การใช้สีธรรมชาติจากกล้วยไม้เพื่อเป็นรีเอเจนท์สำหรับการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ยเคมี

Use of Natural Pigment from Orchid as a Reagent for Quantitative Analysis of Ammonia in Chemical Fertilizers

ธนิกานต์ สุขอร่าม[1] เพชรรัตน์ สิริศักดิ์วิสุทธิ์[2] และ สุมนมาลย์ จันทร์เอี่ยม[1,3]*

Thanikan Sukaram[1], Petcharat Sirisakwisut[2] and Sumonmarn Chaneam[1,3]*

[1]*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร*

[2]*โรงเรียนพระปฐมวิทยาลัย*

[3]*ห้องปฏิบัติการนวัตกรรม-วิจัยการไหลเพื่อวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*

[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University*

[2]*Phrapathom Witthayalai School*

[3]*Flow Innovation-Research for Science and Technology Laboratories (First Labs)*

Received : 11 June 2017

Accepted : 8 July 2017

Published online : 7 August 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้นำสีที่สกัดจากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล '*Dendrobium sonia earsakul*' มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนีย องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดคือสารประกอบในกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งมีสีแดงในสารละลายกรด สีม่วงในสารละลายกลาง และสีเขียวเหลืองในสารละลายเบส วิธีอ้างอิงอาศัยหลักการวิเคราะห์ด้วยระบบการไหลอัตโนมัติแบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน โดยฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าระบบเพื่อให้ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์เกิดเป็นแก๊สแอมโมเนีย แก๊สที่เกิดขึ้นจะแพร่ผ่านเมมเบรนของอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันและละลายลงในกระแสตัวรับซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์กรด-เบส โบรโมไทมอลบลู ทำให้ความเป็นกรด-เบส เปลี่ยนไป และเกิดการเปลี่ยนสีของสารละลาย ในงานวิจัยนี้ประยุกต์โดยการนำสารสกัดจากกล้วยไม้มาใช้แทนโบรโมไทมอลบลู พบว่าสามารถตรวจวัดด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิธีวิเคราะห์ที่ใช้รีเอเจนท์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ค่าความเป็นเส้นตรงดี โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 2.17 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดความเข้มข้นของตัวอย่างที่หาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 2.99 มิลลิโมลาร์ ความแม่นในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันเท่ากับ 0.70% (n=10, 20 mM NH_4Cl) และระหว่างวันเท่ากับ 2.62% (n=9, 20 mM NH_4Cl) สามารถวิเคราะห์ได้ 48 ตัวอย่างใน 1 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์แอมโมเนียในปุ๋ยตัวอย่างเมื่อใช้รีเอเจนท์ธรรมชาติที่พัฒนาขึ้นจะนำไปเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงต่อไป

คำสำคัญ : แอมโมเนีย ปุ๋ยเคมี กล้วยไม้ ระบบการไหลอัตโนมัติแบบโฟลอินเจคชัน อุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน

***Corresponding author. E-mail** : schaneam@gmail.com

Abstract

In this work, use of natural pigment, crude aqueous extracted from orchid '*Dendrobium sonia earsakul',* as a reagent for determination of ammonia was investigated. The extract contained anthocyanin compounds which is red in acidic solution, purple in neutral solution and greenish-yellow in alkaline solution. The reference method is based on flow injection analysis with gas diffusion unit (GD). The sample solution was injected and mixed with NaOH in order to generate ammonia gas. The gas consequently diffused through the PTFE membrane, at GD unit, and finally dissolved into bromothymol blue acceptor resulting in a change of pH. Our method proposes using of the orchid extract as acceptor reagent instead of using bromothymol blue. The change in color of the orchid extract is monitored using a spectrophotometer at 600 nm and correlates with the concentration of ammonia in the sample. The method shows good linear response with a detection limit of 2.17 mM and quantitation limit of 2.99 mM. Throughput of 48 samples/h was achieved. The intra-day precision is 0.70% (n=10, 20 mM NH_4Cl) and inter- day precision is 2.62% (n=9, 20 mM NH_4Cl). Comparison of sample analysis results obtained from our method and those obtained from reference method will be discussed.

Keywords : ammonia, fertilizer, orchid, flow injection analysis, gas diffusion unit

บทนำ

งานวิจัยที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญในการพัฒนาที่ยั่งยืนของระบบการวิเคราะห์ทางเคมีที่ทันสมัย ปัจจุบันพบว่าสารเคมีสังเคราะห์บางกลุ่มก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย และหากกำจัดทิ้งโดยไม่มีการบำบัดที่ถูกต้องก็จะเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมด้วย จากปัญหาดังกล่าวจึงมีนักวิจัยหลายกลุ่มหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีสังเคราะห์มาใช้สารจากธรรมชาติแทน โดยเฉพาะใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับกรด-เบส เช่น N. Chigurupati และคณะ (Chigurupati *et al*., 2002) นำสีที่สกัดจากกะหล่ำม่วง มาใช้เป็นเซนเซอร์วัดค่าความเป็นกรด-เบส ในกระบวนการสลายตัวของ chlorbutol พบว่าสีที่สกัดได้มีประสิทธิภาพดีแม้จะใช้ความเข้มข้นเพียงแค่ 0.015% w/v เท่านั้น G. Kavitha และคณะ (Kavitha *et al*., 2014) ใช้น้ำสกัดสีจากฝาง (*Caesalpinia sappan)* และใช้เมทานอลสกัดสีจากดอกรักเร่ *(Dahlia pinnata)* ทดสอบการเป็นอินดิเคเตอร์สำหรับกรด-เบส S. Singh และคณะ (Singh *et al*. 2011) ศึกษาคุณสมบัติของสีที่สกัดได้จากดอกไม้จำพวก*Cassia aungostifolia* Linn., *Thevetiaperuviana* (Pers.) K. Schum และ*Thevetiathvetiodes* (Kunth) K. Schum โดยใช้เอทานอลเป็นตัวสกัด พบว่าสามารถใช้เป็นพีเอชอินดิเคเตอร์บอกจุดยุติในการไตเตรทได้เช่นกัน นอกจากนี้มีกลุ่มวิจัยที่นำสีจากธรรมชาติมาประยุกต์เป็นเซนเซอร์บนบรรจุภัณฑ์เพื่อบอกความสดของเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมู เนื้อปลา (Zhang *et al*., 2014) และเนื้อกุ้ง (Kuswandi *et al*., 2012) ข้อดีของการใช้สารจากธรรมชาติเหล่านี้คือมีต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำ และมีขั้นตอนการเตรียมง่าย

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้มาใช้เป็นรีเอเจนท์ในการวิเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากกล้วยไม้เป็นดอกไม้ที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย สามารถสร้างรายได้สูงโดยมีมูลค่าการส่งออกปีละ 1,000 ล้านบาท (Chanthakul *et al*.,2013) โดยกล้วยไม้ที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกมีหลายสกุล แต่ส่วนใหญ่มากกว่า 80% ของกล้วยไม้ที่ปลูกเป็นสกุลหวาย โดยเฉพาะพันธุ์ '*Dendrobium sonia earsakul'* เนื่องจากมีสีสันสวยงาม ปลูกง่าย และราคาถูก อย่างไรก็ตามพบว่า มีบางช่วงที่ผลผลิตกล้วยไม้ออกมามากเกินความต้องการของตลาด ส่งผลให้ราคากล้วยไม้

ต่ำลง กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium sonia earsakul* นี้ กลีบดอกมีสีม่วง เมื่อทำการสกัดโดยใช้น้ำจะได้สารละลายใสสีม่วงสด มีรงควัตถุที่สำคัญคือแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) มีรายงานการประยุกต์แอนโทไซยานินในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์อื่นๆ แต่ละอนุพันธ์ของแอนโทไซยานินมีคุณสมบัติแตกต่างกันทั้งทางเภสัชวิทยาและชีววิทยาเช่น ความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) สามารถในการต้านอาการอักเสบ (anti-inflammatory) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Castaneda-Ovando *et al*., 2009) เป็นต้น นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันโดยจะขึ้นกับค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายนั้น (Castaneda-Ovando *et al*., 2009) โดยทั่วไปจะมีสีแดงในสารละลายกรด สีม่วงในสารละลายกลาง และสีเขียวเหลืองในสารละลายเบส ดังนั้นสารสกัดจากกล้วยไม้นี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์สำหรับกรด-เบสได้

แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญของพืชและสัตว์ แต่หากแอมโมเนียตกค้างในสิ่งแวดล้อมปริมาณมากก็จะส่งผลให้พืชและสัตว์ถึงตายได้ (Yuen & Shit, 2010) ในแหล่งน้ำที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะทำให้เกิดกระบวนการยูโทรฟิเคชั่น (eutrophication) ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในน้ำนั้น ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งน้ำอาจมาจากน้ำทิ้งครัวเรือน แหล่งอุตสาหกรรม หรือแหล่งเกษตรกรรม โดยเฉพาะบริเวณที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีปริมาณมาก การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียสามารถทำได้โดยใช้วิธีเนสเลอร์ (Nessler's method) โดยใช้เนสเลอร์รีเอเจนท์ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียได้ตะกอนสีเหลืองส้ม หรือน้ำตาล ขึ้นกับปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 400-425 นาโนเมตร (Jeong *et al.,* 2013) หรือใช้วิธีฟีเนต (Phenate method) โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์และฟีนอลลงในตัวอย่าง เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียที่ละลายอยู่ และมีโซเดียมไนโตรปรัสไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดสารละลายสีฟ้าหรือน้ำเงินเข้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร (Zhou, L. & Boyd, C. E., 2016) และเพื่อให้วิธีวิเคราะห์เป็นอัตโนมัติมากขึ้น มีการใช้ระบบการไหลมาวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียเช่นกัน โดยติดตามการเปลี่ยนสีของอินโดฟีนอล (indophenol) (Oliveira *et al*., 2009) หรือติดตามแสงฟลูออเรสเซนท์โดยใช้วิธีโอพีเอ (o-phthaldehyde, OPA) (Mana and Spohn, 2000)

งานวิจัยนี้ได้นำวิธีอ้างอิงในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (Van Son M. *et al*., 1983) มาประยุกต์โดยเสนอการใช้รีเอเจนท์ใหม่ที่สกัดได้จากกล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium sonia earsakul* อาศัยการทำงานของระบบการไหลอัตโนมัติแบบโฟลอินเจคชัน (Flow injection analysis, FIA) ร่วมกับอุปกรณ์คัดเลือกแก๊สแบบแก๊สดิฟฟิวชัน (Gas diffusion unit, GD) โดยฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าระบบ แอมโมเนียมไอออนในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์เกิดเป็นแก๊สแอมโมเนีย แก๊สที่เกิดขึ้นจะแพร่ผ่านไฮโดรโฟบิคเมมเบรนของอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน และละลายลงในกระแสตัวรับซึ่งเป็นสารสกัดจากกล้วยไม้ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส เปลี่ยนแปลง และเกิดการเปลี่ยนสีของสารสกัดจากกล้วยไม้ สามารถติดตามสัญญาณด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สุดท้ายได้นำวิธีที่ประยุกต์ขึ้นมาวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ยเคมี และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับการใช้โบรโมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์เป็นรีเอเจนท์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารละลาย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) และสารละลายทุกชนิดเตรียมในน้ำกลั่นจากระบบ reversed osmosis ตลอดการศึกษา สารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 M เตรียมโดยชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ (Carlo Erba, France) 1.3373 g ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 250.00 mLจากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น

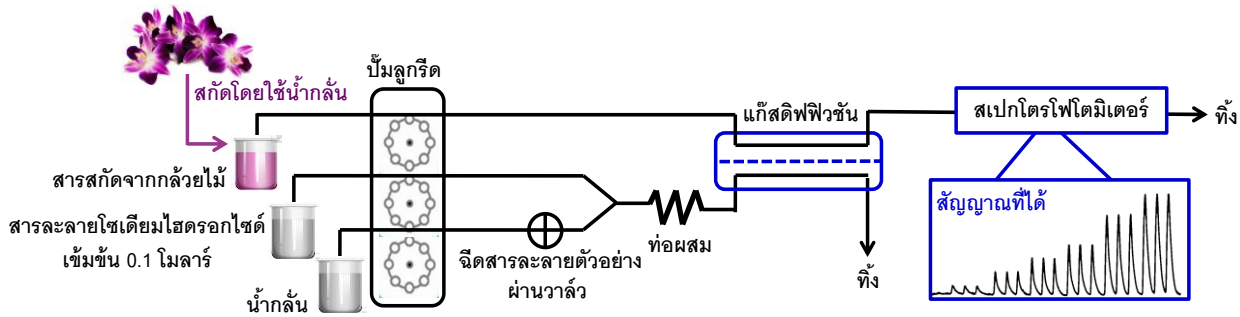
0.1 M เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carlo Erba, France) 1.00 g ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 250.00 mL สารละลาย 0.001 %w/v pH 6.3 ของโบรโมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์สำหรับใช้เป็นสารละลายตัวรับในวิธีอ้างอิง เตรียมโดยชั่งโบรโมไทมอลบลู (Fluka, Switzerland) 0.1 g ละลายในเอทานอล 100.00 mL จากนั้นปิเปตมา 1.00 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 100.00 mL ปรับ pH ของสารละลายด้วย 6 M โซเดียมไฮดรอกไซด์

2. การเตรียมสารสกัดจากกล้วยไม้

ชั่งดอกกล้วยไม้ที่ตากแห้งแล้ว 10.00 g นำมาต้มกับน้ำปริมาตร 100.0 mL ให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง (No.1, Wintech, Japan) จะได้สารละลายใสสีม่วงสด จากนั้นเจือจางสารละลาย 10 เท่า ด้วยสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์และปรับพีเอชให้ได้ 5.0 ด้วย 6 M โซเดียมไฮดรอกไซด์

3. การเตรียมตัวอย่างปุ๋ย

ตัวอย่างปุ๋ยเคมีซื้อจากร้านขายปุ๋ยทั่วไป เตรียมโดยชั่งปุ๋ย 0.1xxx กรัม ละลายน้ำ กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วปรับปริมาตรเป็น 50.00 mL



ภาพที่ 1 แผนภาพจำลองระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนีย

4. ระบบการไหลอัตโนมัติแบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน

เพื่อให้การวิเคราะห์แอมโมเนียทำได้อัตโนมัติและรวดเร็ว ในงานวิจัยนี้จึงใช้ระบบการไหลแบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันในการวิเคราะห์ ระบบการไหลประกอบด้วยปั๊มลูกรีด (peristaltic pump, Ismatec REGLO Analog 4-Ch Var-Speed pump, Switzerland) ทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลาย ฉีดสารละลายตัวอย่างผ่านวาล์ว (injection valve, V-540, Upchurch Scientific®, USA) เข้าสู่กระแสตัวพา (carrier stream) ซึ่งในงานวิจัยนี้เป็นน้ำกลั่นเพื่อให้ไหลไปผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์บริเวณท่อผสม (mixing coil) แอมโมเนียมในตัวอย่างจะเกิดปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์เกิดเป็นแก๊สแอมโมเนีย เมื่อไหลเข้าสู่อุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันแก๊สแอมโมเนียนี้จะแพร่ผ่านไฮโดรโฟบิคเมมเบรน (PTFE, 47 mm i.d., pore size 0.45 µm, Sartorius, Germany) แล้วละลายในกระแสตัวรับ (acceptor stream) ซึ่งเป็นสารสกัดจากกล้วยไม้ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายเปลี่ยนไป ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียวและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Lambda 35, Perkin Elmer, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยสัญญาณจะแสดงผลไปยังหน้าจอคอมพิวเตอร์ผ่านโปรแกรม Lamda 35 (Time

drive mode) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป (แกน Y) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

5. ศึกษาตัวทำละลายที่ใช้สกัด (Extractant)

ปัจจัยที่มีความสำคัญมากในการเตรียมสารสกัดจากดอกกล้วยไม้คือชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด ในงานวิจัยนี้ศึกษาตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำที่อุณหภูมิห้อง น้ำต้มเดือด เมทานอล และเอทานอล ทำการสกัดโดยชั่งดอกกล้วยไม้ *Dendrobium sonia earsakul* ที่ตากแห้งแล้วมา 10.0 g สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ สำหรับน้ำที่อุณหภูมิห้อง เอทานอล และเมทานอล จะแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 ºC) นาน 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดที่ได้มาเจือจาง 10 เท่า แล้ววัดการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ใช้น้ำต้มจนเดือดนาน 15 นาที เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่สกัดได้

6. ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อระบบการไหล

6.1 อัตราเร็วในการลำเลียงสาร (Flow rate)

เพื่อให้ระบบมีความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) สูงและวิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็ว ผู้วิจัยจึงศึกษาอัตราเร็วในการลำเลียงสารที่ดีที่สุดโดยจัดระบบการไหลดังภาพที่ 1 ใช้ปริมาตรตัวอย่างเท่ากับ 100 µL แล้วกำหนดค่าความเร็วด้วยปั๊มลูกรีดให้อัตราเร็วในการลำเลียงสารของสารละลายตัวรับคงที่เท่ากับ 1.0 mL/min (สารละลายตัวรับ หรือ acceptor stream, AC, หมายถึง orchid reagent ในภาพที่ 1) ใช้อัตราเร็วในการลำเลียงสารของสารละลายตัวให้เป็น 0.5 mL/min (สารละลายตัวให้ หรือ donor stream, DO, หมายถึง water carrier และ NaOH ในภาพที่ 1 ฉีดสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมเข้มข้น 5-40 มิลลิโมลาร์ วัดความสูงของสัญญาณที่ได้แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่เปลี่ยนอัตราเร็วในการลำเลียงสารของสารละลายตัวให้เป็น 1.0 และ 1.5 mL/min ตามลำดับ จากนั้นกำหนดอัตราเร็วในการลำเลียงสารของสารละลายตัวรับให้คงที่ แล้วเปลี่ยนอัตราเร็วในการลำเลียงสารของสารละลายตัวให้เป็น 0.5, 1.0 และ 2.0 mL/min ฉีดสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมเข้มข้น 5-40 มิลลิโมลาร์ วัดความสูงของสัญญาณที่ได้แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน

6.2 ศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่าง (Injection volume)

ทำการศึกษาโดยกำหนดค่าอัตราเร็วในการลำเลียงสารที่ดีที่สุดจากการศึกษาในข้อ 2.6.1 โดยใช้ปริมาตรตัวอย่าง 100 µL ฉีดสารละลายมาตรฐานแอมโมเนียมเข้มข้น 5-40 มิลลิโมลาร์ บันทึกค่าสัญญาณที่ได้ จากนั้นทำการทดลองเช่นเดิมแต่เปลี่ยนปริมาตรตัวอย่างเป็น 300 และ 500 µL นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน และเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์

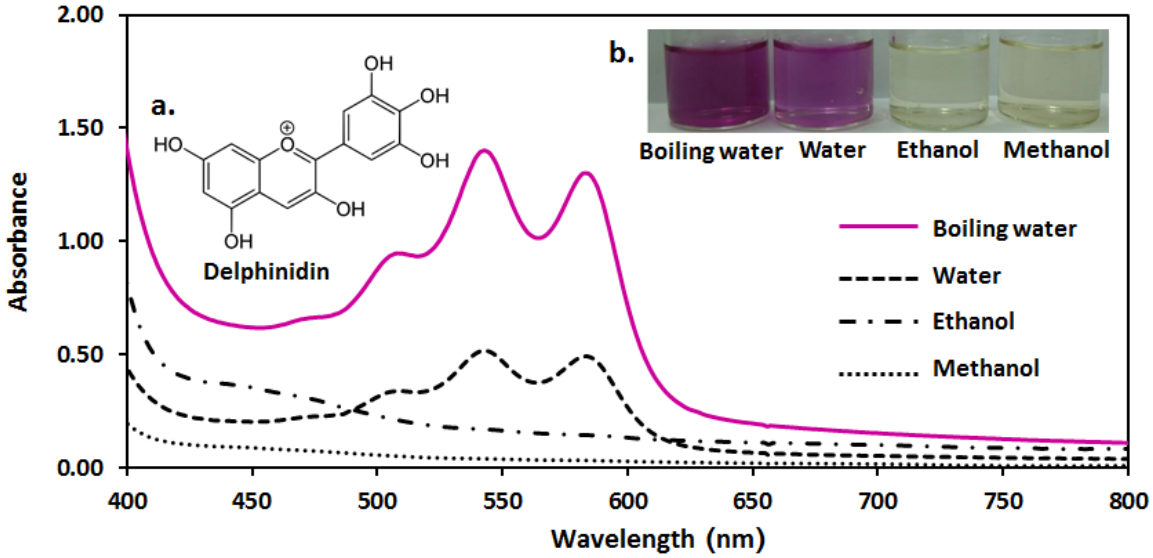
7. การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ยเคมีโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น

นำระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันที่พัฒนาขึ้นในงานนี้ไปประยุกต์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ยเคมี โดยฉีดสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแล้วเข้าระบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันด้วยสภาวะการทดลองที่เหมาะสม วัดค่าความสูงของสัญญาณ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม คำนวณความเข้มข้นแล้วรายงานในหน่วย % Nitrogen (w/w) พร้อมเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับวิธีโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน โดยจัดการทดลองเช่นเดียวกับในรูปที่ 1 แต่ใช้โบรโมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์เป็นสารละลายตัวรับแทนสารสกัดจากกล้วยไม้

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (Extractant)

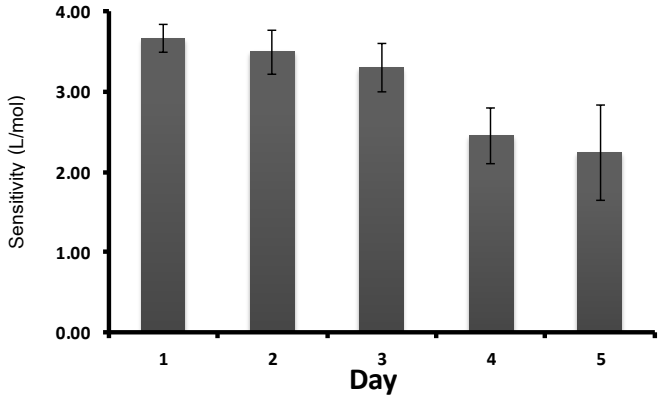
จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและต้มจนเดือดนาน 15 นาที มีค่าการดูดกลืนแสงดีที่สุดเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 2 ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากกล้วยไม้มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคืออนุพันธ์ของแอนโทไซยานิน โดยอนุพันธ์ที่สามารถพบได้ในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ที่มีสีม่วงคือ 'เดลฟินิดิน' (delphinidin) (Junka *et al*., 2011) ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2 a. จะเห็นว่าเดลฟินิดิน เป็นโมเลกุลที่มีสภาพขั้วสูง จึงถูกสกัดด้วยน้ำได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ และเมื่อให้ความร้อนโดยการต้มจนเดือดพบว่าสารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นด้วย (ภาพที่ 2 b.) นอกจากนี้การสกัดสารจากดอกกล้วยไม้โดยใช้น้ำต้มเดือดยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และลดการใช้สารเคมีอื่นๆ อีกด้วย โดยสารที่สกัดได้นี้มีอายุการใช้งานประมาณ 4 วัน เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ºC โดยในวันที่ 5 พบว่าความไวและความแม่นของการวิเคราะห์ลดลง สังเกตได้จากแถบค่าคลาดเคลื่อนในรูปที่ 3 นอกจากนี้สารสกัดจากกล้วยไม้ยังมีกลิ่นเน่าเสียเกิดขึ้นด้วย



ภาพที่ 2 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากดอกกล้วยไม้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน

(a.) โครงสร้างทางเคมีของเดลฟินิดิน

(b.) สีของสารที่สกัดได้เมื่อใช้ตัวทำลายเป็นน้ำต้มเดือด น้ำ เอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ

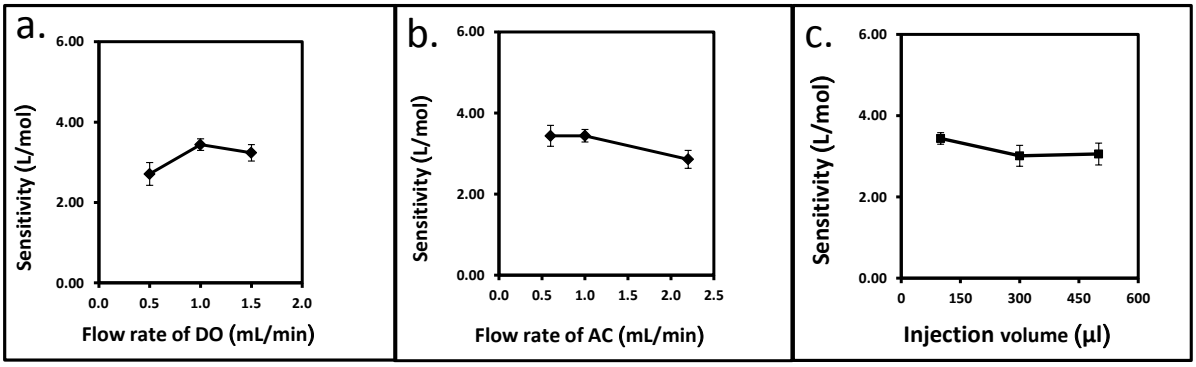


ภาพที่ 3 อายุการใช้งานของสารสกัดจากกล้วยไม้เมื่อทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2. ผลของปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อระบบการไหล

ผลของอัตราเร็วในการลำเลียงสารในระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันแสดงดังภาพที่ 4 เมื่อกำหนดให้อัตราการไหลของสารละลายตัวรับ (AC) คงที่ และเปลี่ยนอัตราการไหลของสารละลายตัวให้ (DO) พบว่าความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุดเมื่อใช้อัตราการลำเลียงสาร 1.0 mL/min (ภาพที่ 4 a.) จากนั้นกำหนดให้อัตราการลำเลียงสารของ DO เท่ากับ 1.0 mL/min แล้วเปลี่ยนอัตราการลำเลียงสารของ AC พบว่าที่ 1.0 mL/min ให้ความไวในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดเช่นกัน (ภาพที่ 4 b.) สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อใช้อัตราการไหลช้าเกินไปจะทำให้สารละลายเกิดการเจือจางและกระจายตัวในระบบมากเกินไป ในขณะที่เมื่อใช้อัตราการไหลของสารละลายเร็วเกินไปจะทำให้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาของสารลดลงรวมถึงเวลาที่ท่อนโซนของสารไหลผ่านส่วนตรวจวัดก็เร็วเกินไปด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราเร็วในการลำเลียงสาร 1.0 mL/min ในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

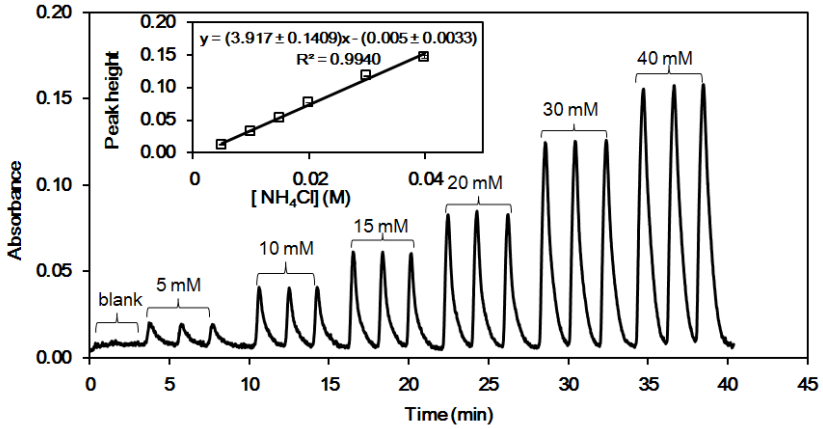
จากนั้นทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของปริมาตรสารตัวอย่างต่อระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน แสดงผลการทดลองในภาพที่ 4 c. พบว่าความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาตร 100 µL ผลการทดลองพบว่าที่ปริมาตร 300 µL และ 500 µL สัญญาณของพีคกว้างมาก (broad) และความไวในการวิเคราะห์ลดลง อีกทั้งสัญญาณของความเข้มข้นสูงๆ ก็ไม่แปรผันตามความเข้มข้นอีกด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาตรตัวอย่างที่ฉีดเข้าระบบมีมากจนเกินไป อีกทั้งเมื่อใช้ปริมาตร 100 µL ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยที่สุดอีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาตรตัวอย่างขนาด 100 µL ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 กราฟเปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) เมื่อศึกษาผลของอัตราการลำเลียงสารของสารละลายตัวให้ (a.) สารละลายตัวรับ (b.) และปริมาตรตัวอย่าง (c.) โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5-40 มิลลิโมลาร์

3. กราฟมาตรฐานและคุณลักษณะการวิเคราะห์

เมื่อใช้ระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันดังภาพที่ 1 และใช้สภาวะที่เหมาะสม คืออัตราการลำเลียงสาร 1.0 mL/min และปริมาตรตัวอย่าง 100 µL สร้างกราฟมาตรฐานโดยฉีดสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5-40 มิลลิโมลาร์ บันทึกสัญญาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แสดงผลการทดลองดังภาพที่ 5 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์มากขึ้น ทำปฏิกิริยากับโซเดียมไฮดรอกไซด์ก็จะเกิดแก๊สแอมโมเนียมากขึ้นด้วย เมื่อแก๊สแอมโมเนียแพร่ผ่านเมมเบรนของ แก๊สดิฟฟิวชัน และละลายลงในสารสกัดจากกล้วยไม้ จะทำให้สารละลายมีความเป็นเบสมากขึ้น ส่งผลให้สีของสารสกัดจากกล้วยไม้เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียวที่เข้มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรจึงเพิ่มขึ้นนั่นเอง กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์กับความสูงของสัญญาณแสดงในภาพที่ 5 (แทรก) ได้สมการเส้นตรงคือ $y=(3.9170 \pm 0.1409)x - (0.0050 \pm 0.0033)$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9940 มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 5-40 มิลลิโมลาร์ ความแม่นในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันเท่ากับ 0.70% (n=10, 20 mM NH_4Cl) และระหว่างวันเท่ากับ 2.62% (n=9, 20 mM NH_4Cl) โดยมีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 2.17 มิลลิโมลาร์ และขีดจำกัดความเข้มข้นของตัวอย่างที่หาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 2.99 มิลลิโมลาร์ และระบบนี้สามารถทำการวิเคราะห์ได้ 48 ตัวอย่างต่อชั่วโมง ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกกล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium sonia earsakul* สามารถนำมาใช้เป็นรีเอเจนท์ร่วมกับระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันที่พัฒนาขึ้นได้ดีและสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในตัวอย่างต่อไปได้



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานแอมโมเนียมคลอดไรด์กับความสูงของสัญญาณ (รูปแทรก) โดยใช้สารสกัดจากดอกกล้วยไม้เป็นสารละลายตัวรับด้วยระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชัน

4. การศึกษาปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ยตัวอย่าง

การทดลองนี้ทำขึ้นเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในตัวอย่างได้จริง ผู้วิจัยสนใจวิเคราะห์หาแอมโมเนียในตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่มีจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาด ผลการวิเคราะห์รายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (% Nitrogen, w/w) แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าระบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันโดยใช้สารสกัดจากกล้วยไม้และโบรโมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์เป็นสารละลายตัวรับสามารถตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียที่มีอยู่ในปุ๋ยเคมีได้และเมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนพบว่าทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ *t*-test (paired two sample for means) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าค่า t_{stat} มีค่าเท่ากับ 0.72 ซึ่งน้อยกว่า $t_{critical}$ ที่มีค่าเท่ากับ 4.30 ดังนั้นผลการวิเคราะห์จากทั้งสองวิธีนี้จึงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาร้อยละการกลับคืน (% recovery) มีค่า 93.0%-102.5% แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์แอมโมเนียด้วยวิธีนี้ไม่มีผลการรบกวนอันเนื่องมาจากพื้นหลังของตัวอย่างและสารอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากความจำเพาะของปฏิกิริยาและอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันที่ใช้

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยโดยใช้ระบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันที่ใช้สารละลายตัวรับต่างกัน

ตัวอย่างปุ๋ย	% Nitrogen (w/w)[a]	
	GD-FIA using orchid extract acceptor	GD-FIA using bromothymol blue acceptor[b]
1	n.d.[c] (96.8%)[d]	n.d.
2	n.d. (93.0%)	n.d.
3	9.43 ± 0.10 (94.1%)	9.42 ± 0.24
4	7.44 ± 0.20 (94.3%)	9.01 ± 0.27
5	8.40 ± 0.30 (102.0%)	9.17 ± 0.05
6	8.10 ± 0.37 (102.5%)	7.28 ± 0.32

[a] mean ± sd ของการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

[b] ประยุกต์จาก Van Son M. *et al*., 1983: 271-275

[c] not detectable [d] % Recovery

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนารีเอเจนท์โดยใช้สีธรรมชาติคือสารสกัดจากกล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium sonia earsakul* ทำการสกัดด้วยน้ำแล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดนี้มาใช้เป็นรีเอเจนท์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย โดยใช้ระบบการไหลโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-เบส ของสารละลายตัวรับ ซึ่งจะทำให้สีของสารสกัดจากกล้วยไม้เปลี่ยนไป และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปได้ โดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแอมโมเนีย เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมของระบบโฟลอินเจคชันร่วมกับอุปกรณ์แก๊สดิฟฟิวชันพบว่าได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงดี (R^2= 0.9940) มีช่วงความเป็นเส้นตรง 5 – 40 มิลลิโมลาร์ ความแม่น 0.70% และขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 2.17 มิลลิโมลาร์ สามารถวิเคราะห์ได้เร็ว 48 ตัวอย่างต่อชั่วโมง สุดท้ายนำวิธีที่เสนอในงานวิจัยนี้มาวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียในปุ๋ยเคมีเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคือโบรโมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์เป็นสารละลายตัวรับ พบว่าผลที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อดีของงานวิจัยนี้คือ ง่าย สะดวก อัตโนมัติ และสารสกัดจากกล้วยไม้ก็เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์กับปฏิกิริยาอื่นๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-เบส และมีแนวโน้มที่จะพัฒนาในเชิงพาณิชย์ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอกจากกองทุนวิจัยและสร้างสรรค์คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559 (SRF-PRG-2559-05) และทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับบัณฑิตพสวท. แรกบรรจุปีงบประมาณ 2556 (017/2557) ขอบคุณคุณพันทิพา ลิ้มสงวน เจ้าของวัชระ ออร์คิดฟาร์ม อ. สามพราน จ. นครปฐม ที่อนุเคราะห์กล้วยไม้เพื่อใช้ในงานวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี รวมถึงสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A. and Galán-Vidal, A.C. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*, 859–871.

Chanthakul, S., Thaithiang, A. and Hongrattanaworakit, S. (2013).Study on orchid garland shelft life. Rajamangala University of Technoology Phra Nakhon .Thesis report in M.S. degree,1-68. (in thai)

Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser, C.J. and Dash, A.K. (2002). Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. *Journal of Pharmaceutics*, *241*, 293–299.

Jeong, H., Park, J. and Kim, H. (2013). Determination of NH_4^+ in Environmental Water with interfering substances using the modified Nessler Method. *Journal of Chemistry*, 1-9.

Junka, N., Kanlayanarat, S., Buanong, M., Wongchaochant, S., and Wongs-Aree, C. (2011). Analysis of anthocyanins and the expression patterns of genes involved in biosynthesis in two *Vanda* hybrids. *International Journal of Agriculture and Biology, 13*(6), 873–880.

Kavitha, G., George, C.S., Alex, A., Raju, R., Biju, R. and Deepa, T.V. (2014). Herbal Indicators: An alternative to Synthetic Indicators. *Journal of Pharmaceutics*, *3* (6), 434-435.

Kuswandi, B., Jayus, Larasati, T.S., Abdullah, A. and Heng, L.Y. (2012). Real-Time Monitoring of Shrimp Spoilage Using On-Package Sticker Sensor Based on Natural Dye of Curcumin. *Food Analytical Methods, 5*, 881–889.

Mana, H. and Spohn, U. (2000). Chem. Rapid and selective determination of ammonium by fluorimetric flow injection analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *366*, 825-829.

Oliveira,S.M., Marques da Silva Lopes,T.I., TÓth, I.V. and Rangel, A.O.S.S. (2009). Determination of ammonium in marine waters using a gas diffusion multi commuted flow injection with in-line prevention of metal hydroxides precipitation. *Journal Environmental Monitoring*, *11*, 228-234.

Singh, S., Bothara, S.B., and Singh, S. (2011). Acid-Base Indicator Properties of Dyes from Local Flowers: *Cassia aungostifolia* Linn., Thevetia peruviana (Pers.) K. Schum and Thevetia thvetiodes (Kunth) K. Schum. *Pharmacognosy Journal*, *3*(19), 35–39.

Van Son, M., Schothorst, R. C. and Den Boef, G. (1983). Determination of total amminical nitrogen in water by flow injection analysis and a gas diffusion membrane. Analytica Chimica Acta, *153*, 271-275

Yuen, K.I. and Shit, F.C. (2010). Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. *Frontiers in Physiology*,*1*, 1-20.

Zhang, X., Lu, S. and Chen, X. (2014). A visual pH sensing film using natural dyes from Bauhinia blakeana Dunn. *Sensors and Actuators B chemical*, *198,* 268–273.

Zhou, L. and Boyd, C. E. (2016). Comparison of Nessler, phenate, salicylate and ion selective electrode procedures for determination of total ammonia nitrogen in aquaculture. *Aquaculture*, *450*, 187–193.