

รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 - กิจกรรมที่ 1 พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
 - กิจกรรมย่อยที่ 1.2 พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พืช

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ธาตุเหล็กในพืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Method Validation on Analysis of Iron in plants

4. คณะผู้ดำเนินงาน

ชื่อหัวหน้าโครงการ นางจิตติมา ยถาภูชานนท์ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลอง นางสาววิรวรรณ ศรีถาวร สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ธาตุเหล็กในพืช เพื่อให้ได้เทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว แม่นยำ สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล โดยศึกษาหาความถูกต้อง (Accuracy), ความแม่นยำ (Precision), ค่าต่ำสุดของปริมาณเหล็กที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณเหล็กที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ) ดำเนินการวิเคราะห์ Certified Reference

Material (CRM) คือ **Tomato Leaves** เพื่อประเมินความถูกต้องและแม่นยำ โดย หาค่า Recovery ได้เท่ากับ **89.20%** จากการประเมินความแม่นยำโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio พบว่าวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือบุคคล และเวลาเดียวกันได้ค่า HORRAT 0.08 ส่วนการหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) ได้เท่ากับ **0.25ppm** และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) ได้เท่ากับ **0.299ppm** ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดนั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นจึงถือว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชดังกล่าวนี้เป็นเทคนิควิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์พืชฯ **ต่อไป**

คำนำ

เหล็กเป็นจุลธาตุที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของพืช เนื่องจากเป็นองค์ประกอบของโปรตีนและเอนไซม์ที่สำคัญหลายชนิด โดยมีหน้าที่เกี่ยวข้องข้องกับการตรึงไนโตรเจน การสังเคราะห์แสง การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในการสร้างคลอโรฟิลล์ ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชจึงมีความสำคัญ เพราะสามารถบอกได้ว่าปริมาณเหล็กที่มีนั้นอยู่ในระดับที่เหมาะสมหรือไม่ หากมีอยู่ในระดับต่ำหรือสูงเกินไป พืชจะแสดงอาการผิดปกติหรืออาการขาดธาตุอาหารแฝง (hidden hunger) ผลการวิเคราะห์จะถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบในการปรับสมดุลธาตุอาหารแก่พืช การวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชนั้น กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชและวัตถุเคมีการเกษตรใช้เทคนิค Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ธาตุที่ให้ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) มีสภาพไวสูง ต้นทุนต่อหน่วยการวิเคราะห์ไม่สูงนัก แต่เทคนิคนี้มีโอกาสที่สเปกตรัมของธาตุอื่นที่ปนอยู่อาจรบกวนได้ จึงเป็นสาเหตุให้เกิดความผิดพลาด เพื่อให้เกิดความถูกต้องแม่นยำของผลการวิเคราะห์ ทางกลุ่มงานฯ จึงต้องพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ที่เหมาะสม และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชโดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM) เป็นตัวอย่างทดสอบ และทำการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเหล็กที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (Linearity range) ช่วงของการใช้งาน (Working range) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเหล็กในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเหล็กในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation : LOQ) โดยมีความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เพื่อแสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมกับการใช้งาน สามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ของกลุ่มงานฯ **ต่อไป**

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

- 1) Atomic absorption spectrophotometer (AAS)
- 2) เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง ที่สอบเทียบแล้ว
- 3) Hot plate
- 4) Volumetric flask, beaker, pipet
- 5) เครื่องแก้วและวัสดุอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารเคมี และการเตรียมสารเคมี

- 1) HNO_3 (conc) 69% AR grade
- 2) HClO_4 (conc) 70% AR grade
- 3) วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM)
- 4) Standard solution ของธาตุ Fe ใช้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1000 ppm ที่ใช้กับเครื่อง AAS โดยเตรียมชุดของ working standard solution ดังนี้ Fe 1, 2, 3, 4, 5 ppm คือเริ่มเตรียม intermediate standards ก่อนโดยดูด Standard solution (1000 ppm) จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วดูดสารละลาย intermediate standards ตามความเข้มข้นที่ต้องการใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน
- 5) Strontium (Sr) solution 1000 – 2000 มิลลิกรัม/ลิตร สารละลายนี้ใช้เติมเพื่อกำจัดสิ่งรบกวนในการวิเคราะห์ Ca และ Mg (ละลาย $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 121.7 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 2000 มิลลิลิตร) บางห้องปฏิบัติการจะใช้ Lanthanum (La) solution 5% ก็ได้เช่นเดียวกัน แต่ราคาของ La_2O_3 จะแพงกว่า SrCl_2

วิธีการ

- 1) การย่อย (Wet digestion) :

ชั่งตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้ว 1 – 2 กรัม ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml เติม conc HNO₃ 10 – 15 ml นำไปวางบน hot plate ที่ร้อนพอสมควร ทิ้งไว้จนควันสีน้ำตาลปนแดงของ NO₂ เริ่มจางลง นำ flask ตัวอย่างลงจาก hot plate ทิ้งไว้ให้เย็น เติมกรด HClO₄ 70% ลงใน flask 4 – 6 ml นำขึ้นตั้งบน hot plate ที่ร้อนเพิ่มขึ้น จนกระทั่งกรดไนตริกระเหยไปหมด และนํ้ายาใน flask เริ่มใส ต้มต่อไปจนกระทั่งควันสีขาวของกรด HClO₄ ระเหย ต้มต่อไปจนควันสีขาวจางลง และนํ้ายาใน flask ใส ต้มต่อไปอีกประมาณ 10 นาที ยกลง และทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากเย็นเติมนํ้ากลั่นลงไปประมาณ 20 – 30 ml นำ flask ขึ้นต้มบน hot plate อีกครั้ง ต้มจนเดือดหรือเกือบเดือด ยกลงกรองนํ้ายาใน flask ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ลงใน volumetric flask 100 ml เมื่อกรองเสร็จล้าง flask และชะกระดาษกรองด้วยนํ้ากลั่นที่อุ่น ๆ หลาย ๆ ครั้ง ปรับปริมาตรจนได้ตามต้องการ con.digest หรือต้มสารละลายใน flask ควรมี glass bead ใส่อยู่ด้วย เพื่อป้องกันการกระเด็นของนํ้ายา ออกมานอก flask สารละลาย (aliquot) ที่กรองได้สามารถนำไปวิเคราะห์หาธาตุ Fe ได้

2) การวัดปริมาณ Fe

นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจาก ข้อ 1) วัดปริมาณได้โดยตรงเนื่องจากในพืชจะมีธาตุเหล่านี้ ในปริมาณน้อย นอกจากบางกรณีอาจจะต้องมีการทำให้เจือจางบ้าง ด้วยนํ้าปราศจากไอออน ปรับปริมาตรตาม ต้องการ และนำมาวัดเทียบกับ standard ได้เลย

การวัดปริมาณธาตุด้วยเครื่อง AAS เปิดเครื่องตามคู่มือการใช้งาน ปรับความยาวคลื่นแสง (wave length) และ condition ต่าง ๆ ตามคู่มือ และควร warm up เครื่องโดยใช้เวลาพอสมควร เพื่อให้ทุกอย่างคงที่ และพร้อมจะใช้งานได้อย่างถูกต้อง

การคำนวณ

คำนวณปริมาณธาตุต่าง ๆ จากสูตร

$$\text{ppm Fe} = \frac{\text{ppm equi} \times \text{dilution factor} \times \text{original solution} \times 100}{10^6 \times \text{wt. sample (g)}}$$

$$\text{ppm equi.} = \text{ค่าความเข้มข้นที่อ่านได้จากการวัดตัวอย่างเทียบกับ}$$

ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน

dilution factor = อัตราส่วนการดูดสารละลายตัวอย่างมาทำให้เจือจาง

original solution = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการย่อยหลัง
ปรับปริมาตรแล้ว

wt. sample = น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (กรัม)

1. การศึกษาหาค่า Accuracy และค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Fe ในพืช

1.1 ชั่ง CRM คือ Tomato leaves 1 กรัม จำนวน 10 ชั่ง

1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์

1.3 บันทึกข้อมูล และคำนวณผล

1.4 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าที่รับรองของ CRM

2. การศึกษาหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

2.1 นำ Sample Blank ไปหาค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

2.2 บันทึกข้อมูล และคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 - กันยายน 2555 ระยะเวลา 2 ปี

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุประสงค์การเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

เนื่องจากเครื่อง AAS ที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเหล็กนั้น ในการทำ standard curve จะมีค่าที่กำหนดของเครื่องไว้ว่าแต่ละธาตุจะมีช่วงที่เป็น linear อยู่ที่กี่ ppm สำหรับในเหล็กมี range อยู่ที่ 0 – 3 ppm ซึ่ง

ได้ลองทำการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชหลายชนิด เช่น ยางพารา , มะม่วง , ถั่วเหลือง ชนิดละ 30 ตัวอย่าง โดยต้องทำการ dilute ตัวอย่างให้อยู่ในช่วงที่เป็น linear ของ standard curve ก่อนสำหรับ ตัวอย่างทุกชนิด

เมื่อทำการวิเคราะห์ CRM คือ Tomato Leaves อย่างละ 10 ซ้ำ จะได้ค่าจากการทำซ้ำ(Repeatability) ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) โดยค่าของ CRM ที่กำหนดมาคือ 361 ppm

เมื่อทำการวิเคราะห์ CRM แล้วพบว่า

$$\text{ค่าเฉลี่ย} = 322 \text{ ppm}$$

$$\text{SD} = 1.20$$

$$\% \text{RSD} = 0.37$$

หา Accuracy

-ประเมิน Accuracy โดยใช้ค่า %recovery

วิธีคำนวณค่า Accuracy

$$\begin{aligned} \% \text{recovery} &= \frac{\text{mean}}{\mu} \times 100 \\ &= \frac{322 \times 100}{361} \\ &= 89.20\% \end{aligned}$$

หา Precision โดยการทดลองซ้ำแบบ repeatability

-ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

วิธีคำนวณค่า Precision

$$\text{HORRAT} = \frac{\%RSD}{\text{Predicted RSD}}$$

Predicted RSD :

$$\begin{aligned} \text{Repeatability : -PRSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.000322)} \\ &= 4.43 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\%RSD}{\text{Predicted RSD}} \\ &= \frac{0.37}{4.43} = 0.08 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = 0.08$$

HORRAT < 2 ยอมรับ Precision

เมื่อทำการวิเคราะห์ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ สามารถหาค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

เมื่อทำการวิเคราะห์ sample blank แล้วพบว่า

$$\text{ค่าเฉลี่ย} = 0.229 \text{ ppm}$$

$$\text{SD} = 0.007$$

วิธีคำนวณค่า Limit of Detection:LOD

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \text{mean} + 3\text{SD} \\ &= 0.11 + 3(0.007) \\ &= 0.25 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= \text{mean} + 10\text{SD} \\ &= 0.11 + 10(0.007) \\ &= 0.299 \end{aligned}$$

สรุปผลการทดลอง

ผลจากค่าวิเคราะห์พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 85 - 110% และ HORRAT < 2 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างถั่วเหลือง และสบู่ดำ อย่างละ 30 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องมือ Soxtherm 2000 และ TFE 2000 เพื่อเปรียบเทียบค่าวิเคราะห์ระหว่าง 2 เครื่องมือ พบว่ามีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 2%

6. การนำไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในพืชที่ถูกต้อง แม่นยำ และวิธีที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ของกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิเวศลิยร์
เทคนิคการเกษตร

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความแม่นยำ (Precision)

Tomato Leaves	Fe (ppm)
1	320
2	321
3	322
4	324
5	323
6	322
7	321
8	323
9	322
10	321
Mean	322
SD	1.20
%RSD	0.37

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection:LOD)
และค่าต่ำสุดของปริมาณน้ำมันที่สามารถตรวจหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation:LOQ)

Sample blank	Fe (ppm)
1	0.24
2	0.24
3	0.24
4	0.24
5	0.22
6	0.23
7	0.23
8	0.22
9	0.22
10	0.22
Mean	0.23
SD	0.01

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ธาตุเหล็กในตัวอย่างถั่วเหลือง(เมล็ด) , มะม่วง(ใบ) , ยางพารา(ใบ)

ตัวอย่างที่	Fe(ppm)		
	ถั่วเหลือง(เมล็ด)	มะม่วง(ใบ)	ยางพารา(ใบ)
1	80	27	102
2	74	25	111
3	66	24	98
4	62	24	107
5	57	19	89
6	55	18	115
7	55	23	129
8	55	21	121
9	56	28	118
10	57	28	109

11	64	41	116
12	65	41	111
13	69	29	120
14	79	31	109
15	56	45	131
16	56	29	100
17	74	31	108
18	78	33	78
19	60	23	101
20	58	58	66
21	62	32	107
22	59	31	98
23	83	30	95
24	81	30	121
25	64	28	106
26	64	27	106
27	66	23	76
28	66	24	99

29	74	21	81
30	73	26	107