง มีรายได้เพิ่มขึ้นไร่ละ 1,800 – 10,900 บาท, 1,500 – 7,700 บาท และ 1,100 – 3,300 บาท ในดินชุดดินยโสธร จังหวัดขอนแก่น ดินชุดดินโคราช จังหวัดนครราชสีมา และดินชุดดินห้วยโป่ง จังหวัดระยอง

การนำไปใช้ประโยชน์

พื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังของประเทศประมาณ 7.56 ล้านไร่ ซึ่งดินเสื่อมโทรมคุณภาพมาก ร้อยละ 90 ประมาณ 6 ล้านไร่ พื้นที่เก็บเกี่ยวประมาณ 7.3 ล้านไร่ มีผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 3.01 ตันต่อไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 22 ล้านตัน มีมูลค่า 44 ล้านบาท (เมื่อหัวมันสดกิโลกรัมละ 2 บาท) เมื่อเกษตรกรมีการจัดการเพาะปลูกที่ถูกต้องและเหมาะสม โดยมีการปรับปรุงบำรุงดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำ ซึ่งปริมาณธาตุอาหารพอเพียง

กับความต้องการของมันสำปะหลัง ผลผลิตมันสำปะหลังเฉลี่ยประมาณ 4 – 5 ตันต่อไร่ ได้ผลผลิต 30 ล้านตัน มูลค่าเพิ่มเป็น 60 ล้านบาท ผลตามมาคือมีการสะสมเพิ่มขึ้นของธาตุอาหาร พืชในดินทั้งฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม การผลิตมันสำปะหลัง อย่างยั่งยืนด้วยการใช้วัสดุอินทรีย์จากต้นใบมันสำปะหลัง หรือชนิดอื่นๆ เช่น ปุ๋ยอินทรีย์มูลสัตว์ ปุ๋ยพืชสด ที่หาได้ง่ายในพื้นที่ใช้ผสมผสาน กับปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำ ผลผลิตมันสำปะหลังเพิ่มสูงมากกว่า 6 ตันต่อไร่ มีผลผลิต 44 ล้านตัน มูลค่าเพิ่มเป็น 88 ล้านบาท (รายได้เพิ่มขึ้นมากกว่า 6,000 บาทต่อไร่) และสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ของประเทศในการใช้หัวมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลมาทดแทนน้ำมันอย่างเพียงพอ ประการสำคัญที่สุดเป็นวิธีการเหมาะสมในการปรับปรุงบำรุงดินเพื่อการรักษาหรือเพิ่มสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดิน ทั้งด้านเคมี กายภาพ และชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2525. **การจำแนกดินของประเทศไทย**. กองสำรวจดิน กรุงเทพฯ.

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ, ชุมพล นาควิโรจน์ และโชติ สิทธิบุศย์. 2538. การผลิตมันสำปะหลัง และการจัดการดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ **รายงานประจำปี 2538** กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ชุมพล นาควิโรจน์, หริ่ง มีสวัสดิ์, กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ และมาโนช ดอนเส. 2540. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปุ๋ยเคมีสูตร 16 – 8 – 16 และ 16 – 16 – 16 กับมันสำปะหลัง. **เอกสารผลงานวิจัยประกอบการจัดนิทรรศการมันสำปะหลัง และการแปรรูปผลิตภัณฑ์ โครงการเผยแพร่และขยายผลงานวิจัยเพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมครั้งที่ 1.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 26 – 28 มิถุนายน 2540 : หน้า 12.

ชุมพล นาควิโรจน์. 2542. การปรับปรุงบำรุงดินปลูกมันสำปะหลังอย่างยั่งยืน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2542** กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ชุมพล นาควิโรจน์. 2542. การใช้ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์กับมันสำปะหลัง **เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรเร่งรัดการใช้ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์** กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร 23-26 กันยายน 2542.

ชุมพล นาควิโรจน์, กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ, โอภาษ บุญเส็ง, ชัยโรจน์ วงศ์วิวัฒน์ชัย และ สมาน รุ่งเรือง. 2543. อิทธิพลระยะยาวของปุ๋ย ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และการไถกลบซากพืชที่มีต่อสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ใช้ปลูกมันสำปะหลัง **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ประจำปี 2543. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร : หน้า 1 – 15.**

ชุมพล นาควิโรจน์, กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ, โอภาษ บุญเส็ง, ชัยโรจน์ วงศ์วิวัฒน์ชัย และ สมาน รุ่งเรือง. 2546 อิทธิพลระยะยาวของปุ๋ย ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และการไถกลบซากพืชที่มีต่อสถานะความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ใช้ปลูกมันสำปะหลัง **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ประจำปี 2546** กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

โชติ สิทธิบุศย์, วิชัย นพอมรบดี, สนั่น รัตนานุกูล และชุมพล นาควิโรจน์. 2522. อิทธิพลของการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียม ที่มีต่อปริมาณแป้งและผลผลิตมันสำปะหลัง. **รายงานผลการทดลองและวิจัย ประจำปี 2522** กองพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร : หน้า 57 – 60.

โชติ สิทธิบุศย์ และ ชุมพล นาควิโรจน์. 2529. **การทดลองปุ๋ยระยะยาวกับมันสำปะหลังของดินชุดดินห้วยโป่ง** เอกสารทางวิชาการด้านปฐพีวิทยา เล่มที่ 2 กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ปิยะ ดวงพัตรา. 2537. การปรับปรุงและบำรุงรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินมันสำปะหลัง **รายงานการสัมมนา เรื่อง ปัญหาการผลิต การใช้มันสำปะหลัง และลดต้นทุนการผลิต** ณ โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา ชลบุรี 1 – 3 กันยายน 2537 : หน้า 60 – 82.

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย 2545 รายงานประจำปี 2545 อาคารลุมพินีทาวเวอร์ ถนนพระราม 4 เขตสาธร กรุงเทพฯ.

สมเจตน์ จันทวัฒน์, อนุชิต ทองกล่ำ, สมยศ พุทธเจริญ, ปิยะวุฒิ พูลสงวน, วิจารณ์ วิชชุกิจ และ R.H. Howeler 2537 การอนุรักษ์ดินที่ใช้ปลูกมันสำปะหลัง **รายงานการสัมมนา เรื่อง ปัญหาการผลิต การใช้มันสำปะหลัง และลดต้นทุนการผลิต**. ณ โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช พัทยา ชลบุรี 1 – 3 กันยายน 2537 : หน้า 83 – 97.

สรสิทธิ์ วัชโรทยาน . 2525. การใช้ผลผลิตพลอยได้ และเศษเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีอยู่ในประเทศไทย ให้เกิดประโยชน์ในการใช้ปุ๋ยและวัตถุบำรุงดิน **รายงานการวิจัยโครงการวิจัย และแนะนำทางเทคโนโลยีของดินและปุ๋ย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อารันต์ พัฒโนทัย และธนรักษ์ เมฆขยาย. 2534. **คู่มือการฝึกอบรมทางเศรษฐศาสตร์**. จากข้อมูลผลการทดลองสู่คำแนะนำแก่เกษตรกรฝ่ายเศรษฐศาสตร์ ศูนย์วิจัยการปรับปรุงข้าวโพดและข้าวสาลีนานาชาติ(CIMMYT.1998)

โอภาษ บุญเส็ง. 2539. **พันธุกรรมและการใช้ปุ๋ยเคมีในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพมันสำปะหลัง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. 217 น.

Ananymous. 1985. **Conventional Tillage**. USA. Dept. of Agri., Agri. Inf. Bull. 481: 15

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT.). 1975. Annual Report. 1974. Cali, Columbia : 253 p.

Hagens P. and C. Sittibusaya. 1990. Short and long – term aspects of fertilizer application on cassava in Thailand. In ; Proc. 8 th Symp. Int. Soc. Trop. Root Crops. Bangkok, Thailand. Oct. 30 – Nov. 5, 1988. pp. 244 – 259.

Howeler, R.H. 1978. The mineral nutrition and fertilization of cassava. In ; Cassava Production Course. CIAT., Cali, Colombia. pp. 247 – 292.

Jantavat, S., S. Puttacharoen and R.H. Howeler. 1992. Soil and crop management practices for sustainable production of cassava on sloping land. In ; Evaluation for Sustainable Land Management in the Developing World. IBSRAM Proc. No. 12, Vol. 3. pp. 63-64

Lozano, J.C. 1975. Bacterial blight of cassava. **Pans. 21(1)**, 38 – 43.

Lozano, J.C., Bellotti, A., Schoonhoven, A. Van, Howeler, R., Howell, D. and J., Doll. 1976. Field problems in cassava. CIAT., Cali Colombia, Series GE-16, 127 p.

Nakviroj, C., Paisancharoen, K., Boonseng, O., Wongwiwatchai, C., and S., Roongruang. 2002. Cassava long-term fertility Trials in Thailand. In The 7th Regional Cassava Workshop, Oct. 28 – Nov. 1, 2002, Bangkok, Thailand.

Obigbesan, G.O. 1973. The influence of potassium nutrition on the yield and chemical composition of some tropical root and tuber crops. In, International Potash Institute, Coloquium, 10 th, Abidjam, Ivory Coast.

Ofori, C.S. 1973. Decline in fertility status of a tropical forest ochrosaol under continuous cropping. Expl. Agri. 9 (1), pp. 15 – 22.

ตารางที่ 1. สมบัติทางเคมีของดินก่อนปลูกที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร ในแหล่งปลูกต่างๆ

วิธีการ	ปี 2554			
	pH (1:1)	O.M. (%)	Avai. P (mg/kg)	Exch. K
ดินชุดดินห้วยโป่ง จ.ระยอง				
0-0-0	4.51	0.94	18	14
N (16-0-0)	3.80	1.06	22	13
NP (16-8-0)	4.15	1.14	117	10
NK (16-0-16)	4.55	1.41	56	35
NPK (16-8-16)	4.11	0.95	103	26
NPK+CP	6.24	1.79	299	50
NPK+St	4.88	1.61	98	50
0-0-0+St	4.59	1.17	38	18
ดินชุดดินโคราช จ.นครราชสีมา				
0-0-0	6.67	0.78	18	81
N (16-0-0)	6.84	0.70	22	67
NP (16-8-0)	6.18	0.57	50	61
NK (16-0-16)	6.91	0.78	45	92
NPK (16-8-16)	6.23	0.56	45	89
NPK+CP	7.55	0.96	253	130
NPK+St	6.51	0.72	61	108
0-0-0+St	6.17	0.60	29	89
ดินชุดดินยโสธร จ.ขอนแก่น				
0-0-0	4.73	0.40	7	23
N (16-0-0)	4.32	0.32	5	11
NP (16-8-0)	4.60	0.31	70	15
NK (16-0-16)	4.54	0.54	4	45
NPK (16-8-16)	4.70	0.66	52	60
NPK+CP	6.59	1.03	382	141
NPK+St	5.02	0.73	42	49
0-0-0+St	5.54	0.40	15	29

หมายเหตุ CP= ปุ๋ยอินทรีย์ อัตรา 2 ตันต่อไร่

ST= สับกลบต้นใบมันสด อัตรา 3 ตันต่อไร่

ตารางที่ 2. ผลผลิตน้ำหนักหัวมันสด (ตัน/ไร่) ฤดูปลูกปี 2554/55 ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ

กรรมวิธี	สถานที่ดำเนินการ		
	ชุดดินห้วยโป่ง (Hp)	ชุดดินโคราช (Kt)	ชุดดินยโสธร (Yt)
0-0-0	1.01 e	2.64 d	0.92 c
N (16-0-0)	2.08 cd	3.20 cd	1.82 c
NP (16-8-0)	1.77 de	4.06 bc	1.92 c
NK (16-0-16)	4.12 b	4.07 bc	4.39 b
NPK (16-8-16)	4.87 ab	4.33 ab	6.38 a
NPK+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	5.54 a	5.17 a	7.56 a
NPK+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	5.64 a	4.80 ab	7.34 a
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	3.01 c	2.91 d	3.91 b
เฉลี่ย	3.51	3.90	4.28
F-test	**	**	**
CV.(%)	18.3	16.3	22.2

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3. ผลผลิตแป้ง (กก./ไร่) ฤดูปลูกปี 2554/55 ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ

กรรมวิธี	สถานที่ดำเนินการ		
	ชุดดินห้วยโป่ง (Hp)	ชุดดินโคราช (Kt)	ชุดดินยโสธร (Yt)
0-0-0	269 d	841 c	173 c
N (16-0-0)	448 d	952 bc	349 c
NP (16-8-0)	416 d	1181 abc	384 c
NK (16-0-16)	1029 bc	1232 ab	928 b
NPK (16-8-16)	1154 b	1230 ab	1313 a
NPK+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	1468 a	1511 a	1526 a
NPK+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	1480 a	1425 a	1544 a
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	796 c	877 bc	783 b
เฉลี่ย	882	1156	875
F-test	**	**	**
CV.(%)	18.7	20.3	20.2

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4. ปริมาณเปอร์เซ็นต์แป้งในหัวมันสด (%) ฤดูปลูกปี 2554/55 ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ

กรรมวิธี	สถานที่ดำเนินการ		
	ชุดดินห้วยโป่ง (Hp)	**ชุดดินโคราช** (Kt)	**ชุดดินยโสธร** (Yt)
0-0-0	26.6 a	31.4	18.9
N (16-0-0)	21.1 d	29.7	19.3
NP (16-8-0)	23.3 c	29.5	19.7
NK (16-0-16)	24.1 bc	29.3	21.2
NPK (16-8-16)	25.2 ab	28.4	20.7
NPK+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	26.5 a	29.1	20.3
NPK+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	25.6 ab	29.5	21.1
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	26.3 a	30.6	20.1
เฉลี่ย	24.8	29.7	20.2
F-test	**	NS	NS
CV.(%)	4.0	8.6	7.0

NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 5. มวลน้ำหนักสดส่วนเหนือดิน ต้น+ใบ+เหง้า (กก./ไร่) ฤดูปลูกปี 2554/55 ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ

กรรมวิธี	สถานที่ดำเนินการ		
	ชุดดินห้วยโป่ง (Hp)	**ชุดดินโคราช** (Kt)	**ชุดดินยโสธร** (Yt)
0-0-0	517 d	1502 c	472 e
N (16-0-0)	820 d	3581 ab	846 e
NP (16-8-0)	813 d	2999 b	1223 de
NK (16-0-16)	2003 bc	3583 ab	2858 cd
NPK (16-8-16)	1884 bc	3890 ab	3352 bc
NPK+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	3089 a	4088 a	5025 ab
NPK+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	2613 ab	4331 a	6017 a
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	1230 cd	2025 c	2321 cde
เฉลี่ย	1621	3250	2764
F-test	**	**	**
CV.(%)	30.9	18.8	34.2

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 6. ดัชนีการเก็บเกี่ยว (HI) ฤดูปลูกปี 2554/55 ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ

กรรมวิธี	สถานที่ดำเนินการ		
	ชุดดินห้วยโป่ง (Hp)	ชุดดินโคราช (Kt)	ชุดดินยโสธร (Yt)
0-0-0	0.66 b	0.63 a	0.67
N (16-0-0)	0.73 a	0.48 c	0.69
NP (16-8-0)	0.69 ab	0.57 abc	0.59
NK (16-0-16)	0.68 ab	0.50 bc	0.61
NPK (16-8-16)	0.70 ab	0.51 bc	0.66
NPK+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	0.65 b	0.56 abc	0.62
NPK+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	0.70 ab	0.52 bc	0.55
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	0.71 ab	0.58 ab	0.66
เฉลี่ย	0.69	0.54	0.63
F-test	NS	*	NS
CV.(%)	6.2	11.1	15.1

NS = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ * = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7. ความสูงมันสำปะหลังเมื่อเก็บเกี่ยว (ซม.) ฤดูปลูกปี 2554/55 ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ

กรรมวิธี	สถานที่ดำเนินการ		
	ชุดดินห้วยโป่ง (Hp)	ชุดดินโคราช (Kt)	ชุดดินยโสธร (Yt)
0-0-0	100 d	158 c	88 d
N (16-0-0)	115 d	203 b	96 d
NP (16-8-0)	105 d	203 b	95 d
NK (16-0-16)	168 bc	204 b	162 c
NPK (16-8-16)	165 bc	210 ab	198 bc
NPK+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	203 a	222 ab	227 ab
NPK+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	184 ab	230 a	264 a
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	146 c	174 c	160 c
เฉลี่ย	148	200	161
F-test	**	**	**
CV.(%)	12.0	6.9	21.0

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8. ประสิทธิภาพของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ต้นใบมันสำปะหลังสดและใส่ผสมผสานอย่างต่อเนื่อง ในแต่ละพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง ฤดูปลูกปี 2554/55

วิธีการ	ผลผลิต (ตัน/ไร่)	ดัชนี (%)	เปอร์เซ็นต์แป้ง (%)	ดัชนี (%)	ผลผลิตแป้ง (ตัน/ไร่)	ดัชนี (%)
ชุดดินห้วยโป่ง จ.ระยอง						
$N_0P_0K_0$	1.01	100	26.6	100	0.27	100
$N_1P_0K_0$	2.08	206	21.1	79	0.45	167
$N_1P_1K_0$	1.77	175	23.3	88	0.42	156
$N_1P_0K_1$	4.12	408	24.1	91	1.03	381
$N_1P_1K_1$	4.87	482	25.2	95	1.15	426
$N_1P_1K_1$+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	5.54	549	26.5	100	1.47	544
$N_1P_1K_1$+สับกลบต้นใบมัน 3 ตัน/ไร่	5.64	558	25.6	96	1.48	548
$N_0P_0K_0$+สับกลบต้นใบมัน 3 ตัน/ไร่	3.01	298	26.3	99	0.80	296
ชุดดินโคราช จ.นครราชสีมา						
$N_0P_0K_0$	2.64	100	31.4	100	0.84	100
$N_1P_0K_0$	3.20	121	29.7	95	0.95	113
$N_1P_1K_0$	4.06	154	29.5	94	1.18	140
$N_1P_0K_1$	4.07	154	29.3	93	1.23	146
$N_1P_1K_1$	4.33	164	28.4	90	1.23	146
$N_1P_1K_1$+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	5.17	196	29.1	93	1.51	180
$N_1P_1K_1$+สับกลบต้นใบมัน 3 ตัน/ไร่	4.80	182	29.5	94	1.43	170
$N_0P_0K_0$+สับกลบต้นใบมัน 3 ตัน/ไร่	2.91	110	30.6	97	0.88	105
ชุดดินยโสธร จ.ขอนแก่น						
$N_0P_0K_0$	0.92	100	18.9	100	0.17	100
$N_1P_0K_0$	1.82	198	19.3	102	0.35	206
$N_1P_1K_0$	1.92	209	19.7	104	0.38	223
$N_1P_0K_1$	4.39	477	21.2	112	0.93	547
$N_1P_1K_1$	6.38	693	20.7	110	1.31	771
$N_1P_1K_1$+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	7.56	822	20.3	107	1.53	900
$N_1P_1K_1$+สับกลบต้นใบมัน 3 ตัน/ไร่	7.34	798	21.1	112	1.54	906
$N_0P_0K_0$+สับกลบต้นใบมัน 3 ตัน/ไร่	3.91	425	20.1	106	0.78	459

หมายเหตุ N_1= 16 กก.N/ไร่ P_1= 8 กก.P_2O_5/ไร่ K_1= 16 กก.K_2O/ไร่ CP= ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่ CR= ต้นใบมันสด 3 ตัน/ไร่

ตารางที่ 9. วิเคราะห์ผลตอบแทนเชิงเศรษฐกิจจากการใช้ปุ๋ย และวัสดุปรับปรุงดิน ในแหล่งปลูกต่างๆ ปี 2554/55

วิธีการ	ผลผลิตเฉลี่ย (ตัน/ไร่)	รายได้ (บาท/ไร่)	รายได้เพิ่ม (บาท/ไร่)	ต้นทุนเพิ่ม (บาท/ไร่)	MRR %
ชุดดินห้วยโป่ง จ.ระยอง					
0-0-0	1.01	2,020	-	-	-
16-0-0	2.08	4,160	2,140	884	242
16-8-0	1.77	3,540	1,520	1,263	120
16-0-16	4.12	8,240	6,220	1,372	453
16-8-16	4.87	9,740	7,720	1,751	441
16-8-16+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	5.54	11,080	9,060	3,751	242
16-8-16+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	5.64	11,280	9,260	3,251	285
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	3.01	6,020	4,000	1,500	267
ชุดดินโคราช จ.นครราชสีมา					
0-0-0	2.64	5,280	-	-	-
16-0-0	3.20	6,400	1,120	884	127
16-8-0	4.06	8,120	2,840	1,263	225
16-0-16	4.07	8,140	2,860	1,372	208
16-8-16	4.33	8,660	3,380	1,751	193
16-8-16+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	5.17	10,340	5,060	3,751	135
16-8-16+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	4.80	9,600	4,320	3,251	133
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	2.91	5,820	540	1,500	36
ชุดดินยโสธร จ.ขอนแก่น					
0-0-0	0.92	1,840	-	-	-
16-0-0	1.82	3,640	1,800	884	204
16-8-0	1.92	3,840	2,000	1,263	158
16-0-16	4.39	8,780	6,940	1,372	506
16-8-16	6.38	12,760	10,920	1,751	624
16-8-16+ปุ๋ยอินทรีย์ 1 ตัน/ไร่	7.56	15,120	13,280	3,751	354
16-8-16+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	7.34	14,680	12,840	3,251	395
0-0-0+สับกลบต้นใบสด 3 ตัน/ไร่	3.91	7,820	5,980	1,500	399

หมายเหตุ คำนวณจากราคาหัวมันสด 2.00 บาท/กิโลกรัม ราคาปุ๋ยไนโตรเจน (21 – 0 – 0) 11.60 บาท/กิโลกรัม
ปุ๋ยฟอสเฟต (0 – 46 – 0) 21.80 บาท/กิโลกรัม ปุ๋ยโพแทช (0 – 0 – 60) 18.30 บาท/กิโลกรัม
ปุ๋ยอินทรีย์ ราคา 2.00 บาท/กิโลกรัม ต้นใบมันสด 500 บาท/ตัน (1,000 ต้น)

ศักยภาพการดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินต่าง ๆ สำหรับใช้ในการประเมินการใช้ปุ๋ยโพแทชอย่างแม่นยำเฉพาะพื้นที่

Adsorption and Desorption Potential of Potassium under Various Soil Series for Assessment of Potash Fertilizer Application in Specific Areas

ศิริขวัญ ภู่นา[1] ศุภกาญจน์ ล้วนมณี[2] สมฤทัย ตันเจริญ[1] ไพรสน รุจิคุณ[3] อนันต์ ทองภู[1]
วริศ แคนคอง[1] กิตจเมธ แจ้งศิริกุล[1]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

ศึกษาศักยภาพการดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินต่างๆ สำหรับใช้ในการประเมินการใช้ปุ๋ย โพแทชอย่างแม่นยำเฉพาะพื้นที่ แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมของดินต่างๆ โดยการบ่มดินในห้องปฏิบัติการ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียม (Buffer coefficient of potassium – BC_K) ใน 4 ชุดดิน ได้แก่ ชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบ ทำการบ่มดินด้วยสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ระดับความชื้น 60% ของความจุการอุ้มน้ำของดิน เป็นระยะเวลา 14 วัน โดยชุดดินโชคชัยและปากช่องให้มีความเข้มข้นของโพแทสเซียม 7 ระดับ ได้แก่ 0 40 80 120 160 200 และ 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนชุดดินห้วยโป่งและสัตหีบให้มีความเข้มข้นของโพแทสเซียม 7 ระดับ ได้แก่ 0 20 40 60 80 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นสกัดโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ด้วยน้ำยาสกัด 1 *N* NH_4OAc pH 7 พบว่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบมีค่าเท่ากับ 0.9823 0.7783 0.9871 และ 0.9976 ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 การประเมินการใช้ปุ๋ยโพแทชจากค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมในชุดดินต่างๆ ในสภาพพื้นที่ปลูก : กลุ่มดินด่าง โดยทำการทดลองปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชทดสอบ ที่แปลงเกษตรกร ตำบลสุขสำราญ อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งเป็นชุดดินลพบุรี มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.8265 ปริมาณความต้องการปุ๋ยโพแทชจากสมการคาดคะเนมีค่าเท่ากับ 4 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่

[1]กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
[2]ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน
[3]ศูนย์วิจัยยางบุรีรัมย์ สถาบันวิจัยยาง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี 7 กรรมวิธี 3 ซ้ำดังนี้ ใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 0, 10 – 10 – 2, 10 – 10 – 4, 10 – 10 – 6, 10 – 10 – 8, 10 – 10 – 10 และ 10 – 10 – 12 กิโลกรัม $N – P_2O_5 – K_2O$ ต่อไร่ พบว่าข้าวโพดไม่ตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยโพแทช โดยความสูงของข้าวโพดที่อายุ 30 และ 60 วัน จำนวนต้นต่อไร่ น้ำหนักต้นต่อไร่ จำนวนฝักต่อไร่ น้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่ และเปอร์เซ็นต์กะเทาะเมล็ดไม่แตกต่างกันทาง สถิติ กรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 10 กิโลกรัม $N – P_2O_5 – K_2O$ ต่อไร่ มีแนวโน้มให้น้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่ สูงสุดเท่ากับ 1,089 กิโลกรัมต่อไร่ เนื่องจากปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินบนก่อนปลูกข้าวโพดของชุดดินลพบุรีอยู่ในระดับสูงมาก เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิต ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จึงไม่ตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยโพแทชในระดับต่างๆ

คำนำ

ปัจจุบันพื้นที่ทางการเกษตรส่วนใหญ่ของประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์น้อยลง เนื่องจากมีการใช้พื้นที่ทางการเกษตรติดต่อกันเป็นเวลานานโดยไม่มีการปรับปรุงบำรุงดินและเกษตรกรขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้ที่ดินและการจัดการดินอย่างถูกต้อง การใช้ปุ๋ยเคมีจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่เกษตรกรเลือกใช้ในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งในปัจจุบันปุ๋ยเคมีมีราคาแพง เกษตรกรจึงมีความจำเป็นที่จะต้องลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้ปัจจัยการผลิตทางด้านปุ๋ยให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตพืช ดังนั้นการพัฒนาคำแนะนำในการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินที่มีความแม่นยำสูงและมีความเฉพาะเจาะจงกับพื้นที่ดิน จะทำให้พื้นที่ทางการเกษตรมีศักยภาพในการผลิตพืชสูงขึ้นและให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ โดยข้อมูลพื้นฐานด้านดินที่สำคัญและจำเป็นต้องใช้ในการประเมินการใช้ปุ๋ย คือศักยภาพในการดูดซับและการปลดปล่อยธาตุอาหารของดินในชุดดินต่างๆ ซึ่งทำให้สามารถประเมินการใช้ปุ๋ยให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นตามลักษณะดินที่แตกต่างกันไป เนื่องจากเมื่อมีการใส่ปุ๋ยลงไปในดิน พบว่าปุ๋ยที่ใส่ลงไปไม่ได้เป็นประโยชน์ทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ปุ๋ยส่วนหนึ่งอาจถูกดินดูดยึดเอาไว้และไม่สามารถปลดปล่อยให้เป็นประโยชน์กับพืชได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะที่เฉพาะของดินนั้นๆ เช่น ค่าปฏิกิริยาดิน ชนิดของแร่ดินเหนียว การเปียกและแห้งของดิน (เมื่อดินแห้งแร่ดินเหนียวชนิด Montmorillonite จะตรึงโพแทสเซียมไปอยู่ระหว่างชั้นดินเหนียวและจะถูกปลดปล่อยเมื่อดินเปียก ส่วนแร่ดินเหนียวชนิด Illite จะตรึงโพแทสเซียมเมื่อดินแห้ง แต่จะไม่ปลดปล่อยโพแทสเซียมเมื่อดินเปียก) เป็นต้น (Rehm and Schmit, 2002) ดังนั้นหากทราบถึง buffer coefficients ของโพแทสเซียมในแต่ละดิน ซึ่งได้จากอัตราส่วนระหว่างปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ที่เพิ่มขึ้นกับปริมาณปุ๋ยโพแทชบางชนิดที่ใส่ลงไปในดิน ก็จะเป็นแนวทางหนึ่งในการประเมินปริมาณการใช้ปุ๋ยโพแทชให้เหมาะสมกับความต้องการของพืชที่ปลูกในดินนั้นๆ ได้ จากนั้นจึงประเมินการใช้ปุ๋ยโพแทชจากค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมในชุดดินต่างๆ ในสภาพพื้นที่ปลูก:กลุ่มดินด่าง เพื่อให้ได้คำแนะนำการจัดการธาตุอาหารโพแทสเซียมที่แม่นยำและมีความเฉพาะเจาะจงกับลักษณะดินด่าง ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

วิธีดำเนินการ

การทดลองที่ 1. ศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมของดินต่างๆ โดยการบ่มในห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์

1) ตัวอย่างดิน ได้แก่ ชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบ

2) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) สำหรับใช้ในการบ่ม

3) สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ดิน

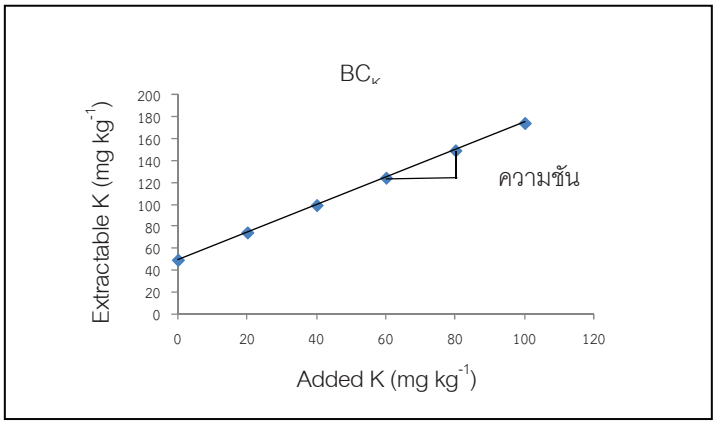
วิธีการ

เก็บตัวอย่างดิน 4 ชุดดิน ได้แก่ ชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบ ที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร สำหรับวิเคราะห์ 1) เนื้อดินโดยวิธี Hydrometer method 2) pH ใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1 3) อินทรียวัตถุโดยวิธี Walkley and Black method 4) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โดยวิธี Bray 2 แล้ววิเคราะห์การเกิดสีด้วยวิธี molybdate ascorbic acid และ 5) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้โดย 1 *N* NH_4OAc, pH 7 แล้ววิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ Atomic absorption spectrophotometer

ดำเนินการทดลองบ่มดินในห้องปฏิบัติการ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียม (Buffer coefficient of potassium – BC_K) ใน 4 ชุดดินต่อไปนี้ ได้แก่ ชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบ บดดินและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ชั่งดินจำนวน 5 กรัมผสมกับสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ระดับความชื้น 60% ของความจุการอุ้มน้ำของดิน โดยชุดดินโชคชัยและปากช่องให้มีความเข้มข้นของโพแทสเซียม 7 ระดับ ได้แก่ 0 40 80 120 160 200 และ 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนชุดดินห้วยโป่งและสัตหีบให้มีความเข้มข้นของโพแทสเซียม 7 ระดับ ได้แก่ 0 20 40 60 80 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม บ่มดินเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา สกัดโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ด้วยน้ำยาสกัด 1 *N* NH_4OAc pH 7 จำนวน 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำสารละลายที่ได้วิเคราะห์โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

นำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ (แกน y) กับปริมาณความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่เติมลงไปในดิน (แกน X) และสรุปค่า Buffer coefficient of potassium (BC_K) สำหรับใช้ในการประเมินความสามารถในการดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบ

BC_K หมายถึง อัตราส่วนของปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้โดยน้ำยาสกัด 1 *N* NH_4OAc pH 7 ต่อปริมาณโพแทสเซียมที่ใส่ลงไปในดิน ค่าดังกล่าวนี้ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ (แกน Y) กับปริมาณโพแทสเซียมที่เติมลงไปในดิน (แกน X) โดยแผนภาพที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นตรง (Attanandana *et al*., 2004; Yost and Attanandana, 2006) ดังภาพที่ 1 ในแต่ละดินจะมี BC_K ต่างกันไปขึ้นอยู่กับสมบัติของดิน ซึ่งค่า BC_K คือความชันของเส้นตรง สามารถเขียนในรูปสมการได้ดังนี้ BC_K = extractable K (mg kg^{-1})/ added K (mg kg^{-1})



ภาพที่ 1. ค่า BC_K ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโพแทสเซียมที่สกัดได้ (Extractable K) กับปริมาณโพแทสเซียมที่เติมลงไปในดิน (Added K)

การคำนวณและเปรียบเทียบปริมาณความต้องการปุ๋ยโพแทชจากสมการคาดคะเน เมื่อใช้วิธีการสกัดโพแทสเซียมโดยวิธี 1*N* NH_4OAc pH7

สมการความต้องการปุ๋ยโพแทสเซียมที่เสนอโดย Yost and Attanandana (2006)

K*req* (kgK ha^{-1}) = (K*critical* – K*soil*)/BC_K x B.D. x (Application depth/10 xplacement factor) + (Biomass removed x K*percentage*/100)

K*critical* = ค่าวิกฤติของโพแทสเซียมในดิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) คือความเข้มข้นของโพแทสเซียมในดินระดับหนึ่งที่พืชไม่ตอบสนองต่อปุ๋ยที่ใส่ ถ้าในดินมีโพแทสเซียมต่ำกว่าระดับนี้การใส่ปุ๋ยโพแทชเพิ่มขึ้นจะทำให้ผลผลิตพืชเพิ่มขึ้น โดยค่าวิกฤติของโพแทสเซียมในดินที่ สกัดด้วยน้ำยา 1 *N* NH_4OAc Ph 7 เท่ากับ 72 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับกลุ่มชุดดินที่มีแร่ดินเหนียวสเมกไทต์เด่น ส่วนกลุ่มชุดดินที่มีแร่ดินเหนียวเค โอลิไนต์เด่นมีค่าวิกฤติของโพแทสเซียมเท่ากับ 35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

K*soil* = ปริมาณโพแทสเซียมดั้งเดิมในดิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

BC_K = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียม

B.D. = ความหนาแน่นรวม

Biomass removed = ปริมาณน้ำหนักแห้งของผลผลิตพืชในส่วนเหนือดิน ในกรณีข้าวโพดเลี้ยงสัตว์คิดเฉพาะ เมล็ด ข้าวโพดเนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่ไถกลบตอซังลงไปในดิน โดยกลุ่มชุดดินที่มี แร่ดินเหนียวสเมกไทต์เด่นมีค่าเท่ากับ 6,000 กิโลกรัมต่อเฮกแตร์ ในกลุ่มชุดดินที่มีแร่ดินเหนียว เคโอลิไนต์เด่นมีค่าเท่ากับ 4,554 กิโลกรัมต่อเฮกแตร์ นำข้อมูลมาจากงานวิจัยโครงการ “การจัดการปุ๋ยเฉพาะพื้นที่สำหรับข้าวโพด” (ทัศนีย์ และสันติ, 2548)

K*percentage* = ปริมาณของโพแทสเซียมในส่วนของตัวแปร biomass removed ดังนั้นจะนำเอาเปอร์เซ็นต์ K ในเมล็ดมาคำนวณเท่านั้น และมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ K ในเมล็ด ประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์

Placement factor = วิธีการใส่ปุ๋ย ในกรณีของการใส่แบบเป็นแถวคำนวณจากอัตราส่วนของระยะทางระหว่างปุ๋ยที่ใส่ทั้ง 2 ด้านของพืชกับความกว้างของแถวที่ปลูกพืช ให้เท่ากับ 0.166 ระยะระหว่างที่ใส่ปุ๋ยกับต้นข้าวโพดเท่ากับ 12.5 เซนติเมตร ความกว้างระหว่างแถวที่ ปลูกเท่ากับ 75 เซนติเมตร

Application depth = ความลึกของปุ๋ยที่ใส่ลงไปในดินที่ระดับ 10 เซนติเมตร

การทดลองที่ 2. การประเมินการใช้ปุ๋ยโพแทชจากค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับต่อการปลดปล่อยโพแทสเซียมในชุดดินต่างๆ ในสภาพพื้นที่ปลูก : กลุ่มดินด่าง

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3
2. ปุ๋ยเคมี ได้แก่ ปุ๋ยยูเรีย ปุ๋ยทริปเปิ้ลซูเปอร์ฟอสเฟต และปุ๋ยโพแทสเซียมคลอไรด์
3. สารกำจัดวัชพืช
4. สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ดินและพืช

วิธีการ

ทำการคัดเลือกพื้นที่ที่จะทำการศึกษาโดยใช้ชุดดินลพบุรี การจำแนกดิน Very – fine, smectitic, isohyperthermic Typic Haplusterts (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548ก) เป็นดินลึก มีเนื้อดินเป็นดินเหนียว สีดำ ค่าปฏิกิริยาดินเป็นด่างอ่อน (pH 7.40) พบชั้นปูนมาร์ลที่ระดับความลึก 80 เซนติเมตร ลงไปจากผิวดิน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ดังนี้

1) ใส่ปุ๋ย 10-10-0 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
2) ใส่ปุ๋ย 10-10-2 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
3) ใส่ปุ๋ย 10-10-4 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
4) ใส่ปุ๋ย 10-10-6 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
5) ใส่ปุ๋ย 10-10-8 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
6) ใส่ปุ๋ย 10-10-10 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
7) ใส่ปุ๋ย 10-10-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่

ไถเตรียมดินและปรับระดับพื้นที่ แบ่งแปลงย่อยให้มีขนาดแปลงกว้าง X ยาว เท่ากับ 6.0 X 5.0 เมตร เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนของดินก่อนทำการทดลองมาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี ทำการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยใช้ระยะปลูก 75 X 25 เซนติเมตร (แปลงละ 8 แถว แถวละ 20 ต้น) ใส่ปุ๋ยเคมีข้างแถวปลูกในอัตราที่กำหนดตามกรรมวิธี โดยปุ๋ยไนโตรเจนแบ่งใส่ 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกใส่พร้อมปลูก และครั้งที่ 2 ใส่เมื่อข้าวโพดอายุได้ประมาณ 30 วัน ส่วนปุ๋ยฟอสเฟตและปุ๋ยโพแทชใส่ครั้งเดียวพร้อมปลูก ทำการเก็บเกี่ยวข้าวโพดที่อายุ 120 วัน ในพื้นที่เก็บเกี่ยว 3 X 3 เมตร (เก็บเกี่ยวจากแถวกลาง 4 แถว เว้นแถวริมข้างละ 2 แถว และหัวแปลงกับท้ายแปลงข้างละ 4 ต้น)

เก็บตัวอย่างดินในช่วงก่อนปลูกและหลังเก็บเกี่ยว โดยเก็บที่ระดับความลึก 0 – 20 และ 20 – 50 เซนติเมตร จากผิวดิน เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินได้แก่ 1) เนื้อดินโดยวิธี Hydrometer method

2) pH ใช้อัตราส่วนดินต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1 3) อินทรียวัตถุโดยวิธี Walkley and Black method 4) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์โดยวิธี Olsen แล้ววิเคราะห์การเกิดสีด้วยวิธี molybdate ascorbic acid และ 5) โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้โดย 1 *N* NH_4OAc, pH 7 แล้ววิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ Atomic absorption spectrophotometer

เก็บตัวอย่างพืช โดยแบ่งออกเป็น 5 ส่วนคือ ต้น ใบ กาบฝัก เมล็ด และซัง มาวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช ได้แก่ 1) ไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldhal method 2) ฟอสฟอรัสทั้งหมดโดยวิธีย่อยสลายตัวอย่างด้วย mixed – nitric perchloric acid แล้ววิเคราะห์การเกิดสีด้วยวิธี Vanado – molybdate yellow color และ 3) โพแทสเซียมทั้งหมดโดยวิธีย่อยสลายตัวอย่างด้วย mixed – nitric perchloric acid แล้ววิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ Atomic absorption spectrophotometer

บันทึกข้อมูลความสูง จำนวนต้น จำนวนฝัก น้ำหนักต้น ผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ปริมาณการดูดใช้ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมของพืช นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติของ IRRISTAT Version 3/93 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test และสรุปผล

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ 1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยเคมีดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2. แปลงเกษตรกร ตำบลสุขสำราญ อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1. ศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับต่อการปลดปล่อยโพแทสเซียมของดินต่างๆ โดยการบ่มในห้องปฏิบัติการ

ได้ตัวอย่างดิน 4 ชุดดิน ได้แก่ ชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบ จากการวิเคราะห์สมบัติของดินก่อนทำการทดลอง พบว่าชุดดินโชคชัยมีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียว ค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดจัดมาก (pH 3.9) ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ 13.2 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับปานกลาง 12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูง 113 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชุดดินปากช่องมีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดปานกลาง (pH 6.0) ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับสูง 38.3 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก 70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูงมาก 336 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ชุดดินห้วยโป่งมีเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดจัดมาก (pH 3.8) ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำ 8.2 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก 51 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับต่ำ 43 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

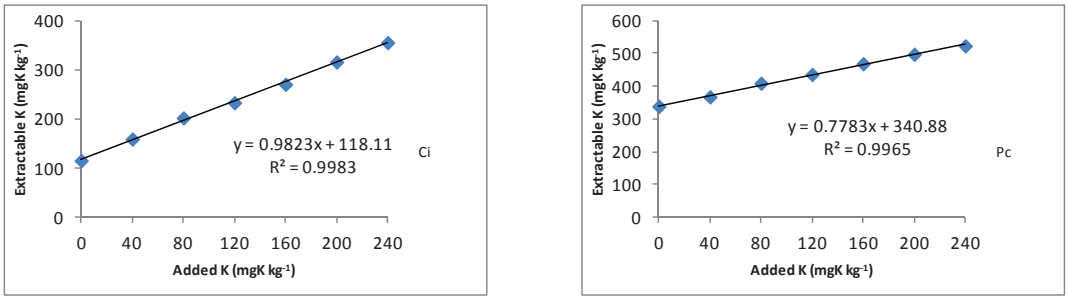
ชุดดินสัตหีบมีเนื้อดินเป็นดินทรายร่วน ค่าปฏิกิริยาดินเป็นกรดจัดมาก (pH 4.1) ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับต่ำมาก 3.8 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับสูงมาก 58 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณ

โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับต่ำมาก 19 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (กรมวิชาการเกษตร, 2553 ; Land Classification Division and FAO Project Staff, 1973) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. สมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

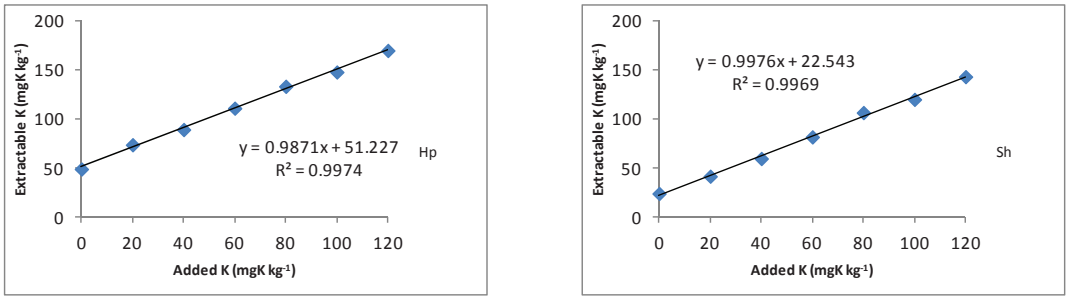
สมบัติของดิน	ค่าวิเคราะห์ดิน			
	ชุดดินโชคชัย	ชุดดินปากช่อง	ชุดดินห้วยโป่ง	ชุดดินสัตหีบ
Texture	clay loam	sandy clay loam	sandy clay loam	loamy sand
pH (1:1)	3.9	6.0	3.8	4.1
OM (ก./กก.)	13.2	38.3	8.2	3.8
Avai.P (มก./กก.)	12	70	51	58
Exch.K (มก./กก.)	113	336	43	19

จากการศึกษาการดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินโชคชัยและปากช่อง พบว่าชุดดินโชคชัยมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.9823 และชุดดินปากช่องมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.7783 ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2. ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินโชคชัย (Ci) และชุดดินปากช่อง (Pc)

จากการศึกษาการดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินห้วยโป่งและสัตหีบ พบว่าชุดดินห้วยโป่งมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.9871 และชุดดินสัตหีบมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.9976 ดังภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียม (BC_K) มีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 1 ค่า BC_K มีค่าต่ำเข้าใกล้ 0 แสดงถึงว่าปุ๋ยโพแทชที่ใส่ลงไปมีแนวโน้มถูกตรึงไว้มาก ในขณะที่ค่าเข้าใกล้ 1 จะแสดงถึงปุ๋ยโพแทชที่ใส่ลงไปในดิน จะถูกตรึงได้น้อยและปลดปล่อยออกมาเป็นประโยชน์ให้แก่พืชได้ ใกล้เคียงกับปริมาณปุ๋ยโพแทชที่ใส่ลงไป ค่า BC_K ที่ได้จะเป็นค่าคงที่ไม่มีหน่วย (สาริศา, 2552)



ภาพที่ 3. ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินห้วยโป่ง (Hp) และชุดดินสัตหีบ (Sh)

ชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง สัตหีบ และลพบุรี (แปลงทดลอง) ปริมาณความต้องการปุ๋ยโพแทชจากสมการคาดคะเนมีค่าเท่ากับ 2 0 4 6 และ 4 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 โดยชุดดินปากช่องไม่ต้องการปุ๋ยโพแทช เนื่องจากปริมาณโพแทสเซียมดั้งเดิมในดินเท่ากับ 336 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน่าจะเพียงพอแก่การเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ตารางที่ 2. ผลการคาดคะเนความต้องการโพแทสเซียมที่ได้จากการสกัดโพแทสเซียมโดยวิธี 1 *N* NH_4OAc, pH 7

ชุดดิน	B.D. (เมกะกรัม/ลบ.ม.)	Kcritical (มก./กก.)	Ksoil (มก./กก.)	BC_K	เมล็ด (กก./เฮกแตร์)	คำแนะนำปุ๋ยที่ได้จากการคาดคะเน (กก.K/เฮกแตร์)	(กก.K_2O/ไร่)
โชคชัย	1.09	35	113	0.9823	4554	9	2
ปากช่อง	1.21	35	336	0.7783	4554	0	0
ห้วยโป่ง	1.75	35	43	0.9871	4554	21	4
สัตหีบ	1.64	35	19	0.9976	4554	28	6
ลพบุรี (แปลงทดลอง)	1.28	72	121	0.8265	6000	18	4

การทดลองที่ 2. การประเมินการใช้ปุ๋ยโพแทชจากค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับ/การปลดปล่อยโพแทสเซียมในชุดดินต่างๆ ในสภาพพื้นที่ปลูก : กลุ่มดินด่าง

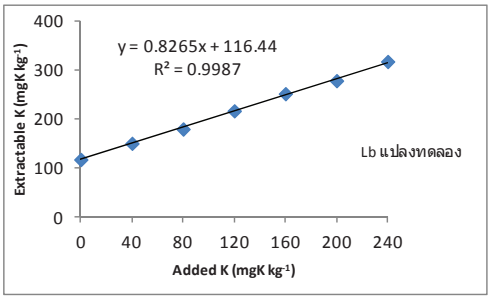
1. **สมบัติทางกายภาพและเคมีของชุดดินลพบุรี**

สมบัติของดินก่อนปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ แปลงเกษตรกร ตำบลสุขสำราญ อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ พิกัด 47P 0663486 1696265 ซึ่งเป็นชุดดินลพบุรี เป็นดินลึก ดินบนมีเนื้อดินเป็นดินเหนียว ค่าปฏิกิริยาดินเป็นด่างอ่อน (pH 7.4) พบชั้นปูนมาร์ลที่ระดับความลึก 80 เซนติเมตรลงไปจากผิวดิน ปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับค่อนข้างสูง 29.5 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ 7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูงมาก 121 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดินล่างมีเนื้อดินเป็นดินเหนียว ค่าปฏิกิริยาดินเป็นด่างปานกลาง (pH 7.9) มีปริมาณอินทรียวัตถุอยู่ในระดับปานกลาง 16.6 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์อยู่ในระดับต่ำ 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับปานกลาง 85 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. สมบัติทางกายภาพและเคมีของชุดดินลพบุรีก่อนปลูก

สมบัติของดิน	**ค่าวิเคราะห์ดิน**	
	0 – 20 ซม.	**20 – 50 ซม.**
Texture	clay	clay
pH (1:1)	7.4	7.9
OM (ก./กก.)	29.5	16.6
Avail.P (มล./กก.)	7	4
Exch.K (มล./กก.)	121	85

จากการศึกษาการดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินลพบุรี (แปลงทดลอง) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.8265 ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4. ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินลพบุรี (Lb) แปลงทดลอง

ปริมาณความต้องการปุ๋ยโพแทชจากสมการคาดคะเน เมื่อใช้วิธีการสกัดโพแทสเซียมโดยวิธี 1 *N* NH_4OAc, pH 7 มีค่าเท่ากับ 4 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ (ตารางที่ 2) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี 7 กรรมวิธี 3 ซ้ำดังนี้

1) ใส่ปุ๋ย 10-10-0 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
2) ใส่ปุ๋ย 10-10-2 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
3) ใส่ปุ๋ย 10-10-4 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
4) ใส่ปุ๋ย 10-10-6 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
5) ใส่ปุ๋ย 10-10-8 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
6) ใส่ปุ๋ย 10-10-10 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่
7) ใส่ปุ๋ย 10-10-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่

2. การเจริญเติบโตของข้าวโพดปี 2555

2.1 ความสูงของข้าวโพดที่อายุ 30 วัน

การใส่ปุ๋ยโพแทชในทุกระดับ ให้ความสูงของข้าวโพดที่อายุ 30 วันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 2 และ 10 – 10 – 12 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ มีแนวโน้มให้ความสูง สูงสุดเท่ากับ 71 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

2.2 ความสูงของข้าวโพดที่อายุ 60 วัน

การใส่ปุ๋ยโพแทชในทุกระดับ ให้ความสูงของข้าวโพดที่อายุ 60 วันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 10 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ มีแนวโน้มให้ความสูงสูงสุดเท่ากับ 203 เซนติเมตร ส่วนกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 8 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ ให้ความสูงต่ำสุดเท่ากับ 195 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

3. องค์ประกอบผลผลิตข้าวโพดปี 2555

3.1 จำนวนต้นต่อไร่

การใส่ปุ๋ยโพแทชในทุกระดับ ให้จำนวนต้นต่อไร่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยทุกกรรมวิธีมีจำนวนต้นต่อไร่เท่ากับ 8,533 ต้นต่อไร่ (ตารางที่ 5)

3.2 น้ำหนักต้นต่อไร่

การใส่และไม่ใส่ปุ๋ยโพแทชไม่ทำให้ข้าวโพดมีน้ำหนักต้นต่อไร่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 6 กิโลกรัม N-P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ มีแนวโน้มให้น้ำหนักต้นต่อไร่สูงสุดเท่ากับ 1,889 กิโลกรัมต่อไร่ ส่วนกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 4 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ ให้น้ำหนักต้นต่อไร่ต่ำสุดเท่ากับ 1,334 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 5)

3.3 จำนวนฝักต่อไร่

การใส่ปุ๋ยโพแทชในทุกระดับ ให้จำนวนฝักต่อไร่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยทุกกรรมวิธีมีจำนวนฝักต่อไร่เท่ากับ 8,533 ฝักต่อไร่ (ตารางที่ 5)

3.4 น้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่

การใส่และไม่ใส่ปุ๋ยโพแทชไม่ทำให้ข้าวโพดมีน้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 10 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ มีแนวโน้มให้น้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่สูงสุดเท่ากับ 1,089 กิโลกรัมต่อไร่ (ตารางที่ 5)

3.5 เปอร์เซ็นต์กะเทาะเมล็ด

การใส่และไม่ใส่ปุ๋ยโพแทชไม่ทำให้ข้าวโพดมีเปอร์เซ็นต์กะเทาะเมล็ดแตกต่างกันทางสถิติ โดยทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์กะเทาะเมล็ดเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4. ความสูงของข้าวโพดที่อายุ 30 และ 60 วัน ปี 2555

กรรมวิธีการทดลอง	ความสูงที่อายุ 30 วัน (ซม.)	ความสูงที่อายุ 60 วัน (ซม.)
10-10-0 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	70	196
10-10-2 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	71	200
10-10-4 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	69	197
10-10-6 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	69	201
10-10-8 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	68	195
10-10-10 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	70	203
10-10-12 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	71	202
F-test	ns	ns
CV(%)	6.1	1.9

หมายเหตุ ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 5. องค์ประกอบผลผลิตข้าวโพด

กรรมวิธีการทดลอง	จำนวนต้น (ต้น/ไร่)	น้ำหนักต้น (กก./ไร่)	จำนวนฝัก (ฝัก/ไร่)	น้ำหนักเมล็ด (กก./ไร่)	% กะเทาะ (เปอร์เซ็นต์)
10-10-0 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,422	8,533	1,030	82.5
10-10-2 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,600	8,533	1,030	82.5
10-10-4 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,334	8,533	1,007	82.4
10-10-6 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,889	8,533	1,065	82.2
10-10-8 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,622	8,533	1,005	82.4
10-10-10 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,711	8,533	1,089	82.2
10-10-12 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	8,533	1,867	8,533	1,086	82.3
F-test	ns	ns	ns	ns	ns
CV(%)	-	27.7	-	7.2	0.3

หมายเหตุ ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สรุปผลการทดลอง

ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง และสัตหีบมีค่าเท่ากับ 0.9823 0.7783 0.9871 และ 0.9976 ตามลำดับ

ปริมาณความต้องการปุ๋ยโพแทสเซียมจากสมการคาดคะเนในปี 2555 ของชุดดินโชคชัย ปากช่อง ห้วยโป่ง สัตหีบ และลพบุรี (แปลงทดลอง) มีค่าเท่ากับ 2 0 4 6 และ 4 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ตามลำดับ

ปี 2555 กรรมวิธีการใส่ปุ๋ยโพแทชในทุกระดับทั้ง 7 กรรมวิธีให้ความสูงของข้าวโพดที่อายุ 30 และ 60 วัน จำนวนต้นต่อไร่ น้ำหนักต้นต่อไร่ จำนวนฝักต่อไร่ น้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่ และเปอร์เซ็นต์กะเทาะเมล็ดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกรรมวิธีการใส่ปุ๋ยอัตรา 10 – 10 – 10 กิโลกรัม N – P_2O_5 – K_2O ต่อไร่ มีแนวโน้มให้น้ำหนักเมล็ดที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ต่อไร่สูงสุดเท่ากับ 1,089 กิโลกรัมต่อไร่ โดยชุดดินลพบุรี มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมเท่ากับ 0.8265 แสดงว่าปุ๋ยโพแทชที่ใส่ลงไปในดิน 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกตรึงไว้ได้ 17.35 เปอร์เซ็นต์ และปลดปล่อยออกมาเป็นประโยชน์ให้แก่พืชได้ 82.65 เปอร์เซ็นต์

ชุดดินลพบุรี (แปลงทดลอง) มีปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินบนที่ระดับความลึก 0 – 20 เซนติเมตร ก่อนปลูกข้าวโพดอยู่ในระดับสูงมาก มีค่าเท่ากับ 121 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอต่อการ เจริญเติบโตและให้ผลผลิต ทำให้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ไม่ตอบสนองต่อการใส่ปุ๋ยโพแทช การทดลองครั้งนี้ได้คำแนะนำว่า ไม่ต้องใส่ปุ๋ยโพแทชในการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ข้อมูลการดูดซับและการปลดปล่อยโพแทสเซียมของดิน สามารถนำไปใช้ในการให้คำแนะนำการใช้ปุ๋ยโพแทชในพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เพื่อรักษาศักยภาพของดินในการผลิตข้าวโพดอย่างยั่งยืนต่อไป

2. สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ไปขยายผลหรือปรับใช้กับชุดดินอื่น ซึ่งจะเป็นประโยชน์กับนักวิชาการเกษตรของกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานอื่นๆ นำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยด้านดินและปุ๋ย และสามารถให้คำแนะนำการใช้ปุ๋ยแก่เกษตรกรได้อย่างถูกต้อง

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2548ก. **รายงานการจัดการทรัพยากรดินเพื่อการปลูกพืชเศรษฐกิจหลักตามกลุ่มชุดดิน เล่มที่ 1 ดินบนพื้นที่ราบต่ำ**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ

กรมวิชาการเกษตร. 2553. **คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ

ทัศนีย์ อัตตะนันทน์ และ สันติ ธีราภรณ์. 2548. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการ "การจัดการปุ๋ยเฉพาะพื้นที่สำหรับข้าวโพด โดยใช้โปรแกรมสนับสนุนการตัดสินใจและการวิเคราะห์ดิน"**.

สาริศา ศิริชมจันทร์. 2552. **การปรับปรุงวิธีการประเมินความต้องการปุ๋ยโพแทสเซียมสำหรับดินสเมกไทต์ที่ปลูกข้าวโพด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Attanandana, T., R. Yost, T. Vearsilp, K. Soitong, and C. Sangchayosawat. 2004. Final Report, FAO Project TCP/THA/2901, Sustainable Maize Production through the Use of a Location Specific Nutrient Management Decision Support System (TCP/THA/2901A).

Land Classification Division and FAO Project Staff. 1973. **Soil Interpretation Handbook for Thailand.** Dept. of Land Development, Min. of Agri. And Coop., Bangkok.

Rehm, G. and M. Schmitt. 2002. **Potassium for Crop Production.** Extension Soil Scientist. University of Minnesota

Yost, R. and T. Attanandana. 2006. Predicting and testing site-specific potassium fertilization of maize in soils of the tropics-an example from Thailand. **Soil Sci.** 171: 968-980

การวิจัยพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูง

Research, Development to enhancement of plant growth promoting rhizobacteria to be higher efficiency strains

ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง[1] กัลยกร โปร่งจันทึก[1] ประไพ ทองระอา[1] สุริยะ ปัจฉา[2]
สุธารัตน์ ประภารัตน์[1] พันธ์ศักดิ์ สุขทัศน์[1]
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อวิจัยพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูง เพื่อพัฒนาสายพันธุ์พีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น สำหรับใช้เป็นเชื้อพันธุ์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ให้มีศักยภาพในการผลิตพืชเพิ่มขึ้น โดยดำเนินการทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการฉายรังสีด้วย e – beam ด้วยการหาค่า D_{10} ของแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* sp. DASF 02125 *Beijerinckia mobilis* ATCC 3509 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 แล้วดำเนินการฉายรังสีที่ระดับ D_{10} ดังกล่าว แล้วจึงทดสอบประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) และคัดเลือกโคโลนีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างน้อยสกุลละ 5 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า ได้ *Azotobacter* sp. DASF 02125 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 6 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 38.4 – 70.3% ได้ *Beijerinckia mobilis* ATCC 3509 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าเดิม 8 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 29.0 – 52.0% ได้ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 4 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 75.9 – 154% จึงทำให้ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มพีจีพีอาร์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ทั้ง 3 สกุล เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการทดลองต่อไป

[1]กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
[2]สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียแห่งชาติ (องค์การมหาชน)

บทนำ

การผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อใช้ในการผลิตพืช ได้พัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ โดยการแยกเชื้อจากธรรมชาติและคัดเลือกไอโซเลทเชื้อที่มีประสิทธิภาพและพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ซึ่งแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria หรือ PGPR) ได้มีการค้นพบในส่วนต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจที่หลากหลายชนิดมากขึ้น และยังมีการค้นพบการแสดงออกของยีนตรึงไนโตรเจนและโปรตีนของเชื้อดังกล่าวในเนื้อพืชด้วย (James and Olivares, 1998 ; Reinhold Hurek and Hurek, 1998 ; Reddy *et al*., 2002 ; Iniguez *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเหล่านี้ยังสามารถผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ควบคุมโรคพืชบางชนิด และเพิ่มความเป็นประโยชน์และความสามารถในการดูดแร่ธาตุบางชนิด เช่น ฟอสฟอรัส เป็นต้น (Sessitsch *et al*., 2002 ; Sturz *et al*., 2000 ; Jacoud *et al*., 1999 ; Meunchang *et al*., 2004)

ปัจจุบันได้มีความสนใจศึกษาประโยชน์ของแบคทีเรียที่อาศัยบริเวณรอบๆ รากพืชเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพบว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพได้ (Diem, 1978 ; Bashan and Levanony, 1990) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการใช้ปุ๋ยชีวภาพแต่ละพื้นที่นั้นมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น สกุลและสายพันธุ์แบคทีเรีย ชนิดของพืช สมบัติของดิน ประชากรจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ และเงื่อนไขทางสภาพแวดล้อม เช่น ความชื้นในดิน โดยทั่วไปหลังการใส่ปุ๋ยชีวภาพปริมาณแบคทีเรียจะลดอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของสภาพแวดล้อมซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ จึงมักพบว่าผลการทดลองในสภาพปลอดเชื้อกับในสภาพธรรมชาติมักมีความแตกต่างกัน (Bashan and Levanony, 1988)

การใช้ประโยชน์จากการฉายรังสี นิยมในการฆ่าเชื้อ ปรับปรุงพันธุ์ มานานกว่า 50 ปีแล้ว มักนิยมใช้ฆ่าเชื้อเพื่อการถนอมอาหารในระดับอุตสาหกรรม เป็นแหล่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ แหล่งของไอออนในการฉายรังสีมาจากลำแสงอิเลคตรอน (electron beam หรือ e – beam) หรือเอ็ก – เรย์ (X – rays) ที่กำเนิดจากเครื่องเร่งที่เป็นระบบไฟฟ้า หรือ ^{60}Co ^{137}Cs (Patterson and Loaharanu, 2000) e – beam ใช้ไฟฟ้าเป็นต้นกำเนิดพลังงานไม่ใช้สารกำมันตะภาพรังสีและเครื่องกำเนิดอิเลคตรอนสามารถปิด เมื่อไม่มีการใช้รังสี ซึ่งแตกต่างจากวิธีการที่ใช้สารกำมันตะภาพรังสีเป็นต้นกำเนิดพลังงานที่สารกำมันตะภาพรังสีทำงานตลอดเวลา ในการฉายรังสีด้วยอิเลคตรอนบีมจะไม่ทำให้คุณภาพของอาหารเปลี่ยนแปลงไป ขณะที่รังสีแกรมม่าลดคุณภาพแป้งในเมล็ดข้าว (Hayashi, Takahashi and Todoriki, 1997) ความสัมพันธ์ในการทนทานของจุลินทรีย์ต่อรังสีนั้น Monk *et al*., (1995) รายงานว่าเซลล์แบคทีเรียตอบสนองต่อไอออนไวมาก ซึ่งโดยทั่วไปมีค่า D_{10} ต่ำกว่า 1 kGy (D_{10} หมายถึงระดับความเข้มข้นของรังสีที่ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดประชากรลง 1 log cycle) สปอร์แบคทีเรียทนทานรังสีมากกว่ายีสต์ รา และเซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานว่าสปอร์แบคทีเรียทั่วไปต้านทานรังสีอยู่ในระดับ 1 – 4 kGy ซึ่งผลงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของการวิจัยการใช้รังสีแกรมม่า แต่การใช้ e – beam ยังมีน้อย และเทคนิคการใช้ e – beam ในการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ยังไม่มี

ในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่า D_{10} จากการใช้ e – beam ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อไรโซแบคทีเรีย (rhizobacteria) ที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ สำหรับ ข้าวโพด 3 สกุล คือ *Azotobacter Beijerinckia* และ*Azospirillum* เพื่อพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าเดิมอย่างน้อย 10%

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย 3 สกุล คือ *Azotobacter* sp. DASF 02005,*Beijerinckia mobilis* ATCC 3059 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008
2. เครื่องฉายรังสีแบบ Electron beam (e – beam)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ตู้เขี่ยเชื้อ
5. ตู้แช่แข็ง – 80 องศาเซลเซียส
6. สารเคมีและเครื่องแก้ว
7. เครื่อง Gas chromatograph

วิธีการ

1. เตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์

แบคทีเรีย 3 สกุล ประกอบด้วย *Azotobacter* sp. DASF 02005 *Beijerinckia mobilis* ATCC 3059 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยการเขี่ยเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยวิธีการย้อมเซลล์จากโคโลนีเดียวให้มีเซลล์ที่บริสุทธิ์ ขยายเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูบใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเฉพาะสำหรับ *Azotobactor, Beijerinckia* และ *Azospirillum* เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง *Azotobacter* และ *Azospirillum* เขย่านาน 48 ชั่วโมง ส่วน *Beijerinckia* 5 วัน เพื่อให้ได้การเจริญเติบโตของเซลล์ถึงตอนกลางของระยะเพิ่มจำนวน (log phase or exponential phase) ซึ่งการเพิ่มจำนวนเซลล์มีอัตราเร็วที่คงที่ ประชากรแบคทีเรียจะมีลักษณะคล้ายกันในแง่ของส่วนประกอบทางเคมีและ metabolism ภายในเซลล์ และของเสียยังมีการสะสมน้อย เซลล์จึงมีความแข็งแรงสมบูรณ์เต็มที่เหมาะสำหรับการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

2. การฉายรังสี e-beam และการหาค่า D_{10}

แบ่งเชื้อเหลวใส่หลอดพลาสติกปลอดเชื้อหลอดละ 2 มิลลิลิตร การฉายรังสีใช้ระดับความเข้มข้นพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ที่ 8 MeV ระดับความเข็มข้นรังสี e – beam จริงที่ใช้ คือ 0, 30, 60, 120 และ 150 Gy ฉายรังสีด้วยเครื่อง e – beam ที่สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) อำเภอองค์รักษ์ จังหวัดนครนายก ค่า D_{10} คำนวณจาก slope ของค่า regression ที่ได้รับจากค่าการรอดของเชื้อที่ฉายรังสีแต่ละระดับ (Lara *et al*., 2002) เมื่อได้ช่วงค่า D_{10} แล้วเตรียมดำเนินการฉายรังสี e – beam ที่ระดับค่า D_{10} ของแต่ละไอโซเลทและรวบรวมโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งประมาณ 500 โคโลนีต่อไอโซเลท และดำเนินการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญเติบโตสมบูรณ์หลังต่อเชื้อ 5 ครั้ง อย่างน้อย 25 โคโลนีต่อไอโซเลท และวัดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA และคัดเลือกโคโลนีที่มี ARA เพิ่มขึ้นสูงกว่าเชื้อเดิมไม่น้อยกว่า 10% เพื่อใช้ในการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทีปลอดจากเชื้อปนเปื้อนต่อไป

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และสำนักงานเทคโนโลยีนิวเคลียแห่งชาติ (องค์การมหาชน) จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **ความต้านทานต่อระดับรังสี** e - beam

ความต้านทานรังสีของแบคทีเรียทั้ง 3 สกุล วัดด้วยค่า D_{10} ของ ไรโซแบคทีเรีย 3 สกุล คือ *Azotobacter* sp. DASF 03005 *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 หลังฉายรังสี e – beam ที่ระดับความเข้มข้น 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 Gy พบว่าระดับรังสีที่ทำให้ปริมาณแบคทีเรียทั้งสามสกุลลดลง 1 log cycle อยู่ระหว่าง 120 – 150 Gy

2. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียฉายรังสีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

คัดเลือกแบคทีเรียฉายรังสีที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน โดยประเมินผลด้วยการวัดศักยภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Activity (ARA) สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพได้ดังนี้

2.1 สกุล *Azotobacter* sp. DASF 02125 พบว่าการฉายรังสีที่ระดับ 150 Gy ทำให้ได้ *Azotobacter* สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 5 สายพันธุ์ เรียงลำดับตามรหัสดังนี้ DASF 02125 – 14, DASF 02125 – 15, DASF 02125 – 16, DASF 02125 – 18 และ DASF 02125 – 21 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 38.4, 70.3, 53.4, 52.8 และ 57.5% ของเชื้อ *Azotobacter* สายพันธุ์เดิม (ตารางที่ 1)

2.2 สกุล *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 พบว่าการฉายรังสีที่ระดับ 120 Gy ทำให้ได้ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 6 สายพันธุ์ คือ ATCC 35011 – 14, ATCC35011 – 17, ATCC35011 – 19, ATCC35011 – 26, ATCC35011 – 27 และ ATCC35011 – 28 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการ ตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 38.6, 31.4, 32.2, 52.0, 37.9 และ 29.0% ของเชื้อ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 สายพันธุ์เดิม (ตารางที่ 2)

2.3 สกุล *Azospirillum* sp. DASF 04008 พบว่าการฉายรังสีที่ระดับ 120 Gy ทำให้ได้ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 8 สายพันธุ์ คือ DASF 04008 – 2 DASF 04008 – 6, DASF 04008 – 9, DASF 04008 – 33, DASF 04008 – 34, DASF 04008 – 36 DASF 04008 – 40 และ DASF 04008 – 41 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 147, 101, 75.9, 101, 126, 142, 77.4 และ 154% ของเชื้อ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์เดิม (ตารางที่ 3)

ผลจากการทดลองชี้ให้เห็นชัดเจนว่า electron beam ที่ความเข้มข้นในระดับต่ำมีศักยภาพในการใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ สกุล *Azotobacter*, *Beijerinckia* และ *Azospirillum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก electron beam มีศักยภาพในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งมีผลกระทบถึงกลุ่มยีนที่ควบคุมกลไกการตรึงไนโตรเจน จนอาจมีผลทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้นกว่า สายพันธุ์เดิม

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ได้ค่า D10 ของแบคทีเรียสกุล *Azotobacter* sp. DASF 02125 *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 และ *Azospirillum* sp. DASF 04008 ซึ่งอยู่ระหว่าง 120 – 150 Gy

2. ได้ *Azotobacter* sp. DASF 02125 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 5 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 38.4 – 70.3%

3. ได้ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงกว่าเดิม 6 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 29.0 – 52.0%

4. ได้ *Azospirillum* sp. DASF 04008 สายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าเดิม 4 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 75.9 – 154%

5. ควรมีการดำเนินการขยายผลไปสู่จุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ ต่อไป และควรเพิ่มการศึกษาเชิงลึกในด้านการเปลี่ยนแปลงในระดับสารพันธุกรรมภายในเซลล์

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. **คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารวิชาการลำดับที่ 001/2553. ISBN : 978 – 974 – 436 – 7/49 – 5.

Bashan, Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. **J. Microbiol. 43** : 103 – 121.

Bashan, Y. and H. Levanony. 1988. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand and peat particles. **J.Gen. Microbiol. 134** : 1811 – 1820.

Diem, G. 1978. Colonization of rice roots by diazotroph bacteria. In Environmental role of nitrogen – fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. Edited by U.Granhall. **Ecol. Bull. (Stockholm) 26,** 305 – 311.

Jacoud, C., D. Job., P. Wadoux and R. Bally. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. **J. Microb., 45:** 339 – 342.

James, EK. and Olivares FL (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by Endophytic diazotrophs. **CRC Crit Rev Plant Sci 17**:77 – 119.

Iniguez AL., Dong Y. and E.W.Triplett. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by Klebsiella pneumoniae 342. **Mol Plant Microbe Interact 17**:1078 – 1085.

Lara J.D.L., Fernandez, P.S. Periogo, P.M., and A. Palop. 2002. Irradiation of spore of *Bacillus subtilis* with electron beams. **Innovative Food Science and Emerging Technologies 3** : 379 – 384.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Ando, S. and T. Yokoyama. 2004. Phylogenetic and Physiological Characterization of Indigenous *Azospirillum* Isolates in Thailand. **Soil Sci. Plant Nutr., 50(3)** : 413-421.

Monk, J.D., Beuchat, L.R. and M.P. Doyle. 1995. Irradiation inactivation of food – borne microorganisms. **J. Food Protection 58** : 197 – 208.

Patterson, M.F. and P. Loaharanu. 2000. Irradiation. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, G.W. Gould, The Microbiological Safety and Quality of Food (pp.65-99). Maryland: Aspers Publishers.

Reddy PM., James EK. And J.K. Ladha. 2002. Nitrogen fixation in rice. In: Leigh GJ (ed) Nitrogen fixation at the millennium. Elsevier, Amsterdam, pp 421 – 445.

Reinhold-Hurek B. and T. Hurek. 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol 6**:139 – 144.

Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H. and E. Martínez – Romero. 2002. Advances in rhizobium research. **Crit Ver Plant Sci 21**:323 – 378.

Sturz AV, Christie BR. and J.Nowak. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable Systems of Crop production. **CRC Crit Rev Plant Sci** 19:1–30.

Hayashi, T. Takahashi, Y. and S.Todoriki. 1997. Low-energy electron effects on the sterility and viscosity of grains. **J. Food Science 62**: 858-860.

ตารางที่ 1. สายพันธุ์ *Azotobacter* sp. DASF 03005 ฉายรังสี 150 Gy ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

สกุล – สายพันธุ์	อัตราการตรึงไนโตรเจน นาโนโมล/หลอด/ชั่วโมง	ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (%ของพันธุ์เดิม)
Azotobacter sp. DASF 03005 พันธุ์เดิม	367	0
DASF02125-14	508	38.4
DASF02125-15	625	70.3
DASF02125-16	563	53.4
DASF02125-18	561	52.8
DASF02125-21	578	57.5

ตารางที่ 2. สายพันธุ์ *Beijerinckia mobilis* ATCC 35011 ฉายรังสี 120 Gy ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

สกุล-สายพันธุ์	อัตราการตรึงไนโตรเจน นาโนโมล/หลอด/ชั่วโมง	ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (%ของพันธุ์เดิม)
Beijerinckia mobilis ATCC 35011 พันธุ์เดิม	544	0
ATCC35011-14	754	38.6
ATCC35011-17	715	31.4
ATCC35011-19	719	32.2
ATCC35011-26	827	52.0
ATCC35011-27	750	37.9
ATCC35011-28	702	29.0

ตารางที่ 3. สายพันธุ์ *Azospirillum* sp. DASF 04008 ฉายรังสี 120 Gy ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น

สกุล – สายพันธุ์	อัตราการตรึงไนโตรเจน นาโนโมล/หลอด/ชั่วโมง	ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเพิ่มขึ้น (%ของพันธุ์เดิม)
Azospirillum sp. DASF 04008 พันธุ์เดิม	41.6	0
DASF 04008-2	102.9	147.0
DASF 04008-6	86.3	101.4
DASF 04008-9	73.2	75.9
DASF 04008-33	83.6	100.9
DASF 04008-34	94.1	126.2
DASF 04008-36	100.8	142.3
DASF 04008-40	73.8	77.4
DASF 04008-41	105.7	154.1

ศึกษาวัสดุพาที่เหมาะสมสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

ศฟิษา สังวิเศษ ศิริลักษณ์ จิตรอักษร

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาวัสดุพาที่เหมาะสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวัสดุพาที่มีคุณสมบัติสามารถนำมาผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียมได้ ผลศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมในวัสดุพาชนิดต่างๆ พบว่า จำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมเพิ่มขึ้น 10 ถึง 100 เท่าภายหลังเก็บรักษา 4 สัปดาห์ และลดลงเป็น 10 ถึง 100 เท่า ภายหลังเก็บรักษา 12 สัปดาห์ โดยแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่ผสมกับถ่านเผา มีการรอดชีวิตสูงที่ระดับ 10^6 CFU/g ซึ่งถ่านเผาเป็นวัสดุที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียมได้ เนื่องจากสามารถรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไว้ได้ภายหลังการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ อีกทั้งยังมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อยและคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

คำนำ

ระบบการผลิตพืชในปัจจุบันมุ่งเน้นผลิตตามปริมาณความต้องการของผู้บริโภค จึงมีการเร่งผลิตพืชให้เพียงพอโดยไม่คำนึงถึงความอุดมสมบูรณ์ของดิน เป็นเหตุให้มีการใช้ปุ๋ยเคมีมากขึ้นเพื่อเพิ่มธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช หนึ่งในธาตุอาหารหลัก คือ โพแทสเซียม ซึ่งเป็นธาตุที่ช่วยสังเคราะห์น้ำตาล แป้ง และโปรตีน ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลจากใบไปสู่ผล ช่วยให้ผลเติบโตเร็ว มีคุณภาพดี แข็งแรงต้านทานต่อโรคและแมลงบางชนิด ปุ๋ยเคมีที่ให้ธาตุโพแทสเซียมหรือปุ๋ยโพแทช ได้แก่ โพแทสเซียมคลอไรด์ โพแทสเซียมซัลเฟต ซึ่งมีราคาสูงจึงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตพืช หากมีการใส่ปุ๋ยโพแทสเซียมมากเกินความจำเป็นจะถูกตรึงไว้ในรูปที่พืชไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ชั่วคราวจนกระทั่งเกิดความสมดุลระหว่างส่วนของโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้และส่วนของโพแทสเซียมในสารละลายดิน โพแทสเซียมกลุ่มดังกล่าวจึงจะปลดปล่อยออกมาในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนั้น การลดการใช้ปุ๋ยโพแทสเซียมและละลายธาตุโพแทสเซียมที่ถูกตรึงในดินโดยใช้จุลินทรีย์ละลายโพแทสเซียมจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดต้นทุนในการผลิตพืชได้ และเมื่อพิจารณาถึงกระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียมหนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญ คือ การศึกษาสมบัติของวัสดุพาที่เหมาะสมในการผลิตปุ๋ยชีวภาพโพแทสเซียม ซึ่งวัสดุพาที่มีคุณสมบัติดีจำเป็นต้องมีประสิทธิภาพในการดูดซับความชื้น ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ง่ายต่อการทำให้แห้งและบดเป็นผงละเอียด ฆ่าเชื้อหรือทำให้ปลอดเชื้อได้ง่าย มีปริมาณมากพอสามารถใช้ได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้จุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตได้สูง และมีอายุการเก็บรักษานาน วัสดุพาที่นิยมใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ได้แก่ ดินพีทลิกไนท์ ผงถ่าน ปุ๋ยหมักที่ย่อยสลายสมบูรณ์ ดินร่วนเหนียว อะพาไทท์ เวอร์มิคิวไลท์ เป็นต้น

วิธีดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์

ไอโซเลทแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม K05075 วัสดุรองรับที่ทำการศึกษา ได้แก่ วัสดุอินทรีย์โรงงาน ถ่านเผาบดละเอียด ดินร่วนเหนียว ปุ๋ยหมักย่อยสลายสมบูรณ์ ขุยมะพร้าว และวัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท) จานเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ กล้องจุลทรรศน์ เครื่อง Flame photometer เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer อุปกรณ์เครื่องแก้วและสารเคมีที่จำเป็นต่างๆ

วิธีการ

ศึกษาสมบัติทางเคมีบางประการของวัสดุพา

ชนิดวัสดุพาที่ศึกษา 6 ชนิด ได้แก่ วัสดุอินทรีย์โรงงาน ถ่านเผาบดละเอียด ดินร่วนเหนียว ปุ๋ยหมักย่อยสลายสมบูรณ์ ปุ๋ยหมักผสมขุยมะพร้าวอัตราส่วน 2 : 1 และวัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท) นำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดละเอียดด้วยโกร่งบดหรือเครื่องบดละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาดช่องเปิด 0.5 และ 2 มิลลิเมตร นำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ pH ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นทั้งหมด และปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด

ศึกษาลักษณะโคโลนี

การติดแกรม รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของไอโซเลทแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม K05075 โดยนำแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซิลิเกตแบคทีเรีย (Hebie Academy of Science, 1996) ใช้แร่เฟลด์สปาร์เป็นแหล่งโพแทสเซียม เตรียมอาหารวุ้นแข็งซิลิเกตแบคทีเรีย และเกลี่ยสารละลายด้วยวิธี dilution plate บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 3 วัน

ศึกษาผลของชนิดวัสดุพาต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Designed (CRD) 6 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำ กรรมวิธีประกอบด้วย วัสดุอินทรีย์โรงงาน ถ่านเผาบดละเอียด ดินร่วนเหนียว ปุ๋ยหมักย่อยสลายสมบูรณ์ ปุ๋ยหมักผสมขุยมะพร้าวอัตราส่วน 2 : 1 และวัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท) โดยในกรรมวิธีควบคุมใช้วัสดุพาของแต่ละกรรมวิธี นำวัสดุพาทั้ง 6 ชนิด ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดด้วยโกร่งบดหรือเครื่องบดละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาดช่องเปิด 0.5 มิลลิเมตร บรรจุในถุงพลาสติกโพลิเอทธิลีนตามปริมาณที่กำหนดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำ 1 ครั้ง หลังจากนั้นเลี้ยงไอโซเลทแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม K05075 ในอาหารซิลิเกตเหลวแบคทีเรีย เขย่าที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน หรือได้เซลล์ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในวัสดุพาผสมเข้ากันให้ความชื้นเทียบเท่า 50–60 Water holding capacity เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส บันทึกผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทดสอบบนอาหารซิลิเกตแบบวุ้นแข็ง ภายหลังเก็บรักษาเป็นเวลา 2 4 6 8 และ 12 สัปดาห์ และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของวัสดุพาที่ศึกษา พบว่า มี pH อยู่ระหว่าง 6.90 – 9.29 โดยถ่านเผามี pH สูงสุด ส่วนปุ๋ยหมักผสมขุยมะพร้าว อัตรา 2 : 1 มี pH ต่ำสุด ปริมาณอินทรียวัตถุมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.56 – 25.28 เปอร์เซ็นต์ โดยวัสดุอินทรีย์โรงงานมีอินทรียวัตถุต่ำสุด และวัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท) มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงสุด ส่วนในถ่านเผามีปริมาณอินทรียวัตถุ 2.87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาลักษณะโคโลนี การติดแกรม รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของไอโซเลทแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม K05075 พบว่า โคโลนีมีขนาด 4 – 10 มิลลิเมตร สีเหลืองเข้ม รูปร่างของโคโลนีเจริญเป็นเส้นหยาบและแผ่ขยายคล้ายราก (Rhizoid) ความโค้งนูนเป็นแบบแบนราบไปตามผิวหน้าของอาหาร (Flat) ผิวหน้าเหี่ยว (Wrinkled) ขอบเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (Undulate) ย้อมติดสีแกรมบวก เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์มีลักษณะเป็นแท่งมน การตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมบนอาหารซิลิเกตแบคทีเรียแบบวุ้นแข็ง จากปริมาณแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมเริ่มต้นเท่ากัน คือ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่า ภายหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วัสดุพาทุกชนิดมีจำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมเพิ่มขึ้น 10 – 100 เท่า (ตารางที่ 1) และลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยพบจำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมรอดชีวิตในถ่านเผาสูงกว่าวัสดุพาชนิดอื่นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จาก log CFU/g เทียบเท่า 5.32 ที่ 2 สัปดาห์ เพิ่มเป็น 7.76 ที่ 4 สัปดาห์ และลดลงเหลือ 6.90 ภายหลังเก็บรักษาที่ 12 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องจากถ่านเผามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อยกว่าวัสดุพาชนิดอื่น (วัสดุอินทรีย์โรงงาน ดินร่วนเหนียว ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยหมักผสมขุยมะพร้าวอัตรา 2 : 1) ทำให้เกิดการแข่งขันการแย่งอาหารระหว่างจุลินทรีย์ปนเปื้อนกับแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม แต่เมื่อพิจารณาวัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท) ซึ่งมีแนวโน้มการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมคล้ายกับถ่านเผา คือ จาก log CFU/g เทียบเท่า 5.66 ที่ 2 สัปดาห์ เพิ่มเป็น 7.56 ที่ 4 สัปดาห์ และลดลงเหลือ 6.38 ภายหลังเก็บรักษาที่ 12 สัปดาห์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมสามารถรอดชีวิตในวัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท) ได้ แต่ไม่สามารถนำมาผลิตเป็นวัสดุพาสำหรับผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียมได้เพราะไม่มีแหล่งดินพีทในปริมาณมาก ไม่สามารถใช้ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น ถ่านเผาจึงเป็นวัสดุที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม เนื่องจากสามารถรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมไว้ได้นาน อีกทั้งยังมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อย

ตารางที่ 1. การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่มีชีวิตเมื่อเก็บรักษาในวัสดุพาชนิดต่าง ๆ

กรรมวิธี	จำนวนโพแทสเซียม (Log CFU/g) ที่ระยะเวลาเก็บรักษา					F-test	CV (%)
	2 สัปดาห์	4 สัปดาห์	6 สัปดาห์	8 สัปดาห์	12 สัปดาห์		
วัสดุอินทรีย์โรงงาน	5.54	7.63	5.75	5.69	5.62	152.00**	2.1
ถ่านเผา	5.32	7.76	6.65	6.52	6.90	1733.24**	0.5
ดินร่วนเหนียว	5.05	6.19	5.91	5.44	5.23	100.70**	1.5
ปุ๋ยหมัก	5.64	7.59	5.54	5.52	5.85	3541.35**	0.4
ปุ๋ยหมักผสมขุยมะพร้าว อัตรา 2 : 1	5.54	7.55	5.94	5.93	5.65	1870.12**	0.5
วัสดุที่มีคุณสมบัติเทียบเท่าฮิวมัส (ดินพีท)	5.66	7.56	6.39	6.36	6.38	1267.18**	0.6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

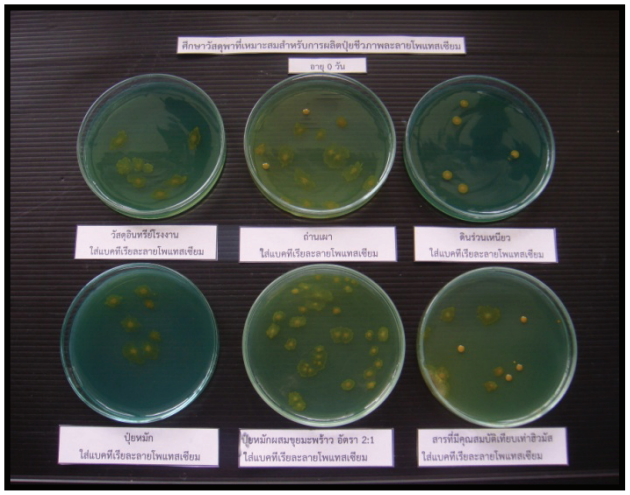
ถ่านเผา เป็นวัสดุพาที่เหมาะสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม เนื่องจากสามารถรักษาให้แบคทีเรียละลายโพแทสเซียมมีการรอดชีวิตได้นานและปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นน้อยที่สุด อีกทั้งยังเป็นวัสดุหาง่าย บดเป็นผงละเอียด ฆ่าเชื้อหรือทำให้ปลอดเชื้อได้ง่าย และมีปริมาณมากพอสามารถใช้ได้อย่างต่อเนื่อง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

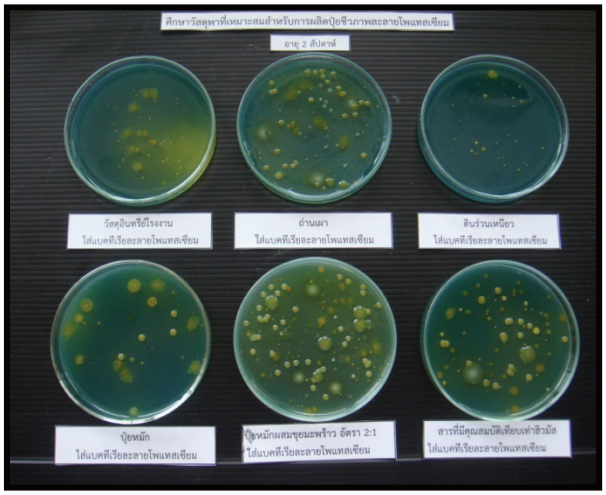
สามารถนำข้อมูลการรอดชีวิตของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมในถ่านเผา วิจัยและพัฒนาต่อด้านสัดส่วนผสมกับวัสดุอื่น และกรรมวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมถ่านเผาให้ปลอดจุลินทรีย์ปนเปื้อน เพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายโพแทสเซียม

เอกสารอ้างอิง

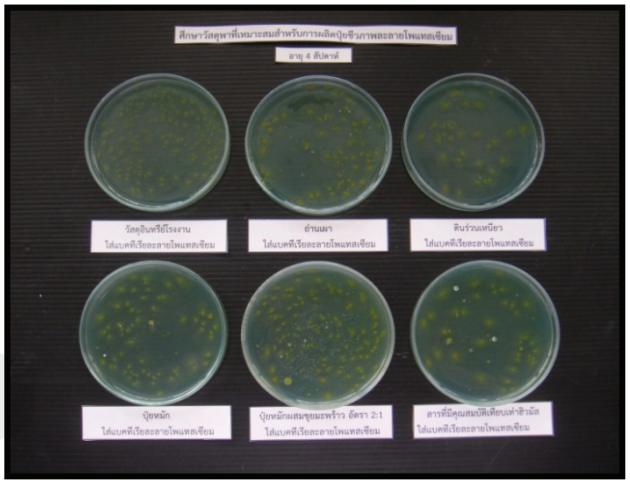
Hebie Academy of Science 996. ***International training course on biological fertilizer***. The International Science and Technology Corporation Department of SSTCC. The Institute of Microbiology.



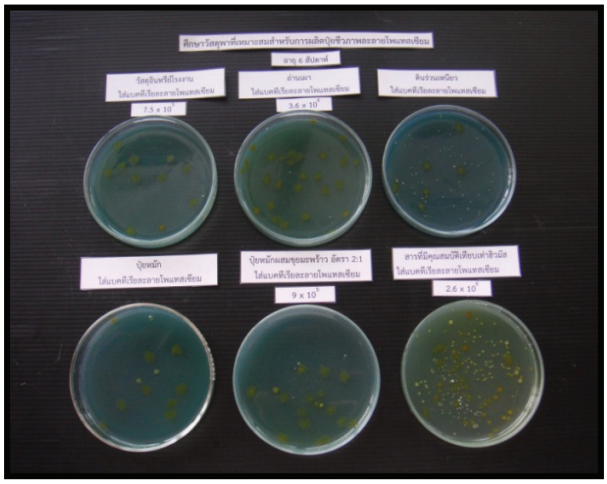
0 สัปดาห์



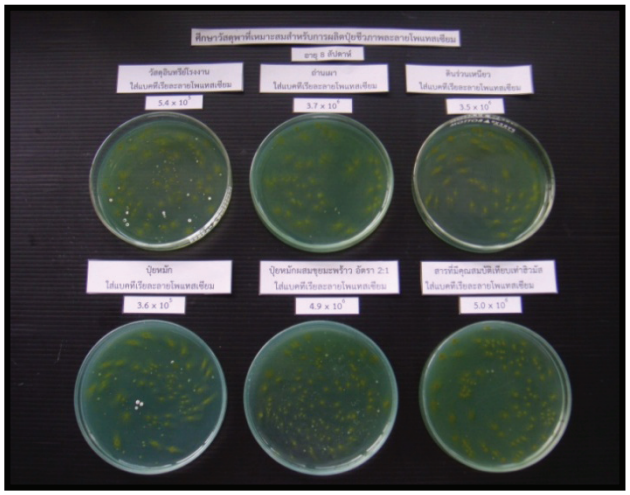
2 สัปดาห์



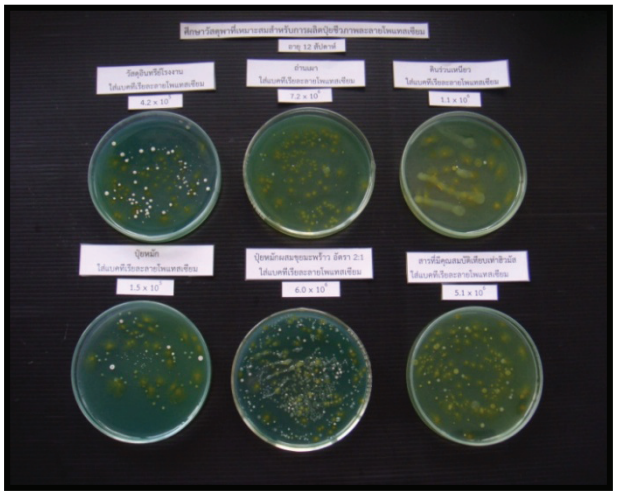
4 สัปดาห์



6 สัปดาห์



8 สัปดาห์



12 สัปดาห์

ภาพที่ 1. จำนวนแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่มีชีวิตในวัสดุพาชนิดต่างๆ เมื่อระยะเวลาเก็บรักษาแตกต่างกัน

การวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต

ศฟิษา สังวิเศษ ศิริลักษณ์ จิตรอักษร พชร อริยะสกุล

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอส ซึ่งเป็นสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต โดยการแยกบริสุทธิ์จุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่ในพื้นที่ทำการเกษตรของเกษตรกรที่มีการใช้สารคลอร์ไพริฟอส จำนวน 7 แหล่ง ได้แบคทีเรียที่ทนทานต่อสารคลอร์ไพริฟอส ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 18 ไอโซเลท และจากการศึกษามี 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอส ได้แก่ OPCP01 OPCP08 OPCP09 OPCP15 และ OPCP18 โดยทำให้ปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสในดินลดลง 45.04 47.96 47.06 49.27 และ 54.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำนำ

การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นปริมาณมาก เมื่อสารเหล่านี้ตกลงสู่ดินย่อมก่อให้เกิดผลกระทบต่อพืชและสิ่งมีชีวิตในดิน ซึ่งพืชและจุลินทรีย์ในดินจะได้รับอันตรายจากพิษที่สะสมในดินมากที่สุดเมื่อเทียบกับมนุษย์และสัตว์ ทั้งนี้เพราะพืชและสิ่งมีชีวิตในดินอาศัยอาหารจากดินโดยตรง จากการศึกษาปริมาณสารตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย ส่วนใหญ่พบสารตกค้างกลุ่มออร์แกโนคลอรีน และบางตัวอย่างพบสารตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต และยังพบว่าสารตกค้างในดินมีแนวโน้มตกค้างสูงขึ้น กองวัตถุมีพิษทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการวิเคราะห์และพบสารตกค้างในดินอยู่มากและปริมาณกระจายไปตามดินเกษตรกรรมทั่วประเทศ ซึ่งพบในปริมาณน้อยจนถึงปริมาณสูง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (Organophosphate) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่เกษตรกรกว่าร้อยละ 80 นิยมใช้ป้องกันกำจัดแมลง เช่น คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) เป็นสารกำจัดแมลงที่อยู่ในกลุ่มฟอสโฟโรโธโอเนต (phosphorothionates) มีฤทธิ์ไม่ดูดซึมสามารถกำจัดแมลงได้หลายชนิด ทั้งที่อยู่ตามบ้านเรือน เช่น ยุง มด แมลงสาบ และแมลงศัตรูพืชต่างๆ เช่น หนอน เพลี้ย ด้วง อีกทั้งยังใช้กำจัดแมลงศัตรูในโรงเก็บและผลิตผลการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวด้วยเนื่องจากมีความคงทนและสลายตัวได้อย่างช้าๆ (รัตนาและคณะ, 2537) ด้วยเหตุผลที่มีความสามารถในการกำจัดแมลงได้หลายชนิดและราคาถูก จึงเป็นผลให้คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงที่มีการนำเข้ามาใช้กันอย่างกว้างขวางและใช้ปริมาณมากในประเทศไทยโดยมีปริมารการนำเข้าสูงถึง 1,400 ตัน ในปี พ.ศ.2555 (กรมวิชาการเกษตร, 2555) จากรายงานของสำนักระบาดวิทยาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2546 มีรายงานการจำแนกสารพิษทั้งหมดได้เพียงร้อยละ 6.7 ในกลุ่มนี้พบ Organophosphate มากที่สุด คือ ร้อยละ 65.4 Carbamate ร้อยละ 4.5 สารกำจัดหนูและสัตว์แทะ ร้อยละ 10.3 และอื่นๆ ร้อยละ 19.9

วิธีการบำบัดดินหรือการปรับสภาพดินที่มีการปนเปื้อนให้เหมาะสมก่อนการผลิตพืชสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น 1) การฟื้นฟูสภาพดินโดยการใช้พืช (phytoremediation) เป็นการใช้พืชที่มีชีวิตหรือพืชสีเขียว (Living Plant หรือ Green Plant) ปลูกในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของเสียอันตรายในดินเพื่อกำจัดและทำลายความเข้มข้นของสารอันตราย เช่น น้ำมัน สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช หรือสารอินทรีย์เคมี เป็นต้น 2) การดูดซับด้วยชีววิธี (biosorption) และ 3) การฟื้นฟูสภาพดินโดยชีววิธี (bioremediation) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการฟื้นฟูสภาพดินโดยชีววิธี เป็นวิธีการใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดสารปนเปื้อน เช่น สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช อีกทั้งเป็นวิธีที่มีราคาถูกและปลอดภัยมากกว่า จากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์ย่อยสลายสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืชเพื่อนำผลที่เกิดจากการย่อยสลายมาเป็นแหล่งพลังงาน คาร์บอน แร่ธาตุและอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต (Alexander, 1977) และสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชบางชนิดอาจถูกย่อยสลายได้แต่จุลินทรีย์ไม่ได้ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาคัดเลือก ทดสอบ และเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอส ซึ่งอยู่ในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต

วิธีดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างดิน เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ ได้แก่ จานเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ กล้องจุลทรรศน์ เครื่อง Flame photometer เครื่อง Atomic absorption spectrophotometer อุปกรณ์เครื่องแก้วและสารเคมีที่จำเป็นต่างๆ และวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่ตกค้างในตัวอย่างดิน เครื่อง Gas Chromatography (GC)

วิธีการ

ศึกษาสมบัติของดินบริเวณที่ศึกษา สำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างดินในแปลงเกษตรกรที่มีการใช้กลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตจาก 3 แหล่ง ได้แก่ แปลงเกษตรกรในเขตภาคกลาง 2 แหล่ง และในเขตภาคตะวันออก 1 แหล่ง โดยทำการเก็บตัวอย่างดินที่ระยะ 0 – 15 เซนติเมตร ในแปลงเกษตรกรอย่างน้อย 5 หลุมๆ ละ 0.5 กิโลกรัม ในพื้นที่ 25 ตารางเมตร เก็บรักษาตัวอย่างดินที่อุณหภูมิต่ำระหว่างขนส่งมายังห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ ทำการวิเคราะห์สมบัติดินทางเคมี กายภาพ และชีวภาพ โดยศึกษาความหลากหลายของจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่รวบรวมได้ด้วยเทคนิคทางปฐพีวิทยาและจุลินทรีย์ และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่ตกค้างในตัวอย่างดินด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) แยกบริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจนับได้ โดยแยกบริสุทธิ์เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดด้วยอาหาร nutrient agar โดยนำตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่มา 10 กรัม ละลายใน 0.85% NaCl และ Tween 80 จำนวน 90 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 30 นาที เตรียมอาหารแข็งที่มีสารคลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos) เข้มข้น 10 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และทำการ spread สารละลายดินที่เตรียมไว้ลงบนอาหารดังกล่าว บ่มเชื้อไว้ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ทนทานต่อสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอส และศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการที่เหมาะสม

ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 20 กรรมวิธี ทำ 3 ซ้ำ โดยใช้ไอโซเลทของแบคทีเรียเป็นกรรมวิธีทดสอบ และไม่ใส่เชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม เตรียมตัวอย่างดิน โดยผึ่งลมให้แห้ง บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อสำหรับกรรมวิธีที่ใส่ไอโซเลทแบคทีเรีย และไม่นึ่งฆ่าเชื้อสำหรับกรรมวิธีควบคุม นำตัวอย่างดินบรรจุในขวดพลาสติก ขนาด 150 มิลลิลิตร จำนวน 50 กรัม และเลี้ยงไอโซเลทของแบคทีเรียในอาหาร NB เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ หลังจากนั้นบ่มดินกับสารละลายคลอร์ไพริฟอสความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในดินที่ระดับความชื้น 60% ของความจุความชื้นของดิน และใส่ไอโซเลทเชื้อแบคทีเรียตามกรรมวิธี ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณคลอร์ไพริฟอสด้วยเครื่อง GC ที่ระยะเวลา 0 7 14 21 และ 28 วัน นำข้อมูลวิเคราะห์ทางสถิติและคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลาย

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยปฐพีวิทยา และกลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ได้พื้นที่ที่มีการใช้สารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตในเขตจังหวัดปทุมธานี จำนวน 4 แปลง และจังหวัดจันทบุรี จำนวน 3 แปลง และทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่ศึกษาเพื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติของดิน พบว่า ลักษณะเนื้อดินเป็นดินทรายร่วน (loam sand) ดินร่วนปนทราย (sandy loam) และดินเหนียวปนตะกอน (silty clay) ปฏิกิริยาของดินอยู่ระหว่าง 4.2 – 5.7 ซึ่งเป็นกรดรุนแรงมากถึงเป็นกรดปานกลาง ปริมาณอินทรียวัตถุ อยู่ในระดับปานกลางถึงสูงมาก ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำถึงสูงมาก ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูงมาก รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่ตกค้างในตัวอย่างดิน พบการสะสมของคลอร์ไพริฟอสในปริมาณ 0.17 – 0.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างดิน 6 ตัวอย่าง พบการสะสมของมาลาไธออนและโปรฟิโนฟอสในปริมาณ 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างดิน 2 ตัวอย่าง พบการสะสมของ EPN ในปริมาณ 0.16 และ 0.31 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นจึงเลือกศึกษาสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอส เนื่องจากพบการสะสมในตัวอย่างดินมากกว่าสารชนิดอื่น ผลวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1. สมบัติของตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่	แหล่งที่เก็บ	การใช้ที่ดิน	เนื้อดิน	pH	อินทรียวัตถุ (%)	Avail.P (mgP/kg)	Exch.K (mgK/kg)
1	ต.บึงบา อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี	ถั่วฝักยาว	ดินเหนียว	4.7	3.4	147	337
2	ต.บึงบา อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี	ส้ม	ดินทรายร่วน	5.7	6.4	1,617	399
3	ต.บึงบอน อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี	ถั่วฝักยาว	ดินเหนียวปนตะกอน	4.6	5.1	339	445
4	ต.บึงบอน อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี	บวบ	ดินร่วนปนทราย	4.4	3.9	254	340
5	ต.วังแซ้ม อ.มะขาม จ.จันทบุรี	ลำไย	ดินร่วนปนทราย	5.7	4.2	376	100
6	ต.วังแซ้ม อ.มะขาม จ.จันทบุรี	มังคุด	ดินร่วนปนทราย	4.8	5.9	12	54
7	ต.วังแซ้ม อ.มะขาม จ.จันทบุรี	ทุเรียน	ดินทรายปนดินร่วน	4.2	2.6	165	34

ตารางที่ 2. ปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่ตกค้างในตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่	สารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่ตรวจพบ (mg/kg)					
	diazinon	chlorpyrifos	malathion	profenofos	ethion	EPN
1	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.25	0.02	0.01	0.00	0.16
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.31
5	0.00	0.56	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00

ผลการคัดแยกเชื้อจากดินพบว่า ได้เชื้อทั้งหมด 18 ไอโซเลท คือ เชื้อ OPCP01 และ OPCP02 มาจากตัวอย่างดินที่ 1 เชื้อ OPCP03 OPCP04 และ OPCP05 มาจากตัวอย่างดินที่ 2 เชื้อ OPCP06 OPCP07 OPCP08 และ OPCP09 มาจากตัวอย่างดินที่ 3 เชื้อ OPCP10 มาจากตัวอย่างดินที่ 4 เชื้อ OPCP11 OPCP12 และ OPCP13 มาจากตัวอย่างดินที่ 5 เชื้อ OPCP14 และ OPCP15 มาจากตัวอย่างดินที่ 6 เชื้อ OPCP16 OPCP17 และ OPCP18 มาจากตัวอย่างดินที่ 7 และศึกษาลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์จำนวน 18 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 3

ตัวอย่างดินที่ศึกษา คือ ดินในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงล้าน ตำบลบึงบอน อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี ซึ่งผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของดินบางประการ พบว่า เนื้อดินเป็นดินเหนียวปนตะกอน ปฏิกิริยาของดินเป็นกรดรุนแรงมาก ปริมาณอินทรียวัตถุและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในดินอยู่ในระดับต่ำมาก ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูงมาก และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตที่ตกค้างในดิน มีปริมาณการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในปริมาณ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมาลาไธออนในปริมาณ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โปรพิโนฟอสในปริมาณ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และอีพีเอ็นในปริมาณ 0.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

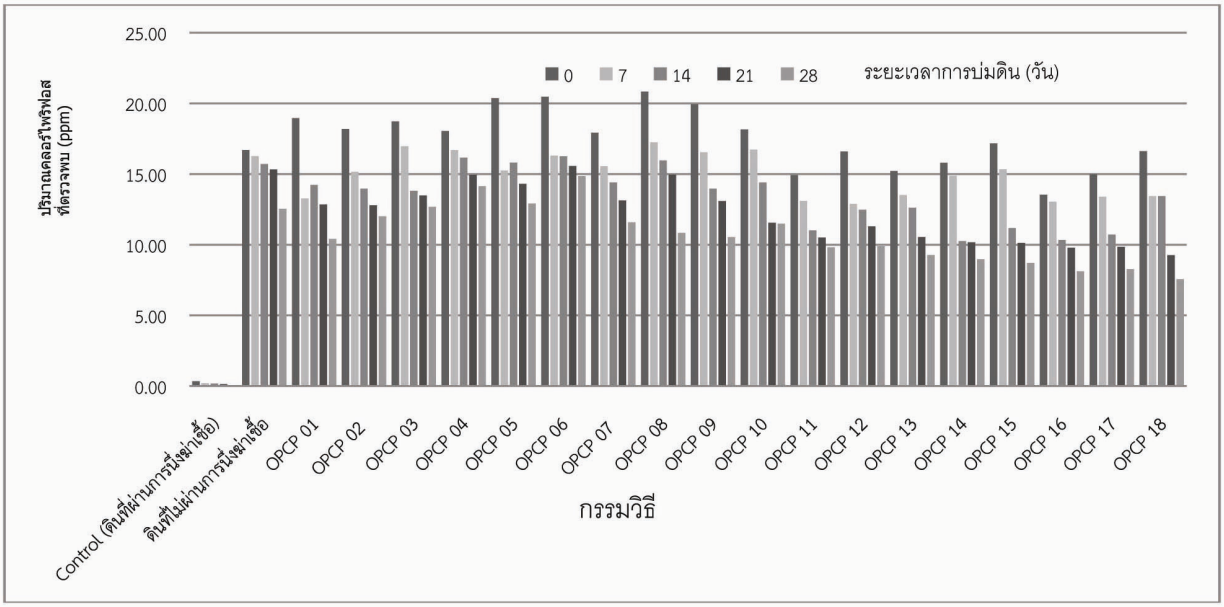
ผลการทดสอบการย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสโดยแบคทีเรียที่คัดเลือกจำนวน 18 ไอโซเลท พบว่าการสลายตัวของสารคลอร์ไพริฟอสในดินที่มีการใส่ไอโซเลทแบคทีเรียที่คัดเลือกเป็นไปในลักษณะเดียวกันทั้งการบ่มดินด้วยสารคลอร์ไพริฟอสที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กล่าวคือ ในระยะ 1 ถึง 7 วันแรกหลังจากการบ่มดินสารคลอร์ไพริฟอสมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วในบางกรรมวิธีและสลายตัวเพียงเล็กน้อยในบางกรรมวิธี แต่ภายหลังจาก 28 วัน หลังการบ่มดินปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสมีเหลือตกค้างอยู่ในดินร้อยละ 45.49 ถึง 78.34 สำหรับไอโซเลทแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอสสูงสุดจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ OPCP01 OPCP08 OPCP09 OPCP15 และ OPCP18 โดยทำให้ปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสในดินลดลง 45.04 47.96 47.06 49.27 และ 54.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Kang *et al.,* (2002) ที่รายงานว่าสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตถูกย่อยสลายหรือลดความเป็นพิษลงโดยกระบวนการทางชีวภาพ โดยอาศัยเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* นอกจากนี้ ศุภมาศ (2540) ยังกล่าวอีกว่า โครงสร้างของโมเลกุลก็มีผลต่อการดำรงชีวิตและกิจกรรม

ของจุลินทรีย์ โดยสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตส่วนใหญ่ที่มีโครงสร้างของ OH COO หรือ NH_2 เป็นองค์ประกอบ และเป็นสารมีขั้วจึงเกิดการสลายตัวทางชีวภาพได้ง่าย

ตารางที่ 3. ลักษณะโคโลนีและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์ จำนวน 18 ไอโซเลท

ลำดับไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ย้อม Gram's	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
OPCP 01	Ø = 1 mm. circular, raised, entire, smooth, shiny	สีแดง	อ้วน ป้อม คล้ายไข่ปลา
OPCP 02	Ø = 1 mm. circular, flat, entire, dry	สีม่วง	อ้วน ป้อม ใหญ่กว่าไข่ปลา
OPCP 03	Ø = 1 mm. circular, raised, entire, smooth	สีแดง	อ้วน ป้อม คล้ายไข่ปลา
OPCP 04	Ø = 2-3 mm. circular, convex, entire, smooth	สีม่วง	อ้วน ป้อม คล้ายไข่ปลา
OPCP 05	Ø = 1 mm. irregular, raised, undulate, smooth	สีม่วง	อ้วน ป้อม มีจุดหัวท้าย
OPCP 06	Ø = 1-2 mm. irregular, convex, entire, smooth, shiny	สีแดง	แท่งคล้ายก้นไม้ขีดเล็ก
OPCP 07	Ø = 1 mm. irregular, raised, entire, smooth, shiny	สีแดง	อ้วน ป้อม คล้ายไข่ปลา
OPCP 08	Ø = 1 mm. filamentous, raised, undulate, dry	สีม่วง	ท่อน อ้วน ปลายมน มีจุดทึบหัวท้าย
OPCP 09	Ø = 2-4 mm.filamentous, raised, undulate, wrinkled	สีม่วง	อ้วน ป้อม ปลายมน มีจุดทึบหัวท้าย
OPCP 10	Ø = 1 mm. circular, raised, entire, smooth	สีแดง	อ้วน ป้อม คล้ายไข่ปลา
OPCP 11	Ø = 1-2 mm. irregular, convex, entire, smooth, shiny	สีแดง	แท่งเล็ก บาง
OPCP 12	Ø = 3-4 mm. circular, convex, entire, smooth, shiny	สีแดง	แท่ง ป้อมสั้น
OPCP 13	Ø = 4-5 mm. irregular, raised, lobate, smooth	สีม่วง	อ้วน ป้อม มีจุดหัวท้าย
OPCP 14	Ø = 3-4 mm. circular, convex, entire, smooth, shiny	สีม่วง	วงรีเล็ก หัวท้ายมน
OPCP 15	Ø = 1-2 mm. irregular, raised, lobate, dry	สีม่วง	ท่อน มีจุดหัวท้าย
OPCP 16	Ø = 1 mm. irregular, raised, lobate, dry	สีม่วง	ท่อน มีจุดหัวท้าย
OPCP 17	Ø = 1-2 mm. irregular, raised, undulate, dry	สีม่วง	ท่อน มีจุดหัวท้าย
OPCP 18	Ø = 4-5 mm. circular, convex, entire, smooth, shiny	สีแดง	จุดเล็ก

ภาพที่ 1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย่อยสลายคลอร์ไพริฟอส ณ ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของจุลินทรีย์ที่แยกบริสุทธิ์



สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจพื้นที่ที่มีการใช้สารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตจำนวน 7 แหล่ง และเก็บตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรกรมาทำการคัดแยกเชื้อจากดินพบว่า ได้แบคทีเรียที่ทนทานต่อสารคลอร์ไพริฟอส ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 18 ไอโซเลท และจากการศึกษามี 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารคลอร์ไพริฟอส ได้แก่ OPCP01 OPCP08 OPCP09 OPCP15 และ OPCP18

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำแบคทีเรีย OPCP01 OPCP08 OPCP09 OPCP15 และ OPCP18 ไปศึกษาการย่อยสลายสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตชนิดอื่นได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ที่อนุเคราะห์การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต และคุณมริสา เวชยานนท์ ที่ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2555. **สถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร**. (ออนไลน์) 21 พฤษภาคม 2556 เข้าถึงได้จาก : http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/StatisticsHazardTop%2010%2055.pdf

รัตนา สิตะยัง นวลศรี ทยาพัชร และวิภา ตั้งนิพนธ์. 2537. ศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของคลอร์ไพริฟอส ในกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิคทางนิวเคลียร์. **ข่าวสารวัตถุมีพิษ 21(2)** : 51 – 59.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2540. **ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alexander, M. 1965. **Persistance and biological reaction of pesticide in soils.** Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 29: 1-7.

Kang, D.G., Kim, J.Y.H. and H.J. Cha, 2002. Enhanced detoxification of organophosphate using recombinant *Escherichia coli* with co – expression of organophophorus hydrolase and bacterial hemoglobin. **Biotech Letters. 24:** 879 – 883.

ศึกษาวิธีการสกัดสารละลายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของสารสกัด

The extraction method of cyanobacterial cells and its components analysis

ประไพ ทองระอา ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง กัลป์ยกร โปร่งจันทึก

กลุ่มงานวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถสังเคราะห์สารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และพัฒนาการเจริญเติบโตของพืชได้ อาทิเช่น ฮอร์โมน วิตามิน กรดอะมิโน โพลีเปปไทด์ และธาตุอาหาร เป็นต้น เพื่อให้ได้สารสกัดจากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จึงทำการทดสอบวิธีการสกัดสารละลายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จำนวน 2 วิธี คือวิธีสกัดเย็น และวิธีสกัดร้อน วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดของทั้งสองวิธี ผลการวิเคราะห์พบว่า วิธีการสกัดทั้งสองวิธี ทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนในด้านปริมาณกรดอะมิโนในรูป Total amino และ Free amino ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์นั้น พบว่าวิธีการสกัดเย็นมีผลทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งในรูป Total amino และ Free amino สูงกว่าวิธีการสกัดร้อน

คำนำ

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanobacteria) ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ที่ดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระสามารถเป็นประโยชน์แก่พืชได้โดยการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ และเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนให้แก่ดินและพืช นอกจากนี้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังสามารถสังเคราะห์สารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืช (bioactive substance) ได้ เช่น ออกซิน จิบเบอเรลลิน ไซโตไคนิน วิตามิน โพลีเปปไทด์ และ กรดอะมิโน เป็นต้น (Whitton, 2000 ; Rodriguez *et al*., 2006) ซึ่งสารที่เป็นประโยชน์เหล่านี้บางชนิดสามารถถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในช่วงการเจริญเติบโตของสาหร่าย และบางชนิดอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งการจะนำสารเหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์คล้ายคลึงกับสารสกัดจากเซลล์สาหร่ายทะเล (seaweed extract) จำเป็นต้องศึกษาวิธีการสกัดเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดการเสื่อมสภาพของสาร ดังนั้นจึงทำการศึกษาวิธีการสกัดสารละลายในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร ปริมาณกรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัด เพื่อทราบปริมาณที่เป็นประโยชน์แก่พืชเพื่อเป็นข้อมูลในการทดสอบการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Anabaena cylindrica* DASHN01101 และ *Hapalosiphon* sp. DASHN05101

2. สารเคมีชนิด Analytical grade

- สำหรับเตรียมอาหารเหลว BG – 11 ได้แก่ Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$), Sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3), Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2.2H_2O$), Citric acid anhydrous, Ferric ammonium citrate ($FeNH_4$ citrate), Ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (Na_2 EDTA), Di – Potassium hydrogen phosphate anhydrous (K_2HPO_4), Boric acid (H_3BO_3), Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4.H_2O$), Molybdenum trioxide (MoO_3), Zinc sulfate heptahydrate ($ZnSO_4.7H_2O$), Copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4.\ 5H_2O$), Potassium chromium sulfate ($K_2Cr_2(SO_4)_4.\ 24\ H_2O$), Nickel sulfate hexahydrate ($NiSO_4.\ 6H_2O$), Cobalt (II) nitrate hexahydrate ($Co(NO_3)_2.\ 6H_2O$), Sodium tungstate dehydrate ($Na_2WO_4.\ 2H_2O$), Titanium dioxide (TiO_2) และ Ammoniummonovanadate ($NH_4\ VO_3$)

3. วัสดุที่ใช้เพาะเลี้ยงและเก็บเซลล์สาหร่าย ได้แก่ ถังพลาสติกโพลีคาร์บอเนตขนาด 18.9 ลิตร ปั๊มลม ผ้ากรองแพลงตอนขนาด 30 ไมครอน

4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้เย็น – 20 องศาเซลเซียส ชั้นแสง

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและการสกัดสารละลายในเซลล์

นำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสร้างโปรตีนได้ดีจำนวน 2 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปราศจากไนโตรเจนสูตร BG – 11 ในถังพลาสติกโพลีคาร์บอเนตขนาด 18.9 ลิตร โดยใส่หัวเชื้อตั้งต้น (Starter) ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสภาพควบคุม โดยให้แสงด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ และที่อุณหภูมิ 25 + 1 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายโดยกรองผ่านผ้ากรองแพลงตอน และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง พอหมาด จากนั้นทำการชั่งหาน้ำหนักสดเซลล์สาหร่าย และนำไปสกัดหาสารละลายในเซลล์ โดยวิธีการสกัดเย็น และวิธีการสกัดร้อน

1.1 วิธีการสกัดเย็น ทำการสกัดตามวิธีการสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวของ Shaaban (2001) โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการกรองและชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้ว ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีปริมาตรเป็น 10 เท่าของน้ำหนักเซลล์สาหร่ายสด กวนเซลล์ให้เข้ากัน นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายน้ำแข็ง และนำสารแขวนลอยเชื้อที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เก็บสารสกัดเซลล์ส่วนใส (clear cell sap) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ ไนโตรเจน โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี ค่าความเป็นกรด – ด่าง และลักษณะสี

1.2 วิธีการสกัดร้อน ทำการสกัดตามวิธีการสกัดเซลล์สาหร่ายทะเลของ Thirumaran *et al.,* (2009) โดยนำเซลล์สาหร่ายที่ผ่านการกรองและชั่งน้ำหนัก ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีปริมาตรเป็น 10 เท่าของน้ำหนักเซลล์สาหร่ายสด กวนเซลล์ให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อนาน 1 ชั่วโมง เมื่อสารแขวนลอยเชื้อเย็นลง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เพื่อเก็บสารสกัดเซลล์ส่วนใสเพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ ไนโตรเจน โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี ค่าความเป็นกรด – ด่าง และลักษณะสี

2. **การคัดเลือกวิธีการสกัดที่ทำให้ได้องค์ประกอบของธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนสูง**

ทำการเปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์ที่สกัดโดยวิธีการสกัดเย็น และวิธีการสกัดร้อน คัดเลือกวิธีการสกัดที่ทำให้ได้องค์ประกอบของปริมาณธาตุอาหารและปริมาณกรดอะมิโนสูง สำหรับนำไปใช้ทดสอบกับพืช

ระยะเวลา เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะสี ค่าความเป็นกรด – ด่าง ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเมื่อสกัดโดยวิธีสกัดเย็น และวิธีสกัดร้อน

1.1 ลักษณะสีของสารสกัดเซลล์สาหร่ายเมื่อสกัดโดยวิธีสกัดเย็นและวิธีสกัดร้อน พบว่ามีความแตกต่างกัน คือเมื่อสกัดวิธีเย็นสีของสารสกัดจะเป็นสีม่วงแดง และเมื่อสกัดร้อนสีของสารสกัดจะเป็นสีน้ำตาล ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลมาจากการสกัดวิธีเย็นไม่มีผลในการทำลายรงควัตถุในเซลล์สาหร่าย แต่การสกัดวิธีร้อน อุณหภูมิที่สูงมีผลต่อการสลายตัวของรงควัตถุในเซลล์สาหร่าย จึงทำให้สีของสารสกัดที่ได้แตกต่างกัน ส่วนค่าความเป็นกรด – ด่าง ของสารสกัดเซลล์นั้นพบว่าวิธีสกัดเย็น และวิธีสกัดร้อน มีค่าเป็นกลางใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 2 สายพันธุ์ คือ *Hapalosiphon* sp. DASHN05101 และ *Anabaena cylindrical* DASHN01101 พบว่า วิธีการสกัดเย็นและวิธีการสกัดร้อนทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ในสารสกัดเซลล์ปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนในด้านปริมาณกรดอะมิโนในรูป Total amino และ Free amino ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเซลล์นั้น พบว่าวิธีการสกัดเย็นมีผลทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนทั้งในรูป Total amino และ Free amino สูงกว่าวิธีสกัดร้อน ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกันในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 1 และ 2) และจากข้อมูลปริมาณกรดอะมิโนที่สกัดได้จากเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งสองสายพันธุ์นั้นพบว่า มีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียว *Chlorella vulgaris* ส่วนปริมาณธาตุอาหารในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินพบว่ามีปริมาณน้อยกว่าสาหร่ายสีเขียว (Shaaban *et al.,* 2001) และน้อยกว่าสาหร่ายทะเล *Sargassum wightii* (Sivasankari *et al*., 2006 ;

Zodape *et al.*, 2009) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดสาหร่าย และแหล่งของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่าย

สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อเลี้ยงขยายในภาชนะเพาะเลี้ยงที่ใหญ่ขึ้นเพื่อเก็บผลผลิตเซลล์อาจต้องมีการคัดเลือกจากทั้ง 2 สายพันธุ์ว่าสายพันธุ์ใดมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงคัดเลือกนำไปผลิตเพื่อใช้ทดสอบกับพืช

ตารางที่ 1. ลักษณะสี ค่าความเป็นกรด – ด่าง ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโน ในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Hapalosiphon* sp. DASHN05101 และ *Anabaena cylindrical* DASHN01101

พารามิเตอร์	*Hapalosiphon* sp. DASHN05101		*Anabaena cylindrica* DASHN01101	
	สกัดวิธีเย็น	**สกัดวิธีร้อน**	**สกัดวิธีเย็น**	**สกัดวิธีร้อน**
1. สี	ม่วงแดงปนน้ำเงิน	น้ำตาล	ม่วงแดงปนน้ำเงิน	น้ำตาล
2. ค่าความเป็นกรด – ด่าง	7.0	7.1	7.0	7.1
3. ปริมาณธาตุอาหาร (มก./ลิตร) [1]/				
3.1 ไนโตรเจน	2.17	2.00	2.25	2.40
3.2 โพแทสเซียม	7.93	10.18	24.00	24.72
3.3 แคลเซียม	3.11	3.25	2.62	1.31
3.4 แมกนีเซียม	5.65	5.66	14.87	15.34
3.5 โซเดียม	3.97	3.67	2.62	1.31
3.6 เหล็ก	ND	ND	ND	ND
3.7 แมงกานีส	0.23	0.076	0.50	0.25
3.8 ทองแดง	0.01	0.013	0.38	0.19
3.9 สังกะสี	0.06	0.028	0.13	0.066
4. ปริมาณรวมกรดอะมิโน 17 ชนิด ในรูป Free amino (มก./ลิตร) [2]/	258.93	104.90	267.93	168.25
5. ปริมาณรวมกรดอะมิโน 17 ชนิด ในรูป Total amino (มก./ลิตร) [2]/	1,002.10	931.10	5,677.40	2,243.05

ND = ตรวจไม่พบ

[1]/ วิเคราะห์โดยกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา [2]/ วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2. ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด ในรูป Free amino และ Total amino ในสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ *Hapalosiphon* sp.DASHN05101 และ *Anabaena cylindrica* DASHN01101

กรดอะมิโน [1]/ (มก./ลิตร)	*Hapalosiphon* sp. DASHN05101				*Anabaena cylindrica* DASHN01101			
	สกัดวิธีเย็น		สกัดวิธีร้อน		สกัดวิธีเย็น		สกัดวิธีร้อน	
	Free amino	Total amino	Free amino	Total amino	Free amino	Total amino	Free amino	Total amino
1. Aspartic acid	7.28	96.60	2.28	75.50	11.45	473.00	10.78	208.70
2. Serine	13.65	52.60	2.40	47.00	9.78	338.40	4.65	136.35
3.Glutamic	47.13	173.00	32.65	149.70	48.43	732.30	54.18	357.10
4. Glycine	6.13	50.80	1.33	46.50	5.88	345.90	9.33	132.85
5. Histidine	10.83	10.40	0.45	11.80	6.88	94.70	Nd	34.30
6. Arginine	20.80	81.80	6.23	102.80	29.83	557.80	11.43	158.45
7. Threonine	11.45	71.50	2.28	51.90	12.65	366.70	3.18	150.95
8. Alanine	23.15	85.60	4.38	80.30	31.33	466.80	9.13	168.10
9. Proline	6.55	41.10	8.45	38.30	7.75	264.40	4.15	111.85
10. Cystine	ND	0.40	ND	0.60	1.20	29.30	3.08	5.80
11.Tyrosine	16.23	37.10	4.45	41.60	17.15	291.40	8.00	109.20
12. Valine	13.55	52.10	3.05	25.90	13.90	308.50	6.50	111.60
13. Methionine	10.48	10.60	5.28	24.90	9.00	26.20	4.33	24.55
14. Lysine	13.85	51.70	9.83	42.90	28.55	326.20	19.05	149.05
15. Isoleucine	19.03	70.30	11.58	69.50	18.50	328.80	2.15	118.00
16. Leucine	23.75	77.90	7.60	79.80	6.58	500.60	13.00	174.15
17. Phenylalanine	15.10	38.60	2.70	42.10	9.10	226.40	5.35	92.05
ปริมาณรวม	258.93	1,002.10	104.90	931.10	267.93	5,677.40	168.25	2,243.05

ND = ตรวจไม่พบ

[1]/ วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วิธีการสกัดสารละลายในเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณกรดอะมิโนสูง คือ วิธีการสกัดเย็น ซึ่งสามารถคัดเลือกและนำวิธีการสกัดดังกล่าวไปใช้สกัดเซลล์สาหร่ายเพื่อนำไปใช้ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชต่อได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำสารสกัดเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้ไปใช้ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่พืชผัก อาทิเช่น การใช้แช่เมล็ด และฉีดพ่นทางใบ หรือใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมีในรูปปุ๋ยน้ำเพื่อเพิ่มการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารแก่พืช เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Shaaban, M. M. 2001. Green micro water extract as foliar feeding to wheat plants. *Pakistan* ***J. Biological Science*** **4(6)**:628 – 632.

Sivasankari, S., V. Venkatesalu, M. Anantharaj and M. Chandrasekaran. 2005. Effect of seaweed extracts on the growth and biochemical constituents of *Vigna sinensis*. ***Bioresource Technology*** **97**:1745 – 1751.

Thirumaran, G., M. Arumugam, R. Arumugam and P. Anantharaman. 2009. Effect of seaweed liquid fertilizer on growth and pigment concentration of *Cyamopsis tetrogonolaba* (L) Taub. *American – Eurasian J. Agronomy* **2(2)**: 50 – 56.

Whitton, B. A. 2000. Soils and rice – fields, pp.233 – 255. *In* B. A. Whitton and M. Potts(eds). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers.

Zodape, S. T., S. Mukherjee, M.P. Reddy and D. R. Chaudhary. 2009. Effect of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) ex silva. extract on grain quality, yield and some yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) *International Journal of Plant Production* **3(2)**: 97 – 101.

ทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ในห้องปฏิบัติการ

Selection of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Laboratory

สุปรานี มั่นหมาย อธิปัตย์ คลังบุญครอง ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต ภาวนา ลิกขนานนท์

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟต ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง ได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน $CaHPO_4$ จำนวน 228 ไอโซเลท โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย $CaHPO_4$ ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้ 8 ไอโซเลท จำแนกเบื้องต้น เป็นแบคทีเรียในจีนัส Bacillus และ Pseudomonas ราในจีนัส Penicillium และ Aspergillus จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อบนอาหารที่เหมาะสมเพื่อทำการทดลองต่อไป

คำนำ

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากธาตุอาหารนี้จำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดนิวคลิอิคและฟอสโฟไลปิดส์ของเซลล์สิ่งมีชีวิต ฟอสฟอรัสพบในธรรมชาติในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในดินอยู่ในช่วง 0.02 - 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Barber, 1984) และส่วนใหญ่อยู่ในรูปออร์โทฟอสเฟต แต่บางครั้งอยู่ในรูปฟอสฟีน และฟอสโฟเนท ในด้านธาตุอาหารพืชฟอสฟอรัสในดิน โดยทั่วไปสามารถจำแนกได้เป็น (ก) ฟอสฟอรัสในสารละลายดิน (ข) อนินทรีย์ฟอสฟอรัส และ (ค) อินทรีย์ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสในสารละลายดินที่จัดว่าเป็นประโยชน์ต่อพืชมีปริมาณน้อยมาก เนื่องจากฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบต่างๆ ในดินได้ดี ดังนั้นดินที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยจึงมีฟอสฟอรัสในสารละลายดินประมาณ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือพบน้อยมากที่จะเกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ลิตร (Ozanne, 1980) ส่วนอนินทรีย์ฟอสฟอรัสในสารละลายดินอยู่ในรูปของออร์โทฟอสเฟต ($H_2PO_4^{-1}$และHPO_4^{-2}) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) สำหรับอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินทั่วไปนั้นพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน (Paul and Clark, 1989) โดยอาจจะมีถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในดินที่มีอินทรียวัตถุสูง (Barber, 1984) และประพิศ (2534) รายงานว่าดินไร่ของประเทศไทยมีอินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ ของฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน ซึ่งฟอสฟอรัสรูปนี้จะเป็นประโยชน์ต่อพืชเมื่อถูกปลดปล่อยออกมาโดยจุลินทรีย์ในดิน ดินส่วนใหญ่มีอนินทรีย์ฟอสฟอรัสอยู่ในรูปที่ไม่ละลายจึงเป็นฟอสฟอรัสที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อพืช ในขณะที่ดินส่วนใหญ่มีแหล่งสำรองของธาตุฟอสฟอรัส แต่ฟอสฟอรัสในแหล่งสำรองนี้คงอยู่ในสภาพที่เป็นประโยชน์น้อยเพราะถูกดินดูดตรึงเอาไว้ และด้วยเหตุที่

ฟอสฟอรัสมีปฏิกิริยาทางเคมีมาเกี่ยวข้องหลายประการ จึงมีฟอสฟอรัสน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เข้าสู่วัฏจักร พืช สัตว์ ดังนั้นการขาดฟอสฟอรัสจึงเป็นปัญหาที่พบอย่างกว้างขวาง การใส่ปุ๋ยฟอสเฟตจึงจำเป็นเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง ปัจจุบัน ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตของกรมวิชาการเกษตรผลิตจากจุลินทรีย์ประเภทเชื้อราในจีนัส *Penicillium sp.* เมื่อเกษตรกรนำไปใช้ได้ผลเป็นพึงพอใจในระดับหนึ่ง ผลิตภัณฑ์ยังมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชบางชนิดและยังไม่สามารถใช้ได้อย่างแพร่หลาย ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่มุ่งเน้นให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตชนิดใหม่เพิ่มขึ้นมา โดยพัฒนาให้ได้ปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตในรูปแบบเชื้อผสม เพื่อจะได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น จึงทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรวบรวมไว้จากโครงการอนุรักษ์จุลินทรีย์ดินที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรและที่คัดแยกได้ใหม่จากแหล่งของเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อใช้ในการทดลองผลิตให้อยู่ในรูปแบบปุ๋ยชีวภาพต่อไป

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลายๆ ชนิด ในการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ประโยชน์ด้านปุ๋ยกำลังเป็นที่สนใจของเกษตรกร เพราะประชากรจุลินทรีย์เป็นส่วนประกอบหลักของระบบ ดิน-พืช การที่ประชากรจุลินทรีย์มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์นี้จะมีผลต่อการพัฒนาของพืช ยกตัวอย่างเช่น ผลการวิจัยพบว่าจุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายไอออนฟอสเฟตจากสารประกอบอนินทรีย์ฟอสฟอรัส ทำให้ฟอสฟอรัสเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามการใช้กระบวนการที่จุลินทรีย์เป็นตัวการสำคัญนี้ไปสนับสนุนด้านธาตุอาหารของพืชยังต้องศึกษาเพิ่มเติม เพราะฟอสเฟตไอออนรูปที่ละลายออกมานี้จะถูกดินตรึงไว้อีกครั้งก่อนที่จะถึงผิวรากพืช อย่างไรก็ตามในกรณีของการใช้หินฟอสเฟตซึ่งเป็นแหล่งฟอสฟอรัสต้นทุนต่ำ พบว่ามีปัญหาของการใช้คือประสิทธิภาพในการใช้ต่ำ ใช้ไม่ได้ผลในดินที่มีค่า pH สูงกกว่า 5.5-6 แม้ว่ามีสภาพแวดล้อมอื่นๆ เหมาะสม ทำให้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพืชได้รับจากปุ๋ยเคมีฟอสเฟตที่ละลายได้อื่นๆ (Khasawneh and Doll, 1979) การใช้หินฟอสเฟตเป็นปุ๋ยโดยตรงจึงไม่แพร่หลาย ได้มีความพยายามหาวิธีการหลายวิธีที่ทำให้ฟอสฟอรัสในหินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้นเช่นวิธีการทางเคมี (วิศิษฐ์ และมนูเวทย์, 2520) วิธีทางกายภาพโดยนำอาหินฟอสเฟตไปเผาไฟหรือบดให้ละเอียด (ลัดดาวัลย์ และคณะ, 2529) นอกจากนี้พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาเป็นประโยชน์ได้ (Sperber, 1958; Louw and Weble, 1959; Gerretsen, 1984) ดังนั้นการทำให้ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นจากหินฟอสเฟตจากกระบวนการของจุลินทรีย์ จึงเป็นแนวทางที่น่าจะนำไปถึงจุดมุ่งหมายในการทำการเกษตรอย่างยั่งยืนได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำเกษตรอินทรีย์ โดยมีรายงานว่าจุลินทรีย์สามารถปลดปล่อยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ออกมา ทำให้หินฟอสเฟตเป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดอินทรีย์โมเลกุลต่ำสามารถเพิ่มความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายโดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับ chelation และปฏิกิริยาแลกเปลี่ยน (Fox and Comerford, 1990; Gerkel, 1992) จึงมีการนำเชื้อราเส้นใยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดอินทรีย์อย่างแพร่หลาย (Matte, 1992; Vassilev and Vassileva, 1992) เฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. บางสายพันธุ์ โดยมีการศึกษาในระบบหมักร่วมกันกับหินฟอสเฟต หรือโดยการเพาะเชื้อโดยตรงเพื่อให้ไปละลายหินฟอสเฟต (Kucey, 1987; Asea *et al.,*1988; Cerezine *et al.,*1988; Cunningham and Kuiak, 1992)

วิธีดำเนินการ

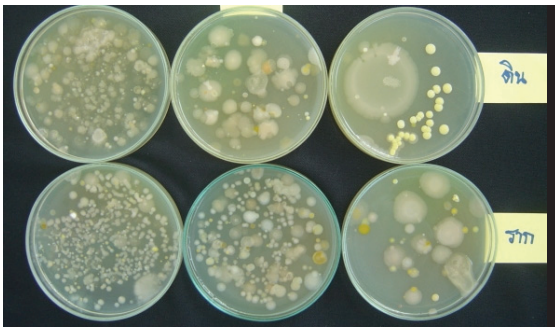
เก็บตัวอย่างดินและรากพืช จากแหล่งที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต วิธีปฏิบัติการทดลอง แบ่งการดำเนินงานออกเป็น 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ

1) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่แยกเลี้ยงเชื้อได้มาจากตัวอย่างดินและพืช ทดสอบประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตโดยเพาะจุลินทรีย์แบบจุด (Spot inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Pikovskaya's agar medium นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิตู้บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส แล้ววัดวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ ตามวิธีของ Katznelson and Boss (1959) ร่วมกับการวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $Ca_3(PO_4)_2$ โดยวิธี Tony's blue method เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายเพื่อการทดลองต่อไป

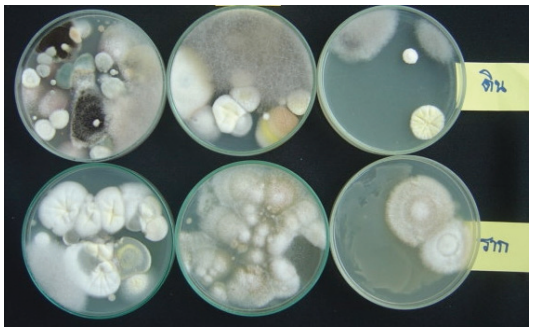
2) ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการพัฒนาราก โดยทำสารละลายเชื้อแล้วเพาะลงบนเมล็ด/ตาของพืช ตรวจนับจำนวนเมล็ดที่งอก วัดความยาวของราก บันทึกระยะเวลาที่รากงอกภายหลังการเพาะเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างดินและรากพืชจากแหล่งที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตอาศัยอยู่ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินและพืชโดยวิธีนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable plate count) จากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) และ Potato Dextrose Agar (PDA) ได้จุลินทรีย์ประมาณ 2,000 ไอโซเลท

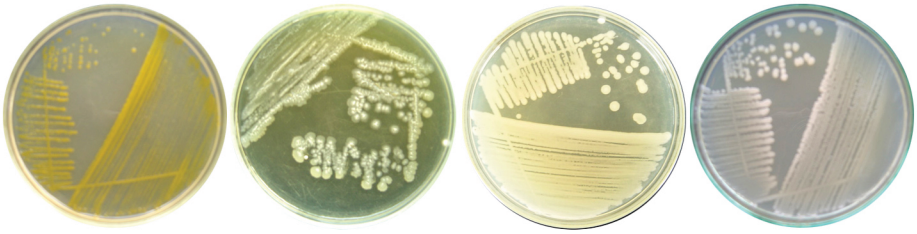


รูปที่ 1 แบคทีเรียที่แยกจากดินและรากพืช



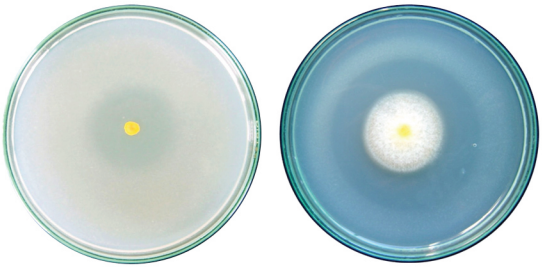
รูปที่ 2 ราที่แยกจากดินและรากพืช

แยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการละลายตะกอน $CaHPO_4$ ได้จุลินทรีย์จำนวน 228 ไอโซเลท คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย $CaHPO_4$ ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้ 8 ไอโซเลท เมื่อนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ไปวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $Ca_3(PO_4)_2$ โดยวิธี Tony's blue method โดยใช้หินฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟต พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้สามารถละลายหินฟอสเฟตออกมาได้



รูปที่ 3 แบคทีเรียที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินและรากพืช

รูปที่ 4 ราที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินและรากพืช

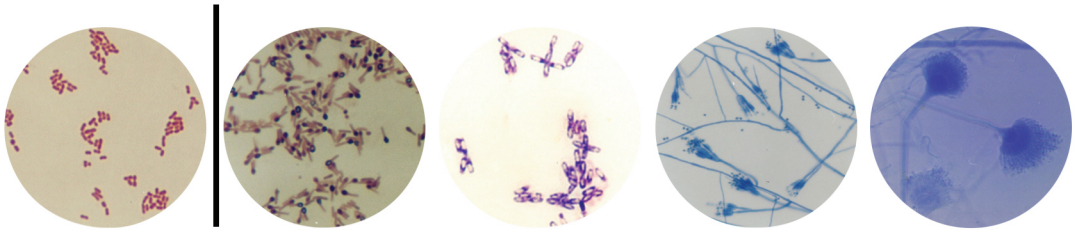


รูปที่ 5 การละลายตะกอน $CaHPO_4$ ได้วงใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 1. ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $Ca_3(PO_4)_2$

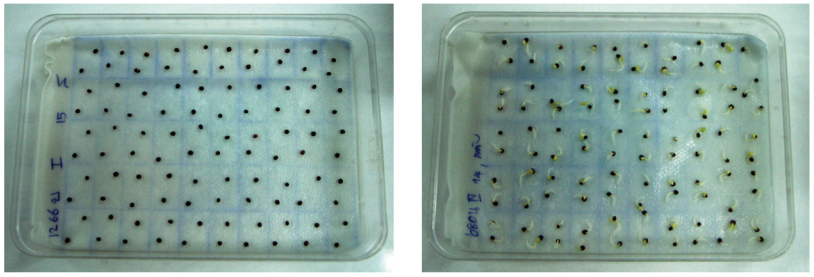
จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต	ปริมาณฟอสฟอรัสที่ละลายออกมาจาก $Ca_3(PO_4)_2$ (mg/kg)	
	แหล่งที่ 1	แหล่งที่ 2
Control	0.698	0.546
RPS 101B	1.476	1.845
RPS 102B	1.676	1.632
RPS 103B	1.804	1.528
RPS 104B	1.575	1.235
RPS 105B	1.593	1.485

จำแนกเบื้องต้น เป็นแบคทีเรียในจีนัส Bacillus และ Pseudomonas ราในจีนัส Penicillium และ Aspergillus ทำการต่อเชื้อและเก็บรักษาเพื่อทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 6 ย้อมสีแกรมจุลินทรีย์เพื่อจำแนกเบื้องต้น

ศึกษาประสิทธิภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตกับพืช ต่อการงอกของเมล็ดพืช โดยใช้เมล็ดพืช 4 ชนิดคือ กะหล่ำปลี ผักกาดขาว คะน้า กวางตุ้ง พบว่าจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต ไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืชทั้ง 4 ชนิด



รูปที่ 7 ผลของจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตต่อการงอกของเมล็ดพืช

ตารางที่ 2. เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพืชเมื่อเพาะร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย

เมล็ดพืช	เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพืช									
	RPS-101B		RPS-102B		RPS-1033B		RPS-104B		RPS-105B	
	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ
พริก	70	75	69	72	79	84	76	74	71	79
ผักบุ้ง	85	82	87	85	87	88	86	88	81	85
กะหล่ำปลี	90	83	94	92	92	92	94	90	92	92
ผักกาดขาว	95	90	85	89	86	86	92	95	89	89
คะน้า	90	90	93	90	88	88	85	95	86	95
กวางตุ้ง	89	91	93	89	94	85	93	89	88	87

ตารางที่ 3. เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพืชเมื่อเพาะร่วมกับเชื้อรา

เมล็ดพืช	เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพืช					
	RPS-106F		RPS-107F		RPS-108F	
	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ	-เชื้อ	+เชื้อ
พริก	70	82	79	75	77	69
ผักบุ้ง	85	84	85	86	85	87
กะหล่ำปลี	95	92	90	85	94	94
ผักกาดขาว	90	86	89	89	82	85
คะน้า	89	88	90	86	87	93
กวางตุ้ง	90	95	88	79	80	93

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

คัดแยกจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตจากตัวอย่างดินและรากพืช จำนวน 150 ตัวอย่าง แยกจุลินทรีย์ได้ประมาณ 2,000 ไอโซเลท ได้จุลินทรีย์ที่สามารถละลายตะกอน $CaHPO_4$ จำนวน 228 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยการละลายตะกอนแคลเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($CaHPO_4$) โดยแบ่งเป็น 5 ระดับการละลาย คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพละลาย $CaHPO_4$ ที่ระดับ 5 (วงใสมากกว่า 9 มิลลิเมตร) ได้จุลินทรย์ละลายฟอสเฟต 8 สายพันธุ์

จำแนกเบื้องต้น เป็นแบคทีเรียในจีนัส Bacillus และ Pseudomonas ราในจีนัส Penicillium และ Aspergillus จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่คัดเลือกไว้ไม่มีผลกระทบต่อการงอกของเมล็ดพืช ทำการต่อเชื้อและเก็บรักษาเพื่อการทดลองต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้จุลินทรีย์ละลายฟอสเฟตที่มีประสิทธิภาพเบื้องต้นในสภาพห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถนำไปผลิตปุ๋ยชีวภาพละลายฟอสเฟตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ประพิศ แสงทอง. 2534. อนินทรีย์และอินทรีย์ฟอสฟอรัสในดินไร่. **วารสารดินและปุ๋ย** 13(2): 142 - 152

ลัดดาวัลย์ มีสุข, เพ็ญศรี ชูวรเวช, ยุพิน สรวิสูตร, จันทิรา อริยธัช, เรวดี ดีมาก และภาวนาฏ เสมรสูต. 2529. การเพิ่มประสิทธิภาพของหินฟอสเฟตโดยเผาที่อุณหภูมิต่ำ. **วารสารวิชาการเกษตร** 4 (1) :17 - 24.

วิศิษฐ์ โชลิตกุล และมนูเวทย์ ศรีเสน. 2520. ปุ๋ยฟอสเฟตและโพแทสเซียม. **รายงานการสัมมนาทาง วิชาการเรื่องอุตสาหกรรมปุ๋ยกับการเกษตร**. หน้า 85 - 130.

Asea, P.E.A., R.M.N. Kucey and J.W.B. Stewart. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two Penicillium species in solution culture and soil. **Soil Biol. Biochem 20**: 459-464.

Barber, S.A. 1984. **Soil Nutrient Bioavailability**, John Wiley and Sons. New York.

Cerezine, P.C., E., Nahas and D.A. Ban Zatto. 1988. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluoapatite. **Appl Microbiol Biotechnol 29**: 501-505.

Cunningham J.E. and C. Kuiak. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaji*. **Appl Environ Microbiol 52**: 1451 - 1458.

Fox,T. and N. Comerford. 1990. Low - molecular weight acids in selected forest soils of the southeastern USA.. **Soil Sci Soc Am J 54**: 1139 - 1144.

Gerkel. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. **Pflanzenernahr Bodenk. 155**: 339 - 343.

Gerretsen, F.C. 1984. The influence of microorganisms on the phosphate uptake by plant. **Plant Soil, 1**: 51 - 81. Katznelson, H. and B. Boss. 1959. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots: rhizosphere and non - rhizosphere soil. Can. **J. Microbiol. 5**: 79 - 85.

Khasawneh, F.E. and E.C. Doll. 1979. The use of phosphate rock for direct application to soils. **Adv. Agron 30**: 159 - 206.

Kucey, R.M.N. 1987. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilajii* and with mycorrhizal fungi. **Appl Environ Microbiol 55:** 2699-2703.

Louw, H.A. and Weble. 1959. A study of soil bacteria dissolving certain mineral phosphate fertilizers and relate d compounds. **J. Appl. Bacteriol. 22:** 171-196.

Matte, M. 1992. **The production of organic acids.** Rev Biotechnol. 12: 87-132

Ozanne, P. G. 1980. **The Role of Phosphorus in Agriculture.** Am.Soc. of Agron. Madison, Wisc.

Paul, E.A. and F.E. Clark. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, New York.

Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soli. Aust.. **J. Agriic. Res. 9:** 778-781.

Vassilev, N. and M. Vassileva. 1992. Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. **Mycol Res 96:** 563-570.

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และกายภาพ ของแหนแดงเพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

Chemical Composition and Physical Property of Azolla Served as Carriers for Biofertilizer Production

ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต ประไพ ทองระอา

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของแหนแดง เพื่อใช้เป็นวัสดุพาใน การผลิตปุ๋ยชีวภาพแหนแดง พบว่า แหนแดง (*Azolla microphylla* Kaulf.) ที่ใช้ในการศึกษามีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 4.62% ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.65% ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด 5.27% ปริมาณ แคลเซียมทั้งหมด 2.54% ปริมาณแมกนีเซียมทั้งหมด 0.37% ปริมาณเหล็กทั้งหมด 0.18% ปริมาณแมงกานีสทั้งหมด 0.17% ปริมาณทองแดงทั้งหมด 15.57 ppm และปริมาณสังกะสีทั้งหมด 66.22 ppm แหนแดงมีปริมาณกรดอะมิโนสูงซึ่งจากค่าวิเคราะห์นั้นทำให้ทราบว่าปริมาณกรดอะมิโนของแหนแดงที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สูง เช่น ปริมาณ Aspatic acid, Glycine, Threonine, Glutamic acid, Proline, Methionine, Lysine, Arginine และ Tryptophan 1,931, 1,043, 989, 2,886, 951, 329, 1,023, 1,149 และ 266 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของแหนแดง (A) และวัสดุพาชนิดอื่น ซึ่งได้แก่ ปุ๋ยหมักมูลวัว (C) และ ซีโอไลท์ (Z) มาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ ประกอบด้วยความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา (Permeability) พร้อมการจัดชั้น (Class) และความหนาแน่นรวม (Bulk Density) พบว่าแหนแดงมีความสามารถซึมได้ของน้ำต่ำกว่าปุ๋ยหมักมูลวัว และ ซีโอไลท์ และเมื่อจัดชั้นความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา พบว่า แหนแดงมีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ต่ำ ส่วนปุ๋ยหมักมูลวัว และ Zeolite มีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ปานกลาง และเมื่อนำวัสดุพามาผสมกันทั้ง 3 ชนิด และ 2 ชนิด ในทุกๆ อัตราส่วน พบว่า มีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ปานกลาง สำหรับความหนาแน่นรวมของวัสดุพา พบว่าแหนแดงมีความหนาแน่นรวม 0.19 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งต่ำกว่า ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ซึ่งมีความหนาแน่นรวม เท่ากับ 0.88 และ 0.90 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อนำวัสดุพาทั้ง 3 ชนิด มาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันพบว่า แหนแดงมีความหนาแน่นรวมต่ำกว่าทุกอัตราส่วน

คำนำ

แหนแดงจัดเป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่ง ซึ่งถูกนำมาใช้ในรูปแบบของปุ๋ยพืชสดอย่างแพร่หลายในนาข้าว เนื่องจากในโพรงใบของแหนแดงมีจุลินทรีย์จำพวกไซยาโนแบคทีเรียอาศัยอยู่ ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถตรึงก๊าซไนโตรเจนจากบรรยากาศ แล้วเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมมาใช้ประโยชน์อย่างเพียงพอสำหรับตัวจุลินทรีย์เองและแหนแดง ไซยาโนแบคทีเรียที่อยู่ในโพรงใบแหนแดงนั้นสามารถตรึงไนโตรเจนได้ถึง 5 – 10 กิโลกรัม ไนโตรเจนต่อไร่ และเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบไนโตรเจนให้แหนแดงนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นส่วนสำคัญ ที่ทำให้แหนแดงสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และมีน้ำหนักสดสูงถึง 3 ตันต่อไร่ ภายในระยะเวลา 30 วัน ด้วยอัตราเริ่มต้นของแหนแดงเพียง 100 กิโลกรัมต่อไร่ (ประยูร, 2530) แหนแดงมีสัดส่วน C : N ต่ำ (ประมาณ 10) นอกจากนี้แหนแดงมีความสามารถในการดูดซับโพแทสเซียมที่ไม่เป็นประโยชน์ในดินได้สูง (2–3.5 %K, Lui, 1987) และจากการที่แหนแดงสามารถเพิ่มมวลชีวภาพได้อย่างรวดเร็ว ให้น้ำหนักเพิ่มขึ้นหนึ่งเท่าตัวได้ภายในเวลา 3 – 5 วัน (Watanabe, 1982) แต่ถ้าหากมีฟอสฟอรัสปริมาณที่เหมาะสม จะสามารถเพิ่มน้ำหนักได้รวดเร็วขึ้นคือ 2 – 3 วัน (Tung and Shen, 1981; Watanabe and Ramirez, 1984) และเป็นแหล่งวัสดุอินทรีย์ที่มีธาตุไนโตรเจนและ โพแทสเซียมสูง รวมถึงมีโปรตีนและกรดอะมิโนต่างๆ เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง (Alalade and Lyayi, 2006) และราคาต้นทุนการผลิตต่ำมาก นอกจากนี้แล้วแหนแดงจะเป็นส่วนสำคัญในการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในดิน เนื่องจากองค์ประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในแหนแดงอาจเป็นประโยชน์โดยตรงต่อจุลินทรีย์ ด้วยคุณสมบัติต่างๆ ที่ดีของแหนแดง จึงมีแนวคิดที่สามารถจะนำแหนแดงมาเป็นวัสดุพาเพื่อทดแทนดินพีท ซึ่งการผลิตแหนแดงนั้น หากสามารถทำให้แหนแดงกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศได้ ก็จะทำให้เรามีทรัพยากรที่มีประโยชน์ได้ใช้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด

จากสถานการณ์ของทรัพยากรธรรมชาติที่ถูกใช้และกำลังจะหมดไปเรื่อยๆ ไม่สามารถที่จะสร้างขึ้นมาทดแทนได้ในระยะเวลาอันสั้นซึ่งปัจจุบันเป็นวัสดุพา (carrier) ที่สำคัญในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพต่างๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการที่ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดสูงและมีระยะเวลาในการเก็บรักษาได้นาน ซึ่งปัจจุบันมีปริมาณลดลงและมีราคาแพง เนื่องจากแหล่งดินพีทที่นำมาใช้ส่วนใหญ่นั้นได้มาจาก ดินพรุและมักอยู่ในเขตป่าสงวน ประกอบกับการขุดเพื่อเอาดินพีทมาใช้นั้นเป็นการทำลายสภาพแวดล้อมและใช้ทรัพยากรธรรมชาติแบบใช้แล้วหมดไปไม่สามารถหามาทดแทนได้ การหาวัสดุพาชนิดอื่นมาทดแทนการใช้ดินพีท เป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้ไม่ต้องทำลายทรัพยากรธรรมชาติและควรจะต้องเป็นวัสดุที่มีคุณภาพแน่นอน หาได้ง่ายในประเทศ มีปริมาณมากและใช้ได้อย่างต่อเนื่องรวมทั้ง ราคาไม่แพงสามารถช่วยให้จุลินทรีย์อาศัยอยู่ได้และมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดี นำปุ๋ยชีวภาพไปใช้ได้ง่ายและทำให้ปุ๋ยชีวภาพมีอายุการเก็บได้ยาวนาน วัสดุพาที่สามารถนำมาใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพนอกจากดินพีทแล้วยังมีอีกหลายชนิด ได้แก่ ผงถ่าน ปุ๋ยหมักที่ย่อยสลายดีแล้ว ดินเหนียว เป็นต้นซึ่งวัสดุพาแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ออกไปทั้งทางเคมีและฟิสิกส์ แต่คุณสมบัติที่ดีของวัสดุพานั้นต้องคำนึงถึงประสิทธิภาพ การดูดซับความชื้นได้ดี ไม่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ง่ายต่อการทำให้แห้งและบดเป็นผงละเอียด ไม่มีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ (วิทยา, 2545)

การผลิตปุ๋ยชีวภาพนั้น วัสดุพาเป็นสิ่งจำเป็นในการที่จะใช้พาจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพไปสู่มือของผู้ใช้วัสดุพาที่มีคุณภาพจะทำให้ปุ๋ยชีวภาพนั้นสามารถมีอายุการใช้งานได้นานและมีปริมาณจุลินทรีย์ตามที่ พรบ. ปุ๋ยชีวภาพ ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 กำหนด วัสดุพาที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ ดินพีท รำข้าวสาลี แคลเซียมอัลจิเนท ดินที่ผสมด้วยหินฟอสเฟต ปุ๋ยหมักที่ย่อยสลายสมบูรณ์แล้ว สำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพของกรมวิชาการเกษตรนั้น ใช้ดินพีทเป็นวัสดุพา แต่ในปัจจุบันปริมาณดินพีทในประเทศไทยที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพนั้น มีปริมาณจำกัด จึงทำให้ราคาต้นทุนการผลิตสูงขึ้นอย่างมาก เพื่อเตรียมการผลิตปุ๋ยชีวภาพ จึงจำเป็นต้องวิจัยหาสัดส่วนที่เหมาะสมของวัสดุพาชนิดอื่นที่สามารถทำให้จุลินทรีย์หัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพสามารถมีอัตราการรอดชีวิตได้สูงเป็นระยะเวลานาน เพื่อสร้างความเชื่อมั่นว่าได้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ ที่มีคุณภาพก่อนจะแนะนำให้แก่เกษตรกรเพื่อใช้ในพื้นที่อื่นๆ ต่อไป การใช้แหนแดงซึ่งมีคุณสมบัติและคุณภาพค่อนข้างคงตัว รวมถึงสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมาก และมีต้นทุนการผลิตต่ำ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำมาทดสอบเพื่อใช้เป็นวัสดุพา ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อทดแทนดินพีท โดยแหนแดงมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมอยู่ในปริมาณมาก รวมทั้งเป็นแหล่งของกรดอมิโนต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย รวมถึงแหนแดงสามารถขยายเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและสามารถผลิตได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด เพื่อที่จะสามารถผลิตปุ๋ยชีวภาพให้ได้คุณภาพดี โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพาดินพีท จึงจำเป็นต้องทดสอบหาวัสดุพาชนิดใหม่ที่มีคุณภาพ ราคาถูก และหาได้ง่ายมาทดแทน รวมถึงศึกษาวิธีการและสัดส่วนที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตปุ๋ยชีวภาพ

วิธีดำเนินการ

วิธีการ

นำแหนแดงที่ทำการขยายพันธุ์ในกระชังเพาะเลี้ยง มาวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี และกายภาพ

1. วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ N P K OM กรดอะมิโนต่างๆ และความเป็นกรด - ด่าง
2. วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ความสามารถในการอุ้มน้ำ เปอร์เซ็นต์ความชื้น ความหนาแน่นรวม อัตราการอุ้มน้ำ

นำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำมาใช้เป็นวัสดุพาเพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพ

แหนแดง **ซีโอไลท์** **ปุ๋ยหมักมูลวัว**

ภาพที่ 1. วัสดุพาชนิดต่างๆ

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

สมบัติทางเคมีของแหนแดง

แหนแดง (*Azolla microphylla* Kaulf.) ที่ใช้ในการศึกษา มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 4.62% ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 0.65% ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด 5.27% ปริมาณแคลเซียมทั้งหมด 2.54% ปริมาณแมกนีเซียมทั้งหมด 0.37% ปริมาณเหล็กทั้งหมด 0.18% ปริมาณแมงกานีสทั้งหมด 0.17% ปริมาณทองแดงทั้งหมด 15.57 ppm และปริมาณสังกะสีทั้งหมด 66.22 (ppm) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากค่าวิเคราะห์นี้ทำให้ทราบว่าแหนแดงมีปริมาณธาตุอาหารหลักและปริมาณธาตุอาหารรองทุกธาตุที่ทำการวิเคราะห์สูงกว่าใบพืชทั่วไป

ตารางที่ 1. ค่าวิเคราะห์ทางเคมีทางแหนแดง (*Azolla microphylla* Kaulf.)

ค่าวิเคราะห์	แหนแดง
ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	4.62
ฟอสฟอรัสทั้งหมด (%)	0.65
โพแทสเซียมทั้งหมด (%)	5.27
แคลเซียมทั้งหมด (%)	2.54
แมกนีเซียมทั้งหมด (%)	0.37
เหล็กทั้งหมด (%)	0.18
แมงกานีสทั้งหมด (%)	0.17
ทองแดงทั้งหมด (ppm)	15.57
สังกะสีทั้งหมด (ppm)	66.22

ปริมาณกรดอะมิโนของแหนแดง

สำหรับปริมาณกรดอะมิโนที่ตรวจพบในแหนแดง มีจำนวนทั้งสิ้น 18 ตัว ซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกันดังนี้ ปริมาณ Aspatic acid 1,931 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Threonine 989 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Serine 1,051 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Glutamic acid 2,886 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Proline 951 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Glycine 1,043 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Alanine 1,203 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Cystine 220 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Valine 832 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Methionine 329 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Isoleucine 747 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Leucine 1,533 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง

ปริมาณ Tyrosine 850 มิลลิกรัมต่อร้อย กรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Phenylalanine 1,042 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Histidine 456 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Lysine 1,023 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณ Arginine 1,149 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง และปริมาณ Tryptophan 266 มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2. ค่าวิเคราะห์กรดอะมิโนของแหนแดง (มิลลิกรัมต่อร้อยกรัมน้ำหนักแห้ง)

ค่าวิเคราะห์	แหนแดง
Aspatic acid	1,931
Threonine	989
Serine	1,051
Glutamic acid	2,886
Proline	951
Glycine	1,043
Alanine	1,203
Cystine	220
Valine	832
Methionine	329
Isoleucine	747
Leucine	1,533
Tyrosine	850
Phenylalanine	1,042
Histidine	456
Lysine	1,023
Arginine	1,149
Tryptophan	266

สมบัติทางกายภาพของแหนแดง และวัสดุพาชนิดอื่น

เมื่อนำวัสดุพา ซึ่งได้แก่ แหนแดง (A) ปุ๋ยหมักมูลวัว (C) และซีโอไลท์ (Z) มาวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพประกอบด้วยความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา (Permeability) พร้อมการจัดชั้นความสามารถซึมได้ของน้ำ (Class) และความหนาแน่นรวม (Bulk Density) ดังตารางที่ 3 โดยมีรายละเอียดดังนี้

ความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา พบว่า แหนแดงมีความสามารถซึมได้ของน้ำ 0.58 มิลลิเมตรต่อชั่วโมงปุ๋ยหมักมูลวัว มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 3.10 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง และซีโอไลท์ มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 4.38 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นทำให้ทราบว่า ซีโอไลท์มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้สูงที่สุด

รองลงมาได้แก่ ปุ๋ยหมักมูลวัว ส่วนแหนแดงมีความสามารถในการอุ้มน้ำ หรือเก็บรักษาความชื้นได้น้อยที่สุด เมื่อนำวัสดุพาทั้ง 3 ชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 9.32 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง ส่วนการใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 2:1:1 มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 5.22 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง การใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 3:1:1มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 5.59 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้การใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 มีความสามารถในการอุ้มน้ำหรือเก็บรักษาความชื้นได้ดีที่สุด สำหรับการนำวัสดุพา 2 ชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าการใช้แหนแดง และปุ๋ยหมักมูลวัว ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 9.36 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง ส่วนการใช้แหนแดง และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 11.98 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง สำหรับการใช้ ปุ๋ยหมัก มูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มีความสามารถซึมได้ของน้ำ 4.43 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง เมื่อเพิ่มสัดส่วนการผสมกันของแหนแดง และซีโอไลท์ เป็น 2:1 ความสามารถซึมได้ของน้ำ มีค่าเท่ากับ 7.91 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาสัดส่วนของการผสมกันของวัสดุพาทั้ง 3 ชนิดและ 2 ชนิด ทำให้ทราบว่าการใช้แหนแดงผสมกับซีโอไลท์ในอัตราส่วน 1:1 จะมีค่าความสามารถซึมได้ของน้ำ สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ การใช้แหนแดงและ ปุ๋ยหมักมูลวัว ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 และการใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันใน อัตราส่วน 1:1:1 ตามลำดับ ส่วนการใช้ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จะมีค่า ความสามารถซึมได้ของน้ำต่ำที่สุด

การจัดชั้นความสามารถซึมได้ของน้ำในวัสดุพา พบว่า แหนแดงมีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ต่ำ ส่วนปุ๋ยหมักมูลวัว และ ซีโอไลท์ มีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ปานกลาง และเมื่อนำวัสดุพามาผสมกันทั้ง 3 ชนิด และ 2 ชนิด ในทุกๆ อัตราส่วน พบว่า มีคุณสมบัติในการให้น้ำซึมผ่านได้ปานกลาง

ความหนาแน่นรวมของวัสดุพา พบว่า แหนแดงมีความหนาแน่นรวม 0.19 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปุ๋ยหมักมูลวัว มีความหนาแน่นรวม 0.88 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และซีโอไลท์มีความหนาแน่นรวม 0.90 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อนำวัสดุพาทั้ง 3 ชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่า การใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 มีความหนาแน่นรวม 0.75 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนการใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ผสมกันในอัตราส่วน 2:1:1 มีความหนาแน่นรวม 0.62 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร การใช้แหนแดง ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ผสมกันในอัตราส่วน 3:1:1 มีความหนาแน่นรวม 0.56 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับการนำวัสดุพา 2 ชนิดมาผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าการใช้แหนแดงและปุ๋ยหมักมูลวัว ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มีความหนาแน่นรวม 0.58 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนการใช้แหนแดงและซีโอไลท์ ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มีความหนาแน่นรวม 0.62 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับการใช้ ปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มีความหนาแน่นรวม 0.94 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อเพิ่มสัดส่วนการผสมกันของแหนแดง และซีโอไลท์เป็น 2:1 มีความหนาแน่นรวม 0.51 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อพิจารณาสัดส่วนของการผสมกันของวัสดุพาทั้ง 3 ชนิดและ 2 ชนิด ทำให้ทราบว่าการใช้ปุ๋ยหมักมูลวัว ผสมกับซีโอไลท์ในอัตราส่วน 1:1 จะมีความหนาแน่นรวมสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ การใช้แหนแดงปุ๋ยหมักมูลวัว และซีโอไลท์ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 ส่วนการใช้แหนแดง และซีโอไลท์ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 จะมีความหนาแน่นรวมต่ำที่สุด

ตารางที่ 3. สมบัติทางกายภาพของแหนแดง และวัสดุพาชนิดอื่น

Sample Name	Permeability (mm/hr)	Class	Bulk Density (g/cm^3)
1. แหนแดง (A)	0.58	Slow	0.19
2. ปุ๋ยหมักมูลวัว (C)	3.10	Moderate	0.88
3. ซีโอไลท์ (Z)	4.38	Moderate	0.90
4. A:C:Z (1:1:1)	9.32	Moderate	0.75
5. A:C:Z (2:1:1)	5.22	Moderate	0.62
6. A:C:Z (3:1:1)	5.59	Moderate	0.56
7. A:C (1:1)	9.36	Moderate	0.58
8. A:Z (1:1)	11.98	Moderate	0.62
9. C:Z (1:1)	4.43	Moderate	0.94
10. A:Z (2:1)	7.91	Moderate	0.51

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากค่าวิเคราะห์ต่างๆ ทั้งทางด้านเคมี และกายภาพของแหนแดงนั้น พบว่าแหนแดงมีสมบัติที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นวัสดุพา เนื่องจากมีธาตุอาหารต่างๆ สูง และมีความสามารถซึมได้ ของน้ำในแหนแดงสูง และมีความโปร่ง ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีที่อาจจะทำให้แหนแดงนั้นสามารถกักเก็บจุลินทรีย์ได้ดีซึ่งจะได้ทำการศึกษากับจุลินทรีย์ต่างๆ เพื่อใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ประยูร สวัสดี, สมพร ชุนห์ลือชานนท์ และ นันทกร บุญเกิด. 2530. **รายงานผลการวิจัยการใช้แหนแดงเป็นปุ๋ยพืชสดในนาข้าว**. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 28 น.

วิทยา ธนานุสนธิ์. 2545. **ไรโซเบียมและการผลิตปุ๋ยไรโซเบียม** *ใน* เอกสารวิชาการปุ๋ยชีวภาพ หน้า 83 – 130. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพ

Alalade O.A. and E.A. Lyayi. 2006. Chemical composition and the Feeding value of Azolla (*Azolla pinnata*) meal for Egg–type chicks. Int. J. Poultry Sci. 5: 137–141.

Lui Chung - Chu. 1987. **Reevaluation of *Azolla* Utilization in Agricultural Production.** *In* Azolla Utilization : Proceedings of the Workshop on *Azolla* Use. pp. 67–76. Int. Rice Research Inst., Los Baños, Philippines.

Tung H.F. and T.C. Shen 1981. Studies of the *Azolla pinnata – Anabaena azollae* symbiosis: growth and nitrogen fixation. **New Phytol.** 87:743 – 749.

Watanabe, I. 1982. **Azolla – Anabaenasymbiosis. Its physiology and use in tropical agriculture.** PP. 169–185. *In*: Microbiology of tropical soils and plant productivity. Dammergues. Y and H.G. Diem, (eds.). Martinus Nijhoff publishers Hague.

Watanabe I., and Ramirez C. 1984. Relationship between soil phosphorus availability and *Azolla* growth. **Soil Sci. Plant Nutr. 30:** 595 – 598.

การใช้ผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติลดการใช้ chlorpyrifos ในพริก

Using Botanical Pesticides to Reduce chlorpyrifos for Controlling Chili Pests

พรรณีกา อัตตนนท์[1/] ปิยศักดิ์ อรรคบุตร[1/] ธนิตา ค่ำอำนวย[1/] สุเทพ สหายา[2/]

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาการใช้สารผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติลดการใช้ chlorpyrifos ในพริก มีวัตถุประสงค์ที่จะหาวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติ เช่น สะเดา หางไหล พ่นสลับหรือใช้ร่วมกันกับสารเคมี ที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำ (imidacloprid) ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพริก เพื่อทดแทนสารที่กรมวิชาการเกษตรไม่แนะนำแต่เกษตรกรนิยมใช้ (chlorpyrifos) ดำเนินการทดลองในแปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในช่วงเดือนมกราคม 2553 ถึง เมษายน 2553 วางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ 9 กรรมวิธี ได้แก่ การพ่นหางไหล การพ่นหางไหลผสมสะเดา การพ่นหางไหลผสมสะเดาสลับกับสะเดา การพ่นหางไหลผสมสะเดาสลับกับหางไหล การพ่นสาร imidacloprid ผสมสะเดา ติดต่อกัน 3 ครั้ง สลับกับสะเดา 2 ครั้ง การพ่นสาร imidacloprid ผสมหางไหล ติดต่อกัน 3 ครั้งสลับกับหางไหล 2 ครั้ง การพ่นสาร imidacloprid การพ่นสาร chlorpyrifos และกรรมวิธีไม่พ่นสาร มีการพ่นสารตามกรรมวิธี 5 ครั้ง ห่างกันทุก 5 วัน ตรวจนับเพลี้ยไฟแมลงศัตรูสำคัญในพริก ที่บริเวณยอด และดอก ก่อนพ่นสารทุกครั้ง และหลังพ่นสารครั้งสุดท้าย 5 วัน สุ่มเก็บผลผลิต 5 ครั้ง พบว่า การพ่นสารธรรมชาติผสมสลับสารธรรมชาติ การพ่นสารธรรมชาติผสมสารเคมี imidacloprid สลับสารธรรมชาติ มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในพริกไม่แตกต่างจากการพ่นสาร imidacloprid โดยเฉพาะการพ่นหางไหลผสมสะเดาสลับสะเดาทำให้เพลี้ยไฟในส่วนใบพริกลดลงไม่แตกต่างกับสาร imidacloprid คือ 13.7 ตัวต่อ 20 ยอด และ 13.3 ตัวต่อ 20 ยอด ตามลำดับ และทำให้จำนวนเพลี้ยไฟลดต่ำลงกว่าการพ่นสาร chlorpyrifos และการไม่พ่นสาร คือ 23.3 ตัวต่อ 20 ยอด และ 30 ตัวต่อ 20 ยอด ตามลำดับ จากการสุ่มผลผลิตพริกเกรดส่งตลาดพบว่าการพ่นสารสะเดาผสม imidacloprid 3 ครั้งสลับสะเดา 2 ครั้ง ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ 711.7 กรัมต่อ 20 ต้น รองลงมา คือการพ่น chlorpyrifos และการพ่น imidacloprid 596.7 และ 546.7 กรัมต่อ 20 ต้น ตามลำดับ ผลตรวจวิเคราะห์สารตกค้างหลังเก็บเกี่ยว 1, 5 และ 14 วัน ในผลผลิตของแปลงพริกที่พ่นสาร chlorpyrifos พบปริมาณสารตกค้าง 5.49, 4.19, และ 1.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกินค่ามาตรฐานของ Japan MRLs (1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และ EU MRLs (0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จะเห็นว่าถ้าเปรียบเทียบประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟแล้วสารธรรมชาติสามารถทดแทนสารเคมี chlorpyrifos ได้ และไม่มีพิษตกค้าง

[1/] กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2/] กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ถูกต้อง ทำให้เกิดผลกระทบต่อชีวิตและสิ่งแวดล้อม เกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อปัญหาสุขภาพ ปัจจุบันได้มีการพัฒนานำผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืช (botanical pesticides) มาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากสารสกัดธรรมชาติที่ใช้ด้านกำจัดศัตรูพืชไม่มีอันตรายต่อผู้ใช้และผู้บริโภค ไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและศัตรูธรรมชาติซึ่งเป็นการเกษตรยั่งยืนและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม สารกำจัดแมลง chlorpyrifos เป็นสารกลุ่ม ออร์แกโนฟอสเฟต (organophosphates) ความเป็นพิษในระดับ ปานกลาง (Moderately hazard class II) มีพิษต่อระบบประสาทโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่มีบทบาทในการขบวนการสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาทมีผลทำให้เกิดอาการกล้ามเนื้อเกร็ง กระตุก ถ้ารุนแรงอาจเสียชีวิต นอกจากนี้มีความเป็นพิษรุนแรงต่อผึ้ง ตัวห้ำ ตัวเบียน และสัตว์ป่าทั่วไป ในปี พ.ศ.2551 มีปริมาณนำเข้ามากถึง 2,350 ตัน ทำให้มีการใช้อย่างแพร่หลายในพืชต่างๆ ที่กรมวิชาการเกษตรไม่แนะนำเช่น ผัก ผลไม้ที่มีการบริโภคสด (กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2551) จินตนา และคณะ (2552) รายงานการเฝ้าระวังปริมาณสารพิษตกค้างในพริกที่เก็บจากทุกภาคของประเทศไทย พบสาร chlorpyrifos ตกค้าง ปริมาณ 0.01 - 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างพริกร้อยละ 38 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้รับการแจ้งเตือนจากกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปในเรื่องผลิตผลที่นำเข้าจากประเทศไทย ในปี พ.ศ.2551 พบสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักผลไม้นำเข้าจากประเทศไทย ผ่านระบบ Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) รวม 26 รายการ มีทั้งการแจ้งพบสารที่ไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในสหภาพยุโรป และการพบสารเคมีสูงเกินค่าตกค้างสูงสุด (MRLs) สาร chloropyrifos เป็นหนึ่งในสารที่ได้รับการแจ้งเตือนตรวจพบตกค้างในพืช ได้แก่ พริก และ ถั่วฝักยาว เป็นต้น

จากการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสมุนไพรหลายชนิดที่ศักยภาพเป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา หางไหล หรือโล่ติ๊น หนอนตายหยาก ตะไคร้หอม สาบเสือ ข่า เป็นต้น (ธาวดี, 2524) สารสกัดสะเดามีสารสำคัญ Azadirachtin มีผลต่อ titers hormone ซึ่งจะไปรบกวนกับการเจริญเติบโตของตัวหนอน ทำให้รูปร่างผิดปกติไป และลอกคราบไม่สมบูรณ์ ไประงับการเจริญเติบโตขอหนอนและทำให้ไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัย นอกจากนี้มีผลยับยั้งการวางไข่ของผีเสื้อ และพบว่า Azadirachtin ทำให้แมลงเป็นหมัน (Arnason *et al.,* 1989) สารที่สกัดได้จากเนื้อในเมล็ดสะเดาออกฤทธิ์เป็นสารไล่ และยับยั้งการกินอาหารของแมลงของหนอนผีเสื้อยาสูบ หนอนใยผัก และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สารออกฤทธิ์ในเมล็ดสะเดาไม่ได้ฆ่าแมลงให้ตายในทันที แต่มีผลทำให้แมลงมีการเจริญเติบโตผิดปกติ และมีพฤติกรรมเปลี่ยนแปลง มีผลในการยับยั้งการกินอาหาร ไล่แมลง (Barnby *et al.,* 1990) สารสกัดสะเดาสามารถใช้ในการควบคุมการระบาดของแมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไฟ หนอนชอนใบ (Annonymous, 1999a) สมศักดิ์ (2550) รายงานว่า กรรมวิธีพ่นสารสกัดสะเดา การพ่นสารฆ่าแมลง imidacloprid, emamectin benzoate, fipronil และมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ สารสกัดจากรากหางไหล สามารถป้องกันกำจัดหนอนเจาะต้นข้าวโพด Rejesus *et al.,* (1995) รายงานว่าการพ่นสารสกัดจากหางไหล (S6) และการพ่นสารสกัดหางไหลสูตรผง (S49) สามารถลดประชากรหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด นอกจากนี้พบว่าสารสกัดยังมีความปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติ เช่น แมลงหางหนีบ ด้วงเต่า และ *Trichogramma evanescens* ซึ่งเป็นแตนเบียนไข่ของหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด และจากการทดลองสกัดหางไหลกับแมลงเจาะฝักถั่วที่ความเข้มข้น 50 – 100 พีพีเอ็ม ให้ผลดี (เสริมและคณะ 2546)

Grainge Ahmed (1998) พบว่าสามารถใช้ป้องกันเพลี้ยอ่อนและหนอนผีเสื้อ ผลิตภัณฑ์โล่ติ๊นใช้ป้องกันแมลงศัตรูกะหล่ำดอก (Javier *et al.*,1995) ป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว หนอนใยผัก (Rejeus *et al.*, 1994) และใช้ป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ *(Thrip palmi* Karny)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาแนวทางการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ (สารสกัดหางไหล และสะเดา) ทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช chlorpyrifos เพื่อแก้ไขปัญหาสารพิษตกค้างในพริก เพื่อป้องกันปัญหาการส่งออกของพริกที่มีสาร chlorpyrifos ตกค้าง และเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดแมลงในพืชส่งออกที่มีปัญหาสารพิษตกค้างร้ายแรงยิ่งอื่นๆ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์พริก
2. สารทดลองได้แก่
   - ผลิตภัณฑ์สารธรรมชาติ
   - ผลิตภัณฑ์สะเดาสะเดาไทย111® ที่มีสาร azadiratchtin A 0.04 %
   - ผลิตภัณฑ์หางไหล ronocide® ที่มีสารโรติโนน 6.9%
   - สารเคมีทางการเกษตร chlorpyrifos 40% EC และ imidacloprid 10% SL
3. สารจับใบเซลเลสตรอน
4. ปุ๋ย 46-0-0 และ 15-15-15
5. เครื่องพ่นสารแบบโยกสูบสะพายหลัง
6. ป้ายแปลงทดลอง
7. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, pipette, flat bottom flask, glass cylinder เป็นต้น
8. สารมาตรฐาน chlorpyrifos
9. สารเคมีชนิดต่างๆ เช่น sodium sulfate (anhydrous granular) sodium chloride (AR grade)
10. สารทำละลายชนิดต่างๆ เช่น acetone (AR grade) dichloromethane(AR grade) เป็นต้น
11. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น Homogenizer, เครื่องปั่นย่อยขนาดตัวอย่าง food processor, column พร้อม container และ tube ขนาด 15 มิลลิลิตร สำหรับการ Cleanup เป็นต้น
12. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
13. เครื่องลดปริมาตร Rotary Evaporator
15. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ประกอบด้วยหัวตรวจชนิด Flame Photometer Detector (FPD)

วิธีการ

ดำเนินงานในแปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในช่วง เดือนมกราคม 2553 ถึงเดือนเมษายน 2553 สารธรรมชาติที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์สะเดาสะเดาไทย111® ที่มีสาร azadiratchtin A 0.04 เปอร์เซ็นต์ ผลิตภัณฑ์หางไหล ronocide® ที่มีสารโรติโนน 6.9 เปอร์เซ็นต์ สารเคมีทางการเกษตร imidacloprid 10% SL และ chlorpyrifos 40% EC

วางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ 9 กรรมวิธี ได้แก่ การพ่นหางไหล อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร การพ่นหางไหลผสมสะเดาอัตรา 60 + 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร การพ่นหางไหลผสมสะเดา (อัตรา 60 + 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) สลับกับสะเดา (อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) การพ่นหางไหลผสมสะเดา (อัตรา 60 + 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) สลับกับหางไหล (อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) การพ่นสาร imidacoprid ผสมสะเดา (อัตรา 20 + 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) ติดต่อกัน 3 ครั้งสลับกับสะเดา (อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) 2 ครั้ง การพ่นสาร imidacoprid ผสมหางไหล (อัตรา 20 + 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) ติดต่อกัน 3 ครั้งสลับกับหางไหล (อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) 2 ครั้งการพ่นสาร imidacoprid (อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) การพ่นสาร chlorpyrifos (อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร) และกรรมวิธีไม่พ่นสาร แต่ละหน่วยทดลองมีพื้นที่ 20 ตารางเมตร เป็นแปลงขนาดกว้าง 4 เมตร ยาว 5 เมตร จำนวน 27 แปลง ปลูกพริกพันธุ์ ซุปเปอร์ฮอท 5 แถวๆ ละ 11 ต้น จำนวน 55 ต้นต่อแปลง ใช้ระยะปลูก 50 x 100 เซนติเมตร เริ่มพ่นสารทดลองตามกรรมวิธีที่กำหนด หลังปลูกพริก 30 – 40 วัน ทำการพ่นสารทดลองทุก 5 วัน จำนวน 5 ครั้ง โดยใช้เครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง สารทดลองทุกวิธีการผสมสารจับใบเบสมอร์ อัตรา 5 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร สุ่มเก็บดอกจำนวน 20 ดอกต่อแปลงย่อย และยอดพริก 20 ยอดต่อแปลงย่อย โดยแต่ละยอดมีความยาว 10 เซ็นติเมตร นับจากปลายยอด นำมาจุ่มล้างในสารละลายแอลกอฮอล์ ตรวจนับจำนวนเพลี้ยไฟ บันทึกข้อมูล สุ่มตรวจนับเพลี้ยไฟก่อนพ่นสารทุกครั้งและหลังพ่นสาร 5 วัน

สุ่มพริกในแปลงที่มีการใช้สาร chlorpyrifos เพื่อตรวจหาสารพิษตกค้างที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสารพิษตกค้าง เพื่อตรวจสารพิษตกค้างหลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 5 โดยสุ่มเพื่อตรวจหลังพ่นสาร 1, 5 และ 14 วัน ตามลำดับ เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ chlorpyrifos นำตัวอย่างประมาณ 1 กิโลกรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นย่อย (food processor) ชั่งตัวอย่างที่ปั่นแล้ว 25 $\pm$ 0.1 กรัม ขวดเก็บตัวอย่าง ติดป้ายระบุตัวอย่าง

สกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้าง chlorpyrifos ตามวิธีที่พัฒนาจาก Steinwandter,H,1985.

ระยะเวลา ตุลาคม 2552 - กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง ดำเนินงานทดลองทั้งในแปลงเกษตรกร ที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจนับแมลงศัตรูพริกก่อนและหลังการพ่นสารต่างๆ หลังปลูกพริก 30 - 40 วัน แมลงศัตรูพืชที่พบมาก คือ เพลี้ยไฟ พบทั้งในดอกและใบ หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้ายพบจำนวนเล็กน้อย

จำนวนเพลี้ยไฟในใบพริก

ก่อนพ่นสารพบจำนวนเพลี้ยไฟ อยู่ระหว่าง 24 - 39.3 ตัวต่อ 20 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ หลังพ่นสารครั้งที่ 1 พบจำนวนเพลี้ยไฟในใบพริกของกรรมวิธีการพ่นสาร imidacloprid ผสม สะเดา ติดต่อกัน 3 ครั้ง สลับกับสะเดา 2 ครั้ง ลดเพลี้ยไฟได้ดีที่สุดเท่ากับ imidacloprid จำนวนเฉลี่ย 14.7 และ 15.7 ตัวต่อ 20 ยอด ตามลำดับแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่นๆ และกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบเฉลี่ย 18.7 - 27.3 ตัวต่อ 20 ยอด ยกเว้นกรรมวิธีการพ่นสะเดาผสมหางไหลสลับหางไหลที่ลดลงน้อยสุด 30.33 ตัว หลังพ่นสารครั้งที่ 2, 3 และ 4 พบจำนวนเพลี้ยไฟเฉลี่ย

32.3-48.7, 22.3-56 และ 18-34.7 ตัวต่อ 20 ยอด ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ หลังพ่นสารครั้งที่ 5 พบจำนวนเพลี้ยไฟลดลงแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่ากรรมวิธีการพ่นสารธรรมชาติผสมกันหรือผสมกับสารเคมี imidacloprid ทำให้เพลี้ยไฟลดลงได้ มากอยู่ระหว่าง 13.3 - 20.7 ตัวต่อ 20 ยอด และไม่แตกต่างจากการพ่นด้วยสารเคมี imdacloprid โดยเฉพาะ การพ่นหางไหลผสมสะเดาสลับกับสะเดาที่ทำให้จำนวนเพลี้ยไฟลดลง 13.7 ตัวต่อ 20 ยอด เทียบเท่าการพ่น imidacloprid ที่ทำให้จำนวนเพลี้ยไฟลดลงมากสุดคือ 13.3 ตัวต่อ 20 แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีการพ่น chlorpyrifos และการไม่พ่นสาร ยกเว้นกรรมวิธีการพ่นสารสะเดาผสมหางไหลซึ่งเป็นกรรมวิธีที่มีแต่สารธรรมชาติแต่ทำให้จำนวนเพลี้ยไฟลดลงไม่แตกต่างจากแปลงไม่พ่นสารและกรรมวิธีการพ่น chlorpyrifos แต่แตกต่างจากกรรมวิธีสารธรรมชาติอื่นๆ (ตารางที่ 1)

จำนวนเพลี้ยไฟในดอกพริก

ผลการตรวจนับจำนวนเพลี้ยไฟ พบว่าจำนวนเพลี้ยไฟในดอกพริกทุกกรรมวิธี ไม่แตกต่างจากการไม่พ่นสาร รวมทั้งก่อนพ่นสาร และหลังพ่นสาร ครั้งที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ซึ่งพบว่าข้อมูลการลดลงของเพลี้ยไฟไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ผลผลิตพริกเกรดส่งตลาด

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเฉลี่ย (เกรดส่งตลาด) จากการสุ่มเก็บพริก 5 ครั้ง พบว่าการพ่นสารสะเดาผสม imidacloprid 3 ครั้ง สลับสะเดา 2 ครั้ง การพ่น chlorpyrifos และการพ่น imidacloprid ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน โดยที่การพ่นสารสะเดาผสม imidacloprid 3 ครั้ง สลับสะเดา 2 ครั้ง ให้ผลผลิตสูงสุดสูงคือ 711.7 กรัมต่อ 20 ต้น รองลงมาคือการพ่น chlorpyrifos และการพ่น imidacloprid คือ 596.7 และ 546.7 กรัมต่อ 20 ต้น ตามลำดับ ส่วนการพ่นสะเดาผสมหางไหลสลับสะเดาให้ผลผลิต 416.7 กรัมต่อ 20 ต้น ถึงแม้จะแตกต่างจาก 3 กรรมวิธีดังกล่าว ข้างต้น (ตารางที่ 3) แต่เมื่อเปรียบเทียบความสวยสมบูรณ์ของผลพริก (รูปที่ 1) จะเห็นว่าผลพริกที่ได้จากการพ่น สะเดาผสมหางไหลสลับสะเดา (T3) จะสวยสมบูรณ์ไม่ต่างกับที่พ่นด้วยสารเคมี chlorpyrifos (T8) แต่จะสวยกว่าการพ่นด้วยสารสะเดาผสม imidacloprid 3 ครั้ง สลับสะเดา 2 ครั้ง (T5) และการพ่นด้วยสาร imidacloprid อย่าง เดียว (T7)

รูปที่ 1. เปรียบเทียบความสวยสมบูรณ์ของผลพริก

การตรวจหาพิษตกค้าง

จากการสุ่มผลพริกในแปลงที่มีการใช้สาร เพื่อตรวจหาสารพิษตกค้าง หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 5 โดยสุ่มเพื่อตรวจหลังพ่นสาร 1, 5 และ 14 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4) พบสาร chlorpyrifos ตกค้าง หลังการพ่น 1, 5 และ 14 วัน ดังนี้ คือ 5.49, 4.19 และ 1.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับโดยค่า Japan MRL เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ EU MRL เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นว่า หลังพ่นสารนานถึง 14 วัน สารพิษ chlorpyrifos ก็ยังเกินค่ามาตรฐาน MRLs ทั้งของ EU และญี่ปุ่น

ผลจากการทดลองการใช้สารธรรมชาติ สะเดา และหางไหล ทั้งรูปแบบการพ่นสารเดี่ยว ผสมและหรือสลับกับสารแนะนำ imidacloprid ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพริก มีแนวโน้มในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในใบพริก โดยเฉพาะการพ่นหางไหลผสมสะเดาสลับกับสะเดา ทำให้จำนวนเพลี้ยไฟลดลงเทียบเท่าการพ่นสาร imidacloprid แม้บางกรรมวิธีสารธรรมชาติอื่นอาจลดจำนวนเพลี้ยไฟได้น้อยกว่าการพ่น imidacloprid แต่เมื่อเทียบกับ chlorpyrifos จะเห็นว่ากรรมวิธีต่างๆ ที่พ่นสารธรรมชาติลดเพลี้ยไฟได้ดีกว่า chlorpyrifos เนื่องจากผลของสารธรรมชาติ สะเดาและหางไหล ร่วมกันออกฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง สมศักดิ์ และเตือนจิตต์ (2550) ซึ่งรายงานในการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดสะเดา น้ำมันปิโตรเลียมและสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟพริกว่าสะเดามีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ

จากการนับจำนวนเพลี้ยไฟในดอกพบว่า จำนวนเพลี้ยไฟในดอกพริกทุกกรรมวิธีรวมทั้งสารแนะนำ imidacloprid ไม่แตกต่างจากการพ่น Chlorpyrifos และการไม่พ่นสาร ทั้งก่อนพ่นสาร และหลังพ่นสาร ครั้งที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 สำหรับสารธรรมชาติเป็นไปได้ว่าเพลี้ยไฟต้านทานสารเคมี imidacloprid ไปแล้ว ซึ่งในระยะสองสามปีที่ผ่านมีเริ่มมีรายงานการต้านทานของแมลง ต่อสารกลุ่มนีโอโคตินอยด์โดยเฉพาะ imdacloprid (พิสุทธิ์, 2553)

สำหรับการพ่นการพ่นหางไหลผสม สะเดา (อัตรา 60 + 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งเป็นกรรมวิธีสารธรรมชาติวิธีเดียวที่ทำให้จำนวนเพลี้ยไฟลดลงไม่แตกต่างจากแปลงไม่พ่นสาร เป็นไปได้ที่อัตราส่วนที่ผสมของหางไหลและสะเดาต่ำเกินไป และเป็นกรรมวิธีที่ไม่มีสารธรรมชาติอื่นสลับ จึงมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการทำให้เพลี้ยไฟลดลง แสดงให้เห็นว่าการที่สลับด้วยสารสกัดสะเดาหรือหางไหลมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟได้ดี โดยเฉพาะสะเดา อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งต่อไปอาจต้องใช้สารสมุนไพร เช่น สะเดา หางไหล ในปริมาณเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะกรรมวิธีที่มีสะเดาผสมหางไหลอาจใช้เป็นอัตราส่วนผสมกันเป็น 100 มิลลิลิตร + 100 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร

ในส่วนของผลผลิตจะเห็นว่าการพ่นสารธรรมชาติผสม/สลับกับสารแนะนำ คือ การพ่นสารสะเดาผสม imidacloprid 3 ครั้ง สลับสะเดา 2 ครั้ง ให้ผลผลิตสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟแล้วกรรมวิธีนี้ก็ให้ผลในการป้องกันกำจัดดีกว่าการพ่น chlorpyrifos จะเห็นว่าการใช้สารธรรมชาติผสมและสลับกับสารเคมีแนะนำนอกจากป้องกันกำจัดศัตรูพริกที่สำคัญเช่นเพลี้ยไฟได้ดีกว่า chlorpyrifos แล้วยังได้ผลผลิตพริกสูงสุด และปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง chlorpyrifos

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปว่าเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพแล้วสารธรรมชาติสามารถทดแทนสาร chlorpyrifos ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟได้เลย ถึงแม้จะสู้สารแนะนำ imidacloprid ไม่ได้ แต่สารธรรมชาติบางกรรมวิธีก็ยังใช้ลดเพลี้ยไฟได้ไม่แตกต่างกับสารแนะนำ และได้ผลผลิตพริกที่สวยและที่สำคัญคือปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง chlorpyrifos ซึ่งช่วยแก้ปัญหาในเรื่องการส่งออกพริก นอกจากนี้การใช้สารธรรมชาติอาจนำมาเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในพริกได้แทนสารเคมีที่เพลี้ยไฟต้านทานแล้ว อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาการใช้สารธรรมชาติในพืชอื่นๆ ที่มีปัญหาสารพิษตกค้างที่ได้รับการแจ้งเตือนจากประเทศนำเข้าสินค้าเกษตรไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2551. **คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2551**. เอกสารวิชาการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 295 หน้า.

จินตนา ภู่มงกุฎชัย และพนิดา ไชยยันต์บรูณ์. 2552. วิจัยการเฝ้าระวังสารพิษตกค้างในพริก. หน้า 115 - 123. ใน : ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2552 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

ธาวดี ผ่องลักษณ์. 2524. พืชที่ใช้ฆ่าแมลงและไล่แมลง. **ว. วิทยาศาสตร์ 35 (8)** : 559 – 569

พิสุทธิ์ เอกอำนวย. 2553. **โรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สวนสัตว์แมลงสยาม เชียงใหม่ 592 หน้า

สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และ เตือนจิตต์ สัตยาวิสุทธิ์. 2552. **ประสิทธิภาพสารสกัดสะเดา น้ำมันปิโตรเลียม และสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในพริก**. รายงานประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร

เสริม สีมา ถวิล จอมเมือง และสมบัติ แผนดี. 2546. **วิจัยประสิทธิภาพของสารสกัดหางไหลและสารฆ่าแมลงกับแมลงศัตรูถั่วฝักยาว** รายงานประจำปี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 10 หน้า

Annonymous, 1999a. Extention Toxicology Network, 1999. Available on http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/azadirac.htm. (4pp.)

Arneson, J.T. Phylogenies, B.J.R. and P. Morand, 1989. Insecticides of Plant Origin, American Chemical Society, Washington, D.C., 213 pp.

Barnby, M.A. Yamasaki, R.B. and J.A. Klocke, 1990. Biological Activity of Azadirachtin, their derivatives and their ultraviolet radiation degradation products against tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae, **J. Entomo. 82**, 58-63.

Codex Alimentarius. 1993. **Pesticide Residues in Food.** Volume 2.2nd ed. FAO pp. 147-365.

Grainge M. and S. Ahmed. 1998. **Handbook of Plants with Pest-Control Properties.** A Wiley – Interscience Publication John Wiley & Sons. New York. 262 pp.

Javier, P.A.; Rejesus, B.M. San - Juan, E.A. J.M. and Malabanan. 1995. “Field evaluation of Derris against the major insect pests of crusifiers, corn and mungbean” Derris Research program, Colledge Laguana (Philippines), May 1995, p.83-125.

Rejesus, B.M. Maini, H.A. Ocampo, V.R. Dayrit, F.M. and E.G. Quintana. 1994. “Insecticidal Actions of several Phillippine Plants with emphasis on Vitex negundo L.” Phillippine Agriculturist (Phillippines), Oct. - Dec. 1993., 76(4), p. 355-371. ZIssued Nov. 1994)

Rejesus, B.M.; Ocampo, V.R. E.I. and Inocencio. 1995. “Bioassay of Derris extracts and its formulated products for insecticidal and mammalian toxicity” Derris research program, Colledge, Laguana (Phillippines), May 1995, 31 - 82.

Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min on - line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. **Fresenlus Z Anal. Chem. 322** : 752 - 754

ตารางที่ 1. จำนวนเพลี้ยไฟใน **ใบพริก** ก่อนพ่น และหลังพ่นสารชนิดต่างๆ

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (/น้ำ20 ลิตร)	ก่อนพ่น	จำนวนเพลี้ยไฟ 5 วันหลังพ่นสารครั้งที่				
			1	2	3	4	5
หางไหล	100 มล.	24	23 ab	46	49	18.67	20.7 abc
หางไหลผสมสะเดา	60+60 มล.	37	24.3 ab	42	53	28.67	25.7 cd
หางไหลผสมสะเดา พ่นสลับ สะเดา	60+60 มล./ 100 มล.	25	23.3 ab	36.7	49	18	13.7 a
หางไหลผสมสะเดา พ่นสลับ หางไหล	60+60 มล./ 100 มล.	25	30.33 b	48.7	56	34.67	18.7 abc
Imidacloprid ผสมสะเดา พ่นติดต่อกัน 3 ครั้งแรก ตามด้วย พ่นสะเดา 2 ครั้ง	20+60 มล. /100 มล.	29.7	14.7 a	39	36.67	22.67	19.7 abc
Imidacloprid ผสมหางไหล พ่นติดต่อกัน 3 ครั้งแรก ตามด้วย พ่นหางไหล 2 ครั้ง	20+60 มล. /100 มล.	39.3	21.3 ab	34	22.33	24	18.0ab
Imidacloprid 10% SL	20 มล.	22.3	15.7 a	32.3	26	19.67	13.3 a
Chlorpyrifos 40% EC	40 มล.	23	18.7 ab	34.7	24.67	24.33	23.3 bcd
ไม่พ่นสาร	-	34	27.3 ab	34.3	54	29	30.0 d
CV (%)		56.8	33.8	60.9	60.5	46.2	18.9

ค่าเฉลี่ย (จาก 3 ซ้ำ) ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 95% ด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 2. จำนวนเพลี้ยไฟใน.**ดอกพริก** ก่อนพ่น และหลังพ่นสารชนิดต่างๆ

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (/น้ำ20 ลิตร)	ก่อนพ่น	จำนวนเพลี้ยไฟ 5 วันหลังพ่นสารครั้งที่				
			1	2	3	4	5
หางไหล	100มล.	48.0	38.0	81.7	52.7 ab	18.3	33.0
หางไหลผสมสะเดา	60+60 มล.	54.3	31.3	64.0	64.0 b	24.3	37.7
หางไหลผสมสะเดา พ่นสลับ สะเดา	60+60 มล./ 100มล.	27.0	29.7	60.7	55.3 ab	26.3	35.7
หางไหลผสมสะเดา พ่นสลับ หางไหล	60+60 มล./ 100มล.	41.7	50.3	87.3	62.3 ab	20.3	31.3
Imidacloprid ผสมสะเดา พ่นติดต่อกัน 3 ครั้งแรก ตามด้วย พ่นสะเดา 2 ครั้ง	20+60 มล. /100 มล.	47.7	33.3	32.0	39.3 ab	26.3	24.3
Imidacloprid ผสมหางไหล พ่นติดต่อกัน 3 ครั้งแรก ตามด้วย พ่นหางไหล 2 ครั้ง	20+60 มล. /100 มล.	49.0	40.3	68.7	40.3 ab	36.3	32.7
Imidacloprid 10% SL	20 มล.	47.7	32.3	32.3	35.3 a	20.0	31.7
Chlorpyrifos 40% EC	40 มล.	50.3	26.3	30.0	53.0 ab	22.0	34.7
ไม่พ่นสาร	-	45.7	47.0	56.7	44.0 ab	22.7	35.3
CV (%)		35.7	48.6	59.1	28.6	49.1	32.3

ค่าเฉลี่ย (จาก 3 ซ้ำ) ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 95% ด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 3. ปริมาณผลผลิตพริก รวม เก็บ 5 ครั้ง (20 ต้น) เกรดส่งตลาด

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (/น้ำ20 ลิตร)	นน. พริก (กรัม)
หางไหล	100 มล.	315.0 cd
หางไหลผสมสะเดา	60+60 มล.	310.0 cd
หางไหลผสมสะเดา พ่นสลับ สะเดา	60+60 มล./ 100 มล.	416.7 bcd
หางไหลผสมสะเดา พ่นสลับ หางไหล	60+60 มล./ 100 มล.	385.0 bcd
Imidacloprid ผสมสะเดา พ่นติดต่อกัน 3 ครั้งแรก ตามด้วย พ่นสะเดา 2 ครั้ง	20+60 มล. / 100 มล.	711.7 a
Imidacloprid ผสมหางไหล พ่นติดต่อกัน 3 ครั้งแรก ตามด้วย พ่นหางไหล 2 ครั้ง	20+60 มล. / 100 มล.	430.0 bcd
Imidacloprid 10% SL	20 มล.	546.7 abc
Chlorpyrifos 40% EC	40 มล.	596.7 ab
ไม่พ่นสาร	-	248.3 d
CV (%)		30.3

ค่าเฉลี่ย (จาก 3 ซ้ำ) ที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 95% ด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4. ปริมาณสารตกค้างที่พบหลังการพ่นสารครั้งที่ 5 ในกรรมวิธีที่พ่นสาร chlorpyrifos

กรรมวิธี	สารเคมี	ปริมาณสารตกค้างหลังฉีดพ่น (mg/kg)		
		1 วัน	5 วัน	7 วัน
สาร chlorpyrifos 40% EC	chlorpyrifos	5.49	4.19	1.8

วิจัยเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดพืชหนอนตายหยาก หางไหล ว่านน้ำระดับโรงงานต้นแบบ

Research on Pilot Plant Level of Extraction Process of *Stemona* sp. *Derris elliptica* and *Acorus calamus* as Botanical Pesticides

พรรณีกา อัตตนนท์[1/] เสริม สีมา[1/] สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต[2/]

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

งานวิจัยวิจัยเทคโนโลยีการผลิตสารสกัดพืชหนอนตายหยาก หางไหลและว่านน้ำระดับโรงงานต้นแบบเป็นงานวิจัยต่อจากการวิจัยเครื่องสกัดหางไหล (*Derris elliptica* Benth.) แบบต่อเนื่องระดับโรงงานต้นแบบ มีวัตถุประสงค์ในการนำเครื่องต้นแบบที่ได้มาใช้ในการผลิตสารสกัดจากพืช 3 ชนิด คือ หางไหล หนอนตายหยาก และว่านน้ำ และผสมปรุงแต่งให้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นงานวิจัยที่ดำเนินงานทั้งในห้องปฏิบัติการและในส่วนโรงงานของกลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เริ่มดำเนินงานตั้งแต่ตุลาคม 2549 – กันยายน 2553 ประกอบไปด้วยการทดลองแยกตามพืชที่ศึกษาดังนี้

การวิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลหรือโล่ติ๊นด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ ผลการศึกษาการผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบหางไหลให้เป็นผลิตภัณฑ์ พบว่า อัตราส่วนของสารสกัดหยาบที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 27 – 36% โดยทำให้ผลิตภัณฑ์มีสารโรติโนนอยู่ระหว่าง 4 – 5% และมีการละลายที่ดี การศึกษาการคงสภาพของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์หางไหลโดยการใช้ความร้อน พบว่าสูตร ก 45. ที่มีค่าความเป็นกรดสูงกว่าสูตรอื่นๆ หลังอบที่อุณหภูมิ 54°C นาน 2 สัปดาห์ ปริมาณสารโรติโนนลดลงน้อยที่สุดคือ 3.84% คิดเป็นเปอร์เซ็นต์คงเหลือหลังอบสูง 92.53% ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์หางไหลในการควบคุมแมลงศัตรูพืชผลิตภัณฑ์หางไหลพบว่า หางไหลเข้มข้น 1,400 ppm ทำให้หนอนกระทู้หอม วัยที่ 2 และที่ 3 ตาย 92.50 และ 74.72% ตามลำดับ หลังพ่น 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลต่อหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 พบว่า ผลิตภัณฑ์หางไหลเข้มข้น 1,400 ทำให้หนอน ตาย 90.00, 85.00 และ 72.50% ตามลำดับ หลังพ่นสาร 72 ชั่วโมง

[1/] กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2/] กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การวิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงาน พบว่าการสกัดหนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep ด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ ใช้หนอนตายหยากบดแห้ง ความชื้นต่ำกว่า 10% จำนวน 5 กิโลกรัม จะได้สารสกัดหยาบเหลวเหนียว เฉลี่ย 1.8 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย total alkaloid 7.98% สภาวะที่ใช้ในการลดปริมาตรของเครื่องคือความดันภายในเท่ากับ – 0.5 bar – gauge และอุณหภูมิภายในที่ 42 – 50°C ได้สูตรผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep ที่มีอัตราส่วนสารสกัดหนอนตายหยากต่อส่วนผสมปรุงแต่ง คือ 66% โดยทำให้ผลิตภัณฑ์มีปริมาณ total alkaloid 2 – 3% ผลทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชหนอนตายหยาก พบว่าผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep มีประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้หอมวัยที่ 3 ตาย 63.61% หลังพ่นสาร 24 ชั่วโมง

วิจัยการสกัดว่านน้ำที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตด้วยระบบของเครื่องหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ ผลได้แนวทางการสกัดว่านน้ำเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องสกัดหางไหล โดยมีสารทำละลายที่เหมาะสม คือ เอทธานอล และ dichloromethane

คำนำ

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และมีรายได้หลักจากการส่งออกสินค้าเกษตร ทำให้มีการเร่งการผลิต โดยการขยายพื้นที่การเกษตรให้มากขึ้นรวมทั้งการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น ขณะเดียวกันการใช้สารเคมีทางการเกษตรก็มากขึ้น การใช้สารเคมีการเกษตรเป็นจำนวนมากซึ่งทำให้มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์และระบบนิเวศน์เป็นอันมาก ก่อให้เกิดความเสียหายในหลายๆ ด้าน เช่น สารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสัตว์เลี้ยงทั่วไป รวมทั้งสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ทำให้นักวิจัยสาขาเกษตร และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ทำการทดลองค้นคว้าหาสารทดแทนสารเคมีการเกษตร และพบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น สะเดา โล่ติ๊น หนอนตายหยาก และอื่นๆเป็นต้น สามารถนำเอาส่วนที่สำคัญต่างๆ เช่น ต้น ราก ใบ ดอก และผล มาสกัดเพื่อให้ได้สาระสำคัญจากพืชนั้นๆ มาใช้ควบคุมศัตรูพืชแทน สารเคมีได้ดี โดยไม่มีพิษตกค้าง เนื่องจากสารธรรมชาติส่วนใหญ่จะสลายตัวได้เร็ว

โล่ติ้น หรือ หางไหลเป็นไม้พุ่ม หรือไม้เถาอยู่ในตระกูล Leguminoceae จัดว่าเป็นพืชที่มีศักยภาพชนิดหนึ่งในการนำมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ มีสารโรติโนนมีฤทธิ์สามารถกำจัดแมลงและเบื่อปลาได้ วินัยและอารมย์(2540) ศึกษาการสกัดหางไหลเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงด้วยการใช้ตัวทำละลายอะซิโตนหรือแอลกอฮอล์ในการสกัด ทดสอบฤทธิ์ต่อแมลง พบว่าสารสกัดในระดับ 25 ppm สามารถฆ่าหนอนตาย 50% ใน 2 วัน และพบว่าองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็นสารโรติโนนและอนุพันธ์ จากรายงานของอารมณ์ และคณะ (2537) พบว่าโล่ติ๊นสามารถใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น แมลงวัน ไร และหนอนบางชนิด ในแปลงผักและไม้ดอก และตั๊กแตน เป็นต้น วีรวิทย์ (2541) ได้ทำการศึกษาการใช้สารสกัดโล่ติ้นในแปลงปลูกมะเขือเปราะที่ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร พบว่า รากโล่ติ๊นที่เก็บไว้ 1 วัน แล้วมาทุบให้แตกแช่น้ำแล้วนำไปฉีดพ่น สามารถทำลายตัวของเพลี้ยจักจั่นฝ้ายได้ถึง 86.3% ในขณะที่สารไซฮาโลทรินทำลายเพียง 30.5%

หนอนตายหยาก หรือที่ชาวบ้านเรียกว่าโป่งมดง่าม ปงช้าง กระเพียด เป็นไม้ตระกูล Stemonaceae เป็นไม้เลื้อย มีรากใต้ดินจำนวนมาก เป็นพวงคล้ายกระชายยาว 10 – 30 เซนติเมตร ปี พ.ศ.2536 วีระพลและคณะ (2536) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากต้นหนอนตายหยาก *Stemona collinse* ต่อเห็บโค พบว่า สารสกัดเข้มข้น 50%

จะฆ่าเห็บในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้ 100% และ 93.33% ตามลำดับ Areekul *et al.* (2531) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่อแมลงวันผลไม้ พบว่า หนอนตายหยากมีฤทธิ์ปานกลางในการไล่แมลงวันผลไม้ รากหนอนตายหยากประกอบด้วยสารพวกอัลคาลอยด์ ได้แก่ Stemonidine, stemonine, tuberostemonine และสารพวก roteniods (เทพ และวิจิตรา, 2520) แต่มิได้ระบุว่าตัวใดเป็นสารออกฤทธิ์

ว่านน้ำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในเขตอบอุ่นของทวีปเอเชีย เป็นพืชที่ขึ้นอยู่กับโคลนเลน หรือริมบ่อ หนอง บึง มีชื่ออื่นๆ ได้แก่ คาเจียงจี้ ทิสีปุตอ ผมผา ส้มชื่น ฮางคาวน้ำ ฮางคาวบ้าน ฮางคาวผา Calamus flargoot, Myrtle grass, Sweet flag, Sweet sedge ว่านน้ำเป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อนสูง 1 – 2 เมตร จะมีลักษณะเหง้าอยู่ใต้ดิน เป็นรูปทรงกระบอกที่ค่อนข้างแบน ภายนอกจะมีสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นหอม ใบรูปยาวเรียงคล้ายใบดาบฝรั่ง จะเรียงสลับซ้ายขวาทแยงกัน มีการนำว่านน้ำมาใช้เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตั้งแต่ต้น ค.ศ.1600 ในประเทศแถบทวีปยุโรป นำมาใช้เป็นสารไล่แมลง ซึ่งมีการใช้มาก่อนที่จะใช้หางไหล (Thacker, 2009) มงคล (2547) ได้รายงานวิจัยที่ระบุถึงฤทธิ์ในการกำจัดแมลงของว่านน้ำว่ามีผลต่อระบบสืบพันธุ์ การวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลง สารสกัดเมทธานอลของว่านน้ำทำให้ด้วงข้าว *Sitophilus oryzae* (L.) และด้วงถั่วเหลือง *Callosobruchus chinensis* ที่โตเต็มวัยตายมากกว่า 90% หลังจากการสัมผัสสารสกัดโดยตรง 3 – 4 วัน น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าว่านน้ำพบสาร β – asarone (2,4,5 – trimethoxypropenylbenzenes), acorangermacrone และ asarylaldehyde ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด คือ *Ceratitis capitata*, *Dacus cucurbita* และ D. *dorsalis* เมื่อนำว่านน้ำ สะเดา และโล่ติ๊น มาผสมในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และการกินอาหารของตัวอ่อนผีเสื้อกลางคืน *Earias vittella* (Fab)

งานวิจัยทางด้านสารธรรมชาติจากพืชที่ผ่านมายังเป็นการศึกษาทางเลือกเท่านั้นยังไม่อาจนำไปใช้แทนสารเคมีที่มีความสะดวกในรูปแบบการนำไปใช้ได้ในไร่นาเพื่อการผลิตสินค้าเกษตรระดับอุตสาหกรรมได้ และเพื่อทดแทนสารเคมีเกษตรที่หาซื้อได้ง่าย และใช้ก็สะดวกจึงจำเป็นต้องมีการศึกษา การนำสมุนไพรที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลงมาทำการผลิต เช่น ผลิตสำเร็จรูปที่สะดวกในการหาซื้อได้ง่ายและใช้สะดวกดังเช่นเคมีเกษตรแต่ไม่มีพิษตกค้าง และสามารถใช้ควบคุมแลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาการนำเทคโนโลยีการผลิตระดับโรงงานมาใช้ในการผลิตสารสกัดจากพืชปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ผลิตสารตั้งต้นของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการผลิตสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น หางไหล และ หนอนตายหยาก เป็นต้น และเนื่องจากเทคโนโลยีการสกัดสารจากพืชไม่ค่อยแตกต่างกันมากนักทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตสารสกัดตั้งต้นของอุตสาหกรรมสารธรรมชาติอื่นๆ ได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งหยาบ (2 ตำแหน่ง) และละเอียด (4 ตำแหน่ง)
2. เครื่องบดตัวอย่าง ตู้อบตัวอย่าง เครื่องกวนตัวอย่าง
3. เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator)
4. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ที่มีตัวตรวจวัดชนิด Diode array (DAD)

5. เครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ
6. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ กรวยกรอง กรวยแยก บีกเกอร์ และอื่นๆ
7. สารทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เอทานอล เมทานอล ไดโครโรมีเทน ปิโตเลียมอีเทอร์ เป็นต้น
8. สิ่งทดลอง : หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก
9. อุปกรณ์การเลี้ยงสิ่งทดลอง

วิธีการ

1. วิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลหรือโล่ติ๊น ด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ กลุ่มวิจัย วัตถุมีพิษทางการเกษตร

1.1 การศึกษาการผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบหางไหลให้เป็นผลิตภัณฑ์ทำการผลิตสารสกัดหยาบหางไหลด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับต้นแบบในส่วนโรงงานของกลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติโดยนำสภาวะที่ศึกษาการสกัดหางไหลด้วยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่องระดับโรงงานต้นแบบ พรรณีกา (2549) ทำการผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบหางไหลที่ได้ให้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยผสมสารทำละลาย emulsifier ลงในสารสกัดหยาบหางไหลที่ผลิตได้จากเครื่องสกัดหางระดับโรงงานต้นแบบ โดยมีอัตราส่วนของสารสกัดหยาบหางไหลต่อส่วนผสมปรุงแต่งในอัตราที่เหมาสมคือ 27%, 31% และ 36% จากนั้นสังเกตการละลาย บันทึกผล นำตัวอย่างของผสมไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโรติโนนด้วยวิธี HPLC บันทึกและวิเคราะห์ผล

1.2 การศึกษาการคงสภาพของสารสำคัญโรติโนน ในผลิตภัณฑ์หางไหล ทำการทดลองโดยนำสูตรที่พัฒนาโดยการปรับค่าความเป็นกรด – ด่างได้เป็น 3 สูตร คือ สูตร ก 0 สูตร ก 2 และสูตร ก 45 ทำการทดสอบการคงสภาพของผลิตภัณฑ์โดยการใช้ความร้อนเป็นตัวเร่ง ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ผลิตภัณฑ์ 3 สูตร และการไม่อบ และอบที่ 54^{0}C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบการคงสภาพของสูตร วางแผนการทดลอง แบบ RCB 6 ซ้ำ 6 (3 x 2) วิธีการดังนี้ สูตร ก 0 ไม่อบ สูตร ก 0 อบ สูตร ก 2 ไม่อบ สูตร ก 2 อบสูตร ก 45, ไม่อบ สูตร ก 45 อบ เตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์หางไหลสูตร ก ปรับระดับความเป็นกรด – ด่าง 3 ระดับคือ 6.87, 6.44 และ 5.81 จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดดำเนินการตามวิธีการ สกัดและตรวจวิเคราะห์ปริมาณโรติโนน บันทึกข้อมูลปริมาณสารโรติโนน ก่อนและหลังอบ

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์หางไหลในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ผลิตผลิตภัณฑ์หางไหล ณ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

1.3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 และวัยที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธีดังนี้

1. ผลิตภัณฑ์หางไหล 1,400 ppm
2. ผลิตภัณฑ์หางไหล1,200 ppm
3. ผลิตภัณฑ์หางไหล 1,000 ppm
4. ผลิตภัณฑ์หางไหล 800 ppm
5. ผลิตภัณฑ์หางไหล 600 ppm
6. น้ำกลั่น

ดำเนินการทดลองโดย เตรียมผลิตภัณฑ์ตามกรรมวิธี ทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัยที่ 3 และด้วงหมัดผักตัวเต็มวัย จำนวนแมลง 10 ตัว ต่อซ้ำ อัตราการฉีดพ่น 200 ไมโครลิตรต่อตัว ตรวจนับจำนวนหนอนตายทุกวัน บันทึกผล

1.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลต่อหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ1.3.1) เปลี่ยนหนอนทดสอบ

2. วิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

2.1 ศึกษาการสกัดหนอนตายหยากด้วยเครื่องสกัดหางไหล ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องสกัดหางไหลเพื่อใช้ในการสกัดพืชหนอนตายหยากเก็บตัวอย่างพืชหนอนตายหยาก จากอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ชนิดรากอ้วน *(Stemona phyllantha* Gagnep) นำรากไปล้างน้ำให้สะอาด ทำให้แห้งโดยการหั่นเป็นชิ้นบางๆ แล้วผึ่งในที่ร่ม 7 – 11 วัน อบที่ 55°C 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปบดให้ละเอียด นำตัวอย่างที่เตรียมแล้วไปเข้าเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบโดยชั่งตัวอย่างจำนวน 5 กิโลกรัม ใส่ลงถังสกัดที่อยู่ในระบบสกัด ส่งตัวทำละลายเมทานอล จำนวน 60 ลิตร เข้าไปในถังสกัด กดปุ่มทำงานของเครื่อง จับเวลากวน 1 ชั่วโมง เปิดวาวล์และปั้มเพื่อส่งสารสกัดเมทานอลที่ได้ผ่านระบบกรอง ไปเก็บที่ถังเก็บ เพื่อรอส่งเข้าระบบลดปริมาตร ทำการสกัดสารด้วยเมทานอลจำนวน 60 ลิตร อีก 2 ครั้ง ทำนองเดียวกันจนถึงขั้นเก็บสารสกัดเมทานอลรวมกันในถังเก็บ เป็นการเสร็จสิ้นกระบวนการสกัด จากนั้นส่งสารสกัดในถังเก็บเข้าไปลดปริมาตร ทำการทดลองหาสภาวะในส่วนของการลดปริมาตร เมื่อได้ข้อมูลสภาวะแล้ว ทำการผลิตสารสกัดด้วยเครื่องหางไหลภายใต้สภาวะนั้น บันทึกข้อมูล ทำการผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบหนอนตายหยากให้เป็นผลิตภัณฑ์ โดยผสมสารทำละลาย, emulsifier ลงในสารสกัดหยาบหนอนตายหยากที่ผลิตได้จากเครื่องสกัดหางระดับโรงงานต้นแบบ โดยมีอัตราส่วนของสารสกัดหยาบหนอนตายหยากต่อส่วนผสมปรุงแต่งในอัตราที่เหมาะสมคือ 66%

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชหนอนตายหยาก และผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี คือ 1) สารสกัดหยาบ (45.6%) *Stemona aphylla* 2) สารสกัดหยาบ (39.7%) *Stemona aphylla* 3) สารสกัดหยาบ (51.6%) *Stemona phyllantha* 4) สารสกัดหยาบ (42.8%) *Stemona phyllantha* 5) ผลิตภัณฑ์ *Stemona aphylla* (66.7% สารสกัดหยาบ) 6) ผลิตภัณฑ์ *Stemona phyllantha* (66.7% สารสกัดหยาบ) 7) เอทธานอล 8) เมทธานอล 9) PG และ 10) น้ำกลั่น เตรียมสารทดลอง สำหรับกรรมวิธี ที่ 1 – 4 โดยเก็บตัวอย่างพืชหนอนตายหยาก จากอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี ราก ผอม *(Stemona aphylla* Craib) และ ราก อ้วน *(Stemona phyllantha* Gagnep) นำรากไปล้างน้ำให้สะอาด ทำให้แห้งให้แห้งโดยการหั่นเป็นชิ้นบางๆ แล้วผึ่งในที่ร่ม 7 – 11 วัน แล้วนำไปบดให้ละเอียด สกัดตัวอย่างรากหนอนตายหยาก 10 กรัม ด้วยสารทำละลายเมทธานอล ได้สารสกัดหยาบแล้วละลายด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร สำหรับกรรมวิธีที่ 5 – 6 สกัดสารสกัดหยาบด้วยเครื่องหางไหลผสมปรุงแต่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ นำสารทดลองที่ได้ไปผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน สาร 1 ต่อน้ำ 10 ส่วน เท่ากันทุกกรรมวิธี จากนั้นนำสารทดลองไปฉีดพ่นบนตัวหนอนกระทู้หอมด้วยอัตรา 200 ไมโครลิตรต่อตัว จำนวนหนอน 10 ตัวต่อซ้ำ ตรวจนับจำนวนหนอนตายทุกวัน บันทึกผล

3. วิจัยการสกัดว่านน้ำที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตด้วยระบบของเครื่องหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

3.1 สกัดและทดสอบประสิทธิภาพ ว่านน้ำ (7 – 8 เดือน) เหง้าอ่อนและใบ

3.1.1 เตรียมตัวอย่างสารสกัด แยกบดตัวอย่างเหง้า และใบ ว่านน้ำแห้งด้วยเครื่องบดลูกกลิ้ง (ได้ผง ละเอียด) สกัดตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด (เหง้า และใบ) ด้วยตัวทำละลาย 4 กรรมวิธี ดังนี้methanol, ethanol, dichloromethane, methanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether ดำเนินการสกัดตามกรรมวิธีที่สกัดด้วย methanol โดยชั่ง ตัวอย่างว่านน้ำที่บดละเอียด และหยาบ อย่างละ 50 กรัม สกัดด้วยmethanol 300 มิลลิลิตร ครั้งที่ 1 และ 200 มิลลิลิตร อีก 2 ครั้ง จากนั้นรวมสารสกัดทั้ง 3 ครั้ง ใส่ใน round bottom flask โดยผ่าน anhydrous sodium sulfate จากนั้นนำไปลดปริมาตรจนแห้ง ด้วย เครื่อง rotary evaporator สกัดด้วยอีก 2 วิธีการคือ ethanol และ dichloromethane ในทำนองเดียวกัน สำหรับวิธีการสกัดด้วย methanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether ขั้นแรกทำทำนองเดียวกันกับ 3 วิธีการข้างต้นโดยใช้ methanol หลังจากได้สารสกัดหยาบ methanol แห้งที่ชั่งน้ำหนักแล้ว เติม methanol ลงไป 60 มิลลิลิตร และน้ำประมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วไปทำ partitioning extract กับ petroleum ether 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นรวมสารสกัด petroleum ether ที่ได้ถ่ายใส่ใน round bottom flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยผ่าน anhydrous sodium sulfate จากนั้น นำไปลดปริมาตรจนแห้ง ด้วย เครื่อง rotary evaporator

3.1.2 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดว่านน้ำ ต่อหนอนใยผัก วัย 2

วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 11 กรรมวิธี ดังนี้ 1) การสกัด(เหง้า) ด้วย methanol 2) การสกัด (เหง้า) ด้วย ethanol 3) การสกัด(เหง้า) ด้วย dichloromethane 4) การสกัด(เหง้า) ด้วย methanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether 5) การสกัด (ใบ)ด้วย methanol 6) การสกัด (ใบ) ด้วย ethanol 7) การสกัด (ใบ) ด้วย dichloromethane 8) การสกัด(ใบ)ด้วย methanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether 9) Acetone 10) Petroleum ether และ 11) น้ำ ดำเนินการเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบตามกรรมวิธี ดังนี้ ละลาย methnol crude, ethanol crude และ dichloromethane crude ด้วย 50 มิลลิลิตร acetone ในขวด volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลาย petroleum ether crude ด้วย PE 50 มิลลิลิตร ในขวด volumetric flask 50 มิลลิลิตร เจือจาง เป็น 10 เท่าด้วยสารทำละลาย acetone และpetroleum ether จากนั้นนำไปทดสอบกับหนอนใยผัก วัย 2 ใช้วิธีการ Leaf dipping method โดยการจุ่มใบคะน้าในสารทดลอง ผึ่งใบคะน้าให้แห้ง จากนั้นนำไปใส่กล่องเลี้ยงหนอน ทำการปล่อยหนอนใยผักกล่องละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ 1 2 3 และ 4 วัน ตามลำดับ

3.2 สกัดทดสอบประสิทธิภาพ สารสกัดเหง้าว่านน้ำแก่ (13 - 14 เดือน)

3.2.1 เตรียมตัวอย่างสารสกัด ทำนองเดียวกับข้อ 3.1.1 โดยสกัดเฉพาะ เหง้า เท่านั้น

3.2.2 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดเหง้าว่านน้ำ ต่อหนอนใยผัก วัย 2 วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

1. การสกัดด้วย methanol
2. การสกัดด้วย ethanol
3. การสกัดด้วย dichloromethane
4. การสกัดด้วย methanol และ partition ต่อ ด้วย petroleum ether

5. acetone

6. petroleum ether

7. น้ำ

ดำเนินการเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบตามกรรมวิธี ดังนี้

ละลาย methnol crude, ethanol crude และ dichloromethane crude ด้วย 50 ml acetone ในขวด volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลาย petroleum ether crude ด้วย PE 50 มิลลิลิตร ในขวด volumetric flask 50 มิลลิลิตร เจือจาง เป็น 10 เท่าด้วยสารทำละลาย acetone และ petroleum ether จากนั้นนำไปทดสอบกับหนอนใยผัก วัย 2 ใช้วิธีการ Leaf dipping method โดยการจุ่มใบคะน้าในสารทดลอง ผึ่งใบคะน้าให้แห้ง จากนั้นนำไปใส่กล่องเลี้ยงหนอน ทำการปล่อยหนอนใยผักกล่องละ 10 ตัว บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ 1 2 3 และ 4 วัน ตามลำดับ

ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2553

สถานที่ทำการทดลอง - ห้องปฏิบัติการและในส่วนโรงงานของกลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏ และสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. วิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลหรือโล่ติ๊น ด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

1.1 การศึกษาการผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบหางไหลให้เป็นผลิตภัณฑ์ ผลจากการทดลองผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบให้เป็นผลิตภัณฑ์จากสูตรต่างๆ พบว่าสูตรที่มีอัตราส่วนของสารสกัดหยาบกับส่วนผสมอื่นๆ จำนวน 3 อัตราส่วน คือ 27%, 31% และ 36% เป็นสูตรที่เป็นไปได้โดยพบว่าทั้ง 3 สูตรมีปริมาณสารสำคัญโรติโนนเท่ากับ 4.7%, 5.1% และ 5.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สรุปว่าอัตราส่วนของสารสกัดหยาบที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 27 – 36% โดยทำให้ผลิตภัณฑ์มีสารโรติโนนอยู่ระหว่าง 4 – 5% และมีการละลายที่ดี

1.2 การศึกษาการคงสภาพของสาระสำคัญในผลิตภัณฑ์หางไหล ผลการศึกษาการคงสภาพโดยการใช้ความร้อนเป็นตัวเร่ง ของผลิตภัณฑ์จำนวน 3 สูตร คือ สูตร ก 0 สูตร ก 2 และสูตร ก 45 (ตารางที่ 2) พบว่าสูตร ก 45 ที่มีค่าความเป็นกรดสูงกว่าสูตรอื่นๆ หลังอบที่อุณหภูมิ 54°C นาน 2 สัปดาห์ ปริมาณสารโรติโนนลดลงน้อยที่สุดคือ 3.84% แตกต่างกับสูตร ก 0 และสูตร ก 2 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์คงเหลือหลังอบสูง 92.53% แตกต่างกับอีก 2 สูตรคือ ก 0 และ ก 2 ที่คงเหลือ 47.76% และ 54.69% ตามลำดับ

1.3 ศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์หางไหลในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

1.3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลต่อหนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 และวัยที่ 3 (ตารางที่ 3) พบว่า ผลิตภัณฑ์หางไหลทุกความเข้มข้น ทำให้หนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 ตายไม่แตกต่างกันแต่แตกต่างกับน้ำกลั่น โดยทำให้ตายตั้งแต่ 61.39 – 92.50% และผลิตภัณฑ์หางไหลที่ความเข้มข้น 1,000 1,200 และ 1,400 ppm ทำให้หนอนวัยที่ 3 ตายสูงกว่าที่ความเข้มข้น 600 และ 800 ppm

1.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลต่อหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 (ตารางที่ 4) พบว่า ผลิตภัณฑ์หางไหลเข้มข้น 1,400 1,200 1,000 ทำให้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 ตาย 87.5 – 90.00% และที่ความเข้มข้น 800 ppm ทำให้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 ตาย 82.50% สำหรับการทดสอบกับหนอนวัยที่ 2 ผลพบว่า ผลิตภัณฑ์หางไหลเข้มข้น 1,400 1,200 1,000 ทำให้หนอนตายสูงไม่แตกต่างกัน 72.5 – 85.00% ผลจากการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 พบว่าความเข้มข้น 1,400 ppm ทำให้หนอนตาย สูงสุด 72.50% ที่ความเข้มข้น 800 – 1,200 ppm ทำให้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ตาย 57.50-60.00%

2. วิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

2.1 ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องสกัดหางไหลเพื่อใช้ในการสกัดพืชหนอนตายหยาก พบว่าที่ความดันภายในเท่ากับ – 0.5 bar – gauge และอุณหภูมิภายในที่ 42 – 50°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาตรสารสกัดในระบบสุญญากาศ ผลการผลิตสารสกัดหยาบหนอนตายหยากจำนวน 5 รุ่น พบว่าความชื้นของวัตถุดิบมีผลต่อการสกัดของเครื่อง โดยความชื้นมากกว่า 10% ทำให้ได้สารสกัดหยาบไม่เป็นเนื้อเดียวกันคือเป็นทั้งของเหนียวและของเหลว แต่ถ้าความชื้นต่ำกว่า 10% จะได้เฉพาะของเหนียวเท่านั้น (ตารางที่ 5) สารสกัดหยาบที่ได้เมื่อนำมาผสมปรุงแต่งให้เป็นผลิตภัณฑ์พบว่าสารสกัดหยาบหนอนตายหยากต่อส่วนผสมปรุงแต่งในอัตราที่เหมาะสมคือ 66 %

2.2 ผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดพืชหนอนตายหยาก 2 ชนิด ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก (ตารางที่ 6) พบว่า ผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* ทำให้หนอนกระทู้หอมวัย 3 ตาย 63.61% มากกว่า และแตกต่างจากผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona aphylla* และสารสกัดหยาบของหนอนตายหยากทั้ง 2 สายพันธุ์ และสารทำละลายเปรียบเทียบ สำหรับการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักวัย 1 (ตารางที่ 7) พบว่าผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* และผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona aphylla* ทำให้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 ตาย 95% ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากสารละลายเมทานอล แต่แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ

3. วิจัยการสกัดว่านน้ำที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตด้วยระบบของเครื่องหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

3.1 สกัดและทดสอบประสิทธิภาพว่านน้ำ (7 – 8 เดือน) เหง้าอ่อนและใบ ผลการสกัดและทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผักวัย 2 (ตารางที่ 8) พบว่าค่า Corrected% Mortality ของวิธีการสกัดใบสด อายุ 7 – 8 เดือน ด้วยmethanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether ทำให้หนอนตายสูงสุด 75% รองลงมาเป็นการสกัดใบด้วย dichloromethane การสกัดเหง้าด้วย methanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether และการสกัดเหง้าด้วย dichloromethane ทำให้หนอนตาย 33.3, 31.23 และ 30.00% ตามลำดับ

3.2 สกัดทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดเหง้าว่านน้ำแก่ (13 – 14 เดือน) ผลการสกัดและทดสอบประสิทธิภาพต่อหนอนใยผัก วัย 2 (ตารางที่ 9) พบว่าค่า Corrected% Mortality ของวิธีการสกัดเหง้าแก่ อายุ 13 – 14 เดือนด้วย ethanol ทำให้หนอนตายสูงสุด 70.97% รองลงมาเป็นการสกัดใบด้วย dichloromethane และการสกัดเหง้าด้วย methanol และ partition ต่อด้วย petroleum ether ทำให้หนอนตาย 54.84 และ 41.67% ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. วิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หางไหลหรือโล่ติ๊น ด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

สูตรผลิตภัณฑ์หางไหลที่ได้จากการผสมปรุงแต่งสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเครื่องหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ มีอัตราส่วนของสารสกัดหยาบต่อส่วนผสมปรุงแต่งที่เหมาะสมอยู่ที่ 27 – 36% โดยทำให้ผลิตภัณฑ์มีสารสำคัญโรติโนนอยู่ระหว่าง 4 – 5% และมีการผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คงสภาพได้ดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรดเมื่อถูกเร่งด้วยความร้อนที่ 54°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าสูตร ก45 (pH 5.8) มีปริมาณสารโรติโนนคงเหลือ 92.53% ผลการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการพบว่า ผลิตภัณฑ์หางไหลทำให้แมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหนอนกระทู้หอม วัยที่ 2 และวัยที่ 3 ตายได้หลังพ่นสาร 48 ชั่วโมง และทำให้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และวัยที่ 3 ตายหลังพ่นสาร 72 ชั่วโมง

2. วิจัยการผลิตผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

การสกัดหนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep ด้วยเครื่องสกัดหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ หนอนตายหยากบดแห้ง ความชื้นต่ำกว่า 10% จำนวน 5 กิโลกรัม จะได้สารสกัดหยาบเหลวเหนียว เฉลี่ย 1.8 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย total alkaloid 7.98% สภาวะที่ใช้ในการลดปริมาตรของเครื่องคือความดันภายในเท่ากับ – 0.5 bar – gauge และอุณหภูมิภายในที่ 42 – 50°C ได้สูตรผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก *Stemona phyllantha* Gagnep ที่มีอัตราส่วนสารสกัดหนอนตายหยากต่อส่วนผสมปรุงแต่ง คือ 66% โดยพบว่ามีประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้หอมวัยที่ 3 ตายได้หลังพ่นสาร 24 ชั่วโมง และทำให้หนอนกระทู้ผักตายหลังพ่นสาร 24 ชั่วโมง ควรมีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์สำคัญใน *Stemona phyllantha* Gagnep โดยวิธี colum chromatography ต่อไปเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์หนอนตายหยากชนิดนี้เพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

3. วิจัยการสกัดที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตด้วยระบบของเครื่องหางไหลระดับโรงงานต้นแบบ

เป็นการทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาการสกัดสารจากว่านน้ำเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้วิธีการสกัดที่สามารถใช้ได้กับเครื่องสกัดหางไหลต้นแบบ ผลได้แนวทางการสกัดว่านน้ำเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องสกัดหางไหล โดยมีสารทำละลายที่เหมาะสม คือ เอทธานอล และ dichloromethane

เอกสารอ้างอิง

เทพ เชียงทอง และ วิจิตรา ภัคเกษม. 2520 สารประกอบเคมีบางอย่างที่มีในรากหนอนตายหยาก **ว.วิทยาศาสตร์** 31 **(11)** : 33 – 34.

พรรณีกา อัตตนนท์. 2549. วิจัยเครื่องสกัดหางไหล (*Derris elliptica* Benth.) แบบต่อเนื่องระดับโรงงาน ต้นแบบ. **ว.วิชาการเกษตร. 24** : 198 – 210.

มงคล แก้วเทพ. 2547. ว่านน้ำสมุนไพรฆ่าแมลง จุลสารข้อมูลสมุนไพร 21 (4) : 8 – 11.

วินัย ปิติยนต์ และอารมย์ แสงวนิชย์. 2540. การศึกษาสารสกัดจากหางไหล เพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ในรายงานการประชุมวิชาการกองวัตถุมีพิษการเกษตร 2540 วันที่ 8 – 10 กรกฎาคม 2540 ณ โรงแรม เฟสิกซ์ เวอร์แคล จังหวัดกาญจนบุรี หน้า 84 – 92.

วีรวิทย์ วิทยารักษ์. 2541. ข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาการใช้สารสกัดโล่ติ๊นในแปลงปลูกมะเขือเปราะ. ที่ศูนย์วิจัยพืช สวนพิจิตร กรมวิชาการเกษตร.

วีระพล จันทร์สวรรค์, สถาพร จิตตปาลพงศ์ และนงนุช จันทรราช. 2536. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากหนอนตายหยาก ต่อเห็บโค **ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 27**: 336-340.

สุภาณี พิมพ์สมาน และยนต์ สุตะภักดี. 2546. การใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นในพื้นที่โคกภูตากา ในการควบคุมแมลง. รายงานวิจัยคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

อารมย์ แสงวนิชย์, ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารี, เศรษฐพงศ์ เลขะวัฒนะ และทวีพงษ์ สุวรรณ, 2537. สมุนไพรพื้นบ้านเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช. หน้า 16 – 17.

Areekul, S. Sinchaisri, P. and S. Tigvatananon, 2531. Effect of Thai Plant Extracts on Oriental Fruit Fly II Repellency Test *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 22: 56 – 61.

Thacker, J. R. M., 2009. “An Introduction to Arthropod Pest Control” Dept. of Biological Science, University of Paisley, UK, available on http: //assets.cambridge.org/97805215/61068/sample/978052156068

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์โรติโนนและการละลายของสารสกัดหยาบ

อัตราส่วนสารสกัดหยาบ	การละลาย	ปริมาณสารโรติโนน (%)
27%	ดีมากไม่มีการแยกชั้น	4.7
31%	ดีเป็นเนื้อเดียวกัน สีน้ำตาลเข้ม ตั้งทิ้งไว้จะเห็นตะกอนละเอียด (เมื่อเขย่าก็จะเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง)	5.1
36%	ดี เขย่าแล้วเป็นเนื้อเดียวกันมีตะกอนเล็กน้อย ของผสมมีสีน้ำตาลเข้ม	5.5

ตารางที่ 2. เปอร์เซ็นต์ของสารโรติโนนในสูตรก่อนอบและหลังอบ

สูตร	pH	ปริมาณสารโรติโนน (%)		ค่าแตกต่าง[2/]
		ก่อนอบ[1/]	หลังอบ 54^{0}C , 14 วัน[1/]	
ก 0	6.87	4.25 a	2.03 b	2.22**
ก 2	6.44	3.84 b	2.10 b	1.75**
ก 45	5.81	4.15 a	3.84 a	0.31**

CV = 5.3%

[1/]ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

[2/] ** แตกต่างกันโดยเทียบกับ LSD .01

ตารางที่ 3. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม วัยที่ 2 และวัยที่ 3 ต่อผลิตภัณฑ์หางไหล

กรรมวิธี	% การตายหนอนหลังพ่น 48 ชั่วโมง	
	หนอนวัยที่ 2	หนอนวัยที่ 3
ผลิตภัณฑ์หางไหล 1,400 ppm	92.50 a	74.72 a
ผลิตภัณฑ์หางไหล 1,200 ppm	81.94 a	66.67 a
ผลิตภัณฑ์หางไหล 1,000 ppm	71.67 a	63.06 a
ผลิตภัณฑ์หางไหล 800 ppm	67.22 a	30.00 b
ผลิตภัณฑ์หางไหล 600 ppm	61.39 a	22.78 bc
น้ำกลั่น	0.00 b	0.00 c
cv (%)	35	41.8

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 1, 2 และ 3 ต่อผลิตภัณฑ์หางไหล

กรรมวิธี	% การตายหนอนหลังพ่น 72 ชั่วโมง		
	หนอนวัยที่1	หนอนวัยที่ 2	หนอนวัยที่ 3
ผลิตภัณฑ์หางไหล 1400 ppm	90.00 a	85.00 a	72.50 a
ผลิตภัณฑ์หางไหล 1200 ppm	87.50 a	77.50 ab	60.00 ab
ผลิตภัณฑ์หางไหล 1000 ppm	87.50 a	72.50 ab	57.50 ab
ผลิตภัณฑ์หางไหล 800 ppm	82.50 ab	67.50 b	57.50 ab
ผลิตภัณฑ์หางไหล 600 ppm	50.00 b	40.00 c	40.00 b
น้ำกลั่น	0.00 c	0.00 d	0.00 c
CV (%)	33	15	34.9

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 5. ผลผลิตของสารสกัดหยาบหนอนตายหยาก ที่ผลิตจากเครื่องสกัดหางไหลต้นแบบ

รุ่นผลิต	ความชื้นราก หนอนตายหยากบด (%)	นน. รากหนอน ตายหยากบด (กก.)	ผลผลิตสารสกัดหยาบของเหนียว		% total alkaloid ในผลิตภัณฑ์ (formulate)
			จำนวน (กรัม)	% total alkaloid	
1	9.76	5	1,800	8.94	3.24
2	11.77	5	2,600	5.52	2.03
3	9.66	5	1,800	7.16	3.30
4	17.3	5	1,900 1,500 (น้ำดำใส มล.)	8.04	2.97
5	5.47	5	1,800	7.75	3.18

ตารางที่ 6. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอม วัย 3 ต่อสารสกัดหนอนตายหยาก

กรรมวิธี	นน. รากหนอน ตายหยาก	% สารสกัด หยาบเมทธานอล (สารทำละลาย)	อัตราการผสม น้ำใช้ทดสอบ	% การตายของหนอน หลังพ่นสาร 24 ชม.
1.สารสกัดหยาบ *Stemona aphylla*	10	45.6(ethanol)	1:10	2.50 c
2.สารสกัดหยาบ *Stemona aphylla*	10	39.7(ethanol)	1:10	2.50 c
3.สารสกัดหยาบ *Stemona phyllantha*	10	51.6(ethanol)	1:10	0.00 c
4.สารสกัดหยาบ *Stemona phyllantha*	10	42.8(ethanol)	1:10	25.56 b
5.ผลิตภัณฑ์ *Stemona aphylla*	-	66.7 (สูตร)	1:10	20.00 b
6.ผลิตภัณฑ์ *Stemona phyllantha*	-	66.7 (สูตร)	1:10	63.61 a
7.เอทธานอล	-	-	1:10	0.00 c
8.เมทธานอล	-	-	1:10	2.50 c
9.PG	-	-	1:10	0.00 c
10.น้ำกลั่น	-	-	-	0.00 c

CV =91.2%

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 7. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก วัย 1 ต่อสารสกัด และผลิตภัณฑ์หนอนตายหยาก

กรรมวิธี	น.น. หนอนตายหยาก	% สารสกัดหยาบเมทธานอล(mixer)	อัตราการผสมน้ำใช้ทดสอบ	% การตายของหนอนหลังพ่นสาร 24 ชม.
1.สารสกัดหยาบ *Stemona aphylla*	10	45.6(ethanol)	1:10	2.50 c
2.สารสกัดหยาบ *Stemona aphylla*	10	39.7(ethanol)	1:10	10.00 c
3.สารสกัดหยาบ *Stemona phyllantha*	10	51.6(ethanol)	1:10	12.50 c
4.สารสกัดหยาบ *Stemona phyllantha*	10	42.8(ethanol)	1:10	47.50 b
5.ผลิตภัณฑ์ *Stemona aphylla*	-	66.7 (สูตร)	1:10	95.00 a
6.ผลิตภัณฑ์ *Stemona phyllantha*	-	66.7 (สูตร)	1:10	95.00 a
7.เอทธานอล	-	-	1:10	5.00 c
8.เมทธานอล	-	-	1:10	100.00 a
9.PG	-	-	1:10	0.00 c
10.น้ำกลั่น	-	-	-	0.00 c

CV =40.8%

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ต่อสารสกัดว่านน้ำ เหง้าและใบ อ่อน (7 - 8 เดือน)

กรรมวิธี	น้ำหนักแห้งบด (กรัม)	น.น. crude (กรัม)	% crude in testing soln (10% ว่านน้ำ)	ค่าเฉลี่ย % Mortarity	Corrected %Mortality
การสกัด (เหง้า) ด้วยmethanol	50	11.042	2.28	20.00 cd	20.00
การสกัด (เหง้า) ด้วย ethanol	50	4.22	0.84	23.33 cd	23.33
การสกัด (เหง้า) ด้วย dichloromethane	50	1.29	0.26	30.00 bcd	30.00
การสกัด (เหง้า) ด้วยmethanol และpartition ต่อ ด้วย petroleum ether	50	1.37	0.27	63.33 ab	31.23
การสกัด (ใบ) ด้วยmethanol	50	6.12	1.22	10.00 cd	10.00
การสกัด (ใบ) ด้วย ethanol	50	3.45	0.69	13.33 cd	13.33
การสกัด(ใบ) ด้วย dichloromethane	50	1.00	0.20	33.33 bcd	33.33
การสกัด (ใบ) ด้วยmethanol และpartition ต่อ ด้วยpetroleum ether	50	0.75	0.15	86.67 a	75.00
acetone				0.00 d	-
petroleum ether				46.67 bc	-
น้ำ				0.00 d	-

CV= 65.8%

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 9. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนใยผัก ต่อสารสกัดว่านน้ำ เหง้าแก่ (13 - 14 เดือน)

กรรมวิธี	น้ำหนักแห้งบด (กรัม)	น.น. crude (กรัม)	%crude in testing soln (10% ว่านน้ำ)	ค่าเฉลี่ย % Mortarity	Corrected % Mortality
การสกัด(เหง้า)ด้วยmethanol	50	4.60	0.92	50.00 b	35.48
การสกัด(เหง้า)ด้วย ethanol	50	2.09	0.42	77.50 a	70.97
การสกัด(เหง้า)ด้วยdichloromethane	50	2.14	0.43	65.00 ab	54.84
การสกัด(เหง้า) ด้วยmethanol และpartition ต่อ ด้วยpetroleum ether	50	2.20	0.44	82.50 a	41.67
acetone				22.50 c	-
petroleum ether				70.00 ab	-
น้ำ				10.00 c	-

CV= 30.6%

ตัวเลขที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ Atrazine, Ametryn, Alachlor และ 2,4-D Dimethyl ammonium

จิราพรรณ ทองหยอด จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม มนัสนันท์ อรชุน ทัศนี จงกลาง นพพร ถนอมวงษ์

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาการตรวจติดตามคุณภาพสารป้องกันและกำจัดวัชพืชตามท้องตลาดภาคกลาง 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี โดยเก็บ ตัวอย่าง atrazine (8% WP, 90% WG) ametryn (80% WP, 80% WG) alachlor 48% W/V EC และ 2,4 – D dimethyl ammonium (84, 82.1, 72 %W/V SL) จำนวน 242 ตัวอย่าง ทำการศึกษาคุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณสารออกฤทธิ์ ซึ่ง atrazine ametryn และ alachlor วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC – FID และ 2,4 – D dimethyl ammonium วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC – VWD จากนั้นทำการศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ การทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น และค่าพีเอช ซึ่ง alachlor ทำการทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น ตามวิธีทดสอบ MT 36.3 สำหรับ 2,4 – D dimethyl ammonium วิเคราะห์ค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH meter ผลการวิเคราะห์พบว่า ตัวอย่างผ่านมาตรฐาน จำนวน 223 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.1% และตัวอย่างผิดมาตรฐาน จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.90% ตัวอย่าง ที่พบว่าผิดมาตรฐานมากที่สุด คือ 2,4 – D dimethyl ammonium

คำนำ

สารป้องกันและกำจัดวัชพืช (Herbicides) เป็นสารที่มีการใช้อย่างกว้างขวางทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ใช้ทำลายพืชที่ไม่ต้องการในพื้นที่รกร้างหรือควบคุมวัชพืชในการเกษตร มีทั้งชนิดเลือกทำลายและไม่เลือกทำลาย สำหรับประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าอาทราซีน อามีทรีน อะลาคลอร์ เป็นอันดับที่ 3, 4 และ 5 ของการนำเข้าวัตถุอันตรายการเกษตร 10 อันดับปี 2553 (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2553)

อาทราซีน (atrazine) จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี 1,3,5 – Triazine มีสูตรผสม 2 สูตร ที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด ได้แก่ 80%WP (Wettable Powder) และ 90% WG (Water Dispersion Granule) ใช้ก่อนวัชพืชงอก (pre – emergence) และหลังวัชพืชงอกในระยะเริ่มต้น (early post – emergence) ในไร่อ้อย ข้าวโพด สับปะรด กำจัดหญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู หญ้าปากควาย ผักเบี้ยหิน ผักเบี้ยใหญ่ ผักโขม ผักโขมหนาม สาบแร้งสาบกา

อามีทรีน (ametryn) จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี 1, 3, 5 – Triazine มีสูตรผสม 2 สูตร ที่วางจำหน่ายตามท้องตลาด ได้แก่ 80% WP (Wettable Powder) และ 80% WG (Water Dispersion Granule) เป็นสารกำจัดวัชพืช

ประเภทดูดซึม (systemic) กำจัดวัชพืชใบแคบและใบกว้างในไร่อ้อย สับปะรด ชา กาแฟ เช่น หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา ผักเบี้ยหิน สาบแร้งสาบกา ใช้กำจัดวัชพืชหลังงอก

อะลาคลอร์ (alachlor) จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี Chloroacetanillide มีสูตรผสม 48% W/V EC (Emulsiable Concentrate) ใช้กำจัดวัชพืชก่อนงอกในพืชไร่และพืชผัก เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว หอม กระเทียม พริก มะเขือเทศ กำจัดวัชพืชใบแคบ เช่น หญ้าตีนนก หญ้าปากควาย หญ้าดอกขาว หญ้าสีชมพู ประเภทใบกว้าง เช่น ผักโขม ผักโขมหนาม ผักเบี้ยใหญ่

2,4 – ดี ไดเมทิล แอมโมเนียม (2,4 – D dimethyl ammonium) จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี Aryloxy alkanoic acid มีสูตรผสม 84% W/V SL (Soluble Concentrate) จัดเป็นชนิดเลือกทำลายมีฤทธิ์ทำลายเฉพาะพืชใบกว้าง เช่น ผักปราบ เทียนนา ผักปู่ง ผักเบี้ย ประเภทกก เช่น กกขนาก แห้วหมู ในนาข้าว อ้อย ข้าวโพด ใช้กำจัดหลังวัชพืชงอก

นอกจากสารป้องกันและกำจัดวัชพืชข้างต้น ยังมีสารชนิดอื่นอีกที่นิยมใช้ อาทิเช่น พาราควอต ไกลโฟเซต และไดยูรอน เป็นต้น เกษตรกรสามารถใช้สารได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถ้าใช้ตรงตามคุณสมบัติของสารชนิดนั้น ดังนั้น กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร มุ่งหวังให้เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์อย่างมีคุณภาพตรงตามฉลากระบุ จึงทำการสุ่มเก็บตัวอย่างตามท้องตลาดตรวจสอบคุณภาพ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับทางสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ทราบสถิติของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐานเพื่อเฝ้าระวังต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจจับชนิดเฟลมไอออไนเซชัน ดีเทคเตอร์ (flame ionization detector) ประกอบด้วย capillary คอลัมน์ HP – 5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)

2. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) มีตัวตรวจจับชนิด variable wavelength ประกอบด้วยคอลัมน์ Lichroshers 100 RP – 18e, 5 µm (250 mm x 4.6 mm)

3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยมตำแหน่ง 4 (± 0.1 มิลลิกรัม)

4. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)

5. Ultrasonic bath

6. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 และ 100 มิลลิลิตร (class A) กระบอกตวงที่มีจุกปิดขนาด 100 มิลลิลิตร และปิเปต (pipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร และบีกเกอร์ (beaker)

7. ชุดกรองสารละลายตัวอย่าง พร้อมเซลลูโลสเมมเบรน ขนาด 0.20 ไมโครเมตร

8. สารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง ได้แก่ atrazine ametryn alachlor และ 2,4 – D dimethyl ammonium

9. ผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง ได้แก่ atrazine (80% WP, 90% WG) Ametryn (80% WP, 80% WG) alachlor 48% W/V EC และ 2,4-D dimethyl ammonium (84, 82.1, 72% W/V SL)

10. อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile : HPLC grade) อะซิโตน (acetone : AR grade) กรดอะซิติก แอซิค (acetic acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid : HCL) สารละลายแอมโมเนีย (ammonia solution) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide : NaOH)

11. Standard Water D, น้ำปราศจากไอออนและน้ำกลั่น (distilled water)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างของสารป้องกันและกำจัดวัชพืช รวมทั้งสิ้น 242 ตัวอย่าง มีรายละเอียดดังนี้

1.1 atrazine เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 66 ตัวอย่าง

1.2 ametryn เก็บตัวอย่างจากจังหวัดลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 56 ตัวอย่าง

1.3 alachlor เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 58 ตัวอย่าง

1.4 2,4 – D dimethyl ammonium เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 62 ตัวอย่าง

2. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณสารออกฤทธิ์

2.1 ปริมาณสารออกฤทธิ์ atrazine ametryn และ alachlor ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค GC – FID โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่งสารมาตรฐานให้มีเนื้อสาร 25 ± 5 มิลลิกรัมจำนวน 2 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath 5 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ชั่งผลิตภัณฑ์ตัวอย่างแต่ละชนิด ให้มีเนื้อสารของสารออกฤทธิ์ 25 ± 5 มิลลิกรัม จำนวน 3 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath 5 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.1.3 การเตรียมสภาวะเครื่อง GC มีตัวตรวจจับชนิด FID ซึ่งการจุดเปลวไฟใช้อัตราส่วนดังนี้ : ก๊าซจุดเปลวไฟ H_2 อัตราการไหล 40.0 มิลลิลิตรต่อนาที AIR อัตราการไหล 450.0 มิลลิลิตรต่อนาที ก๊าซ make up N_2 อัตราการไหล 45.0 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับการปรับสภาวะเครื่องของสารแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. สภาวะเครื่อง GC – FID ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์

ชนิดของสาร	การปรับสภาวะเครื่อง					
	Oven (˚C)	Injector (˚C)	Detector (˚C)	Split ratio	Flow of He (ml/min)	Inj.vol. (µl)
atrazine	210	250	250	50:1	2	1
ametryn	210	250	250	100:1	2	1
alachlor	240	260	260	100:1	2	1

2.1.4 เกณฑ์กำหนดตาม FAO - Specifications แสดงดังตารางที่ 2

เกณฑ์กำหนดปริมาณสารออกฤทธิ์						
atrazine		ametryn	alachlor	2,4 – D dimethyl ammonium		
80 % WP (%W/W)	90% WG (%W/W)	80 % WP, 80%WG (%W/W)	48% W/V EC	84% W/V SL	82.1% W/V SL	72% W/V SL
78-84	88-94	78-84	45.6-50.4	81.5-86.5	79.6-84.6	69.5-74.5

2.2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ 2,4 – D dimethyl ammonium ที่ความเข้มข้น 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยเทคนิค HPLC โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่งสารมาตรฐานให้มีเนื้อสาร 10 ± 2 มิลลิกรัม จำนวน 2 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath 5 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol

2.2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง ชั่งผลิตภัณฑ์ตัวอย่างแต่ละชนิด ให้มีเนื้อสารของสารออกฤทธิ์ 10 ± 2 มิลลิกรัม จำนวน 3 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath 5 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol

2.2.3 การเตรียมสภาวะเครื่อง HPLC มีตัวตรวจจับชนิด VWD ดังนี้

Column Lichroshers	100 RP-18e (250 mm x 4.6 mm)
Mobile phase acetonitrile	: 0.5% acetic acid (60:40)
Wavelength	280 นาโนเมตร
Flow rate	1 มิลลิลิตรต่อนาที
Column Oven	40 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ การทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น และค่าพีเอช ซึ่งการทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น เป็นพารามิเตอร์สำคัญของสูตร EC และ ค่าพีเอช เป็นพารามิเตอร์สำคัญของสูตร SL โดยดำเนินการการทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพกับผลิตภัณฑ์ Alachlor 48% W/V EC และวัดค่าพีเอชกับผลิตภัณฑ์ 2,4 – D dimethyl ammonium 84% W/V SL

3.1 การทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 การเตรียม Standard Water D (ความกระด้าง 342 ppm, Ca : Mg 80 : 20) ดำเนินการตามวิธี MT 18 CIPAC F

ก. การเตรียม Solution A (0.04 M calcium ion solution)

ชั่ง calcium carbonate 4.0 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำกลั่นไว้เล็กน้อย ค่อยๆ หยด HCL 1.0N ปริมาตร 82 มิลลิลิตร จน calcium carbonate ละลายหมด เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายต้มไล่คาร์บอนไดออกไซด์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม methyl red 2 – 3 หยด ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายแอมโมเนีย จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม ให้เติมสารละลายแอมโมเนีย อีก 2 หยด จากนั้นเทสารละลายที่เป็นกลางลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ข. การเตรียม Solution B (0.04 M magnesium ion solution)

ชั่ง magnesium oxide 1.613 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำกลั่นไว้เล็กน้อย ค่อยๆ หยด HCL 1.0N ปริมาตร 82 มิลลิลิตร ค่อยๆ อุ่นจน magnesium oxide ละลายหมด เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร นำสารละลายต้มไล่คาร์บอนไดออกไซด์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม methyl red 2 – 3 หยด ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายแอมโมเนีย จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม ให้เติมสารละลายแอมโมเนีย อีก 2 หยด จากนั้นเทสารละลายที่เป็นกลางลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ค. การเตรียม Standard Water D

ปิเปต Solution A ปริมาตร 68 มิลลิลิตร และ Solution B ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร วัด pH ให้อยู่ในช่วง 6 – 7 ด้วย NaOH 0.1 N เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.1.2 การทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น (MT 36.3 CIPAC K) โดยปิเปตสารตัวอย่าง (คำนวณปริมาณตัวอย่างที่ใช้ ตามอัตราการใช้สูงสุดของผลิตภัณฑ์ต่อ Standard Water D ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ลงในกระบอกตวงที่เติม Standard Water D ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ปิดจุกพลิกกระบอกตวงกลับไปมา จำนวน 10 รอบ ซึ่งแต่ละครั้งที่พลิกให้พักเป็นเวลา 2 วินาที จากนั้นนำกระบอกตวงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการณ์เกิดครีม น้ำมัน และตะกอน ที่ 0.0 0.5 และ 2.0 ชั่วโมง ที่ 24 ชั่วโมง ทำการพลิกกระบอกตวงกลับไปมาอีกครั้ง จำนวน 10 รอบ สังเกตการณ์เกิดครีม น้ำมัน และตะกอน ที่ 24.5 ชั่วโมง มีเกณฑ์กำหนดตาม FAO – Specifications of Alachlor/EC (1992) ดังนี้

ที่ 0.0 ชั่วโมง สารละลายเป็นอิมัลชั่นทั้งหมด

ที่ 0.5 ชั่วโมง สารละลายเกิดครีม ไม่เกิน 2 มิลลิลิตร

ที่ 2.0 ชั่วโมง สารละลายเกิดครีม ไม่เกิน 4 มิลลิลิตร และไม่มีน้ำมันแยกชั้น

ที่ 24 ชม. สารละลายคืนอิมัลชั่นทั้งหมด

ที่ 24.5 ชั่วโมง สารละลายเกิดครีม ไม่เกิน 4 มิลลิลิตร และมีน้ำมันไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตร

3.2 วัดค่าพีเอช (MT 75.3 CIPAC J) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง pH – meter โดยทำการสอบเทียบ (calibrate) เครื่องด้วยสารละลายมาตรฐานบัฟเฟอร์ pH 4 และ 7 ก่อนทำการวิเคราะห์ และวัดพีเอชกับตัวอย่างโดยตรง มีเกณฑ์กำหนดอยู่ในช่วง 4.5 – 7.5

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

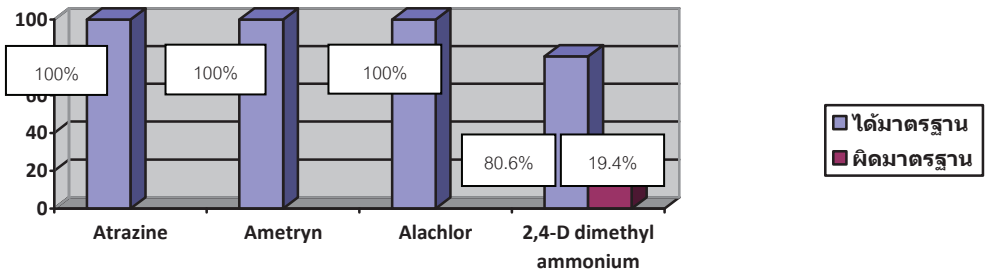
สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารออกฤทธิ์ atrazine (80% WP, 90% WG) และ ametryn (80% WP, 80% WG) ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 122 ตัวอย่าง พบว่า จำนวนตัวอย่างทั้งหมดผ่านมาตรฐาน (คิดเป็น 100%)

alachlor 48% W/V EC เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 58 ตัวอย่างพบว่าจำนวนตัวอย่างทั้งหมดผ่านมาตรฐาน (คิดเป็น 100%)

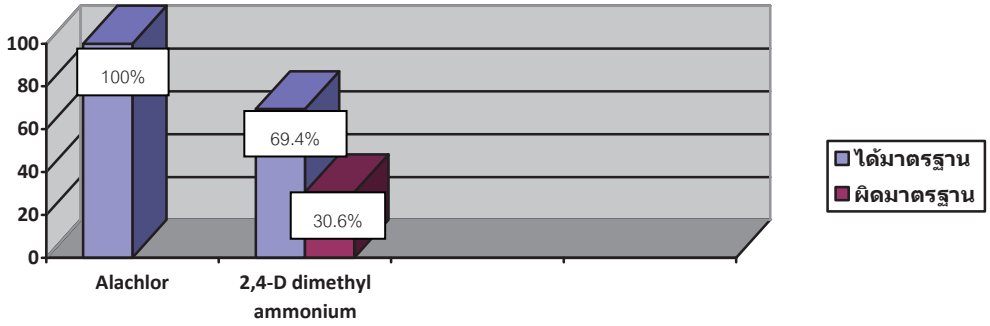
สำหรับ 2,4 – D dimethyl ammonium เก็บตัวอย่างจากจังหวัดพิจิตร นครสวรรค์ พิษณุโลก ลพบุรี อยุธยา สระบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี และราชบุรี จำนวน 62 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารออกฤทธิ์ พบว่า ผ่านมาตรฐาน 50 ตัวอย่าง (คิดเป็น 80.6%) ผิดมาตรฐาน 12 ตัวอย่าง (คิดเป็น 19.4%) ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 ชนิด ที่ผ่านมาตรฐาน และผิดมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1. คุณภาพของผลิตภัณฑ์ (ปริมาณสารออกฤทธิ์) ของผลิตภัณฑ์ atrazine, ametryn, alachlor และ 2,4 – D dimethyl ammonium

2. การตรวจติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เมื่อพิจารณาทั้งคุณภาพทางเคมี (ปริมาณสารออกฤทธิ์) และกายภาพ (ค่าพีเอช และการทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น) ของตัวอย่าง alachlor และ 2,4 – D dimethyl ammonium พบว่า alachlor 48% W/V EC จำนวน 58 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ และการทดสอบอิมัลชั่นและการคืนสภาพอิมัลชั่น ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทุกตัวอย่าง คิดเป็น 100% ในขณะที่ 2,4 – D dimethyl ammonium 84% W/V SL จำนวน 48 ตัวอย่าง ผ่านมาตรฐาน จำนวน 32 ตัวอย่าง คิดเป็น 66.7% ผิดมาตรฐาน จำนวน 16 ตัวอย่าง คิดเป็น 33.3%, 2,4 – D dimethyl ammonium 82.1% W/V SL จำนวน 4 ตัวอย่าง ผ่านมาตรฐาน

จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% ผิดมาตรฐาน จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% และ 2,4 – D dimethyl ammonium 72% W/V SL จำนวน 10 ตัวอย่าง ผ่านมาตรฐาน จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 90% ผิดมาตรฐาน จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 10% เมื่อคำนวณจากตัวอย่าง 2,4 – D dimethyl ammonium ทั้ง 3 ความเข้มข้น จำนวน 48 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างผ่านมาตรฐาน จำนวน 43 ตัวอย่าง คิดเป็น 69.4% ผิดมาตรฐาน จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 30.6% (ภาพที่ 2) เมื่อพิจารณาทั้งคุณภาพทางเคมี และกายภาพ จะพบว่าผลิตภัณฑ์ผิดมาตรฐานเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าพีเอช มีความสำคัญ เนื่องจากค่าพีเอชควบคุมการสลายตัวของสารออกฤทธิ์ในสูตรผสม และถ้าพีเอชต่ำ นั่นคือ มีความเป็นกรดสูง ซึ่งสามารถกัดกร่อนต่อภาชนะบรรจุได้



ภาพที่ 2. คุณภาพทางเคมี และกายภาพของผลิตภัณฑ์ alachlor และ 2,4 – D dimethyl ammonium

สรุปผลการทดลอง

การตรวจติดตามคุณภาพสารป้องกันและกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้ตามท้องตลาดในภาคกลาง ได้แก่ atrazine, ametryn, alachlor และ 2,4 – D dimethyl ammonium จำนวนทั้งสิ้น 242 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างผ่านมาตรฐาน จำนวน 223 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.1% และ ตัวอย่างผิดมาตรฐาน จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.90% ตัวอย่างที่พบว่าผิดมาตรฐานมากที่สุดคือ 2,4 – D dimethyl ammonium ซึ่งควรจะทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องในปีต่อไป โดยเก็บเป็นข้อมูลทางสถิติเพื่อเฝ้าระวังคุณภาพผลิตภัณฑ์ตามท้องตลาดในภาคกลาง และภาคอื่นๆ ของประเทศไทย

การนำไปใช้ประโยชน์

เป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับทางฝ่ายสารวัตรเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ทราบสถิติของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐานเพื่อเฝ้าระวังผลิตภัณฑ์นั้นๆ ในการเก็บตัวอย่างมาดำเนินการควบคุมคุณภาพ ให้เกษตรกรใช้ผลิตภัณฑ์ที่ดีมีคุณภาพ ลดปัญหาสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2553. **รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตราย ปี พ.ศ. 2553**. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/ard/, 16 ตุลาคม 2554.

AGP - FAO Specifications – Old Procedure. 2011. **FAO SPECIFICATIONS FOR PLANT PROTECTION PRODUCTS ALACHLOR (AGP: CP/300)**, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Available Source: http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/pm/jmps/ps/ps- old/en/. October 16, 2011.

Dobrat, W. and Martijn A. 1995. **CIPAC Handbook Vol. F : Physico – chemical Methods for Technical and Formulated Pesticides.** England : Collaborative International Pesticides Analytical Council Limitted, The Black Bear Press Ltd.

Dobrat, W. and Martijn A. 2000. **CIPAC Handbook Vol. J : Analysis of Technical and Formulated Pesticides.** England: Collaborative International Pesticides Analytical Council Limitted, The Black Bear Press Ltd.

Dobrat, W. and Martijn A. 2003. **CIPAC Handbook Vol. K : Analysis of Technical and Formulated Pesticides.** England: Collaborative International Pesticides Analytical Council Limitted, The Black Bear Press Ltd.

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร