รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนามาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดิน เพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล

Research and Development of Analysis Standard for Soil, Water, Fertilizer, Plant, Plant Growth Regulators and Soil Conditioner as the International Reference Laboratory

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวจรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์

Ms. Charirat Kusonwiriyawong

ปี พ.ศ. 2564

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนามาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดิน เพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล

Research and Development of Analysis Standard for Soil, Water, Fertilizer, Plant, Plant Growth Regulators and Soil Conditioner as the International Reference Laboratory

กรมวิชาการเกษตร

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวจรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์
Ms. Charirat Kusonwiriyawong

ปี พ.ศ. 2564

คำปรารภ (Foreword)

โครงการวิจัยและพัฒนามาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดินเพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล เป็นโครงการที่มุ่งเน้นพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์เพื่อรับรองคุณภาพ ควบคุม และกำกับดูแลคุณภาพปัจจัยการผลิต เช่น ปุ๋ย สารปรับปรุงดิน ผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ผลิต และจำหน่ายในท้องตลาด รวมทั้งนำเข้าและส่งออกทั้งภายใน และต่างประเทศ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ซึ่งเป็นภารกิจหลักของกรมวิชาการเกษตรในการควบคุมคุณภาพของปัจจัยการผลิตพืช เพื่อลดความเสี่ยงต่อผู้บริโภคและผู้ประกอบการ ในการใช้นำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้มาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการพัฒนามาตรฐานวิธีวิเคราะห์ เพื่อใช้ในการกำกับดูแลคุณภาพ และกำหนดมาตรฐานของปัจจัยการผลิตที่นำมาใช้ภายในประเทศ จากผลการศึกษาวิจัยนี้ ได้ 1) เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ แคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ กำมะถันทั้งหมด และคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี และปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี จำนวน 8 เกณฑ์ เพื่อสนับสนุน กำกับ ควบคุม และดูแล ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 2) ได้วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ จำนวน 13 วิธี ได้แก่ วิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมี โบรอนในดิน โบรอนในพืช ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน โซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน แคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน เหล็กที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน แมงกานีสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน สังกะสีที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน และทองแดงที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน และซิลิคอน 3) ได้วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ จำนวน 5 วิธี ได้แก่ การพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี และสารปรับปรุงดิน ประเภทปูนขาว โดโลไมท์ และปูนมาร์ล และหาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี 4) ได้ตัวอย่างปุ๋ย และอ้างอิงรับรองมีค่ากำหนดของเหล็ก และทองแดงทั้งหมด ตามข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO Guide 35 จำนวน 2 ตัวอย่าง 5) ได้วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ จำนวน 7 วิธี ได้แก่ ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย วิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ วิธีการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำ กรดอะมิโน ฮอร์โมนพืช Indole acetic acid (IAA) และGibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร และ 6) ได้ข้อมูลการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ด้วยวิธีโดยตรงและวิธีโดยอ้อม และปริมาณฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA), Gibberellic acid (GA_3) และ ธาตุอาหารในกล้วยน้ำว้า

ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และระบบการตรวจรับรองคุณภาพปัจจัยการผลิตที่ได้จากโครงการนี้ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มความสามารถและศักยภาพ และสร้างมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ เพื่อ

กรมวิชาการเกษตร

เป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้านปัจจัยการผลิตของเป็นประเทศไทย ด้วยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เป็นที่ยอมรับทั้งในและนอกประเทศ และเพิ่มความมั่นใจให้แก่ผู้ใช้บริการห้องปฏิบัติการ และใช้ในการควบคุมและกำกับดูแลคุณภาพปัจจัยการผลิต เพื่อรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ลดความเสียหายจากการหลบเลี่ยงกฎหมาย โดยการจำหน่ายสารปรับปรุงดินที่ไม่ได้คุณภาพ การจำหน่ายปุ๋ยปลอม และสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ไม่ได้มาตรฐาน

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 6
คณะผู้วิจัย 7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ 9
บทนำ 10
บทคัดย่อ 23
กิจกรรมที่ 1 การกำหนดเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยเคมีอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์ 27
กิจกรรมที่ 2 พัฒนา และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ดิน และพืช ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี 58
กิจกรรมที่ 3 พัฒนาวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และสารปรับปรุงดินโดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) 117
กิจกรรมที่ 4 พัฒนาตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified reference materials) ด้วยวิธีมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard method) 181
กิจกรรมที่ 5 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ วัสดุปรับปรุงดิน น้ำ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และธาตุอาหารในพืช และผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร 211
บทสรุปและข้อเสนอแนะ 332
บรรณานุกรม 334

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนามาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดินเพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงาน และงบประมาณ เป็นอย่างดียิ่งมาโดยตลอด นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้อำนวยการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรนายยงยุทธ ไผ่แก้ว อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านวัตถุอันตรายทางการเกษตร นางสาวพนิดา ไชยยันต์บูรณ์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์และทดสอบ และนางสาววรรณรัตน์ ชุติบุตร ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี ที่ได้ให้ข้อคิดเห็น คำแนะนำ และแนวทางการจัดทำงานวิจัย จึงทำให้โครงการวิจัยดังกล่าวสมบูรณ์ด้วยดี ท้ายนี้ ขอขอบคุณ นักวิจัยจากหน่วยงานต่างๆ ประกอบด้วย กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 ที่ร่วมมือในการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

นางสาวจรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์
หัวหน้าโครงการวิจัยและพัฒนามาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดินเพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล

กรมวิชาการเกษตร

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

จรีรัตน์	กุศลวิริยะวงศ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลองและผู้ร่วมการทดลอง

วรรณรัตน์	ชุติบุตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
สาธิดา	โพธิ์น้อย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
จริยา	วงศ์ตรี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
พงศ์พิศ	แก้วสุข	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
สงกรานต์	มะลิสอน	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ชฎาพร	คงนาม	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
สุพิศสา	ทองเขียว	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ทองจันทร์	พิมพ์เพชร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ศุภัคชญา	ทาหาร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ญาณธิชา	จิตต์สะอาด	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
นันทกานต์	ขุนโหร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ศุภากร	ดวนใหญ่	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
สุภา	โพธิจันทร์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
จิตติรัตน์	ชูชาติ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
เจนจิรา	เทเวศร์วรกุล	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
พจมาลย์	ภู่สาร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
สุวลักษมิ์	ไชยทอง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
อาธิยา	ปุ่นประโคน	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
เพชรรัตน์	ศิริวิ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กัญฐณา	คล้ายแก้ว	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กอรีอะ	บิลหลี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ตวงพร	ธีระพิทยาพงศ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
สุภานันทน์	จันทร์ประอบ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
อำนาจ	เอี่ยมวิจารณ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กัลยกร	โปร่งจันทึก	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
จิตรา	เกาะแก้ว	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
พิรุณ	ติระพัฒน์	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
เยาวลักษณ์	แสงแก้ว	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
สรัญญา	ช่วงพิมพ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

กรมวิชาการเกษตร

Research Project Team

Research Project Leader

Charirat	Kusonwiriyawong	Agriculture Production Sciences Research and Development Division

Experimental Chief and Team

Wannarut	Chutibut	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Sathida	Phonoy	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Jariya	Wongtree	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Pongpit	Kaewsuk	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Songkrant	Malisorn	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Chadaporn	Khongnam	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Supissa	Thongkeaw	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Tongchan	Pimpech	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Supakchaya	Thaha	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Yarnthicha	Jittsa-aad	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Nanthakan	Khunhon	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Supakorn	Duanyai	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Supha	Photichan	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Jittirat	Choochat	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Janejira	Teweswarakul	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Pojjamarn	Poosarn	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Suwalak	Chitong	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Arthiya	Punprakhon	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Phetcharat	Siriwi	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Kanthana	Klaigaew	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Koreeah	Binlee	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Tuanporn	Teerapitthayapong	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Supanun	Junpra-ob	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Amnat	Eamvijarn	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Kunlayakorn	Prongjunthuek	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Jitra	Kokaew	Agriculture Production Sciences Research and Development Division
Pirun	Tirapat	Office of Agricultural and Development Region 8
Yaowalak	Sangkeaw	Office of Agricultural and Development Region 8
Saranya	Choungpim	Office of Agricultural and Development Region 8

กรมวิทยาศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CRM	วัสดุอ้างอิงรับรอง
GA_3	กรดจิบเบอเรลลิ
IAA	กรดอินโดล-3-แอซีติก
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer
ICP–IDMS	inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometer
k	ค่าคงที่ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, k =2) สำหรับคำนวณค่าความไม่แน่นอน
LOD	ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัด
LOQ	ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้
mg/l	มิลลิกรัมต่อลิตร
mg/kg	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
n	จำนวนซ้ำของตัวอย่างทดสอบ สำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ
n_b	จำนวนซ้ำของ Blank สำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ
NIRS	เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
PGPR	แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโต
r	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
% RSD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
SEC	ค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์
SEP	ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
S'_0	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ
S_0	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบการทำซ้ำของ Sample Blank
u	ค่าความไม่แน่นอนของการวัด
u_{samp}	ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง
u_{anal}	ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์
u_{CRM}	ค่าความไม่แน่นอนจากการทดสอบวัสดุอ้างอิงรับรอง
u_{char}	ค่าความไม่แน่นอนจากการศึกษาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง
u_{bb}	ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน
u_{lts}	ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว
u_{sts}	ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น
$\bar{x}$	ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร โดยกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ซึ่งเป็นหน่วยงานหลักที่รับผิดชอบภารกิจการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติด้านต่างๆ ของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการขอขึ้นทะเบียน การขออนุญาตผลิต การนำเข้า การขาย การนำผ่านการส่งออก การดำเนินคดีกับผู้กระทำผิด และออกหนังสือสำคัญรับแจ้งปุ๋ยเคมีธาตุอาหารรอง ธาตุอาหารเสริม ซึ่งเป็นการกำกับดูแลคุณภาพปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

การควบคุมปุ๋ย แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ฉลาก ขนาดบรรจุ และเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร มีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองของปุ๋ยเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554 ซึ่งเป็นการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมีทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรอง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และข้อมูลตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2552 ซึ่งเป็นการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุที่มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปริมาณอินทรียวัตถุรับรองที่มีในปุ๋ยอินทรีย์ทุกชนิด ที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยอินทรีย์เพื่อตรวจสอบปริมาณอินทรียวัตถุรับรอง แต่ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์คลาดเคลื่อนสำหรับการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรองของธาตุอาหารรอง และธาตุอาหารเสริมในปุ๋ยเคมี และปริมาณธาตุอาหารรับรองของไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์เพื่อควบคุมคุณภาพปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ ถูกต้องตามหลักเกณฑ์ และรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ซึ่งต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยของห้องปฏิบัติการ โดยในกระบวนการวิเคราะห์หรือวัดค่าสิ่งต่างๆ ย่อมมีความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนออกมารองรับปริมาณ หรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นเกณฑ์สำหรับห้องปฏิบัติการใช้ในการพิจารณาดำเนินการตรวจสอบซ้ำ ในกรณีที่ผลวิเคราะห์ไม่ตรงกับปริมาณที่แจ้ง และเพื่อความเป็นธรรมของผู้ที่เกี่ยวข้อง ในกรณีที่มีการนำผลการวิเคราะห์มาใช้ตัดสินในทางกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการให้มีมาตรฐานสากล จำเป็นที่จะต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ มีระบบการควบคุมคุณภาพ (Quality control) และการประกันคุณภาพของ

กรมวิชาการเกษตร

ห้องปฏิบัติการ (Quality assurance) โดยปฏิบัติตาม Good laboratory practice จึงจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ ปัญหาของห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน ได้แก่ การแปรผันของผลการวิเคราะห์ การมีวิธีวิเคราะห์หลากหลายโดยไม่สามารถสรุปว่าวิธีการใดเหมาะสม และสมควรใช้เป็นวิธีมาตรฐาน และการเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่มีอยู่ นอกจากนี้เทคโนโลยี เครื่องมือ และเทคนิควิธีวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชในตัวอย่างประเภทต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลง/ปรับปรุง/พัฒนา ให้มีความเหมาะสม ถูกต้อง รวดเร็ว และเป็นทางเลือกใหม่มากขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูล เปรียบเทียบและสนับสนุนอย่างเป็นระบบ ทำให้เทคนิคเหล่านั้นขาดความน่าเชื่อถือ รวมทั้งวิธีวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช และจุลินทรีย์ บางส่วนยังไม่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล ทำให้ขาดข้อมูลที่ใช้ยืนยันความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุง/พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) โดยยึดตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025:2017 ซึ่งห้องปฏิบัติการที่จะต้องทำการทดสอบเพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ และจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล เป็นผลดีต่อการส่งสินค้าเกษตรเป็นสินค้าส่งออกและปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้กรมวิชาการเกษตรที่เป็นผู้รับผิดชอบหลักด้านปัจจัยการผลิตต่างๆ เช่น ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช จำเป็นที่จะต้องพัฒนาห้องปฏิบัติการในด้านต่างๆ เช่น เทคนิควิธีการวิเคราะห์ และระบบการควบคุมคุณภาพให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว เข้าถึงเกษตรกร รวมทั้งสร้างความเชื่อมั่นในด้านความถูกต้องของข้อมูลผลการวิเคราะห์ให้แก่เกษตรกร ผู้ประกอบการด้านปัจจัยการผลิตและประชาชนทั่วไปเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาด้านการปรับปรุงคุณภาพและเพิ่มผลผลิตพืช ลดการใช้ปุ๋ย และใช้ในการวินิจฉัยปัญหาและผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น การพัฒนาระบบมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล จึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง เพื่อให้ผลวิเคราะห์เป็นที่เชื่อถือของผู้ขอรับบริการ และยกระดับมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ให้มีมาตรฐานเดียวกันและเทียบเท่าสากล

นอกจากการเลือกวิธีวิเคราะห์ที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แล้ว ยังต้องมีการควบคุมคุณภาพผลวิเคราะห์ ซึ่งประกอบด้วย การควบคุมภายในและภายนอกห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องใช้วัสดุ หรือสารอ้างอิงรับรอง (Certified reference materials) ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง การผลิตตัวอย่างอ้างอิงรับรองสามารถจัดทำได้เองภายในประเทศ ซึ่งมาตรฐาน ISO Guide 35 ได้ให้นิยามของตัวอย่างอ้างอิงรับรองไว้ว่าเป็นตัวอย่างที่มีการให้ค่ากำหนดรับรองของตัวอย่าง และมีการประเมินความไม่แน่นอนที่สามารถสอบย้อนกลับทางมาตรวิทยาของผลการวัด ในการให้ค่ากำหนดรับรองห้องปฏิบัติการจะต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard method) ปัจจุบัน ประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานใดผลิตตัวอย่างอ้างอิงรับรองของการวิเคราะห์ดินและปุ๋ย ดังนั้นเพื่อให้กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตเป็นศูนย์กลางของตัวอย่างอ้างอิง จึงจำเป็นต้องพัฒนาเตรียม และ

กรมวิชาการเกษตร

วิเคราะห์ตัวอย่างดินและปุ๋ย เพื่อให้ได้ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง เป็นที่ยอมรับทั้งในและนอกประเทศ จะช่วยในการลดต้นทุนการวิเคราะห์ และเพิ่มความมั่นใจให้แก่ผู้ใช้บริการห้องปฏิบัติการ

แต่อย่างไรก็ตาม วิธีวิเคราะห์เคมีประกอบด้วยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณอาจมีข้อจำกัด ทำให้ห้องปฏิบัติการต้องมีการยืนยันผลการทดสอบด้วยการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อทำให้มั่นใจได้ว่าผลการทดสอบที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) เป็นทางเลือกหนึ่งของเทคนิควิเคราะห์เชิงคุณภาพ และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ด้านต่างๆอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็วแม่นยำ และสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่างๆ ได้โดยใช้ความยาวคลื่นจำเพาะขององค์ประกอบทางเคมีที่เป็นส่วนประกอบในสารนั้นๆ ซึ่งการวิเคราะห์องค์ประกอบไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีด้วยวิธีวิเคราะห์ทางเคมีอาจยังไม่สามารถยืนยัน และแยกปริมาณองค์ประกอบไนโตรเจนได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ ปัจจุบัน มีการใช้สารปรับปรุงดินอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีการควบคุมคุณภาพของสารปรับปรุงดิน ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ดังกล่าว ให้ความเหมาะสมกับสารปรับปรุงดินประเภทปูน เพื่อให้สามารถนำเทคนิควิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นอกจากนี้ ยังเป็นการลดมลภาวะที่เกิดจากห้องปฏิบัติการจากการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งลดต้นทุน และระยะเวลาในการวิเคราะห์ ด้วยกระแสการผลิตพืชปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม พร้อมการลดต้นทุนการผลิต เพิ่มคุณภาพผลผลิตพืช จึงมีการสนับสนุนให้มีการผลิตและใช้ผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น มีทั้งผลิตขึ้นเองภายในประเทศและยังมีการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยผลิตภัณฑ์ต่างๆเหล่านี้ จะมีการอ้างถึงสรรคุณทางด้านการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีการลงโฆษณาทางสื่อต่างๆ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีราคาสูง และเข้าถึงเกษตรกรได้ง่าย ทำให้เกษตรกรหลงเชื่อและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยไม่สามารถควบคุมได้ วัตถุดิบทางธรรมชาติที่นำมาผลิตมีทั้งจากพืชและสัตว์ อาทิเช่น ผัก ผลไม้ วัชพืช สาหร่าย ปลา กุ้ง ฯลฯ ในพืชหลายชนิดที่มีฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช แต่จะมีปริมาณมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชนิดของฮอร์โมนพืช เนื่องจากฮอร์โมนพืชมีทั้งที่ได้จากธรรมชาติและมนุษย์สามารถผลิตขึ้นได้ ในการนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซึ่งฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ถูกกำหนดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2562 แต่ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว อาจไม่มีการขึ้นทะเบียนเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานในผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ หรือผลิตจากวัตถุดิบที่เป็นธรรมชาติว่าต้องมีมากน้อยเพียงใด จึงเป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ที่ไม่ต้องขึ้นทะเบียน หรือต้องขึ้นทะเบียนตามพ.ร.บ. วัตถุอันตราย (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2562

ศูนย์วิทยทรัพยากร

2. วัตถุประสงค์

1) ศึกษาเพื่อกำหนดเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยเคมีอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อสนับสนุน กำกับ ควบคุม และดูแล ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และศึกษาข้อมูลสารออกฤทธิ์ขั้นต่ำของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ได้จากพืชตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2562

2) พัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ ดิน น้ำ วัตถุเคมีทางการเกษตร และธาตุอาหารพืชในพืช ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017

3) ศึกษาวิธีวิเคราะห์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี และปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี และสารปรับปรุงดิน ประเภทปูนโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

4) พัฒนาตัวอย่างอ้างอิงรับรองของดินและปุ๋ย ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17034

3. วิธีการวิจัย

พัฒนาความสามารถของห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงในการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดิน โดยการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ หาสมบัติต่างๆ ในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ ดิน พืช และวัตถุเคมีการเกษตร โดยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี (ICP-OES) และเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิค โครมาโทกราฟี (HPLC) เป็นต้น โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ต้องมีการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ช่วงของการวัด (Working range) ความคงทนของวิธี (Ruggedness/ Robstness) ตามมาตรฐาน Eurachem (2014) และ ISO/IEC 17025:2017 เพื่อกำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของประเทศไทย และนำค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบมากำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และปุ๋ยอินทรีย์ โดยเริ่มตั้งแต่กระบวนการเตรียมตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน เพื่อให้ผู้ประกอบการนำไปใช้ควบคุมคุณภาพปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ รวมทั้งพัฒนาเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์เชิงคุณภาพในการพิสูจน์หาเอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมีของปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ รวมทั้งสารปรับปรุงดิน หาองค์ประกอบทางเคมีของสารแต่ละชนิดในปุ๋ย หรือสารปรับปรุงดิน เพื่อเป็นการลดข้อจำกัดของการวิเคราะห์ทางเคมีที่ไม่สามารถแยกองค์ประกอบของไนโตรเจนในรูปต่างๆ ได้ และยังเป็นการยืนยันความถูกต้องของการวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อให้สารวัตรเกษตรนำไปบังคับใช้ กำกับ ควบคุม และดูแลคุณภาพปุ๋ยที่จำหน่ายในท้องตลาด ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และวิจัยเพื่อหาข้อมูลสารออกฤทธิ์ขั้นต่ำของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชที่ได้จากพืช เพื่อใช้ในการควบคุมตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2562 เพื่อให้เกิดความเป็นธรรมกับผู้ประกอบการ และรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร นอกจากนี้ ยังเป็นการ สร้างระบบประกันคุณภาพผลวิเคราะห์ด้วยการพัฒนาตัวอย่างอ้างอิงรับรองตามมาตรฐาน ISO Guide 35 โดยการให้ค่ากำหนดด้วย

กรมวิชาการเกษตร

เทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) และเป็นการเตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการเข้าสู่มาตรฐาน ISO/IEC 17034 เพื่อให้ห้องปฏิบัติการในประเทศไทยมีมาตรฐานเดียวกัน เป็นที่น่าเชื่อถือ และยอมรับในระดับสากล ประกอบด้วย 5 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 **การกำหนดเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยเอินทรีย์คมี และปุ๋ยอินทรีย์** ประกอบด้วย 6 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

การทดลองที่ 1.3 ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

การทดลองที่ 1.4 ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

การทดลองที่ 1.5 ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

การทดลองที่ 1.6 ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี

โดยการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง ($\%U_{Sampling}$) และค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ($\%U_{Analytical}$) และนำมาคำนวณเป็นค่าความไม่แน่นอนรวม ($\%U_{Total}$) (Eurachem, 2019)

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการดำเนินการ

1. แบ่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยอินทรีย์ A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2019) และบดตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 8 ส่วน นำตัวอย่างที่ได้ไปดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

2. คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนวิเคราะห์ ตามสมการ

$$U = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ u = ค่าความไม่แน่นอน

% RSD = Relative standard deviation

SD = standard deviation

3. คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ปุ๋ยแบบ ตามสมการ

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2}$$

เมื่อ u_c = Combined uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

4. นำผลที่ได้มาคำนวณทางสถิติ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองในปุ๋ยอินทรีย์ อินทรีย์เคมี และเคมี

กิจกรรมที่ 2 **พัฒนา และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ดิน และพืช ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี** ประกอบด้วย 7 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

การทดลองที่ 2.2 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

การทดลองที่ 2.3 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

การทดลองที่ 2.4 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

การทดลองที่ 2.5 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

การทดลองที่ 2.6 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโต

กรมวิชาการเกษตร

รเมท

การทดลองที่ 2.7 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

โดยการหา Range/Linearity, Limit of Detection; LOD, Limit of Quantitation; LOQ , Trueness และprecision โดยใช้วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) คำนวณผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ตามมาตรฐาน Eurachem (2014) และ AOAC (2016) และตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ ระยะเวลาการกรอง เป็นต้น

วิธีการดำเนินการ

1. Linearity / range ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน อย่างน้อย 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และปริมาณความเข้มข้นตัวอย่าง ($r \geq 0.995$)

2. หาค่า Trueness และ precision โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง และดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ โดยทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำและต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery และ HorRat < 1.3 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016)

การคำนวณ % Recovery จากสมการ

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (Horwitz' Ratio)} = \frac{\text{RSD(r)}}{\text{PRSD(R)}}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{RSD(r)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

$$\text{PRSD(R)} = \frac{2C^{-0.15}}{100} \quad (C = \text{mean})$$

3. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า Standard deviation ของการวิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสมการ

$$\text{LOD} = 3S0'$$

$$\text{LOQ} = 10S0'$$

กรมวิชาการเกษตร

4. ทดสอบความคงทนของวิธี Ruggedness โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ ประเมินโดยใช้สถิติ t-test ค่า t-Stat < t Critical แสดงว่าค่าเฉลี่ยของการวัดจากข้อมูลทั้ง 2 ชุด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หรือทดสอบโดยใช้ Youden-Steiner testing| E | < S แสดงว่า ไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

กิจกรรมที่ 3 **พัฒนาวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และสารปรับปรุงดินโดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy; NIRS)** ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 พิสูจน์เอกลักษณ์ และวิเคราะห์องค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

การทดลองที่ 3.2 วิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

การทดลองที่ 3.3 พิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้

การทดลองที่ 3.4 พิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์ โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้

การทดลองที่ 3.5 พิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดปูนมาร์ล โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้

โดยใช้สเปคตรัม (Spectrum) ที่ได้จากเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ที่ได้มาปรับปรุง (pre-treatment) โดยวิธีทางคณิตศาสตร์ สร้างและปรับปรุงสมการทำนายเพื่อใช้ประเมินผล ประเมินประสิทธิภาพและตรวจสอบความใช้ได้ของสมการ และนำมาเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ โดยพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (Standard of Calibration : SEC) ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (Standard of Error of Prediction: SEP) ค่าอัตราส่วนระหว่าง SD กับ SEP (Ratio of Prediction to Deviation, RPD) ค่า accuracy และค่า precision

วิธีการดำเนินการ

1. วิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพตามคุณลักษณะทางเทคนิคของตัวอย่าง

2. วัดการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) โดยเทตัวอย่างใส่ลงใน Petri dish ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร เพื่อเก็บสเปกตรัม

กรมวิชาการเกษตร

3. นำสเปคตรัม (Spectrum) ที่ได้มาปรับปรุง (pre-treatment) โดยวิธีทางคณิตศาสตร์ เพื่อหาความยาวคลื่นจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์

4. สร้างและปรับปรุงสมการทำนายเพื่อใช้ประเมินผลโดยหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น และค่าทางเคมี

5. ประเมินค่าและทำนายผลจากสมการ โดยปรับปรุงสมการให้มีค่าความสัมพันธ์ (R) ค่าความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ (SEC) และค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (SEP) ต่ำ และค่าอัตราส่วนระหว่าง SD กับ SEP (Ratio of Prediction to Deviation, RPD) สูง แล้วนำสมการไปประเมินในตัวอย่าง จนแน่ใจว่าสมการมีประสิทธิภาพในการประเมิน

6. การพิจารณาความแม่น (Accuracy) โดยใช้ Paired t-test และ %Recovery เปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้ด้วยวิธี NIRS กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี

การคำนวณ

$$t_{ext} = \frac{\bar{d}}{sd/\sqrt{n}}$$

$$\%Recovery = \frac{\text{ค่าที่ทำนายด้วยวิธี NIR}}{\text{ค่าวิเคราะห์ทางเคมี}} \times 100$$

เมื่อ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง

sd = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

n = จำนวนตัวอย่าง

7. พิจารณาความเที่ยง (Precision) โดยใช้ %RSD (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ : Relative Standard Deviation)

การคำนวณ

$$\%RSD = \frac{sd}{\bar{x}} x\,100$$

เมื่อ sd = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง

กิจกรรมที่ 4 **พัฒนาตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified reference materials) ด้วยวิธีมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard method)** ประกอบด้วย 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 4.1 ศึกษาหาค่ากำหนดของเหล็กทั้งหมด และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิงด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)

การทดลองที่ 4.2 ศึกษาหาค่ากำหนดของเหล็กทั้งหมด และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

ด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)

ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน ทดสอบความเสถียรระยะสั้น และระยะยาว หาค่ากำหนด และประเมินค่าความไม่แน่นอนด้วยวิธีทางสถิติตามมาตรฐาน ISO Guide 35

วิธีการดำเนินการ

1. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีโดยหา Matrix effect ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง ICP-MS และพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision) โดยใช้วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่มีค่าไอโซโทปรับรอง

2. เตรียมตัวอย่างอ้างอิง และทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างดินอ้างอิงโดยการสุ่มตัวอย่างแบบ Random จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นประเมินผลทางสถิติด้วย Cochran's test และ One-way ANOVA และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) ตามแนวทาง ISO Guide 35

3. ทดสอบความเสถียรระยะสั้น (Short-term stability) โดยทำการทดลองส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน วิเคราะห์ตัวอย่าง ประเมินทางสถิติ และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) ตามแนวทาง ISO Guide 35

4. ทดสอบความเสถียรระยะยาว (Long-term stability) โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 12 เดือน และสุ่มตัวอย่าง มาวิเคราะห์ และประเมินทางสถิติ จากนั้นคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว (U_{lts})

5. ศึกษาหาค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิง โดยสุ่มตัวอย่างอ้างอิงมาจำนวน 10 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP–IDMS จากนั้นคำนวณค่าคุณสมบัติด้วยวิธี Weighted mean ดังนี้

$$y_{char} = \sum w_i x_i / \sum w_i$$

โดย

$$w_i = 1/u_i^2$$

และคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการหาค่าคุณสมบัติจากสมการ

$$U_{char} = \sqrt{\sum w_i^2 u_i^2}$$

6. ประเมินความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง ดังสมการ

$$U_{RM} = k\sqrt{U_{char}^2 + U_{bb}^2 + U_{lts}^2 + U_{sts}^2}$$

เมื่อ U_{RM} = ค่าความไม่แน่นอนขยายของวัสดุอ้างอิง

U_{char} = ค่าความไม่แน่นอนจากการศึกษาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง

U_{bb} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน

U_{lts} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว

กรมวิชาการเกษตร

U_{lts} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น

k = Coverage factor (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, k =2)

กิจกรรมที่ 5 **พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ วัสดุปรับปรุงดิน น้ำ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และธาตุอาหารในพืช และผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร** ประกอบด้วย 8 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 5.1 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีด้วยวิธีโดยตรงและวิธีโดยอ้อม

การทดลองที่ 5.2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย สวพ. 8

การทดลองที่ 5.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

การทดลองที่ 5.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

การทดลองที่ 5.5 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด และหาค่าคงที่เพื่อประเมินความเค็มของน้ำทางการเกษตร

การทดลองที่ 5.6 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช

การทดลองที่ 5.7 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

การทดลองที่ 5.8 ศึกษาหาปริมาณฮอร์โมน indole acetic acid (IAA) gibberellic acid (GA_3) และ ธาตุอาหารในกล้วยน้ำว้า

ประกอบด้วย 1) การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีด้วยวิธีโดยตรงและวิธีโดยอ้อม 2) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย วิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ วิธีการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ วิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน วิธีวิเคราะห์ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร 3) การศึกษาหาปริมาณฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA), Gibberellic acid (GA3) และ ธาตุอาหารในกล้วยน้ำว้า

วิธีการดำเนินการ

1. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ดังนี้

1.1 ทดสอบความเที่ยง (Precision) โดยการวัดความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability) และการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation) คำนวณหาค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation, CV) โดย %CV

กรมวิชาการเกษตร

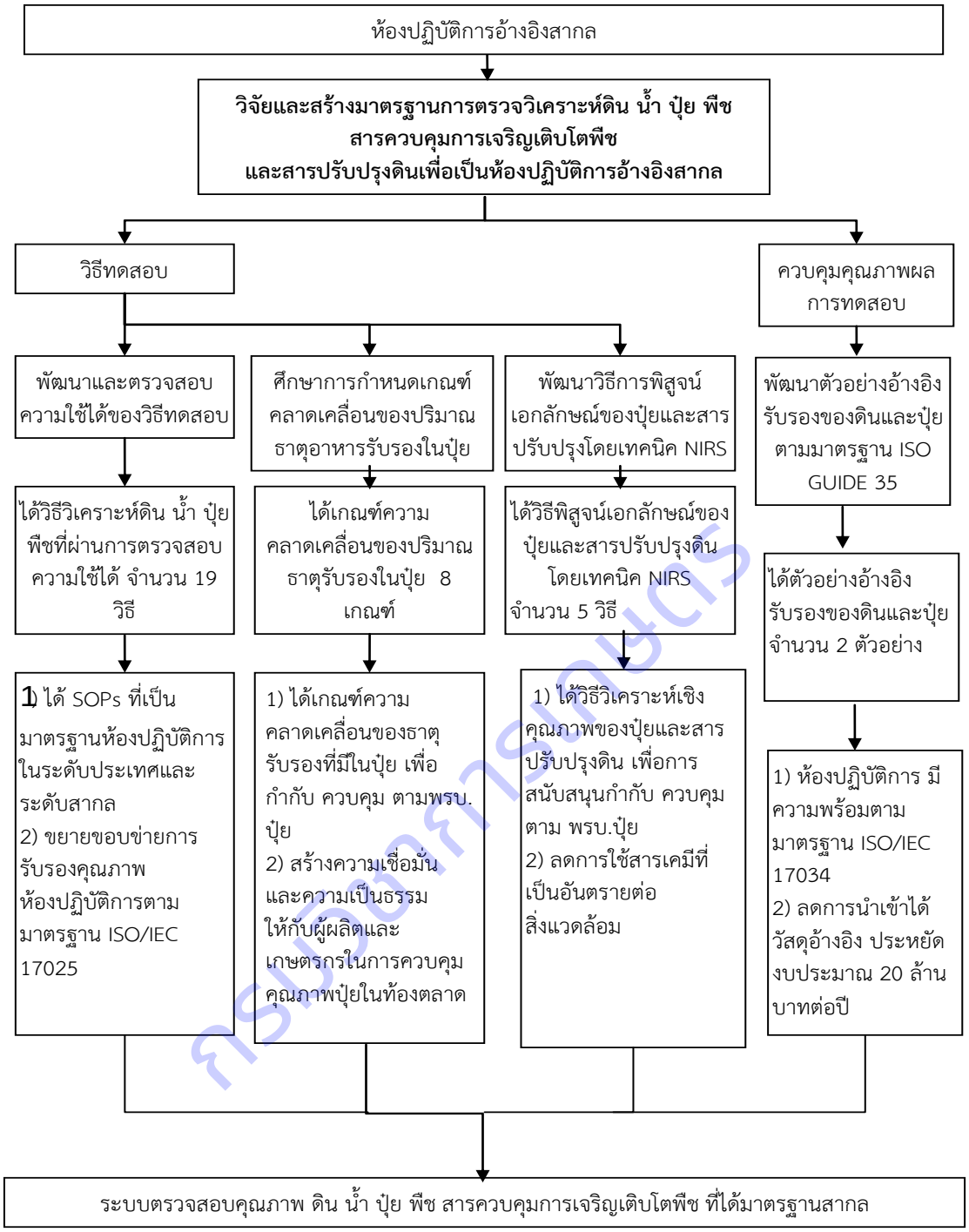
จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่า 10 และเปรียบเทียบค่าที่วัดได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยทดสอบทางสถิติด้วย Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

1.2 ทดสอบความแม่น (Accuracy) ทำการหาจำนวนจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์อ้างอิง จากการทดสอบ 3 วิธี และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) โดยมีค่า 80-120 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

1.3 ทดสอบความถูกต้องของการจำแนกจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์ รายงานผลการจำแนกชนิด และเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (% Similarity) พร้อมทั้งประเมินคะแนนความคล้ายคลึงกัน (Score value) ซึ่งหาก score values ≥2.0 สามารถจำแนกได้ระดับสกุล (genus) และชนิด (species) แต่หาก score values 1.7 to 2.0 จำแนกได้ระดับสกุล (genus) และหาก score values <1.7 ไม่สามารถจำแนกได้

โดยภาพที่ 1 แสดงขอบเขตและความมุ่งหมายของการดำเนินงานโครงการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร



หมายเหตุ : SOPs (Standard Operating Procedures)

ภาพที่ 1 แสดงการดำเนินงานวิจัยของโครงการวิจัย

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยวิจัยและพัฒนามาตรฐานการตรวจวิเคราะห์ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และสารปรับปรุงดินเพื่อเป็นห้องปฏิบัติการอ้างอิงสากล มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาเพื่อกำหนดเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และปุ๋ยอินทรีย์ 2) พัฒนาวิธี และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ ดิน น้ำ วัตถุเคมีทางการเกษตร และธาตุอาหารพืชในพืช 3)ศึกษาวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีปุ๋ยอินทรีย์ และสารปรับปรุงดิน ประเภทปูนโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ 4) พัฒนาตัวอย่างอ้างอิงรับรองของดินและปุ๋ย ดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม 2562 – ธันวาคม 2564 จากผลการศึกษา เกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ของไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 2.3-25.8%,ฟอสฟอรัสทั้งหมดเท่ากับ 4.3 - 9.6%,โพแทสเซียมทั้งหมดเท่ากับ 1.6 -10.2% ในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์,แคลเซียมออกไซด์เท่ากับ 3.1-8.6%, แมกนีเซียมออกไซด์ เท่ากับ 1.8-8.0%,กำมะถันทั้งหมด เท่ากับ3.2-11.9%,คลอไรด์ เท่ากับ 0.7 - 11.9% ในตัวอย่างปุ๋ยเคมี และอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีเท่ากับ 1.6-6.4% ตามลำดับ และการตรวจสอบความใช้ของวิธีพบว่า ครอบคลุมโบรอนในปุ๋ยเคมีตั้งแต่ 0.004 – 17.48%,โบรอนในพืช 6.75 – 27.0 mg/kg, โบรอนในดิน 0.05 – 1.90 mg/kg, ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน 10.84 – 91.93 mg/kg, โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน 16.44 – 424.78 mg/kg, โซเดียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน 18.06 – 1,063.24 mg/kg, แคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน 15.28 – 3,601.38 mg/kg, แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 18.15 – 1,760.56 mg/kg, เหล็กที่เป็นประโยชน์ในดิน 6.17 – 198.89 mg/kg, แมงกานีสที่เป็นประโยชน์ในดิน 1.63 – 202.15 mg/kg, สังกะสีที่เป็นประโยชน์ในดิน 0.97 – 12.48 mg/kg, ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดิน 1.01 – 13.12 mg/kg ซิลิคอนในดิน 8.00 – 370 mg/kg, ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ 0.97 – 61.49%, 0.48 – 10.07% ตามลำดับ, การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของเชื้อ A. brasilense (DASF04003) มีค่า LOD และค่า LOQ เท่ากับ 4.68 และ 1.58 Log_{10}CFU ตามลำดับ ขณะที่เชื้อ A.vinelandii (DASF04141) มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 6.36 และ 4.90 Log_{10}CFU ตามลำดับ ค่าความถูกต้องของวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เท่ากับ 98-99%, ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำ 46 – 7195 mg/L, ฮอร์โมนพืช Indole acetic acid (IAA) และGibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร 0.013 - 5.00 mg/L และ 0.125-5.00 mg/L ตามลำดับและการใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้วิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีความแม่นอยู่ในช่วง 80 – 120% และประเมินค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 15.0% มีความแม่นอยู่ในช่วง 80 – 120%รวมทั้งใช้จัดจำแนกปูนขาว ปูนโดโลไมท์ และปูนมาร์ล โดยใช้การทดสอบ CaO, MgO, CCE และ pH Fความแม่นเฉลี่ยอยู่ในช่วง 90 – 115% และพัฒนาตัวอย่างปุ๋ยและดินอ้างอิงมีค่ากำหนดของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 12,478±1,075 และ 8,340±298 mg/kg และทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 1,028±68 และ 42.83±4.08 mg/kg ตามลำดับจากผลการวิจัยที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการกำหนดวิธีวิเคราะห์มาตรฐานเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ และสร้างระบบ

กรมวิทยาศาสตร์

ประกันคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการ เป็นการยกระดับ และพัฒนาศักยภาพของห้องปฏิบัติการให้เป็นห้องอ้างอิงของประเทศไทย ทำให้ผลการทดสอบที่ได้เป็นที่ยอมรับ น่าเชื่อถือ และลดข้อโต้แย้งที่เกิดจากการการบังคับใช้กฎหมายของกรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The project of research and development of analysis standard for soil, water, fertilizer, plant, plant growth regulators and soil conditioner as the international reference laboratory was conducted to 1) study uncertainty of the content of nutrients in chemical fertilizer, organic-chemical fertilizer and organic fertilizer 2) develop and validate method analysis of chemical fertilizer, organic fertilizer, bio-organic fertilizer, soil, water, agrochemical product and plant nutrients 3) study method analysis of nitrogen components in chemical fertilizer, organic fertilizer and soil conditioner especially in lime using near infrared spectospocy (NIR) 4) establish certified reference materials of fertilizer and soil. The project was proceeded from October 2019-December 2021. This study revealed that the uncertainty of total nitrogen, total phosphorus and total potassium in organic fertilizer analysis ranged from 2.3-25.8%, 4.3-9.6%, 1.6 -10.2%, repectively. In chemical fertilizer, uncertainly of calcium oxide, magnesium oxide, total sulphur and chloride analysis equalled 3.1-8.6%, 1.8-8.0%, 3.2-11.9% and 0.7-11.9%, respectively. The uncertainty of organic matter content in organic-chemical fertilizer was 1.6-6.4%. Analysis methods were also validated consisting 0.004-17.48%, boron in chemical fertilizer, 6.75-27.0 mg/kg boron in plant, in soil including 0.05-1.90 mg/kg boron, 10.84-91.93 mg/kg available phosphorusl, 16.44-424.78 mg/kg exchangeable potassium, 18.06- 1, 063.24 mg/kg exchangeable sodium, 15.28-3,601.38 mg/kg, exchangeable calcium, 18.15-1,760.56 mg/kg exchangeable magnesium, 6.17-198.89 mg/kg available iron, 1.63-202.15 mg/kg available manganese, 0.97-12.48 mg/kg available zinc, 1.01-13.12 mg/kg available copper, 8.00-370 mg/kg silicon, 0.97-61.49% and 0.48-10.07% totol phosphorus in chemical and organic fertilizer, respectively. Furthermor, *Azospirillum brasilense* (DASF04003) and *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) was also validated. The LOD and LOQ of method was 4.68 และ 1.58 Log_{10}CFU 6.36 and 4.90 Log_{10}CFU, respectively. Similarity percentage from molecular identification method of *Azospirillum brasilense* was 98-99%. In addition, 46-7,195 mg/L of total dissolved solid in water, 0.013-5.00 mg/L and 0.125-5.00 mg/L Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA3) in agrochemical products were also validated. Ammonium nitrate and urea analysis using NIR approaches were found that these approaches accurated approximately 80-120%. NIR accurately evaluated organic matter content in organic-chemical fertilizer more than 15.0% approximately 80-120 %. In addition, CaO, MgO, CCE and pH were accurately evaluated in lime, dolomite and marl at

กรมวิทยาศาสตร์

90-115%. Total iron and Total copper were certified 12,478±1,075 and 1,028±68 mg/kg in fertilizer reference materials and 8,340±298 mg/kg and 42.83±4.08 mg/kg in soil reference materials. Finally, this project substantially defined the standard method and developed the internal quality assurance thus enhancing the potential of laboratory as the Thailand reference laboratory. Moreover, the reliable and inevitable results deduct the controversies causing by law enforcement of the Department of Agriculture.

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 การกำหนดเกณฑ์ความคลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และปุ๋ยอินทรีย์

ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

Tolerance of uncertainty on total nitrogen in organic fertilizer

นันทกานต์ ขุนโหร ศุภัคชญา ทาหาร

คำสำคัญ (Key words)

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอน ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

Tolerance of uncertainty total nitrogen in organic fertilizer

บทคัดย่อ (Abstract)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอน ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และขั้นตอนการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ทำการทดสอบ Range, Linearity, accuracy, precision, limit of detection(LOD), Limit of quantitation (LOQ) พ บ ว่ า Range, Linearity, accuracy, precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.03 %N และ 0.11%N ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด ที่ค่าความเข้มข้นต่ำ (0.3%N) ความเข้มข้นสูง (6.0%N) เท่ากับ 0.006และ 0.068 ตามลำดับ การวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง พบว่าค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและจากการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 0.29-10.14%TN เท่ากับ 1.77-12.42% และ 1.51-22.63% ได้เกณฑ์ค่าความไม่แน่นอนขยายของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 2.33-25.81%

Tolerance of uncertainty on total nitrogen in organic fertilizer was study of usage data from the method validation of total nitrogen, sampling and analysis to be combined. The result of method validation, Range, Linearity, accuracy, precision were passed. All acceptance criteria, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) were 0.03%TN and 0.11%TN. The measurement uncertainty from the method validation was assessed. At low concentrations (0.3%N), medium and high concentrations (6.0 %N) were 0.006 %N and 0.068 %N, respectively. Analysis of organic fertilizers at 3 concentration levels, 3 samples each, found that the uncertainty from the sampling and testing at concentration 0.29-10.14%TN were 1.77-12.42% แ ล ะ 1.51-22.63% and expanded uncertainty were 2.33-25.81%.

กรมวิทยาศาสตร์

บทนำ (Introduction)

ปุ๋ยอินทรีย์ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (มาตรา 3) หมายความว่า ปุ๋ยที่ได้หรือทำมาจากวัสดุอินทรีย์ ซึ่งผลิตด้วยกรรมวิธีทำให้ ชื้น สับ หมัก บด ร่อน หรือด้วยวิธีการอื่น และวัสดุอินทรีย์ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์แต่ไม่ใช่ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยชีวภาพ การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้าต้องได้รับการอนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่ กรมวิชาการเกษตรในฐานะผู้รับผิดชอบหลักในการกำกับดูแลคุณภาพปุ๋ย การควบคุมปุ๋ย แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ฉลาก ขนาดบรรจุ และเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร มีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองของปุ๋ยเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมีทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรอง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และข้อมูลตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2552 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุที่มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปริมาณอินทรียวัตถุรับรองที่มีในปุ๋ยอินทรีย์ทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยอินทรีย์เพื่อตรวจสอบปริมาณอินทรียวัตถุรับรอง แต่ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรองของไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อควบคุมคุณภาพปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ ถูกต้องตามหลักเกณฑ์ และรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ซึ่งต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยของห้องปฏิบัติการ โดยในกระบวนการวิเคราะห์หรือวัดค่าสิ่งต่างๆ ย่อมมีความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนออกมารองรับปริมาณ หรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นเกณฑ์สำหรับห้องปฏิบัติการใช้ในการพิจารณาดำเนินการตรวจสอบซ้ำ ในกรณีที่ผลวิเคราะห์ไม่ตรงกับปริมาณที่แจ้ง และเพื่อความเป็นธรรมของผู้ที่เกี่ยวข้อง ในกรณีที่มีการนำผลการวิเคราะห์มาใช้ตัดสินในทางกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทดลอง สอบเทียบเครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและปุ๋ยอินทรีย์สำหรับการวิเคราะห์ครอบคลุมที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม

2. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Combustion

2.1 ทดสอบ (Range) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) โดยชั่ง Sample blank (ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในระดับต่ำ เติมสารมาตรฐานโตรเจน 7 ระดับความเข้มข้น ความ

เข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกับค่าที่อ่านได้ พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) เกณฑ์การยอมรับ r ≥ 0.995 (APHA, AWWA and WEF, 2017)

2.2 หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปริมาณไนโตรเจนน้อย (sample blank ปริมาณ 0.1xxx กรัม ใส่ sucrose อย่างน้อย 0.5 เท่าของตัวอย่าง นำไปทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยหลักการเผา บันทึกข้อมูล และคำนวณหาที่ได้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S) เพื่อคำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = 3S'_0$$

$$LOQ = 10S'_0$$

โดยที่

$$S'_0 = S_0\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{1}{n_b}}$$

S'_0 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ

S_0 คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบ Repeatability ของ Sample Blank

n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่างทดสอบ

n_b คือ จำนวนซ้ำของ Blank

2.3 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision) โดยวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรองและวัสดุอ้างอิง ที่เติมลงในตัวอย่างปุ๋ยที่มีเนื้อสารต่างกัน (Matrix effect)ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ชั่งตัวอย่างปุ๋ย 0.50XX กรัม และเติมวัสดุอ้างอิงรับรอง สูตร 12-60-0 ปริมาณ 0.012X กรัมคำนวณความเข้มข้น เท่ากับ 0.30 %N ความเข้มข้นสูง ชั่ง EDTA 3.14 กรัม ใส่ในตัวอย่างปุ๋ย 1.86 กรัม คำนวณความเข้มข้น เท่ากับ 6.0 %N ชั่งตัวอย่างที่ได้ 0.1xxx กรัม เติม sucrose ในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 0.5 เท่า นำตัวอย่างที่ชั่งได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดโดยหลักการเผา ทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำและต่างวันเวลา นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าที่รับรอง เกณฑ์การยอมรับ % Recovery 95-105 และ 97-103 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016) และประเมินค่า Precision โดย HorRat (Horwitz's Ratio) เกณฑ์การยอมรับ <1.3 (AOAC, 2016)

3. ประเมินค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการวิเคราะห์ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

3.1 แบ่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยอินทรีย์ A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2019) และบดตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 8 ส่วน นำตัวอย่างที่ได้ไปดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

3.2 คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ตามสูตร

กรมวิชาการเกษตร

$$U = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ u = ค่าความไม่แน่นอน

% RSD = Relative standard deviation

SD = standard deviation

3.3 คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ตามสูตร

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2}$$

เมื่อ u_c = Combined uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดด้วยวิธี Combustion

1) หาค่า Range and Linearity โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณไนโตรเจน (mg) (แกน y) กับพื้นที่ของสาร(Area) (แกน X) หาช่วงความเป็นเส้นตรง พบว่าอยู่ในช่วง 1.06-60.49 มิลลิกรัมไนโตรเจน (มาจากปริมาณต่ำสุดและสูงสุดที่สามารถชั่งได้) เลือกเอาช่วง 3-50 มิลลิกรัมไนโตรเจน นำมาหาค่า Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99999 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

2) ประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ และการประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ พบว่า ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.07 %N ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.009 %N คำนวณค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.03%N และ LOQ เท่ากับ 0.11 %N

3) พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision)

ตรวจสอบความถูกต้อง โดยหาค่า % recovery ของวัสดุอ้างอิงรับรอง และวัสดุอ้างอิง ที่ เติมลงในตัวอย่างปุ๋ย พบว่า % recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และความเข้มข้นสูง อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับและการตรวจสอบความเที่ยง โดยประเมินค่า Precision จาก HorRat (Horwitz's Ratio) ที่ความเข้มข้น ต่ำและ สูง อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ <1.3 ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยง

ระดับความเข้มข้น	%Recovery	HorRat (เกณฑ์ยอมรับ <1.3)	เกณฑ์ยอมรับ %Recovery
ต่ำ (0.3 %N)	100.00	0.63	95-105
สูง (6.0 %N)	101.17	0.14	97-103

2. ประเมินค่า คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการทดสอบ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

3.1 เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวัดของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยคำนวณจากค่าความไม่แน่นอน จากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ ที่ความเข้มข้น ต่ำ เท่ากับ 25.81%, 5.61%, 8.67% ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 7.54%, 6.52%, 3.72% และความเข้มข้นสูง เท่ากับ 2.33%, 3.97% และ 2.69 % ตามลำดับ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ร้อยละค่าความไม่แน่นอนของไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

ระดับความเข้มข้น	%TN	ค่าความไม่แน่นอน		
		Sampling (%)	Analytical (%)	Total (%)
ต่ำ	0.29	12.42	22.63	25.81
	0.69	2.62	4.95	5.61
	0.84	4.17	7.60	8.67
กลาง	1.12	3.34	6.76	7.54
	1.30	4.99	4.19	6.52
	2.27	2.85	2.40	3.72
สูง	3.84	1.77	1.51	2.33
	5.29	2.80	2.83	3.97
	10.14	1.80	2.00	2.69

ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ความเข้มข้น 1.0%TN มีค่าความไม่แน่นอนสูงสุดเท่ากับ 25.81% ซึ่งสอดคล้องกับกฎหมายของสหภาพยุโรป (Official Journal of the European Union. 2019) เกี่ยวกับการจำหน่ายปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระบุว่าปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 1% มีค่าคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 50%

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยทำการตรวจสอบความชี้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ การทดสอบ range, linearity, accuracy, precision, limit of detection(LOD), Limit of quantitation (LOQ) พบว่า range, linearity, accuracy, precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.03 %TN และ 0.11%TN และได้เกณฑ์ค่าคลาดเคลื่อนของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่คลอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง 0.29-10.14% TN มีค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ในช่วง 2.33-25.81%

ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของ
การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์
Tolerance of Uncertainty on Total Phosphorus in Organic Fertilizers

ศุภากร ดวนใหญ่

คำสำคัญ (Key words)

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอน ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

Tolerance of uncertainty Total Phosphorus in Organic Fertilizers

บทคัดย่อ (Abstract)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ หาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณ ธาตุอาหารรับรองของฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เพื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนในขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างและขั้นตอนการทดสอบ โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยวิธี Spectrophotometric Molybdovanadophosphate พบว่า Range, Linearity, Accuracy, Precision ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.03 %TP_2O_5 และ 0.10%TP_2O_5 ผลการพิสูจน์ Trueness และความเที่ยง (Precision) ของตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่มีลักษณะเนื้อสาร (matrix) ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (0.3%TP_2O_5) และความเข้มข้นสูง (8.0%TP_2O_5) ได้ %Recovery เท่ากับ 98.67 และ 100.03 ได้ HorRat เท่ากับ 0.70 และ 0.25 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบคลอบคลุมที่ระดับความเข้มข้น 0.25 – 7.25%TP_2O_5 และได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์อยู่ในช่วง 4.25 - 9.63%

The purpose this study was to 1) validation method of total phosphorus in organic fertilizers 2) study the tolerance of uncertainty on total phosphorus in organic fertilizers. Analysis by spectrophotometric molybdovanadophosphate method. The result of Limit of detection (LOD) 0.03%TP_2O_5. Limit of quantitation (LOQ) 0.10%TP_2O_5. To prove the trueness and precision of LOQ as 0.3%TP_2O_5. The intermediate analysis CRM of LOQ and 8.0% TP_2O_5. %Recovery as 98.67, 100.03 and HorRat as 0.70, 0.25. The results of analysis showed that the acceptance criteria. Test organic fertilizers samples covering concentration ranged from 0.25 – 7.25%TP_2O_5. Tolerance of uncertainty on total phosphorus in organic fertilizers were in the range 4.25 - 9.63%.

บทนำ (Introduction)

ภาคเกษตรกรรมกำลังประสบปัญหาราคาปุ๋ยเคมีแพง เนื่องมาจากแม่ปุ๋ยซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตปุ๋ยเคมีต้องนำเข้าจากต่างประเทศเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ รัฐบาลได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรเข้าร่วมโครงการเกษตรอินทรีย์ ที่ตั้งเป้าหมายเพิ่มพื้นที่ปลูกเกษตรอินทรีย์ในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 1.3 ล้านไร่ (ผู้จัดการออนไลน์, 2564) เพื่อให้การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เป็นไปอย่างถูกต้องตามมาตรฐาน และเป็นการรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร กรมวิชาการเกษตรจึงมีการกำหนดมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ (ราชกิจจานุเบกษา, 2557) ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

ศรีวิชาการเกษตร

(มาตรา 3) ปุ๋ยอินทรีย์ หมายความว่า ปุ๋ยที่ได้หรือทำมาจากวัสดุอินทรีย์ ซึ่งผลิตด้วยกรรมวิธีทำให้ชื้น สับหมัก บด หรือด้วยวิธีอื่น และวัสดุอินทรีย์ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์ แต่ไม่ใช่ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยชีวภาพ

กรมวิชาการเกษตรในฐานะผู้รับผิดชอบหลักในการกำกับดูแลคุณภาพปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 โดยกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ซึ่งเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบภารกิจการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติด้านต่างๆ ของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการขอขึ้นทะเบียน การขออนุญาตผลิต การนำเข้า การขาย การนำผ่านการส่งออก การดำเนินคดีกับผู้กระทำผิด

การควบคุมปุ๋ย แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ฉลาก ขนาดบรรจุ และเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร มีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุรับรองที่มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมีและในปุ๋ยอินทรีย์ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2552 และกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองของปุ๋ยเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไข เพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554 แต่ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรองของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อให้การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เป็นไปอย่างถูกต้องตามมาตรฐาน และเป็นการรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ซึ่งต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารจากห้องปฏิบัติการ โดยในกระบวนการวิเคราะห์หรือวัดค่าสิ่งต่างๆ ย่อมมีความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนออกมารองรับปริมาณหรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นเกณฑ์สำหรับห้องปฏิบัติการใช้ในการพิจารณาดำเนินการตรวจสอบซ้ำ ในกรณีที่ผลวิเคราะห์ไม่ตรงกับปริมาณที่แจ้ง และเพื่อความเป็นธรรมของผู้ที่เกี่ยวข้อง ในกรณีที่มีการนำผลการวิเคราะห์มาใช้ตัดสินในทางกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทดลอง สอบเทียบเครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและปุ๋ยอินทรีย์สำหรับการวิเคราะห์ครอบคลุมที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม) โดยนำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์บดด้วยเครื่องบดตัวอย่างความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่มีรูคัดขนาด 0.5 มิลลิเมตร เตรียมใส่ถุงพลาสติกซิบ ไล่อากาศออกให้หมด และปิดถุงให้สนิท เขียนป้ายบ่งชี้ตัวอย่าง

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์

ชั่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ จำนวน 1.xxxx กรัม ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมกรดผสม 20 มิลลิลิตร (HNO_3 : $HClO_4$ 1:1 v/v) นำไปย่อยบนเตาระเหยไฟฟ้า ย่อยจนมีควันสีขาวเกิดขึ้นเหนือสารละลายหรือสารละลายมีลักษณะใส ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30–40 นาที จากนั้นยกลงจากเตาระเหยไฟฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายตัวอย่างและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นใส่ใน Volumetric flask ขนาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ตั้งสารละลายตัวอย่างไว้ข้ามคืน ในกรณีที่เป็นสารละลายมีตะกอนขุ่นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

3.1 เทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี (AOAC, 2016)

3.1.1 การเตรียมสารละลาย Molybdovanadate reagent

1) ชั่ง Ammonium molybdate จำนวน 40 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อน (น้ำกลั่น) ปริมาณ 400 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น

2) ชั่ง Ammonium metavanadate ปริมาณ 2 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำร้อน (น้ำกลั่น) ปริมาณ 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม 69-72%$HClO_4$ ปริมาณ 450 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น

3) ค่อยๆ รินผสมสารละลาย Ammonium molybdate ลงในสารละลาย Ammonium metavanadate ใน Volumetric flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เขย่าให้เข้ากัน และถ่ายเก็บไว้ในขวดแก้วสีชา

3.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (Standard P) 1000 mg/L ชั่ง KH_2PO_4 ซึ่งอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จำนวน 2.1968 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน

2) สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 mg/L ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 mg/L ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

3) สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 10 mg/L ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 mg/L ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

4) สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 0.5 mg/L ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 10 mg/L ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

5) สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/L (Working standard) ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 mg/L ปริมาตร 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

1) นำ Working standard 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/L เติม Molybdovanadate reagent ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที

กรมวิชาการเกษตร

2) ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วงการวัด ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติม Molybdovanadate reagent ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตร Volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที

3) นำ Working standard ไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นเป็น mg/L ของสารกับค่า Absorbance (A)

4) นำสารละลายตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ วัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงหาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ Standard curve และบันทึกผลการวิเคราะห์

การคำนวณ

$$\%P = \frac{\text{mg/L from standard curve} \times \text{dilution factor}}{\text{wt of sample (g)} \times 10^6} \times 100$$

$$\%P_2O_5 = \%P \times 2.2914$$

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

4.1 การหาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

4.1.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่มีสารที่ต้องการศึกษา (Sample blank) ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ จำนวน 1.xxxx กรัม ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร Spike standard P solution 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 mg/L นำไปย่อยบนเตาระเหยไฟฟ้า ย่อยจนมีควันสีขาวเกิดขึ้นเหนือสารละลายหรือสารละลายมีลักษณะใส จากนั้นยกลงจากเตาระเหยไฟฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นถ่ายสารละลายตัวอย่าง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากัน ตั้งสารละลายตัวอย่างไว้ข้ามคืน กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นปิเปตตัวอย่างใส่ Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Molybdovanadate reagent ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตร Volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

4.1.2 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของ Sample blank ที่ spike standard (แกน x) กับค่าเฉลี่ย Absorbance (Abs.) (แกน y)

4.1.3 คำนวณหา สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r)

เกณฑ์ยอมรับ : $r \geq 0.995$ (APHA, AWWA and WEF, 2017)

4.2 การหาค่า Linearity ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

4.2.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่มีสารที่ต้องการศึกษา (Sample blank) ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ จำนวน 1.xxxx กรัม ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร Spike standard P solution 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/L นำไปย่อยบนเตาระเหยไฟฟ้า ย่อยจนมีควันสีขาวเกิดขึ้นเหนือสารละลายหรือสารละลายมีลักษณะใส จากนั้นยกลงจากเตาระเหยไฟฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายตัวอย่าง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

กรมวิชาการเกษตร

เขย่าให้เข้ากัน ตั้งสารละลายตัวอย่างไว้ข้ามคืน จากนั้นปิเปตตัวอย่างใส่ Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Molybdovanadate reagent ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตร Volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดความเข้มของสีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

4.2.2 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของ Sample blank ที่ spike standard (แกน x) กับค่าเฉลี่ย Absorbance (Abs.) (แกน y)

4.2.3 คำนวณหา สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r)

เกณฑ์ยอมรับ : $r \geq 0.995$

4.3 การหาค่า Limit of Detection (LOD)

4.3.1 วิเคราะห์ sample blank 10 ซ้ำ ชั่งปุ๋ยอินทรีย์ จำนวน 3.xxxx กรัม นำไปย่อย

4.3.2 คำนวณหา %Total P_2O_5, ค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ Sample blank

4.3.3 คำนวณค่า LOD , LOQ (Eurachem, 2014)

จากสูตร LOD = $3S_0'$

LOQ = $10S_0'$

4.3.4 ยืนยันความถูกต้องและความเที่ยงของ LOQ

1) เตรียมสารละลาย 0.3%P_2O_5 ชั่ง Ammonium Dihydrogen Phosphate (SRM 194a) 61.71±0.14 %P_2O_5 จำนวน 0.4861 กรัม ใส่ Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

2) ชั่งสารละลาย 0.3%P_2O_5 จำนวน 1.xxxx กรัม spike ลงใน Sample blk จำนวน 0.9xxx กรัม นำไปย่อยตามข้อ 2

3) นำไปวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

4.4 การหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและสูง

4.4.1 ชั่งสารที่ทราบค่าที่มีปริมาณความเข้มข้นต่ำและสูง ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง ได้แก่ ระดับความเข้มข้นต่ำ 0.3%P_2O_5 เตรียมโดยการ Dilute Ammonium Dihydrogen Phosphate (SRM 194a); 61.71$\pm$0.17%P_2O_5) ชั่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ 0.9xxx กรัม และระดับความเข้มข้นสูง 8.0%P_2O_5 โดยการ Dilute Potassium Dihydrogen Phosphate; 52.18%P_2O_5 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ 0.8xxx กรัม

4.4.2 ดำเนินการเตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับขั้นตอน 2 และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับขั้นตอน 3.1.3

4.4.3 บันทึกข้อมูล และคำนวณหาค่า Precision

4.4.4 การประเมินค่า Precision ในเกณฑ์การประเมิน : ใช้ HorRat (Horwitz' Ratio)

กรมวิชาการเกษตร

$$\text{HorRat (r)} = \frac{RSD(r)}{PRSD(R)}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{RSD(r)} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100$$

$$\text{PRSD(R)} = 2C^{-0.15} \quad (C = \frac{\bar{x}}{100})$$

เกณฑ์การยอมรับ AOAC (2016) : HorRat ≤ 1.3

โดยที่ RSD(r) หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดสอบซ้ำภายในห้องปฏิบัติการ

PRSD(R) หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากการทดสอบซ้ำภายในห้องปฏิบัติการ

SD หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบซ้ำ

$\bar{x}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำ

C หมายถึง เศษส่วนมวล

5. ประเมินค่าความไม่แน่นอน ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการทดสอบ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

5.1 นำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (A) จำนวน 2 กิโลกรัม แบ่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยอินทรีย์ A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2014) และบดตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 8 ส่วน

5.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.1-1.0 %TP_2O_5) กลาง (1.1-3.0 %TP_2O_5) และสูง (> 3.0 %TP_2O_5) ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 1.xxxx กรัม วิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน ดำเนินการเตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับขั้นตอน 2 และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับขั้นตอน 3 โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

5.3 คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ตามสูตร

$$u = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ u = ค่าคลาดเคลื่อน

% RSD = Relative standard deviation

SD = Standard deviation

5.4 คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ตามสูตร

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2}$$

เมื่อ u_c = Combine uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (Range) โดยสร้างกราฟความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (แกน x) กับค่าเฉลี่ย Absorbance (Abs.) 8 ความเข้มข้น (แกน y) ได้แก่ 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 12 และ 15 mg/L ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 1.0000 ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

2. ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) โดยสร้างกราฟความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (แกน x) กับค่าเฉลี่ย Absorbance (Abs.) 8 ความเข้มข้น (แกน y) ได้แก่ 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/L ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 1.0000 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ

3. การประมาณปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่ที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (Sample blank) วิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.04%TP_2O_5 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.01 ดังนั้นได้ค่า LOD เท่ากับ 0.03%TP_2O_5 และได้ค่า LOQ เท่ากับ 0.10%TP_2O_5

4. การพิสูจน์ Trueness และความเที่ยง (Precision) ของตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่มีลักษณะเนื้อสาร (matrix) ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (0.3%TP_2O_5) และความเข้มข้นสูง (8.0%TP_2O_5) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยการเติมวัสดุอ้างอิงรับรองหรือสารเคมีมาตรฐานลงไปใน Sample blankพบว่า %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น LOQ และสูง อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ และการตรวจสอบความเที่ยง โดยประเมินค่า Precision จาก HorRat (Horwitz's Ratio) ที่ความเข้มข้น LOQ และสูง อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์ Trueness และความเที่ยง (Precision)

ระดับความเข้มข้น	%Recovery	HorRat (เกณฑ์ยอมรับ <1.3)	เกณฑ์ยอมรับ %Recovery
ต่ำ (0.3 %TP_2O_5)	98.67	0.70	95-105
สูง (8.0%TP_2O_5)	100.03	0.25	97-103

5. ประเมินค่าความไม่แน่นอนในขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวัดของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยคำนวณจากค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 4.81%, 5.42% และ 4.25% ช่วงความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 9.49%, 6.15% และ 6.86% และช่วงความเข้มข้นสูง เท่ากับ 9.63%, 8.13% และ 4.46% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความไม่แน่นอนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

กรมวิชาการเกษตร

ระดับความเข้มข้น	%TP_2O_5	Measurement uncertainty		
		Sampling (%)	Analytical (%)	Total (%)
ต่ำ	0.25	4.40	1.97	4.81
	0.72	2.70	4.70	5.42
	0.82	2.01	3.74	4.25
กลาง	1.72	4.45	8.38	9.49
	2.12	3.26	5.21	6.15
	2.32	3.35	5.99	6.86
สูง	3.53	5.46	7.93	9.63
	4.12	4.46	6.79	8.13
	7.25	3.85	2.24	4.46

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ช่วงความเข้มข้น 1.0%TP_2O_5 มีค่าความไม่แน่นอนมากที่สุดเท่ากับ 5.42% สอดคล้องกับกฎหมายของสหภาพยุโรป (Official Journal of the European Union. 2019) เกี่ยวกับการจำหน่ายปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระบุว่าปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 1% มีค่าคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 50%

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ การทดสอบ Range, Linearity, Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ), Accuracy และ Precision พบว่า Range, Linearity, Accuracy, Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.03%TP_2O_5 และ 0.10%TP_2O_5 และได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ครอบคลุมที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง (0.25 – 7.25%TP_2O_5) อยู่ในช่วง 4.25 - 9.63%

ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

Tolerance of Uncertainty on Total Potassium in Organic Fertilizers

ชฎาพร คงนาม

คำสำคัญ (Key words)

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอน โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

Tolerance of uncertainty Total Potassium in Organic Fertilizers

บทคัดย่อ (Abstract)

กรมวิชาการเกษตร

งานวิจัยนี้ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดย Flame Photometric Method พบว่ามีค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.05 %TK_2O และ 0.16 %TK_2O ตามลำดับ ผลการทดสอบ Range Linearity Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมดตามมาตรฐานสากล (AOAC, 2016) ทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ระดับความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนจากขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และการวิเคราะห์ พบว่าได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่คลอบคลุมที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง (0.59 – 5.96%) อยู่ในช่วง 1.57 – 10.15%

In this study, Tolerance of uncertainty on total potassium in organic fertilizers. The method validation of total potassium in organic fertilizers by Flame Photometric Method, the result showed that the Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantitation (LOQ) were 0.05 %TK_2O and 0.16 %TK_2O, respectively. The Range, Linearity, Accuracy and Precision were passed the criteria for acceptance of AOAC. Organic fertilizer samples were tested at low medium and high concentrations to assess the uncertainty from the sampling procedure and analysis. Tolerance of uncertainty on total potassium content in organic fertilizers were in the range 1.57 – 10.15%.

บทนำ (Introduction)

ปุ๋ยอินทรีย์ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550 (มาตรา 3) หมายความว่า ปุ๋ยที่ได้หรือทำมาจากวัสดุอินทรีย์ ซึ่งผลิตด้วยกรรมวิธีทำให้ ชื้น สับ หมัก บด ร่อน หรือด้วยวิธีการอื่น และวัสดุอินทรีย์ถูกย่อยสลายสมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์แต่ไม่ใช่ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยชีวภาพ การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เพื่อการค้าต้องได้รับการอนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่ กรมวิชาการเกษตรในฐานะผู้รับผิดชอบหลักในการกำกับดูแลคุณภาพปุ๋ย การควบคุมปุ๋ย แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ฉลาก ขนาดบรรจุ และเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร มีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองของปุ๋ยเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมีทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรอง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แต่ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรองของโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์เพื่อควบคุมคุณภาพปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ ถูกต้องตามหลักเกณฑ์ และรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ซึ่งต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยของห้องปฏิบัติการ โดยในกระบวนการวิเคราะห์หรือวัดค่าสิ่งต่างๆ ย่อมมีความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ

กรมวิชาการเกษตร

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนออกมารองรับปริมาณ หรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นเกณฑ์สำหรับห้องปฏิบัติการใช้ในการพิจารณาดำเนินการตรวจสอบซ้ำ ในกรณีที่ผลวิเคราะห์ไม่ตรงกับปริมาณที่แจ้ง และเพื่อความเป็นธรรมของผู้ที่เกี่ยวข้อง ในกรณีที่มีการนำผลการวิเคราะห์มาใช้ตัดสินในทางกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียมปุ๋ยอินทรีย์สำหรับการวิเคราะห์ โดยให้ครอบคลุมปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม
2. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมด โดย Flame Photometric Method

2.1 การหาช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (Range)

- ชั่ง Sample blank (ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในระดับต่ำ) และเติมสารมาตรฐานโพแทสเซียม 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 4, 8, 12, 16 และ 18 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ (กรมวิชาการเกษตร, 2551)
- นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานโพแทสเซียมกับค่าความเข้มข้นแสง (Emission Intensity) ของกราฟมาตรฐาน
- เลือกช่วงการใช้งานที่มีความเป็นเส้นตรง และเหมาะสมกับความเข้มข้นของตัวอย่าง

2.2 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity)

- ชั่ง Sample blank และเติมสารมาตรฐานโพแทสเซียม 7 ระดับ ในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ
- ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ (กรมวิชาการเกษตร , 2551)
- นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกับค่าความเข้มข้นแสง (Emission Intensity) ของกราฟมาตรฐาน
- คำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ (APHA, AWWA and WPCF, 2017)

2.3 การหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

- ชั่ง Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ
- ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ (กรมวิชาการเกษตร , 2551)
- บันทึกข้อมูล คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อคำนวณค่า LOD และ LOQ (Eurachem, 2014) จากสูตร

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

LOD = $3S_0'$

LOQ = $10S_0'$

โดยที่ $S_0' = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$

S_0' หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ

S_0 หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำซ้ำของ Sample Blank

n หมายถึง จำนวนซ้ำของตัวอย่างทดสอบ

2.4 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

- วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่ระดับความเข้มข้น LOQและสูง ที่เติมลงในตัวอย่างปุ๋ยที่มีเนื้อสารต่างกัน (Matrix effect) โดยที่ระดับความเข้มข้น LOQ และสูง เตรียม CRM ให้ได้ความเข้มข้น 0.2 %TK_2O (จาก CRM สูตร 0-52-34) และ 6.0 %TK_2O (จาก CRM สูตร 0-0-60) ตามลำดับ

- ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ (กรมวิชาการเกษตร , 2551) ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำและต่างวันเวลา

- นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าที่รับรองของ CRM เกณฑ์การยอมรับ % Recovery 95-105 และ 97-103 (AOAC, 2016) และประเมินค่า Precision โดย HorRat (Horwitz's Ratio) เกณฑ์การยอมรับ < 1.3 (AOAC, 2016)

3. ประเมินค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง การวิเคราะห์ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

3.1 แบ่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยอินทรีย์ A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2019) และบดตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ทั้ง 8 ส่วน นำตัวอย่างที่ได้ไปดำเนินการทดสอบตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

3.2 คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และการวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สูตรค่าความไม่แน่นอน (Eurachem, 2019)

$$u = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \, x \, 100$$

โดยที่ u = ค่าคลาดเคลื่อน

% RSD = Relative standard deviation

SD = standard deviation

3.3 คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ ตามสูตร

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2}$$

โดยที่ u_c = Combine uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการสุ่มตัวอย่าง

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมด โดย Flame Photometric Method

1.1 การหาช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (Range) โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม (แกน X) และค่าความเข้มของแสงของกราฟมาตรฐาน (แกน y) หาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง พบว่าอยู่ในช่วง 0-18 มิลลิกรัมต่อลิตรโพแทสเซียม ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r \geq 0.995$)

1.2 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) เลือกเอาช่วง 0-15 มิลลิกรัมต่อลิตรโพแทสเซียม นำมาหาค่า Linearity โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม (แกน X) และค่าความเข้มของแสงของกราฟมาตรฐาน (แกน y) ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r \geq 0.995$) จึงเลือกเป็นช่วงใช้งานในห้องปฏิบัติการ

1.3 การหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) พบว่า ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.05% และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.0159% คำนวณค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.05 %TK_2O และ LOQ เท่ากับ 0.16 %TK_2O

1.4 ผลการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

จากการทดสอบวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่ระดับความเข้มข้น LOQ และสูง ที่เติมลงในตัวอย่างปุ๋ยที่มีเนื้อสารต่างกัน (Matrix effect) พบว่า % Recovery และ HorRat (Horwitz's Ratio) ที่ระดับความเข้มข้น LOQ และ สูง อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) แสดงว่าความเหมาะสมของวิธีทดสอบโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ อยู่ในช่วง 0.2 – 6.0%TK_2O

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

ระดับความเข้มข้น	Accuracy		Precision	
	%Recovery	เกณฑ์ยอมรับ	HorRat	เกณฑ์ยอมรับ
LOQ (0.2%)	99.39	95-105	0.34	1.3
สูง (6.0%)	100.43	97-103	0.28	1.3

2. ประเมินค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง การวิเคราะห์ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

กรมวิชาการเกษตร

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยคำนวณจากค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่าง และการวิเคราะห์ พบว่าค่าความไม่แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 7.60%, 9.15% และ 10.15% ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 4.64%, 5.42% และ 5.44% และความเข้มข้นสูง เท่ากับ 1.57%, 2.49% และ 4.31% (ตารางที่ 2)

ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ช่วงความเข้มข้น 1.0%TK_2O มีค่าความไม่แน่นอนมากที่สุดเท่ากับ 11% สอดคล้องกับกฎหมายของสหภาพยุโรป (Official Journal of the European Union. 2019) เกี่ยวกับการจำหน่ายปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระบุว่าปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่ความเข้มข้น 1.0% มีค่าคลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน 50%

ตารางที่ 2 ร้อยละค่าความไม่แน่นอนของปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์

ระดับความเข้มข้น	%TK_2O	Measurement uncertainty		
		Sampling (%)	Analytical (%)	Total (%)
ต่ำ	0.59	2.52	7.16	7.60
	0.82	3.22	9.62	10.15
	0.97	3.93	8.26	9.15
กลาง	1.21	2.49	4.84	5.44
	1.89	2.78	4.65	5.42
	2.88	2.39	3.98	4.64
สูง	3.52	0.40	1.52	1.57
	4.58	1.12	2.23	2.49
	5.96	1.14	4.16	4.31

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์โพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ โดยทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เพื่อประเมินค่าความไม่แน่นอนจากขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และการวิเคราะห์ พบว่าได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำของปริมาณธาตุอาหารโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง (0.59 – 5.96%) อยู่ในช่วง 1.57 – 10.15%

ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Study on Tolerance from Measurement Uncertainty of Calcium oxide magnesium oxide and sulfur in Fertilizer by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

พงศ์พิศ แก้วสุข วรรณรัตน์ ชุติบุตร จริยา วงค์ตรี

คำสำคัญ (Key words)

กรมวิชาการเกษตร

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอน แคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และ กำมะถันในปุ๋ยเคมี เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Tolerance of uncertainty, Calcium oxide, Magnesium oxide, Sulfur, Fertilizer, Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

บทคัดย่อ (Abstract)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ระยะเวลาดำเนินการตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกันยายน 2564 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าเกณฑ์คลาดเคลื่อนของผลการวิเคราะห์ปุ๋ยธาตุอาหารรองที่เหมาะสมสำหรับแต่ละช่วงความเข้มข้นของตัวอย่าง จากการนำค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งของการสุ่มตัวอย่าง (sub-sampling) จากแหล่ง sampling precision และ analytical precision โดยใช้สถิติ ANOVA การประเมินความคลาดเคลื่อนจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี จากการนำค่าความไม่แน่นอนการสุ่มตัวอย่าง (sub-sampling) จากแหล่ง sampling precision และ analytical precision โดยใช้สถิติ ANOVA พบว่า แคลเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี ช่วงความเข้มข้น 0.6-34.8% แมกนีเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี ช่วงความเข้มข้น 0.7-28.3% และกำมะถันในปุ๋ยเคมี ช่วงความเข้มข้น 0.6-22.0% มีความคลาดเคลื่อน ($\%U_{Total}$) เท่ากับ 2.33-25.81%, 4.25-9.63% และ 1.57-10.15 ตามลำดับ จากข้อมูลนี้สามารถใช้กำหนดเป็นเกณฑ์การตัดสินใจได้

Study Tolerance from the uncertainty of the calcium oxide quantitative analysis. magnesium oxide and sulfur in chemical fertilizers by Inductive couple plasma spectrometry. Implementation period from October 2019 to September 2021 at the Laboratory of Systemic Research of Fertilizer Quality, Agricultural Chemical Research Group, Agricultural Production Science Research and Development Division, Department of Agriculture. The objective was to find the error of the secondary nutrient fertilizer analysis. suitable for each sample concentration range from taking the uncertainty value from the source of sampling (sampling) from sampling precision and analytical precision using ANOVA statistics. The results of analysis showed that calcium oxide covering concentration ranged from 0.6-34.8 %CaO. Tolerance of uncertainty on calcium oxide in chemical fertilizers were in the range 2.33-25.81%. Magnesium oxide covering concentration ranged from 0.7-28.3 %MgO. Tolerance of uncertainty on magnesium oxide in chemical fertilizers were in the range 4.25-9.63%. Sulfur covering concentration ranged from 0.6-22.0% S. Tolerance of uncertainty on magnesium oxide in chemical fertilizers were in the range 1.57-10.15

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ (Introduction)

ในการทดสอบทางเคมี ที่ใช้เครื่องมือวัดหรือไม่ก็ตาม ต้องประเมินค่าความไม่แน่นอนของผลการทดสอบ ซึ่งจะช่วยในการตัดสินใจในผลการทดสอบว่าจะยอมรับหรือไม่ยอมรับในผลิตภัณฑ์นั้น การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (measurement uncertainty) เป็นค่าบวกลบที่ติดไปกับผลการวิเคราะห์ ที่แสดงถึงการกระจายของข้อมูลผลการวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการวิเคราะห์ รวมไปถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากผู้วิเคราะห์ หรือข้อมูลอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบในกระบวนการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนของผลการวิเคราะห์ แหล่งของความไม่แน่นอน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ ความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม (random errors) เป็นแหล่งของความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นจากความแตกต่างกันของค่าที่ได้จากการวัดแต่ละครั้ง ทำให้ข้อมูลมีการกระจายตัวไปรอบๆ ค่าเฉลี่ย โดยไม่สามารถควบคุมได้และหลีกเลี่ยงไม่ได้ ไม่อาจคาดการณ์แนวโน้มของความคลาดเคลื่อนจะเป็นทางบวกหรือทางลบ ปริมาณหรือระดับการคลาดเคลื่อนมีค่าไม่แน่นอนการลดความคลาดเคลื่อนประเภทนี้สามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง และทำการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้ง (precision หรือ repeatability) ความคลาดเคลื่อนของระบบ (systematic error) เป็นค่าความคลาดเคลื่อนที่ประเมินโดยความเบี่ยงเบนทั้งระบบจากค่าแท้จริง (bias) ซึ่งในการวัดแต่ละครั้งจะเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้ทั้งแบบคลาดเคลื่อนมากกว่าค่าจริง หรือที่เรียกว่าความคลาดเคลื่อนทางบวก (positive determinate error) หรือคลาดเคลื่อนน้อยกว่าค่าจริง หรือที่เรียกว่าความคลาดเคลื่อนทางลบ (negative determinate error) เป็นความคลาดเคลื่อนแบบคาดการณ์ได้ จำแนกได้ดังนี้ ความคลาดเคลื่อนจากวิธีวิเคราะห์ (method error) เนื่องจากวิธีวิเคราะห์สารที่สนใจหนึ่งมีกระบวนการวิเคราะห์หลายขั้นตอน ซึ่งในแต่ละขั้นตอนตั้งแต่ การสุ่มตัวอย่าง (sub-sampling) เช่นตัวอย่างที่สุ่มไม่ได้เป็นตัวแทนของสารตัวอย่างทั้งระบบ ความแตกต่างของรูปร่าง ขนาด น้ำหนัก หรือจำนวนตัวอย่างที่สุ่มน้อย และในบริเวณที่อาจพบสารที่สนใจปริมาณสูงมากหรือน้อยมาก (Eurachem, 2019) การเตรียมตัวอย่าง (sample preparation) เนื่องจาก วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ของสารที่สนใจ (analyte) แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปตามวิธีวิเคราะห์ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม เช่นการละลายตัวอย่าง การย่อยด้วยความร้อน การเจือจาง และการตรวจวัด (measurement) เนื่องจากการทดลอง มีการใช้อุปกรณ์หรือเครื่องแก้วในการชั่ง ตวง วัด เช่นเครื่องชั่ง ขวดวัดปริมาตร ปิเปต เป็นต้น (ISO 21748, 2017) โดยพิจารณาความไม่แน่นอนจากทุกแหล่งที่มีผลต่อการวัด (EURACHEM, 2012) โดยเริ่มต้นการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบตั้งแต่การสุ่มตัวอย่าง (sub-sampling) ซึ่งประกอบด้วย sampling precision และ analysis precision เป็นความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม แล้วประเมินค่าความไม่แน่นอนโดยใช้สถิติ ANOVA (EURACHEM, 2019)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของธาตุอาหารรองด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี (Boss and Fredeen, 2004) ในปุ๋ยเคมีประเภทต่างๆ และระดับช่วงความเข้มข้นที่ต่างกัน จากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ โดยนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมีธาตุอาหารรองจากแหล่งที่เกิดขึ้นในกระบวนการวิเคราะห์มารวมกัน แล้วพิจารณาความคลาดเคลื่อน โดย

สามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์การตัดสินใจในการรายงานผลการวิเคราะห์ (Eurachem, 2015) ตามช่วงคุณลักษณะเฉพาะของงานที่ยอมรับข้อผิดพลาดได้ ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดทางมาตรวิทยา specification zone (ISO 14253-1:2017) หรือช่วงการยอมรับ Tolerance interval (JCGM 106, 2012) (ILAC-G8:09, 2019) (ILAC-G8:09, 2019) (Eurachem, 2007) และ (Eurolab, 2017)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

ประเมินค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง การวิเคราะห์ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี

1. แบ่งตัวอย่างปุ๋ยเคมี (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยเคมี A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2019) และบดตัวอย่างปุ๋ยเคมีทั้ง 8 ส่วน นำตัวอย่างที่ได้ไปดำเนินการทดสอบตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

2. คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และการวิเคราะห์แคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี โดยใช้สูตรค่าความไม่แน่นอน (Eurachem, 2019)

$$u = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \; x \; 100$$

โดยที่ u = ค่าคลาดเคลื่อน

% RSD = Relative standard deviation

SD = standard deviation

3. คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี ตามสูตร

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2}$$

โดยที่ u_c = Combine uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการสุ่มตัวอย่าง

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง การวิเคราะห์ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี

ดำเนินการทดสอบตาม Eurachem (2019) รายการทดสอบแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี โดยการประเมินค่าค่าความคลาดเคลื่อน จากค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง (%U

กรมวิชาการเกษตร

$_{Sampling}$) และค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (%U $_{Analytical}$) และกำหนดค่าคลาดเคลื่อน (%U $_{Total}$) ผลการทดสอบตามตารางที่ 1 พบว่า

ค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่าง (%U $_{Sampling}$) ของการทดสอบ แคลเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.6-34.8%) แมกนีเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.7-28.3%) กำมะถันในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.6-22.0%) เท่ากับ 0.00-2.70%, 0.00-1.51% และ 0.00-1.02% ตามลำดับ

ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (%U $_{Analytical}$) ของการทดสอบ แคลเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.6-34.8%) แมกนีเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.7-28.3%) กำมะถันในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.6-22.0%) เท่ากับ 1.05-4.34%, 1.03-4.64% และ1.76-6.31%, ตามลำดับ

ประเมินค่าความคลาดเคลื่อน (%U $_{Total}$) ของการทดสอบ แคลเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.6-34.8%) แมกนีเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.7-28.3%) กำมะถันในปุ๋ยเคมี (ช่วงความเข้มข้น 0.6-22.0%) เท่ากับ 2.33-25.81%, 4.25-9.63% และ 1.57-10.15 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 หาค่าความไม่แน่นอนของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนการวิเคราะห์ และค่าความคลาดเคลื่อนในรายการทดสอบ แคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี

รายการทดสอบ	ความเข้มข้น (%)	measurement uncertainty (%U)		
		Sampling	Analytical	Total
แคลเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี	0.6-34.8	0.00-2.70	1.05-4.34	3.1-8.6
แมกนีเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี	0.7-28.3	0.00-1.51	1.03-4.64	1.8-8.0
กำมะถันในปุ๋ยเคมีในปุ๋ยเคมี	0.6-22.0	0.00-1.02	1.76-6.31	3.2-11.9

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การประเมินความคลาดเคลื่อนจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์หาปริมาณแคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี จากการนำค่าความไม่แน่นอนการสุ่มตัวอย่าง (sub-sampling) จากแหล่ง sampling precision และ analytical precision โดยใช้สถิติ ANOVA ที่ช่วงความเข้มข้น แคลเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี ช่วงความเข้มข้น 0.6-34.8% แมกนีเซียมออกไซด์ในปุ๋ยเคมี ช่วงความเข้มข้น 0.7-28.3% และกำมะถันในปุ๋ยเคมี ช่วงความเข้มข้น 0.6-22.0% มีความคลาดเคลื่อน (%U $_{Total}$) เท่ากับ 2.33-25.81%, 4.25-9.63% และ 1.57-10.15 ตามลำดับ

ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

Tolerance of uncertainty on organic matter in organic-chemical fertilizer

ศุภัคชญา ทาหาร นันทกานต์ ขุนโหร

กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ (Key words)

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอน อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

Tolerance of uncertainty organic matter in organic-chemical fertilizer

บทคัดย่อ (Abstract)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์เคมี เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนขั้นตอนการสุ่มตัวอย่าง และขั้นตอนการทดสอบ โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ทำการทดสอบหาค่า limit of detection(LOD), Limit of quantitation (LOQ) และ precision, พบว่า ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.21 และ 0.70 %OM ค่า Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ คลอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง (14.86-69.13%OM) ได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีคลอบคลุมอยู่ในช่วง 1.63-6.38%

Tolerance of uncertainty on organic matter in organic-chemical fertilizer was study of usage data from the method validation of organic matter, sampling and analysis to be combined. The result of method validation, Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ) and Precision, were passed. All acceptance criteria, LOD and LOQ were 0.21%OM and 0.70%OM. The measurement uncertainty from the method validation was assessed. The results of analysis showed that the acceptance criteria. The uncertainty from the sampling and testing at low concentrations, middle concentrations and high concentrations (14.86-69.13%OM). Tolerance of uncertainty on organic matter in organic-chemical fertilizer were in the ranged 1.63-6.38%

บทนำ (Introduction)

อินทรียวัตถุเป็นองค์ประกอบสำคัญของดิน มีผลในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ให้กับดินหากมีการใช้งานทำการเกษตรอย่างต่อเนื่องจะทำให้อินทรียวัตถุในดินลดลงลง จึงควรเติมอินทรียวัตถุให้ดินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเพาะปลูก การใส่ปุ๋ยอินทรีย์จึงเป็นการเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุให้กับดิน แต่เนื่องจากปุ๋ยอินทรีย์ให้อาหารพืชต่ำจึงต้องใช้ปริมาณมากอาจทำให้ค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ดังนั้น จึงต้องมีการปรับความเข้มข้นของธาตุอาหารพืชโดยการผสมอินทรีย์และปุ๋ยเคมีเข้าด้วยกัน เรียกว่า ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มความสมบูรณ์ของดินและธาตุอาหารพืช ซึ่งตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2550 (มาตรา 3) ปุ๋ยอินทรีย์เคมี หมายความว่า ปุ๋ยที่มีธาตุอาหารรับรองแน่นอนโดยมีปริมาณอินทรียวัตถุไม่น้อยกว่า 10% การผลิตปุ๋ยอินทรีย์เคมีเพื่อการค้าต้องได้รับการอนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่ กรมวิชาการเกษตร ในฐานะผู้รับผิดชอบหลักในการกำกับดูแลคุณภาพปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 โดยกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง

กรมวิชาการเกษตร

การเกษตร ซึ่งเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบภารกิจการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติด้านต่างๆของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการขอขึ้นทะเบียน การขออนุญาตผลิต การนำเข้า การขาย การนำผ่าน การส่งออก การดำเนินคดีกับผู้กระทำผิด การควบคุมปุ๋ย แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ฉลาก ขนาดบรรจุ และเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารมีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองของปุ๋ยเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมีทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรอง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียมและข้อมูลตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2552 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุที่มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปริมาณอินทรียวัตถุรับรองที่มีในปุ๋ยอินทรีย์ทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยอินทรีย์เพื่อตรวจสอบปริมาณอินทรียวัตถุรับรอง แต่เนื่องจากยังไม่มีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุจากการวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์เคมีโดยตรง จึงต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีเพื่อนำค่าวิเคราะห์มากำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการตรวจสอบปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี เพื่อควบคุมคุณภาพ ปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ ถูกต้องตามหลักเกณฑ์ และรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ซึ่งต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยของห้องปฏิบัติการ โดยในกระบวนการวิเคราะห์หรือวัดค่าสิ่งต่างๆ ย่อมมีความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนออกมารองรับปริมาณ หรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเป็นเกณฑ์สำหรับห้องปฏิบัติการใช้ในการพิจารณาดำเนินการตรวจสอบซ้ำ ในกรณีที่ผลวิเคราะห์ไม่ตรงกับปริมาณที่แจ้ง และเพื่อความเป็นธรรมของผู้ที่เกี่ยวข้อง ในกรณีที่มีการนำผลการวิเคราะห์มาใช้ตัดสินในทางกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่2) พ.ศ. 2550

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทดลอง และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีสำหรับการวิเคราะห์อินทรียวัตถุ (ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม (A)

2. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุ

2.1 หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีปริมาณอินทรียวัตถุน้อย จำนวน 10 ซ้ำ นำไปทดสอบตามวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุ บันทึก

ข้อมูล และคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อคำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = 3S'_0$$

$$LOQ = 10S'_0$$

โดยที่ $S'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$

S'_0 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ

S_0 คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบ Repeatability ของ Sample Blank

n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่างทดสอบ

2.2 พิสูจน์ความเที่ยง (Precision) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่ระดับความเข้มข้น LOQ ต่ำ กลาง และสูง ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และวิเคราะห์ต่างวันเวลา นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณค่าทางสถิติ ประเมินค่า Precision โดย HorRat (Horwitz's Ratio) เกณฑ์การยอมรับ <1.3 (AOAC, 2016)

3. ประเมินค่า คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการทดสอบ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

3.1 แบ่งตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยอินทรีย์เคมี A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2019) และบดตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีทั้ง 8 ส่วน นำตัวอย่างที่ได้ไปดำเนินการทดสอบตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

3.2 คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนวิเคราะห์อินทรียวัตถุใน ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ตามสูตร

$$u = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ u = ค่าคลาดเคลื่อน

% RSD = Relative standard deviation

SD = standard deviation

3.3 คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ตามสูตร

Verification of conformity if the width of the specification zone = 4 x U_c

(ISO 14253-1, 2017)

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2 + (u_{validation})^2}$$

เมื่อ u_c = Combined uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

$u_{validation}$= ค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ได้อุปกรณ์ สารเคมี และตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี จำนวน 12 ตัวอย่าง
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

2.1 ประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ และการประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ พบว่า ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.21%OM ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.07%OM คำนวณค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.21%OM และ LOQ เท่ากับ 0.70 %OM

2.2 พิสูจน์ความความเที่ยง (Precision)

3. ตรวจสอบความความเที่ยงโดยนำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีมาวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุ จำนวน 7 ซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น LOQ ต่ำ กลาง สูง โดยประเมินค่า Precision จาก HorRat (Horwitz's Ratio) พบว่า ที่ความเข้มข้น LOQ ต่ำ กลาง สูง อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ <1.3 ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความเที่ยงในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี

ความเข้มข้นตัวอย่าง	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์	Predicted RSD	HorRat	ผลการประเมิน
LOQ (1.24%)	0.05	3.91	3.86	1.01	ผ่านเกณฑ์
ต่ำ (21.45%)	0.19	0.86	2.52	0.34	ผ่านเกณฑ์
กลาง (43.02%)	0.19	0.43	2.27	0.19	ผ่านเกณฑ์
สูง (69.12)	0.63	0.91	2.11	0.43	ผ่านเกณฑ์

4. วามไม่แน่นอนในขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวัดของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยคำนวณจากค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 6.38%, 3.69% และ 5.83% ช่วงความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 3.77%, 2.70% และ 3.27% และช่วงความเข้มข้นสูง เท่ากับ 3.18%, 1.63% และ 2.27% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความไม่แน่นอนของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

ระดับความเข้มข้น	%OM	Measurement uncertainty		
		Sampling (%)	Analytical (%)	Total (%)
ต่ำ	14.86	3.36	5.42	6.38

กรมวิชาการเกษตร

	23.12	2.78	2.42	3.69
	25.01	3.60	4.60	5.83
กลาง	27.72	3.30	1.82	3.77
	36.50	1.42	2.30	2.70
	42.26	2.62	1.96	3.27
สูง	50.56	2.68	1.72	3.18
	55.71	0.96	1.32	1.63
	69.13	1.28	1.88	2.27

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์เคมี เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี การทดสอบ Limit of detection(LOD), Limit of quantitation (LOQ), Precision พบว่า ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.21%OM และ 0.70%OM ค่า Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด และได้เกณฑ์ค่าคลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่คลอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง (14.86-69.13% OM) มีค่าความไม่แน่นอนอยู่ในช่วง 1.63-6.38%

ศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์คลอไรด์ในปุ๋ยเคมี

Tolerance of uncertainty on chloride in chemical fertilizer

ศุภัคชญา ทาหาร ทองจันทร์ พิมพ์เพชร

คำสำคัญ (Key words)

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอน คลอไรด์ในปุ๋ยเคมี

Tolerance of uncertainty chloride in chemical fertilizer

บทคัดย่อ (Abstract)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมีโดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คลอไรด์ เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยเคมี ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอน ขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างและขั้นตอนการทดสอบ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คลอไรด์ในปุ๋ยเคมีทำการทดสอบ Limit of detection(LOD), Limit of quantitation (LOQ), Trueness และ Precision พบว่า ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.24%Cl และ 0.80%Cl ค่า Trueness และ Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด ค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบคลอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง (6.50-67.41 %Cl) ได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมีคลอบคลุมอยู่ในช่วง 0.68-11.91%

กรมวิชาการเกษตร

Tolerance of uncertainty on chloride in chemical fertilizer was study of usage data from the method validation of chloride, sampling and analysis to be combined. The result of method validation, Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ), Trueness and Precision, were passed. All acceptance criteria, LOD and LOQ were 0.24%Cl and 0.80%Cl. The measurement uncertainty from the method validation was assessed. The results of analysis showed that the acceptance criteria. The uncertainty from the sampling and testing at low concentrations, middle concentrations and high concentrations (6.50-67.41 %Cl). Tolerance of uncertainty on chloride in chemical fertilizer were in the ranged 0.68-11.91%

บทนำ (Introduction)

คลอไรด์ เป็นไอออนของคลอรีน ซึ่งเป็นธาตุอาหารเสริมหรือจุลธาตุอาหาร เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการใช้น้อย แต่เป็นธาตุอาหารทีมีอยู่ในธรรมชาติปริมาณสูง โดยคลอไรด์ในดินมาจากการสลายตัวของวัตถุต้นกำเนิดดิน นอกจากนี้ยังได้มาจากน้ำชลประทาน น้ำฝน และปุ๋ย มีบทบาทเกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและช่วยให้พืชแก่เร็วขึ้น แต่หากพืชบางชนิดได้รับคลอไรด์มากเกินไปก็ทำให้ได้ผลผลิตลดลงและคุณภาพเสื่อมลงได้ ดังนั้นการผลิตปุ๋ยเคมีเพื่อการค้าต้องได้รับการอนุญาตจากพนักงานเจ้าหน้าที่ กรมวิชาการเกษตรในฐานะผู้รับผิดชอบหลักในการกำกับดูแลคุณภาพปุ๋ยตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 โดยกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ซึ่งเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบภารกิจการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติด้านต่างๆ ของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการขอขึ้นทะเบียนการขออนุญาตผลิต การนำเข้า การขาย การนำผ่านการส่งออก การดำเนินคดีกับผู้กระทำผิด การควบคุมปุ๋ยแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ฉลาก ขนาดบรรจุ และเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร มีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุ ผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองของปุ๋ยเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ.2554 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมีทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรอง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และข้อมูลตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2552 กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณอินทรียวัตถุที่มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปริมาณอินทรียวัตถุรับรองที่มีในปุ๋ยอินทรีย์ทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยอินทรีย์เพื่อตรวจสอบปริมาณอินทรียวัตถุรับรอง แต่ปัจจุบันยังไม่มีเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารเสริมของคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี เพื่อควบคุมคุณภาพปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ ถูกต้อง

กรมวิชาการเกษตร

ตามหลักเกณฑ์ และรักษาผลประโยชน์ของเกษตรกร ซึ่งต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยของห้องปฏิบัติการ โดยในกระบวนการวิเคราะห์หรือวัดค่าสิ่งต่างๆ ย่อมมีความไม่แน่นอนหรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนออกมารองรับปริมาณ หรือความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นอีกทั้งยังเป็นเกณฑ์สำหรับห้องปฏิบัติการใช้ในการพิจารณาดำเนินการตรวจสอบซ้ำ ในกรณีที่ผลวิเคราะห์ไม่ตรงกับปริมาณที่แจ้ง และเพื่อความเป็นธรรมของผู้ที่เกี่ยวข้อง ในกรณีที่มีการนำผลการวิเคราะห์มาใช้ตัดสินในทางกฎหมาย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียม สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทดลอง และวัสดุอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและปุ๋ยเคมีสำหรับการวิเคราะห์คลอไรด์ (ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 กิโลกรัม (A)

2. ตรวจความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คลอไรด์

2.1 หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่มีปริมาณคลอไรด์น้อย จำนวน 10 ซ้ำ นำไปทดสอบตามวิธีวิเคราะห์คลอไรด์ บันทึกข้อมูล และคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เพื่อคำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = 3S'_0$$

$$LOQ = 10S'_0$$

โดยที่ $S'_0 = S_0\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$

S'_0 คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับการคำนวณ LOD และ LOQ

S_0 คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบ Repeatability ของ Sample Blank

n คือ จำนวนซ้ำของตัวอย่างทดสอบ

n_b คือ จำนวนซ้ำของ Blank

2.2 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision) โดยวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง ระดับความเข้มข้น LOQ ต่ำ กลาง สูง ทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และทดสอบต่างวันเวลา นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าที่รับรอง เกณฑ์การยอมรับ % Recovery 95-105%, 97-103% และ 98-102% (Eurachem, 2014; AOAC, 2016) และประเมินค่า Precision โดย HorRat (Horwitz's Ratio) เกณฑ์การยอมรับ <1.3 (AOAC, 2016)

3. ประเมินค่า คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนการทดสอบ และคำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี

กรมวิชาการเกษตร

3.1 แบ่งตัวอย่างปุ๋ยเคมี (A) เป็น 2 ส่วน (A1, A2) ส่วนละ 1 กิโลกรัม แล้วนำปุ๋ยเคมี A1, A2 มาแบ่งเป็น 4 ส่วน ตาม Eurachem (2019) และบดตัวอย่างปุ๋ยเคมีทั้ง 8 ส่วน นำตัวอย่างที่ได้ไปดำเนินการทดสอบตัวอย่างละ 2 คน คนละ 2 ซ้ำ

3.2 คำนวณค่าความไม่แน่นอนตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง และขั้นตอนวิเคราะห์คลอไรด์ในปุ๋ยเคมี ตามสูตร

$$u = \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

เมื่อ u = ค่าคลาดเคลื่อน

% RSD = Relative standard deviation

SD = standard deviation

3.3 คำนวณเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี ตามสูตร

Verification of conformity if the width of the specification zone = 4 x U_c (ISO 14253-1, 2017)

$$u_c = \sqrt{(u_{samp})^2 + (u_{anal})^2 + (u_{validation})^2}$$

เมื่อ u_c = Combined uncertainty

u_{samp} = ค่าความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่าง

u_{anal} = ค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

$u_{validation}$ = ค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ได้อุปกรณ์ สารเคมี วัสดุอ้างอิงรับรอง และตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีจำนวน 15 ตัวอย่าง
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คลอไรด์

2.1 ประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ และการประมาณค่าต่ำสุดที่สามารถรายงาน ผลได้พบว่า ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.14%Cl ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน เท่ากับ 0.08%Cl คำนวณค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.24%Cl และ LOQ เท่ากับ 0.80%Cl

2.2 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

ตรวจสอบความถูกต้อง โดยหาค่า % recovery ของวัสดุอ้างอิง พบว่า % recovery ที่ระดับความเข้มข้น LOQ ต่ำ กลาง สูง อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับและการตรวจสอบความเที่ยง โดยประเมินค่า Precision จาก HorRat (Horwitz's Ratio) ที่ความเข้มข้น LOQ ต่ำ กลาง สูง อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ <1.3 ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องและความเที่ยง

กรมวิชาการเกษตร

ระดับความเข้มข้น (%Cl)	Recovery (%)	HorRat (เกณฑ์ยอมรับ <1.3)	เกณฑ์ยอมรับ %Recovery
LOQ (0.5 %)	96.0	0.97	95-105
ต่ำ (2.05 %)	102.7	0.39	97-103
กลาง (47.56 %)	99.5	0.26	98-102
สูง (66.39 %)	100.2	0.23	98-102

3. ประเมินค่าความไม่แน่นอนในขั้นตอนการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ

เกณฑ์คลาดเคลื่อนจากค่าความไม่แน่นอนของการวัดของปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี โดยคำนวณจากค่าความไม่แน่นอนจากการสุ่มตัวอย่างและการทดสอบ ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 11.91%, 2.68% และ 2.91% ช่วงความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 3.62%, 6.79% และ 2.51% และช่วงความเข้มข้นสูง เท่ากับ 0.78%, 0.89% และ 0.68% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความไม่แน่นอนของปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี

ระดับความเข้มข้น	%Cl	Measurement uncertainty		
		Sampling (%)	Analytical (%)	Total (%)
ต่ำ (≤22.0%Cl)	6.50	10.96	4.66	11.91
	14.85	2.38	1.24	2.68
	20.29	1.22	2.64	2.91
กลาง (22.1-48.0 %Cl)	26.57	2.92	2.16	3.63
	38.02	6.16	2.86	6.79
	47.35	0.68	2.42	2.51
สูง (> 48.0 %)	66.27	0.18	0.76	0.78
	66.95	0.4	0.8	0.89
	67.41	0.02	0.68	0.68

เมื่อนำความเข้มข้นทั้งสามช่วงกับค่าความไม่แน่นอนมาสร้างกราฟ เพื่อดูการกระจายค่าความไม่แน่นอนของแต่ละช่วงความเข้มข้น พบว่า ช่วงความเข้มข้น ≤22.0%Cl มีค่าความไม่แน่นอนอยู่ในช่วง 2.68-11.91% ช่วงความเข้มข้น 22.1-48.0 %Cl มีค่าความไม่แน่นอนอยู่ในช่วง 2.51-6.70% และช่วงความเข้มข้น >48.0%Cl มีค่าความไม่แน่นอนอยู่ในช่วง 0.68-0.89% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาช่วงความเข้มข้น 0.1-68.0% Cl มีค่าความไม่แน่นอนอยู่ในช่วง 0.68-11.91%

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การศึกษาเกณฑ์คลาดเคลื่อนของการวัดปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี โดยทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คลอไรด์ในปุ๋ยเคมี เพื่อนำมาประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด และทำการทดสอบตัวอย่างปุ๋ยเคมี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์คลอไรด์ในปุ๋ยเคมี การทดสอบ Limit of detection(LOD), Limit of quantitation (LOQ), Trueness, Precision พบว่า ค่า LOD และ LOQ

กรมวิชาการเกษตร

เท่ากับ 0.24%Cl และ 0.80%Cl ค่า Trueness และ Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับและได้เกณฑ์ค่าคลาดเคลื่อนของปริมาณคลอไรด์ในปุ๋ยเคมีที่คลอบคลุมระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 11.91%, 6.79% และ 0.89% ตามลำดับ

กิจกรรมที่ 2 พัฒนา และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ดิน และพืช ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมี ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation on Analysis of Boron in Fertilizer by Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy

อาธิยา ปุ่นประโคน วรรณรัตน์ ชุติบุตร จริยา วงศ์ตรี

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โบรอนในปุ๋ยเคมี

Method Validation Boron in Fertilizer

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมี เพื่อให้ได้เทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว แม่นยำ สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล ทำให้เป็นที่ยอมรับห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ได้ค่า correlation coefficient (r) ที่แสดงความเป็นเส้นตรง Linearity range และ Working range ผ่านเกณฑ์กำหนด มีปริมาณที่ต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.002%B และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.004 %B ดำเนินการพิสูจน์ความถูกต้อง (trueness) และ ความเที่ยง (Precision) ของ LOQ ได้ %Recovery เท่ากับ 100.0 ได้ HorRat เท่ากับ 0.33 การทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ Metrix effect โดยเปรียบเทียบความชันของกราฟ ระหว่าง Std B spike standard B ลงใน Sample blank โดยกราฟ เมื่อคำนวณความชันของกราฟทั้งสอง มีความแตกต่างกัน เท่ากับ 3.92 % แสดงว่ามีความชันต่างกันไม่เกิน 10 % จึงไม่มี Metrix effect ต่อ standard curve วิเคราะห์ Certified Reference Material (CRM) ในปุ๋ยเคมี ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง นำมาประเมินความถูกต้องจาก 3 วิธีคือ หาค่า %Recovery ได้เท่ากับ 100.0 99.62 และ 100.77% ตามลำดับ หาค่า HorRat ได้เท่ากับ0.33 0.34 และ 0.24 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (%recovery อยู่ในช่วง 80-110% 98-102% และ HorRat ≤ 1.3) ทุกช่วงความเข้มข้น จากการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม Ruggedness จำนวน 7 ตัวแปร 8 การทดลอง โดยใช้ Youden-Steiner testing พบว่า การทดลอบโบรอนไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ วิธีวิเคราะห์มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย เมื่อคำนวณต้นทุนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES และเครื่อง

กรมวิชาการเกษตร

Spectrophotometer พบว่า การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer มีค่าใช้จ่ายต้นทุนการวิเคราะห์มากกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES ด้านระยะเวลา การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างต่อวันได้น้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง ICP-OES วิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยโดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำและยังพบว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากต่อวัน ไม่สิ้นเปลืองสารเคมี ทำให้มีความสะดวกรวดเร็วในการวิเคราะห์โบรอนโดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ

Development of Boron Analysis Techniques in Chemical Fertilizers In order to obtain accurate, fast, accurate analytical techniques, can refer to international standards. Make it acceptable to the laboratory Verification of the validity of the analysis method was obtained, the correlation coefficient (r) indicating the linearity, the Linearity range and the working range passed the specified criteria. Limit of Detection (LOD) was 0.002%B and limit of Quantity (LOQ) 0.004 %B to proof trueness and Precision of LOQ as 100.0 %Recovery and HorRat as 0.33 acceptance criteria. Metrix effect test comparing the slope of the curve between Std B spike standard B in the sample blank by the curve. When calculating the slope of both curves. There was a difference of 3.92%, indicating that the slope difference was not more than 10%, so there was no Metrix effect on the standard curve. Certified Reference Material (CRM) analysis in chemical fertilizers at low, medium and high concentrations were used to assess the accuracy from 3 methods, %Recovery were 100.0, 99.62 and 100.77% HorRat were 0.33, 0.34 and 0.24 The results of analysis showed that the acceptance criteria. (%Recovery in the concentration range 80-110% 98-102% and HorRat ≤1.3). When studying ruggedness using Youden-Steiner testing. It was found that the boron analysis was not affected by changes in the environment. When calculating the cost of analysis. with ICP-OES and Spectrophotometer was calculated. It was also found that the ICP-OES analytical method was cheaper and a large number of samples can be analyzed samples per day more than Spectrophotometer. Method for analyzing boron in fertilizers using inductively coupled plasma spectrometry. can be properly used in the laboratory It was also found that the ICP-OES analytical method was able to analyze a large number of samples per day. no wasted chemicals making it more convenient and quick to analyze Boron by inductive coupled plasma spectrometry technique. can be used in the laboratory with accuracy and precision.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ (Introduction)

โบรอน (Boron : B) จัดเป็นจุลธาตุอาหารพืชที่สำคัญอีกธาตุหนึ่ง และที่เรียกว่าจุลธาตุอาหารนั้นเนื่องจากปริมาณที่พืชต้องการน้อยมาก แต่ก็มีความสำคัญต่อพืชไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากลุ่มธาตุอาหารพืชอื่นๆ เพราะถ้าหากมีไม่พอกับความต้องการของพืชแล้ว พืชย่อมเจริญเติบโตและให้ผลผลิตน้อยลง และพืชอาจตายก่อนที่จะผลิดอกออกผลก็ได้หากขาดแคลนอย่างรุนแรง (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

วิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรีของห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่มีมาตรฐาน โดยเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่มีอยู่ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติงาน ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล เป็นการยืนยันถึงวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ และสอดคล้องกับข้อกำหนดของ ISO/IEC 17025: 2017 และจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล เป็นผลดีต่อเกษตรกร ที่จะได้ใช้สินค้าที่มีคุณภาพ เนื่องจากกรมวิชาการเกษตรเป็นผู้รับผิดชอบหลักด้านปัจจัยการผลิตต่างๆ เช่น ดิน น้ำ ปุ๋ย พืช จำเป็นที่จะต้องพัฒนาห้องปฏิบัติการในด้านต่างๆ เช่น เทคนิควิธีการวิเคราะห์ ระบบการควบคุมคุณภาพ ระบบการให้บริการ ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว เข้าถึงเกษตรกร และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสร้างความเชื่อมั่นในด้านความถูกต้องของข้อมูลผลการวิเคราะห์ให้แก่เกษตรกร ผู้ประกอบการด้านปัจจัยการผลิต และประชาชนทั่วไปเพื่อใช้ประกอบการพิจารณาด้านการปรับปรุงคุณภาพและเพิ่มผลผลิตพืช เพื่อให้ผลวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือของผู้ขอรับบริการ และยกระดับมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ให้มีมาตรฐานเดียวกันและเทียบเท่าสากล ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องดำเนินการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมีด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี เพื่อพิสูจน์ว่าวิธีนี้มีความเหมาะสมกับการใช้งาน

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียมวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่มีค่ารับรอง (Certified Value) และค่าความไม่แน่นอน (Uncertainty)ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ สำหรับทดสอบหาปริมาณโบรอน

2. หาสภาวะของเครื่อง ICP ที่เหมาะสม ได้แก่ wavelength, plasma, view, plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump flow และ Uptake

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ โบรอน ตามขั้นตอน

3.1. การหาช่วงการใช้งานและความเป็นเส้นตรง (Working and linear range) โดยการชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่มีธาตุที่สนใจ น้ำหนัก 1.xxxx กรัม เป็น sample blank และเติมสารละลายมาตรฐานโบรอน 7 ความเข้มข้น ใส่ volumetric flask 100 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เจือจาง 10 มล.

3.2. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

ศรีวิชัยการเกษตร

3.3. นำไปวัดโดยใช้เครื่อง ICP-OES

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียม กับสัญญาณเครื่องมือ

4. การหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

4.1. ชั่งตัวอย่างที่ไม่มีธาตุที่สนใจ น้ำหนัก 1.xxxx กรัม ใส่ volumetric flask 100 มิลลิลิตร (โดยทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ)

4.2. เติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เจือจาง 10 มล.

4.3. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

4.4. นำไปวัดโดยใช้เครื่อง ICP-OES

4.5. คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

LOD = 3SD

LOQ = 10SD

5. การพิสูจน์ค่าความเที่ยงและความถูกต้องที่ระดับความเข้มข้น LOQ

5.1. ชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง ความเข้มข้นใกล้เคียงกับ LOQ น้ำหนัก 1.xxxx กรัม ใส่ volumetric flask 100 มิลลิลิตร (โดยทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ)

5.2. ดำเนินการเช่นเดียวกับ 6.2.4.2 – 6.2.4.4 (โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน)

5.3. ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่มีธาตุที่สนใจ น้ำหนัก 1.xxxx กรัมเติมวัสดุอ้างอิงรับรองในแต่ละซ้ำ ความเข้มข้นใกล้เคียงกับ LOQ น้ำหนัก 0.3xxx กรัม

5.4. ดำเนินการเช่นเดียวกับ 7.2.4.2 – 7.2.4.4 (โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน)

5.5. บันทึกผลข้อมูล แล้วเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้ กับค่าความเข้มข้นที่ทราบค่าโดยพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (%recovery) และค่า HorRat

- การคำนวณ % Recovery จากสูตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

- การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (Horwitz ' Ratio)} = \frac{\text{RSD(r)}}{\text{PRSD(R)}}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{RSD(r)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

กรมวิชาการเกษตร

$$PRSD(R) = \frac{2C^{-0.15}}{100} \quad (C = mean)$$

โดยที่

RSD(r) หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบซ้ำภายในห้องปฏิบัติการ

PRSD(R)หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบซ้ำระหว่างห้องปฏิบัติการ

คำนวณ จากสูตรของ Horwitz equation

SD หมายถึง ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบซ้ำ

mean หมายถึง ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำ

C หมายถึง เศษส่วนมวล

เกณฑ์การยอมรับ AOAC (2016) : HorRat ≤ 1.3

6. หาค่าความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (Trueness and precision

6.1. ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่ไม่มีธาตุที่สนใจ เติมวัสดุอ้างอิงรับรองในแต่ละซ้ำ ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง น้ำหนัก 0.3xxx กรัม จำนวน 10 ซ้ำ

6.2. ดำเนินการเช่นเดียวกับ 7.2.4.2 – 7.2.4.4 (โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 10 วัน)

7. ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อม ของวิธีการทดสอบโบรอนโดยใช้เครื่อง ICP-OES ด้วยการทดสอบ Ruggedness โดยมี 7 ตัวแปร จำนวน 8 การทดลอง

7.1. สภาวะการทดสอบปกติที่เขย่าตัวอย่างทันที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงตั้งทิ้งไว้ก่อนเขย่า 15 นาที

7.2. สภาวะการทดสอบปกติที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า 180 rpm

7.3. สภาวะการทดสอบปกติที่ระยะเวลาในการเขย่า 15 นาที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเขย่า 20 นาที

7.4. สภาวะการทดสอบปกติที่ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงที่ใช้กระดาษกรองเบอร์ 5

7.5. สภาวะการทดสอบปกติที่ใช้กรวยกรองพลาสติก กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงใช้กรวยกรองแก้ว

7.6. สภาวะการทดสอบปกติที่กรองตัวอย่างทันที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนกรองตัวอย่าง

7.7. สภาวะการทดสอบปกติของการวัดที่ใช้เวลา up take ตัวอย่าง 25 วินาที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงใช้เวลา up take ตัวอย่าง 20 วินาที

7.8. วางแผนการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

7.9. ดำเนินการตามแผนการทดลอง โดยชั่งสารมาตรฐานอ้างอิงรับรอง ค่าต่ำ น้ำหนัก 1.xxxx กรัม ค่ากลาง และสูง น้ำหนัก 0.3xxx ดำเนินการเช่นเดียวกับ 7.2.4.2 – 7.2.4.4

7.10. คำนวณผลกระทบของตัวแปร (E) ของแต่ละตัวแปร 7 ตัวแปร จาก 8 การทดลอง

7.11. พิจารณาค่า | E | ของแต่ละตัวแปร 7 ตัวแปร โดยถ้า

| E | > S แสดงว่า มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

$$\text{โดย } S = \sqrt{\frac{2}{7} * \Sigma(E^2)}$$

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ได้สภาวะของเครื่อง ICP ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ Boron ในปุ๋ยเคมี ใช้ค่า wavelength ที่ 249.772 นาโนเมตร plasma view ใช้มุมมอง radial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 16 ลิตรต่อนาที, 0.8 ลิตรต่อนาที, 1.2 ลิตรต่อนาที, 1.200 กิโลวัตต์, 25 RPM, และ 25 วินาทีตามลำดับ และความเข้มข้นของ Standard curve เท่ากับ 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 15 ppm ตามลำดับ

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบโบรอน ตามขั้นตอน

2.1. การหาช่วงใช้งาน และพิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (working range and linearity)

2.1.1. การหาค่า linearity range โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโบรอน (แกน X) และค่าความเข้มของแสงที่อ่านจากเครื่อง (แกน y) หาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง พบว่าอยู่ในช่วง 0-20 ppm B ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Correlation coefficient ; r) เท่ากับ 1.0000

2.1.2. การหา Working range เลือกเอาช่วง 0-15 ppm B เป็นช่วงการใช้งาน (Working range) นำมาหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Correlation coefficient ; r) เท่ากับ 1.0000 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับจึงเลือกเป็นช่วงใช้งานในห้องปฏิบัติการ

2.2. ทดสอบผลของ matrix effect โดยเปรียบเทียบความชันของกราฟมาตรฐานระหว่าง Standard B solution กับ Spiked Standard B solution ลงใน sample blank ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด % RPD ของ Slope < 10% (NATA, 2018)

2.3. การประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection ; LOD) และการประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantization ; LOQ)

หาปริมาณโบรอน (%B) ต่ำที่สุดที่สามารถทดสอบได้ (Limit of Detection ; LOD) และปริมาณโบรอน (%B) ต่ำสุดที่สามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantization ; LOQ) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ทดสอบ (Sample blank) และ spike Boron 0.002 % โดยเตรียมสารละลายSRM

กรมวิชาการเกษตร

973 (Boric acid) ที่มี Boron 17.48% ที่ความเข้มข้น 0.002 % คำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยมีค่าเฉลี่ย = 0.0018 , SD = 0.0012 , LOD = 0.002 , LOQ (Predict) = 0.004

2.4. พิสูจน์ความแม่น (Trueness) และ และความเที่ยง (Precision) ด้วยเทคนิค ICP วิเคราะห์ Certified Reference Material (CRM) ในปุ๋ยเคมีที่ความเข้มข้นต่ำ ความเข้มข้น 0.004% กลาง 5.83 % และสูง 17.48% จากการศึกษาพบว่ามีค่าความแม่น (Trueness) ที่แสดง % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ 100.0 ความเข้มข้นกลาง 99.62 และความเข้มข้นสูง 100.77 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ % Recovery ความเข้มข้นต่ำ 90-107 % ความเข้มข้น กลางและสูง 98-102 % และ Precision มีค่า HorRat ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.27 ความเข้มข้นกลาง 0.30 และความเข้มข้นสูง 0.24 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ HorRat ≤ 1.3 (AOAC, 2016) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (LOQ) กลาง สูง

รายการวิเคราะห์	ความเข้มข้น	Trueness			Precision		
		Mean	SD	%Recovery	RSD_r	PRSD (R)	HorRat (r)
B	LOQ	0.004	0.0001	100.0	3.001	9.1389	0.33
	กลาง	5.80	0.052	99.62	0.905	3.066	0.30
	สูง	17.61	0.11	100.77	0.614	2.595	0.24

2.5. ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อม ด้วยการทดสอบ Ruggedness โดยการวางแผนการทดลอง 7 ตัวแปร 8 การทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ

- ตัวแปรที่ 1 ระยะเวลาก่อนเขย่า สภาวะการทดสอบปกติที่เขย่าตัวอย่างทันที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงตั้งทิ้งไว้ก่อนเขย่า 15 นาที
- ตัวแปรที่ 2 รอบในการเขย่า สภาวะการทดสอบปกติที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า 180 rpm
- ตัวแปรที่ 3 ระยะเวลาในการเขย่า สภาวะการทดสอบปกติที่ระยะเวลาในการเขย่า 15 นาที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการเขย่า 20 นาที
- ตัวแปรที่ 4 กระดาษกรอง สภาวะการทดสอบปกติที่ใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงที่ใช้กระดาษกรองเบอร์ 5
- ตัวแปรที่ 5 กรวยกรอง สภาวะการทดสอบปกติที่ใช้กรวยกรองพลาสติก กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงใช้กรวยกรองแก้ว
- ตัวแปรที่ 6 การกรอง สภาวะการทดสอบปกติที่กรองตัวอย่างทันที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนกรองตัวอย่าง
- ตัวแปรที่ 7 ระยะเวลาการ up take สภาวะการทดสอบปกติของการวัดที่ใช้เวลา up take ตัวอย่าง 25 วินาที กับสภาวะที่เปลี่ยนแปลงใช้เวลา up take ตัวอย่าง 20 วินาที

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิเคราะห์โบรอน 8 การทดลอง (ตารางที่ 2, 3, 4) และผลกระทบของตัวแปร (E) ทั้ง 7 ตัวแปร (ตารางที่ 5) พบว่าไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของการทดสอบดังกล่าว

ตารางที่ 2 แสดง 7 ตัวแปร ที่ใช้ในการทดลอง

ตัวแปร	สัญลักษณ์ตัวแปร	สภาวะ	ปกติ (A-G)	เปลี่ยนแปลง (a-g)
A	A/a	ระยะเวลาก่อนเขย่า	เขย่าทันที	ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
B	B/b	รอบในการเขย่า	200 rpm	180 rpm
C	C/c	ระยะเวลาในการเขย่า	15 นาที	20 นาที
D	D/d	กระดาษกรอง	เบอร์ 1	เบอร์ 5
E	E/e	กรวยกรอง	พลาสติก	แก้ว
F	F/f	การกรอง	กรองทันที	ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
G	G/g	ระยะเวลาการ up take	25 วินาที	20 วินาที

ตารางที่ 3 แสดงแผนการทดลอง 8 การทดลองที่ใช้ในการทดสอบ Ruggedness

การทดลอง	แผนการทดลอง							ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์
การทดลองที่ 1	A	B	C	D	E	F	G	R_1
การทดลองที่ 2	A	B	c	D	e	f	g	R_2
การทดลองที่ 3	A	b	C	d	E	f	g	R_3
การทดลองที่ 4	A	b	c	d	e	F	G	R_4
การทดลองที่ 5	a	B	C	d	e	F	g	R_5
การทดลองที่ 6	a	B	c	d	E	f	G	R_6
การทดลองที่ 7	a	b	C	D	e	f	G	R_7
การทดลองที่ 8	a	b	c	D	E	F	g	R_8

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ Ruggedness โบรอนในตัวอย่างปุ๋ย

การทดลอง	ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์		
	ความเข้มข้นต่ำ (%B)	ความเข้มข้นกลาง (%B)	ความเข้มข้นสูง (%B)
การทดลองที่ 1	0.004	5.77	17.62
การทดลองที่ 2	0.004	5.72	17.42
การทดลองที่ 3	0.004	5.72	17.48
การทดลองที่ 4	0.004	5.74	17.51
การทดลองที่ 5	0.004	5.72	17.45
การทดลองที่ 6	0.004	5.76	17.20

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 7	0.004	5.74	17.31
การทดลองที่ 8	0.004	5.76	17.57

ตารางที่ 5 ผลกระทบของตัวแปร (E)

	ผลต่างตามค่าสัมบูรณ์ E		
	ช่วงความเข้มข้น B		
	ต่ำ	กลาง	สูง
E_A = [R1 + R2 + R3 + R4]/4 - [R5 + R6 + R7 + R8]/4	0.0002	-0.01	0.13
E_B = [R1 + R2 + R5 + R6]/4 - [R3 + R4 + R7 + R8]/4	0.0001	0.00	-0.05
E_C = [R1 + R3 + R5 + R7]/4 - [R2 + R4 + R6 + R8]/4	0.0000	-0.01	0.04
E_D = [R1 + R2 + R7 + R8]/4 - [R3 + R4 + R5 + R6]/4	-0.0001	0.01	0.07
E_E = [R1 + R3 + R6 + R8]/4 - [R2 + R4 + R5 + R7]/4	0.0001	0.02	0.04
E_F = [R1 + R4 + R5 + R8]/4 - [R2 + R3 + R6 + R7]/4	0.0001	0.01	0.19
E_G = [R1 + R4 + R6 + R7]/4 - [R2 + R3 + R5 + R6]/4	0.0001	0.02	-0.07
S	0.0003	0.03	0.19

| E | > S แสดงว่า มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยเคมี โดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ที่ wavelength ที่ 249.772 นาโนเมตร plasma view ใช้มุมมอง radial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 16 ลิตรต่อนาที, 0.8 ลิตรต่อนาที, 1.2 ลิตรต่อนาที, 1.200 กิโลวัตต์, 25 RPM, และ 25 วินาทีตามลำดับ โดยมีผลจากการศึกษาการรบกวนจากการเปรียบเทียบกราฟสารละลายมาตรฐาน และกราฟสารละลายมาตรฐานที่เติมตัวอย่างปุ๋ย พบว่า % RPD ผ่านเกณฑ์กำหนด

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) ที่แสดงความเป็นเส้นตรงของ Linearity range เท่ากับ 1.0000 ทุกรายการวิเคราะห์ และ Working range เท่ากับ 0.99995 ผ่านเกณฑ์กำหนด r ≥ 0.995 มีค่า LOD เท่ากับ 0.0004%B และ LOQ เท่ากับ 0.004%B การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์กำหนดโดยมี % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ 100.0 ความเข้มข้นกลาง 99.62 ความเข้มข้นสูง 100.77 ค่า HorRat ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.33 ที่ความเข้มข้น 0.30 ความเข้มข้นสูง 0.24 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ

จากการศึกษาความคงทนของวิธี (Ruggedness) 7 ตัวแปร 8 การทดลอง โดยใช้ Youden-Steiner testing โดยการพิจารณาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม พบว่าไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของการทดสอบดังกล่าว จากการคำนวณต้นทุนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-OES และเครื่อง Spectrophotometer พบว่า การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer มีค่าใช้จ่ายต้นทุนการวิเคราะห์มากกว่าการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง ICP-OES ด้าน

กรมวิทยาศาสตร์

ระยะเวลา การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer สามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างต่อวันได้น้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วย เครื่อง ICP-OES วิธีวิเคราะห์โบรอนในปุ๋ยโดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation of Boron in soil by using Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques

จิตติรัตน์ ชูชาติ สงกรานต์ มะลิสอน พจมาลย์ ภู่สาร ญาณธิชา จิตต์สะอาด
สุภา โพธิจันทร์ กัณฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โบรอนในดิน

Method Validation Boron in soil

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ในรูปของ Extractable Boron โดยการสกัดดินด้วยวิธี Hot-$CaCl_2$ soluble Boron และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometer พบว่า การวิเคราะห์โบรอนด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.03 mg/kg และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.04 mg/kg เมื่อพิสูจน์ค่าความถูกต้อง (Trueness) และค่าความเที่ยง (Precision) ของ LOQ ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 99.06% และ HorRat (Horwitz'Ratio) เท่ากับ 0.91 ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง(Trueness) และค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 95.29, 101.61 และ 100.05 ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.40, 0.38 และ 0.46 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วง 80-110% และ HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3) ผลการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม Ruggedness พบว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ไม่มีผลกระทบต่อวิธีวิเคราะห์โบรอน และวิธีมีความคงทนต่อการนำไปใช้เป็นวิธีอ้างอิงของห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์โบรอนที่สกัดได้ในดินด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry จึงมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจ ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ

Development and Method Validation of boron in soil by using Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) found that the Limit of Detection (LOD) was 0.03 mg/kg and Limit of Quantitation (LOQ) was 0.04 mg/kg. To prove the trueness and precision at LOQ concentration was 99.06% Recovery and HorRat

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

(Horwitz'Ratio) was 0.91. The CRM analysis to prove concentrations (0.17, 0.56, 1.90 mg/kg) %Recovery were 95.29, 101.61 and 100.05 % respectively. HorRat (Horwitz'Ratio) were 0.43, 0.38 and 0.46 respectively. The results of analysis showed that the (AOAC) acceptance criteria (%Recovery in the ranges from 80-110% and HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3). When studying ruggedness using. It was found that the boron analysis was not affected by changes in the environment. Therefore, this method is effective and suitable for use in the analysis of boron in soil. That is routine work and needs fast, accurate analysis results with Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques.

บทนำ (Introduction)

โบรอนเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เป็นธาตุอาหารเพียงธาตุเดียวที่ให้ผลตอบสนองสูงมากเมื่อใส่ให้พืชในปริมาณที่น้อย แต่ถ้าใส่โบรอนในปริมาณที่สูงเพียงเล็กน้อยจากอัตราที่แนะนำ โบรอนก็อาจเป็นพิษหรือทำให้เกิดความเสียหายได้ ในดินทั่วไปโบรอนในสารละลายดินอยู่ในรูป H_3BO_3 หรือ $B(OH)_3$ โบรอนละลายได้ดีในสภาพดินเป็นกรด และสามารถถูกชะละลายออกจากดินได้ง่าย โบรอนมีบทบาทอย่างมากต่อการสร้างและคงรูปของผนังเซลล์ ความแข็งแรงของ ท่อเรณู (pollen tube) และการผสมของละอองเกสร นอกจากนั้นยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังเซลล์ พืชที่ขาดโบรอนมักมีรูปทรงผิดปกติที่ผล การใส่โบรอนและแคลเซียมมีผลทำให้เมล็ดมีความแข็งแรงขึ้น ในพืชหลายชนิดอาการขาดแคลเซียมและโบรอนมีลักษณะใกล้เคียงกัน เนื่องจากธาตุทั้งสองมีบทบาทและหน้าที่หลายอย่างร่วมกัน (Marschner, 1995) โดยถั่วลิสงเป็นพืชที่แสดงการขาดโบรอนได้อย่างชัดเจน ถั่วลิสงที่ปลูกในดินที่ขาดโบรอนทำให้เกิดเมล็ดกลวง หรือ Hollow heart seed (Cox *et al*., 1982) ซึ่งเป็นเมล็ดที่มีเนื้อเยื่อด้านใน (เมื่อแยกเมล็ดออกเป็น 2 ซีก) มีลักษณะผิวขรุขระ หากอาการขาดรุนแรงมากขึ้นจนเนื้อเยื่อเจริญไม่เต็มพื้นผิวเมล็ดและเกิดเป็นหลุม สีของเนื้อเยื่อบริเวณนี้อาจเป็นสีเหลือง จนถึงสีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม โดยปริมาณโบรอนที่สกัดได้ที่เพียงพอในดินจะอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอน ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ การสกัดดินด้วยวิธี Hot-$Cacl_2$ soluble Boron แล้วสามารถนำไปวิเคราะห์วัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometer โดยตรง ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Method of soil analysis (Sparks *et al*., 1996) ซึ่งดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งต้องผ่านการทำให้เกิดสีด้วยวิธี Curcumin หรือ Azomethine H แล้ววัดด้วยความยาวคลื่น 550 nm (Keren, 1996) ซึ่งพบว่าการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโบรอนด้วยเครื่อง ICP-OES ซึ่งใช้หลักการ Emission spectroscopy (แม้นและคณะ, 2552) สามารถลดขั้นตอนการเจือจางความเข้มข้นและการทำให้สารละลายเกิดสีด้วย Azomethine H และ Curcumin ตามแบบวิธีเดิม และพบว่าการวิเคราะห์ด้วย Inductively Coupled Plasma (ICP) มีความไวในการตรวจพบ และสามารถตรวจพบได้ในระดับที่ต่ำกว่าการใช้วิธี Spectrophotometric และ flame AES/AAS อีกด้วย (Sah and Brown, 1997) การทดลองนี้จึงมุ่งเน้น

กรมวิชาการเกษตร

ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์โบรอนในดิน ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี (Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry) เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ดินในห้องปฏิบัติการ

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ ที่ต้องใช้ในการทดสอบ และจัดหาวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่มีค่า Certified Value และ Uncertainty และตัวอย่างดินที่มีระดับความเข้มข้นโบรอน ต่ำ กลาง สูง

2. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์โบรอนในดิน เช่น Wavelenght, Sample flow rate, Neubilizer flow rate, Plasma flow rate และ plasma scanning เป็นต้น

3. ศึกษาการรบกวนของธาตุเหล็ก ที่มีผลต่อปริมาณโบรอนในการวัดด้วยเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

4. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน ที่สกัดด้วยวิธี Hot-Water Soluble Boron และวัดปริมาณด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopic method ดังนี้

4.1. Linearity / range ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานโบรอน ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน อย่างน้อย 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และปริมาณความเข้มข้นของโบรอน ($r \geq 0.995$)

4.2. หาค่า Trueness และ precision โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโบรอน โดยทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 10 ซ้ำและต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery และ HorRat < 1.3 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016)

4.2.1. การคำนวณ % Recovery จากสูตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

4.2.2. การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (Horwitz' Ratio)} = \frac{\text{RSD(r)}}{\text{PRSD(R)}}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{RSD(r)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

$$\text{PRSD(R)} = \frac{2C^{-0.15}}{100} \quad (C = \text{mean})$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4.3. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า Standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีโบรอนปริมาณน้อย จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = 3S0'$$

$$LOQ = 10S0'$$

5. นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ โดยใช้เกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน AOAC Official Methods of Analysis (2016)

6. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ ระยะเวลาการกรอง เป็นต้น

7. สรุปและรายงานผลการทดลองการวิเคราะห์โบรอนด้วยเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1) ได้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์โบรอนในดิน โดยใช้ค่า wavelength ที่ 249.772 นาโนเมตร plasma view ใช้มุมมอง Axial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 14 ลิตรต่อนาที, 0.8 ลิตรต่อนาที, 1.2 ลิตรต่อนาที, 1.2 กิโลวัตต์, 25 RPM, และ 25 วินาทีตามลำดับ และความเข้มข้นของ Standard curve เท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/kg ตามลำดับ

2) ทำการศึกษา matrix effect โดยเปรียบเทียบความชันของกราฟมาตรฐานระหว่าง Standard Boron กับ Spiked Standard Boron ลงใน Sample blank ได้ค่าความชันแตกต่างกัน ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ค่าความชันแตกต่างกันไม่เกิน 10 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด (% RPD ของ Slope < 10%) (NATA, 2018)

3) ศึกษาการรบกวนของธาตุเหล็ก ที่มีผลต่อปริมาณโบรอนในการวัดด้วยเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ที่ความเข้มข้น ต่ำ และกลาง โดยใช้เหล็กเป็นตัวรบกวนการวิเคราะห์โบรอน ซึ่งปริมาณเหล็กจะส่งผลให้ปริมาณโบรอนที่วิเคราะห์ได้มีค่าสูงกว่าความเป็นจริง (Keren, 1996) โดยชั่งตัวอย่างดินที่มีปริมาณโบรอนความเข้มข้นต่ำ และกลาง และสูง (0.17, 0.56 และ 1.97 mg/kg) เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก 7 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 mg/l ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบ Intensity และความเข้มข้นของสารละลายโบรอนที่วัดได้เมื่อมีการเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก และความเข้มข้นของโบรอนในดินตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES เปรียบเทียบ % Recovery ของตัวอย่างดินที่ทราบค่าโบรอนความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง ที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก คำนวณหาค่า % Recovery พบว่า ตัวอย่างดินที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก 0, 5, 10, 20, 50 และ 100mg/l ผ่านเกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน AOAC: 2016 (% Recovery 80-110) สอดคล้องกับการศึกษาของ Turner *et al*., (2016) พบว่าการวิเคราะห์โบรอนด้วยวิธี Hot-water extracts ซึ่งสกัดดินด้วย 0.01M $CaCl_2$ ไม่ส่งผลให้ปริมาณเหล็กรบกวนการวิเคราะห์โบรอน แต่การวิเคราะห์โบรอนด้วย Mehlich-III Extracts และ Total Boron จะส่งผลให้ธาตุเหล็กรบกวนการวิเคราะห์โบรอนได้ นอกจากนี้การศึกษาต่อมาของ Turner *et al*., (2017) พบว่าหากวิเคราะห์โบรอนด้วยวิธี Mehlich-III Extracts และ Total Boron จะพบการรบกวนของเหล็กและสามารถลดการรบกวนของเหล็กได้โดยใช้ wavelength 208.597 nm ดังนั้นจากการศึกษาการรบกวนของธาตุเหล็กที่มีผลต่อการวิเคราะห์โบรอนที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ด้วยวิธี Hot-water extracts พบว่า ปริมาณเหล็กในดินไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์โบรอน ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยวิธี Hot-water extracts ที่ wavelength 249.772 nm

4) หาช่วงความสามารถของวิธีทดสอบที่ทำให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารทดสอบในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด (Working range/linearity)

- ประเมินช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Working range) โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของของสารละลาย Fortified sample blank (แกน X) และค่า Intensity ที่อ่านจากเครื่อง (แกน y) พบว่าความเข้มข้น 0-1.2 ppm มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) เท่ากับ 0.9992 ซึ่งค่า r มีค่ามากว่า 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ และเลือกความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm เป็นช่วงการใช้งาน

- ทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ใช้งาน (Linearity) โดยทดสอบ Fortified sample blank ที่เติมสารมาตรฐานโบรอน 7 ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ppm ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกับค่าที่อ่านได้ พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$

5) หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยวิเคราะห์ Sample blank ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบปริมาณโบรอน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยมีค่าเฉลี่ย = 0.0258 , SD = 0.0020 , LOD = 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, LOQ (Predict) = 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบค่า Accuracyและ Precision ที่ระดับ LOQ = 0.08 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ % Recovery และ HORRAT พบว่ามี % Recovery = 99.06% และ HorRat = 0.91 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (% Recovery = 80-110, HORRAT $<$ 1.3)

6) พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยชั่งตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง NCS DC 85106a (0.17 ± 0.05 mg/kg Available Boron), GBW 07458 (0.56 ± 0.08 mg/kg Available Boron), GBW 07459 (1.90 ± 0.30 mg/kg Available Boron) ที่มีความเข้มข้นของโบรอน 0.17, 0.56 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ คำนวณความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) โดยมีเกณฑ์ยอมรับ % Recovery = 80-110 และ Precision มีเกณฑ์ยอมรับ HorRat < 1.3 พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มีค่า % Recovery เท่ากับ 95.29, 101.61 และ 100.05 ตามลำดับ มีค่า HorRat เท่ากับ 0.40, 0.38 และ 0.46 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

7) ได้ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน (Ruggedness) จากสภาวะปกติ ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำหนักตัวอย่าง ปริมาตรน้ำยาสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการต้ม ได้ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน ที่ความเข้มข้นต่ำ จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำหนักตัวอย่าง ปริมาตรน้ำยาสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการต้ม พบว่า ค่า t-Stat < t Critical ยอมรับ H_0 ซึ่งแสดงว่าค่าเฉลี่ยของการวัดจากข้อมูลทั้ง 2 ชุด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ในรูปของ Extractable Boron โดยการสกัดดินด้วยวิธี Hot-$CaCl_2$ soluble Boron และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometer พบว่า การวิเคราะห์โบรอนด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.03 mg/kg และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.04 mg/kg เมื่อพิสูจน์ค่าความถูกต้อง (Trueness) และค่าความเที่ยง (Precision) ของ LOQ ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 99.06% และ HorRat (Horwitz'Ratio) เท่ากับ 0.91 ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง(Trueness) และค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 95.29, 101.61 และ 100.05 ตามลำดับ ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.40, 0.38 และ 0.46 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ตาม AOAC) ทั้งหมด (%Recovery อยู่ในช่วง 80-110% และ HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3) ผลการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม Ruggedness พบว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ไม่มีผลกระทบต่อวิธีวิเคราะห์โบรอน และวิธีมีความคงทนต่อการนำไปใช้เป็นวิธีอ้างอิงของห้องปฏิบัติการได้

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิคอิน ดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation on Analysis of Boron in Plant by Inductively Coupled Plasma Spectrometry technique

สุวลักษมิ์ ไชยทอง สุภานันทน์ จันทร์ประอบ สาธิดา โพธิ์น้อย

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โบรอนในพืช

Method Validation Boron in Plant

บทคัดย่อ (Abstract)

พัฒนาวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis โดยศึกษาสภาวะของการวิเคราะห์ และศึกษาผลของ Matrix effects ต่อการวิเคราะห์โบรอนในพืช พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์โบรอนด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ได้แก่ Wavelength เท่ากับ 249.772 Axail, RF power เท่ากับ 1.2 kw, Plasma flow เท่ากับ 14.0 LPM, Auxiliary flow เท่ากับ 0.8 LPM, Nebulizer flow เท่ากับ 1.20 LPM, Pump speed เท่ากับ 25 RPM และ Uptake เท่ากับ 25 sec ผลการศึกษา Matrix effects พบว่าความชันของ Standard calibration curve และ Matrix calibration

กรมวิชาการเกษตร

curve ในช่วงความเข้มข้นโบรอน 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความต่างกันน้อยกว่า 10% (%RPD<10) แสดงว่าการทดสอบไม่มี Matrix effects ตามมาตรฐาน Nata ผลการตรวจสอบช่วงของการวิเคราะห์และช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.2 และ 0-1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 0.9999 และ 1.0000 ตามลำดับ ผลการพิสูจน์ความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ได้ค่า HorRat (Horwitz's ratio) เท่ากับ 0.5, 0.7 และ 0.3 ตามลำดับ และการพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจาก %Recovery พบว่า อยู่ในช่วง 85.5 – 90.9 % ทั้งความแม่นยำและความถูกต้อง ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ มีค่าเท่ากับ 0.15 และ 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เวลา และปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการล้างเถ้าตัวอย่าง โดยการประเมินค่าทางสถิติ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ของการเปลี่ยนแปลงทั้งสามสภาวะการทดสอบ ทั้งนี้การวิเคราะห์โบรอนในพืชในช่วงความเข้มข้น 6.75 – 27.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรีตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis เป็นวิธีที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์พืชได้ เพราะเป็นวิธีที่ถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ

Development on boron in plant determination technique using inductively coupled plasma spectrometry (ICP) was conducted by following guidelines from the "Handbook of Methods for Plant Analysis". Its analysis condition and matrix effects were studied. Results showed a suitable condition for boron in plant determination at 249.772 Axial wavelength, 1.2 kW RF power, 14.0 LPM plasma flow, 0.8 LPM Auxiliary flow, 1.2 LPM Nebulizer flow, 25 RPM pump speed, and 25 seconds uptake. The slope of boron standard calibration curve and matrix calibration curve at 0-1.2 mg/L boron concentration range with %RPD lower than 10% indicated that there is no matrix effects according to NATA standard. A working range and a standard curve linearity were also validated. At 0-1.2 and 0-1.4 mg/L, the curve's correlation coefficients (r) are 0.9999 and 1.0000, respectively. Precision of the technique was determined by HorRat values at low, medium, and high boron concentration which are 0.5, 0.7, and 0.3, respectively. These values are acceptable according to AOAC standard. %Recovery range is 85.5 - 90.9 % and is also acceptable by AOAC standard. Limit of detection and limit of quantitation are 0.15 and 6.75 mg/kg, respectively. Ruggedness under different temperature, time, and HCl volume used in washing ashes from sample preparation process, was determined by t-test and found no significant difference in every parameters. Therefore, analysis range is 6.75 – 27.0 mg/kg for determination of boron in plant by ICP technique from the "Handbook of Methods for Plant Analysis" is precise, accurate, reliable, and suitable for use in a laboratory.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

บทนำ (Introduction)

โบรอนเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในต้นพืช และสรีรวิทยาของพืช เช่น การสร้างผนังเซลล์ การสังเคราะห์ลิกนินและเมตาบอลิซึมของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต เมื่อพืชขาดโบรอนจะก่อให้เกิดความผิดปกติของผนังเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญพืช จึงแสดงอาการใบอ่อนหงิกงอ หรือหักเป็นตะขอ ไส้กลวงหรือเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากการตายของเซลล์บริเวณนั้น ผลบิดเบี้ยวเสียรูปทรง พืชที่ขาดโบรอนจะทำให้เกิดการสะสมของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์พืช การขาดโบรอนในพืชตระกูลถั่วทำให้พืชตึงไนโตรเจนน้อยลง การขาดโบรอนมักส่งผลกระทบรุนแรงในระยะเจริญพันธุ์ของพืช พืชที่ขาดโบรอนมักมีดอกที่ไม่สมบูรณ์ เกสรตัวผู้เป็นหมัน ผลมีเมล็ดน้อยกว่าปกติหรือไม่มีเมล็ด เมล็ดลีบ มีอัตราการงอกต่ำ (สมศักดิ์ มณีพงศ์, 2537)

การวิเคราะห์เนื้อเยื่อของพืช ช่วยให้ทราบถึงการขาดธาตุและความเป็นพิษของธาตุในพืชนั้นได้ ซึ่งมีการวิเคราะห์หลายเทคนิคที่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุต่างๆที่มีในเนื้อเยื่อพืชได้ อาทิเช่น เทคนิค Atomic absorption spectrometry (AAS) เทคนิค inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) เทคนิค inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) และเทคนิค flame atomic absorption spectrometry (FASS) เป็นต้น (Bhandari, 2018)

การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนในพืชสามารถทำโดยการเผาที่อุณหภูมิสูง (High temperature dry oxidation of the organic matter) และทำการละลายเถ้าด้วยกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Atomic absorption spectrometry (AAS) หรือ เทคนิค Inductively coupled plasma spectrometry (ICP-AES) (Bhandari, 2018)

ปัจจุบันการวิเคราะห์โบรอนในพืชของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร เป็นวิธี Azomethine-H ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สารเคมีปริมาณมาก และใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โบรอนในพืช เป็นเทคนิค Inductively coupled plasma spectrometry ซึ่งเป็นวิธีที่มีสภาพไวสูง รวดเร็ว ใช้สารเคมีปริมาณน้อยและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยได้ศึกษาสภาวะการวิเคราะห์ของวิธี และสภาวะที่เหมาะสมของการใช้งานเครื่อง Inductively coupled plasma spectrometer สำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช นอกจากนี้ได้ศึกษา Matrix effects พบว่าวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค inductively coupled plasma spectrometry ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis ไม่มี Matrix effects แสดงให้เห็นว่า สารและธาตุอื่นๆ ในตัวอย่างพืชไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณโบรอน

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. ศึกษาสภาวะของเครื่อง Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICP) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช ได้แก่ Wavelength, RF Power, Plasma flow, Auxiliary flow, Nebulizer flow, Pump speed และ Uptake

สำนักวิทยบริการฯ

1.1 พิจารณาค่าความเข้มแสง (Intensity) และค่า Correlation coefficient ของกราฟมาตรฐานสำหรับสารละลายมาตรฐานโบรอนช่วงความเข้มข้น 0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis (Gupta. U.C., 1998)

1.2 หาค่าความถูกต้อง ของการวิเคราะห์ CRMs ; NIST-1547

นำผลวิเคราะห์มาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจากค่า %Recovery จากสมการ

%Recovery = (C1 / C2) x 100

C1 = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

C2 = ความเข้มข้นของสารที่ทราบค่า, 29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 % (AOAC, 2016)

1.3 เลือก Wavelength, RF Power, Plasma flow, Auxiliary flow, Nebulizer flow, Pump speed และ Uptake ที่ทำให้ได้ค่าความเข้มแสง (Intensity) ของโบรอนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าสูงที่สุด ค่า Correlation coefficient, r ≥ 0.995 และผลการพิสูจน์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ CRMs ต้องผ่านเกณฑ์กำหนด

2. ศึกษาการรบกวนของธาตุและสารอื่นๆ ต่อผลการวิเคราะห์โบรอนในพืช โดยการทดสอบ Matrix Effects

2.1 สร้าง Standard calibration curve

2.2 สร้าง Matrix calibration curve

2.3 พิจารณาความชันของ Standard calibration curve เทียบกับ Matrix calibration curve ถ้าพบว่าผลต่างของค่าความชัน หรือ %RPD น้อยกว่า 10% แสดงว่าไม่มี Matrix effects (Nata, 2018)

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis

3.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Linearity)

นำสารละลายมาตรฐานโบรอน ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มาวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICP) โดยเลือกความยาวคลื่นเท่ากับ 249.772 nm (axial) และสภาวะอื่นๆที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์โบรอน นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของโบรอน (แกน x) และค่าความเข้มแสง (Intensity) (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยต้องมีค่า Correlation coefficient, r ≥ 0.995 และ นำช่วงที่ได้มาศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Range)

3.2 หาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Range)

เลือกช่วงที่เป็นเส้นตรงจากการศึกษา Linearity โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มา

กรมวิชาการเกษตร

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของโบรอน (แกน x) และค่าความเข้มแสง (Intensity) (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง ต้องมีค่า Correlation coefficient, $r \geq 0.995$

3.3 พิสูจน์ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง นำผลวิเคราะห์ที่ได้จากการหาค่าความเข้มแสง (Intensity) คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่า $\%RSD_r$ ค่า Predicted Horwitz RSD และพิสูจน์ความแม่น โดยประเมินจากค่า HorRat (Horwitz's Ratio) ดังสมการ

$$\text{HorRat} = \%RSD_r / \text{Predicted Horwitz RSD}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

เกณฑ์การยอมรับ HorRat 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

3.4 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ของวิธีวิเคราะห์นำผลวิเคราะห์มาพิสูจน์ความถูกต้องโดยประเมินจากค่า %Recovery ดังสมการ

$$\text{Total \% recovery} = 100(C_f)/(C_u + C_A)$$

C_f = ความเข้มข้นของสารใน fortified samples

C_u = ความเข้มข้นของ Unfortified samples

C_A = ความเข้มข้นของ Analyte ที่เติม

เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 % (AOAC, 2016)

3.5 หาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) จากนั้น พิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่า S'_0 เพื่อหาค่า LOD และค่า LOQ ดังสมการ

$$LOD = 3S'_0$$

$$LOQ = 10\ S'_0$$

พิสูจน์ความแม่นยำและความถูกต้อง ในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

- วิเคราะห์ความเข้มข้นของโบรอน จากการ Spiked sample ที่ระดับ LOQ
- นำผลวิเคราะห์ที่ได้ คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่า $\%RSD_r$ ค่า Predicted Horwitz RSD และพิสูจน์ความแม่นยำ โดยประเมินจากค่า HorRat (Horwitz's Ratio) ดังสมการ
- นำผลวิเคราะห์มาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจากค่า %Recovery

3.6 ศึกษาความคงทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

หาความคงทนของวิธีวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อย ดังตารางที่ 1

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยสำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช

สภาวะการทดลอง	วิธีการวิเคราะห์ตาม Handbook of Reference Methods for Plant Analysis	วิธีการวิเคราะห์เมื่อเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย
สภาวะที่ 1	เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500˚ c 4 hr.	เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500˚ c 3.5 hr.
สภาวะที่ 2	เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500˚ c 4 hr.	เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 498˚ c 4 hr.
สภาวะที่ 3	- เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500˚ c 4 hr. - ล้างเถ้าด้วย 20%HCl ปริมาตร 5 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 ml	- เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500˚ c 4 hr. - ล้างเถ้าด้วย 20%HCl ปริมาตร 4.98 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 ml

3.6.1 ทดสอบการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลองที่ 1 -3 โดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโบรอนจากการ Spiked sample ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดลองละ 10 ซ้ำ

3.6.2 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ของแต่ละการทดลอง มาทดสอบความแตกต่างของความแปรปรวน (F-test) และใช้สถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระจากกัน t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลของการศึกษาสภาวะของเครื่อง Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICP) ที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช โดยทำการเลือก Wavelength, RF Power, Plasma flow, Auxiliary flow, Nebulizer flow, Pump, Uptake ที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาจากค่า r^2 ของกราฟมาตรฐาน, ความเข้มแสง (Intensity) ของโบรอนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า %Recovery จากการวิเคราะห์ CRMs พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์โบรอน คือ Wavelength ที่ 249.772 nm (axail), RF Power เท่ากับ 1.2 kw, Plasma flow เท่ากับ 14.0 LP, Auxiliary flow เท่ากับ 0.8 LPM, Nebulizer flow เท่ากับ 1.20 LPM, Pump เท่ากับ 25 RPM, Uptake เท่ากับ 25 sec (ตารางที่ 2) ซึ่งพบค่า r^2 ของกราฟมาตรฐานโบรอน เท่ากับ 0.99992 และ ค่า Intensity ของโบรอนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าIntensity มากที่สุด เมื่อเทียบกับการวัดค่าที่ความยาวคลื่นอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 1,827,244 และพบว่าค่า %Recovery ของการวิเคราะห์ CRMs มีค่าเท่ากับ 97.2 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด (80-110%)

2. ศึกษาการรบกวนของธาตุและสารอื่นๆ ต่อผลการวิเคราะห์โบรอนในพืช โดยการทดสอบ Matrix Effects ผลการทดสอบ Matrix effects จากภาพที่ 1 พบว่า ความชันของ Standard calibration curve เทียบกับ Matrix calibration curve มีค่าความต่าง หรือ %RPD เท่ากับ 2.13% ซึ่ง

ศรีวิชาการเกษตร

ความชันต่างกันไม่เกิน 10% แสดงว่า ไม่มี Matrix effects หรือไม่มีการรบกวนของธาตุ และสารอื่นๆต่อการวิเคราะห์โบรอนในช่วง 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis (Gupta. U.C., 1998)

3.1 การศึกษา Linearity ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ความเข้มข้นโบรอนอยู่ในช่วง 0-1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 1.0000 พบว่า ค่า Correlation coefficient, r ≥ 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ในช่วงความเข้มข้นของโบรอน 0-1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 การศึกษา Range ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชความเข้มข้นโบรอนอยู่ในช่วง 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 0.9999 พบว่า ค่า Correlation coefficient, r ≥ 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ในช่วงความเข้มข้นของโบรอน 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3 พิสูจน์ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ประเมินจากค่า HorRat พบว่า ค่า HorRat ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 0.5 , 0.7 และ 0.3 ตามลำดับ พบว่าค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าการวิเคราะห์โบรอนในพืชตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis มีความแม่นยำ

3.4 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ประเมินจากค่า %Recovery พบว่า ค่า %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 90.9, 90.2 และ 85.5 % ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 80 - 110 % ซึ่งการวิเคราะห์ Trueness ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่า การวิเคราะห์โบรอนในพืชตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis มีความถูกต้อง

3.5 การหาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) และการพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

ผลการวิเคราะห์ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

$LOD = 3S'_0 = 3 \times 0.05 = 0.15$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

$LOQ = 10S'_0 = 10 \times 0.05 = 0.50$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

พิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นโบรอน 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้จึงได้พิสูจน์ LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถพบในตัวอย่างพืช ผลการพิสูจน์ LOQ ด้วยการ Spiked sample ที่ความเข้มข้น 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 90.9 % ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 %) และ ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.5 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ HorRat 0.3-1.3)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3.6 ทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะเดิม ผลการวิเคราะห์หาความคงทนของวิธี พิจารณาจากค่าทางสถิติ t-test โดยเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะ สภาวะที่ 1, 2 และ 3 (ตารางที่ 3) พบว่าทั้งสามสภาวะมี ค่า $t_{cal} < t_{crit}$ ดังนั้นสรุปได้ว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลองจากเดิมเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็น เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง และ เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 498 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์โบรอนในพืช นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารละลาย 20% HCl ที่ใช้ล้างเถ้าตัวอย่าง จาก 5 เป็น 4.98 มิลลิลิตร พบว่า ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์โบรอนในพืชเช่นเดียวกัน

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ตามวิธี Handbook of Reference Methods for Plant Analysis พบค่าสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์โบรอนด้วยเทคนิค ICP และพบว่าวิธีดังกล่าว ไม่มี matrix effects ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า Linearity และ Range อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.4 และ 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า r เท่ากับ 1.0000 และ 0.9999 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ $r \geq 0.995$ ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) และความถูกต้อง (Trueness) ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และ สูง ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.5, 0.7 และ 0.3 ตามลำดับ พบค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ และได้ค่า %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 90.9, 90.2 และ 85.5 % ตามลำดับ พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับซึ่งอยู่ในช่วง 80 - 110 % และ ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOQ เท่ากับ 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับผลการทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ t-test ของการทดสอบ 3 สภาวะ ดังนี้ สภาวะที่ 1 เมื่อเปลี่ยนแปลงการทดสอบจากการเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็น เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง สภาวะที่ 2 จากเดิมเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็นเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 498 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และสภาวะที่ 3 การล้างเถ้าหลังการเผาตัวอย่างด้วย 20%HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็น ล้างเถ้าด้วย 20%HCl ปริมาตร 4.98 มิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ t-test ของการทดสอบ พบว่าการเปลี่ยนแปลงทั้งสามสภาวะมีค่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงได้ว่าการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชช่วงความเข้มข้น 6.75 – 27.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of Reference Methods for Plant Analysis เป็นวิธีที่เหมาะสม มีความแม่นยำ ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และยอมรับได้

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation on Analysis of phosphorus analyzes in soil with Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer

พจมาลย์ ภู่สาร จรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์ สุภา โพธิจันทร์ สงกรานต์ มะลิสอน
ญาณธิชา จิตต์สะอาด จิตติรัตน์ ชูชาติ

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน
Method Validation Available phosphorus in soil

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี เป็นการพัฒนา ปรับปรุงโดยการการใช้เครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ได้สภาวะของเครื่อง ICP ที่ใช้ในการวัดฟอสฟอรัส ใช้ค่า wavelength ที่ 214.914 plasma view ใช้มุมมอง radial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 16 ลิตรต่อนาที, 0.80 ลิตรต่อนาที, 1.20 ลิตรต่อนาที, 1.300 กิโลวัตต์, 25 รอบต่อนาที และ 25 วินาที ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) 3 พารามิเตอร์ คือ น้ำหนักตัวอย่าง เวลาในการสกัด และปริมาณน้ำยาสกัด ความเป็นกรดด่าง โดยน้ำหนักตัวอย่างเปลี่ยนจาก 1.25 กรัม เป็น 1.20 กรัม เวลาในการสกัดจาก 30 นาที เป็น 28 นาที และปริมาณน้ำยาสกัดจาก 25 มิลลิลิตร เป็น 23 มิลลิลิตร มี % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด 80 - 110 % ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง พบว่าไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ประเมินค่า correlation coefficient; r ของ Linearity เท่ากับ 0.9997 ของ range เท่ากับ 0.9998 ประเมินหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 2.6545 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 8.8484 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) มี % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด 80 - 110 % ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง ตามที่มาตรฐานกำหนด มีความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์กำหนด โดยมีค่า HorRat < 1.3

Development and Method Validation on Analysis of phosphorus analyzes in soil with Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer was developed in order to fit for purpose by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer. The condition of the ICP used to measure phosphorus was obtained using a wavelength at 214.914. plasma view uses radial view, plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow and Uptake uses 16 liters per minute, 0.80 liters per minute, 1.20 liters per minute, 1.300 kW, 25 rpm และ 25 seconds. Verify the durability of the test method by changing the condition only slightly from the normal condition (Ruggedness). 3 parameters are sample weight, extraction time and volume of extraction solution. The sample weight was changed from 1.25 g to 1.20 g, the extraction time from 30 min to 28 min. and the volume of extraction from 25 ml to 23 ml. with each parameter 3 iterations were found. Ruggedness with % Recovery passed the criteria 80 - 110 % at low, medium and high concentrations as specified by the standard, there was no effect from the change environment conditions. Estimate the correlation coefficient; r of Linearity is 9997 of range is 0.9998. Limit of Detection (LOD) was 2.6545 mg/kg and Limit of Quantitative (LOQ) was 8.8484 mg/kg.Trueness with % Recovery passed the criteria 80 - 110 % at low,

กรมวิชาการเกษตร

medium and high concentrations as specified by the standard, with precision passed the criteria, with HorRat values <1.3 for all analyzes at low, medium and high concentrations.

บทนำ (Introduction)

ฟอสฟอรัส (Phosphorus) เป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการมากธาตุหนึ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในดินมีปัจจัยต่าง ๆ ควบคุม เช่น ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน , ชนิดของแร่ดินเหนียว เป็นต้น ปริมาณของฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้โดยการสกัดดินด้วยน้ำยาต่างๆ เป็นค่าของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ค่านี้จะมีประโยชน์ต่อเมื่อทดลองแล้วว่ามี correlation กับการตอบสนองของพืช วิธีที่ใช้น้ำยาสกัดที่นิยมในปัจจุบัน Bray II (Bray and Kurtz, 1945) ระดับปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืช (P.A.) ดังนั้นวิธีการในการทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และความรวดเร็วในการวิเคราะห์ ช่วยให้การประเมินความต้องการธาตุอาหารของพืช และปริมาณธาตุอาหารที่มีจากแหล่งต่างๆ มีประสิทธิภาพมากขึ้น เกษตรกรสามารถนำผลวิเคราะห์นั้นไปใช้กับพืชได้อย่างถูกต้องทันต่อฤดูกาลเพาะปลูก และตรงกับความต้องการของพืชอย่างแท้จริง ห้องปฏิบัติการจึงปรับปรุงและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ทันสมัย โดยนำเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) มาใช้ จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ว่าเหมาะสมหรือไม่

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectro photometer) ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน เช่น Wavelenght, Sampleflowrate, Neubilizerflowrate, Plasma flow rate และ plasma scanning เป็นต้น
2. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) โดยเปลี่ยนแปลง น้ำหนัก ปริมาตรน้ำยาสกัด และเวลาเขย่า
3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดินที่สกัดด้วยวิธี Olsen และวัดปริมาณโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopic ดังนี้

3.1. Linearity / range ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และปริมาณความเข้มข้นของฟอสฟอรัส ($r \geq 0.995$)

3.2. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า SD- standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีฟอสฟอรัสปริมาณน้อย จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = \overline{X} + 3SD$$

$$LOQ = \overline{X} + 10SD$$

กรมวิชาการเกษตร

3.4 หาค่า Trueness และ precision ที่ระดับความเข้มข้นต่ำชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย เติม CRM GB 02 ได้ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (ต่ำ) ที่ระดับความเข้มข้นกลาง (45 mg/kg) โดยใช้ CRM GB 02 ที่ระดับความเข้มข้นสูง (90 mg/kg) โดยใช้ CRM GBW07417a ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบฟอสฟอรัส โดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ และต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery และ HorRat 0.3 - 1.3 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016)

การคำนวณ % Recovery จากสูตร

- กรณีมีการ Spiked sample

$$\%Recovery = \frac{(\text{ความเข้มข้นของ Spiked sample} - \text{ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้น})}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}} \times 100$$

- กรณีการวิเคราะห์ CRM

$$\%Recovery = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

การคำนวณ Precision

$$HorRat = \frac{RSD}{PRSD\ (R)}$$

โดยที่ $RSD = \frac{SD \times 100}{Mean}$

$PRSD\ (R) = 2C^{-0.15}$

เมื่อ C (mass fraction) ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบ x 10^{-6} เมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l)

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ศรีวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน ได้สภาวะของเครื่อง ICP ที่ใช้ในการวัดฟอสฟอรัส ใช้ค่า wavelength ที่ 214.914 plasma view ใช้มุมมอง radial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 16 ลิตรต่อนาที, 0.80 ลิตรต่อนาที, 1.20 ลิตรต่อนาที, 1.300 กิโลวัตต์, 25 รอบต่อนาที และ 25 วินาที

2. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) โดยเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง น้ำหนัก ปริมาตรน้ำยาสกัด และเวลาเขย่า

ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) 3 พารามิเตอร์ คือ น้ำหนักตัวอย่าง (T1) เวลาในการสกัด (T2) และปริมาณน้ำยาสกัด (T3) โดยน้ำหนักตัวอย่างเปลี่ยนจาก 1.25 กรัม เป็น 1.20 กรัม เวลาในการสกัดจาก 30 นาที เป็น 28 นาที และ

ปริมาณน้ำยาสกัดจาก 25 มิลลิลิตร เป็น 23 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่ำชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย เติม CRM GB 02 ได้ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (ต่ำ) ที่ระดับความเข้มข้นกลาง (45 mg/kg) โดยใช้ CRM GB 02 ที่ระดับความเข้มข้นสูง (90 mg/kg) โดยใช้ CRM GBW07417a โดยแต่ละพารามิเตอร์ทำ 10 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหา % Recovery ผลการทดสอบความคงทนของวิธีที่ความเข้มข้นต่ำพบว่า การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวอย่าง (T1) เวลาในการสกัด (T2) และปริมาณน้ำยาสกัด (T3) ให้ผลการทดสอบ % Recovery เท่ากับ

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดินที่สกัดด้วยวิธี Olsen และวัดปริมาณโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopic ดังนี้

3.1 Linearity / range ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานฟอสเฟตที่ทราบความเข้มข้น 12 ความเข้มข้นคือ 0, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ของ Linearity เท่ากับ 0.9997 ของ range เท่ากับ 0.9998 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ < 0.995

3.2 หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า SD- standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีฟอสฟอรัสปริมาณน้อย จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีฟอสฟอรัสปริมาณน้อย จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาค่า X และ SD ของ P (mg/kg) ผลการวิเคราะห์ พบว่ามีเฉลี่ย = 2.1423, SD = 0.8848 , LOD = 2.6545 , LOQ (Predict) = 8.8484 สรุปได้ว่า P (mg/kg) ต่ำสุดที่สามารถวัดได้ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คือ 2.6545 mg/kg และ P (mg/kg) ที่สามารถนำมารายงานผลได้ต้องไม่ต่ำกว่า 8.8484 mg/kg

กรมวิชาการเกษตร

3.3 หาค่า Trueness และ precision ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง

หาค่า Trueness ที่ระดับความเข้มข้นต่ำชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย เติม CRM GB 02 ได้ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (ต่ำ) ที่ระดับความเข้มข้นกลาง (45 mg/kg) โดยใช้ CRM GB 02 ที่ระดับความเข้มข้นสูง (90 mg/kg) โดยใช้ CRM GBW07417a ให้ผลการวิเคราะห์ พบว่า % Recovery ของการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 98.27, 93.49 และ 102.14 % ตามลำดับ ค่า HorRat ของการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชในดิน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 1.04, 0.80 และ 0.69 ผ่านเกณฑ์ยอมรับ %recovery ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง = 80-110 % และ Precision (เกณฑ์ยอมรับ < 1.3)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ได้สภาวะของเครื่อง ICP ที่ใช้ในการวัดฟอสฟอรัส ใช้ค่า wavelength ที่ 214.914 plasma view ใช้มุมมอง radial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 16 ลิตรต่อนาที, 0.80 ลิตรต่อนาที, 1.20 ลิตรต่อนาที, 1.300 กิโลวัตต์, 25 รอบต่อนาที และ 25 วินาที

ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) 3 พารามิเตอร์ คือ น้ำหนักตัวอย่าง เวลาในการสกัด ปริมาณน้ำยาสกัด และความเป็นกรดด่าง โดยน้ำหนักตัวอย่างเปลี่ยนจาก 1.25 กรัม เป็น 1.20 กรัม เวลาในการสกัดจาก 30 นาที เป็น 28 นาที และปริมาณน้ำยาสกัดจาก 25 มิลลิลิตร เป็น 23 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่ำชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย เติม CRM GB 02 ได้ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (ต่ำ) ที่ระดับความเข้มข้นกลาง (45 mg/kg) โดยใช้ CRM GB 02 ที่ระดับความเข้มข้นสูง (90 mg/kg) โดยใช้ CRM GBW07417a โดยแต่ละพารามิเตอร์ทำ 10 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหา % Recovery พบว่า เกณฑ์ยอมรับ %recovery ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง = 80-110 % แสดงว่า ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีค่า correlation coefficient; r ของ Linearity เท่ากับ 0.9997 ของ range เท่ากับ 0.9998 ประเมินหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 2.6545 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 8.8484 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) มี % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด 80 - 110 % ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง ตามที่มาตรฐานกำหนด มีความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์กำหนด โดยมีค่า HorRat < 1.3

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Method Validation and Development of Exchangeable Potassium Sodium Calcium and Magnesium in Soil by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer

สุภา โพธิจันทร์ ญาณธิชา จิตต์สะอาด สงกรานต์ มะลิสอน
จิตติรัตน์ ชูชาติ พจมาลย์ ภู่สาร กัญฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน

Method Validation Exchangeable Potassium Sodium Calcium and Magnesium in Soil

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มเทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่เป็นทางเลือก ในรายการทดสอบ K, Na, Ca และ Mg ในดิน ที่มีความแม่น เที่ยงตรง รวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับ โดยหาสภาวะเครื่องมือ หาเวลาการสกัดตัวอย่างดินที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ในครั้งเดียว และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า เวลาในการสกัดที่เหมาะสมคือ 30 นาที จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP พบว่า ปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานผลได้อยู่ในระดับ 15.50, 18.01, 14.82 และ 17.40 ppm สำหรับ K, Na, Ca และ Mg ตามลำดับ มีค่า correlation coefficient (r) ที่แสดงความเป็นเส้นตรงของ Linearity range และ Working range ผ่านเกณฑ์กำหนด การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) มี % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด 80 - 110 %, 90 - 107 % และ 95-105% ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง ตามที่มาตรฐานกำหนด มีความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์กำหนด โดยมีค่า HorRat < 1.3 ทุกรายการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง และจากการทดสอบ Ruggedness โดยการวางแผนการทดลอง 7 ตัวแปร 8 การทดลอง โดยใช้ Youden-Steiner testing พบว่า ในขั้นตอนการวิเคราะห์ไม่สามารถเปลี่ยนแปลง pH น้ำยาสกัดได้ ควรกรองตัวอย่างจนแห้ง และควรวัดตัวอย่างภายใน 1 วัน สรุปว่าในการวิเคราะห์ โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน โดยใช้เครื่อง ICP ความแม่น แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล

Method validation and development of exchangeable potassium sodium calcium and magnesium in soil by inductively coupled plasma emission spectrophotometer was intended to enhance optional analytical techniques for soils K, Na, Ca and Mg test items that are accurate, precise, fast and acceptable. Finding the condition of ICP, the extraction time for single analysis of K, Na, Ca and Mg and method validation. It was found that the optimum extraction time was 30 min. The LOQ values were at levels 15.50, 18.01, 14.82 and 17.40 ppm for K, Na, Ca and Mg respectively, with a correlation coefficient (r) indicating the linearity of the Linearity range and the working range passed the criteria. Trueness with % Recovery passed the criteria 80 - 110 %, 90 - 107% and 95-105% at low, medium and high concentrations as specified by the standard, with

กรมวิทยาศาสตร์

precision passed the criteria, with HorRat values < 1.3 for all analyzes at low, medium and high concentrations. The Ruggedness test by planning 7 variable and 8 experiments using the Youden-Steiner testing, it was found that the extract pH cannot be changed in the analysis process. The sample should be filtered until dry. The samples should be measured within 1 day. In conclusion, exchangeable potassium, sodium, calcium and magnesium in the soil analysis by using ICP, the accuracy, accuracy, reliability and traceability of the results ensure confidence in the analysis results. and is accepted according to international standards.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ (Introduction)

การวิเคราะห์ดิน เป็นวิธีที่ทำให้ทราบถึงความอุดมสมบูรณ์ดิน เพื่อลดการใช้ปัจจัยการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งลดการใช้ปุ๋ยเคมี หรือการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีประสิทธิภาพตามความอุดมสมบูรณ์ ลดการปนเปื้อนของปุ๋ยสู่สิ่งแวดล้อม การวิเคราะห์ดินประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักคือ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน จะเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดดินด้วยน้ำยาสกัดที่สามารถแลกเปลี่ยน K, Na, Ca และ Mg ไอออนในดินได้ ซึ่งน้ำยาสกัดที่ใช้กันทั่วไป คือ 1N NH_4OAc จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง Flame photometer สำหรับ K และ Na และ Atomic adsorption spectrophotometer สำหรับ Ca และ Mg ซึ่งทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์เนื่องจากเครื่องไม่สามารถวัดได้ทั้ง 4 ธาตุในเวลาเดียวกัน ดังนั้น จึงควรปรับปรุง และพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ทันสมัยความแม่น แม่นยำ รวดเร็ว ประหยัด จึงได้นำเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) มาใช้ โดยอาศัยหลักการที่ทำให้สารที่วิเคราะห์เปลี่ยนสถานะจากสถานะพื้นไปยังสถานะกระตุ้นด้วยกระบวนการที่เหมาะสม ทำให้อะตอมของสารนั้นสามารถเปล่งแสงออกมาในช่วงยูวีวิสิเบิล และมีลักษณะเฉพาะตัว (แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2534) และเนื่องจากเครื่องมือนี้สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายธาตุ ทำให้ประหยัด รวดเร็วในการวิเคราะห์ แต่ในการที่จะนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้ จำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการวิเคราะห์ เพื่อหาสภาวะที่ถูกต้องในการใช้เครื่องมือ เปรียบเทียบความสามารถระหว่างวิธีวิเคราะห์ใหม่กับวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยพิสูจน์ความแม่น (Trueness) ความเที่ยง (Precision) ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (Range, Linearity) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัด (Limit of detection ; LOD) และรายงานผลได้ (Limit of Quantitation ; LOQ) เพื่อให้มั่นใจในความแม่น เที่ยงตรง และเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg
    1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน K, Na, Ca และ Mg นำสารละลายมาตรฐานไปวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer (ICP-OES)
    1.2 ทำการปรับสภาวะของเครื่อง ได้แก่ wavelength plasma view ใช้มุมมอง Radial ค่า plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump flow และ Uptake
    1.3 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับสัญญาณของเครื่องมือ และเลือกสภาวะที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ที่สูงที่สุด
2. หาเวลาการสกัดตัวอย่างดินที่เหมาะสม สำหรับวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ในครั้งเดียว

    สกัดดินด้วย 1N NH_4OAc อัตราส่วน ดินต่อน้ำยาสกัด (1:10) ที่เวลา 5, 15 และ 30 นาที วิเคราะห์หา K, Na, Ca และ Mg ด้วยเครื่อง ICP โดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 1 พิจารณาวิธีการสกัดที่เหมาะสมโดยใช้สถิติ ANOVA

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3. ศึกษาการรบกวนกันของธาตุ K, Na, Ca และ Mg ในการวัดด้วยเครื่อง ICP ในเวลาเดียวกัน ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน K, Na, Ca และ Mg จำนวน 8 ความเข้มข้น เติมลงตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน S-004 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ตัวอย่างละ 1 ความเข้มข้น

3.2 สกัดดินตามวิธีการในข้อ (2) และนำไปวัดหาปริมาณ K, Na, Ca และ Mg ด้วยเครื่อง ICP

3.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างความชันของกราฟสารละลายมาตรฐาน และกราฟสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างดิน (%RPD) และคำนวณค่า % recovery

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น

4.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity)

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน K, Na และ Mg ที่ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ppm Ca ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ppm ใน 1N NH_4OAc เติมลงในตัวอย่างดินที่มี K, Na, Ca และ Mg ปริมาณน้อย (sample blank) นำไปสกัดตามวิธีการในข้อ (2)

4.1.2 นำไปวัดหาปริมาณ K, Na, Ca และ Mg ด้วยเครื่อง ICP

4.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้น หาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง คำนวณหาค่า Correlation Coefficient (r) เพื่อหา linearity

4.2 การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (working range)

4.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน K, Na และ Mg ที่ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm Ca ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppm ใน 1N NH_4OAc เติมลงในตัวอย่างดินที่มี K, Na, Ca และ Mg ปริมาณน้อย (sample blank) นำไปสกัดตามวิธีการในข้อ (2)

4.2.2 นำไปวัดหาปริมาณ K, Na, Ca และ Mg ด้วยเครื่อง ICP

4.2.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้น หาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง คำนวณหาค่า Correlation Coefficient (r) เพื่อหา working range

4.3 การศึกษาขีดจำกัดในการตรวจพบ Limit of Detection (LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

นำตัวอย่างดินที่มี K, Na, Ca และ Mg ปริมาณน้อย (sample blank) ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์และวัดด้วยเครื่อง ICP-OES โดยทำการวิเคราะห์ต่างวัน จำนวน 10 วัน คำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) หาค่า LOD และ LOQ จากสมการ

$$LOD = 3SD$$

$$LOQ = 10SD$$

4.4 หาค่า Trueness และ precision ของวิธีวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

พิสูจน์หาค่า Trueness และ precision ที่ความเข้มข้นต่ำ ปานกลาง และสูง ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ (ทำการวิเคราะห์ที่เวลาต่างวัน วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน) โดยความเข้มข้นต่ำวิเคราะห์ sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น ที่ระดับ LOQ และ 200 ppm สำหรับความเข้มข้นต่ำและปานกลางตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นสูงวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน (S-003) ที่ผ่านโปรแกรมการทดสอบความชำนาญแล้ว ประเมินผลการทดสอบ และคำนวณทางสถิติ จาก % Recovery และ HorRat < 1.3 โดยใช้เกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน (AOAC, 2016)

4.4.1 การคำนวณ % Recovery จากสูตร

- กรณี fortified sample

$$\%\ \text{Total recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ fortified sample x 100}}{\text{ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้น} + \text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

- กรณีการวิเคราะห์ CRM/IRM

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} x\ 100$$

4.4.2 การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (r)} = \frac{RSD\ (r)}{PRSD\ (R)}$$

โดยที่ $$\text{RSD (r)} = \frac{SD}{mean} x\ 100$$

$$\text{PRSD (R)} = 2C^{-0.15}$$

4.5 ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ

4.5.1 ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภาวะแวดล้อม ด้วยการทดสอบ Ruggedness โดยการวางแผนการทดลอง 7 ตัวแปร 8 การทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน S-004, S-003 และ 0763 ซึ่งมีค่าวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ต่ำ ปานกลาง และสูง ตามลำดับ

- ตัวแปรที่ 1 ความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของน้ำยาสกัด
- ตัวแปรที่ 2 น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
- ตัวแปรที่ 3 ปริมาตรน้ำยาสกัด (มิลลิลิตร)
- ตัวแปรที่ 4 ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)
- ตัวแปรที่ 5 ระยะเวลาก่อนกรอง
- ตัวแปรที่ 6 เวลาในการกรอง
- ตัวแปรที่ 7 เวลารอวัด

4.5.2 วางแผนการทดลอง (Youden WT, 1975)

4.5.3 ดำเนินการวิเคราะห์ตามแผนการทดลอง

4.5.4 คำนวณค่าผลกระทบของตัวแปร (E) ของแต่ละตัวแปร 7 ตัวแปร จาก 8 การทดลอง

4.5.5 พิจารณาค่า E ของแต่ละตัวแปร 7 ตัวแปร โดยถ้า

กรมวิชาการเกษตร

| E | > S แสดงว่า มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทด

โดย S = $\sqrt{\left(\frac{2}{7}\right) x \Sigma(E^2)}$

5. วิเคราะห์ ขั้นตอนการวิเคราะห์ที่เปลี่ยนแปลง และความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ สรุปและรายงานผล

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg

ได้สภาวะของเครื่อง ICP ที่ใช้ในการวัด K, Na, Ca และ Mg ในดิน ใช้ค่า wavelength ที่ 766.491, 589.932, 317.933 และ 285.213 นาโนเมตร ตามลำดับ plasma view ใช้มุมมอง radial ส่วน plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump Flow และ Uptake ใช้ที่ 1.60 ลิตรต่อนาที, 0.80 ลิตรต่อนาที, 1.20 ลิตรต่อนาที, 1.400 กิโลวัตต์, 25 รอบต่อนาที และ 20 วินาที ตามลำดับสำหรับทุกธาตุ

2. หาเวลาการสกัดตัวอย่างดินที่เหมาะสม สำหรับวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ในครั้งเดียว

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน S-003 ซึ่งมีปริมาณ K, Na, Ca และ Mg สูง โดยใช้เวลาในการสกัด 5, 15 และ 30 นาที เวลาละ 10 ซ้ำ พบว่า ค่าเฉลี่ยของ K, Na, Ca และ Mg ที่สกัด 30 นาที สูงที่สุดและมี %recovery ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทุกรายการวิเคราะห์ และเมื่อนำผลวิเคราะห์มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้สถิติ ANOVA พบว่า ผลวิเคราะห์ K และ Na มีค่าไม่แตกต่างกัน (Fcal < Fcrit) ส่วนผลวิเคราะห์ Ca และ Mg มีค่าใดค่าหนึ่งแตกต่างกัน (Fcal > Fcrit) (ตารางที่ 3) จึงเลือกเวลา 30 นาทีในการสกัด K, Na, Ca และ Mg ในครั้งเดียว เนื่องจากเป็นเวลาที่ใช้ในการสกัด Ca และ Mg ในวิธีมาตรฐานและมี %recovery ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทุกรายการวิเคราะห์ (95-105%)

3. ศึกษาการรบกวนกันของธาตุ K, Na, Ca และ Mg ในการวัดด้วยเครื่อง ICP ในเวลาเดียวกัน ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

จากการศึกษาการรบกวนกันของ K, Na, Ca และ Mg ในดิน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน K, Na, Ca และMg จำนวน 8 ความเข้มข้น เติมลงตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน S-004 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ตัวอย่างละ 1 ความเข้มข้น ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์ วัดปริมาณด้วยเครื่อง ICP-OES สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่างความชันของกราฟสารละลายมาตรฐาน และกราฟสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างดิน (%RPD) และคำนวณค่า % recovery พบว่า มีค่า % RPD ของ Slope เท่ากับ 0.68, 1.85, 0.48, 3.23 สำหรับ K, Na, Ca และ Mg ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด % RPD ของ Slope < 10% (NATA: 2018)

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

กรมวิชาการเกษตร

4.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity)

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานรายการวิเคราะห์ K, Na และ Mg ที่ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ppm รายการวิเคราะห์ Ca ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ppm ที่เติมตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.9993, 0.9985, 0.9999, 0.9999 ในรายการวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ตามลำดับ

4.2 การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (working range)

จากการศึกษาความเข้มข้นที่ใช้งาน (working range) โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิเคราะห์ K Na และ Mg ที่ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm รายการวิเคราะห์ Ca ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ppm ที่เติมตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.9997, 0.9985, 0.9999, 0.9999 ในรายการวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ตามลำดับ

4.3 การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

จากการหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยการนำตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อยมาดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์และวัดด้วยเครื่อง ICP-OES โดยทำการวิเคราะห์ต่างวัน พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 4.65, 5.40, 4.45 และ 5.22 LOQ เท่ากับ 15.50, 18.01, 14.82 และ 17.40 ในรายการวิเคราะห์ K, Na, Ca และMg ตามลำดับ

4.4 การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

พิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ ปานกลาง และสูง ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น ที่ระดับ LOQ และ 200 ppm สำหรับความเข้มข้นต่ำและปานกลาง ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นสูงวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงภายในชุดดินบางเขน แล้วคำนวณความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) พบว่า Trueness (เกณฑ์ยอมรับ %recovery ความเข้มข้นต่ำ 10 ppm = 80-110% ความเข้มข้นปานกลาง 100 ppm = 90-107% ความเข้มข้นสูง 0.1% = 95-105%) และ Precision (เกณฑ์ยอมรับ 1.3) ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 1, 2 และ 3)

ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ

รายการ	ผลวิเคราะห์ (ppm)			
	K (16 ppm)	Na (18 ppm)	Ca (15 ppm)	Mg (18 ppm)
1	16.5018	18.0642	15.1887	18.1247
2	16.5390	18.2485	15.2632	18.1470
3	16.5498	18.1535	15.2387	18.1934

ศรีวิชาการเกษตร

4	16.4015	18.0739	15.3491	18.0830
5	16.3835	17.9839	15.3628	18.1884
6	16.3237	17.8237	15.2978	18.1749
7	16.3636	18.0620	15.2258	18.1184
ค่าเฉลี่ย	16.4376	18.0585	15.2751	18.1471
SD	0.091	0.133	0.065	0.041
% RSD (r)	0.554	0.736	0.423	0.226
% Total recovery	102.84	100.47	101.62	100.86
HorRat	0.058	0.071	0.040	0.022

ตารางที่ 2 ผลการพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นปานกลาง

รายการ	ผลวิเคราะห์ (ppm)			
	K	Na	Ca	Mg
1	184.9643	185.1104	212.2264	180.4443
2	184.7363	183.7114	202.0184	181.5293
3	186.2833	184.9029	197.4824	181.9378
4	187.9073	185.5129	197.4809	177.5128
5	185.7678	183.5754	194.8814	180.3203
6	183.7143	183.0724	198.7409	182.2198
7	189.1383	186.0334	199.1639	181.3293
ค่าเฉลี่ย	186.0731	184.5598	200.2849	180.7563
SD	1.892	1.111	5.689	1.595
% RSD (r)	1.017	0.602	2.840	0.883
% Total recovery	93.04	92.28	100.14	90.38
HorRat	0.140	0.083	0.396	0.121

ตารางที่ 3 ผลการพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นสูงโดยใช้ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน S-003 (Ca = 3628.04 ppm, Mg = 1761.14 ppm, K = 423.30 ppm, Na = 1111.44 ppm)

รายการ	ผลวิเคราะห์ (ppm)			
	K	Na	Ca	Mg
1	431.56	1036.82	3631.54	1725.73
2	420.20	1042.60	3518.20	1726.26
3	433.64	1059.19	3568.38	1749.24
4	438.25	1098.74	3765.14	1846.20
5	416.22	1069.06	3582.43	1765.48
6	396.72	1054.33	3574.20	1744.80
7	436.84	1081.96	3569.77	1766.18
ค่าเฉลี่ย	424.78	1063.24	3601.38	1760.56

กรมวิชาการเกษตร

SD	14.91	21.85	79.41	41.14
% RSD (r)	3.51	2.055	2.205	2.337
% Total recovery	100.35	95.66	99.27	99.97
HorRat	0.773	0.523	0.475	0.637

4.5 ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ

จากศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภาวะแวดล้อมเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ ด้วยการทดสอบ Ruggedness โดยการวางแผนการทดลอง 7 ตัวแปร 8 การทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้ Youden-Steiner testing (ตารางที่ 4 และตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ตัวแปรที่ใช้ในการทดลองในสภาวะมาตรฐานและสภาวะที่เปลี่ยนแปลง

ตัวแปร	ความหมายของตัวแปร	สภาวะมาตรฐาน (+)	สภาวะที่เปลี่ยนแปลง (-)
A	pH น้ำยาสกัด	7.0	6.8
B	น้ำหนักดิน (กรัม)	2.50	2.55
C	ปริมาตรน้ำยาสกัด (มิลลิลิตร)	25.0	24.5
D	ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)	190	180
E	การกรองตัวอย่าง	กรองทันทีหลังเขย่าเสร็จ	กรองหลังเขย่าเสร็จ 15 นาที
F	เวลาในการกรองตัวอย่าง	กรองจนแห้ง	กรอง 30 นาที
G	เวลารอวัด	1 วัน	3 วัน

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 แผนการทดลองที่ใช้ในการทดสอบ Ruggedness

การทดลองที่	ตัวแปร							ผลการทดลอง
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	+	+	+	+	+	+	Y_1
2	+	+	-	+	-	-	-	Y_2
3	+	-	+	-	+	-	-	Y_3
4	+	-	-	-	-	+	+	Y_4
5	-	+	+	-	-	+	-	Y_5
6	-	+	-	-	+	-	+	Y_6
7	-	-	+	+	-	-	+	Y_7
8	-	-	-	+	+	+	-	Y_8

ได้ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อม ในตัวอย่างดินอ้างอิงภายในชุดดินยโสธร (Yt) ชุดดินบางเขน (Bn) และชุดดินบางเลน (Bl) การทดลองที่ 1-8 การทดลองละ 4 ซ้ำ จากนั้นนำผลการทดสอบมาคำนวณผลกระทบของตัวแปร (E) และค่า S ของการการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ คือ

$E_A = (Y1 + Y2 + Y3 + Y4)/4 - (Y5 + Y6 + Y7 + Y8)/4$

$E_B = (Y1 + Y2 + Y5 + Y6)/4 - (Y3 + Y4 + Y7 + Y8)/4$

$E_C = (Y1 + Y3 + Y5 + Y7)/4 - (Y2 + Y4 + Y6 + Y8)/4$

$E_D = (Y1 + Y2 + Y7 + Y8)/4 - (Y3 + Y4 + Y5 + Y6)/4$

$E_E = (Y1 + Y3 + Y6 + Y8)/4 - (Y2 + Y4 + Y5 + Y7)/4$

$E_F = (Y1 + Y4 + Y5 + Y8)/4 - (Y2 + Y3 + Y6 + Y7)/4$

$E_G = (Y1 + Y4 + Y6 + Y7)/4 - (Y2 + Y3 + Y5 + Y8)/4$

$$S = \sqrt{\left(\frac{2}{7}\right) x \sum(E^2)}$$

โดยใช้เกณฑ์การประเมิน ดังนี้

$|E| <$ S แสดงว่า ไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

ตารางที่ 6 ผลกระทบของตัวแปร (E) และค่า S ของการการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆ ในการทดลองที่ 1-8

Effect	ผลกระทบของตัวแปร (E)											
	K			Na			Ca			Mg		
	S-004	0763	S-003	S-004	0763	S-003	S-004	0763	S-003	S-004	0763	S-003
E_A	3.18	-4.26	-2.33	-3.01	-37.07	-25.57	10.91	332.33	192.58	1.02	51.15	5.01
E_B	1.12	-4.70	-8.88	2.84	18.33	-23.16	-10.47	98.79	-0.39	-3.05	4.98	-25.86
E_C	0.95	-4.53	-7.94	-0.31	17.25	-25.18	10.71	-223.82	101.07	1.96	-41.49	55.46
E_D	0.50	-2.31	3.94	0.59	-30.59	4.83	-4.47	174.84	121.08	-0.86	28.73	35.87
E_E	1.30	1.04	5.46	0.93	-28.30	5.28	15.36	-131.93	187.53	4.10	-15.69	130.90

กรมวิทยาศาสตร์

E_F	-1.83	2.34	-5.71	3.55	30.26	16.96	-14.87	-416.66	-445.56	-4.55	-74.00	-172.45
E_G	-0.70	2.57	-8.83	8.69	-20.83	12.72	-11.75	-374.74	-341.26	-2.86	-59.57	-134.09
S	**2.27**	**4.76**	**9.31**	**5.52**	**38.15**	**25.77**	**16.55**	**389.98**	**343.41**	**4.16**	**64.27**	**141.33**

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เวลาการสกัด 30 นาทีเหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ K, Na, Ca และ Mg ในครั้งเดียว การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP พบว่า ปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานผลได้อยู่ในระดับ 15.50, 18.01, 14.82 และ 17.40 ppm สำหรับ K, Na, Ca และ Mg ตามลำดับ จากการพิสูจน์ความแม่นเที่ยงตรง โดยใช้ ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน พบว่ามี % Recovery และค่า HorRat ผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกรายการทดสอบ การทดสอบความคงทนของวิธี โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะทั้ง 7 ตัวแปร พบว่า การเปลี่ยนแปลง pH น้ำยาสกัดจาก 7.0 เป็น 6.8 มีผลทำให้ผลวิเคราะห์โพแทสเซียมมีค่าเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนระยะเวลารอวัดจาก 1 วัน เป็น 3 วัน มีผลทำให้ผลวิเคราะห์โซเดียมมีค่าเพิ่มขึ้น และการกรองตัวอย่างเพียง 30 นาที มีผลทำให้ผลวิเคราะห์แคลเซียมและแมกนีเซียมลดลง ดังนั้นในขั้นตอนการวิเคราะห์จึงไม่สามารถเปลี่ยนแปลง pH น้ำยาสกัดได้ ควรกรองตัวอย่างจนแห้ง และควรวัดตัวอย่างภายใน 1 วัน สรุปว่าในการวิเคราะห์ โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดิน โดยใช้เครื่อง ICP ความแม่น แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation of Iron Manganese Zinc Copper by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

สงกรานต์ มะลิสอน ญาณธิชา จิตต์สะอาด สุภา โพธิจันทร์ จิตติรัตน์ ชูชาติ
พจมาลย์ ภู่สาร กัญฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดิน
Method Validation Iron Manganese Zinc Copper in soil

บทคัดย่อ (Abstract)

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ซึ่งถือเป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้ทันสมัยด้วยเครื่องมือที่มีสมรรถนะสูง มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายธาตุ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการมีความสะดวก ในการปฏิบัติงาน และการให้บริการได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี ได้หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่าง และพบว่าเทคนิคดังกล่าวไม่มีการรบกวนของธาตุอื่น (matrix effect) ในการวิเคราะห์ โดยมี % RPD ของ Slope สารละลายมาตรฐาน และสารละลายมาตรฐานที่เติมตัวอย่างดิน พร้อมทั้งมี % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ มีค่า LOD เท่ากับ 1.71, 0.51, 0.18, 0.12 mg/l และ LOQ เท่ากับ 5.70, 1.70,

กรมวิทยาศาสตร์

0.60, 0.40 mg/l ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง ตามลำดับ มีค่า correlation coefficient (r) ที่แสดงความเป็นเส้นตรง Linearity range และ Working range ผ่านเกณฑ์กำหนด การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) มี % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด 80 - 110 % และ 90 - 107 % ที่ระดับความเข้มข้นตามที่มาตรฐานกำหนด มีความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์กำหนด โดยมีค่า HorRat ≤1.3 ทุกรายการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง และวัสดุอ้างอิงรับรอง เมื่อนำวิธีวิเคราะห์มาศึกษาความคงทนของวิธี (Ruggedness) 7 ตัวแปร 8 การทดลอง โดยใช้ Youden-Steiner testing พิจารณาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม พบว่าวิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดิน มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง และ pH น้ำยาสกัด จึงไม่สามารถเปลี่ยนแปลงปัจจัยดังกล่าวได้ ทำให้มีความสะดวกรวดเร็วในการให้บริการวิเคราะห์ วิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์โดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำน่าเชื่อถือ สอดคล้องตามมาตรฐานสากล

Development and method validation of iron, manganese, zinc, copper in soil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. This is considered the development of modern analytical methods with high-performance tools. high accuracy can analyze multiple elements simultaneously to make the laboratory convenient in operation and the service is fast and accurate. System Research of Soil and Water Quality Sub-group, Agricultural Chemistry Group Optimal conditions of the ICP-OES were determined for sample analysis. It was found that the technique did not interfere with other elements (matrix effect) in the analysis with %RPD of the standard solution slope. and standard solution spiked soil samples with % Recovery passed the specified criteria verification of the analytical method, the LOD values of 1.71, 0.51, 0.18, 0.12 mg/l and LOQ were 5.70, 1.70, 0.60, 0.40 mg/l in the iron, manganese, zinc, copper, respectively. The correlation coefficient (r) that shows linearity, Linearity range and Working range pass the specified criteria. The proof of accuracy (% Recovery passed the criteria) 80 - 110 % and 90 - 107% at the concentration specified by the standard, the precision (Precision) passed the criteria, with the HorRat value ≤1.3. When studying ruggedness using Youden-Steiner testing, the effects of environmental changes were considered. There is an effect of the shaking speed, stand before filtering and pH of extract solution cannot be changed. Simultaneous analysis without solution dilution or less dilution make it convenient and quick to provide analysis services. Method for analyzing useful iron, manganese, zinc, copper using inductively coupled plasma spectrometry can be used in laboratories accurately and reliably, in accordance with international standards.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ (Introduction)

เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และ ทองแดง จัดเป็นกลุ่มจุลธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่ก็มีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนกว่ากลุ่มธาตุอาหารอื่นๆ เพราะหากไม่เพียงพอต่อความต้องการ หรือมากเกินความต้องการก็จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชได้ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) การวิเคราะห์หาปริมาณจุลธาตุในดินที่ทำการเพาะปลูกจึงเป็นเรื่องสำคัญ กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ วิเคราะห์หาปริมาณเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และ ทองแดงในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ DTPA ที่ pH 7.3 สารละลาย DTPA จะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับ Ca^{2+} เมื่อนำสารละลายมาสกัดตัวอย่างดิน Fe^{3+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} และ Cu^{2+} ที่ละลายอยู่ในดิน จะเข้าไปแทนที่ Ca^{2+} และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ DTPA จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ของธาตุเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และ ทองแดง ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer โดยสามารถวัดได้ทีละธาตุตามลำดับ (กรมวิชาการเกษตร, 2553) ในปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตได้มีการพัฒนาเครื่องมือวัดที่มีสมรรถนะสูง เทคโนโลยี และเทคนิควิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างประเภทต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลง/ปรับปรุง/พัฒนา ให้มีความเหมาะสม ถูกต้อง รวดเร็ว และเป็นทางเลือกใหม่มากขึ้น เครื่อง Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrophotometer (ICP-OES) ก็เป็นอีกเครื่องมือวัดหนึ่งที่สามารถวิเคราะห์ธาตุได้ทีละหลายๆธาตุพร้อมกัน ห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุง/พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้ทันสมัย มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ได้พร้อมกันหลายธาตุ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการมีความสะดวก ในการปฏิบัติงาน และการให้บริการได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง พร้อมทั้งมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ว่าสามารถนำมาใช้งานได้ ถือเป็นกระบวนการในการยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ (Method Performance Characteristics) และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติว่าวิธีมีความถูกต้อง เหมาะสม ตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน (ทิพวรรณ, 2549) อีกทั้งยังเป็นการดำเนินการให้สอดคล้องกับ ISO/IEC 17025: 2017 ที่ถือเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐานสากล และสามารถนำไปจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ได้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ ที่ต้องใช้ในการทดสอบ และจัดหาวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่มีค่า Certified Value และ Uncertainty และตัวอย่างดิน

2. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-OES ในการวิเคราะห์ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดิน

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน เหล็ก และแมงกานีส ความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/l ตามลำดับ สังกะสี และทองแดง ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mg/l

2.2 นำสารละลายมาตรฐานไปวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer (ICP-OES)

2.3 ทำการปรับสภาวะของเครื่อง ได้แก่ wavelength, plasma, view, plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump flow และ Uptake

กรมวิชาการเกษตร

2.4 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับสัญญาณของเครื่องมือ และเลือกสภาวะที่เหมาะสมโดยการพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ที่สูงที่สุด และ %Recovery ของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นกลาง ที่มาจากคนละแหล่ง Lot หรือยี่ห้อ เป็นต้น

3. ศึกษาการรบกวนกันของธาตุ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ในการวัดด้วยเครื่อง ICP-OES ในเวลาเดียวกัน ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

3.1 ชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย 25 กรัม และเติมสารละลายมาตรฐาน เหล็ก และแมงกานีส ความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/l สังกะสี และทองแดง ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mg/l ธาตุละ 7 ความเข้มข้น ตามลำดับ

3.2 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 190 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5

3.3 นำสารละลายใสที่ได้จากการกรองไปวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer (ICP-OES)

3.4 เปรียบเทียบความชัน (Slope) ของกราฟสารละลายมาตรฐาน และกราฟของสารละลายมาตรฐานที่เติมตัวอย่างดิน โดยการคำนวณ %RPD

3.5 คำนวณค่า % Recovery ของสารละลายมาตรฐานที่เติมตัวอย่างดิน เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐาน

4. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดิน

4.1 การหาช่วงใช้งานที่เป็นเส้นตรง (Working range and Linearity range)

4.1.1 ชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย เติมสารมาตรฐานเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ธาตุละ 8 ความเข้มข้น (Linearity range) ธาตุละ 7 ความเข้มข้น (Working range) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์; 2553 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับสัญญาณของเครื่องมือ

4.1.3 ประเมินค่า correlation coefficient; r ($r \geq 0.995$)

4.2 หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

4.2.1 ชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย ดำเนินการวิเคราะห์ตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์; 2553 จำนวนธาตุละ 7 ซ้ำ

4.2.2 คำนวณค่า Standard deviation (SD) ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีเหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดงปริมาณน้อย

4.2.3 คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = 3SD$$

$$LOQ = 10SD$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4.3 หาค่า Trueness และ Precision

4.3.1 ชั่งตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย เติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น LOQ (ต่ำ) ความเข้มข้นกลาง สูง และวัสดุอ้าอิงรับรอง (CRM) จำนวนธาตุละ 7 ซ้ำ (โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาต่างวัน วันละ 1 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน)

4.3.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์; 2553

4.3.3 ประเมินผลการทดสอบ และคำนวณทางสถิติ จาก % Recovery และ HorRat < 1.3 โดยใช้เกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน (AOAC; 2016)

4.3.3.1 การคำนวณ % Recovery จากสูตร

- กรณีมีการ Fortified sample

$$\text{Total \% Recovery} = \frac{100 \times \text{ความเข้มข้นของ fortified sample}}{\text{ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้น + ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}}$$

- กรณีการวิเคราะห์ CRM

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์} \times 100}{\text{ค่าจริง}}$$

4.3.3.2 การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (r)} = \frac{RSD_r}{PRSD\ (R)}$$

โดยที่ $RSD_r = \frac{SD}{Mean} \times 100$

$PRSD\ (R) = 2C^{-0.15}$

เมื่อ C (mass fraction) คือ ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบ x 10^{-6} เมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l)

5. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness)

5.1 ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภาวะแวดล้อม ด้วยการทดสอบ Ruggedness โดยการวางแผนการทดลอง 7 ตัวแปร 8 การทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้ Youden-Steiner testing

- ตัวแปรที่ 1 pH น้ำยาสกัด
- ตัวแปรที่ 2 น้ำหนักตัวอย่าง
- ตัวแปรที่ 3 ปริมาตรน้ำยาสกัด
- ตัวแปรที่ 4 รอบในการเขย่า
- ตัวแปรที่ 5 ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง
- ตัวแปรที่ 6 ระยะเวลาในการกรอง
- ตัวแปรที่ 7 กรวยกรอง

กรมวิชาการเกษตร

5.2 วางแผนการทดลอง

5.3 ดำเนินการวิเคราะห์ตามแผนการทดลอง โดยใช้ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน รหัส S003 รหัส 0763 และ รหัส S004

5.4 คำนวณผลกระทบของตัวแปร (E) ของแต่ละตัวแปร 7 ตัวแปร จาก 8 การทดลอง

5.5 พิจารณาค่า | E | ของแต่ละตัวแปร 7 ตัวแปร โดยถ้า

| E | > S แสดงว่า มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

โดย S = $\sqrt{\frac{2}{7} * \Sigma(E^2)}$

6. สรุปและรายงานผลการทดลอง

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ได้สภาวะของเครื่อง ICP สำหรับการวิเคราะห์ธาตุ เหล็ก สังกะสี แมงกานีส และทองแดง โดยค่า wavelength ที่ 259.940, 257.610, 213.856 และ324.754 นาโนเมตร ตามลำดับ plasma view ใช้มุมมอง Radial, ค่า plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump flow และ Uptake ที่ 18 ลิตรต่อนาที, 0.8 ลิตรต่อนาที, 1.2 ลิตรต่อนาที, 1.400 กิโลวัตต์, 25 รอบต่อนาที และ 25 วินาที ตามลำดับสำหรับทุกรายการวิเคราะห์

2. ผลการศึกษาการรบกวนของการวิเคราะห์ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์ในดิน พบว่า กราฟของสารละลายมาตรฐาน และสารละลายมาตรฐานที่เติมตัวอย่างดิน มีค่า % RPD ของ Slope เท่ากับ 2.53, 3.54, 4.56, 8.35 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด % RPD ของ Slope < 10% (NATA, 2018) และจากการคำนวณค่า % Recovery แต่ละความเข้มข้น 7 ความเข้มข้น ของรายการวิเคราะห์เหล็ก เท่ากับ 99.45, 93.05, 91.25, 99.32, 99.42, 98.30 และ 95.87 รายการแมงกานีส เท่ากับ 96.96, 102.12, 95.39, 93.29, 97.04, 97.03 และ 96.29 รายการสังกะสี เท่ากับ 106.81, 92.71, 96.16, 99.48, 88.85, 90.38, 92.11 รายการทองแดง เท่ากับ 85.40, 92.46, 90.20, 92.09, 87.91, 91.63, 90.89 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด 80 – 110 %ตามมาตรฐาน (AOAC, 2016)

3. การหาช่วงใช้งานที่เป็นเส้นตรง (Working range and Linearity range)

3.1 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity range)

ผลการวัดสารละลายมาตรฐานรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส ที่ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 mg/l ได้ค่า รายการวิเคราะห์ สังกะสี ทองแดง ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 mg/l ที่เติมตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES พบว่ามีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9999, 0.9999, 0.9999, 0.9999 ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (r < 0.995)

กรมวิชาการเกษตร

3.2. จากการศึกษาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Working range)

ผลการวัดสารละลายมาตรฐานรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส ที่ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100 รายการวิเคราะห์ สังกะสี ทองแดง ช่วงความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ที่เติมตัวอย่างดินที่มีสารที่สนใจในปริมาณน้อย แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES พบว่ามีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9999, 0.9998, 0.9998, 0.9999 ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ($r < 0.995$)

3. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 1.71, 0.51, 0.18, 0.12 mg/l และ LOQ เท่ากับ 5.70, 1.70, 0.60, 0.40 mg/l ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง ตามลำดับ ดังแสดงตามตาราง 3

4. พิสูจน์ความแม่น (Trueness) และ และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง และวัสดุอ้าอิงรับรอง (CRM)

- รายการวิเคราะห์เหล็ก และแมงกานีส ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 6 และ 2 mg/l ตามลำดับ ความเข้มข้นความเข้มข้นกลาง 100 mg/l และที่ความเข้มข้นสูง 200 mg/l

- รายการวิเคราะห์สังกะสี และทองแดง ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ 1 mg/l ความเข้มข้นกลาง 7 mg/l และความเข้มข้นสูง 14 mg/l

พบว่า มีค่าความแม่น (Trueness) ที่แสดง % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ 101.95, 81.43, 97.14, 100.96 ความเข้มข้นกลาง 107.63, 100.78, 97.43, 97.66 ความเข้มข้นสูง 99.45, 101.07, 89.35, 93.77 และวัสดุอ้างอิงรับรอง 101.06, 95.20, 99.82, 110.43 ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ % Recovery ความเข้มข้นต่ำ กลาง และวัสดุอ้างอิงรับรอง 80-110 % ความเข้มข้นสูง 90-107 % และ ความเที่ยง (Precision) ที่แสดงโดยค่า HorRat ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.28, 0.21, 0.08, 0.04 ที่ความเข้มข้นกลาง 0.32, 0.05, 0.03, 0.02 ความเข้มข้นสูง 0.43, 0.58, 0.24, 0.23 และวัสดุอ้างอิงรับรอง 0.13, 0.14, 0.38, 0.05 รายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ HorRat ≤ 1.3 (AOAC, 2016)

5. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness)

5.1 จากศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม ด้วยการทดสอบความคงทนของวิธี (Ruggedness) โดยการวางแผนการทดลอง 7 ตัวแปร 8 การทดลอง การทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้ Youden-Steiner testing (ตาราง 1 และ ตาราง 2)

- ตัวแปรที่ 1 ความเป็นกรด–ด่าง (pH) สภาวะการทดสอบปกติ 7.3 สภาวะที่เปลี่ยนแปลง 7.4

- ตัวแปรที่ 2 น้ำหนักตัวอย่าง สภาวะการทดสอบปกติ 25.00 กรัม สภาวะที่เปลี่ยนแปลง 25.05 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

- ตัวแปรที่ 3 ปริมาตรน้ำยาสกัด สภาวะการทดสอบปกติ 50 มิลลิลิตร สภาวะที่เปลี่ยนแปลง 49 มิลลิลิตร

- ตัวแปรที่ 4 ความเร็วรอบในการเขย่า สภาวะการทดสอบปกติ 190 rpm สภาวะที่เปลี่ยนแปลง 180 rpm

- ตัวแปรที่ 5 ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง สภาวะการทดสอบปกติ กรองทันที สภาวะที่เปลี่ยนแปลงตั้งไว้ 15 นาที ก่อนกรอง

- ตัวแปรที่ 6 เวลาในการกรอง สภาวะการทดสอบปกติ กรองทิ้งไว้ข้ามคืน สภาวะที่เปลี่ยนแปลง 3 ชั่วโมง

- ตัวแปรที่ 7 กรวยกรอง สภาวะการทดสอบปกติ แก้ว สภาวะที่เปลี่ยนแปลง พลาสติก

5.2 ผลการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง 8 การทดลอง ตัวอย่างดินอ้างอิงภายในรหัส S003 รหัส 0763 และ รหัส S004 (ตาราง 3) และผลกระทบของตัวแปร (E) ทั้ง 7 ตัวแปร (ตาราง 4) พบว่า

- รหัส S003 มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า รายการทดสอบ เหล็กและสังกะสี ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง รายการทดสอบแมงกานีส และทองแดง

- รหัส 0763 มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลง pH น้ำยาสกัด

- รหัส S004 ไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรอบในการเขย่า ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง และ pH น้ำยาสกัดได้

ตารางที่ 1 แสดงตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง

ตัวแปรที่	สัญลักษณ์ตัวแปร	สภาวะ	ปกติ (A-G)	เปลี่ยนแปลง (a-g)
1	A/a	pH น้ำยาสกัด	7.3	7.4
2	B/b	น้ำหนักตัวอย่าง	25 กรัม	25.05 กรัม
3	C/c	ปริมาตรน้ำยาสกัด	50 มิลลิลิตร	49 มิลลิลิตร
4	D/d	ความเร็วรอบในการเขย่า	190 rpm	180 rpm
5	E/e	ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง	กรองทันที	ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนกรอง
6	F/f	ระยะเวลาในการกรอง	กรองทิ้งไว้ข้ามคืน	3 ชั่วโมง
7	G/g	กรวยกรอง	แก้ว	พลาสติก

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 แสดงการวางแผนการทดลอง

การทดลอง	แผนการทดลอง							ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์
การทดลองที่ 1	A	B	C	D	E	F	G	R_1
การทดลองที่ 2	A	B	c	D	e	f	g	R_2
การทดลองที่ 3	A	b	C	d	E	f	g	R_3
การทดลองที่ 4	A	b	c	d	e	F	G	R_4
การทดลองที่ 5	a	B	C	d	e	F	g	R_5
การทดลองที่ 6	a	B	c	d	E	f	G	R_6
การทดลองที่ 7	a	b	C	D	e	f	G	R_7
การทดลองที่ 8	a	b	c	D	E	F	g	R_8

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง 8 การทดลอง

การทดลอง	ค่าเฉลี่ยผลการวิเคราะห์ (R)											
	รหัส S003				รหัส 0763				รหัส S004			
	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn	Zn	Cu
การทดลองที่ 1	37.98	148.57	3.33	2.71	49.59	45.29	3.79	5.52	7.60	21.62	1.29	2.20
การทดลองที่ 2	44.32	148.72	3.44	3.43	51.50	45.98	3.84	5.74	7.82	23.15	1.28	2.25
การทดลองที่ 3	43.91	142.81	3.26	3.28	51.00	45.32	3.75	5.64	7.58	22.65	1.19	2.19
การทดลองที่ 4	44.31	146.93	3.20	3.3	53.40	46.57	3.96	5.90	8.00	21.17	1.12	2.33
การทดลองที่ 5	42.42	147.74	3.06	3.35	53.07	47.15	3.91	5.92	7.98	22.85	1.11	2.24
การทดลองที่ 6	44.41	144.27	3.06	3.22	52.93	48.37	4.04	5.99	7.68	21.22	1.27	2.30
การทดลองที่ 7	38.56	147.20	3.30	3.34	54.61	49.02	4.24	6.21	7.49	24.03	1.25	2.28
การทดลองที่ 8	39.74	143.21	3.33	2.92	53.07	47.54	4.06	6.00	7.76	21.56	1.14	2.26

ระบบวิทยานิพนธ์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ห้องปฏิบัติการได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างเหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์โดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี โดยมีผลการศึกษาการรบกวนจากการเปรียบเทียบกราฟสารละลายมาตรฐาน และกราฟสารละลายมาตรฐานที่เติมตัวอย่างดิน พบว่า % RPD และ % Recovery ผ่านเกณฑ์กำหนด

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) ที่แสดงความเป็นเส้นตรงของ Linearity range เท่ากับ 0.9999 ทุกรายการวิเคราะห์ และ Working range เท่ากับ 0.9999 ในรายการวิเคราะห์เหล็กและทองแดง 0.9998 ในรายการแมงกานีส และสังกะสี ผ่านเกณฑ์กำหนด $r \geq 0.995$ มีค่า LOD เท่ากับ 1.71, 0.51, 0.18, 0.12 mg/l และ LOQ เท่ากับ 5.70, 1.70, 0.60, 0.40 mg/l ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง ตามลำดับ การพิสูจน์ความแม่น (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ผ่านเกณฑ์กำหนดโดยมี % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ 101.95, 81.43, 97.14, 100.96 ความเข้มข้นกลาง 107.63, 100.78, 97.43, 97.66 ความเข้มข้นสูง

99.45, 101.07, 89.35, 93.77 และวัสดุอ้างอิงรับรอง 101.06, 95.20, 99.82, 110.43 ค่า HorRat ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.28, 0.21, 0.08, 0.04 ที่ความเข้มข้นกลาง 0.32, 0.05, 0.03, 0.02 ความเข้มข้นสูง 0.43, 0.58, 0.24, 0.23 และวัสดุอ้างอิงรับรอง 0.13, 0.14, 0.38, 0.05 ในรายการวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และทองแดง ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 ผลกระทบของตัวแปร (E)

	ผลกระทบของตัวแปร (E)											
	รหัส S003				รหัส 0763				รหัส S004			
	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn	Zn	Cu	Fe	Mn	Zn	Cu
E_A = [R1 + R2 + R3 + R4]/4 - [R5 + R6 + R7 + R8]/4	1.35	1.15	0.12	-0.03	-2.05	-2.23	-0.23	-0.33	0.02	-0.27	0.03	-0.05
E_B = [R1 + R2 + R5 + R6]/4 - [R3 + R4 + R7 + R8]/4	0.65	2.29	-0.05	-0.03	-1.25	-0.41	-0.11	-0.15	0.06	-0.14	0.06	-0.02
E_C = [R1 + R3 + R5 + R7]/4 - [R2 + R4 + R6 + R8]/4	-2.48	0.80	-0.02	-0.05	-0.66	-0.42	-0.05	-0.09	-0.15	1.01	0.01	-0.06
E_D = [R1 + R2 + R7 + R8]/4 - [R3 + R4 + R5 + R6]/4	**-3.61**	1.49	**0.21**	-0.19	-0.41	0.10	0.07	0.00	-0.14	0.62	0.07	-0.02
E_E = [R1 + R3 + R6 + R8]/4 - [R2 + R4 + R5 + R7]/4	-0.89	**-2.93**	0.00	**-0.32**	-1.50	-0.55	-0.08	-0.16	-0.17	-1.04	0.03	-0.04
E_F = [R1 + R4 + R5 + R8]/4 - [R2 + R3 + R6 + R7]/4	-1.69	0.86	-0.03	-0.25	-0.23	-0.54	-0.04	-0.06	0.19	-0.96	-0.08	0.00
E_G = [R1 + R4 + R6 + R7]/4 - [R2 + R3 + R5 + R6]/4	-1.28	1.12	-0.05	-0.10	0.47	0.82	0.12	0.08	-0.09	-0.54	0.05	0.06
S	**2.76**	**2.39**	**0.13**	**0.25**	**1.59**	**1.37**	**0.16**	**0.22**	**0.19**	**1.04**	**0.08**	**0.06**

| E | > S แสดงว่า มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ

จากการศึกษาความคงทนของวิธี (Ruggedness) 7 ตัวแปร 8 การทดลอง โดยใช้ Youden-Steiner testing โดยการพิจารณาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม พบว่า ตัวอย่างดินอ้างอิงภายใน รหัส S003 มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบในการเขย่า และระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง รหัส 0763 มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลง pH น้ำยาสกัด และ รหัส S004 ไม่มีผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ไม่สามารถ

กรมวิชาการเกษตร

เปลี่ยนแปลงรอบในการเขย่า ระยะเวลาตั้งทิ้งไว้ก่อนกรอง และ pH น้ำยาสกัดได้ ทำให้มีความสะดวก รวดเร็วในการวิเคราะห์ วิธีวิเคราะห์เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์โดยใช้เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนในดิน ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation of Silicon in Soil by using Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques

จิตติรัตน์ ชูชาติ สงกรานต์ มะลิสอน พจมาลย์ ภู่สาร ญาณธิชา จิตต์สะอาด
สุภา โพธิจันทร์ กัญฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ซิลิคอนในดิน

Method validation Silicon in soil

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี โดยการสกัดดินด้วยวิธี 1 N CH_3COONa pH 4.0 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometer พบว่า การวิเคราะห์ซิลิคอนด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 7.05 mg/kg และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 7.90 mg/kg ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง (Trueness) และค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 99.40, 99.95 และ 1010.70%ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.41, 0.47 และ 0.31 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วง 90 - 107% และ HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3) ผลการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม Ruggedness พบว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ไม่มีผลกระทบต่อวิธีวิเคราะห์โบรอน และวิธีมีความคงทนต่อการนำไปใช้เป็นวิธีอ้างอิงของห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนที่สกัดได้ในดินด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry จึงมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจ ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ

Development and Method Validation of Silicon in soil by using Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) found that the Limit of Detection (LOD) was 7.05 mg/kg and Limit of Quantitation (LOQ) was 7.90 mg/kg. To prove the Trueness and precision of LOQ was 99.06% Recovery and HorRat (Horwitz'Ratio) was 0.91. The CRM analysis to prove concentrations at low, medium and high level of silicon

กรมวิทยาศาสตร์

(37, 185 and 370 mg/kg), %Recovery were 99.40, 99.95 and 1010.70% respectively. HorRat (Horwitz'Ratio) were 0.41, 0.47 and 0.31 respectively. The results of analysis showed that the (AOAC) acceptance criteria (%Recovery in the ranges from 90 - 107% and HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3). When studying ruggedness using. It was found that the boron analysis was not affected by changes in the environment. Therefore, this method is effective and suitable for use in the analysis of silicon in soil. That is routine work and needs fast, accurate analysis results with Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques.

บทนำ (Introduction)

ซิลิคอน (Silicon; Si) ไม่จัดว่าเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อพืช แต่จัดเป็นธาตุเสริมประโยชน์ (beneficent element) (Synder *et al.* 2007) สำหรับพืชบางชนิด ซึ่งรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชของซิลิคอน คือ SiO_2 ซิลิคอนมีผลทำให้เซลล์พืชแข็งแรง สามารถต้านทานโรคและแมลงได้ดี (ยงยุทธ, 2543) ในข้าว ซิลิคอนทำให้ใบของต้นข้าวตั้งตรงรับแสงแดดได้ดี ลำต้นแข็งแรงไม่ล้มง่าย และเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะแห้งแล้ง (Epstein, 1999; Marschner, 1995) รวมทั้ง มีประโยชน์ทางอ้อมต่อผลผลิตของข้าว (Alyne *et al.,* 2016) มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น การพัฒนาราก การเจริญของผล และการเพิ่มผลผลิตพืช นอกจากนี้ซิลิคอนยังช่วยปกป้องพืชจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และจากการทำลายของศัตรูพืช และเมื่อพืชดูดซิลิคอนเข้าไปในเซลล์พืช ซิลิคอนถูกเปลี่ยนอยู่ในรูปของแข็งตามผนังเซลล์ ซึ่งทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์แข็งแรงขึ้นทนต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลงอีกด้วย (Marschner, 1995)

การวิเคราะห์หาปริมาณซิลิคอน สามารถวิเคราะห์ได้โดยการสกัดดินด้วยวิธี ใช้วิธีสกัดดินด้วยน้ำยาสกัด 1 N CH_3COONa pH 4.0 และวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยวิธี Colorimetric silicomolybdic acid (Nayer *et al.,* 1975; Jones and Dreher, 1996) อย่างไรก็ตาม พบว่าตามวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ดิน Method of soil analysis (Sparks *et al*., 1996) สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometer ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งต้องผ่านการทำให้เกิดสีด้วยวิธี Silicomolybdic acid ซึ่งพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณซิลิคอนด้วยเครื่อง ICP-OES ซึ่งใช้หลักการ Emission spectroscopy (แม้น และคณะ, 2552) สามารถลดขั้นตอนการทำให้สารละลายเกิดสี ตามแบบวิธีเดิม และพบว่าการวิเคราะห์ด้วย Inductively Coupled Plasma (ICP) มีความไวในการตรวจพบและสามารถตรวจพบได้ในระดับที่ต่ำกว่าการใช้วิธี Spectrophotometric และ flame AES/AAS อีกด้วย (Sah and Brown, 1997) การทดลองนี้จึงมุ่งเน้นในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ซิลิคอนในดิน ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี (Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry) เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ซิลิคอนของห้องปฏิบัติการต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

ศรีปทุมการเกษตร

1. จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ ที่ต้องใช้ในการทดสอบ และจัดหาวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่มีค่า Certified Value และ Uncertainty และตัวอย่างดิน

2. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ในการวิเคราะห์ซิลิคอนในดิน

3. ศึกษาการรบกวนกันของธาตุซิลิคอน ในการวัดด้วยเครื่อง ICP ในเวลาเดียวกัน ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

4. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ (Ruggedness) เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบในการเขย่า อุณหภูมิ ระยะเวลาการกรอง เป็นต้น

5. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซิลิคอน โดยสกัดดินด้วย1 N Na Acetate buffer pH 4.0 และวัดปริมาณด้วยเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometerดังนี้

5.1. Linearity / range ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานซิลิคอนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Response และปริมาณความเข้มข้นของซิลิคอน ($r \geq 0.995$)

5.2. หาค่า Trueness และ precision โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ สูง ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบซิลิคอน โดยทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำและต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery และ HorRat< 2 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016)

การคำนวณ % Recovery จากสูตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (Horwitz' Ratio)} = \frac{\text{RSD(r)}}{\text{PRSD(R)}}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{RSD(r)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

$$\text{PRSD(R)} = \frac{2C^{-0.15}}{100} \quad (C = \text{mean})$$

5.3. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า SD- standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีซิลิคอนปริมาณน้อย จำนวน 7 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

กรมวิชาการเกษตร

$$LOD = 3S_0'$$

$$LOQ = 10S_0'$$

6. นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติโดยใช้เกณฑ์กำหนดตามที่มาตรฐาน AOAC Official Methods of Analysis (2016) พร้อมทั้งสรุปและรายงานผลการทดลอง ขั้นตอนการวิเคราะห์ที่เปลี่ยนแปลง และความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ดำเนินการศึกษาสภาวะของเครื่อง ICP ที่ใช้ในการวัดซิลิคอนในดิน ได้สภาวะของเครื่อง ICP สำหรับการวิเคราะห์ซิลิคอน โดยค่า wavelength ที่ 288.158 นาโนเมตร plasma view ใช้มุมมอง Radial, ค่า plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump flow และ Uptake ที่ 14 ลิตรต่อนาที, 0.8 ลิตรต่อนาที, 1.2 ลิตรต่อนาที, 1.2 กิโลวัตต์, 25 รอบต่อนาที และ 25 วินาที และความเข้มข้นของ Standard ที่ใช้เท่ากับ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ppm ตามลำดับ

2. ศึกษาการรบกวนของธาตุแคลเซียม ที่มีผลต่อปริมาณซิลิคอนในการวัดด้วยเครื่อง ICP (Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer) ที่ความเข้มข้น ต่ำกลาง และสูงโดยการชั่งตัวอย่างดินที่มีปริมาณซิลิคอนความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง (53, 112 และ 254 mg/kg) เติมสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 4 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0, 50, 100 และ 250 mg/l ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความเข้มข้นของซิลิคอนที่วัดได้เมื่อมีการเติมสารละลายมาตรฐานแคลเซียม โดยการเปรียบเทียบ % Recovery พบว่า ตัวอย่างดินที่เติมสารละลายมาตรฐานแคลเซียม 0, 50, 100 และ 250 mg/l ผ่านเกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน AOAC: 2016 (% Recovery 90-107) สรุปได้ว่า ปริมาณแคลเซียมไม่รบกวนการวิเคราะห์ซิลิคอน สอดคล้องกับ Jones and Dreher (1996) ที่พบว่าไม่มีธาตุหรือสารรบกวนในการวิเคราะห์ซิลิคอนในดิน เนื่องเป็นธาตุที่มีปริมาณมากในดิน

3. ทดสอบหาค่า Range/ Linearity ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานซิลิคอนที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Response และปริมาณความเข้มข้นของซิลิคอน ($r \geq 0.995$)

- ทดสอบหา Range : โดยการเติมสารละลายมาตรฐานซิลิคอนใน sample blank ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ (Fortified sample blank) โดยมีความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ซิลิคอนในดิน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน และค่า Intensity พบว่า ช่วงความเข้มข้นซิลิคอน 0 – 40 มิลลิกรัมต่อลิตรคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient ; r) ได้ 0.999 ผ่านเกณฑ์ยอมรับ $r > 0.995$

กรมวิชาการเกษตร

- ทดสอบหา Linearity: ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์โดยการ Fortified sample blank ที่ 7 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวน 3 ซ้ำคำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient ; r) ได้ 0.999 เกณฑ์ยอมรับ r > 0.995

4. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า SD- standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีซิลิคอนปริมาณน้อย จำนวน 7 ซ้ำ และคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณค่า LOD และ LOQ โดยมีค่าเฉลี่ย = 6.60 , SD = 0.17 , LOD = 7.05 , LOQ (Predict) = 7.90 ได้ขีดความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ และรายงานผลได้ (LOD และ LOQ) คือ 7.05 และ 7.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นทำการทดสอบค่า Accuracy และ Precision ที่ระดับ LOQ = 8.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า %Recovery เท่ากับ 100.71 และ HorRat เท่ากับ 1.24 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (%Recovery = 80-110, HorRat < 1.3)

5. พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยชั่ง CRM ที่มีซิลิคอนความเข้มข้น 37, 185 และ 370 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แล้วคำนวณความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) พบว่ามี %recovery เท่ากับ 99.40, 99.95 และ 1010.70% ตามลำดับ และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.41, 0.47 และ 0.31 ผ่านเกณฑ์ยอมรับโดยมี %recovery = 90-107% และ Precision (เกณฑ์ยอมรับ HorRat < 1.3) ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

6. ทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ ศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนในดิน ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำหนักตัวอย่าง ปริมาตรน้ำยาสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการต้ม เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานที่ปฏิบัติ ผลการวิเคราะห์หาความคงทนของวิธี พิจารณาจากค่าทางสถิติ t-test โดยเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ 1, 2 และ 3 พบว่าทั้ง - มีค่า $t_{cal} < t_{crit}$ ดังนั้นสรุปได้ว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลองจากเดิมใช้น้ำหนักตัวอย่างดิน 10 กรัม เป็น 10.05 กรัม และเปลี่ยนปริมาตรน้ำยาสกัดจาก 100 มิลลิลิตร เป็น 102 มิลลิลิตร และเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการต้ม 40 องศาเซลเซียส เป็น 42 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ซิลิคอนใน ทำให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนในดินด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี โดยการสกัดดินด้วยวิธี 1 N CH_3COONa pH 4.0 และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometer พบว่า การวิเคราะห์ซิลิคอนด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry Techniques ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 7.05 mg/kg และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 7.90 mg/kg ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง (Trueness) และค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

แบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 99.40, 99.95 และ 1010.70%ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.41, 0.47 และ 0.31 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วง 90 - 107% และ HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3) ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ซิลิคอนที่สกัดได้ในดินด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma (ICP) Emission Spectrometry จึงมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจ ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 พัฒนาวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และสารปรับปรุงดินโดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy; NIRS)

พิสูจน์เอกลักษณ์ และวิเคราะห์องค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Qualitative Identification and Nitrogen Constituent Analysis in Chemical Fertilizers by Near Infrared Spectroscopy

ชฎาพร คงนาม วรรณรัตน์ ชุติบุตร จรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์ ศุภัคชญา ทาหาร
ทองจันทร์ พิมพ์เพชร นันทกานต์ ขุนโหร

คำสำคัญ (Key words)

พิสูจน์เอกลักษณ์ องค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี
เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
Qualitative Identification Nitrogen Constituent Analysis in Chemical Fertilizers
Near Infrared Spectroscopy

บทคัดย่อ (Abstract)

งานวิจัยนี้ศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ และวิเคราะห์องค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS ซึ่งเป็นวิธีการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถทำนายค่าทางเคมี และการวิเคราะห์จำแนกกลุ่ม ได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ลดการใช้สารเคมี และมลภาวะที่เกิดจากห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างปุ๋ยเคมีไปสแกนด้วยเทคนิค สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ที่ความยาวคลื่น 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 4000 – 12500 ต่อเซนติเมตร พบช่วงการดูดกลืนแสงที่สำคัญของแอมโมเนียมไนโตรเจนประมาณ 7184 cm^{-1} ไนเตรทไนโตรเจนประมาณ 4768 cm^{-1} และยูเรียไนโตรเจนประมาณ 6536, 6820, 6904 และ 8452 cm^{-1} สร้างสมการทำนายแบบจัดกลุ่ม (Cluster) พบว่าได้สมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยใช้การปรับแต่งสมการ (Pretreatments) แบบ 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) ทวนสอบสมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS ด้วยแม่ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยเชิงประกอบ สูตร 20-0-0, 21-0-0, 12-60-0, 12-61-0, 13-0-46, 15-0-0 และ 46-0-0 พบว่าสมการทำนายแยกชนิดองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี (แอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน) ได้ถูกต้องทุกตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างปุ๋ยที่มีการผสมแอมโมเนียมไนโตรเจน ยูเรียไนโตรเจน และไนเตรทไนโตรเจน สามารถทำนายแยกชนิดองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีได้ถูกต้อง 47% การวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน พบว่าค่าพิสัยอยู่ในช่วง 3.4 – 21.7, 7.4 – 16.4 และ 4.6 – 46.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สร้างสมการเทียบมาตรฐาน

กรมวิชาการเกษตร

(Calibration) เพื่อใช้ทำนายค่าด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) regression ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Multiplicative scatter correction full (mf), 2nd Savitzky-Golay 9 points (dg2) และ 2nd Savitzky-Golay 9 points (dg2) ตามลำดับ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.98, 0.98 และ 0.99 ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Calibration (Standard error of Calibration, SEC) เท่ากับ 0.86, 0.17 และ 1.08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Validation (Standard error of prediction, SEP) เท่ากับ 0.86, 0.43 และ 1.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีด้วยตัวอย่างปุ๋ยเคมี พิจารณาความแม่นโดยใช้ Paired t-test พบว่าค่า t_{ext} มีค่าน้อยกว่า t_{crit} ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับ และ Recovery อยู่ในช่วง 80-120% พิจารณาความเที่ยงโดยใช้ %RSD พบว่ามีค่า %RSD เฉลี่ยน้อยกว่า 1.9 ผลการวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (%RSD ≤ 1.9) สามารถนำสมการมาใช้ประเมินค่าปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ได้อย่างรวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง และมีความแม่นอยู่ในช่วง 80 – 120%

In this study, Qualitative identification and nitrogen constituent analysis in chemical fertilizers by Near Infrared Spectroscopy (NIRS), is non-destructive technique to rapidly and accurately predictions. The chemical fertilizers were scanned by NIRS in the region 800 – 2500 nm or 4000 – 12500 cm^{-1},the significant absorbance of ammonium nitrogen (AN) was 7184 cm^{-1} nitrate nitrogen (NN) was 4768 cm^{-1} and urea nitrogen (UN) were 6536, 6820, 6904 and 8452 cm^{-1}. Cluster prediction model for AN, NN and UN in chemical fertilizers were developed from the 1st Savitzky - Golay a points (dg1) and Normalization to Unit Length (nle). Validation of the method, was found that the equations for separating nitrogen constituent (urea nitrogen ammonium nitrogen and nitrogen nitrates) in chemical fertilizers formulas 20-0-0, 21-0-0, 12-60-0, 12-61-0, 13-0-46, 15-0-0 and 46-0-0 were correct in all samples. For the mixed fertilizers, the nitrogen constituent was predicted with accuracy of 47%. Analysis of AN UN and NN in chemical fertilizers, the results of AN NN and UN the range were 3.4 – 21.7%, 7.4 – 16.4% and 4.6 – 46.4%, respectively. All spectra were pretreated by Multiplicative scatter correction full (mf), 2nd Savitzky-Golay 9 points (dg2) and 2nd Savitzky-Golay 9 points (dg2), respectively. The calibration for predicting AN NN and UN in chemical fertilizers, the correlation coefficient (R) were 0.98, 0.98 and 0.99, respectively. The standard error of calibration (SEC) were 0 .86%, 0 .17% and 1.08%, respectively.; and standard error of prediction (SEP) were 0.86%, 0.43% and 1.28%, respectively. Validation of the method, inspection of accurate by paired t-test showed that t_{ext} lower than t_{crit} of 95% (accepted $t_{ext} < t_{crit}$) and recovery was 80-120%. Inspection of precision by RSD, the

ศูนย์วิทยทรัพยากร

%RSD lower than 1.9. (AOAC accepted %RSD ≤ 1.9) Therefore, calibration model can be predict of AN, NN and UN content in chemical fertilizers by NIRS with accuracy in the range of 80-120%.

บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันผู้ประกอบการมีการผลิตปุ๋ยไนโตรเจนเชิงเดี่ยวแบบผสมคลุกเคล้าจำนวนมาก ด้วยวิธีทางกายภาพ เช่น ปุ๋ยยูเรียผสมกับปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต การขึ้นทะเบียนตัวอย่างปุ๋ยจะต้องมีผลทดสอบขององค์ประกอบของไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรียไนโตรเจน แอมโมเนียมไนโตรเจน แต่เนื่องจากการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณมากจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต ทำให้ผู้ประกอบการบางรายนำปุ๋ยยูเรียมาลดสูตรด้วยการผสมกับสารตัวเติม หรือ นำปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยผสมกับยูเรีย การทดสอบองค์ประกอบของไนโตรเจนจึงมีการผิดพลาดเกิดขึ้น เนื่องจากวิธีทดสอบแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยที่มีส่วนประกอบของยูเรียไนโตรเจน และแอมโมเนียมไนโตรเจน จะให้ผลทดสอบแตกต่างจากค่าจริง เพราะการทดสอบแอมโมเนียมไนโตรเจนจะทำให้ยูเรียบางส่วนแตกตัวออกมาเป็นแอมโมเนียมไนโตรเจน ผลทดสอบแอมโมเนียมไนโตรเจนจึงมีค่าสูงกว่าค่าจริง ถ้าตัวอย่างปุ๋ยมียูเรียปริมาณมากและแอมโมเนียมไนโตรเจนปริมาณน้อย ผลทดสอบจะมีความแตกต่างจากค่าจริงมากขึ้น เทคนิค NIRS สามารถแยกพีคขององค์ประกอบของไนโตรเจนได้เนื่องจากยูเรียไนโตรเจน แอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน มีพีคที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกกันอย่างชัดเจน ประกอบกับวิเคราะห์ปริมาณปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี มีหลายขั้นตอน ต้องใช้สารเคมี และเวลาในการวิเคราะห์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ลดการใช้สารเคมี และปลอดภัยต่อผู้วิเคราะห์ จึงเป็นที่ต้องการในการวิเคราะห์ดังกล่าว

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่าง เนื่องจากเป็นเทคนิคการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ ทราบผลภายใน 3-4 นาที มีการศึกษาเทคนิค NIR เพื่อจำแนกข้าวหอมมะลิออกจากข้าวพันธุ์อื่นด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ (อารีรัตน์ และคณะ, 2555) การวิเคราะห์แอมโมเนียในมูลสัตว์ปีกด้วยเทคนิค NIRS (Reeves, J.B. et al., 2002) การวิเคราะห์ธาตุอาหารที่มีรายการแอมโมเนียมไนโตรเจนของมูลสุกรด้วยเทคนิค NIRS (Yang, Z. et al., 2006) การวิเคราะห์ไนเตรทในดินด้วยเทคนิค NIRS (Ehsani, M.R. et al., 1999) การตรวจพบและหาปริมาณของสารเติมแต่ง (ยูเรีย ไบยูเร็ต) ในอัลฟาฟ่า โดย NIRS ด้วยโพรบไฟเบอร์ออปติก (Gonzalez-Martin, I. and Hernandez-Hierro, J.M., 2008) เทคนิค NIRS อาศัยหลักการวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนของตัวอย่าง เมื่อรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 4000 – 12500 ต่อเซนติเมตร เดินทางผ่านเข้าไปในตัวอย่าง ทำให้เกิดอันตรกิริยา (interaction) กับอะตอม และโมเลกุลของตัวอย่างนั้น โมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้เข้าไปจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ของตัวอย่างที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะปรากฏในสเปกตรัม NIR การหาความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแต่ละความยาวคลื่นกับค่าทางเคมี โดยทั่วไปมัก

กรมวิชาการเกษตร

ใช้การวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression; MLR) การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square (PLS) regression) การถดถอยองค์ประกอบหลัก (Principle Component Regression; PCR) เป็นต้น โดยวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในขณะนี้ คือ PLS และ PCR เนื่องจากโปรแกรมจะวิเคราะห์การถดถอย เพื่อสร้างสมการแคลิเบรชั่นอย่างอัตโนมัติ รวดเร็ว ทำให้ผู้ใช้สะดวก และเพื่อให้สมการแคลิเบรชั่นมีความเสถียร และมีปัจจัย (factors) ที่เหมาะสม ควรตรวจสอบช่วงความยาวคลื่นที่ดีที่สุดที่สอดคล้องกับการดูดกลืนขององค์ประกอบที่สนใจ ดังนั้นระหว่างการสร้างสมการแคลิเบรชั่นควรลองปรับช่วงความยาวคลื่นที่ใช้วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม และเงื่อนไขการปรับแต่งในแต่ละวิธี เพื่อให้ได้สร้างสมการแคลิเบรชั่นที่มีความแม่นยำที่สุด เพื่อใช้ทำนายค่าคุณสมบัติทางเคมีหรือคุณสมบัติอื่นๆ ของตัวอย่าง ที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ประหยัดเวลา และลดต้นทุนในการใช้สารเคมี (เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, 2555) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีโดยเทคนิค NIRS เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้นและวิเคราะห์เชิงปริมาณของยูเรียไนโตรเจน แอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน ในตัวอย่างปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS ที่มีความรวดเร็ว ประหยัดเวลา ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย และปลอดภัยกับผู้วิเคราะห์

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมตัวอย่างปุ๋ยเคมี

คัดเลือก และรวบรวมแม่ปุ๋ยแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน และตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน ให้ครอบคลุมทุกระดับความเข้มข้น พร้อมกับรวบรวมข้อมูลของตัวอย่าง นำตัวอย่างปุ๋ยเคมีมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างให้มีความละเอียดไม่น้อยกว่า 20 เมช เทตัวอย่างที่บดแล้วใส่ถุงพลาสติกซิบ ไล่อากาศออกให้หมด และปิดถุงให้สนิท เขียนป้ายบ่งชี้ตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559)

2. การวิเคราะห์ค่าทางเคมี

วิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 วิธีทดสอบ 1.06.01 1.07.01 และ 1.08.01 ตามลำดับ

3. วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRS

วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่ทราบปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ยูเรียไนโตรเจน และไนเตรทไนโตรเจน โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) โดยเทตัวอย่างปุ๋ยเคมี ใส่ลงใน Petri dish ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร เพื่อเก็บสเปกตรัม นำสเปคตรัม (spectrum) ที่ได้มาปรับปรุง (pre-treatment) โดยวิธีทางคณิตศาสตร์ เพื่อหาความยาวคลื่นจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์ของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4. สร้างและปรับปรุงสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ของวิธีหาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS

หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร และค่าทางเคมีของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) และในงานวิจัยนี้เลือกใช้ PLS ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) โดยการสร้างแฟกเตอร์แบบสมการเชิงเส้นตรงจากข้อมูลของสเปกตรัมเริ่มต้น และนำแฟกเตอร์ที่ได้ไปใช้ในสมการถดถอย วัตถุประสงค์ของ PLS เพื่อต้องการลดจำนวนข้อมูลสเปกตรัมให้ได้เฉพาะข้อมูลสเปกตรัมที่มีความสำคัญกับการทำนายค่าทางเคมีที่สนใจเท่านั้น เพื่อให้สามารถประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น การประเมินผลความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นสามารถอธิบายได้จากค่าสถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า R (William, 2001)

ค่า R	ความสามารถของสมการแคลิเบรชั่น
± 0.5	ไม่ควรใช้ในการทำนาย (Not usable)
± 0.51 – 0.70	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ (poor correlation)
± 0.71 – 0.80	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (rough screening)
± 0.81 – 0.90	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณ หรือ ประมาณค่าเบื้องต้น (screening)
± 0.91 – 0.95	การทำนายเพื่องานวิจัย (research) และงานทั่วไป
± 0.96 – 0.98	การทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance)
± 0.99 ขึ้นไป	ทุกงาน (any application)

5. สร้างสมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS

นำสเปคตรัมของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่ความยาวคลื่น (wave length) 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร มาสร้างสมการทำนายแบบจัดกลุ่ม (Cluster) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) สมการทำนายองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีที่ถูกต้องต้องได้ค่า Cluster/Property เท่ากับ 1

6. ทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ที่ใช้ในการทำนายปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี

กรมวิทยาศาสตร

ทวนสอบสมการ Calibration โดยใช้ตัวอย่างปุ๋ยเคมี โดยพิจารณาความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) เพื่อให้ได้สมการทำนายผลที่มีความถูกต้อง และแม่นยำ

6.1 พิจารณาความแม่น (Accuracy) โดยใช้ Paired t-test และ %Recovery เปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้ด้วยวิธี NIRS กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี

การคำนวณ

$$t_{ext} = \frac{\bar{d}}{sd / \sqrt{n}}$$

$$\%Recovery = \frac{\text{ค่าที่ทำนายด้วยวิธี NIR}}{\text{ค่าวิเคราะห์ทางเคมี}} \times 100$$

เมื่อ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง

sd = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

n = จำนวนตัวอย่าง

6.2 พิจารณาความเที่ยง (Precision) โดยใช้ %RSD (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ : Relative Standard Deviation)

การคำนวณ

$$\%RSD = \frac{sd}{\bar{x}} x\,100$$

เมื่อ sd = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง

7. ทวนสอบสมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS ทวนสอบสมการทำนายโดยใช้ตัวอย่างปุ๋ยเคมี โดยพิจารณาความถูกต้องของการจำแนกกลุ่มองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี (แอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน)

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

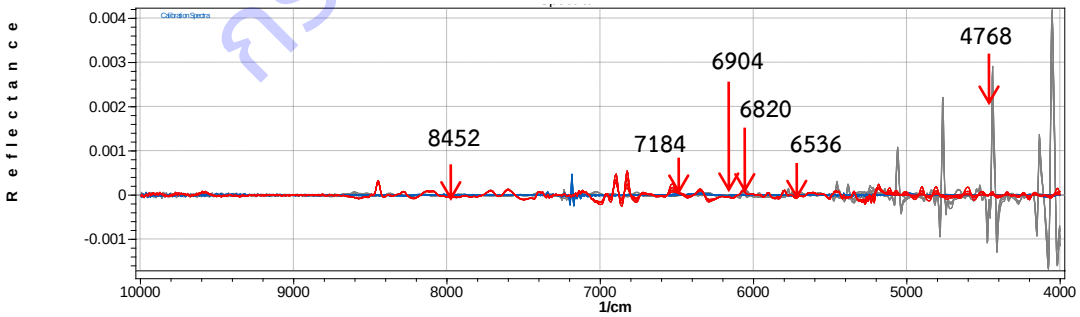
1. ผลการวิเคราะห์ทางเคมี

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน ในตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration จำนวน 138, 81 และ 140 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบว่ามีค่าพิสัยอยู่ในช่วง 3.4 – 21.7, 7.4 – 16.4 และ 4.6 – 46.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. ผลการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRS

จากการวัดตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อหาความยาวคลื่นจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์ของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) โดย Scan ที่ช่วงความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร และทำการปรับแต่งสเปกตรัมของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมีด้วยวิธี second derivative แสดงในภาพที่ 1 พบช่วงการดูดกลืนแสงที่สำคัญของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี ได้แก่

- แอมโมเนียมไนโตรเจน พบช่วงการดูดกลืนแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตรประมาณ 7184 cm^{-1} (Yang และคณะ, 2006) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสั่นของหมู่ R-O-H (ภาพที่ 1)
- ไนเตรทไนโตรเจน พบช่วงการดูดกลืนแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตรประมาณ 4768 cm^{-1} ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสั่นของหมู่ O-H และ C-O (ภาพที่ 1)
- ยูเรียไนโตรเจน พบช่วงการดูดกลืนแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตรประมาณ 6536, 6820, 6904 และ 8452 cm^{-1} (Gonzalez-Martin และคณะ, 2008) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการสั่นของหมู่ RNH_2, $CONH_2$ และ C-H (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 อนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) ของสเปกตรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมีในตัวอย่างปุ๋ยเคมี

3. สมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ของปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน

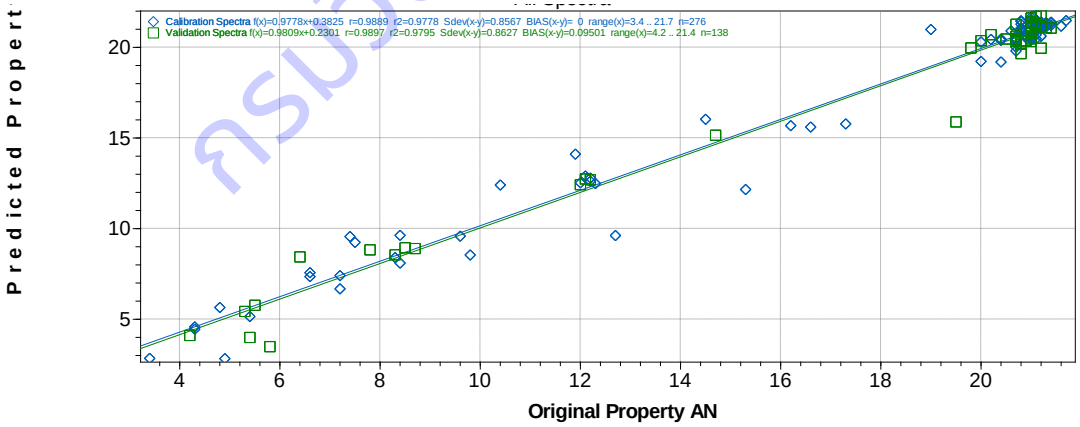
6852

นำค่าการดูดกลืนแสง และค่าทางเคมีของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี มาสร้างสมการ Calibration โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) ด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) regression

- ได้สมการแอมโมเนียมไนโตรเจน โดยใช้การปรับแต่งสมการ (Pretreatments) แบบ Multiplicative scatter correction full (mf) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.98 แสดงว่าสามารถทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance) ได้ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Calibration (SEC) เท่ากับ 0.86 เปอร์เซ็นต์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Validation (SEP) เท่ากับ 0.86 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2)

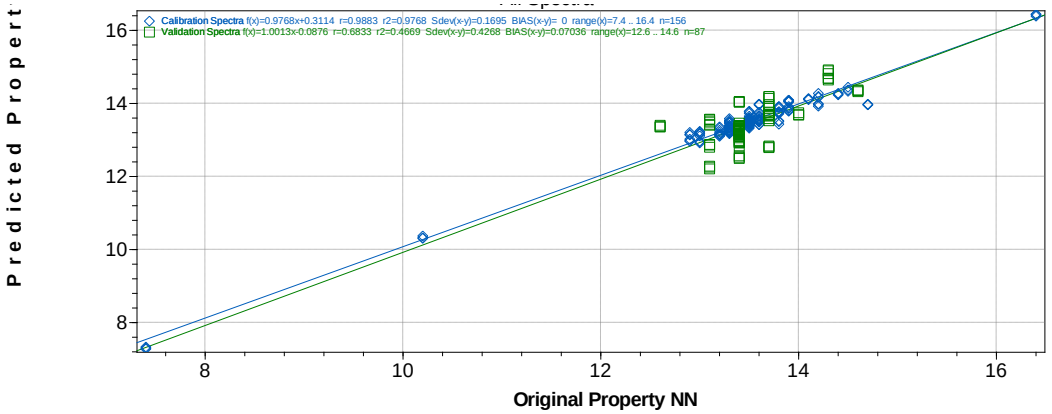
- ได้สมการไนเตรทไนโตรเจน โดยใช้การปรับแต่งสมการ (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky-Golay 9 points (dg2) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.98 แสดงว่าสามารถทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance) ได้ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Calibration (SEC) เท่ากับ 0.17 เปอร์เซ็นต์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Validation (SEP) เท่ากับ 0.43 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)

- ได้สมการยูเรียไนโตรเจน โดยใช้การปรับแต่งสมการ (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky-Golay 9 points (dg2) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.99 แสดงว่าสามารถทำนายทุกงาน (any application) ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Calibration (SEC) เท่ากับ 1.08 เปอร์เซ็นต์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Validation (SEP) เท่ากับ 1.28 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

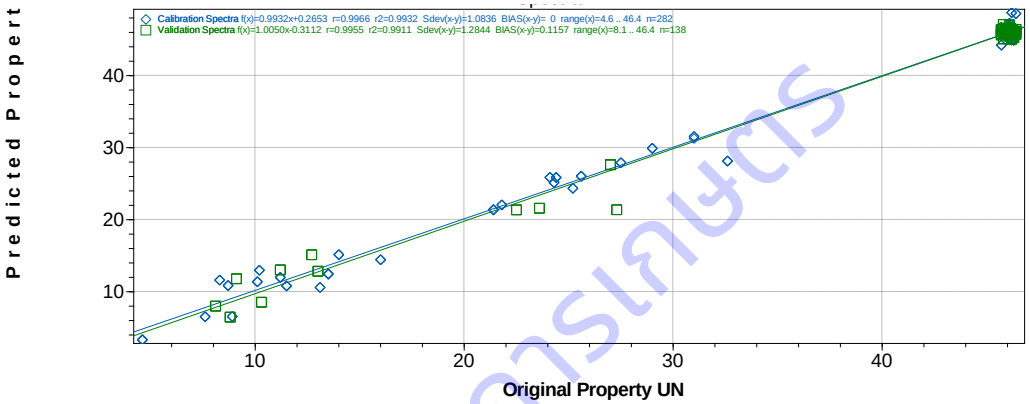


ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทางเคมี และค่าที่ทำนายได้ด้วย NIRS ของปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี

กรมวิชาการเกษตร



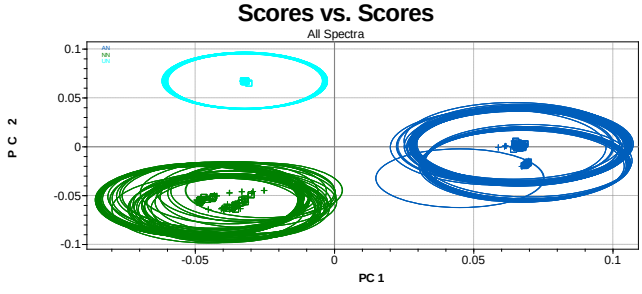
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทางเคมี และค่าที่ทำนายได้ด้วย NIRS ของปริมาณไนเตรทไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี

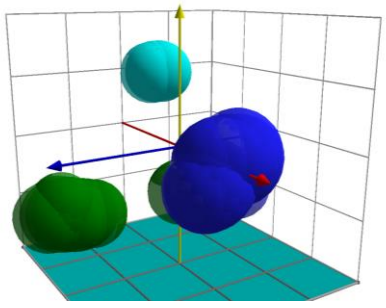


ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทางเคมี และค่าที่ทำนายได้ด้วย NIRS ของปริมาณยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมี

4. สมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS

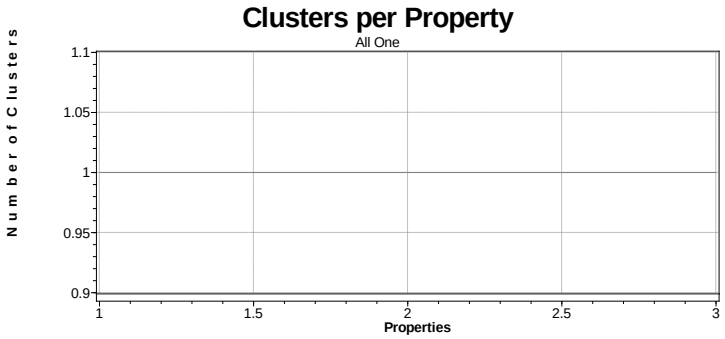
นำสเปกตรัมของแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่ความยาวคลื่น (wave length) 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร มาสร้างสมการทำนายแบบจัดกลุ่ม (Cluster) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) พบว่าได้สมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยใช้การปรับแต่งสมการ (Pretreatments) แบบ 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) สมการที่ได้แบ่งแยกองค์ประกอบของไนโตรเจนได้อย่างชัดเจน และค่า Cluster/Property เท่ากับ 1 (ภาพที่ 5)





กรมวิชาการเกษตร

(a) (b)



(c)

ภาพที่ 5 สมการทำนายจัดกลุ่มแบบ 2D (a) และ 3D (b) ของตัวอย่างแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี และ (c) ความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี กับการจัดกลุ่มตัวอย่าง ด้วย NIRS

5. ผลทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ที่ใช้ในการทำนายปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS

เมื่อนำตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจน จำนวน 22, 20 และ 25 ตัวอย่าง ตามลำดับ มาทวนสอบสมการที่ใช้ทำนายปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี พิจารณาความแม่นโดยเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้ (เทคนิค NIRS) กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี ด้วย Paired t-test พบว่า มีค่า $t_{ext} < t_{crit}$ ทุกรายการทดสอบ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ %Recovery อยู่ในช่วง 80-120% พิจารณาความเที่ยงด้วย %RSD พบว่า มีค่า %RSD เฉลี่ย น้อยกว่า 1.9 ทุกรายการทดสอบ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (AOAC, 2016) (ตารางที่ 2)

จากข้อมูลแสดงว่าสามารถนำสมการ Calibration มาใช้ประเมินค่าปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ได้อย่างรวดเร็ว และไม่ทำลายตัวอย่าง ความแม่นของการประเมินค่าปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี อยู่ในช่วง 80-120% สำหรับสมการ Calibration ที่ดี ควรมีการปรับปรุงโดยการเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้มีความหลากหลาย ค่าทางเคมีในตัวอย่างควรมีค่าที่กระจายอย่างสม่ำเสมอตลอดช่วงของค่าทั้งหมด หรือมีความแปรปรวนครอบคลุมค่าของตัวอย่างในอนาคต เพื่อให้ได้สมการ Calibration ที่เหมาะสม มีความถูกต้องและแม่นยำ ตลอดการใช้งาน

ตารางที่ 2 ประเมิน Accuracy และ Precision ของสมการที่ใช้ในการทำนายปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

Parameter	Accuracy			Precision	
	Paired t-test		%Recovery	$\%RSD_{ext}$	$\%RSD_r$
	$t_{ext.}$	$t_{crit.}$			
Ammonium nitrogen (AN)	1.05	2.08	88 - 120	0.03	1.9

Nitrate nitrogen (NN)	-0.65	2.09	87 - 107	0.36	1.9
Urea nitrogen (UN)	-0.13	2.06	84 - 110	0.08	1.9

6. ทวนสอบสมการทำนายสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยเทคนิค NIRS

นำตัวอย่างแม่ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยเชิงประกอบที่มีแอมโมเนียมไนโตรเจน (สูตร 20-0-0, 21-0-0, 12-60-0, 12-61-0) ไนเตรทไนโตรเจน (สูตร 13-0-46, 15-0-0) และยูเรียไนโตรเจน (สูตร 46-0-0) รายการทดสอบละ 20 ตัวอย่าง มาทวนสอบสมการสำหรับการจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี พบว่าสมการทำนายแยกชนิดองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี (ยูเรียไนโตรเจน แอมโมเนียมไนโตรเจน และไนเตรทไนโตรเจน) ได้ถูกต้องทุกตัวอย่าง คิดเป็น 100% และตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่มีการผสมแอมโมเนียมไนโตรเจน ยูเรียไนโตรเจน และไนเตรทไนโตรเจน จำนวน 21 ตัวอย่าง สามารถทำนายแยกชนิดองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีได้ถูกต้อง 10 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 21 ตัวอย่าง คิดเป็น 47% อาจเนื่องมาจากพีคของตัวอย่างที่แสดงยังไม่เด่นชัดทำให้การแยกพีคขององค์ประกอบของไนโตรเจนคลาดเคลื่อนได้

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การหาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยเคมีโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) วิธีการวัดแบบ Reflectance สามารถนำสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) มาใช้ประเมินค่าปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ได้อย่างรวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง และมีความแม่นของการประเมินค่าปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ไนเตรทไนโตรเจน และยูเรียไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีอยู่ในช่วง 80-120% และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับจำแนกองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีสามารถใช้ตรวจประเมินเพื่อแยกชนิดขององค์ประกอบของไนโตรเจนในกลุ่มตัวอย่างแม่ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยเชิงประกอบสูตร 20-0-0, 21-0-0, 12-60-0, 12-61-0, 13-0-46, 15-0-0 และ 46-0-0 ได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ สำหรับตัวอย่างปุ๋ยผสมที่มีแอมโมเนียมไนโตรเจน ยูเรียไนโตรเจน และไนเตรทไนโตรเจน สามารถทำนายแยกชนิดองค์ประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีได้ถูกต้อง 47%

วิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Study on Organic Matter Analysis Method in Chemical Organic Fertilizers by Near Infrared Spectroscopy

ชฎาพร คงนาม ศุภัคชญา ทาหาร

คำสำคัญ (Key words)

อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Organic Matter in Chemical Organic Fertilizers Near Infrared Spectroscopy

บทคัดย่อ (Abstract)

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยเทคนิค NIRS ซึ่งเป็นวิธีการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ลดการใช้สารเคมีและมลภาวะที่เกิดจากห้องปฏิบัติการ โดยเตรียมตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีให้ครอบคลุมทุกระดับความเข้มข้น จำนวน 178 ตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดย walkley and black method ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย พบว่าค่าพิสัยอยู่ในช่วง 7.3 – 62.4 เปอร์เซ็นต์ นำไปสแกนด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) ที่ความยาวคลื่น 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 4000 – 12500 ต่อเซนติเมตร สร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) เพื่อใช้ทำนายค่าด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) regression ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน Standard Normal Variate (SNV) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.90 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Calibration (Standard error of Calibration, SEC) เท่ากับ 4.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Validation (Standard error of prediction, SEP) เท่ากับ 4.94 เปอร์เซ็นต์ ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีด้วยตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี พิจารณาความแม่นโดยใช้ Paired t-test พบว่าค่า t_{ext} มีค่าน้อยกว่า t_{crit} ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับ และ %Recovery ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 15.0% อยู่ในช่วง 80 – 120% พิจารณาความเที่ยงโดยใช้ %RSD พบว่ามีค่า %RSD เฉลี่ยน้อยกว่า 1.9 ผลการวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (%RSD ≤ 1.9) สามารถนำสมการมาใช้ประเมินค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยเทคนิค NIRS ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 15.0% ได้อย่างรวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง และมีความแม่นอยู่ในช่วง 80 – 120%

The objective of this study was to determine organic matter in chemical organic fertilizers by Near Infrared Spectroscopy (NIRS), is non-destructive technique to rapidly and accurately predictions. The chemical organic fertilizers are determined the organic matter content by walkley and black method. The results of organic matter the range was 7.3 – 62.4%. All samples were scanned by NIRS in the region 800 – 2500 nm or 4000 – 12500 cm^{-1} All spectra were pretreated by Standard Normal Variate (SNV). NIRS-PLS technique showed the calibration for predicting organic matter in chemical organic fertilizers, the correlation coefficient (R) was 0.90. The standard error of calibration (SEC) was 4.89%; and standard error of prediction (SEP) was 4.94%. Validation of the method, inspection of accurate by paired t-test showed that t_{ext} lower than t_{crit} at confidence level of 95% (accepted $t_{ext} < t_{crit}$) and recovery at concentration more than 15.0% was 80-120%. Inspection of precision by RSD, the %RSD lower than 1.9. (AOAC accepted %RSD ≤ 1.9) Therefore, calibration model can be used to predict of organic matter contents in

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์

chemical organic fertilizers at concentration more than 15.0% with accuracy in the range of 80-120%.

บทนำ (Introduction)

ปุยอินทรียเคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 หมายความวา ปุยที่มีปริมาณธาตุอาหารรับรองแนนอนโดยมีปริมาณอินทรียวัตถุตามที่รัฐมนตรีกำหนดโดยประกาศในราชกิจจานุเบกษา ซึ่งปริมาณอินทรียวัตถุรับรอง คือ ปริมาณขั้นต่ำของอินทรียวัตถุที่ผู้ผลิต หรือผู้นำเข้าปุยอินทรียรับรองในฉลากวามีอยู่ในปุย อินทรียที่ตนผลิตหรือนำเข้า แล้วแต่กรณี โดยคิดเป็นจำนวนร้อยละของน้ำหนักสุทธิของปุ๋ยอินทรีย์ และกำหนดให้ปุ๋ยอินทรีย์เคมีต้องมีปริมาณอินทรียวัตถุไม่ต่ำกว่าร้อยละ 10 ของน้ำหนัก ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดปริมาณอินทรียวัตถุที่ให้มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554 การวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ด้วยวิธี Walkley and Black Method ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 วิธีทดสอบ 1.28.01 ซึ่งเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ยใช้วิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ มีหลายขั้นตอน ต้องใช้สารเคมี และเวลาในการวิเคราะห์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ลดการใช้สารเคมี และปลอดภัยต่อผู้วิเคราะห์ จึงเป็นที่ต้องการในการวิเคราะห์ดังกล่าว

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ในตัวอย่าง เนื่องจากเป็นเทคนิคการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ ทราบผลภายใน 3-4 นาที มีการศึกษาเทคนิค NIR-PLS เพื่อประเมินองค์ประกอบทางเคมีหรือสมบัติทางกายภาพ เช่น ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์โดยเทคนิค NIRS พบว่าช่วงคลื่นแสง 8800-5299 cm-1 เหมาะสมที่จะใช้ประเมินอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ (จิตติมา และสงกรานต์, 2556) การทำนายค่าอินทรียวัตถุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในดินโดยใช้แสงอินฟราเรดย่านใกล้ พบว่า สมการที่ได้สามารถทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในดินได้ค่อนข้างแม่นยำ โดยมีค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SECV) เท่ากับ 0.12% (ชลันธร และสมศักดิ์, 2557) การหาปริมาณของอินทรียวัตถุในดินโดย NIRS และ PLS (Fidencio, P.H. et al., 2002) ศึกษาเทคนิค NIR-PLS เพื่อพัฒนาการประเมินปริมาณอินทรียคาร์บอนในปุ๋ยอินทรีย์ให้ได้ผลการทดสอบที่รวดเร็วและถูกต้อง (Wang et al., 2014) การเลือกความยาวคลื่นของการวิเคราะห์อินทรียวัตถุในดินโดย NIRS (Pan, T. et al., 2009) การทำนายองค์ประกอบของเส้นใย เถ้า และอินทรียวัตถุในในข้าวโพด (Fassio, A. et al., 2014) เทคนิค NIRS อาศัยหลักการวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนของตัวอย่าง เมื่อรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 4000 – 12500 ต่อเซนติเมตร เดินทางผ่านเข้าไปในตัวอย่าง ทำให้เกิดอันตรกิริยา (interaction) กับอะตอม และโมเลกุลของตัวอย่างนั้น โมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้เข้าไปจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ของตัวอย่างที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะปรากฏในสเปกตรัม NIR การหาความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแต่ละความยาวคลื่นกับค่าทางเคมี โดยทั่วไปมักใช้การวิเคราะห์ถดถอย (regression

analysis) ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple linear regression; MLR) การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square (PLS) regression) การถดถอยองค์ประกอบหลัก (Principle Component Regression; PCR) เป็นต้น โดยวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในขณะนี้ คือ PLS และ PCR เนื่องจากโปรแกรมจะวิเคราะห์การถดถอย เพื่อสร้างสมการแคลิเบรชั่นอย่างอัตโนมัติ รวดเร็ว ทำให้ผู้ใช้สะดวก และเพื่อให้สมการแคลิเบรชั่นมีความเสถียร และมีปัจจัย (factors) ที่เหมาะสม ควรตรวจสอบช่วงความยาวคลื่นที่ดีที่สุดที่สอดคล้องกับการดูดกลืนขององค์ประกอบที่สนใจ ดังนั้นระหว่างการสร้างสมการแคลิเบรชั่นควรลองปรับช่วงความยาวคลื่นที่ใช้วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม และเงื่อนไขการปรับแต่งในแต่ละวิธี เพื่อให้ได้สร้างสมการแคลิเบรชั่นที่มีความแม่นยำที่สุด เพื่อใช้ทำนายค่าคุณสมบัติทางเคมีหรือคุณสมบัติอื่นๆ ของตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ประหยัดเวลาและลดต้นทุนในการใช้สารเคมี (เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, 2555) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยเทคนิค NIRS เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ที่มีความรวดเร็ว ประหยัดเวลา ลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย และปลอดภัยกับผู้วิเคราะห์

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี

คัดเลือก และรวบรวมตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีปริมาณอินทรียวัตถุให้ครอบคลุมทุกระดับความเข้มข้น พร้อมกับรวบรวมข้อมูลของตัวอย่าง

นำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างให้มีความละเอียดไม่น้อยกว่า 20 เมช เทตัวอย่างที่บดแล้วใส่ถุงพลาสติกซิบ ไล่อากาศออกให้หมด และปิดถุงให้สนิท เขียนป้ายบ่งชี้ตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559)

2. การวิเคราะห์ค่าทางเคมี

วิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดย Walkley and Black Method ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 วิธีทดสอบ 1.28.01

การคำนวณ

% อินทรียคาร์บอน (OC) $= \dfrac{0.3896 \times N \times B(C-D)}{wt.of\ sample(g) \times C}$

% อินทรียวัตถุ (OM) $= \dfrac{\%OC}{58} \times 100$

ศูนย์วิทยาการเกษตร

3. วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRS

วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) โดยเทตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีใส่ลงใน Petri dish ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร เพื่อเก็บสเปกตรัม

4. สร้างและปรับปรุงสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration)

หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800 – 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร และค่าทางเคมีของอินทรียวัตถุในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) และในงานวิจัยนี้เลือกใช้ PLS ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์หลายตัวแปร (multivariate analysis) โดยการสร้างแฟกเตอร์แบบสมการเชิงเส้นตรงจากข้อมูลของสเปกตรัมเริ่มต้น และนำแฟกเตอร์ที่ได้ไปใช้ในสมการถดถอย วัตถุประสงค์ของ PLS เพื่อต้องการลดจำนวนข้อมูลสเปกตรัมให้ได้เฉพาะข้อมูลสเปกตรัมที่มีความสำคัญกับการทำนายค่าทางเคมีที่สนใจเท่านั้น เพื่อให้สามารถประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น การประเมินผลความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นสามารถอธิบายได้จากค่าสถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า R (William, 2001)

ค่า R	ความสามารถของสมการแคลิเบรชั่น
± 0.5	ไม่ควรใช้ในการทำนาย (Not usable)
± 0.51 – 0.70	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ (poor correlation)
± 0.71 – 0.80	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (rough screening)
± 0.81 – 0.90	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณ หรือ ประมาณค่าเบื้องต้น (screening)
± 0.91 – 0.95	การทำนายเพื่องานวิจัย (research) และงานทั่วไป
± 0.96 – 0.98	การทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance)
± 0.99 ขึ้นไป	ทุกงาน (any application)

5. ทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ที่ใช้ในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ทวนสอบสมการ Calibration โดยใช้ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยพิจารณาความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) เพื่อให้ได้สมการทำนายผลที่มีความถูกต้อง และแม่นยำ

6.3 พิจารณาความแม่น (Accuracy) โดยใช้ Paired t-test และ %Recovery เปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้ด้วยวิธี NIRS กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี

การคำนวณ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

$$t_{ext} = \frac{\bar{d}}{sd/\sqrt{n}}$$

$$\%Recovery = \frac{\text{ค่าที่ทำนายด้วยวิธี NIR}}{\text{ค่าวิเคราะห์ทางเคมี}} \times 100$$

เมื่อ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง

sd = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

n = จำนวนตัวอย่าง

6.4 พิจารณาความเที่ยง (Precision) โดยใช้ %RSD (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ : Relative Standard Deviation)

การคำนวณ

$$\%RSD = \frac{sd}{\bar{x}} x\,100$$

เมื่อ sd = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{x}$ = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

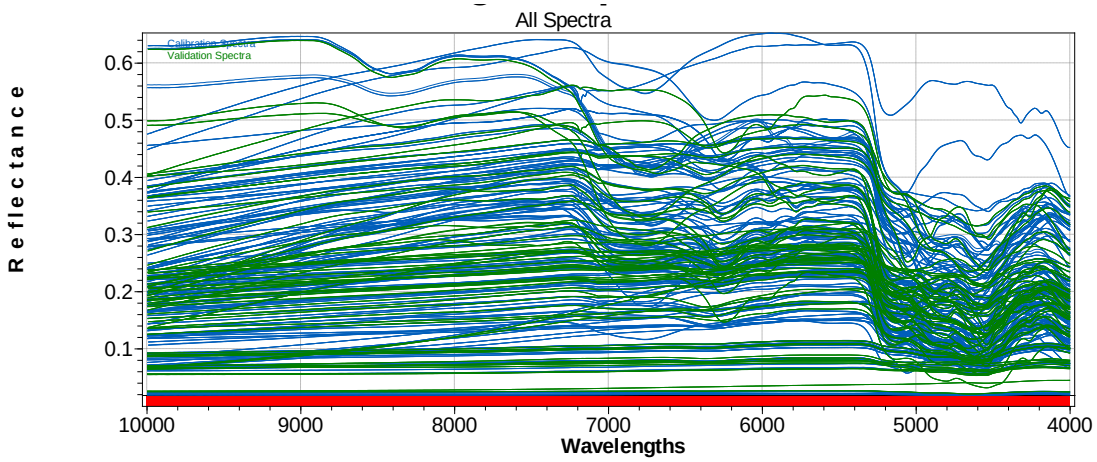
ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการวิเคราะห์ทางเคมีจากการวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุโดย Walkley and Black Method ในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration จำนวน 178 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าพิสัยอยู่ในช่วง 7.3 – 62.4 เปอร์เซ็นต์

2. ผลการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRS

จากการวัดตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีเพื่อหาปริมาณอินทรียวัตถุ โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) พบว่าได้สเปกตรัมอยู่ในช่วงความยาวคลื่น (wave length) 1000-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-10000 ต่อเซนติเมตร (ภาพที่ 1)

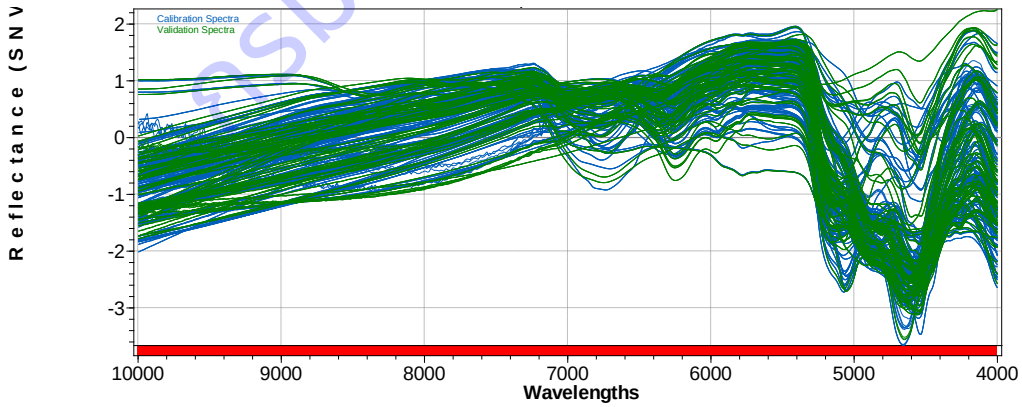
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 Original spectra ของตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีในช่วงเลขคลื่น 4000-10000 ต่อเซนติเมตร

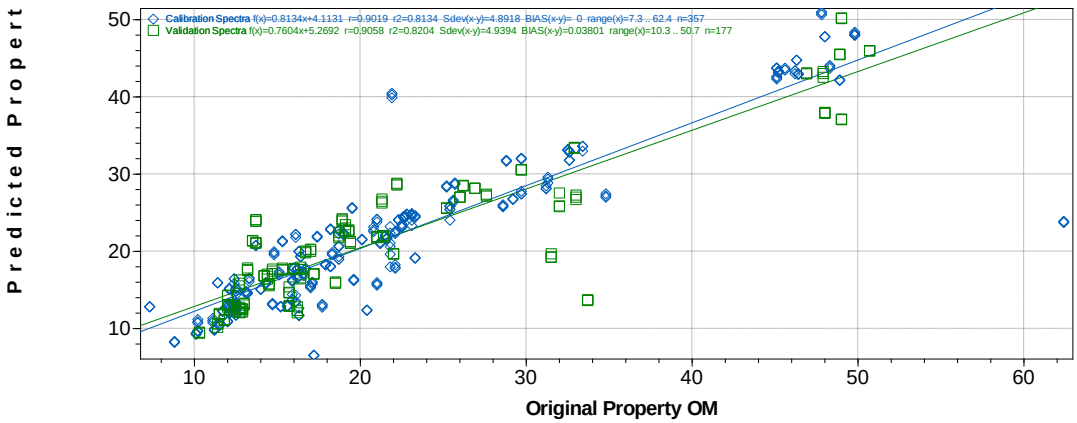
3. สมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ของปริมาณอินทรียวัตถุ

นำค่าการดูดกลืนแสง และค่าทางเคมีของอินทรียวัตถุในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี มาสร้างสมการ Calibration โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) ด้วยวิธี Partial Least Square (PLS) regression ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน Standard Normal Variate (SNV) เพื่อลดอิทธิพลของการกระเจิงแสงออกจากสเปกตรัม สาเหตุให้เกิดความแปรปรวนในข้อมูลที่วัด (ภาพที่ 2) พบว่า สมการ Calibration ของปริมาณอินทรียวัตถุ มีค่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R) เท่ากับ 0.90 แสดงว่าสามารถทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณ หรือประมาณค่าเบื้องต้น (screening) ได้ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Calibration (SEC) เท่ากับ 4.89 เปอร์เซ็นต์ และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายกลุ่มตัวอย่าง Validation (SEP) เท่ากับ 4.94 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 สเปกตรัมที่ปรับแต่งด้วย Standard Normal Variate (SNV) ของตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีทางเคมี และค่าที่ทำนายได้ด้วย NIRS ของปริมาณอินทรียวัตถุในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี

4. ผลทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) ที่ใช้ในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยเทคนิค NIRS

เมื่อนำตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีปริมาณอินทรียวัตถุที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง จำนวน 20, 31 และ 21 ตัวอย่าง ตามลำดับ มาทวนสอบสมการที่ใช้ทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี พิจารณาความแม่นโดยเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้ (เทคนิค NIRS) กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี ด้วย Paired t-test พบว่า มีค่า $t_{ext} < t_{crit}$ ทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าผลการวิเคราะห์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ %Recovery ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง อยู่ในช่วง 75-127%, 81-117% และ 92-114% ตามลำดับ พิจารณาความเที่ยงด้วย %RSD พบว่า มีค่า %RSD เฉลี่ย น้อยกว่า 1.9 ทุกระดับความเข้มข้น ผลการวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (AOAC, 2016) (ตารางที่ 2)

จากข้อมูลแสดงว่าสามารถนำสมการ Calibration มาใช้ประเมินค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ได้อย่างรวดเร็ว และไม่ทำลายตัวอย่าง ความแม่นของการประเมินค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีโดย NIRS ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15.1% อยู่ในช่วง 75 – 127% ความเข้มข้น 15.1-20.0% อยู่ในช่วง 81 – 117% และความเข้มข้นมากกว่า 20.0% อยู่ในช่วง 92 – 114%

ตารางที่ 2 ประเมิน Accuracy และ Precision ของสมการที่ใช้ในการทำนายปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี

Concentration	Accuracy			Precision	
	Paired t-test		%Recovery	$\%RSD_{ext}$	$\%RSD_r$
	$t_{ext.}$	$t_{crit.}$			
Low (≤15.0%)	-0.29	2.09	75 - 127	1.66	1.9
Medium (15.1-20.0%)	-1.28	2.13	81 - 117	1.46	1.9
High (>20.0%)	-0.66	2.06	92 - 114	0.41	1.9

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

กรมวิทยาศาสตร์

การหาปริมาณอินทรียวัตถุในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) วิธีการวัดแบบ Reflectance สามารถนำสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) มาใช้ประเมินค่าปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมีโดย NIRS ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 15.0% ได้อย่างรวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง และมีความแม่น อยู่ในช่วง 80 – 120% สำหรับที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 15.0% ยังคงต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาสมการที่ใช้ในการทำนาย สมการ Calibration ที่ดีควรมีการปรับปรุง โดยเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้มีความหลากหลาย ค่าทางเคมีในตัวอย่างควรมีค่าที่กระจายอย่างสม่ำเสมอตลอดช่วงของค่าทั้งหมด หรือมีความแปรปรวนครอบคลุมค่าของตัวอย่างในอนาคต เพื่อให้ได้สมการ Calibration ที่เหมาะสม มีความถูกต้อง และแม่นยำ ตลอดการใช้งาน

พิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้

Identity and to determine the chemical and physical properties of hydrated lime by near infrared spectrophotometer

สงกรานต์ มะลิสอน ญาณธิชา จิตต์สะอาด สุภา โพธิจันทร์ จิตติรัตน์ ชูชาติ
พจมาลย์ ภู่สาร กัญฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

พิสูจน์เอกลักษณ์ สมบัติทางเคมีและกายภาพ สารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว
เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
Identity chemical and physical properties hydrated lime
Near Infrared Spectroscopy

บทคัดย่อ (Abstract)

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วในการวิเคราะห์และไม่ทำลายตัวอย่าง เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นข้อมูลประกอบการกำหนดเกณฑ์เพื่อรองรับกฎหมายการควบคุมคุณภาพของสารปรับปรุงดิน พบว่าสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ มีลักษณะสเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์ การจัดจำแนกโดยการจัดกลุ่ม (Cluster calibration) สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Derivatives 1 st Savitzky - Golay 9 Points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) สามารถจัดจำแนกได้ดี ทำนายได้อย่างถูกต้องร้อยละ 100 สำหรับตัวอย่างสารปรับปรุงดินชนิดนั้นที่ไม่มีตัวอย่างปูนชนิดอื่นผสม ในขณะที่ตัวอย่างปูนผสม สามารถจำแนกได้หรือตรวจพบการผสมปูนชนิดอื่น ร้อยละ 40.7 ซึ่งพบว่าจำแนกได้ดีที่สุดในการผสมโดโลไมท์กับปูนมาร์ล ส่วนการผสมที่มีปูนขาวผสมกับปูนชนิดอื่นจะจำแนกหรือตรวจพบการผสมได้น้อยลง

การประเมินค่าทางเคมี ได้สมการที่ตอบสนองดีที่สุด ในรายการ CaO การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ Sa3, ncl, db1 มีค่า r 0.93 ค่า SEC 2.46 และค่า SEP 2.40 รายการ CCE การ

กรมวิชาการเกษตร

ปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ ds2 มีค่า r 0.90 ค่า SEC 3.21 และค่า SEP 2.57 รายการ pH การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ db1 มีค่า r 0.82 ค่า SEC 0.04 และค่า SEP 0.04 การประเมินความแม่น (Accuracy) จากการประเมินทางสถิติ t-test paired two sample for mean พบว่ามีค่า 0.15, -0.68 และ 0.005 ซึ่งน้อยกว่า t จากตาราง (t_{crit}) การคำนวณ % Recovery รายการ CaO มีค่า 92.10 – 109.23 รายการ CCE มีค่า 94.48 - 109.06 รายการ pH มีค่า Absolute difference 0.01 – 0.11 และการประเมินความเที่ยง (Precision) จาก %RSD พบว่า มีค่า 0.01 – 0.86 และ 0.04 – 1.18 ในรายการ CaO CCE การประเมินค่าทางเคมีแสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วยวิธี NIRS สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ CaO CCE และ pH ในตัวอย่างปูนขาวได้อย่างแม่นยำ และมีความเที่ยง

Identity and to determine the chemical and physical properties of hydrated lime by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). This is a technique that is fast in analysis and does not destroy samples to be used in qualitative and quantitative analysis It is a supplementary information for the determination of criteria to support the law on quality control of soil amendments. It was found that hydrated lime, marl and dolomite have unique spectral characteristics. Classification by cluster calibration. Derivatives 1st Savitzky - Golay 9 Points (dg1) and Normalization to Unit Length (nle) pretreatments can be classified well. 100% accurate prediction for that soil amendment sample without other calcareous samples. while 40.7% can be classified or detected of mixed soil amendment. It is best classified as a mixture of dolomite and marl, mixtures containing hydrate lime and other types of soil amendment were less classified or detectable.

Chemical evaluation results in the CaO. The pretreatment was Sa3, ncl, db1 with r-value of 0.93, SEC 2.46 and SEP 2.40, CCE was ds2 pretreatment had r-value 0.90, SEC 3.21 and SEP 2.57, pH was db1 pretreatment had an r-value of 0.82, a SEC value of 0.04 and a SEP value of 0.04. Accuracy of the t-test paired two sample for mean values were 0.15, -0.68 and 0.005, which were less than t-critical. Calculation of % Recovery, the items CaO were 92.10 – 109.23 items, CCE were 94.48 - 109.06 items, pH had an absolute difference of 0.01 – 0.11, and the precision assessment of %RSD was found to be 0.01 – 0.86. and 0.04 – 1.18 on the CaO CCE. The NIRS analysis was able to accurately and have precision for determine of CaO, CCE and pH in hydrate lime samples.

บทนำ (Introduction)

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared spectroscopy; NIRS) อาศัยหลักการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนของตัวอย่างโดยคลื่นแสงในช่วงอินฟราเรดย่านใกล้ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 800-2,500 นาโนเมตรส่องเข้าไปในตัวอย่างทำให้โมเลกุลของตัวอย่างดูดกลืน (Absorb) พลังงาน แล้วเกิดการสั่นสะเทือน (Vibration) ของโมเลกุลในกลุ่มฟังก์ชันนัล (Functional Groups)

สารบัญการเกษตร

ได้แก่ การยืดหด (Stretching) และการเปลี่ยนมุม (Blending) การตรวจวัดพลังงานทำได้หลายรูปแบบ เช่น วัดการสะท้อน (Reflectance) วัดการส่องผ่าน (Transmittance) เป็นต้น สเปกตรัมที่ได้จะถูกนำมาแยกแยะลักษณะเฉพาะ เพื่อประมวลผลและหาความสัมพันธ์ทางคณิตศาสตร์และสถิติ (Chemometrics) กับข้อมูลของตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีหรือวิธีอื่นๆของห้องปฏิบัติการ จะได้สมการสอบเทียบมาตรฐาน (Calibration Equation) เพื่อใช้ทำนายค่าคุณสมบัติทางเคมี สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative) และเชิงคุณภาพ (Qualitative) เป็นวิธีการที่ให้ผลที่ดีรวดเร็ว ไม่ทำลายตัวอย่าง และลดการใช้สารเคมีในห้องปฏิบัติการจึงถูกนำมาใช้ในการจำแนกองค์ประกอบและคุณสมบัติต่างๆ ของตัวอย่างทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณได้เป็นอย่างดี

สารปรับปรุงดิน ซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติหรือการสังเคราะห์ขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติของดินทั้งทางกายภาพและทางเคมีเพื่อให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้นเหมาะแก่การปลูกพืช เกษตรกรจึงนิยมนำมาใช้ปรับปรุงบำรุงดินก่อนการเพาะปลูก โดยปูนขาว (Hydrate lime) ก็ถือเป็นสารปรับปรุงดินชนิดหนึ่ง ที่มีองค์ประกอบในรูป $Ca(OH)_2$ เตรียมได้จากการนำปูนเผา (Quick lime หรือ burned lime) ขณะที่ยังเป็นก้อนแข็ง เมื่อเย็นแล้วนำน้ำมาพรมให้ชุ่มสารประกอบออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับน้ำเกิดเป็นสารประกอบไฮดรอกไซด์ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) ถือเป็นปูนทางการเกษตรที่ใช้ในการปรับปรุงดินที่เป็นกรด

เนื่องจากปัจจุบันมีสารปรับปรุงดินที่จำหน่ายตามท้องตลาดแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและการนำไปใช้แตกต่างกัน อีกทั้งยังไม่มีหน่วยงานภาครัฐ หรือกฎหมายเข้ามากำกับดูแลด้านคุณภาพ หรือเกณฑ์กำหนดปริมาณธาตุอาหารของสารปรับปรุงดิน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ในการจัดจำแนกและตรวจหาปริมาณสารปรับปรุงดิน ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการกำหนดเกณฑ์ประกอบกับการเตรียมรองรับกฎหมายการควบคุมคุณภาพของสารปรับปรุงดินของกรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. เตรียมตัวอย่างที่ทราบชนิดตามมาตรฐานของตัวอย่างปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ โดยตัวอย่างที่เตรียมจะนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ สร้างสมการการจัดจำแนกชนิดปูน สร้างสมการประเมินค่าทางเคมีและใช้สำหรับทวนสอบสมการ
2. การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธี NIR โดยทำการเทตัวอย่างสารปรับปรุงดินปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ ที่เตรียมใส่ลงใน Petridish ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร
3. การจัดจำแนกชนิดปูน

3.1 นำสเปกตรัม (Spectrum) จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ มาพิจารณาสเปกตรัม (Spectrum) ที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนแต่ละชนิด

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผสมสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาวกับปูนชนิดอื่นในอัตราส่วนโดยปริมาตร 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1

3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRS เพื่อพิจารณาสเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนแต่ละชนิด และตัวอย่างที่ได้จากการผสม

3.4 นำสเปกตรัม (Spectrum) จาการวัดค่าการดูดกลืนแสง มาปรับแต่ง (Pretreatments) โดยวิธีทางคณิตศาสตร์ โดยเลือกเลือกวิธีปรับแต่งสเปกตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุด เพื่อจัดจำแนกชนิดของ ปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์

3.5 สร้างและปรับปรุงสมการจัดจำแนกชนิดปูน

3.6 ประเมินผลโดยสมการจัดจำแนกชนิดปูนของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว ปูนมาร์ล โดโลไมท์ และการผสมสารปรับปรุงดิน

4. การประเมินผลทางเคมี

4.1 นำตัวอย่างปูนขาววิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมออกไซด์ (CaO) ค่าการทำให้เป็นกลาง (CCE) และความเป็นกรด ด่าง (pH)

4.2 นำสเปกตรัม (Spectrum) สร้างและปรับปรุงสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปกตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปกตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุด พิจารณา ค่า correlation coefficient (r) ค่าค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (standard error of calibration; SEC) และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (standard error of prediction; SEP) ในรายการทดสอบ ปริมาณแคลเซียมออกไซด์ (CaO) ค่าการทำให้เป็นกลาง (CCE) และความเป็นกรด ด่าง (pH)

4.3 สร้างและปรับปรุงสมการประเมินผลค่าทางเคมีของปูนขาว

4.4 ประเมินผลค่าทางเคมีของปูนขาว

5. ทวนสอบสมการ และประเมินความแม่น และความเที่ยง ของตัวอย่างปูนขาว

5.1 พิจารณาความแม่น (Accuracy) โดยใช้ Paired t-test เปรียบเทียบค่าที่ประเมินได้ด้วยวิธี NIRS กับค่าวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการ และ %Recovery หรือ Absolute difference

5.2 พิจารณาความเที่ยง (Precision) โดยใช้ %RSD (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ : Relative Standard Deviation)

6. สรุปผล และรายงานผล

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. การจัดจำแนกชนิดปูน

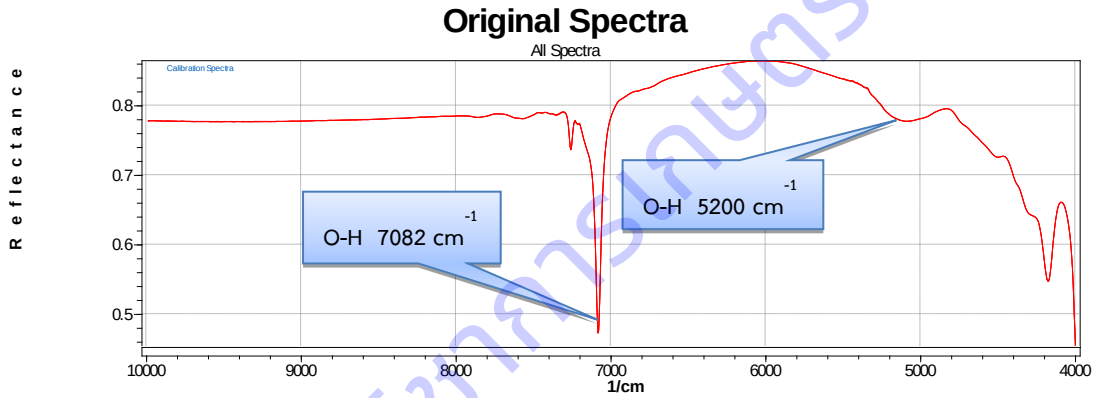
สำนักวิชาการเกษตร

1.1 พิจารณาสเปกตรัมของสารปรับปรุงดิน

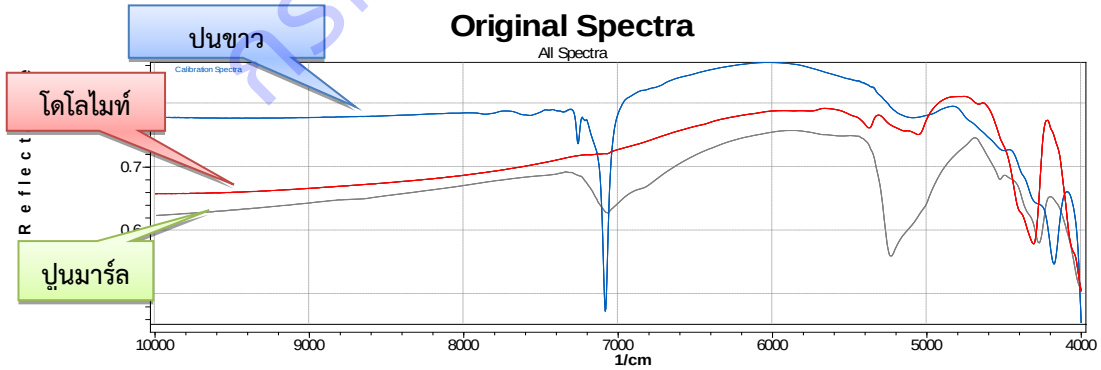
จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ ด้วยเครื่อง NIRS พบว่า มีแถบการดูดกลืนแสงตำแหน่งเลขคลื่น 7082 cm^{-1} และ5200 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งหมู่ฟังก์ชัน O-H แสดงถึงเอกลักษณ์ของปูนขาวที่มีสูตรโครงสร้างของสาร คือ $Ca(OH_2)$ ตามภาพที่ 1 และเมื่อพิจารณาสเปกตรัมของปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ ก็พบว่า สเปกตรัมมีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของปูนแต่ละชนิด ตามภาพที่ 2

1.2 พิจารณาสเปกตรัมการผสมสารปรับปรุงดิน

จากการผสมสารปรับปรุงดินสองชนิด ชนิดละ 9 อัตราส่วน โดยปริมาตร พบว่า การผสมปูนขาวผสมกับปูนมาร์ล แสดงสเปกตรัมที่ตำแหน่งเลขคลื่น 7000 - 7200, 5000 – 5300 และ 4100 – 4300 (ภาพที่ 3) และปูนขาวผสมกับโดโลไมท์แสดงสเปกตรัมที่ตำแหน่งเลขคลื่น 7000- 7200, 5000 – 5300 และ 4000 – 4400 (ภาพ 4) สเปกตรัมมีลักษณะเปลี่ยนแปลงตามอัตราส่วนในการผสม

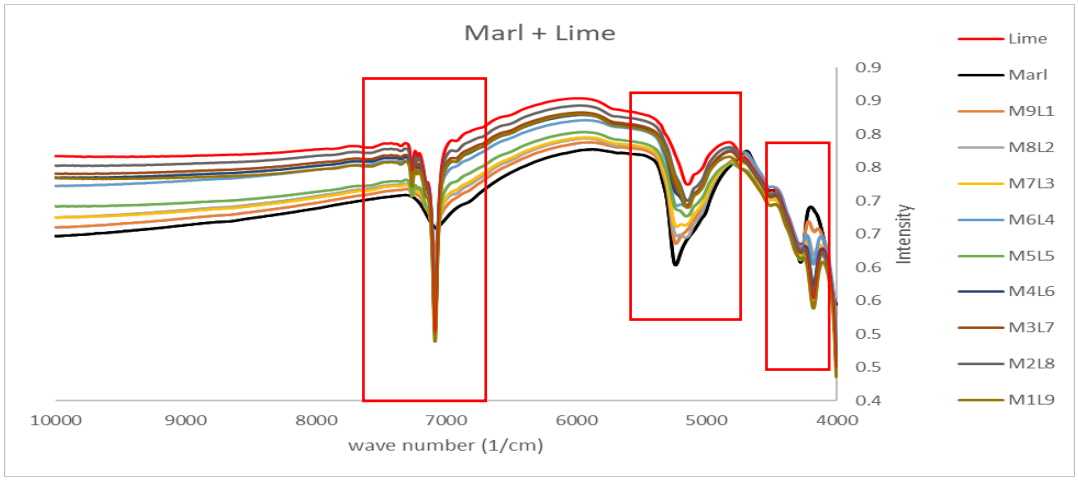


ภาพที่ 1 แสดงสเปกตรัมของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว

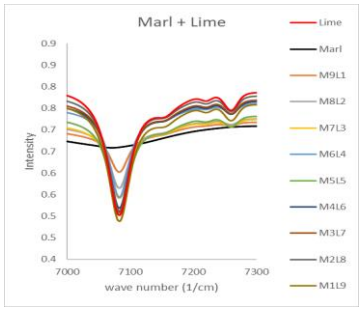


ภาพที่ 2 แสดงสเปกตรัมของสารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์

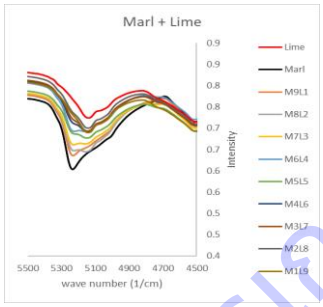
กรมวิชาการเกษตร



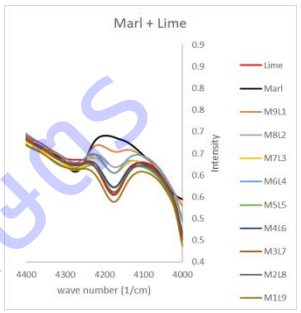
a)



b)



c)



d)

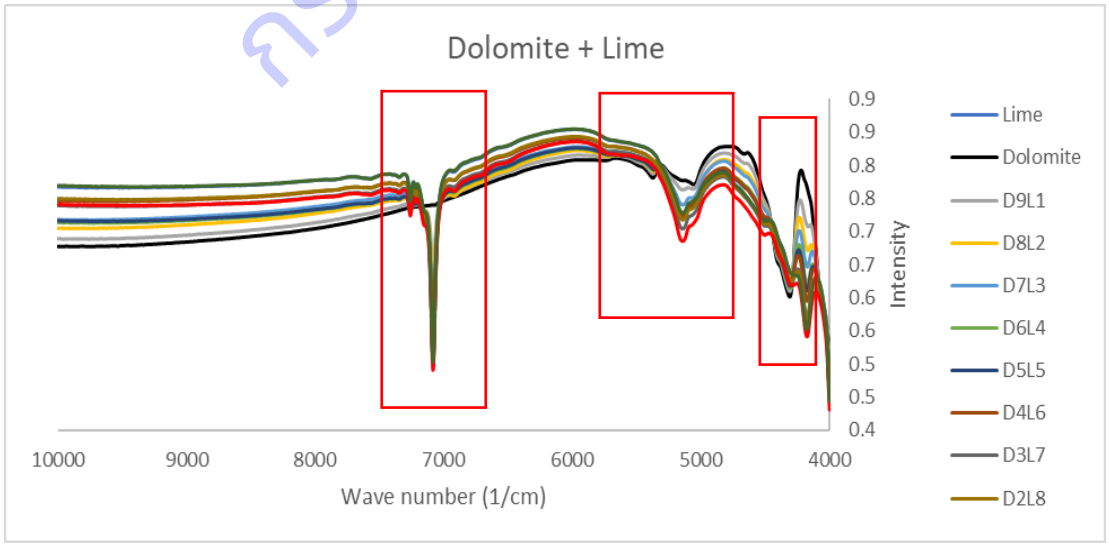
ภาพที่ 3 แสดง Original spectra ของการผสมปูนขาวกับปูนมาร์ล 9 อัตราส่วนโดยปริมาตร

a) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 4000 – 10000

b) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 7000 – 7200

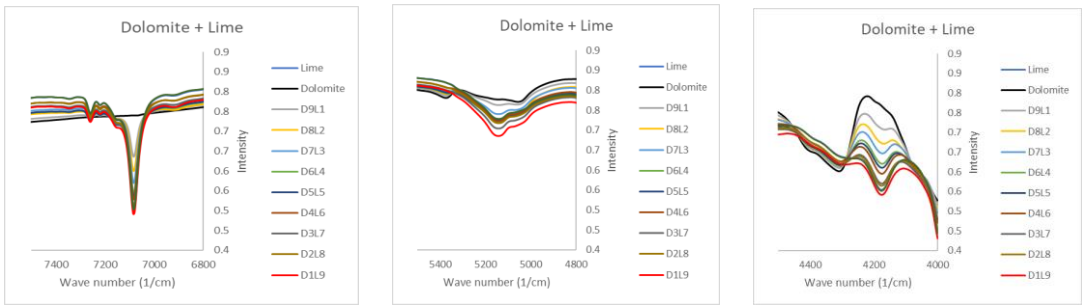
c) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 5000 – 5300

d) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 4100 – 4300



a)

กรมวิชาการเกษตร



b) c) d)

ภาพที่ 4 แสดง Original spectra ของการผสมปูนขาวกับโดโลไมท์ 9 อัตราส่วนโดยปริมาตร

a) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 4000 – 10000

b) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 7000 – 7200

c) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 5000 – 5300

d) ตำแหน่งเลขคลื่น (wave number) 4000 – 4400

กรมวิชาการเกษตร

1.3 จัดจำแนกสารปรับปรุงดินโดยใช้วิธีการจัดกลุ่ม

จากการนำตัวอย่างปูนขาว โดโลไมท์ และปูนมาร์ล ทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS ได้ Original spectra ดังแสดงตามภาพที่ 5 เพื่อนำไปสร้างสมการ โดยใช้แบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) และทำการปรับแต่งสเปกตรัมเพื่อให้ได้สมการที่สามารถแยกได้ดีที่สุด พบว่าสมการแบบจัดกลุ่มปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Derivatives 1st Savitzky - Golay 9 Points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) ดังแสดงตามภาพที่ 6

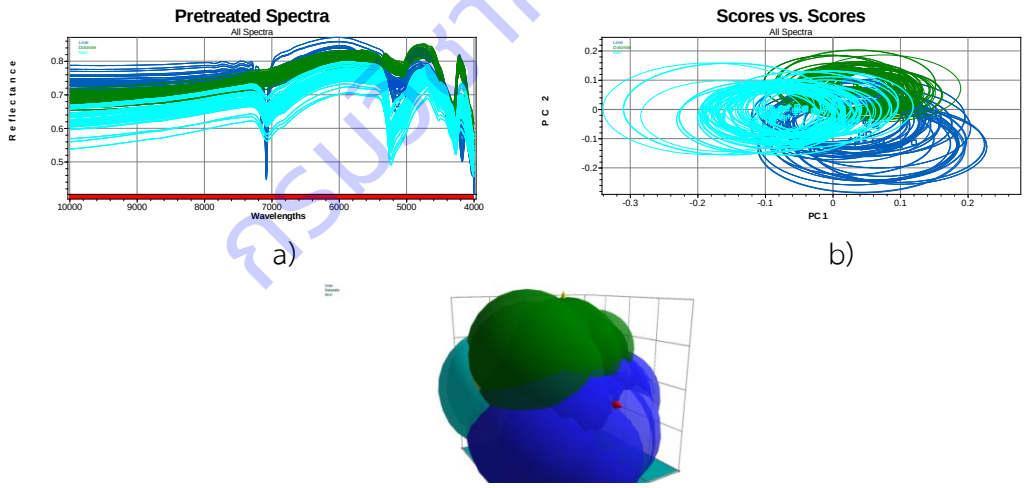
1.3.1 ประเมินผลการจัดจำแนกชนิดสารปรับปรุงดินปูนขาว โดโลไมท์ และปูนมาร์ล จำนวน 56 ตัวอย่าง สามารถจัดกลุ่มได้อย่างถูกต้องตรงตามชนิดปูนร้อยละ 100

1.3.2 ประเมินผลการจัดจำแนกชนิดสารปรับปรุงดินในตัวอย่างปูนผสมสองชนิด ชนิดละ 9 อัตราส่วน โดยปริมาตร ทั้งหมดจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่า สามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.7 ดังนี้

1) การผสมปูนขาวกับโดโลไมท์ สามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.1 เมื่อมีปริมาตรปูนขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 10

2) การผสมโดโลไมท์กับปูนมาร์ลสามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 77.8 เมื่อมีปริมาตรโดโลไมท์มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30

3) การผสมปูนขาวกับปูนมาร์ลสามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 เมื่อมีปริมาตรปูนขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30

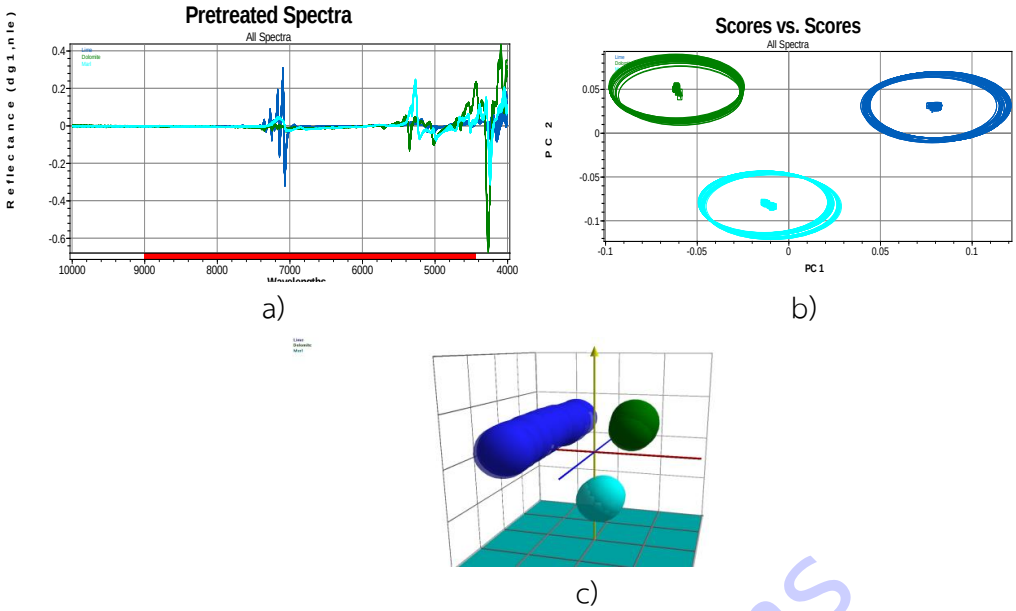


a) b)

c)

ภาพที่ 5 สมการแบบจัดกลุ่ม Original spectra ของตัวอย่างปูนขาว โดโลไมท์ และปูนมาร์ล จำนวน 150 ตัวอย่าง a) แบบ original b) แบบ original 2D c) แบบ original 3D

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 6 สมการแบบจัดกลุ่มปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Derivatives 1st Savitzky - Golay 9 Points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) ของตัวอย่างปูนขาว โดโลไมท์ และปูนมาร์ล จำนวน 150 ตัวอย่าง a) แบบปรับแต่ง b) แบบปรับแต่ง 2D c) แบบปรับแต่ง 3D

2. การประเมินผลทางเคมี

2.1 จากการนำตัวอย่างปูนขาว 50 ตัวอย่างวิเคราะห์ผลค่าทางเคมีโดยวิธีห้องปฏิบัติการ พบว่า รายการแคลเซียมไฮดรอกไซด์ CaO มีค่า 49.27 - 74.95% รายการค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง (CCE) มีค่า 100.64 - 135.30% และรายการความเป็นกรด ด่าง (pH) มีค่า 12.70 - 12.96 (ตารางที่ 1)

2.2 จากการนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปกตรัมเพื่อให้ได้สเปกตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุด โดยพิจารณา ค่า correlation coefficient (r) ค่าค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (standard error of calibration; SEC) และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (standard error of prediction; SEP) เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาความแม่นยำของสมการประเมินค่าทางเคมี พบว่า รายการ CaO การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ Sa3, ncl, db1 มีค่า r 0.93 ค่า SEC 2.46 และค่า SEP 2.40 รายการ CCE การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ ds2 มีค่า r 0.90 ค่า SEC 3.21 และค่า SEP 2.57 รายการ pH การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ db1 มีค่า r 0.82 ค่า SEC 0.04 และค่า SEP 0.04 (ตาราง 2) และแสดงสเปกตรัมในรายการ CaO ดังแสดงตามภาพที่ 7- 8 รายการ CCE แสดงตามภาพที่ 9 - 10 และรายการความเป็นกรด - ด่าง แสดงตามภาพที่ 11 - 12

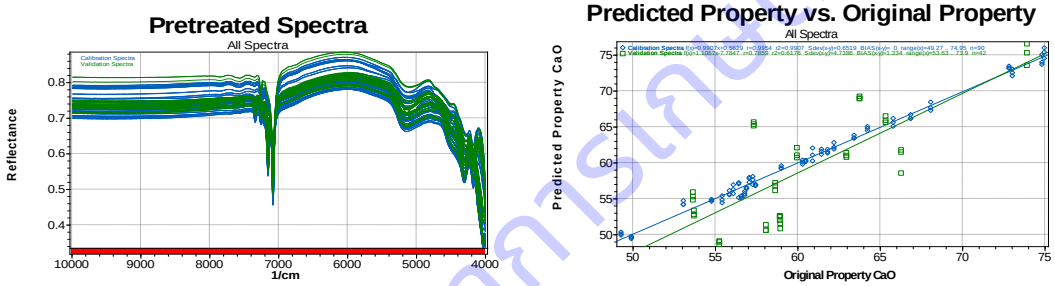
ตารางที่ 1 แสดงค่าทางเคมี และค่าประเมินทางเคมีด้วยวิธี NIR ของรายการ CaO CCE และ pH

กรมวิชาการเกษตร

รายการ	CaO (%)	CCE (%)	pH (pH unit)
ค่าทางเคมี	49.27 - 74.95	100.64 - 135.30	12.70 - 12.96
ค่าทำนายจาก NIR	53.81 - 73.82	109.76 - 135.94	12.74 - 12.88

ตารางที่ 2 แสดง ค่าความสัมพันธ์ (r) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (SEC) และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ (SEP)

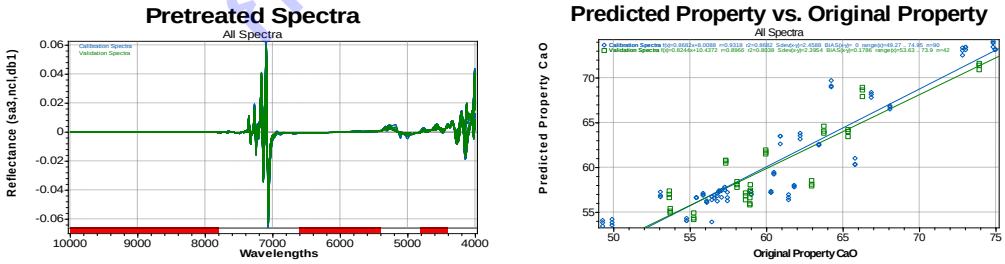
รายการทดสอบ	การปรับแต่งสมการ (Pretreatment)	r	SEC	SEP
CaO	Smmoting Average 3 Points, Nomalization by Closure, Derivatives 1st BCAP (Sa3, ncl, db1)	0.93	2.46	2.40
CCE	Derivatives 2nd Taylor 3 Points Segment5 Gap5 BCAP (ds2)	0.90	3.21	2.57
pH	Derivatives 1st BCAP (db1)	0.82	0.04	0.04



a) b)

ภาพที่ 7 Original spectra และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมี ของรายการวิเคราะห์ CaO

a) Original spectra b) และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการและค่าจากวิธี NIRS



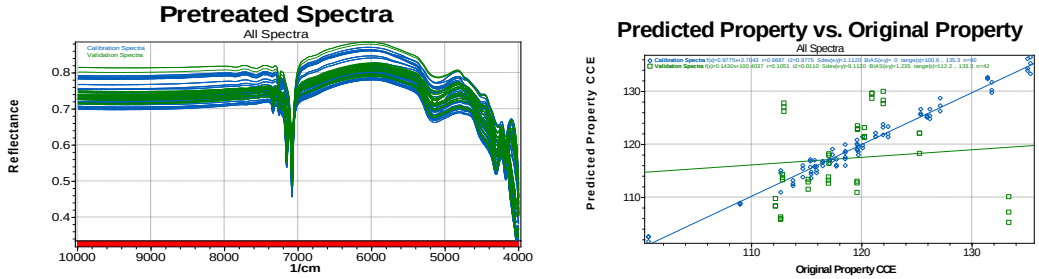
a) b)

ภาพที่ 8 สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Sa3, ncl, db1 และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS ของรายการวิเคราะห์ CaO

a) สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Sa3, ncl, db1

b) ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS

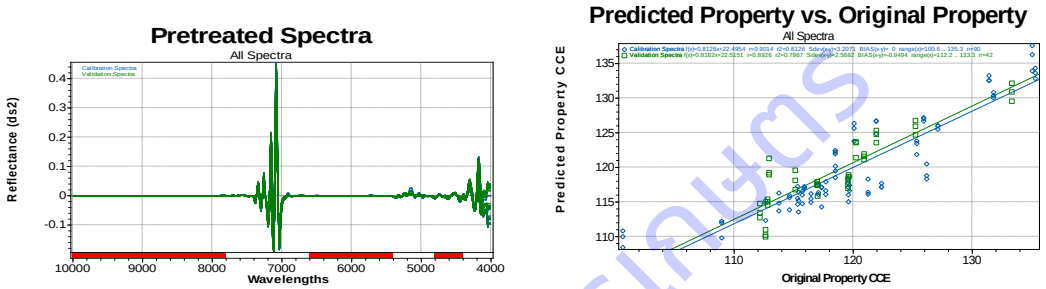
กรมวิชาการเกษตร



a) b)

ภาพที่ 9 Original spectra และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS ของรายการวิเคราะห์ CCE

a) Original spectra b) และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS

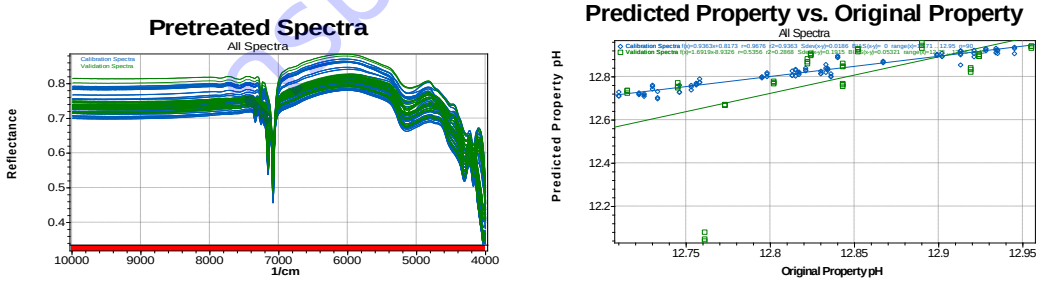


a) b)

ภาพที่ 10 สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ ds2 และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS ของรายการทดสอบ CCE

a) สมการปรับแต่ง แบบ ds2

b) ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS

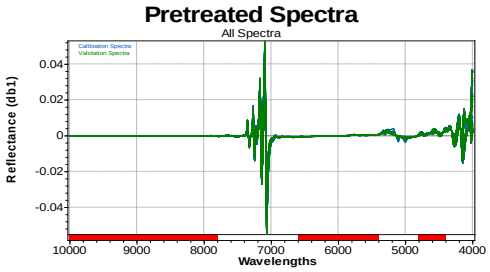


a) b)

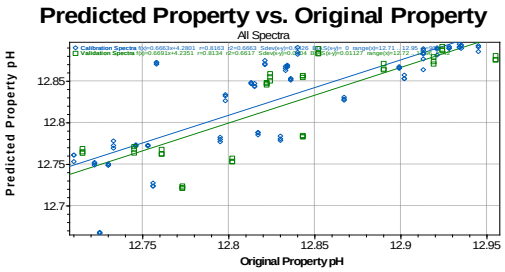
ภาพที่ 11 Original spectra และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS ของรายการวิเคราะห์ pH

a) Original spectra b) ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS

ระบบวิชาการเกษตร



a)



b)

ภาพที่ 12 สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ db1 และค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS ของรายการวิเคราะห์ pH

a) สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ db1

b) ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ และค่าจากวิธี NIRS

2.3 การประเมินความแม่น (Accuracy) จากการประเมินทางสถิติ t-test paired two sample for mean พบว่า t ที่ได้จากการคำนวณ (t_{ext}) มีค่า 0.15, -0.68 และ 0.005 ซึ่งน้อยกว่า t จากตาราง (t_{crit}) การคำนวณ % Recovery รายการ CaO มีค่า 92.10 – 109.23 รายการ CCE มีค่า 94.48 - 109.06 รายการ pH มีค่า Absolute difference 0.01 – 0.11 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (DEQ, 2013) และการประเมินความเที่ยง (Precision) จาก %RSD พบว่า มีค่า 0.01 – 0.86 และ 0.04 – 1.18 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (AOAC, 2016) ในรายการ CaO CCE แสดงให้เห็นว่า การประเมินค่าทางเคมีด้วยวิธี NIRS ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ CaO CCE และ pH (ตาราง 3) ในตัวอย่างปูนขาวได้อย่างแม่นยำ และมีความเที่ยง

อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้เป็นการสร้างสมการแคลิเบรชั่นจากกลุ่มตัวอย่างจำนวนน้อย ในการสร้างสมการสมการแคลิเบรชั่นต้องมีกลุ่มตัวอย่างจำนวนมากพอและครอบคลุมความแปรปรวนของตัวอย่างหากต้องการนำไปใช้ต้องทำการพัฒนาและปรับปรุงสมการเพื่อนำมาใช้ประเมินค่าเชิงปริมาณให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างในการสร้างสมการให้มากขึ้นและมีค่าทางเคมีที่กระจายอย่างสม่ำเสมอกันและคลอบคลุมการใช้งานจริง

ตารางที่ 3 ประเมินความแม่น (Accuracy) และ ความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์ด้วยวิธี NIR รายการทดสอบ CaO CCE และ pH จำนวน 45 ตัวอย่าง

รายการทดสอบ	Accuracy				Precision		
	$t_{ext.}$	$t_{crit.}$	Evaluation	%Recovery[1]/ Absolute difference[2]	%RSD	เกณฑ์ %RSD	Evaluation
CaO	0.15	2.02	non significant	92.10 - 109.23[1]	0.01 – 0.86	1.9	pass
CCE	-0.68	2.02	non significant	94.48 - 109.06[1]	0.04 – 1.18	1.3	pass

กรมวิชาการเกษตร

pH	0.005	2.02	non significant	0.01 - 0.11[2]	-	-	-

หมายเหตุ Absolute difference คือ ค่าสัมบูรณ์ผลต่างระหว่างค่าทางเคมี และค่าจากวิธี NIRS

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

สารปรับปรุงดินชนิดปูนขาว ปูนมาร์ล และโดโลไมท์ มีสเปกตรัมที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว สามารถจัดจำแนกโดยการพิจารณาเอกลักษณ์ และยังพบว่าตัวอย่างการผสมสารปรับปรุงดินก็แสดงสเปกตรัมที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงตามอัตราส่วนในการผสมอีกด้วย การจัดจำแนกโดยการจัดกลุ่ม (Cluster calibration) สมการปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Derivatives 1st Savitzky - Golay 9 Points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) สามารถจัดจำแนกได้ดี ทำนายได้อย่างถูกต้องร้อยละ 100 สำหรับตัวอย่างสารปรับปรุงดินชนิดนั้นที่ไม่มีตัวอย่างปูนชนิดอื่นผสม ในขณะที่ตัวอย่างปูนผสม สามารถจำแนกได้หรือตรวจพบการผสมปูนชนิดอื่น ร้อยละ 40.7 ซึ่งพบว่าจำแนกได้ดีที่สุดในการผสมโดโลไมท์กับปูนมาร์ล ส่วนการผสมที่มีปูนขาวผสมกับปูนชนิดอื่นจะจำแนกหรือตรวจพบการผสมได้น้อยลง

การประเมินค่าทางเคมีจากการนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปกตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปกตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุด พบว่า ได้สมการปรับแต่งดีที่สุด รายการ CaO การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ Sa3, ncl, db1 มีค่า r 0.93 ค่า SEC 2.46 และค่า SEP 2.40 รายการ CCE การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ ds2 มีค่า r 0.90 ค่า SEC 3.21 และค่า SEP 2.57 รายการ pH การปรับแต่งสมการ (Pretreatment) แบบ db1 มีค่า r 0.82 ค่า SEC 0.04 และค่า SEP 0.04 การประเมินความแม่น (Accuracy) จากการประเมินทางสถิติ t-test paired two sample for mean พบว่า t ที่ได้จากการคำนวณ (text) มีค่า 0.15, -0.68 และ 0.005 ซึ่งน้อยกว่า t จากตาราง (tcrit) การคำนวณ % Recovery รายการ CaO มีค่า 92.10 – 109.23 รายการ CCE มีค่า 94.48 - 109.06 รายการ pH มีค่า Absolute difference 0.01 – 0.11 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (DEQ, 2013) และการประเมินความเที่ยง (Precision) จาก %RSD พบว่า มีค่า 0.01 – 0.86 และ 0.04 – 1.18 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (AOAC, 2016) ในรายการ CaO CCE แสดงให้เห็นว่า การประเมินค่าทางเคมีด้วยวิธี NIRS ใช้วิเคราะห์หาปริมาณ CaO CCE และ pH ในตัวอย่างปูนขาวได้อย่างแม่นยำ และมีความเที่ยง

พิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้

Identity and to determine the chemical and physical properties of Dolomite by Near Infrared Spectroscopy

สุภา โพธิจันทร์ ญาณธิชา จิตต์สะอาด สงกรานต์ มะลิสอน
พจมาลย์ ภู่สาร จิตติรัตน์ ชูชาติ กัญฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

พิสูจน์เอกลักษณ์ สมบัติทางเคมีและกายภาพ สารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์

สำนักวิทยบริการฯ

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Identity chemical and physical properties Dolomite

Near Infrared Spectroscopy

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ (Abstract)

เทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) เป็นวิธีการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ประหยัดเวลา ลดต้นทุนในการใช้สารเคมีและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ห้องปฏิบัติการจึงมีความสนใจศึกษาเทคนิคนี้ สำหรับใช้ในการจัดจำแนกชนิดและทำนายผลค่าทางเคมีของสารปรับปรุงดินประเภทปูน โดยเตรียมตัวอย่างโดโลไมท์และปูนชนิดอื่น พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอินฟราเรดย่านใกล้ (Near-Infrared Spectroscopy, NIRS) ในช่วงความยาวคลื่น 800 ถึง 2500 นาโนเมตร พิสูจน์เอกลักษณ์จากสเปคตรัมของปูนแต่ละชนิด สร้างและปรับปรุงสมการคำนวณด้วยวิธี PLS calibration และสร้างสมการทำนายผลค่าทางเคมี พบว่า สามารถแยกเอกลักษณ์ของสารปรับปรุงดินได้จากสเปคตรัมที่แตกต่างกันได้ได้สมการทำนายการจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) แบบ 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ to Unit Length (nle) ที่สามารถทำนายผลสำหรับการจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่มได้ถูกต้องทุกตัวอย่างสำหรับปูนที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน และสามารถทำนายพบการมีปูนอื่นผสมอยู่สำหรับปูนผสมได้ร้อยละ 40.7 สมการทำนายเชิงปริมาณที่ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r) เท่ากับ 0.6313, 0.8952, 0.9326 และ 0.9180 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard error of calibration ; SEC) เท่ากับ 0.2483, 1.0904, 0.6292 และ 3.4038 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบสมการ (Standard error of prediction ; SEP) เท่ากับ 0.3106, 1.3722, 0.8099 และ 3.8764 สำหรับ pH, CaO, MgO และ CCE ตามลำดับ จากการประเมินความแม่นยำโดยเปรียบเทียบผลการทำนายกับค่าวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ paired t-test พบว่า pH, CaO, MgO และ %CCE มีค่า $t_{ext} < t_{crit}$ แสดงว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR ให้ผลไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการอย่างมีนัยสำคัญ สรุปว่า เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) สามารถใช้จัดจำแนกโดโลไมท์จากสารปรับปรุงดินชนิดอื่นได้ และสามารถทำนายผลค่าทางเคมีของโดโลไมท์ได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว และสามารถพัฒนาและปรับปรุงสมการเพื่อนำมาใช้ประเมินค่าให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้มากขึ้นและมีความสม่ำเสมอกันเพื่อให้สเปกตรัมเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่าง และคลอบคลุมการใช้งานจริง จะทำให้สมการทำนายมีความถูกต้อง แม่นยำ มากขึ้น

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is a sample non-destructive measurement method. It can predict chemical values quickly, accurately, saving time, reducing the cost of using chemicals and does not harm the environment. therefore laboratory is interested in studying this technique use for classification and predicting the chemical value of soil amendment. Studied by preparing samples of dolomite and other types of soil amendment. Identification by taking a sample to measure absorbance with Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) in a wavelength range from 800 to 2500 nm was identified from the spectra of each soil amendment. The PLS calibration equations were created

ศรีวิชัยการเกษตร

and improved and the chemical prediction equations were created. It was found that the soil amendment identity can be distinguished from different spectra. The 1st Savitzky - Golay a points (dg1) and to Unit Length (nle) cluster calibration equations were obtained that could accurately predict the results for the cluster calibration every sample and was able to predict the presence of other mixes by 40.7%. Quantitative prediction equations that had a correlation coefficient (r) 0.6313, 0.8952, 0.9326 and 0.9180, the standard error of calibration; SEC was 0.2483, 1.0904, 0.6292 and 3.4038, the standard error of predictions; SEP were 0.3106, 1.3722, 0.8099 and 3.8764 for pH, CaO, MgO and CCE respectively. The Accuracy testing by comparing the predicted results with the chemical analyses using paired t-tests. The pH, CaO, MgO and %CCE values were text < tcrit, indicating that the NIR analysis showed no different results from the laboratory analysis. In concluded that Near Infrared Spectroscopy (NIRS) techniques could be used to classify dolomite from other soil amendments. The chemistry of dolomite can be predicted accurately and quickly, and equations can be developed and improved for better estimation by increasing the sample volume and consistency for the spectra. good representative of the example and cover the actual usage This will make the prediction equations more accurately.

บทนำ (Introduction)

ปูนเพื่อการเกษตร (Agricultural lime) หมายถึง วัสดุสารประกอบที่มีธาตุแคลเซียม หรือแคลเซียมและแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ มีสมบัติเป็นด่าง หรือหมายถึงสารประกอบออกไซด์ ไฮดรอกไซด์ และคาร์บอเนตของแคลเซียมและแมกนีเซียม สามารถลดความเป็นกรดของดินได้ ได้แก่พวกปูนหรือหินปูนชนิดต่างๆ เช่นปูนมาร์ล ปูนเปลือกหอยเผา ปูนขาว ปูนบด (หินฝุ่น) หรือแคลไซท์ (Calcite) ปูนโดโลไมท์ (Dolomite) และปูนยิปซัม เป็นต้น หรือความหมายของคาที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ซึ่งมีสารประกอบของแคลเซียมและแมกนีเซียมที่สามารถปรับปรุงดินเปรี้ยวได้ เช่น ปูนสุก ปูนขาว หินปูน (แคลไซต์ และโดโลไมท์) ปูนมาร์ล เปลือกหอย และผลพลอยได้ต่างๆ เช่นผลพลอยได้ชนิดเป็นด่าง (base) ที่ได้จากการหลอมหรือถลุงโลหะและอโลหะ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2542; คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา 2548; McCart *et al*., 2009) แต่ปูนเพื่อการเกษตรที่เป็นที่นิยม หรือมีจาหน่ายในท้องตลาด แบ่งออกเป็น ปูนมารลหรือแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ปูนโดโลไมท์หรือแคลเซียมแมกนีเซียมคารบอเนต ($CaMg(CO_3)_2$) ปูนขาวหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH_2)$] และปูนยิปซัม ($CaSO_4.2H_2O$) จากการศึกษาชนิดและแหล่งของปูนแล้ว จะเห็นได้ว่าปูนชนิดต่างๆ ดังกล่าวจะมีส่วนประกอบของแคลเซียมเป็นส่วนใหญ่ และจะมีสารประกอบของแมกนีเซียมอยู่บ้างไม่มากนัก ด้วยเหตุผลดังกล่าว การใส่ปูนจึงหมายถึง การใส่สารประกอบแคลเซียมอยู่ในปริมาณมาก และสารประกอบนี้ก็คือปูนซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่าง (กรมพัฒนาที่ดิน 2542; Balog *et al*., 2014)

สำนักวิชาการเกษตร

ปัจจุบันการตรวจสอบวัสดุปูนที่ใช้ในการเกษตรของประเทศไทย มีการศึกษาและจำแนกโดยกรมพัฒนาที่ดิน (2542) และคณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2548) ใช้วิธีศึกษาสมบัติทางเคมี และกายภาพ โดยสารปรับปรุงดินปูนโดโลไมท์ เป็นสารปรับปรุงดิน ที่ได้จากแร่ที่เกิดจากตะกอนของแคลเซียมและแมกนีเซียมทับถมกัน [$CaMg(CO_3)_2$] มีสีต่างๆ กัน เช่น เทา ชมพู ขาว มีส่วนประกอบทางเคมีเป็น $CaCO_3$ และ $MgCO_3$ ใช้ปรับปรุงดินเพื่อแก้ความเป็นกรดของดิน และยังให้ธาตุอาหารแคลเซียมและแมกนีเซียมแก่พืชอีกด้วย มาตรฐานที่กาหนดคือ มีค่าความสามารถในการทาให้เป็นกลาง (CCE) ไม่น้อยกว่า 90 มีค่า CaO (Calcium Oxide) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 25 และมีค่า MgO (Magnesium Oxide) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 15 ขนาดอนุภาค มีค่าความละเอียดสามารถร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.177 มิลลิเมตร (80 เมช) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 โดยน้าหนัก ปริมาณความชื้น ไม่เกินร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ไม่น้อยกว่า 8.0 ปูนมาร์ล (Marl) หรือ ดินมาร์ล เป็นสารปรับปรุงดินประเภทวัสดุปูนเพื่อการเกษตร (Agricultural lime) ชนิดหนึ่ง องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และดินเหนียว (Clay) ในอัตราส่วน 35:65 หรือ 65:35 มีสีขาว หรือขาวขุ่นปนน้ำตาล ใช้ปรับปรุงดินเปรี้ยวเพื่อแก้ความเป็นกรดของดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2556)

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) เป็นทางเลือกหนึ่งของเทคนิควิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ด้านต่างๆ อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าได้อย่างรวดเร็วแม่นยำ และสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่างๆได้โดยใช้ความยาวคลื่นจำเพาะขององค์ประกอบทางเคมีที่เป็นส่วนประกอบในสารนั้นๆ เช่น การประมาณค่า โดยสเปกโตรสโกปีใกล้อินฟราเรดของแร่หินปูนภายใต้สภาวะแห้งและเปียก (Sungchan. *et al*., 2017) ทำนายการชะล้างพังทลายของดิน และ $CaCO_3$ โดยใช้สเปกตรัม Vis-NIR ในห้องปฏิบัติการ (Yaser. *et al*., 2017) เป็นต้น เทคนิคนี้ใช้หลักการหาความสัมพันธ์การดูดกลืนแสงในช่วง อินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared) คือ ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 4000-12500 ต่อเซนติเมตร กับสสารที่ต้องการประเมินหรือสสารที่สามารถเกิดอันตรกริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ อันตรกิริยาดังกล่าว คือ การที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้เข้าไป ซึ่งจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะปรากฏในสเปกตรัม NIRS (เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, 2555) ซึ่งสารแต่ละชนิด เมื่อได้รับแสงจะมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงได้ไม่เท่ากัน ทำให้ผลที่แสดงออกมาบอกถึงความแตกต่างได้ จึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาประมวลผลวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพที่ต้องการได้ ปัจจุบันมีการใช้สารปรับปรุงดินอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีการควบคุมคุณภาพของสารปรับปรุงดิน ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตรจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ดังกล่าว ให้ความเหมาะสมกับประเภทตัวอย่าง ชนิดและปริมาณธาตุอาหารพืช เพื่อให้สามารถนำเทคนิควิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นอกจากนี้ ยังเป็นการลดมลภาวะที่เกิดจากห้องปฏิบัติการจากการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งลดต้นทุน และระยะเวลาในการวิเคราะห์

สำนักวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมตัวอย่างปูน

จัดหาตัวอย่างสารปรับปรุงดินปูนโดโลไมท์ และปูนชนิดอื่น ได้แก่ ปูนมาร์ล และปูนขาว เพื่อนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์และสร้างสมการการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Identification) สร้างสมการการวัดเชิงปริมาณ (quantification) และทวนสอบสมการการวัดเชิงคุณภาพหรือเอกลักษณ์และการวัดเชิงปริมาณ

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์

2.1 ศึกษาสเปคตรัมที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนโดโลไมท์ และปูนชนิดอื่นที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

นำตัวอย่างโดโลไมท์ ปูนขาว และปูนมาร์ล ชนิดละ 50 ตัวอย่าง มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) และทำการวัดเชิงคุณภาพหรือเอกลักษณ์ (Identification) โดยทำการเทตัวอย่างปูนที่เตรียมใส่ลงใน Petridis ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร

2.2 ศึกษาสเปคตรัมของปูนผสม โดยการผสมปูนโดโลไมท์ และปูนชนิดอื่นศึกษาสเปกตรัมของสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์ ปูนมาร์ล และปูนขาว โดยนำนำสารปรับปรุงดินทั้ง 3 ชนิด วิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR และผสมสารปรับปรุงดินทั้งสามชนิดในอัตราส่วนต่างๆ แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR และศึกษาสเปคตรัมที่เปลี่ยนแปลงไป โดยผสมกับปูนชนิดอื่นทีละ 1 ชนิด อัตราส่วน เท่ากับ 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยปริมาตร

3. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

3.1 นำสเปคตรัมที่ได้จาก ข้อ 2.1 ไปสร้างสมการแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) เพื่อจัดจำแนกชนิดของสารปรับปรุงดิน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) และปรับปรุงสมการโดยการปรับแต่ง (Pretreatments)

3.2 นำสมการแบบจัดกลุ่มที่ได้จากการปรับแต่งสมการไปประเมินผลในตัวอย่างปูนทวนสอบ

3.2.1 ทวนสอบกับตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่าง รวม 75 ตัวอย่าง

3.2.2 ทวนสอบกับตัวอย่างปูนผสมกับปูนชนิดอื่นทีละ 1 ชนิด อัตราส่วน เท่ากับ 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยปริมาตร ทั้งหมดจำนวน 27 ตัวอย่าง

4. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

4.1 นำตัวอย่างโดโลไมท์ 50 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ค่าทางเคมี ได้แก่

4.1.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้อัตราส่วนของปูนต่อน้ำเท่ากับ 1:1 แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง pH meter

4.1.2 แคลเซียมออกไซด์ (CaO) และแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) โดยการย่อยด้วยกรดผสม (ไนตริก : เปอร์คลอริค เท่ากับ 1 : 3) แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4.1.3 นำผลวิเคราะห์ CaO และ MgO มาคำนวณค่า Calcium carbonate equivalent (CCE)

4.2 นำตัวอย่างโดโลไมท์ 50 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIR โดย Scan ที่ช่วงความยาวคลื่น 800 -2500 nm

4.3 หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร กับ pH, CaO, MgO และ CCE โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) และปรับปรุงสมการโดยการปรับแต่ง (Pretreatments)

4.4 พิจารณาเลือกสมการที่ความสัมพันธ์ (R) สูง ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard of Calibration : SEC) และค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบสมการ (Standard of Error of Prediction: SEP) ต่ำหมายถึงสามารถตอบสนองได้ดี

4.5 นำสมการที่ได้ไปประเมินค่า pH, CaO, MgO และ CCE ในตัวอย่างปูนทวนสอบ

5. สรุปและรายงานผล

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

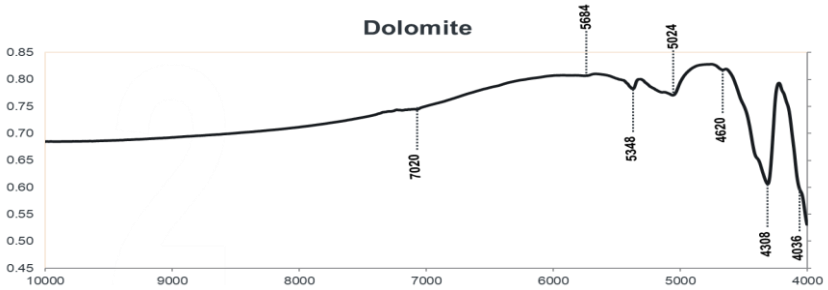
สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

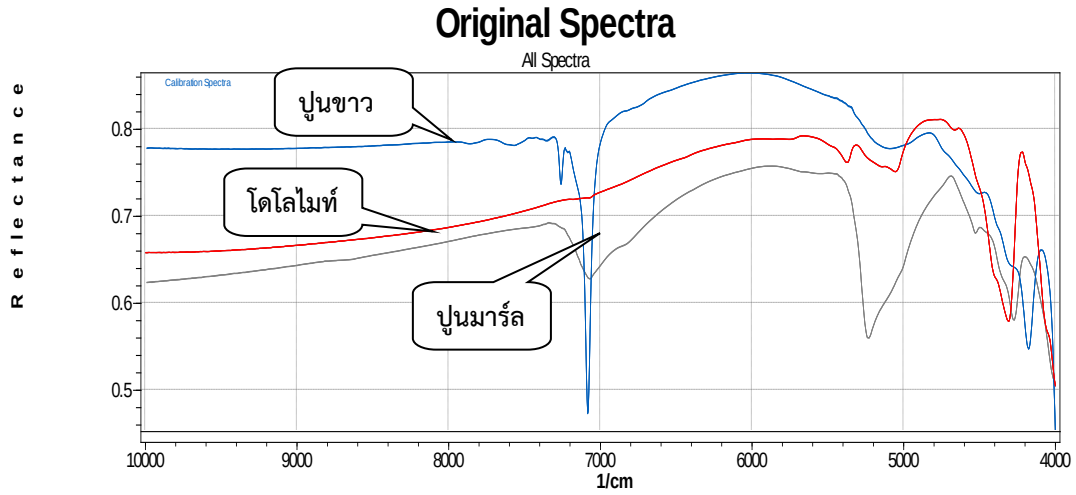
1. เตรียมตัวอย่างปูน ได้ตัวอย่างสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์ ปูนขาว และปูนมาร์ล ชนิดละ 50 ตัวอย่าง

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์

2.1. ศึกษาสเปคตรัมที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนโดโลไมท์ และปูนชนิดอื่นที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน จากการนำตัวอย่างโดโลไมท์ ปูนขาว และปูนมาร์ล ที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร พบว่า ตัวอย่างโดโลไมท์ด้วยเครื่อง NIR ตัวอย่างที่ผ่านเกณฑ์ได้สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 4036, 4308, 4620, 5024, 5348, 5684 และ 7020 cm^{-1} ดังภาพที่ 1 และเมื่อพิจารณาสเปคตรัมของโดโลไมท์ ปูนมาร์ล และ ปูนขาว พบว่า สเปคตรัมมีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของปูนแต่ละชนิด ดังภาพที่ 2 และตารางที่ 1



ภาพที่ 1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของโดโลไมท์ที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน



ภาพที่ 2 สเปกตรัม NIR ของตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว ชนิดละ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของโดโลไมท์ ปูนมาร์ล และปูนขาว

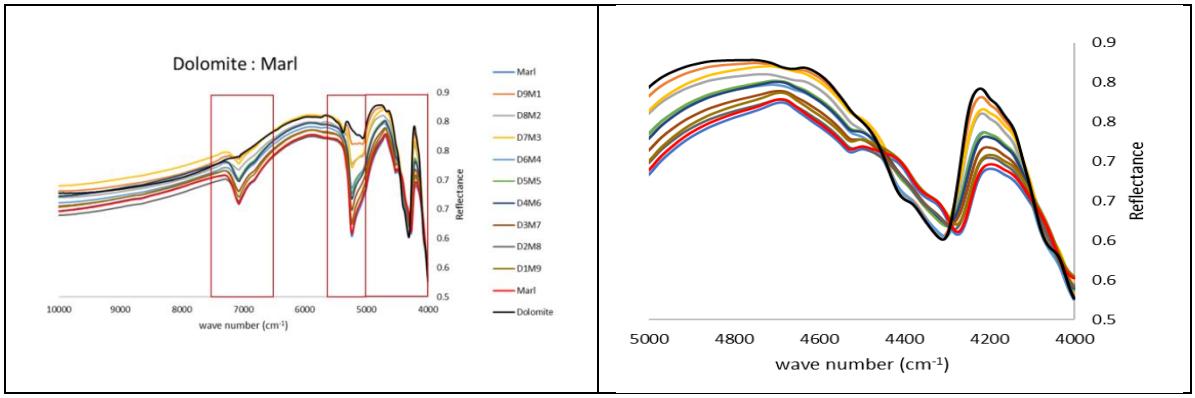
Absorption band	Dolomite	Marl	Lime
	(.....Absorption (cm^{-1}).....)		
1	4036	4000	-
2	4308	4272	4172
3	4620	4500	4496
4	5024	5232	5112
5	5348		
6	5684		
7	7020	7068	7084
8			7260

2.2 ศึกษาสเปคตรัมของปูนผสม โดยการผสมปูนโดโลไมท์ และปูนชนิดอื่น

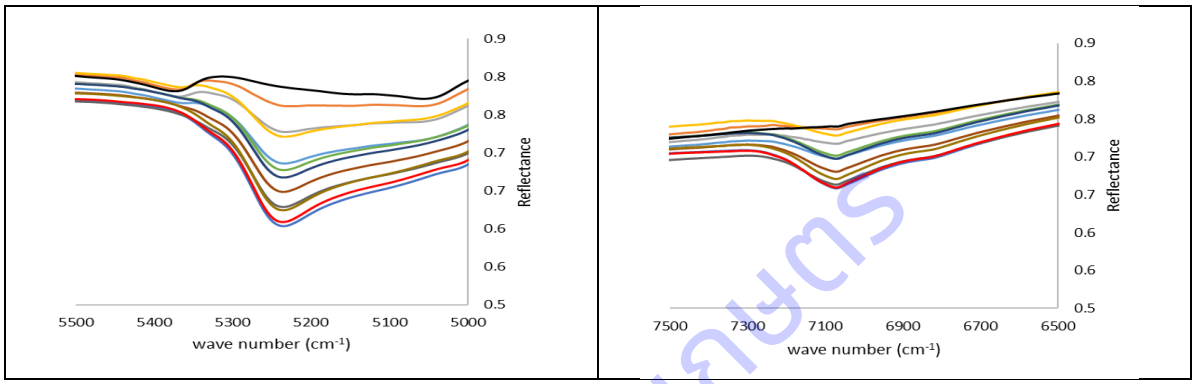
1) ผสมปูนโดโลไมท์ กับปูนมาร์ล

จากการผสมตัวอย่างปูนโดโลไมท์ กับปูนมาร์ล ที่อัตราส่วน 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยปริมาตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR พบว่า สเปคตรัมซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของปูนมาร์ลชัดเจนกว่าโดโลไมท์ ที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ 4272 cm^{-1}, 4500 cm^{-1}, 5232 cm^{-1} และ 7068 cm^{-1} แต่ความชัดเจนลดลงตามอัตราส่วนของโดโลไมท์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3a) และเริ่มพบเอกลักษณ์ของโดโลไมท์ที่ 4308 cm^{-1}, 4620 cm^{-1} และ 5348 cm^{-1} ชัดเจนเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนโดโลไมท์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3b, 3c)

กรมวิชาการเกษตร



(a) (b)



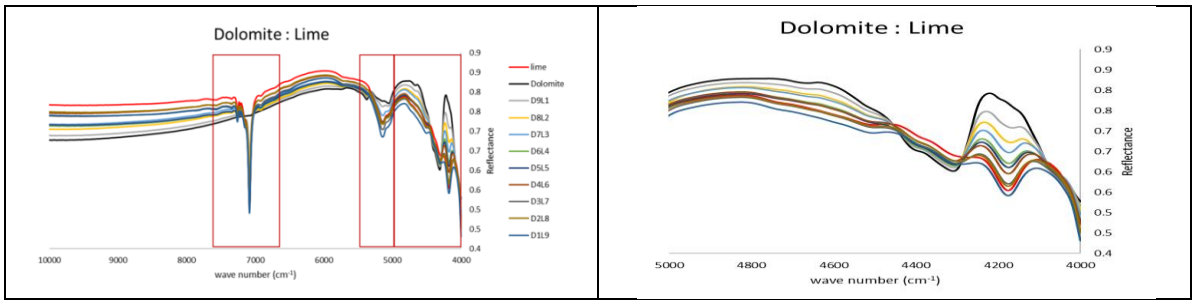
(c) (d)

ภาพที่ 3 Original spectrum ตัวอย่างปูนผสมที่อัตราส่วน โดโลไมท์ : ปูนมาร์ล

(a) 4000-10000 cm^{-1} (b) 4000-5000 cm^{-1} (c) 5000-5500 cm^{-1} (d) 6500-7500 cm^{-1}

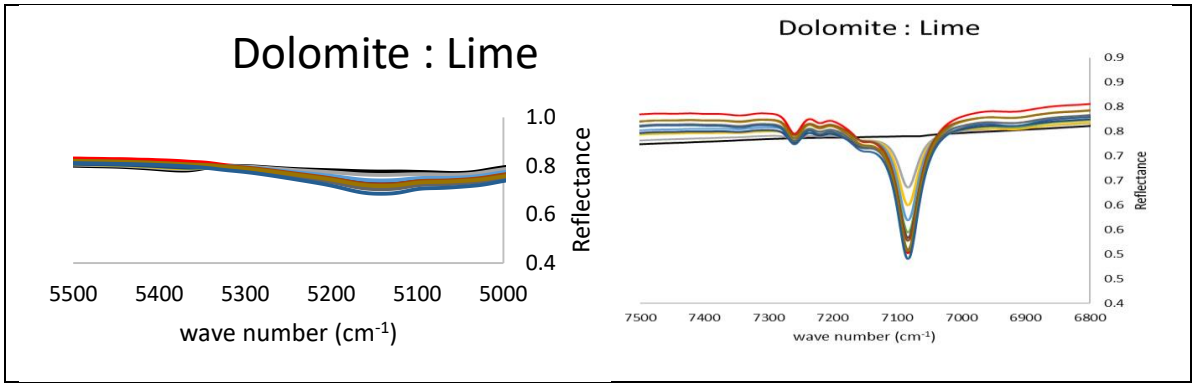
2) ผสมปูนโดโลไมท์ กับปูนขาว

จากการผสมตัวอย่างปูนโดโลไมท์กับปูนขาว ที่อัตราส่วน 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยปริมาตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR พบว่า สเปคตรัมซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของปูนขาวชัดเจนกว่าโดโลไมท์ ที่การดูดกลืนแสงช่วง 4172 cm^{-1}, 5112 cm^{-1} และ 7084 cm^{-1} แต่ความชัดเจนจะลดลงตามอัตราส่วนของโดโลไมท์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4a) และพบเอกลักษณ์ของโดโลไมท์ที่ 4308 cm^{-1} 5024 cm^{-1}และ 5348 cm^{-1} ที่ชัดเจนเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนโดโลไมท์ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4b, 4c)



(a) (b)

ศูนย์วิทยทรัพยากร



(c) (d)

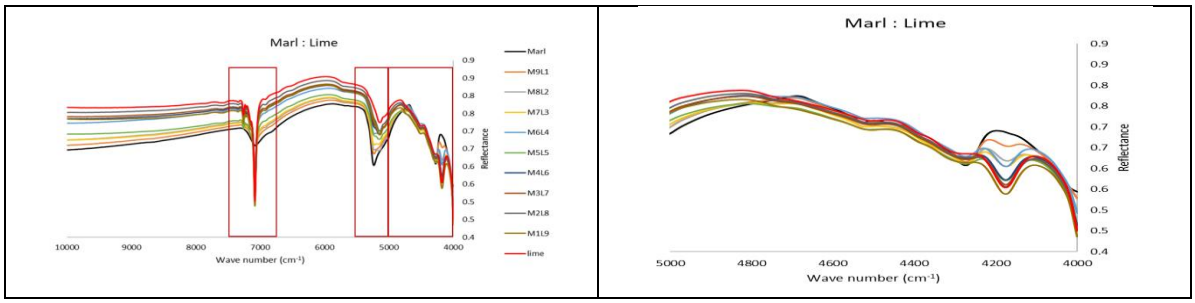
ภาพที่ 4 Original spectrum ตัวอย่างปูนผสมที่อัตราส่วน โดโลไมท์ : ปูนขาว

(a) 4000-10000 cm^{-1} (b) 4000-5000 cm^{-1} (c) 5000-5500 cm^{-1} (d) 6800-7500 cm^{-1}

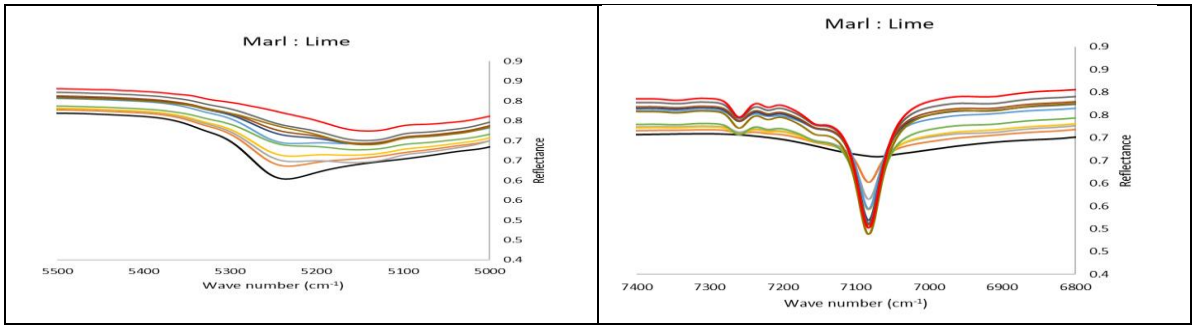
3) ผสมปูนมาร์ลและปูนขาว

จากการผสมตัวอย่างปูนโดโลไมท์ กับปูนขาว ที่อัตราส่วน 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยปริมาตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR พบว่า สเปคตรัมซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของปูนขาวชัดเจนกว่าปูนมาร์ล ที่การดูดกลืนแสงช่วง 4172 cm^{-1}, 5112 cm^{-1} และ 7084 cm^{-1} แต่ความชัดเจนจะลดลงตามอัตราส่วนของปูนมาร์ลที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 5a) และพบเอกลักษณ์ของปูนมาร์ลที่ 4272 cm^{-1} และ 5232 cm^{-1} ที่ชัดเจนเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนปูนมาร์ลที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4b, 4c)

กรมวิชาการเกษตร



(a) (b)



(c) (d)

ภาพที่ 5 Original spectrum ตัวอย่างปูนผสมที่อัตราส่วนปูนมาร์ล : ปูนขาว

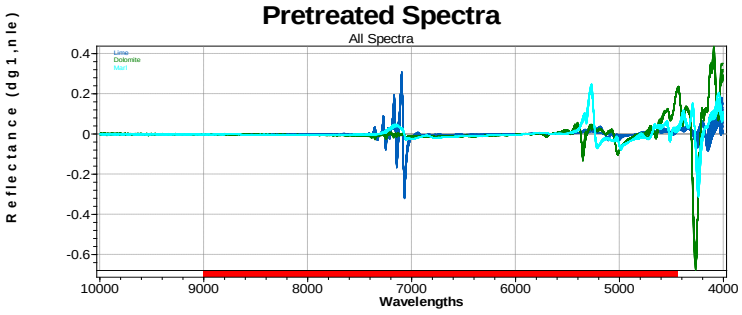
(a) 4000-10000 cm^{-1} (b) 4000-5000 cm^{-1} (c) 5000-5500 cm^{-1} (d) 6800-7400 cm^{-1}

จากการศึกษาสเปคตรัมที่เปลี่ยนแปลงไปจากการผสมสารปรับปรุงดินในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าสเปคตรัมซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของปูนขาวชัดเจนที่สุด โดยเฉพาะที่ 7084 cm^{-1} ซึ่งไม่ว่าจะผสมกับปูนชนิดอื่นเอกลักษณ์นี้ยังคงชัดเจนมาก แต่เมื่อพิจารณาสเปคตรัมที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ 4176 cm^{-1} ที่มีการดูดกลืนแสงลดลง และเพิ่มขึ้นที่ช่วง 4272-4305 cm^{-1} ก็จะทราบได้ว่ามีปูนชนิดอื่นผสมอยู่กับปูนขาว ส่วนการผสมกันระหว่างปูนมาร์ลกับโดโลไมท์ สเปคตัมที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนมาร์ลก็จะชัดเจนกว่าโดโลไมท์เช่นเดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาสเปคตรัมที่ช่วงการดูดกลืนแสงที่ 4232 cm^{-1} และ 7068 cm^{-1} ที่มีการดูดกลืนแสงลดลง และเกิดช่วงการดูดกลืนแสงที่ 5348 cm^{-1} ขึ้น ก็จะทราบได้ว่ามีโดโลไมท์ผสมอยู่กับปูนมาร์ล

3. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

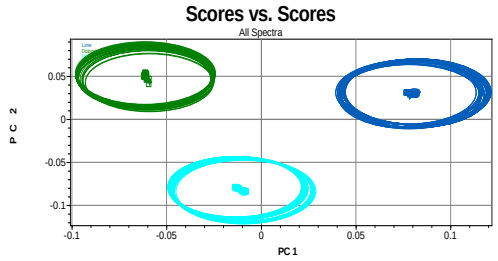
3.1. การสร้างสมการแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration)

จากการนำตัวอย่างโดโลไมท์ ปูนขาว และปูนมาร์ล ชนิดละ 50 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIR โดย Scan ที่ช่วงความยาวคลื่น 800 - 2500 nm ได้สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ to Unit Length (nle) (ภาพที่ 6a) และสามารถแบ่งกลุ่มชนิดโดโลไมท์ ปูนขาว และปูนมาร์ล ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 6b, 6c)

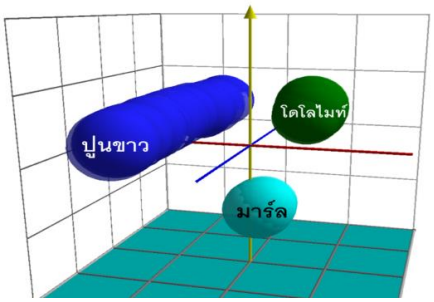


(a)

กรมวิชาการเกษตร



(b)



(c)

ภาพที่ 6 การสร้างและปรับปรุงสมการทำนายผลการจัดจำแนกชนิดปูน

(a) สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) ของตัวอย่างโดโลไมท์ ปูนขาว และปูนมาร์ล จำนวน ชนิดละ 50 ตัวอย่าง

(b) สมการจัดกลุ่มแบบ 2 มิติ (2D) ของ สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments)

(c) สมการจัดกลุ่มแบบ 3 มิติ (3D) ของ สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments)

3.2. การทวนสอบสมการ

จากการสร้างสมการการจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) โดยใช้ สมการแบบจัดกลุ่มของสเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ to Unit Length (nle) กับปูนทวนสอบ ได้ผลดังนี้

1) ทวนสอบกับตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่าง พบว่าสามารถทำนายการจัดจำแนกชนิดปูนได้ถูกต้องทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

2) ทวนสอบกับตัวอย่างปูนผสมสองชนิดใน 9 อัตราส่วนโดยปริมาตร ทั้งหมดจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่า สามารถทำนายพบการมีปูนอื่นผสมอยู่ได้ จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.7 ดังนี้

- การผสมโดโลไมท์กับปูนขาว ที่อัตราส่วนโดโลไมท์ : ปูนขาว 1 : 9 – 8 : 2 สมการทำนายเป็นปูนขาว จำนวน 8 ตัวอย่าง สามารถทำนายพบการมีปูนอื่นผสมกับปูนขาว จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนโดโลไมท์ : ปูนขาว 9 : 1 คิดเป็นร้อยละ 11.1 เมื่อมีปริมาตรปูนขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 10 (ตารางที่ 2)
- การผสมโดโลไมท์กับปูนมาร์ล สมการทำนายเป็นปูนมาร์ล จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนโดโลไมท์ : ปูนมาร์ล 1 : 9 – 2 : 8 สามารถทำนายพบการมีปูนอื่นผสมกับปูนมาร์ล จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนโดโลไมท์ : ปูนมาร์ล 3 : 7 – 8 : 2 และทำนายพบการมีปูนอื่นผสมกับโดโลไมท์ 1 ตัวอย่าง อัตราส่วนโดโลไมท์ : ปูนมาร์ล 9 : 1 แสดงว่าสมการสามารถทำนายพบการผสมปูนได้ จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 77.8 เมื่อมีปริมาตรโดโลไมท์มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30 (ตารางที่ 2)
- การผสมปูนมาร์ลกับปูนขาว สมการทำนายเป็นปูนขาว จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนปูนมาร์ล : ปูนขาว 1 : 9 - 6 : 4 สามารถทำนายพบการมีปูนอื่นผสมกับปูนขาวจำนวน 3

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่าง ที่อัตราส่วนปูนมาร์ล : ปูนขาว 7 : 3 - 9 : 1 คิดเป็นร้อยละ 33.3 เมื่อมีปริมาตรปูนขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทวนสอบสมการจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) กับตัวอย่างปูนผสมสองชนิด

Ratio	Dolomite + Lime	Dolomite + Marl	Marl + Lime
1 : 9	Lime	Marl	Lime
2 : 8	Lime	Marl	Lime
3 : 7	Lime	Marl*	Lime
4 : 6	Lime	Marl*	Lime
5 : 5	Lime	Marl*	Lime*
6 : 4	Lime	Marl*	Lime*
7 : 3	Lime	Marl*	Lime*
8 : 2	Lime	Marl*	Lime*
9 : 1	Lime*	Dolomite*	Lime*

หมายเหตุ: * การทำนายพบปูนอื่นผสม

3.3. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ

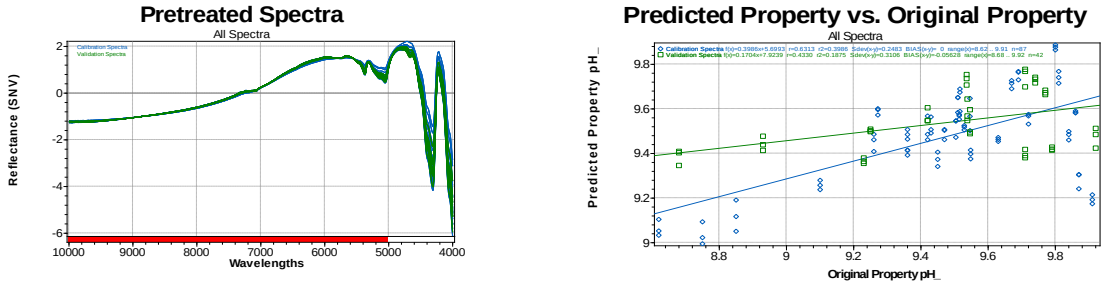
3.3.1. สร้างและปรับปรุงสมการประเมินผลค่าทางเคมี

จากการนำตัวอย่างโดโลไมท์ 50 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIR โดย Scan ที่ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 nm นำสเปคตรัมที่ได้ไปสร้างสมการประเมินผลค่าทางเคมีโดยใช้สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) เทียบกับผลวิเคราะห์ทางเคมีของโดโลไมท์ ได้แก่ pH, CaO, MgO และ CCE ได้ผลการดำเนินงาน ดังนี้

1) สมการประเมินผลค่า pH

ผลการเมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ Standard Normal Variate (SNV) (ภาพที่ 7 a) มีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.6313 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (SEC) เท่ากับ 0.2483 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (SEP) เท่ากับ 0.3106 (ภาพที่ 7 b)

สำนักวิชาการเกษตร



(a) (b)

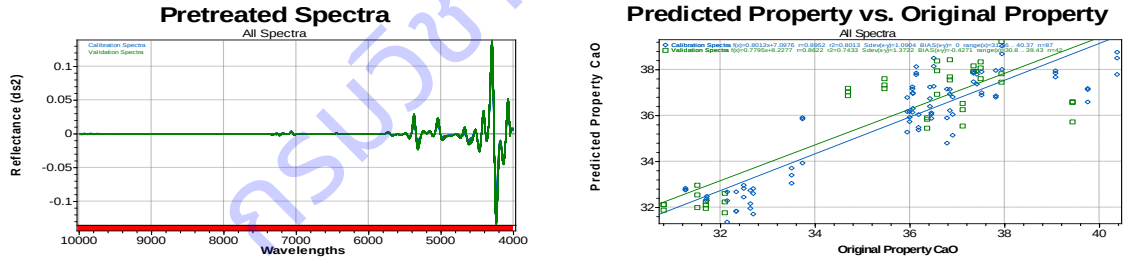
ภาพที่ 7 การสร้างและปรับปรุงสมการทำนายผลค่าความเป็นกรด-ด่าง

(a) สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ Standard normal variate (SNV)

(b) ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการและที่นำนายได้โดยเครื่อง NIR โดยปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatments) แบบ Standard normal variate (SNV)

2) สมการประเมินผลค่า CaO

ผลการเมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ CaO คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2) (ภาพที่ 8 a) มีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.8952 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (SEC) เท่ากับ 1.0904 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (SEP) เท่ากับ 1.3722 (ภาพที่ 8 b)



(a) (b)

ภาพที่ 8 การสร้างและปรับปรุงสมการทำนายผลค่า CaO

(a) สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)

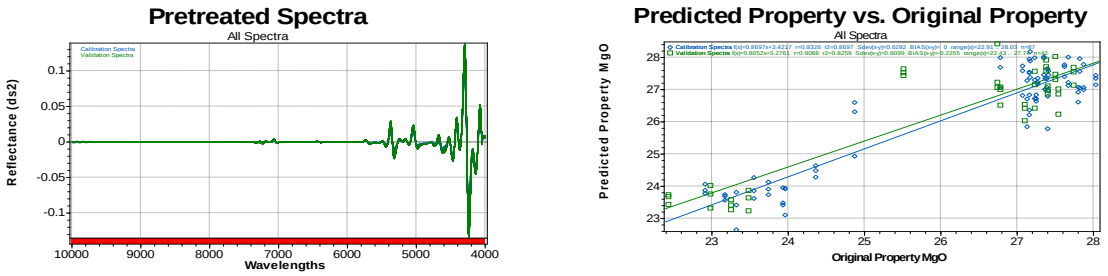
(b) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า CaO ที่วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการและที่นำนายได้โดยเครื่อง NIR โดยปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)

3) สมการประเมินผลค่า MgO

ผลการเมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ MgO คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2) (ภาพที่ 9 a) มีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9326 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (SEC) เท่ากับ

กรมวิชาการเกษตร

0.6292 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (SEP) เท่ากับ 0.8099 (ภาพที่ 9 b)



(a) (b)

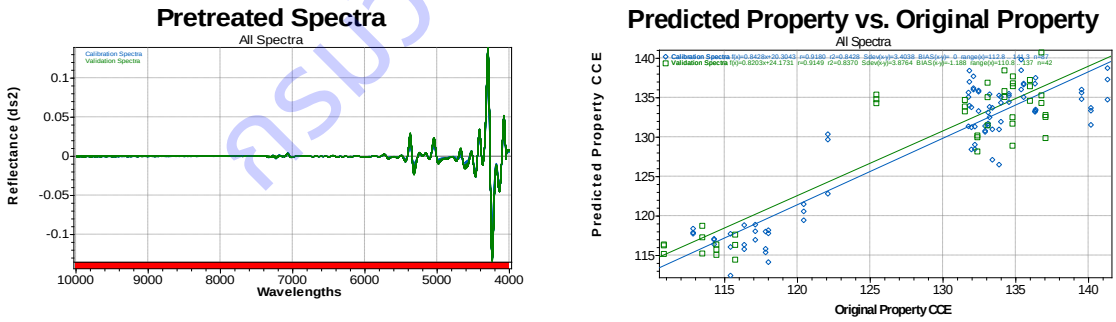
ภาพที่ 9 การสร้างและปรับปรุงสมการทำนายผลค่า MgO

(a) สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)

(b) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MgO ที่วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการและที่นำนายได้โดยเครื่อง NIR โดยปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)

4) สมการประเมินผลค่า CCE

ผลการเมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและ CCE คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2) (ภาพที่ 10 a) มีค่าความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9180 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (SEC) เท่ากับ 3.4038 และค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (SEP) เท่ากับ 3.8764 (ภาพที่ 10 b)



(a) (b)

ภาพที่ 10 การสร้างและปรับปรุงสมการทำนายผลค่า CCE

(a) สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)

(b) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า CCE ที่วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการและที่นำนายได้โดยเครื่อง NIR โดยปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatments) แบบ 2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)

ตารางที่ 3 ค่าความสัมพันธ์ (r) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ Calibration (SEC) และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบสมการ Validation (SEP)

รายการ	สมการ	r	SEC	SEP

กรมวิชาการเกษตร

pH	Standard Normal Variate (SNV)	0.6313	0.2483	0.3106
CaO	2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)	0.8952	1.0904	1.3722
MgO	2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)	0.9326	0.6292	0.8099
CCE	2nd Savitzky Golay 9 point (dg2)	0.9180	3.4038	3.8764

3.3.2. ทดสอบสมการและปรับปรุงสมการประเมินผลค่าทางเคมี

นำตัวอย่างปูนโดโลไมด์ 50 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIR โดย Scan ที่ช่วงความยาวคลื่น 800 nm-2500 nm ไปทดสอบทำนายผลค่าทางเคมีโดยใส่มการปรับแต่ง (Pretreatments) สำหรับ pH, CaO, MgO และนำผลวิเคราะห์ CaO และ MgO จากค่าที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง NIR มาคำนวณค่า %CCE พบว่า ค่าที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เครื่อง NIR มีค่าวิเคราะห์ pH อยู่ในช่วง 9.04 - 9.88, CaO อยู่ในช่วง 32.04 – 38.58%, MgO อยู่ในช่วง 23.30 – 27.82% และ %CCE อยู่ในช่วง 115.43 – 138.13% ซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้จัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์ทั้ง 50 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 100 ผลดังตารางที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 ผลวิเคราะห์ค่าทางเคมีโดยวิธีห้องปฏิบัติการและวิธี NIR

parameter	Lab	NIR Predicted
pH	8.62 - 9.92	9.04 – 9.88
CaO (%)	30.80 – 40.37	32.04 – 38.58
MgO (%)	22.43 – 28.03	23.30 – 27.82
CCE (%)	110.82 – 141.30	115.43 – 138.13

ประเมินความแม่นยำโดยเปรียบเทียบผลการทำนายกับค่าวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ paired t-test พบว่า pH, CaO, MgO และ %CCE มีค่า $t_{ext} < t_{crit}$ แสดงว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR ให้ผลไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความแตกต่างสัมบูรณ์ (Absolute different) สำหรับ pH ค่า %recovery และ %RSD ของ CaO, MgO และ CCE อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงถึงความถูกต้อง แม่นยำ ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR ซึ่งซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้จัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์ทั้ง 50 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 100 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ประเมินความแม่นยำ และความเที่ยงของสมการที่ใช้ในการทำนายโดโลไมท์

parameter	Accuracy					Precision
	Paired t-test			% recovery	Absolute different	% RSD
	$t_{ext.}$	$t_{crit.}$	Evaluation			
pH	1.51	2.01	non significant	-	0.05 - 0.77	-
CaO (%)	0.80	2.01	non significant	92.08 – 106.76	-	0.29 – 3.35
MgO (%)	0.62	2.01	non significant	91.70 – 107.95	-	0.34 – 3.48
CCE (%)	0.77	2.01	non significant	94.81 – 107.51	-	0.29 – 3.35

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) ใช้หลักการวัดความสัมพันธ์กับสสารที่ต้องการประเมินหรือสสารที่สามารถเกิดอันตรกริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ด้วยวิธีการสะท้อนแสง (Reflection) คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสสารได้ไม่เท่ากัน ทำให้ผลที่แสดงออกมาบอกถึงความแตกต่างได้ จึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาประมวลผลวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพที่ต้องการได้ โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร สามารถแยกเอกลักษณ์ของสารปรับปรุงดินได้จากสเปคตรัมที่แตกต่างกันได้ ได้การจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) แบบ 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ to Unit Length (nle) ที่สามารถทำนายผลสำหรับการจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration) ได้ถูกต้องทุกตัวอย่างสำหรับปูนที่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน และสามารถทำนายพบการมีปูนอื่นผสมอยู่สำหรับปูนผสมได้ร้อยละ 40.7 โดยจะทำนายพบได้ดีสำหรับการผสมระหว่างโดโลไมท์และปูนมาร์ล การทดสอบสมการทำนายผลค่าทางเคมี สามารถอธิบายความสามารถ

กรมวิชาการเกษตร

ของสมการแคลิเบรชั่นแบบปรับแต่งสมการ (pretreatment) ด้วยค่า R ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่า R = 0.6313 สามารถคัดแยกตัวอย่างได้ดี ใช้ในการควบคุมคุณภาพได้แต่ความสัมพันธ์ยังไม่ดีพอ แคลเซียมออกไซด์ (CaO) ค่า R = 0.8952 สามารถคัดแยกตัวอย่างได้ยอดเยี่ยม ทำนายผลในระดับปริมาณได้เบื้องต้นหรือ screening แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) และค่าสมมูลแคลเซียมคาร์บอเนต (CCE) มีค่า R = 0.9326 และ 0.9180 ตามลำดับ สามารถคัดแยกตัวอย่างได้ยอดเยี่ยม สามารถใช้ทำนายผลในงานวิจัยหรืองานทั่วไปได้ จากการประเมินความแม่นยำโดยเปรียบเทียบผลการทำนายกับค่าวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ paired t-test พบว่า pH, CaO, MgO และ %CCE มีค่า $t_{ext} < t_{crit}$ แสดงว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR ให้ผลไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการอย่างมีนัยสำคัญ ค่าความแตกต่างสัมบูรณ์ (Absolute different) สำหรับ pH ค่า %recovery และ %RSD ของ CaO, MgO และ CCE อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงถึงความถูกต้อง แม่นยำ ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NIR ซึ่งซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้จัดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสารปรับปรุงดินชนิดโดโลไมท์ทั้ง 50 ตัวอย่าง หรือร้อยละ 100 สรุปว่า เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) สามารถใช้จัดจำแนกโดโลไมท์จากสารปรับปรุงดินชนิดอื่นได้ และสามารถทำนายผลค่าทางเคมีของโดโลไมท์ได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว และสามารถพัฒนาและปรับปรุงสมการเพื่อนำมาใช้ประเมินค่าให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างให้มากขึ้นและมีความสม่ำเสมอกันเพื่อให้สเปกตรัมเป็นตัวแทนที่ดีของตัวอย่าง และคลอบคลุมการใช้งานจริง จะทำให้สมการทำนายมีความถูกต้อง แม่นยำ มากขึ้น

พิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดิน
ชนิดปูนมาร์ล โดยเทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้

Identity and to determine the chemical and physical properties of Marl
by Near Infrared Spectroscopy

ญาณธิชา จิตต์สะอาด สุภา โพธิจันทร์ สงกรานต์ มะลิสอน
พจมาลย์ ภู่สาร จิตติรัตน์ ชูชาติ กัญฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

พิสูจน์เอกลักษณ์ สมบัติทางเคมีและกายภาพ ปูนมาร์ล
เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
Identity chemical and physical properties Marl
Near Infrared Spectroscopy

บทคัดย่อ (Abstract)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ และหาสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารปรับปรุงดินชนิดปูนมาร์ล โดยเทคนิค อินฟาเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) เป็นเทคนิคใหม่ที่ได้รับความนิยม มีวิธีการวัดแบบไม่ทำลายตัวอย่าง สามารถทำนายค่าได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ ลดต้นทุนในการใช้สารเคมีและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม โดยเตรียมตัวอย่างปูนมาร์ลและปูนชนิดอื่น วิเคราะห์ค่าทางเคมีตัวอย่างปูน

กรมวิชาการเกษตร

มาร์ลในห้องปฏิบัติการหาปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง (CCE) แคลเซียมออกไซด์ (CaO) และความเป็นกรด-ด่าง (pH) นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRS ในช่วงความยาวคลื่น 800 ถึง 2500 นาโนเมตร สร้างและปรับปรุงสมการ พบว่า สมการทำนายผลเชิงคุณภาพที่สร้างด้วยวิธีจัดกลุ่ม (Cluster calibration) สามารถแยกกลุ่มชนิดปูนกันอย่างชัดเจน และสมการทำนายเชิงปริมาณที่สร้างด้วยวิธี Partial Least Square Regression (PLS) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r) เท่ากับ 0.47, 0.50 และ 0.93 ตามลำดับ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard error of calibration ; SEC) เท่ากับ 3.04, 1.67 และ 0.08 ตามลำดับ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบสมการ (Standard error of prediction ; SEP) เท่ากับ 3.32, 1.83 และ 0.07 ตามลำดับ ทวนสอบความใช้ได้ของวิธีด้วยตัวอย่างปูนมาร์ลและปูนชนิดอื่น พิจารณาความแม่นโดยใช้ Paired t-test พบว่าค่า t_{ext} มีค่าน้อยกว่า t_{crit} ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ผลการวิเคราะห์ที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับ และ % Recovery ของ CCE และ CaO อยู่ในช่วง 93-111 % และค่า Absolute different ของ pH อยู่ในช่วง 0.0-0.7 ตามลำดับ และพิจารณาความเที่ยงโดยใช้ %RSD พบว่ามีค่า %RSD ของ CCE และ CaO อยู่ในช่วง 0.07 – 0.38% (%RSD ≤ 1.3) และ 0.08 - 0.41 (%RSD ≤ 1.9) ตามลำดับ สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของปูนมาร์ล และนำมาใช้ทำนายผลสำหรับการจัดจำแนกได้ถูกต้องตามชนิดตัวอย่างสารปรับปรุงดิน ส่วนตัวอย่างผสมทำนายได้อย่างถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 40.7 และประเมินค่าค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว ควรทำการพัฒนาและปรับปรุงสมการให้เหมาะสมเพื่อการนำไปใช้งานต่อไป

Identity and to determine the chemical and physical properties of Marl by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). It's a new and popular technique. There is a non-destructive measurement method. Can predict values quickly, accurately, reducing the cost of using chemicals. and does not harm the environment. Prepare samples of marl and other types of agricultural liming material. The chemistry of marl samples was analyzed in the laboratory to calcium carbonate equivalent (CCE), calcium oxide (CaO) and pH. The sample was taken to measure the absorbance with an NIRS instrument in the wavelength range 800 to 2500 nm. Develop the cluster calibration equation for prediction of marl. It was found that the groups were clearly separated from each other. Partial Least Squares Regression (PLS) was used to develop the calibration equation for prediction of marl. The correlation coefficient (R) of 0.47, 0.50 and 0.93 standard error of calibration (SEC) of 3.04, 1.67 and 0.08, standard error of prediction (SEP) of 3.32, 1.83 and 0.07 respectively. Validation of the method, inspection of accurate by paired t-test showed that the t_{ext} is less than the t_{crit} at confidence level of 95% (accepted $t_{ext} < t_{crit}$). Inspection of precision by %RSD of CCE and CaO, the range were 0.07 – 0.38 % (AOAC accepted %RSD ≤ 1.3) and 0.08 - 0.41 (AOAC accepted %RSD ≤ 1.9),

กรมวิชาการเกษตร

%Recovery of CCE and CaO the range were 93-111% and Absolute different of pH the range were 0 .0 -0 .7 . Can prove the identity of the marl and used to predict the results for classification according to the agricultural liming material. The mixed samples predicted correctly. accounted for 40.7% and evaluate CaO, CCE and pH Accurately and quickly. The equation should be developed and optimized for further use.

บทนำ (Introduction)

ปูนมาร์ล (Marl) หรือ ดินมาร์ล เป็นสารปรับปรุงดินประเภทวัสดุปูนเพื่อการเกษตร (Agricultural lime) ชนิดหนึ่งที่มีเนื้อเป็นสารประกอบแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ผสมกับดินเหนียว (Clay) สัดส่วน 35:65 หรือ 65:35 มีสัดส่วนไม่แน่นอน มีสีขาว หรือขาวขุ่นปนน้ำตาล (ราชกิจจานุเบกษา, 2549 และ กรมพัฒนาที่ดิน, 2556) เป็นหินปูนที่มีลักษณะเนื้อค่อนข้างร่วน ใช้ปรับปรุงดินเปรี้ยวเพื่อแก้ความเป็นกรดของดิน เป็นวัสดุปรับปรุงดินที่ให้แคลเซียมซึ่งมีประโยชน์สำหรับพืช มีราคาถูกกว่าปูนขาวหรือไดโลไมท์ เนื่องจากใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ในการเกษตร

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) เป็นทางเลือกหนึ่งของเทคนิควิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ และถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ด้านต่างๆ อย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าได้อย่างรวดเร็วแม่นยำ และสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารต่างๆได้โดยใช้ความยาวคลื่นจำเพาะที่เป็นส่วนประกอบในสารนั้นๆ สำหรับงานวิจัยที่มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ซึ่งเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของปูนมาร์ล ได้แก่ การประมาณค่าแคลเซียมออกไซด์โดยสเปกโตรสโกปีใกล้อินฟราเรดของแร่หินปูนภายใต้สภาวะแห้งและเปียกในเหมืองแร่ (Sungchan *et al.,* 2017) ทำนายการชะล้างพังทลายของดินและแคลเซียมคาร์บอเนตโดยใช้สเปกตรัมวิสิเบิลสเปกโตรสโกปีใกล้อินฟราเรดในห้องปฏิบัติการ (Yaser. *et al*., 2017) เป็นต้น เทคนิคนี้ใช้หลักการหาความสัมพันธ์การดูดกลืนแสงในช่วง อินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared) คือ ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 4000-12500 ต่อเซนติเมตร กับสสารที่ต้องการประเมินหรือสสารที่สามารถเกิดอันตรกริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ อันตรกิริยาดังกล่าว คือ การที่โมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้เข้าไป ซึ่งจะมีผลต่อการสั่นของพันธะต่างๆ ในโมเลกุล ระดับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ของสสารที่ความยาวคลื่นต่างๆ จะปรากฏในสเปกตรัม NIRS (เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม, 2555) ซึ่งสารแต่ละชนิด เมื่อได้รับแสงจะมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงได้ไม่เท่ากัน ทำให้ผลที่แสดงออกมาบอกถึงความแตกต่างได้ จึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาประมวลผลวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณที่ต้องการได้ ปัจจุบันมีการใช้สารปรับปรุงดินอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีการควบคุมคุณภาพของสารปรับปรุงดิน ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตรจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาแนวทางการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการวิเคราะห์ดังกล่าว ให้ความเหมาะสมกับประเภทตัวอย่าง เพื่อให้สามารถนำเทคนิควิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นอกจากนี้ ยังเป็นการลดมลภาวะที่เกิดจากห้องปฏิบัติการจากการลดการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งลดต้นทุน และระยะเวลาในการวิเคราะห์

ศรีวิชัยการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมตัวอย่างปูน

เตรียมตัวอย่างที่ทราบชนิดตามมาตรฐานของตัวอย่างปูนมาร์ลและปูนชนิดอื่น ได้แก่ โดโลไมท์และปูนขาว และทำการผสมปูน โดยตัวอย่างที่เตรียมจะนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ สร้างสมการการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Identification) สร้างสมการการวัดเชิงปริมาณ (Quantification) และทวนสอบสมการการวัดเชิงคุณภาพและการวัดเชิงปริมาณ

2. วัดการดูดกลืนแสงเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

พิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้ตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว และผสมปูนมาร์ล กับโดโลไมท์และปูนขาว วิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิค NIRS แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) และทำการวัดเชิงคุณภาพหรือเอกลักษณ์ (Identification) โดยทำการเทตัวอย่างปูนที่เตรียม ใส่ลงใน Petridis ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ย่านนี้ และทำการพิจารณาสเปคตรัม (Spectrum)

3. วิเคราะห์ค่าทางเคมีและวัดการดูดกลืนแสงวิเคราะห์เชิงปริมาณ

3.1. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณค่าทางเคมีในห้องปฏิบัติการหาปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง (CCE) ปริมาณแคลเซียมออกไซด์ (CaO) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยปริมาณแคลเซียมออกไซด์ ด้วยวิธีโดยการนำไปย่อยด้วยกรดผสม (ไนตริก 1 : เปอร์คลอริค 3) แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง ICP-OES และคำนวณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง และค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยการใช้อัตราส่วนของปูนต่อน้ำเท่ากับ 1:1 นำไปวัดด้วยเครื่อง pH meter (ASTM Standard C25, 2016)

3.2. วิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยนำตัวอย่างปูนมาร์ลที่มีปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง มาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เทคนิคส NIRS แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) และทำการวัดเชิงปริมาณ (quantification) โดยทำการเทตัวอย่างปูนที่เตรียม ใส่ลงใน Petridis ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยใช้แสงที่ความยาวคลื่น (wave length) 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) 4000-12500 ต่อเซนติเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ย่านนี้

3.3. สร้างและปรับปรุงสมการ

3.3.1. หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับตัวอย่างปูนแต่ละชนิด เพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยวิธีการจัดกลุ่ม (Cluster calibration) ตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) และปรับปรุงสมการโดยการปรับแต่ง (Pretreatments)

3.3.2. หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าทางเคมีปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง ปริมาณแคลเซียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ

กรมวิชาการเกษตร

โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) และปรับปรุงสมการโดยการปรับแต่ง (Pretreatments)

3.4. ประเมินผลสมการ

3.4.1. นำสมการแบบจัดกลุ่มที่ได้จากการปรับแต่งสมการ เมื่อสมการที่ได้แบ่งแยกชนิดปูนกันอย่างชัดเจนแล้วนำสมการไปประเมินผลในตัวอย่างปูนทวนสอบและปูนผสมโดยเปรียบเทียบผลการทำนายกับชนิดตัวอย่างปูน

3.4.2. นำสมการค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ได้จากการปรับแต่งสมการให้มีประสิทธิภาพในการประเมิน โดยการพิจารณาเลือกสมการที่ความสัมพันธ์ (R) สูง ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการแคลิเบรชั่น (Standard of Calibration : SEC) และค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบสมการ (Standard of Error of Prediction: SEP) ต่ำ หมายถึงสามารถตอบสนองได้ดี นำสมการที่ได้ไปประเมินค่าในตัวอย่างปูนมาร์ลทวนสอบ

3.4.3. การประเมินผลความสามารถของสมการตามแนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า R (ตารางที่ 1) (William, 2001)

ตารางที่ 1 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชั่นด้วยค่า r

ค่า r	ความสามารถของสมการแคลิเบรชั่น
± 0.5	ไม่ควรใช้ในการทำนาย (Not usable)
± 0.51-0.70	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ (Poor correlation)
± 0.71-0.80	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (Rough screening)
± 0.81-0.90	การทำนายเพื่อแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ หรือปริมาณค่าเบื้องต้น (Screening)
± 0.91-0.95	การทำนายเพื่องานวิจัย (Research) และงานทั่วไป
± 0.96-0.98	การทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (Quality assurance)
± 0.99 ขึ้นไป	ทุกงาน (Any application)

3.4.4. ทวนสอบสมการแคลิเบรชั่นโดยใช้ตัวอย่างปูนมาร์ลโดยพิจารณาความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) (AOAC, 2016 และ DEQ, 2013) เพื่อให้ได้สมการทำนายผลที่มีความถูกต้อง และแม่นยำ

1) พิจารณาความแม่น (Accuracy) โดยใช้ Paired t-test และ % Recovery หรือ Absolute different (AD) โดยการเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้ด้วยวิธี NIRS กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี

2) พิจารณาความเที่ยง (Precision) โดยใช้ %RSD (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ : Relative Standard Deviation)

กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการเตรียมตัวอย่างปูนเตรียมตัวอย่างที่ทราบชนิดตามมาตรฐานของตัวอย่างปูนมาร์ล ปูนชนิดอื่นและปูนผสม นำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ สร้างสมการการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ สร้างสมการการวัดเชิงปริมาณ และทวนสอบสมการการวัดเชิงคุณภาพและการวัดเชิงปริมาณ ดังตารางที่ 2

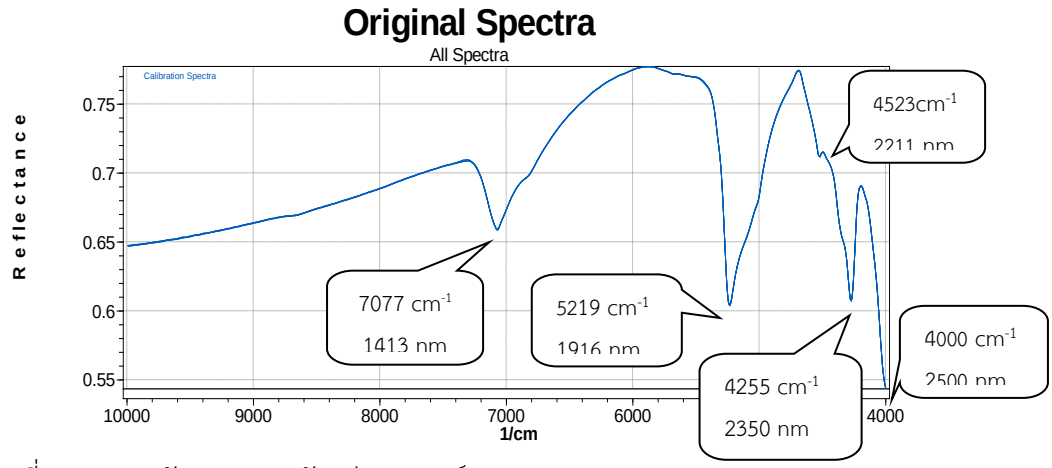
ตารางที่ 2 ตัวอย่างปูนมาร์ล ปูนชนิดอื่นและปูนผสม

ชนิดตัวอย่างปูน	อัตราส่วน	ดำเนินงาน	จำนวน (ตัวอย่าง)
ปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว	-	พิสูจน์เอกลักษณ์	ชนิดละ 1
ปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว	-	สร้างสมการการวัดเชิงคุณภาพ	ชนิดละ 50
ปูนมาร์ล	-	สร้างสมการการวัดเชิงปริมาณ	50
ปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว	-	ทวนสอบสมการการวัดเชิงคุณภาพ	25
ปูนมาร์ล	-	ทวนสอบสมการการวัดเชิงปริมาณ	16
ปูนมาร์ลผสมโดโลไมท์	1 : 9, 2 : 8, 3 : 7,	พิสูจน์เอกลักษณ์ และ	9
ปูนมาร์ลผสมปูนขาว	4 : 6, 5 : 5, 6 : 4,	ทวนสอบสมการการวัด	9
	7 : 3, 8 : 2, และ	เชิงคุณภาพ	
โดโลไมท์ผสมปูนขาว	9 : 1	ทวนสอบสมการการวัดเชิงคุณภาพ	9

2. วัดการดูดกลืนแสงเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

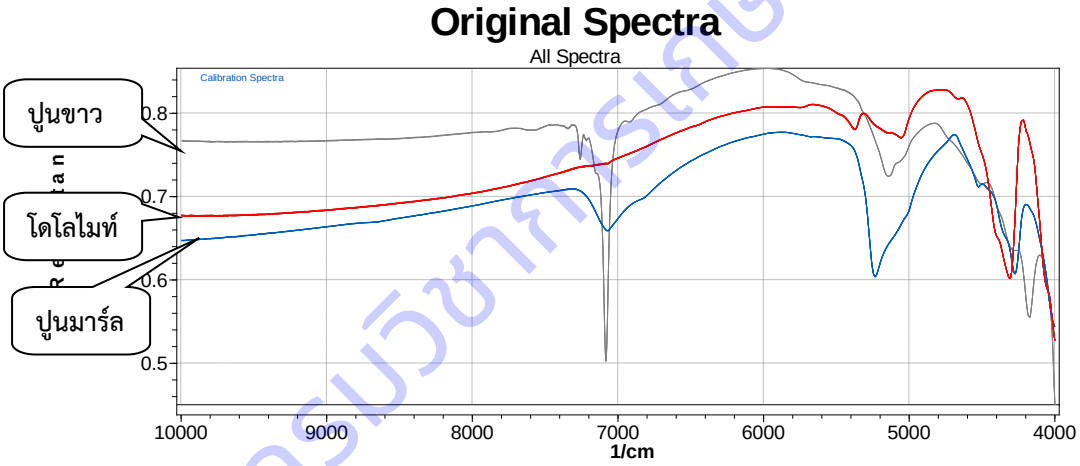
2.1. ผลการนำตัวอย่างปูนมาร์ลไปมาวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ได้สเปกตรัม NIR ภาพที่ 1 พบแถบการดูดกลืนรังสีอินฟาเรดย่านใกล้ของปูนมาร์ลที่ตำแหน่ง ตำแหน่ง 1413, 1916 และ 2211 nm (7077, 5219 และ 4523 cm^{-1}) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yaser และคณะ ที่พบตำแหน่งการดูดกลืนแสงของดินเหนียว และตำแหน่ง 2350 และ 2500 nm (4255 และ 4000 cm^{-1}) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sungchan และคณะ ที่พบตำแหน่งการดูดกลืนแสงของแคลเซียมออกไซด์ในหินปูน ตามองค์ประกอบของปูนมาร์ล

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 สเปกตรัม NIR ของตัวอย่างปูนมาร์ล

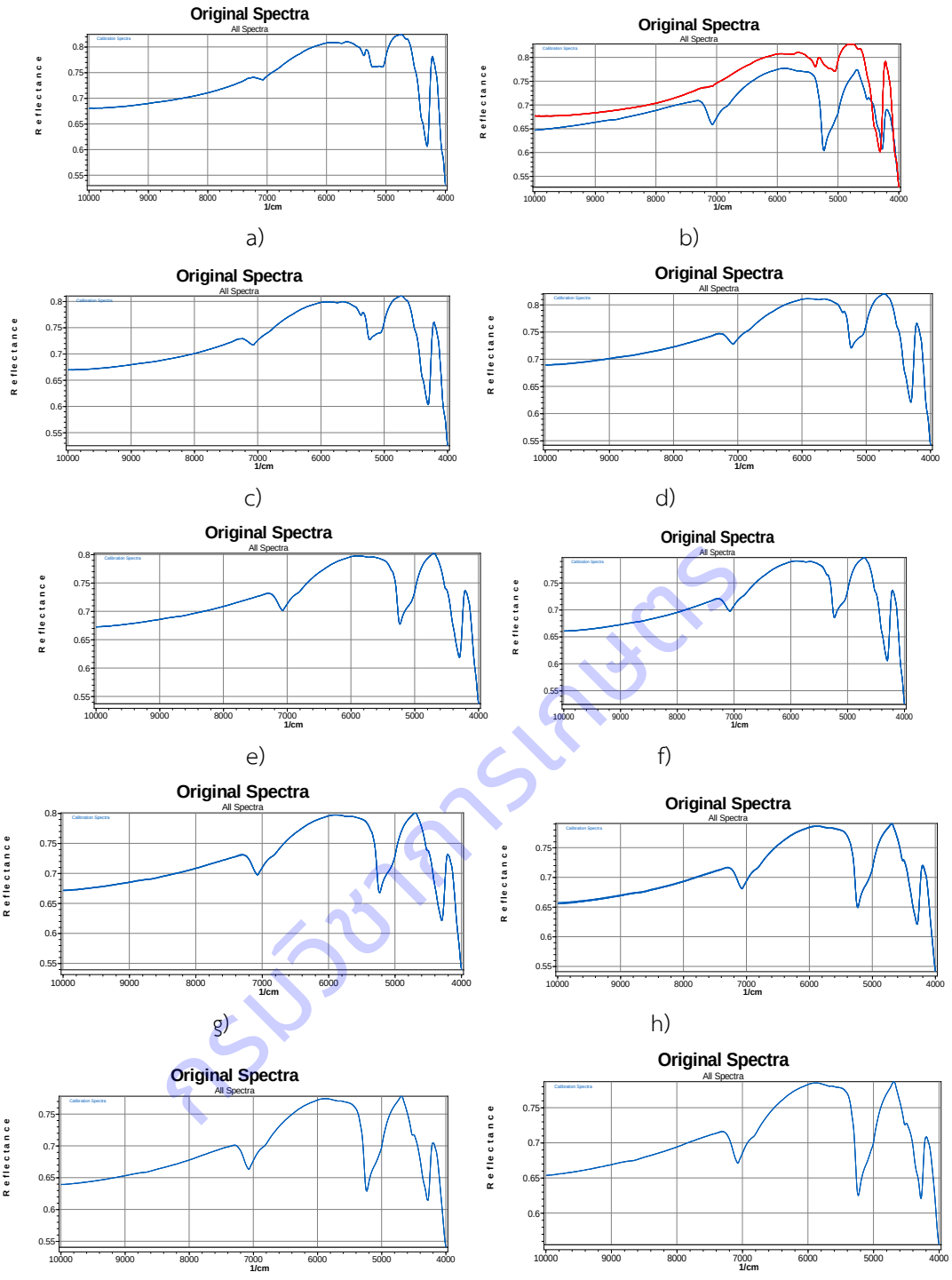
ผลการนำตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว ไปมาวัดค่าการดูดกลืนแสงได้สเปกตรัม NIR ภาพที่ 2 เมื่อพิจารณาพบว่าแถบการดูดกลืนแสงและลักษณะรูปร่างของสเปคตรัมของปูนแต่ละชนิดมีเอกลักษณ์แตกต่างกันอย่างชัดเจน



ภาพที่ 2 สเปกตรัม NIR ของตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว

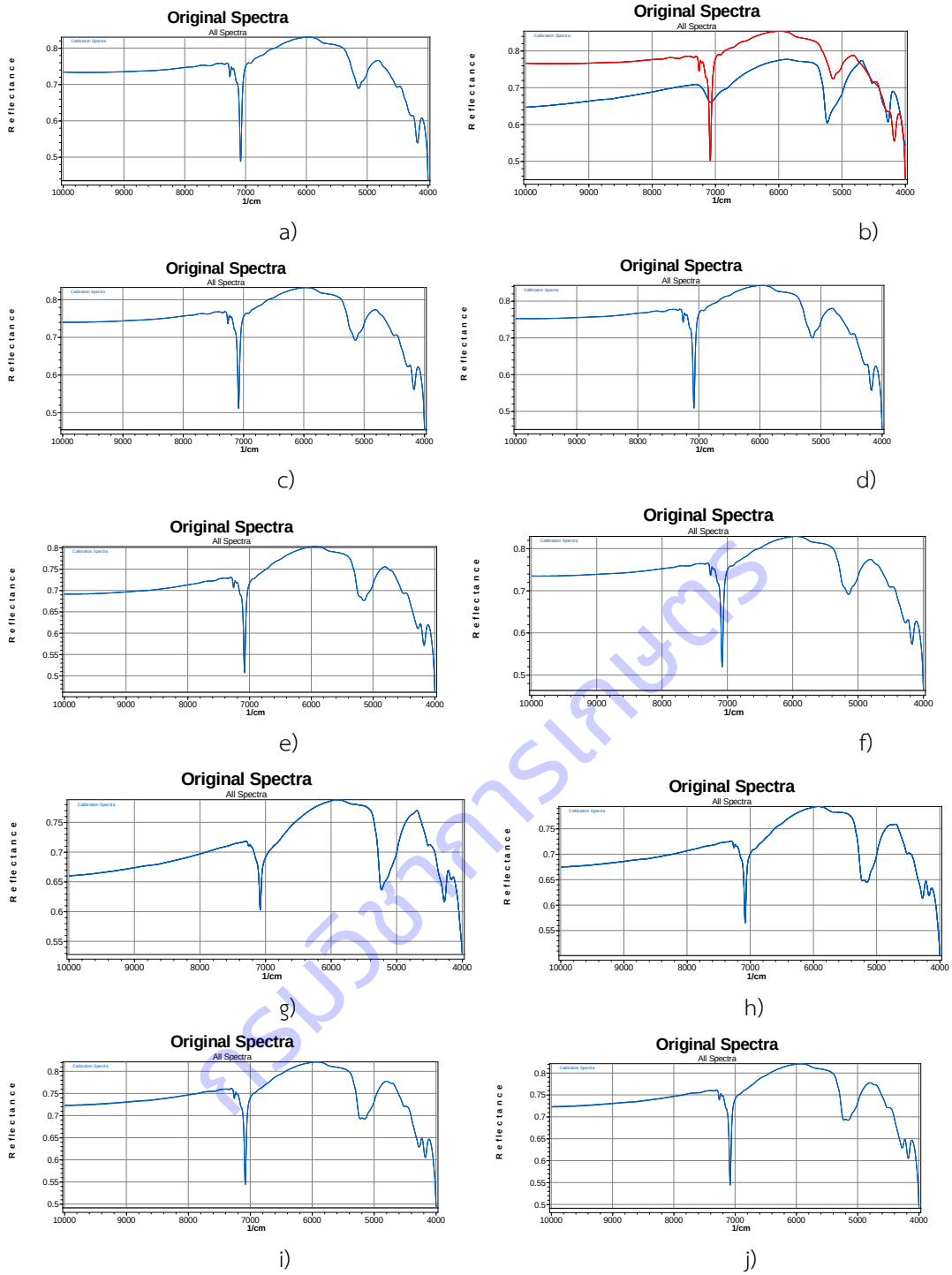
ผลการนำตัวอย่างปูนมาผสมกัน พบว่า การผสมกันสองชนิดปูนโดยปริมาตรระหว่างปูนมาร์ลกับโดโลไมท์ (ภาพที่ 3) มีแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนมาร์ลปรากฏที่อัตราส่วน 3 : 7 และเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่ตำแหน่ง 1916 nm (5219 cm^{-1}) และการผสมระหว่างปูนมาร์ลกับปูนขาว (ภาพที่ 4) พบแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นเอกลักษณ์ของปูนมาร์ลปรากฏที่อัตราส่วน 7 : 3 และเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่ตำแหน่ง 1916 และ 2350 nm (5219 และ 4255 cm^{-1}) และปูนขาวปรากฏลดลงที่ตำแหน่ง 1412 nm (7082 cm^{-1}) ตามอัตราส่วน

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 Original spectra ของปูนมาร์ลและโดโลไมท์และการผสมกันโดยปริมาตรในอัตราส่วนต่างๆ a) ปูนมาร์ลและโดโลไมท์ b) อัตราส่วน (1:9) c) อัตราส่วน (2:8) d) อัตราส่วน (3:7) e) อัตราส่วน (4:6) f) อัตราส่วน (5:5) g) อัตราส่วน (6:4) h) อัตราส่วน (7:3) i) อัตราส่วน (8:2) j) อัตราส่วน (9:1)

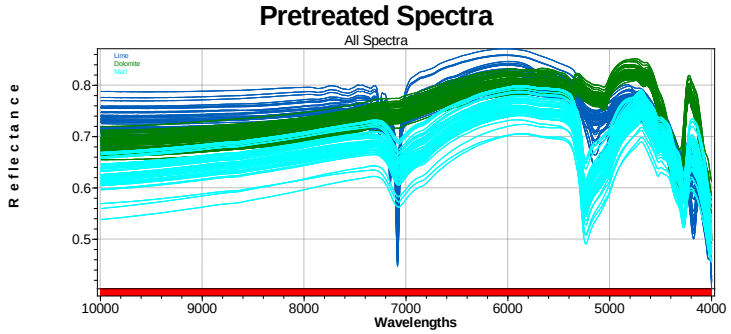
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 4 Original spectra ของปูนมาร์ลและปูนขาวและการผสมกันโดยปริมาตรในอัตราส่วนต่างๆ
a) ปูนมาร์ลและปูนขาว b) อัตราส่วน (1:9) c) อัตราส่วน (2:8) d) อัตราส่วน (3:7)
e) อัตราส่วน (4:6) f) อัตราส่วน (5:5) g) อัตราส่วน (6:4) h) อัตราส่วน (7:3)
i) อัตราส่วน (8:2) j) อัตราส่วน (9:1)

2.2. ผลการนำตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว ชนิดละ 50 ตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ เครื่อง NIRS เพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพได้สเปกตรัมของตัวอย่างปูน แสดงให้เห็นเป็นสเปคตรัมเริ่มต้น (Original spectra) (ภาพที่ 5)

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 5 Original spectra ของตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว จำนวน ชนิดละ 50 ตัวอย่าง

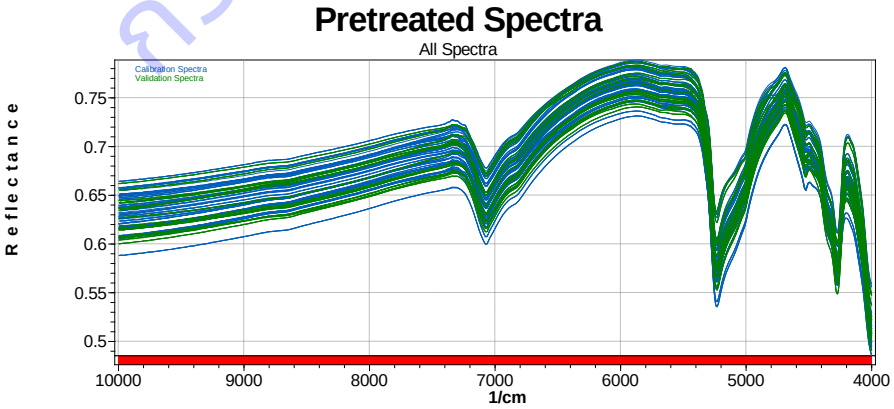
3. วิเคราะห์ค่าทางเคมีและวัดการดูดกลืนแสงวิเคราะห์เชิงปริมาณ

3.1. ผลการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จากตัวอย่างปูนทั้งหมดจำนวน 50 ตัวอย่าง ได้ผลวิเคราะห์ ในช่วง 91-106%, 50.95-59.41% และ 8.02-8.87 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 3.61, 2.24 และ 0.22 (ตารางที่ 3) ตัวอย่างปูนที่เตรียมได้เป็นตัวอย่างที่ใช้ศึกษาจำนวนหนึ่งซึ่งยังไม่ครอบคลุมช่วงการใช้งานได้ในปัจจุบัน

ตารางที่ 3 ผลการเตรียมตัวอย่างปูนมาร์ลและวิเคราะห์ปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง

รายการวิเคราะห์	CCE (%)	CaO (%)	pH (pH Unit)
พิสัย	91-106	50.95-59.41	8.02-8.87
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	3.61	2.24	0.22

3.2. ผลการนำตัวอย่างปูนมาร์ล จำนวน 50 ตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้ เครื่อง NIRS เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้สเปกตรัมของตัวอย่างปูน แสดงให้เห็นเป็นสเปคตรัมเริ่มต้น (Original spectra) (ภาพที่ 6)



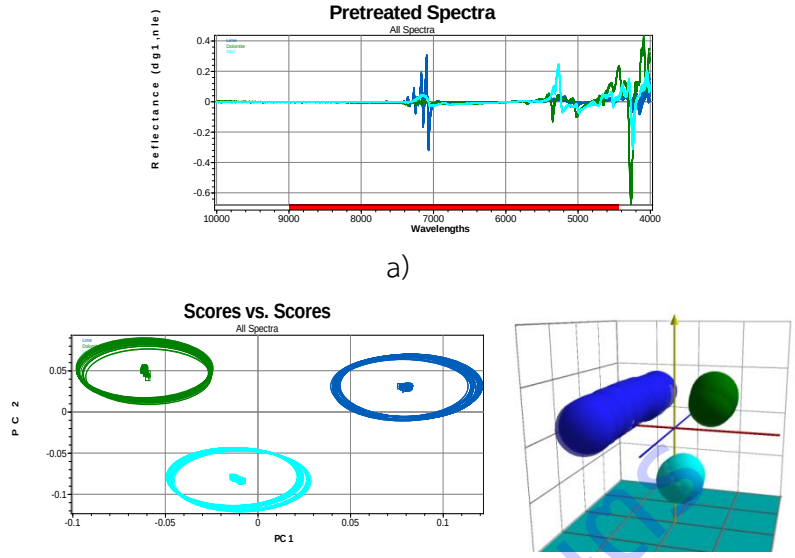
ภาพที่ 6 Original spectra ของปูนมาร์ล จำนวน 50 ตัวอย่าง

4. สร้างและปรับปรุงสมการ

4.1. การวัดเชิงคุณภาพ ผลการนำสเปกตรัมเริ่มต้น ไปสร้างสมการด้วยวิธีจัดกลุ่ม (Cluster calibration) ของปูนแต่ละชนิด ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม

กรมวิชาการเกษตร

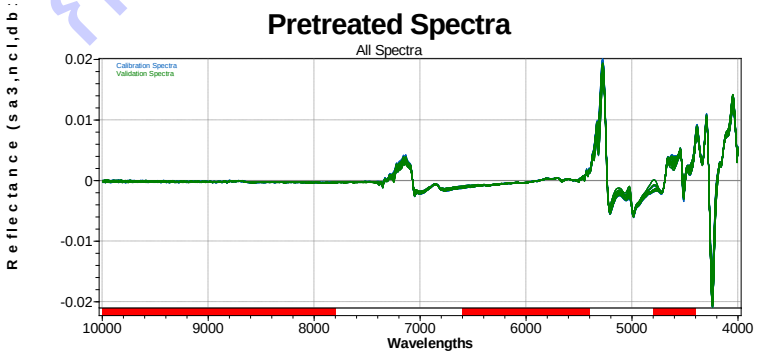
(Pretreatment) ที่แยกกลุ่มกันอย่างชัดเจน ของตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว ได้แบบ Derivatives 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 สเปคตรัมปรับแต่ง (a) และสมการจัดกลุ่มแบบ 2D (b) และแบบ 3D (c) ของตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว ปรับแต่ง Pretreatments แบบ Derivatives 1st Savitzky - Golay a points (dg1) และ Normalization to Unit Length (nle)

4.2. การวัดเชิงปริมาณ

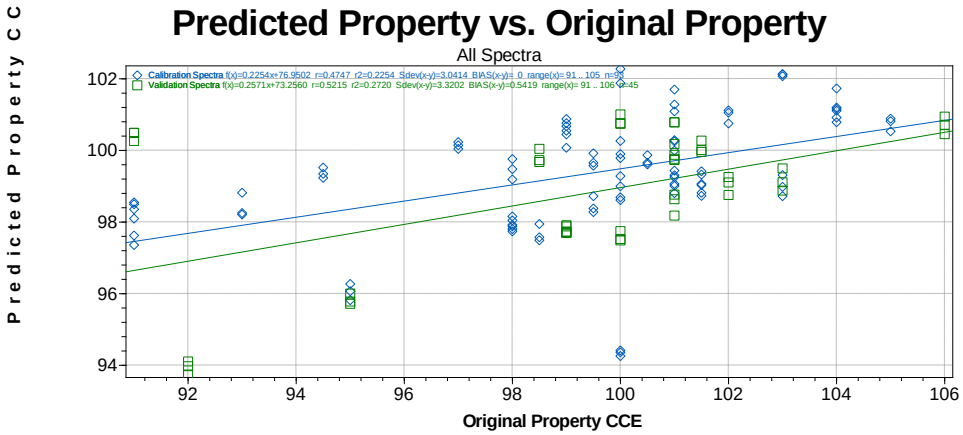
4.2.1. เมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ Smoothing Average 3 Points (sa3), Normalization by closure (ncl) และ Derivatives 1st BCAP (db1) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) ของปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง จำนวน 50 ตัวอย่าง แบบ Smoothing Average 3 Points (sa3), Normalization by closure (ncl) และ Derivatives 1st BCAP (db1)

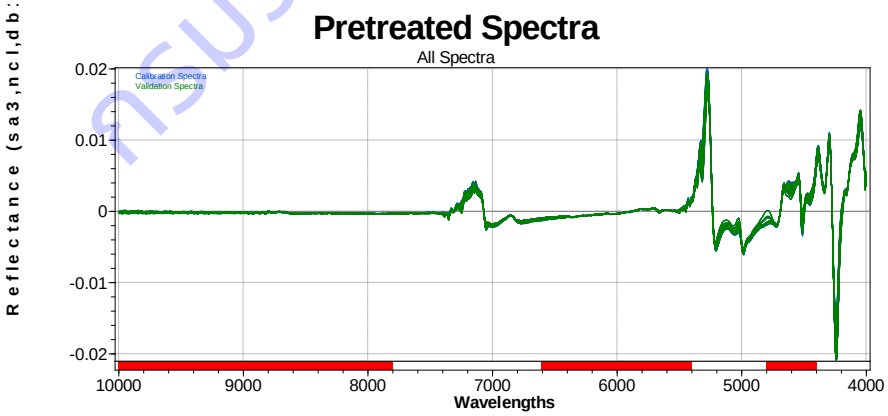
กรมวิชาการเกษตร

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.47 ความผิดพลาดมาตรฐานของการจำลอง (SEC) เท่ากับ 3.04 ความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 3.02 (ภาพที่ 9 และตารางที่ 4)



ภาพที่ 9 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการของปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง และค่าจากการประเมินจากเทคนิค NIRS ปรับแต่ง Smoothing Average 3 Points (sa3), Normalization by closure (ncl) และ Derivatives 1st BCAP (db1)

4.2.2. เมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีปริมาณแคลเซียมออกไซด์ คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ Smoothing Average 3 Points (sa3), Normalization by closure (ncl) และ Derivatives 1st BCAP (db1) (ภาพที่ 10)



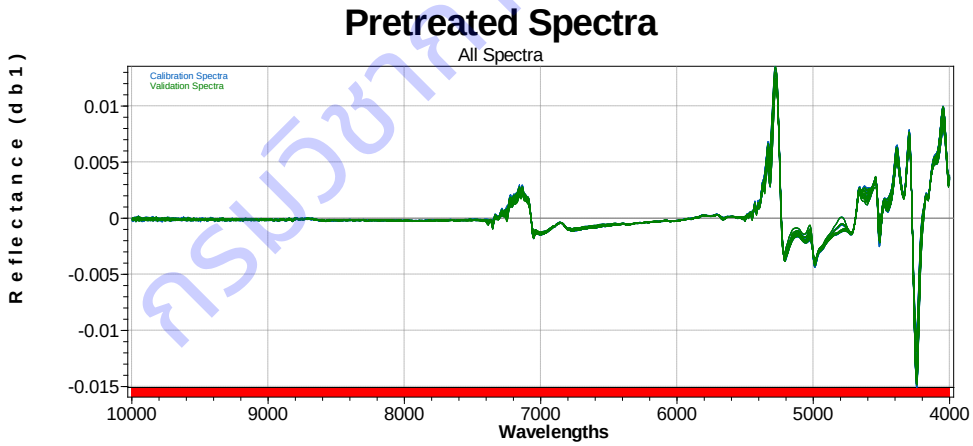
ภาพที่ 10 สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) ของปริมาณแคลเซียมออกไซด์ จำนวน 50 ตัวอย่าง แบบ Smoothing Average 3 Points (sa3), Normalization by closure (ncl) และ Derivatives 1st BCAP (db1)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณแคลเซียมออกไซด์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.50 ความผิดพลาดมาตรฐานของการจำลอง (SEC) เท่ากับ 1.67 ความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 1.83 (ภาพที่ 11 และตารางที่ 4)

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 11 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการของปริมาณแคลเซียมออกไซด์ และค่าจากการประเมินจากเทคนิค NIRS ปรับแต่ง Pretreatments แบบ Smoothing Average 3 Points (sa3), Normalization by closure (ncl) และ Derivatives 1st BCAP (db1)

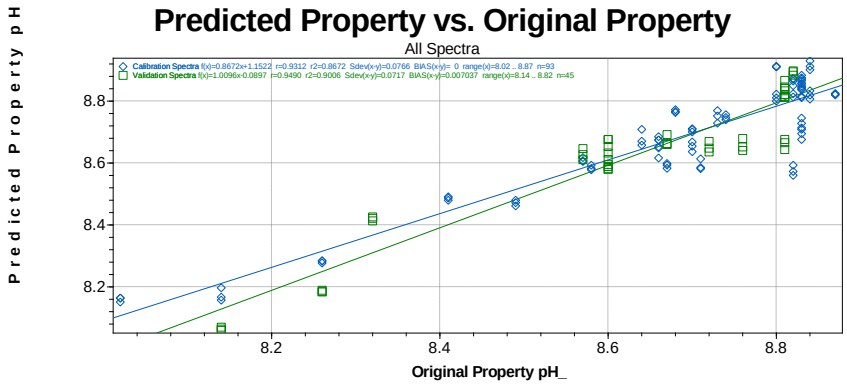
4.2.3. เมื่อนำสเปกตรัมเริ่มต้นไปสร้างและปรับปรุงสมการ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีปริมาณค่าความเป็นกรด-ด่าง คำนวณด้วยวิธี PLS calibration ปรับแต่งสเปคตรัมและเลือกวิธีปรับแต่งสเปคตรัม (Pretreatment) ที่ตอบสนองดีที่สุดได้ Derivatives 1st BCAP (db1) (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 สเปคตรัมปรับแต่ง (Pretreatments) ของปริมาณความเป็นกรด-ด่าง จำนวน 50 ตัวอย่าง แบบ Derivatives 1st BCAP (db1)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.93 ความผิดพลาดมาตรฐานของการจำลอง (SEC) เท่ากับ 0.08 ความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (SEP) เท่ากับ 0.07 (ภาพที่ 13 และตารางที่ 4)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 13 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีจากห้องปฏิบัติการของปริมาณความเป็นกรด-ด่าง และค่าจากการประเมินจากเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy-NIRS) ปรับแต่ง Pretreatments แบบ Derivatives 1st BCAP (db1)

ตารางที่ 4 ค่าทางสถิติของสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง (CCE) แคลเซียมออกไซด์ (CaO) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ประเมินด้วยเทคนิค NIRS

รายการวิเคราะห์	จำนวนตัวอย่าง	ปรับแต่งสเปกตรัม	r	SEC	SEP
CCE (%)	50	sa3	0.47	3.04	3.32
		ncl			
		db1			
CaO (%)	50	sa3	0.50	1.67	1.83
		ncl			
		db1			
pH	50	db1	0.93	0.08	0.07

5. ประเมินผลสมการ

5.1. ทดสอบสมการทำนายผลเชิงคุณภาพสำหรับการจัดจำแนกชนิดปูนแบบจัดกลุ่ม (Cluster calibration)

5.2. ทดสอบตัวอย่างปูนมาร์ล โดโลไมท์ และปูนขาว ทวนสอบ จำนวน 25 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบผลการทำนายกับชนิดตัวอย่างปูน พบว่าสามารถทำนายได้ถูกต้องทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

5.3. ทดสอบตัวอย่างปูนผสมสองชนิดใน 9 อัตราส่วนโดยปริมาตร ทั้งหมดจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่าสามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40.7 ดังนี้

1) การผสมโดโลไมท์กับปูนขาว สามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.1 เมื่อมีปริมาตรปูนขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 10

กรมวิชาการเกษตร

2) การผสมปูนมาร์ลกับโดโลไมท์สามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 77.8 เมื่อมีปริมาตรโดโลไมท์มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30

3) การผสมปูนมาร์ลกับปูนขาวสามารถทำนายได้อย่างถูกต้อง จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.3 เมื่อมีปริมาตรปูนขาวน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30

5.4. ทดสอบสมการแคลิเบรชั่นโดยใช้ตัวอย่างปูนมาร์ลทวนสอบได้ค่าทำนายจากเทคนิค NIRS (ตาราง

5) พิจารณาความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) (ตารางที่ 6)

1) พิจารณาความแม่น (Accuracy) โดยเปรียบเทียบค่าที่ทำนายได้กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้ paired t-test และ % Recovery หรือ Absolut different (AD) พบว่าวิธีหาปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่า ค่า t_{ext} เท่ากับ 0.21, 0.21 และ -0.08 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า ค่า t_{crit} แสดงว่าผลการทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ% Recovery ของค่าความสามารถทำให้เป็นกลางและแคลเซียมออกไซด์ อยู่ในช่วง 93-111% ตามลำดับ Absolut different (AD) ของค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 0.0-0.7

2) พิจารณาความเที่ยง (Precision) ด้วย %RSD พบว่าค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง และแคลเซียมออกไซด์ มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 0.07 - 0.38 (%RSD ≤ 1.3) และ 0.08 – 0.41 (%RSD ≤ 1.9) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC

ตารางที่ 5 ผลวิเคราะห์ค่าทางเคมีโดยวิธีห้องปฏิบัติการและค่าทำนายจาก NIR ของตัวอย่างทวนสอบปูนมาร์ล

รายการวิเคราะห์	CCE (%)	CaO (%)	pH
ค่าทางเคมี	91-106	50.95-59.41	8.02-8.87
ค่าทำนายจาก NIR	94-102	52.46-57.27	8.20-8.85

ตารางที่ 6 ประเมิน Accuracy และ Precision ของสมการที่ใช้ในการทำนายค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างปูนมาร์ล

รายการวิเคราะห์	Accuracy				Precision		
	$t_{ext.}$	$t_{crit.}$	Evaluation	% Recovery[1] /AD[2]	%RSD	เกณฑ์ %RSD	Evaluation
CCE (%)	0.21	2.13	non significant	93-111[1]	0.07-0.38	1.3	pass
CaO (%)	0.21	2.13	non significant	93-111[1]	0.08 – 0.41	1.9	pass
pH	-0.08	2.13	non significant	0.0-0.7[2]	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

จากข้อมูลการทำนายเชิงปริมาณแสดงว่าสามารถนำสมการมาใช้ประเมินค่าปริมาณค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และความเป็นกรด-ด่างในปูนมาร์ล ได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้เป็นการสร้างสมการแคลิเบรชั่นกลุ่มจำนวนตัวอย่างน้อย ในการสร้างสมการสมการแคลิเบรชั่นต้องมีจำนวนมากพอที่ครอบคลุมความแปรปรวนของตัวอย่างหากต้องการนำไปใช้ต้องทำการพัฒนาและปรับปรุงสมการเพื่อนำมาใช้ประเมินค่าเชิงปริมาณให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างในการสร้างสมการให้มากขึ้นและมีค่าทางเคมีที่กระจายอย่างสม่ำเสมอกันและคลอบคลุมการใช้งานจริง

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เทคนิคอินฟาเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy ; NIRS) ใช้หลักการวัดความสัมพันธ์กับสสารที่ต้องการประเมินหรือสสารที่สามารถเกิดอันตรกริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ ด้วยวิธีการสะท้อนแสง (Reflection) คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสสารได้ไม่เท่ากัน ทำให้ผลที่แสดงออกมาบอกถึงความแตกต่างได้ จึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาประมวลผลวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพที่ต้องการได้ สามารถพิสูจน์ เอกลักษณ์ของปูนมาร์ลและปูนชนิดอื่นได้จากแถบการดูดกลืนแสงและลักษณะรูปร่างของสเปคตรัมของชนิดตัวอย่างที่แตกต่างกัน ทำนายผลเชิงคุณภาพสำหรับการจัดจำแนกได้ถูกต้องตามชนิดตัวอย่างสารปรับปรุงดิน ส่วนตัวอย่างผสมทำนายได้อย่างถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 40.7 และสามารถนำมาใช้ประเมินค่าค่าความสามารถทำให้เป็นกลาง แคลเซียมออกไซด์ และความเป็นกรด-ด่างได้อย่างมีความแม่นยำ และรวดเร็ว สามารถพัฒนาและปรับปรุงสมการเพื่อนำมาใช้ประเมินค่าเชิงปริมาณให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างในการสร้างสมการให้มากขึ้นและมีค่าทางเคมีที่กระจายอย่างสม่ำเสมอกันและคลอบคลุมการใช้งานจริง เพื่อให้ได้สมการ แคลิเบรชั่นที่เหมาะสม มีความถูกต้อง และแม่นยำ ในการนำไปใช้งานต่อไป

กิจกรรมที่ 4 พัฒนาตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified reference materials) ด้วยวิธีมาตรฐานปฐมภูมิ (primary standard method)

ศึกษาหาค่ากำหนดของเหล็กทั้งหมด และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิงด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)

Study of the certified value of total iron and total copper in soil by inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)

กัญฐณา คล้ายแก้ว ญาณธิชา จิตต์สะอาด สงกรานต์ มะลิสอน สุภา โพธิจันทร์ จิตติรัตน์ ชูชาติ พจมาลย์ ภู่สาร

คำสำคัญ (Key words)

วัสดุอ้างอิง, ดิน, เหล็กทั้งหมด, ทองแดงทั้งหมด

Reference material, Soil, Total iron, Total copper

บทคัดย่อ (Abstract)

วัสดุอ้างอิงหรือตัวอย่างอ้างอิงสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินได้ทำการจัดเตรียมและศึกษาตามแนวทางของ ISO Guide 35 การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงทำโดยการนำตัวอย่างไปย่อย และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) ตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมจะถูกนำมาบด ร่อน ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งใส่ถุงอลูมิเนียมฟอยล์ ศึกษาและประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความเสถียรของตัวอย่างอ้างอิงด้วยสถิติ Standard univariate analysis of

กรมวิชาการเกษตร

variance (ANOVA) และ Regression analysis จากการประเมินทางสถิติพบว่าตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันและมีความเสถียรเพียงพอภายใต้สภาวะที่ศึกษา ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียรระยะสั้น และความเสถียรระยะยาว เท่ากับ 0.91–0.98, 0.02-0.11 และ 1.62-4.64% ตามลำดับ ตัวอย่างดินอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (k=2) ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 8340±298 mg/kg และทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 42.83±4.08 mg/kg

A reference material for total iron and total copper analysis in soil was produced and characterized according to the ISO Guide 35. Characterization of the reference material was performed using acid digestion and inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) for iron and copper analysis. The collected soil was ground, sieved, homogenized and divided into aluminium foil bag. The homogeneity and stability of the prepared reference material were investigated and evaluated using standard univariate analysis of variance (ANOVA) and regression analysis. Statistical evaluation of the data showed good homogeneity and stability of the reference material under the conditions studied. Homogeneity and stability assessment of the material demonstrated that the relative standard uncertainties due to the inhomogeneity, the short-term instability and the long-term instability were 0.91–0.98, 0.02-0.11 and 1.62-4.64%, respectively. The properties values and combined uncertainty for at the 95% confidence level (k=2) were 8340±298 mg/kg for total iron and 42.83±4.08 mg/kg for total copper.

บทนำ (Introduction)

ในการวิเคราะห์ทดสอบในห้องปฏิบัติการจะต้องมีการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเฝ้าระวังไม่ให้เกิดความผิดพลาดของการทดสอบ ทำให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือ นอกจากการควบคุมคุณภาพภายนอก เช่น การเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ เป็นต้น ยังมีการควบคุมคุณภาพภายในโดยใช้วัสดุอ้างอิง (Reference Materials, RM) ควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง วัสดุอ้างอิงหรือตัวอย่างอ้างอิงที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นวัสดุหรือสารมาตรฐานที่ถูกจัดทำขึ้นเพื่อให้เหมาะสำหรับการใช้งานในกระบวนการวัด โดยจะถูกผลิตและทดสอบภายใต้กระบวนการผลิตที่เข้มงวด และมีคุณสมบัติที่เพิ่มเติมจากสารเคมีทั่วๆ ไป คือ วัสดุนั้นจะต้องมีคุณสมบัติความเป็นเนื้อเดียว (Homogeneity) และความเสถียร (Stability) (Quevauviller, 2018) วัสดุอ้างอิงถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือในงานเคมีวิเคราะห์ โดยเฉพาะกับข้อกำหนดทางกฎหมาย งานด้านสิ่งแวดล้อม และงานวิเคราะห์ทางการแพทย์ จึงทำให้มีความต้องการใช้วัสดุอ้างอิงสำหรับการควบคุมคุณภาพ ไม่ว่าจะเป็นการสอบเทียบ การตรวจสอบวิธีทดสอบ การสอบกลับได้ของการวัด และการควบคุมคุณภาพ เป็นต้น วัสดุอ้างอิงจึงกลายเป็นเครื่องมือสำคัญสำหรับกระบวนการวัดของห้องปฏิบัติการเพื่อให้เกิดความ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

น่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ และเพื่อให้การดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

ตัวอย่างอ้างอิงที่นำมาใช้เป็นตัวอย่างสำหรับควบคุมคุณภาพภายใน สามารถนำมาใช้ได้ทั้งวัสดุอ้างอิงและวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Materials, CRM) โดยวัสดุอ้างอิงรับรองจะมีคุณสมบัติที่ครอบคลุมและผ่านมาตรฐานการผลิตและทดสอบที่เข้มงวดมากกว่าวัสดุอ้างอิง ซึ่งความแตกต่างที่สำคัญคือ CRM นั้นจะต้องมีการตรวจสอบย้อนกลับทางมาตรวิทยา (Traceability) และความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty) (Quevauviller, 2018) เพิ่มเติมจากคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิงทั่วไปที่ต้องมีความเป็นเนื้อเดียวและความเสถียร โดยกระบวนการผลิตและทดสอบต้องได้รับการรับรองมาตรฐานตาม ISO 17034 โดยทั่วไปแล้วเมื่อมีการจัดหาและเตรียมตัวอย่างอ้างอิงแล้วจะต้องมีการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร และค่าคุณสมบัติของตัวอย่างที่เตรียมขึ้น การหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้าอิงตาม ISO 17034 สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ด้วยหลายห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีวิเคราะห์ต่างๆ กัน การวิเคราะห์หลายห้องปฏิบัติการโดยกำหนดวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีเดียวกัน (Kawamoto, *et al*., 2019; Santana Santos *et al*., 2020) หรือการวิเคราะห์ด้วยห้องปฏิบัติการเดียวโดยวิธี Primary method เป็นต้น (Olivares *et al*., 2017; Linsinger *et al*., 2019) Primary method เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังระบบหน่วยสากล (SI) ได้ (Olivares *et al*., 2017) และจัดเป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง ซึ่งวิธีที่ได้รับการยอมรับจาก Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology (CCQM) ให้เป็น Primary method มีหลายวิธี ดังนี้ Gravimetry, Titrimetry, Coulometry, Isotope dilution mass spectrometry (IDMS), Two-step IDMS และ Freezing-point depression (Milton *et al*., 2001) มีหลายงานวิจัยที่นำวิธี IDMS มาประยุกต์ใช้ในการหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิงที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างเช่น การพัฒนาวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ Ethyl carbamate ในอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยใช้วิธี IDMS ร่วมกับ Gas chromatography (GC) (Vicentim *et al*., 2019) และการพัฒนาวัสดุอ้างอิงรับรองสำหรับวิเคราะห์ธาตุในน้ำทะเล โดยใช้วิธี IDMS ร่วมกับ ICP-MS (Ari, 2020; Lee *et al*., 2011) เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมตัวอย่างดินอ้างอิงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด โดยนำตัวอย่างดินจากธรรมชาติมาเตรียมเป็นตัวอย่างดินอ้างอิง จากนั้นทำการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร ค่าคุณสมบัติ และค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งต่างๆ ของตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้น ตามมาตรฐาน ISO 17034 และ ISO Guide 35 เพื่อให้ได้ตัวอย่างอ้างอิงที่มีค่าคุณสมบัติที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1) ศึกษาการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS เช่น อัตราการไหลของเชื้อเพลิง อัตราการไหลของตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

และอัตราการดูดสารละลายตัวอย่าง ศึกษา Mass spectral interferences หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) หาค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ตรวจสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS

2) เตรียมตัวอย่างดินอ้างอิง

จัดหาตัวอย่างชุดดินปากช่อง จากนั้นนำตัวอย่างมาบดและร่อนตัวอย่างด้วยตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร นำตัวอย่างที่ร่อนแล้วทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และตักใส่ซองอลูมิเนียมฟอยล์ ปิดซองให้แน่น และกำหนดหมายเลขตัวอย่างในแต่ละซอง

3) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างดินอ้างอิง

ทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอ้างอิง โดยการสุ่มตัวอย่างแบบ Random จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นประเมินผลทางสถิติด้วย Cochran's test และ One-way ANOVA และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) ตามแนวทาง ISO Guide 35

การประเมินผลทางสถิติด้วยวิธี Cochran's test เป็นการศึกษาความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างอ้างอิงตัวอย่างเดียวกัน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนภายในตัวอย่าง สามารถคำนวณ C_{cal} ได้จากสมการ

$$C_{cal} = D_{max}^2 / \sum D_i^2$$

เมื่อ D_i = ผลต่างของผลวิเคราะห์ 2 ซ้ำของแต่ละคู่ คู่ที่ i เมื่อ i = 1, 2, 3,..., 10

D_{max} = ผลต่างของผลวิเคราะห์ 2 ซ้ำของคู่ที่มีค่าสูงสุด

ΣD_i^2 = ผลรวมกำลังสองของผลต่างของผลวิเคราะห์ทุกคู่

ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่าง C_{cal} และ C_{crit} โดยค่า C_{crit} ได้จากตาราง Cochran's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยหากค่า $C_{cal} < C_{crit}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 หรือสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ซ้ำภายในขวดตัวอย่างเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน จากนั้นจะทำการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่างด้วยสถิติ One-way ANOVA ต่อไป

การประเมินทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA เป็นการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง เพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอ้างอิง โดยคำนวณหาค่า F_{cal} จากสมการ

$$F_{cal} = MS_{between} / MS_{within}$$

เมื่อ MS_{within} = Mean squares within sample

$MS_{between}$ = Mean squares between sample

ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่าง F_{cal} และ F_{crit} ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยค่า $F_{cal} < F_{crit}$ แสดงว่าความแปรปรวนของผลวิเคราะห์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 หรือสรุปได้ว่าวัสดุอ้างอิงมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

กรมวิทยาศาสตร์

4) ทดสอบความเสถียรระยะสั้น (Short-term stability) ของตัวอย่างดินอ้างอิง

ทำการทดสอบความเสถียรระยะสั้นโดยทำการทดลองส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และนำผลวิเคราะห์มาประเมินทางสถิติ และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) ตามแนวทาง ISO Guide 35

การศึกษาความเสถียรจะประเมินทางสถิติด้วยวิธี Trend analysis ตามแนวทางของ ISO Guide 35 โดยนำข้อมูลผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารในตัวอย่างอ้างอิงกับระยะเวลาการเก็บรักษา จากนั้นหาสมการ Regression line คือ $y = b_1x + b_0$ เมื่อ x คือระยะเวลาการเก็บรักษา และ y คือค่าผลวิเคราะห์ของสารในตัวอย่างอ้างอิง ทำการทดสอบว่า Slope (b_1) ที่ได้มีค่าต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ซึ่งถ้าค่า Slope ต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าตัวอย่างไม่เสถียรในช่วงเวลานั้น ตัวอย่างอ้างอิงจะมีความเสถียร เมื่อค่า $|b_1|/s(b_1)$ จะต้องมีค่าน้อยกว่าค่า $t_{0.95,n-2}$ และค่า b_1, $s(b_1)$ และ t_{stat} หาได้จากสมการ

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{stat} = \frac{|b_1|}{s(b_1)}$$

กรมวิทยาศาสตร์การเกษตร

โดย

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n-2}}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}$$

เมื่อ $s(b_1)$ = Standard deviation of slope

$t_{0.95,n-2}$ = t critical value ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%)

ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่าง t_{stat} และ $t_{0.95,n-2}$ ถ้าหากค่า $t_{stat} < t_{0.95,n-2}$ แสดงว่าตัวอย่างอ้างอิงมีความเสถียร และคำนวณค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรได้จากสมการ

$$U_{sts} = s(b_1)t$$

เมื่อ $s(b_1)$ = Standard deviation of slope

t = ระยะเวลาที่ศึกษา

5) ทดสอบความเสถียรระยะยาว (Long-term stability) ของตัวอย่างดินอ้างอิง

ทำการทดสอบความเสถียรระยะยาวโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 12 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างในช่วงเวลา 0, 1, 3, 6 และ 12 เดือน ครั้งละ 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และนำผลวิเคราะห์มาประเมินทางสถิติ จากนั้นคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว (U_{lts}) เช่นเดียวกันกับการทดสอบความเสถียรระยะสั้น

6) ศึกษาหาค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิง

ทำการสุ่มตัวอย่างอ้างอิงมาจำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP–IDMS จากนั้นคำนวณค่าคุณสมบัติด้วยวิธี Weighted mean ดังนี้

$$y_{char} = \sum w_i x_i \,/\, \sum w_i$$

โดย

$$w_i = 1/u_i^2$$

และคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการหาค่าคุณสมบัติจากสมการ

$$U_{char} = \sqrt{\sum w_i^2 u_i^2}$$

7) ประเมินความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง

ทำการประเมินความไม่แน่นอนของปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิงตามแนวทาง ISO Guide 35 ตามสมการ

$$U_{RM} = k\sqrt{U_{char}^2 + U_{bb}^2 + U_{lts}^2 + U_{sts}^2}$$

เมื่อ U_{RM} = ค่าความไม่แน่นอนขยายของวัสดุอ้างอิง

U_{char} = ค่าความไม่แน่นอนจากการศึกษาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง

U_{bb} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน

U_{lts} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว

กรมวิทยาศาสตร์

U_{lts} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น

k = Coverage factor (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, k =2)

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ศึกษาการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS

1.1) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ในการหาปริมาณเหล็ก และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดิน

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ในการหาปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ Plasma gas flow, Auxiliary gas flow และ Nebulizer gas flow เท่ากับ 18.0, 1.2 และ 0.86 L/min ตามลำดับ ค่า Sample uptake rate เท่ากับ 270 µL/min ค่า RF power เท่ากับ 1600 W ค่า Dead time เท่ากับ 35 ns โดยใช้ Ge เป็น Internal standard และวัดปริมาณไอโซโทปดังนี้ ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu, และ ^{65}Cu ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง ICP-MS ที่ใช้ในการหาปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดิน

Parameter	Value
Plasma gas flow	18.0 L/min
Auxiliary gas flow	1.2 L/min
Nebulizer gas flow	0.86 L/min
Sample uptake rate	270 µL/min
RF power	1600 W
Dead time	35 ns
Internal standard	Ge
Measured isotopes	^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu, ^{65}Cu

1.2) ศึกษา Mass spectral interferences ในการหาเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS

ในการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS นั้น มีสารรบกวนที่สำคัญ คือ แคลเซียมและโซเดียม ซึ่งจะมีผลทำให้สัญญาณของเหล็กและทองแดงเพิ่มขึ้น (Thomas *et al.*, 1998; Lum *et al.*, 2016) เนื่องจากในตัวอย่างดินมีองค์ประกอบของแคลเซียมและโซเดียม ซึ่งอาจมีผลต่อการหาปริมาณเหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS จึงได้ทำการศึกษาการรบกวนของแคลเซียมและโซเดียม ต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดง โดยนำสารละลายมาตรฐานเหล็กและทองแดงที่มีความเข้มข้น 2 mg/kg มาเติมสารละลายมาตรฐานแคลเซียมและโซเดียมที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 และ 20% แล้ว

กรมวิชาการเกษตร

นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP–IDMS ผลการทดลองแสดงอยู่ในตารางที่ 2 พบว่าแคลเซียมที่ความเข้มข้น 0–20% ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ^{54}Fe, ^{63}Cu และ ^{65}Cu โดยผลการวิเคราะห์มี %recovery อยู่ในช่วง 96–107, 98–101 และ 96–107% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 80–110% ตามมาตรฐาน AOAC ในการวิเคราะห์ ^{56}Fe พบว่าที่ความเข้มข้นของแคลเซียมเท่ากับ 20% มี Recovery ที่สูง 106% เนื่องจากแคลเซียมเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนที่อยู่ในสารละลายเกิดเป็น $^{40}Ca^{16}O$ ซึ่งสามารถรบกวนการวิเคราะห์ ^{56}Fe ได้ (Cristina, *et al.*, 1999) สำหรับการศึกษาผลของแคลเซียมต่อการวิเคราะห์ ^{57}Fe พบว่าค่า Recovery อยู่ในช่วง 99–158% ซึ่งเกินจากมาตรฐาน AOAC และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้น เนื่องจากแคลเซียมเกิดทำปฏิกิริยากับออกซิเจนที่อยู่ในสารละลายเกิดเป็น $^{40}Ca^{16}OH$ ซึ่งไปรบกวนการวิเคราะห์ ^{57}Fe (Cristina, *et al.*, 1999) ปริมาณแคลเซียมในตัวอย่างดินในพื้นที่เขตร้อนมีปริมาณที่ต่ำ คือ 0.1–0.3% (Brandy, *et al.*, 2002) เมื่อนำมาเตรียมเป็นตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP–IDMS จะมีความเข้มข้นไม่เกิน 20% ดังนั้นแคลเซียมจึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ^{56}Fe และ ^{57}Fe ในช่วงที่ศึกษา

จากการศึกษาผลกระทบของโซเดียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0, 1, 5, 10 และ 20% ต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดง พบว่าค่า Recovery ของ ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu และ ^{65}Cu อยู่ในช่วง 103–105, 99–106, 90–99, 99–106 และ 103–105% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งอยู่ในช่วงตามมาตรฐาน AOAC ดังนั้นโซเดียมที่ความเข้มข้น 0–20% ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการรบกวนของ Ca และ Na ต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS

Interferences	Conc.	Recovery (%)				
	(%)	^{54}Fe	^{56}Fe	^{57}Fe	^{63}Cu	^{65}Cu
Ca	0	99	99	103	101	99
	1	100	102	99	101	100
	5	96	101	113	98	96
	10	103	106	128	98	103
	20	107	106	158	98	107
Na	0	104	103	91	106	104
	1	105	103	90	104	105
	5	103	99	99	100	103
	10	105	106	92	103	105
	20	104	102	91	99	104

กรมวิชาการเกษตร

1.3) หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ของการทดสอบเหล็กและทองแดงทั้งหมดในดิน

การทดสอบ LOD และ LOQ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดิน ทำโดยการทดสอบ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่า LOD และ LOQ ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 276.14 และ 356.80 mg/kg ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 3.51 และ 4.15 mg/kg ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดิน

	Fe	Cu
Mean (mg/kg)	241.57	3.23
S'_0	11.52	0.09
LOD	276.14	3.51
LOQ	356.80	4.15

กรมวิชาการเกษตร

1.4) ตรวจสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP–IDMS

การทดสอบ Precision ของวิธีวิเคราะห์ทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52.26, 203.98 และ 806.06 mg/kg ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า HorRat ได้ค่า HorRat ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 0.88, 1.11 และ 1.11 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยค่า HorRat ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3–1.3 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC

การตรวจสอบ Trueness ทำโดยการหา Recovery ในตัวอย่างดินที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไป 3 ระดับความเข้มข้น คือ 50, 200 และ 800 mg/kg และทำการทดสอบระดับละ 10 ซ้ำ ได้ค่า Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.93, 100.57 และ 100.40% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 90–107% ตามมาตรฐาน AOAC

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดิน

	Low concentration	Medium concentration	High concentration
Mean (mg/kg)	52.26	203.98	806.06
SD	0.52	2.54	10.10
%RSD	0.99	1.24	1.25
%Recovery	98.93	100.57	100.40
HorRat	0.88	1.11	1.11

2. จัดเตรียมตัวอย่างดินอ้างอิง

ตัวอย่างดินอ้างอิงได้จัดเตรียมขึ้นโดยการนำตัวอย่างมาบดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาดอนุภาค 0.5 มิลลิเมตร นำตัวอย่างทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และตักใส่ซองอลูมิเนียมฟอยล์ ปิดซองให้แน่น และกำหนดหมายเลขตัวอย่าง

3. ศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างดินอ้างอิง

หลังจากการเตรียมตัวอย่างดินอ้างอิงแล้ว ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ และทำการประเมินผลทางสถิติ ผลการประเมินด้วยสถิติ Cochran's test สำหรับศึกษาความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้น แสดงอยู่ในตารางที่ 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมด มีค่า C_{cal} เท่ากับ 0.303 และ 0.416 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า C_{crit} ซึ่งเท่ากับ 0.602 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้งเหล็กและทองแดงที่ค่า $C_{cal} < C_{crit}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่างต่อไป

ผลการประเมินด้วยสถิติ One-way ANOVA สำหรับศึกษาความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง แสดงอยู่ในตารางที่ 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมด มีค่า F_{cal} เท่ากับ 0.903 และ 2.662

กรมวิชาการเกษตร

ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า F_{crit} ซึ่งเท่ากับ 3.020 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้งเหล็กและทองแดงที่ค่า $F_{cal} < F_{crit}$ แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันอย่างเพียงพอ

การหาค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) แบ่งได้เป็น 2 กรณี คือ

กรมวิชาการเกษตร

กรณี 1 ค่า $MS_{between} > MS_{within}$ หาค่า U_{bb} จากสมการ

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{between} - MS_{within}}{n_0}}$$

เมื่อ n_0 คือ จำนวนซ้ำของการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

กรณี 2 ค่า $MS_{between} < MS_{within}$ หาค่า U_{bb} จากสมการ

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}$$

เมื่อ $v_{MS_{within}}$ คือ จำนวนตัวอย่าง x (n-1)

ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกันแสดงอยู่ในตารางที่ 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิงมีค่า $MS_{between} < MS_{within}$ และได้ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกันเท่ากับ 0.71% สำหรับทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิงมีค่า $MS_{between} > MS_{within}$ และได้ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกันเท่ากับ 0.98%

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอ้างอิง ประเมินด้วยสถิติ Cochran's test และ One-way ANOVA

	Fe	Cu
$\sum D_i^2$	278631	2.96
D_{MAX}^2	84320.54	1.23
C_{cal}	0.303	0.416
C_{crit}	0.602	0.602
Conclusion: $C_{cal} < C_{crit}$	No outlier	No outlier
$MS_{between}$	12585.12	0.394
MS_{within}	13931.55	0.148
F_{cal}	0.903	2.662
F_{crit}	3.02	3.02
Conclusion: $F_{cal} < F_{crit}$	Homogeneous	Homogeneous
U_{bb} (mg/kg)	55.81	0.35
U_{bb} (%)	0.71	0.98

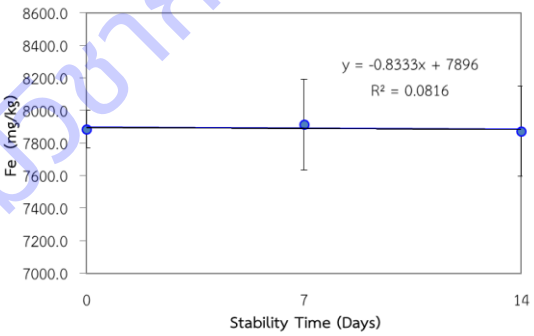
D_i = Difference of each pair of duplicate, D_{MAX} = The maximum difference of the duplicate,
C_{cal} = Cochran calculation value, C_{crit} = Cochran critical value at 95% confidence level (n=10),
MS_{within} = Mean squares within sample, $MS_{between}$ = Mean squares between sample,
F_{cal} = F calculation value, F_{crit} = F critical value at 95 confidence level and
U_{bb} = Standard uncertainty associated with between-unit variability

กรมวิชาการเกษตร

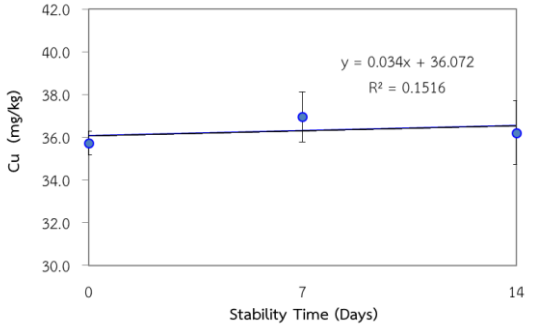
4. ศึกษาความเสถียรระยะสั้นของตัวอย่างอ้างอิง

การทดสอบความเสถียรระยะสั้นเพื่อศึกษาความเสถียรของตัวอย่างในการขนส่ง ทำโดยการสุ่มตัวอย่างมาจำนวน 5 ตัวอย่าง และทำการจัดส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด จากนั้นทำการประเมินทางสถิติด้วยวิธี Trend analysis ตามแนวทางของ ISO Guide 35 โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณของเหล็กและทองแดงทั้งหมด และระยะเวลาในการจัดส่งตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จะได้สมการถดถอย คือ $y = b_1x + b_0$ ซึ่งตัวอย่างจะมีความเสถียรเมื่อค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ เมื่อค่า Degree of freedom เท่ากับ 1 และค่า $t_{0.95,1}$ เท่ากับ 12.706 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตารางที่ 6 และภาพที่ 1 และ 2 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ y = -0.8333x + 7896.01 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 0.833 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 2.795 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.298 สำหรับปริมาณทองแดงทั้งหมด ได้สมการ Regression line คือ y = 0.0340x + 36.07 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 0.034 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 0.081 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.423 ซึ่งค่า $|b_1|/s(b_1)$ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดน้อยกว่าค่า $t_{0.95,n-2}$ แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเสถียรเพียงพอเมื่อทำการจัดส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 14 วัน

ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) คำนวณจาก $U_{sts} = s(b_1)$ x t เมื่อ t คือระยะเวลาในการจัดส่งตัวอย่าง 14 วัน โดยค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้นของเหล็กและทองแดงทั้งหมด เท่ากับ 0.02 และ 0.11% ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

	Fe	Cu
$\|b_1\|$	0.833	0.034
b_o	7896.01	36.07
$s(b_1)$	2.795	0.081
$\|b_1\|/s(b_1)$	0.298	0.423
$t_{0.95,n-2}$	12.706	12.706
Conclusion: $\|b_1\|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$	Stable	Stable
U_{sts} (mg/kg)	1.40	0.04
U_{sts} (%)	0.02	0.11

b_1 = Slope of stability data, b_o = Intercept of stability data,

$s(b_1)$ = Standard deviation of slope (associated uncertainty),

$t_{0.95,n-2}$ = t critical value at 95% confidence level and

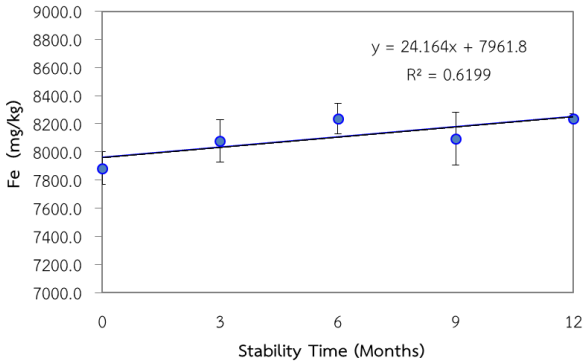
U_{sts} = Standard uncertainty associated with short term stability

5. ศึกษาความเสถียรระยะยาวของตัวอย่างดินอ้างอิง

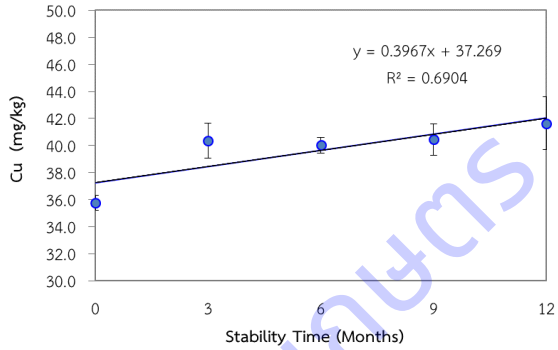
ทำการศึกษาความเสถียรของตัวอย่างขณะการเก็บรักษา โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 12 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ในช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง จำนวน 5 ครั้ง ในเดือนที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 ครั้งละ 5 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และทำการประเมินทางสถิติด้วยวิธี Trend analysis ตามแนวทางของ ISO Guide 35 เช่นเดียวกันกับการศึกษาความเสถียรระยะสั้น โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณของสารและระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่าง จะได้สมการถดถอย คือ $y = b_1x + b_0$ ซึ่งตัวอย่างจะมีความเสถียรเมื่อค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ โดยค่า Degree of freedom เท่ากับ 3 และค่า $t_{0.95,3}$ เท่ากับ 3.182 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตารางที่ 7 และรูปที่ 3 และ 4 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ y = 24.164x + 7961.81 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 24.164 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 10.925 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 2.212 สำหรับปริมาณทองแดงทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ y = 0.397x + 37.27 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 0.397 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 0.153 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 2.586 ซึ่งค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ ทั้งเหล็กและทองแดง แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเสถียรเพียงพอเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 12 เดือน

ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว U_{lts} คำนวณจาก $U_{lts} = s(b_1) \times t$ เมื่อ t คือระยะเวลาในการจัดเก็บตัวอย่าง 12 เดือน โดยค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาวของเหล็กและทองแดงทั้งหมด เท่ากับ 1.62 และ 4.64% ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง

	Fe	Cu
$\|b_1\|$	24.164	0.397
b_o	7961.81	37.27
$s(b_1)$	10.925	0.153
$\|b_1\|/s(b_1)$	2.212	2.586
$t_{0.95,n-2}$	3.182	3.182
Conclusion: $\|b_1\|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$	Stable	Stable
U_{lts} (mg/kg)	131.10	1.84
U_{lts} (%)	1.62	4.64

b_1 = Slope of stability data, b_o = Intercept of stability data,

$s(b_1)$ = Standard deviation of slope (associated uncertainty),

$t_{0.95,n-2}$ = t critical value at 95% confidence level and

U_{lts} = Standard uncertainty associated with long term stability

6. ศึกษาหาค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิง

จากการศึกษาหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP–IDMS โดยใช้ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง IRMM-634 และ ERM – AE633 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงตามลำดับ ได้ค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

อ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าค่าคุณสมบัติของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 8340 mg/kg และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กทั้งหมดเท่ากับ 0.25% ค่าคุณสมบัติของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 42.83 mg/kg และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 0.43%

ตารางที่ 8 ผลการหาค่าคุณสมบัติของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง

	Fe	Cu
$\sum w_i^2 u_i^2$	425.7288	0.0345
y_{char} (mg/kg)	8340	42.83
U_{char} (mg/kg)	21	0.19
U_{char} (%)	0.25	0.43

x_i = Analytical results of laboratory, u_i = Associated standard uncertainty of the results,

w_i = Weighting, y_{char} = Property values and

U_{char} = Standard uncertainty associated with a value assigned in a characterization study

7. ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินอ้างอิง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงตามแนวทางของ ISO Guide 35 ได้ค่าตามแสดงในตารางที่ 9 โดยค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของเหล็กทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 8340±298 mg/kg ส่วนค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของทองแดงทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 42.83±4.08 mg/kg

ตารางที่ 9 ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง

	Fe	Cu
U_{bb} (%)	0.71	0.98
U_{sts} (%)	0.02	0.11
U_{lts} (%)	1.62	4.64
U_{char} (%)	0.25	0.43
U_{RM} (%)	3.57	9.53
y_{char} (mg/kg)	8340	42.83
U_{RM} (mg/kg)	298	4.08
Property values ± U_{RM} (mg/kg)	8340±298	42.83±4.08

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการเตรียมตัวอย่างดินอ้างอิง และศึกษาการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินด้วยเทคนิค ICP-IDMS พบว่าสามารถหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างดินได้ด้วยเทคนิค ICP-IDMS โดยได้ค่า LOD และ LOQ ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 276.14 และ 356.80 mg/kg ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 3.51 และ 4.15 mg/kg ตามลำดับ ค่า HorRat และ

กรมวิชาการเกษตร

Recovery ของปริมาณทองแดงทั้งหมด เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC และจากการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร และค่าคุณสมบัติของตัวอย่างอ้างอิง พบว่าตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความเสถียรเมื่อทำการขนส่ง และมีความเสถียรเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 12 เดือน ค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงเท่ากับ 8,340±298 mg/kg และ 42.83±4.08 mg/kg ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดินอ้างอิงที่เตรียมขึ้นนี้มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

ศึกษาหาค่ากำหนดของเหล็กทั้งหมด และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)

Study of the certified value of total iron and total copper in chemical fertilizer by inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)

กัญฐณา คล้ายแก้ว ญาณธิชา จิตต์สะอาด สงกรานต์ มะลิสอน สุภา โพธิจันทร์
จิตติรัตน์ ชูชาติ พจมาลย์ ภู่สาร

คำสำคัญ (Key words)

วัสดุอ้างอิง, ปุ๋ยเคมี, เหล็กทั้งหมด, ทองแดงทั้งหมด

Reference material, Chemical fertilizer, Total iron, Total copper

บทคัดย่อ (Abstract)

การศึกษาวัสดุอ้างอิงสำหรับหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมี ได้ทำการศึกษาและประมาณค่าความไม่แน่นอนของตัวอย่างอ้างอิงปุ๋ยเคมีตามแนวทางของ ISO Guide 35 ตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่จัดหามาได้จะนำมาบด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงทำโดยการนำตัวอย่างไปย่อย และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) ผลจากการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันโดยทำการวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง จำนวน 2 ซ้ำ พบว่าวัสดุอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ และจากการประเมินทางสถิติพบว่าวัสดุอ้างอิงมีความเสถียรเพียงพอในการขนส่ง และมีความเสถียรเพียงพอเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 12 เดือน ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียรในการขนส่ง และความเสถียรระยะยาว เท่ากับ 0.97–1.27, 0.05-0.14 และ 3.12-4.60% ตามลำดับ ตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงที่เตรียมขึ้น มีค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอน (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, k=2) ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 12478±1075 mg/kg และทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 1028±68 mg/kg

Reference material for determination total iron and total copper in chemical fertilizer was investigated. Characterization and evaluation of the uncertainty of chemical fertilizer laboratory reference material were proposed following the recommendations of the ISO Guide 35. The chemical fertilizer was crushed, finely ground, sieved through a <40 μm sieve, and well mixed in a plastic bag, prior to divided into 30 ml bottles. Characterization of the reference material was carried out by inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) with acid digestion. The homogeneity testing shown that ten bottles with duplicate analysis are enough to demonstrate the homogeneity of this reference material. The statistical results also

กรมวิทยาศาสตร์

showed no significant trends in both transportation stability test and long-term stability test for twelve months. Homogeneity and stability assessment of the material demonstrated that the relative standard uncertainties due to the inhomogeneity, the instability for transportation and the instability for twelve months were 0.97–1.27, 0.05-0.14 and 3.12-4.60%, respectively. The certified values of total Fe and Cu concentrations with expanded uncertainties (coverage factor k=2, approximate 95% confidence interval) calculated using the results of the characterization, homogeneity and stability assessment were 12478±1075 mg/kg for total iron and 1028±68 mg/kg for total copper.

บทนำ (Introduction)

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย เป็นอีกหนึ่งส่วนงานที่สำคัญในกระบวนการผลิตและขึ้นทะเบียนปุ๋ย ปุ๋ยที่มีปริมาณธาตุอาหารที่ไม่ตรงตามสูตรที่ขอขึ้นทะเบียน จะไม่สามารถซื้อขายได้ นอกจากนี้ยังเป็นการประกันคุณภาพของปุ๋ยว่าเกษตรกรจะได้ใช้ปุ๋ยที่มีปริมาณธาตุอาหารตรงตามที่ระบุในฉลาก ดังนั้น การควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยจึงมีความสำคัญอย่างมาก เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเกิดประโยชน์สูงสุดแก่เกษตรกร ซึ่งการควบคุมคุณภาพแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control) และการประเมินคุณภาพโดยองค์กรภายนอก (External Quality Assessment) ซึ่งการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการ เป็นกระบวนการที่สำคัญในการวิเคราะห์ทดสอบในห้องปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการดำเนินการในการเฝ้าระวัง ตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ เพื่อให้เกิดความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบก่อนการรายงานผล และเพื่อให้การดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในปัจจุบันมีเทคนิคการควบคุมคุณภาพภายในมากมายหลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุม (QC sample) ได้แก่ วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Materials, CRM), การวิเคราะห์รีเอเจนต์แบลงค์หรือแบลงค์ของวิธีทดสอบ (Reagent Blank or Method Blank), การวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน (Duplicate Analysis Pair), การวิเคราะห์ Spiked Sample หรือ การหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เป็นต้น

วัสดุอ้างอิง (Reference Materials, RM) และวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Materials, CRM) มีความสำคัญและมีบทบาทอย่างมากในกระบวนการวิเคราะห์ทดสอบตัวอย่างสำหรับทุกห้องปฏิบัติการ โดยวัตถุประสงค์ของการใช้งานแตกต่างกันออกไป ผู้วิเคราะห์จะต้องมีการเลือกใช้ประเภทของวัสดุอ้างอิงที่เหมาะสมตามลักษณะงานที่ปฏิบัติ โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการจะใช้วัสดุอ้างอิงหรือสารมาตรฐานประกอบในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารในตัวอย่าง วัสดุอ้างอิง หมายถึงวัสดุหรือสารที่มีสมบัติหนึ่งอย่างหรือหลายอย่างที่จัดทำมาอย่างดี มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) และความเสถียร (Stability) (Quevauviller, 2018) และสำหรับใช้สอบเทียบอุปกรณ์ใช้ในการประเมินวิธีหรือใช้ในการกำหนดค่าวัสดุต่างๆ สำหรับวัสดุอ้างอิงรับรอง หมายถึงวัสดุอ้างอิงที่มีคุณสมบัติที่ครอบคลุมและผ่านมาตรฐานการผลิตและทดสอบที่เข้มงวด และมีค่าระบุที่มีการรับรองสามารถตรวจสอบย้อนกลับ

ศรีวิชัยการเกษตร

ทางมาตรวิทยา (Traceability) และมีความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty) (Quevauviller, 2018) เพิ่มเติมจากความเป็นเนื้อเดียวกัน และความเสถียร

การผลิตวัสดุอ้างอิงเพื่อให้ได้คุณสมบัติที่เป็นที่ยอมรับจะต้องจัดเตรียมและประเมินผลทางสถิติตามมาตรฐาน ISO 17034 และ ISO Guide 35 ซึ่งจะต้องมีการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร และค่าคุณสมบัติของตัวอย่างที่เตรียมขึ้น การหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้าอิงตาม ISO 17034 สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ด้วยหลายห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีวิเคราะห์ต่างๆ กัน การวิเคราะห์หลายห้องปฏิบัติการโดยกำหนดวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีเดียวกัน (Kawamoto, *et al*., 2019; Santana Santos *et al*., 2020) หรือการวิเคราะห์ด้วยห้องปฏิบัติการเดียวโดยวิธี Primary method เป็นต้น (Olivares *et al*., 2017; Linsinger *et al*., 2019) Primary method เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังระบบหน่วยสากล (SI) ได้ (Olivares *et al*., 2017) และจัดเป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง ซึ่งวิธีที่ได้รับการยอมรับจาก Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology (CCQM) ให้เป็น Primary method มีหลายวิธีดังนี้ Gravimetry, Titrimetry, Coulometry, Isotope dilution mass spectrometry (IDMS), Two-step IDMS และ Freezing-point depression (Milton *et al*., 2001) มีหลายงานวิจัยที่นำวิธี IDMS มาประยุกต์ใช้ในการหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิงที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างเช่น การพัฒนาวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ Ethyl carbamate ในอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยใช้วิธี IDMS ร่วมกับ Gas chromatography (GC) (Vicentim *et al*., 2019) และการพัฒนาวัสดุอ้างอิงรับรองสำหรับวิเคราะห์ธาตุในน้ำทะเล โดยใช้วิธี IDMS ร่วมกับ ICP-MS (Ari, 2020; Lee *et al*., 2011) เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมีนั้น ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องทำการซื้อวัสดุอ้างอิงรับรองจากต่างประเทศ ซึ่งมีผู้จำหน่ายน้อยรายและมีราคาแพง คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะผลิตวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย ซึ่งช่วยเพิ่มความเชื่อมั่นในการตรวจวิเคราะห์ ช่วยประหยัดงบประมาณ และลดระยะเวลาในการจัดซื้อวัสดุอ้างอิงรับรองของห้องปฏิบัติการ การจัดทำวัสดุอ้างอิงปุ๋ยเคมีสำหรับวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมด จะดำเนินการตามแนวทาง ISO Guide 35 เพื่อให้ได้วัสดุอ้างอิงที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความเสถียร มีค่าปริมาณเหล็กและทองแดง และค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1) ศึกษาการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS เช่น อัตราการไหลของเชื้อเพลิง อัตราการไหลของตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวอย่าง และอัตราการดูดสารละลายตัวอย่าง ศึกษา Mass spectral interferences หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) หาค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

ตรวจสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS

2) เตรียมตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

จัดหาตัวอย่างปุ๋ยจากท้องตลาด และนำตัวอย่างมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการบดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้ว มาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช จากนั้นนำตัวอย่างที่ร่อนแล้วทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และตักใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร และกำหนดหมายเลขตัวอย่างในแต่ละขวด

3) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ทำการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง โดยการสุ่มตัวอย่างแบบ Random จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นประเมินผลทางสถิติด้วย Cochran's test และ One-way ANOVA และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) ตามแนวทาง ISO Guide 35

การประเมินผลทางสถิติด้วยวิธี Cochran's test เป็นการศึกษาความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างอ้างอิงตัวอย่างเดียวกัน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนภายในตัวอย่าง สามารถคำนวณ C_{cal} ได้จากสมการ

$$C_{cal} = D_{max}^2 / \sum D_i^2$$

เมื่อ D_i = ผลต่างของผลวิเคราะห์ 2 ซ้ำของแต่ละคู่ คู่ที่ i เมื่อ i = 1, 2, 3,..., 10

D_{max} = ผลต่างของผลวิเคราะห์ 2 ซ้ำของคู่ที่มีค่าสูงสุด

ΣD_i^2 = ผลรวมกำลังสองของผลต่างของผลวิเคราะห์ทุกคู่

ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่าง C_{cal} และ C_{crit} โดยค่า C_{crit} ได้จากตาราง Cochran's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยหากค่า $C_{cal} < C_{crit}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 หรือสรุปได้ว่าการวิเคราะห์ซ้ำภายในขวดตัวอย่างเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน จากนั้นจะทำการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่างด้วยสถิติ One-way ANOVA ต่อไป

การประเมินทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA เป็นการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง เพื่อทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอ้างอิง โดยคำนวณหาค่า F_{cal} จากสมการ

$$F_{cal} = MS_{between} / MS_{within}$$

เมื่อ MS_{within} = Mean squares within sample

$MS_{between}$ = Mean squares between sample

ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่าง F_{cal} และ F_{crit} ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยค่า $F_{cal} < F_{crit}$ แสดงว่าความแปรปรวนของผลวิเคราะห์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 หรือสรุปได้ว่าวัสดุอ้างอิงมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

กรมวิทยาศาสตร์

4) ทดสอบความเสถียรระยะสั้น (Short-term stability) ของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

การทดสอบความเสถียรระยะสั้นทำโดยการทดลองส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และนำผลวิเคราะห์มาประเมินทางสถิติ และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) ตามแนวทาง ISO Guide 35

การประเมินทางสถิติใช้วิธี Trend analysis ตามแนวทางของ ISO Guide 35 โดยนำข้อมูลผลการวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารในตัวอย่างอ้างอิงกับระยะเวลาการเก็บรักษา จากนั้นหาสมการถดถอย (Regression line) คือ $y = b_1x + b_0$ เมื่อ x คือระยะเวลาการเก็บรักษา และ y คือค่าผลวิเคราะห์ของสารในตัวอย่างอ้างอิง ทำการทดสอบว่า Slope (b_1) ที่ได้มีค่าต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ ซึ่งถ้าค่า Slope ต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าตัวอย่างไม่เสถียรในช่วงเวลานั้น ตัวอย่างอ้างอิงจะมีความเสถียร เมื่อค่า $|b_1|/s(b_1)$ จะต้องมีค่าน้อยกว่าค่า $t_{0.95,n-2}$ และค่า b_1, $s(b_1)$ และ t_{stat} หาได้จากสมการ

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{stat} = \frac{|b_1|}{s(b_1)}$$

โดย

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - b_0 - b_1x_i)^2}{n-2}}$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1\bar{x}$$

เมื่อ $s(b_1)$ = Standard deviation of slope

$t_{0.95,n-2}$ = t critical value ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (ระดับความเชื่อมั่น 95%)

ทำการเปรียบเทียบค่าระหว่าง t_{stat} และ $t_{0.95,n-2}$ ถ้าหากค่า $t_{stat} < t_{0.95,n-2}$ แสดงว่าตัวอย่างอ้างอิงมีความเสถียร และคำนวณค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรได้จากสมการ

$$U_{sts} = s(b_1)t$$

เมื่อ $s(b_1)$ = Standard deviation of slope

t = ระยะเวลาที่ศึกษา

5) ทดสอบความเสถียรระยะยาว (Long-term stability) ของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

ทำการทดสอบความเสถียรระยะยาวโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 12 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างในช่วงเวลา 0, 1, 3, 6 และ 12 เดือน ครั้งละ 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และนำผลวิเคราะห์มาประเมินทางสถิติ และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว (U_{lts}) เช่นเดียวกันกับการทดสอบความเสถียรระยะสั้น

6) ศึกษาหาค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ทำการสุ่มตัวอย่างอ้างอิงมาจำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ICP–IDMS จากนั้นคำนวณค่าคุณสมบัติด้วยวิธี Weighted mean ดังนี้

$$y_{char} = \sum w_i x_i / \sum w_i$$

โดย $w_i = 1/u_i^2$

และคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการหาค่าคุณสมบัติจากสมการ

$$U_{char} = \sqrt{\sum w_i^2 u_i^2}$$

7) ประเมินความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ทำการประเมินความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงตามแนวทาง ISO Guide 35 ตามสมการ

$$U_{RM} = k\sqrt{U_{char}^2 + U_{bb}^2 + U_{lts}^2 + U_{sts}^2}$$

เมื่อ U_{RM} = ค่าความไม่แน่นอนขยายของวัสดุอ้างอิง

U_{char} = ค่าความไม่แน่นอนจากการศึกษาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง

U_{bb} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน

U_{lts} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว

U_{lts} = ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น

k = Coverage factor (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, k =2)

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ศึกษาการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS

1.1) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ในการหาปริมาณเหล็ก และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ย

จากการศึกษาได้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ที่ใช้สำหรับการวัดปริมาณเหล็กและทองแดงในตัวอย่างปุ๋ย ดังนี้ ค่า Plasma gas flow, Auxiliary gas flow และ Nebulizer gas flow เท่ากับ 18.0, 1.2 และ 0.86 L/min ตามลำดับ ค่า Sample uptake rate เท่ากับ 270 µL/min ค่า RF

กรมวิชาการเกษตร

power เท่ากับ 1600 W ค่า Dead time เท่ากับ 35 ns โดยใช้ Ge เป็น Internal standard และวัดปริมาณไอโซโทปดังนี้ ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu, และ ^{65}Cu ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง ICP-MS ที่ใช้ในการหาปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ย

Parameter	Value
Plasma gas flow	18.0 L/min
Auxiliary gas flow	1.2 L/min
Nebulizer gas flow	0.86 L/min
Sample uptake rate	270 μL/min
RF power	1600 W
Dead time	35 ns
Internal standard	Ge
Measured isotopes	^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu, ^{65}Cu

1.2) ศึกษา Mass spectral interferences ในการหาเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS

ในการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS นั้น มีสารรบกวนที่สำคัญ คือ แคลเซียมและโซเดียม ซึ่งจะมีผลทำให้สัญญาณของเหล็กและทองแดงเพิ่มขึ้น (Thomas *et al*, 1998 ; Lum *et al*, 2016) แต่ในตัวอย่างปุ๋ยธาตุอาหารเสริมโดยทั่วไปจะไม่มีส่วนผสมของแคลเซียมหรือโซเดียมในตัวอย่าง จึงไม่จำเป็นต้องศึกษาการรบกวนของแคลเซียมและโซเดียมต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลกระทบของสารรบกวนในตัวอย่างปุ๋ย ต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS โดยนำตัวอย่างปุ๋ย 4 ตัวอย่าง คือ F1, F2, F3 และ F4 มาเติมด้วยสารละลายมาตรฐานเหล็ก ความเข้มข้น 5 mg/kg และสารละลายมาตรฐานทองแดง ความเข้มข้น 2 mg/kg จากนั้นไปวิเคราะห์หาปริมาณ ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu และ ^{65}Cu ด้วยเทคนิค ICP–IDMS และคำนวณค่า Recovery ซึ่งค่า Recovery ของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1–10 mg/kg ต้องอยู่ในช่วง 80–110% จึงเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ตารางที่ 2 แสดงค่า Recovery ของการวิเคราะห์ ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu และ ^{65}Cu ในตัวอย่างปุ๋ย โดยพบว่าค่า Recovery ของการวิเคราะห์ ^{54}Fe, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{63}Cu และ ^{65}Cu อยู่ในช่วง 93–104, 94–103, 101–109, 89–98 และ 91–96% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC ดังนั้นสารรบกวนในตัวอย่างปุ๋ยไม่มีผลต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP–IDMS

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาการรบกวนของแคลเซียมและโซเดียมต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS

Samples	Recovery (%)				
	^{54}Fe	^{56}Fe	^{57}Fe	^{63}Cu	^{65}Cu
F1	103	101	109	96	96

Samples	Recovery (%)				
	^{54}Fe	^{56}Fe	^{57}Fe	^{63}Cu	^{65}Cu
F2	104	103	107	90	95
F3	101	103	102	98	91
F4	93	94	101	89	91

1.3) หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ของการทดสอบเหล็กและทองแดงทั้งหมดในปุ๋ย

การทดสอบหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ย โดยการทดสอบ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่า LOD และ LOQ ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 6.42 และ 12.33 mg/kg ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 4.17 และ 5.49 mg/kg ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ย

	Fe	Cu
Mean (mg/kg)	3.88	**3.60**
S'_0	0.85	**0.19**
LOD	6.42	**4.17**
LOQ	12.33	**5.49**

1.4) ตรวจสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP–IDMS

การทดสอบ Precision ของวิธีวิเคราะห์ทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 1208.88, 2611.40 และ 4456.62 mg/kg ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า HorRat ได้ค่า HorRat ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 0.46, 0.82 และ 0.94 ตามลำดับ โดยค่า HorRat ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.3 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC สำหรับการตรวจสอบ Trueness ทำโดยการหา Recovery ในตัวอย่างปุ๋ยที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไป 3 ระดับความเข้มข้น คือ 400, 1800 และ 3600 mg/kg และทำการทดสอบระดับละ 10 ซ้ำ ได้ค่า Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 100.36, 100.26 และ 101.18% ตามลำดับ ซึ่งค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 95–105% ตามมาตรฐาน AOAC

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ย

	Low concentration	Medium concentration	High concentration
Mean (mg/kg)	1208.88	2611.40	4456.62
SD	6.29	24.21	47.09
%RSD	0.52	0.93	1.06

กรมวิชาการเกษตร

%Recovery	100.36	100.26	101.18
HorRat	0.46	0.82	0.94

2. จัดเตรียมตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงได้จัดเตรียมขึ้นโดยการนำตัวอย่างมาบดและร่อนผ่านตะแกรงตะแกรงขนาด 40 เมช นำตัวอย่างทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และตักใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น และกำหนดหมายเลขตัวอย่างในแต่ละขวด

3. ศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างปุ๋ย

ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ และทำการประเมินผลทางสถิติ ผลการประเมินด้วยสถิติ Cochran's test สำหรับศึกษาความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้น แสดงอยู่ในตารางที่ 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมด มีค่า C_{cal} เท่ากับ 0.169 และ 0.334 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า C_{crit} ซึ่งเท่ากับ 0.602 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้งเหล็กและทองแดงที่ค่า $C_{cal} < C_{crit}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่างต่อไป

ผลการประเมินด้วยสถิติ One-way ANOVA สำหรับศึกษาความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง แสดงอยู่ในตารางที่ 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมด มีค่า F_{cal} เท่ากับ 2.154 และ 0.682 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า F_{crit} ซึ่งเท่ากับ 3.020 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้งเหล็กและทองแดงที่ค่า $F_{cal} < F_{crit}$ แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันอย่างเพียงพอ

การหาค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) แบ่งได้เป็น 2 กรณี คือ

กรณี 1 ค่า $MS_{between} > MS_{within}$ หาค่า U_{bb} จากสมการ

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{between} - MS_{within}}{n_0}}$$

เมื่อ n_0 คือ จำนวนซ้ำของการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน

กรณี 2 ค่า $MS_{between} < MS_{within}$ หาค่า U_{bb} จากสมการ

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MS_{within}}}}$$

เมื่อ $v_{MS_{within}}$ คือ จำนวนตัวอย่าง x (n-1)

ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงมีค่า $MS_{between} > MS_{within}$ และได้ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกันเท่ากับ 1.27% สำหรับทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงมีค่า $MS_{between} < MS_{within}$ และได้ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกันเท่ากับ 0.97%

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างอ้างอิง ประเมินด้วยสถิติ Cochran's test และ One-way ANOVA

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

	Fe	Cu
ΣD_i^2	601967.35	5931.57
D_{MAX}^2	118115.94	1982.03
C_{cal}	0.196	0.334
C_{crit}	0.602	0.602
Conclusion: $C_{cal} < C_{crit}$	No outlier	No outlier
$MS_{between}$	64843.545	202.258
MS_{within}	30098.368	296.578
F_{cal}	2.154	0.682
F_{crit}	3.020	3.020
Conclusion: $F_{cal} < F_{crit}$	Homogeneous	Homogeneous
U_{bb} (mg/kg)	131.80	8.14
U_{bb} (%)	1.27	0.97

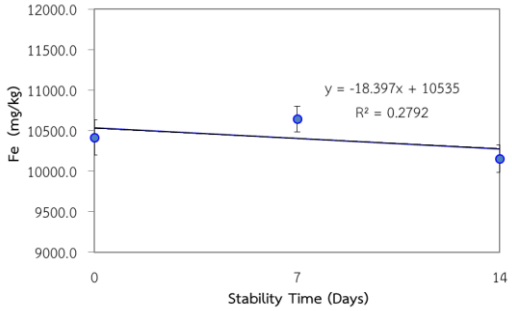
D_i = Difference of each pair of duplicate, D_{MAX} = The maximum difference of the duplicate,
C_{cal} = Cochran calculation value, C_{crit} = Cochran critical value at 95% confidence level (n=10),
MS_{within} = Mean squares within sample, $MS_{between}$ = Mean squares between sample,
F_{cal} = F calculation value, F_{crit} = F critical value at 95 confidence level and
U_{bb} = Standard uncertainty associated with between-unit variability

7) ศึกษาความเสถียรระยะสั้นของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

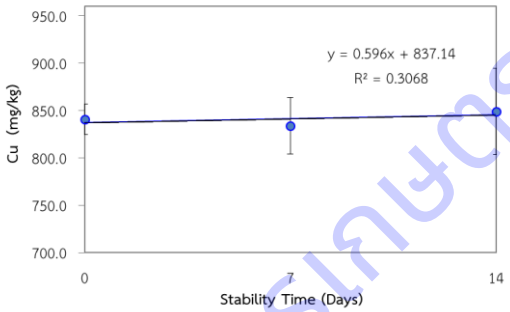
การทดสอบความเสถียรระยะสั้นเพื่อศึกษาความเสถียรของตัวอย่างในการขนส่ง ทำโดยการสุ่มตัวอย่างมาจำนวน 5 ตัวอย่าง และทำการจัดส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน และนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด จากนั้นทำการประเมินทางสถิติด้วยวิธี Trend analysis ตามแนวทางของ ISO Guide 35 โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณของเหล็กและทองแดงทั้งหมด และระยะเวลาในการจัดส่งตัวอย่าง ดังภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จะได้สมการถดถอย คือ $y = b_1x + b_0$ ซึ่งตัวอย่างจะมีความเสถียรเมื่อค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ โดยค่า Degree of freedom เท่ากับ 1 และค่า $t_{0.95,1}$ เท่ากับ 12.706 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตารางที่ 6 และภาพที่ 1 และ 2 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ y = -18.397x + 10535.08 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 18.397 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 29.562 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.622 สำหรับปริมาณทองแดงทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ y = 0.596x + 837.14 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 0.596 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 0.896 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.665 ซึ่งค่า $|b_1|/s(b_1)$ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดน้อยกว่าค่า $t_{0.95,n-2}$ แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเสถียรเพียงพอเมื่อทำการจัดส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 14 วัน

กรมวิทยาศาสตร์

ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) คำนวณจาก $U_{sts} = s(b_1)$ x t เมื่อ t คือ ระยะเวลาในการจัดส่งตัวอย่าง 14 วัน โดยค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้นของเหล็กและทองแดงทั้งหมด เท่ากับ 0.14 และ 0.05% ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu
$\|b_1\|$	18.397	0.596
b_o	10535.08	837.14
$s(b_1)$	29.562	0.896
$\|b_1\|/s(b_1)$	0.622	0.665
$t_{0.95,n-2}$	12.706	12.706
Conclusion: $\|b_1\|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$	Stable	Stable
U_{sts} (mg/kg)	14.78	0.45
U_{sts} (%)	0.14	0.05

b_1 = Slope of stability data, b_o = Intercept of stability data,

$s(b_1)$ = Standard deviation of slope (associated uncertainty),

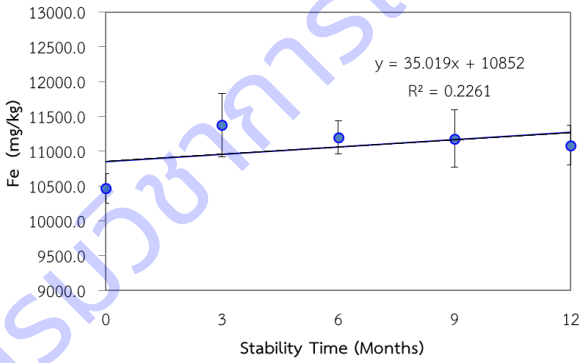
$t_{0.95,n-2}$ = t critical value at 95% confidence level and

U_{sts} = Standard uncertainty associated with short term stability

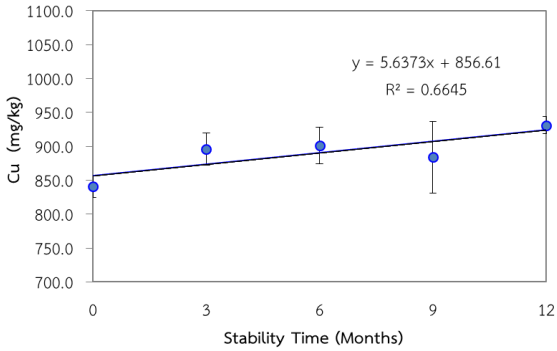
8) ศึกษาความเสถียรระยะยาวของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาความเสถียรของตัวอย่างขณะการเก็บรักษาทำโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 12 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ในช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง จำนวน 5 ครั้ง ในเดือนที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 ครั้งละ 5 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และทำการประเมินทางสถิติด้วยวิธี Trend analysis ตามแนวทางของ ISO Guide 35 เช่นเดียวกันกับการศึกษาความเสถียรระยะสั้น โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณของสารและระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่าง จะได้สมการถดถอย ซึ่งตัวอย่างจะมีความเสถียรเมื่อค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ โดยค่า Degree of freedom เท่ากับ 3 และค่า $t_{0.95,3}$ เท่ากับ 3.182 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังตารางที่ 7 และรูปที่ 3 และ 4 พบว่าเหล็กทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ y = 35.091x + 10852.05 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 35.091 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 37.406 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.936 สำหรับปริมาณทองแดงทั้งหมดได้สมการถดถอย คือ y = 5.637x + 856.61 โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 5.637 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 2.313 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 2.437 ซึ่งค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ ทั้งเหล็กและทองแดงแสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเสถียรเพียงพอเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 12 เดือน ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว U_{lts} คำนวณจาก $U_{lts} = s(b_1) \times t$ เมื่อ t คือระยะเวลาในการจัดเก็บตัวอย่าง 12 เดือน โดยค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาวของเหล็กและทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 4.06 และ 3.12% ตามลำดับ



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu

กรมวิชาการเกษตร

	Fe	Cu
b_1	35.019	5.637
b_o	10852.05	856.61
$s(b_1)$	37.406	2.313
$\|b_1\|/s(b_1)$	0.936	2.437
$t_{0.95,n-2}$	3.182	3.182
Conclusion: $\|b_1\|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$	Stable	Stable
U_{sts} (mg/kg)	448.87	27.75
U_{sts} (%)	4.06	3.12

b_1 = Slope of stability data, b_o = Intercept of stability data,

$s(b_1)$ = Standard deviation of slope (associated uncertainty),

$t_{0.95,n-2}$ = t critical value at 95% confidence level and

U_{lts} = Standard uncertainty associated with long term stability

9) ศึกษาหาค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง

จากการศึกษาหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP–IDMS โดยใช้ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง IRMM-634 และ ERM – AE633 สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงตามลำดับ ได้ค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า ค่าคุณสมบัติของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 12478 mg/kg และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กทั้งหมดเท่ากับ 0.68% ค่าคุณสมบัติของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 1028 mg/kg และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 0.37%

ตารางที่ 8 ผลการหาค่าคุณสมบัติของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง

	Fe	Cu
$\sum w_i^2 u_i^2$	7106.90	14.81
y_{char} (mg/kg)	12478	1028
U_{char} (mg/kg)	84	4
U_{char} (%)	0.68	0.37

x_i = Analytical results of laboratory, u_i = Associated standard uncertainty of the results,

w_i = Final weighting, y_{char} = Property values and

U_{char} = Standard uncertainty associated with a value assigned in a characterization study

10) ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงตามแนวทางของ ISO Guide 35 ได้ค่าตามตารางที่ 9 โดยค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของเหล็กทั้งหมดมีค่าเท่ากับ

กรมวิทยาศาสตร์

12478±441 mg/kg ส่วนค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของทองแดงทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 1028±98 mg/kg

ตารางที่ 9 ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิง

	Fe	Cu
U_{bb} (%)	0.71	0.98
U_{sts} (%)	0.02	0.11
U_{lts} (%)	1.62	4.64
U_{char} (%)	0.0004	0.3742
U_{RM} (%)	3.54	9.52
y_{char} (mg/kg)	12478	1028
U_{RM} (mg/kg)	441	98
Property values ± U_{RM} (mg/kg)	12,478±441	1,028±98

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการเตรียมตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง และศึกษาการหาปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP-IDMS พบว่าสามารถหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยได้ด้วยเทคนิค ICP-IDMS โดยได้ค่า LOD และ LOQ ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 6.42 และ 12.33 mg/kg ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 4.17 และ 5.49 mg/kg ตามลำดับ ค่า HorRat และ Recovery ของปริมาณทองแดงทั้งหมด เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC และจากการศึกษาคุณสมบัติของตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้น พบว่าตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความเสถียรเมื่อทำการขนส่ง และมีความเสถียรเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 12 เดือน ค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงเท่ากับ 12,478±1075 mg/kg และ 1,028±68 mg/kg ตามลำดับ

กรมวิทยาศาสตร์

กิจกรรมที่ 5 พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี ปุ๋ยอินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพ วัสดุปรับปรุงดิน น้ำ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช และธาตุอาหารในพืช และผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

ปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และปุ๋ยหินฟอสเฟตด้วยวิธีโดยตรงและวิธีโดยอ้อม

Comparison analysis of available phosphorus in chemical fertilizers organic fertilizer and Rock Phosphate method

เจนจิรา เทเวศร์วรกุล ศุภากร ดวนใหญ่ จริยา วงศ์ตรี

คำสำคัญ (Key words)

ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และปุ๋ยหินฟอสเฟต

Available phosphorus chemical fertilizers organic fertilizer Rock Phosphate

บทคัดย่อ (Abstract)

จากการเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (%AVP_2O_5) ในปุ๋ยเคมี ที่มี %CIP_2O_5 ระดับต่ำ(0-1%) กลาง(1-2%) และสูง(>2%) ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่มี %CIP_2O_5 ระดับต่ำ (<20%) กลาง(20%) และสูง(>20%) ปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มี %CIP_2O_5 ระดับต่ำ (0-1%) กลาง (1-2%) และสูง (>2%) ด้วยวิธีสกัดโดยตรง (AOAC 993.31) และวิธีโดยอ้อม ได้จากผลต่างของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (%TP_2O_5) กับปริมาณฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรท (%CIP_2O_5) 2 วิธี คือ วิธี 1.10.01 และวิธี AOAC 963.02พบว่า %AVP_2O_5 ในปุ๋ยเคมีที่มี %CIP_2O_5 ต่ำ (0-1%) กลาง (1-2%) และสูง (>2%) ที่วิเคราะห์โดยวิธี 1.10.01 และ AOAC 963.02 ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ วิเคราะห์ด้วยวิธี AOAC 993.31 นั้นให้ %AVP_2O_5 ในระดับที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) %AVP2O5$_2O_5$ ในปุ๋ยอินทรีย์เคมี AOAC 963.02 < วิธี 1.10.01 < AOAC 993.31 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของวิธี 1.10.01 และ AOAC 963.02 แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างวิธี AOAC 963.02 และ AOAC 993.31 %AVP_2O_5 ในปุ๋ยหินฟอสเฟตที่วิเคราะห์โดย 1.10.01 และ AOAC 963.02 นั้นไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ วิธีทั้ง 2 นั้นให้ความแตกต่างกันกับ AOAC 993.31 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ศึกษา % Relative AVP_2O_5 ของตัวอย่างทั้งหมด สามารถจำแนกตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่มคือ ปุ๋ยเคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 40-60%) ให้สหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 และ %TP ในวิธี 1.10.01 และ AOAC 963.02มากกว่าร้อยละ 90 ขณะที่ 993.31 ให้สหสัมพันธ์ร้อยละ 77 84 และ 91 ตามลำดับ และปุ๋ยหินฟอสเฟต ให้สหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 และ %TP ในวิธี 1.10.01 AOAC 963.02และ AOAC 993.31 เพียงร้อยละ 20 17 และ 11 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาระยะเวลาการเตรียมตัวอย่าง รูปและปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้ รวมทั้งการผ่านเกณฑ์ความเป็นประโยชน์ พบว่า พบสหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 (1.10.01) และ %AVP_2O_5 (AOAC 963.02) มากกว่าร้อยละ 90 ในปุ๋ยเคมีและอินทรีย์เคมีที่มี %Relative AVP_2O_5 80-100 มากกว่าร้อยละ 80 ในปุ๋ยหินฟอสเฟต ที่มี %Relative AVP_2O_5 10.44-17.41 และ มากกว่าร้อยละ 70 ในปุ๋ยอินทรีย์เคมี พบสหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 (AOAC 963.02) และ %AVP_2O_5 (AOAC 993.31) มากกว่าร้อยละ 80 ในปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP_2O_5 10.44-17.41) และปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 40-60) มากกว่าร้อยละ 70 ในปุ๋ยเคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100) และมากกว่าร้อยละ 60 ในปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP 80-100)

Comparison of available phosphorus (%P_2O_5) in low (0-1%) medium (1-2%) high (>2%) %CIP_2O_5 in chemical fertilizers , Rock phosphate low (<20%) medium (20%) high (>20%) and chemical organic fertilizers as bone meal low (0-1%) medium (1-2%) high (>2%) between Direct extraction method (AOAC 993.31) and 2 methods of Indirect Extraction Method (%TP_2O_5-%CIP_2O_5) were Inhouse and AOAC 993.31 found that %AVP2O5$_2O_5$

ศรีปทุมการเกษตร

(Inhouse) and %AVP2O5$_2O_5$ (AOAC 963.03) were similary. In Chemical organic fertilizers: AOAC 963.02 < 1.10.01 < AOAC 993.31 %AVP$_2O_5$ (1.10.01) and %AVP$_2O_5$ (AOAC 963.02) were significantly. %AVP$_2O_5$(AOAC 963.02) were similary to %AVP$_2O_5$(AOAC 993.31) In Phosphate Rock: %AVP$_2O_5$(1.10.01) and %AVP$_2O_5$(AOAC 963.03) were similary. %AVP$_2O_5$ (AOAC 993.31) were significantly both (P<0.05). Classified on 4 level % Relative AVP$_2O_5$ and kind of phosphate fertilizer : Chemical fertilizer (%Relative AVP 80-100) Chemical Organic fertilizer (%Relative AVP 80-100) Chemical Organic fertilizer (%Relative AVP 40-60) that were high correlated with %AVP (1.10.01,AOAC 963.02) and %TP (>90%) as %AVP (AOAC 993.31) were correlated 77 84 and 91% Phosphate Rock(%Relative AVP 10.44-17.41), were not corrleted with %AVP from all and %TP (20,17 and 11%). Study on Sample preparation P-fraction amount of P and critiria of availability found that %AVP$_2O_5$ (1.10.01) and %AVP$_2O_5$ (AOAC 963.02) were high correlated more than 90% in Chemical and Chemical Organic Fertilizers (%Relative AVP$_2O_5$ 80-100), more than 80% in Rock Phosphate (%Relative AVP$_2O_5$ 10.44-17.41) and more than 70 % in Chemical Organic fertilizer (%Relative AVP$_2O_5$ 40-60). %AVP$_2O_5$ (AOAC 963.03) and %AVP$_2O_5$ (AOAC 993.31) were high correlated more than 80% in Rock Phosphate (%Relative AVP$_2O_5$ 10.44-17.41) and Chemical Organic fertilizer (%Relative AVP$_2O_5$ 40-60), more than 70% in Chemical Fertilizer (%Relative AVP$_2O_5$ 80-100) and more than 60% in Chemical Organic fertilizer (%Relative AVP$_2O_5$ 40-60)

บทนำ (Introduction)

เนื่องจากการรายงานความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารฟอสฟอรัสในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยหินฟอสเฟต ต้องรายงานในรูปของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

การวิเคราะห์โดยอ้อม (Indirect method) ด้วยวิธี AOAC 960.02 ซึ่งเป็นการหาผลต่างจากปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (AOAC 957.02) และปริมาณฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรท (AOAC 963.03) ซึ่งทางห้องปฏิบัติการได้ประยุกต์หลักการดังกล่าวมาใช้งานพร้อมทั้งปรับลดขั้นตอนการล้างในส่วนของ WSP ออก (1.10.01)

การวิเคราะห์โดยตรง (Direct Extraction Method) ด้วยวิธี AOAC 993.31 โดยหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้โดยการสกัดเอารูปของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ออกมาโดยสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทที่เติม EDTA เข้าไป เพื่อให้การละลายฟอสฟอรัสเกิดได้มากขึ้นในปุ๋ยที่มีรูปของแคลเซียมไตรฟอสเฟตสูง เช่น ปุ๋ยกระดูกและปุ๋ยหินฟอสเฟต

โดยวิธีทั้งสองนี้ถูกกำหนดไว้ในวิธีมาตรฐานการวิเคราะห์ปุ๋ยของ AOAC (AOAC, 2016) โดยทั้งสองวิธีนั้นมีความยากง่ายในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์โดยอ้อมนั้นต้องวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดและปริมาณฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรท มีขั้นตอนการย่อยตะกอนด้วยกรดเข้มข้น ขณะที่วิธีการวิเคราะห์โดยตรง (AOAC

กรมวิชาการเกษตร

993.31) นั้นสามารถทำสกัดหาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในตัวอย่างปุ๋ยได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อย จึงเป็นไปได้ว่าหากวิธีทั้งสองให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและหินฟอสเฟตไม่แตกต่างกัน สามารถที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไปเป็นการสกัดปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อยตะกอนด้วยกรดเข้มข้น แต่ทั้งนี้ยังไม่พบหลักฐานการเปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยหินฟอสเฟตจากวิธีทั้งสอง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเปรียบเทียบเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสม เพื่อยกระดับห้องปฏิบัติทั้งภาครัฐและเอกชนให้เป็นมาตรฐานสากล

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. **เตรียมตัวอย่างปุ๋ย** โดยมีกรรมวิธีทดลอง : แผนการทดลองเป็นแบบ CRD 3 ซ้ำมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1.1 เตรียมตัวอย่างปุ๋ยเคมี โดยใช้ระดับ %CIP$_2$O$_5$ เป็นเกณฑ์ ดังนี้

- ปุ๋ยเคมีที่มี %CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับต่ำ 0-1%
- ปุ๋ยเคมีที่มี %%CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับกลาง 1-2 %
- ปุ๋ยเคมีที่มี %%CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับสูง > 2.0%

1.2 เตรียมตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี โดยใช้ระดับ %CIP$_2$O$_5$ เป็นเกณฑ์ ดังนี้

- ปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มี %CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับต่ำ 0-1%
- ปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มี %%CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับกลาง 1-2 %
- ปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มี %%CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับสูง > 2%

1.3 เตรียมตัวอย่างปุ๋ยหินฟอสเฟต โดยใช้ระดับ %CIP$_2$O$_5$ เป็นเกณฑ์ ดังนี้

- ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่มี %CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับต่ำ <20 %
- ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่มี %CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับกลาง 20 %
- ปุ๋ยหินฟอสเฟตที่มี %CIP$_2$O$_5$ ที่ระดับกลาง >20 %

2. **เปรียบเทียบ %P$_2$O$_5$ ในปุ๋ย 3 ชนิด** ได้แก่ ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยหินฟอสเฟตที่มี %CIP ต่ำกลางและสูง จากวิธีวิเคราะห์ 3 วิธี คือ

2.1 **Indirect Extraction Method** : วิธีมาตรฐาน AOAC 963.02

2.1.1 Removing H$_2$O-soluble P$_2$O$_5$ (AOAC 977.01) ชั่งตัวอย่างปุ๋ยประมาณ 1 กรัม กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างตะกอนตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งได้ปริมาตร filtrant 250 มิลลิลิตร ซึ่งควรใช้เวลาไม่เกิน 1 ชม. ซึ่งหากเกินนั้นต้องกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ หากตะกอนขุ่นให้เติม HNO$_3$ 1-2 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

2.1.2 Removing Citrate soluble P$_2$O$_5$ (AOAC 963.03) นำกระดาษกรองที่ได้จาก 2.1.1 เติมสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทที่เป็นกลาง เขย่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ พร้อมทั้งล้างด้วยน้ำอุณหภูมิ

กรมวิชาการเกษตร

65 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า จนกระทั่งได้ปริมาตร filtrant 350 มิลลิลิตร จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำการย่อยตามวิธีมาตรฐาน AOAC 957.02B ต่อไป

2.1.3 Wet Digestion ต้มด้วย HNO_3 20 ml. เป็นเวลาประมาณ 30-45 นาที (สำหรับตัวอย่างที่มีอินทรียวัตถุในปริมาณสูง) จากนั้นทำให้เย็นแล้วเติม 70-72% $HClO_4$ 20 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนได้สารละลายใสแต่ต้องไม่ให้แห้ง โดยตัวอย่างที่มีปริมาณอินทรียวัตถุสูงควรเพิ่มอุณหภูมิสำหรับการย่อยเป็น 170 องศาเซลเซียส เนื่องจากวิธีดังกล่าวมีการขั้นตอนที่ค่อนข้างซับซ้อนและใช้ระยะเวลานานดังนั้นจึงได้ลดขั้นตอนมาเป็นการใช้กรดผสม HNO_3 + $HClO_4$ (1:1) 20 มิลลิลิตร

2.2 Indirect Extraction Method : วิธีประการศกระทรวงฯ (1.10.01) ซึ่งพัฒนาขึ้นเองโดยห้องปฏิบัติการ

ชั่งตัวอย่างปุ๋ย 1.xxxx กรัม เติมสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทที่เป็นกลาง 100 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 5 ด้วยกรวยกรองธรรมดาหรือกรองสุญญากาศ (กรณีที่ตัวอย่างใช้เวลากรองนาน) จนได้ปริมาตร filtrant 350 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นนำไปทำการย่อยตะกอน ตามวิธี AOAC 957.02B ต่อไป

2.3 Direct Extraction Method : วิธีมาตรฐาน AOAC 993.31

ตัวอย่างปุ๋ยถูกสกัดด้วย สารละลายแอมโมเนียมซิเตรทที่เป็นกลางที่ผสม EDTA เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับแคลเซียมและแมกนีเซียมในสารละลายปุ๋ย ชั่งตัวอย่างปุ๋ย 0.5 กรัม (ใส่ใน volumetric flask 250 มิลลิลิตร) เติมสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทที่เป็นกลางที่ผสม EDTA 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตร

3. ทำการวิเคราะห์ทางเคมี หา %TP, %CIP ของวิธี 2.1 และ 2.2 และ %AVP_2O_5 (AOAC, 993.31) โดยวิธี Spectrophotometric Molybdovanadophosphate Method (960.03D) เพื่อคำนวณหาปริมาณ Available P บันทึกข้อมูล

4. วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ด้วยวิธี 2.1, 2.2 และ 2.3

เปรียบเทียบปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์จากทั้ง 3 วิธี ด้วยโปรแกรมทางสถิติ อภิปรายและสรุปผล

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ศึกษาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี (% Available Phosphorus : %AVP_2O_5) ที่มี %CIP_2O_5 ที่ระดับต่ำ (0-1%) กลาง (1-2%) และสูง (>2%) ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี 1.10.01, AOAC 963.02 และ AOAC 993.31 พบว่าปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (%AVP_2O_5) ในปุ๋ยเคมีที่มี %CIP_2O_5 ต่ำ (0-1%) กลาง (1-2%) และสูง (>2%) ที่วิเคราะห์โดยวิธี 1.10.01 และ AOAC 963.02ไม่แตกต่างกัน

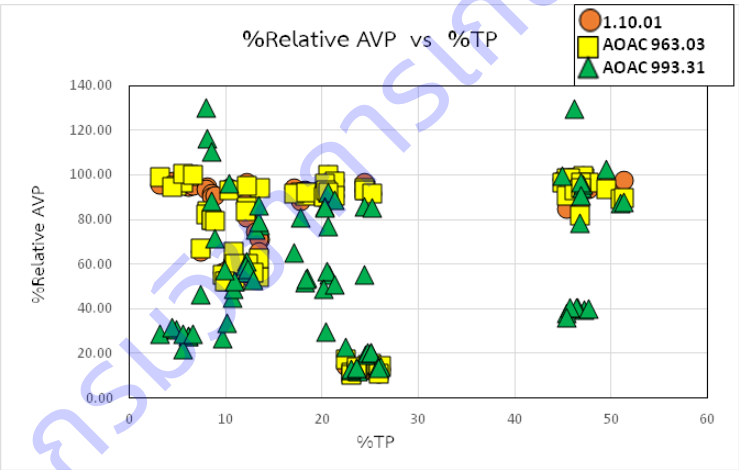
กรมวิชาการเกษตร

ในขณะที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AOAC 993.31 นั้นให้ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ %AVP_2O_5 ในระดับที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

2. ศึกษาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (%AVP_2O_5) ในปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่วิเคราะห์โดยวิธีทั้ง 3 นั้นเป็นดังนี้ AOAC 963.02 < Inhouse < AOAC 993.31 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของวิธี Inhouse และ AOAC 963.02แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างวิธี AOAC 963.02 และ AOAC 993.31

3. ศึกษาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (%AVP_2O_5) ที่วิเคราะห์โดย 1.10.01 และ AOAC 963.02 นั้นไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ วิธีทั้ง 2 นั้น ให้ความแตกต่างกันกับ AOAC 993.31 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการสกัด %P_2O_5 ออกจากหินฟอสเฟตได้มากขึ้นด้วยการเพิ่ม EDTA เข้าไปเพื่อให้เกิดสารเชิงซ้อนกับแคลเซียม เหล็กและอะลูมินัม ที่อยู่ภายในหินฟอสเฟต เป็นผลทำให้การละลายและความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสเพิ่มมากขึ้น (Newlon, 2003) และให้ในปริมาณที่สูงกว่าวิธี AOAC 963.02อย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในตัวอย่างปุ๋ยทั้ง 3 ชนิด สามารถนำมาวิเคราะห์หา % Relative AVP_2O_5 ได้โดยหาจากอัตราส่วน %AVP_2O_5/%TP x 100 จากนั้นนำมาพล๊อตกราฟระหว่าง %TP ได้ความสัมพันธ์ดังภาพที่ 1

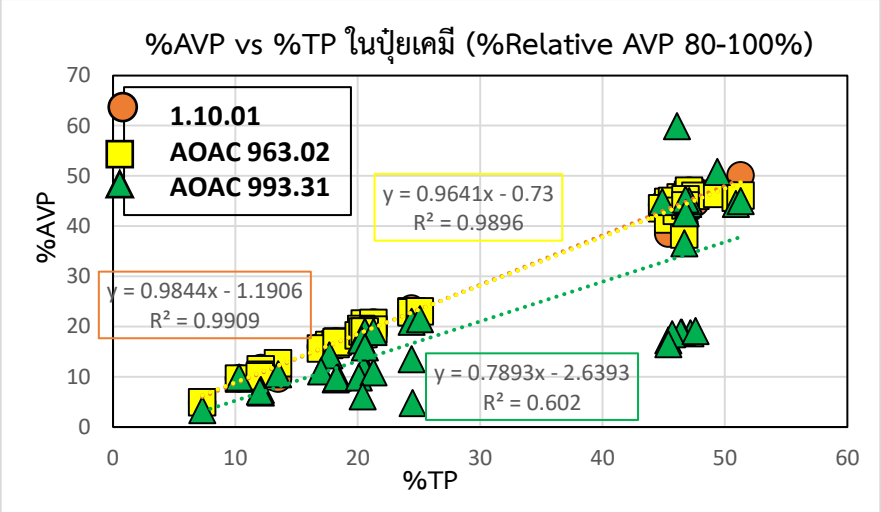


ภาพที่ 1 แสดง%Relative AVP_2O_5 และ %TP โดยวิธี 1.10.01 AOAC 963.02 และ AOAC 993.31

4. จัดกลุ่มปุ๋ยตาม %Relative AVP_2O_5 ได้ ดังนี้

4.1. **กลุ่มที่ 1 ปุ๋ยเคมี (% Relative AVP_2O_5 80-100%)** เมื่อนำมาพิจารณาสัดส่วนระหว่าง %AVP_2O_5 และ %TP โดยมี %TP อยู่ในช่วง 7.30-51.30 ให้สหสัมพันธ์เป็นดังนี้ 1.10.01 = 960.02 > 9933.31 โดยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และ slope แสดงในตารางที่ 1

กรมวิชาการเกษตร



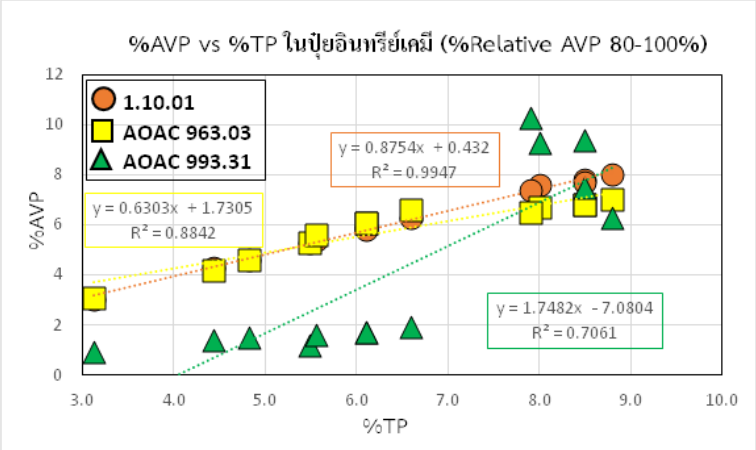
ภาพที่ 2 %Relative AVP$_2O_5$ และ %TP ในตัวอย่างปุ๋ยเคมี (%Relative AVP$_2O_5$ 80-100%)

จากภาพที่ 2 พบสหสัมพันธ์ระหว่าง %TP และ %AVP$_2O_5$ ในปุ๋ยเคมีที่มี %Relative AVP$_2O_5$ 80-100% เป็นดังนี้ 1.10.01 = AOAC 963.02 ซึ่งให้สหสัมพันธ์ที่สูงมาก และไม่พบความแตกต่างของ %AVP$_2O_5$ ที่ได้จากวิธีทั้งสอง (P>0.05) ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้สหสัมพันธ์และค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากวิธีนี้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ปุ๋ยที่มีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลัง เช่นปุ๋ยหินฟอสเฟต โดยเพิ่ม EDTA เข้าไปในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทเพื่อให้ เกิดสารเชิงซ้อนกับแคลเซียมในตัวอย่าง (AOAC, 2016) มีผลทำให้สารประกอบแคลเซียมฟอสเฟตในตัวอย่างปุ๋ยสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสละลายออกมาได้มากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จาก %AVP$_2O_5$ ที่เพิ่มขึ้น ของปุ๋ยหินฟอสเฟตและปุ๋ยอินทรีย์เคมี ในขณะที่ปุ๋ยเคมีบางตัวอย่างมี %AVP$_2O_5$ ลดลงครึ่งหนึ่งแม้สูตรเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบที่อยู่ภายในปุ๋ยมีความแตกต่างกันจึงมีผลทำให้ %AVP$_2O_5$ ที่ได้ไม่เท่ากันแม้จะสูตรเหมือนกัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธี AOAC 993.31 นั้นมีความเหมาะสมสำหรับปุ๋ยที่มีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก โดยองค์ประกอบของปุ๋ยเคมีที่นำมาศึกษานั้นส่วนใหญ่มาจากสารประกอบแอมโมเนียมเหล็กและอะลูมินัมฟอสเฟต (Akiyama and Ando, 1972) ที่ได้จากการเติมแอมโมเนียลงในกระบวนการ Wet Process (Jacob *et al*.,1930) ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นโมโนแอมโมเนียมฟอสเฟตที่อุณหภูมิ 155 องศาเซลเซียส (Akiyama and Ando, 1972) ซึ่งสารละลาแอมโมเนียมซิเตรท EDTA ไม่สามารถละลายสารประกอบในส่วนนี้ได้ จึงมีผลทำให้%AVP$_2O_5$ ที่ได้จากวิธีดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าวิธีอื่น จากสหสัมพันธ์ที่ได้ทำให้ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และ slope แสดงในตารางที่ 1

4.2. **กลุ่มที่ 2 ปุ๋ยอินทรีย์เคมี** จำแนกตาม %Relative AVP$_2O_5$ ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

4.2.1. **ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (% Relative AVP$_2O_5$ 80-100%)** มี %TP อยู่ในช่วง 3.13-8.80 ให้สหสัมพันธ์เป็นดังนี้ 1.10.01 > AOAC 960.02 > AOAC 9933.31 โดยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และ slope แสดงในตารางที่ 1

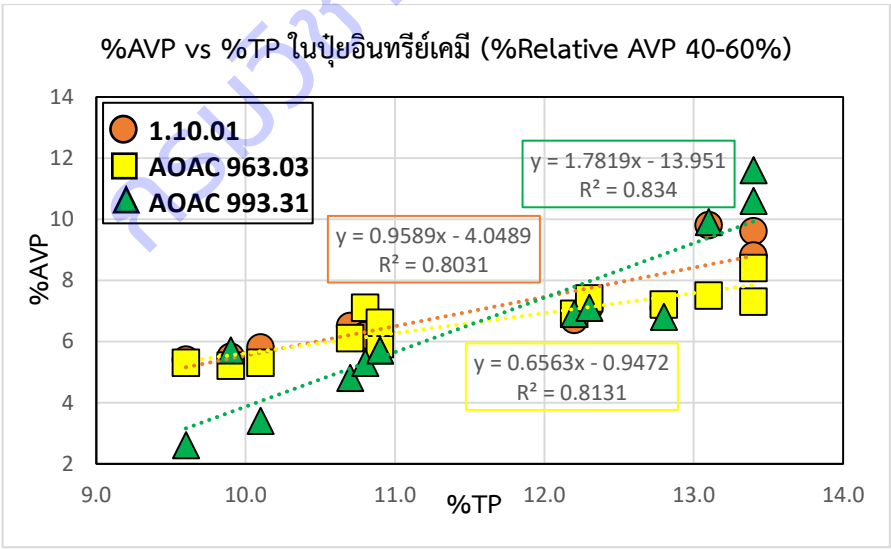
กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 %Relative AVP$_2O_5$ และ %TP ในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP$_2O_5$ 80-100%)

จากภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่า %AVP$_2O_5$ ที่ได้จาก 1.10.01 นั้นให้ปริมาณ AVP$_2O_5$ ที่ใกล้เคียงกับ AOAC 963.02 ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %AVP$_2O_5$ ที่ต่ำกว่าทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวไม่มีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก จึงมีผลทำให้ %AVP$_2O_5$ ที่ได้ต่ำ ในขณะที่ตัวอย่างที่มี %TP อยู่ระหว่าง 8-9 % เป็นตัวอย่างของปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีองค์ประกอบเป็นพวก แคลเซียมไตรฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ ซึ่งอยู่ในเศษซากกระดูกสัตว์จึงมีผลทำให้แคลเซียมในรูปดังกล่าวสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้ ทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าวิธีอื่น

4.2.2.**ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP$_2O_5$ 40-60%)** ซึ่งกลุ่มนี้จะมี %TP อยู่ในช่วง 9.60-13.40 ให้สหสัมพันธ์เป็นดังนี้ 1.10.01>993.31>963.03 โดยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์และ slope แสดงในตารางที่ 1



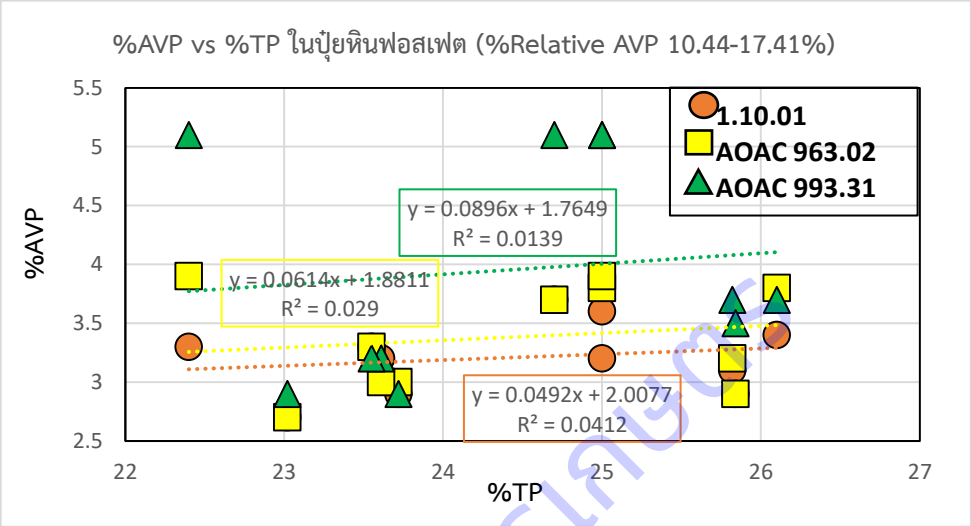
ภาพที่ 4 %Relative AVP$_2O_5$ และ %TP ในตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP$_2O_5$ 40-60%)

จากภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า %AVP$_2O_5$ ที่ได้จาก 1.10.01 นั้นให้ปริมาณ AVP$_2O_5$ ที่ใกล้เคียงกับ AOAC 963.02ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %AVP$_2O_5$ ในตัวอย่างที่มี %TP อยู่ระหว่าง 10-14 % ใกล้เคียงกับวิธีทั้งสองที่กล่าวมาเป็นตัวอย่างของปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มีองค์ประกอบเป็นพวก แคลเซียมไตร

กองวิชาการเกษตร

ฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ ซึ่งพบในเศษซากกระดูกสัตว์จึงมีผลทำให้แคลเซียมในรูปดังกล่าวสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้ ทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าวิธีอื่น

4.3. **กลุ่มที่ 4 ปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP$_2$O$_5$ 10.39-17.41%)** ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ที่วิเคราะห์ได้จาก AOAC 963.02 อยู่ในช่วง 2.39-3.70 ในขณะที่ %TP อยู่ในช่วงระหว่าง 22.4-26.1 จึงไม่พบสหสัมพันธ์ระหว่าง %TP และ %AVP$_2$O$_5$ ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 % AVP$_2$O$_5$ ที่ได้จาก 1.10.01, AOAC 963.02, AOAC 993.31 และ %TP ในตัวอย่างปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP$_2$O$_5$ 10.44-17.41)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 %TP, %AVP_2O_5, %ATP/%TP, R และ Slope ที่ได้จากวิธีวิเคราะห์ 1.10.01, AOAC 963.02 และ AOAC 993.31

ชนิดปุ๋ย	%Relative AVP_2O_5	%TP	Method	%AVP_2O_5	%AVP_2O_5/ %TP	R	Slope
ปุ๋ยเคมี	80-100%	(7.30-51.30)	1.10.01	4.80-50.10	0.65-1.00	0.99	0.98
			963.03	4.90-47.00	0.67-1.00	0.99	0.96
			993.31	3.40-59.90	0.19-1.29	0.77	0.79
ปุ๋ยอินทรีย์เคมี	80-100%	(3.13-8.80)	1.10.01	3.00-8.00	0.91-0.97	0.99	0.88
			963.03	3.10-7.00	0.80-1.00	0.94	0.63
			993.31	0.90-10.30	0.22-0.13	0.84	1.75
	40-60%	(9.60-13.40)	1.10.01	5.40-9.80	0.55-0.75	0.90	0.96
			963.03	5.20-8.40	0.52-0.66	0.90	0.66
			993.31	2.60-11.60	0.27-0.87	0.91	1.78
ปุ๋ยหินฟอสเฟต	10.3-17.41%	(22.4-26.1)	1.10.01	2.69-3.70	0.11-0.15	0.20	0.05
			963.03	2.39-3.90	0.10-0.17	0.17	0.06
			993.31	2.90-5.10	0.12-0.23	0.11	0.09

จากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ได้นั้นพบว่า ในปุ๋ยเคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) และปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 40-60%) นั้นให้สหสัมพันธ์มากว่าร้อยละ 99 และ AOAC 993.31 ให้สหสัมพันธ์ร้อยละ 77 ในขณะที่ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) ให้สหสัมพันธ์ของ%AVP_2O_5 วิธี 1.10.01 AOAC 963.02 AOAC 993.31 และ %TP ร้อยละ 99, 94 และ 84 ตามลำดับ ในขณะที่ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 40-60%) นั้นให้สหสัมพันธ์มากกว่า ร้อยละ 90 ในทุกวิธี สำหรับปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP_2O_5 10.44-17.41) พบสหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 ที่ได้จาก 1.10.01 AOAC 963.02 และ AOAC 993.31 และ %TP เพียงร้อยละ 20 17 และ 11 ตามลำดับ จากสหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 และ %TP จะเห็นได้ว่า %AVP_2O_5 (1.10.01) นั้นให้เท่ากันและใกล้เคียงกับ %AVP_2O_5 (AOAC 963.02) มากที่สุด

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธี 1.10.01 AOAC 963.02 และ 993.31

ขั้นตอน	1.10.01	AOAC 963.02	AOAC 993.31
ปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้จากวิธี (%)			
ฟอสฟอรัสทั้งหมด (TP)	วิเคราะห์ได้ตามประกาศกระทรวงฯ	วิเคราะห์ได้ตาม 957.02 (AOAC, 2016)	-
ฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ (WSP)	-	วิเคราะห์ได้ตาม 977.01 (AOAC, 2016)	-
ฟอสฟอรัสที่ในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรท (CSP)		วิเคราะห์ได้ตาม AOAC 960.01 (AOAC, 2016)	-

กรมวิชาการเกษตร

ฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรท (CIP)	วิเคราะห์ได้ตามประกาศกระทรวงฯ	วิเคราะห์ได้ตาม AOAC 963.02(AOAC, 2016)	-
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (AVP2O5)	TP - CIP	TP - CIP	วิเคราะห์ได้ตาม AOAC 993.31 (AOAC, 2016)
การผ่านเกณฑ์ความเป็นประโยชน์ของฟอสฟอรัสในรูป $\%P_2O_5$ (%)			
ปุ๋ยเคมี(%Relative AVP_2O_5 80-100%)	71.42	66.67	21.42
ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP2O5 80-100%)	100.00	100.00	38.46
ปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP2O5 40-60%)	61.54	69.23	46.15
ปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP2O5 10.44 -17.41%)	100	100	100

จากการศึกษาสหสัมพันธ์ %Relative AVP_2O_5 และ %TP สหสัมพันธ์ระหว่าง $\%AVP_2O_5$ และ %TP ศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาการเตรียมตัวอย่าง รูปและปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้รวมทั้งการผ่านเกณฑ์ความเป็นประโยชน์ในตารางที่ 2 พบว่าวิธี AOAC 963.02นั้นมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยเคมี อินทรีย์ และหินฟอสเฟต เนื่องจากสามารถวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสรูปต่างๆได้ไม่ว่าจะเป็นฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำ ฟอสฟอรัสที่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรท ฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายในแอมโมเนียมซิเตรท ในการทดสอบครั้งเดียว ทั้งยังใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อยที่สุด ให้ความถูกต้องและมีผ่านเกณฑ์ความเป็นประโยชน์ได้เท่ากับวิธี 1.10.01 ในขณะที่วิธี AOAC 993.31 นั้นมีความเหมาะสมเฉพาะปุ๋ยหินฟอสเฟตเพียงชนิดเดียว (เนื่องจาก EDTA สามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับแคลเซียมจึงสามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสออกมาได้มากกว่าวิธีอื่น และไม่สามารถปลดปล่อยฟอสฟอรัสในตัวอย่างปุ๋ยที่มีการเติมแอมโมเนียเข้าไประหว่างกระบวนการ wet process)

5. ทำการศึกษา %Recovery ของวิธี 1.10.01 และ วิธี AOAC 993.31 โดยเทียบกับ $\%AVP_2O_5$ ที่วิเคราะห์ AOAC 963.02 และ %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 ดังแสดงในตารางที่ 3

- จากการศึกษาในปุ๋ยเคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) เมื่อเทียบกับ $\%AVP_2O_5$ (AOAC 963.02) พบว่า $\%AVP_2O_5$ ที่ได้จาก 1.10.01 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 75.59-108.68 %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 คิดเป็นร้อยละ 59.52 ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 20.96-139.30 %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 คิดเป็นร้อยละ 1.95
- จากการศึกษาในปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) เมื่อเทียบกับ $\%AVP_2O_5$ (AOAC 963.02) พบว่า $\%AVP_2O_5$ ที่ได้จาก 1.10.01 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 88.89-121.88

กรมวิทยาศาสตร์

%Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 คิดเป็นร้อยละ 33.33 ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 96.67-137.84 และไม่พบ%Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102

- จากการศึกษาในปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP2O5 40-60%) เมื่อเทียบกับ %AVP_2O_5 (AOAC 963.02) พบว่า %AVP_2O_5 ที่ได้จาก 1.10.01 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 87.32-131.51 %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 คิดเป็นร้อยละ 53.85 ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 49.06-145.21 %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 คิดเป็นร้อยละ 7.69

- จากการศึกษาในปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP_2O_5 80-100%) เมื่อเทียบกับ %AVP_2O_5 (AOAC 963.02) พบว่า %AVP_2O_5 ที่ได้จาก 1.10.01 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 88.89-121.88 %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102 คิดเป็นร้อยละ 33.33 ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 96.67-137.84 และไม่พบ %Recovery ที่ผ่านเกณฑ์ 98-102

ตารางที่ 3 %Recovery, % ผ่านเกณฑ์ Recovery 98-102 และสหสัมพันธ์ระหว่าง %AVP_2O_5 (963.02) และ %AVP_2O_5 (1.10.01) และ %AVP_2O_5 (993.31)

ชนิดปุ๋ย	ปุ๋ยเคมี		ปุ๋ยอินทรีย์เคมี				ปุ๋ยหินฟอสเฟต	
%AVP_2O_5/%TP	80-100		80-100		40-60		10.3-17.41%	
%TP	(7.30-51.30)		(3.13-8.80)		(9.60-13.40)		(22.4-26.1)	
Method	1.10.01	993.31	1.10.01	993.31	1.10.01	993.31	1.10.01	993.31
%Recovery	75.59-108.68	20.96-139.30	95.08-114.71	22.64-158.46	87.32-121.88	49.06-145.21	88.89-121.88	96.67-137.84
%Recovery 98-102	59.52	0.0	46.15	0	53.85	7.69	33.33	0
R	0.99	0.76	0.96	0.66	0.77	0.84	0.84	0.84
Slope	1.02	0.80	0.73	2.05	1.13	2.25	1.56	0.53
Urea	-		76.92 (10)		100 (13)		28.95 (11)	
Ammonia	-		23.08 (3)		-		47.37 (18)	
Ammonium Sulphate	5.26 (2)		15.38 (2)		23.08 (3)		-	
Ammonium Carbonate	13.16 (5)		-		-		-	
Ammonium Nitrate	2.63 (1)		-		-		-	
By product/ bone meal/ organic fertilizers	-		53.85 (7)		100 (13)		-	
DAP	5.62 (2)		46.15 (6)		38.46 (5)		-	
MAP	28.95 (11)		38.46 (5)		30.77 (4)		-	
Phosphoric acid	26.32 (10)		15.38 (2)		23.08 (3)		-	
Phosphate Rock	31.58 (12)		-		-		100 (20)	
Tetrapyrophosphate	-		-		-		-	

กรมวิชาการเกษตร

SSP	2.63 (1)	-	-	-
DSP	5.26 (1)	-	-	-
TSP	5.26 (1)	-	-	-
Monopotassium phosphate	-	15.38 (2)	-	-
Tetrapotassium phosphate	-	15.38 (2)	-	-
KCl	21.50 (8)	46.15 (6)	-	-
K_2SO_4	10.53 (4)	-	-	-
KOH	2.63 (1)	-	-	-
H_2SO_4	36.84 (14)	-	-	-
HNO_3	2.63 (1)	-	-	-
MnO	5.26 (2.0)	-	-	-
$MgSO_4$	2.63 (1)	-	-	-
Clay mineral	5.26 (2)	-	-	-
Filler	13.16 (5)	30.77 (4)	-	-

(1,2,..) = จำนวนตัวอย่าง

จากตารางที่ 3 %Recovery ของปุ๋ยเคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) ที่ได้จาก 1.10.01 เทียบกับ AOAC 963.02อยู่ในช่วง 75.59 – 108.68 ผ่านเกณฑ์ %Recovery 98-102 ถึงร้อยละ 59.52 ในขณะที่ AOAC 993.31 %Recovery อยู่ในช่วง 20.96-139.30 ซึ่งมีทั้งช่วงสูงและต่ำ สำหรับช่วง %Recovery ต่ำ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบว่าในตัวอย่างประกอบด้วย แอมโมเนีย DAP MAP Phosphoric Acid Phosphate Rock เป็นหลัก ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบแอมโมเนียมเหล็กอะลูมินัมฟอสเฟตที่สารละลายแอมโมเนียมซิเตรท EDTA ไม่สามารถสกัดออกมาได้ %Recovery ที่ได้จึงต่ำลง ขณะที่ในบางตัวอย่างจะมีสารประกอบซุปเปอร์ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ ไม่ว่าจะเป็นดับเบิ้ลซุปเปอร์ฟอสเฟตหรือ ทริปเปิลซุปเปอร์ฟอสเฟต ซึ่งการละลายจะเข้าหลักการของ AOAC 993.31 นั่นคือ EDTA เกิดสารเชิงซ้อนกับแคลเซียมในตัวอย่างดังกล่าว มีผลทำให้ฟอสฟอรัสละลายออกมาได้มากขึ้น (AOAC, 2016) จึงทำให้ %Recovery ของ AOAC 993.31 อยู่ในช่วงสูง ซึ่งผ่านเกณฑ์ 98-102 เพียงร้อยละ 1.95

%Recovery ของปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 80-100%) ที่ได้จาก 1.10.01 เทียบกับ AOAC 963.02อยู่ในช่วง 95.08 – 114.71 ผ่านเกณฑ์ %Recovery 98-102 ถึงร้อยละ 46.15 ในขณะที่ AOAC 993.31 %Recovery อยู่ในช่วง 22.64-158.46 เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบว่าในตัวอย่างประกอบด้วย เศษซากสัตว์ (By Product by slouaghter house) เช่นกระดูกสัตว์ ซึ่งมีรูปของไตรแคลเซียมฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้อยู่ จึงสามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับปุ๋ยหินฟอสเฟต ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นมี EDTA เข้ามาช่วยทำให้การละลายเกิดได้มากขึ้น จึงทำ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

ให้%Recovery ของ AOAC 993.31 สูงแต่น้อยกว่ากลุ่มปุ๋ยอินทรีย์เคมีที่มี (%Relative AVP2O5 40-60%) จึงมีผลทำให้ %Recovery ยังคงสูงและไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ %Recovery 98-102

%Recovery ของปุ๋ยอินทรีย์เคมี (%Relative AVP_2O_5 40-60%) ที่ได้จาก 1.10.01 เทียบกับ AOAC 963.02อยู่ในช่วง 87.32 – 131.51 ผ่านเกณฑ์ %Recovery 98-102 ถึงร้อยละ 53.85 ในขณะที่ AOAC 993.31 อยู่ในช่วง 49.06-145.21 เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของตัวอย่างที่นำมาศึกษาพบว่าในตัวอย่างประกอบด้วย เศษซากสัตว์ (By Product by slaughter house) เช่น กระดูกสัตว์ซึ่งมีรูปของแคลเซียมไตรฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้อยู่ จึงสามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับปุ๋ยหินฟอสเฟต ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นมี EDTA เข้ามาช่วยทำให้การละลายเกิดได้มากขึ้น จึงทำให้%Recovery ของ AOAC 993.31 สูงมากและผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ %Recovery 98-102 เพียงร้อยละ 7.69

จากตารางจะเห็นได้ว่า %Recovery ของปุ๋ยหินฟอสเฟต (%Relative AVP_2O_5 10.44-17.41%) ที่ได้จากวิธี 1.10.01 เทียบกับ AOAC 963.02อยู่ในช่วง 29.41-112.50 ผ่านเกณฑ์ %Recovery 98-102 ถึงร้อยละ 33.33 ในขณะที่ AOAC 993.31 นั้นให้ %Recovery อยู่ในช่วง 96.67-137.84 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์ %Recovery 98-102 เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของปุ๋ยพบว่าประกอบด้วยหินฟอสเฟตทั้งหมด ดังนั้นการละลายของหินฟอสเฟตในวิธีทั้งสองมีความแตกต่าง %Recovery ที่ได้นั้นจึงแตกต่างกัน โดยเฉพาะในวิธี AOAC 993.31 จะให้ %Recovery ในทางที่สูงมาก ทั้งนี้เนื่องจาก EDTA ในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทสามารถเกิดสารเชิงซ้อนกับแคลเซียมในตัวอย่าง (AOAC, 2016) มีผลทำให้ฟอสเฟตละลายออกมาได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทที่เป็นกลาง มีผลทำให้ $\%AVP_2O_5$ สูงและผ่านเกณฑ์ความเป็นประโยชน์ทั้งหมด

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

วิธี 1.10.01 และ AOAC 963.02 มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมีและปุ๋ยหินฟอสเฟต ในขณะที่วิธี AOAC 993.31 เหมาะสำหรับปุ๋ยที่มีแคลเซียมฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ปุ๋ยหินฟอสเฟต หรือปุ๋ยที่มีเศษซากสัตว์เป็นองค์ประกอบ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย สวพ. 8

Method Validation on Analysis of Total Phosphorus in Fertilizers at Office of Agricultural Research and Development Region 8

ว่าที่ร้อยตรีพิรุณ ติระพัฒน์ เยาวลักษณ์ แสงแก้ว สรัญญา ช่วงพิมพ์

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย

Method Validation Total Phosphorus in Fertilizers

บทคัดย่อ (Abstract)

ศรีวิชาการเกษตร

เปรียบเทียบประสิทธิภาพสารละลายปรับสีที่เตรียมตาม 1) ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 (พรบ., 2559) 2) Official method of analysis of fertilizer (1987)(OMAF, 1987) และ 3) Standard methods for the Examination of water and wastewater (1999) (SMWW, 1999) ในการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง โดยเติมสารละลายปรับสี 10, 20 และ 20 ml (ตามลำดับ) ลงในสารละลายตัวอย่างและปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ของปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม ทั้ง 3 วิธี คือ 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999) โดยวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง โดยทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range), พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (Linearity), ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD), ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ), ตรวจสอบค่าความถูกต้อง (Trueness) และค่าความเที่ยง (precision) ทั้งแบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) และแบบทำซ้ำ (Intermediate precision) โดยปุ๋ยเคมี วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material, CRM) ที่ความเข้มข้น 1.0 $\%P_2O_5$ เตรียมจาก SRM 194a, 30.20 $\%P_2O_5$ (SRM 694, Western Phosphate Rock) และ 61.71 $\%P_2O_5$ (SRM194a, Ammonium dihydrogen phosphate) และปุ๋ยอินทรีย์ วิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.5 5.0 และ 10.0 $\%P_2O_5$ ใช้การเติมสารละลายฟอสฟอรัสที่ทราบค่าซึ่งเตรียมจาก SRM 194a ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

ปุ๋ยเคมี ทดสอบ Range ที่ช่วงความเข้มข้น 1 – 35 mg/L พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) และ SMWW (1999) ให้ค่า r = 0.9996 และ 0.9990 ตามลำดับ แต่สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี พรบ. (2559) ให้ค่า r = 0.9709 และให้ค่า $r \geq 0.997$ ที่ช่วงความเข้มข้น 1 – 25 mg/L (0.9979) และได้เลือกช่วง 1 – 12 mg/L เพื่อพิสูจน์ Linearity ของสารละลายปรับสีที่เตรียมตาม ทั้ง 3 วิธี ให้ค่า r = 1.0000, LOD ได้ค่าเท่ากับ 0.0174, 0.0084 และ 0.0075 $\%P_2O_5$ ตามลำดับ, LOQ ได้ค่าเท่ากับ 0.0580, 0.0280 และ 0.0250 $\%P_2O_5$ ตามลำดับ, ตรวจสอบความถูกต้อง ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ค่า % Recovery เฉลี่ย ในการพิจารณา พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม พรบ. (2559) ได้ % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 97.43, 99.41 และ 99.65 % ตามลำดับ, ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) ได้ % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.13, 100.13 และ 100.13 % ตามลำดับ และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ได้ % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 98.50, 99.85 และ 100.16 % ตามลำดับ ตรวจสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำ ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ค่า HorRat ในการพิจารณา พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.04, 0.06 และ 0.05 ตามลำดับ, ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.03, 0.06 และ 0.06 ตามลำดับ และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.02,

0.05 และ 0.06 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำ ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ค่า HorRat ในการพิจารณา พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.06, 0.06 และ 0.09 ตามลำดับ, ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.10, 0.07 และ 0.11 ตามลำดับ และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.08, 0.03 และ 0.15 ตามลำดับ

ปุ๋ยอินทรีย์ ทดสอบ Range ที่ช่วงความเข้มข้น 1 – 35 mg/L พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) และ SMWW (1999) ให้ค่า r = 0.9995 และ 0.9990 ตามลำดับ แต่สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี พรบ. (2559) ให้ค่า r = 0.9726 และให้ค่า r$\geq$ 0.997 ที่ช่วงความเข้มข้น 1 – 25 mg/L (0.9982) และได้เลือกช่วง 1 – 12 mg/L เพื่อพิสูจน์ Linearity สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม ทั้ง 3 วิธี ให้ค่า r = 1.0000, LOD ได้ค่าเท่ากับ 0.0063, 0.0048 และ 0.0102 %P_2O_5 ตามลำดับ, LOQ ได้ค่าเท่ากับ 0.0210, 0.0160 และ 0.0340 %P_2O_5 ตามลำดับ, ตรวจสอบความถูกต้อง ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ค่า % Recovery เฉลี่ย ในการพิจารณา พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม พรบ. (2559) ได้ % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 96.69, 100.58 และ 100.74 % ตามลำดับ, ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) ได้ % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 100.37, 101.05 และ 101.06 % ตามลำดับ และ ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ได้ % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 94.83, 100.18 และ 100.53 % ตามลำดับ ตรวจสอบความเที่ยงแบบทวนซ้ำ ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ค่า HorRat ในการพิจารณา พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.10, 0.05 และ 0.08 ตามลำดับ, ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.16, 0.05 และ 0.10 ตามลำดับ และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.08, 0.06 และ 0.08 ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบความเที่ยงแบบทำซ้ำ ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ค่า HorRat ในการพิจารณา พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.04, 0.05 และ 0.03 ตามลำดับ, ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.19, 0.07 และ 0.10 ตามลำดับ และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.08, 0.06 และ 0.09 ตามลำดับจากการเปรียบเทียบขั้นตอน ระยะเวลาการวิเคราะห์ ความแม่นยำ และต้นทุนการวิเคราะห์ พบว่า ขั้นตอนและระยะเวลาการวิเคราะห์ ไม่มีความแตกต่างกัน, ความแม่นยำของการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

Comparison of the efficiency of the color developing solution prepared according to 1) Notification of the Ministry of Agriculture and Cooperatives Re: Determination of Chemical Fertilizer Analysis Method B.E. 2559 (Procedure 1.09.01 (Act., 2016) 2) Official method of analysis of fertilizer (1987)(OMAF, 1987) and 3) Standard methods for the Examination of water and wastewater (1999) (SMWW, 1999) in the analysis of chemical and organic fertilizers at low, medium and high concentrations. And add 10, 20 and 20 ml (respectively) to the sample solution and adjust to 100 ml. found that total

กรมวิชาการเกษตร

phosphorus content analyzed were not statistically significant differences between the two fertilizers at different concentrations and using a color developing solution prepared according to each method.

Verification of the validity of the total phosphorus analysis method in chemical and organic fertilizers. Using color developing solution prepared according to 3 methods were 1) Act B. (2016), 2) OMAF (1987) and 3) SMWW (1999) at low, medium and high concentrations to assessed the Range, Linearity, Limit of detection (LOD), Limit of quantitation (LOQ), Trueness and precision (repeatability and intermediate precision). The validation chemical fertilizer used certified reference material (CRM) : 1.0 $\%P_2O_5$ concentration prepared from SRM 194a, 30.20 $\%P_2O_5$ (SRM 694, Western Phosphate Rock) and 61.71. $\%P_2O_5$ (SRM194a, Ammonium dihydrogen phosphate). Organic fertilizers Analyzed at concentrations 0.5, 5.0 and 10.0 $\%P_2O_5$ (add phosphorus solution which was prepared from SRM 194a) the results show that:

Chemical fertilizers: Range at the concentration range of 1 – 35 mg/L, it was found that the color developing solution prepared according to OMAF (1987) and SMWW (1999) gave r = 0.9996 and 0.9990, respectively, but the color developing solution prepared according to the Act . (2016) gave r = 0.9709, and giving more than $r \geq 0.997$ at a concentration range of 1 – 25 mg/L (0.9979). Linearity at the concentration range of 1 - 12 mg/L found that the color developing solution prepared according to all 3 methods was found to give r = 1.0000. LOD = 0.0174, 0.0084 and 0.0075 $\%P_2O_5$, respectively. LOQ = 0.0580, 0.0280 and 0.0250 $\%P_2O_5$, respectively. Trueness at low, medium and high levels assessed % Mean Recovery found that the color developing solution prepared according to Act (2016) got % Mean Recovery = 97.43, 99.41 and 99.65%, respectively, color developing solution prepared according to OMAF (1987) got % mean Recovery = 99.13, 100.13 and 100.13 %, respectively, and the color developing solution prepared according to SMWW (1999) got % mean Recovery = 98.50, 99.85 and 100.16 %, respectively. Repeatability precision at low, medium and high levels assessed HorRat values. It was found that the color developing solution prepared according to the Act (2016) got HorRat values= 0.04, 0.06 and 0.05 ,respectively, color developing solutions prepared according to OMAF (1987) got HorRat values = 0.03, 0.06 and 0.06, respectively, and the color developing solution prepared according to SMWW (1999) got HorRat values = 0.02, 0.05 and 0.06, respectively. Intermediate precision at low, medium and high levels assessed HorRat values. It was found that the color developing solution prepared

according to the Act (2016) got HorRat values = 0.06, 0.06 and 0.09, respectively, color developing solutions prepared according to OMAF (1987) got HorRat values = 0.10, 0.07 and 0.11, respectively, and the color developing solution prepared according to SMWW (1999) got HorRat values = 0.08, 0.03 and 0.15, respectively.

Organic fertilizers: Range at the concentration range of 1 – 35 mg/L, it was found that the color developing solution prepared according to OMAF (1987) and SMWW (1999) gave r = 0.9995 and 0.9990, respectively, but the color developing solution prepared according to the Act . (2016) gave r = 0.9726, and giving more than r $\geq$ 0.997 at a concentration range of 1 – 25 mg/L (0.9982). Linearity at the concentration range of 1 - 12 mg/L found that the color developing solution prepared according to all 3 methods was found to give r = 1.0000. LOD = 0.0063, 0.0048 and 0.0102 %P_2O_5, respectively. LOQ = 0.0210, 0.0160 and 0.0340 %P_2O_5, respectively. Trueness at low, medium and high levels assessed % Mean Recovery found that the color developing solution prepared according to Act (2016) got % Mean Recovery = 96.69, 100.58 and 100.74%, respectively, color developing solution prepared according to OMAF (1987) got % mean Recovery = 100.37, 101.05 and 101.06 %, respectively, and the color developing solution prepared according to SMWW (1999) got % mean Recovery = 94.83, 100.18 and 100.53 %, respectively. Repeatability precision at low, medium and high levels assessed HorRat values. It was found that the color developing solution prepared according to the Act (2016) got HorRat values= 0.10, 0.05 and 0.08 ,respectively, color developing solutions prepared according to OMAF (1987) got HorRat values = 0.16, 0.05 and 0.10, respectively, and the color developing solution prepared according to SMWW (1999) got HorRat values = 0.08, 0.06 and 0.08, respectively. Intermediate precision at low, medium and high levels assessed HorRat values. It was found that the color developing solution prepared according to the Act (2016) got HorRat values = 0.04, 0.05 and 0.03, respectively, color developing solutions prepared according to OMAF (1987) got HorRat values = 0.19, 0.07 and 0.10, respectively, and the color developing solution prepared according to SMWW (1999) got HorRat values = 0.08, 0.06 and 0.09, respectively.

บทนำ (Introduction)

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย ด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมททริก โมลิบโดวานาโดฟอสเฟต (Spectrophotometric molybdovanadophosphate) เป็นวิธีวิเคราะห์ทั่วไปสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่มีความเข้มข้นสูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีโมลิบดินัมบลู

สถาบันการเกษตร

(Molybdenum blue method) ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้สารละลายปรับสี ที่เรียกว่า โมลิบโดวานาเดต (Molybdovanadate reagent) เพื่อสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของฟอสฟอรัส สีเหลือง-ใส

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ได้เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560) โดยสารละลายปรับสี เป็นสารผสมระหว่าง Ammonium molydate tetrahydrate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$], Ammonium metavanadate (NH_4VO_3) และ Perchloric acid ($HClO_4$) แต่พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียม เมื่อระยะเวลาผ่านไปประมาณ 2 – 3 สัปดาห์จะสังเกตเห็นตะกอนสีเหลือง และเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งถ้านำสารละลายปรับสีดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ พบว่า ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาลดลง ส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย (Dispenser) อุดตัน ดังนั้นห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นต้องทิ้งสารละลายปรับสีดังกล่าว ซึ่งสิ้นเปลืองทรัพยากรโดยใช่เหตุ และเมื่อนำตะกอนสีเหลืองที่ได้ไปวิเคราะห์ชนิดสาร ด้วยเทคนิค X-ray Diffractometer (XRD) พบว่า มีสารประกอบอยู่ 2 ชนิด คือ Molybdenum oxide hydrate ($MoO_3(H_2O)_2$ และ Vanadyl hydrogen phosphate hydrate ($VO(HPO_4).2H_2O$) สอดคล้องกับการศึกษา Heyns และ Cruywagen (1986) พบว่า เมื่อนำ $Na_2MoO_4.2H_2O$ ทำปฏิกิริยากับ $HClO_4$ จะเกิดการตกตะกอนของ Molybdenum oxide ภายใน 2 – 3 สัปดาห์

และจากการตรวจเอกสารพบว่า การเตรียมสารละลายปรับสี Molybdovanadate reagent ต้องใช้ Ammonium molybdate tetrahydrate [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$], Ammonium metavanadate (NH_4VO_3) ละลายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยกรดที่ใช้อาจเป็น Nitric acid (HNO_3), Sulfuric acid (H_2SO_4), Hydrochloric acid (HCl) และ Perchloric acid ($HClO_4$) ก็ได้ (Dell, 1990 อ้างโดย จำเป็น, 2536) และจากการตรวจสอบเอกสารวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด ด้วยวิธี Spectrophotometric molybdovanadophosphate พบว่า วิธีการของ Official method of analysis of fertilizers (1987) Methods in agricultural chemical analysis (Faithfull, 2002), Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis (Motsara and Roy, 2008), Methods of Soil, Plant and water Analysis (ICARDA, 2013), คู่มือการปฏิบัติงาน กระบวนการวิเคราะห์พืช ปุ๋ย และสิ่งปรับปรุงดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2553) และคู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช (จำเป็น และจักรกฤษณ์, 2560) เป็นต้น ใช้ HNO_3 เป็นสารละลายปรับสภาพความเป็นกรดของสารละลายปรับสี โดยสารละลายปรับสีชนิดนี้รู้กันดีในชื่อ Barton's reagent และสารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธีของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 1999) และMethods of Phosphorus Analysis for Soils Sediments, Residuals, and Waters (USDA-CSREES Regional Committee, 2000) เลือกใช้ HCl เพื่อปรับสภาพความเป็นกรดของสารละลายปรับสี ดังนั้นจึงได้เตรียมสารละลายปรับสี ตามวิธี Official

กรมวิชาการเกษตร

method of analysis of fertilizers (1987) และ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 1999) เพื่อทดสอบการตกตะกอน พบว่า ไม่มีการตกตะกอนตลอดระยะเวลา 6 เดือน (รูปที่ 2) แต่การไม่มีการตกตะกอนของสารละลายปรับสี ไม่อาจบอกถึงประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยได้

ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่า สารละลายปรับสีที่ใช้ HNO_3 และ HCl เป็นสารปรับสภาพให้เป็นกรด โดยเตรียมตามวิธีของ Official method of analysis of fertilizers (1987) และ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 1999) ตามลำดับ มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารละลายปรับสีตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560) ในการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ย จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ ทดสอบและเปรียบเทียบผลเพื่อให้ได้ข้อสรุป และเพื่อให้มีความน่าเชื่อถือ จึงตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ของสารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารละลายปรับสี ในการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์
   1.1. จัดหาปุ๋ยเคมี ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง ต่ำ กลาง และสูง-เข้มข้น และตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดอยู่ในช่วงต่ำ กลาง และสูง
   1.2. เตรียมสารละลายปรับสีของแต่ละวิธี ตามตารางที่ 1
   1.3. เตรียมตัวอย่างปุ๋ยให้เป็นสารละลาย (ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ) สร้างกราฟมาตรฐานฟอสฟอรัส และการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm และคำนวณปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ปฏิบัติตามวิธีที่กำหนดไว้ใน พรบ. (2559) ยกเว้นในขั้นตอนการเติมสารละลายปรับสี จะเติมตามปริมาณที่แต่ละวิธีกำหนด (ตารางที่ 1) และนำผลวิเคราะห์ที่ได้มาเปรียบเทียบทางสถิติ

ตารางที่ 1 วิธีการเตรียมสารละลายปรับสี ตาม พรบ. (2559), OMAF (1987) และ SMWW (1999)

สารเคมี	การเตรียมสารละลายปรับสี ตามวิธี		
	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)
Ammonium metavanadate	2 g	2.24 g	2.5 g
Ammonium molybdate tetrahydrate	40 g	54 g	50 g
Perchloric acid 69 - 72 %	450 ml	-	-
Nitric acid 69 - 70 %	-	500 ml	-
Hydrochloric acid 36%	-	-	660 ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็นปริมาตรสารละลายปรับสี ที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง ตามที่แต่ละวิธีกำหนด (% ของปริมาตรทั้งหมดก่อนนำไปวัด)	2000 ml 10 % (10 ml/100 ml)	2000 ml 20 % (20 ml/100 ml)	2000 ml 20 % (20 ml/100 ml)

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี เพื่อทดสอบ

2.1. ทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range) และ พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส ที่ความเข้มข้น 1 – 35 mg/L ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient; r ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และปริมาณความเข้มข้นของฟอสฟอรัส ($r \geq 0.997$)

2.2. ตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยคำนวณค่า standard deviation (SD) ของการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยที่มีฟอสฟอรัสปริมาณน้อย (Matrix sample) จำนวน 10 ซ้ำ ในกรณีที่ตัวอย่างปุ๋ยไม่มีปริมาณฟอสฟอรัส ให้เติมสารละลายฟอสฟอรัสลงไปเล็กน้อย เพื่อให้สามารถคำนวณค่า SD ได้ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (s_0) เพื่อคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

s_0 = SD

$s'_0 = s_0 / \sqrt{n}$, n = จำนวนซ้ำในการวิเคราะห์ตัวอย่างของห้องปฏิบัติการ

กรมวิชาการเกษตร

$$LOD = 3s'_0$$

$$LOQ = 10\ s'_0$$

2.3. ตรวจสอบค่าความถูกต้อง (Trueness) และค่าความเที่ยง (precision) โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรองปุ๋ยเคมี (Certified Reference Material; CRM) SRM194a และ SRM 694 และตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่เติมสารละลายฟอสฟอรัสที่ทราบค่า ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery เฉลี่ย และ HorRat< 2 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016)

$$\%\ Recovery = \frac{\%P_2O_5\ (ต่ำ/\ กลาง/\ สูง) - \bar{x}\ \%P_2O_5\ (Matrix\ sample)}{\%P_2O_5\ (CRM)}$$

$$\%\ Recovery\ เฉลี่ย = \frac{\%\ Recovery\ แต่ละซ้ำ}{จำนวนซ้ำ}$$

การคำนวณค่า HorRat

$$RSD_r = \left(\frac{SD}{\bar{x}\%P_2O_5\ (ต่ำ, กลาง, สูง)}\right) \times 100$$

$$PRSD_R = 2C^{-0.15}\quad C=concentration/100$$

$$HorRat = \frac{RSD_r}{PRSD_R}$$

RSD_r = Repeatability relative standard deviation

$PRSD_R$ = Predicted relative standard deviation

3. นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ โดยใช้เกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016)

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

ผลการวิจัย (Results)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารละลายปรับสี ที่เตรียมตามวิธีของ 1) ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 (พรบ., 2559) 2) Official method of analysis of fertilizer (1987)(OMAF, 1987) และ 3) Standard methods for the Examination of water and wastewater (1999)(SMWW, 1999) ในการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเคราะห์ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธีข้างต้น ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารละลายปรับสี ในการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์

กรมวิชาการเกษตร

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999) เติมลงในสารละลายตัวอย่าง 10, 20 และ 20 ml ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เขย่าให้เข้ากัน และตั้งไว้ 30 นาทีก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ($\%P_2O_5$) ในตัวอย่างปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่ใช้สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559), 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999)

ตัวอย่างปุ๋ย	ปริมาณฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$)	สูตรปุ๋ย	สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี			การทดสอบทางสถิติ (95%)		
			พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)	F คำนวณ	F ตาราง	การประเมินทางสถิติ
ปุ๋ยเคมี	ต่ำ	20-5-24	4.10	4.11	4.11	1.21	3.55	ไม่แตกต่าง
		25-7-7	6.64	6.65	6.65	1.86	3.55	ไม่แตกต่าง
	กลาง	15-15-15	15.65	15.67	15.66	2.08	3.55	ไม่แตกต่าง
		30-20-10	20.45	20.49	20.49	0.06	3.55	ไม่แตกต่าง
	สูง-เข้มข้น	8-24-24	25.86	25.90	25.86	1.42	3.55	ไม่แตกต่าง
		0-3-0	25.28	25.39	25.45	0.65	3.55	ไม่แตกต่าง
		0-3-0	30.09	30.07	30.15	2.36	3.55	ไม่แตกต่าง
		18-46-0	46.86	46.81	46.80	0.53	3.55	ไม่แตกต่าง
		10-52-17	50.34	50.35	50.43	1.26	3.55	ไม่แตกต่าง
		12-60-0	61.82	61.73	61.72	0.30	3.55	ไม่แตกต่าง
ปุ๋ยอินทรีย์	ต่ำ	-	0.40	0.39	0.41	1.66	3.55	ไม่แตกต่าง
		-	1.01	1.02	1.03	1.49	3.55	ไม่แตกต่าง
	กลาง	-	3.78	3.81	3.88	2.32	3.55	ไม่แตกต่าง
		-	2.98	3.01	3.03	1.83	3.55	ไม่แตกต่าง
	สูง	-	5.74	5.75	5.77	2.30	3.55	ไม่แตกต่าง
		-	6.28	6.28	6.32	0.65	3.55	ไม่แตกต่าง

หมายเหตุ ระดับความเข้มข้นของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ($\%P_2O_5$) ในปุ๋ยเคมี อ้างอิงตาม หนังสือปฐพีวิทยาเบื้องต้น (2544) แต่งโดย คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศรีวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม แต่ละวิธีกำหนด

2.1. ทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range) และ พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

2.1.1.ทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสให้มีความเข้มข้น 1 – 35 mg/L สำหรับการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสฟอรัส กับปริมาณค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 420 nm โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามตามวิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999) เติมลงในสารละลาย 10, 20 และ 20 ml ตามลำดับ และประเมินช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้ค่า correlation coefficient; r ต้องมีค่า $r \geq 0.997$ เพื่อหาช่วงที่เหมาะสมสำหรับการพิสูจน์ความเป็นเส้นตรงต่อไป พบว่า สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี พรบ. (2559) ให้ค่า r ตลอดช่วงความเข้มข้นเท่ากับ 0.9709 และ 0.9726 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับ โดยช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ค่า r ต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับ คือ ช่วงความเข้มข้น 25 – 35 mg/L ทั้งนี้น่าจะเกิดจากปริมาณสารละลายปรับสีที่เติมลงไปมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว และช่วงความเข้มข้นที่ให้ค่า r เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ คือ ช่วงความเข้มข้น 1-25 mg/L โดยมีค่า r เท่ากับ 0.9979 และ 0.9982 ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรง โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี OMAF (1987) ให้ค่า r เท่ากับ 0.9996 และ 0.9995 ตามลำดับ และสารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ให้ค่า r เท่ากับ 0.9990 และ 0.9990 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์ยอมรับ และเพื่อให้สอดคล้องกับ พรบ. (2559) ที่ห้องปฏิบัติการฯใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงเลือกความเข้มข้นที่ 1 – 12 mg/L พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

2.1.2.พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสให้มีความเข้มข้น 1 – 12 mg/L สำหรับวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสฟอรัส กับปริมาณค่าการดูดกลืนคลื่น ที่ความยาวคลื่น 420 nm โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี และประเมินค่า correlation coefficient; r ต้องมีค่า $r \geq 0.997$ พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี และทั้ง 2 ชนิดปุ๋ย ให้ค่า r เท่ากับ 1.0000

2.2. ตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

วิเคราะห์ Matrix sample 10 ซ้ำ ของตัวอย่างปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่เติมสารละลายปรับสีของแต่ละวิธี และคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณ LOD และ LOQ ของแต่ละชนิดปุ๋ย และแต่ละชนิดสารละลายปรับสี ได้ผลการวิเคราะห์ตารางที่ 3

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ของการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ ที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม วิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999)

LOD, LOQ	ปุ๋ยเคมี ($\%P_2O_5$)			ปุ๋ยอินทรีย์ ($\%P_2O_5$)		
	สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี			สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี		
	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)
s_0 = SD	0.0082	0.0039	0.0035	0.0030	0.0022	0.0048
$s'_0 = s_0 / \sqrt{n}$, n=2	0.0058	0.0028	0.0025	0.0021	0.0016	0.0034
LOD = $3s'_0$	0.0174	0.0084	0.0075	0.0063	0.0048	0.0102
LOQ = $10s'_0$	0.0580	0.0280	0.0250	0.0210	0.0160	0.0340

หมายเหตุ Matrix sample ปุ๋ยเคมี ไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในตัวอย่างได้ ดังนั้น จึงเติมสารละลายฟอสฟอรัสลงไปเล็กน้อย

2.3. ค่าความถูกต้อง (Trueness)

วิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรองปุ๋ยเคมี ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ (1.00 % P_2O_5 เตรียมจาก SRM 194a) กลาง (SRM 694, 30.20 % P_2O_5) สูง (SRM 194a, 61.71 $\%P_2O_5$) และปุ๋ยอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (0.5, 5.0 และ 10.0 $\%P_2O_5$ ตามลำดับ โดยการเติมสารฟอสฟอรัสที่ทราบค่า เตรียมจาก SRM 194a) ร่วมกับ Matrix sample โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และคำนวณปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ตรวจสอบค่าความถูกต้อง โดยใช้ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ โดยประเมินจาก % Recovery ได้ผลวิเคราะห์ตามตารางที่ 4 และตารางภาคผนวกที่ 3 และ 4 ซึ่ง พบว่า % Recovery เฉลี่ย ของปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่เติมสารละลายปรับสี ที่เตรียมตามแต่ละวิธี ให้ค่า % Recovery เฉลี่ย อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ที่กำหนดไว้ใน AOAC (2016) ยกเว้น ตัวอย่างปุ๋ยอินทรีย์ที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (0.5 %) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 94.83 % ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับ คือ 95 – 105 % อยู่ 0.17 % แต่ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี SMWW (1999) ไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจาก % Recovery บางซ้ำ มีค่ามากกว่า 95%

ตารางที่ 4 ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ($\%P_2O_5$) เฉลี่ย และ % Recovery เฉลี่ย ของการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ (โดยการเติมสารละลายฟอสฟอรัสที่ทราบค่า) ที่ระดับต่ำ กลาง สูง ที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม วิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999)

ระดับความเข้มข้น	ปุ๋ยเคมี			เกณฑ์ยอมรับ % Recovery เฉลี่ย
	สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี			
	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)	

	%P_2O_5 / % Recovery เฉลี่ย			(AOAC, 2016)
ระดับต่ำ (1.00 %P_2O_5)	0.97 / 97.43	0.99 / 99.13	0.98 / 98.50	97-103
ระดับกลาง (30.20 %P_2O_5)	30.02 / 99.41	30.24 / 100.13	30.15 / 99.85	98-102
ระดับสูง (61.71 %P_2O_5)	61.49 / 99.65	61.79 / 100.13	61.81 / 100.16	98-102

ระดับความเข้มข้น	ปุ๋ยอินทรีย์ สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี			เกณฑ์ยอมรับ % Recovery เฉลี่ย
	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)	
	%P_2O_5 / % Recovery เฉลี่ย			(AOAC, 2016)
ระดับต่ำ (0.5 %P_2O_5)	0.48 / 96.69	0.50 / 100.37	0.47 / 94.83	95-105
ระดับกลาง (5.0 %P_2O_5)	5.03 / 100.58	5.05 / 101.05	5.01 / 100.18	97-103
ระดับสูง (10.0 %P_2O_5)	10.07 / 100.74	10.11 / 101.06	10.05 / 100.53	98-102

หมายเหตุ - %P_2O_5 หมายถึง ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ – ค่าเฉลี่ยฟอสฟอรัสใน Matrix sample

- 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 % P_2O_5 เตรียมจาก SRM 194a

2.4. ค่าความเที่ยง (Precision)

ได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเที่ยงแบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) และความเที่ยงแบบทำซ้ำ (Intermediate precision) โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรองปุ๋ยเคมี ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ (1.00 % P_2O_5 เตรียมจาก SRM 194a) กลาง (SRM 694, 30.20 % P_2O_5) สูง (SRM 194a, 61.71 %P_2O_5) และปุ๋ยอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (0.5, 5.0 และ 10.0 %P_2O_5 ตามลำดับ โดยการเติมสารฟอสฟอรัสที่ทราบค่า) ร่วมกับ Matrix sample โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ และคำนวณค่า HorRat จากสูตรในข้อ 7.3.2.3 พบว่า ค่า HorRat ที่ได้น้อยกว่า 2 ของทั้งปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่เติมสารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ (HorRat < 2) (ตารางที่ 5 และตารางภาคผนวกที่ 3 - 6)

ตารางที่ 5 ค่า HorRat ของการวิเคราะห์ความเที่ยงแบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) และความเที่ยงแบบทำซ้ำ (Intermediate precision) ของการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ (โดยการเติมสารละลายฟอสฟอรัสที่ทราบค่า) ที่ระดับต่ำ กลาง สูง ที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม วิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999)

ระดับความเข้มข้น	ปุ๋ยเคมี					
	สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี					
	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)
	HorRat ของ Repeatability precision			HorRat ของ Intermediate precision		

ต่ำ (1.00 %P_2O_5)	0.04	0.03	0.02	0.06	0.10	0.08
กลาง (30.20 %P_2O_5)	0.06	0.06	0.05	0.06	0.07	0.03
สูง (61.71 %P_2O_5)	0.05	0.06	0.06	0.09	0.11	0.15
ระดับความเข้มข้น	ปุ๋ยอินทรีย์					
	สารละลายปรับสี เตรียมตามวิธี					
	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)	พรบ. (2559)	OMAF (1987)	SMWW (1999)
	HorRat ของ Repeatability precision			HorRat ของ Intermediate precision		
ต่ำ (0.5 %P_2O_5)	0.10	0.16	0.08	0.04	0.19	0.08
กลาง (5.0 %P_2O_5)	0.05	0.05	0.06	0.05	0.07	0.06
สูง (10.0 %P_2O_5)	0.08	0.10	0.08	0.03	0.10	0.09

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมี และปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999) โดยเติมลงในสารละลายตัวอย่าง 10, 20 และ 20 ml ตามลำดับ พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) 2) OMAF (1987) และ 3) SMWW (1999) พบว่า

2.1. ช่วงความเป็นเส้นตรง (Range) โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1 – 35 mg/L พบว่า สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี OMAF (1987) และ SMWW (1999) โดยเติมสารละลายปรับสี 20 ml ต่อ 100 ml ของทั้ง 2 ชนิด ให้ค่า r เท่ากับ 0.9996, 0.9995, 0.9990 และ 0.9990 ตามลำดับ แต่สำหรับสารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี พรบ. (2559) และเติมสารละลายลงไป 10 ml ต่อ 100 ml ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1 – 25 mg/L โดยได้ค่า r เท่ากับ 0.9979 และ 0.9982 ตามลำดับ

2.2. พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1 – 12 mg/L พบว่า การใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธี กับปุ๋ยทั้ง 2 ชนิด ให้ค่า r เท่ากับ 1.0000 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ

2.3. ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) พบว่า ปุ๋ยเคมีที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธีกำหนด ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.0174, 0.0084 และ 0.0075 %P_2O_5 ตามลำดับ และปุ๋ยอินทรีย์ ที่ใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามแต่ละวิธีกำหนด ให้ค่า LOD เท่ากับ 0.0063, 0.0048 และ 0.0102 %P_2O_5 ตามลำดับ

2.4. ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ปุ๋ย ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง พบว่า

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

2.4.1. ปุ๋ยเคมี วิเคราะห์วัสดุอ้างอิง ที่ระดับความเข้มข้น 1.00, 30.20 และ 61.71 %P_2O_5 โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 97.43, 99.41 และ 99.65 % ตามลำดับ 2) OMAF (1987) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.13, 100.13 และ 100.13 % ตามลำดับ และ 3) SMWW (1999) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 98.50, 99.85 และ 100.16 % ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

2.4.2. วิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 5.0 และ 10.0 %P_2O_5 โดยการเติมสารฟอสฟอรัสที่ทราบค่า และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 96.69, 100.58 และ 100.74 % ตามลำดับ 2) OMAF (1987) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 100.37, 101.05 และ 101.06 % ตามลำดับ และ 3) SMWW (1999) ได้ค่า % Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 94.83, 100.18 และ 100.53 % ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ ยกเว้น การใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตาม SMWW (1999) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ให้ค่าต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับอยู่ 0.17 %

2.4.3. ค่าความเทียงแบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) ของการวิเคราะห์ปุ๋ย ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

2.4.3.1. ปุ๋ยเคมี วิเคราะห์วัสดุอ้างอิง ที่ระดับความเข้มข้น 1.00, 30.20 และ 61.71 %P_2O_5 โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.04, 0.06 และ 0.05 ตามลำดับ 2) OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.03, 0.06 และ 0.06 ตามลำดับ และ 3) SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.02, 0.05 และ 0.06ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ

2.4.3.2. วิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 5.0 และ 10.0 %P_2O_5 โดยการเติมสารฟอสฟอรัสที่ทราบค่า และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.10, 0.05 และ 0.08 ตามลำดับ 2) OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.16, 0.05 และ 0.10 ตามลำดับ และ 3) SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.08, 0.06 และ 0.08 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ

2.4.3.3. ค่าความเทียงแบบทำซ้ำ (Intermediate precision) ของการวิเคราะห์ปุ๋ย ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

2.4.3.4. ปุ๋ยเคมี วิเคราะห์วัสดุอ้างอิง ที่ระดับความเข้มข้น 1.00, 30.20 และ 61.71 %P_2O_5 โดยใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.06, 0.06 และ 0.09 ตามลำดับ 2) OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.10, 0.07 และ 0.11 ตามลำดับ และ 3) SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.08, 0.03 และ 0.15ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ

2.4.3.5. วิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 5.0 และ 10.0 %P_2O_5 โดยการเติมสารฟอสฟอรัสที่ทราบค่า และใช้สารละลายปรับสีที่เตรียมตามวิธี 1) พรบ. (2559) ได้ค่า HorRat

ศรีวิชาการเกษตร

เท่ากับ 0.04, 0.05 และ 0.03 ตามลำดับ 2) OMAF (1987) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.19, 0.07 และ 0.10 ตามลำดับ และ 3) SMWW (1999) ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.08, 0.06 และ 0.09 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ภายใต้เกณฑ์ยอมรับ

3. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ ประเมินโดยใช้ % Recovery เฉลี่ย พบว่า มีความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ยกเว้นปุ๋ยอินทรีย์ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (0.5%) ได้ค่า % Recovery เท่ากับ 94.83 % ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์ยอมรับอยู่ 0.17 % โดย AOAC (2016) ได้กำหนดไว้ที่ 95 – 105 %

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

Development and validation method of microbial quantity and efficiency for PGPR biofertilizer

อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ จิตรา เกาะแก้ว กัลยกร โปร่งจันทึก

คำสำคัญ (Key words)

การตรวจสอบความใช้ได้ ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

method validation microbial quantity and efficiency PGPR biofertilizer

บทคัดย่อ (Abstract)

ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) และการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี Most Probable Number (MPN) และ Viable plate count เป็นวิธีที่ใช้คัดเลือกจุลินทรีย์อ้างอิงเพื่อใช้ควบคุมคุณภาพปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ โดยคัดเลือกจุลินทรีย์ *Azospirillum brasilense* (DASF04003) และ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) เพื่อนำมาใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการทดลอง ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของเชื้อ *A. brasilense* (DASF04003) พบว่าการทดสอบความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) เท่ากับ 2.79 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบความแม่นของวิธีได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-4} มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.39 และ 103.65 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) และค่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 4.68 และ 1.58 Log_{10}CFU ตามลำดับ และค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.599 ขณะที่และเชื้อ *A. vinelandii* (DASF04141) การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำมี CV เท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ ค่า %Recovery ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 118.55 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LOD และค่า LOQ เท่ากับ 6.36 และ 4.90 Log_{10}CFU ตามลำดับ และค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.421 ขณะที่การทดสอบความเที่ยงแบบ between-analyst variation โดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

กรมวิชาการเกษตร

Acetylene Reduction Assay (ARA), the Most Probable Number (MPN) and Viable Plate Count are the methods for selecting the microbial quantity and efficiency for PGPR biofertilizer. *Azospirillum brasilense* (DASF04003) and *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) were used for method validation. The results revealed that *A. brasilense* (DASF04003) had the repeatability of analytical method was 2.79% of coefficient of variation (CV). The accuracy test at 10^{-1} and 10^{-4} concentrations were 98.39 and 103.65%. The LOD and LOQ of method was 4.68 and 1.58 Log_{10}CFU. In addition, the uncertainty of measurement based on MPN method was 0.599. Furthermore, *A. vinelandii* (DASF04141) showed the repeatability of analytical method was 5.61% of CV. The accuracy test at 1 0 $^{-1}$ concentration was 118.55%. The LOD and LOQ of method was 6.36 and 4.90 Log_{10}CFU. The uncertainty of measurement based on Viable Plate Count method was 0.421. Importantly, the within laboratory reproducibility test by between-analyst variation of both methods were non significance at 95% confidence level.

บทนำ (Introduction)

ปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR) เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีชีวิต ที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบ ๆ ราก ผิวราก ภายในราก บางครั้งพบบริเวณต้นและใบ ส่วนใหญ่มักพบแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวมากถึง 10-100 เท่า บริเวณรอบรากเนื่องจากพืชจะปล่อย exudate หลายชนิด เช่น กรดอะมิโน (amino acid) และน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยเป็นแหล่งอาหารและพลังงานของแบคทีเรีย (Gray and Smith, 2005) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ 2 ทาง คือ การตรึงไนโตรเจน ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นมีผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Boddey *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004 and Jacoud *et al*. 1999) หรือการสร้างปฏิชีวนสาร (antagonistic substance) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Glick, 1995) และยังช่วยให้อนุภาคดินจับกันเป็นเม็ดดินที่สมบูรณ์ จึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และลดการศักยภาพการพังทลายของดิน

ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เป็นปุ๋ยชีวภาพชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีความสามารถหลายด้านอยู่ในผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพเดียวกัน จุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสามารถ ตรึงไนโตรเจน ผลิตสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ละลายฟอสเฟต รวมทั้งสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ ทำให้เกิดโรคบางชนิดได้ อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจนับปริมาณ มักใช้อาหารจำเพาะในการนับ ตามสกุลจุลินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบ วิธีการที่นิยมใช้นับจำนวนจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มี 2 วิธี คือ 1) วิธีนับจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (Viable Plate Count) ซึ่งใช้นับแบคทีเรียในกลุ่ม aerobic และ 2) วิธีการนับแบบ MPN (Most Probable Number) ใช้กับแบคทีเรียในกลุ่ม micro aerophilic (กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา. 2551) เกณฑ์ที่กำหนดใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 นั้น ปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยชีวภาพต้องมีไม่ต่ำกว่า 1×10^6 โคโลนี/เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

จุลินทรีย์กลุ่ม aerobic คือ จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต เพื่อการหายใจ (respiration) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ในภาวะที่มีอากาศ หรือมีออกซิเจนเท่านั้น (obligate aerobe) มักพบเจริญบริเวณผิวหน้าของอาหาร เช่น *Azotobacter, Beijerinnckia* และ *Burkholderia* เป็นต้น *Azotobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปท่อนขนาดใหญ่ บางชนิดรูปร่างเซลล์คล้ายผลแพร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-4 µm เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลล่า (flagella) พบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออาจอยู่รวมเป็นกลุ่มหรือต่อกันเป็นสาย สร้างเมือก (mucus) และแคปซูล (capsule) บางชนิดสร้างเม็ดสี (pigment) เช่น สีเขียวอมเหลือง สีม่วง หรือสีน้ำตาลเข้ม (Jensen, 1954; Holt *et al.* 1994) สามารถพบได้ทั่วไปในดิน ดินเค็ม น้ำและพืช มีรายงานการนำเชื้อ *Azotobacter* ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น วัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) โพลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) และที่สำคัญการนำมาใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพ (biofertilizer) (Then *et al*. 2012 and Wani *et al*. 2016)

จุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophilic คือ จุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำประมาณ 2-10 เปอร์เซ็นต์ (<21 เปอร์เซ็นต์) จึงต้องการออกซิเจนเพื่อการอยู่รอดเท่านั้น เช่น *Azospirillum, Gluconacetobacter* เป็นต้น *Azospirillum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบได้ทั่วไปในดินบริเวณรอบรากพืช สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ดีเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน ผลิต proteolytic enzyme ผลิตฮอร์โมนพืช (auxins cytokinins และ gibberellines) และสร้าง cyst ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Hartmann and Zimmer, 1994) มีรายงาน *Azospirillum* จำนวน 5 ชนิดที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ *Azospirillum lipoferum, A. rasilens, A. amazonense, A. halopraeferens* และ *A. irakense* (Tarrand *et al*. 1978; Magalhães *et al*. 1983; Reinhold *et al*. 1987 and Khammas *et al*. 1989)

ปัจจุบันเอกชนมีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อจำหน่ายกันอย่างแพร่หลาย ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพื่อการค้านั้น มีการควบคุมคุณภาพโดยต้องขอขึ้นทะเบียนปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ซึ่งได้กำหนดมาตรฐานปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์จะต้องมีจุลินทรีย์อย่างน้อย 1×10^6 หรือ 1 ล้านโคโลนี/เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ทั้งนี้การตรวจนับปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพด้วยวิธีข้างต้นยังไม่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล ทำให้ขาดข้อมูลที่ใช้ยืนยันความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ และจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล และคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ เพื่อรองรับการขึ้นทะเบียนปุ๋ยชีวภาพพีจีพี

กรมวิชาการเกษตร

อาร์ ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และเตรียมข้อมูลเพื่อขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

วัดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี Acetylene Reduction Assay (ARA) ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 20 สายพันธุ์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารกึ่งเหลว NFb และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนจุกหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแบบพลาสติกให้เป็นจุกยางสำหรับเก็บแก๊ส ทำการอัดแก๊สอะเซทิลีนลงไปในส่วนปริมาตรเหนืออาหาร 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หลังจากนั้นทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการดูดแก๊สจากหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไอโซเลทละ 3 ซ้ำ ทำการศึกษาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay (ARA) ตามวิธีการของ Hardy *et al*. (1973) แล้วนำตัวอย่างแก๊สที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณเอทิลีนด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) คำนวณหาปริมาณแก๊สเอทิลีน โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของเอทิลีนมาตรฐานจากสูตรดังนี้

อัตราการตรึงไนโตรเจน = $(10^3 \times B \times V)/(250 \times Std. \times A \times 22.4)$

B = พื้นที่ใต้กราฟของพืชตัวอย่าง

V = ปริมาตรของขวดกรวยแก้วที่ใช้เก็บตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Std. = พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแก๊สอะเซทิลีนมาตรฐาน

A = เวลาที่ใช้ในการรีดิวซ์แก๊สอะเซทิลีน (ชั่วโมง)

10^3 = เปลี่ยนหน่วยจากมิลลิโมลเป็นไมโครโมล (µmol)

250 = ปริมาตรของภาชนะบรรจุแก๊สมาตรฐาน

22.4 = ปริมาณของแก๊ส 1 โมล ที่ STP

อัตราการตรึงไนโตรเจน มีหน่วยเป็นไมโครโมลของเอทิลีน (C_2H_4) ต่อหลอดต่อชั่วโมง เมื่อใช้เอทิลีนมาตรฐานที่ทราบปริมาตรที่แน่นอน (250 มิลลิลิตร) นำข้อมูลอัตราการตรึงไนโตรเจนของเชื้อแต่ละไอโซเลทมาเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนดีที่สุดและสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพ

2.1 นำหลอดเก็บตัวอย่างเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ มาทำการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

2.3 ใช้ลูป (loop) แตะโคโลนีเชื้อประมาณ 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 150-180 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-5 วัน

กรมวิชาการเกษตร

2.4 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 150-180 รอบ/นาที เป็นเวลา 3-5 วัน จะได้หัวเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณอย่างน้อย 1.0×10^5 ถึง 1.0×10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร

2.5 ชั่งวัสดุพา (พีทมอส) ถุงละ 100 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยวิธีการเดิม

2.6 นำวัสดุพาที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับหัวเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยการใช้กระบอกฉีดยาฉีดหัวเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปในถุงวัสดุพา จากนั้นใช้ผสมวัสดุพาและหัวเชื้อเข้ากันดี จะได้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

3. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ

3.1 จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

3.1.1 วิธี Most Probable Number (MPN)

3.1.1.1 เตรียมอาหาร LGI แบบกึ่งเหลว แบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.1.2 ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามลำดับ ตั้งแต่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-7}

3.1.1.3 ดูดตัวอย่างปุ๋ยที่ทำการเจือจางแล้วระดับความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดใส่ในหลอดอาหาร LGI กึ่งเหลว ความเจือจางละ 5 หลอด

3.1.1.4 บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน

3.1.1.5 คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตามสูตร

CFU/1 กรัม = ค่าจากตาราง MPN x 10 x dilution factor

3.1.2 วิธี drop plate

3.1.2.1 เตรียมอาหาร LGI แบบวุ้นแข็ง ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้อาหารแข็งตัวอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

3.1.2.2 ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามลำดับ ตั้งแต่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-7}

3.1.2.3 หยดตัวอย่างที่ระดับการเจือจาง จำนวน 3 จุดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 6 ซ้ำ โดยแต่ละจุดใช้ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานอาหาร ประมาณ

ศรีวิชัยการเกษตร

15-30 นาที นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตามสูตร

CFU/1 กรัม = จำนวนโคโลนีเฉลี่ย x 5 x dilution factor

3.2 จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

3.2.1 วิธี Viable plate count

3.2.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อไว้อย่างน้อย 4 ชั่วโมง

3.2.1.2 ทำการเจือจางตัวอย่างปุ๋ยโดยชั่งตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 10 กรัม ใส่ในขวดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วเจือจางตามลำดับ ตั้งแต่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-8}

3.2.1.3 ดูดตัวอย่างปุ๋ยที่เจือจางแล้วแต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร หยดบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นเกลี่ยให้กระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม (glass spreader) ความเจือจางละ 3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซ้ำ)

3.2.1.4 บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่สารละลายตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้งหมดในตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

4.1 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

4.1.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

ทดสอบหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนเดียว นำข้อมูลจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ได้ในหน่วยเซลล์หรือโคโลนีต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพจากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้งสองคนมาเปลี่ยนค่าให้อยู่ในรูป Log_{10}CFU คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่า 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์

4.1.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

ทดสอบหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 21 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน คำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ค่าเฉลี่ย และ %CV โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่า 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์ และเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ที่วัดได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยทดสอบทางสถิติด้วย Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2 การทดสอบความแม่น (Accuracy)

กรมวิชาการเกษตร

นำตัวอย่างปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่เตรียมจากเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์บริสุทธิ์อ้างอิง จำนวน 10 กรัม มาทำการเจือจางลำดับส่วน 10 เท่า (10 fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-8} แล้วทำการหาจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพจากการทดสอบ 3 วิธี ดังนี้

4.2.1 จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

วิธี Most Probable Number (MPN) โดยทำการดูดสารละลายที่ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} (สูง) 10^{-4} (กลาง) 10^{-6} (ต่ำ) ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร หยดใส่ในหลอดอาหาร LGI กึ่งเหลว ความเจือจางละ 5 หลอด จำนวน 6 ซ้ำ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

วิธี drop plate โดยทำการดูดสารละลายที่ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} (สูง) 10^{-4} (กลาง) 10^{-6} (ต่ำ) ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 3 จุด/จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 6 ซ้ำ บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

4.2.2 จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

วิธี Viable plate count โดยทำการดูดสารละลายที่ความเข้มข้นระดับ 10^{-1} (สูง) 10^{-2} (กลาง) 10^{-3} (ต่ำ) ความเข้มข้นละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำไปเกลี่ย (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแข็ง บ่มในตู้บ่มเชื้อ และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) โดยมีค่า 80-120 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

4.3 การหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ (Uncertainty) ทางจุลชีววิทยา

4.3.1 การนับปริมาณจุลินทรีย์

4.3.1.1 ชั่งตัวอย่าง 10±0.1 กรัม อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

4.3.1.2 ตัวอย่างชุดที่1 (Yj1) ให้ผู้ทดสอบคนที่ 1 เป็นผู้ทดสอบ และตัวอย่าง (Yj2) ให้ผู้ทดสอบคนที่ 2 เป็นผู้ทดสอบ

4.31.3 ทำการทดสอบตัวอย่างเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์

4.3.1.4 แปลงข้อมูลที่ได้จากผู้ทดสอบแต่ละคนให้อยู่ในรูป $Log_{10}CFU$

4.3.1.5 นำมาคำนวณตามสูตร

การหาค่า Standard deviation of reproducibility

$$S_R = \sqrt{\frac{1}{2n}\sum_{i=1}^{n}(Yj1 - Yj2)^2}$$

โดยที่

S_R = Standard deviation of reproducibility

$(Y_j1 - Y_j2)$ = ผลต่างของผลการทดสอบจากผู้ทดสอบแต่ละคนในรูป $Log_{10}CFU$

n = จำนวนตัวอย่าง

i = ลำดับที่ของตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

4.3.2 การคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Expanded Uncertainty)

$$U_{95\%} = 2\sqrt{S_R^2 + \frac{0.18861}{\sum C}}$$

โดยที่

$U_{95\%}$ = ค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Expanded Uncertainty)

S_R = Standard deviation of reproducibility ที่ได้จากคำนวณ

$\sum C$ = ผลรวมของจำนวนจุลินทรีย์ทุกซ้ำของการทดสอบ

$\frac{0.18861}{\sum C}$ = Variance component due to Poisson distribution

เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. การวัดประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic สกุล *Azospirillum* จำนวน 10 สายพันธุ์ มีค่าการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 23.89 - 90.30 นาโนโมลเอทิลีน/ชั่วโมง/หลอด สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 3 อันดับแรก คือ AP1, DASF04175 และ DASF04178 โดยมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 90.30 68.89 และ 65.23 นาโนโมลเอทิลีน/ชั่วโมง/หลอด (ตารางที่ 1) ส่วนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic สกุล *Azotobacter* จำนวน 10 สายพันธุ์ มีค่าการตรึงไนโตรเจนอยู่ในช่วง 3.65 - 30 นาโนโมลเอทิลีน/ชั่วโมง/หลอด สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 3 อันดับแรก คือ DASF04141, AT4 และ DASF04127 โดยมีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเท่ากับ 30 9.14 และ 8.73 นาโนโมลเอทิลีน/ชั่วโมง/หลอด (ตารางที่ 1) ทั้งนี้บางสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูง แต่มีการเจริญเติบโตช้า จึงคัดเลือกสายพันธุ์ DASF04003 และ DASF04141 เพื่อใช้เป็นเชื้ออ้างอิงที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการวิธีวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ มีรายงานการศึกษาปริมาณการตรึงไนโตรเจนของเชื้อ *Azotobacter* จำนวน 16 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่า มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน 0.48 – 0.99 มิลลิกรัม/ชั่วโมง (อรุณี, 2556) ในทางเดียวกัน อาภากร (2553) รายงานการใช้เชื้อ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ผลิตเป็นหัวเชื้อปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ในนาข้าว พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในช่วง 0.05 – 9.74 นาโนโมลเอทิลีน/วัน/10^8 CFU นอกจากนี้แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชยังผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid ช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นมีผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Boddey *et al.*, 1995; Meunchang *et al.*, 2004 and Jacoud *et al*. 1999) หรือการสร้าง

กรมวิชาการเกษตร

ปฏิชีวนสาร (antagonistic substance) เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช (Glick, 1995) และยังช่วยให้อนุภาคดินจับกันเป็นเม็ดดินที่สมบูรณ์ จึงช่วยปรับปรุงโครงสร้างของดิน และลดการศักยภาพการพังทลายของดิน

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์

ลำดับ	สายพันธุ์จุลินทรีย์*	ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน (นาโนโมลเอทิลีน/ชั่วโมง/หลอด)**
1	DASF04003	65.0
2	DASF04005	60.90
3	DASF04008	23.89
4	PGPR16/63	41.22
5	AP1	90.30
6	DASF04175	68.89
7	DASF04176	55.67
8	DASF04177	43.11
9	DASF04178	65.23
10	PGPR189/62	36.10
11	DASF04141	30.0
12	DASF04126	3.65
13	DASF04127	8.73
14	AT1	7.95
15	AT2	5.78
16	AT4	9.14
17	AT9	5.86
18	AT10	6.02
19	AT32	7.53
20	AT38	7.78

หมายเหตุ: *DASF04003, DASF04005, DASF04008 และ DASF04141 เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
**ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจาก 3 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

2.1 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

2.1.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria มีค่าความสามารถในการทำซ้ำของการทดสอบ พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพเฉลี่ยเท่ากับ 8.68 Log_{10}CFU มีค่า %CV เท่ากับ 2.79 (ตารางที่ 2) ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria ความสามารถในการทำซ้ำของ

การทดสอบ พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ในหน่วย CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.58 Log_{10}CFU มีค่า %CV เท่ากับ 5.61 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การทดสอบความเที่ยงของปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria และ aerobic bacteria ในหน่วย CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ

ครั้งที่	ตัวอย่าง micro aerobic bacteria (Log_{10}CFU/g)	ตัวอย่าง aerobic bacteria (Log_{10}CFU/g)
1	8.54	4.78
2	8.54	4.67
3	8.96	4.29
เฉลี่ย	8.68	4.58
%CV	2.79	5.61

หมายเหตุ : * ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจาก 3 ซ้ำ

2.1.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between - analyst variation)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

ทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 21 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.37 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 7.10 สำหรับเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.66 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 7.06 (ตารางที่ 3) และเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ที่นับได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95% ได้ค่าเท่ากับ 0.39

ตารางที่ 3 ความเที่ยงของวิธีทดสอบปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน

จำนวนซ้ำที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ (Log_{10}CFU/g)	
	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2
1	8.96	7.53
2	7.75	7.69
3	8.73	6.51
4	7.67	7.45
5	8.23	6.67
6	8.25	7.60
7	8.96	7.32
8	8.78	8.23
9	8.34	7.69
10	9.38	7.75

กรมวิทยาศาสตร์

11	8.54	8.73
12	8.78	8.54
13	8.54	7.84
14	7.54	8.54
15	7.30	7.67
16	8.54	7.32
17	7.75	7.68
18	9.20	7.34
19	7.6	7.75
20	8.96	7.67
21	8.15	7.38
ค่าเฉลี่ย	8.37	7.66
%CV	7.10	7.06
t-test* (Sig. 2-tailed)	0.39	

หมายเหตุ: *Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

ทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 21 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.52 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 6.71 สำหรับเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.53 Log_{10}CFU และมี %CV เท่ากับ 7.75 (ตารางที่ 4) และเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ ที่นับได้จากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95% ได้ค่าเท่ากับ 0.87

ตารางที่ 4 ความเที่ยงของวิธีทดสอบปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน

จำนวนซ้ำที่	ปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria ในหน่วย CFU ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ (Log_{10}CFU/g)	
	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2
1	4.24	4.08
2	4.78	4.08
3	4.66	4.26
4	4.15	4.46
5	3.78	3.95
6	4.69	4.34
7	4.20	4.18

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

8	4.59	4.18
9	4.11	4.15
10	4.66	4.89
11	4.52	4.52
12	4.68	4.71
13	4.66	4.83
14	4.36	4.65
15	4.26	4.89
16	4.78	4.75
17	4.6	4.58
18	4.72	4.9
19	5.10	5.14
20	4.75	4.64
21	4.70	5.04
ค่าเฉลี่ย	4.52	4.53
%CV	6.72	7.75
t-test* (Sig. 2-tailed)	0.87	

หมายเหตุ: *Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

กรมวิชาการเกษตร

2.2 การทดสอบความแม่น (Accuracy)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

Relative Accuracy (AC) คือ ระดับของความตรงกันระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ได้จากวิธีทดสอบ Most probable number (MPN) เมื่อเทียบกับวิธี Drop Plate ผลการทดสอบพบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของวิธีทดสอบปริมาณเชื้อ *Azospirillum brasilense* (DASF04003) ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} (ระดับสูง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 7.40 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.39% (ตารางที่ 5) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} (ระดับกลาง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 4.68 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 103.65% (ตารางที่ 6) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} (ระดับต่ำ) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 1.58 Log_{10}CFU (ตารางที่ 7) โดยมีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 193.09%

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อพีจีพีอาร์กลุ่ม micro aerophillic bacteria ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} จากการทดสอบความแม่นของวิธี

ตัวอย่างที่	วิธี MPN (Log_{10}CFU/g)	วิธี Drop plate (Log_{10}CFU/g)	%Recovery
1	7.73	7.52	102.79
2	7.34		97.61
3	7.45		99.10
4	7.11		94.55
5	7.38		98.14
6	7.38		98.14
ค่าเฉลี่ย	**7.40**		**98.39**

ตารางที่ 6 จำนวนเชื้อพีจีพีอาร์กลุ่ม micro aerophillic bacteria ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} จากการทดสอบความแม่นของวิธี

ตัวอย่างที่	วิธี MPN (Log_{10}MPN)	วิธี Drop plate (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	4.86	4.52	107.52
2	4.52		100
3	4.90		108.41
4	4.90		108.41
5	4.52		100
6	4.41		97.57
ค่าเฉลี่ย	**4.68**		**103.65**

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อพีจีพีอาร์กลุ่ม micro aerophillic bacteria ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} จากการทดสอบความแม่นของวิธี

ตัวอย่างที่	วิธี MPN (Log_{10}MPN)	วิธี Drop plate (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	1.65	0.82	201.22
2	1.65		202.22
3	1.60		195.12
4	1.65		201.22
5	1.30		158.54
6	1.65		201.22
ค่าเฉลี่ย	**1.58**		**193.09**

จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

Relative Accuracy (AC) คือ ระดับของความตรงกันระหว่างปริมาณเชื้อพีจีพีอาร์กลุ่ม aerophillic bacteria เชื้อ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพที่ได้จากปุ๋ยชีวภาพแบบผงและเหลว โดยนับปริมาณด้วยวิธี Viable Plate Count ผลการทดสอบพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} (ระดับสูง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 6.36 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 118.55% (ตารางที่ 8) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} (ระดับกลาง) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 5.35 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 131.25% (ตารางที่ 9) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} (ระดับต่ำ) มีปริมาณจุลินทรีย์เฉลี่ยเท่ากับ 4.90 Log_{10}CFU (ตารางที่ 10) มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 168.52% ทั้งนี้ปริมาณเชื้อในระยะแรกที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากที่นำหัวเชื้อแบบเหลวผสมกับวัสดุพา (carrier) อาจเนื่องจากพื้นที่ในการเจริญเติบโต ปริมาณออกซิเจน และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ติดไปกับหัวเชื้อแบบเหลว สอดคล้องกับการศึกษาของ Abd El-Fattah (2013) ที่รายงานว่าการใช้ดินเหนียว พีทมอสแกลบ รำข้าวสาลี และพีทมอสผสมเวอร์มิคูไลท์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์จากเชื้อ *Azotobacter chroococcum* ทำให้ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นในระยะแรก และจะลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1-2 เดือน นอกจากนี้ กัลยกรและคณะ (2556) รายงานว่า การใช้วัสดุพาที่นึ่งฆ่าในการผลิตปุ๋ยชีวภาพทำให้ปริมาณจุลินทรีย์มีค่าสูงกว่าการใช้วัสดุพาที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ในปุ๋ยชีวภาพแบบผงและเหลว ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} โดยนับปริมาณด้วยวิธี plate count

ตัวอย่างที่	ชีวภาพแบบผง (Log_{10}CFU)	ชีวภาพแบบเหลว (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	6.31	5.37	117.58
2	6.42		119.54
3	6.44		120.02
4	6.42		119.54

ตัวอย่างที่	ชีวภาพแบบผง (Log_{10}CFU)	ชีวภาพแบบเหลว (Log_{10}CFU)	%Recovery
5	6.40		119.28
6	6.19		115.34
ค่าเฉลี่ย	**6.36**		**118.55**

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 9 จำนวนเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ในปุ๋ยชีวภาพแบบผงและเหลว ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2} โดยนับปริมาณด้วยวิธี plate count

ตัวอย่างที่	ชีวภาพแบบผง (Log_{10}CFU)	ชีวภาพแบบเหลว (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	5.30		130.14
2	5.26		129.14
3	5.40		132.58
4	5.12	4.07	127.37
5	5.50		135.08
6	5.42		133.19
ค่าเฉลี่ย	**5.35**		**131.25**

ตารางที่ 10 จำนวนเชื้อ *Azotobacter vinelandii* (DASF04141) ในปุ๋ยชีวภาพแบบผงและเหลว ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} โดยนับปริมาณด้วยวิธี plate count

ตัวอย่างที่	ชีวภาพแบบผง (Log_{10}CFU)	ชีวภาพแบบเหลว (Log_{10}CFU)	%Recovery
1	4.90		168.79
2	4.89		168.38
3	4.85		166.93
4	4.94	2.91	170.06
5	4.89		168.34
6	4.90		168.62
ค่าเฉลี่ย	**4.90**		**168.52**

2.3 การประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection: LOD) และการประมาณค่าต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantization: LOQ)

จุลินทรีย์ในกลุ่ม micro aerobic bacteria

ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Azospirillum brasilense* ต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ด้วยวิธีทดสอบปริมาณในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-4} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.68 Log_{10}MPN มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 103.65 ส่วนจำนวน *A. brasilense* ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่สามารถตรวจได้ในระดับต่ำที่สุด แต่ยังไม่ถือว่ามีความถูกต้อง (Critical Level: LC) อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.58 Log_{10}MPN มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 193.09 เนื่องจากมีค่า %Recovery เฉลี่ยเกิน 120 ดังนั้นจำนวน *A. brasilense* ต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 4.68 Log_{10}MPN

จุลินทรีย์ในกลุ่ม aerobic bacteria

กรมวิชาการเกษตร

ระดับความเข้มข้นของเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ด้วยวิธีทดสอบปริมาณในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.36 Log_{10}CFU มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 118.55 ส่วนจำนวน *A. vinelandii* ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ที่สามารถตรวจได้ในระดับต่ำที่สุด แต่ยังไม่ถือว่ามีความถูกต้อง (Critical Level: LC) อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} หรือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.90 Log_{10}CFU เนื่องจากมีค่า %Recovery เฉลี่ยเกิน 120 ดังนั้นจำนวน *A. vinelandii* ต่ำที่สุดที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 6.36 Log_{10}CFU

2.4 การหาค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ (Uncertainty) ทางจุลชีววิทยา

การทดสอบตัวอย่างเชื้อ *Azospirillum brasilense* ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 21 ตัวอย่าง (n = 21) ตัวอย่างละ 2 ชุด ให้เจ้าหน้าวิเคราะห์ 2 ค่าผลต่างของผลการทดสอบจากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์แต่ละคนในรูป Log_{10}CFU ยกกำลังสอง $\sum_{i=1}^{n}(Yj1 - Yj2)^2$ เท่ากับ 3.73 ทำให้ได้ค่า Standard deviation of reproducibility (S_R) เท่ากับ 0.298 เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Expanded Uncertainty) จะได้ค่าเท่ากับ 0.599 ขณะที่การทดสอบเชื้อ *Azotobacter vinelandii* ค่าผลต่างของผลการทดสอบจากเจ้าหน้าที่วิเคราะห์แต่ละคนในรูป Log_{10}CFU ยกกำลังสอง $\sum_{i=1}^{n}(Yj1 - Yj2)^2$ เท่ากับ 1.82 ทำให้ได้ค่า S_R เท่ากับ 0.208 เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบได้ค่าเท่ากับ 0.421

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic สกุล *Azospirillum* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 3 อันดับแรก คือ AP1, DASF04175 และ DASF04178 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic สกุล *Azotobacter* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 3 อันดับแรก คือ DASF04141, AT4 และ DASF04127 การทดสอบความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) ของเชื้อ *Azospirillum brasilense* เท่ากับ 2.79 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบความแม่นของวิธีได้ค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-4} มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 98.39% และ 103.65% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOD) และค่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดเชิงปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 4.68 และ 1.58 Log_{10}MPN ตามลำดับ และการทดสอบความเที่ยงแบบ between-analyst variation โดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.39 โดยค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.599 และเชื้อ *Azotobacter vinelandii* การทดสอบความสามารถในการทำซ้ำมี CV เท่ากับ 5.61 เปอร์เซ็นต์ ค่า %Recovery ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} มีค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 118.55% มีค่า LOD และค่า LOQ เท่ากับ 6.36 และ 4.90 Log_{10}MPN ตามลำดับ และการทดสอบความเที่ยงแบบ between-analyst variation มีค่า *P* เท่ากับ 0.87 โดยค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบเท่ากับ 0.421

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

กรมวิชาการเกษตร

The validation of bacterial classification method in PGPR biofertilizer

อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ กัลยกร โปร่งจันทึก

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี การจัดจำแนกจุลินทรีย์ ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

Method validation bacterial classification PGPR biofertilizer

บทคัดย่อ (Abstract)

การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของแบคทีเรียอ้างอิงที่ใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จำนวน 2 สกุล ได้แก่ *Azospirillum* (DASF04003 และ DASF04008) และ *Azotobacter* (DASF04141) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอมาหาลำดับเบส จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Azospirillum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จัดอยู่ในกลุ่มของ *Azospirillum brasilense* โดยมีค่า Bootstrap 85-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบพบว่า ค่าความถูกต้องของวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เท่ากับ 98 – 99 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เครื่อง MALDI-TOF MS มีค่า score value เท่ากับ 2.33 – 2.39 ความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) เท่ากับ 4.94 และ 4.77 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intermediate precision จากการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน มีค่า CV เท่ากับ 2.28 และ 2.31 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.481 ขณะที่ *Azotobacter* จัดอยู่ในกลุ่มของ *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* โดยมีค่า Bootstrap 85-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบพบว่า ค่าความถูกต้องของวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เท่ากับ 98 – 99 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เครื่อง MALDI-TOF MS มีค่า score value เท่ากับ 2.55 2.45 และ 2.45 ความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV) เท่ากับ 1.14 3.95 และ 3.23 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intermediate precision จากการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน มีค่า CV เท่ากับ 2.55 และ 2.51 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.127 แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นวิธีทดสอบการจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยการใช้เครื่อง MALDI-TOF MS จึงมีความเที่ยง และมีความเหมาะสม และให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้

The identification of *Azospirillum* (DASF04003 and DASF04008) and *Azotobacter* (DASF04141) that were bacterial reference strains for plant growth promoting bacteria (PGPR) biofertilizer production. The 16S rRNA gene fragment were amplified by using universal primers. Then bacterial DNAs were sequenced and compared with other bacterial strains in NCBI database. The results showed that *Azospirillum* strains were grouped in *Azospirillum brasilense.* Whereas, *Azotobacter* strains were grouped in

กรมวิชาการเกษตร

Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii and *Azotobacter salinestris* with 8 5 - 100% bootstrap support. The validation of bacterial classification method found that the Trueness of % similarity from molecular identification method of *Azospirillum brasilense* was 98 - 99% and score value of MALDI-TOF MS was 2.33 – 2.39. The Repeatability of analytical method of MALDI-TOF MS that shown Coefficient of Variation (%CV) value were 4.94 and 4.77. The Intermediate precision was 2.28 and 2 .31 at 95% confidence level (*P* = 0.481). Moreover, Trueness of % similarity from molecular identification method of *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* and *Azotobacter salinestris* were 98 – 99% and score value of MALDI-TOF MS was 2.55 2.45 and 2.45 respectively. The Repeatability of analytical method of MALDI-TOF MS that shown %CV were 1.14 3.95 and 3.23. The Intermediate precision was 2 .55 and 2 .51 at 95% confidence level (*P* = 0 .127). Thus, MALDI-TOF MS has Precision of the method and suitable for use according the standard of validation of analytical method

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ (Introduction)

Azospirillum และ *Azotobacter* เป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ลำต้น และใบ ของพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระ (free-living diazotrophs) เพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช สร้างสารซิเดอโรฟอร์ (siderophores) ซึ่งมีสมบัติเพิ่มการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์พืช โดยการแย่งจับธาตุเหล็กบริเวณรอบรากพืช นอกจากนี้ยังสามารถสร้างฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น ฮอร์โมนกลุ่มออกซิน (auxins) ซึ่งกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ สร้างเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และลามินาริเนส (laminarinase) ย่อยเส้นใยเชื้อราโรคพืช (antagonistic) สร้างสารปฏิชีวนะ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เป็นต้น (หนึ่ง, 2548; ธงชัย, 2550; Glick *et al*., 1999; Choudhury and Kennedy, 2004)

ในปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อจำหน่าย จึงต้องมีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพเพื่อขอขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เพื่อควบคุม กำกับ คุณภาพของปุ๋ยชีวภาพ โดยปริมาณจุลินทรีย์ขั้นต่ำ 1.0×10^6 เซลล์ต่อกรัมปุ๋ยชีวภาพ และต้องจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ (scientific name) ของจุลินทรีย์ในระดับสกุล (genus) ด้วย

การจัดจำแนกจุลินทรีย์เป็นขั้นตอนพื้นฐานในการศึกษาเพื่อให้รู้ถึงชื่อทางวิทยาศาสตร์ ก่อนการศึกษาในเชิงลึกเนื่องจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติมีทั้งประโยชน์และโทษ การจำแนกในปัจจุบันอาศัยรากฐานจากระบบการจำแนกของคาโรลัส ลินเนียส (Carolus Linnaeus) นักพฤกษศาสตร์ชาวสวีเดนเมื่อประมาณ 300 ปี เป็นผู้จัดกลุ่มต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตโดยดูจากลักษณะเฉพาะทางกายภาพ (morphological characteristics) ซึ่งการจัดกลุ่มแบบดังกล่าวได้มีการศึกษารายละเอียดที่จำเพาะเพิ่มมากขึ้น และมีการปรับปรุงให้ทันสมัยอยู่เสมอเพื่อเป็นพื้นฐานของการศึกษาด้านจุลินทรีย์ ทั้งนี้ในปัจจุบันการจัดจำแนกจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มหลัก ๆ ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) หมายถึง การศึกษาทางด้านกายภาพที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เช่น ลักษณะโคโลนี สี กลิ่น อาหารสูตรจำเพาะ หรือลักษณะที่มองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น สปอร์ รูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัว การสร้างแคปซูล และการติดสีแกรม (gram staining) เป็นต้น (Christopher and Bruno, 2003; Tshikhudo *et al*., 2013)

2. การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical testing) หมายถึง การทดสอบเอนไซม์ที่แบคทีเรียใช้ย่อยสลายสารอาหารและสังเคราะห์ชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ผลิตผลที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายอาหารและชีวโมเลกุลที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นจึงไม่เหมือนกันด้วย ดังนั้นจึงใช้ทดสอบกับปฏิกิริยาที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันด้วย เช่น pH indicator, Enzyme production หรือ Chromogenic media (Váradi *et al*., 2017)

3. การศึกษาทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) หมายถึง เป็นการศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้าง และการทำงานของหน่วยพันธุกรรมในระดับโมเลกุล ซึ่งรวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์

ศรีวิชาการเกษตร

ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนโดยเทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย เช่น Polymerase chain reaction (PCR), Gel electrophoresis, Southern blotting and Northern blotting, Western blotting, DNA microarrays, Whole genome sequencing หรือ Multi-omics approaches เป็นต้น (Wilson and Walker, 2010)

4. แมสสเปคโตรเมทรี (Mass Spectrometry) หมายถึง การวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาค ส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่างหรือในโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล เช่น เปปไทด์ (peptide) และสารประกอบทางเคมีอื่น ๆ โดยการทำงานคือทำให้สารประกอบเคมีกลายเป็นประจุ (ionize) เพื่อสร้างโมเลกุลที่มีประจุและวัดสัดส่วนมวลต่อประจุของสาร (Sparkman, 2000)

การจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่นิยมมี 2 วิธี ดังนี้

1. การศึกษาทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคพีซีอาร์ หมายถึง ปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิดใดชนิดหนึ่งในบริเวณยีนที่ต้องการได้ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ ด้วยเครื่อง thermocycler จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า โดยหลักการเพิ่มปริมาณของ DNA ช่วงใดช่วงหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างส่วนของดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่ทราบลำดับเบสแล้ว เรียกว่า ไพร์เมอร์ (primer) และเรียกต้นแบบดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณว่า DNA template ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ Denaturating, Annealing และ Extension และดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษ (Ethidium bromide, SYBR green, Gelstar, Gelred และ Gelgreen) ซึ่งจะเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต โดยจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (อำไพวรรณ และธันยชัย, 2534)

2. การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเครื่องมัลดิทอฟ (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization: MALDI) โดยใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรี (Mass Spectrometry) เป็นเครื่องมือวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร ซึ่งเป็นการตรึงโปรตีน (ribosomal protein) หรือเปปไทด์ (peptide) กับผลึกของ matrix (crystalline matrix) และยิงแสงเลเซอร์ลงบนตัวอย่างโปรตีนให้เกิดการแตกตัวเป็นไอออนแล้วเคลื่อนที่ไปตามท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้าเพื่อแยกโมเลกุลของสาร โดยสารที่มวลโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลมาก และตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกว่า time-of-flight (TOF) มีความสามารถในการแยก (resolution) โดยตรวจสอบจากการวัดเปปไทด์ มีซอฟต์แวร์ที่ใช้ในการควบคุมการทำงานของเครื่องและประมวลผลจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ (Identification and Classification for microorganism) มี

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Reference Library หรือ In-house Library ของ peptide mass fingerprint (PMF) ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากตัวอย่าง (Hosseini and Martinez-Chapa, 2017)

นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 มีงานวิจัยการใช้เครื่องมัลดิทอฟในการจำแนกชนิดจุลินทรีย์จำนวนมาก โดยส่วนใหญ่ประยุกต์ใช้งานทางด้านการแพทย์ และอุตสาหกรรม จากการรายงานของ Váradi *et al*. (2017) สามารถจำแนกแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*, *Burkholderia multivorans*, *B. cenocepacia* และ *B. contaminans* ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุโรคของคนได้อย่างรวดเร็ว มีการศึกษาการการดื้อยาปฏิชีวนะ (antibacterial resistance) ของเชื้อแบคทีเรียโดยการศึกษาเอนไซม์ β-lactamase ต่อยากลุ่ม β-lactams (penicillins, cephalosporins, monobactams และ carbapenems) เป็นยากลุ่มใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางและมีบทบาทมากในการช่วยชีวิตมนุษย์ ซึ่งเครื่องมัลดิทอฟสามารถแยกเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* สายพันธุ์ที่ต้านทานยากลุ่ม β-lactams ได้อย่างชัดเจน (Hrabák, *et al*., 2011) ในทางอุตสาหกรรมอาหาร Elbehiry *et al*. (2017) สำรวจอาหารจากร้านอาหารในประเทศซาอุดิอาระเบียจำนวน 80 ตัวอย่าง โดยแยกเชื้อบนอาหารสูตรจำเพาะ (selective media) และใช้เทคนิคมัลดิทอฟจำแนกแบคทีเรียได้ 69 ไอโซเลท และจำแนกราได้ 32 ไอโซเลท นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ทางด้านการเกษตรโดยทดสอบศักยภาพของวิธีเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในวงศ์ Rhizobiaceae ได้แก่ *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, และ *Azorhizobium* เปรียบเทียบกับวิธี phylogenetic analyses พบว่าการใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีด้วยเครื่องมัลดิทอฟให้ผลการจำแนกเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถจำแนก *Bradyrhizobium japonicum* strain G49, *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 และ USDA257 ที่เจริญในปมรากของถั่ว (Ferreira *et al*., 2011; Ziegler *et al*., 2012; Jia *et al*., 2015) ในทางเดียวกัน Stets *et al.* (2013) ศึกษาการจำแนกแบคทีเรียบริเวณรอบรากข้าวสาลีด้วยเครื่องมัลดิทอฟ พบเชื้อ *Azospirillum brasilense, A. amazonense, A. lipoferum, Pseudomonas, Pantoea, Acinetobacter, Enterobacter* และ *Curtobacterium* เป็นต้น

เทคนิคพีซีอาร์และเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีถูกพัฒนาและประยุกต์ใช้งานเพิ่มขึ้นจำนวนมากเพื่อให้การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เป็นไปอย่างรวดเร็ว ทำให้นักวิจัยเลือกวิธีการที่สามารถปรับใช้ให้ทันต่อสถานการณ์ปัจจุบัน เพราะเทคนิค วิธีการ รวมทั้งเทคโนโลยีแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน ซึ่งนักวิจัยจึงควรคำนึงถึงผลการจัดจำแนกที่รวดเร็ว ประหยัด น่าเชื่อถือ ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญต้องปลอดภัยกับผู้ปฏิบัติงาน (Singhal *et al*., 2015) เมื่อพิจารณาข้อดีข้อเสียของเทคนิคพีซีอาร์และแมสสเปคโตรเมทรี พบว่า เทคนิคพีซีอาร์มีการใช้สารเคมี เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขั้นตอนและระยะเวลาดำเนินงาน ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ที่มีความชำนาญสูง ซึ่งเทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีตอบโจทย์ความต้องการข้างต้น อีกทั้งสามารถสร้างฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์เองและลดการพึ่งพาการส่งอย่างเพื่อวิเคราะห์กับหน่วยงานภายนอก ทั้งนี้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีโดยใช้เครื่องมัลดิทอฟยังไม่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีอย่างถูกต้องตามหลัก

วิชาการที่เป็นมาตรฐานสากล ทำให้ขาดข้อมูลที่ใช้ยืนยันความถูกต้อง แม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้น ห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สอบกลับได้ และจัดทำเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (Standard Operation Procedure) ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การจัดจำแนกด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา (Molecular identification)

1.1 นำจุลินทรีย์พีจีพีอาร์กลุ่ม micro aerophillic จำนวน 5 สายพันธุ์ และ aerophillic จำนวน 10 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหาร Nutrient broth ปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเซลล์

1.2 สกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์สายพันธุ์ต่าง ๆ ตามวิธีการของชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit (Tissue) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)

1.3 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S rDNA ที่ต้องการโดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ fD1 (5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’) และ rP2 (5’-ACGGCTACCTTGTTAC GAC TT-3’) (Weisburg *et al*., 1991) จากนั้น นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง PCR โดยมีลำดับของปฏิกิริยา (PCR reaction condition) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1	94 องศาเซลเซียส	3 นาที	จำนวน 1 รอบ
ขั้นตอนที่ 2	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35 รอบ
	50 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
ขั้นตอนที่ 3	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	จำนวน 1 รอบ

1.4 ตรวจปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

1.5 ทำความสะอาดสารพันธุกรรมตามวิธีของ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)

1.6 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง DNA Sequencer

1.7 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์แต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ด้วย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

1.8 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์ในฐานข้อมูลที่มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันมากที่สุด (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์พีจีพีอาร์สายพันธุ์อ้างอิง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ว่ามีความใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ชนิดใดในฐานข้อมูล และบ่งบอกชนิด (species) ของเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร

2. การจัดจำแนกโดยใช้เครื่อง MALDI-TOF MS

2.1 ใช้ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แตะโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ เกลี่ยเชื้อลงบน Target plate โคโลนีละ 2 จุด รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 10-15 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ

2.2 หยด 70% Formic acid จำนวน 1 ไมโครลิตร รอให้ตัวอย่างแห้งประมาณ 15-30 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ

2.3 หยด HCCA จำนวน 1 ไมโครลิตร เป็นลำดับสุดท้าย รอให้ตัวอย่างแห้งโดยสังเกตตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นคราบสีขาว

2.4 ใช้ BTS เป็น Calibration

2.5 นำ Target plate เข้าเครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ Bruker รุ่น Maldi Biotyper

2.6 บันทึกค่า score value

ค่า score value ที่ได้จากเครื่อง MALDI-TOF MS คำนวณจากการวิเคราะห์แมสสเปคตรัมของเชื้อที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบกับแมสสเปคตรัมของเชื้อในฐานข้อมูล (Reference library) ซึ่งค่าอยู่ระหว่าง 0.00-3.00 โดยแบ่งผลการวิเคราะห์เป็น 3 ช่วง ดังนี้

ช่วง 0.00-1.69 คือ ผลการวิเคราะห์ไม่สามารถจำแนกได้

ช่วง 1.70-1.99 คือ ผลการวิเคราะห์จำแนกได้ในระดับสกุล (genus)

ช่วง 2.00-3.00 คือ ผลการวิเคราะห์จำแนกได้ในระดับชนิด (species)

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

3.1 การทดสอบความถูกต้อง (trueness)

3.1.1 ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง 5 ตัวอย่าง (isolate) โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลด้วยการทำ Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพร์เมอร์ fD1 และ rP2 และหาลำดับเบสเพื่อนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันกับสายพันธุ์ไรโซเบียมที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) โดยการทำ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search รายงานผลการจำแนกชนิด และเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกัน (% similarity)

3.1.2 ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง 5 ตัวอย่าง ตัวอย่าง (isolate) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ Bruker รุ่น Maldi Biotyper ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน คะแนนความคล้ายคลึงกัน (score value) ของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล และรายงานผลการจำแนกชนิด

3.1.3 นำผลการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้จากวิธีที่ 3.1.1 และ 3.1.2 มาเปรียบเทียบกัน หากผลการจำแนกชนิดเดียวกัน จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์

3.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision) ของเครื่อง MALDI-TOF MS

3.2.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

กรมวิชาการเกษตร

ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 2 ชนิด (species) โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Direct Transfer ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน นำค่า score value ของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล มาหาค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์

3.2.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด (species) ทำการทดสอบ 20 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน นำคะแนนความคล้ายคลึงกันของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล มาหาค่าเฉลี่ย และค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) โดย %CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 จึงยอมรับและประเมินการผ่านเกณฑ์ และเปรียบเทียบคะแนนความคล้ายคลึงกันของชนิดจุลินทรีย์ที่วัดได้จากผู้ทดสอบทั้ง 2 คน โดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เวลาและสถานที่ ระยะเวลาเริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. การจัดจำแนกด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา (Molecular identification)

เมื่อนำดีเอ็นเอบริเวณ 16S rRNA ของจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายพันธุ์ DASF04003, DASF04005, DASF04008, PGPR16/63 และ AP1 มีความคล้ายคลึงกัน (% similarity) กับเชื้อ *Azospirillum brasilense* อยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 1) และจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอสายพันธุ์ DASF04141 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Azotobacter vinelandii* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ AT2, AT4 และ AT9 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Azotobacter beijerinckii* อยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สายพันธุ์ AT10 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Azotobacter salinestris* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 1)

ตารางที่ 1 ผลการจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม micro aerophillic และ aerophillic ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

สายพันธุ์จุลินทรีย์	วิธีทางชีวโมเลกุล	
	Genus-species	% similarity
DASF04003*	*Azospirillum brasilense*	98
DASF04005	*Azospirillum brasilense*	99
DASF04008	*Azospirillum brasilense*	98

PGPR16/63	*Azospirillum brasilense*	98
AP1	*Azospirillum brasilense*	99
DASF04141	*Azotobacter vinelandii*	99
AT1	*Azotobacter beijerinckii*	99
AT4	*Azotobacter beijerinckii*	98
AT9	*Azotobacter beijerinckii*	99
AT10	*Azotobacter salinestris*	99

หมายเหตุ: DASF04003, DASF04005, DASF04008 และ DASF04141 เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

2. การจัดจำแนกโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ (MALDI-TOF MS)

ผลการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์อ้างอิงกลุ่ม micro aerophillic จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ DASF04003 และ DASF04008 คือ *Azospirillum brasilense* มีค่า score value เท่ากับ 2.33 และ 2.39 (ตาราง 2) และจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ DASF04141, AT1 และ AT10 คือ *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* ซึ่งมีค่า score value เท่ากับ 2.55 2.45 และ 2.45 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ Stets *et al.* (2013) ศึกษาการจำแนกแบคทีเรียบริเวณรอบรากข้าวสาลีด้วยเครื่องมัลดิทอฟในกลุ่ม micro aerophillic 3 ชนิด ได้แก่ พบเชื้อ *Azospirillum brasilense, A. Amazonense* และ *A. lipoferum* นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียสกุล *Pseudomonas, Pantoea, Acinetobacter, Enterobacter* และ *Curtobacterium* ได้อีกด้วย นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้ทางด้านการเกษตรโดยทดสอบศักยภาพของวิธีเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียในวงศ์ Rhizobiaceae ได้แก่ *Rhizobium*, *Ensifer*, *Shinella*, *Mesorhizobium*, และ *Azorhizobium* เปรียบเทียบกับวิธี phylogenetic analyses พบว่าการใช้เทคนิคแมสสเปคโตรเมทรีด้วยเครื่องมัลดิทอฟให้ผลการจำแนกเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถจำแนก *Bradyrhizobium japonicum* strain G49, *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 และ USDA257 ที่เจริญในปมรากของถั่ว (Ferreira *et al*., 2011; Ziegler *et al*., 2012; Jia *et al*., 2015)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 ผลการจัดจำแนกชนิดสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม micro aerophillic และ aerophillic ด้วยเครื่อง Maldi Biotyper

สายพันธุ์จุลินทรีย์	เครื่อง Maldi Biotyper	
	Genus-species	Score value*
DASF04003	*Azospirillum brasilense*	2.33
DASF04008	*Azospirillum brasilense*	2.39
DASF04141	*Azotobacter vinelandii*	2.55
AT1	*Azotobacter beijerinckii*	2.45
AT10	*Azotobacter salinestris*	2.45

หมายเหตุ: score values ≥2.0 จำแนกได้ระดับสกุล (genus) และชนิด (species); score values 1.7 to 2.0 จำแนกได้ระดับสกุล (genus); score values <1.7 ไม่สามารถจำแนกได้

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

3.1 การทดสอบความถูกต้อง (trueness)

ผลเปรียบเทียบการจำแนกชนิด (species) ของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงกลุ่ม micro aerophillic จำนวน 2 สายพันธุ์ (DASF04003 และ DASF04008) ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (16S rRNA) และเครื่อง MALDI-TOF MS พบว่ามีผลการจำแนกเป็น *Azospirillum brasilense* มีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ และค่า score value เท่ากับ 2.33 และ 2.39 (ตารางที่ 3) และจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic จำนวน 3 สายพันธุ์ (DASF04141, AT1 และ AT10) พบว่ามีผลการจำแนกเป็น *Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* มีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ และค่า score value เท่ากับ 2.55 2.45 และ 2.45 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งค่าความคล้ายคลึงกันด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและ MALDI-TOF MS อยู่ในเกณฑ์ประเมินการยอมรับผลการทดสอบ

ตารางที่ 3 การทดสอบความถูกต้อง (trueness) สายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม micro aerophillic และ aerophillic ด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล และด้วยเครื่อง Maldi Biotyper

สายพันธุ์จุลินทรีย์	วิธีทางอณูชีวโมเลกุล		เครื่อง Maldi Biotyper	
	สกุล – ชนิด	% similarity	สกุล – ชนิด	Score values*
DASF04003	*Azospirillum brasilense*	98	*A. brasilense*	2.33
DASF04008	*Azospirillum brasilense*	98	*A. brasilense*	2.39
DASF04141	*Azotobacter vinelandii*	99	*A. vinelandii*	2.55
AT1	*Azotobacter beijerinckii*	99	*A. beijerinckii*	2.45
AT10	*Azotobacter salinestris*	99	*A. salinestris*	2.45

กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ: score values ≥2.0 จำแนกได้ระดับสกุล (genus) และชนิด (species); score values 1.7 to 2.0 จำแนกได้ระดับสกุล (genus); score values <1.7 ไม่สามารถจำแนกได้

กรมวิชาการเกษตร

3.2 การทดสอบความเที่ยง (Precision) ของเครื่อง MALDI-TOF MS

3.2.1 ความสามารถในการทำซ้ำ (Repeatability)

ทดสอบการจำแนกชนิด (species) ของแบคทีเรียกลุ่ม micro aerophillic จำนวน 2 ชนิด โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Direct Transfer ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน ได้ค่า score value ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล พบว่า ตัวอย่างที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.32 %CV เท่ากับ 4.939 ตัวอย่างที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.23 มีค่า %CV เท่ากับ 4.770 (ตารางที่ 4) ขณะที่การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม aerophillic จำนวน 3 ชนิด พบว่า พบว่า ตัวอย่างที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.57 และมีค่า %CV เท่ากับ 1.14 ตัวอย่างที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.56 และมีค่า %CV เท่ากับ 3.95 ขณะที่ตัวอย่างที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.45 และมีค่า %CV เท่ากับ 3.23 (ตารางที่ 5) ซึ่ง CV จะต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ จึงยอมรับและผ่านเกณฑ์การประเมินผลการทดสอบ

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ (Repeatability) ของแบคทีเรียกลุ่ม micro aerophillic

ครั้งที่	ตัวอย่าง A*	ตัวอย่าง B**
1	2.18	2.31
2	2.08	2.27
3	2.31	2.28
4	2.35	2.38
5	2.34	2.28
6	2.39	2.2
7	2.43	2.44
8	2.32	2.06
9	2.47	2.38
10	2.33	2.38
Species	*Azospirillum brasilense*	*Azospirillum brasilense*
เฉลี่ย	2.32	2.298
%CV***	4.939	4.770

หมายเหตุ: ตัวอย่าง A ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตัวอย่างที่ 1
ตัวอย่าง B ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตัวอย่างที่ 2
%CV น้อยกว่า 10 ผ่านเกณฑ์การทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความทำซ้ำได้ (Repeatability) ของแบคทีเรียกลุ่ม aerophillic

ครั้งที่	ตัวอย่าง A*	ตัวอย่าง B**	ตัวอย่าง C***
1	2.57	2.45	2.31
2	2.53	2.45	2.46
3	2.55	2.47	2.44
4	2.59	2.52	2.50
5	2.52	2.69	2.48
6	2.58	2.68	2.44
7	2.60	2.46	2.31
8	2.58	2.68	2.48
9	2.54	2.61	2.55
10	2.60	2.56	2.50
Species	*Azotobacter vinelandii*	*Azotobacter beijerinckii*	*Azotobacter salinestris*
เฉลี่ย	2.57	2.56	2.45
%CV	1.14	3.95	3.23

หมายเหตุ: ตัวอย่าง A ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตัวอย่างที่ 1
ตัวอย่าง B ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตัวอย่างที่ 2
ตัวอย่าง C ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ตัวอย่างที่ 3
%CV น้อยกว่า 10 ผ่านเกณฑ์การทดสอบ

3.2.2 การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation)

การทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน ทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic 1 ชนิด (species) โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Direct Transfer ทำการทดสอบ 20 ซ้ำ โดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน โดยทดสอบในวันและสภาวะเดียวกัน พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่า score value ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล จำนวน 20 ซ้ำ ดังตารางที่ 6 โดยได้ค่าเฉลี่ย 2.28 และมี %CV เท่ากับ 5.07 สำหรับเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่า score value ที่ทำการทดสอบกับชนิดของจุลินทรีย์ในฐานข้อมูล เฉลี่ยเท่ากับ 2.31 และมี %CV เท่ากับ 5.58 และเมื่อเปรียบเทียบผลคะแนนความคล้ายคลึงกันของชนิดจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลที่วัดได้ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า P = 0.481 (ตารางที่ 6) ในทางเดียวกันผลการทดสอบหาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม aerophillic พบว่า เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1 ได้ค่า score value เฉลี่ย 2.55 และมี %CV เท่ากับ 2.02 และเจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2 ได้ค่า score value เฉลี่ย 2.51 มีค่า %CV เท่ากับ 3.66 และ P = 0.127 (ตารางที่ 7) ซึ่งแสดงว่าค่า score value ของเจ้าหน้าที่ทั้ง 2 คน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 การทดสอบความเที่ยงโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation) ของแบคทีเรียกลุ่ม micro aerophillic

จำนวนซ้ำที่	ค่า score value	
	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2
1	2.38	2.40
2	2.27	2.39
3	2.18	2.37
4	2.3	2.4
5	2.16	2.26
6	2.0	2.45
7	2.19	2.28
8	2.34	2.36
9	2.27	1.88
10	2.33	2.38
11	2.34	2.22
12	2.38	2.32
13	2.26	2.34
14	2.42	2.35
15	2.34	2.40
16	2.35	2.28
17	2.27	2.37
18	2.38	2.16
19	2.36	2.16
20	2.02	2.38
ค่าเฉลี่ย	2.28	2.31
%CV	5.07	5.58
ค่าเฉลี่ย	2.30	
%CV	5.32	
Sig. (2-tailed)	0.481	

หมายเหตุ: Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05)

ตารางที่ 7 การทดสอบความเที่ยงโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน (Intermediate precision: between-analyst variation) ของแบคทีเรียกลุ่ม aerophillic

จำนวนซ้ำที่	ค่า score value

กรมวิชาการเกษตร

	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 1	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์คนที่ 2
1	2.57	2.5
2	2.53	2.48
3	2.55	2.57
4	2.59	2.58
5	2.52	2.44
6	2.58	2.5
7	2.6	2.62
8	2.58	2.51
9	2.54	2.36
10	2.6	2.63
11	2.53	2.6
12	2.55	2.26
13	2.46	2.49
14	2.39	2.54
15	2.51	2.58
16	2.59	2.57
17	2.61	2.56
18	2.58	2.55
19	2.58	2.4
20	2.54	2.55
เฉลี่ย	2.55	2.51
%CV	2.02	3.66
เฉลี่ย	2.53	
%CV	3.01	
Sig.(2-tailed)*	0.127	

หมายเหตุ: Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P = 0.05)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การจำแนกชนิดจุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic และ aerophillic ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุล พบว่า มีความคล้ายคลึงกัน (% similarity) กับเชื้อ *Azospirillum brasilense, Azotobacter vinelandii, Azotobacter beijerinckii* และ *Azotobacter salinestris* อยู่ในช่วง 98-99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ค่าความถูกต้องของวิธีจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล เท่ากับ 98-99 เปอร์เซ็นต์ และเครื่อง MALDI-TOF MS มีค่า score value เท่ากับ 2.33-2.55 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ค่าความเที่ยงของความสามารถในการทำซ้ำมี CV ของ

กรมวิชาการเกษตร

จุลินทรีย์กลุ่ม micro aerophillic เท่ากับ 4.94 และ 4.77 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่ม aerophillic มี CV เท่ากับ 1.14 3.95 และ 3.23 เปอร์เซ็นต์ และค่า Intermediate precision จากการทดสอบโดยเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ 2 คน มี CV เท่ากับ 5.32 และ 2.53 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบทางสถิติโดยใช้ Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า *P* เท่ากับ 0.481 และ 0.127 แสดงให้เห็นว่าผลการทดสอบของเจ้าหน้าที่วิเคราะห์ทั้ง 2 คน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ได้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงเพื่อใช้จัดจำแนกสกุล-ชนิดของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด และหาค่าคงที่เพื่อประเมินความเค็มของน้ำทางการเกษตร

Development and Method Validation of Total Dissolve Solid and Calculate Constance factor (K) to determine the Salinity of Agricultural Water

จิตติรัตน์ ชูชาติ สงกรานต์ มะลิสอน พจมาลย์ ภู่สาร ญาณธิชา จิตต์สะอาด
สุภา โพธิจันทร์ กัณฐณา คล้ายแก้ว

คำสำคัญ (Key words)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด และหาค่าคงที่
Method validation, Total Dissolve Solid, Constance factor (K)

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 16.45 mg/l และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 21.23 mg/l ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง (Trueness) และค่า HorRat (r) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 98.48%, 95.48% และ 99.51% ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.27, 0.42 และ 0.36 ตามลำดับ ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วง 80 - 110% และ HorRat (r) <1.3 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำ จึงมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจ ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) มาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทางการเกษตร จำนวน 344 ตัวอย่าง พร้อมทั้งวิเคราะห์ pH, EC, TDS, Ca, Mg, Na, K, CO_3^{2-}, HCO_3^-, Cl^- และ SO_4^{2-} พบว่าตัวอย่างน้ำทางการเกษตร มีค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) มีค่าตั้งแต่ 3.9 - 8.4 ค่าการนำไฟฟ้า (EC) มีค่าตั้งแต่ 30 – 30,900 µS/cm at 25 °C ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) มีค่าตั้งแต่ 13-21,758 mg/l ปริมาณแคลเซียม (Ca^{2+}) มีค่าตั้งแต่ 0.05 – 17.77 me/l ปริมาณแมกนีเซียม (Mg^{2+}) มีค่าตั้งแต่

กรมวิชาการเกษตร

0.03 – 66.88 me/l ปริมาณโซเดียม (Na^+) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ - 256.55 me/l ปริมาณโพแทสเซียม (K^+) มีค่าตั้งแต่ 0.01 – 8.29 me/l ปริมาณคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 6.00 me/l ปริมาณไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 7.70 me/l ปริมาณคลอไรด์ (Cl^-) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 306.60 me/l และมีปริมาณเกลือซัลเฟต (SO_4^{2-}) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 34.47 me/l ตามลำดับ หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำกับค่าการนำไฟฟ้า และประมาณค่าคงที่ K หรือค่า Ratio TDS/EC (K) ของน้ำทางการเกษตรคือ 0.60 (R^2 = 0.99) หรือสามารถเขียนเป็นสมการได้ เท่ากับ TDS = 0.60 x EC และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดตัวอย่างน้ำทางการเกษตรของประเทศไทย มีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้า และเกลือที่ละลายน้ำได้ในรูปของ Na^+, K^+ Mg^{2+}, Cl^-, และ SO_4^{2-} ซึ่งทำให้สามารถคำนวณ ค่าคงที่ Ratio TDS/EC (K) = 0.60 (R^2 = 0.99) ซึ่งเป็นค่าคงที่ของน้ำธรรมชาติทั่วไป น้ำชลประทาน และน้ำที่ได้รับผลกระทบเล็กน้อยจากน้ำทะเล มาใช้ในทางการเกษตร

Development and Method Validation of Total Dissolve Solid in agricultural water found that the Limit of Detection (LOD) was 21.23 mg/l and Limit of Quantitation (LOQ) was 30.0 mg/l. The CRM analysis to prove concentrations (47, 692, 7230 mg/l) %Recovery were 98.48%, 95.48% and 99.5% respectively. HorRat (r) were 0.27, 0.36 and 0.42 respectively. The results of analysis showed that the (AOAC) acceptance criteria (%Recovery in the range from 80-110% and HorRat (r) <1.3). Therefore, this method is effective and suitable for use in the analysis of boron in soil. That is routine work and needs fast, accurate analysis results.

The water samples were taken 344 samples. Water quality parameters, which obtained pH, EC, TDS, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^+, K^+, CO_3^{2-}, HCO_3^-, Cl^- and SO_4^{2-}. The results considered, the pH values ranged from 3.9 - 8.4. The EC values of the water samples varied from 30 – 30,900 µS/cm at 25 °C. TDS values varied from 13-21,758 mg/l. Calcium (Ca^{2+}) varied from 0.05 – 17.77 me/l. Magnesium (Mg^{2+}) varied from 0.03 – 66.88 me/l. Sodium (Na^+) varied from 0.00 - 256.55 me/l. Potassium (K^+) varied from 0.01 – 8.29 me/l, Carbonate (CO_3^{2-}) varied from 0.00 – 6.00 me/l. Bicarbonate (HCO_3^-) varied from 0.00 – 7.70 me/l. Chloride (Cl^-) varied from 0.00 – 306.60 me/l. and Sulfate (SO_4^{2-}) $^-$) varied from 0.00 – 34.47 me/l. These results make research in revealing TDS/EC ratios interesting to do. By finding the ratio value, TDS concentration can be measured from EC, which are used to describe salinity level. These two parameters are correlated and usually expressed by a simple equation : TDS = K x EC. The process of obtaining TDS = 0.60 x EC, can be written as Ratio TDS/EC (K) = 0.60 (R^2 = 0.99). Indicates that the correlation of both parameters is strongly influenced by the EC values. Even so, all the findings are in agreement with the conclusion in which the obtained variation of TDS/EC ratio for

natural water, Irrigation water and water slightly affected by seawater can be. The type of water is generally sodium, calcium, magnesium type or calcium, sodium, chloride and sulfate. In line with this, it has been found that the most correlated major ions, especially to TDS are Na^+, K^+ Mg^{2+}, Cl^- and SO_4^{2}.

บทนำ (Introduction)

การวิเคราะห์ความเค็มของน้ำ สามารถทำได้โดยการวัดปริมาณผลรวมของความเข้มข้นของไอออนทั้งหมดที่ละลายในน้ำ (Total dissolve ions) ซึ่งไม่ใช่แต่เฉพาะไอออนของโซเดียมคลอไรด์เท่านั้น แต่หมายรวมถึงไอออนอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ โดยแสดงผลออกมาเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) แต่ถ้าหากในน้ำปริมาณของไอออนละลายสูงจะแสดงผลเป็นกรัมต่อลิตร (g/l) ความเค็มของน้ำที่มีค่าแตกต่างกันไปแล้วแต่สถานที่ โดยมีข้อกำหนดค่าความเค็มของน้ำ สำหรับการเพาะปลูกทางการเกษตร ไม่มากกว่า 2 กรัม/ลิตร Scanlon *et al*. (2007) ได้ศึกษาความเค็มของแหล่งน้ำทางการเกษตร พบว่า เกิดจากเกลือที่ปนอยู่ในน้ำ หรือมาจากน้ำใต้ดินเค็มที่อยู่ตื้นใกล้ผิวดิน ทำให้เกิดเกลือสะสมในดินบริเวณรากพืช เมื่อมีปริมาณมากขึ้นทำให้พืชไม่สามารถดึงน้ำจากดินได้ตามปกติ เมื่อน้ำที่จะนำไปใช้ได้ลดลง พืชก็จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง มีอาการคล้ายพืชขาดน้ำ เช่น เหี่ยว และแห้งตายในที่สุด ปัญหาดินเค็มเกิดขึ้นเมื่อเกลือที่ละลายน้ำได้ และเคลื่อนย้ายไปกับน้ำ ซึ่งขึ้นกับปริมาณและชนิดของเกลือในน้ำ ยิ่งมีเกลือในน้ำที่ใช้ในการชลประทานมากก็จะยิ่งเสี่ยงต่อการเกิดปัญหาน้ำเค็มมากขึ้น การวิเคราะห์ปริมาณเกลือที่ละลายน้ำทำได้โดยการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) วิธีนี้หากนำมาใช้จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด มีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อการการเพาะปลูก และมีอิทธิพลต่อแหล่งน้ำอย่างสำคัญ เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพทางเคมีและความสมดุลของเกลือในน้ำ และส่งผลต่อค่าการนำไฟฟ้าที่มีความเกี่ยวข้องกับความเค็มของน้ำ Thirumalini and Joseph (2009) พบว่า ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำจะเป็นสัดส่วนและปฏิภาคโดยตรงกับการนำไฟฟ้าของน้ำ เป็นคุณลักษณะหรือดัชนีคุณภาพน้ำที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยจะบ่งบอกถึงความสามารถของน้ำในการนำกระแสไฟฟ้า ซึ่งมีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นทั้งหมดของสารที่มีประจุที่ละลายอยู่ในน้ำ อุณหภูมิของน้ำขณะทำการตรวจวัด ชนิดของสารที่มีประจุ และความเข้มข้นของสารมีประจุแต่ละชนิด ซึ่งส่วนมากจะเกิดจากสารประกอบเกลือ หรือปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด โดยเกลือที่มักพบบ่อยในน้ำ ได้แก่ เกลือ Na, Cl, SO_4^{2-}, Mg, Ca และ K

Food and Agriculture Organization of the United Nations (1985) ได้แบ่งชั้นคุณภาพของน้ำเพื่อการชลประทาน จากผลของค่าการนำไฟฟ้า และค่าวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) ในการปลูกพืช พบว่า น้ำที่มีคุณภาพดี มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่า 700 ไมโครซีเมนต์ต่อเซนติเมตร หรือมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) น้อยกว่า 450 ppm เป็นน้ำชลประทานที่ใช้ได้โดยไม่มีข้อจำกัด หากมีค่ามากกว่านี้จะทำให้น้ำเค็ม ความเค็มทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพของพืชลดลง เนื่องจากความเครียดออสโมติก (Osmotic stress) และความเป็นพิษของธาตุบางชนิด (Ion toxicity) พืชที่ขึ้นบนพื้นที่ดินเค็มจะต้องใช้พลังงานมากกว่าปกติเพื่อ

ศรีวิชาการเกษตร

ดูดน้ำ และธาตุอาหารมาใช้ในการเจริญเติบโต เกลือในดินทำให้น้ำในดินมีแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้น และความต่างศักย์ของน้ำ (Water potential) ลดลง เซลล์พืชมีอาการขาดน้ำและอาจถึงตายได้ เกลือที่ละลายในน้ำเข้มข้นกว่าในพืช ความเป็นประโยชน์ของน้ำในดินจะลดลง ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำจากดินได้ พืชแสดงอาการเฉา หรือขอบใบไหม้ ซึ่งเป็นผลจากอิทธิพลร่วมของเกลือ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมุ่งเน้นตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดกับค่าการนำไฟฟ้า เพื่อหาค่าคงที่เพื่อประเมินความเค็มของน้ำทางการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1) เตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ในการสำรวจ และ จัดเตรียม วัสดุ อุปกรณ์ ที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ และจัดหาวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ได้แก่ Standard TDS standard 47 ppm (Thermo Scientific), Standard TDS standard 692 ppm (Thermo Scientific), Standard TDS standard 7230 ppm (Thermo Scientific), Standard TDS standard 30 ppm (HACH)

2) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) ตามวิธีของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (AWWA APHA, 2017) ดังนี้

- หาค่า Trueness และ precision โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ระดับ ต่ำ กลาง สูง ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) โดยทำการทดสอบระดับละ 7 ซ้ำ และต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery และ HorRat < 1.3 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016)

- การคำนวณ % Recovery จากสูตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

- การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (Horwitz' Ratio)} = \frac{\text{RSD(r)}}{\text{PRSD(R)}}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$\text{RSD(r)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

$$\text{PRSD(R)} = \frac{2C^{-0.15}}{100} \quad (C = \text{mean})$$

กรมวิชาการเกษตร

- หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า SD- standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ปริมาณน้อย จำนวน 7 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = 3S_0'$$

$$LOQ = 10S_0'$$

- นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ โดยใช้เกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน AOAC Official Methods of Analysis (2016)

3) วิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทางการเกษตร และตัวอย่างน้ำที่เตรียมขึ้นที่ประกอบด้วยเกลือชนิดต่างๆ เช่น เกลือ Ca, Mg, K, Na, Cl, และ SO_4, ซึ่งเป็นเกลือที่พบมากในแหล่งน้ำทางการเกษตร โดยวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณแมกนีเซียม โพแทสเซียมโซเดียม คลอไรด์ และซัลเฟต

4) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) ค่าการนำไฟฟ้า และชนิดของเกลือที่ละลายน้ำ และหาค่าคงที่

5) นำค่าคงที่ที่ได้มาใช้ทำนายค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณและชนิดเกลือที่ละลายได้ในน้ำ

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

ดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) ตามวิธีของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA and WEF, 2017) และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

1) ทดสอบขีดความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ และรายงานผลได้ (LOD และ LOQ) โดยคำนวณหาค่าmeanและ SD นำมาหาค่า LOD และประมาณ Predictedค่า LOQ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ปริมาณน้อย จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ ดังนี้ โดยมีค่าเฉลี่ย = 14.40 , SD = 0.96, LOD = 16.45 มิลลิกรัมต่อลิตร, LOQ (Predict) = 21.23 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) หาค่า Trueness โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Standard Reference Material; SRM) ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ระดับ ต่ำ กลาง สูง (TDS standards 47 ppm, TDS standard 692 ppm และ TDS standard 7230 ppm)ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) โดยทำการทดสอบระดับละ 7 ซ้ำ และต่างวันเวลา ประเมินผลการทดสอบ จาก %Recovery (Eurachem, 2014; AOAC, 2016) พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ระดับ ต่ำ กลาง สูง มีค่า % Recovery เท่ากับ 98.48%, 95.48% และ 99.51% ตามลำดับ ผ่าน

กรมวิชาการเกษตร

เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วงที่ระดับความเข้มข้นต่ำใช้เกณฑ์ % Recovery = 80 - 110% ที่ระดับความเข้มข้นกลางใช้เกณฑ์ % Recovery = 90 – 107 % ที่ระดับความเข้มข้นสูงใช้เกณฑ์ % Recovery = 95 – 105 %

3) หาค่า Precision โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Standard Reference Material; SRM) ที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ระดับ ต่ำ กลาง สูง พบว่ามีค่า HorRat เท่ากับ 0.27, 0.42 และ 0.36 ตามลำดับ โดยประเมินผลการทดสอบ จาก HorRat พบว่า ผ่านเกณฑ์ยอมรับโดยมีเกณฑ์การยอมรับ HorRat < 1.3 (Eurachem, 2014; AOAC, 2016) จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) ตามวิธีของ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (AWWA APHA, 2017) ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม Eurachem (2014) และ AOAC (2016) สามารถนำวิธีไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์น้ำได้

4) นำวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) มาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทางการเกษตร จำนวน 344 ตัวอย่าง พร้อมทั้งวิเคราะห์ pH, EC, TDS, Ca, Mg, Na, K, CO_3^{2-}, HCO_3^-, Cl^- และ SO_4^{2-} พบว่า ตัวอย่างน้ำทางการเกษตร มีค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) มีค่าตั้งแต่ 3.9 - 8.4 ค่าการนำไฟฟ้า (EC) มีค่าตั้งแต่ 30 – 30,900 µS/cm at 25 °C ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) มีค่าตั้งแต่ 13-21,758 mg/l ปริมาณแคลเซียม (Ca) มีค่าตั้งแต่ 0.05 – 17.77 me/l ปริมาณแมกนีเซียม (Mg) มีค่าตั้งแต่ 0.03 – 66.88 me/l ปริมาณโซเดียม (Na) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ - 256.55 me/l ปริมาณโพแทสเซียม (K) มีค่าตั้งแต่ 0.01 – 8.29 me/l ปริมาณคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 6.00 me/l ปริมาณไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 7.70 me/l ปริมาณคลอไรด์ (Cl^-) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 306.60 me/l และมีปริมาณเกลือซัลเฟต (SO_4^{2-}) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 34.47 me/l ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางสถิติของตัวอย่างน้ำทางการเกษตรที่ใช้ในการศึกษา

Parameters	pH	EC	TDS	Ca	Mg	Na	K	CO_3^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}
	-	µS/cm)	(mg/l)	me/l	me/l	me/l	me/l	me/l	me/l	me/l	me/l
N	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344	344
Average	7.6	1,807	1,184	3.26	3.80	11.20	0.43	0.36	2.46	12.60	3.11
Minimum	3.9	30	13	0.05	0.03	0.03	0.01	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Maximum	8.4	0,900	21,758	17.77	66.88	256.55	8.29	6.00	7.70	306.60	34.47
Std. Dev	0.4	4045	2826	2.11	8.14	33.21	0.95	0.93	1.11	39.57	4.39
Mode	7.5	710	372	2.45	1.35	2.30	0.17	0.20	2.40	0.15	1.67

ศึกษาคาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) ของน้ำ พบว่า เปนปฏิภาคโดยตรงกับค่าการนำไฟฟ้าของน้ำ ที่จะทำให้ทราบค่าคงที่ (K) โดย Viscony *et al.* (2004) และ Iyasele *et al.* (2015) ศึกษาคาคงที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำกับค่าการนำไฟฟ้า จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.50 – 1.0 ซึ่งการจะใชคาคงที่คาใดในการคูณจะขึ้นอยู่กับรูป และส่วนประกอบที่ละลาย

กรมวิชาการเกษตร

น้ำได้ทั้งหมด สำหรับประเทศไทยยังไม่ได้มีการศึกษาและกำหนดค่าคงที่ที่แท้จริง น้ำที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงก็จะมีปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำสูงเช่นกัน และในแหล่งน้ำแห่งใดแห่งหนึ่ง จะมีค่าความสัมพันธ์ดังกล่าวค่อนข้างคงที่ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำกับค่าการนำไฟฟ้า สามารถอธิบายได้โดยสมการ ดังนี้

$$K = TDS/EC$$

หรือ $$TDS = K(EC)$$

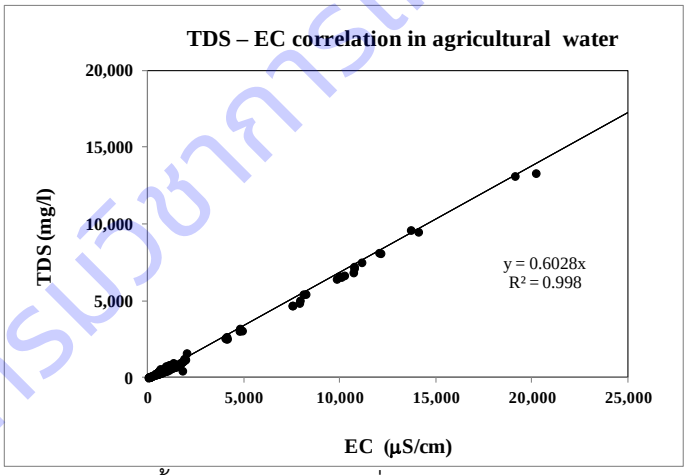
เมื่อ K = ค่าคงที่ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง EC และ TDS

EC = ค่าการนำไฟฟ้า มีหน่วยเป็นไมโครซีเมนต่อเซนติเมตร

TDS = ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solid) มีหน่วย เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

ซึ่งจากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทั้งหมด 344 ตัวอย่าง นั้น สามารถนำหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำกับค่าการนำไฟฟ้า และประมาณค่าคงที่ K จากสมการข้างต้น

TDS/EC ratio ของน้ำทางการเกษตรคือ 0.60 (R^2 = 0.998) หรือสามารถเขียนเป็นสมการได้ตามภาพที่ 1 $TDS = 0.60 \times EC$



ภาพที่ 1 TDS – EC correlation ของน้ำทางการเกษตร ที่มีค่า TDS/EC ratio หรือค่า K = 0.60 (R^2 = 0.998)

อย่างไรก็ตามปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) มีค่าเฉพาะตามที่มาและรูปของเกลือของแหล่งน้ำนั้นๆ ซึ่งหากมีการใช้คาคงที่ที่มีค่าสูง จะทำให้คุณภาพน้ำของแหล่งน้ำนั้นมีค่าความเค็มที่สูงกว่าปกติ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีการใช้คาคงที่ที่มีคาต่ำสำหรับน้ำที่มี OH^- หรือ Free Acid ดังนั้นจึงใช้ความสัมพันธ์ของค่าวิเคราะห์ของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ค่าการนำไฟฟ้า และรูปของเกลือที่ละลายได้ เพื่อประเมินความเค็มของน้ำซึ่งสามารถประเมินคุณภาพของแหล่งน้ำโดยอาศัยความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นโดย Food and Agriculture Organization of the United Nations (1985) ได้แบ่งชั้นคุณภาพของน้ำเพื่อการชลประทานจากผลของค่าการนำไฟฟ้า และค่าวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid;

กรมวิชาการเกษตร

TDS) ในการปลูกพืช และรายงานว่าความเค็มทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพของพืชลดลง เนื่องจากความเครียดออสโมติก (Osmotic stress) และความเป็นพิษของธาตุบางชนิด (Ion toxicity) ความเป็นพิษเนื่องจากไอออนบางชนิดที่พืชดูดเข้าไปสะสมมากเกินความต้องการ พืชแสดงอาการขอบใบไหม้ และลุกลามเข้าเส้นกลางใบในที่สุด ไอออนที่มีอิทธิผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในน้ำ และมีผลต่อความสัมพันธ์ของค่าวิเคราะห์ของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ค่าการนำไฟฟ้า เพื่อสามารถประเมินคุณภาพของแหล่งน้ำ ได้แก่ Na^+, Mg^{2+}, Cl^-, และ SO_4^{2-} (Viscony *et al.*, 2004; Iyasele *et al.*, 2015)

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของค่าวิเคราะห์ของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ค่าการนำไฟฟ้า และรูปของเกลือที่ละลายได้

Correlation	pH	EC	TDS	Ca	Mg	Na	K	CO_3^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}
pH	1.000										
EC	-0.049	1.000									
TDS	-0.052	**0.989**	1.000								
Ca	0.053	0.651	0.634	1.000							
Mg	-0.042	**0.996**	**0.987**	0.664	1.000						
Na	-0.052	**0.998**	**0.990**	0.621	**0.995**	1.000					
K	-0.051	**0.991**	**0.983**	0.621	**0.993**	**0.993**	1.000				
CO_3^{2-}	-0.015	-0.037	-0.053	0.235	-0.021	-0.053	-0.052	1.000			
HCO_3^-	0.296	0.050	0.049	0.244	0.065	0.036	0.026	-0.292	1.000		
Cl^-	-0.053	**0.998**	**0.989**	0.616	**0.995**	**1.000**	**0.994**	-0.071	0.036	1.000	
SO_4^{2-}	-0.048	**0.920**	**0.908**	**0.840**	**0.929**	**0.907**	**0.908**	0.136	0.006	**0.903**	1.000

จากตารางที่ 2 และการศึกษาของ Viscony *et al.* (2004) และ Iyasele *et al.* (2015) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำกับค่าการนำไฟฟ้า และส่วนประกอบที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ได้แก่ Na^+, Mg^{2+}, Cl^-, และ SO_4^{2-} ในขณะที่การศึกษาตัวอย่างน้ำของประเทศไทยจำนวน 344 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดตัวอย่างน้ำทางการเกษตรของประเทศไทย มีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้า และเกลือที่ละลายน้ำได้ในรูปของ Na^+, K^+ Mg^{2+}, Cl^-, และ SO_4^{2-} ซึ่งทำให้สามารถคำนวณ ค่าคงที่ Ratio TDS/EC (k) = 0.60 ซึ่งเป็นค่าคงที่ของน้ำธรรมชาติทั่วไป และน้ำชลประทานที่ใช้ทางการเกษตร และสามารถใช้ทางการเกษตรได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าคงที่ Ratio TDS/EC (k) ของน้ำแต่ละประเภท

EC at 25 ^{0}C	Ratio TDS/EC (k)
Natural water for irrigation EC = 500 – 3,000 µS/cm	0.55 - 0.75
Natural water, EC = 500 – 3,000 µS/cm	0.55 - 0.75
Distillate water, EC = 1 – 10 µS/cm	0.50
Freshwater, EC = 300 – 800 µS/cm	0.55
Seawater, EC = 45,000 – 60,000 µS/cm	0.70

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

Brine water, EC = 65,000 – 85,000 µS/cm	0.75

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 16.45 mg/l และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 21.23 mg/l ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง (Trueness) และค่า HorRat (r) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 98.48%, 95.48% และ 99.51% ตามลำดับ ค่า HorRat (r) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.27, 0.42 และ 0.36 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วง 80 - 110% และ HorRat (r) <1.3 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) จึงมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจ ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ

นำวิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolve Solid; TDS) มาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำทางการเกษตร จำนวน 344 ตัวอย่าง พร้อมทั้งวิเคราะห์ pH, EC, TDS, Ca, Mg, Na, K, CO_3^{2-}, HCO_3^-, Cl^- และ SO_4^{2-} พบว่า ตัวอย่างน้ำทางการเกษตร มีค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) มีค่าตั้งแต่ 3.9 - 8.4 ค่าการนำไฟฟ้า (EC) มีค่าตั้งแต่ 30 – 30,900 µS/cm at 25 °C ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (TDS) มีค่าตั้งแต่ 13-21,758 mg/l ปริมาณแคลเซียม (Ca) มีค่าตั้งแต่ 0.05 – 17.77 me/l ปริมาณแมกนีเซียม (Mg) มีค่าตั้งแต่ 0.03 – 66.88 me/l ปริมาณโซเดียม (Na) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ - 256.55 me/l ปริมาณโพแทสเซียม (K) มีค่าตั้งแต่ 0.01 – 8.29 me/l ปริมาณคาร์บอเนต (CO_3^{2-}) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 6.00 me/l ปริมาณไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 7.70 me/l ปริมาณคลอไรด์ (Cl^-) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 306.60 me/l และมีปริมาณเกลือซัลเฟต (SO_4^{2-}) มีค่าตั้งแต่ ไม่พบ – 34.47 me/l ซึ่งจากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทั้งหมด 344 ตัวอย่าง นั้น

หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายในน้ำกับค่าการนำไฟฟ้า และประมาณค่าคงที่ K หรือค่า Ratio TDS/EC (K) ของน้ำทางการเกษตรคือ 0.60 (R^2 = 0.99) หรือสามารถเขียนเป็นสมการได้ เท่ากับ TDS = 0.60 x EC และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดตัวอย่างน้ำทางการเกษตรของประเทศไทย มีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้า และเกลือที่ละลายน้ำได้ในรูปของ Na^+, K^+ Mg^{2+}, Cl^-, และ SO_4^{2-} ซึ่งทำให้สามารถคำนวณ ค่าคงที่ Ratio TDS/EC (k) = 0.60 ซึ่งเป็นค่าคงที่ของน้ำธรรมชาติทั่วไป และน้ำชลประทานที่ใช้ทางการเกษตร และสามารถใช้ทางการเกษตรได้

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

Develop and Validation Method Analysis of Essential Amino Acids for Plant Growth

สุพิศสา ทองเขียว เพชรรัตน์ ศิริวิ สาธิดา โพธิ์น้อย

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช

Validation Method Essential Amino Acids for Plant Growth

บทคัดย่อ (Abstract)

พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดอะมิโน ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ ความคงสภาพหลังการเตรียมอนุพันธ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดอะมิโนใช้การปรับเฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient ด้วย Acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์และ Triethylamine ความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาของการเตรียมอนุพันธ์ 10 นาที ภายหลังจากการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนมีความคงสภาพได้ถึง 4 วัน และจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ กรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ซึ่งจะตรวจสอบ Specificity, Matrix effect, LOD, LOQ, Range, Linearity, Trueness Precision และ Ruggedness พบว่าวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนนั้นมีความจำเพาะเจาะจงและไม่มีการรบกวนของสารอื่นสำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสและชนิดผง มีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.05-4.76 ไมโครกรัมต่อลิตร และ มีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.5-50 ไมโครกรัมต่อลิตร การพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับ LOQ พบว่าทุกค่าผ่านเกณฑ์ยอมรับ จากผลการตรวจสอบ Range และ Linearity พบว่ามีค่า Range ในช่วง 5-60, 5-60,5-60,0.5-6 และ 50-600 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมี Linearity อยู่ในช่วง 5-100, 5-100, 5-100, 0.5-10 และ 5-1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ Correlation coefficient (r) >0.995 การประเมินค่า Trueness จาก %Recovery และ Precision แบบ Intermediate precision จากค่า HorRat พบว่า การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง มี %Recovery อยู่ในช่วง 94.34-103.24, 96.40-102.82 และ 95.86-103.55 ตามลำดับ มีค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.31-0.61, 0.51-0.93 และ 0.30-0.65 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดมี %Recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับและค่า 80-110 และมีค่าHorRat ไม่เกิน 1.3 ตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC, 2016 การตรวจสอบ Ruggedness โดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่มีผลต่อการทดสอบ และเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนด้วยวิธีทางสถิติ t-test พบว่าทุกค่า มีค่า t_{stat} น้อยกว่า $t_{critical}$ จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นพบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับและวิธีที่พัฒนานี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline อยู่ในช่วง 0.005-500 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine อยู่ในช่วง 0.0005-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Tryptophan อยู่ในช่วง 0.05-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ค่าที่มีความถูกต้องและแม่นยำจึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนในห้องปฏิบัติการได้

Analytical method of amino acids was developed for aspartic acid, glutamic acid, proline, phenylalanine and tryptophan using high performance liquid chromatography technique. The stationary phase ratio and concentrations of buffer conditions were optimized for amino acids separation including studing of derivatize time and stability after derivatize. Amino acids were separated by gradient profile between acetonitrile and 100 mM sodium acetate trihydrate with triethylamine at a concentration of 12 mM. The time of preparation of the derivatives was 10 min. The stability of amino acid after derivatives was 4 days. The required validation parameter i.e., specificity, matrix effect, limit of detection, limit of quantitation, range, linearity trueness, precision and ruggedness were studied for 5 types of amino acids. The method is characterized by high specificity and no matrix effect for clearless seaweed extract and powder extract sample. The results of limit of detection and the limit of quantitation were in the ranges 0.05-5 and 0.5-50 ug/L, respectively.Verification of accuracy and reliability at all LOQ levels passed the criteria. Range and linearity verification results of aspartic acid glutamic acid proline phenylalanine and tryptophan ranged from 5-60, 5-60,5-60,0.5-6 and 50-600 ug/L, respectively. Linearity was in the range of 5-100, 5-100, 5-100, 0.5-10 และ 5-1000 ug/L, respectively, Which Correlation coefficient (r) > 0.995 passed the acceptance criteria. The accuracy from % recovery and precision from Horrat values as intermediate precision were evaluated. Recovery studies using three spiking concentratons at varying levels showed recoveries of 94.34-103.24,. 96.40-102.82 and 95.86-103.55 at inter-day intervals, respectively. Precision studies using three spiking concentratons at varying levels showed HorRat values of 0.31-0.61, 0.51-0.93 and 0.30-0.65, respectively. Recovery with in the range of 80-110 and HorRat values not more than 1.3 according to AOAC,2016 criteria were accepted. Ruggedness verification with changes the test conditions and comparing amino acid concentrations by statistical t-test, it was found that all values t_{cal} less than $t_{critical}$. From the results, it was found that the characteristics of the method the acceptance criteria.This developed method is suitable for the for determine Aspartic acid Glutamic acid Proline content within 0.005-500 mg/L concentration range, Phenylalanine content within 0.0005-100 mg/L concentration range, and Tryptophan content within 0.05-1000 mg/L concentration range. The results given by the method are accurate and

precise. Therefore, this method can be used as standard method for analysis of amino acid products in the laboratory.

บทนำ (Introduction)

ปัจจุบันเกษตรกรให้ความสำคัญกับการผลิตพืชปลอดสารพิษมากขึ้น ลดการใช้สารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ที่มีสารพิษตกค้างทางการเกษตรและหันกลับมาใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่เป็นมิตรกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น การใช้สารสกัดอินทรีย์ น้ำหมักชีวภาพ สารเพิ่มประสิทธิภาพพืช และสารสกัดจากสาหร่าย เป็นต้น ทำให้หน่วยงานสารวัตรเกษตรได้มีการส่งตัวอย่างเพื่อให้ทำการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์กันมากขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์บางตัวมีการอ้างว่าเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช แต่ฉลากข้างขวดมีการเติมสารอาหารบำรุงพืชชนิดอื่นๆ ลงไปด้วย เช่น กรดอะมิโน (Amino acid) วิตามิน (Vitamin) กรดฮิวมิก (Humic acid) และสารอื่นๆจากข้อมูลการรับตัวอย่างของห้องปฏิบัติการพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ส่งมาวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นสารสกัดอินทรีย์และสารสกัดจากสาหร่ายที่ระบุว่ามีกรดอะมิโนมากถึงร้อยละ 50 ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญต่อพืช ช่วยเสริมสร้างพืชให้แข็งแรง ต้านทานโรค และมีสารอาหารจำเป็นต่างๆ ที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ง่าย Al-Said and Kamal (2008), Awad และคณะ (2007) กล่าวว่ากรดอะมิโนมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกิจกรรมทางสรีรวิทยาของพืชและช่วยเพิ่มคลอโรฟิลล์ในพืช กรดอะมิโนบางตัวยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนพืชอีกด้วย (Rivier and Crozier, 1987) และกรดอะมิโนที่พบในสารสกัดจากสาหร่ายมากที่สุด 4 อันดับแรก ได้แก่ กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline และ Phenylalanine ซึ่งมีมากถึง 35-40% สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจหาปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์หรือในเมทริกซ์ต่างๆ เช่น จากการศึกษาของ Fang Zeng และคณะ (2014) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 21 ชนิด ในน้ำผลไม้ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatograpy (HPLC) ที่มีการเตรียมอนุพันธ์ด้วยการใช้สาร 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) ก่อนนำไปวิเคราะห์พบว่า ในน้ำผลไม้ 6 ชนิด มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระอยู่ในช่วง 56.97-469.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน 17 ชนิดในอาหาร พบว่า มี% Recovery อยู่ในช่วง 87-104 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (Katarzyna และคณะ, 2017) จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่ากรดอะมิโนนั้นมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช และการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ห้องปฏิบัติการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีในผลิตภัณฑ์สารสกัดอินทรีย์หรือสารสกัดจากสาหร่ายเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นมาตรฐานสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนจากสารสกัดอินทรีย์หรือสารสกัดจากสาหร่ายที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการให้ความรู้และแนะนำเกษตรกรในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดอินทรีย์ได้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

กรมวิชาการเกษตร

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการเตรียมอนุพันธ์ (Derivatize) กรดอะมิโน

1.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ในสารละลาย 0.1 N HCl โดยเตรียม Stock standard ที่ความเข้มข้นประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียม Working standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำเป็น Standard calibration curve และ Spike ลงในตัวอย่าง

1.2. เตรียมสารอนุพันธ์กรดอะมิโนโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่กรองผ่าน PVDF syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน Vial ขนาด 1 มิลลิลิตร (Recovery vial) เติมสารละลาย Borate buffer ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และเติม Solvent 2A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

1.3. การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน (ดัดแปลงจาก Fang Zeng *et al*., 2015) ดังนี้

Column	:	Athena C18, 5 µm, 4.6 mm x 150 mm
Column Temp.	:	35 °C
Detector	:	Wavelength λex=250 nm, λem = 395 nm
Mobile phase	:	A = Eluent A (Sodium acetate trihydrate+Triethylamine)
		B = Acetonitrile
Elution	:	Gradient
Flow rate	:	1.0 ml/min.
Injection volume	:	5 µl
Run Time	:	30 min.

2. ศึกษา Gradient profile สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกกรดอะมิโน 5 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid, Glutamic acid, Proline Phenylalanine และ Tryptophan โดยมีวิธีการทดสอบ คือเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และProline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยทดสอบการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ โดยอัตราส่วนสาร A : สาร B ตามอัตราส่วนดังนี้ 35: 65, 45: 55, 50:50 และ 70:30 ตามลำดับ ผลการทดสอบที่ได้นำมาพิจารณาค่าการแยก (Resolution) ของสารต้องมากกว่า 2

3. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

กรมวิชาการเกษตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid, และProline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตรนำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์

3.1. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1) ความเข้มข้น 140 mM sodium acetate trihydrate + 17 mM triethylamine
2) ความเข้มข้น 100 mM sodium acetate trihydrate + 12 mM triethylamine
3) ความเข้มข้น 70 mM sodium acetate trihydrate + 8.5 mM triethylamine
4) ความเข้มข้น 50 mM sodium acetate trihydrate + 6 mM triethylamine

3.2. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่มีการปรับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ตามข้อ ผลทดสอบที่ได้นำมาพิจารณาค่าการแยก (Resolution) ของสารต้องมากกว่า 2

4. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโน

4.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8, 10, 12 และ 15 นาที ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสม ที่มีการปรับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ผลทดสอบที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % Recovery

5. ศึกษาความคงสภาพของกรดอะมิโนหลังการเตรียมอนุพันธ์

5.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสม

5.2. นำสารละลายไปเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาทดสอบหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนในวันที่ 2, 4 และ 6

5.3. ผลทดสอบที่ได้นำมาคำนวณหา % Recovery เปรียบเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น

6. การหาความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีทดสอบ

6.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตรและ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร สารละลายแบลงค์และสารละลายตัวอย่างกรดอะมิโน 3 ลักษณะ ได้แก่ ตัวอย่างกรดอะมิโนที่มีลักษณะใส ข้นหนืด และชนิดผง ที่ Spike สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด

ศรีนครินทรวิโรฒ

นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสม ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่

6.2. พิจารณาโครมาโทแกรม โดยดูว่ามีโครมาโทแกรมมีสารอื่นมาปลอมปนหรือรบกวนโครมาโทแกรมของสาร Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan หรือไม่

7. การพิสูจน์ Matrix effect

7.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan อย่างละ 5 ความเข้มข้น จำนวน 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ไม่เติมสารละลายตัวอย่าง ส่วนชุดที่ 2 เติมสารละลายตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสม ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสม

7.2. นำผลความชันที่ได้มาคำนวณหาค่า %RPD ซึ่งมีเกณฑ์กำหนด < 10 ตามมาตรฐาน NATA, 2018

8. การหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยวิเคราะห์แบบ Intermediate ไม่ต่ำกว่า 10 ซ้ำ ที่ทำต่างเวลากัน

ผลทดสอบที่ได้นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = 3\,S'_0$$

$$LOQ = 10\,S'_0$$

9. การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ที่เติมใน Sample blank ที่มีความเข้มข้น ระดับ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ นำสารละลายที่ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์แบบ Intermediate ไม่ต่ำกว่า 10 ซ้ำ ที่ทำต่างเวลากัน คำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนและประเมินความถูกต้อง โดยพิจารณาค่า %Recovery อยู่ในช่วง 80-110 และประเมินความเที่ยง โดยพิจารณาจากค่า HorRat ≤ 1.3 (AOAC, 2016)

10. หาค่าช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Range) ของวิธี

10.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ใน Sample blank จำนวน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสม ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

10.2. สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) กับ Response (y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับที่ค่า $r \geq 0.995$

11. การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

กรมวิชาการเกษตร

11.1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ใน Sample blank ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง นำสารละลายไปเตรียมอนุพันธ์ นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยวิเคราะห์แบบ Intermediate ไม่ต่ำกว่า 10 ซ้ำ ที่ทำต่างเวลากัน

11.2. คำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนและประเมินความถูกต้องโดยพิจารณาค่า Recovery ต้องอยู่ในช่วง 80-110% และประเมินความแม่นโดยพิจารณาจากค่า HorRat ≤ 1.3

12. ทดสอบความคงทนของวิธี (Ruggedness)

ทำการทดสอบ Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยปรับเปลี่ยนสภาวะที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์กรดอะมิโน ได้แก่ ระยะเวลาในการ Incubate ตัวอย่าง ชนิดของตัวทำละลาย และชนิดของตัวกรองซึ่งมีวิธีการทดสอบโดย เตรียม Sample blank ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยเติมกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร คำนวณหาความเข้มข้น ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้ t-test

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี มีผลการศึกษาดังนี้

1. การศึกษาปรับอัตราส่วนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (Gradient profile) สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน

จากผลการศึกษา Gradient profile ที่เหมาะสมในการแยกพีกของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดออกจากสารชนิดอื่นๆ ได้มีการปรับ Gradient profile เริ่มต้น โดยใช้ Solvent A เป็น Eluent A (Sodium acetate trihydrate+Triethylamine) และ Solvent B เป็น Acetonitrile ตามเวลาและอัตราส่วน ดังนี้ นาทีที่ 0-10 : (95:5-90:10) นาทีที่ 10-19 : (90:10-80:20) นาทีที่ 19-23 : (80:20-40:60) นาทีที่ 23-25 : (40:60- 95:5) นาทีที่ 25-30 : (95:5-95:5) และทำการฉีดสารมาตรฐานของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดตามสภาวะข้างต้นพบว่า สภาวะดังกล่าวสามารถทำให้พีกของกรดอะมิโนที่สนใจศึกษาแยกออกมาดังนี้ กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ตามลำดับ ซึ่งพีกของ Aspartic acid และ Glutamic acid แยกออกจากพีกอื่นได้ดี แต่พีกกรดอะมิโน Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ยังไม่สามารถแยกออกจากพีคอื่นได้จึงทำการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในนาทีที่ 23 เพื่อให้พีกของ Proline, Phenylalanine และ Tryptophan แยกออกจากพีกอื่นได้ดียิ่งขึ้นซึ่งทำให้ได้ค่าการแยก (Resolution, Rs) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าการแยกของกรดอะมิโนตามการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนต่างๆ

กรมวิชาการเกษตร

Amino acid	ค่าการแยกของกรดอะมิโนตามการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่				
	40:60	50:50	55:45	65:35	70:30
Aspartic acid	5.9	6.1	6.2	6.1	6.0
Glutamic acid	5.1	5.1	5.1	5.1	5.0
Proline	1.6	1.6	1.6	2.5	2.4
Phenylalanine	1.8	1.4	1.3	1.2	2.2
Tryptophan	0.0	1.6	1.3	1.6	2.0

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าสภาวะที่ใช้ทดสอบโดยปรับอัตราส่วนของ Eluent A ต่อ Acetonitrile เป็น 70:30 สามารถแยกกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ออกจากพีกอื่นได้ดี มีค่า Retention time ที่เวลา 7.60, 8.63, 15.59, 25.11 และ 25.34 ตามลำดับ และมีค่าการแยกมากกว่า 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด แต่เมื่อมีการฉีดสารจำนวนหลายๆ ซ้ำ พบว่ายังมีสารอื่นเกิดขึ้นจากการ Derivatize คงค้างอยู่ในคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ทำให้เกิดการสะสม ส่งผลรบกวนพีกที่สนใจทำให้ไม่สามารถคำนวณผลการวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับ Gradient profile เพื่อลดการสะสมของสารอื่นในคอลัมน์โดยเพิ่มการล้างคอลัมน์ด้วย Solvent เพื่อไล่สิ่งสกปรกออกจากคอลัมน์ก่อนมีการฉีดสารต่อไป ซึ่งได้ผลการปรับ Gradient profile แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Gradient profile ที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดอะมิโน 5 ชนิดหลังการปรับอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่

Time (min.)	Flow rate (ml/min.)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Curve
0	1.0	95	5	6
10	1.0	90	10	6
19	1.0	80	20	6
23	1.0	70	30	6
25	1.0	95	5	6
26	1.0	95	5	6
27	1.0	30	70	6
30	1.0	30	70	6
31	1.0	95	5	2
35	1.0	95	5	6

จากตารางที่ 2 เป็น Gradient profile ที่มีการปรับอัตราส่วนเพื่อทำความสะอาดคอลัมน์เพิ่มขึ้น จึงทำให้ระยะเวลาการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น และจากการทดสอบฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ หลายๆ ซ้ำ พบว่าพีกที่สนใจศึกษาสามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้น ไม่มีพีกอื่นๆ รบกวนพีกที่สนใจศึกษา ดังนั้นจึง

กรมวิชาการเกษตร

ได้นำสภาวะนี้ไปใช้ในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนต่อไป

1.1. ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate กับ Triethylamine ซึ่งเป็นการเลี่ยงการใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง หรือมีความเป็นกรดอ่อนๆ หากใช้ไปนานๆ อาจจะเกิดการสะสมจากเกลือของบัฟเฟอร์ตามอุปกรณ์ข้อต่อของเครื่อง HPLC ทำให้เกิดการอุดตันของท่อ และข้อต่อได้ จึงมีการปรับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ให้ลดลง ซึ่งผลการทดสอบได้พิจารณาจากค่าการแยกของกรดอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 3

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ค่าการแยกสารของการศึกษาความเข้มข้นสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน จำนวน 5 ชนิด

Amino acids	Resolution			
	50 mM sodium acetate trihydrate + 6 mM triethylamine	70 mM sodium acetate trihydrate + 8.5 mM triethylamine	100 mM sodium acetate trihydrate + 12 mM triethylamine	140 mM sodium acetate trihydrate + 17 mM triethylamine
Aspartic acid	5.6	5.5	5.7	5.6
Glutamic acid	4.6	4.6	4.8	4.8
Proline	1.6	1.8	2.0	2.2
Phenylalanine	3.9	3.1	3.8	3.5
Tryptophan	1.9	2.0	2.0	2.0

จากตารางที่ 3 แสดงค่าการแยกซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกว่าพีกของสารทั้งสองพีกที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันได้มากน้อยเพียงใด โดยมีเกณฑ์การยอมรับค่า Resolution มากกว่า 2 จากผลการทดสอบพบว่าเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 140 mM Sodium acetate trihydrate + 17 mM Triethylamine และที่ความเข้มข้น 100 mM Sodium acetate trihydrate + 12 mM Triethylamine เป็นสารละลาย Mobile phase ทำให้พีกของกรดอะมิโนทุกตัวแยกออกจากกันได้ดี แต่เมื่อลดความเข้มข้นเป็น 70 mM Sodium acetate trihydrate + 8.5 mM Triethylamine ทำให้การแยก Proline เกิดขึ้นไม่ดี ส่วนการใช้ความเข้มข้น 50 mM Sodium acetate trihydrate + 6 mM Triethylamine ทำให้ทั้งกรดอะมิโน Proline และ Tryptophan มีค่า Resolution ที่ต่ำกว่า 2 ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 100 mM Sodium acetate trihydrate + 12 mM Triethylamine ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ซึ่งทำให้ค่า Resolution ของกรดอะมิโนทุกชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับ

1.2. ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารอนุพันธ์

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารอนุพันธ์ โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 10 12 และ 15 นาที ตามลำดับ เพื่อเป็นการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารอนุพันธ์ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงการทำปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ของสารและทำให้ทราบว่ากรดอะมิโนจะมีการสลายตัวไปได้มากน้อยเพียงใด เมื่อใช้ระยะเวลาในการทำอนุพันธ์เพิ่มขึ้น ซึ่งพิจารณาจาก % Recovery ซึ่งผลทดสอบแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบ % Recovery ในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนที่ระยะเวลาต่างๆ

Amino acids	%Recovery			
	8 นาที	10 นาที	12 นาที	15 นาที
Aspartic acid	98.71	100.24	92.66	84.79
Glutamic acid	98.77	100.42	95.00	87.75

กรมวิทยาศาสตร์

Proline	99.33	100.33	94.06	93.45
Phenylalanine	98.64	100.42	96.96	95.20
Trtptophan	100.01	99.86	97.69	96.41

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนนั้นมีความสำคัญมาก การเกิดอนุพันธ์ที่สมบูรณ์จะเกิดได้ในระยะเวลา 10 นาที (Waters,1996) หากใช้ระยะเวลาที่ต่ำกว่า การเกิดอนุพันธ์อาจจะยังไม่สมบูรณ์ จากการทดลองพบว่า Aspartic acid, Glutamic acid, Proline และ Phenylalanine เกิดอนุพันธ์ได้ 98-99% ในระยะเวลา 8 นาที และเกิดได้ 100% เมื่อใช้ระยะเวลา 10 นาที ส่วน Tryptophan สามารถเกิดอนุพันธ์สมบูรณ์ได้ตั้งแต่นาทีที่ 8-10 สามารถเกิดอนุพันธ์ได้มากถึง 99-100% และทุกสารมีแนวโน้มของการเกิดอนุพันธ์ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความร้อนที่สะสมและระยะเวลาที่นานเกิดไปทำให้สารที่เกิดอนุพันธ์นั้นสลายตัวไปได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องใช้ความระมัดระวังเรื่องระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนให้มาก

1.3. ผลการศึกษาความคงสภาพของกรดอะมิโนหลังการทำอนุพันธ์

กรดอะมิโนที่ได้ Derivatize แล้วไม่สามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารที่นำมาใช้ในการก่ออนุพันธ์ สารก่ออนุพันธ์บางตัวอาจจะทำให้มีความคงสภาพได้มากกว่าสัปดาห์ แต่สารบางตัวอาจจะทำให้มีความคงสภาพได้เพียงไม่กี่นาที ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาความคงสภาพของกรดอะมิโนที่ทำ Derivatize แล้ว เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาที่สามารถวิเคราะห์หรือเก็บรักษากรดอะมิโนที่จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนแต่ละชนิดภายหลังจากการทำ Derivatize และเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ในวันที่ 2, 4 และ 6 ซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้คิดเป็น %Recovery ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 %Recovery และผลต่างของกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ในระยะเวลาต่างๆ

Amino acids	%Recovery			Difference of %Recovery		
	2 วัน	4 วัน	6 วัน	D0-D2	D0-D4	D0-D6
Aspartic acid	99.51	97.32	96.69	0.49	2.68	3.31
Glutamic acid	99.46	98.93	97.01	0.54	1.07	2.99
Proline	99.20	97.87	94.98	0.80	2.13	5.02
Phenylalanine	99.31	98.88	98.84	0.69	1.12	1.16
Tryptophan	99.47	98.45	96.47	0.53	1.55	3.53

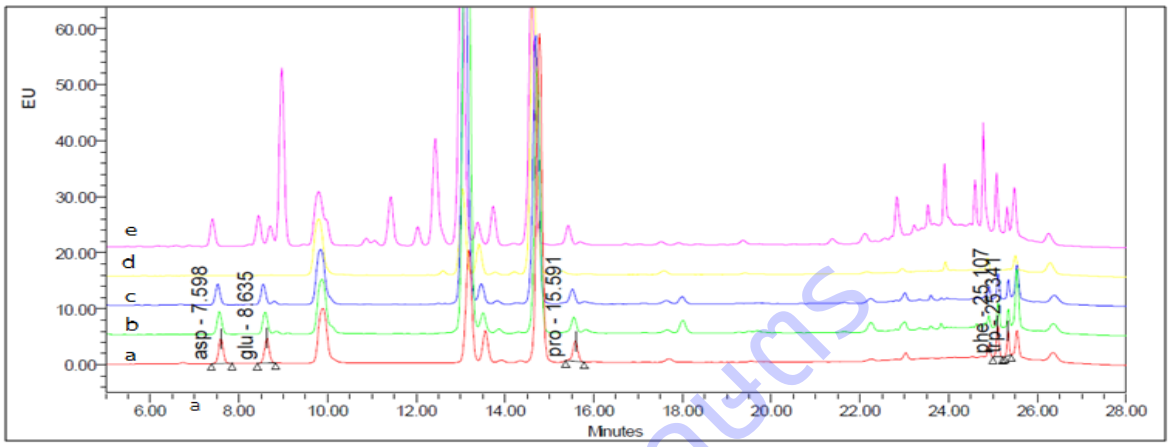
จากตารางที่ 5 แสดง %Recovery ของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดที่ทำการวิเคราะห์ในวันที่ 2, 4 และ 6 เทียบกับปริมาณกรดอะมิโนเริ่มต้น พบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์หลังจาก Derivatize แล้วระยะเวลา 2, 4 และ 6 วัน มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่ากรดอะมิโน Phenylalanine ค่อนข้างมีความเสถียร มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย และปริมาณของกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Tryptophan ลดลงอย่างช้าๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของกรดอะมิโน Proline มีแนวโน้มลดลงอย่างมากถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ระยะเวลา 6 วัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการสลายตัวของกรดอะมิโนตามระยะเวลาที่เก็บไว้ ดังนั้นหลังจากการ Derivatize กรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิดแล้วควรนำมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิเคราะห์ทันที และสามารถเก็บสารไว้วิเคราะห์ครั้งต่อไปได้ภายในระยะเวลา 4 วัน ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนจะยังคงสภาพอยู่ได้ถึง 97.32-98.93%

1.4. ผลของทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ผลการทดสอบ Specificity ของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิด โดยพิจารณาจากโครมาโทแกรมของสารละลายแบล็งค์ สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน และตัวอย่างสารสกัด 3 ลักษณะ ที่มีการ Spike สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด ซึ่งมีผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของ a) สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนผสม 5 ชนิด b) ตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใส c) ตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายชนิดผง d) สารละลายแบล็งค์ และ e) ตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืด

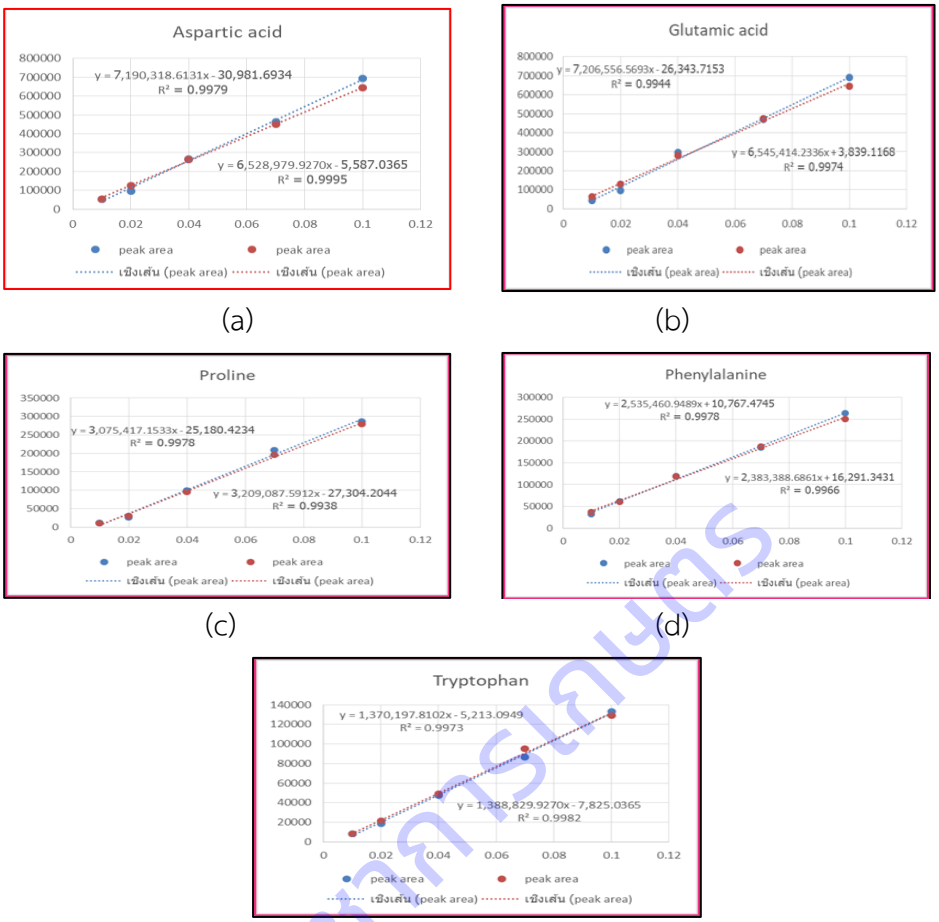
จากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าโครมาโทรแกรมของตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดพบว่า ตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสและชนิดผง ไม่มีสารแปลกปลอมอื่นมารบกวนหรือซ้อนทับโครมาโทแกรมของกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ส่วนสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืด พบว่ามีพีกอื่นมารบกวนพีกของกรดอะมิโน Glutamic acid และ Trptophan ซึ่งพิจารณาจากค่าการแยกทั้ง 2 พีกมีค่าการแยกน้อยกว่า 2 ส่วนกรดอะมิโน Aspartic acid Proline และ Phenylalanine ไม่มีพีกของสารอื่นรบกวนหรือซ้อนทับ นั่นแสดงว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสและชนิดผง ส่วนในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับกรดอะมิโนบางตัวเท่านั้น

1.5. ผลการทดสอบ Matrix effect

จากการทดสอบ Matrix effect ของการวิเคราะห์กรดอะมิโนผสม 5 ชนิดในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใส ซึ่งผลจากการพล็อตกราฟสารมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้น และพิจารณาความต่างสัมพัทธ์ (%RPD) ของความชันของกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด พบว่า กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan มี %RPD เท่ากับ 9.64 9.62 4.25 6.18 และ 1.35 ตามลำดับ ซึ่ง %RPD อยู่ในเกณฑ์กำหนด (%RPD < 10) ตามมาตรฐาน

กรมวิทยาศาสตร์

NATA, 2018 แสดงว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างที่เป็นสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสไม่มี Matrix effect ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงผลการศึกษา Matrix effect ของการวิเคราะห์กรดอะมิโน (a) Aspartic acid (b) Glutamic acid (c) Proline (d) Phenylalanine (e) Tryptophan ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มี

ลักษณะใส

ส่วนการศึกษา Matrix effect ในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืด พบว่า กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan มี %RPD เท่ากับ 10.14, 12.39, 45.15, 33.64 และ 0.36 ตามลำดับ ซึ่ง %RPD ของการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine มีค่าเกินเกณฑ์กำหนด (%RPD < 10) แสดงว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างดังกล่าวมี Matrix effect มีเพียงกรดอะมิโน Tryptophan ที่ไม่มี Matrix effect (ไม่แสดงรูปภาพ)

1.6. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จากการหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) โดยการเติมสารมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartiic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ลงในตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ (Sample blank) แล้วนำมาดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้นำมาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า LOD และ LOQ พบว่ากรดอะมิโน 5 ชนิดมีค่า LOD เท่ากับ 0.82, 0.68, 0.69, 0.05 และ 4.76 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่า LOQ จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 2.6, 2.3, 2.3, 0.2 และ 15.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้แสดงดัง

การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ

จากค่า LOQ ที่คำนวณได้ข้างต้น นำค่าที่ได้มาทำการพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ โดยทำการ Spike สารมาตรฐานกรดอะมิโนความเข้มข้นที่ระดับ LOQ ของกรดอะมิโนแต่ละตัวลงในสารละลายตัวอย่าง จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartiic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan มีค่า %Recovery เท่ากับ 78.73, 77.17, 70.44, 78.37 และ 75.45 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ ที่ 80-110% ตามมาตรฐาน AOAC, 2016 ของสารที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นได้มีการเจือจางสารมาตรฐานหลายเท่า ส่งผลทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้สูง ดังนั้นจึงทำการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่า มี %Recovery เท่ากับ 103.65, 100.90, 96.29, 94.94 และ 86.92 ตามลำดับ ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 80-110 % มีค่า HorRat เท่ากับ 0.17, 0.22, 0.27, 0.20 และ 0.32 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤ 1.3 ตามมาตรฐาน AOAC, 2016 ผลการทดสอบที่ได้แสดงดังตารางผนวก 1

1.7. ผลการหาค่าช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และ ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Range) ของวิธี

1.7.1. ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยทำการเตรียมสารมาตรฐานกรดอะมิโนผสม จำนวน 7 ความเข้มข้น ซึ่งกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline เตรียมที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine เตรียมที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan เตรียมที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้นำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดอะมิโน (µg/L) (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) (แกน y) พบว่า มีค่า r เท่ากับ 0.99931, 0.99950, 0.99934, 0.99973, 0.99927 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า Correlation coefficient (r) ของกราฟความสัมพันธ์ มีค่า $r > 0.995$ ซึ่งทั้งหมดผ่านเกณฑ์การยอมรับ

1.7.2. ศึกษาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Range) โดยทำการเตรียมสารมาตรฐานกรดอะมิโนรวม จำนวน 7 ความเข้มข้น ซึ่งกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline เตรียมความ

กรมวิทยาศาสตร์

เข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine เตรียมความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan เตรียมความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้นำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดอะมิโน (mg/L) (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) (แกน y) พบว่า มีค่า r เท่ากับ 0.99960, 0.99949, 0.99926, 0.99970 และ 0.99970 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า Correlation coefficient (r) ของกราฟความสัมพันธ์ มีค่า r > 0.995 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

1.8. ผลการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

1.8.1. การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ จากการพิสูจน์ Trueness โดยการหาค่า %Recovery ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นระดับต่ำ จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบพบว่ากรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan มีค่า %Recovery เท่ากับ 103.24, 103.20, 99.59, 94.34 และ 95.39 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 80-110 % มีค่า HorRat เท่ากับ 0.31, 0.43, 0.57, 0.40 และ 0.61 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤ 1.3 (AOAC, 2016)

1.8.2. การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง จากการพิสูจน์ Trueness โดยการหาค่า %Recovery ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นระดับกลาง จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบพบว่า ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 96.40, 102.82, 101.79, 98.68 และ 98.51 ตามลำดับ ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 90-107% และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.93, 0.56, 0.82, 0.53 และ 0.51 ตามลำดับ ค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤ 1.3 (AOAC, 2016) ซึ่งมีผลการทดสอบเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงดังแสดงในตารางผนวก 3

1.8.3. การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับสูง จากการพิสูจน์ Trueness โดยการหาค่า %Recovery ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นระดับสูง จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบพบว่า กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan มีค่า %Recovery เท่ากับ 95.86, 99.16, 98.91, 97.39 และ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

103.55 ตามลำดับ ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 95-105% และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.30, 0.60, 0.57, 0.65 และ 0.31 ตามลำดับ ค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤1.3 (AOAC, 2016)

1.9. ผลการทดสอบความคงทนของวิธี (Ruggedness) วิเคราะห์กรดอะมิโน

ทำการทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยทำการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงสภาวะของการเตรียมตัวอย่างโดยมีการปรับระยะเวลาของการ Incubate ตัวอย่างจากวิธีการวิเคราะห์ในสภาวะปกติใช้เวลาในการ Incubate 10 นาที เปลี่ยนเป็น 11 นาที เปลี่ยนแปลงตัวทำละลายตัวอย่างที่ใช้ในสภาวะปกติคือละลายด้วย 0.1 N HCl เป็นการละลายด้วย H_2O และเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวกรองสารละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายตัวอย่างกรดอะมิโน ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเปลี่ยนแปลงตัวกรองสารละลายที่ใช้ในสภาวะปกติคือ กรองด้วยตัวกรองชนิด Polyvinylidene fluoride (PVDF) เป็นชนิด Polyethersulfone (PES) โดยทำการทดสอบจำนวน 7 ซ้ำ จากการนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ t-test พบว่าค่า t_{stat} น้อยกว่า $t_{critical}$ ทุกค่า แสดงว่าทั้งสองสภาวะให้ผลทดสอบไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการ Incubate ตัวอย่างจึงไม่มีผลกับค่าวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan

2. ผลการหาปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์กรดอะมิโน

ผลการศึกษาปริมาณกรดอะมิโน 5 ชนิดตัวอย่างผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนที่ได้สุ่มเก็บจากร้านค้าเคมีเกษตร แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

2.1. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดจากสาหร่ายที่ไม่ระบุความเข้มข้นที่มีลักษณะใส จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโน Aspatic acid, Glutamic acid, Proline, Phenylalanine และ Tryptophan อยู่ในช่วง 0.39-135.50, 1.07-326.33, 1.11-91.25, 0.09-4.34 และ 46.67-429.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นผง จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโน Aspatic acid, Glutamic acid, Proline และ Phenylalanine อยู่ในช่วง 4.25-24.70, 0.98-11.13, 0.18-6.20 และ 7.61-48.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโน Trptophan มีปริมาณต่ำกว่าค่า LOQ

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

1. การวิเคราะห์กรดอะมิโนผสมทั้ง 5 ชนิดสามารถตรวจวัดโดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Fluorescence โดยใช้ความยาวคลื่น (Wavelength) λex เท่ากับ 250 นาโนเมตร, λem เท่ากับ 395 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ความยาว 150 มิลลิเมตร ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate+Triethylamine และ Acetonitrile โดยชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 35 นาที

กรมวิชาการเกษตร

2. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการแยกพีกของกรดอะมิโนให้ออกจากกัน โดยมีการปรับเฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient ด้วย Acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ Triethylamine ความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำให้พีกแยกจากกันได้ดี มีค่าการแยกมากกว่า 2 ระยะเวลาของการเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมใช้เวลา 10 นาที ภายหลังจากการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนมีความคงสภาพได้นานถึง 4 วัน อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์กรดอะมิโนก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการทำอนุพันธ์ซึ่งจะไม่สามารถเก็บสารที่เปิดใช้แล้วไว้ได้นานและสารที่ใช้มีราคาสูงจึงต้องมีการวางแผนการทดสอบอย่างดี

3. จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่า วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนมีความจำเพาะเจาะจงสำหรับตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสและแบบผงเท่านั้น จากการทดสอบผลของเมทริกซ์ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะสารละลายใสพบว่า มี %RPD อยู่ในช่วง 1.35-9.64 ซึ่ง %RPD อยู่ในเกณฑ์กำหนด (%RPD < 10) ตามมาตรฐาน NATA, 2018 สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะขุ่นและข้นหนืด มี %RPD เกินเกณฑ์กำหนด ยกเว้นกรดอะมิโน Tryptophan ทั้งนี้อาจจะต้องวิเคราะห์โดยวิธีทำ Standard addition และจากการหาค่า LOD มีค่าอยู่ในช่วง 0.05-4.76 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.5-50 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ มีค่าที่อยู่ในช่วงแกณฑ์ยอมรับ การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working range) กรดอะมิโนโดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) พบว่าทุกค่าผ่านเกณฑ์ยอมรับ มีค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.995 การพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง โดยประเมินจาก %Recovery ของกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด พบว่า ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มี %Recovery อยู่ในช่วง 94.34-103.24 และการพิสูจน์ความเที่ยง (Precision) ได้ค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.30-0.93 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับของ AOAC, 2016 สำหรับการตรวจสอบ Ruggedness โดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่มีผลต่อการทดสอบ และคำนวณเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนด้วยวิธีทางสถิติ t-test พบว่าทุกค่า มีค่า t_{cal} น้อยกว่า $t_{critical}$ ทั้งสิ้น

4. วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนมีขอบข่ายการวิเคราะห์ Aspartic acid, Glutamic acid, Proline อยู่ในช่วง 0.005-500 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine อยู่ในช่วง 0.005-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan อยู่ในช่วง 0.05-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่าคุณสมบัติเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและเป็นที่น่าเชื่อถือได้

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

Development and Validation of analytical method for Indole acetic acid (IAA)

and Gibberellic acid (GA_3) in chemical agricultural substances

เพชรรัตน์ ศิริวิ สุพิศสา ทองเขียว สาธิดา โพธิ์น้อย

คำสำคัญ (Key words)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ฮอร์โมนอินโดล-3-อะซิติก ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิคแอซิต

Method validation Indole acetic acid (IAA) Gibberellic acid (GA_3)

บทคัดย่อ (Abstract)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้ทำการพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างด้วย Ethyl acetate และนำมา Cleanup ด้วยเทคนิค Solid phase extraction และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-PDA โดยใช้ Column Nucleosil C_{18}, (5 µm, 4.6 mm x 150 mm) และใช้ Mobile phase เป็น 35:65 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min. จากผลการทดลองพบว่าค่า Retention time ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่วิเคราะห์ได้มีค่าเท่ากับ 9.74 และ 6.80 นาที ตามลำดับ ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.005-5.0 และ 0.05-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ค่า r เท่ากับ 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ ได้ค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ %Recovery อยู่ในช่วง 86.76-106.57 และ 81.30-104.70 ตามลำดับ และจากการประเมินค่า HorRat ที่ได้จากการทดสอบความเที่ยง พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.30-0.62 และ 0.32-0.35 ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016 ดังนั้นวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีขอบข่ายในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.013-5.00 และ 0.125-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

The analysis method for Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) in chemical agricultural substances samples was developed and validated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The sample preparation with ethyl acetate combined with solid phase extraction technique has been developed. The samples from extraction were detected by HPLC-PDA at wavelength of 206 nm. The separation was carried out on a Nucleosil C_{18} reversed-phase column, using methanol/water containing 0.025% phosphoric acid (35:65, v/v) as the isocratic mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min., the IAA and GA_3 were eluted at 9.74 and 6.80

กรมวิชาการเกษตร

min., respectively. Good linearities were found within the range of 0.005-5.0 mg/L for IAA and 0.05-5.0 mg/L for GA_3 with the correlation coefficients at 0.9998 and 0.9998, respectively. The limit of detections (LOD) were 0.001 mg/L for IAA and 0.005 mg/L for GA_3, and the limit of quantitation were 0.005 mg/L and 0.05 mg/L for IAA and GA_3, respectively. Trueness of three concentration level was in the range of 86.76-106.57 and 81.30-104.70 for IAA and GA_3, respectively. The precision of the method was tested with HorRat value, the HorRat value of IAA and GA_3 was in the range of 0.30-0.62 and 0.32-0.35for IAA and GA_3, respectively. Therefore, this method can be used for the determination of Indole acetic acid (IAA) and Gibberellic acid (GA_3) in chemical agricultural substances samples with the analytical scope in the concentration range of 0.013-5.00 and 0.125-5.00 mg/L, respectively, accurately and precisely.

บทนำ (Introduction)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators; PGRs) จัดเป็นสารสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช (Plant hormones) โดยทั่วไปมักจะเรียกสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชว่า “ฮอร์โมน” ซึ่งบทบาทหน้าที่ของฮอร์โมนพืชจะเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืชทุกขั้นตอนตั้งแต่การงอก การพัฒนาของพืช การออกดอกติดผล การพัฒนาการของผล การสุก จนกระทั่งต้นตาย ฮอร์โมนพืชเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นเองในปริมาณน้อยมาก โดยพืชจะสร้างสารดังกล่าวที่อวัยวะหรือเนื้อเยื่อส่วนหนึ่งแล้วเคลื่อนย้ายไปยังอีกส่วนหนึ่ง และมีผลต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ข่อนข้างเฉพาะเจาะจงภายในพืช หรือเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นโดยอวัยวะหรือเนื้อเยื่อนั้นและมีผลโดยตรงกับอวัยวะหรือเนื้อเยื่อนั้นๆ

Indole acetic acid (IAA) เป็นสารกลุ่มออกซิน (Auxins) ที่พืชสามารถสร้างขึ้นเองได้ สารกลุ่มนี้มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขยายขนาดของเซลล์ การแบ่งตัวของเซลล์ในแคมเบียม การขยายขนาดของใบ การเกิดราก การขยายขนาดของผล ป้องกันการหลุดร่วงของใบ ดอก ผล ยับยั้งการแตกตาข้าง ส่วนของพืชที่มีการสร้างมากคือบริเวณปลายยอด ปลายราก ผลอ่อนและบริเวณที่มีปริมาณเนื้อเยื่อเจริญอยู่มาก (Meristematic tissue) ปริมาณ IAA ในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีมากน้อยแตกต่างกันไป ส่วนที่กำลังมีการเจริญเติบโตจะมีปริมาณ IAA มาก แต่ส่วนที่มี IAA Oxidase สูงจะมีปริมาณของ IAA ต่ำ และพืชจะมีกลไกลในการรักษาระดับปริมาณ IAA ภายในเนื้อเยื่อพืช โดยมีระบบการสร้างและการทำลายไปพร้อมๆกัน เนื้อเยื่อที่กำลังมีการเจริญเติบโตจะมีการสร้างมากกว่าการทำลาย ส่วนเนื้อเยื่อที่มีอายุมากจะมีการทำลายมากกว่าการสร้าง (ทวีศักดิ์, 2559)

Gibberellic acid สารกลุ่มนี้มีทั้งที่พืชสร้างขึ้นเองและเชื้อราบางชนิดสร้างขึ้น เป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการยืดตัวของเซลล์ (Cell elongation) ช่วยขยายขนาดของผล ทำลายการพักตัวของพืช กระตุ้นการงอกของเมล็ด กระตุ้นการเจริญของพืชทั้งต้นและผล กระตุ้นการออกดอกของพืชบางชนิดหรือยับยั้งการ

กรมวิชาการเกษตร

ออกดอกของพืชบางชนิด ปรับเปลี่ยนเพศดอก ทำให้เกิดดอกเพศผู้ กระตุ้นให้เกิดผลแบบไม่มีเมล็ดในพืชบางชนิด แหล่งที่มีการสร้างจิบเบอเรลลินในพืชเช่น กิ่งที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เมล็ดและผลที่กำลังพัฒนา บริเวณที่กำลังยืดตัวเช่น ปลายยอดและปลายราก ปัจจุบันมีสารประกอบประเภทนี้มากกว่า 80 ชนิด (ทวีศักดิ์, 2559) แต่ที่มีการนำมาใช้ทางการเกษตรมากที่สุดคือสาร Gibberellic acid (GA_3) ซึ่งพืชสามารถสร้างได้ปริมาณน้อยมาก โดยสาร Gibberellic acid ที่นำมาใช้ทางการเกษตรนั้นได้มาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อราบางชนิดแล้วสกัดสารออกมา เนื่องจากปัจจุบันยังไม่สามารถสังเคราะห์สาร Gibberellic acid ได้ด้วยวิธีทางเคมี (พีรเดช, 2537)

ปัจจุบันเกษตรกรได้มีการใช้ผลิตภัณฑ์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกันอย่างแพร่หลาย ทั้งที่มีและไม่มีการขึ้นทะเบียน หรือขอใบอนุญาต วางจำหน่ายในท้องตลาดเป็นจำนวนมาก และมีการอ้างถึงสรรพคุณกันมากมาย สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจัดเป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตรชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายทางการเกษตร ซึ่งวัตถุประสงค์ของพระราชบัญญัติดังกล่าวเพื่อตรวจสอบควบคุม กำกับ ดูแล ผู้ประกอบกิจการให้ปฏิบัติตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย ทั้งนี้เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับบุคคล สัตว์ พืช ทรัพย์สิน และสิ่งแวดล้อม คุ้มครองเกษตรกร และควบคุมผู้ประกอบการ ซึ่งประโยชน์ที่เกษตรกรจะได้รับคือใช้วัตถุอันตรายที่มีคุณภาพ ลดความเสียหายที่เกิดจากการใช้ผิด ลดต้นทุนในการผลิต ผู้ประกอบการไม่กล้าละเมิดกฎหมาย และเกษตรกรถูกเอารัดเอาเปรียบในทางการค้าน้อยลง (ทวีศักดิ์, 2559)

ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรจึงต้องเป็นวิธีที่ได้มาตรฐาน และสามารถตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ได้ ซึ่งปัจจุบันวิธีการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ใช้ปริมาณสารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษในปริมาณที่สูง ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ ปัญหาสุขภาพของผู้ทำการทดลองเอง และมีค่าใช้จ่ายสูงในการกำจัดของเสียดังกล่าว นอกจากนี้วิธีการวิเคราะห์แบบเดิมยังคงมีปัญหาการถูกรบกวนของเมทริกซ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารในระดับต่ำๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สะดวกในการนำไปใช้กับเครื่องมือวิเคราะห์ เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ใน Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเตรียม Stock standard ที่ความเข้มข้นประมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารมาตรฐานของ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) เพื่อนำไปเตรียม

Intermediate standard (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) Working standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำเป็น Calibration curve และ Spike ลงในตัวอย่าง

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC เตรียมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Water รุ่น Alliance e2695, 2998 PDA-Detector) ที่เริ่มใช้ในการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ดังนี้ (ดัดแปลงมาจากวิธี Tansupo *et al.*, 2010)Column : Nucleosil C18, 5 µm, 4.6 mm x 150 mm

Guard column:Nucleosil C18, 5 µm

Temperature : 30 °C

Detector : PDA λ 208 nm

Mobile phase : 35:65 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water), pH 2.83

Flow rate : 0.8 ml/min.

Injection volume: 10 µl

Run Time : 15 min.

จากนั้นทำการทดสอบการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเครื่อง HPLC ซึ่งทั้ง 3 สภาวะ มีรายละเอียด ดังนี้

1) สภาวะที่ 1 ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC แบบ Isocratic elution ตามสภาวะของเครื่อง HPLC ที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นทำการทดสอบปรับเปลี่ยนอัตราส่วนของ Mobile phase ที่อัตราส่วน 3 อัตราส่วนดังนี้คือ อัตราส่วน 30:70 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่ pH 2.76 อัตราส่วน 35:65 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่ pH 2.83 และอัตราส่วน 40:60 (Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) ที่ pH 2.86

2) สภาวะที่ 2 ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC แบบ Isocratic elution ตามสภาวะของเครื่อง HPLC ที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นทำการทดสอบปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 0.8 ml/min. 1.0 ml/min. และ 1.2 ml/min.

3) สภาวะที่ 3 ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC แบบ Isocratic elution ตามสภาวะของเครื่อง HPLC ที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นทำการทดสอบปรับเปลี่ยนค่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ได้แก่ที่ความยาวคลื่นที่ 206, 208 และ 280 นาโนเมตร (nm)

3. การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร การเตรียมตัวอย่างก่อนนำไป Clean-up ด้วย Cartridge

ศรีวิชัยการเกษตร

1) วิธีการสกัดตัวอย่างดัดแปลงมาจากวิธีของ Tansupo *et al.* (2010) โดยทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

2) เทลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่างปรับ pH ให้เป็น 2.5 ด้วยสารละลาย HCl และสารละลาย KOH

3) นำมาสกัดด้วย Ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

4) นำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Evaporator ที่อุณหภูมิ 40-42 °C

5) นำมาละลายด้วยสารละลาย 1% Formic acid และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไป Clean-up ด้วย Cartridge ต่อไป

4. หาชนิดของ SPE-Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

4.1. ทำการศึกษาชนิดของ SPE-Cartridge จำนวน 3 ชนิด คือ SSQAX Cartridge, HR-XA Cartridge และ HLB Cartridge ชนิดละ 3 ซ้ำ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปผ่านลงใน SPE-Cartridge แต่ละชนิด จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

4.2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างด้วย SPE-Cartridge ที่ได้จากข้อ 7.3.3.2 โดยทำการทดลองที่สภาวะละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างทั้งหมด 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้ (Tansupo *et al.*, 2010)

1) ขั้นตอนการ Pre-condition column ด้วย Methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

2) ขั้นตอนการ Equilibrate column ด้วยสารละลาย 1.0 M Formic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

3) ขั้นตอนการ Load ตัวอย่างลงใน Column ใช้ตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

4) ขั้นตอนการ Wash column ด้วยสารละลาย 10 mM Potassium di hydrogen phosphate ที่ pH 7.0 ปริมาตร 5 ml จำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง และ Methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง ตามลำดับ

5) ขั้นตอนการ Elute สารที่เราสนใจออกจาก Column ด้วยสารละลาย 1.0 M Formic acid ใน Methanol ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

วิธีที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้ (Cui *et al.*, 2015)

1) ขั้นตอนการ Pre-condition column ด้วย Methanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

2) ขั้นตอนการ Equilibrate column ด้วยสารละลาย 1.0 M Formic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

3) ขั้นตอนการ Load ตัวอย่างลงใน Column ใช้ตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

กรมวิชาการเกษตร

4) ขั้นตอนการ Elute สารที่เราสนใจออกจาก Column ด้วยสารละลาย 1.0 M Formic acid ใน Methanol ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร จำนวน 1 ครั้ง

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างด้วย SPE-Cartridge ที่ได้จากข้อ 7.3.3.3 โดยทำการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างดังนี้

5.1. ศึกษาความเข้มข้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ Cartridge ชนิด HR-XA สามารถจุได้ ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.5, 5.0, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนนำไปผ่านลงใน Cartridge ชนิด HR-XA และวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

5.2. ศึกษาปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ใช้ในการผ่านลงใน Cartridge ชนิด HR-XA ที่ปริมาตรละ 3 ซ้ำ โดยทำการศึกษาที่ปริมาตรสารตัวอย่างเท่ากับ 3.0, 5.0 และ 7.0 มิลลิลิตร นำไปผ่านลงใน Cartridge ชนิด HR-XA และวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC

6. เปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น

ทำการทดสอบการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการทดสอบ Sample blank (ตัวอย่างที่มีสาร IAA และ GA_3 ในระดับต่ำๆ หรือไม่มี) ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบของแต่ละวิธีจำนวน 10 ซ้ำ นำผลการทดสอบแต่ละวิธีที่ได้มาคำนวณหาค่าทางสถิติ (t-test) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $t_{stat} < t_{crit}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

7. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยวิธี HPLC

7.1. หาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Selectivity หรือ Specificity) ของวิธีวิทดสอบ

ทำการทดสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มขัน 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่มี Matrix ที่แตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 3 ชนิดตัวอย่าง โดยทำการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของ Matrix ที่อยู่ในแต่ละตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มขัน 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

1) ตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์มีลักษณะเป็นสารละลายใส

2) ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติมีลักษณะเป็นสารละลายสีดำข้น เหนียวหนืด

3) ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืชเช่น กรดอะมิโน ฮิวมิก มีลักษณะเป็นสารละลายสีเขียว, สีเหลือง, สีน้ำตาล และสีดำ ข้น เหนียวหนืด

7.2. ศึกษาผลของ Matrix effect ของวิธีทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

ทำการทดสอบ Matrix calibration curve เปรียบเทียบกับ Standard calibration curve ของสาร IAA และ GA_3 ที่ช่วงความเข้มข้น 0.05-0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกเตรียมในสารละลาย Mobile phase (35:65;Methanol:0.025% H_3PO_4 in Water) และชุดที่ 2 เตรียมใน Matrix ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการ (Sample blank) ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป (แกน x) กับค่าพื้นที่ใต้พีกที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC (แกน y) จากนั้นนำค่าความชันจากสมการเส้นตรงที่ได้จากทั้ง 2 ชุดการทดสอบมาเปรียบเทียบกัน โดยพิจารณาค่า %RPD ในการเปรียบเทียบ ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับ < 10% ตาม NATA, 2018

7.3. หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยทำการทดสอบ Sample blank (ตัวอย่างที่มีสาร IAA และ GA_3 ในระดับต่ำๆ หรือไม่มี) ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ลงใน Sample blank ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ 10 ซ้ำ และต่างวันเวลา บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = 3\ S'_0$$

$$LOQ = 10\ S'_0$$

7.4. การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ โดยทำการทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับ LOQ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และต่างวันเวลา นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยมีเกณฑ์การยอมรับ %Recovery อยู่ในช่วง 80-110 (AOAC, 2016) และประเมินค่า Precision ด้วยการหาค่า HorRat เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

7.5. หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (Range) โดยเตรียมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานกับค่าพื้นที่ใต้พีคที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับที่ค่า $r \geq 0.995$

7.6. พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) โดยทำการทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และต่างวันเวลา นำผลการวิเคราะห์มาคำนวณทางสถิติ ประเมินค่า Trueness โดยมีเกณฑ์การยอมรับ %Recovery อยู่ในช่วง 80-110 (AOAC, 2016) และประเมินค่า Precision ด้วยการหาค่า HorRat เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

กรมวิชาการเกษตร

7.7. ทดสอบความคงทนของวิธี (Ruggedness) โดยปรับเปลี่ยนสภาวะที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) อย่างน้อย 3 สภาวะดังนี้ การทดสอบปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด การทดสอบค่า pH ที่ใช้ในการสกัด และการทดสอบปริมาณ Solvent ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง

8. วิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างจริงของผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

9. คำนวณผลการทดสอบ ประเมินผล และรวบรวมผลการทดสอบ

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

1.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของ Mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC

ทำการทดสอบอัตราส่วนของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค HPLC ระหว่างอัตราส่วนของ Methanol และสารละลาย 0.025% H_3PO_4 มีทั้งหมด 3 อัตราส่วนดังนี้คือ อัตราส่วน 30:70 (Methanol: 0.025% H_3PO_4 in Water, pH 2.76) อัตราส่วน 35:65 (Methanol: 0.025% H_3PO_4 in Water, pH 2.83) และอัตราส่วน 40:60 (Methanol: 0.025% H_3PO_4 in Water, pH 2.86) ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

อัตราส่วน Mobile phase	Retention time (R_t) ของสาร GA_3 (min.)	Retention time (R_t) ของสาร IAA (min.)
30:70	10.99	14.63
35:65	6.80	9.74
40:60	4.82	7.02

จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC ที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วน 35:65 ที่อัตราส่วน 30:70 ใช้เวลาในการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากคอลัมน์นานเกินไป และที่อัตราส่วน 40:60 ใช้เวลาในการแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากคอลัมน์เร็วเกินไปและทำให้ Base line ในการวิเคราะห์สารไม่นิ่งเท่าที่ควร

กรมวิชาการเกษตร

ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วน Mobile phase ที่ 35:65 (Methanol: 0.025% H_3PO_4 in Water, pH 2.83) ในการทดลองต่อไป

1.2 ผลการศึกษาอัตราการไหลของ Mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC

ทำการทดสอบอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเทคนิค HPLC ที่อัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 0.8, 1.0 และ 1.2 mL/min. ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ใช้ในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC

อัตราการไหลของ Mobile phase (mL/min.)	Retention time (R_t) ของสาร GA_3 (min.)	Retention time (R_t) ของสาร IAA (min.)
0.8	8.44	12.11
1.0	6.80	9.74
1.2	5.66	8.09

จากผลการทดลองพบว่าอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 1.0 mL/min. ให้ผลในการแยกสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ออกจากกันดีที่สุดและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นานเกินไป ส่วนที่อัตราการไหลที่ 0.8 ml/min. ให้ผลในการแยกสารทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้ดี แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเกินไป และที่อัตราการไหลที่ 1.2 mL/min. ให้ผลในการแยกสารออกจากกันดี และใช้เวลาในการวิเคราะห์สารน้อยกว่าทั้ง 2 อัตราการไหล แต่มีข้อเสียคือถ้าใช้อัตราการไหลของ Mobile phase สูงเกินไปจะทำให้แรงดัน (Pressure) ของระบบเครื่อง HPLC สูงเกินไปเสี่ยงต่อการชำรุดเสียหายของเครื่องมือวิเคราะห์ และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดไม่ได้แตกต่างจากอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 1.0 mL/min. มากเกินไป ดังนั้นจึงเลือกอัตราการไหลของ Mobile phase ที่ 1.0 ml/min. ในการทดลองต่อไป

1.3 ผลการศึกษาความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC- PDA

ทำการทดสอบความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 3 ความยาวคลื่นคือ ความยาวคลื่นที่ 206, 208 และ 280 นาโนเมตร จากการทดลองพบว่าที่ความยาวคลื่น 206 นาโนเมตร ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร ทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันค่อนข้างสูง ส่วนที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) สูง แต่ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Gibberellic acid (GA_3) ปานกลาง และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) สูง แต่ให้ Sensitivity ในการตรวจวัดปริมาณสาร

กรมวิชาการเกษตร

Gibberellic acid (GA_3) ต่ำ ดังนั้นจึงเลือกความยาวคลื่นที่ 206 นาโนเมตร ในการตรวจวัดปริมาณสารทั้ง 2 ชนิด ในการทดลองต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

2. ผลการศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

2.1 ผลการศึกษาชนิดของ SPE-Cartridge ที่เหมาะสมในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

ทำการทดสอบชนิดของ SPE-Cartridge ที่จะนำไปใช้ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) จำนวน 3 ชนิด คือชนิด SSQAX, HR-XA และ HLB Cartridge ชนิดละ 3 ซ้ำ โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปผ่านลงใน Cartridge แต่ละชนิด จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC แล้วคำนวณหาค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการ Elute ออกจาก SPE-Cartridge แต่ละชนิด ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการ Elute ออกจาก SPE-Cartridge แต่ละชนิด

ชนิดของ Cartridge	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
SSQAX Cartridge	67.83	101.26
HR-XA Cartridge	81.86	101.00
HLB Cartridge	99.73	21.18

จากผลการทดลองพบว่าค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการแยกด้วย Cartridge ชนิด SSQAX ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 67.83 และ 101.26 ตามลำดับ Cartridge ชนิด HR-XA ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 81.86 และ 101.00 ตามลำดับ และ Cartridge ชนิด HLB ให้ค่า %Recovery มีค่าเท่ากับ 99.73 และ 21.18 ตามลำดับ ซึ่งจากการพิจารณาค่า %Recovery ในการแยกสารทั้ง 2 ชนิด ด้วย Cartridge ชนิด HR-XA ให้ค่า %Recovery ดีที่สุด และค่า %Recovery ที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016 ดังนั้นจึงเลือก Cartridge ชนิด HR-XA ในการทดลองต่อไป

2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของ Cartridge ที่ใช้ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

ทำการทดสอบสภาวะที่จะนำไปใช้ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วย HR-XA Cartridge จำนวน 2 สภาวะการทดลอง สภาวะละ 3 ซ้ำ โดยทำการทดสอบด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำไปผ่านลงใน HR-XA Cartridge จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC แล้วคำนวณหาค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ

กรมวิชาการเกษตร

Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการ Elute ออกจาก HR-XA Cartridge ซึ่งแต่ละสภาวะการทดลองให้ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 แสดงค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการ Elute ออกจาก HR-XA Cartridge ของทั้ง 2 วิธี

วิธีการทดสอบ	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
วิธีที่ 1	101.22	94.18
วิธีที่ 2	99.49	96.90

จากผลการทดลองพบว่าวิธีที่ 2 ให้ค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ดีกว่าวิธีที่ 1 ซึ่งมีค่า %Recovery มีค่าเท่ากับ 99.49 และ 96.90 ตามลำดับ และยังมีขั้นตอนการดำเนินงานที่ง่ายและรวดเร็วกว่า ดังนั้นจึงเลือกวิธีที่ 2 ในการทดลองต่อไป

2.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ HR-XA Cartridge สามารถจุได้

ทำการทดสอบความเข้มข้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ HR-XA Cartridge สามารถจุปริมาณความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดไว้ใน Cartridge ได้ ที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยทำการทดสอบด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.5, 5.0, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านลงใน HR-XA Cartridge และวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC แล้วคำนวณหาค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ผ่านการ Elute ออกจาก HR-XA Cartridge ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ HR-XA Cartridge สามารถจุปริมาณความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดไว้ใน Cartridge ได้

ความเข้มข้นของสาร	%Recovery	
GA_3 และ IAA (ppm)	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
0.5	103.91	83.27
5.0	104.28	87.81
10	100.54	91.24
20	93.88	97.87

จากผลการทดลองพบว่าค่า %Recovery ของทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบยังให้ค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016 ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร Cartridge ชนิด HR-XA สามารถจุปริมาณสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ไว้ใน Cartridge ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กรมวิชาการเกษตร

2.4 ผลการศึกษาปริมาณสารตัวอย่างที่เหมาะสมที่ใช้ในการผ่านลงใน HR-XA Cartridge

ทำการทดสอบปริมาณของสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ใช้ในการผ่านลงใน HR-XA Cartridge เพื่อให้เกิดความเหมาะสมกับความสามารถในการจุสารของ Cartridge ซึ่งจะทำให้การแยกสารมีประสิทธิภาพ ปริมาตรละ 3 ซ้ำ โดยทำการทดสอบด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปผ่านลงใน HR-XA Cartridge ที่ปริมาตรสารตัวอย่างที่ 3.0, 5.0 และ 7.0 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC แล้วคำนวณหาค่า %Recovery ที่ผ่านการ Elute ออกจาก HR-XA Cartridge ในแต่ละปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงค่า %Recovery ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ใช้ในการผ่านลงใน HR-XA Cartridge ที่ปริมาณของสารตัวอย่างต่างๆ

ปริมาณสารตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	%Recovery	
	Indole acetic acid (IAA)	Gibberellic acid (GA_3)
3.0	75.77	103.66
5.0	98.11	103.34
7.0	101.81	109.85

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 75.77 และ 103.66 ตามลำดับ ที่ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 98.11 และ 103.34 ตามลำดับ และที่ปริมาตร 7.0 มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 101.81 และ 109.85 ตามลำดับ จากการพิจารณาค่า %Recovery ของสารทั้ง 2 ชนิด ที่แต่ละปริมาตรแล้วพบว่า ที่ปริมาณของสารตัวอย่างที่ 5.0 มิลลิลิตร ให้ค่า %Recovery ดีที่สุด และค่า %Recovery ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาตรที่ 5.0 มิลลิลิตร ในการทดลองต่อไป

3. ผลการเปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้น

ทำการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ลงใน Sample blank ที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบของแต่ละวิธีจำนวน 10 ซ้ำ นำผลการทดสอบแต่ละวิธีที่ได้มาคำนวณหาค่าทางสถิติ (t-test) พบว่าค่า t_{stat} ที่คำนวณได้จากการเปรียบเทียบวิธีเดิมที่มีในห้องปฏิบัติการและวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} > t_{Critical}$ ทั้ง 2 สาร แสดงว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผลการเปรียบเทียบการทดสอบแสดงดังตารางที่ 7

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เดิมที่มีในห้องปฏิบัติการ และวิธีใหม่ที่ได้พัฒนาขึ้นของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.10 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชนิดของสาร	ค่า t-test ที่คำนวณได้		ผลการเปรียบเทียบ
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
IAA	9.87	2.11	*S
GA_3	5.68	2.10	*S

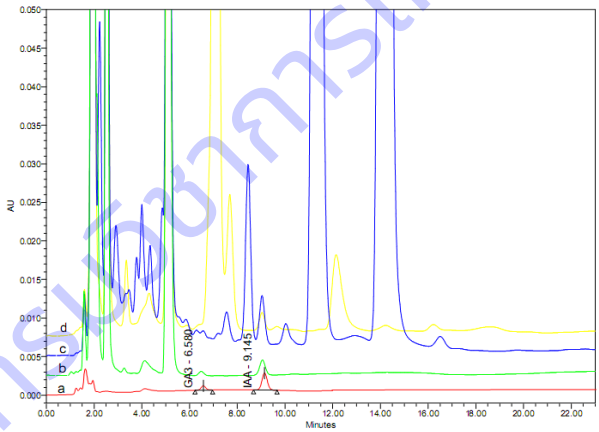
ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

4. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ด้วยเทคนิค HPLC ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

4.1 หาความจำเพาะเจาะจง (Selectivity หรือ Specificity) ของวิธีทดสอบ

ทำการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในตัวอย่างที่มี Matrix แตกต่างกันจำนวน 3 ชนิดตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติ และตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืช ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ จากนั้นนำโครมาโทแกรมที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง HPLC-PDA มาเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน IAA และ GA_3 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 4 จากการพิจารณาโครมาโทแกรมที่ได้ของตัวอย่างแต่ละ Matrix เทียบกับสารมาตรฐาน พบว่าโครมาโทแกรมของตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์มีความจำเพาะในการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มากที่สุด เนื่องจากพีกของสาร IAA และ GA_3 ไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นที่มีอยู่ใน Matrix ของตัวอย่างชนิดนี้ ส่วนตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติและตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืช พบว่าพีกของสาร IAA ไม่ถูกรบกวน แต่พีกของสาร GA_3 ถูกรบกวนจากสารอื่นที่มีอยู่ใน Matrix ของตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำให้วิธีนี้ไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมกับการวิเคราะห์สาร IAA และ GA_3 ในตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ที่มีลักษณะตัวอย่างเป็นสารละลายใส ไม่เหนียวหรือไม่ข้นหนืดเท่านั้น



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของ a) สารมาตรฐาน IAA และ GA_3 b) ตัวอย่างสารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ c) ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายเข้มข้นจากธรรมชาติ และ d) ตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายจากธรรมชาติผสมกับสารที่มีประโยชน์ต่อพืช

4.2 ผลของการศึกษา Matrix effect ของวิธีทดสอบ

จากการทดสอบ Matrix effect ของการวิเคราะห์ของสาร IAA และ GA_3 พบว่ามีค่า %RPD เท่ากับ 7.78 และ 8.09 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ < 10% ตาม NATA, 2018 ดังนั้นในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสาร IAA และ GA_3 สามารถเตรียม Calibration curve ในสารละลาย Mobile phase ได้ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 8

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชันของสมการเส้นตรงที่ได้จากการเตรียมสารมาตรฐานในสารละลาย Mobile phase และ Matrix ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ชนิดสาร	สมการ (Equation)		ความชัน (Slope)		%RPD
	Solvent	Matrix	Solvent	Matrix	
IAA	Y=64620.47x-494.14 r=0.9999	Y=59782.98x+752.89 r=0.9985	64620	59782	7.78
GA_3	Y=14140.50x-248.16 r= 0.9999	Y=15333.44x-11.58 r= 0.9991	13536	14272	8.09

4.3 การหาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

ทำการทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูล คำนวณหาค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากผลการทดสอบพบว่าค่า Limit of Detection (LOD) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และสาร Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่า Limit of Quantification (LOQ) ที่ได้จากการ Predicted LOQ พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.017 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4.4 การตรวจสอบค่า Linearity และ Range ของวิธีทดสอบ

4.4.1 ทดสอบ Linearity โดยการเตรียมสารมาตรฐานจำนวน 7 ระดับความเข้มข้นดังนี้ สาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05, 0.10, 0.50, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 1.0, 2.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) ที่อ่านค่าได้จากเครื่อง HPLC พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$ จากการทดสอบพบว่าค่า Correlation Coefficient (r) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016) ที่มีเกณฑ์การยอมรับ Correlation Coefficient (r) $\geq$ 0.995

4.4.2 ทดสอบ Range โดยการเตรียมสารมาตรฐานจำนวน 7 ระดับความเข้มข้นดังนี้ สาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.005-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.05-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) ที่อ่านค่าได้จากเครื่อง HPLC ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 9 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation

กรมวิชาการเกษตร

coefficient : r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ r ≥ 0.995 จากการทดสอบพบว่าค่า Correlation Coefficient (r) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.9995 และ 0.9991 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016) ที่มีเกณฑ์การยอมรับ Correlation Coefficient (r) $\geq$ 0.995

ตารางที่ 9 แสดงสมการเส้นตรงและค่า Correlation Coefficient (r) ที่ได้จากการทดสอบ Working range ของสาร Indole acetic acid (IAA) และสาร Gibberellic acid (GA_3)

ชนิดสาร	สมการเส้นตรง	Correlation Coefficient (r)
IAA	y = 67,813.35x - 29.38	0.9995
GA_3	y = 14,475.55x + 152.93	0.9991

4.5 พิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3)

เนื่องจาก LOQ เป็นค่าต่ำสุดของการทดสอบที่ยังคงมีความถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้นจึงทำการทดสอบความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับ Predicted LOQ ที่ได้ โดยทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ย, %Recovery, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่า HorRat จากผลการทดสอบ พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) ที่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 91.19-107.11 และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.30 ส่วนสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 66.55-80.19 และค่า HorRat มีค่าเท่ากับ 0.30 จากผลการพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ ของสาร Gibberellic acid (GA_3) พบว่าผลการทดสอบมีความแม่นยำ แต่ไม่มีความถูกต้อง เนื่องจากค่า %Recovery ที่ได้จากการทดสอบมีค่าอยู่ในช่วง 66.55-80.19 ซึ่งมีบางค่าไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016 (80-110%) จึงทำการทดสอบที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดสอบพบว่า ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 81.91-95.93 และค่า HorRat เท่ากับ 0.33 ซึ่งให้ผลการทดสอบที่มีทั้งความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับ LOQ

8.4.6 การทดสอบความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

ทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง โดยทำการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงที่ 3 ระดับความเข้มข้นดังนี้ สาร Indole acetic acid (IAA) ที่ความเข้มข้น 0.013, 1.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.125, 1.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำผลการทดสอบที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, %Recovery และค่า HorRat ผลการทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

ที่ได้แสดงดังตารางที่ 10 และตารางที่ 11 จากผลการทดสอบความถูกต้องและความเที่ยงของวิธีทดสอบสาร Indole acetic acid (IAA) และสาร Gibberellic acid (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวให้ผลการทดสอบที่มีทั้งความถูกต้องและความเที่ยง เนื่องจากทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบให้ค่า %Recovery ของการทดสอบอยู่ในช่วง 80-110% ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016 และค่า HorRat ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ที่มีการเติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.013, 1.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนซ้ำ	สาร IAA (0.013 mg/L)		สาร IAA (1.00 mg/L)		สาร IAA (5.00 mg/L)	
	ความเข้มข้น (mg/L)	% Recovery	ความเข้มข้น (mg/L)	% Recovery	ความเข้มข้น (mg/L)	% Recovery
1	0.0131	93.34	1.02375	93.70	5.4288	99.37
2	0.0134	96.02	1.03650	94.86	5.3700	98.30
3	0.0148	105.68	0.96725	88.53	5.3175	97.34
4	0.0143	101.92	1.03925	95.12	4.8506	88.79
5	0.0128	91.19	1.03250	94.50	5.4013	98.87
6	0.0130	92.80	1.03325	94.57	4.9125	89.92
7	0.0132	94.59	0.96050	87.91	5.0425	92.30
8	0.0145	103.71	1.03875	95.07	4.8988	89.67
9	0.0146	104.60	0.97025	88.80	5.3163	97.31
10	0.0149	106.57	0.97150	88.92	4.7400	86.76
Mean	0.01385	99.04	1.00735	92.20	5.1278	93.86
SD	0.00084		0.03479		0.26433	
%RSD	6.06		3.45		5.15	
HorRat	0.30		0.33		0.62	

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง ที่มีการเติมสารมาตรฐาน Gibberellic acid (GA_3) ที่ระดับความเข้มข้น 0.125, 1.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร

จำนวนซ้ำ	สาร GA_3 (0.125 mg/L)		สาร GA_3 (1.00 mg/L)		สาร GA_3 (5.00 mg/L)	
	ความเข้มข้น (mg/L)	% Recovery	ความเข้มข้น (mg/L)	% Recovery	ความเข้มข้น (mg/L)	% Recovery

กรมวิชาการเกษตร

1	0.11150	90.65	1.1455	99.26	5.9425	102.99
2	0.10300	83.74	1.1390	98.70	6.0563	104.96
3	0.10675	86.79	1.1555	100.13	5.8063	100.63
4	0.11150	90.65	1.1463	99.33	5.9450	103.03
5	0.10575	85.98	1.1815	102.38	5.6225	97.45
6	0.11350	92.28	1.1500	99.65	5.7338	99.37
7	0.11650	94.72	1.1253	97.51	5.8063	100.63
8	0.10675	86.79	1.2083	104.70	6.0113	104.18
9	0.10075	81.91	1.1373	98.55	5.5988	97.03
10	0.10000	81.30	1.0638	92.18	5.9125	102.47
Mean	0.10760	87.48	1.1452	99.24	5.8435	101.28
SD	0.0055		0.0374		0.1570	
%RSD	5.14		3.26		2.69	
HorRat	0.35		0.32		0.33	

4.7 ผลการศึกษา Ruggedness ของวิธีทดสอบ Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) โดยทำการทดสอบปัจจัยต่างๆ ในวิธีทดสอบดังนี้

4.7.1 ทดสอบปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด

ทำการทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ โดยมีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้จากสภาวะปกติปริมาตร 10 มิลลิลิตร เปลี่ยนแปลงสภาวะเป็นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ จากการเปรียบเทียบสภาวะการทดสอบปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะดังกล่าว โดยนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ (t-test) จากการพิจารณาค่าทางสถิติ (t-test) ที่คำนวณได้จากการทดสอบทั้ง 2 สภาวะ พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} < t_{Critical}$ แสดงว่าทั้ง 2 สภาวะ ให้ผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน

4.7.2 ทดสอบค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง

ทำการทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะปกติ pH 2.5 และจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ค่า pH 2.7 ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการเปรียบเทียบการทดสอบแสดงดังตารางที่ 12 จากการเปรียบเทียบสภาวะของค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะดังกล่าว โดยนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ (t-test) จากการพิจารณาค่าทางสถิติ (t-

test) ที่คำนวณได้จากทั้ง 2 สภาวะ พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} < t_{Critical}$ แสดงว่าทั้ง 2 สภาวะให้ผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 12 ผลการเปรียบเทียบการทดสอบค่า pH ที่ใช้ในการสกัดสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะปกติที่ค่า pH 2.5 และจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่ค่า pH 2.7

ชนิดของสาร	ค่า t-test ที่คำนวณได้		ผลการเปรียบเทียบ
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
สาร IAA	0.598	2.101	ns
สาร GA_3	0.981	2.101	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

4.7.3 ทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

ทดสอบ Sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่ความเข้มข้น 0.010 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบโดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัด Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะปกติปริมาตร 20 มิลลิลิตร และจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำการทดสอบจำนวน 10 ซ้ำ ผลการเปรียบเทียบการทดสอบแสดงดังตารางที่ 13 จากการเปรียบเทียบสภาวะการทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัด Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ที่สภาวะดังกล่าว โดยนำค่าวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่าทางสถิติ (t-test) จากการพิจารณาค่าทางสถิติ (t-test) ที่คำนวณได้จากการทดสอบทั้ง 2 สภาวะ พบว่า Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า $t_{stat} < t_{Critical}$ แสดงว่าทั้ง 2 สภาวะให้ผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 13 ผลการเปรียบเทียบการทดสอบปริมาณของ Solvent ที่ใช้ในการสกัด IAA และ GA_3 ที่สภาวะปกติปริมาตร 20 มิลลิลิตร และจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะปริมาตร 30 มิลลิลิตร

ชนิดของสาร	ค่า t-test ที่คำนวณได้		ผลการเปรียบเทียบ
	t_{stat}	$t_{Critical}$	
สาร IAA	0.575	2.101	ns
สาร GA_3	0.196	2.101	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

5. การหาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร ซึ่งเป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารชีวอินทรีย์สกัดจากธรรมชาติพืชและสัตว์ที่มีลักษณะเป็นสารละลายใส ไม่เหนียว และไม่ข้นหนืด ทั้งหมดจำนวน 20 ตัวอย่าง จากการ

กรมวิชาการเกษตร

วิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่าง IAA และ GA_3 พบว่ามีปริมาณสาร IAA อยู่ในช่วง 0.005-5.26 มิลลิกรัมต่อลิตร และสาร GA_3 อยู่ในช่วง 0.05-5.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการทดสอบหาค่า %Recovery พบว่าสาร IAA อยู่ในช่วง 82.62-103.01 และ GA_3 อยู่ในช่วง 90.00-98.84 ซึ่งค่า %Recovery ที่ได้ของสารทั้ง 2 ชนิด อยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, 2016

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันและมีความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) ในการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิด สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ประยุกต์ใช้วิธีการสกัดสารด้วย Ethyl acetate ร่วมกับการ Clean-up ตัวอย่างด้วยเทคนิค Solid phase extraction ซึ่งมีการใช้ Cartridge ชนิด XR-HA ในการสกัดสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าได้ค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.005-5.0 และ 0.05-5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า r เท่ากับ 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ ได้ค่าขีดจำกัดในการตรวจวัด (LOD) ของสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) มีค่าเท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และขีดจำกัดในการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง พบว่าสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 86.76-106.57 และ 81.30-104.70 ตามลำดับ และจากการประเมินค่า HorRat ที่ได้จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.30-0.62 และ 0.32-0.35 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ (AOAC, 2016) ดังนั้นวิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาสาร Indole acetic acid (IAA) และ Gibberellic acid (GA_3) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีขอบข่ายในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.013-5.00 และ 0.125-5.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ

ศึกษาหาปริมาณฮอร์โมน indole acetic acid (IAA) gibberellic acid (GA_3) และธาตุอาหารในกล้วยน้ำว้า

Study the quantity of Plant hormone Indole acetic acid (IAA) Gibberellic acid (GA_3) and Nutrients in Namwa Bananas

สาธิดา โพธิ์น้อย สุพิศสา ทองเขียว สุภานันทน์ จันทร์ประอบ เพชรรัตน์ ศิริวิ
สุวลักษมิ์ ไชยทอง ตวงพร ธีระพิทยาพงศ์

คำสำคัญ (Key words)

ฮอร์โมนอินโดล-3-อะซิติก ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิคแอซิต ธาตุอาหาร กล้วยน้ำว้า

ศรีนครินทร์

Plant hormone Indole acetic acid (IAA) Gibberellic acid (GA_3) Nutrients Namwa Bananas

บทคัดย่อ (Abstract)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณของฮอร์โมนพืชจำนวน 2 ชนิด คือ indole acetic acid (IAA) gibberellic acid (GA_3) และปริมาณธาตุอาหารพืช ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแทสเซียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ในกล้วยน้ำว้า 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์มะลิอ่อง พันธุ์ปากช่อง50 พันธุ์สุโขทัย1 ที่เก็บตัวอย่างจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย (สวพ.2) โดยทำการศึกษาในส่วนต่างๆของกล้วยน้ำว้า ได้แก่ เปลือกผลอ่อน เปลือกผลแก่ เปลือกผลสุก เนื้อผลดิบ เนื้อผลอ่อน ลำต้นเทียม ปลี และใบ ดำเนินการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชตามวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช หลังจากเตรียมตัวอย่าง นำมาสกัดด้วยวิธี liquid liquid extraction แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จากผลการศึกษาปริมาณธาตุอาหารพืชในกล้วยน้ำว้า 3 สายพันธุ์ ไม่แตกต่างกัน จึงดำเนินการต่อโดยใช้ตัวอย่างกล้วยพันธุ์สุโขทัย1 มาวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชและปริมาณฮอร์โมน พบว่าซึ่งพบว่า ในปลีและใบมีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส สูงกว่าส่วนอื่น โดยในปลีมีปริมาณ ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส เท่ากับ 2.47 และ 0.43 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และใบ มีปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เท่ากับ 2.62 และ 0.33 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ส่วนปริมาณฮอร์โมนพืช IAA พบในทุกส่วนของกล้วยน้ำว้า โดยตรวจพบในใบสูงที่สุดมีปริมาณ 4.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจพบปริมาณ GA_3 ในทุกส่วนของตัวอย่างกล้วยน้ำว้า และพบมากที่สุดในส่วนของปลีปริมาณ 1.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือใบมีปริมาณ 1.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารและปริมาณฮอร์โมนพืชทั้งสองชนิด พบว่าปริมาณธาตุไนโตรเจน เหล็ก ซัลเฟอร์ และคอปเปอร์ จะให้ค่าความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกว่าธาตุอื่น จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ทุกส่วนของกล้วยสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืชได้

This research aims to study the quantity of 2 plant hormones, Indole acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA_3) and the amount of plant nutrients nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and Magnesium in 3 Nam Wa bananas, namely Mali Ong 50, Pak Chong, Sukhothai, were sampled from Office of Agricultural Research and Development Region2 (Sukhothai). Raw fruit, young fruit pulp, artificial stalks and leaves were carried out for nutrient analysis according to the laboratory method. Plant hormone content analysis after sample preparation was extracted by liquid liquid extraction method and then analyzed by HPLC from The results of the study on the nutrient content of the 3 Namwa bananas were not different., the Sukhothai banana cultivar samples were used for analysis of plant nutrients and plant hormones content. It was found that the nutrient content of the nitrogen and phosphorus in banana flower and the leaves was higher than other elements. Banana flower were 2.47 and 0.43 percent dry weight and

กรมวิชาการเกษตร

the leaves content of nitrogen and phosphorus were 2.62 and 0.33 percent dry weight. Plant hormones IAA was found in all parts of the banana, with the highest concentration of 4.07 mg/kg in the leaves. GA_3 was found in all parts of the Nam Wa banana samples and the highest in banana flower. The amount of 1.42 mg/kg was followed by the leaves with 1.32 mg/kg. When analyzing the relationship between nutrient content and plant hormone content, it was found that nitrogen, iron, sulfur and copper content showed a high positive correlation. More than other trace elements from this study, it can be seen that every part of the banana can be used as a raw material in natural plant products.

บทนำ (Introduction)

ด้วยกระแสการผลิตพืชปลอดภัยต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม พร้อมการลดต้นทุนการผลิต เพิ่มคุณภาพผลผลิตพืช จึงมีการสนับสนุนให้มีการผลิตและใช้ผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น ทั้งจากหน่วยงานของรัฐและผู้ประกอบการ โดยเฉพาะผู้ประกอบการมีทั้งผลิตขึ้นเองภายในประเทศ และยังมีการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยผลิตภัณฑ์ต่างๆเหล่านี้ จะมีการอ้างถึงสรรพคุณเพื่อนำไปใช้ทางการเกษตรอย่างมากมาย มีสารสกัดที่ได้จากวัตถุดิบตามธรรมชาติไม่เป็นพิษกับผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีการอ้างถึงสรรคุณทางด้านการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช มีการลงโฆษณาทางสื่อต่างๆ ทุกทางเท่าที่ทำได้ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีราคาสูง และเข้าถึงเกษตรกรได้ง่าย ทำให้เกษตรกรหลงเชื่อและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยไม่สามารถควบคุมได้ วัตถุดิบทางธรรมชาติที่นำมาผลิตมีทั้งจากพืชและสัตว์ อาทิเช่น ผัก ผลไม้ วัชพืช สาหร่าย ปลา กุ้ง ฯลฯ ในพืชหลายชนิดที่มีฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช แต่จะมีปริมาณมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและชนิดของฮอร์โมนพืช เนื่องจากฮอร์โมนพืชบางชนิดเป็นสารธรรมชาติที่มีอยู่ในพืช ได้แก่ สารอินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic : IAA) เป็นฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน มีคุณสมบัติ ควบคุมการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ กระตุ้นการเกิดราก แหล่งการสร้างออกซินจะอยู่ในเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ตายอด ยอดอ่อน อินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic : IAA) เป็นฮอร์โมนธรรมชาติที่สร้างจากกรดอะมิโนทริบโตเฟน สารจิบเบอเรลลิค แอซิค (gibberellic acid : GA_3) เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มจิบเบอเรลลิน มีคุณสมบัติ ช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ในช่วงระหว่างข้อ ช่วยให้พืชยืดตัวสูงขึ้น เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์จากเมวาโลนิก (mevalonic acid) (สุนันทา, 2546)

ปัจจุบันมีการผลิตฮอร์โมนพืชจากวัตถุดิบธรรมชาติมากมายหลายชนิด แต่ในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอาจไม่มีการขึ้นทะเบียนเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช และยังไม่มีเกณฑ์มาตรฐานในผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติหรือผลิตจากวัตถุดิบที่เป็นธรรมชาติว่าต้องมีมากน้อยเพียงใด จึงเป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ ที่ไม่ต้องขึ้นทะเบียน หรือต้องขึ้นทะเบียนตามพ.ร.บ. วัตถุอันตราย กล้วยเป็นหนึ่งในวัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรสำหรับพืชเนื่องจากกล้วยน้ำว้าหาได้ง่ายและราคาไม่แพง ทุกส่วนของกล้วยสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนธรรมชาติที่ได้จากพืช

ศูนย์วิทยทรัพยากร

เช่น ใบกล้วย เปลือกกล้วย ผลกล้วยดิบ ผลกล้วยสุกและปลีของกล้วย โดยเฉพาะกล้วยน้ำว้า จากการศึกษาเรื่องฮอโมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพของ สุนันทา (2546) เกี่ยวกับวัสดุหลักโดยมีกล้วยเป็นหนึ่งในวัสดุหลัก พบว่า ทุกสูตรที่ใช้กล้วยเป็นวัสดุหลักจะตรวจพบ ฮอร์โมนพืช IAA มีปริมาณน้อกว่า0.1 ถึง 1.28 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ GA_3 จะตรวจพบ ร้อยละ 62.5 มีปริมาณ 1.03 ถึง 133.94 มิลลิกรัมต่อลิตร ฮอร์โมนพืชอินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic : IAA) และ จิบเบอเรลลิคแอซิต (gibberellic acid : GA_3) ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกับปริมาณ endogenous IAA และ gibberellic acid ภายในต้นพืช ส่งผลให้เซลล์พืชยืดยาวและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับธาตุอาหารจากดินของพืช (Buensanteai *et al*., 2008) ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาถึงปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3ในส่วนต่างๆ ของกล้วย และวิเคราะห์ธาตุอาหารพืชในส่วนของกล้วยที่ทำการทดสอบเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮอร์โมนและปริมาณธาตุอาหาร เพื่อเป็นแนวทางในการจัดทำเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรสำหรับพืช ตามท้องตลาดเพื่อสะดวกในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกษตรกรได้นำไปใช้และเกิดประโยชน์อย่างแท้จริง อีกทั้งนำข้อมูลมาปรับปรุง แก้ไข กฎระเบียบ ข้อบังคับที่ทันสมัย สำหรับควบคุมปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมตัวอย่างกล้วยน้ำว้า

1) การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช นำตัวอย่างกล้วยน้ำว้าที่ได้จากที่เก็บตัวอย่างจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย (สวพ.2) ล้างทำความสะอาดตัวอย่าง แยกส่วน เนื้อ เปลือก ใบ และปลี หั่นเป็นชิ้นเล็ก แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่1ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ ไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช (ภาคผนวก1)

2) ส่วนที่ 2 นำไปเตรียมสำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC โดยนำตัวอย่างสดที่หั่นแล้ว มาบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดตัวอย่าง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20±5ºC เพื่อป้องกันการสลายตัวของสาร IAA และ GA_3 ในตัวอย่าง ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณ

2. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC

- นำตัวอย่างสดชั่ง 100 กรัม ลงในบีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร เติม methanol ที่เย็น 200 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่า เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วกรองเอาเมทธานอลไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลซียส เพื่อป้องกันการสลายตัวของฮอร์โมนพืช IAA

- นำตัวอย่างที่ระเหย methanol ออกแล้ว เติมด้วย 0.5 M phosphate buffer 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย 1% phosphoric acid และ 1% potassium hydroxide

- สกัดด้วย hexane 2 ครั้ง ครั้งละ 80 มิลลิลิตร และ 70 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดสาร nonpolar ทิ้งส่วนของ hexane นำสารละลาย ปรับ pH ให้ได้ 2.7

กรมวิชาการเกษตร

- สกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง ครั้งละ 50 50 และ 40 มิลลิลิตร ตามลำดับ รวมส่วนที่เป็น ethyl acetate แล้วนำไประเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส

- ละลายสารที่ได้ด้วย methanol ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเจือจางด้วยสารละลาย mobile phase จากนั้นกรองตัวอย่างผ่านตัวกรอง PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 สภาวะของเครื่อง HPLC สำหรับการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 ในตัวอย่างกล้วยน้ำว้า

HPLC parameter	condition	
	IAA	GA_3
Mobile phase	45% MeOH in 0.02 Ammonium acetate pH 3.5	35% MeOH pH 2.7
column	µBondapak C18 10µm 3.9 x 300 mm	µBondapak C18 10µm 3.9 x 300 mm
detector	Fluorescence ex 280 nm em 350 nm	PDA 206 nm
Flow rate	1.0 ml/min	1.2 ml/min
Run time	12 min	12 min
Inject volume	10 µl	10µl

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานจากสารมาตรฐานฮอร์โมนพืช IAA 99.00% และ GA_3 98.8% ความเข้มข้น 1 2 3 4 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่งสาร IAA 0.01265 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทธานอล จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 500.94 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) ปิเปตสารละลายจากข้อ1 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทธานอล จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) ปิเปตสารละลายจากข้อ2 มา 4 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทธานอล จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

4) ปิเปตสารละลายจากข้อ3 มา 1 2 3 4 และ5 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย mobile phase จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1 2 3 4 และ5 มิลลิกรัมต่อลิตร

5) กรองด้วย PTFE ใส่ขวดฉีด ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6) การเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยชั่งสาร GA_3 0.01302 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทธานอล จะได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 514.55 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำตามขั้นตอนที่1-5 เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน IAA

7) สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area (แกน y) ซึ่งมีค่า correlation ของ linear regression (r) ไม่น้อยกว่า 0.995

กรมวิชาการเกษตร

8) คำนวณหาปริมาณฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 จากกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ด้วยการนำพื้นที่ใต้ peak ของสารที่ตรวจวิเคราะห์ไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟ

4. สร้างสมการเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ฮอร์โมนพืช IAA GA_3 และธาตุอาหารพืชในส่วนต่างๆ ของกล้วย

ระยะเวลา เริ่มต้น ต.ค. 2562 สิ้นสุด ก.ย. 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการวิจัย (Results)

1. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืชในตัวอย่างกล้วย

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืช ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม ในส่วนต่างๆ ของกล้วยน้ำว้า 3 พันธุ์ คือ มะลิอ่อง ปากช่อง50 และ สุโขทัย1 นำกล้วยแต่ละพันธุ์มาแบ่งส่วนต่างๆดังนี้ เปลือกผลอ่อน เปลือกผลแก่ เนื้อผลแก่ เนื้อผลอ่อน ปลี และใบ เพื่อตรวจสอบความความแตกต่างระหว่างชนิดและปริมาณของธาตุอาหารพืชในส่วนต่างๆกับพันธุ์ของกล้วยน้ำว้า ซึ่งพบว่า ในปลีและใบ มีปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจน ฟอสฟอรัส สูงกว่าส่วนอื่น โดยในปลีมีปริมาณ ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส เท่ากับ 2.47 และ 0.43 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง และใบ มีปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เท่ากับ 2.62 และ 0.33 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ เปลือกผลแก่ เปลือกผลอ่อน ส่วนเปลือกผลแก่จะพบปริมาณ โปแทสเซียม มากที่สุดเท่ากับ 6.33 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง รองลงมาคือเปลือกอ่อน ปลี และใบ มีเท่ากับ 6.07 4.71 และ 3.82 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งตามลำดับ (ตารางที่ 1) แต่เนื่อกจากกล้วยน้ำว้าพันธุ์สุโขทัย1 เป็นพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตรพัฒนาสายพเพียงชนิดเดียวเพื่อดำเนินการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากกล้วยน้ำว้าพันธุ์ดังกล่าวเป็นพันธุ์ที่ถูกพัฒนาขึ้น โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 (สวพ.2) จังหวัดสุโขทัย ของกรมวิชาการเกษตร และมีจำนวนที่มากพอต่อการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืช ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม ในส่วนต่างๆ ของกล้วยน้ำว้า เป็นค่าเฉลี่ยของกล้วย 3 สายพันธุ์

กล้วยน้ำว้าส่วนต่างๆ	ปริมาณธาตุอาหารพืช (% น้ำหนักแห้งเฉลี่ย)		
	N	P	K
เปลือกผลอ่อน	1.09	0.26	6.07
เปลือกผลแก่	1.40	0.34	6.33
เนื้อผลอ่อน	0.39	0.09	1.00
เนื้อผลแก่	0.44	0.08	1.09
ปลี	2.74	0.43	4.71
ใบ	2.62	0.33	3.82

กรมวิชาการเกษตร

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืชในส่วนต่างๆของกล้วยน้ำว้า พบว่า ปลีมีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 2.74 0.43 และ 4.71 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือใบ มีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม เฉลี่ยเท่ากับ 2.62 0.33 และ 3.82 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาคำนวณค่าความแตกต่างด้วยสถิติ ANOVA พบว่า ไนโตรเจนฟอสฟอรัส และโปแทสเซียม มีค่า F ที่ได้จากการทดลอง (F_{cal}) เท่ากับ 0.41 0.28 และ 0.07 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้น้อยกว่าค่าที่อ่านได้จากตาราง F_{crit} 4.10 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า พันธุ์ของกล้วยน้ำว้าไม่มีผลต่อปริมาณธาตุอาหารชนิดเดียวกัน

8.1.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารรอง Ca Mg S และธาตุอาหารเสริม Fe Mn Zn Cu B จากผลการวิเคราะห์ พบว่า มีปริมาณอาหารรองจะมีในปลีและใบมากกว่าส่วนอื่น โดยในปลี มี Ca Mg S เท่ากับ 0.46 0.46 และ 0.22 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในใบ เท่ากับ 0.36 0.37 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับธาตุอาหารเสริม จะพบมากในส่วนของปลีและใบของกล้วยเช่นเดียวกัน ในปลี เท่ากับ 42 77 52 8 และ 22 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในใบ เท่ากับ 90 108 20 7 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่2)

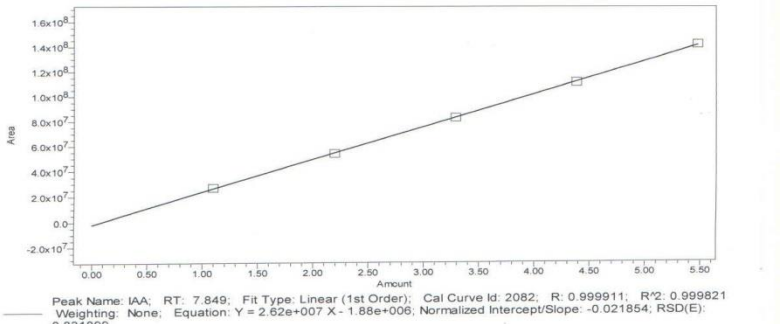
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริมในตัวอย่างกล้วยน้ำว้าสุโขทัย1

ส่วนของกล้วยน้ำว้า	ปริมาณธาตุอาหารรอง (%น้ำหนักแห้ง)			ปริมาณธาตุอาหารเสริม (มิลลิกรัมต่อลิตร)				
	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn	Cu	B
เปลือกผลอ่อน	0.25	0.49	0.06	30	71	47	2	19
เปลือกผลแก่	0.27	0.40	0.06	42	87	65	3	24
เนื้อผลอ่อน	0.01	0.12	0.02	18	12	8	3	2
เนื้อผลแก่	0.02	0.11	0.02	21	12	6	2	3
ปลี	0.46	0.46	0.22	42	77	52	8	22
ใบ	0.36	0.37	0.20	90	108	20	7	12

2. การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 ในส่วนต่างๆของกล้วยน้ำว้า ได้แก่ เปลือกผลอ่อน เปลือกผลแก่ เนื้อผลแก่ เนื้อผลอ่อน ปลี และใบ

2.1 การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน IAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ได้จากการเตรียมสารมาตรฐานเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อจัดทำ curve ของสารมาตรฐานวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area (แกน y) จากผลการวิเคราะห์ มีค่า correlation ของ linear regression (r) เท่ากับ 0.99991 (ภาพที่ 3) ซึ่งลักษณะ โครมาโทรแกรมของสารมาตรฐาน IAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังภาพที่4

ศูนย์วิทยทรัพยากร

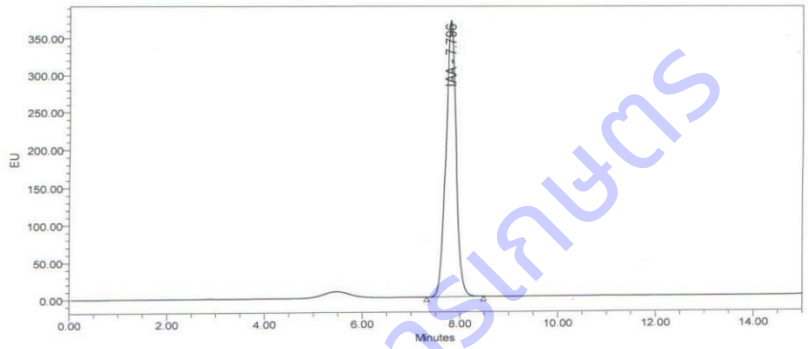


Peak Name: IAA; RT: 7.849; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 2082; R: 0.999911; R^2: 0.999821 Weighting: None; Equation: Y = 2.62e+007 X - 1.88e+006; Normalized Intercept/Slope: -0.021854; RSD(E): 0.831899

Peak: IAA

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	IAA_1ppm	2080	IAA		1.096	27391788.985	1.118	2.06	No	No
2	IAA_2ppm	2083	IAA		2.191	55065521.789	2.175	-0.72	No	No
3	IAA_3ppm	2084	IAA		3.287	83914055.643	3.277	-0.29	No	No
4	IAA_4ppm	2085	IAA		4.382	112209989.850	4.358	-0.55	No	No
5	IAA_5ppm	2086	IAA		5.478	142220814.368	5.505	0.49	No	No

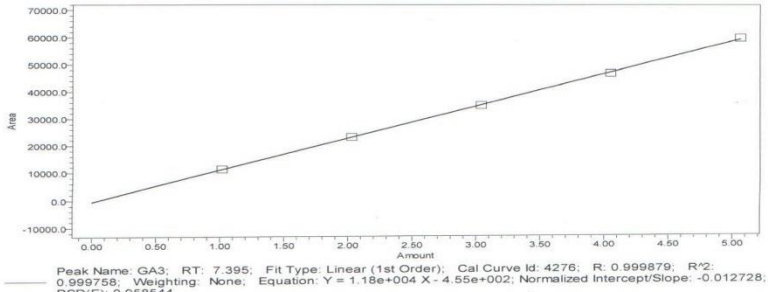
ภาพที่ 3 calibration curve ของฮอร์โมนพืช IAA ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 ถึง 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount	Units
1	IAA	7.796	54994167	100.00	3729996	2.173	ppm

ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน IAA ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ให้ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area (แกน y) ซึ่งมีค่า correlation ของ linear regression (r) เท่ากับ 0.99988 (ภาพที่ 5) ซึ่งลักษณะโครมาโทรแกรมของสารละลายมาตรฐาน GA_3 ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 6)



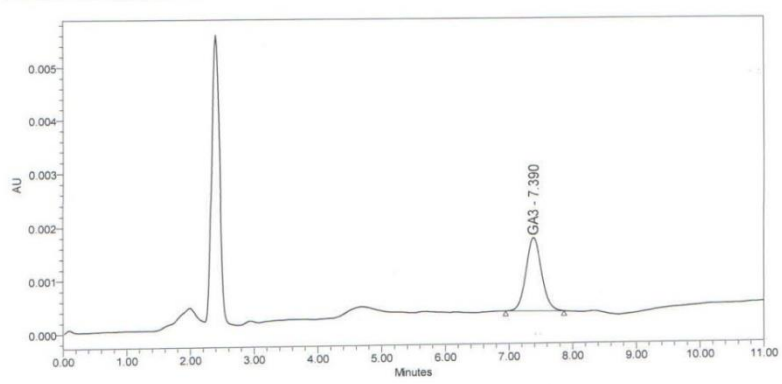
Peak Name: GA3; RT: 7.395; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 4276; R: 0.999879; R^2: 0.999758; Weighting: None; Equation: Y = 1.18e+004 X - 4.55e+002; Normalized Intercept/Slope: -0.012728; RSD(E): 0.958544

Peak: GA3

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	GA3_1ppm	4277	GA3		1.012	11580.702	1.022	0.92	No	No
2	GA3_2ppm	4278	GA3		2.025	23496.899	2.033	0.41	No	No
3	GA3_3ppm	4279	GA3		3.037	35162.901	3.023	-0.45	No	No
4	GA3_4ppm	4274	GA3		4.049	46846.000	4.015	-0.85	No	No
5	GA3_5ppm	4280	GA3		5.061	59541.001	5.092	0.61	No	No

กรมวิชาการเกษตร

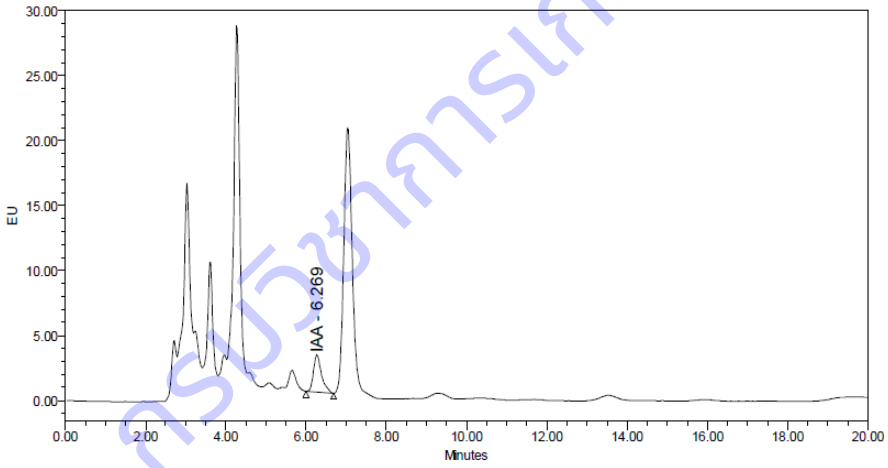
ภาพที่ 5 calibration curve ของฮอร์โมนพืช GA_3 ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 ถึง 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount
1	GA3	7.390	23521	100.00	1385	2.035

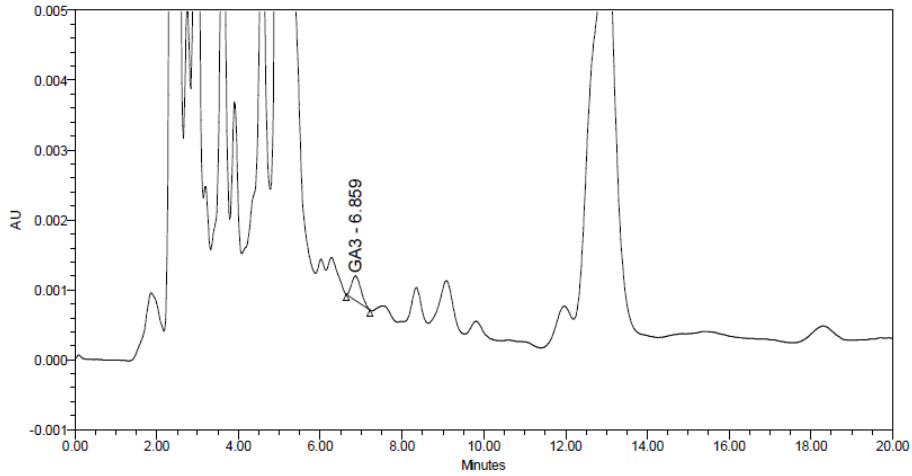
ภาพที่ 6 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน GA_3 ระดับความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ IAA และ GA_3 ในส่วนต่างๆของตัวอย่างกล้วยน้ำว้า ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี liquid liquid extraction และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยทำการวิเคราะห์แยกกัน เนื่องจาก



ภาพที่ 7 ลักษณะโครมาโทแกรมของ IAA ในตัวอย่างกล้วยน้ำว้าที่สกัดได้จากวิธี liquid liquid extraction

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 8 ลักษณะโครมาโทแกรมของ GA_3 ในตัวอย่างกล้วยน้ำว้าที่สกัดได้จากวิธี liquid liquid extraction

2.4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน IAA และ GA_3 ในตัวอย่างกล้วยน้ำว้าส่วนต่างๆ ได้แก่ เปลือกผลอ่อน เปลือกผลแก่ เนื้อผลอ่อน เนื้อผลแก่ ปลี และใบ จากผลการวิเคราะห์ ตรวจพบปริมาณ IAA ในทุกส่วนของกล้วยน้ำว้า โดยตรวจพบในใบสูงที่สุดมีปริมาณ 4.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจาก สาร IAA เป็นฮอร์โมนพืชชนิดที่เคลื่อนที่จากปลายยอดลงมายังลำต้น และจะอยู่ในส่วนของเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญ จึงทำให้มีการตรวจพบในส่วนของใบมากที่สุด ผลการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตรวจพบปริมาณ GA_3 ในทุกส่วนของตัวอย่างกล้วยน้ำว้า และพบมากที่สุดในส่วนของปลีปริมาณ 1.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม รองลงมาคือใบมีปริมาณ 1.32 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 3) เนื่องจากฮอร์โมนพืชทั้งสองชนิดคือสารอินทรีย์ ที่พืชสร้างขึ้นเองในบริเวณอวัยวะหรือเนื้อเยื่อของต้นพืชและเคลื่อนย้ายเพื่อควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปยังส่วนต่างๆของพืช (คัดคณัฐ, 2562) จึงพบในปริมาณที่ต่างกัน

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ผลวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชในส่วนต่างๆของกล้วยน้ำว้าด้วยเครื่อง HPLC

ส่วนของพืช	ปริมาณฮอร์โมนพืชที่ตรวจพบ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	
	IAA	GA_3
เปลือกผลอ่อน	<0.01	0.16
เปลือกผลแก่	0.01	0.28
เนื้อผลอ่อน	0.13	0.10
เนื้อผลแก่	0.04	0.37
ปลี	0.15	1.42
ใบ	4.07	1.32

2.5 การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารพืชในเปลือกผลอ่อน เปลือกผลแก่ เนื้อผลอ่อน เนื้อผลแก่ ปลี และใบ ของกล้วยน้ำว้า กับ ปริมาณฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เป็นการหาความสัมพันธ์แบบสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ซึ่งค่า r มีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง 1 ถ้าค่า r ใกล้ 1 แสดงว่า ตัวแปรสองตัวมีความสัมพันธ์กันมาก และมีทิศทางเดียวกัน ถ้า r มีค่าใกล้ -1 แสดงว่า ตัวแปรสองตัวมีความสัมพันธ์กันมากแต่ในทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งในการวิเคราะห์นี้ให้ตัวแปรตามเป็นฮอร์โมนพืช และตัวแปรอิสระเป็นธาตุอาหารพืช จากการวิเคราะห์สมการ พบว่า ปริมาณธาตุอาหาร ไนโตรเจน ซันเฟอร์ เหล็ก แมงกานีส และคอปเปอร์ มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฮอร์โมนพืช IAA มีค่า r เท่ากับ 0.553 0.560 0.918 0.609 และ 0.516 ตามลำดับ แต่ฟอสฟอรัส โปแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และโบรอน มีความสัมพันธ์กันในทางลบ มีค่า r เท่ากับ 0.271 0.095 0.383 0.267 0.218 และ 0.036 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนฮอร์โมนพืช GA_3 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณ ธาตุอาหาร ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม ซัลเฟอร์ เหล็ก แมงกานีส และคอปเปอร์ มีค่า r เท่ากับ 0.912 0.683 0.773 0.965 0.722 0.584 และ 0.962 ตามลำดับ และมีความสัมพันธ์เชิงลบ กับ โปแทสเซียม แมกนีเซียม ซิงค์ และโบรอน มีค่า r เท่ากับ 0.139 0.395 0.114 และ0.289 ตามลำดับ (ตารางที่5)

ตารางที่ 4 สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารที่วิเคราะห์ได้กับปริมาณฮอร์โมนพืช IAA

รายการธาตุอาหารพืช	**สมการแสดงความสัมพันธ์**	**R^2**	**r**
N กับ IAA	y = 0.8684x - 0.4382	0.305	0.553
P กับ IAA	y = 3.0428x + 0.1071	0.074	0.271
K กับ IAA	y = 0.073x + 0.6325	0.009	0.095
Ca กับ IAA	y = 3.3802x + 0.1228	0.147	0.383
Mg กับ IAA	y = 2.8901x + 0.0361	0.071	0.267
S กับ IAA	y = 10.16x - 0.1767	0.314	0.560
Fe กับ IAA	y = 0.0569x - 1.5426	0.843	0.918

กรมวิชาการเกษตร

Mn กับ IAA	y = 0.0244x - 0.5654	0.371	0.609
Zn กับ IAA	y = -0.0146x + 1.3195	0.048	0.218
Cu กับ IAA	y = 0.3408x - 0.6875	0.266	0.516
B กับ IAA	y = -0.0063x + 0.9598	0.001	0.036

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารที่วิเคราะห์ได้กับปริมาณฮอร์โมนพืช GA_3

รายการธาตุอาหารพืช	**สมการแสดงความสัมพันธ์**	**R^2**	**r**
N กับ GA3	y = 0.5344x - 0.1648	0.8474	0.921
P กับ GA3	y = 2.8698x - 0.1235	0.4665	0.683
K กับ GA3	y = 0.0353x + 0.4728	0.0192	0.139
Ca กับ GA3	y = 2.5504x + 0.026	0.5972	0.773
Mg กับ GA3	y = 1.404x + 0.152	0.1557	0.395
S กับ GA3	y = 6.4306x - 0.0133	0.9321	0.965
Fe กับ GA3	y = 0.0164x - 0.0575	0.5214	0.722
Mn กับ GA3	y = 0.0087x + 0.076	0.3405	0.584
Zn กับ GA3	y = 0.0027x + 0.5176	0.0131	0.114
Cu กับ GA3	y = 0.2179x - 0.2998	0.9247	0.962
B กับ GA3	y = 0.0181x + 0.3613	0.0835	0.289

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืชในตัวอย่างกล้วยน้ำว้า พบว่าพันธุ์ไม่มีผลต่อปริมาณธาตุอาหาร แต่เมื่อแยกส่วนวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารจะแตกต่างกัน ปลีกล้วยเป็นส่วนที่พบปริมาณธาตุอาหารทุกชนิดมากที่สุด รองลงมาคือใบ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน ในใบจะมีปริมาณฮอร์โมน IAA สูงที่สุด และปลีจะมีปริมาณ GA_3 สูงที่สุด เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารและปริมาณฮอร์โมนพืชทั้งสองชนิด ปริมาณธาตุไนโตรเจน เหล็ก ซัลเฟอร์ และคอปเปอร์ จะให้ค่าความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกว่าธาตุอื่น ซึ่งอาจพอสรุปเบื้องต้นได้ว่าเมื่อมีปริมาณธาตุอาหารดังกล่าวสูงจะตรวจพบปริมาณ ฮอร์โมนพืช IAA และ GA_3 สูงด้วย ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนพืชยังมีข้อจำกัด ในเรื่องของวิธีการเก็บตัวอย่างที่ถูกต้องด้วยเนื่องจาก ฮอร์โมนพืช IAA เป็นสารที่มีความไวต่อแสงและความร้อน ทำให้สารสลายตัวได้ง่าย และอาจตรวจไม่พบหากเก็บไม่ถูกวิธี ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยในพืชอื่นๆ ต่อไปเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์วัตถุดิบจากธรรมชาติมาทำผลิตภัณฑ์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

1) ได้เกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมี ปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยอินทรียเคมี จำนวน 8 เกณฑ์ ได้แก่ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัสทั้งหมด และโพแทสเซียมทั้งหมดในปุ๋ยอินทรีย์ แคลเซียมออกไซด์ แมกนีเซียมออกไซด์ และกำมะถันในปุ๋ยเคมี อินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี และคลอไรด์ในปุ๋ยเคมี โดยการนำค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ที่เกิดขึ้นของข้อมูลผลการวิเคราะห์ โดยพิจารณาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เป็นองค์ประกอบในกระบวนการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนของผลวิเคราะห์ การศึกษาและกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์เคมี และปุ๋ยอินทรีย์ โดยเริ่มตั้งแต่กระบวนการเตรียมตัวอย่าง และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน Eurachem (2019) สามารถนำไปกำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหาร ซึ่งมีความสำคัญในการบ่งชี้ว่าปริมาณธาตุอาหารรับรองที่ระบุผ่านเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพปุ๋ย ตามที่กำหนดไว้ในพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 ที่จำหน่ายในท้องตลาดได้เพื่อให้ผู้ประกอบการนำไปใช้ควบคุมคุณภาพปุ๋ย ควบคุมการผลิต และจำหน่ายปุ๋ยให้มีคุณภาพ

2) ได้เทคนิควิธีการวิเคราะห์ ดิน น้ำ พืช ปุ๋ย ปุ๋ยชีวภาพ และผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่มีความถูกต้อง และแม่นยำ โดยการทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ช่วงของการวัด (Working range) ความถูกต้อง (Trueness) ความเที่ยง (Precision) และความคงทนของวิธี (Ruggedness) ผ่านเกณฑ์การยอมรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จำนวน 20 วิธี ดังนี้

ตัวอย่าง	รายการทดสอบ
พืช	1. โบรอน
ดิน	1. โบรอน
	2. ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์
	3. โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้
	4. เหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดงที่เป็นประโยชน์
	5. ซิลิคอน
น้ำ	1. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด
ปุ๋ยเคมี	1. โบรอน
	2. ฟอสฟอรัสทั้งหมด
ปุ๋ยชีวภาพ	1. ปริมาณและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
	2.การจัดจำแนกจุลินทรีย์ในปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
ผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตร	1. กรดอะมิโน

กรมวิชาการเกษตร

ตัวอย่าง	รายการทดสอบ
	2. ฮอร์โมน Indole acetic acid (IAA)
	3. ฮอร์โมน Gibberellic acid (GA_3)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับ สร้างความเชื่อมั่นด้านการตรวจวิเคราะห์ และลดข้อโต้แย้งที่เกิดขึ้นจากการบังคับใช้กฎหมายของกรมวิชาการเกษตร และการนำวิธีมาตรฐาน และวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ตามมาตรฐานสากล มาใช้เป็นข้อมูลเผยแพร่ให้ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาค และห้องปฏิบัติการอื่น ๆ นำไปใช้สำหรับวิเคราะห์เพื่อให้บริการวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตต่อไป ทำให้มั่นใจได้ว่าห้องปฏิบัติการของประเทศไทยมีมาตรฐานเดียวกัน

3) ได้สมการในการทำนายสมบัติ องค์ประกอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบไนโตรเจนในรูปต่างๆ ในปุ๋ยเคมี ปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์เคมี สารปรับดินปูนขาวโดโลไมท์ และปูนมาร์ลด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ โดยให้ผลการทำนายที่มีค่าความผิดพลาดอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดกรองตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ ทำให้สามารถลดปริมาณตัวอย่าง และลดการใช้สารเคมี และมลพิษที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการ

4) ได้ตัวอย่างอ้างอิงรับรองที่มีเป็นที่ยอมรับในระดับสากลผลิตขึ้นเป็นไปตามข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17034และ ISO Guide 35 จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างดินและปุ๋ยอ้างอิงที่มีค่ากำหนดของเหล็ก และทองแดงทั้งหมดจากเทคนิคInductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS)ซึ่งเป็น Primary method เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังระบบหน่วยสากล (SI) และตัวอย่างอ้างอิงรับรองที่ได้ สามารถนำมาใช้ในการประกันคุณภาพผลการทดสอบซึ่งทำให้ห้องปฏิบัติการของประเทศไทยมีมาตรฐานเดียวกัน และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล นอกจากนี้ ยังเป็นการเตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการเข้าสู่มาตรฐาน ISO/IEC 17034ทำให้กรมวิชาการเกษตรเป็นศูนย์กลางของวัสดุอ้างอิงรับรองของตัวอย่างปุ๋ยและดินของประเทศไทย

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

การทดลอง 1.1

พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (2551, 11 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา. ราชกิจจา นุเบกษา เล่ม 125/ตอนที่ 7 ก. หน้า 2/28.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

ISO 14253-1:2017 Geometrical product specifications (GPS) — Inspection by measurement of workpieces and measuring equipment — Part 1: Decision rules for verifying conformity or nonconformity with specifications

Latimer, George W. (ed). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD.

M H Ramsey, S L R Ellison and P Rostron (eds.) Eurachem/EUROLAB/ CITAC/Nordtest/AMC Guide: *Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches.* Second Edition, Eurachem (2019). ISBN (978-0-948926-35-8). Available from http://www.eurachem.org.

Official Journal of the European Union. 2019. Laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003. Available from https://assets.gov.ie/127589/228a7796-1204-49e0-834d-1966755c79e9.pdf.

การทดลอง 1.2

ผู้จัดการออนไลน์. 13 กันยายน 2564. รัฐบาลแจงปุ๋ยแพง เหตุจีนมีนโยบายส่งออกน้อย แนะเปลี่ยนปลูกพืชจากใช้ปุ๋ยเคมีเป็นปุ๋ยอินทรีย์. สืบค้นเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2564 จาก https://mgronline.com/politics/detail/9640000090892.

ราชกิจจานุเบกษา. 2551.พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550. ราชกิจจา นุเบกษา เล่ม 125/ตอนที่ 7 ก. หน้า 2/28.

ราชกิจจานุเบกษา. 2557. ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง กำหนดเกณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์ พ.ศ. 2557. เล่มที่ 131 ตอนพิเศษ 29 ง หน้า 4. วันที่ 12 กุมภาพันธ์ 2557.

กรมวิชาการเกษตร

APHA, AWWA and WEF. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Part 1020: Quality Assurance. American Public Health Association, Washington, DC.USA.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

Latimer, George W. (ed). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD.

M H Ramsey, S L R Ellison and P Rostron (eds.) Eurachem/EUROLAB/ CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches. Second Edition, Eurachem (2019). ISBN (978-0-948926-35-8). Available from http://www.eurachem.org

Official Journal of the European Union. 2019. Laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003. Available from https://assets.gov.ie/127589/228a7796-1204-49e0-834d-1966755c79e9.pdf.

<u>การทดลอง 1.3</u>

กรมวิชาการเกษตร. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยอินทรีย์. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (2551, 11 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125/ตอนที่ 7 ก. หน้า 2/28.

APHA, AWWA and WEF. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Part 1020: Quality Assurance. American Public Health Association, Washington, DC.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

Latimer, George W. (ed). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD.

M H Ramsey, S L R Ellison and P Rostron (eds.) Eurachem/EUROLAB/ CITAC/Nordtest/AMC Guide: *Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and*

กรมวิชาการเกษตร

approaches. Second Edition, Eurachem (2019). ISBN (978-0-948926-35-8). Available from http://www.eurachem.org.

Official Journal of the European Union. 2019. *Laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003*. Available from https://assets.gov.ie/127589/228a7796-1204-49e0-834d-1966755c79e9.pdf.

<u>การทดลอง 1.4</u>

Association of analytical communities (AOAC). 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International Inc., Maryland, USA.

Barwick V. (Ed).2016.Eurachem/CITAC Guide. Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation. 2nded.UK.ISBN 978-0-948926-32-7. Available from www.eurachem.org.

Barwick VJ and Ellison SLR.2000.VAM Project 3.2.1 Develoment and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles.Protocol for uncertain evaluation from validation data.

Boss, C.B., and Fredeen, K.J. 2004. Concepts. Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Perkin Elmer, Inc., USA.

Bettencourt da Silva R. and Williams A. (Eds). 2015. Eurachem/CITAC Guide.Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement. 1thed .UK

Cantwell H. (Ed).2019.Blanks in method Validation-Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods.1thed.UK. Available from www.eurachem.org.

Ellison SLR and Williams A (Eds).2012. Eurachem/CITAC Guide.Quantifying Uncertainty in Analitical Measurement,3rd ed.UK.

Ellison SLR and Williams A (Eds).2019. Eurachem/CITAC Guide.Metrological Traceability in Analytical measurement.UK.2nded.ISBN 978-0-948926-34-1.Available from www.eurachem.org.

Ellison SLR and Williams A (Eds).2007. Eurachem/CITAC Guide.Use of uncertainty information in compliance assessment,1th ed.UK.

Eurachem. 2019. Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches

กรมวิทยาศาสตร์

Hayami, A. 1987. Official Methods of Analysis of Fertilizers. The Nation Institute of Agro-environmental Sciences. Japan.

ISO/IEC 17025. 2017 (E). General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.

ISO 14253-1.2017. Geosmetrical product specifications (GPS)-Inspection by measurement of workpieces and measuring equipment- Part 1: Decision rules for verifying conformity or nonconformity with specifications. 3thed.Switzerland.

ISO 21748.2017. Guidance for the use of repeatability,reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evalution.2nded.Switzerland.

ISO 21263.2017.Slow-release fertilizers Determination of therelease of the nutrients.Method for coated fertilizers .1thed.Switzerland.

ISO 18645.2016. Fertilizers and soil conditioners Water fertilizer Generalvre quirements. 1thed.Switzerland.

Latimer, G.W. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th Ed. AOAC International Gaithersburg, Maryland. USA.

Magnusson and U. Ornemark (eds) (Eurachem).2014.The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2ndEd.ISBN 978-91-87461-59-0.Available from www.eurachem.org.

NATA Technical Note 17.2018. General Accreditation Guidance - validation and verification of quantitative and qualitative test methods.

National Association of Testing Authorities, 2018. General Accreditation Guidance - validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Australia

National Association of Testing Authorities, 2018. General Accreditation Guidance – Estimating and reporting measurement uncertainty of chemical test results. Australia

Ramsey MH, Ellison SLR and Rostron P (Eds).2019. Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide.Measurement uncertainty arising from sampling .A guide to methods and approaches,2nd ed.UK.

<u>การทดลอง 1.5</u>

พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (2551, 11 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา. ราชกิจจา นุเบกษา เล่ม 125/ตอนที่ 7 ก. หน้า 2/28.

สถาบันการเกษตร

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

ISO 14253-1:2017 Geometrical product specifications (GPS) — Inspection by measurement of workpieces and measuring equipment — Part 1: Decision rules for verifying conformity or nonconformity with specifications

Latimer, George W. (ed). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD.

M H Ramsey, S L R Ellison and P Rostron (eds.) Eurachem/EUROLAB/ CITAC/Nordtest/AMC Guide: *Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches.* Second Edition, Eurachem (2019). ISBN (978-0-948926-35-8). Available from http://www.eurachem.org.

การทดลอง 1.6

พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 (2551, 11 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา. ราชกิจจา นุเบกษา เล่ม 125/ตอนที่ 7 ก. หน้า 2/28.

ยงยุทธ โอสถสภา. 2543. ธาตุอาหารพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.

ISO 14253-1:2017 Geometrical product specifications (GPS) — Inspection by measurement of workpieces and measuring equipment — Part 1: Decision rules for verifying conformity or nonconformity with specifications

Latimer, George W. (ed). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD.

M H Ramsey, S L R Ellison and P Rostron (eds.) Eurachem/EUROLAB/ CITAC/Nordtest/AMC Guide: *Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches.* Second Edition, Eurachem (2019). ISBN (978-0-948926-35-8). Available from http://www.eurachem.org.

การทดลอง 2.1

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 10. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 547 หน้า

กรมวิชาการเกษตร

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.

สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ. 2564. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : https://www.mwa.co.th/download/prd01/reference_ISO17025/Meth-validation-NIMT.pdf. 8 มีนาคม 2564

Latimer, G.W. 2016. Official Method of Analysis of AOAC International. 20thEd. AOAC International Gaithersburg, Maryland. USA.

Magnusson, B., and Ornemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd Ed. ISBN 978-91-87461-59-0.

National Association of Testing Authorities. 2018. General Accreditation Guidance -Validation and Verification of Quantitative and Qualitative test Methods. Australia.

Eftichia Karageorgou, Victoria Samanidou. 2014. Youden test application in robustness assays during method.

<u>การทดลอง 2.2</u>

แม้น อมรสิทธ์ อมร เพชรสม ยุวดี เชี่ยววัฒนา อทิตยา ศิริภิญญานนท์ ศรีวไล โอมอภิญญาณ และ อุมาพร สุขม่วง. 2552. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principle and Techniques of Instrumental Analysis Spectroscopy. ชวนพิมพ์ กรุงเทพมหานคร. 676 หน้า.

Association of analytical commnuities (AOAC). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International Inc., Maryland, USA.

Cox, F. R., F. Adams, and B. B. Tucker. 1982. Liming, fertilization and mineral nutrition. In H.E. Pattee and C.T. Young. Peanut Science and Technology. Amer. Peanut Res. And Ed. Soc., Inc. Texas, U.S.A. p.139-163.

Eurachem. 2000. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

Keren, R. 1996. Chapter 21 Boron, pp. 603-626. In Sparks, D. L., J. M. Bartels and J. M. Bigham, eds. Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin.

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, New York. pp. 405-435.

Sah, R.N. and P.H. Brown. 1 9 9 7 . Boron Determination-A Review of Analytical Methods. Microchemical Journal 56, 258-304.

กรมวิชาการเกษตร

Sparks D.L., A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumnerane. 1996. Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods: Madison, WI, Soil Science Society of America, Soil Science Society of America Book Series Number 5, 494 p.

การทดลอง 2.3

สมศักดิ์ มณีพงศ์. 2537. การวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 175-176

AOAC. 2016. Official Method of Analysis of AOAC International 20th Edition. Washington, DC., USA. p.1-7

Bhandari. N., 2018. Techniques used in plant tissue analysis for essential elements on horticultural plants and correlate with nutrient requirement. *North American Academic Research.*1: 94-113.

EURACHEM. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods–A Laboratory Guide to MethodValidation and Related Topics, 2nd ed. editor Magnusson, B and Örnemark, U. p.70

Gupta. U.C., 1998. Determination of boron, molybdenum, and selenium in plant tissue, pp. 171-173. In: Y.P. Kalra (Ed.), Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. First edition. Washington, D. C.

Nata. 2018. Validation and verification of quantitative and quantitative test methods (Online).https://nata.com.au/files/2021/05/Validation-and-Verification-of-Quantitative-and-Qualitative-Test-Methods.pdf.

การทดลอง 2.4

กรมวิชาการเกษตร. 2553. คู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์.กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

อมรา หาญจวณิช สงกรานต์ มะลิสอน พงศ์พิศ แก้วสุข และ วรรณรัตน์ ชุติบุตร. 2553. พัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ธาตุอาหารเสริม และสารพิษในปุ๋ย โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma (ICP). ใน รายงานผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

Adesanwo, O. O., Ige, D. V., Thibault, L., Flaten, D. and W. Akinremi. 2013. Comparison of Colorimetric and ICP Methods of Phosphorus Determination in Soil Extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44:3061–3075,

กรมวิชาการเกษตร

Bray, R.H. and L.T. Kurtz. 1945. Determination of Total, Organic and Available Forms of Phosphorus in Soil. Soil Sci. 59:39-45

CAMELIA DRĂGHICI, CRISTINA JELESCU, CARMEN DIMA, MIHAELA SICA, ELISABETA CHIRILĂ, SIMONA DOBRINAŞ and ALINA SOCEANU. 2012. Method validation and uncertainty estimation for total phosphorus determination in wastewater sludge samples. STUDIA UBB CHEMIA, LVII, 1, 93 - 102

Iatrou, M., Papadopoulos, A., Papadopoulos, F., Dichala, O., Psoma, P., AND A. Bountla. 2014. Determination of Soil Available Phosphorus using the Olsen and Mehlich 3 Methods for Greek Soils Having Variable Amounts of Calcium Carbonate. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 45:16, 2207-2214

Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and L. A. Dean. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. vol. 939. U. S. Gov. Print Office, Washington D.C, pp. 1-19.

<u>การทดลอง 2.5</u>

กรมวิชาการเกษตร. 2553. คู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 10. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 547 หน้า

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.

สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ. 2564. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : https://www.mwa.co.th/download/prd01/reference_ISO17025/Meth-validation-NIMT.pdf. 8 มีนาคม 2564

Latimer, G.W. 2016. Official Method of Analysis of AOAC International. 20thEd. AOAC International Gaithersburg, Maryland. USA.

Magnusson, B., and Ornemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd Ed. ISBN 978-91-87461-59-0.

National Association of Testing Authorities. 2018. General Accreditation Guidance -Validation and Verification of Quantitative and Qualitative test Methods. Australia. Eftichia Karageorgou, Victoria Samanidou. 2014. Youden test application in robustness assays during method.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลอง 2.6

กรมวิชาการเกษตร. 2553. คู่มือวิธีวิเคราะห์ดินทางเคมีและฟิสิกส์. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 10. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 547 หน้า

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.

สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ. 2564. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: https://www.mwa.co.th/download/prd01/reference_ISO17025/Meth-validation-NIMT.pdf. 8 มีนาคม 2564

AOAC. 2016. Official Method of Analysis of AOAC International. 20thEd. AOAC International Gaithersburg, Maryland. USA.

Magnusson, B., and Ornemark, U. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd Ed. ISBN 978-91-87461-59-0.

NATA. 2018. National Association of Testing Authorities. General Accreditation Guidance - Validation and Verification of Quantitative and Qualitative test Methods. Australia.

Eftichia Karageorgou, Victoria Samanidou. 2014. Youden test application in robustness assays during method.

David Harvey. 2009. Analytical Chemistry 2.0. (online). Available form: http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.0.html. accessed 10 October 2020.

การทดลอง 2.7

แม้น อมรสิทธ์ อมร เพชรสม ยุวดี เชี่ยววัฒนา อทิตยา ศิริภิญญานนท์ ศรีวไล โอมอภิญญาณ และ อุมาพร สุขม่วง. 2552. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principle and Techniques of Instrumental Analysis Spectroscopy. ชวนพิมพ์ กรุงเทพมหานคร. 676 หน้า.

ยงยุทธ โอสถสภา, 2543, ธาตุอาหารพืช, กรุงเทพฯ, ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 424 หน้า.

Alyne, O.L., Kelly, C.D., Josimar, V.R., Rodrigo, T.A, Matheus, L.S., Lucas, F.P., Lilian, M.V.P.S., Fabricio, A.R., Wagner, L.A. and Fabio, M.D. 2016. Silicon Improves Rice Grain Yield and Photosynthesis Specifically when Supplied During the Reproductive Growth Stage, Journal of Plant Physiology, 206: 125–132.

กรมวิชาการเกษตร

Association of analytical commnuities (AOAC). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International Inc., Maryland, USA.

Epstein E., 1999, Silicon, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50(1): 641-664.

Eurachem. 2000. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

Jones, R W. and G. B. Dreher. 1996. Chapter 22 Silicon, pp. 627-637. In Sparks, D. L., J. M. Bartels and J. M. Bigham, eds. Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin.

Marschner, H., 1995, Mineral Nutrition of Higher plant, 2nd ed., Academic Press, New York, 889p.

Nayer, P. K., A. K. Misra and S. Patnaik. 1975. Rapid microdetermination of silicon in rice plant. Plant and Soil. 42: 491-494.

Sah, R.N. and P.H. Brown. 1997. Boron Determination-A Review of Analytical Methods. Microchemical Journal 56, 258-304.

Sparks D.L., A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumnerane. 1996. Methods of Soil Analysis, Part 3, Chemical Methods: Madison, WI, Soil Science Society of America, Soil Science Society of America Book Series Number 5, 494 p.

Synder, G. H., V. V. Matichenkov and L. E. Datnoff. 2007. Silicon. In Handbook of Plant Nutrition. (A.V. Barker and D.J. Pilbleam eds.), CRC Press, Tayor and Francis Group, New York.

กรมวิชาการเกษตร

<u>การทดลอง 3.1</u>

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 2 ง หน้า 11-21. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559.

อารีรัตน์ อิ่มศิลป์, ปิยรัตน์ สิริธัญกิจ และรจนา ประสิทธิ์. การจำแนกข้าวหอมมะลิออกจากข้าวพันธุ์อื่นด้วยเทคนิคสเปคโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้. วารสารวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต 5 ฉบับ 2 (2555): กรกฎาคม - ธันวาคม

Ehsani, M.R.; Upadhyaya, S.K.; and Slaughter, D. A NIR Technique for Rapid Determination of Soil Mineral Nitrogen. Precision Agriculture. 1999, 1: 217-234.

Gonzalez-Martin, I. and Hernandez-Hierro, J.M. Detection and quantification of additives (urea, biuret and poultry litter) in alfaifas by nir spectroscopy with fibre-optic probe. Talanta. 2008, 76: 1130-1135.

Reeves, J.B.; Van Kessel, J.S.; and Malone, G.W. Quick Test for the Determination of Ammonia in Poultry Litter. Poultry Science. 2002, 81: 1301-1307.

Williams P.C., Implementation of Near-Infrared Technology, in Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, Ed by P.C. Williams and K.H. Norris. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, p.163-165 (2001).

Yang, Z.; Han, L. and Fan, X. Rapidly estimating nutrient contents of fattening pig manure from floor scrapings by near infrared reflectance spectroscopy. Near Infrared Spectrosc. 2006. 14, 261-268.

<u>การทดลอง 3.2</u>

จิติมา และสงกรานต์. 2556. ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์โดยเทคนิค NIRS. ในเอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ 2556 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

ชลันธร วิชาศิลป์ และสมศักดิ์ ระยัน. 2557. การทำนายค่าอินทรียวัตถุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมในดินโดยใช้แสงอินฟราเรดย่านใกล้. วารสารแก่นเกษตร 42 (1) (พิเศษ) 1 : 708-713

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550. (2551, 11 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 125/ตอนที่ 7 ก. หน้า 2-3/28.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559. (2559, 25 พฤศจิกายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 134/ตอนพิเศษ 2 ง.

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดปริมาณอินทรียวัตถุที่ให้มีในปุ๋ยอินทรีย์เคมี ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2554. (2554, 1 สิงหาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 128/ตอนพิเศษ 98 ง. หน้า 20.

Fassio, A.; E. Restaino, D. Cozzolino. Prediction of fiber fractions, ash and organic matter digestibility in untreated maize stover by near infrared reflectance spectroscopy. Agro Sur. 2014, 42(1), 81-86.

กรมวิชาการเกษตร

Fidencio, P.H.; R.J. Poppi; J.C. Andrade and H. Cantarella. Determination of organic matter in solil using near-infrared spectroscopy and partial least squares regression. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 2002, 33 (9&10), 1607-1615.

Latimer, George W. (ed) . 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Rockville, MD.

Pan, T.; H. Chen.; J. Xie.; H. Yin and X. Chen. 2009. Wavelengths selection of near infrared diffuse reflection spectroscopy analysis for soil organic matter, pp. 159-162. *In* Proceedings of the 14th International Conference. IM Publications LLP, OHY, UK.

Wang, C., C. Huang, J. Qian, J. Xiao, H. Li, Y. Wen, X. He, W. Ran, Q. Shen and G. Yu. 2014. Rapid and Accurate Evaluation of the Quality of Commercial Organic Fertilizers Using Near Infrared Spectroscopy. Evaluation of Commercial Organic Fertilizers. 9(2) : 1-7.

Williams P.C., Implementation of Near-Infrared Technology, in Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, Ed by P.C. Williams and K.H. Norris. American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, p.163-165 (2001).

<u>การทดลอง 3.3</u>

ระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. 2556. กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ.

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Standard test method for chemical analysis, quick stone, and hydrate lime. ASTM. 2016. C25, Annual Book of ASTM Standards, 2016., Vol.04.01, 14-51.

AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. AOAC International Gaithersburg, MD, USA, Official Method 20th Ed.

Sungchan Oh, Chang-Uk Hyun and Hyeong-Dong Park. Near-Infrared Spectroscopy of Limestone Ore for CaO Estimation under Dry and Wet Conditions. Minerals. 16 September 2017 : 1-11.

Williams P.C., Implementation of Near-Infrared Technology, in Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, Ed by P.C. Williams and K.H. Noris. Amarican Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, p. 163-165 (2001)

Yaser Ostovaria, Shoja Ghorbani-Dashtakia, Hossein-Ali Bahramib, Mozhgan Abbasic, Alexandre M. Demattee, Emmanuel Arthurd, Panos Panagos. Towards prediction of

กรมวิชาการเกษตร

soil erodibility, SOM and $CaCO_3$ using laboratory Vis-NIR spectra: A case study in a semi-arid region of Iran. Geoderma Volume 314, 15 March 2018, 102-112.

Tanyapa Sangpongpitthaya, Alfred.A Chrity, Rein Terje. Quantitative Determination of Cacium Hydoxide by Using Near-Infrared Spectroscopy.

DEQ. 2013. Oregon Department of Environmental Quality. Data Validation Criteria for Water Quality Parameters Measured in the Field. Portland, Orgeon, US. Available at https://www.oregon.gov/deq/FilterDocs/DataQualMatrix.pdf

การทดลอง 3.4

ระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. 2556. กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ.

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ASTM Standard C25, 2016, "Standard test method for chemical analysis, quickstone, and hydrate lime" ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016.

ASTM Standard C50, 2016, " Practice for Sampling, Sample Preparation, Packaging, and Marking of Lime and Limestone Products, PA, 2016.

ASTM Standard C110, 2016, "Standard test method for physical testing of quicklime, hydrate lime and limestone" ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016.

Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. AOAC International Gaithersburg, MD, USA, Official Method 20th Ed.

Sungchan Oh, Chang-Uk Hyun and Hyeong-Dong Park. Near-Infrared Spectroscopy of Limestone Ore for CaO Estimation under Dry and Wet Conditions. Minerals. 16 September 2017 : 1-11.

Williams P.C., Implementation of Near-Infrared Technology, in Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, Ed by P.C. Williams and K.H. Noris. Amarican Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, p. 163-165 (2001)

Yaser Ostovaria, Shoja Ghorbani-Dashtakia,, Hossein-Ali Bahramib, Mozhgan Abbasic, Alexandre M. Demattee, Emmanuel Arthurd, Panos Panagos. Towards prediction of soil erodibility, SOM and $CaCO_3$ using laboratory Vis-NIR spectra: A case study in a semi-arid region of Iran. Geoderman Volume 314, 15 March 2018, 102-112.

การทดลอง 3.5

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ระเบียบกรมพัฒนาที่ดินว่าด้วยการใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. 2556. กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ.

ราชกิจจานุเบกษา. 2549. ประกาศกระทรวงกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง ยกเลิกและกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปูนไลม์ เล่ม 1 บทนิยามเกี่ยวกับปูนไลม์และหินปูน. 24 สิงหาคม 2549. ราชกิจจานุเบกษา. เล่มที่ 123 ตอนที่ 84 ง.

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ASTM. 2016 Standard test method for chemical analysis, quick stone, and hydrate lime. American Society for Testing and Materials, ASTM C25. Vol.04.01, 14-51.

Official Methods of Analysis of AOAC International. 2016. AOAC International Gaithersburg, MD, USA, Official Method 20th Ed.

Oregon Department of Environmental Quality (DEQ). 2013. Data Validation Criteria for Water Quality Parameters Measured in the Field. Portland, Orgeon, US. Available at https://www.oregon.gov/deq/FilterDocs/DataQualMatrix.pdf

Sungchan Oh, Chang-Uk Hyun and Hyeong-Dong Park. Near-Infrared Spectroscopy of Limestone Ore for CaO Estimation under Dry and Wet Conditions. Minerals. 16 September 2017 : 1-11.

Williams P.C., Implementation of Near-Infrared Technology, in Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, Ed by P.C. Williams and K.H. Noris. Amarican Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA, p. 163-165 (2001)

Yaser Ostovaria, Shoja Ghorbani-Dashtakia,, Hossein-Ali Bahramib, Mozhgan Abbasic, Alexandre M. Demattee, Emmanuel Arthurd, Panos Panagos. Towards prediction of soil erodibility, SOM and $CaCO_3$ using laboratory Vis-NIR spectra: A case study in a semi-arid region of Iran. Geoderma Volume 314, 15 March 2018, 102-112.

<u>การทดลอง 4.1</u>

AOAC. 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International Gaithersburg, MD, USA, Official Method 20th Ed.

Ari, B. and S. Bakırdere. 2020. A primary reference method for the characterization of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a candidate certified reference seawater material: TEA/$Mg(OH)_2$ assisted ID^3MS by triple quadrupole ICP-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 1140, 178–189.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Brandy, N. C. and R. R. Weil. 2002. *The nature and properties of soils*. 13th ed. New Jersey: Prentice Hall.

Cristina, S. M., M. M. G. Juan, J. I. G. Alonso, and S. Alfredo. 1999. Accurate determination of iron, copper and zinc in human serum by isotope dilution analysis using double focusing ICP-MS. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 14, 1505-1510.

ISO 17034. 2016. *ISO 17034:2016 - General requirements for the competence of reference material producers*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

ISO Guide 35. 2017. *ISO Guide 35:2017 - Reference materials – guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

ISO/IEC 17025. 2017. *ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

Kawamoto, M. S., G. B. de Souza and A. R. de Araujo Nogueira. 2019. Preparation and evaluation of a new reference material for macro- and micronutrients in fish feed. *Microchemical Journal*, 149, 104027.

Lee, J.-M., E. A. Boyle, Y. Echegoyen-Sanz, J. N. Fitzsimmons, R. Zhang and R. A. Kayser. 2011. Analysis of trace metals (Cu, Cd, Pb, and Fe) in seawater using single batch nitrilotriacetate resin extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 686(1-2), 93–101.

Linsinger T.P.J. and A. Botha. 2019. Principles for the characterisation and the value assignment of the candidate reference material in the new ISO Guide 35:2017. *Accreditation and Quality Assurance*, 24, 157–161.

Lum, T., and S. L. Kelvin. 2016. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 31, 1078-1088.

Milton, M. J. T. and T. J. Quinn. 2001. Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia*, 38(4), 289–296.

Olivares, I. R. B., G. B. Souza, A. R. A. Nogueira, G. T. K. Toledo and D. C. Marcki. 2018. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 53–64.

Quevauviller, P. 2019. Quality Assurance | Reference Materials. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, 514-518.

Santana Santos, A., L. Oliveira dos Santos, J. B. Pereira Junior, F. M. de Oliveira and S. L. C. Ferreira. 2020. Development of reference material from powdered milk: uncertainties and interlaboratory evaluation through confidence ellipses. *Microchemical Journal*, 159, 105330.

Thomas, W. M., and R. H. Wiedmeyer. 1998. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic spectroscopy*, 19(5), 150-155.

Vicentim, M. P., T. M. Monteiro, R. R. R. de Almeida, A. D. A. Soares, J. M. Rodrigues and E. C. P. do Rego. 2019. Isotope dilution gas chromatography - mass spectrometry for the development of certified reference material of ethyl carbamate in hydroalcoholic matrix. *Microchemical Journal*, 147, 497–506.

<u>การทดลอง 4.2</u>

AOAC. 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International Gaithersburg, MD, USA, Official Method 20th Ed.

Ari, B. and S. Bakırdere. 2020. A primary reference method for the characterization of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a candidate certified reference seawater material: TEA/$Mg(OH)_2$ assisted ID^3MS by triple quadrupole ICP-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 1140, 178–189.

ISO 17034. 2016. *ISO 17034:2016 - General requirements for the competence of reference material producers*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

ISO Guide 35. 2017. *ISO Guide 35:2017 - Reference materials – guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

ISO/IEC 17025. 2017. *ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.

Kawamoto, M. S., G. B. de Souza and A. R. de Araujo Nogueira. 2019. Preparation and evaluation of a new reference material for macro- and micronutrients in fish feed. *Microchemical Journal*, 149, 104027.

Lee, J.-M., E. A. Boyle, Y. Echegoyen-Sanz, J. N. Fitzsimmons, R. Zhang and R. A. Kayser. 2011. Analysis of trace metals (Cu, Cd, Pb, and Fe) in seawater using single batch nitrilotriacetate resin extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 686(1-2), 93–101.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Linsinger T.P.J. and A. Botha. 2019. Principles for the characterisation and the value assignment of the candidate reference material in the new ISO Guide 35:2017. *Accreditation and Quality Assurance*, 24, 157–161.

Lum, T., and S. L. Kelvin. 2016. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 31, 1078-1088.

Milton, M. J. T. and T. J. Quinn. 2001. Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia*, 38(4), 289–296.

Olivares, I. R. B., G. B. Souza, A. R. A. Nogueira, G. T. K. Toledo and D. C. Marcki. 2018. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 53–64.

Quevauviller, P. 2019. Quality Assurance | Reference Materials. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, 514-518.

Santana Santos, A., L. Oliveira dos Santos, J. B. Pereira Junior, F. M. de Oliveira and S. L. C. Ferreira. 2020. Development of reference material from powdered milk: uncertainties and interlaboratory evaluation through confidence ellipses. *Microchemical Journal*, 159, 105330.

Thomas, W. M., and R. H. Wiedmeyer. 1998. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic spectroscopy*, 19(5), 150-155.

Vicentim, M. P., T. M. Monteiro, R. R. R. de Almeida, A. D. A. Soares, J. M. Rodrigues and E. C. P. do Rego. 2019. Isotope dilution gas chromatography - mass spectrometry for the development of certified reference material of ethyl carbamate in hydroalcoholic matrix. *Microchemical Journal*, 147, 497–506.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

<u>การทดลอง 5.1</u>

ศุภากร ดวนใหญ่, จริยา วงศ์ตรี และวรรณรัตน์ ชุติบุตร. 2561. พัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสที่ไม่ละลายในสารละลายแอมโมเนียมซิเตรทในปุ๋ยเคมี. รายงานโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดินและน้ำ โดยนางสาววรรณรัตน์ ชุติบุตร. กรมวิชาการเกษตร. แขวงลาดยาว. เขตจตุจักร. กทม. หน้า 71-77.

สถาบันอาหาร, 2543. การทำ Validation วิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. ณ โรงแรมมารวย กรุงเทพฯ.

สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ. 2550. เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตร “นักวิเคราะห์มืออาชีพสาขาเคมี (Professional Chemical Analyst) รุ่นที่ 4 ระหว่างวันที่ 22

กันยายน 2549 ถึง 24 กุมภาพันธ์ 2550 ณ อาคารสถานศึกษาเคมีปฏิบัติชั้น 3 ห้อง 312. สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

AOAC international. 2009. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th edition. Method 2.7.08. Chapter2.p37.

Ben-Dor, E., and A. Banin. 1989. Determiantion of organic matter content in arid-zone soils using a simple “loss-on-ignition” method. Commun. Soil. Sci. Soc. Am. J. 43:78-83.

Craswell, E.T. and R.D.B. Lefroy. 1999. The role and function of organic matter in tropical soils. Nutreint Cycling in Agroecosystem. 61:7-18.

Dorivar A. Ruiz Diaz, David B. Mengel and Kent L. Martin. 2011. Phosphorus Facts, soil, plant and fertilizers. Department of Agronomy. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service.

Ecological Risk Assesment Support Center office of Research and Development. United States Environmental Protection Agency.

Heiri, O., A.F. Lotter and G. Lemcke. 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. Journal of Paleolimonology. 25: 101-110.

H.H.A. Mulanula and M.W.Oggema, 1978. The Comparative Effect of Water Soluble Phosphorus and Citrate Soluble Phosphorus on Yield and Plant Characters of Wheat in Kenya. East African Agricultural and Forestry journal, Vol.43, Issue 3, 179-184.

K.D.Jacob, W.L.Hill, W.H. Ross and L.F.Rader.Jr, 1930. Composition of Citrate-Insoluble Residues from Superphosphates and Ammoniated Superphosphates. Ind.Eng.Chem.1930,22,12,1385-1392.

Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1996. Chapter 34 total carbon, organic carbon and organic matter, pp. 961-1010. In Sparks, D.L., J.M. Bartels and J.M. Bigham, eds. Methods of Soil Analysis, Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin.

N. F. Newlon. 2003. Comparison of the Ammonium Oxalate Extraction of Fertilizer for K2O, Method 983.02,with the Ammonium Citrate/EDTA Extraction, Method 993.31. Journal of Association of Official Analytical Chemists. Volume 86.No.4

Ranny, R.W. 1969. An organic carbon – organic matter conversion equation for Pennsylvania surface soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 33:809-811.

ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์

Robertson, S. 2011. Direct Estimation of Organic matter by loss on ignition:Method. Property of SFU Soil Science lab.

Salehi, M.H., O. H. Beni, H. B. Harchigani, I.E. Borujeni and H.R. Motaghian. 2011. Refining soil organic matter determination by Loss-on-ignition. Pedosphere. 21(4): 473-482.

Schulte, E.E. and B. Hoskins. 2011. Chapter 8: Recommended Soil Organic Matter Tests. In Soil Testing Procedures for the Northeasthern United states. Northern Regional Publication. Cooperative Extension. College of Agriculture and natural resources. University of Delaware.

Schumacher, B.A. 2002. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soil and sediments. Environmental Sciences Division National Exposure Research Laboratory.

T. Akiyama and J. Ando, 1972. Constituents and Properties of Ammoniated Slurry From Wet-process Phosphoric Acid. Bulletin of The Chemical Society of Japan. Vol.45, 2195-2920.

T.P.Hignett and J.A.Brabson. 1961. Phosphate Solubility, Evaluation of Water-Insoluble Phosphorus in Fertilizers by Extraction with Alkaline Ammonium Citrate Solutions. J.Agric.Food Chem. 9, 4. 272-276.

U.D.Termine and A.S.Posner. 1970, Calcium phosphate formation *in vitro*: I. Factors affecting initial phase separation. Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 140, Issue 2, Pages 307-317.

Veres, D.S., 2002. A comparative study between loss on ignition and total carbon analysis on minerogenic sediments. Geoglacia, XLLVII, 1. 171-182.

กรมวิชาการเกษตร

<u>การทดลอง 5.2</u>

กรมพัฒนาที่ดิน. 2553. คู่มือการปฏิบัติงาน กระบวนการวิเคราะห์พืช ปุ๋ย และสิ่งปรับปรุงดิน.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2560. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559. กรรมวิธีที่ 1.09.01 ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เมื่อวันที่ ๔ มกราคม 2560.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2544. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จำเป็น อ่อนทอง. 2536. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์ธาตุอาหารในพืช. ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร.

จำเป็น อ่อนทอง และจักรกฤษณ์ พูนภักดี. 2560. คู่มือการวิเคราะห์ดินและพืช. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิรุณ ติระพัฒน์. 2560. รายงานการตรวจสอบตะกอนของสารละลายปรับสี เตรียมตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01.

พิรุณ ติระพัฒน์, เยาวลักษณ์ แสงแก้ว และ สรัญญา ช่วงพิมพ์. 2559. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธี Official methods of analysis of fertilizers. ประชุมวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8.

APHA, AWWA and WEF. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. United book press, Inc.

AOAC. 2016. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 20thed. Official Method of Analysis. AOAC International Gaithersburg, MD.

Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nded.).

Faithfull, N.T. 2002. Methods in agricultural chemical analysis. CAB International.

Heyns, J.B.B. and Cruywagen, J.J. 1986. Yellow Molybdenum(VI) oxide dehydrate. Inorganic Syntheses. Volume 24. p.191-192.

International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). 2013. Methods of Soil, Plant and water Analysis. 3th edition.

Motsara, M.R. and Roy, R.N. 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. Food and Agriculture Organization of the United nations (FAO).

Official method of analysis of fertilizers. 1987. Published by The National Institute of Agro-Environmental Science, Ministry of agiculture, Forestry, and Fisheries, Japan.

USDA-CSREES Regional Committee. 2000. Methods of Phosphorus Analysis for Soils Sediments, Residuals, and Waters. Editor Gary M. Pierzynski.

<u>การทดลอง 5.3</u>

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยชีวภาพ. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพ. 45 หน้า.

กัลยกร โปร่งจันทึก ภัชญภณ หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา จินดารัตน์ ชื่นรุ่ง และพีรพงษ์ เชาวนพงษ์. 2556. การคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ. หน้า 192-199. *ใน: รายงานผลการปฏิบัติงานสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ประจำปี* 2556.

อรุณี คงสอน. 2556. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาการสร้างฮอรโมนออกซิน และการตรึงไนโตรเจนโดยเชื้ออะโซโตแบคเตอร. 33 หน้า.

สำนักวิชาการเกษตร

อาภากร หล่องทองหลาง. 2553. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของ *Azospirillum largimobile* และ *Azotobacter vinelandii* ในการปลูกข้าวระบบประณีต. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 79 หน้า.

Abd El-Fattah, D.A. W.E Eweda, M.S Zayed and M.K. Hassanein. 2013. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. Annals of Agricultural Sciences 58(2): 111–118.

Boddey, R.M. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contribution and prospects for improvement. Plant Soil. 174: 195-209.

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can J Microbiol 41:109- 117.

Gray E.J. and D.L. Smith 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37:395-412.

Hardy, R.W.F.; R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Application of the Acetylene–ethylene Assay for Measurement of Nitrogen Fixation. Soil Biol. Biochem. 5: 47-81.

Hartmann, A. and Zimmer, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum*/Plant Associations (Okon, Y., Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. USA. 15–39 pp.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 787 p.

Jacoud, C. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CTR1 during maize seed germination. Canadian Journal of Microbiology. 45: 339-342.

Jensen, H. L. 1954. The Azotobacteriaceae. Bacteriol. Rev. 18(4): 195–214.

Khammas, K.M., E. Ageron, P.A.D. Grimont, and P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140, 679–693.

Magalhães, F.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall, J. Döbereiner. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Cienc. 55: 417–429.

Meunchang, S., S. Panichsakpatana, S. Ando, T. Yokayama. 2004. Phylogenetic and Physiological characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Journal of the Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition 50(3): 413-421.

Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans and J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (Leptochloa fusca (L.) Kunth). Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 43–51.

Tarrand, J.J., N.R.Krieg and J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967–980.

Then, C., Z. Othman, W.A.W. Mustapha, M.R. Sarmidi , R. Aziz, H. A. El Enshasy. 2012. Production of Alginate by *Azotobacter vinelandii* in semi-industrial scale using batch and fed-batch cultivation systems. J. Adv. Sci. Res., 3(4): 45-50.

การทดลอง 5.4

ธงชัย มาลา. 2550. ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ: เทคนิคการผลิตและการใช้ประโยชน์. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 300 หน้า.

หนึ่ง เตียอำรุง. 2548. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแบคทีเรีย PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). ว. เทคโนโลยีสุรนารี. 12(3): 249–258.

อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และธันยชัย สุระ. 2534. ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. ว. โลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 1(4): 469-477.

Choudhury, A., I.R. Kennedy. 2004. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. Biology and Fertility of Soils 39: 219–227.

Christopher, K. and E. Bruno. 2003. Identification of Bacterial Species. Pages 103-130. *In: Tested Studies for Laboratory Teaching.* O'Donnell M.A. (ed.). Proceedings of the 24th Workshop /Conference of the Association for Biology Laboratory Education.

Ferreira, L., F. Sanchez-Juanes, P. Gracia-Fraile, R. Rivas, P. Mateos, E. Martinez-Molina, J.M. Gonzales-Ziegler, D.A. Mariotti, V. Pfluger, M. Saad, G. Vogel, M. Tonolla and X. Perret. 2011. *In Situ* Identification of Plant-invasive Bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. PloS ONE. 7(5): e37189.

Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose. 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, Waterloo, Ontario, Canada. 276 p.

กรมวิชาการเกษตร

Hrabák, J., R. Walková, V. Studentová, E. Chudácková and T. Bergerová. 2011. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization–time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. 49(9): 3222-3227.

Hosseini, S. and S.O. Martinez-Chapa. 2017. Fundamentals of MALDI-TOF-MS Analysis. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 68 p.

Jia, R.Z., R.J. Zhang, Q. Wei, W.F. Chen, I.K. Cho, W.X. Chen and Q.X. Li. 2015. Identification and Classification of Rhizobia by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. Genom. Proteom. Bioinf. 8(6): 98-107.

Singhal, N., M. Kumar, P.K. Kanaujia and J.S. Virdi. 2015. MALDI-TOF Mass Spectrometry: an Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. Front. Microbiol. 6: 1-16.

Sparkman, D.O. 2000. Mass Spectrometry Desk Reference. Global View Publishing, Pittsburgh, PA USA. 110 p.

Stets, M. I., A. S. Pinto, L. F. Huergo, E. M.de Souza, V. F.Guimarães, A. C.Alves, M. B. R. Steffens, R. A. Monteiro, F. O. Pedrosa and L. M. Cruz. 2013. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. Journal of Biotechnology 165 (3-4): 167–174.

Tshikhudo, P., R. Nnzeru, K. Ntushelo and F. Mudau. 2013. Bacterial Species Identification Getting Easier. Afr. J. Biotechnol. 12(41): 5975-5982.

Váradi, L., J.L. Luo, D.E. Hibbs, J.D. Perry, R.J. Anderson, S. Orenga and P.W. Groundwater. 2017. Methods for the Detection and Identification of Pathogenic Bacteria: Past, Present, and Future. Chem. Soc. Rev. 46(16): 4818–4832.

Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J. Bacteriol. 173: 697-703.

Wilson, K. and J. Walker. 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (7th Eds). Cambridge University Press. 744 p.

Ziegler, D., A. Mariotti, V. Pfluger, M. Saad, G. Vogel, M. Tonolla and X. Perret. 2012. *In Situ* Identification of Plant-invasive Bacteria with MALDI-TOF Mass Spectrometry. PloS ONE. 7 (5): e37189.

<u>การทดลอง 5.5</u>

American Public Health Association, the American Water Works Association and the Water Environment Federation (APHA, AWWA and WEF). 2017. Standard Methods for the

Examination of Water and Wastewater. 23rd ed. Washington D.C. American Public Health Association. 1360 p.

Association of analytical commnuities (AOAC). 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International Inc., Maryland, USA.

Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1985. Water Quality for Agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 29. FAO Rome.

Iyasele, J. U., J. David and D. J. Idiata. 2015. Investigation of the Relationship between Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids for Mono-Valent, Di-Valent and Tri-Valent Metal Compounds. International Journal of Engineering Research and Reviews 3: 40-48.

Scanlon, B. R., I. Jolly, M. Sophocleous, and L. Zhang. 2007. Global impacts of conversions from natural to agricultural ecosystems on water resources: Quantity versus quality Water Resources Research 43.

Viscony, R. F., J. M. de Paz Becares, R. D. Z. Hernandez, and J. S. Diaz. 2004. Development of an equation to relate electrical conductivity to soil and water salinity in a Mediterranean agricultural environment. Australian Journal of Soil Research 42(4) 381 – 388.

Thirumalini, S. and K. Joseph. 2009. Correlation between Electrical Conductivity and Total Dissolved Solids in Natural Waters. Malaysian Journal of Science 28 (1): 55-61.

กรมวิชาการเกษตร

การทดลอง 5.6

AOAC. 2016. Guidelines for Standard Method performance Requirements. Appendix F.

Awad, El-M.M., A.M. Abd El-Hameed and Z.S. Shall. 2007. Effect of glycine and nitrogen fertilizer rates on growth, yield and chemical composition of potato. J. Agric. Sci. Mansoura Univ. 32: 8541-8551.

Fang, Z. ,J. Ou, Y. Huang, Q. Li ,G. Xu, Zhungzhen and L. S. Yang. 2015. Determination of 21 free amino acids in fruit juices by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. Food Anal Methods 8: 428-437.

Katarzyna, S., S. Ilona, R. Jolanta, K.Waldemar, B. Grazyna. 2017.Method Valiidation of determaination of amino acids in feed by UHPLC 22: 247-252.

Maria, P. B. and F. Maisano. 2006. Validation of reversed phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. J.Biomol Tech. 17(2): 131-137.

NATA. 2018. General Accreditation Guidance-Validation and verification of Quantitative and Qualitative Test Methods.

Rashida Qasim. 1991. Amino acid composition of some common seaweeds. Pakistan Journal of Phamaceutical Science 4(1): 49-54.

Waters . 1996. Analyzing feed hydroolysate samples using the AccQ Tag method. Waters corporation U.S.A.

<u>การทดลอง 5.7</u>

ทวีศักดิ์ แสงอุดม. 2559. สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชและแนวทางการใช้กับไม้ผล เอกสารการเผยแพร่ทางวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 1 สถาบันวิจัยพืชสวน จตุจักร กรุงเทพฯ. กันยายน 2559. หน้า 88.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศ. พิมพ์ครั้งที่ 4 วิชัยการพิมพ์ กรุงเทพฯ. 195 หน้า

ภิรมย์ สุวรรณสม ปนัดดา แทนสุขโพธิ์ ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย และเฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2551. การหาปริมาณจิบเบอเรลลิน (จีเอ 3) ในน้ำหมักชีวภาพ. การประชุมทางวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 10 ณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 18 มกราคม 2551. หน้า 28.

AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method performance Requirements, 2016.

Cui, K., Lin, Y., Zhou, X., Li, S., Lui, H., Zeng, F., Zhu, F., Ouyang, G. and Zeng, Z. 2015, Comparision of sample pretreatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospry ionization-tandam mass spectrometry. *Microchemical Journal* 121 (2015) 25-31.

EURACHEM. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, The Fitness for Purpose of Analytical Methods, 2014.

Liu, H. T., Y. F. Li, T. G. Luan, C. Y. Lan and W. S. Shu. 2007. Simultaneous Determination of Phytohormones in Plant Extracts using SPME and HPLC. Chroma., 66 (7): 515–520.

NATA. General Accreditation Guidance-Validation and verification of Quantitative and Qualitative Test Methods, 2018.

Tansupo, P., P. Suwannasom, D. L. Luthria, S. Chanthai and C. Ruangviriyachai. 2010. Optimised separation procedures for the simultaneous assay of three plant hormone in liquid biofertiliser. Phytochem Anal. 21 (2):157-62.

กรมวิชาการเกษตร

Yan, H., F. Wang, D. Han and G. Yang. 2012. Simultaneous determination of four plant hormone in banana by molecularly imprinted solid phase extraction couple with high performance liquid chromatography. Analyst. 137 (2): 2884-90.

การทดลอง 5.8

สุนันทา ชมพูนิช. 2546. ฮอร์โมนพืชและธาตุอาหารพืชในน้ำหมักชีวภาพ. กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Georgina D. Arthur., Wendy A. Stirk., Ondrej Novak., Petr Hekera., and Johannes Van Staden. 2007. Occurrence of nutrients and plant hormones (cytokinins and IAA) in the water fern *Salvinia molesta* during growth and composting. Environmental and Experimental Botany 61, 137–144.

Yong Zhang., Yujing Yanb., Chunxia Fub., Ming Lia. and Yan'an Wangb. 2016. Zinc sulfate spray increases activity of carbohydrate metabolicenzymes and regulates endogenous hormone levels in apple. Sci. horticulturae 211, 363-368.

กรมวิชาการเกษตร