การตรวจวัดปริมาณของธาตุอาหารในน้ำสกัดชีวภาพที่ได้มาจากวัตถุดิบต่างชนิด

Determination of nutrient compositions in bio-extract solutions produced from different sources

นฤมล วชิรปัทมา

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต ปทุมธานี 12121

เยาวพา จิระเกียรติกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณของธาตุอาหารหลัก (N, P, K, Ca, Mg และ S) และธาตุอาหารรอง (Cl, Fe, Mn, Zn, Cu และ Mo) ในน้ำสกัดชีวภาพซึ่งได้จากการหมักวัสดุ 6 ชนิด (ปลีกล้วย ผลกล้วย กวางตุ้ง หอยเชอรี่ ปลาป่นและมูลค้างคาว) ทำโดยวิธี Kjeldahl สำหรับปริมาณ total nitrogen และใช้วิธีกลั่นและการ titrate สำหรับหาปริมาณ ammonium และ nitrate สำหรับปริมาณ phosphorus (P) วิเคราะห์ด้วยวิธี spectrophotometry ส่วน potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), Iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), copper (Cu) และ molybdenum (Mo) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS), แอนอิออนของ chloride (Cl^-) และ sulphate (SO_4^{2-}) หาปริมาณด้วยวิธี indirect high performance liquid chromatography (Indirect HPLC) จากการวิเคราะห์ธาตุอาหารหลักคือ N, P, K, Ca, Mg และ SO_4^{2-} พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.32-2.06%, 0.01-0.20%, 0.69-2.53%, 0.13-1.91%, 0.16-0.30% และ 0.67-3.27% ตามลำดับ ซึ่ง nitrogen ในน้ำสกัดชีวภาพอยู่ในรูป ammonium (0.01-0.52%) มากกว่าในรูป nitrate (0.003-0.02%) ส่วนธาตุอาหารรองที่ทำการตรวจวิเคราะห์คือ Cl, Fe, Mn, Zn, Cu และ Mo มีค่าอยู่ในช่วง 1.46-4.80%, 21.2-515.4 mg/L, 3.9-113.9 mg/L, 4.9-24.8 mg/L, 0.00-1.99 mg/L และตรวจไม่พบ ตามลำดับ

Abstract

Macronutrients (N, P, K, Ca, Mg and S) and micronutrients (Cl, Fe, Mn, Zn, Cu and Mo) in bio-extract solutions prepared from six different materials (banana bract and male flower, banana fruit, Chinese green mustard, golden apple snail, fish meal and bat faeces) were investigated. The Kjeldahl method was used to determine total nitrogen (N) in bio-extract solutions. Ammonium and nitrate quantities were determined by distillation method and titration, respectively. Phosphorus was determined by spectrophotometric method. The determination of potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), copper (Cu) and molybdenum (Mo) were investigated by atomic

absorption spectrophotometry (AAS). Indirect high performance liquid chromatography (Indirect HPLC) was used to determine chloride (Cl^-) and sulphate (SO_4^{2-}). The quantities of macronutrients: N, P, K, Ca, Mg and SO_4^{2-} in bio-extract solutions were 0.32-2.06%, 0.01-0.20%, 0.69-2.53%, 0.13-1.91%, 0.16-0.30% and 0.67-3.27%, respectively. Nitrogen was found in bio-extract solutions in ammonium form (0.01-0.52%) more than in nitrate form (0.003-0.02%). The micronutrients of Cl, Fe, Mn, Zn, Cu and Mo were determined and the quantities of 1.46-4.80%, 21.2-515.4 mg/L, 3.9-113.9 mg/L, 4.9-24.8 mg/L, 0.00-1.99 mg/L and not being detected were found, respectively.

1. บทนำ

ประเทศไทยมีวัตถุดิบที่เหลือใช้ในด้านเกษตร ทั้งที่เป็นส่วนของพืชและส่วนที่มาจากสัตว์ รวมทั้งกากของเสียจากภาคการเกษตรและภาคอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้นำสิ่งต่างๆเหล่านี้มาแปรรูปเป็นน้ำสกัดชีวภาพ เพื่อใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีกันอย่างกว้างขวาง ประโยชน์ที่เห็นเด่นชัดคือเป็นการลดปริมาณขยะและกากของเสีย รวมทั้งลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร ธาตุอาหารต่างๆในน้ำสกัดชีวภาพขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ขั้นตอนการหมัก การสลายตัว ความเป็นกรด ความเข้มข้นของน้ำสกัดชีวภาพที่ใช้ การหมักจะทำให้วัตถุดิบที่ประกอบด้วยโมเลกุลขนาดใหญ่ สลายตัวกลายเป็นแคตอิออน (cation) และแอนอิออน (anion) ซึ่งมีขนาดเล็กลงและเป็นรูปที่พืชสามารถดูดไปใช้ได้ ธาตุอาหารหลักที่พืชต้องการคือ N, P, K, Ca, Mg, S นอกจากนี้ยังต้องการธาตุอื่นๆอีกเช่น Fe, Cu, Zn, Mn, Cl และ B ดังนั้นก่อนนำน้ำสกัดชีวภาพไปใช้เพื่อเพิ่มธาตุอาหารในดิน จึงควรที่จะวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่มีอยู่เพื่อจะได้ใช้ในความเข้มข้นที่พอเหมาะ กับความต้องการของพืช อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์แต่ละธาตุจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับธรรมชาติของธาตุนั้นๆ เช่น ปริมาณ Total nitrogen นิยมหาปริมาณโดยวิธี Kjeldahl [1] และปริมาณ Phosphorus หาได้หลายวิธีเช่น Spectrophotometry [2] และ Ion chromatography [3] สำหรับปริมาณของโลหะอิออน ในตัวอย่างสามารถหาได้หลายวิธีเช่น Ion Chromatography [3] [4], และ Atomic Absorption Spectrophotometry [5] เป็นต้น ปริมาณของแอนอิออน ที่มีในสารตัวอย่างหาได้หลายวิธีเช่น Indirect High Performance Liquid Chromatography หรือ Ion chromatography [6, 7] เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้คือวิเคราะห์หาธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองในน้ำสกัดชีวภาพที่หมักจากส่วนของพืชและสัตว์ต่างชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาหรือวิจัยที่เกี่ยว ข้องกับการใช้น้ำสกัดชีวภาพเพื่อการปลูกพืชต่อไป

2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 เครื่องมือ

วิเคราะห์ Nitrogen: Digestion Unit (Gerhardt Model KB20S, Konigswinter, Germany), Distillation Unit (Gerhardt Model Vap12, Konigswinter, Germany), pH-meter, (Orion 420 A, MA. U.S.A)

วิเคราะห์ phosphorus: pH-meter (Orion420 A, MA. U.S.A), UV-VIS spectrometer (Perkin Elmer Lambda 35, U.S.A)

วิเคราะห์ metal ion: Atomic Absorption Spectrophotometer VARIAN Spectra 800

วิเคราะห์ chloride และ sulphate: High Performance Liquid Chromatography (Waters, MA, USA), Sample loop 100 μL, NovaPak C18 Analytical Column (15 cm, 4 μm), NovaPak C18 Guard column (4 mm, 10 μm), อุณหภูมิที่ทดลอง 30°C, UV-VIS Detector (Jasco, Tokyo, Japan) ที่ 254 nm , flow rate 1 mL /min, pH meter (744, Metrohm, Herisau, Switzerland)

2.2 สารเคมี

Boric acid (H_3BO_3), Analytical grade 99.99% (Aldrich, Steinheim, Germany), Hydrochloric acid (HCl), Analytical grade 37% by wt (Merck, Darmstadt, Germany), Sulfuric acid (H_2SO_4), Analytical grade 95-97% by wt (Merck), Bromocresol green ($C_{11}H_{14}Br_4O_5S$), AR grade (AJAX, NSW, Australia), Devada's alloy, AR grade (Merck), Ethanol, commercial grade (Merck), Methyl red [4-$(CH_3)_2NC_6H_4N$:NC_6H_4-2-COOH], AR grade (Fluka, Switzerland), Sodium carbonate (Na_2CO_3), AR grade (Merck), Sodium hydroxide (NaOH), AR grade (Merck), Ammonium molybdate tetrahydrate ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$), Analytical grade Assay 99% (Fluka, Steinheim, Switzerland), Antimony potassium tartate ($SbC_4H_4O_7K.5H_2O$), Analytical grade 99% (Aldrich, Wilwaukee, USA), L-(+)-Ascorbic acid ($C_6H_8HO_6$), Analytical grade 99% (Aldrich), Standard Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), Analytical grade >99% (Ferak Berlin, Germany), Nitric acid (HNO_3), Analytical grade 65% (Merck), HPLC methanol (Merck), Deionized water 18 MΩ-cm (D.I), Tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH, Fluka, Steinheim, Germany), potassium hydrogen phthalate, KHP (99.5%,Merck), NaCl (99.999%, Aldrich), $NaNO_3$ (99.99%, Aldrich), Na_2SO_4 (99.99%, Aldrich), $NH_4H_2PO_4$ (99.999%, Aldrich)

2.3 การเตรียมน้ำสกัดชีวภาพ

ทำการหมักน้ำสกัดชีวภาพจำนวน 6 ชนิด โดยเตรียมวัสดุที่ใช้หมักเป็นชิ้นเล็กๆ (หั่นชิ้นส่วนพืช: ปลีกล้วย กวางตุ้ง ผลกล้วย ให้เป็นชิ้นเล็กๆ และทุบหอยเชอรี่ให้ละเอียดพอประมาณ) ผสมกับกากน้ำตาล คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำไปใส่ในถังหมักที่ปิดสนิท ทำการหมักน้ำสกัดชีวภาพแต่ละชนิดจำนวน 3 ถัง (3 ซ้ำ) เป็นเวลานานอย่างน้อย 8 เดือน ก่อนนำน้ำสกัดชีวภาพแต่ละชนิดมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบธาตุอาหาร วัสดุที่ใช้เตรียมแสดงในตาราง 1

ตารางที่ 1 แสดงวัสดุและอัตราส่วนที่ใช้เตรียมน้ำสกัดชีวภาพทั้ง 6 ชนิด

วัสดุ	อัตราส่วนโดยน้ำหนัก		
	วัสดุ	กากน้ำตาล	น้ำ
ปลีกล้วย	3	1	-
ผลกล้วย	3	1	-
กวางตุ้ง (ใบและต้น)	3	1	-
หอยเชอรี่	3	1.5	-
ปลาป่น	3	1.5	4
มูลค้างคาว	3	1.5	10

2.4 การหาปริมาณ Total Nitrogen, Ammonium Ion และ Nitrate ion ในน้ำสกัดชีวภาพ

2.4.1 การหาปริมาณ Total Nitrogen

ชั่งน้ำสกัดชีวภาพ 0.2-0.5 g ใส่ใน Digestion flask ตามด้วย K_2SO_4 5 g และ $CuSO_4.5H_2O$ 0.5 g หลังจากนั้นเติม H_2SO_4 เข้มข้น 25 mL และให้ความร้อนกับ Digestion flask ใน Digestion Unit โดยเริ่มต้นจาก 150°C ประมาณ 30 นาที แล้วค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 350°C จนได้สารละลายใสซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง แล้วจึงย้าย Digestion flask ไปวางใน Distillation Unit เติม 40% NaOH 80 mL ลงใน flask (ระบบปิด) บรรจุ Boric acid-indicator solution 50 mL ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL และวางไว้ในตำแหน่งรองรับ distillate จากนั้นกลั่นสารตัวอย่างโดยให้ปลายหลอดที่ gas ammonia ไหลผ่านจุ่มอยู่ในสารละลายตลอดเวลาที่กลั่น ทำการกลั่นประมาณ 8 นาที หรือจนได้สารละลายใน Erlenmeyer flask ประมาณ 250 mL (distillate) ยก Erlenmeyer flask ออกจาก Distillation Unit และ titrate distillate ที่ได้ด้วยสารละลาย standard HCl ความเข้มข้น 0.02-0.05 M จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นม่วงอมชมพู

2.4.2 การหาปริมาณ ammonium

เติม boric acid-indicator solution 50 mL ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 mL นำไปวางที่รองรับของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายหลอดที่แก๊สไหลผ่านจุ่มอยู่ใน

สารละลายตลอดเวลาที่ทำการกลั่น ชั่งสารตัวอย่าง 5 g ใส่ลงใน Distillation flask และวางในตำแหน่งกลั่น จากนั้นเติม 40% NaOH 20 mL (ระบบปิด) ใน Distillation flask ทำการกลั่น 5 นาทีหรือจนได้สารละลายใน Erlenmeyer flask ประมาณ 200 mL (distillate) แล้วนำ distillate ไป titrate ต่อด้วยสารละลาย standard HCl ความเข้มข้น 0.02-0.05 M จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นม่วงอมชมพู และนำ Distillation flask ออกจาก Distillation Unit แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นเพื่อนำไปทำการทดลองหาปริมาณ nitrate ต่อไป

2.4.3 การหาปริมาณ nitrate

เติม boric acid-indicator solution 50 mL ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 250 mL นำไปวางที่รองรับของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายหลอดที่แก๊สไหลผ่านจุ่มอยู่ในสารละลายตลอดเวลาที่ทำการกลั่น ชั่ง Devada's alloy 0.8 g เติมลงใน distillation flask ที่ได้จากข้อ 2.4.2 ทำการกลั่น 5 นาทีหรือจนได้สารละลายใน Erlenmeyer flask ประมาณ 200 mL (distillate) แล้วนำ distillate ไป titrate ต่อด้วยสารละลาย standard HCl ความเข้มข้น 0.02-0.05 M จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นม่วงอมชมพู

2.5 การหาปริมาณ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพ

2.5.1 สารละลาย

2.5.1.1 Sulfuric-Molybdate solution (reagent A)

ละลาย Ammonium molybdate tetrahydrate 6 g ด้วย Deionized water 250 mL และละลาย Antimony potassium tartate 0.1454 g ด้วย Deionized water 50 mL ผสมสารละลาย Ammonium molybdate และ Antimony potassium tartrate ในบีกเกอร์ แล้วนำไปแช่ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งประมาณ 45 นาที รอจนสารละลายเย็นจัด จึงค่อยๆ เติม H_2SO_4 เข้มข้นลงไปอย่างช้าๆ จำนวน 70 mL และคนตลอดเวลา จากนั้นเติม Deionized water จนได้ปริมาตรสารละลายประมาณ 490 mL และแช่สารละลายในน้ำแข็งต่อไปจนอุณหภูมิเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 mL ใน Volumetric flask ด้วย Deionized water (ควรเก็บสารละลายในที่มืด และอุณหภูมิต่ำ และเก็บไว้ได้ไม่เกิน 5 วัน)

2.5.1.2 Working solution (สารละลายที่ใช้ในการ form complex)

ละลาย ascorbic acid 1.5 g ในสารละลาย Sulfuric-Molybdate 200 mL จะได้สารละลายสีเหลืองใสที่เรียกว่า working solution ซึ่งควรใช้ทันทีเก็บไว้ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง

2.5.2 การย่อย (digest) น้ำสกัดชีวภาพ

ชั่งน้ำสกัดชีวภาพ 0.5 g ใส่ลงใน TEFLON vial จากนั้นเติม HNO_3 เข้มข้น 2 mL และ HCl เข้มข้น 1 mL ตามลำดับ ให้ความร้อนกับสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C โดยวางบน hot plate จนควันสีน้ำตาลแดงลดลงแล้วจึงปิดฝา vial ขณะย่อยให้เปิดฝาเป็นครั้งคราว เพื่อลดความดันและไอของกรดภายใน vial และให้ความร้อนไปจนกว่าจะได้สารละลายใส จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วเจือจางด้วย Deionized water จนได้ปริมาตร 25 mL ใน volumetric flask กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm สารละลายที่ย่อยได้ (digested solution) ใช้สำหรับหาปริมาณ phosphorus ด้วยวิธี Spectrophotometry และหาปริมาณโลหะอิออน (metal ions) ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

2.5.3 การหาช่วงเวลาที่เหมาะกับการวัดค่าการดูดกลืนแสง(absorbance) ของ complex

ปิเปตสารตัวอย่าง (digested solution) 1 mL (ยกเว้นปลาปนใช้เพียง 0.25 mL) และ H_3BO_3 อิ่มตัว 3 หยด ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL เติม working solution ปริมาตรต่างกัน (2-8 mL) ลงไป จากนั้นปรับปริมาตรจนครบ 25 mL ด้วย Deionized water เขย่าสารละลายให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 880 nm เพื่อศึกษาความเสถียรของ complex ที่เกิดจากสารละลายที่มีความเข้มข้นของ working solution ต่างกัน ในช่วงเวลา 0-120 นาที

2.5.4 การหาปริมาณ phosphorus

ปิเปตสารละลาย standard KH_2PO_4 5 ppm ปริมาตร 0, 2.5, 4, 5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 25 mL (ในแต่ละขวดมีสารละลาย standard KH_2PO_4 เข้มข้น 0, 0.5, 0.8, 1 ppm ตามลำดับ) เติมสารตัวอย่าง 1 mL (ยกเว้นปลาป่นใช้เพียง 0.25 mL) และ H_3BO_3 อิ่มตัว 3 หยด ลงใน volumetric flask แต่ละขวด จากนั้นเติม working solution ปริมาตรที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากัน ปรับให้ถึงขีดปริมาตร 25 mL ด้วย Deionized water เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในช่วงเวลาที่เหมาะสม ที่ความยาวคลื่น 880 nm

2.6 การหาปริมาณโลหะอิออน ในน้ำสกัดชีวภาพด้วย AAS

ในการศึกษาปริมาณโลหะ ซึ่งเป็นธาตุอาหารในน้ำสกัดชีวภาพด้วย Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) จำเป็นต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปโลหะอิออนก่อน ดังนั้นจึงย่อยสลายน้ำสกัดชีวภาพด้วยกรด ธาตุอาหารที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้แก่ potassium, calcium, magnesium, iron, manganese, zinc, copper และ molybdenum การย่อยน้ำสกัดชีวภาพเหมือนหัวข้อ 2.5.2 จากนั้นนำสารละลายที่ย่อยได้ (digested solution) ที่ได้ไปวัดหาปริมาณโลหะอิออนด้วยเครื่อง AAS

2.7 การหาปริมาณ Chloride และ Sulphate ในน้ำสกัดชีวภาพด้วย HPLC

2.7.1 การเตรียม Mobile phase

ผสม methanol 100 mL, TBAOH 1.2495 g และ Deionized water ประมาณ 800 mL เข้าด้วยกัน ปรับให้สารละลายมี pH เป็น 7 ด้วยสารละลาย potassium hydrogen phthalate (KHP) จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 1000 mL ด้วย Deionized water

2.7.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

นำน้ำสกัดชีวภาพเข้าเครื่อง Autoclave ที่ 121°C ประมาณ 30 นาที หลังจากตัวอย่างเย็นตัวลงถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งสารตัวอย่างน้ำสกัดชีวภาพ 1 g ละลายน้ำจนได้ปริมาตร 10 mL ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลาย 0.1 mL ลงใน volumetric flask 25 mL เติมน้ำจนถึงขีดปริมาตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm ฉีดสารละลายที่กรองได้ (สารละลายเจือจาง 2500 เท่า) เข้าเครื่อง HPLC โดยตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การหาปริมาณ Total Nitrogen, Ammonium Ion และ Nitrate Ion ในน้ำสกัดชีวภาพ

จากการหาปริมาณ nitrogen ในน้ำสกัดชีวภาพ 6 ชนิด (ปลีกล้วย ผลกล้วย กวางตุ้ง หอยเชอรี่ ปลาป่น มูลค้างคาว) และกากน้ำตาล พบว่า น้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่นและมูลค้าวคาวมี %nitrogen ในรูป NH_4^+ มากประมาณ 0.5 % รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ประมาณ 0.16 % ส่วนน้ำสกัดชีวภาพอื่นที่เหลือและกากน้ำตาลพบน้อยมาก (0.01-0.02% ดังตารางที่ 2) สำหรับ % nitrogen ในรูป NO_3^- พบน้อยมากในน้ำสกัดชีวภาพและในกากน้ำตาล (<0.02% ดังตารางที่ 2) ส่วน %total nitrogen ซึ่งเป็นผลรวมของ nitrogen ที่อยู่ในรูป NH_4^+, NO_3^-, amino acid, protein และอื่นๆ พบมากที่สุดในน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่นประมาณ 2% รองลงมาคือ น้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาว กากน้ำตาล และน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ ส่วนน้ำสกัดชีวภาพจากกวางตุ้งและผลกล้วยมี %total nitrogen ในปริมาณใกล้เคียงกัน คือประมาณ 0.4% และน้ำสกัดชีวภาพจากปลีกล้วยมี %total nitrogen น้อยที่สุดประมาณ 0.3% (ตารางที่ 2)

3.2 การหาปริมาณ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพโดยวิธี Spectrophotometry

ปริมาณ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพที่หาได้จากเทคนิค Spectrophotometry นั้นเป็นปริมาณ total phosphorus ที่มีในสารตัวอย่าง โดยดัดแปลงวิธีการมาจาก McKelvie [8] ซึ่งทำ

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาณ %N ในรูป ammonium, nitrate และ total N (3 ซ้ำวิเคราะห์ซ้ำละ 3 ครั้ง)

น้ำสกัดชีวภาพ	%N (NH_4^+)	%N (NO_3^-)	% Total N
ปลีกล้วย	0.0237	ฟองมากหาไม่ได้	0.3222
ผลกล้วย	0.0089	0.0048	0.3933
กวางตุ้ง	0.0364	0.0165	0.4351
หอยเชอรี่	0.1623	0.0037	0.8059
ปลาป่น	0.5276	0.0070	2.0638
มูลค้างคาว	0.5461	0.0047	0.9727
กากน้ำตาล	0.0199	0.0031	0.8499

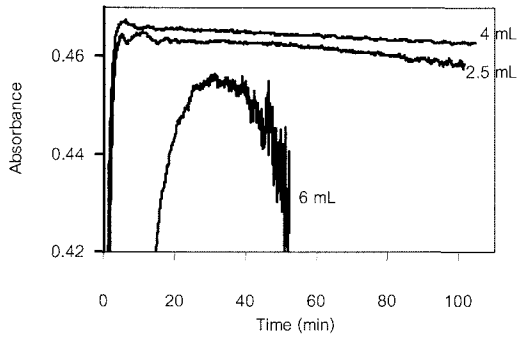
การย่อยสารตัวอย่างด้วยกรดให้อยู่ในรูป phosphate จากนั้น phosphate จะทำปฏิกิริยากับ molybdate โดยมี ascorbic acid เป็น reductant และ antimony potassium tartrate เป็น catalyst ได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (blue complex) และหาปริมาณสารประกอบดังกล่าวด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 880 nm ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ

$$PO_4^{3-}+12MoO_4^{2-}+27H^+ \longrightarrow H_3PO_4(MoO_3)_{12}+12H_2O$$

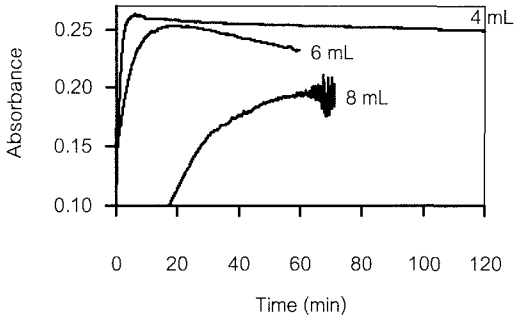
3.2.1 เวลาที่เหมาะกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ complex

รูปที่ 1 แสดงความเสถียร (stability) ของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เตรียมจาก standard phosphate ทำปฏิกิริยากับ working solution ที่ปริมาตรต่างกันคือ 2.5, 4 และ 6 mL ผลปรากฏว่าปริมาตร 4 mL เหมาะสมที่สุดเพราะจะให้ความเสถียร ดีในช่วง 20-100 นาทีและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 2.5 mL แต่ถ้าใช้ 6 mL จะพบว่า complex เสถียรเพียง 10 นาทีคือในช่วง 25-35 นาที และเกิดตะกอนขึ้นหลังจาก form complex ได้ 35 นาที

Phosphate ในสารตัวอย่าง (digested solution) ของน้ำสกัดชีวภาพแต่ละชนิดรวมทั้งกากน้ำตาลมี sample matrix แตกต่างกันและต่างจากสารละลาย standard เมื่อทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid ใน Sulfuric-Molybdate solution (Working solution) เพื่อให้เกิด ascorbic acid molybdenum blue complex พบว่ามีปัญหาเกี่ยวกับมีตะกอนเกิดขึ้น หรือในบางกรณีที่ไม่มีตะกอนเกิดขึ้นแต่ complex ที่เกิดขึ้นไม่เสถียร หากใช้ปริมาณ Working solution ไม่เหมาะสมกับตัวอย่างนั้นๆ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเตรียม สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินของน้ำสกัดชีวภาพ และกากน้ำตาลจาก working solution ปริมาตรต่างกันระหว่าง 2 - 8 mL นอกจากนี้ทำการศึกษาความเสถียรของ complex ที่ความยาวคลื่น 880 nm ในช่วงเวลา 0-120 นาที เพื่อหาช่วงเวลาที่ complex เสถียร และเลือกใช้เป็นเวลาสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงของ complex ซึ่งปริมาตร working solution ที่เหมาะสม และช่วงเวลาที่เหมาะกับการวัดค่าการดูดกลืนแสง แสดงในตารางที่ 3 สำหรับรูปที่ 2 และรูปที่ 3 แสดงความเสถียรของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน เมื่อใช้ working solution ปริมาตรต่างกันในน้ำสกัดชีวภาพปลาป่น และในกากน้ำตาลตามลำดับ จากรูปที่ 2 และ 3 จะเห็นว่าปริมาตร working solution ที่เหมาะสมของปลาป่นและกากน้ำตาลคือ 4 mL เพราะ complex ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงและเสถียรเป็นเวลานาน



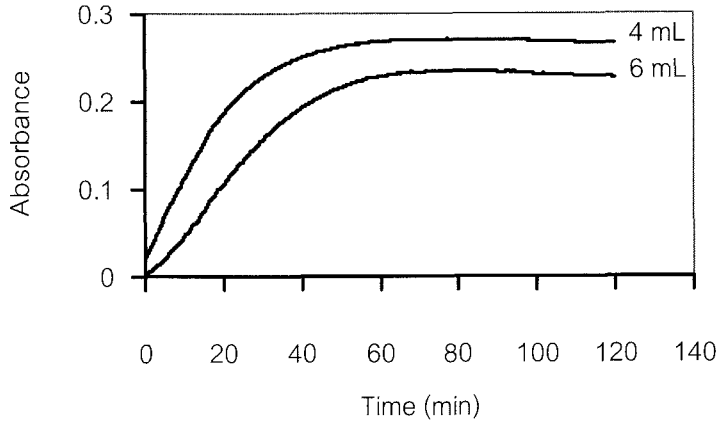
รูปที่ 1 แสดงความเสถียรของ ascorbic acid molybdenum blue complex ของ standard phosphate ที่เตรียมจาก working solution ปริมาตร 2.5, 4 และ 6 mL ตามลำดับ



รูปที่ 2 แสดงความเสถียร ของ ascorbic acid molybdenum blue complex ของน้ำสกัดชีวภาพปลาป่นที่เตรียมจาก working solution ปริมาตร 4, 6 และ 8 mL ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาตร working solution ที่เหมาะสมในการเกิด phosphomolybdenum blue complex และช่วงเวลาที่เหมาะกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ complex

น้ำสกัดชีวภาพ	working solution ที่เหมาะสม (mL)	เวลาที่เหมาะกับการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ complex (min)
ปลีกล้วย	6	20-55
ผลกล้วย	4	20-60
กวางตุ้ง	4	20-60
หอยเชอรี่	6	50-90
ปลาป่น	4	10-90
มูลค้างคาว	6	45-60
กากน้ำตาล	4	50-120
Standard phosphate	4	20-90



รูปที่ 3 แสดงความเสถียรของ ascorbic acid molybdenum blue complex ของกากน้ำตาลที่เตรียมมาจาก working solution ปริมาตร 4, 6 และ 8 mL ตามลำดับ

3.2.2 ปริมาณ Phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพ

เมื่อ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพ ทำปฏิกิริยากับ ascorbic acid ใน sulfuric-molybdate solution (working solution) จะได้สารละลายสีน้ำเงินของ phosphomolybdenum blue complex เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพ โดยวิธี external calibration curve พบว่า sample matrix มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพมีค่าต่ำกว่าที่ควรจะเป็นจึงจำเป็นต้องหาปริมาณ phosphorus โดยวิธี standard addition calibration curve ในการทดลองจะใช้ปริมาตรของน้ำสกัดชีวภาพปลาป่นเพียง 0.25 mL ซึ่งน้อยกว่าน้ำสกัดชีวภาพตัวอื่นๆ เพราะน้ำสกัดชีวภาพปลาป่นมีปริมาณphosphorus สูงมากหากใช้สารตัวอย่างในปริมาณที่มาก จะทำให้ค่าดูดกลืนแสงมากกว่า 1 AU ตารางที่ 6 แสดงผลของปริมาณ phosphorus ในน้ำสกัดชีวภาพ จากตารางจะเห็นว่าปริมาณ phosphorus พบมากที่สุดในน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่นคือ 0.20% รองลงมาคือ น้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาว สำหรับกากน้ำตาล น้ำสกัดชีวภาพจากผลกล้วย ปลีกล้วย และกวางตุ้ง มีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 0.05% สำหรับน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่พบ phosphorus น้อยที่สุด

ตาราง 4 ค่าเฉลี่ย % P ในน้ำสกัดชีวภาพและกากน้ำตาล

น้ำสกัดชีวภาพ	% P ในน้ำสกัดชีวภาพ
ปลีกล้วย	0.04
ผลกล้วย	0.05
กวางตุ้ง	0.04
หอยเชอรี่	0.01
ปลาป่น	0.20
มูลค้างคาว	0.07
กากน้ำตาล	0.05

3.3 การหาปริมาณโลหะอิออนในน้ำสกัดชีวภาพด้วย AAS

ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในน้ำสกัดชีวภาพด้วยเทคนิค Atomic absorption แสดงในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่ากากน้ำตาลมีโลหะอิออนทุกตัวสูงมาก เนื่องจากไม่มีการเติมน้ำลงไปเหมือนการเตรียมน้ำสกัดชีวภาพ การเปรียบเทียบธาตุอาหารจะพบว่าในน้ำสกัดชีวภาพมี potassium สูงมากเมื่อเทียบกับธาตุอาหารตัวอื่นๆ โดยน้ำสกัดชีวภาพจากผลกล้วยมี

potassium มากที่สุด (25,327.8 mg/L) รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่น กวางตุ้ง และมูลค้างคาว ส่วนน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ และปลีกล้วย มีค่าน้อย ธาตุ calcium พบมากที่สุดในน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ (19,078.3 mg/L) และมีค่าสูงกว่าน้ำสกัดชีวภาพตัวอื่นๆมาก ทั้งนี้เนื่องจากน้ำหมักทำจากตัวหอยและเปลือกหอยซึ่งมีธาตุ calcium ในปริมาณมาก ธาตุ magnesium พบมากสุดในน้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาว (3,049.2 mg/L) รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ ส่วนน้ำสกัดชีวภาพชนิดอื่นๆ มีปริมาณธาตุ maganesium ในปริมาณใกล้เคียงกัน ธาตุ iron พบมากสุดในน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ (515.4 mg/L) รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาว ธาตุ manganese และ zinc พบมากสุดในน้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาว (113.9 และ 25 mg/L) ธาตุ copper พบน้อยมากในน้ำสกัดชีวภาพทุกชนิด ส่วน Molybdenum ตรวจไม่พบในน้ำสกัดชีวภาพ

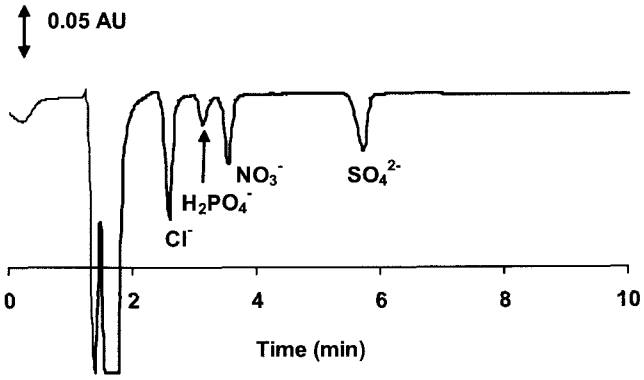
ตารางที่ 5 ปริมาณโลหะอิออนในน้ำสกัดชีวภาพที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer

ธาตุอาหาร	ผลกล้วย (mg/L)	ปลีกล้วย (mg/L)	กวางตุ้ง (mg/L)	หอยเชอรี่(mg/L)	ปลาป่น(mg/L)	มูลค้างคาว(mg/L)	กากน้ำตาล (mg/L)
potassium	25,327.8	6,902.0	18,040.7	8,176.4	21,169.8	13,405.9	45,552.5
calcium	2,706.6	1,271.9	2,975.5	19,078.3	6,203.2	2,247.3	9,135.0
magnesium	1,837.5	1,676.2	1,571.8	2,552.0	1,811.7	3,049.2	4,712.0
iron	38.7	21.2	35.1	515.4	137.9	258.3	88.2
manganese	28.3	24.7	24.7	32.7	3.9	113.9	58.8
zinc	6.95	4.9	13.8	18.8	5.4	24.8	8.8
copper	1.99	2.5	ไม่พบ	0.99	0.1	ไม่พบ	0.5
molybdenum	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

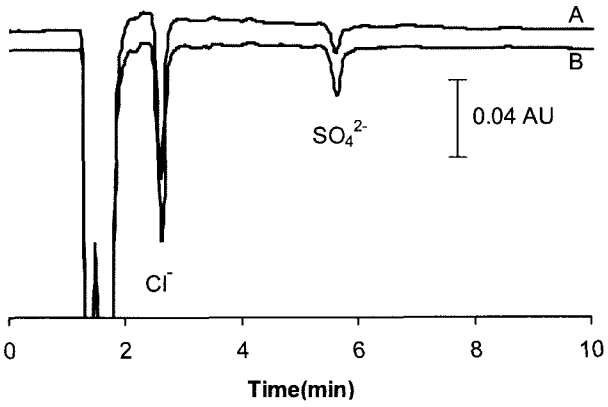
3.4 การหาปริมาณ Chloride และ Sulphate ในน้ำสกัดชีวภาพด้วย HPLC

การศึกษาหาปริมาณ chloride, sulphate, nitrate และ phosphate ด้วย HPLC นั้น จำเป็นต้องหาปริมาณแอนอิออนเหล่านี้ด้วยวิธี indirect detection เนื่องจากเป็นแอนอิออนที่ไม่ดูดกลืนแสง (absorb) ในช่วง UV ดังนั้นการวิจัยนี้จึงใช้ KHP เป็นสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV เป็นองค์ประกอบใน mobile phase และใช้ TBAOH เป็น ion interaction reagent ใน mobile phase เพื่อทำให้แอนอิออนทั้ง 4 ตัวมี peak แยกจากกัน จากรูปที่ 4 แสดง chromatogram ของ standard chloride, sulphate, nitrate และ phosphate ที่มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 mg/L โดยใช้วิธี indirect detection ที่ความยาวคลื่น 254 nm ซึ่ง peak แยกกันได้ดี และพบว่า peak height ของ phosphate มีค่าน้อยที่สุดและ chloride มีค่ามากที่สุดแสดงว่า sensitivity ของ phosphate มีค่าน้อยที่สุดและ chloride มีค่ามากที่สุด เมื่อศึกษาปริมาณแอนอิออนทั้ง 4 ตัวในน้ำสกัดชีวภาพพบว่ามีผลของ sample matrix เข้ามาเกี่ยวข้องประกอบกับความเข้มข้นของ free phosphate และ nitrate ในตัวอย่างมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ chloride ทำให้เทคนิคนี้ตรวจพบได้ผลดีเฉพาะปริมาณ chloride และ sulphate เท่านั้น จากรูปที่ 5 แสดง chromatogram ของน้ำสกัดชีวภาพจากกวางตุ้งที่ spike และไม่ spike ด้วย standard chloride และ sulphate เนื่องจากผลของ sample matrix ดังนั้นปริมาณ chloride และ sulphate จึงหาด้วยวิธี standard addition และแสดงผลในตารางที่ 6 จากการทดลองพบว่า %chloride มีค่าสูงสุดใน

น้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่น (4.8%) รองลงมาคือ น้ำสกัดชีวภาพจากผลกล้วย หอยเชอรี่ และมูลค้างคาว (~2.5%) ส่วนน้ำสกัดชีวภาพจากกวางตุ้งและปลีกล้วยมีค่าประมาณ 1.7% สำหรับ % sulphate พบมากที่สุดในน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรีคือ 3.3% น้ำสกัดชีวภาพชนิดอื่นมีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 0.7% ส่วนกากน้ำตาล % chloride และ % sulphate สูงคือ 13.2% และ 17.7% ตามลำดับ



รูปที่ 4 Chromatogram ของ standard chloride, sulphate, nitrate และ phosphate ความเข้มข้นเท่ากันคือ 10 mg/L, Mobile phase ประกอบด้วย 10% MeOH+1.5 mM TBAOH +KHP ที่ pH 7, flow rate=1mL/min, อุณหภูมิ 30°C, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm



รูปที่ 5 Chromatogram ของกวางตุ้ง (A)ไม่ spike และ (B) spike ด้วย standard chloride 2 mg/L และ sulphate 2 mg/L Mobile phase ประกอบด้วย 10% MeOH+1.5 mM TBAOH +KHP ที่ pH 7, flow rate=1mL/min, อุณหภูมิ 30°C, ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm

ตารางที่ 6 ปริมาณเฉลี่ยของ Chloride และ Sulphate ในน้ำสกัดชีวภาพ

น้ำสกัดชีวภาพ	%Chloride	%Sulphate
ปลีกล้วย	1.46	0.69
ผลกล้วย	2.23	0.72
กวางตุ้ง	1.72	0.72
หอยเชอรี่	2.64	3.27
ปลาป่น	4.80	0.98
มูลค้างคาว	2.3	0.67
กากน้ำตาล	13.18	17.71

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบของธาตุอาหารในน้ำสกัดชีวภาพ 6 ชนิดที่ได้มาจากวัตถุดิบต่างชนิด พบว่า %N และ %P ของน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่นมีค่าสูงสุด รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาว %K ของน้ำสกัดชีวภาพจากผลกล้วยมีค่าสูงสุด รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่น %Ca ของน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่มีค่าสูงสุด รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่น %Mg ของน้ำสกัดชีวภาพจากมูลค้างคาวมีค่าสูงสุด รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ %chloride ของน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่นมีค่าสูงสุด รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่ % sulphate ของน้ำสกัดชีวภาพจากหอยเชอรี่มีค่าสูงสุด รองลงมาคือน้ำสกัดชีวภาพจากปลาป่น สำหรับองค์ประกอบของธาตุอาหารในกากน้ำตาลที่มีค่าสูง เพราะไม่ได้เติมน้ำเหมือนน้ำสกัดชีวภาพ ในภาพรวมจะเห็นได้ว่าในน้ำสกัดชีวภาพแต่ละชนิดมีธาตุอาหารมากน้อยต่างกัน และ%ของธาตุอาหารมีค่าค่อนข้างต่ำ

5 กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณพิสมัย โพธิ์ศรี และคุณวิชัย สุทธิธรรม ในการเตรียมวัตถุดิบและช่วยเตรียมน้ำสกัดชีวภาพ และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณกุสุมา ชื่นบาน และคุณศรายุทธ ยงประพัฒน์ รวมทั้งแหล่งทุนจากงบประมาณของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6 เอกสารอ้างอิง

[1] Nitrogen (Total) in Fertilizers, AOAC Official Methods of Analysis, Chapter 2 , p.15, 2000.

[2] Szydlowska-Czerniak, A. and Szlyk, E., pectrophotometric determination of total phosphorus in rape seeds and oils at various stages of technological process: calculation of phospholipids and non-hydratable phospholipids contents in rapeseed oil, Food Chemistry, Vol 81 , pp. 613-619, 2003.

[3] Kano, I.C., Darbouret, E., Mabic, S., Using ultrapure water in ion chromatography to run analyses at the ng/L level. Journal of Chromatography A, Vol. 1039 , pp. 27-31, 2004.

[4] Karim, K.J., Jin, J. and Takeuchi, T. Simultaneous separation of inorganic anions and cations by using anion-exchange and cation-exchange columns connected in tandem in ion chromatograph, Journal of Chromatography A, Vol. 995 , pp. 153-160, 2003.

[5] Demirbas, A., β-Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turke, Food Chemistry, Vol. 90 , pp. 773-777, 2005.

[6] del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Diego, J.C., Gomez, L.A., Ruiz, J.M., Higes, M., Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography, Journal of chromatography A, Vol. 881 , pp. 629-638, 2000.

[7] Morales, J.A., de Graterol, L.S. and Mesa, J. Determination of chloride, sulfate and nitrate in groundwater samples by ion chromatograph,. J. Chromatogr. A, Vol. 884 , pp. 185-190, 2000.

[8] McKelvie, I.D., Peat, D.M.W. and Worsfold, P.J., Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters, Anal. Proc. Incl. Anal. Comm., Vol. 32 , pp. 437-445, 1995.