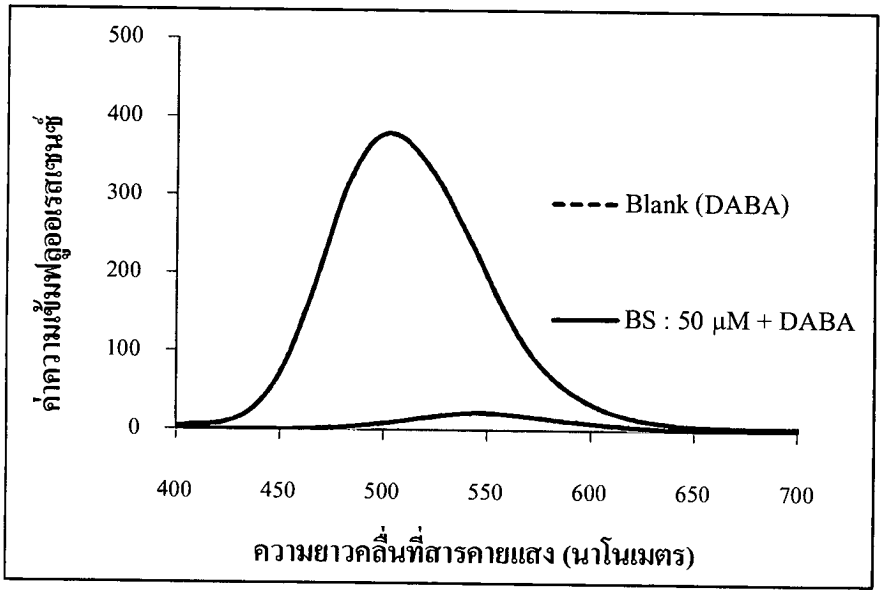
# บทที่ 4
# ผลและอภิปรายการวิจัย

**1. สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์**

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ในน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ ด้วยเทคนิคสเปกโทรฟลูออโรเมทรี โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างบราสสิโนไลด์กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้ ผลการศึกษามีสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา การประเมินประสิทธิภาพของวิธี และการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างด้วยวิธี Standard Addition

**1.1. ความยาวคลื่นที่ใช้ ($\lambda_{ex}$ และ $\lambda_{em}$)**

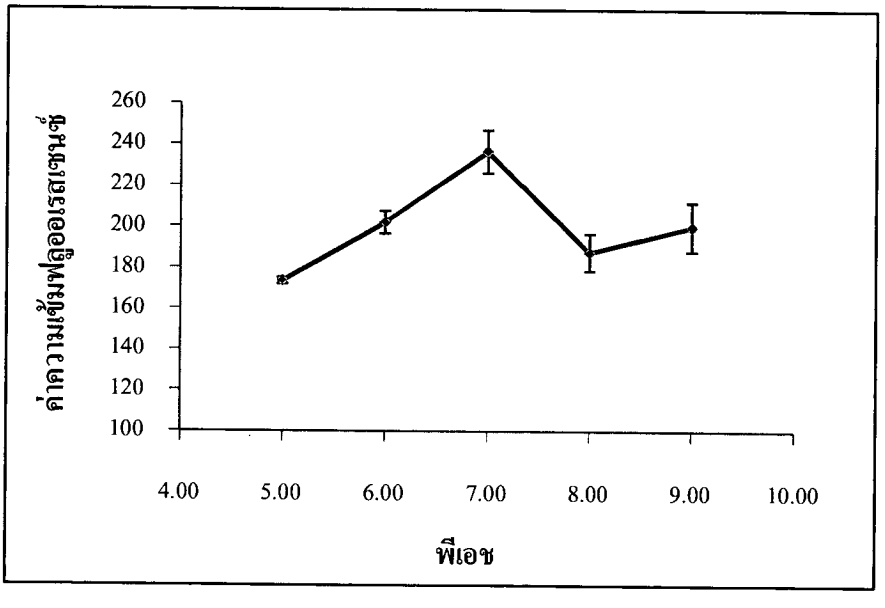
เมื่อนำสารละลายผสมของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ไปสแกนหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมด้วยคิวเวตขนาด 1.5 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้น ($\lambda_{ex}$) เท่ากับ 380 นาโนเมตร จะได้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร ($\lambda_{em}$) ดังรูปที่ 4.1 ความยาวคลื่นทั้งสองนี้ถูกนำไปใช้ตลอดการวิเคราะห์ โดยโมโนโครมาเตอร์ที่ใช้ในการกระตุ้นใช้แถบแสงกว้าง 10 นาโนเมตร ส่วนโมโนโครมาเตอร์ที่แสงคายออกมาใช้แถบแสงกว้าง 5 นาโนเมตร ค่าการขยายสัญญาณ




รูปที่ 4.1 ฟลูออเรสเซนซ์สเปกตรัมของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาอนุพันธ์

**1.2 พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์**

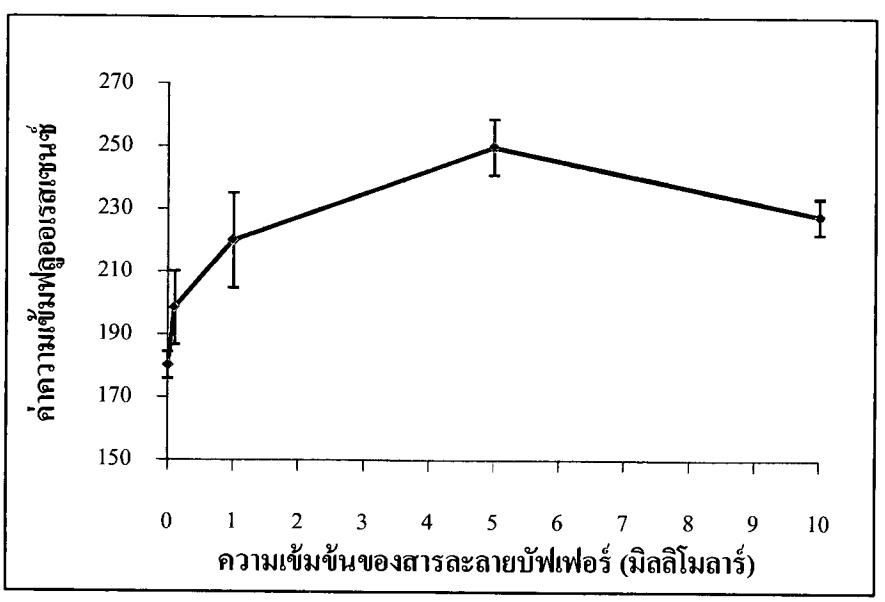
เมื่อใช้สารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลาย แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 0.16 มิลลิโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆกัน ในช่วงพีเอช 5-9 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2 พบว่าค่าพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม คือ 7 เนื่องจากเมื่อบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชต่ำกว่าหรือสูงกว่า 7 จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแดนซิลอะมิโนเฟนิล บอโรนิค แอซิด กล่าวคือ ในกรณีที่สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชต่ำกว่า 7 โปรตอนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการโปรโตเนตที่อะตอมไนโตรเจน หรืออะตอมออกซิเจนในโครงสร้างของแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ทำให้จำนวนอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวในโมเลกุลลดลง ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์จึงมีค่าลดลงไปด้วย และในกรณีที่สารละลายบัฟเฟอร์มีค่าพีเอชสูงกว่า 7 โปรตอนที่หมู่ซัลโฟนาไมด์ และหมู่ไฮดรอกซิลของ แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดจะถูกดึงออกไป (Deprotonated) ทำให้โมเลกุลมีประจุลบ มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเพิ่มขึ้น เกิดเรโซแนนซ์ได้ง่าย พลังงานที่คายออกมาอาจมีค่าน้อยลง ซึ่งส่งผลให้พีคของสารผลิตภัณฑ์เกิดที่ความยาวคลื่นที่ยาวขึ้น และทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร มีค่าลดลง




รูปที่ 4.2 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่พีเอชต่างกัน

**1.3 ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์**

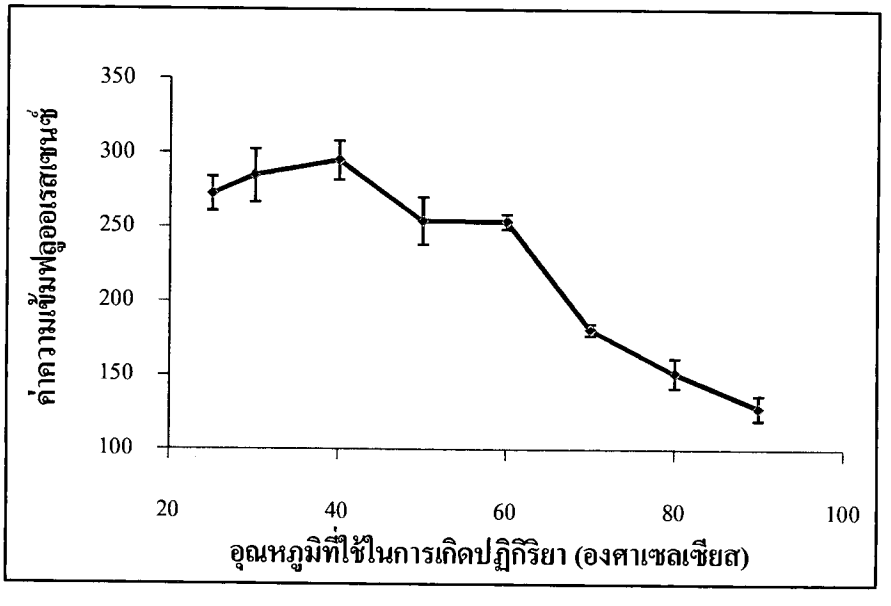
ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ มีผลต่อค่า ionic strength และค่า $pK_a$ ของกรดที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ ที่จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่เตรียม ถึงแม้ว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์จะมีค่าคงที่ก็ตาม (Perrin, D. D., and Dempsey, B., 1974) งานวิจัยจึงได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ โดยใช้สารละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ผสมกับสารละลายไดโซเดียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต โดเดคะไฮเดรต เตรียมบัฟเฟอร์พีเอช 7 เข้มข้นระหว่าง 0.1-10 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายปรับปริมาตร โดยผสมสารละลายมาตรฐาน บราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์กับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ผลแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ก็มีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงที่ 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์เริ่มลดลง ซึ่งอาจจะเป็นผลของ Ionic strength ดังที่กล่าวมาแล้วหรือ เป็นผลจากฟอสเฟตไอออนที่เป็น Quencher ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณมากเกินพอ ซึ่งทำให้เกิด Fluorescence quenching ขึ้นได้ ดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสารละลายปรับปริมาตรคือ 5 มิลลิโมลาร์




รูปที่ 4.3 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน

**1.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา**

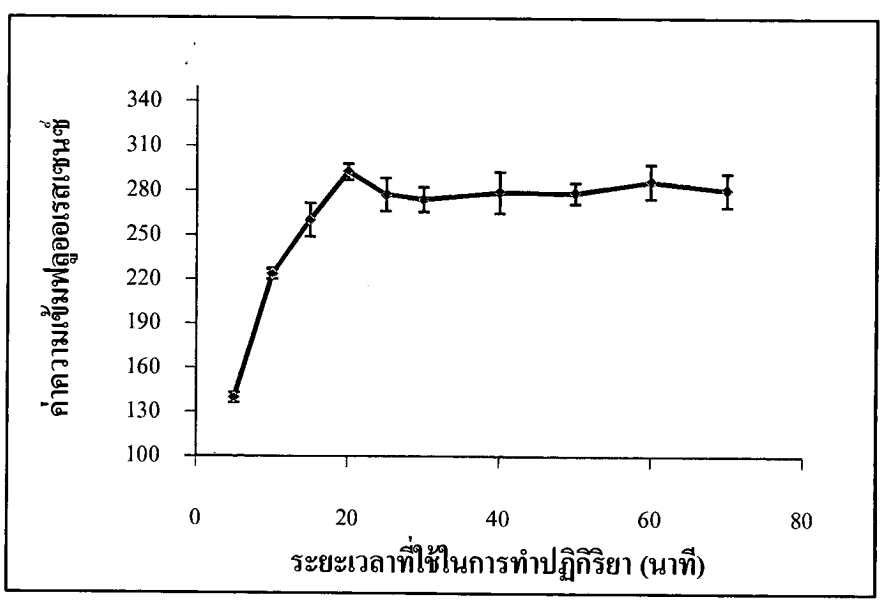
อุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ในเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์ กล่าวคือ กล่าวคือ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นจะเกิดกระบวนการไม่แผ่รังสี (Non-radiative processes) ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ลดลง (Valeur, B., 2001) โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ใช้การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนสเตียรอยด์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 70 องศาเซลเซียส (Gamoh, K., Okamoto, N., Takatsuto, S., and Tejima, I., 1990) นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่ใช้อุณหภูมิห้อง สำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างแซคคาไรด์ กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E., 1998; Peng, B., and Qin, Y., 2008; Seckin, Z. E., 2004) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้สารละลายมาตรฐาน บราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ผสมกับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ และใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 เป็นสารละลายปรับปริมาตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ในช่วง 25-90 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างบราสสิโนไลด์และแดนซิลอะมิโนเฟนิล บอโรนิค แอซิด เพื่อความสะดวกและง่ายต่อการทำอนุพันธ์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะส่งผลให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ลดลง ตามลำดับ




รูปที่ 4.4 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน

**1.5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา**

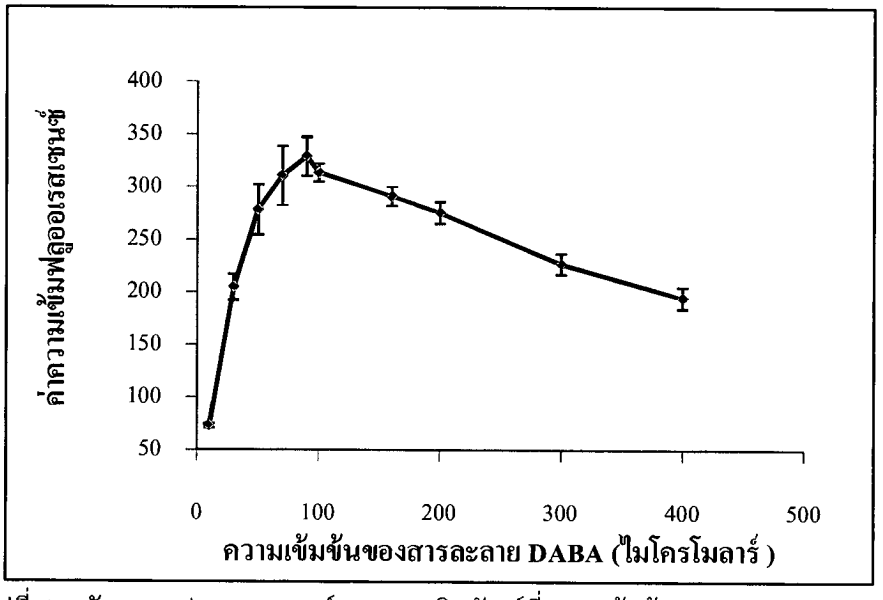
เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 160 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในช่วงระยะเวลา 5-70 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าหลังจากเวลาผ่านไป 20 นาที การตรวจวัดสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่สูงสุด และจะมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 25 นาที จากนั้นค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงจะมีค่าคงที่ไปเรื่อยๆ ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานถึง 70 นาทีก็ตาม จึงกล่าวได้ว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำอนุพันธ์มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน ดังนั้นเวลาที่ 20 นาที จึงมีความเหมาะสมที่จะเลือกใช้ในการทำปฏิกิริยา เนื่องจากให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์สูงสุด ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ได้ทำการหาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์กับรีเอเจนต์แดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเช่นเดียวกัน (Takatsuto, S., Omote, K., Gamoh, K., and Ishibashi, M., 1990; Winter, J., Schneider, B., Meyenburg, S., Strack, D., and Adam, G., 1999




รูปที่ 4.5 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่างกัน

**1.6 ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด**

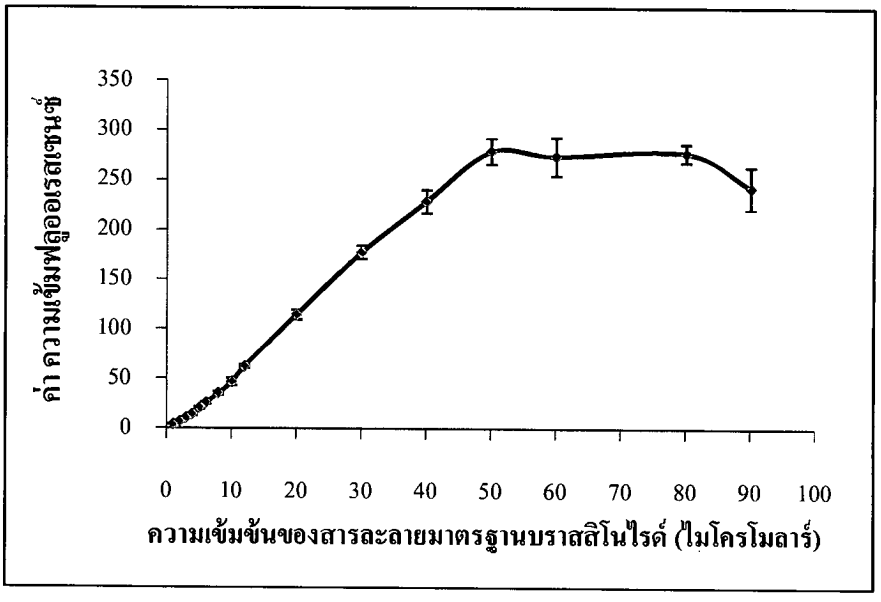
เมื่อนำสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 50 ไมโครโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ในช่วงความเข้มข้น 10-400 ไมโครโมลาร์ ปรับปริมาตรสารละลายผสมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที ผลแสดงดังรูปที่ 4.6 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรีเอเจนต์มากขึ้นจะทำให้มีค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วยจนถึงที่ 90 ไมโครโมลาร์ จากนั้นก็จะมีค่าลดลงเรื่อยๆ อันเนื่องมาจากเมื่อใช้รีเอเจนต์ในการทำอนุพันธ์ในปริมาณที่มากเกินไป โมเลกุลของรีเอเจนต์ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาอยู่จะชนกันเองหรือชนกับโมเลกุลผลิตภัณฑ์ เกิดปรากฏการณ์ fluorescence quenching ขึ้น ทำให้ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์มีค่าลดลง ดังนั้นค่าความเข้มข้นของสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด ที่ 90 ไมโครโมลาร์ จึงถูกเลือก ใช้ในการทำอนุพันธ์กับบราสสิโนไลด์ต่อไป



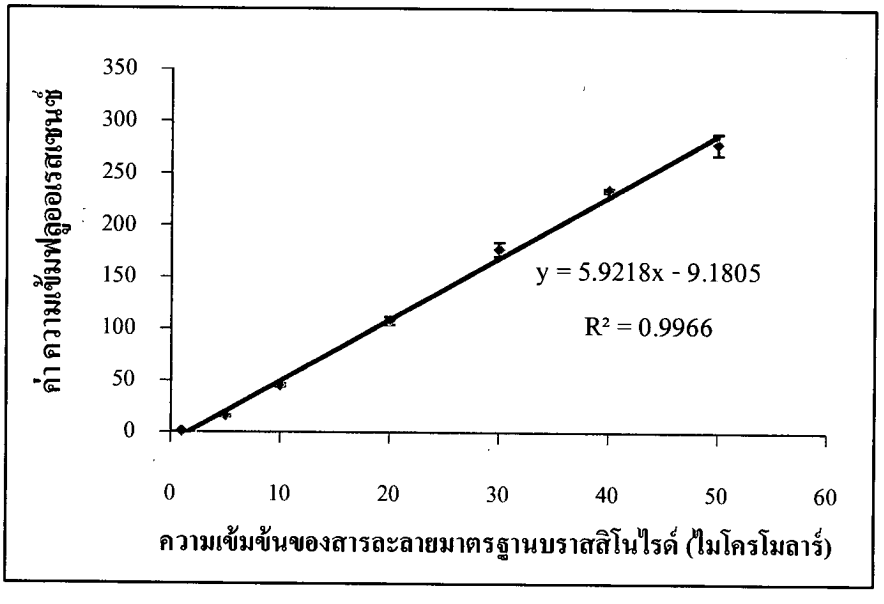

รูปที่ 4.6 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นของสารละลายแดนซิอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดต่างกัน

**2. การประเมินประสิทธิภาพของวิธี (Evaluation of method performance)**

วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) อยู่ระหว่าง 1-50 ไมโครโมลาร์ ดังรูปที่ 4.7 เมื่อความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์สูงขึ้น ค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์จะมีค่าคงที่ จึงได้นำช่วงความเป็นเส้นตรงนี้มาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) แสดงดังรูปที่ 4.8 ซึ่งกราฟมาตรฐานของบราสสิโนไลด์ มีสมการเส้นตรง คือ y = 5.9218x-9.1805 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9966 ค่าที่ได้เข้าใกล้ 1 แสดงถึงแนวโน้มที่ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานบราสสิโนไลด์และค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์มีความเป็นเส้นตรงอย่างดี




รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์




รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD, 3*SD/slope*, n = 10) มีค่าเท่ากับ 38 นาโนโมลาร์ และค่าขีดจำกัดการหาปริมาณ (LOQ, 10*SD/slope*, n = 10) มีค่าเท่ากับ 127 นาโนโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ได้ในระดับนาโนโมลาร์

ผลการศึกษาความเที่ยงภายในวัน (Intra-day Precision) และความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day Precision) โดยนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation หรือ % RSD) ผลดังตารางที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความเที่ยงตรงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ตามมาตรฐานของ Association of Official Analytical Chemists International (1993) ซึ่งค่าที่ได้ต้องไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงความเข้มข้นระดับไมโครโมลาร์ หรือมิลลิกรัมต่อลิตร

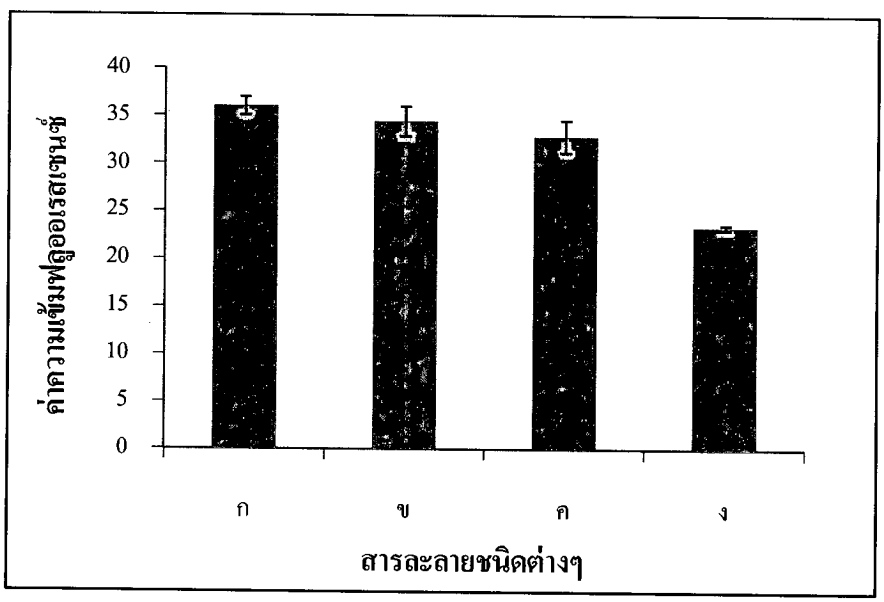
**ตารางที่ 4.1** ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการศึกษาความเที่ยง (n=7)

| ความเที่ยง | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) | | |
|---|---|---|---|
| | ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) | | |
| | 5 | 10 | 40 |
| ภายในวัน | 6.55 | 2.00 | 2.47 |
| ระหว่างวัน | 8.42 | 7.08 | 7.71 |

***- ผลของน้ำตาลต่อปฏิกิริยาอนุพันธ์***

ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพและการผลิตปุ๋ยน้ำต้องใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบ น้ำตาลที่ใช้เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งตามสูตรเคมี โมเลกุลของซูโครสจะมีหมู่ไดออล (Vicinal diols) ที่อาจเกิดปฏิกิริยากับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิดที่ เป็นฟลูออโรฟอร์ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาสมมติฐานนี้ โดยศึกษาน้ำตาล 3 ชนิดที่ใช้ในตัวอย่าง คือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลอ้อย ที่ความเข้มข้น 1- 60 มิลลิโมลาร์ เมื่อนำน้ำตาลแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ พบว่าไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาอนุพันธ์ระหว่างแซคคาไรด์กับแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด (Luis, G. P., Granda, M., Badia, R., and Diaz-Garcia, M. E., 1998) ได้รายงานว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ผลิตภัณฑ์ที่ลดสัญญาณฟลูเรสเซนส์ (Fluorescence quenching) และเกิดได้ดีกับเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวฟรุกโตส แต่จากปริมาณน้ำตาลที่ค่อนข้างสูงในตัวอย่าง งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อถึงผลของน้ำตาลต่อการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ของบราสสิโนไลด์ โดยใช้น้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ (เป็นปริมาณน้ำตาลโดยประมาณที่พบในตัวอย่างที่เจือจางก่อนนำมาวิเคราะห์) มาทำปฏิกิริยากับสารละลายมาตรฐานบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์ และสารละลายแดนซิลอะมิโนเฟนิลบอโรนิค แอซิด 90 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดง

ดังรูปที่ 4.9 พบว่าค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของสารละลายผสมน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง มีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ในน้ำตาลอ้อย ค่าฟลูออเรสเซนซ์ลดลงมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าฟลูออเรสเซนซ์ของบราสสิโนไลด์ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลลงไป อาจเนื่องมาจากสีของน้ำตาลอ้อยมีความเข้มกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ จึงบดบังการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์ได้มาก แต่ในการทดลองนี้สารตัวอย่างมีปริมาณบราสสิโนไลด์สูงพอ จึงสามารถแก้ไขปัญหานี้โดยการเจือจางสารตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วนต่าง ๆ ก่อนที่จะปิเปตต์มาทำปฏิกิริยา เพื่อลดความเข้มของสีจากสารตัวอย่างที่รบกวนการวิเคราะห์




**รูปที่ 4.9** สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสารผลิตภัณฑ์เมื่อผสมด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆกับบราสสิโนไลด์ 10 ไมโครโมลาร์ โดย ก: บราสสิโนไลด์ อย่างเดียว ข: บราสสิโนไลด์+น้ำตาลทรายขาว ค: บราสสิโนไลด์+น้ำตาลทรายแดง ง: บราสสิโนไลด์+น้ำตาลอ้อย

ผลการศึกษาค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ แสดงดังตารางที่ 4.2 และ 4.3 พบว่าค่าร้อยละการได้กลับคืนมีค่าอยู่ในช่วง 5.0-52.5 เปอร์เซ็นต์ และ 10.0-51.7 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ ตามลำดับ ซึ่งค่าร้อยละการได้กลับคืนของ บราสสิโนไลด์ในตัวอย่างมีค่าค่อนข้างต่ำ และมีการกระจายตัวสูง ในการทดลองได้เพิ่มความเข้มข้นของรีเอเจนต์สำหรับการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์แล้ว แต่ผลการทดลองที่ได้ก็ไม่ต่างกัน จึงไม่ใช่ปัญหาว่ารีเอเจนต์ไม่พอทำปฏิกิริยา แต่อาจเป็นไปได้มากกว่าว่าในตัวอย่าง มีเมทริกซ์ที่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์ ทำให้ปริมาณที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ใน

ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำ จึงเลือกใช้วิธี Standard Addition เพื่อแก้ปัญหาการรบกวนจากเมทริกซ์ รายละเอียดดังในหัวข้อต่อไป

**ตารางที่ 4.2** ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ (n = 3)

| ตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ | ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) | | | ค่าร้อยละการได้กลับคืน |
|---|---|---|---|---|
| | ก่อนเติม | ที่เติมลงไป | หลังเติม | |
| สาหร่าย | 1.8 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 1.9 | 5.0 |
| | | 4.0 | 2.0 | 5.0 |
| | | 8.0 | 2.4 | 7.5 |
| กล้วยน้ำว้า | 1.9 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 2.0 | 5.0 |
| | | 4.0 | 2.5 | 15.0 |
| | | 8.0 | 3.4 | 18.8 |
| บอระเพ็ด | 1.6 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 1.7 | 6.7 |
| | | 3.0 | 1.9 | 10.0 |
| | | 6.0 | 2.4 | 13.3 |
| กระชาย | 1.7 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 1.8 | 6.7 |
| | | 3.0 | 2.0 | 10.0 |
| | | 6.0 | 2.4 | 11.7 |
| โหระพา | 1.8 | 0.0 | - | - |
| | | 1.0 | 1.9 | 10.0 |
| | | 2.0 | 2.1 | 15.0 |
| | | 4.0 | 2.9 | 27.5 |
| ข้าว | 1.8 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 2.0 | 10.0 |
| | | 4.0 | 2.4 | 15.0 |
| | | 8.0 | 3.0 | 15.0 |

**ตารางที่ 4.2 (ต่อ)**

| ตัวอย่าง | ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) | | | ค่าร้อยละ |
|---|---|---|---|---|
| น้ำหมักชีวภาพ | ก่อนเติม | ที่เติมลงไป | หลังเติม | การได้กลับคืน |
| มะเขือเทศ | 2.2 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 2.4 | 13.3 |
| | | 3.0 | 2.7 | 16.7 |
| | | 6.0 | 3.5 | 21.7 |
| แก้วมังกร | 2.4 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 2.6 | 10.0 |
| | | 4.0 | 3.0 | 15.0 |
| | | 8.0 | 3.7 | 16.2 |
| ย่านาง | 2.1 | 0.0 | - | - |
| | | 1.0 | 2.2 | 10.0 |
| | | 2.0 | 2.4 | 15.0 |
| | | 4.0 | 3.2 | 27.5 |
| ใบเตย | 1.8 | 0.0 | - | - |
| | | 1.0 | 2.0 | 20.0 |
| | | 2.0 | 2.2 | 20.0 |
| | | 4.0 | 3.1 | 32.5 |
| ข่า | 2.0 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 2.4 | 20.0 |
| | | 4.0 | 2.9 | 22.5 |
| | | 8.0 | 4.3 | 28.8 |
| ขิง | 1.8 | 0.0 | - | - |
| | | 1.0 | 2.0 | 20.0 |
| | | 2.0 | 2.3 | 25.0 |
| | | 4.0 | 3.3 | 37.5 |

**ตารางที่ 4.2 (ต่อ)**

| ตัวอย่าง | ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) | | | ค่าร้อยละ |
|---|---|---|---|---|
| น้ำหมักชีวภาพ | ก่อนเติม | ที่เติมลงไป | หลังเติม | การได้กลับคืน |
| ขมิ้น | 2.3 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 2.6 | 20.0 |
| | | 3.0 | 3.2 | 30.0 |
| | | 6.0 | 4.4 | 35.0 |
| เงาะ | 2.2 | 0.0 | - | - |
| | | 1.0 | 2.4 | 20.0 |
| | | 2.0 | 2.8 | 30.0 |
| | | 4.0 | 3.8 | 40.0 |
| มะยม | 2.4 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 2.8 | 26.7 |
| | | 3.0 | 3.5 | 36.7 |
| | | 6.0 | 5.0 | 43.3 |
| ผลไม้รวม | 2.1 | 0.0 | - | - |
| | | 3.0 | 2.9 | 26.7 |
| | | 6.0 | 3.9 | 30.0 |
| | | 12.0 | 5.4 | 27.5 |
| ลองกอง | 3.6 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 4.4 | 40.0 |
| | | 4.0 | 5.5 | 47.5 |
| | | 8.0 | 7.8 | 52.5 |
| มะกรูด | 1.5 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 2.1 | 40.0 |
| | | 3.0 | 2.5 | 33.3 |
| | | 6.0 | 3.0 | 25.0 |

**ตารางที่ 4.3** ค่าร้อยละการได้กลับคืนของบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำชนิดต่างๆ (n=3)

| ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ | ความเข้มข้นของบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) | | | ค่าร้อยละ |
|---|---|---|---|---|
| | ก่อนเติม | ที่เติมลงไป | หลังเติม | การได้กลับคืน |
| ก | 2.2 | 0.0 | - | - |
| | | 2.0 | 2.4 | 10.0 |
| | | 4 .0 | 2.8 | 15.0 |
| | | 8.0 | 4.1 | 23.8 |
| ข | 3.6 | 0.0 | - | - |
| | | 4.0 | 4.0 | 10.0 |
| | | 8.0 | 5.2 | 20.0 |
| | | 16.0 | 9.2 | 35.0 |
| ค | 3.1 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 3.3 | 13.3 |
| | | 3.0 | 3.9 | 26.7 |
| | | 6.0 | 6.2 | 51.7 |
| ง | 3.1 | 0.0 | - | - |
| | | 1.5 | 3.3 | 13.3 |
| | | 3.0 | 4.1 | 33.3 |
| | | 6.0 | 6.2 | 51.7 |

**3. ปริมาณบราสสิโนสเตียรอยด์ในตัวอย่างด้วยวิธี Standard Addition**

การวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโน สเตียรอยด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพและปุ๋ยน้ำด้วยวิธี Standard Addition ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง เป็นน้ำหมักชีวภาพ 18 ตัวอย่าง และตัวอย่างปุ๋ยน้ำ 4 ตัวอย่าง โดยการทดลองทำวิธีเดียวกับการหาค่าร้อยละการได้กลับคืน จึงได้ใช้ผลข้อมูลจากการทดลองเดียวกัน มาคำนวณปริมาณด้วยวิธี Standard Addition ผลแสดงดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทั้ง 18 ตัวอย่าง มีปริมาณฮอร์โมนพืชกลุ่มบราสสิโนสเตียรอยด์ ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในช่วง 5.8-244.4 ไมโครโมลาร์ (2.8-117.5 มิลลิกรัมต่อลิตร) และในตัวอย่างปุ๋ยน้ำทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าอยู่ในช่วง 378-1669 ไมโครโมลาร์ (168-846 มิลลิกรัมต่อลิตร)

**ตารางที่ 4.4** ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพทั้ง 18 ชนิด (n=3)

| ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ | ปริมาณบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) | ตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพ | ปริมาณบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) |
|---|---|---|---|
| ผลไม้รวม | 11.8 ± 1.5 | ย่านาง | 39.6 ± 2.2 |
| โหระพา | 6.2 ± 0.4 | กล้วยน้ำว้า | 30.4 ± 4.7 |
| ขมิ้น | 5.8 ± 0.2 | กระชาย | 54.6 ± 7.2 |
| ลองกอง | 9.2 ± 0.3 | ข่า | 77.4 ± 4.1 |
| ขิง | 19.0 ± 0.8 | มะเขือเทศ | 40.1 ± 1.5 |
| มะยม | 9.8 ± 0.4 | ข้าว | 133.7 ± 8.2 |
| ใบเตย | 15.8 ± 2.3 | บอระเพ็ด | 244.4 ± 17.8 |
| มะกรูด | 57.9 ± 8.4 | แก้วมังกร | 120.1 ± 13.5 |
| เงาะ | 25.0 ± 1.7 | สาหร่าย | 212.2 ± 13.8 |

**ตารางที่ 4.5** ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างปุ๋ยน้ำทั้ง 4 ชนิด (n=3)

| ตัวอย่างปุ๋ยน้ำ | ปริมาณบราสสิโนไลด์ (ไมโครโมลาร์) |
|---|---|
| ก | 1,669 ± 81 |
| ข | 378 ± 36 |
| ค | 1,060 ± 17 |
| ง | 1,115 ± 8 |

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณบราสสิโนไลด์ในตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ พบว่าตัวอย่าง น้ำหมักชีวภาพข้าว บอระเพ็ด แก้วมังกร และสาหร่าย มีปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่ม บราสสิโนสเตียรอยด์ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพจากพืชชนิดอื่นๆ และในตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ก ค และ ง มีปริมาณของฮอร์โมนพืชกลุ่ม บราสสิโนสเตียรอยด์ที่เทียบเคียงกับบราสสิโนไลด์อยู่ในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างปุ๋ยน้ำ ข