

## การวัดสีระดับไมโครลิตรด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดเพื่อหาปริมาณ ฟอสฟอรัสและเหล็ก

Microliter-Scale Colorimetry Using a Low-Cost Digital Microscope for the Determination of Phosphorus and Iron

มิกิ กัณณะ และ สราวุธ สมนาม\*

Miki Kanna and Sarawut Somnam\*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Chiang Mai Rajabhat University

E-mail: miki\_kan@cmru.ac.th and sarawut\_som@cmru.ac.th\*

\*Corresponding author

(Received: 24 May 2026, Revised: 1 October 2026, Accepted: 16 October 2026)

<https://doi.org/10.57260/stc.2026.1816>

### บทคัดย่อ

การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีมาตรฐานต้องใช้เครื่องมือราคาสูงและสารเคมีปริมาณมาก ซึ่งเป็นข้อจำกัดของหน่วยงานที่มีงบประมาณจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวัดสีระดับไมโครลิตรด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดสำหรับหาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในดินและเหล็กทั้งหมดในวัสดุสำนักงานประเภทเหล็กกล้า และประเมินสมรรถนะของวิธีเทียบกับวิธีอ้างอิง วิธีที่พัฒนาขึ้นอาศัยการอ่านค่าสีในระบบ RGB ของหอยดผลผลิตกันชนแผ่นอะคริลิกสีขาวด้วยโปรแกรม Just Color Picker โดยตรวจวัดฟอสเฟตด้วยปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู และเหล็กด้วยปฏิกิริยา 1,10-ฟีแนนโทรีน สภาวะที่ศึกษา ได้แก่ ค่าสีที่ใช้ตรวจวัด เวลาในการเกิดปฏิกิริยา และอัตราส่วนปริมาตรของรีเอเจนต์ต่อสารละลาย สภาวะที่เหมาะสมสำหรับฟอสเฟต คือ ค่าสี R เวลา 180 วินาที และปริมาตรรวม 60  $\mu\text{L}$  ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเหล็ก คือ ค่าสี B เวลา 5 นาที และปริมาตรรวม 30  $\mu\text{L}$  วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.5–18  $\text{mg L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9887$ ) สำหรับฟอสเฟต และ 3–20  $\text{mg L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9966$ ) สำหรับเหล็ก ขีดจำกัดการตรวจวัด 0.30 และ 0.19  $\text{mg L}^{-1}$  และ %RSD 1.59 และ 0.24% ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ดิน 5 ตัวอย่างและวัสดุสำนักงาน 3 ชนิดสอดคล้องกับวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรีในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล โดยมี %RPD เฉลี่ย 8.90 และ 1.80% ตามลำดับ และร้อยละการกลับคืนของเหล็กอยู่ในช่วง 94.40–102% วิธีที่พัฒนาขึ้นใช้รีเอเจนต์ระดับไมโครลิตรและใช้อุปกรณ์ชุดเดียวสำหรับสารทั้งสองชนิด จึงมีศักยภาพเป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นสำหรับงานส่งเสริมการเกษตรและการเรียนการสอนเคมีวิเคราะห์ในสถานศึกษาที่มีงบประมาณจำกัด

**คำสำคัญ:** กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล การวัดค่าสีจากภาพดิจิทัล ฟอสฟอรัส เหล็ก เคมีวิเคราะห์สีเขียว



Copyright © 2026 Science and Technology to Community  
This is an open access article distributed under the terms of the CC BY 4.0 license

## Abstract

Quantitative analysis using standard methods requires expensive instruments and large amounts of chemical reagents, which can be a limitation for organizations with restricted budgets. This study aimed to develop a microliter-scale colorimetric method using an economical digital microscope for the determination of total phosphorus in soil and total iron in steel office materials, and to evaluate the method performance against reference methods. The developed method was based on RGB color measurement of reaction droplets placed on a white acrylic plate using the Just Color Picker software. Phosphate was determined using the molybdenum blue reaction, while iron was determined using the 1,10-phenanthroline reaction. The investigated conditions included the color channel used for measurement, reaction time, and the volume ratio of reagents to sample solution. The optimum conditions for phosphate determination were the R color channel, a reaction time of 180 s, and a total volume of 60  $\mu\text{L}$ , whereas those for iron determination were the B color channel, a reaction time of 5 min, and a total volume of 30  $\mu\text{L}$ . The developed method exhibited linear ranges of 0.5–18  $\text{mg L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9887$ ) for phosphate and 3–20  $\text{mg L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9966$ ) for iron, with limits of detection of 0.30 and 0.19  $\text{mg L}^{-1}$  and %RSD values of 1.59 and 0.24%, respectively. The results obtained for five soil samples and three types of office materials were in good agreement with those obtained by ultraviolet–visible spectrophotometry, with mean relative percent differences (%RPD) of 8.90% and 1.80%, respectively. The percentage recoveries of iron ranged from 94.40% to 102%. The developed method requires only microliter-scale volumes of reagents and employs a single device for the determination of both analytes. Therefore, it has potential as a preliminary screening method for agricultural extension work and analytical chemistry education in educational institutions with limited budgets.

**Keywords:** Digital microscope, Digital image colorimetry, Phosphorus, Iron, Green analytical chemistry

## บทนำ

ข้อมูลเชิงปริมาณทางเคมีมีความสำคัญต่อการตัดสินใจในภาคปฏิบัติ เช่น การจัดการปุ๋ย การประเมินคุณภาพน้ำ และการจัดกิจกรรมปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์มาตรฐาน เช่น สเปกโทรโฟโตเมตรีในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล (UV-Vis spectrophotometry) และ อะตอมมิกแอบซอร์ปชันสเปกโทรเมตรีแบบเปลวไฟ (Flame atomic absorption spectrometry, FAAS) ต้องใช้เครื่องมือและทรัพยากรสูง รวมถึงก่อให้เกิดการใช้สารเคมีและของเสีย ซึ่งไม่สอดคล้องกับแนวคิดเคมีวิเคราะห์สีเขียว (Green analytical chemistry, GAC) และเกณฑ์การประเมินความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม AGREE (Gatuszka et al., 2013; Pena-Pereira et al., 2020) ข้อจำกัดดังกล่าวทำให้พื้นที่ที่มีทรัพยากรจำกัดเข้าถึงข้อมูลทางเคมีได้ยาก ดังนั้น การพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีต้นทุนต่ำ ใช้งานง่าย และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงเป็นแนวทางสำคัญในการเพิ่มการเข้าถึงข้อมูลทางเคมีเชิงปริมาณ

การวัดค่าสีจากภาพดิจิทัล (Digital image colorimetry, DIC) เป็นทางเลือกที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา หลักการสำคัญคือการถ่ายภาพผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ให้สีด้วยกล้องดิจิทัล สมาร์ทโฟน หรือสแกนเนอร์ แล้วแปลงค่าความเข้มของค่าสีในระบบสี RGB เป็นสัญญาณเชิงปริมาณซึ่งสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ตามกฎเบียร์-แลมเบิร์ต (Capitán-Vallvey et al., 2015) จากรายงานของ Fan et al. (2021) ได้รวบรวมการประยุกต์ DIC บนสมาร์ทโฟนสำหรับการวิเคราะห์สารหลากหลายชนิด เช่น โลหะหนัก ยาฆ่าแมลง และสารชีวเคมี โดยให้สมรรถนะใกล้เคียงกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์มาตรฐาน งานวิจัยที่เป็นต้นแบบของแนวทางนี้ในประเทศไทย ได้แก่ การหาฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินด้วยกล้องโทรศัพท์มือถือของ Moonrungssee et al. (2015) และการตรวจวัด pH ดินด้วยอินดิเคเตอร์ร่วมกับสมาร์ทโฟนของ Somnam et al. (2019) ซึ่งทั้งสองงานชี้ให้เห็นว่า DIC มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้กับงานด้านเกษตรกรรมในระดับแปลงปลูก นอกจากนี้ การประยุกต์เทคนิค DIC ร่วมกับการลดสเกลของการวิเคราะห์ลงสู่ระดับไมโครลิตร (Microvolume analysis) ยังช่วยลดสารเคมีและของเสียได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับหลักการ GAC และเพิ่มศักยภาพของเทคนิคให้เหมาะต่อการใช้งานในภาคสนาม (Pena-Pereira et al., 2020; Tobiszewski et al., 2015)

ในกลุ่มอุปกรณ์บันทึกภาพ กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบ USB (USB digital microscope) ซึ่งจำหน่ายในตลาดออนไลน์ในราคาต่ำกว่า 1,000 บาท เป็นทางเลือกที่เหมาะสม เนื่องจากสามารถส่งขยายภาพหยดสารระดับไมโครลิตรได้อย่างชัดเจน และเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ผ่านพอร์ต USB ได้โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์เสริมที่ซับซ้อน Kanna et al. (2022) ได้รายงานการประยุกต์กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล USB ร่วมกับการสกัดจากใบฝรั่งซึ่งเป็นรีเอเจนต์ธรรมชาติ เพื่อหาปริมาณเหล็กในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยใช้สารเคมีระดับไมโครลิตร ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่แตกต่างจากวิธี FAAS อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และมีค่า %RSD น้อยกว่า 1.80% ซึ่งเป็นการพิสูจน์ความเป็นไปได้ของอุปกรณ์ดังกล่าวในเบื้องต้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวจำกัดอยู่ที่ระบบปฏิกิริยาเดียวสำหรับสารที่วิเคราะห์ชนิดเดียว จึงยังไม่มีหลักฐานว่ากล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดสามารถใช้เป็นแพลตฟอร์มร่วมสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่างกัน ได้หรือไม่ งานวิจัยนี้แตกต่างจากงานก่อนหน้านี้ในเชิงหลักการ คือใช้เครื่องมือชุดเดียวกันตรวจวัดผลิตภัณฑ์สอง

ชนิดที่มีช่วงการดูดกลืนแสงต่างกันอย่างชัดเจน ได้แก่ สารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูสำหรับฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน (วัดที่ 791.5 nm) และสารเชิงซ้อน Fe(II)-1,10-ฟีแนนทรีน สำหรับเหล็กทั้งหมดในวัสดุสำนักงาน (วัดที่ 511.5 nm) โดยเลือกค่าสี (R, G หรือ B) ให้สอดคล้องกับช่วงการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด แทนการกำหนดค่าสีและรีเอเจนต์เฉพาะสำหรับสารชนิดเดียว

งานวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีวัดสีระดับไมโครลิตรด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดสำหรับหาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในดินด้วยปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู และเหล็กในวัสดุสำนักงานด้วยปฏิกิริยา 1,10-ฟีแนนทรีน โดยคัดเลือกค่าสีและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละระบบ ประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงกับวิธีอ้างอิง วิธีที่ได้มีต้นทุนต่ำและใช้สารเคมีน้อย จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องมือคัดกรองเบื้องต้นสำหรับหน่วยงานส่งเสริมการเกษตร และเป็นชุดปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ในสถานศึกษาที่มีงบประมาณจำกัด

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีวัดสีระดับไมโครลิตรด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดสำหรับหาปริมาณฟอสฟอรัสและเหล็ก ด้วยปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลูและ 1,10-ฟีแนนทรีน ตามลำดับ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละระบบ
2. เพื่อประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้น และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงกับวิธีอ้างอิงสเปกโทรโฟโตเมตรในช่วงอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล

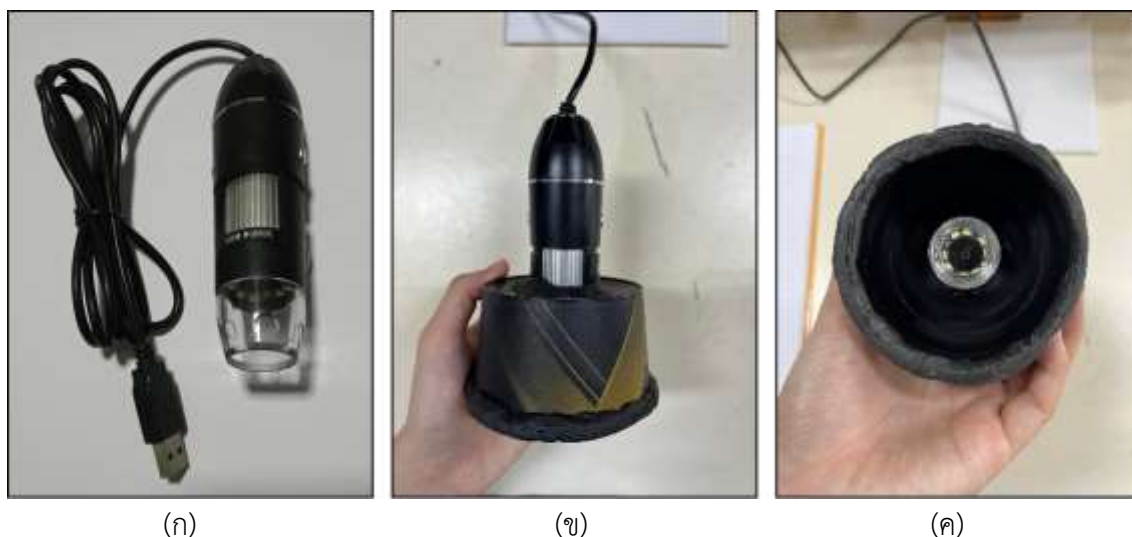
### ระเบียบวิธีวิจัย

#### สารละลายและรีเอเจนต์

สารละลายและรีเอเจนต์ทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) และใช้น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DI) ในการเตรียมสารละลาย สำหรับการวิเคราะห์ฟอสเฟต ใช้โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) เป็นสารมาตรฐาน และใช้แอมโมเนียมโมลิบเดต ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) กรดแอสคอร์บิก ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) โพแทสเซียมแอนติโมนิซาร์เทรต ( $\text{K}_2\text{Sb}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6)_2$ ) และกรดไนตริก ( $\text{HNO}_3$ ) เป็นรีเอเจนต์สำหรับปฏิกิริยาโมลิบดีนัมบลู ส่วนกรดเปอร์คลอริก ( $\text{HClO}_4$  70%) ใช้สำหรับย่อยตัวอย่างดิน สำหรับการวิเคราะห์เหล็ก ใช้แอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) เป็นสารมาตรฐาน และใช้ 1,10-ฟีแนนทรีน ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) เป็นรีเอเจนต์หลักของปฏิกิริยา และโซเดียมอะซิเตต/กรดอะซิติก ( $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ ) สำหรับเตรียมบัฟเฟอร์ pH 4.5 กรดแอสคอร์บิก สำหรับรีดิวซ์ Fe(III) เป็น Fe(II) กรดซัลฟิวริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) สำหรับการเตรียมตัวอย่าง

## เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือหลักของงานวิจัยคือกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบ USB (KKmoon) ดังภาพที่ 1 มีกำลังขยายปรับต่อเนื่อง 40-1,000 เท่า ใช้ตัวรับภาพ Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS) 0.3 ล้านพิกเซล เชื่อมต่อคอมพิวเตอร์โน้ตบุ๊กผ่านพอร์ต USB และทำงานร่วมกับโปรแกรม HiView 1.4 เพื่อแสดงและบันทึกภาพหยดสาร โดยใช้ไฟ Light Emitting Diode (LED) 8 ดวงที่ติดตั้งรอบเลนส์เป็นแหล่งกำเนิดแสงปรับความเข้มแสงได้หลายระดับ ส่วนปลายของกล้องครอบด้วยกระบอกพลาสติกสีดำ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm สูง 5 cm) เพื่อตัดแสงรบกวนภายนอก หยดสารถูกหยดลงบนแผ่นอะคริลิกสีขาวขนาด 14×14 cm ระดับความเข้มแสงตรวจวัดด้วยเครื่องวัดความเข้มแสง (Tenmars TM-204) ค่าสี RGB อ่านจากภาพบนหน้าจอด้วยโปรแกรม Just color picker เวอร์ชัน 5.6 (Anny Studio) เครื่องมืออ้างอิงสำหรับเปรียบเทียบผลคือเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu UV-1601) และเครื่องชั่งวิเคราะห์ 4 ตำแหน่ง (Sartorius BSA224S-CW) สำหรับการเตรียมสารละลายและตัวอย่าง



ภาพที่ 1 กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบ USB ที่ใช้ในงานวิจัย: (ก) ตัวกล้องและสาย USB (ข) กล้องที่ครอบด้วยกระบอกพลาสติกสีดำเพื่อตัดแสงรบกวนภายนอก มุมมองด้านข้าง และ (ค) มุมมองจากปลายเปิดของกระบอก แสดงเลนส์และไฟ LED 8 ดวงรอบเลนส์ (ที่มา: คณะผู้วิจัย, 2567)

## การเตรียมสารละลายมาตรฐานและรีเอเจนต์

สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตเข้มข้น  $1,000 \text{ mg L}^{-1}$  เตรียมโดยละลาย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ในน้ำ DI สารละลายมาตรฐานใช้งาน (working standards) ในช่วง  $0.1\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$  เตรียมโดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (stock standard) ทุกวันที่ทำการทดลอง ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างทั้งหมดรายงานเป็นมิลลิกรัมฟอสเฟตต่อลิตร ( $\text{mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ ) รีเอเจนต์โมลิบดีนัมประกอบด้วย 3 ส่วนคือ (i) สารละลายผสมแอมโมเนียมโมลิบเดต  $0.015 \text{ M}$  และ  $\text{HNO}_3$   $0.2 \text{ M}$ , (ii) โพแทสเซียมแอนติโมนิลทาร์เทรต

0.30 mM และ (iii) กรดแอสคอร์บิก 0.056 M ซึ่งเตรียมแยกกันคนละขวด (ดัดแปลงจากวิธีของ Murphy และ Riley (1962))

สารละลายมาตรฐาน Fe(II) เข้มข้น  $100 \text{ mg L}^{-1}$  เตรียมโดยละลาย  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0757 g และกรดแอสคอร์บิก 0.10 g (เพื่อป้องกันการออกซิเดชันของ Fe(II)) ใน  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.01 M ปรับปริมาตรเป็น 100 mL สารละลายมาตรฐานใช้งานในช่วง  $1\text{--}30 \text{ mg L}^{-1}$  เตรียมโดยเจือจางจากสารละลายตั้งต้น อะซิเตดบัฟเฟอร์ pH 4.5 เตรียมโดยละลายโซเดียมอะซิเตด 1.23 g ในน้ำ DI ผสมกับกรดแอสติก 0.963 mL ปรับปริมาตรเป็น 250 mL รีเอเจนต์ 1,10-ฟีแนโนโทรลีน เตรียมโดยละลาย 1,10-ฟีแนโนโทรลีน 0.625 g ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 mL และน้ำ DI 50 mL จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 250 mL ด้วยอะซิเตดบัฟเฟอร์

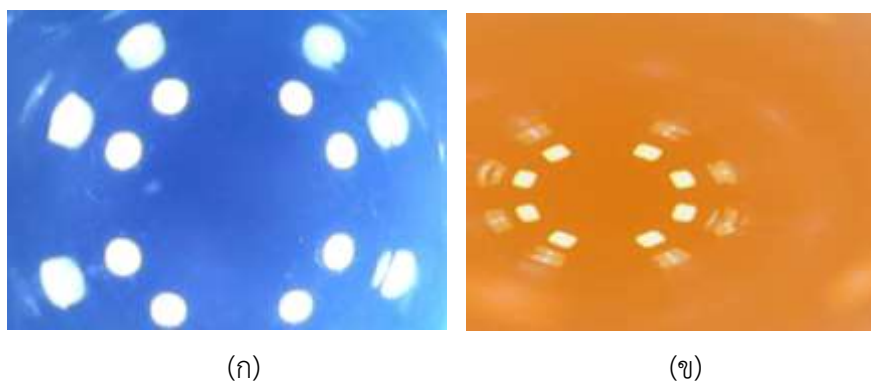
### การเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างดินสำหรับวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด เก็บจาก 5 จุดในพื้นที่ตำบลช้างเผือก อำเภอเมืองเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นดินรอบสิ่งปลูกสร้างและแปลงดอกไม้ โดยชุดหลุมรูปตัว V ที่ความลึก 0–15 cm (Pennock et al., 2008) ผึ่งตัวอย่างดินในที่ร่มจนแห้ง บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 mm (Sheppard & Addison, 2008) การย่อยตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีย่อยด้วยกรดเปอร์คลอริก (Olsen & Sommers, 1982; O'Halloran & Cade-Menun, 2008) โดยชั่งตัวอย่างดิน 2.00 g เติม  $\text{HNO}_3$  เข้มข้น 20 mL ให้ความร้อนจนสีเข้มของอินทรีย์วัตถุหายไป ทิ้งให้เย็นเล็กน้อย จากนั้นเติม  $\text{HClO}_4$  70% 10 mL ให้ความร้อนต่อภายในตู้ดูดควันจนสารละลายใส ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรเป็น 50 mL ด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 และเก็บสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ฟอสเฟตด้วยวิธีโมลิบดีนัมบลู (O'Halloran & Cade-Menun, 2008)

ตัวอย่างวัสดุสำนักงานที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ใบมีดคัตเตอร์ คลิปหนีบกระดาษ และลวดเย็บกระดาษ เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยดัดแปลงจากวิธีการเตรียมสารละลายเหล็กสำหรับการวิเคราะห์เชิงสีที่รายงานโดย Jeffery et al. (1989) โดยเติมน้ำ DI 5 mL และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 25 mL ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL และอุ่นที่อุณหภูมิ  $70\text{--}90^\circ\text{C}$  ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมตัวอย่างที่ชั่งไว้  $0.19\text{--}0.26 \text{ g}$  แล้วปิดปากขวดด้วยกรวยแก้วก้านสั้น โดยให้ก้านกรวยจุ่มอยู่ในขวด เพื่อช่วยรักษาสารละลายรีดิวซ์เหนือสารละลายและลดการเกิดออกซิเดชันของ Fe(II) เป็น Fe(III) ตั้งทิ้งไว้ 10–15 นาที แล้วให้ความร้อนต่อจนตัวอย่างละลายหมด จากนั้นปล่อยให้สารละลายเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ถ่ายสารละลายลงในขวดวัดปริมาตรและปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำ DI ก่อนการตรวจวัด สารละลายตัวอย่างถูกเจือจางให้อยู่ในช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธี และรีดิวซ์ Fe(III) เป็น Fe(II) ด้วยกรดแอสคอร์บิกก่อนทำปฏิกิริยากับ 1,10-ฟีแนโนโทรลีน

## ขั้นตอนการตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล

หยดรีเอเจนต์และสารละลายตัวอย่าง (หรือสารละลายมาตรฐาน) ลงบนแผ่นอะคริลิกด้วยไมโครปิเปต ในปริมาตรระดับไมโครลิตรตามอัตราส่วนคือ สารละลายตัวอย่าง 15  $\mu\text{L}$  และรีเอเจนต์ 3 ชนิด ชนิดละ 15  $\mu\text{L}$  สำหรับระบบฟอสเฟต และอัตราส่วนสารละลายตัวอย่างต่อรีเอเจนต์ 20:10  $\mu\text{L}$  สำหรับระบบเหล็ก ผสมหยดทั้งสองด้วยแท่งพลาสติกปลายแหลม (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm) แล้วตั้งทิ้งไว้ตามเวลา คือ 180 วินาที สำหรับระบบฟอสเฟต และ 5 นาที สำหรับระบบเหล็ก นำกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลที่ครอบกระบอกลดแสงแล้ว มาวางเหนือหยดสาร โดยปรับระยะห่างระหว่างเลนส์กับหยด 2.54 cm สำหรับระบบฟอสเฟต และ 1.5 cm สำหรับระบบเหล็ก ตามขนาดของหยดและกำลังขยายที่เหมาะสมในแต่ละปฏิกิริยา ภาพหยดสารถูกแสดงบนหน้าจอคอมพิวเตอร์แบบเรียลไทม์ผ่านโปรแกรม HiView ใช้โปรแกรม Just Color Picker เลื่อนเคอร์เซอร์อ่านค่าสี R, G, B ที่ 5 ตำแหน่งบนหยด แล้วเฉลี่ยค่าเป็นตัวแทนของหยดนั้น ภาพหยดสารผลิตภัณฑ์จากทั้งสองระบบปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ภาพขยายหยดสารผลิตภัณฑ์บนแผ่นอะคริลิกสีขาวจากกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล: (ก) สารเชิงซ้อนโมลิบดีนัมบลูจากปฏิกิริยาฟอสเฟต และ (ข) สารเชิงซ้อน  $\text{Fe(II)}-1,10\text{-ฟีแนนโทรีน}$  จากปฏิกิริยาเหล็ก จุดสว่างวงกลมในแต่ละหยดเป็นการสะท้อนของไฟ LED 8 ดวงรอบเลนส์กล้อง (ที่มา: คณะผู้วิจัย, 2567)

## การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด ได้แก่ (i) การคัดเลือกค่าสีที่เหมาะสม (R, G หรือ B) จากการสร้างกราฟระหว่างแต่ละค่าสีกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ โดยพิจารณาความชันและสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) (ii) เวลาในการเกิดปฏิกิริยา ที่เวลา 180, 210, 240, 270 และ 300 วินาที สำหรับระบบฟอสเฟต ส่วนระบบเหล็กกำหนดเวลาเกิดปฏิกิริยาคงที่ 5 นาที เนื่องจากเหล็กในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างอยู่ในรูป  $\text{Fe(II)}$  ก่อนทำปฏิกิริยาแล้ว และ (iii) อัตราส่วนปริมาตรของรีเอเจนต์ต่อสารละลายตัวอย่าง โดยศึกษาที่ปริมาตรรวม 5-200  $\mu\text{L}$  สำหรับระบบฟอสเฟต และอัตราส่วน  $\text{Fe(II)}:\text{รีเอเจนต์}$  ที่ 5:5, 10:10, 15:15, 20:20 และ 20:10  $\mu\text{L}$  สำหรับระบบเหล็ก โดยในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ใช้ระดับความเข้มแสง LED ของกล้องคงที่ที่ระดับ 2 (วัดด้วยเครื่องวัดความเข้มแสงได้ 1,247 lux) เนื่องจากความสว่างที่ระดับ 1 คือ 1,060 lux มีความสว่างน้อยเกินไปทำให้วัดค่าสีได้ต่ำมาก ส่วนที่ระดับ 3

และ 4 คือ 1,626 และ 3,120 lux ตามลำดับ มีแสงสว่างเกินไปจนทำให้สีของหยดสารกลืนกับแสงสะท้อน ไม่สามารถวัดค่าสี RGB ได้

### การประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของวิธี ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ตามสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{SD/slope} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD/slope} \quad (2)$$

เมื่อ SD คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณแบล็กครีเอเจนต์จากการวัดซ้ำ 10 ครั้ง และ slope คือความชันของกราฟมาตรฐาน

ความเที่ยง (precision) ประเมินจากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวัดซ้ำ 10 ครั้งที่สามารถละลายมาตรฐานความเข้มข้นในช่วงเส้นตรง และร้อยละการกลับคืน (recovery) ประเมินเฉพาะระบบหลักเพื่อเป็นตัวแทนการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของเทคนิคการวัดค่าสีจากหยดสารระดับไมโครลิตร โดยเติมสารละลายมาตรฐาน Fe(II) ที่ทราบความเข้มข้นลงในตัวอย่างจริง แล้วเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ตรวจพบกับค่าที่เติมเข้าไป

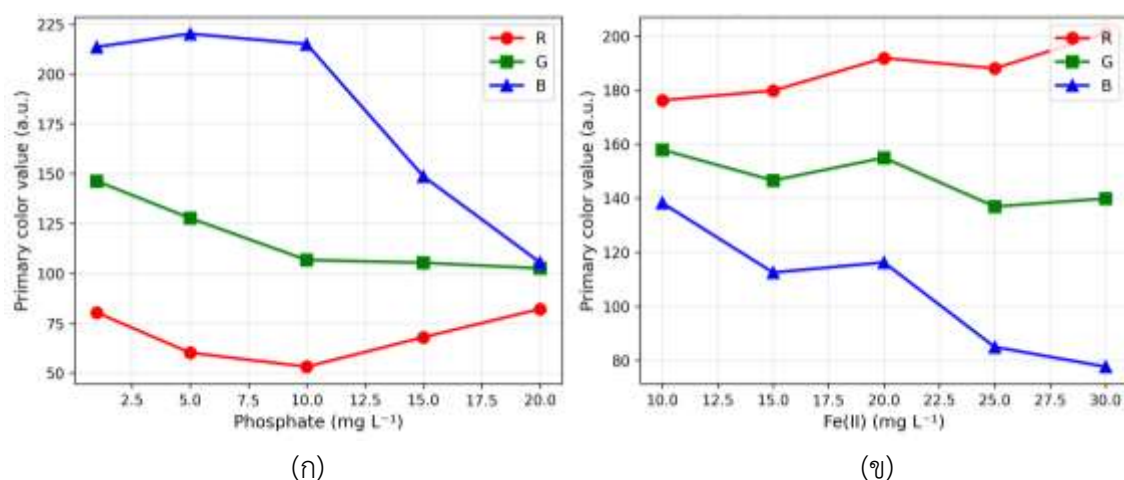
### การวิเคราะห์ตัวอย่างจริงและการเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นตามขั้นตอนที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ และวิเคราะห์ตัวอย่างชุดเดียวกันด้วยวิธีอ้างอิงโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ วิธีอ้างอิงใช้รีเอเจนต์ชุดเดียวกันและอัตราส่วนปริมาตรเดียวกับวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยขยายปริมาตรให้เหมาะกับคิวเวตต์ ระบบฟอสเฟตผสมสารละลายตัวอย่างและรีเอเจนต์ 3 ชนิด ชนิดละ 0.8 mL ส่วนระบบหลักผสมสารละลายตัวอย่าง 2.0 mL กับรีเอเจนต์ 1.0 mL แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Murphy & Riley, 1962; American Public Health Association [APHA] et al., 2017) ความยาวคลื่นที่ใช้ในวิธีอ้างอิงเลือกจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่บันทึกในช่วง 400–800 nm ได้ 791.5 nm สำหรับโมลิบดีนัมบลู และ 511.5 nm สำหรับสารเชิงซ้อน Fe(II)–1,10-ฟีแนนโทรลีน คำนวณความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และเปรียบเทียบผลทั้งสองวิธีด้วยค่าร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ (relative percentage difference, %RPD)

## ผลการวิจัย

### สเปกตรัมการดูดกลืนแสงและการคัดเลือกค่าสี

สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาทั้งสองระบบ พบว่าสารเชิงซ้อน โมลิบดินัมบลูดูดกลืนแสงในช่วงสีแดงถึงอินฟราเรดใกล้ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำเงิน วิธีอ้างอิงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 791.5 nm ซึ่งเป็นค่าสูงสุดในช่วงที่สแกน ในขณะที่สารเชิงซ้อน Fe(II)-1,10-ฟีแนโนโทรลีน ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 511.5 nm ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีส้มแดง เมื่อนำหยดสารผลิตภัณฑ์ระดับไมโครลิตรทั้งสองระบบมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล สามารถสังเกตความแตกต่างของสีได้ชัดเจน ดังภาพที่ 2 จากนั้น ศึกษาการตอบสนองค่าสี R, G และ B ต่อความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ ผลที่ได้แสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การตอบสนองของค่าสี R, G และ B ต่อความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์: (ก) ฟอสเฟตด้วยวิธี โมลิบดินัมบลู และ (ข) Fe(II) ด้วยวิธี 1,10-ฟีแนโนโทรลีน

เมื่อพิจารณาความชันและสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) ของกราฟค่าสีแต่ละชนิด พบว่าค่าสีที่ตอบสนองดีที่สุดต่อแต่ละระบบปฏิกิริยาแตกต่างกัน ดังสรุปในตาราง 1

ตาราง 1 ความชันและ  $R^2$  ของแต่ละค่าสีต่อปฏิกิริยาทั้งสองระบบ

| ระบบปฏิกิริยา                        | ค่าสี | ความชัน | $R^2$  | การคัดเลือก |
|--------------------------------------|-------|---------|--------|-------------|
| โมลิบดินัมบลู ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) | R     | -3.285  | 0.9887 | ✓ เลือก     |
|                                      | G     | -2.450  | 0.9225 |             |
|                                      | B     | -1.920  | 0.6504 |             |
| 1,10-ฟีแนโนโทรลีน (Fe(II))           | R     | +1.180  | 0.8511 | ✓ เลือก     |
|                                      | G     | -1.050  | 0.7846 |             |
|                                      | B     | -7.237  | 0.9966 |             |

พบว่าค่าสี R เป็นค่าสีที่เหมาะสมสำหรับโมลิบดินัมบลู (ความชัน -3.285,  $R^2 = 0.9887$ ) ขณะที่ค่าสี B เหมาะสมสำหรับ Fe(II)-1,10-ฟีแนโนโทรลีน (ความชัน -7.237,  $R^2 = 0.9966$ )

## สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจวัด

### เวลาในการเกิดปฏิกิริยา

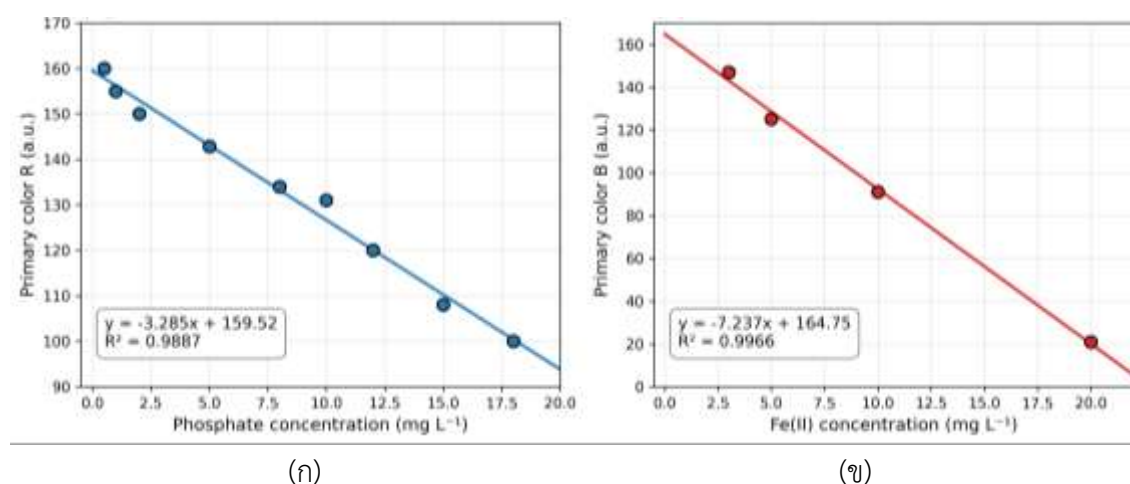
การศึกษาผลของเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 180, 210, 240, 270 และ 300 วินาที สำหรับระบบ โมลิบดีนัมบลู พบว่าเวลา 180 วินาที ให้การเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ตามความเข้มข้นของฟอสเฟตอย่าง ชัดเจนที่สุด ส่วนที่ 210-300 วินาที สีไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าปฏิกิริยาเข้าสู่จุดสมดุลที่ 180 วินาที ส่วนระบบเหล็กใช้เวลาเกิดปฏิกิริยา 5 นาที ซึ่งสั้นกว่าวิธีมาตรฐานที่เผื่อเวลาสำหรับขั้นตอนรีดิวซ์ Fe(III) เป็น Fe(II) ไปด้วย ในงานวิจัยนี้เหล็กอยู่ในรูป Fe(II) ก่อนหยดสาร การเกิดสารเชิงซ้อน Fe(II)-1,10-ฟีแนโนทรอลินจึงเกิดได้รวดเร็ว จึงเลือกเวลา 180 วินาทีสำหรับฟอสเฟตและ 5 นาทีสำหรับเหล็ก ตามลำดับ

### อัตราส่วนปริมาตรของรีเอเจนต์ต่อสารละลายตัวอย่าง

ในระบบโมลิบดีนัมบลู ทดสอบปริมาตรรวม 20, 60, 120, 160 และ 200  $\mu\text{L}$  พบว่าปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  (สารฟอสเฟตและรีเอเจนต์ 3 ชนิด อย่างละ 5  $\mu\text{L}$ ) เกิดความคลาดเคลื่อนของการผสม ขณะที่ปริมาตร 120-200  $\mu\text{L}$  ทำให้ขนาดหยดเกินกรอบภาพของกล้อง จึงเลือก 60  $\mu\text{L}$  (สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตหรือ สารละลายตัวอย่าง 15  $\mu\text{L}$  + รีเอเจนต์ 3 ชนิดอย่างละ 15  $\mu\text{L}$ ) เป็นปริมาตรที่เหมาะสม สำหรับระบบเหล็ก ทดสอบอัตราส่วน Fe(II) : รีเอเจนต์ ที่ 5:5 ถึง 20:20  $\mu\text{L}$  พบว่าอัตราส่วน 20:10  $\mu\text{L}$  ให้ความเข้มข้นสูงสุดและ  $R^2$  สูงสุด จึงเลือกเป็นเงื่อนไขสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

### สมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้น

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จัดทำกราฟมาตรฐานของทั้งสองระบบ ดังแสดงในภาพที่ 4 จากนั้น ประเมินสมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของวิธี ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง สมการเส้นตรง  $R^2$  ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) และความเที่ยง (%RSD) ผลที่ได้สรุปในตาราง 2



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล: (ก) ค่าสี R สำหรับฟอสเฟตในช่วง 0.5-18  $\text{mg L}^{-1}$  และ (ข) ค่าสี B สำหรับ Fe(II) ในช่วง 3-20  $\text{mg L}^{-1}$

ตาราง 2 สมรรถนะเชิงวิเคราะห์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิง (UV-Vis spectrophotometry)

| พารามิเตอร์                       | ฟอสเฟต<br>(วิธีที่พัฒนาขึ้น) | ฟอสเฟต<br>(วิธีอ้างอิง) | เหล็ก<br>(วิธีที่พัฒนาขึ้น) | เหล็ก<br>(วิธีอ้างอิง) |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------|
| ค่าสี/ความยาวคลื่น                | R                            | 791.5 nm                | B                           | 511.5 nm               |
| ช่วงเส้นตรง (mg L <sup>-1</sup> ) | 0.5-18                       | 0.5-20                  | 3-20                        | 3-20                   |
| สมการเส้นตรง                      | $y = -3.285x + 159.52$       | $y = 0.025x + 0.42$     | $y = -7.237x + 164.75$      | $y = 0.041x + 0.05$    |
| R <sup>2</sup>                    | 0.9887                       | 0.9978                  | 0.9966                      | 0.9980                 |
| LOD (mg L <sup>-1</sup> )         | 0.30                         | 0.10                    | 0.19                        | 0.08                   |
| LOQ (mg L <sup>-1</sup> )         | 0.91                         | 0.30                    | 0.58                        | 0.24                   |
| %RSD (n=10)                       | 1.59                         | 0.85                    | 0.24                        | 0.40                   |

วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับฟอสเฟตให้ช่วงเส้นตรง 0.5-18 mg L<sup>-1</sup> ความเที่ยง %RSD = 1.59% ที่ 5 mg L<sup>-1</sup> ในขณะที่วิธีสำหรับเหล็กให้ช่วงเส้นตรง 3-20 mg L<sup>-1</sup> LOD เท่ากับ 0.19 mg L<sup>-1</sup> และ %RSD = 0.24% ที่ 20 mg L<sup>-1</sup> ซึ่งความเที่ยงของทั้งสองวิธีดีกว่าเกณฑ์ทั่วไปของวิธีวิเคราะห์ (<5%)

### ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง

#### ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ตัวอย่างดิน 5 ตัวอย่าง พร้อมเปรียบเทียบกับวิธีอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 791.5 nm ผลแสดงในตาราง 3 พบว่าตัวอย่างที่ 1 และ 2 ตรวจไม่พบฟอสฟอรัสทั้งหมดในทั้งสองวิธี (ต่ำกว่า LOD) ส่วนตัวอย่างที่ 3-5 พบฟอสเฟตในสารละลาย 15.5, 2.7 และ 2.2 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> L<sup>-1</sup> ตามลำดับ (เทียบเป็น ฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน 126.1, 22.0 และ 17.9 mg P kg<sup>-1</sup>) เมื่อเปรียบเทียบผลทั้ง 2 วิธีด้วยค่า %RPD พบว่ามีความแตกต่างเฉลี่ยประมาณ 8.9% ซึ่งอยู่ในระดับเดียวกับความแตกต่างระหว่างวิธีวัดสีจากภาพดิจิทัล กับวิธีอ้างอิงที่มีรายงานไว้ เช่น ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ต่ำกว่า 9.6% ในการวิเคราะห์เหล็กในตะกอนแม่น้ำ (Lovato et al., 2024) จึงอาจกล่าวได้ว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องกัน

ตาราง 3 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในดินระหว่างวิธีกล้องจุลทรรศน์และวิธีอ้างอิง

| ตัวอย่าง  | กล้องจุลทรรศน์ (mg P kg <sup>-1</sup> ) | วิธีอ้างอิง (mg P kg <sup>-1</sup> ) | ค่าร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ |
|-----------|-----------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 1         | N.D.                                    | N.D.                                 | N.D.                         |
| 2         | N.D.                                    | N.D.                                 | N.D.                         |
| 3         | 126.1±5.9                               | 144.3±7.1                            | 13.5                         |
| 4         | 22.0±0.8                                | 20.9±0.8                             | 5.1                          |
| 5         | 17.9±0.5                                | 19.4±0.7                             | 8.0                          |
| ค่าเฉลี่ย | -                                       | -                                    | 8.9                          |

หมายเหตุ: N.D. คือ ตรวจไม่พบ (ต่ำกว่าขีดจำกัดการตรวจวัด) ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3) คำนวณจากความเข้มข้นของ ฟอสเฟตในสารละลาย โดยใช้อัตราส่วนมวล P/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (30.97/94.97) ปริมาตรสารละลาย 50 mL และมวลดิน 2.00 g

## ปริมาณเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างวัสดุสำนักงาน

การวิเคราะห์เหล็กในวัสดุสำนักงาน 3 ชนิด ได้แก่ ไบมีดคัตเตอร์ คลิปหนีบกระดาษ และลวดเย็บกระดาษ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลและเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 511.5 nm ผลแสดงในตาราง 4 ปริมาณเหล็กที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 91.7-95.1% w/w วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับวิธีอ้างอิงมาก โดยมีค่า %RPD เฉลี่ยต่ำเพียง 1.80% นอกจากนี้ได้ศึกษาร้อยละการกลับคืนของระบบเหล็กเพื่อเป็นตัวแทนการตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิคการวัดค่าสีระดับไมโครลิตร โดยเติมสารละลายมาตรฐาน Fe(II) 10 mg L<sup>-1</sup> ลงในสารละลายตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ได้ค่าในช่วง 94.4-102.0% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ AOAC International ยอมรับสำหรับการวิเคราะห์ระดับ mg L<sup>-1</sup> (80–110%) (AOAC International, 2016) แสดงว่าเทคนิคนี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม้ตัวอย่างผ่านการย่อยด้วยกรดเข้มข้น

ตาราง 4 ปริมาณเหล็กทั้งหมดในวัสดุสำนักงานและค่าร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์

| ตัวอย่าง       | กล้องจุลทรรศน์ (% w/w) | วิธีอ้างอิง (% w/w) | ค่าร้อยละความแตกต่างสัมพัทธ์ |
|----------------|------------------------|---------------------|------------------------------|
| คลิปหนีบกระดาษ | 95.1±4.6               | 93.4±4.0            | 1.8                          |
| ไบมีดคัตเตอร์  | 93.0±4.6               | 92.5±3.8            | 0.5                          |
| ลวดเย็บกระดาษ  | 94.5±4.2               | 91.7±4.0            | 3.1                          |
| ค่าเฉลี่ย      | -                      | -                   | 1.8                          |

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n = 3)

## การอภิปรายผล

### การเลือกค่าสีตามหลักการเสริมกันของสี

การที่ค่าสี R เหมาะสมต่อการตรวจวัดผลิตภัณฑ์โมลิบดีนัมบลู และค่าสี B เหมาะสมต่อสารเชิงซ้อน Fe(II)–1,10-ฟีแนโนโทรลีน สามารถอธิบายได้ด้วยหลักการเสริมกันของสี (Color complementarity) ในวงล้อสี โดยสีของสารผลิตภัณฑ์ที่มองเห็นด้วยตาเปล่ามาจากการสะท้อนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตรงข้ามกับช่วงที่ดูดกลืนแสง ในเชิงกลไก เซนเซอร์ CMOS ของกล้องแยกสีด้วยฟิลเตอร์สีแบบเบเยอร์ (Bayer filter) ซึ่งให้ช่อง B, G และ R ไวต่อแสงประมาณช่วง 400–500, 500–600 และ 600–700 nm ตามลำดับ ค่าสีของช่องใดจะลดลงมากที่สุดเมื่อแถบการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ซ้อนทับกับช่วงความยาวของช่องนั้นมากที่สุด (Capitán-Vallvey et al., 2015) สารโมลิบดีนัมบลูมีสีฟ้า เพราะดูดกลืนแสงในช่วงสีแดงถึงอินฟราเรดใกล้ แม้ความยาวคลื่นสูงสุดของสารเชิงซ้อน (ประมาณ 880 nm) จะอยู่นอกช่วงที่กล้องรับได้ แต่แถบการดูดกลืนที่กว้างตั้งแต่ประมาณ 600 nm ซ้อนทับกับช่อง R ทำให้ค่าสี R มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ในทำนองเดียวกัน Fe(II)–1,10-ฟีแนโนโทรลีน ดูดกลืนสูงสุดที่ 511.5 nm (ช่วงสีเขียว-น้ำเงิน) จึงสะท้อนเป็นสีส้มแดง (ช่วง 600-680 nm) ทำให้ค่าสี B ลดลงตามความเข้มข้น การที่ค่าสี B ตอบสนองดีกว่า G (ความชัน -7.237 และ -1.05) ทั้งที่ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) อยู่ในช่วงสีเขียว อาจเกิดจากแถบการดูดกลืนด้านความยาวคลื่นสั้นซ้อนทับกับยอดการเปล่งแสงสีน้ำเงินของไฟ LED สีขาว (ประมาณ 450 nm) ซึ่งเป็นแสง

หลักที่ช่อง B ได้รับ ผลนี้สอดคล้องกับ Lovato และคณะ (2024) ที่พบว่าช่อง B ให้ความชื้นสูงกว่าช่อง G สำหรับสารเชิงซ้อนชนิดเดียวกัน ขณะที่ช่อง R ไม่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของเหล็ก ส่วนค่าสี R ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (+1.18) ไม่ได้เกิดจากการดูดกลืนแสง เพราะผลิตภัณฑ์แทบไม่ดูดกลืนในช่วง 600–700 nm แต่น่าจะมาจากการปรับค่าแสงอัตโนมัติของกล้องที่ชดเชยความสว่างโดยรวมที่ลดลง แนวทางนี้แตกต่างจากงานของ Kanna และคณะ (2022) ซึ่งใช้สารสกัดใบฝรั่งเป็นรีเอเจนต์และได้ผลิตภัณฑ์โทนสีน้ำตาลอมส้ม-เทา จึงใช้ผลคูณ R×G×B แทนค่าสีเดียว ส่วนปฏิกิริยาทั้งสองในงานวิจัยนี้ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีชัดเจน (สีฟ้าและสีส้มแดง) จึงใช้ค่าสีเดียวในการตรวจวัดได้โดยตรง ซึ่งช่วยลดความซับซ้อนของการประมวลผลข้อมูล

### ความยืดหยุ่นของแพลตฟอร์มต่อสารที่วิเคราะห์หลายชนิด

กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดร่วมกับโปรแกรม Just color picker ใช้ตรวจวัดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่ให้สีต่างกันได้ด้วยอุปกรณ์ชุดเดียว โดยปรับเพียงสภาวะเฉพาะของแต่ละระบบ ได้แก่ เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (180 วินาที และ 5 นาที) และระยะห่างระหว่างเลนส์กับหยดสาร (2.54 และ 1.5 cm) ซึ่งเป็นการขยายขอบเขตจากงานของ Kanna และคณะ (2022) ที่ศึกษาเฉพาะเหล็ก กล้องชนิดนี้มีข้อได้เปรียบคือกำลังขยายที่ทำให้หยดสารขนาด 30–60  $\mu\text{L}$  ปรากฏเต็มกรอบภาพ และมีไฟ LED ในตัวที่ให้แสงสม่ำเสมอ ส่วนข้อด้อยคือมีแสงสะท้อนจาก LED บนผิวหยด (ภาพที่ 2) ขนาดหยดถูกจำกัดด้วยกรอบภาพ และต้องต่อกับคอมพิวเตอร์ จึงพกพาไม่สะดวกเท่าสมาร์ทโฟน

### ตาราง 5 การเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีวัดสีจากภาพดิจิทัลอื่น

| อุปกรณ์บันทึกภาพ                | สารที่วิเคราะห์ (ตัวอย่าง)    | ปฏิกิริยา (ค่าสีที่ใช้)   | ปริมาตรต่อการวัด                        | ช่วงเส้นตรง ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | LOD ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | อ้างอิง                   |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| สมาร์ทโฟน + กล้องควบคุมแสง      | ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (ดิน) | โมลิบดีนัมบลู (B)         | ~6.2 mL                                 | 0–3.1 <sup>a</sup>                 | 0.031 <sup>a</sup>         | Moonrungsee et al. (2015) |
| สมาร์ทโฟน + อุปกรณ์พิมพ์สามมิติ | ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (ดิน) | โมลิบดีนัมบลู (V ของ HSV) | คิวเวตต์ 1 $\text{cm}^b$                | 0–1.0                              | – <sup>b</sup>             | Lavanya et al. (2024)     |
| สแกนเนอร์ + ไมโครเพลต 96 หลุม   | เหล็กทั้งหมด (ตะกอนแม่น้ำ)    | 1,10-ฟีแนนโทรีน (G)       | 300 $\mu\text{L}$ ต่อ หลุม <sup>c</sup> | 0.2–14.0                           | 0.11 <sup>d</sup>          | Lovato et al. (2024)      |
| กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล USB       | เหล็ก (ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร)   | สารสกัดใบฝรั่ง (R×G×B)    | 30 $\mu\text{L}$                        | 40–120                             | 10.8                       | Kanna et al. (2022)       |
| กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล USB       | ฟอสฟอรัสทั้งหมด (ดิน)         | โมลิบดีนัมบลู (R)         | 60 $\mu\text{L}$                        | 0.5–18                             | 0.30                       | งานวิจัยนี้               |
| กล้องจุลทรรศน์ดิจิทัล USB       | เหล็กทั้งหมด (วัสดุเหล็กกล้า) | 1,10-ฟีแนนโทรีน (B)       | 30 $\mu\text{L}$                        | 3–20                               | 0.19                       | งานวิจัยนี้               |

หมายเหตุ: <sup>a</sup> แปลงจาก  $\text{mg P L}^{-1}$  เป็น  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$ , <sup>b</sup> ไม่ได้ระบุในบทความ, <sup>c</sup> ปริมาตรที่ถ่ายภาพ โดยเตรียมสารละลายในหลอดปริมาตร 10 mL, <sup>d</sup> รายงานในหน่วย  $\text{mg kg}^{-1}$  ในดินฉบับ

เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวัดสีจากภาพดิจิทัลอื่น (ตาราง 5) วิธีที่พัฒนาขึ้นใช้สารละลายต่อการวัดเพียง 30–60  $\mu\text{L}$  ซึ่งน้อยกว่าวิธีที่ใช้สมาร์ทโฟนถ่ายภาพสารละลายในหลอดทดลองประมาณ 100 เท่า (Moonrungsee et al., 2015) และน้อยกว่าวิธีที่ใช้สแกนเนอร์ร่วมกับไมโครเพลต ซึ่งต้องเตรียมสารละลายในหลอดปริมาตร 10 mL ก่อนแบ่งใส่หลุม (Lovato et al., 2024) อย่างไรก็ตาม ชีตจำกัดการตรวจวัดฟอสเฟตของวิธีที่พัฒนาขึ้นสูงกว่าวิธีที่ใช้สมาร์ทโฟน สำหรับระบบหลัก ให้ชิตจำกัดการตรวจวัดต่ำกว่างานของ Kanna และคณะ (2022) ที่ใช้กล้องชนิดเดียวกันประมาณ 50 เท่า เนื่องจากสารเชิงซ้อน  $\text{Fe(II)}\text{-}1,10\text{-ฟิแนโนโทรลีน}$  ให้สีเข้มกว่าสารเชิงซ้อนกับสารสกัดใบฝรั่ง

### ความสอดคล้องกับวิธีอ้างอิงและความน่าเชื่อถือของข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงทั้งสองระบบสอดคล้องกับวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี ระบบฟอสเฟตมี %RPD เฉลี่ย 8.9% แม้ตัวอย่างดินมีเมทริกซ์ซับซ้อน แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในสารละลายดินที่ผ่านการย่อยได้ อย่างไรก็ตาม ค่า %RPD ของตัวอย่างดินที่ 3 (13.50%) สูงกว่าตัวอย่างอื่น อาจเกิดจากความเข้มข้นฟอสเฟตในสารละลาย ( $15.5 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ ) อยู่ใกล้ขอบบนของช่วงความเป็นเส้นตรง ในช่วงนี้หาค่าสารมีสีเข้มจนค่า  $R$  เข้าใกล้ขีดจำกัดล่างของการแยกความต่าง การตอบสนองจึงเริ่มไม่เป็นเส้นตรงและให้ค่าต่ำกว่าวิธีอ้างอิง ในขณะที่ตัวอย่างที่ 4 และ 5 ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงกลางของกราฟมาตรฐานให้ %RPD เพียง 5.1 และ 8.0% ตามลำดับ การเจือจางตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงให้อยู่ในช่วงกลางของกราฟมาตรฐานก่อนตรวจวัดจึงน่าจะช่วยลดความคลาดเคลื่อนในลักษณะนี้ได้ ส่วนระบบหลักมี %RPD เฉลี่ย 1.8% และร้อยละการกลับคืน 94.4–102.0% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ AOAC กำหนดสำหรับการวิเคราะห์ระดับ  $\text{mg L}^{-1}$  ค่า %RSD ของระบบหลัก (0.24%) ต่ำกว่าระบบฟอสเฟต (1.59%) ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะวัดที่ความเข้มข้นสูงกว่า (20 และ  $5 \text{ mg L}^{-1}$  ตามลำดับ) และระบบฟอสเฟตมีขั้นตอนการหาค่ามากกว่า (4 หายด เทียบกับ 2 หายด) ตัวอย่างดินที่ 1 และ 2 มีฟอสเฟตต่ำกว่า LOD ( $0.30 \text{ mg L}^{-1}$ ) ทั้งสองวิธี งานต่อไปอาจเพิ่มขั้นตอนการเพิ่มความเข้มข้นก่อนวิเคราะห์ (preconcentration) เพื่อลด LOD

### ศักยภาพเชิงเคมีวิเคราะห์สีเขียวและแนวทางการประยุกต์ใช้

วิธีที่พัฒนาขึ้นใช้รีเอเจนต์เพียง 30–60  $\mu\text{L}$  ต่อการวิเคราะห์ ลดลงประมาณ 50–300 เท่าเมื่อเทียบกับวิธีสเปกโทรโฟโตเมตรี (3–10 mL) ซึ่งสอดคล้องกับหลักเคมีวิเคราะห์สีเขียวในด้านการลดของเสีย (Gatuszka et al., 2013) กล้องที่ใช้มีราคาต่ำกว่า 1,000 บาท เทียบกับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ราคาประมาณ 150,000–300,000 บาท ค่าที่วัดได้เป็นฟอสฟอรัสทั้งหมด ไม่ใช่ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จึงใช้กำหนดอัตราปุ๋ยโดยตรงไม่ได้ แต่ใช้คัดกรองเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบระดับฟอสฟอรัสสะสมระหว่างจุดเก็บตัวอย่างได้ เช่น ตัวอย่างดินที่ 3 ซึ่งมีค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่นอย่างชัดเจน นอกจากนี้ ชุดเครื่องมือยังแสดงหลักการของปฏิกิริยาที่ให้สี กฎเบียร์-แลมเบิร์ต และการสร้างกราฟมาตรฐานได้เป็นรูปธรรม จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นชุดปฏิบัติการในสถานศึกษาที่มีงบประมาณจำกัด

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มีข้อจำกัด 4 ประการ ประการแรก ยังไม่ได้ศึกษาผลของสารรบกวน เช่น ซิลิเกตและอาร์เซนิตในระบบฟอสเฟต และไอออนโลหะที่เกิดสารเชิงซ้อนกับ 1,10-ฟิแนโนโทรลีน ในระบบ

หลัก ประการที่สอง LOD และ LOQ คำนวณจากแปลงครีเอเจนต์ ยังไม่ได้ใช้แปลงค์เมทริกซ์ และการศึกษา ร้อยละการกลับคืนทำเฉพาะระบบหลัก และยังไม่ได้ประเมินความเที่ยงระหว่างวัน ประการที่สาม จำนวน ตัวอย่างมีน้อย คือดิน 5 ตัวอย่าง ซึ่งเปรียบเทียบได้จริงเพียง 3 ตัวอย่าง และวัสดุหลักกล้า 3 ชนิด ประการ สุดท้าย การทดลองทั้งหมดทำในห้องปฏิบัติการ และค่าที่ได้เป็นฟอสฟอรัสทั้งหมด ไม่ใช่ฟอสฟอรัสที่เป็น ประโยชน์ต่อพืช การนำไปใช้ในภาคสนามจึงต้องทดสอบเพิ่มเติม

## บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สรุปผลตามวัตถุประสงค์ได้ดังนี้

**วัตถุประสงค์ข้อที่ 1** วิธีวัดสัระดับไมโครลิตรด้วยกล้องจุลทรรศน์ดิจิทัลแบบประหยัดสามารถใช้หา ปริมาณฟอสเฟตและหลักได้ด้วยอุปกรณ์ชุดเดียวกัน ภายใต้ความเข้มแสง LED 1,247 lux สภาพที่เหมาะสม ของระบบฟอสเฟต คือ ค่าสี R เวลาในการเกิดปฏิกิริยา 180 วินาที ปริมาตรรวม 60  $\mu\text{L}$  (สารละลายตัวอย่าง และรีเอเจนต์ 3 ชนิด ชนิดละ 15  $\mu\text{L}$ ) และระยะห่างระหว่างเลนส์กับหยดสาร 2.54 cm ส่วนสภาพที่ เหมาะสมของระบบหลัก คือ ค่าสี B เวลา 5 นาที อัตราส่วนสารละลายตัวอย่างต่อรีเอเจนต์ 20:10  $\mu\text{L}$  และ ระยะห่าง 1.5 cm ค่าสีที่เลือกเป็นค่าสีที่ให้ความเข้มข้นและ  $R^2$  สูงสุดของแต่ละระบบ

**วัตถุประสงค์ข้อที่ 2** วิธีที่พัฒนาขึ้นให้ช่วงความเป็นเส้นตรง 0.5–18 และ 3–20  $\text{mg L}^{-1}$  ชีตจำกัดการ ตรวจวัด 0.30 และ 0.19  $\text{mg L}^{-1}$  และ %RSD 1.59 และ 0.24% สำหรับฟอสเฟตและหลักตามลำดับ ผลการ วิเคราะห์ตัวอย่างจริงสอดคล้องกับวิธีอ้างอิงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยมี %RPD เฉลี่ย 8.9% สำหรับ ฟอสฟอรัสทั้งหมดในดิน และ 1.8% สำหรับหลักทั้งหมดในวัสดุหลักกล้า และร้อยละการกลับคืนของหลัก อยู่ในช่วง 94.4–102.0%

วิธีที่พัฒนาขึ้นใช้รีเอเจนต์เพียง 30–60  $\mu\text{L}$  ต่อการวิเคราะห์ และใช้กล้องราคาต่ำกว่า 1,000 บาท จึง สอดคล้องกับหลักเคมีวิเคราะห์สีเขียว และมีศักยภาพเป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นและชุดปฏิบัติการในสถานศึกษา ที่มีงบประมาณจำกัด

**ข้อเสนอแนะ** งานวิจัยในขั้นต่อไปควรศึกษาผลของสารรบกวน เช่น ซิลิเกตในระบบฟอสเฟตและ ทองแดงในระบบหลัก ศึกษาร้อยละการกลับคืนของฟอสเฟตในตัวอย่างดินร่วมกับแปลงค์เมทริกซ์ เพิ่ม จำนวนตัวอย่างให้เพียงพอต่อการทดสอบทางสถิติ ประยุกต์ใช้กับการสกัดฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช และทดสอบชุดเครื่องมือในภาคสนามร่วมกับสถานศึกษาและหน่วยงานส่งเสริมการเกษตร

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ที่ สนับสนุนเครื่องมือวิเคราะห์สำหรับงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2017). 3500-Fe iron. In R. B. Baird, A. D. Eaton, & E. W. Rice (Eds.), *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (23<sup>rd</sup> ed.). APHA Press.
- AOAC International. (2016). Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. In *Official methods of analysis of AOAC International*. (20<sup>th</sup> ed.). AOAC International.
- Capitán-Vallvey, L. F., López-Ruiz, N., Martínez-Olmos, A., Erenas, M. M., & Palma, A. J. (2015). Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 899, 23–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.009>
- Fan, Y., Li, J., Guo, Y., Xie, L., & Zhang, G. (2021). Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement*, 171, 108829. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108829>
- Gałuszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
- Jeffery, G. H., Bassett, J., Mendham, J., & Denney, R. C. (1989). *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. (5<sup>th</sup> ed.). Longman Scientific & Technical.
- Kanna, M., Luangton, S., & Somnam, S. (2022). Application of an economic USB digital microscope for microvolume colorimetric determination of iron in supplements with a guava leaf extract. *Chiang Mai Journal of Science*, 49(5), 1365–1375. <https://doi.org/10.12982/CMJS.2022.086>
- Lavanya, V., Das, A., Nayak, A., Chawla, Y., Dasgupta, S., Weindorf, D. C., Li, B., & Chakraborty, S. (2024). Digital soil mapping of available phosphorus using a smartphone-integrated RGB imaging device and ascorbic acid extraction method. *Smart Agricultural Technology*, 9, 100591. <https://doi.org/10.1016/j.atech.2024.100591>
- Lovato, P. F. F., Chaves, E. S., Vidal, L. N., & Santos, P. M. (2024). Feasibility of digital image colorimetric methods for iron determination in river sediment. *International Journal of Sediment Research*, 39(5), 714–719. <https://doi.org/10.1016/j.ijsrc.2024.02.005>
- Moonrungsee, N., Pencharee, S., & Jakmunee, J. (2015). Colorimetric analyzer based on mobile phone camera for determination of available phosphorus in soil. *Talanta*, 136, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.024>

- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- O'Halloran, I. P., & Cade-Menun, B. J. (2008). Total and organic phosphorus. In M. R. Carter & E. G. Gregorich (Eds.), *Soil sampling and methods of analysis*. (2<sup>nd</sup> ed., pp. 265–291). CRC Press.
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical Chemistry*, 92(14), 10076–10082.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- Pennock, D., Yates, T., & Braidek, J. (2008). Soil sampling designs. In M. R. Carter & E. G. Gregorich (Eds.), *Soil sampling and methods of analysis*. (2<sup>nd</sup> ed., pp. 1–14). CRC Press.
- Sheppard, S. C., & Addison, J. A. (2008). Soil sample handling and storage. In M. R. Carter & E. G. Gregorich (Eds.), *Soil sampling and methods of analysis*. (2<sup>nd</sup> ed., pp. 39–49). CRC Press.
- Somnam, S., Kanna, M., & Jakmunee, J. (2019). Application of a smartphone to increase effectiveness in the determination of soil pH by using indicators. *Chiang Mai Journal of Science*, 46(4), 733–740. <https://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/journal-detail.php?id=10222>
- Tobiszewski, M., Marć, M., Gałuszka, A., & Namiśnik, J. (2015). Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules*, 20(6), 10928–10946.  
<https://doi.org/10.3390/molecules200610928>