



รายงานฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2543

โครงการวิจัยเลขที่ 3

เรื่อง การเตรียมและการศึกษาสมบัติของของเกลือของไคโตซานกับสารกำจัดวัชพืชที่เป็นกรด (Preparation and Property Study of Mixture of Salts of Chitosan and Acidic Herbicides)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ

วันที่ 26 กันยายน 2544

สค
21/100

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญรูป	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 มุลเหตุจูงใจ	1
1.2 ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
1.4 วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 การหามวลโมเลกุลของโคโตซาน	9
2.2 การหา degree of deacetylation	10
2.3 การสกัดหาปริมาณ 2,4-D ในสารละลายผสม	10
2.4 การหาอัตราเร็วการปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มของผสม	13
2.5 การทดสอบการงอกของเมล็ดถั่วเขียว	14
2.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์	16
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
3.1 การหามวลโมเลกุลของโคโตซานโดยวิธี Intrinsic viscometry	18
3.2 การหา degree of deacetylation	20
3.3 การสกัดหาปริมาณ 2,4-D ในสารละลาย	21
3.4 การหาอัตราเร็วการปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มของผสม	26
3.5 การวิเคราะห์พื้นผิวฟิล์มด้วยเครื่องมือ SEM	29
3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียว	30
3.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์	37
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	41
บทความจากการประชุมนานาชาติโคตินโคโตซาน ครั้งที่ 8 ที่ประเทศญี่ปุ่น	ภาคผนวก

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ความเข้มข้นและเวลาที่ตัวทำละลายและสารละลายโคโตซานจาก Fluka เคลื่อนผ่านหลอด Ubbelohode Viscometer	18
3.2 ความเข้มข้นและเวลาที่ตัวทำละลายและสารละลายโคโตซานจาก Sea fresh เคลื่อนผ่านหลอด Ubbelohode Viscometer	19
3.3 ชนิดโคโตซาน พื้นที่ได้พิก อัตราส่วนพื้นที่ได้พิก และ %DE ของโคโตซานชนิดต่าง ๆ	20
3.4 ค่าการดูดกลืนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 2,4-D ในน้ำ	21
3.5 ค่าการดูดกลืนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 2,4-D ใน CH ₂ Cl ₂	22
3.6 ค่าการดูดกลืนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 2,4-D:โคโตซาน (1:1 โดยโมล) ใน 1 % กรดอะซีติก	23
3.7 ความเข้มข้นของ 2,4-D ในชั้นน้ำ และชั้น CH ₂ Cl ₂ ที่สกัดได้จาก 2,4-D 100 ppm ในน้ำ	24
3.8 ปริมาณ 2,4-D ในชั้นน้ำที่ได้จากการสกัด 2,4-D 100 ppm ในน้ำ	24
3.9 ปริมาณ 2,4-D ในชั้นน้ำ ที่สกัดได้จาก 2,4-D 100 ppm ในสารละลายโคโตซาน:2,4-D (1:1 โดยโมล) ใน 1% ในกรดอะซีติก	25
3.10 น้ำหนักฟิล์มตัวอย่างแห้ง และเปอร์เซ็นต์ 2,4-D โดยน้ำหนัก	27
3.11 น้ำหนักของฟิล์มที่ใช้ในการหาค่าการปลดปล่อยและน้ำหนักของ 2,4-D ที่มีอยู่ในฟิล์ม	28
3.12 เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มที่มีอัตราส่วนโคโตซาน:2,4-D ต่าง ๆ	28
3.13 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารละลายในแต่ละชุดการทดลอง	31
3.14 จำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่งอกในแต่ละวัน และความยาวเฉลี่ยของลำต้นและรากและ pH ของสารละลายในวันที่ 5	32
3.15 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยวิธีสารละลาย	33
3.16 จำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่งอกในแต่ละวัน ความยาวเฉลี่ยของลำต้นและรากในวันที่ 5	34
3.17 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยวิธีเคลือบ	35
3.18 จำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่งอกในแต่ละวัน และความยาวเฉลี่ยของลำต้นและรากในวันที่ 5	36
3.19 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยวิธีใช้ฟิล์มตัวอย่าง	36
3.20 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของลำต้นของต้นกล้าไมยราบยักษ์	38
3.21 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรากของต้นกล้าไมยราบยักษ์	38

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 สูตรโครงสร้างของโคโตซาน	3
1.2 โครงสร้างของ 2,4-D	6
3.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง hsp /c กับความเข้มข้นของโคโตซาน	19
3.2 calibration curve ของ Degree of deacetylation	21
3.3 calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำ	22
3.4 calibration curve ของ 2,4-D ใน CH ₂ Cl ₂	23
3.5 calibration curve ของ 2,4-D:โคโตซาน (1:1 โดยโมล) ใน 1% กรดอะซิติก	24
3.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย 2,4-D กับเวลาของฟิล์มที่อัตราส่วนโคโตซานต่อ 2,4-D เป็น 1:1, 3:1, 5:1, 10:1 และ 20:1 ตามลำดับ	29
3.7 SEM micrographs ของฟิล์มที่เตรียมจากสารละลายของผสมโคโตซาน:2,4-D	30
3.8 กราฟเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวัน เฉพาะ ชุดการทดลองที่มีการงอก	33
3.9 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันเมื่อใช้ การทดสอบโดยวิธีการเคลือบเมล็ด	35
3.10 กราฟแสดงอัตราการงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยใช้ฟิล์ม ตัวอย่างในอัตราส่วนต่าง ๆ	37
3.11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของลำต้นจากต้นกล้า ไมยราบยักษ์	38
3.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของลำต้นจากต้นกล้าไมยราบยักษ์	39

บทคัดย่อ

ได้ทำการเตรียมฟิล์มของของผสมที่มีอัตราส่วนต่าง ๆ ของ ไคโตซานต่อ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติกแอซิด (2,4-D) จากสารละลายของของผสมที่มีอัตราส่วนเดียวกัน เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของ 2,4-D จากฟิล์มของผสมที่มีอัตราส่วนไคโตซานต่อ 2,4-D ต่าง ๆ ฟิล์มที่มีอัตราส่วนของ ไคโตซานต่อ 2,4-D สูงกว่าปลดปล่อย 2,4-D ได้ช้ากว่าฟิล์มที่มีอัตราส่วนไคโตซานต่อ 2,4-D ต่ำกว่า โดยฟิล์มที่เตรียมจากสารละลายที่มีอัตราส่วนของ ไคโตซานต่อ 2,4-D เป็น 20:1 สามารถควบคุมการปลดปล่อยได้นาน 7 วัน Scanning electron microscope (SEM) แสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่มีอัตราส่วนของไคโตซานสูงกว่ามีปริมาณของ 2,4-D บนพื้นผิวน้อยกว่า ฟิล์มของผสมที่เตรียมได้ทั้งหมดสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* Roxb.) ได้ทั้งหมดภายในเวลา 5 วัน เช่นเดียวกับเมื่อใช้ 2,4-D บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามฟิล์มที่มีอัตราส่วนของ ไคโตซานต่อ 2,4-D เป็น 20:1 สามารถยับยั้งการงอกของต้นถั่วเขียวในวันที่ 3 และ 4 ได้ดีกว่าเมื่อใช้ 2,4-D บริสุทธิ์ ในการทดสอบการงอกโดยเทคนิคการเคลือบเมล็ดพบว่าเมล็ดถั่วเขียวที่เคลือบด้วยสารละลายผสมไคโตซานกับ 2,4-D งอกได้น้อยกว่าเมล็ดถั่วเขียวที่เคลือบด้วยสารละลายผสมไคโตซานกับ 2,4-D บริสุทธิ์ แสดงให้เห็นว่าไคโตซานมีส่วนช่วยให้ 2,4-D ยึดติดบนเมล็ดถั่วเขียวได้ดีขึ้น การศึกษาโดยวิธีการสกัดชี้ว่าไคโตซานรควบคุมการปลดปล่อย 2,4-D โดยอาศัยแรงกระทำทางฟิสิกส์มากกว่าที่จะเป็นแรงกระทำทางเคมี

ABSTRACT

Films of the mixture of various ratios of chitosan to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were prepared from solution of the corresponding mixture. Releasing percentages over time of 2,4-D in water from films having different mole ratios of the chitosan to 2,4-D were determined. The films with higher ratio of chitosan:2,4-D released 2,4-D slower than the films with lower ratio of chitosan:2,4-D. The film prepared from a solution of chitosan and 2,4-D with the ratio of 20:1 controlled the release of 2,4-D up to seven days. Scanning electron microscope (SEM) showed that the films with higher ratio of chitosan have less 2,4-D on their surface. All the prepared films totally inhibited the germination of mungbean seeds (*Phaseolus aureus* Roxb.) within 5 days similar to the results obtained from pure 2,4-D. With the mole ratio of chitosan to 2,4-D equal to 20:1, the film however gave significantly lower germination percentages on the third and fourth dates. In the germination test using a seed coating technique, the mungbean seeds coated with solutions of the mixture of 2,4-D and chitosan showed lower germination than seeds coated with solutions of the pure 2,4-D solution. The extraction study suggested that chitosan controlled the release of 2,4-D by physical interaction rather than chemical interaction.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2543 และโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2542 และ 2543

ขอขอบคุณ อาจารย์ อนวัช อาชวคม ผศ. ดร. วรินทร์ ชวศิริ และ Dr. Sei-ichi Aiba ที่ช่วยให้คำปรึกษาแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในระหว่างการปฏิบัติการวิจัย ขอขอบคุณ อ.ดร. วิภาวี ภูวนารถนุรักษ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ขอขอบคุณ ดร. ศิริพร ชิงสนธิพร จากกรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของไมยราบยักษ์ และขอขอบคุณนิสิตทุกคนที่มีส่วนร่วมช่วยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทที่ 1 บทนำ



1.1 มวลเหตุจูงใจ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรให้อยู่ในระดับที่น่าพอใจ จึงมีความจำเป็นต้องใช้สารเคมีเกษตรเป็นจำนวนมากในแต่ละปี สารกำจัดวัชพืช 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phenoxy carboxylic ซึ่งใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชได้หลายชนิดและเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ในปีหนึ่ง ๆ มีมูลค่าการนำเข้าสารดังกล่าวสูงถึงกว่า 200 ล้านบาทต่อปี

สมบัติการละลายน้ำของสารกำจัดวัชพืชชนิดนี้ มีผลต่อวิธีการใช้และประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืชที่มีสมบัติการละลายน้ำได้ดีนั้นมักใช้งานได้ง่ายในรูปแบบของการฉีดพ่น แต่ในขณะเดียวกัน สารก็จะถูกชะล้างโดยน้ำออกจากพื้นที่เป้าหมายได้ง่ายเช่นกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืชลดลงและต้องใช้สารเคมีมากขึ้นทั้งในแง่ปริมาณและจำนวนครั้งที่ใช้ ส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำและแหล่งดินโดยรอบ

การใช้เทคนิคการควบคุมการปลดปล่อย (controlled release) สารเคมีเกษตร โดยใช้พอลิเมอร์นั้น นับเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยลดความถี่ และการใช้สารเคมีเกษตรที่มากเกินไปได้ เนื่องจากพอลิเมอร์จะทำหน้าที่จับสารออกฤทธิ์ และปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ ทำให้สารเคมีเกษตรอยู่ในพื้นที่เป้าหมายได้นานขึ้น ในการเลือกพอลิเมอร์เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อย ควรคำนึงถึงการสลายตัวได้ในธรรมชาติ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวต้องไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ในโครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ไคโตซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ถูกละลายได้ง่ายในธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ และ ที่สำคัญคือยังไม่มีรายงานความเป็นพิษของไคโตซานและผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลาย ประโยชน์ทางอ้อมของการพัฒนานำไคโตซานมาใช้ประโยชน์คือช่วยบรรเทาปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากขยะเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมส่งออกกุ้งแช่แข็ง ที่กำลังมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของชาติ

1.2 ความรู้พื้นฐานที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 การใช้พอลิเมอร์ควบคุมการปลดปล่อยสารเคมีเกษตร²

การใช้พอลิเมอร์ควบคุมการปลดปล่อยสารเคมีเกษตรสามารถทำได้สองวิธีคือ (ก) การผสมทางกายภาพ (physical mixing) และ (ข) การทำให้เกิดพันธะทางเคมี (chemical attachment)

(ก) การผสมทางกายภาพ (physical mixing) การรวมกันทางกายภาพของสารออกฤทธิ์กับพอลิเมอร์ สามารถควบคุมการปลดปล่อยเป็นไปตามกฎของการแพร่ (Fick's law)

$$R_d = dM_t/dt = A/h D(C_s - KC_o)$$

R_d คือ อัตราเร็วของการแพร่

M_t คือ มวลสารออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมา ณ เวลาหนึ่ง ๆ

t คือ เวลา

A คือ พื้นที่ผิวพอลิเมอร์ที่เกิดการแพร่

h คือ ความหนาของพอลิเมอร์

D คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการแพร่ของสารออกฤทธิ์จากพอลิเมอร์

C_s คือ ความเข้มข้นทั้งหมดของสารออกฤทธิ์ที่สามารถปล่อยออกจากพอลิเมอร์

C_e คือ ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ปลดปล่อยออกมาแล้ว

K คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของความสามารถในการการกระจายตัวในพอลิเมอร์เทียบกับในตัวทำละลาย

การปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากพอลิเมอร์นั้น นอกจากจะควบคุมโดยการแพร่แล้วอาจถูกควบคุมด้วยการย่อยสลาย ซึ่งจะเกิดที่พื้นผิว เราสามารถอธิบายอัตราการปลดปล่อยโดยกระบวนการถูกชะล้าง ได้ดังนี้

$$R_r = dM/dt = K_E C_o A$$

R_r คือ อัตราเร็วของการปลดปล่อย ณ เวลาหนึ่ง ๆ

K_E คือ ค่าคงที่ของอัตราเร็วในการย่อยสลาย

A คือ พื้นที่ผิวพอลิเมอร์ที่เกิดการย่อยสลาย

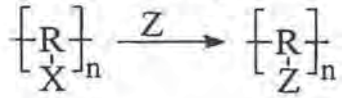
C_o คือ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทั้งหมดที่สามารถถูกชะออกมาจากพอลิเมอร์โดยการย่อยสลาย

พอลิเมอร์ที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยโดยวิธีการผสมทางกายภาพนี้ควรรวมตัวกับสารออกฤทธิ์เป็นเนื้อเดียวได้ดีและไม่เกิดปฏิกิริยากับสารออกฤทธิ์ หรือถ้าไม่สามารถรวมตัวเป็นเนื้อเดียวได้อย่างน้อยควรกระจายตัวได้ดี นอกจากนี้พอลิเมอร์ควรรวมตัวกับสารออกฤทธิ์ได้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อหลีกเลี่ยงการสลายตัวของสารออกฤทธิ์อื่นเนื่องมาจากความร้อน

(ข) การทำให้เกิดพันธะทางเคมี (chemical attachment)

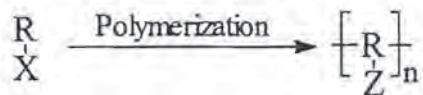
การควบคุมการปลดปล่อยชนิดนี้ สารออกฤทธิ์จะต่ออยู่กับพอลิเมอร์ด้วยพันธะทางเคมี หรือทั้งสองแบบ สำหรับเทคนิคนี้สารออกฤทธิ์จะต้องมีหมู่ฟังก์ชันอย่างน้อยหนึ่งหมู่ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพอลิเมอร์ได้ การทำให้เกิดพันธะทางเคมีกับพอลิเมอร์ที่เป็นสารควบคุมการปลดปล่อยอาจทำได้ 2 วิธี คือ

i) การนำสารออกฤทธิ์มาทำปฏิกิริยากับพอลิเมอร์



Z = active agent

ii) การนำสารออกฤทธิ์มาทำให้เป็นมอนอเมอร์ก่อนแล้วจึงนำไปพอลิเมอไรซ์ในภายหลัง



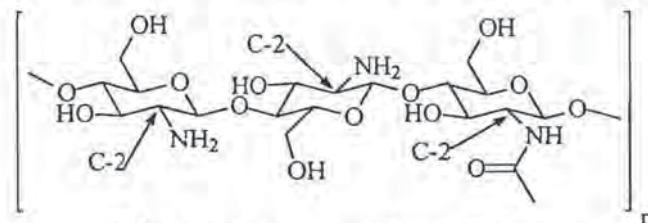
ประโยชน์ของการทำการควบคุมการปลดปล่อยสารเคมีการเกษตรคือทำให้สารออกฤทธิ์ได้นานขึ้น ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์น้อยลง อาจทำให้สารออกฤทธิ์ที่เป็นพิษบางชนิดจะกลายเป็นสารที่ไม่มีพิษเมื่ออยู่ในรูปที่รวมกับพอลิเมอร์ ลดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการแพร่กระจายของสารออกฤทธิ์ที่เป็นพิษ สามารถเปลี่ยนสารออกฤทธิ์ที่เป็นรูปของเหลวให้อยู่ในรูปของแข็งทำให้สะดวกต่อการใช้งานในบางกรณี

ได้มีการนำพอลิเมอร์มาควบคุมการปลดปล่อยสารเคมีเกษตรหลายชนิดเช่น สารกำจัดแมลง สารกำจัดเชื้อรา สารกำจัดวัชพืช ฮอริโมนพืช ปุ๋ย ซึ่งการใช้พัฒนาหาพอลิเมอร์ชนิดใหม่มาควบคุมการปลดปล่อยสารเคมีเกษตรก็มีจุดที่ต้องคำนึงถึงหลายประการ เช่น การใช้พอลิเมอร์ในปริมาณมากมีข้อจำกัดเรื่องการขนส่งและด้านแรงงาน นอกจากนี้เมื่อพอลิเมอร์ปลดปล่อยสารออกฤทธิ์หมดแล้วอาจทิ้งของเสียที่เป็นไม่สลายตัวตกค้างไว้ ตัวอย่างของการนำพอลิเมอร์มาประยุกต์ใช้ทางการเกษตรได้แก่

ในปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะลดปริมาณพอลิเมอร์ที่ตกค้างในดินโดยการใช้พอลิเมอร์ที่มาจากธรรมชาติ เช่น จากเซลลูโลส หรือ ของเหลือทิ้งที่มีส่วนประกอบเป็นเซลลูโลส ซึ่งสารเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้เองโดยจุลินทรีย์ที่มีในธรรมชาติ

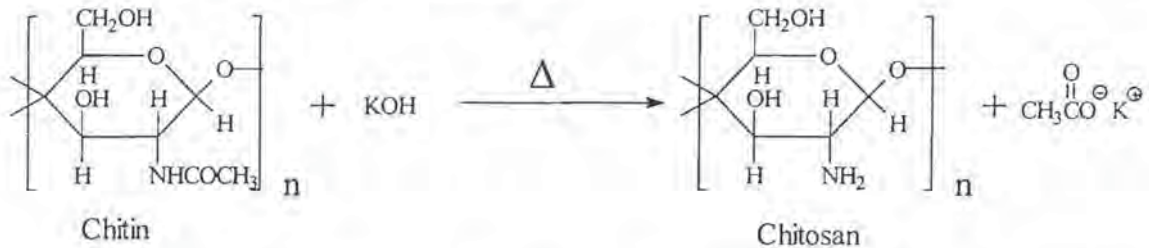
1.2.2 ไคโตซาน³

เป็นพอลิเมอร์ที่พบได้ตามธรรมชาติมีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส (Cellulose) โดยมีหมู่อะมิโนอยู่แทนที่หมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองของทุกหน่วยซ้ำ (repeating unit) ของสายพอลิเมอร์ ดังรูป



รูปที่ 1.1 แสดงสูตรโครงสร้างของไคโตซาน

ไคโตซาน (Chitosan) เป็น Polysaccharide ชนิดหนึ่งที่ได้มาจากการนำไคติน (Chitin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเปลือกกุ้งและปู มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสารละลายที่เป็นเบสแก่เพื่อกำจัดหมู่ acetyl ออกให้เป็น free amine group ดังสมการแสดงปฏิกิริยา



ไคโตซานค้นพบเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1859 โดย Rouget ซึ่งทำการต้มเปลือกกุ้งและปูในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น แต่หลังจากนั้นไม่ได้วิจัยหรือพัฒนาเท่าที่ควร จนกระทั่งถึงปี ค.ศ. 1934 จึงได้มีการนำเอาไคโตซานมาประยุกต์ใช้อย่างเป็นทางการมากขึ้นและได้มีการศึกษาและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากไคโตซานเพิ่มมากขึ้นจนมาถึงปัจจุบัน

ความแตกต่างระหว่างไคโตซาน และ ไคติน คือ degree of deacetylation โดยปกติแล้วปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ใช้กำจัดหมู่ acetyl ของ ไคตินให้เป็นไคโตซานนั้นจะทำในสารละลายที่เป็นเบสของโลหะอัลคาไลน์เข้มข้น ปฏิกิริยานี้มักจะไม่สมบูรณ์ ซึ่งโดยทั่วไปไคโตซานจะมี degree of deacetylation อยู่ในช่วงประมาณ 70 - 95 % ในขณะที่ไคตินจะมี degree of deacetylation น้อยกว่า 20% ในปัจจุบันเราอาศัยสมบัติการละลายในสารละลายกรดอะซิติก 1% เป็นเส้นแบ่งระหว่างไคโตซานกับไคติน โดยไคโตซานจะละลายได้ในกรดอะซิติก 1% ในขณะที่ไคตินจะไม่ละลาย

สมบัติทางกายภาพและเคมี เช่น ความหนืด และ ความสามารถในการละลาย ของไคโตซานขึ้นอยู่กับปัจจัยทางโครงสร้างที่สำคัญสองประการคือ degree of deacetylation และ molecular weight ซึ่ง degree of deacetylation สามารถหาได้จากปริมาณของ free amino group ที่อยู่ในสาย polysaccharide โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น Infrared spectroscopy, titration และ chromatography เป็นต้น สำหรับ molecular weight สามารถวิเคราะห์ได้โดยเทคนิคต่าง ๆ เช่น chromatography, light scattering และ viscometry

ไคโตซานได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้านเช่น

- (i) การบำบัดน้ำเสีย โดยนำไคโตซานไปจับกับโลหะหนักในบ่อน้ำบำบัดน้ำเสียเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนและนำตะกอนไปกำจัดภายหลัง
- (ii) ทางเภสัชวิทยา เช่น ได้มีการประยุกต์ใช้ไคโตซานให้อยู่ในรูปฟิล์มและนำไปบำบัดรักษาแผลไฟไหม้และใช้เป็นตัวปลดปล่อยตัวยาทำให้ออกฤทธิ์ได้นานขึ้น
- (iii) ทางการเกษตร เช่น พบว่าไคโตซานช่วยชะลอการสุกของผลไม้

- (iv) ทางด้านโภชนาการ เช่น โคโตซานสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ทำให้อาหารนั้นอยู่ได้นานขึ้น และใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพในการลดไขมัน

1.2.3 สารกำจัดวัชพืช (herbicide)⁴

สารกำจัดวัชพืชจำแนกตามองค์ประกอบทางเคมีออกเป็น 2 ประเภทคือ

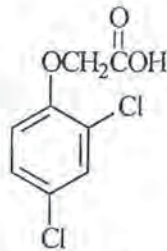
(ก) สารกำจัดวัชพืชประเภทอนินทรีย์สาร (inorganic herbicide) เช่น sulfuric acid, arsenic acid เป็นต้น

(ข) สารกำจัดวัชพืชประเภทอินทรีย์สาร (organic herbicide) สารเคมีประเภทนี้ถูกนำมาใช้กำจัดวัชพืชมากที่สุด เพราะมีประสิทธิภาพดี อัตราการใช้ต่ำ และมีคุณสมบัติในการเลือกทำลาย (selective) สารกำจัดวัชพืชประเภทอินทรีย์สารนี้ยังแบ่งออกเป็นกลุ่มอีกหลายกลุ่มดังนี้

- (i) Oil ได้แก่ Phenoxytixic oil เช่น desel oil, aromatic oil และ phytobland oil เช่น booster, corn oil ส่วนใหญ่สารในกลุ่ม oil นี้ ออกฤทธิ์กำจัดวัชพืชน้อยมาก จึงถูกนำมาใช้ผสมกับสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
- (ii) Aliphatic- carboxylic ได้แก่ TCA และ dalapon
- (iii) Phenol ได้แก่ dinofop, DNOC, PCP
- (iv) Aromatic-carboxylic ได้แก่ Phenoxy carboxylic เช่น 2,4-D 2,4,5-T MCPA 2,4-DB; Diphenoxy carboxylic เช่น diclofop, metriflufen; Phenylacetic acid เช่น fanac; Benzoic acid เช่น 2,3,6-TBA dicamba, tricamba, chloramben; Phthalic acid เช่น DCPA, naphthalam, endothall;
- (v) Benzonitrile เช่น dichlobenil, bromoxynil, ioxynil
- (vi) Dinitroaniline เช่น benefin, dinitramine
- (vii) Diamino-s-triazine เช่น atrazine, cyanazine, cyprazine, propazine และ simazine
- (viii) Urea เช่น fenuron, monuron, diuron
- (ix) Carbamate ได้แก่ Phenylcarbamate เช่น barban, carbettamide; Thiocarbamate เช่น butylate, cycloate, diallate และ EPTC; Dithiocarbamate CDEC และ metham
- (x) Acid amide เช่น alachlor, butachloa และ CDAA
- (xi) Diphenyl ether เช่น acifluorfen, bifenox และ nitrofen
- (xii) Uracil เช่น bromacil, isocil, terbacil
- (xiii) Methaneasonate เช่น AMA, cacodylic acid, CMA และ DSMA
- (xiv) Sulfonylurea เช่น chlorsulfuron, metsulfuron-methyl, chlorimuron-ethyl และ bensulfuron-methyl

(xv) Miscellaneous herbicide เช่น amitrole, bentazon, ethofumeasafen, flamprop และ glyphosate

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) จัดอยู่ในกลุ่ม Phenoxyacetic acid นอกจากนี้ยังมี สารกำจัดวัชพืชที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันนี้คือ 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) และ methylchlorophenoxyacetic acid (MCPA)



รูปที่ 1.2 แสดงโครงสร้างของ 2,4-D

2,4-D เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้พ่นแบบก่อนงอก (premergence) และหลังงอก (postmergence) โดยมีคุณสมบัติในการเลือกทำลาย (selective) ซึ่งมีฤทธิ์ควบคุมวัชพืชใบกว้าง เช่น ไมยราบยักษ์ ถั่วผี สาบเสือ ผักโขมหนาม และวัชพืชในตระกูลกก เช่น แห้วหมู ใช้ในพื้นที่ที่ปลูกพืชใบแคบ เช่น ในนาข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ไร่อ้อย หรือ ใช้พ่นเฉพาะ (direct spraying) ในบริเวณพืชยืนต้นชนิดต่างๆ มีอัตราการใช้ 45 กรัมสารออกฤทธิ์/ไร่ขึ้นไป

2,4-D นั้น มีสูตรโครงสร้างอยู่ในรูปของกรด ในการนำมาใช้อาจต้องมีการทำ formulation ใหม่ให้อยู่ในรูปของเกลือ หรือ ester ซึ่งทั้ง 2 รูปนี้มีลักษณะการใช้งานที่แตกต่างกัน สาร 2,4-D สามารถเข้าทำลายวัชพืชได้ทั้งทางรากและใบ กลไกการทำลายเกิดจากการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสง หายใจ และการแบ่งเซลล์ในพืช สารเคมีจะถูกยึดโดยอนุภาคของดินได้ง่าย และจุลินทรีย์ *Achromobacter* สามารถย่อยสลายโมเลกุลของ 2,4-D ได้ ในการใช้อัตราปกติ 2,4-D จะมีฤทธิ์ตกค้าง โดยมีค่าความคงทนในดินประมาณ 1-4 สัปดาห์ ระดับความเป็นพิษของ 2,4-D มีค่าความเป็นพิษ LD₅₀(rat oral acute) 375 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ชื่อทางการค้าที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ได้แก่ Hedonal, Ester-79, Bara-ester, Ratanal, Veedex ฯลฯ

1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการนำพอลิเมอร์ธรรมชาติและพอลิเมอร์สังเคราะห์หลายชนิดมาใช้ควบคุมการปลดปล่อยกับ Herbicide ชนิดต่าง ๆ ดังนี้

ปี ค.ศ. 1970 Neogi⁵ ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์ธรรมชาติคือ Kraft lignin และ Douglas fir bark กับสารเคมีเกษตรคือ Methyl chlorolrphenyl acetic acid (MCPA) พบว่าให้ผลิตภัณฑ์ที่มี

ปริมาณสารออกฤทธิ์สูงถึง 35 และ 51 wt% ตามลำดับ แต่ปฏิกิริยาระหว่าง 2,4-D กับ α - cellulose ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสารกำจัดวัชพืชอยู่เพียง 7 wt% อย่างไรก็ตามทั้งสามระบบแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อทดสอบการงอกของ lettuce seed

ปี 1981 คณะของ McCormick⁶ ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืชจากพอลิเมอร์ธรรมชาติเช่น cellulose, chitin, amylose, amylopectin, dextran โดยใช้อนุพันธ์ของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D และ metribuzin พบว่าชนิดของพอลิเมอร์มีผลต่อการควบคุมอัตราเร็วในการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืช

ปี 1993 J. Tefft⁷ และคณะได้ทำการศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยของสารกำจัดวัชพืช Dicalnba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) (DA) จาก polymeric microspheres (MS) ซึ่งเตรียมจาก ethyl cellulose (EtCell), polyarylsulfone (PS) และได้ทำการทดสอบการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์โดย 2 เทคนิค คือ ทดสอบโดยการชะล้างใน soil column leaching test และวัดการปลดปล่อยโดยใช้เครื่อง sonicated water bath ด้วยเทคนิค sonication พบว่าการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จาก EtCell MS ที่เตรียมจาก EtCell ที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า จะมีอัตราการปลดปล่อยที่ต่ำกว่า และ MS ที่มี EtCell/PS = 1:9 มีอัตราการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ DA ต่ำกว่าอัตราส่วน 1:4 และ 2:3 ตามลำดับ และพบว่าเทคนิค soil column leaching มีอัตราการปลดปล่อยช้ากว่าเทคนิค sonication นอกจากนี้ยังพบว่า PS MS (18 wt % DA) มีการปลดปล่อยช้ากว่า PS MS (30 wt% DA) EtCell MS (16 wt% DA)

ปี 1997 Woo-Sik Kim⁸ และคณะ ศึกษาการสังเคราะห์ 2,4-Dichlorophenoxy acetyloxymethylstyrene (DMOS) จาก 2,4-D และ *p*-chloromethylstyrene แล้วทำการ copolymerized กับ acrylamide ซึ่งเป็น hydrophilic monomer และศึกษาการปลดปล่อย 2,4-D จากพอลิเมอร์ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ พบว่าอัตราการปลดปล่อย 2,4-D เพิ่มขึ้นเมื่อ pH และอุณหภูมิเพิ่มขึ้น

ปี 1998 Woo-Sik Kim⁹ และคณะได้ศึกษาการสังเคราะห์ พอลิเมอร์ที่มีสารกำจัดวัชพืชเป็นส่วนประกอบโดยใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D 2,4,5-T และ MCPA ที่อยู่ในรูป sodium salt ทำปฏิกิริยากับ chloromethylstyrene แล้วทำโคพอลิเมอร์ไรเซชันกับ acrylamide แล้วศึกษาการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืชจากพอลิเมอร์ที่เตรียมได้ โดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry ตรวจวัด พบว่าพอลิเมอร์ที่มีสารกำจัดวัชพืช 10 mol% มีประสิทธิภาพ ในการควบคุมการปลดปล่อยดีกว่า พอลิเมอร์ที่มีสารกำจัดวัชพืช 5 mol% โดยที่ pH และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการปลดปล่อยเร็วขึ้น

Hasmah Abdullah และ Mashhor Mausor¹⁰ ได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยฤทธิ์ของสาร 2,4-D ที่ได้นำไปผสมกับฟิล์มพลาสติก พบว่าให้อัตราการเร็วในการปลดปล่อย 38.5 ppm/hr. และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเมื่อทดสอบกับพืชน้ำ *hydrilla*

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการใช้พอลิเมอร์ไคโตซานมาควบคุมการปลดปล่อย 2,4-D นั้นยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อนแต่ในปี 1981 Davar และ Wightman¹¹ ได้รายงานว่ไคโตซานสามารถดูดซับสารกำจัดวัชพืชชนิดที่เป็นกรดเช่น 2,4-D, 2,4,5-T, dicamba และ MCPA จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตสารดังกล่าว

ในการนำพอลิเมอร์ไคโตซานมาใช้เป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืชนั้น จะต้องคำนึงถึงอัตราเร็วของการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช อัตราเร็วนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ² เช่น มวลโมเลกุลของพอลิเมอร์ ลักษณะของการจับกันของสารออกฤทธิ์กับพอลิเมอร์ อัตราส่วนของสารออกฤทธิ์ ลักษณะการถูกชะล้าง และสมบัติการละลาย ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะศึกษาถึงวิธีการเตรียมของผสมของไคโตซานกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D รวมถึง ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืช และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของของผสมที่ได้ ซึ่งการศึกษานี้จะได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการใช้ไคโตซานเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืชชนิดที่เป็นกรด และยังให้ประโยชน์ในด้านการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้ ซึ่งเป็นผลดีทางอ้อมต่ออุตสาหกรรมกุ้งแช่แข็งของประเทศ รวมถึงลดปัญหามลภาวะจากโรงงานดังกล่าวเนื่องจากเปลือกกุ้งเป็นของเหลือทิ้งเป็นปริมาณมาก

1.4 วัตถุประสงค์และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมของผสมของสารกำจัดวัชพืชชนิดที่เป็นกรดร่วมกับไคโตซาน และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วของการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืชจากของผสมที่เตรียมได้ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงอิทธิพลของไคโตซานที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารกำจัดวัชพืช และได้แนวทางการประยุกต์ใช้ของเหลือทิ้งคือเปลือกกุ้งและปูให้เป็นประโยชน์ทางการเกษตร และ สิ่งแวดล้อม

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 การหามวลโมเลกุลของโคโตซาน

1. เตรียมตัวทำละลายผสมระหว่าง กรดอะซีติก 0.1 M กับ NaCl 0.2 M
2. เตรียม stock solution ของโคโตซานเข้มข้น 0.0005 g/mL ปริมาตร 100 mL ซึ่งโคโตซานของบริษัท Fluka แห่งมา 50 mg ละลายใน กรดอะซีติก 1 M 10 mL เติมน้ำกลั่น 60 mL ในขวดวัดปริมาตร แล้วคนด้วยเครื่องคนแม่เหล็กเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเติม NaCl 1 M 20 mL คนต่ออีกประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 mL
3. เตรียม stock solution ของโคโตซานเข้มข้น 0.001 g/mL ปริมาตร 250 mL ซึ่งโคโตซานแห่งมา 250 mg ละลายใน กรดอะซีติก 1 M 25 mL เติมน้ำกลั่น 150 mL ในขวดวัดปริมาตรแล้วคนด้วยเครื่องคนแม่เหล็กเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเติม NaCl 1 M 50 mL คนต่ออีกประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 mL
4. นำ stock solution มาทำการเจือจางด้วยตัวทำละลายผสมในข้อ 1 ดังนี้

สารละลาย	ความเข้มข้น ($\times 10^{-4}$ g/m)	ปิเปตมาจาก stock solution ($\times 10^{-4}$ g/m)	ปริมาตรที่ปิเปตมา จาก stock solution (mL)	ปริมาตรสุดท้าย (mL)
C1	0.5	5	10	100
C2	1	5	20	100
C3	2.5	5	50	100
C4	5	-	-	-
C5	7.5	10	75	100
C6	10	-	-	-

5. ใช้ตัวทำละลายผสมจากบิวเรตมา 30 mL ลงใน viscometer ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25 องศาเซลเซียส ให้จุกยางดูดสารละลายขึ้นมาให้อยู่เหนือจุด a เล็กน้อย แล้วปล่อยจุกยาง บันทึกเวลาที่สารละลายเคลื่อนที่จากจุด a ถึง b สามครั้ง จากนั้นนำเวลาสองครั้งที่ใกล้เคียงกันมาเฉลี่ย

6. ใสสารละลาย C1 ของ Fluka จากบิวเรตมา 30 mL ลงใน viscometer ที่ควบคุมอุณหภูมิ ใน water bath 25 องศาเซลเซียส ใ้จุกยางดูดสารละลายขึ้นมาให้อยู่เหนือจุด a เล็กน้อย แล้วปล่อยจุกยาง บันทึกเวลาที่สารละลายเคลื่อนที่จากจุด a ถึง b สามครั้ง จากนั้นนำเวลาสองครั้งที่ใกล้เคียงกันมาเฉลี่ย ทำเช่นนี้จนครบทุกความเข้มข้น (C1-C6)
7. นำข้อมูลมาคำนวณหาโมลโมเลกุลจากสูตร $[\eta] = KM_v^a$ ($K = 1.8 \times 10^{-3}$, $a = 0.93$)
8. นำสารละลายโคโตซานของบริษัท Sea Fresh มาทำการทดลองในทำนองเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้นเป็น 5 เท่าของโคโตซาน ของบริษัท Fluka

2.2 การหา Degree of deacetylation (%DE)

1. ชั่งโคโตซานมา 20 mg ละลายใน กรดอะซิติก 0.1 M 3 mL เทสารละลายลงใน glass dish จำนวน 2 อัน (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5 cm) ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเติม NaOH 0.1 M ใน methanol (1:1) ประมาณ 1-2 mL ลอกฟิล์มออกอย่างระมัดระวัง และนำมาล้างด้วยน้ำผสม methanol (1:1) จนเป็นกลาง แล้วผึ่งให้แห้ง
2. นำฟิล์มแปะลงบนกระดาษแข็งที่เจาะรูไว้พอดีกับ window ของเครื่อง FT-IR แล้วนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer หาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีกที่ wavenumber $1655/2867 \text{ cm}^{-1}$ แล้ว หาปริมาณ % DE จาก calibration curve (รูป 3.2)

2.3 การสกัดหาปริมาณ 2,4-D ในสารละลายผสม

2.3.1 การสร้าง calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำ

1. เตรียม stock solution 150 ppm โดยชั่ง 2,4-D มา 75 mg ($3.39 \times 10^{-5} \text{ mol}$) ละลายในน้ำ 50 mL แล้วอุ่นสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เตรียม stock solution 100 ppm โดยชั่ง 2,4-D มา 100 mg ($3.39 \times 10^{-5} \text{ mol}$) ละลายในน้ำ 100 mL แล้วอุ่นสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำ stock solution มาเจือจางด้วย น้ำ ดังนี้

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ppm)	ความเข้มข้นของ stock solution ที่นำมาเจือจาง (ppm)	ปริมาตร stock solution ที่ปิเปตมา (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
150	-	-	-
100	-	-	-
75	150	12.5	25
50	100	12.5	25
25	100	6.25	25
10	100	2.5	25

4. นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3. มาวัดค่า absorbance ด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 284 nm แล้วสร้าง calibration curve

2.3.2 การสร้าง calibration curve ของ 2,4-D ใน CH_2Cl_2

- เตรียม stock solution 150 ppm โดยชั่ง 2,4-D มา 75 mg (3.39×10^{-5} mol) ละลายใน CH_2Cl_2 50 mL แล้วอุ่นสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- เตรียม stock solution 100 ppm โดยชั่ง 2,4-D มา 100 mg (3.39×10^{-5} mol) ละลายใน CH_2Cl_2 100 mL แล้วอุ่นสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำ stock solution มาเจือจางด้วย CH_2Cl_2 ดังนี้

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ppm)	ความเข้มข้นของ stock solution ที่นำมาเจือจาง (ppm)	ปริมาตร stock solution ที่ปิเปตมา (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
150	-	-	-
100	-	-	-
75	150	12.5	25
50	100	12.5	25
25	100	6.25	25
10	100	2.5	25

4. นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3. มาวัดค่า absorbance ด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 284 nm แล้วสร้าง calibration curve
- 2.3.3 การสร้าง calibration curve ของ 2,4-D:โคโคซาน (1:1 โดยโมล) ใน AcOH / NaHCO₃
- 1 เตรียม stock solution โดยชั่ง 2,4-D มา 75 mg (3.39×10^{-5} mol) ละลายใน 1% กรดอะซิติก 15 mL (0.1748 mol) เติม NaHCO₃ 28 mg (3.39×10^{-5} mol) แล้วอุ่นสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน
 - 2 ชั่งโคโคซาน 55 mg (3.39×10^{-5} mol) ละลายใน 1% กรดอะซิติก 20 mL อุณหภูมิของแข็งละลายหมดแล้วนำไปผสมกับสารละลายในข้อ 1. แล้วปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วย 1% กรดอะซิติก จะได้ stock solution 2,4-D เข้มข้น 150 ppm ปริมาตร 50 mL
 - 3 เตรียม stock solution 100 ppm ปริมาตร 100 mL โดยการชั่ง 2,4-D 100 mg , NaHCO₃ 38 mg และ โคโคซาน 73 mg ในทำนองเดียวกัน
 - 4 นำ stock solution มาเจือจางด้วย 1% กรดอะซิติก ดังนี้

ความเข้มข้นที่ต้องการ (ppm)	ความเข้มข้นของ stock solution ที่นำมาเจือจาง (ppm)	ปริมาตร stock solution ที่ปีเปิดมา (mL)	ปริมาตรรวม (mL)
150	-	-	-
100	-	-	-
75	150	12.5	25
50	100	12.5	25
25	100	6.25	25
10	100	2.5	25

- 5 นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในข้อ 4. มาวัดค่า absorbance ด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 284 nm แล้วสร้าง calibration curve
- 2.3.4 การสกัด 2,4-D จาก 2,4-D 100 ppm ในน้ำ
- 1 นำสารละลาย 2,4-D 100 ppm มา 15 mL สกัดด้วย CH₂Cl₂ 15 mL ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นแล้วนำสารละลายชั้นน้ำ และชั้น CH₂Cl₂ ไปวัดค่า absorbance
 - 2 หาปริมาณ 2,4-D ในทั้งสองชั้น จาก calibration curve
- 2.3.5 การสกัด 2,4-D จากสารละลายผสมระหว่าง โคโคซาน:2,4-D ใน 1% กรดอะซิติก
- 1 นำสารละลายผสมโคโคซาน 2,4-D 100 ppm (2,4-D:โคโคซาน (1:1 โดยโมล) ใน 1% กรดอะซิติก) มา 15 mL สกัดด้วย CH₂Cl₂ 15 mL ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นแล้วนำสารละลายชั้นบน (ชั้น aqueous) ไปวัดค่า absorbance

2. หาปริมาณ 2,4-D ที่เหลืออยู่ในชั้น aqueous จาก calibration curve ของ 2,4-D:โคโคซาน (1:1 โดยโมล) ใน AcOH/NaHCO₃

2.4 การปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มของผสม

2.4.1 การเตรียมแผ่นฟิล์มตัวอย่าง

1. เตรียมของผสมระหว่าง โคโคซาน* :2,4-D ที่อัตราส่วนโดยโมลดังตาราง

อัตราส่วนโดย โมลของ โคโคซาน:2,4-D	Code	ปริมาณสาร			
		โคโคซาน (g)	2,4-D (g)	Na ₂ CO ₃ (g)	1%กรดอะซีติก (mL)
1:1	1A	0.8000	1.0964	0.4160	200
	1B	0.4120	0.5485	0.2658	100
	1C	0.4002	0.5443	0.2629	100
2:1	2A	1.6000	1.0964	0.4160	200
	2B	0.8054	0.5480	0.2647	100
	2C	0.8087	0.5495	0.2963	100
3:1	3A	2.4000	1.0964	0.4160	200
	3B	1.2046	0.5499	0.2718	100
	3C	1.2030	0.5483	0.2694	100
5:1	5A	2.0517	0.5489	0.2659	100
	5B	2.1032	0.5473	0.2705	100
10:1	10A	4.0000	0.5484	0.2644	100
	10B	4.0294	0.5470	0.2593	100
15:1	15A	6.0000	0.5476	0.2633	50
	15B	6.0603	0.5495	0.2620	50
20:1	20A	4.0056	0.2748	0.1316	50
	20B	4.0036	0.2706	0.1311	50
-	CB	0.2052	-	0.1312	50

2. แบ่งสารละลาย 1% กรดอะซีติก ตามตารางเป็นสามส่วนเท่า ๆ กัน นำ 2,4-D มาละลายใน 1% กรดอะซีติก ส่วนแรก แล้วเติม Na₂CO₃ จนจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน นำโคโคซานมาละลาย

กับ 1% กรดอะซีติก ส่วนที่สอง อุณหภูมิของแข็งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อทั้งสองส่วนละลายหมดแล้ว นำทั้งสองส่วนมาผสมกัน แล้วเติม 1% กรดอะซีติก ส่วนที่สาม

3. เทของผสมลงใน glass dish (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 cm.) ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม (ประมาณ 5 วัน) เมื่อแห้งแล้ว ลอกฟิล์มออกมา แล้วนำไปทำให้แห้งสนิทต่อภายใต้ vacuum แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง

หมายเหตุ * ใช้โคโคซานของบริษัท Sea Fresh

2.4.2 การหาอัตราเร็วในการปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มตัวอย่าง

1. ชั่งฟิล์มที่แห้งแล้วมาละลายน้ำ 500 mL ใน flask คนตลอดเวลาด้วยเครื่องคนแม่เหล็กแล้วเก็บสารละลาย ณ เวลาต่าง ๆ โดยการกรองผ่าน filter ครึ่งละ 5 mL
2. นำสารละลายที่กรองได้ไปวัดค่า absorbance ที่ 284 nm แล้วคำนวณหาปริมาณ 2,4-D โดยเทียบจาก calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำ

2.5 การทดสอบการงอกของเมล็ดถั่วเขียว

2.5.1 การทดสอบการงอกโดยใช้สารละลาย

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง 12 ชุด ดังตารางต่อไปนี้

ชุดที่	ปริมาณ					ปริมาตรรวม (mL)	pH
	2,4-D (mg)	โคโคซาน (mg)	Na ₂ CO ₃ (mg)	AcOH (mL)	น้ำกลั่น (mL)		
1	-	-	-	-	250	250	6.5
2	-	91.1	-	250	-	250	2.8
3	-	91.1	-	125	125	250	3.2
4	-	-	59.6	-	250	250	7.3
5	-	-	59.6	250	-	250	3.1
6	-	91.1	59.6	250	-	250	3.5
7	25.0	-	-	-	250	250	7.0
8	125.0	-	-	-	250	250	6.9
9	25.0	-	11.9	-	250	250	6.2
10	125.0	-	59.6	-	250	250	6.5
11	25.0	18.2	11.9	250	-	250	3.2
12	125.0	91.1	59.6	250	-	250	3.3

2. เตรียมจานที่จะปลูกโดยล้างให้สะอาด
 3. วางทิชชูลงบนจานแล้วเทสารละลายที่ 1 ลงในจาน 10 mL
 4. วางเมล็ดถั่วเขียว 30 เมล็ด โดยให้แต่ละเมล็ดวางห่างกันประมาณ 2 cm
 5. วางทิชชูทับเมล็ดถั่วเขียวอีกหนึ่งชั้น แล้วเทสารละลายที่ 1 ลงในจานอีก 10 mL
 6. ห่อด้วยถุงพลาสติก และนับจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวันเป็นเวลา 5 วัน
 7. เมื่อครบ 5 วัน วัดความยาวราก และลำต้น และคำนวณอัตราการงอก
 8. ทำอีก 1 ชุดเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ
 9. สารละลายที่ 2-12 ทดลองในทำนองเดียวกัน
 10. คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกโดยให้การงอกของสารละลายที่ 1 เป็น 100%
- 2.5.2 วิธีการทดลองทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้วิธีเคลือบเมล็ด
1. นำสารละลายชุดที่ 1 ที่เตรียมขึ้นในหัวข้อ 2.6.1 เทลงในภาชนะที่มีเมล็ดถั่วเขียว แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที
 2. นำเมล็ดถั่วเขียวจากข้อ 1 ผึ่งลมให้แห้ง
 3. วางทิชชูลงบนจานภาชนะแล้วเทน้ำกลั่นลงไป 10 mL
 4. นำเมล็ดถั่วเขียวที่แห้งแล้ว วางลงบนจาน 30 เมล็ด โดยแต่ละเมล็ดวางห่างกัน 2 cm
 5. วางทิชชูทับเมล็ดถั่วเขียวอีกหนึ่งชั้น แล้วเทน้ำกลั่น ลงในจานอีก 10 mL
 6. ห่อด้วยถุงพลาสติก และนับจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวันเป็นเวลา 5 วัน
 7. เมื่อครบ 5 วัน วัดความยาวราก และลำต้น และคำนวณอัตราการงอก
 8. ทำอีก 1 ชุดเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ
 9. สารละลายที่ 2-12 ทดลองในทำนองเดียวกัน
 10. คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกโดยให้การงอกของสารละลายที่ 1 เป็น 100%
- 2.5.3 การทดสอบการงอกโดยใช้ฟิล์มของผสม
1. วางทิชชูลงบนจานแล้วเทน้ำกลั่นลงไป 10 mL เทลงบนทิชชู
 2. วางเมล็ดถั่วเขียว 30 เมล็ด โดยให้แต่ละเมล็ดวางห่างกันประมาณ 2 cm
 3. ชั่งฟิล์มตัวอย่างที่เตรียมขึ้นตามหัวข้อ 2.4.1 โดยคำนวณให้ความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 500 ppm (ในน้ำ 20 mL) ถ้ามีการปลดปล่อย 100% ดังตาราง

ชุดที่	น้ำหนักฟิล์ม (g)
CB	0.0277
1A	0.0237
2A	0.0282
3A	0.0336
10A	0.9181
20A	1.5231

- วางฟิล์มที่ซั้งไว้ลงบนจานทึบโดยพยายามให้ฟิล์มกระจายอยู่ที่ทั่วจาน
- วางทึบชุบเมสติดัวเขียวอีกหนึ่งชั้น แล้วเทน้ำกลั่น ลงในจานอีก 10 mL
- ห่อด้วยถุงพลาสติก และนับปริมาณเมสติดที่งอกทุกวันเป็นเวลา 5 วัน
- เมื่อครบ 5 วัน วัดความยาวราก และลำต้น และคำนวณอัตราการงอก
- ทำอีก 1 ชุดเพื่อเป็นการเปรียบเทียบ
- ฟิล์มชุดที่ 1A , 2A , 3A , 10A และ 20A ทดลองในทำนองเดียวกัน
- คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกโดยกำหนดให้การงอกของสารละลายที่ 1 เป็น 100%

2.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์

- ละลาย ไคโตซาน ใน กรดอะซีติก (2.5 % , 10 mL)
- ละลาย 2,4-D และ NaHCO_3 ในน้ำ (5 mL)
- ผสมสารละลายในข้อ 1 และ 2 และเติมน้ำจนได้ปริมาตรรวม 25 mL

ชุด	2,4-D		ไคโตซาน		NaHCO_3		2.5% กรดอะซีติก		อัตราส่วนโดย โมล NaHCO_3 : AcOH	ค่า pH
	g	mmol	g	mmol	g	mmol	mmol	mL		
CDSA14	0.025	0.113	0.0184	0.113	0.092	1.092	4.370	10	1:4	4-5
CDSA12	0.025	0.113	0.0189	0.117	0.183	2.185	4.370	10	1:2	5-6
CDSA34	0.025	0.114	0.0185	0.114	0.275	3.290	4.370	10	3:4	6-7
CSA14	-	-	0.0182	0.113	0.093	1.101	4.370	10	1:4	4
CSA12	-	-	0.0183	0.113	0.184	2.185	4.370	10	1:2	5
CSA34	-	-	0.0194	0.120	0.273	3.250	4.370	10	3:4	5-6
DSA14	0.025	0.113	-	-	0.092	1.092	4.370	10	1:4	4
SA14	-	-	-	-	0.091	1.092	4.370	10	1:4	4

4. เตรียมสารละลายเจือจาง 5, 50, 500 เท่า ซึ่งมีความเข้มข้นของ 2,4-D เป็น 100, 10 และ 1 ppm จากสารละลาย 500 ppm ที่เตรียมได้ในข้อ 3
5. เติมสารละลายในข้อ 3 และ 4 (4.5 mL) ลงในแต่ละหลอดทดลองที่บรรจุด้วยผงวุ้น (1.5 กรัม) โดยมีชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลาย คนให้ผงวุ้นละลาย และรอให้ผงวุ้นแข็งตัว
6. นำเมล็ดไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (ความยาวราก 1-2 มิลลิเมตร) มาปลูกหลอดละ 3 ต้น ความเข้มข้นละ 3 หลอด
7. ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใสนำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน
8. นำพืชทดสอบมาล้างเชลลูโลสออก แล้วบันทึกความยาวของรากและลำต้นนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญเติบโต} = 100 - 100 \times \frac{\text{ความยาวเฉลี่ยของรากหรือลำต้นของชุดทดลอง}}{\text{ความยาวเฉลี่ยของรากหรือลำต้นของชุดควบคุม}}$$

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การหามวลโมเลกุลของโคโคซาน

เนื่องจากมวลโมเลกุลอาจมีผลต่อการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ ได้ทำการทดลองโดยใช้โคโคซาน จากบริษัท Sea Fresh (ประเทศไทย) และ Fluka (ประเทศสวิสเซอร์แลนด์) ที่ 25 °C โดยใช้ตัวทำละลายผสมของสารละลาย กรดอะซิติก (0.1 M) กับสารละลาย NaCl (0.2 M)

ในการทดลองนี้เราได้ทำการบันทึกเวลาที่ตัวทำละลาย และสารละลายใช้ในการเคลื่อนที่จากจุด a ถึง b ภายใน Ubbelohode viscometer ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นและเวลาที่ตัวทำละลายและสารละลายโคโคซานจาก Fluka เคลื่อนผ่านหลอด Ubbelohode Viscometer

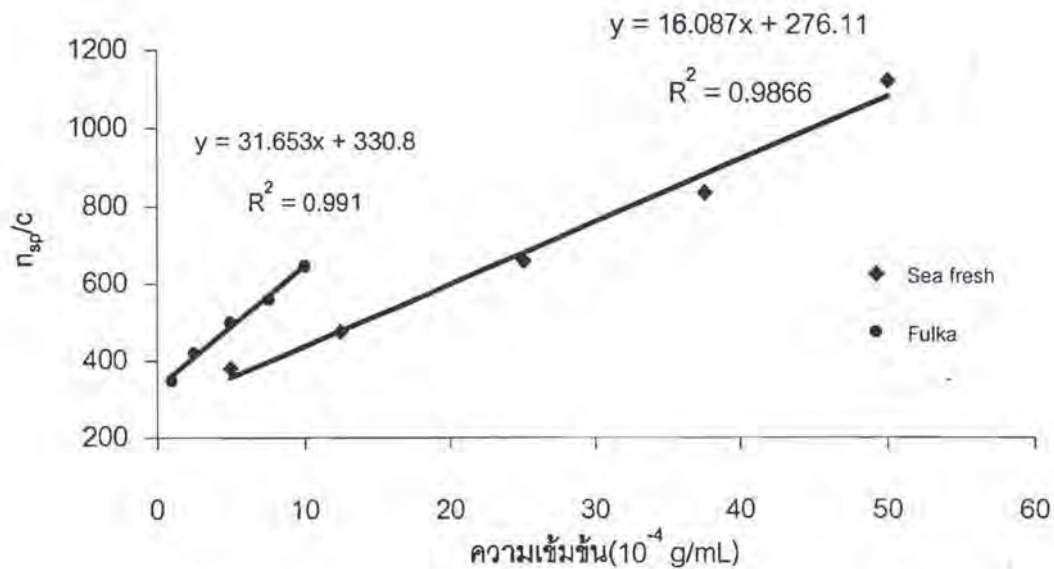
ความเข้มข้น c ($\times 10^{-4}$ g/mL)	เวลา (วินาที)			เวลาเฉลี่ย* t (วินาที)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/c
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3				
0.0	5.71	5.75	5.73	5.72	-	-	-
0.5	5.76	5.72	5.62	5.74	1.0035	0.0035	70
1.0	5.95	5.93	5.91	5.92	1.0350	0.0350	350
2.5	6.39	6.31	6.33	6.32	1.1052	0.1052	420
5.0	7.13	7.19	7.16	7.15	1.2506	0.2506	501
7.5	8.22	8.10	8.12	8.11	1.4089	0.4089	559
10	9.36	9.41	9.40	9.41	1.6467	0.6467	647

* เป็นค่าที่ได้จากการเฉลี่ยสองค่าที่ใกล้เคียงกันที่สุด

ตารางที่ 3.2 แสดงความเข้มข้นและเวลาที่ตัวทำละลายและสารละลายโคโตซานจาก Sea Fresh เคลื่อนผ่านหลอด Ubbelohode Viscometer

ความเข้มข้น c ($\times 10^{-4}$ g/mL)	เวลา (วินาที)			เวลาเฉลี่ย* t (วินาที)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/c (mL/g)
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3				
0.0	5.78	5.71	5.75	5.77	-	-	-
2.5	6.34	6.35	6.41	6.35	1.1005	0.1005	402.0
5.0	6.85	6.82	6.87	6.87	1.1906	0.1906	381.2
12.5	9.19	9.20	9.29	9.20	1.5945	0.5945	475.6
25.0	15.25	15.28	15.02	15.27	2.6464	1.6464	658.6
37.5	23.89	23.77	24.10	23.83	4.1300	3.1300	834.7
50.0	38.13	38.12	38.49	38.13	6.6083	5.6083	1121.7

* เป็นค่าที่ได้จากการเฉลี่ยสองค่าที่ใกล้เคียงกันที่สุด



รูปที่ 3.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง η_{sp}/c กับ ความเข้มข้นของโคโตซาน

ความสัมพันธ์ระหว่าง η_{sp}/c กับ c เป็นกราฟเส้นตรง (รูปที่ 3.1) โดยการประมาณค่าแบบ least square ที่มีค่า $R^2 \approx 0.99$ ซึ่งค่า Y-intercept = $[\eta]$ สามารถนำมาคำนวณหาโมเลกุลของ โคโตซานได้ โดยใช้สมการของ Mark-Houwink

$$\log[\eta] = a \log M_v + \log K$$

สำหรับกราฟของโคโตซานจาก Fluka มีค่า Y-intercept = 330.8 ให้ค่า $[\eta]$ ของโคโตซานจาก Fluka เป็น 330.8 ส่วนค่าคงที่ a และ K ได้จากเอกสารอ้างอิง¹² มีค่าเท่ากับ 0.93 และ 1.8×10^{-3} g/mL ตามลำดับ เมื่อแทนที่ลงในสมการจะได้มวลโมเลกุลของโคโตซานจาก Fluka เป็น 454,928 หรือคิดเป็นจำนวนหน่วยซ้ำประมาณ 2,823 หน่วย ในทำนองเดียวกัน เมื่อแทนค่า $[\eta] = 276.1$ ของโคโตซานจาก Sea Fresh จะคำนวณมวลโมเลกุลของโคโตซานได้เป็น 376,810 ซึ่งคิดเป็นหน่วยซ้ำประมาณ 2,338 หน่วย

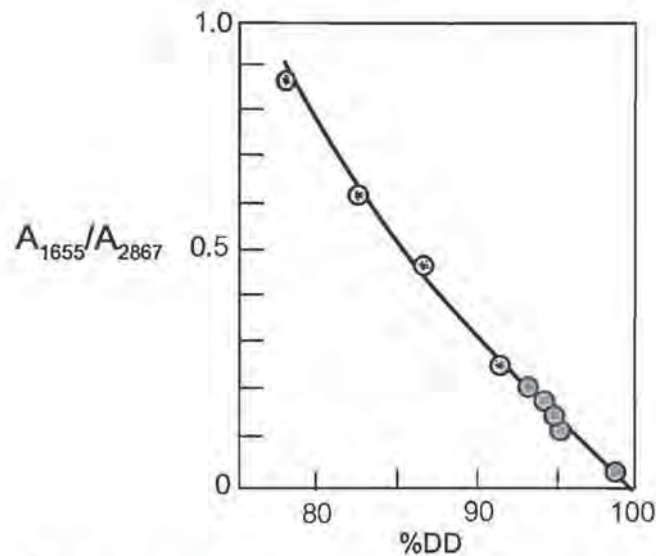
ในการทดลองนี้จะเห็นว่าได้มีการเติมตัวทำละลายผสมระหว่าง กรดอะซิติก และ NaCl เพื่อนำไปละลายโคโตซาน เหตุที่ต้องผสม NaCl ลงไปในตัวทำละลายเพื่อทำให้สายโมเลกุลของโคโตซานขดตัวกันเป็นก้อนอนุภาค เพราะในสภาวะกรดโคโตซานเกือบทุกหน่วยซ้ำจะถูกโปรโตเนตเป็นประจุบวก ทำให้เกิดการผลักกันและสายพอลิเมอร์ยืดออกเป็นเส้นตรงยาว ๆ ซึ่งไม่เหมาะที่จะใช้หามวลโมเลกุลโดยวิธี intrinsic viscometry ที่มีสมมุติฐานว่าโมเลกุลเป็นอนุภาคกลม ทำให้การเติมไอออนลบ เช่น Cl^- จะช่วยลดแรงผลักระหว่างหน่วยซ้ำสายพอลิเมอร์สามารถขดเป็นอนุภาคสอดคล้องกับทฤษฎีที่นำมาคำนวณมวลโมเลกุล

3.2 การหา Degree of deacetylation (%DE)

Degree of deacetylation สามารถหาได้หลายวิธี แต่เทคนิค FTIR spectroscopy เป็นเทคนิคที่นิยมใช้เนื่องจากทำได้สะดวก โดยหาได้จากกราฟพื้นที่ใต้พีคที่ตำแหน่ง 1655 cm^{-1} และ 2867 cm^{-1} ดังในตารางที่ 3.3 มาหาอัตราส่วนระหว่าง พื้นที่ใต้พีค $1655 \text{ cm}^{-1}/2867 \text{ cm}^{-1}$ แล้วนำค่าดังกล่าวมาเทียบกับ calibration curve รูปที่ 3.2 ที่ได้จากเอกสารอ้างอิง¹³ ในการทดลองนี้จะเห็นว่าโคโตซานทั้งสามชนิดมี %DE ใกล้เคียงกัน คือระหว่าง 89% ถึง 93%

ตารางที่ 3.3 แสดงชนิดโคโตซาน พื้นที่ใต้พีค อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค และ %DE ของโคโตซานชนิดต่างๆ

ชนิดของโคโตซาน	พื้นที่ใต้พีค 1655 cm^{-1}	พื้นที่ใต้พีค 2867 cm^{-1}	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค $1655 \text{ cm}^{-1}/2867 \text{ cm}^{-1}$	%DE
Fluka	257	1192	$\cong 0.21$	93
Sea Fresh	904	3231	$\cong 0.27$	91
Fibre net	744	2034	$\cong 0.36$	89



รูปที่ 3.2 แสดง calibration curve ของ Degree of deacetylation

3.3 การสกัดหาปริมาณ 2,4-D ในสารละลาย

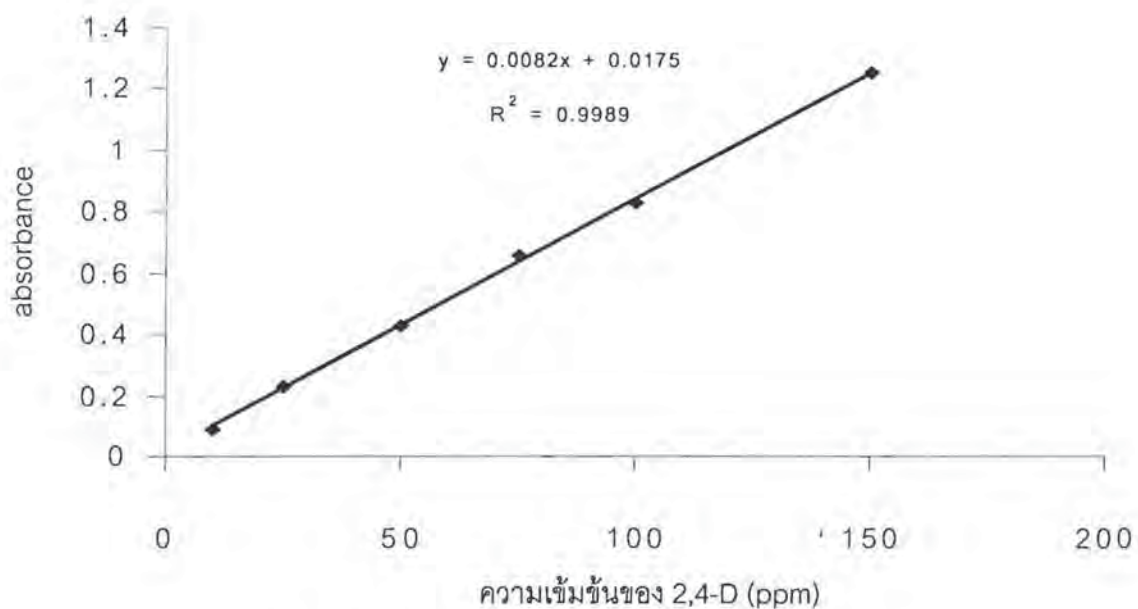
ในขั้นแรกได้มีการสร้าง calibration curve ดังรูปที่ 3.3, 3.4 และ 3.5 โดยใช้ UV-Vis spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} ของ 2,4-D แล้วจึงได้ทำการสกัดหาปริมาณ 2,4-D อิสรระที่ไม่ถูกจับยึดโดยโคโคซาน โดยสร้าง calibration ของ 2,4-D และ โคโคซานในตัวทำละลาย CH_2Cl_2 , H_2O และ 1% กรดอะซีติก

3.3.1 การสร้าง calibration curve

calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำ

ตารางที่ 3.4 แสดงค่าการดูดกลืนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 2,4-D ในน้ำ ที่ 284 nm

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืน
10	0.0899
25	0.2321
50	0.4239
75	0.6578
100	0.8256
150	1.2538

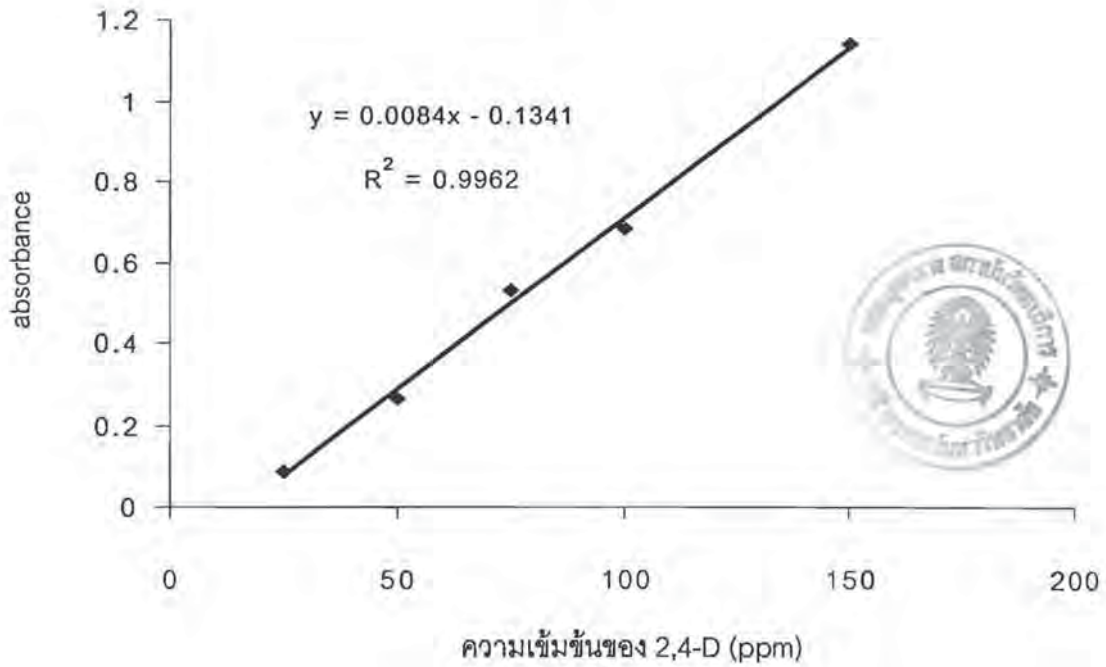


รูปที่ 3.3 calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำ

calibration curve ของ 2,4-D ใน CH_2Cl_2

ตารางที่ 3.5 แสดงค่าการดูดกลืนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ 2,4-D ใน CH_2Cl_2 ที่ 284 nm

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืน
25	0.0878
50	0.2628
75	0.5320
100	0.6851
150	1.1399

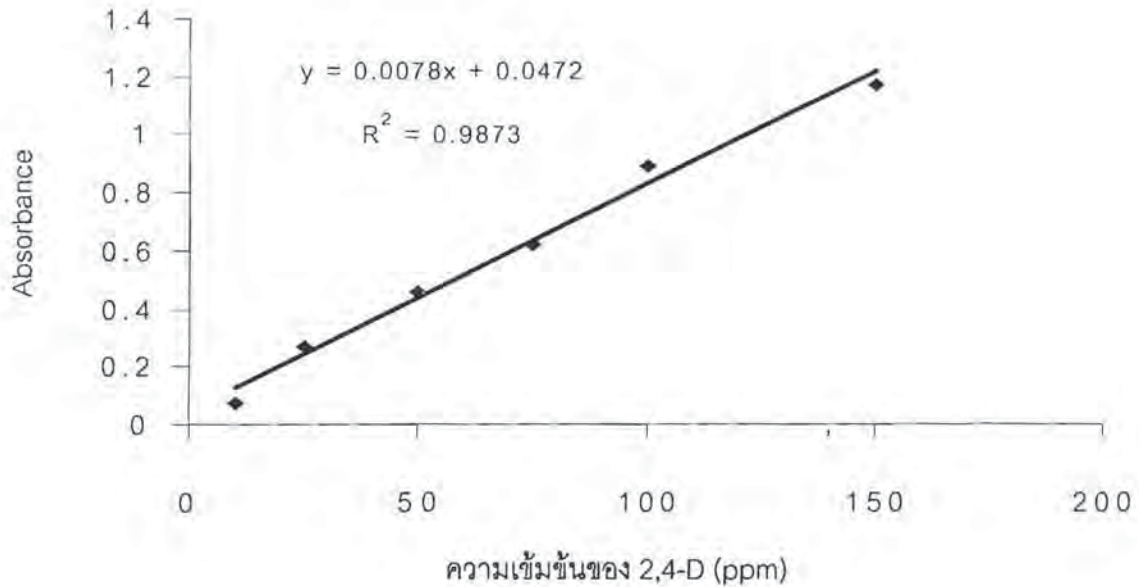


รูปที่ 3.4 แสดง calibration curve ของ 2,4-D ใน CH_2Cl_2

Calibration curve of 2,4-D + ไคโตซาน ใน 1% กรดอะซิติก

ตารางที่ 3.6 แสดงค่าการดูดกลืนที่ความเข้มข้นต่างๆของ 2,4-D:ไคโตซาน (1:1 โดยโมล) ใน 1% กรดอะซิติก ที่ 284 nm

ความเข้มข้น (ppm)	ค่าการดูดกลืน (A284)
10	0.0781
25	0.2668
50	0.4583
75	0.6180
100	0.8912
150	1.1710



รูปที่ 3.5 calibration curve ของ 2,4-D:โคโตซาน (1:1โดยโมล) ใน 1% กรดอะซีติก

3.3.2 การสกัด 2,4-D ในสารละลาย

เพื่อศึกษาว่าโคโตซานสามารถจับ 2,4-D ในรูปสารละลายที่นำมาทำการทดสอบหาการปลดปล่อยและฤทธิ์ทางชีวภาพ เราจึงวัดความสามารถในการยึดจับ 2,4-D โดยการทำการสกัดสารละลาย 2,4-D จากสารละลายผสมระหว่าง 2,4-D:โคโตซาน (1:1โดยโมล) ใน 1% กรดอะซีติก เปรียบเทียบกับการสกัด 2,4-D ในน้ำ

ตารางที่ 3.7 ความเข้มข้นของ 2,4-D ในชั้นน้ำ และชั้น CH_2Cl_2 ที่สกัดได้จาก 2,4-D 100 ppm ในน้ำ

ครั้งที่	ชั้นน้ำ		ชั้น CH_2Cl_2	
	Absorbance	ความเข้มข้น (ppm)	Absorbance	ความเข้มข้น (ppm)
1	0.3943	46	0.4125	33
2	0.2582	29	1.5890	205
3	0.2802	32	1.0083	136

สกัด 2,4-D เข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 15mL ด้วย CH_2Cl_2 15 mL แล้ววางให้แยกชั้นเป็นเวลา 1 วัน แล้วแยกชั้นน้ำมาวัดค่า absorbance นำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบกับ calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำที่เตรียมไว้ ได้ผลดังตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 แสดงปริมาณ 2,4-D ในชั้นน้ำที่ได้จากการสกัด 2,4-D 100 ppm ในน้ำ

ชุดการทดลอง	Absorbance	ความเข้มข้น(ppm)
1	0.1409	15
2	0.1342	14
3	0.1332	14
4	0.2095	23
5	0.2174	24

สกัด 2,4-D จากสารละลายโคโคซาน:2,4-D (1:1โดยโมล) เข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 15mL ด้วย CH_2Cl_2 15 mL แล้ววางให้แยกชั้นเป็นเวลา 1 วันแล้วแยกชั้นน้ำมาวัดค่า absorbance นำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบกับ calibration curve ของ 2,4-D ในน้ำที่เตรียมไว้ ได้ผลดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 แสดงปริมาณ 2,4-D ในชั้นน้ำ ที่สกัดได้จาก 2,4-D 100 ppm ในสารละลายโคโคซาน:2,4-D (1:1 โดยโมล) ใน 1% กรดอะซิติก

การทดลองครั้งที่	ค่าabsorbanceที่ 284nm	ความเข้มข้น(ppm)
1	0.0947	6.09
2	0.0921	5.76
3	0.0975	6.44
4	0.0941	6.01
5	0.0948	6.10

ในการทดลองแรกในการสกัด (ตารางที่ 3.7) เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัด ในการทดลองนี้ เลือก CH_2Cl_2 เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากสามารถละลาย 2,4-D และไม่ดูดกลืนแสง UV ที่ λ_{max} ของ 2,4-D (284 nm) แต่จากผลการทดลองพบว่าการใช้ CH_2Cl_2 มีข้อเสียคือ เป็นตัวทำละลายที่ระเหยง่ายมาก ซึ่งการระเหยนี้เองจะทำให้ความเข้มข้นที่วัดได้จากชั้น CH_2Cl_2 นั้นไม่คงที่และมีค่ามากกว่าที่ควรจะเป็น

ในการทดลองต่อไป เราจึงเลือกที่จะติดตามความเข้มข้นของ 2,4-D ในชั้นน้ำเท่านั้น การสกัด 2,4-D จากสารละลายผสมระหว่าง โคโคซาน:2,4-D (1:1 โดยโมล) ใน 1% กรดอะซิติก (ตารางที่ 3.9) พบว่า 2,4-D เกือบทั้งหมดสามารถถูกสกัดออกมาด้วย CH_2Cl_2 ได้ และได้มากกว่าการสกัดสารละลาย 2,4-D ในน้ำ (ตารางที่ 3.8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในสภาวะสารละลายนี้โคโคซานไม่สามารถยึดจับ 2,4-D ไว้ได้เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาพที่เป็นกรดของสารละลายอันเนื่องมาจาก 1%กรดอะซิติก ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับโคโคซาน

3.4 การหาอัตราเร็วในการปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มของผสม

เพื่อศึกษาอัตราเร็วในการปลดปล่อย 2,4-D จากของแข็งที่เป็นของผสมระหว่าง โคโคซานและ 2,4-D เราจึงได้ทำการเตรียมของผสมระหว่าง โคโคซาน:2,4-D ที่อัตราส่วนต่างๆ หลังจากทีฟิล์มแห้งสนิทก็สามารถคำนวณ เปอร์เซ็นต์ 2,4-D โดยน้ำหนัก จากสูตร

$$\%2,4-D = \frac{\text{น้ำหนัก 2,4-D ที่ใส่เข้าไปในฟิล์มทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักรวมของฟิล์มแห้ง}} \times 100$$

ตารางที่ 3.10 แสดงน้ำหนักฟิล์มตัวอย่างแห้ง และเปอร์เซ็นต์ 2,4-D โดยน้ำหนัก

ฟิล์มตัวอย่าง	น้ำหนักแห้ง(g)	%ของ 2,4-D โดยน้ำหนัก
1A	2.6023	42.00
1B	1.1417	51.20
1C	1.1089	49.08
2A	3.0893	35.00
2B	1.5593	35.14
2C	1.6853	32.61
3A	3.6797	30.00
3B	2.0622	26.67
3C	2.0694	26.50
5A	2.9736	18.46
5B	3.0375	18.02
10A	5.1831	10.58
10B	5.1295	10.66
15A	7.0380	7.78
15B	7.0946	7.75
20A	4.3967	6.25
20B	4.4120	6.13

จากนั้นนำฟิล์มตัวอย่างชุด 1A,1B,3A,3B,5A,5B,10A,10B,20A และ 20B ชุดละสองตัวอย่างมาทำการหาอัตราเร็วในการปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มโคโตะซาน โดยคำนวณน้ำหนักของฟิล์มที่ต้องใช้โดยให้มีปริมาณ 2,4-D (ในน้ำ 500 mL) ให้อยู่ในช่วง 80-100 ppm เพื่อให้สอดคล้องกับ calibration curve ที่เตรียมไว้

$$\text{น้ำหนักฟิล์มที่ซั่ง} = \frac{\text{น้ำหนักฟิล์มแห้งทั้งหมด} \times \text{น้ำหนัก 2,4-D ที่ต้องการ}}{\text{น้ำหนัก 2,4-D ในฟิล์มทั้งหมด}} \times 100$$

ตารางที่ 3.11 แสดงน้ำหนักของฟิล์มที่ใช้ในการหาการปลดปล่อย และน้ำหนักของ 2,4-D ที่มีอยู่ในฟิล์ม

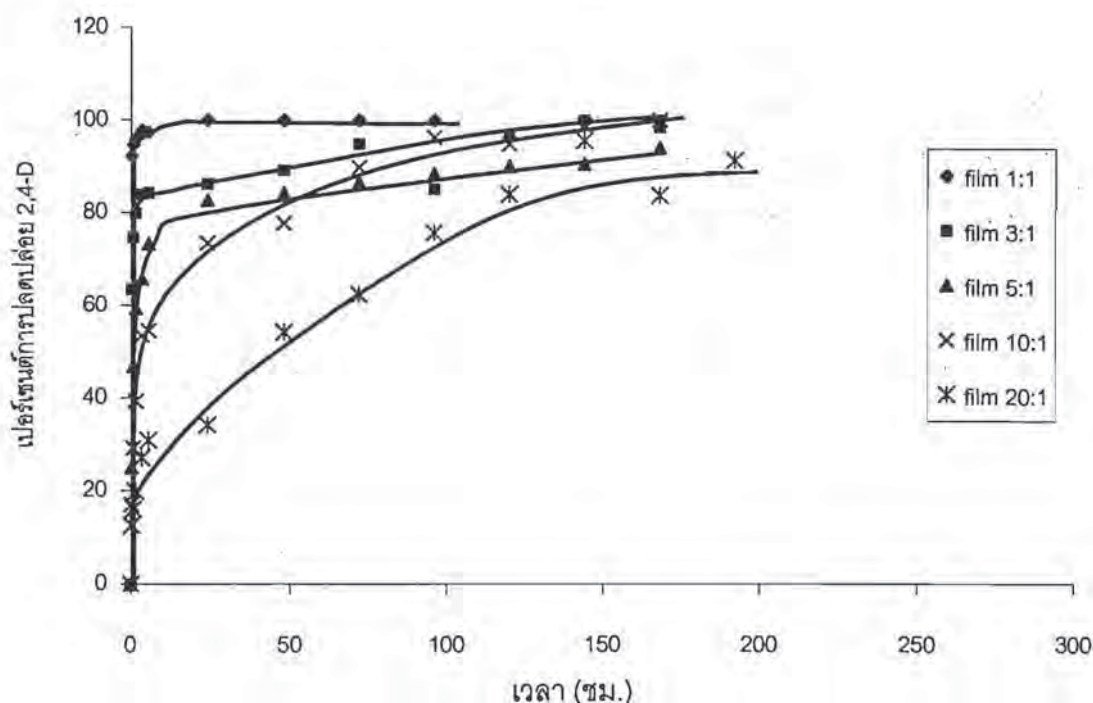
Code	ชุดที่ 1		ชุดที่ 2	
	น้ำหนัก(g)	ปริมาณ 2,4-D (ppm)	น้ำหนัก(g)	ปริมาณ 2,4-D (ppm)
1A	0.1540	130	0.1516	128
1B	0.0848	81	0.0881	85
3A	0.2503	149	0.2494	149
3B	0.1565	83	0.1571	84
5A	0.3084	114	0.3064	113
5B	0.2521	91	0.2483	89
10A	0.5133	109	0.5082	108
10B	0.4300	92	0.4163	90
15A	0.7034	109	0.7050	110
15B	0.5703	88.35	0.5743	89
20A	0.8630	108	0.8778	110
20B	0.7287	89	0.7276	89

ความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ปลดปล่อยออกมาจากฟิล์มตัวอย่างได้จากการเทียบค่า absorbance ของสารละลายกับ calibration curve และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย 2,4-D ดังแสดงในตารางที่ 3.12

ตารางที่ 3.12 เปอร์เซนต์การปลดปล่อย 2,4-D จากฟิล์มที่มีอัตราส่วน โคโคซาน:2,4-D ต่าง ๆ

โคโคซาน : 2,4-D	เปอร์เซนต์การปลดปล่อย 2,4-D ที่เวลาต่าง ๆ (ชม)*														
	0	0.24	0.72	1.5	3.5	5.5	24	48	72	96	120	144	168	192	240
1:1	0	92.3	94.7	95.9	97.7	97.4	100	100	100	100					
3:1	0	63.4	74.5	79.8	84.0	84.2	86.1	89.1	94.8	85.1	96.4	100	98.4		
5:1	0	24.9	46.8	59.3	65.7	73.3	82.7	84.1	86.6	88.4	90.0	90.5	94.0		
10:1	0	17.0	29.1	39.3	53.4	54.5	73.4	77.7	89.8	96.3	94.8	99.0	100		
20:1	0	12.5	16.0	19.8	27.0	30.8	34.1	54.2	62.4	75.7	75.2	84.0	95.6	83.7	91.3

*ได้จากการเฉลี่ย 4 ชุดการทดลอง

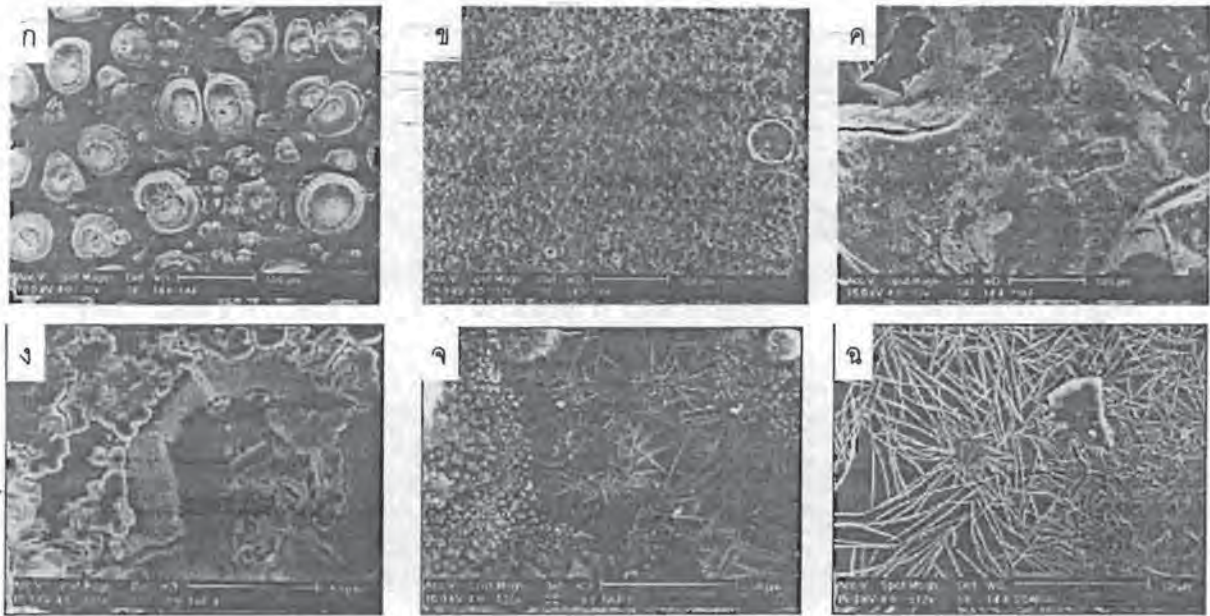


รูปที่ 3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย 2,4-D กับเวลา ของฟิล์มที่อัตราส่วนของโคโตซานต่อ 2,4-D เป็น 1:1, 3:1, 5:1, 10:1 และ 20:1 ตามลำดับ

รูปที่ 3.6 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย 2,4-D กับเวลา ของฟิล์มที่อัตราส่วนของโคโตซานต่อ 2,4-D เป็น 1:1, 3:1, 5:1, 10:1 และ 20:1ตามลำดับ จากกราฟเราอาจกล่าวได้ว่าการปลดปล่อย 2,4-D เกิดขึ้นจากสองส่วนด้วยกัน คือส่วนแรกเกิดจากการละลายของ 2,4-D ที่อยู่บนผิวฟิล์มซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนที่สองเป็นช่วงที่เกิดจากการปลดปล่อย 2,4-D ที่อยู่ในเนื้อฟิล์มซึ่งเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และเมื่ออัตราส่วนของโคโตซานสูงขึ้น เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยที่เกิดขึ้นในช่วงแรกจะลดลง และ เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยในช่วงที่สองเพิ่มขึ้น

3.5 การวิเคราะห์พื้นผิวฟิล์มด้วยเครื่องมือ SEM

เมื่อนำฟิล์มตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย SEM (Scanning Electron Microscope) พบว่าฟิล์มที่มีอัตราส่วนของ โคโตซาน:2,4-D ต่ำๆ (1:1) มีผลึกของ 2,4-D ปรากฏบนผิวฟิล์มอย่างชัดเจน แต่ฟิล์มที่มีอัตราส่วนของ โคโตซาน:2,4-D สูงขึ้น มีผลึกของ 2,4-D ปรากฏบนผิวฟิล์มลดลงเรื่อยๆ จนไม่สามารถสังเกตเห็นได้ที่กำลังขยาย 32 เท่า แต่สามารถสังเกตเห็นผลึกได้เมื่อใช้กำลังขยายมากกว่า 500 เท่า (รูปที่ 3.7) ซึ่งช่วยสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าฟิล์มที่มีอัตราส่วนของโคโตซานต่ำๆ มี 2,4-D อยู่บริเวณพื้นผิวมากกว่า



รูปที่ 3.7 SEM micrographs ของฟิล์มที่เตรียมจากสารละลายของของผสม ไดโตซาน:2,4-D เป็น (ก) 1:1, (ข) 5:1 (ค) 20:1 ที่กำลังขยาย 32 เท่า และ (ง) 1:1, (จ) 5:1 (ฉ) 20:1 ที่กำลังขยาย 512 เท่า

3.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียว

เนื่องจากไม่สามารถจัดหาเมล็ดพันธุ์ของพืชที่เหมาะสมได้ เราจึงเลือกทดสอบการงอกของเมล็ดถั่วเขียวแทน เพราะทำได้สะดวก-สังเกตผลได้ง่ายและรวดเร็ว และต้นถั่วเขียวจัดเป็นพืชใบกว้างซึ่งเหมาะสมกับการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งของ 2,4-D

ในการทดสอบได้แบ่งออกเป็น 3 วิธีคือ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้สารละลาย การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้วิธีเคลือบเมล็ด และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้ฟิล์มตัวอย่างที่อัตราส่วนต่าง ๆ

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้สารละลาย

การทดลองได้ใช้สารละลาย 12 ชุดดังตารางที่ 3.13 ในการเพาะเมล็ดถั่วเขียว ผลการทดลองในตารางที่ 3.14 เป็นการแสดงจำนวนเมล็ดถั่วที่เกิดการงอกและยังไม่ตายในแต่ละวันและแสดงความยาวเฉลี่ยของลำต้นและรากเมื่อครบ 5 วัน โดยให้ต้นถั่วที่ตายและไม่งอกมีความยาวของลำต้นและรากเป็นศูนย์ ในการทดลองนี้ใช้น้ำกลั่นเป็นชุดทดลองควบคุม

ตารางที่ 3.13 แสดงส่วนประกอบต่างๆของสารละลายในแต่ละชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	สารละลาย
1 (blank)	น้ำกลั่น
2	ไคโตซาน 2.26×10^{-3} M ใน 1%กรดอะซีติก
3	ไคโตซาน 2.26×10^{-3} M ใน 0.5 %กรดอะซีติก
4	Na_2CO_3 2.26×10^{-3} M ในน้ำกลั่น
5	Na_2CO_3 2.26×10^{-3} M ใน 1%กรดอะซีติก
6	ไคโตซาน 2.26×10^{-3} M + Na_2CO_3 2.26×10^{-3} M ใน 1%กรดอะซีติก
7	2,4 - D 100 ppm ในน้ำกลั่น
8	2,4 - D 500 ppm ในน้ำกลั่น
9	2,4 - D 100 ppm + Na_2CO_3 4.5×10^{-4} M ในน้ำกลั่น
10	2,4 - D 500 ppm + Na_2CO_3 2.26×10^{-3} M ในน้ำกลั่น
11	2,4 - D 100 ppm + ไคโตซาน 4.5×10^{-4} M+ Na_2CO_3 4.5×10^{-4} M ใน กรดอะซีติก 1%
12	2,4 - D 500 ppm + ไคโตซาน 2.26×10^{-3} M+ Na_2CO_3 2.26×10^{-3} M ใน กรดอะซีติก 1%

ตารางที่ 3.14 จำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่งอกในแต่ละวัน และความยาวเฉลี่ยของลำต้นและราก และ pH ของสารละลายในวันที่ 5

ชุดการทดลอง	การงอกของเมล็ดในแต่ละวัน					ความยาวเฉลี่ย (cm)		pH
	1	2	3	4	5	ลำต้น	ราก	
Blank	60	60	58	58	58	15	7	6.5
2	0	0	0	0	0	0	0	2.8
3	0	0	0	0	0	0	0	3.2
4	58	60	60	60	60	2	2.7	7.3
5	0	0	0	0	0	0	0	3.1
6	0	0	0	0	0	0	0	3.5
7	49	57	46	26	0	0	0	3.6
8	45	52	40	30	0	0	0	3.3
9	37	49	47	37	0	0	0	6.2
10	33	54	53	33	0	0	0	6.5
11	0	0	0	0	0	0	0	6.3
12	0	0	0	0	0	0	0	3.3

ได้จากการเฉลี่ย 2 ชุดการทดลอง

เปอร์เซ็นต์การงอกคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ การงอก} = 100 \times \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}}$$

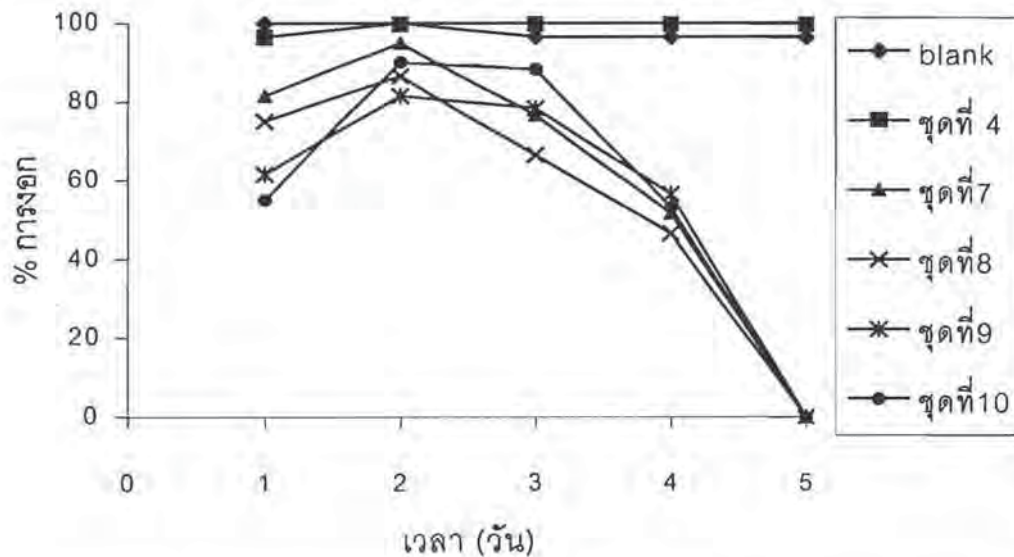
ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.15 ซึ่งสามารถแบ่งผลการทดลองได้เป็นสามกลุ่มด้วยกัน คือ กลุ่มแรกให้ เปอร์เซ็นต์การงอกเกือบ 100% ซึ่งกลุ่มนี้เป็นน้ำ (blank) และสารละลาย Na_2CO_3 (ชุดที่ 4) กลุ่มที่สองให้ เปอร์เซ็นต์การงอกเป็นศูนย์ตั้งแต่วันแรก ซึ่งกลุ่มนี้ได้แก่ชุดที่มีสารละลายที่มีกรดอะซีติกเป็นองค์ประกอบ (ชุดที่ 2, 3, 5, 6, 11 และ 12) ซึ่งสังเกตว่าเมล็ดมีลักษณะเหมือนเดิมแต่จะมีการบวมน้ำเล็กน้อยเท่านั้น และกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่เกิดการงอกเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงเมื่อเข้าสู่วันที่สาม (ชุดที่ 7, 8, 9 และ 10) ซึ่งกลุ่มนี้ได้แก่สารละลายที่มี 2,4-D เป็นองค์ประกอบแต่ไม่มีกรดอะซีติก จากการสังเกตพบว่าเมล็ดถั่วเขียวที่งอกแล้วจะเริ่มมีสีน้ำตาลที่บริเวณลำต้นและรากจนในที่สุดก็เน่าตายไป

ตารางที่ 3.15 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยใช้วิธีสารละลาย

วันที่	เปอร์เซ็นต์การงอก											
	blank	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	100.0	0	0	96.6	0	0	81.6	75.0	61.6	55.0	0	0
2	100.0	0	0	100	0	0	95.0	86.6	81.6	90.0	0	0
3	96.6	0	0	100	0	0	76.6	66.6	78.3	88.3	0	0
4	96.6	0	0	100	0	0	51.6	46.6	56.6	53.3	0	0
5	96.6	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0

ได้จากการเฉลี่ย 2 ชุดการทดลอง

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การงอกเฉพาะชุดที่มีการงอก คือชุดการทดลองที่เป็น blank, ชุดที่ 4, ชุดที่ 7, ชุดที่ 8, ชุดที่ 9 และ ชุดที่ 10 มาเขียนเป็นกราฟกับ เวลา ได้ผลดัง รูปที่ 3.8 ซึ่งเห็นได้ชัดว่าปริมาณของต้นถั่วจะมีมากที่สุดในวันที่ 2 และเริ่มลดลงในวันที่ 3



รูปที่ 3.8 กราฟเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวัน เฉพาะชุดการทดลองที่มีการงอก เมื่อใช้วิธีทดสอบโดยการใส่สารละลาย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่ากรดอะซีติกที่ใช้มีผลต่อการงอกของเมล็ดถั่วเขียว ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงได้พยายามลดความเข้มข้นของกรดอะซีติกให้ต่ำลง โดยทำการลดความเข้มข้นของกรดอะซีติก จาก 1% เป็น

0.5% ซึ่งความเข้มข้นนี้ก็ยังไม่ผลยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียวอยู่ จึงได้พยายามทำการลดความเข้มข้นลงไปอีกเป็น 0.1% ปรากฏว่าที่ความเข้มข้นนี้ไม่สามารถละลายโคโคซานได้จึงได้ยุติการทดสอบการงอกโดยวิธีนี้ และเปลี่ยนวิธีการทดสอบเป็นวิธีเคลือบเมล็ด

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้วิธีการเคลือบเมล็ด

จากการทดลองที่ผ่านมาการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยวิธีสารละลายให้ผลไม่ชัดเจนเนื่องจาก กรดอะซีติก มีผลยับยั้งการงอก ซึ่งรบกวนการสังเกตผลจากการออกฤทธิ์ของ 2,4-D ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการทดสอบเป็นวิธีการเคลือบเมล็ด ซึ่งใช้สารละลายจากการทดลองในหัวข้อ 3.4.1 มาเคลือบที่ผิวของเมล็ด เมื่อทำการนับจำนวนเมล็ดที่งอกในแต่ละวันและวัดความยาวลำต้นและรากในวันที่ 5 ได้ผลดังตารางที่ 3.16 โดยสัญลักษณ์ C ต่อท้ายชุดของสารละลายระบุว่าเป็นการทดสอบโดยวิธีการเคลือบเมล็ด ตารางที่ 3.17 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกในแต่ละวัน ซึ่งเขียนเป็นกราฟได้ดังรูปที่ 3.9

ตารางที่ 3.16 จำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่งอกในแต่ละวัน ความยาวเฉลี่ยของลำต้นและราก ในวันที่ 5

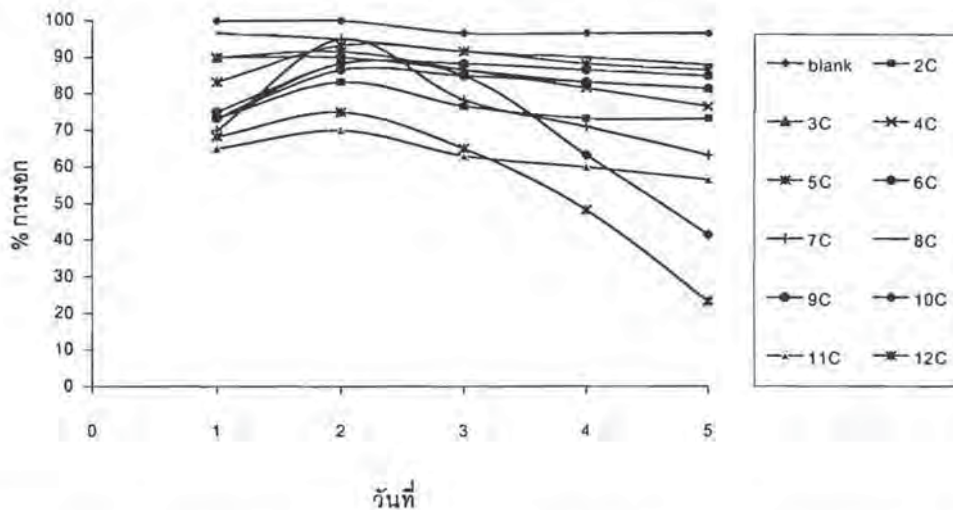
ชุดการทดลอง	การงอกของเมล็ดในแต่ละวัน					ความยาวเฉลี่ย (cm)	
	1	2	3	4	5	ลำต้น	ราก
Blank	60	60	58	58	58	15.0	7.0
2C	44	50	46	44	44	5.3	2.5
3C	54	54	52	50	49	5.6	3.6
4C	54	55	52	49	46	5.4	3.5
5C	50	56	55	53	52	4.8	3.5
6C	45	53	53	52	51	5.9	3.9
7C	42	57	47	43	38	1.9	1.2
8C	48	57	55	54	53	0.8	0.9
9C	44	52	51	50	49	1.9	1.7
10C	44	53	51	38	25	0.6	0.5
11C	39	42	38	36	34	1.0	0.9
12C	41	45	39	29	14	0.3	0.3

ได้จากการเฉลี่ย 2 ชุดการทดลอง

ตารางที่ 3.17 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยใช้วิธีเคลือบ

วันที่	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด											
	Blank	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C	11C	12C
1	100.0	73.3	90.0	90.0	83.3	75.0	70.0	96.6	73.3	65.0	65.0	68.3
2	100.0	83.3	90.0	91.6	93.3	88.3	95.0	95.0	86.6	70.0	70.0	75.0
3	96.6	76.6	86.6	86.6	91.6	88.3	78.3	91.6	85.0	63.0	63.0	65.0
4	96.6	73.3	83.3	81.6	88.3	86.6	71.0	90.0	63.3	60.0	60.0	48.3
5	96.6	73.3	81.6	76.6	86.6	85.0	63.3	88.0	41.6	56.6	56.6	23.3

ได้จากการเฉลี่ย 2 ชุดการทดลอง



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันเมื่อใช้การทดสอบโดยวิธีเคลือบเมล็ด

การทดลองนี้เป็นการจำลองการใช้สารกำจัดวัชพืชโดยวิธีฉีดพ่น ซึ่งสารเคมีดังกล่าวอาจจะแห้งและเคลือบอยู่บนเมล็ดหรือใบวัชพืชหรือพื้นดินบริเวณเป้าหมาย จะเห็นว่าเมล็ดถั่วที่เคลือบด้วยสารละลายที่ไม่มี 2,4-D เป็นองค์ประกอบให้ เปอร์เซ็นต์การงอกที่สูงและค่อนข้างคงที่ (ชุดที่ 1C-6C) ซึ่งแตกต่างจากชุดที่เคลือบด้วยสารละลายที่มี 2,4-D เป็นองค์ประกอบ (ชุดที่ 7C-12C) เมื่อเปรียบเทียบเส้นกราฟของชุดที่เคลือบด้วยสารละลายผสมที่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบ (11C 12C) กับชุดที่มีแต่ 2,4-D ไม่มีไคโตซาน (10C) พบว่าชุดที่มีไคโตซานมีผลในการฆ่าต้นถั่วได้ดีกว่า อาจเป็นเพราะไคโตซานช่วยยึด 2,4-D ให้ติดบนผิวเมล็ดได้ดีขึ้นทำให้มีปริมาณ 2,4-D ติดอยู่บนผิวเมล็ดมากกว่าในระหว่างการเคลือบ ในการทดสอบโดยวิธีการเคลือบเมล็ดนี้พบว่า

การตายของต้นถั่วไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดลงจนเป็นศูนย์เหมือนกับในวิธีสารละลายเพราะ คาดว่าเนื่องมาจากปริมาณของ 2,4-D ที่เคลือบบนผิวเมล็ดมีน้อยมากไม่เพียงพอที่จะทำให้เมล็ดหรือต้นถั่วตายได้ทั้งหมด

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโดยใช้วิธีฟิล์มตัวอย่าง

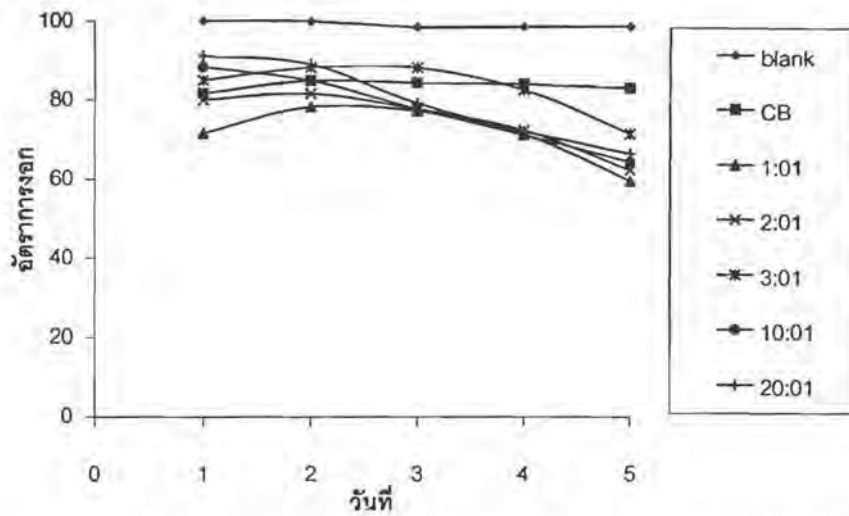
การทดลองนี้ออกแบบขึ้นเพื่อจำลองการใช้สารกำจัดวัชพืชโดยวิธีการหว่านหรือโปรยสารเคมีในรูปของแข็ง ซึ่งได้ทำการทดลองโดยนำแผ่นฟิล์มตัวอย่างที่มีอัตราส่วน ไคโตซาน:2,4-D ต่างๆ กัน ในปริมาณที่มี 2,4-D เท่าๆ กัน มาวางในภาชนะที่ใช้เพาะต้นถั่ว แล้วสังเกตผลการงอกเป็นเวลา 5 วัน และความยาวของลำต้นและรากในวันที่ 5 ดังตารางที่ 3.18 ส่วนเปอร์เซ็นต์การงอกแสดงในตารางที่ 3.19 ซึ่งนำมาเขียนกราฟได้ดังรูป 3.10

ตารางที่ 3.18 จำนวนเมล็ดถั่วเขียวที่งอกในแต่ละวัน และ ความยาวเฉลี่ยของลำต้นและรากในวันที่ 5

ชุดการทดลอง	การงอกของเมล็ดในแต่ละวัน					ความยาวเฉลี่ย (cm)	
	1	2	3	4	5	ลำต้น	ราก
Blank	60.0	60.0	58.0	58.0	58.0	15.0	7.0
CB	49.0	53.0	52.0	51.0	48.0	13.5	5.5
1:1	43.0	51.0	49.0	35.0	0.0	0.0	0.0
2:1	48.0	50.0	43.0	30.0	0.0	0.0	0.0
3:1	51.0	47.0	47.0	33.0	0.0	0.0	0.0
10:1	53.0	49.0	36.0	20.0	0.0	0.0	0.0
20:1	55.0	52.0	34.0	17.0	0.0	0.0	0.0

ตารางที่ 3.19 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยวิธีใช้ฟิล์มตัวอย่าง

วันที่	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด						
	Blank	CB	1:1	2:1	3:1	10:1	20:1
1	100	81.6	71.6	80	85	88.3	91.6
2	100	85	85	83.3	78.3	81.6	86.6
3	98.6	84.4	81.6	71.6	78.3	60	56.6
4	98.6	84	58.3	50	55	33.3	28.3
5	98.6	83	0	0	0	0	0



รูปที่ 3.10 กราฟแสดงอัตราการงอกของเมล็ดถั่วเขียวในแต่ละวันโดยใช้ฟิล์มตัวอย่างในอัตราส่วนต่าง ๆ

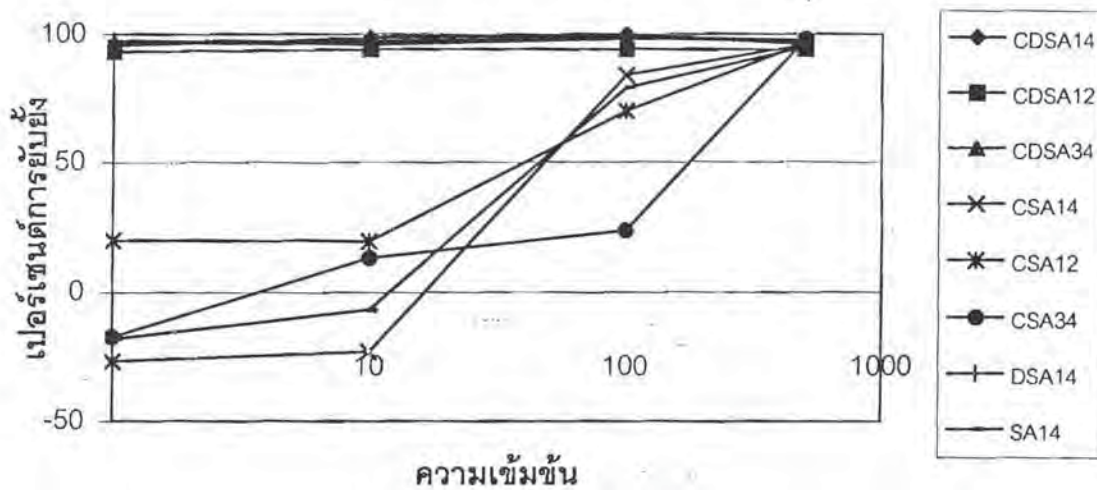
จากกราฟรูปที่ 3.10 ฟิล์มชุด CB เป็นฟิล์มไคโตซานที่ไม่มี 2,4-D เป็นองค์ประกอบ ให้ลักษณะกราฟใกล้เคียงกับ blank ซึ่งเป็นน้ำ ส่วนชุดฟิล์มที่มี 2,4-D เป็นองค์ประกอบสามารถยับยั้งการงอกได้เช่นเดียวกับสารละลาย สังเกตว่าชุดฟิล์มที่มีอัตราส่วนของ ไคโตซาน:2,4-D เป็น 1:1 ให้เส้นกราฟที่มีอัตราการงอกสูงในช่วงแรก และลดลงเมื่อเข้าสู่วันที่ 3 ซึ่งคล้ายกับการทดสอบด้วยวิธีสารละลาย 2,4-D ที่กล่าวมาแล้ว เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไคโตซานในฟิล์มให้สูงขึ้น แนวโน้มเปอร์เซ็นต์การงอกในช่วงสองวันแรกสูงขึ้นเล็กน้อย แต่จะทำให้ต้นถั่วตายอย่างรวดเร็วกว่าในวันถัดๆ มา

3.7 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์

การทดสอบทำโดยใช้สารละลายผสม 2,4-D และไคโตซาน ใน 1% กรดอะซีติกโดยมี Na_2CO_3 เป็นตัวปรับ pH ของสารละลาย ผลการทดสอบ (รูปที่ 3.11) แสดงให้เห็นว่าในช่วงความเข้มข้นของ 2,4-D สูงกว่า 10 ppm กรดอะซีติกมีผลในการยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์ (ดูเส้นกราฟของ SA14) ซึ่งรบกวนการแปลผลที่เกิดจาก 2,4-D และ ไคโตซาน แต่ที่ความเข้มข้นของ 2,4-D ต่ำกว่า 10 ppm กรดอะซีติกไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์ และไคโตซานไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์ (ดูเส้นกราฟของ CSA14, CSA12 และ CSA34) ส่วน 2,4-D (ดูเส้นกราฟของ DSA14) และของผสม 2,4-D กับไคโตซาน (ดูเส้นกราฟของ CDSA14, CDSA12 และ CDSA34) ยังคงมีผลยับยั้งการเจริญของลำต้นและรากของต้นกล้าไมยราบยักษ์ได้เกือบ ถึงแม้ที่ความเข้มข้นเพียง 1 ppm แสดงให้เห็นว่าไคโตซานไม่มีผลทางด้านลบต่อฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของต้นกล้าไมยราบยักษ์ของ 2,4-D

ตารางที่ 3.20 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของลำต้นของต้นกล้าไมยราบยักษ์

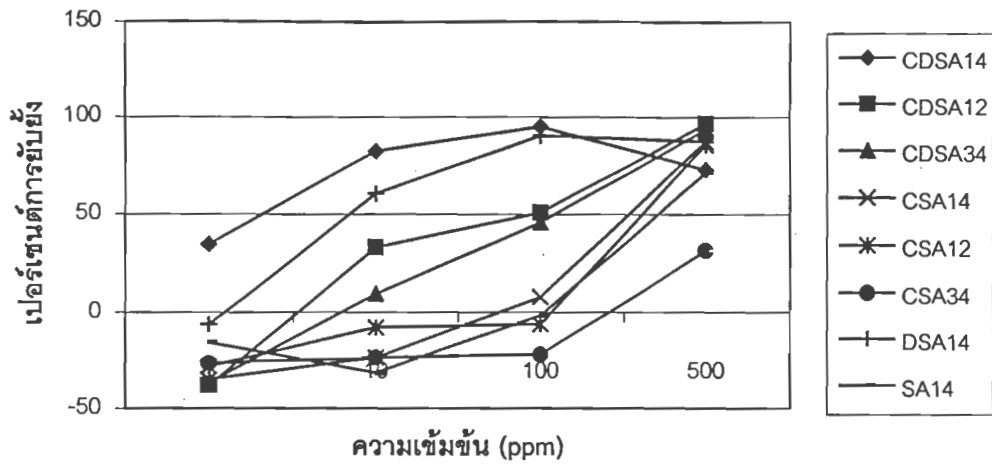
ความเข้มข้น (ppm)	CDSA14	CDSA12	CDSA34	CSA14	CSA12	CSA34	DSA14	SA14
1	95.6	93.2	96.8	-26.7	19.9	-17.1	97.6	-17.9
10	98.8	94	96	-22.7	19.5	13.1	97.2	-6.7
100	100	94	98	84	70.1	23.5	98.8	79.2
500	96	94	98	96	96.4	98	96.8	94.8



รูปที่ 3.11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของลำต้นจากต้นกล้าไมยราบยักษ์

ตารางที่ 3.21 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรากของต้นกล้าไมยราบยักษ์

ความเข้มข้น	CD-14SA	CD-12SA	CD-34SA	CB-14SA	CB-12SA	CB-34SA	DB-14SA	4-14SA
1ppm	34.9	-38.1	-36.51	-34.9	-28.5	-26.9	-6.3	-15.8
10ppm	82.5	33.3	9.5	-23.8	-7.9	-23.8	60.3	-31.7
100ppm	95.2	50.7	46	7.9	-6.3	-22.2	90.4	-1.6
500ppm	73	96.8	93.7	87.3	85.7	31.7	87.3	71.4



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของลำต้นจากต้นกล้าไมยราบยักษ์

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาการใช้ไคโตซานเป็นสารควบคุมการปลดปล่อยสารกำจัดวัชพืช 2,4-D นี้ ได้ใช้ไคโตซาน จากบริษัท Sea Fresh ประเทศไทย ซึ่งมีมวลโมเลกุลที่หาได้จากวิธี viscometry ประมาณ 3.8×10^5 dalton และมี % DE ที่หาได้จาก IR Spectroscopy ประมาณ 91% พบว่าไคโตซานสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารกำจัด 2,4-D ได้นานขึ้นเมื่อใช้อัตราส่วนของ ไคโตซาน:2,4-D สูงขึ้น โดยที่อัตราส่วน 20:1 สามารถควบคุมการปลดปล่อยได้ประมาณ 8 วัน และสามารถสังเกตเห็นการปลดปล่อยที่รวดเร็วเกิดขึ้นในช่วง 2 ชั่วโมงแรกซึ่งสืบเนื่องมาจาก 2,4-D ที่อยู่บนพื้นผิวฟิล์ม ส่วน 2,4-D ที่อยู่ในเนื้อฟิล์มจะแพร่ออกมาอย่างช้าๆ

ผลการสกัดสารละลายผสมไคโตซานกับ 2,4-D ด้วย CH_2Cl_2 บ่งชี้ว่าไม่มีแรงกระทำระหว่างประจุของ หมู่แอมโมเนียมของสายไคโตซานกับหมู่คาร์บอกซิเลตของ 2,4-D จึงคาดว่า การควบคุมการปลดปล่อย 2,4-D ในเนื้อฟิล์มเกิดขึ้นจากการห่อหุ้มของสายพอลิเมอร์รอบโมเลกุล 2,4-D แต่ไม่ได้เกิดจากแรงกระทำระหว่างประจุ

ผลการทดสอบการยับยั้งการงอกของต้นถั่วและการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์บ่งชี้ว่าไคโตซานไม่มีผลทางด้านลบต่อฤทธิ์การยับยั้งของ 2,4-D แต่อาจมีผลช่วยให้ 2,4-D ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นโดยช่วยควบคุมการปลดปล่อยหรือช่วยจับยึด 2,4-D ให้ติดอยู่กับพื้นที่เป้าหมาย เมล็ดวัชพืชหรือต้นวัชพืชได้นานขึ้น

งานวิจัยในอนาคตจะมุ่งพัฒนาให้กระบวนการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางการเกษตรใช้ปริมาณไคโตซานในสัดส่วนที่น้อยลง และจะทำการศึกษาผลกระทบที่มีต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ จากการควบคุมการปลดปล่อย รวมทั้งพัฒนาเทคนิคการควบคุมการปลดปล่อยนี้กับสารออกฤทธิ์ประเภทอื่นอีกเช่น ฮอริโมนพืช

เอกสารอ้างอิง

1. กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช,คำแนะนำการควบคุมวัชพืช 2538, กลุ่มงานวิทยาการวัชพืชกองพฤกษศาสตร์ และวัชพืช การมวิชาการเกษตรและสหกรณ์, 2538, หน้า144
2. Kenawy E.R.; Sherrington D.C. *Chem Polm J.* 1992, 28, 841
3. Goosen,M.F.A., ed. *Application of Chitin and Chitosan*, Technomic Publishing Company PA,1997.
4. พรชัย เหลืองอากาศวัชพืชศาสตร์. กรุงเทพฯ, สำนักพิมพ์ริ้วเขียว, 2540, หน้า 284-475
5. Allen, G.G.; Chopra, C.S.; Neogi, A.N.; and Wilkens, R.M. *Nature* 1971, 234, 349.
6. McCormic, C.L.; Anderson, K.W.; Pelezo, J.A.;and Lichatowich, D.K. *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals* (edided by Lewis, D.H.). Plenum Press,1981, pp 195-224, New York
7. Tefft, J.;Friend, D.R. *Journal of Controlled Release*, 1993, 27, 27.
8. Kim, W.S.; Jung, S.W.; Lee, S.K. *Korea Polymer Journal.* 1997, 5, 238
9. Kim, W.S.; Jung, S.W.; Jang, J.K.; Kim, G.H. *Korea Polymer Journal.* 1998, 56 414,
10. Abdukkah, H.; Mansor, M. "Proceeding I (A) The 17thAsian-Pacific Weed Science Society Conference Weed and Environmental Impact November 22-27, 1999, Bangkok, Thailand."; Mitr Siam Press LTD., Printership, 1999, pp 347.
11. Daver, P. and Wightman, J.P. "Interaction of Pesticides with Chitosan." in *Adsorption from Aqueous Solutions*. P. H. Tewari, ed., New York; Plenum Publishing Corporation, pp. 163-137.
12. Maghami, G.C.; Roberts, G.A.F. *Makromol.* 1988, 189, 195.
13. Domzy, J.G.: Roberts, G.A.F. *Makromol.* 1985, 186, 1671.

ภาคผนวก

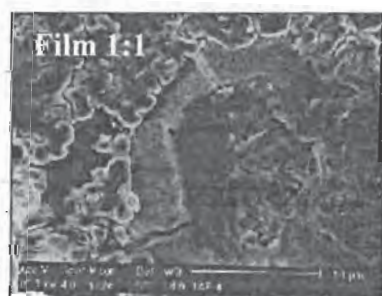
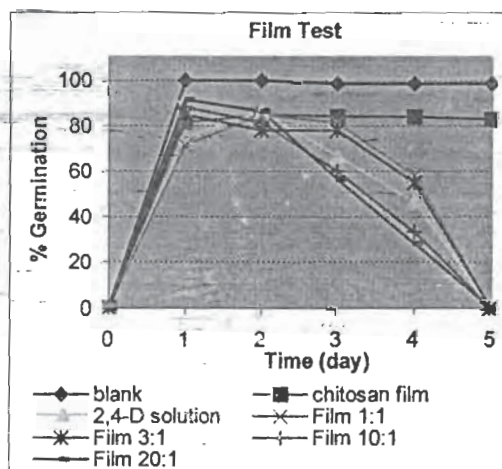
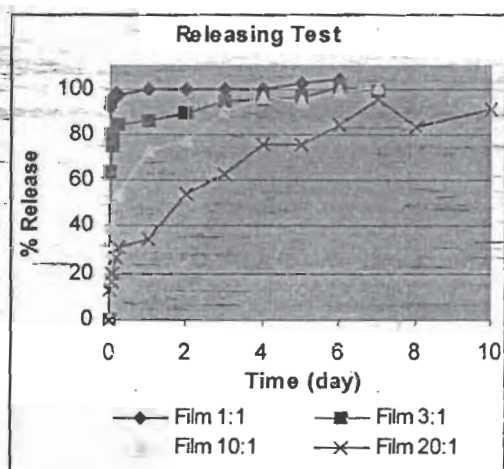
Chitosan as a Releasing Device for 2,4-D Herbicide

Mongkol Sukwattanasinitt[†], Akamol Klaikherd[†], Kanokkarn Skulnee[†], Sei-ichi Aiba[‡]

[†] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. (smongkol@chula.ac.th)

[‡] Department of Organic Materials, Osaka National Research Institute (ONRI), 1-8-31, Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan. (aiba@onri.go.jp)

The chitosan was tested as a releasing device for the herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Releasing percentages over time of 2,4-D in water from films prepared from solutions of different ratios of the chitosan to 2,4-D were determined. By increasing the ratio of the chitosan to 2,4-D from 1:1 to 20:1, the prepared films can control the rate of releasing of 2,4-D. The germination test on *Pailionaceae* seeds indicated that all the prepared films totally inhibited the germination within 5 days similar to the results when using only 2,4-D. With the films of the chitosan to 2,4-D-ratio of 20:1, the significantly lower germination percentages in the third and fourth dates were however observed. Scanning electron microscope (SEM) showed that less 2,4-D crystallized at the film surface and smaller 2,4-D particle appeared in the film of higher ratio of chitosan. Chitosan also assisted in the adherence of 2,4-D on the seeds in the coating experiment resulting in a better inhibition of the germination comparing to when the only 2,4-D solution was used for coating.





Chitosan as A Releasing Device for 2,4-D Herbicide

Mongkol Sukwattanasinitt[†], Akamol Klaikherd[†], Kanokkarn Skulnee[†], Sei-ichi Aiba[‡]

[†] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand. (smongkol@chula.ac.th)

[‡] Department of Organic Materials, Osaka National Research Institute (ONRI), 1-8-31, Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan. (aiba@onri.go.jp)

ABSTRACT

Releasing percentages over time of 2,4-D in water from films having different mole ratios of the chitosan to 2,4-D were determined. The film prepared from a solution of chitosan and 2,4-D with the ratio of 20:1 can control the release of 2,4-D up to seven days. Scanning electron microscope (SEM) showed that the films with higher ratio of chitosan have less 2,4-D on their surface. All the prepared films totally inhibited the germination of mungbean seeds (*Phaseolus aureus* Roxb.) within 5 days similar to the results obtained from pure 2,4-D. With the mole ratio of chitosan to 2,4-D equal to 20:1, the film however gave significantly lower germination percentages on the third and fourth dates. In the germination test using a seed coating technique, the lower germination percentages were observed when the solutions of the mixture of 2,4-D and chitosan were used in place of the pure 2,4-D solution.

INTRODUCTION

Controlled release formulations are generally used to maintain effective local concentration and minimize possible undesirable side effects of agrochemical. Synthetic polymers [1, 2] and biopolymers [3, 4] such as lignin, cellulose, starch and chitin have been used in controlled-release formulations for agrochemical [5]. Unlike in the controlled drug release systems, chitosan has been much less studied in the controlled agrochemical release systems [6] despite many beneficial effects of chitosan on plants have been claimed. We report here a study of utilization of chitosan in controlled-release system for 2,4-D herbicide.

EXPERIMENTAL

Films with the mole ratios of chitosan to 2,4-D being 1:1, 3:1, 5:1, 10:1 and 20:1, were prepared from the corresponding solutions of chitosan and 2,4-D in 1% AcOH in the presence of Na₂CO₃. The releasing tests were carried out by monitoring the concentrations of 2,4-D released into water (500 mL) from the films as a function of time. The 2,4-D concentrations were determined by UV-Vis absorption at 248 nm using a calibration curve in the concentration range of 10-150 ppm. The films with the mole ratio of 1:1, 3:1, 10:1 and 20:1 were tested for germination inhibition of mungbean seeds (*Phaseolus aureus*). The seeds were placed between two sets of dampen tissue papers lying on a plastic plate covered with a plastic bag. The numbers of germinated seeds were counted everyday for five days. For comparison purpose, water, 2,4-D and chitosan film were also tested. The seed coating experiments were performed in the similar fashion excepted for that the seeds were precoated with a solution of chitosan (91 mg) or 2,4-D (125 mg) or chitosan (91 mg) + 2,4-D (125 mg) in 1% AcOH (250 mL) containing Na₂CO₃ (60 mg) prior to the test.

RESULTS AND DISCUSSION

The releasing curves of the films of the mixtures of chitosan and 2,4-D consisted of two distinct regions (Figure 1a). The first region exhibited the fast release appearing within the first two hours and the second region displayed the slow release occurring after two days. The fast release should be corresponding to the dissolution of 2,4-D at the surface of the film. The SEM micrographs of the films (Figure 2) confirmed this supposition as the films with

higher mole ratios of chitosan possessed fewer observable 2,4-D particles or crystals on their surface. The film with the mole ratio of 1:1 released over 95% of its 2,4-D content within two hours while the film with the mole ratio of 20:1 released only 20% of its 2,4-D content in the first 2 hours and required seven days to reach 95% release (Figure 1b). All the films could totally inhibit the germination of mungbean seeds within five days when they were used at the level that 10 mg of 2,4-D presented in the films. There is an interesting note on the third and fourth dates that the films with higher mole ratio of chitosan showed higher germination inhibition. We have not had a definite explanation for this observation yet. In the seed coating experiment, chitosan improved the germination inhibition effect of 2,4-D by about 20% when the seeds were precoated with the solution of chitosan and 2,4-D.

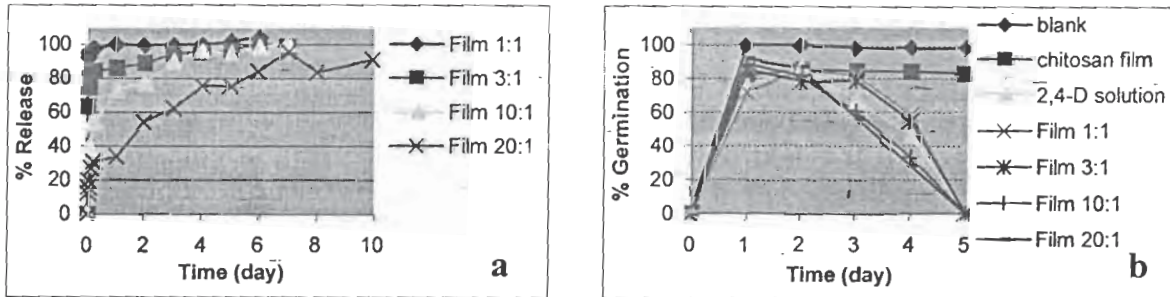


Figure 1 (a) releasing curves from films of chitosan containing 2,4-D at different mole ratios and (b) results from seed germination test for films of chitosan containing 2,4-D at different mole ratios -



Figure 2 SEM micrographs of the films prepared from solution with mole ratios of chitosan : 2,4-D being (a) 1:1, (b) 5:1 and (c) 20:1

CONCLUSION

Films with higher contents of chitosan can control the releasing of 2,4-D herbicide for longer periods. Chitosan has no apparent negative effect on the activity of 2,4-D. Chitosan can increase the adherence-ability of 2,4-D on the surface of the seeds in the seed coating test resulting in higher inhibition-activity. We are now currently working on finding other forms of the releasing device to reduce the amount of chitosan required for controlling the release.

REFERENCES

- [1] W.-S. Kim, S.-W. Jung, and S.-K. Lee, *Korea Polymer Journal*, **5**, 238-240(1997).
- [2] J. Tefft and D. R. Friend, *Journal of Controlled Release*, **27**, 27-35(1993).
- [3] C. L. McCormic, K. W. Anderson, J. A. Pelezo, and D. K. Lichatowich, in *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals*, D.H. Lewis, Editor, Plenum Press, New York. 195-224(1981).
- [4] A. Ferraz, J. A. Souza, F. T. Silva, A. R. Goncalves, R. E. Bruns, and A. R. Cotrim, *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 1001-1005(1997).
- [5] E. R. Kenaway and D. C. Sherrington, *Eur. Polym. J.*, **28**, 841-862(1992).
- [6] Y. Horibe, T. Amagaza, K. Sato, and T. Tsukiyama, *WO1997JP0004031*,(1998).