

## ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

### Method Validation on Analysis of Ammonium Nitrogen in Fertilizer

นางสาวบังอร แสนคาน<sup>1</sup> นางสาวสุพัตรา สุภาการ<sup>1</sup> นางนตยา จันทร์ส่อง<sup>1</sup>

#### บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 ได้ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเพื่อให้ได้เทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว แม่นยำ สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากลโดยศึกษาหา ความถูกต้อง (Accuracy) ความแม่นยำ (Precision) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Range and Linearity) และ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection) ดำเนินการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง Calcium Ammonium Nitrate (CRM-BCR 178, 13.04% Nitrogen) และวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน Ammonium Sulphate 99.999 % (21.20 % Nitrogen) ประเมินความถูกต้องจากค่า Recovery ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (100.38% และ 101.13%) ประเมินความแม่นยำโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio พบว่าค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ หาค่า Range and Linearity พบว่าช่วงที่เหมาะสมและเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนคือ 1.05-21 % หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.02 % และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.08 % ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดนั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นจึงถือว่าวิธีการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยดังกล่าวนี้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

## 1 สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

### คำนำ

แอมโมเนียมไนโตรเจนเป็นอีกหนึ่งรูปที่สำคัญของไนโตรเจน ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีบทบาทในการเจริญเติบโตของพืชโดยช่วยให้พืชสร้างโปรตีน พืชสามารถดูดซึมไนโตรเจนในรูปของไนเตรท ( $\text{NO}_3^-$ ) แล้วแตกตัวออกเป็นแอมโมเนียมไอออน ( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ ) รวมตัวกับ Carbon skeleton เป็น Glutamic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของกรดอะมิโน กรดอะมิโนจะจับตัวกันด้วย Peptide bond ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญอยู่ในโปรตีนของพืช (ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

การตรวจสอบควบคุมคุณภาพปุ๋ยเคมีตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 (แก้ไขเพิ่มเติม ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2550) นั้นต้องอาศัยวิธีการทดสอบปริมาณไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารหลักของปุ๋ยเคมี วิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 เป็นวิธีที่ดัดแปลงและปรับปรุงจากวิธีมาตรฐานของ AOAC 2005<sup>th</sup> Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07 (In-house Method) จึงต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานสากล

### วิธีการดำเนินงาน

#### เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
2. Kjeldahl Digestion Apparatus and Distilling Apparatus
3. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์

#### สารเคมี

1. Ethyl Alcohol 90 % , AR Grade
2. Boric Acid, AR Grade
3. Methylene Blue, AR Grade
4. Methyl Red, AR Grade
5. Standard Hydrochloric Acid 1 N, AR Grade
6. Sodium Hydroxide, Commercial Grade

## 7. วัสดุอ้างอิงรับรอง

7.1 Ammonium Sulphate 99.999 % Purity 21.20 % Nitrogen (Aldrich Chem. 204501)

## 8. วัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน

8.1 Calcium Ammonium Nitrate 13.04% Nitrogen (CRM-BCR 178)

8.2 Sodium Carbonate Purity 99.970 ± 0.014 % (SRM 351a)

## วิธีการ

1. การศึกษาหาค่า Linearity , Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน

1.1 นำวัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน มาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2 ชั่งน้ำหนัก 0.3xxx กรัม ใส่ Kjeldahl Flask ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียม

ไนโตรเจนตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005<sup>th</sup> Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07

2.3 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจน คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.4 คำนวณค่า Linearity, LOD และ LOQ

2. การศึกษาหาค่า Accuracy วิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

2.1 ชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐานของปุ๋ยน้ำหนัก 0.3xxx กรัม

2.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005<sup>th</sup> Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07

2.3 บันทึกผลปริมาตร HCl ที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร) และคำนวณผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้

2.4 เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่ารับรองของ CRM โดยการพิจารณา % Recovery ตาม AOAC Peer – Verified method , Nov. 1998 เกณฑ์การยอมรับ อยู่ในช่วง 98-102 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าอ้างอิง (จากใบรับรอง)}} \times 100$$

3. การศึกษาหาค่า Precision วิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

3.1 ชั่งชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐานของปุ๋ยน้ำหนัก 0.3xxx กรัม ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่า 10 ซ้ำ โดยบุคคล เวลา และเครื่องมือเดียวกัน

3.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนตามวิธีวิเคราะห์ AOAC 2005<sup>th</sup> Ed. Method 920.03 ข้อ 2.4.07

3.3 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ และคำนวณหาค่า Precision โดยใช้ Horwitz equation คำนวณแบบ Repeatability

### ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การหา Linearity, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย Bias และ Standard Deviation ของวัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน

วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน	$\bar{X}$	Bias	SD
STD	1.05	0.004	0.003
Calcium Ammonium Nitrate (CRM)	13.09	0.05	0.08
Ammonium Sulphate	21.17	-0.03	0.14

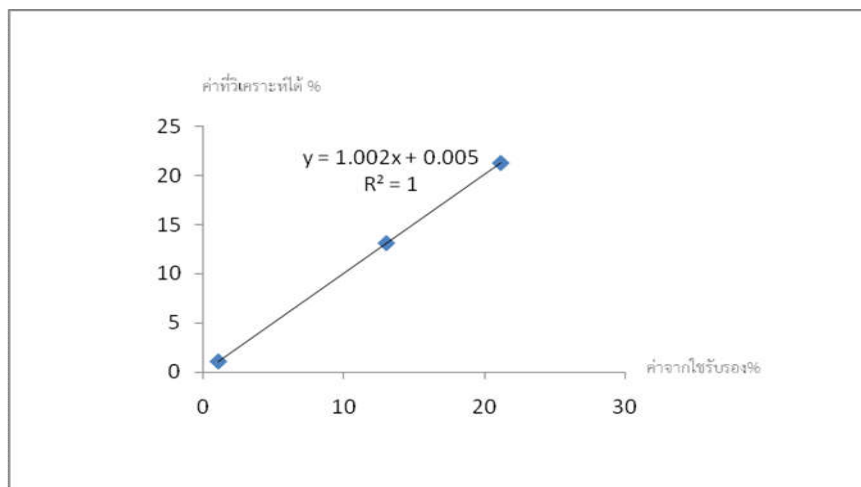
#### 1.1 การหา Linearity

จากตารางที่ 1 เมื่อนำค่าจริงจากใบรับรอง และค่าที่วิเคราะห์ได้มาสร้างกราฟ และพิจารณาจากค่า R โดยค่า R ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ จะต้องมากกว่า 0.995 จากภาพที่ 1 พบว่า  $R = 1$  แสดงว่า

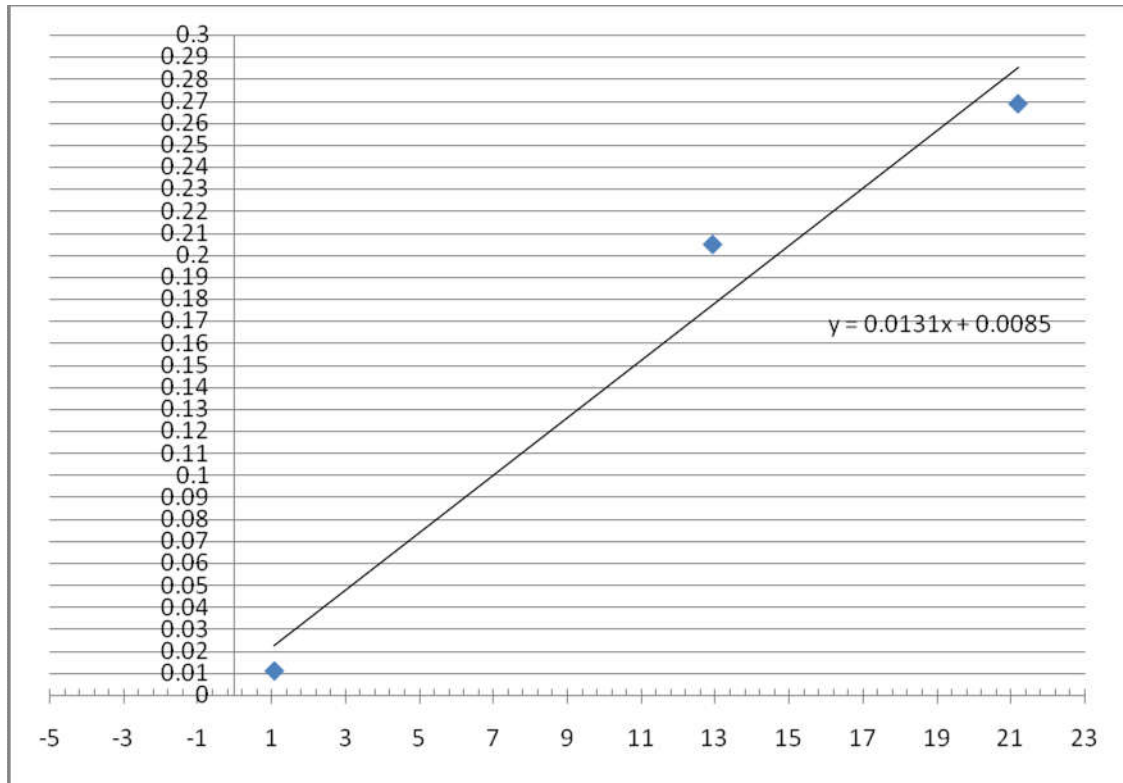
ช่วงการวิเคราะห์ที่ < 21.25 มีความเป็นเส้นตรง สามารถวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในช่วงดังกล่าวได้

$$\text{สูตรการคำนวณ } R^2 = \frac{[\sum xy - \sum x(y/n)]^2}{[\sum x^2 - (\sum x)^2/n] [\sum y^2 - (\sum y)^2/n]}$$

ภาพที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแอมโมเนียมไนโตรเจนจากใบรับรอง และค่าที่วิเคราะห์ได้



## 1.2 การหา Limit of Detection และ Limit of Quantitation



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย และค่า SD ของการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน

จากกราฟ (ภาพที่ 2) พบว่า  $S_o = 0.0085$  ดังนั้น

$$LOD = 3S_o = 0.02 \% \text{ NH}_4^+ - \text{N}$$

$$LOQ = 10S_o = 0.08 \% \text{ NH}_4^+ - \text{N}$$

2. การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

**ตารางที่ 2** แสดงผลการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix) แตกต่างกัน โดยการเติม CRM/SRM ความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ลงไป

รายการคำนวณ	Sample Blank	Ammonium Sulphate	CAN	STD.
	( % AN)	( 21.20% AN)	(13.04%AN)	(1.051%AN)
ค่าเฉลี่ย	0.00	21.25	13.09	1.05
SD	0.00	0.06	0.16	0.003
%Recovery	-	101.13	100.38	100.29
t-test	-	0.53	0.69	1.98
ช่วงความเชื่อมั่น	-	21.25 ± 0.06 %	13.09 ± 0.16 %	1.05 ± 0.003 %

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 1998) แสดงว่า % Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

3. การศึกษาหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ

**ตารางที่ 3** แสดงผลการวิเคราะห์ CRM/SRM ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

รายการคำนวณ	Sample Blank	Ammonium Sulphate	CAN	STD.
	( % AN)	( 21.20% AN)	(13.04%AN)	(1.051%AN)
ค่าเฉลี่ย	0.00	21.53	13.21	1.08
SD	0.00	0.207	0.165	0.013
% RSD	-	0.961	1.249	1.204
Predicted Horwitz RSD	-	2.35	2.53	3.69
HORRAT	-	0.41	0.49	0.33

เกณฑ์การประเมิน HORAAAT < 2 แสดงว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี เพื่อให้ได้เทคนิควิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล ทำให้เป็นที่ยอมรับ โดยทำการศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ), ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ทำการทดลองโดยการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนของ CRM 3 ระดับความเข้มข้น เพื่อให้ครอบคลุมช่วงการใช้งาน คือ 0 – 21 % AN และนำมาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยหาค่า % Recovery ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (98 – 102 %) และพิสูจน์ความเที่ยงโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio พบว่าค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (HORRAT < 2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

### การนำไปใช้ประโยชน์

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ย เป็นการพิสูจน์ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยและเพื่อให้มีความเชื่อมั่นในผลการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ



### เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร.

กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 66 หน้า

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร. มหาวิทยาลัย

เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 547 หน้า

AOAC Peer – Verified method, Nov. 1998. Association of Official Analytical Chemises

(AOAC). 2005. Official Method of Anaysis

955.04. 18<sup>th</sup> ed. International Gaithersburg, MD, USA. P. 13-14

ASTM 2001. Standard Practice for Preparation, Standardization, and Storage of Standard

and Reagent Solutions for Chemical Analysis. Washington. Oct. 2001. p 336 – p 350.

Official Methods of Analysis of Fertilizers. 1987. The National Institute of Agriculture

Sciences. Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Japan. 130 p.

ภาคผนวก

1. การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง

ซ้ำที่	Ammonium Sulphate ( 21.20% AN)	CAN (13.04% AN)	STD. (1.051% AN)
1	21.2825	12.7886	1.0516
2	21.1572	12.9010	1.0513
3	21.2011	12.8291	1.0534
4	21.2590	13.0792	1.0509

5	21.3487	13.3993	1.0544
6	21.2382	12.9655	1.0561
7	21.3819	13.3370	1.0607
8	21.3036	13.3714	1.0597
9	21.1414	13.2139	1.0553
10	21.1922	12.9953	1.0497
ค่าเฉลี่ย	21.25	12.7886	1.054
SD	0.080	0.229	0.004

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ CRM/SRM ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น คือ Ammonium Sulphate 99.999 % Purity 21.20 % Nitrogen (Aldrich Chem. 204501) , Calcium Ammonium Nitrate 13.04% Nitrogen (CRM-BCR 178) และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.051 % AN

2. การศึกษาหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ที่ระดับความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำ ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate)

ซ้ำที่	Ammonium Sulphate ( 21.20% AN)	CAN (13.04% AN)	STD. (1.051% AN)
1	21.0812	13.0492	1.0537
2	21.4000	13.0034	1.0873
3	21.3599	13.1190	1.0728
4	21.6003	13.0722	1.0728
5	21.7118	13.1056	1.0728
6	21.5657	13.3833	1.0873
7	21.6857	13.3425	1.0873
8	21.8020	13.2136	1.0873
9	21.5547	13.4108	1.0873
10	21.5193	13.4327	1.0583
ค่าเฉลี่ย	21.53	13.21	1.08
SD	0.207	0.165	0.013