

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยเป็นองค์ประกอบของเซลล์ และสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมน การทราบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในพืช เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สามารถประเมินความอุดมสมบูรณ์ของดิน เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาการใส่ปุ๋ยเพื่อเพิ่มผลผลิต การวิเคราะห์พืชจึงมีบทบาทสำคัญในงานวิจัยและการทดลองทางด้านการเกษตร ดังนั้นการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีประสิทธิภาพ ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำ จึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืช เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำและมีการควบคุมคุณภาพให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์

- Volumetric flask ขนาด 250, 2,000 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 มิลลิลิตร
- Volume pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ ขนาด 50, 250 มิลลิลิตร
- กระดาษ B2

2. สารเคมี

- H_2SO_4 (96 % AR grade)
- K_2SO_4 และ $CuSO_4$
- สารละลาย 40% NaOH (w/v) AR grade
- Mixed indicator (methyl red และ bromcresol green)
- สารละลาย 0.4% H_3BO_3 (w/v)
- Na_2CO_3 (AR grade)
- สารละลาย 0.01 N HCl

3. วัสดุอ้างอิงรับรอง

- Tomato Leaves
- Glycine

4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- เครื่องกลั่นแบบ semi-micro distillation
- เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ยี่ห้อ Gerhardt ประกอบด้วย
- Vapodest 33
- Kjeltorm

- Serubber Unit turbosog
- Vortex cyclone mixer

- วิธีการ

1. ตรวจสอบหา % ที่แน่นอนของวัสดุอ้างอิงรับรอง

- ชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง 1.000 กรัมใส่ในกระตาะช B2 ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย จำนวน 7 ซ้ำ
- เติม catalyst K_2SO_4 กับ $CuSO_4$ ประมาณ 3 กรัม และเติม H_2SO_4 เข้มข้น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ที่ 600 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน
- นำไปย่อยในเครื่องย่อย Vapodest 33 จนกระทั่งสารละลายในหลอดใสเป็นสีเขียว
- นำสารละลายที่เย็นมาถ่ายใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น
- ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้ผ่านการย่อยแล้ว 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดขนาด 250 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน ยี่ห้อ Gerhardt นำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตรซึ่งใส่ อินดิเคเตอร์ 4-5 หยด วางไว้ในส่วนที่รองรับ ทำการกลั่นโดยใช้เวลาในการกลั่น 4 นาที
- สำหรับวิธี semi-micro distillation ดูดสารละลายที่ได้ผ่านการย่อยแล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องกลั่นชนิด semi-micro distillation เติม 40% NaOH 5 มิลลิลิตร นำ Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลาย 0.3% H_3BO_3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปวางใต้ก้าน condenser โดยให้ปลายก้าน condenser จุ่มอยู่ใต้สารละลาย เปิดระบบกลั่น ใช้เวลาดกลั่นประมาณ 10 นาที
- นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.01 N HCl บันทึกปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้ โดยดูจุดยุติจากสารละลายสีเขียวเริ่มเป็นสีชมพูอ่อน
- ทำ blank โดยใช้กระตาะช B2
- ทำทั้งหมด 2 ครั้ง ได้วิธีละ 14 ซ้ำ
- นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน \%} = \frac{N \times (a-b) \times 250 \times 100 \times 14}{1000 \times 10 \times \text{wt}}$$

- N = ความเข้มข้นของ HCl
- a = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต ตัวอย่าง
- b = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต blank
- wt = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

2. หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limited of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถสามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ)

- นำกระดาษ B 2 ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย เติม catalyst K_2SO_4 กับ $CuSO_4$ จำนวน 3 กรัม และเติม H_2SO_4 จำนวน 30 มิลลิลิตร
- นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยไนโตรเจน ที่อุณหภูมิไม่เกิน 350 องศาเซลเซียสจนกระทั่งสารละลายใส
- สารละลายที่ได้นำไปล้างลงใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนโดยใช้วิธีการกลั่นทั้งวิธี semi-micro distillation และ การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt และทำการไทเทรตพร้อมคำนวณปริมาณไนโตรเจน เช่นเดียวกับการหา % ที่แน่นอนของวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน
- ค่าที่ได้นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = X + 3SD$$

$$LOQ = X + 10SD$$

$$X = \text{ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนของกระดาษ B2}$$

3. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

- ชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง 1 กรัม และวัสดุอ้างอิงรับรอง 1 กรัม+ Glycine 0.1 กรัม ในกระดาษ B2 อย่างละ 7 ซ้ำนำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย เติม catalyst K_2SO_4 กับ $CuSO_4$ จำนวน 3 กรัม และเติม H_2SO_4 จำนวน 30 มิลลิลิตร
- นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยไนโตรเจน ที่อุณหภูมิไม่เกิน 350 องศาเซลเซียสจนกระทั่งสารละลายใส
- สารละลายที่ได้นำไปล้างลงใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปกลั่นหาปริมาณไนโตรเจนโดยใช้วิธีการกลั่นทั้งวิธี semi-micro distillation และ การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt และทำการไทเทรต บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ในการไทเทรต เช่นเดียวกับการหา % ที่แน่นอนของวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน
- นำค่าที่บันทึก ไปคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\{(V_2 - V_1) \times 250 \times 14 / (1000 \times 10 \times \text{wt sample(g)})\} \times 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนใน Glycine}}$$

$$V_2 = \text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรตวัสดูอ่างอิงรับรอง+Glycine}$$

$$V_1 = \text{ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรตวัสดูอ่างอิงรับรอง}$$

4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้อง มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย SD และ % RSD ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่างการคำนวณ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\text{Mean}}$$

เกณฑ์ยอมรับ precision ของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% \text{ RSD Experiment}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \leq 2 \quad (\text{Horwitz et al, 1980})$$

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

$$C = \text{Concentration}$$

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2553 – เมษายน 2555

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชและวัตถุเคมีการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี semi-micro distillation ได้ผลวิเคราะห์ ดังนี้ ปริมาณไนโตรเจนในวัสดูอ่างอิงมาตรฐานเท่ากับ 2.86 % LOD และ LOQ มีค่า 0.013 และ 0.019 ตามลำดับ % recovery ที่ spike glycine มีค่า 97.63 การประเมินความแม่นยำ (Precision) โดยใช้ HORRAT เท่ากับ 1.05 และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยการใช้เครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt มีปริมาณไนโตรเจนในวัสดูอ่างอิงมาตรฐานเท่ากับ 2.89 % LOD และ LOQ มีค่า 0.20 และ 0.33 ตามลำดับ % recovery ที่ spike glycine มีค่า 101.62 การประเมินความแม่นยำ (Precision) โดยใช้ HORRAT เท่ากับ 0.73 (ตารางที่1)

9. สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนในพืชโดยวิธี semi-micro distillation และการใช้เครื่องกลั่นไนโตรเจนยี่ห้อ Gerhardt พบว่าทั้งสองวิธีมีค่า Accuracy อยู่ในช่วง 95-105 และค่า Precision มีค่า HORRAT ≤ 2 ซึ่งค่า Accuracy และ ค่า Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งสองสามารถเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ

10. การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุประสงค์การเกษตรและนิเวศวิทยาเทคนิคการเกษตร
2. เผยแพร่ให้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนในพืช

11. เอกสารอ้างอิง

จิตรา ชัยวิมล. 2545. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ

“การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี” กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

ไพสิน เหล็กคง. 2546. เอกสารวิชาการคู่มือการวิเคราะห์พืช. กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยเคมี สรรวิทยาพืช. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

Jan-Åke Persson. 2008. Handbook for Kjeldahl digestion. 4th ed. CA Andersson, Malmoe, Sweden.

12. คำขอบคุณ

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงค่ารายการทดสอบ และผลการทดสอบ

รายการ การทดสอบ	วิธี semi-micro distillation	การกลั่นโดยใช้เครื่องกลั่นยี่ห้อ Gerhardt
LOQ (%)	0.019	0.33
% recovery (Accuracy)	97.63	101.62
% RSD	1.17	0.82
HORRAT	1.05, ยอมรับได้	0.73 , ยอมรับได้

