

และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดนั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์นี้เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์

Abstract

Method validation of ammonium nitrogen in chemical fertilizer was developed in order to fit for purpose as used in laboratory. The method that use in laboratory was adapted from OMAF (Official Method of Analysis of Fertilizers (1987), 4.1.2) to assess the accuracy, precision and limit of detection. CRM/SRM and CRM/SRM with matrix sample (Sample blank + CRM/ SRM) were analyzed. The characteristics of the method showed that the percentage of recovery of CRM/SRM at 3 levels of its concentration including low (1.00 %AN), moderate (13.04 %AN) and high (21.20 %AN) were 100, 100.05 and 100.09% respectively. Percentage of recovery of Sample blank + CRM/SRM at low, moderate and high concentration were 100, 99.97 and 100.09 % respectively. The repeatability precision at low, moderate and high level, which were evaluated by HORRAT values in CRM/SRM were 0.32, 0.61 and 0.29 respectively, while Sample blank + CRM/ SRM were 0.52, 0.49 and 0.33 respectively. The Intermediate precision at low, moderate and high level, which were evaluated by HORRAT values in CRM/SRM were 0.19, 0.25 and 0.19 respectively, Sample blank + CRM/SRM were 0.37, 0.31 and 0.21 respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.10% and 0.25% respectively. All the values achieved from the analysis were met the referable international standards. Therefore, this validated method was fit for the intended use.

6. คำนำ

กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 เป็นหน่วยงานที่ให้บริการวิเคราะห์ดิน พืช น้ำ ปุ๋ย สารพิษตกค้างในทางเกษตร วัตถุอันตรายทางการเกษตร และจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลผลิตทางเกษตร ของกรมวิชาการเกษตร ในส่วนภูมิภาค สำหรับการวิเคราะห์ปุ๋ยนั้น เป็นไปเพื่อรองรับภารกิจการบังคับใช้กฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรกำกับดูแล คือ พรบ.ปุ๋ย เป็นหลัก โดยได้ใช้วิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร คือ คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (2551) ดังนั้นห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ปุ๋ย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้

การวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี เป็นหัวข้อในการตรวจประเมินคุณภาพปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย และสำหรับการขึ้นทะเบียนปุ๋ยที่มีแอมโมเนียมไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ย โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้น ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ OMAF (Official Method of Analysis of Fertilizers (1987), 4.1.2) ร่วมกับคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (2551) โดยตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ คือ ความถูกต้องของการวัด (Accuracy) ที่ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับสูง กลาง และต่ำ และความเที่ยงของการวัด (Precision) ทั้งแบบ Repeatability precision และ Intermediate precision ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ) (ทิพวรรณ 2549) เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล และสามารถใช่วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวเพื่อขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการในอนาคตต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

7.1.1.1 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น BP221S และ รุ่น ED224S

7.1.1.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง Mettler Toledo รุ่น PL3002

7.1.1.3 เครื่องกลั่นไนโตรเจน Gerhardt รุ่น VAP20

7.1.1.4 ตู้อบลมร้อน Memmert รุ่น UM500

7.1.1.5 Burette Class A ขนาด 50 ml ที่ผ่านการสอบเทียบ

7.1.1.6 Kjeldahl tube ขนาด 300 ml

7.1.1.7 Erlenmeyer Flask ขนาด 250 ml

7.1.1.8 Volumetric flask ขนาด 5000 ml

7.1.1.9 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

7.1.2 สารเคมีและวัสดุอ้างอิง

7.1.2.1 ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน (Certified Reference Material /Standard Reference Material : CRM/SRM)

- Ammonium sulfate 99.999% Purity 21.20 % Nitrogen (Aldrich Chem.204501)

- Calcium ammonium nitrate 13.04 ± 0.32 % Ammonium Nitrogen (CRM-BCR 178)

- Sodium Carbonate (Na₂CO₃) 99.970 ± 0.014 % (SRM 351a)

- 7.1.2.2 Boric acid (H_3BO_3), AR grade
- 7.1.2.3 Alcohol $\geq 90\%$, AR grade
- 7.1.2.4 Hydrochloric acid (HCl) 1 N, AR grade
- 7.1.2.5 Methylene blue ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), Indicator grade หรือ AR grade
- 7.1.2.6 Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$), Indicator grade หรือ AR grade
- 7.1.2.7 Sodium hydroxide (NaOH), Commercial grade หรือสูงกว่า
- 7.1.2.8 Sample Blank (ใช้ตัวอย่างปุย สูตร 0-0-50)

7.2 วิธีการ

7.2.1 วิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน

7.2.1.1 ชั่งตัวอย่างปุยที่ผ่านบดให้ได้น้ำหนักระหว่าง 0.2xxx – 10.xxxx g ใส่ Kjeldahl tube บันทึกน้ำหนักตัวอย่างปุย

7.2.1.2 นำ Kjeldahl tube ใส่เครื่องกลั่นไนโตรเจน

7.2.1.3 นำสารละลายกรดบอริก 4% ปริมาตร 25 ml ใส่ Erlenmeyer Flask ขนาด 250 ml เติม mixed indicator 5 หยด เพื่อดักจับแก๊สแอมโมเนีย เปิดเครื่องกลั่น ถ้าตัวอย่างมีแอมโมเนียมไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูม่วงเป็นสีเขียว กลั่นจนกระทั่งแก๊สแอมโมเนียถูกดักจับด้วยกรดบอริก จนหมด หรือจนกระทั่งได้สารละลาย ประมาณ 100-150 ml

7.2.1.4 นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 N จนถึงจุดยุติ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสารละลายสีชมพูม่วง บันทึกปริมาตร สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 N

7.2.1.5 ทำ Reagent Blank โดยไม่ใส่ตัวอย่างปุย ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

7.2.1.6 การคำนวณ

$$TN = \frac{N(HCl) \times (\text{ปริมาตร HCl ของตัวอย่าง (ml)} - \text{ปริมาตร HCl ของ Reagent Blank (ml)}) \times 1.40067}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (g)}}$$

7.2.2 วิธีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุยเคมี

7.2.2.1 ศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และ ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ)

- ชั่ง Sample Blank จำนวน 10 ซ้ำ ใส่ใน Kjeldahl tube

- วิเคราะห์ตามข้อ 7.2.1.2-7.2.1.6

- คำนวณค่าเฉลี่ย (\bar{x}) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = \bar{x} + 3SD$$

$$LOQ = \bar{x} + 10SD$$

7.2.2.2 ศึกษาความถูกต้องของการวัด (Accuracy) แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (CRM/SRM) และตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank +CRM/SRM) เพื่อศึกษา Matrix effect ดังนี้

- ชั่ง CRM และ Sample blank + CRM/SRM ที่ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนความเข้มข้นระดับ ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ชั่ง พร้อมวิเคราะห์ Reagent Blank

- ระดับต่ำ 1.00 % AN เติร์ยมจาก Ammonium sulfate

- ระดับกลาง 13.04 % AN โดยใช้ Calcium ammonium nitrate

(BCR 178)

- ระดับสูง 21.20 % AN โดยใช้ Ammonium sulfate

- วิเคราะห์ตามข้อ 7.2.1.2-7.2.1.6

- คำนวณ % Recovery เปรียบเทียบกับปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง โดยใช้เกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, 2012 ดังนี้ ความเข้มข้น >10 % คือ 98-102 % และ > 1 % คือ 97-103 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ } (\bar{x})}{\text{ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง}} \times 100$$

7.2.2.3 ศึกษาความเที่ยงของการวัด (Precision) แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ที่ปริมาณไนโตรเจนระดับ ต่ำ กลาง และสูง

- ชั่ง CRM/SRM และ Sample blank + CRM/SRM ที่ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับ ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ชั่ง พร้อมวิเคราะห์ Reagent Blank ในวัน เวลาเดียวกัน เพื่อประเมินค่า Repeatability precision

- ชั่ง CRM/SRM และ Sample blank + CRM/SRM ที่ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับ ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ชั่ง พร้อมวิเคราะห์ Reagent Blank ในวัน เวลาต่างกัน เพื่อประเมินค่า Intermediate precision

- ระดับต่ำ 1.00 % AN เติร์ยมจาก Ammonium sulfate

- ระดับกลาง 13.04 % AN โดยใช้ Calcium ammonium nitrate

(BCR 178)

- ระดับสูง 21.20 % AN โดยใช้ Ammonium sulfate

- วิเคราะห์ตามข้อ 7.2.1.2-7.2.1.6

- คำนวณหาค่าความเที่ยงของการวัด (Precision) ทั้ง Repeatability precision และ Intermediate precision โดยใช้ Horwitz's equation (HORRAT, Horwitz's Ratio) ตามสูตรข้างล่าง โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ ค่า Horrat ≤ 2

$$\%RSD = \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้} (\bar{x})} \times 100$$

Repeatability precision

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}$, C = ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง / 100)

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% \text{ RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

Intermediate precision

Predicted Horwitz RSD = $2^{(1 - 0.5 \log C)}$, C = ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง / 100)

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% \text{ RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

7.2.3 สรุป และรายงานผลการทดลอง

7.3. เวลาและสถานที่

7.3.1 ระยะเวลา

เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2556 - สิ้นสุด เดือนกันยายน 2558

7.3.2. สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยศึกษาคุณลักษณะต่าง ๆ คือ LOD และ LOQ, Accuracy, Precision, โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ซึ่งได้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ OMAF (Official Method of Analysis of Fertilizers (1987), 4.1.2) ร่วมกับคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (2551) ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (CRM/SRM) และตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank +CRM/SRM) ได้ผลการทดลอง ดังนี้

8.1 ศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการวิเคราะห์ sample blank พบว่า ค่าเฉลี่ย (\bar{x}) เท่ากับ 0.0330 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.0221 (ตารางภาคผนวกที่ 1) และนำค่า SD คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ค่าดังนี้

$$LOD = \bar{x} + 3 SD = 0.0330 + 3(0.0221) = 0.10 \% AN$$

$$LOQ = \bar{x} + 10SD = 0.0300 + 10(0.0221) = 0.25 \% AN$$

นั่นคือปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนต่ำสุดที่สามารถวัดได้ เท่ากับ 0.10 % และปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ที่สามารถนำมารายงานผลได้ไม่ต่ำกว่า 0.25%

8.2 ศึกษาความถูกต้องของการวัด (Accuracy) แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

8.2.1 วิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนใน Ammonium sulfate และ BCR 178 ที่ 3 ระดับคือ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1.00 %AN) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (13.04 %AN) และที่ความเข้มข้นระดับสูง (21.20 %AN) ระดับละ 10 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 2 ประเมินค่า Accuracy โดยหาค่า %Recovery และเปรียบเทียบค่าจากการวิเคราะห์กับค่าจริงโดยใช้ t-test ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 1

ซึ่งค่าทั้งหมดผ่านเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, 2012 คือ ความเข้มข้นมากกว่า 10 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 98-102 % และความเข้มข้นมากกว่า 1 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 97-103 %

ตารางที่ 1 ผลและการประเมินผลในการหาค่าการหา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ CRM/SRM

ระดับความเข้มข้น	% Recovery	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน	t-test	เกณฑ์การยอมรับยอมรับที่ 95 %	ผลการประเมิน
ต่ำ (1.00%)	100	97-103%	ผ่าน	0.00	$t_{cal} < t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน
กลาง (13.04%)	100.05	98-102%	ผ่าน	0.13	$t_{cal} < t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน
สูง (21.20%)	100.09	98-102%	ผ่าน	0.61	$t_{cal} < t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน

8.2.2 วิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเดิม (Matrix effect) โดยการวิเคราะห์ Sample Blank + Ammonium sulfate และ BCR 178 ที่ 3 ระดับคือ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1.00 %AN) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (13.0 %AN) และที่ความเข้มข้นระดับสูง (21.20 %AN) ระดับละ 10

ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 3 ประเมินค่า Accuracy โดยหาค่า %Recovery และเปรียบเทียบค่าจากการวิเคราะห์กับค่าจริงโดยใช้ t-test ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 2

ซึ่งค่าทั้งหมดผ่านเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, 2012 คือ ความเข้มข้นมากกว่า 10 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 98-102 % และความเข้มข้นมากกว่า 1 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 97-103 %

ตารางที่ 2 ผลและการประเมินผลในการหาค่าการหา Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ Sample Blank + CRM/SRM

ระดับความเข้มข้น	% Recovery	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน	t-test	เกณฑ์การยอมรับยอมรับที่ 95 %	ผลการประเมิน
ต่ำ (1.00%)	100	97-103%	ผ่าน	0.23	$t_{cal} < t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน
กลาง (13.04%)	99.97	98-102%	ผ่าน	0.11	$t_{cal} < t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน
สูง (21.20%)	100.09	98-102%	ผ่าน	0.54	$t_{cal} < t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน

8.3 ศึกษาความเที่ยงของการวัด (Precision) แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี

ทำการวิเคราะห์ CRM/SRM และ Sample Blank +CRM/SRM ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ Horwitz's equation โดยประเมินความเที่ยงของการวัด 2 แบบ คือ Repeatability precision และ Intermediate precision ได้ผลการประเมิน ดังนี้

8.3.1 การหาค่า Repeatability Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยการวิเคราะห์ CRM/SRM ที่มีปริมาณไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ ในวัน เวลาเดียวกัน ได้ผลการวิเคราะห์ตามตารางภาคผนวกที่ 2 คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz' Ratio หรือ HORRAT ได้ผลดังตารางที่ 3 ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $HORRAT \leq 2$ (ตติย, 2548)

ตารางที่ 3 ผลและการประเมินผลในการหา Repeatability Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ CRM/SRM

ระดับความเข้มข้น	Repeatability Precision (CRM/SRM)				
	% RSD	Predicted Horwitz RSD	HORRAT	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน
ต่ำ (1.00%)	0.84	2.64	0.32	≤ 2	ผ่าน

กลาง (13.04%)	1.09	1.79	0.61	≤ 2	ผ่าน
สูง (21.20%)	0.49	1.67	0.29	≤ 2	ผ่าน

8.3.2 การหาค่า Repeatability precision ในสารตัวเติม โดยการวิเคราะห์ Sample Blank + CRM/SRM ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ ในวัน เวลาเดียวกัน ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 3 คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz' Ratio หรือ HORRAT ได้ผลดังตารางที่ 4 ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $HORRAT \leq 2$ (ตติย, 2548)

ตารางที่ 4 ผลและการประเมินผลในการหา Repeatability Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในสารตัวเติมโดยวิเคราะห์ Sample Blank + CRM/SRM

ระดับความเข้มข้น	Repeatability Precision (Sample Blank + CRM/SRM)				
	% RSD	Predicted Horwitz RSD	HORRAT	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน
ต่ำ (1.00%)	1.37	2.64	0.52	≤ 2	ผ่าน
กลาง (13.04%)	0.88	1.79	0.49	≤ 2	ผ่าน
สูง (21.20%)	0.55	1.67	0.33	≤ 2	ผ่าน

8.3.3 การหาค่า Intermediate precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยการวิเคราะห์ CRM/SRM ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ ในวัน และเวลาต่างกัน ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 4 คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz' Ratio หรือ HORRAT ได้ผลดังตารางที่ 5 ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $HORRAT \leq 2$ (ตติย, 2548)

ตารางที่ 5 ผลและการประเมินผลในการหา Intermediate Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ CRM/SRM

ระดับความเข้มข้น	Intermediate Precision (CRM/SRM)				
	% RSD	Predicted Horwitz RSD	HORRAT	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน
ต่ำ (1.00%)	0.75	4.01	0.19	≤ 2	ผ่าน
กลาง (13.04%)	0.67	2.72	0.25	≤ 2	ผ่าน
สูง (21.20%)	0.48	2.52	0.19	≤ 2	ผ่าน

8.3.4 การหาค่า Intermediate precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในสารตัวเติม โดยการวิเคราะห์ Sample Blank +CRM/SRM ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ ในวัน และเวลาต่างกัน ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 5 คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz' Ratio หรือ HORRAT ได้ผลดังตารางที่ 6 ซึ่งค่าทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT \leq 2 (ตติย, 2548)

ตารางที่ 6 ผลและการประเมินผลในการหา Intermediate Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในสารตัวเติม โดยวิเคราะห์ Sample Blank + CRM/SRM

ระดับความเข้มข้น	Intermediate Precision (Sample Blank + CRM/SRM)				
	% RSD	Predicted Horwitz RSD	HORRAT	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน
ต่ำ (1.00%)	1.48	4.00	0.37	\leq 2	ผ่าน
กลาง (13.04%)	0.85	2.72	0.31	\leq 2	ผ่าน
สูง (21.20%)	0.53	2.52	0.21	\leq 2	ผ่าน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ตามวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ OMAF (Official Method of Analysis of Fertilizers (1987), 4.1.2) โดยวิเคราะห์ CRM/SRM และตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank +CRM/SRM) เพื่อศึกษา Matrix effect ที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ Ammonium sulfate และ CRM BCR 178 (Calcium ammonium nitrate) มีแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรองเท่ากับ 21.20 % และ 13.04 % ตามลำดับ ได้ผลการตรวจสอบดังนี้

- 1) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) คือ 0.10 % AN
- 2) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) คือ 0.25 % AN
- 3) ประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ของการวัดจากค่า %Recovery ที่ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง

ใน CRM/SRM ได้ค่า % Recovery เท่ากับ 100%, 100.05% และ 100.09 % ตามลำดับ

ใน Sample Blank + CRM/SRM ได้ค่า Recovery เท่ากับ 100%, 99.97% และ 100.09 % ตามลำดับ

4) ความเที่ยงของการวัด (Precision) ที่ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง

4.1) Repeatability precision โดยใช้ Horwitz's equation

ใน CRM/SRM ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.32, 0.61 และ 0.29 ตามลำดับ

ใน Sample Blank + CRM/SRM ได้ค่า Horrat เท่ากับ 0.52, 0.49 และ 0.33 ตามลำดับ

4.2) Intermediate precision โดยใช้ Horwitz's equation

ใน CRM/SRM ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.19, 0.25 และ 0.19 ตามลำดับ

ใน Sample Blank + CRM/SRM ได้ค่า Horrat เท่ากับ 0.37, 0.31 และ 0.21 % ตามลำดับ

ค่าที่ได้ทั้งหมดนั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 มีผลวิเคราะห์ที่ความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล และมีสมรรถนะดีพอเหมาะสมต่อการใช้งาน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำวิธีที่ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน มาเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8

2. นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบมาใช้ประกอบในการยื่นขอยกขบขายการรับรอง ISO/IEC 17025 : 2005 ในขบขายการหาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีกับหน่วยรับรอง

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 66 หน้า.

ตติย สี่หรั่ง. 2548. เอกสารประกอบการอบรม-สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร เรื่อง การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี สถาบันอาหาร. กรุงเทพฯ 40 หน้า.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.

AOAC, 2012. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 19thEd. Official Method. AOAC International Gaithersburg, MD. 17 p.

Official Methods of Analysis of Fertilizers. 1978. The National Institute of Agriculture Sciences.
Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Japan 130 p.

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ แอมโมเนียมไนโตรเจน ของ Sample blank เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ซ้ำที่	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาตร HCl (ml)	%AN
1	0.5036	0.05	0.03
2	0.5029	0.05	0.03
3	0.5024	0.00	0.00
4	0.502	0.00	0.00
5	0.5004	0.05	0.03
6	0.5025	0.10	0.06
7	0.5000	0.05	0.03
8	0.5016	0.10	0.06
9	0.5015	0.05	0.03
10	0.5013	0.10	0.06
Average			0.330

SD	0.022
LOD=ค่าเฉลี่ย+3SD	0.10
LOD=ค่าเฉลี่ย+10SD	0.25

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ Ammonium sulfate และ CRM- BCR 178 มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง 1.00, 13.04 และ 21.20 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความเที่ยงแบบ Repeatability precision

ซ้ำที่	ความเข้มข้นระดับต่ำ			ความเข้มข้นระดับกลาง			ความเข้มข้นระดับสูง		
	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium
	CRM/SRM (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)	CRM/SRM (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)	CRM/SRM (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)
1	10.1728	35.80	1.00	0.2055	9.55	13.15	0.2018	15.05	21.12
2	10.2339	35.85	0.99	0.2037	9.25	12.84	0.2028	15.15	21.16
3	10.2933	35.75	0.98	0.2045	9.40	13.00	0.2009	15.00	21.15
4	10.2275	35.65	0.99	0.2018	9.20	12.89	0.2018	15.15	21.26
5	10.2085	36.00	1.00	0.2058	9.65	13.26	0.2006	15.10	21.32
6	10.2462	36.30	1.00	0.2000	9.30	13.15	0.2014	15.25	21.45
7	10.2508	36.60	1.01	0.2012	9.35	13.14	0.2005	14.95	21.12
8	10.2325	36.20	1.00	0.2008	9.35	13.17	0.2000	14.95	21.17
9	10.1954	35.90	1.00	0.2016	9.20	12.91	0.2013	15.10	21.24
10	10.2735	35.85	0.99	0.2023	9.30	13.00	0.2009	15.05	21.22
ค่าเฉลี่ย			1.00			13.05			21.22

SD	0.01	0.14	0.10
% RSD	0.84	1.09	0.49

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (matrix effect) ที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ Sample Blank+ Ammonium sulfate และ CRM- BCR 178 มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง 1.00, 13.04 และ 21.20 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความเที่ยงแบบ Repeatability precision

ซ้ำที่	ความเข้มข้นระดับต่ำ				ความเข้มข้นระดับกลาง				ความเข้มข้นระดับสูง			
	น้ำหนัก	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium
	CRM/SRM (g)	ตัวอย่าง (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)	CRM/SRM (g)	ตัวอย่าง (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)	CRM/SRM (g)	ตัวอย่าง (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)
1	10.2334	0.5045	37.80	0.99	0.2023	0.5003	9.25	12.95	0.5018	0.2011	15.25	21.45
2	10.2702	0.5028	38.50	1.01	0.2027	0.5009	9.25	12.92	0.5022	0.2022	15.15	21.19
3	10.2013	0.5028	37.80	0.99	0.2013	5.0170	9.40	13.22	0.5034	0.2023	15.30	21.39
4	10.2544	0.5003	38.80	1.02	0.2014	0.5003	9.30	13.07	0.5036	0.2016	15.05	21.11
5	10.2095	0.5044	37.50	0.98	0.2019	0.5007	9.20	12.90	0.5005	0.2027	15.15	21.14
6	10.2453	0.5048	37.65	0.99	0.2043	0.5000	9.40	13.03	0.5009	0.2017	15.15	21.24
7	10.2264	0.5013	38.70	1.02	0.2056	0.5006	9.60	13.22	0.5010	0.2012	15.05	21.16
8	10.2322	0.5044	38.00	1.00	0.2009	0.5019	9.20	12.97	0.5009	0.2030	15.15	21.11

9	10.2755	0.5005	38.20	1.00	0.2007	0.5015	9.30	13.12	0.5016	0.2024	15.20	21.24
10	10.1821	0.5034	37.55	0.99	0.2053	0.5018	9.45	13.03	0.5020	0.2019	15.10	21.15
ค่าเฉลี่ย				1.00				13.04				21.22
SD				0.01				0.12				0.12
% RSD				1.37				0.88				0.55

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ แอมโมเนียมไนโตรเจนที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ Ammonium sulfate และ CRM- BCR 178 มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง 1.00, 13.04 และ 21.20 % ตามลำดับเพื่อวิเคราะห์หาความความเที่ยงแบบ Intermediate precision

วันที่	ความเข้มข้นระดับต่ำ			ความเข้มข้นระดับกลาง			ความเข้มข้นระดับสูง		
	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium
	CRM/SRM (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)	CRM/SRM (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)	CRM/SRM (g)	HCl (ml)	Nitrogen (%)
15 มี.ค.57	10.2513	35.80	0.99	0.2045	9.45	13.10	0.2001	14.95	21.17
16 มี.ค.57	10.2273	35.50	0.98	0.2032	9.25	12.88	0.2037	15.20	21.11
17 มี.ค.57	10.1411	35.10	0.98	0.2016	9.20	12.95	0.2034	15.25	21.28
18 มี.ค.57	10.2723	35.95	0.99	0.2039	9.35	13.01	0.2005	15.05	21.30
19 มี.ค.57	10.0727	34.90	0.98	0.2016	9.20	12.97	0.2018	15.10	21.26
20 มี.ค.57	10.1940	35.55	0.99	0.2032	9.30	12.99	0.2012	15.00	21.17

25 มี.ค.57	10.1142	35.30	0.99	0.2043	9.30	12.89	0.2045	15.40	21.33
27 มี.ค.57	10.3085	35.95	0.99	0.2017	9.30	13.10	0.2035	15.20	21.21
6 เม.ย.57	10.0853	35.60	1.00	0.2028	9.40	13.13	0.2025	10.30	21.41
7 เม.ย.57	10.2450	35.95	1.00	0.2052	9.35	12.96	0.2012	15.15	21.41
ค่าเฉลี่ย			0.99			13.00			21.27
SD			0.01			0.09			0.10
% RSD			0.75			0.67			0.48

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (matrix effect) ที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ Sample Blank+ Ammonium sulfate และ CRM- BCR 178 มีปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนรับรอง 1.00, 13.04 และ 21.20 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาความเที่ยงแบบ Intermediate precision

วันที่	ความเข้มข้นระดับต่ำ				ความเข้มข้นระดับกลาง				ความเข้มข้นระดับสูง			
	น้ำหนัก	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium	น้ำหนัก	น้ำหนัก	ปริมาตร	Ammonium
	CRM/SRM	ตัวอย่าง	HCl	Nitrogen	CRM/SRM	ตัวอย่าง	HCl	Nitrogen	CRM/SRM	ตัวอย่าง	HCl	Nitrogen
(g)	(g)	(ml)	(%)	(g)	(g)	(ml)	(%)	(g)	(g)	(ml)	(%)	
15 มี.ค.57	10.0942	0.5046	38.20	1.02	0.2035	0.5027	9.35	12.96	0.2001	0.5001	15.00	21.19
16 มี.ค.57	10.2720	0.5019	38.00	1.02	0.2057	0.5012	9.40	12.90	0.2035	0.5008	15.35	21.32

17 มี.ค.57	10.2328	0.5035	35.40	0.98	0.2029	0.5034	9.30	13.01	0.2009	0.5014	15.20	21.47
18 มี.ค.57	10.2525	0.5020	37.75	0.99	0.2052	0.5027	9.45	13.01	0.2025	0.5030	15.35	21.45
19 มี.ค.57	10.2075	0.5000	36.40	0.98	0.2029	0.5022	9.45	13.21	0.2011	0.5002	15.25	21.52
20 มี.ค.57	10.2210	0.5015	36.40	1.01	0.2008	0.5000	9.15	12.94	0.2029	0.5010	15.15	21.20
25 มี.ค.57	10.2587	0.5020	35.85	0.99	0.2048	0.5024	9.50	13.14	0.2048	0.5002	15.50	21.43
27 มี.ค.57	10.1786	0.5029	36.90	1.00	0.2009	0.5015	9.35	13.19	0.2025	0.5045	15.25	21.36
6 เม.ย.57	10.1738	0.5013	36.85	1.00	0.2003	0.5014	9.30	13.13	0.2011	0.5018	15.15	21.32
7 เม.ย.57	10.2100	0.5040	37.55	0.99	0.2030	0.5005	9.30	12.97	0.2017	0.5003	15.25	21.44
ค่าเฉลี่ย				1.00				13.05				21.37
SD				0.01				0.11				0.12
% RSD				1.48				0.88				0.55