

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัยที่ 171 : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุดิบทรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อยที่ 1.1 : พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ย
3. ชื่อการทดลองที่ 1.1.17: ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธี Official methods of analysis of fertilizers
Method Validation on Analysis of Total Phosphate in Chemical Fertilizers
Follow Official methods of analysis of fertilizers
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : ว่าที่ร้อยตรีพิรุณ ติระพัฒน์ สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8
ผู้ร่วมงาน : สรัญญา ช่วงพิมพ์ สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8
เยาวลักษณ์ แสงแก้ว สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8
5. บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ และสามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 จึงได้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Official methods of analysis of fertilizers (The National Institute of Agro-Environmental Sciences, 1987) เพื่อพิสูจน์ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ โดยศึกษา ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range), ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity), ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD), ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ), ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ที่ระดับฟอสฟอรัสสูง กลาง และต่ำ, และความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision) ทั้งแบบแบบการทวนซ้ำ (Repeatability precision) และแบบการทำซ้ำ (Intermediate precision) โดยวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material, CRM) โดยใช้ Ammonium dihydrogen phosphate (SRM194a) และ Super phosphate (BCR033) ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 61.70 และ 19.34 %P₂O₅ ตามลำดับ จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า Range ที่ช่วงความเข้มข้น 0-35 mg/L มีความไม่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นมากกว่า 25 mg/L แต่ที่ช่วงความเข้มข้น 0-25 mg/L กราฟแสดงความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า Coefficient of Determination (r^2) = 0.9985 และได้เลือกช่วงที่ความเข้มข้น 0-15 mg/L เพื่อศึกษา Linearity พบว่ามีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า r^2 = 1.0000 เมื่อศึกษาค่า LOD และ LOQ พบว่าได้ค่าเท่ากับ 0.3988 และ 1.3190 %P₂O₅ ตามลำดับ สำหรับร้อยละการคืนกลับ (%recovery)

ของ Accuracy ที่ระดับสูง (61.70 %P₂O₅) กลาง (19.34 %P₂O₅) และต่ำ (2.00 %P₂O₅) ได้ %recovery = 99.93, 98.77 และ 98.36 % ตามลำดับ และ Precision ที่ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดระดับสูง กลาง ต่ำ ประเมินด้วย Horwitz's equation พบว่าค่า Horrat repeatability precision เท่ากับ 0.07, 0.15 และ 0.04 % ตามลำดับ และ Horrat Intermediate precision เท่ากับ 0.10, 0.11 และ 0.05 % ตามลำดับ ซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้นั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล

Abstract

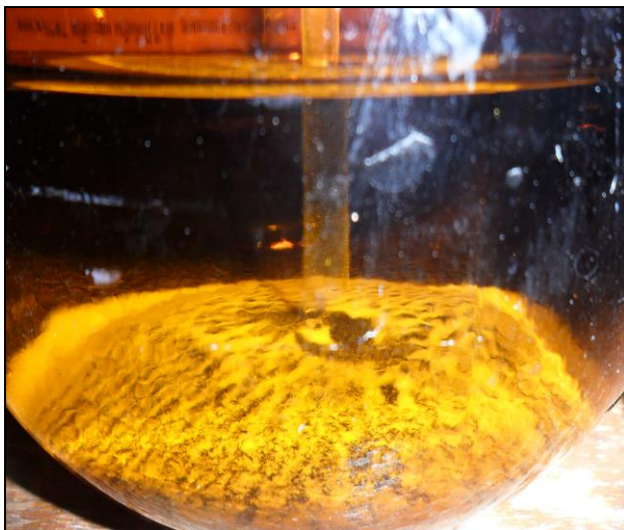
Analysis method of total phosphate in chemical fertilizers in order to achieve the result which is accurate, precise, reliable and referable to international standard, the analysis method validation is needed. The Fertilizers Analysis laboratory, Office of Agricultural Research and Development Region 8 has modified method of the Official Methods of Analysis of Fertilizer (The National Institute of Agro-Environmental Sciences, 1987) to assessed the range, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy and precision (repeatability and intermediate precision). The validation used certified reference material (CRM) : Ammonium dihydrogen phosphate (SRM194a) and Super phosphate (BCR033) which contain 61.70 and 19.34 %P₂O₅ respectively, CRM with matrix sample (CRM + Sample blank) were analyzed. The characteristics of the method showed that Range was not linearity at concentration more than 25 mg/L but concentration rang 0-25 mg/L was linearity, it has Coefficient of Determination (r^2) = 0.9985, Linearity 0-15 mg/L has r^2 =1.0000. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.3988 and 1.3190 %P₂O₅ respectively. The recovery of CRM with matrix sample at 3 levels of its concentration including high (61.70 %P₂O₅), medium (19.34 %P₂O₅) and low (2.00 %P₂O₅) were 99.93, 98.77 and 98.36 % respectively. The repeatability precision at high, medium and low level, which were evaluated by HORRAT values in CRM with matrix sample were 0.07, 0.15 and 0.04 respectively. The intermediate precision at high, medium and low level, which were evaluated by HORRAT values in CRM with matrix sample were 0.10, 0.11 and 0.05 respectively. All the values achieved from the analysis were referable international standard. Therefore, this validate method was fit for the intended use.

6. คำนำ

กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 เป็นหน่วยงานที่ให้บริการวิเคราะห์ดิน พืช น้ำ ปุ๋ย สารพิษตกค้าง และจุลินทรีย์ปนเปื้อนทางการเกษตร ของกรมวิชาการเกษตร ในส่วนภูมิภาค ซึ่งให้บริการกับเกษตรกร ผู้ประกอบการ เจ้าหน้าที่กรมวิชาการเกษตร หน่วยงานภาครัฐ และรัฐวิสาหกิจ กรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานภาครัฐที่มีหน้าที่กำกับดูแลพระราชบัญญัติปุ๋ย พระราชบัญญัติปุ๋ยได้กล่าวปุ๋ยไว้หลายชนิดด้วยกัน หนึ่งในนั้นก็คือ ปุ๋ยฟอสเฟต ซึ่งถ้าผู้ประกอบการและ/หรือผู้จำหน่าย ผลิตและ/หรือ

ปุ๋ยที่ไม่ตรงตามสูตรที่ได้รับหรือขึ้นทะเบียนไว้ ผู้ประกอบการและ/หรือผู้จำหน่ายก็必将มีความผิดตามกฎหมาย การที่จะรู้ว่าปุ๋ยที่ผลิตและ/หรือจำหน่ายมีปริมาณตามสูตรที่ระบุไว้หรือไม่ จำเป็นต้องส่งตัวอย่างปุ๋ยวิเคราะห์กับห้องปฏิบัติการที่เชื่อถือได้ กล่าวคือ ห้องปฏิบัติการต้องให้ผลวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้อง และแม่นยำ

การวิเคราะห์ปุ๋ยฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมีของหน่วยงานในกรมวิชาการเกษตรจะปฏิบัติตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี, 2551) จัดทำโดยกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรซึ่งดัดแปลงวิธีมาจาก AOAC (2012a) เรียกว่า Spectrophotometric molybdovanadophosphate ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้วิเคราะห์ตัวอย่างที่มีฟอสฟอรัสปริมาณสูง เช่น ดิน พีช น้ำ ปุ๋ย อาหารสัตว์ หรือแร่ เป็นต้น แต่วิธีดังกล่าวพบว่า Molybdovanadate reagent (น้ำยาปรับสี) จะตกตะกอนเป็นผลึกสีเหลือง เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ (รูปที่ 1) การตกตะกอนนี้เกิดจากอ็อกซิลไรต์ที่มีปริมาณมากเกินไป ซึ่งอ็อกซิลไรต์นี้มาจากการใช้กรดเพอร์คลอริก (HClO_4) เพื่อปรับสภาพ Molybdovanadate reagent ให้เป็นกรด จากหน้าที่ของกรดเพอร์คลอริกที่กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นว่าในการเตรียม Molybdovanadate reagent สามารถใช้กรดชนิดอื่นทดแทนได้ จึงได้ตรวจเอกสารวิธีวิเคราะห์หลายๆ ฉบับ เช่น Official methods of analysis of fertilizers (The National Institute of Agro-Environmental Sciences, 1987) Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis (Motsara and Roy, 2008) Method in Agricultural chemical analysis (Faithfull, 2002) Method of Soil, Plant and Water Analysis (Estefan *et al*, 2013) คู่มือการปฏิบัติงานกระบวนการวิเคราะห์พืช ปุ๋ย และสิ่งปรับปรุงดิน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2553) พบว่า ใช้กรดไนตริก (HNO_3) เป็นสารปรับสภาพให้เป็นกรด และจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ไม่มีการตกตะกอนของ Molybdovanadate reagent แต่อย่างไรก็ตามการที่จะนำกรดไนตริกมาใช้ทดแทนกรดเพอร์คลอริก จำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เสียก่อน เพื่อยืนยันความถูกต้องและแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ต้องตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ ดังนี้ ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range), ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity), ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD), ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ), ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ที่ระดับปริมาณฟอสฟอรัสสูง กลาง และต่ำ และความแม่นยำของการวัด (Precision) ทั้งแบบการทวนซ้ำ (Repeatability precision) และแบบการทำซ้ำ (Intermediate precision) (ทิพวรรณ, 2549, Eurachem, 2014) เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล และสามารถใช่วิธีการวิเคราะห์นี้เพื่อขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการในอนาคตต่อไป



รูปที่ 1 การตกตะกอนของ Molybdovanadate reagent

7. วิธีดำเนินการ

7.1 เครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมี

- 7.1.1 เครื่อง Spectrophotometer (PerkinElmer รุ่น Lambda 40)
- 7.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP221S)
- 7.1.3 ตู้บลมร้อน (Mettler รุ่น UM 500)
- 7.1.4 เตาหย่อยตัวอย่าง (Thermolyne รุ่น RC2240)
- 7.1.5 ตู้ดูดควัน (Safety Lab รุ่น SHF124)
- 7.1.6 Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4, 5, 10 และ 50 ml
- 7.1.7 Volumetric flask 100, 250, 500 และ 2000 ml
- 7.1.8 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

7.2 วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) และสารเคมี

- 7.2.1 วัสดุอ้างอิง
 - Ammonium dihydrogen phosphate (SRM 194a) มีฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 61.70 %P₂O₅
 - Super phosphate (BCR 033) มีฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 19.34 % P₂O₅
- 7.2.2 Sample blank ใช้ปุ๋ยสูตร 0-0-60
- 7.2.3 Perchloric acid (HClO₄)เข้มข้น 70 % (HClO₄)
- 7.2.4 Nitric acid (HNO₃)เข้มข้น 69-70 % (HNO₃)
- 7.2.5 Ammoniummolybdate [(NH₄)₆Mo₇·4H₂O]
- 7.2.6 Ammonium metavanadate (NH₄VO₃)
- 7.2.7 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 mg/L

7.3 Reagent

- 7.3.1 กรดหย่อยตัวอย่าง
กรดผสมระหว่าง HClO₄ และ HNO₃ สัดส่วน 1:1 โดยปริมาตร
- 7.3.2 Molybdovanadate reagent (น้ำยาปรับสี)
 - 7.3.2.1 ชั่ง Ammonium molybdate 54 g ใส่ Beaker ขนาด 600 ml เติมน้ำกลั่นร้อนประมาณ 400 ml กวนให้ละลาย ตั้งให้เย็น

7.3.2.2 ชั่ง Ammonium metavanadate 2.24 g ใส่ Beaker ขนาด 600 ml เติมน้ำกลั่นร้อน ประมาณ 400 ml กวนให้ละลาย ตั้งให้เย็น ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 2,000 ml นำไปวางไว้ในตู้ดูดควัน เติม HNO₃ 500 ml ลงไปอย่างช้าๆ เขย่าให้เข้ากัน

7.3.2.3 ถ่ายสารละลายข้อ 7.3.2.1 ลงใน Volumetric flask ข้อ 7.3.2.2 อย่างช้าๆ เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรใกล้เคียง 2,000 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งให้เย็น และปรับปริมาตร ให้ได้ 2,000 ml ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน ตั้งให้เย็น ถ่ายใส่ขวดเก็บสารละลาย

7.3.3 สารละลายฟอสฟอรัสมาตรฐานความเข้มข้น 5000 mg/L เตรียมจาก SRM 194a

7.3.4 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 100 mg/L โดยดูดสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1000 mg/L ปริมาตร 10 % ของปริมาณที่ต้องการเตรียม ด้วย Volumetric pipette ใส่ Volumetric flask และปรับปริมาตรให้ได้ตามที่ต้องการ

7.3.5 Working standard solution ที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 15 mg/L ดูดสารละลาย มาตรฐานฟอสฟอรัส 100 mg/L มา 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 15 ml ใส่ Volumetric flask 100 ml เติมน้ำยาปรับสี 10 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml และตั้งไว้อย่างน้อย 30 นาที นำไปสร้าง กราฟมาตรฐานตามข้อ 7.4.4

7.4 วิธีวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

7.4.1 ชั่งตัวอย่าง (sample wt.) ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml

7.4.2 เติมกรดย่อยตัวอย่าง 20 ml ย่อยบนเตาย่อย จนได้สารละลายใส ล้างตะกอน ใส่ Volumetric flask 250 ml (take vol.) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลาย

7.4.3 ดูดสารละลายที่กรอง 5 ml (aliquot) ใส่ใน Volumetric flask 100 ml เติมน้ำยาปรับสี 10 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml (total vol.) และตั้งไว้อย่างน้อย 30 นาที

7.4.4 สร้าง Calibration curve โดยนำ Working standard solution วัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงด้วย เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 420 นาโนเมตร (nm) และหาความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนคลีนแสงและความเข้มข้นของฟอสฟอรัส

7.4.5 วิเคราะห์ตัวอย่างโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาว คลื่นแสง 420 นาโนเมตร (nm) และนำค่าการดูดกลืนคลีนแสงของตัวอย่างเปรียบเทียบกับ Calibration curve เพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลาย (conc. from curve)

7.4.6 คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ตามสูตร

$$\% \text{ P}_2\text{O}_5 = \frac{(\text{conc. from curve}) \times \text{take vol.} \times \text{total vol.} \times 2.2914 \times 100}{1,000,000 \times \text{aliquot} \times \text{sample wt.}}$$

conc. from curve	ความเข้มข้นของ P ในสารละลายตัวอย่าง (mg/L)
take vol.	ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมด (ml)
total vol.	ปริมาตรของสารทั้งหมดก่อนนำไปวิเคราะห์ (ml)
aliquot	ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (ml)

sample wt.	น้ำหนักตัวอย่าง (g)
2.2914	ค่าคงที่สำหรับเปลี่ยนปริมาณ % P เป็น % P ₂ O ₅

7.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

- 7.5.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range) ที่ความเข้มข้น 0-35 mg P/L
- 7.5.1.1 ชั่ง Sample blank 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml
- 7.5.1.2 เติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 5,000 mg/L ปริมาตร 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
- 7.5.1.3 วิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2 – 7.4.3 ได้สารละลายฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 mg/L
- 7.5.1.4 วิเคราะห์ตามข้อ 7.4.5 หาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสง และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฟอสฟอรัส และค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสง
- 7.5.1.5 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า Correlation of determination (r^2) ต้อง ≥ 0.995 เพื่อนำช่วงที่ได้มาศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity)
- 7.5.2 ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Linearity) ที่ความเข้มข้น 0-15 mg/L
- 7.5.2.1 ชั่ง Sample Blank 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml
- 7.5.2.2 เติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 5,000 mg P/L ปริมาตร 0, 1, 3, 6, 9, 12, และ 15 ml ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ
- 7.5.2.3 วิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2 – 7.4.3 ได้สารละลายฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0, 1, 3, 6, 9, 12, และ 15 mg/L
- 7.5.2.4 วิเคราะห์ตามข้อ 7.4.5 หาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสง และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฟอสฟอรัส และค่าเฉลี่ยการดูดกลืนคลื่นแสง
- 7.5.2.5 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า r^2 ต้อง ≥ 0.995
- 7.5.3 ศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ)
- 7.5.3.1 กรณี Sample blank ไม่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ
- 7.5.3.1.1 ชั่ง Sample blank 0.4xxx – 0.5xxx g. ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml เติมสารที่มีฟอสฟอรัสลงไปเล็กน้อย จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2–7.4.3
- 7.5.3.1.2 สร้าง Calibration curve ตามข้อ 7.4.4 วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสเทียบกับ Calibration curve และคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD)

7.5.3.1.3 คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$\text{LOD} = 3 \text{ SD}$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD}$$

7.5.3.2 กรณี Sample blank มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ

7.5.3.2.1 ปฏิบัติตามข้อ 7.5.3.1.1 แต่ไม่เติมสารที่มีฟอสฟอรัสลงไปเล็กน้อย

7.5.3.2.2 ปฏิบัติตามข้อ 7.5.3.1.2 และคำนวณค่าเฉลี่ย (Average; \bar{x}) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD)

7.5.3.2.3 คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

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

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

7.5.4 ศึกษาความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสระดับ สูง กลาง และต่ำ โดยวิเคราะห์ CRM

7.5.4.1 หาความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารตัวเติม

ซึ่ง Matrix sample 0.4xxx – 0.5xxx g จำนวน 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2-7.4.6 และคำนวณความเข้มข้นเฉลี่ย โดยให้สัญลักษณ์ “ \bar{x} % P₂O₅(Matrix)”

7.5.4.2 การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่ระดับต่ำ (2.00 %P₂O₅ โดยเตรียมจาก SRM 194a)

ซึ่ง 2.00 %P₂O₅ 5.xxxx g ใส่ Erlenmeyer flask 125 ml และซึ่ง Matrix sample 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่กระดาษชั่งสาร และถ่ายใส่ใน Erlenmeyer flask เดียวกัน จำนวน 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2-7.4.6 โดยให้สัญลักษณ์ “%P₂O₅(ต่ำ)”

7.5.4.3 การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่ระดับกลาง (19.34 %P₂O₅)

ซึ่ง BCR033 0.5xxx g ใส่ Erlenmeyer flask 125 ml และซึ่ง Matrix sample 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่กระดาษชั่งสาร และถ่ายใส่ใน Erlenmeyer flask เดียวกัน จำนวน 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2-7.4.6 โดยให้สัญลักษณ์ “%P₂O₅(กลาง)”

7.5.4.4 การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่ระดับสูง (61.70 %P₂O₅)

ซึ่ง SRM194a 0.16xx g ใส่ Erlenmeyer flask 125 ml และซึ่ง Matrix sample 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่กระดาษชั่งสาร และถ่ายใส่ใน Erlenmeyer flask เดียวกัน จำนวน 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ตามข้อ 7.4.2-7.4.6 โดยให้สัญลักษณ์ “%P₂O₅(สูง)”

7.5.4.5 นำผลวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดคำนวณการหาค่าคืนกลับ (% Recovery) ดังนี้

7.5.4.5.1 ค่าเฉลี่ย (Average; \bar{x}) ของปริมาณฟอสเฟตทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

$$\text{ค่าเฉลี่ย } (\bar{x}) = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

7.5.4.5.2 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ของปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

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

x_i = ข้อมูลที่วัดแต่ละครั้ง

n = จำนวนครั้งที่วัด

7.5.4.5.3 การหาค่าคืนกลับ (% Recovery)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\%P_2O_5 (\text{ต่ำ/ กลาง/ สูง}) - \bar{x} \%P_2O_5 (\text{Matrix sample}) \times 100}{\%P_2O_5 (\text{CRM})}$$

$$\% \text{ Mean recovery} = (\text{ผลรวม \% Recovery})/n (\text{จำนวนซ้ำ})$$

โดยมีเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC (2012b) ดังนี้

ความเข้มข้น	% Mean recovery
100 %	98-102 %
> 10 %	98-102 %
> 1 %	97-103 %
> 0.1 %	95-105 %

7.5.5 การหาค่าความแม่นยำแบบทวนซ้ำของวิธีทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Repeatability Precision)

7.5.5.1 นำผลวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดที่ระดับ ต่ำ กลาง สูง จากข้อ 7.5.4.2-7.5.4.4 คำนวณหา

Horwitz ratio (HORRAT) ตามสูตร

$$\%RSD_r = \left(\frac{SD}{x \%P_2O_5 (\text{ต่ำ, กลาง, สูง})} \right) \times 100$$

$$\text{Predicted Horwitz } \%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}, \text{ C=concentration/100}$$

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

โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT \leq 2 AOAC (2012)

7.5.6 การหาค่าความแม่นยำแบบทำซ้ำของวิธีทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Intermediate precision)

7.5.6.1 วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดตามข้อ 7.5.4.2-7.5.4.4 วันละ 1 ซ้ำ ทำทั้งหมด 10 วัน (รวม 10 ซ้ำ)

7.5.7 คำนวณหา Horwitz ratio (HORRAT) ตามสูตร

$$\%RSD_R = \left(\frac{SD}{x \%P_2O_5 (\text{ต่ำ, กลาง, สูง})} \right) \times 100$$

$$\text{Predicted Horwitz } \%RSD_R = 2^{(1 - 0.5 \log C)}, \text{ C=concentration/100}$$

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

โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ $HORRAT \leq 2$ AOAC (2012)

7.5.8 สรุป และรายงานผลการทดลอง

7.6 สถานที่ดำเนินการ

7.6.1 ระยะเวลาทดสอบ : ตุลาคม 2557 - สิ้นสุด กันยายน 2558

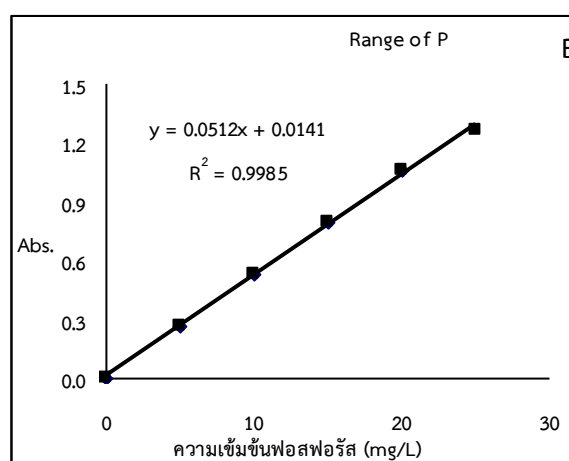
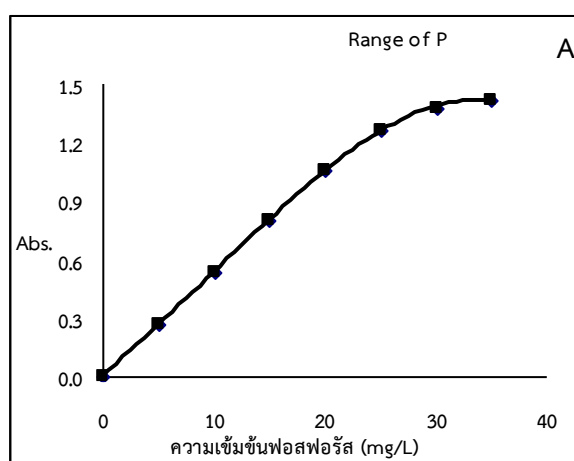
7.6.2 สถานที่ทดสอบ : ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8

8.ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธี Official methods of analysis of fertilizers โดยการหาค่า Range , Linearity, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ), Accuracy และ Precision โดยวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM) ได้ผลการทดลองดังนี้

8.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range)

จากการเติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสลงใน sample blank ที่ความเข้มข้น 0-35 mg/L เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mg/L) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance, Abs)(ตารางภาคผนวกที่ 1) พบว่า ความเข้มข้นมากกว่า 25 mg/L กราฟจะไม่แสดงความเป็นเส้นตรง (รูปที่ 2A) แต่ที่ช่วงความเข้มข้น 0-25 mg/L กราฟแสดงความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า $r^2 = 0.9985$ (รูปที่ 2B)

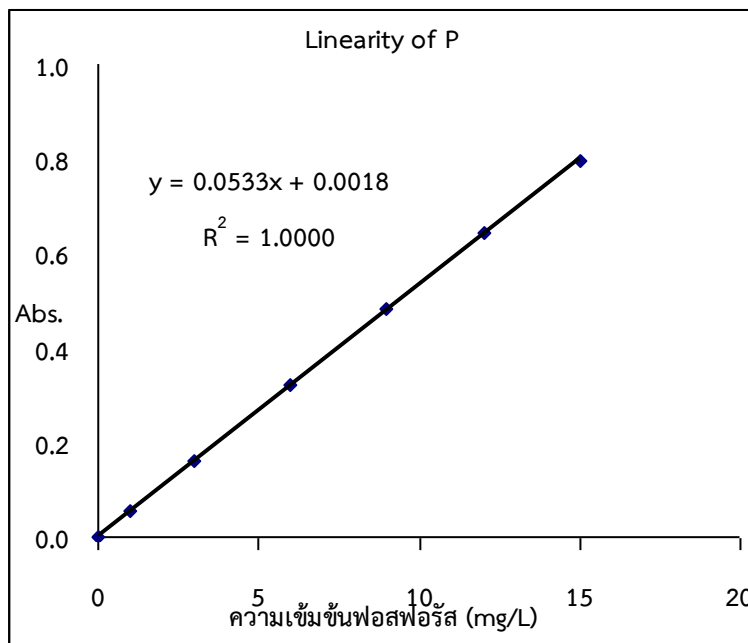


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mgP/L) กับการดูดกลืนแสง (Abs) ของการหา Range

8.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity)

เลือกช่วงความเข้มข้น 0-15 mg/L มาเป็นช่วงใช้งาน ในการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด โดยการเติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสลงใน sample blank ให้มีความเข้มข้น 0-15 mg/L และสร้างกราฟมาตรฐาน

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mg/L) กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance, Abs) (ตารางภาคผนวกที่ 2) พบว่า ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวให้ค่าสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตลอดแนว โดยมีค่า $r^2 = 1.0000$ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mg/L) กับการดูดกลืนแสง (Abs) ของการหา Linearity

8.3 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการวิเคราะห์ sample blank ที่เติมสารละลายฟอสฟอรัสลงไปเล็กน้อย พบว่า ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.1319 (ตารางภาคผนวกที่ 3) และนำค่า SD คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ค่าดังนี้

$$SD = 0.1319$$

$$LOD = 3SD = 3 \times 0.1319 = 0.3957 \%P_2O_5$$

$$LOQ = 10SD = 10 \times 0.1319 = 1.3190 \%P_2O_5$$

8.4 ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

โดยวิเคราะห์ SRM 194a และ BCR 033 ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูง กลาง และต่ำ ร่วมกับ sample blank พบว่า ได้ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดเฉลี่ย เท่ากับ 61.6564, 19.1025 และ 1.9671 % P_2O_5 ตามลำดับ และมี % Recovery เท่ากับ 99.93, 98.77 และ 98.36 % ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 5,6 และ 7 ตามลำดับ) ซึ่ง % Recovery ที่วิเคราะห์ได้ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ตาม AOAC (2012) คือ ปริมาณระดับสูง และกลาง คือ 98-102 % และที่ปริมาณระดับต่ำ คือ 97-103 %

8.5 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision)

โดยวิเคราะห์ SRM 194a และ BCR 033 ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูง กลาง และต่ำ ร่วมกับ sample blank โดยใช้ Horwitz's equation โดยประเมินความแม่นยำของการวิเคราะห์ 2 แบบ คือ ความแม่นยำแบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) และ ความแม่นยำแบบทำซ้ำ (Intermediate precision) ได้ผลการประเมิน ดังนี้

8.5.1 ความแม่นยำแบบทวนซ้ำ

8.5.1.1 ที่ความเข้มข้นระดับสูง (Matrix sample + 61.70 % P₂O₅) ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ 5

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \\ &= (0.0607/61.6564) \times 100 = 0.0984\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}, C = \text{concentration ratio} = (61.70/100) = 0.6170 \\ &= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log 0.5217)} = 1.42\end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.0984}{1.42} = \mathbf{0.07}$$

8.5.1.2 ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (Matrix sample + 19.34 % P₂O₅) ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ 6

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \\ &= (0.0479/19.1025) \times 100 = 0.2508\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}, C = \text{concentration ratio} = (19.34 / 100) = 0.1934 \\ &= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log 0.1934)} = 1.69\end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.2508}{1.69} = \mathbf{0.15}$$

8.5.1.3 ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (Matrix sample + 2 % P₂O₅) ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ 7

$$\begin{aligned}\%RSD &= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \\ &= (0.0021/1.9671) \times 100 = 0.1068\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}, C = \text{concentration ratio} = 2.00 / 100 = 0.02 \\ &= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log 0.02)} = 2.38\end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.1068}{2.38} = \mathbf{0.04}$$

จากการคำนวณหาค่า Horrat ของการทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ในสภาพที่มีสารตัวเติมแบบทวนซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้นฟอสฟอรัสสูง กลาง และต่ำ ได้ค่าเท่ากับ 0.07, 0.15 และ 0.04 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ Horrat \leq 2

8.5.2 การหาค่าความแม่นยำแบบทำซ้ำ

8.5.2.1 ที่ความเข้มข้นระดับสูง (Matrix sample + 61.70 % P₂O₅) ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ 9

$$\begin{aligned} \%RSD &= (SD/\bar{x}) \times 100 \\ &= (0.1356/61.7573) \times 100 = 0.2196 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 2^{(1 - 0.5 \log C)}, C = \text{concentration ratio} = (61.70/100) = 0.6170 \\ &= 2^{(1 - 0.5 \log 0.5217)} = 2.15 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.2196}{2.15} = \mathbf{0.10}$$

8.5.2.2 ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (Matrix sample + 19.34 % P₂O₅) ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ 10

$$\begin{aligned} \%RSD &= (SD/\bar{x}) \times 100 \\ &= (0.0550/19.1263) \times 100 = 0.2876 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 2^{(1 - 0.5 \log C)}, C = \text{concentration ratio} = (19.34/100) = 0.1934 \\ &= 2^{(1 - 0.5 \log 0.1934)} = 2.56 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.2876}{2.56} = \mathbf{0.11}$$

8.5.2.3 ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (Matrix sample + 2 % P₂O₅) ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ 11

$$\begin{aligned} \%RSD &= (SD/\bar{x}) \times 100 \\ &= (0.0036/1.9677) \times 100 = 0.1830 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 2^{(1 - 0.5 \log C)}, C = \text{concentration ratio} = (2.00/100) = 0.02 \\ &= 2^{(1 - 0.5 \log 0.02)} = 3.60 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.1830}{3.60} = \mathbf{0.05}$$

จากการคำนวณหาค่า Horrat ของการทดสอบฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ในสภาพที่มีสารตัวเติมแบบทำซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้นฟอสฟอรัสสูง กลาง และต่ำ ได้ค่าเท่ากับ 0.10, 0.11 และ 0.05 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $Horrat \leq 2$

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธี Official methods of analysis of fertilizers โดยวิเคราะห์ CRM ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสระดับสูง กลาง และต่ำ โดยใช้ CRM คือ SRM 194a (ammonium dihydrogen phosphate) และ BCR 033 (Super phosphate) มีฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 61.70 และ 19.34 % P_2O_5 ตามลำดับ ได้ผลการตรวจสอบดังนี้

- 9.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range) : อยู่ในช่วง 0-25 mg/L (รูปที่ 2)
- 9.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity) : เลือกช่วง 0-15 mg/L มาทดสอบความสัมพันธ์ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Abs) กับความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mg/L) พบว่า ค่า $r^2 = 1.0000$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $r^2 = 0.995$ (รูปที่ 3)
- 9.3 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) คือ 0.3957 % P_2O_5
- 9.4 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ) คือ 1.3190 % P_2O_5
- 9.5 ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ที่ปริมาณฟอสฟอรัสระดับ สูง กลาง และต่ำ ในสภาพที่มีสารตัวเติม พบว่า ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 99.93, 98.77 และ 98.36 % ตามลำดับ
- 9.6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ ในสภาพที่มีสารตัวเติม แบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) โดยใช้ Horwitz's ratio ในการประเมิน พบว่า ได้ค่า HORRAT ที่ระดับสูง กลาง และต่ำ ดังนี้ 0.07, 0.15 และ 0.04 ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $Horrat \leq 2$
- 9.7 ความแม่นยำของการทดสอบ ในสภาพที่มีสารตัวเติม แบบทำซ้ำ (Intermediate precision) โดยใช้ Horwitz's ratio ในการประเมิน พบว่า ได้ค่า HORRAT ที่ระดับสูง กลาง และต่ำ ดังนี้ 0.10, 0.11 และ 0.05 ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $Horrat \leq 2$

จากผลการวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธี Official methods of analysis of fertilizers ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล และมีสมรรถนะดีพอเหมาะสมต่อการใช้งาน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 10.1 การวิเคราะห์ฟอสเฟตทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธี Official methods of analysis of fertilizers สามารถนำมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ได้
- 10.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยทั้งภาครัฐ และเอกชนสามารถนำวิธีการวิเคราะห์นี้ไปใช้ได้ อีกทั้งการใช้วิธีเพื่อการวิเคราะห์ยังมีผลดี ดังนี้
 - 10.2.1 ลดต้นทุนในการวิเคราะห์ เนื่องจากกรดไนตริกมีราคาถูกกว่ากรดเพอร์คลอริก 5-10 เท่า (ขึ้นอยู่กับยี่ห้อของสารเคมี)

10.2.2 ไม่มีปัญหาการตกตะกอนของ Molybdovanadate reagent (น้ำยาปรับสี) ทำให้ห้องปฏิบัติการสามารถใช้ Molybdovanadate reagent จนหมด

10.2.3 การไม่เกิดตะกอนของ Molybdovanadate reagent ยังทำให้ไม่เกิดการอุดตันของระบบกระจายสารอัตโนมัติ (ถ้าใช้) ทำให้ยืดอายุการใช้งาน

10.3 ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ประกอบการขอการรับรอง ISO/IEC 17025

11. คำขอขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2012a. Official Method Of Analysis of The Association Of Official Analytical Chemists, 19thEd. AOAC International Inc., Gaithersberg MD.

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

Estefan, George, Sommer, Rolf and Ryan, John. 2013. Method of Soil, Plant and Water Analysis. ICARDA. 243 p.

Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd Ed. 62 p.

Motsara, M.R. and Roy,R.N. 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Rome. 205 p.

Faithfull, N.T. 2002. Method in Agricultural chemical analysis. CABI publishing. New York. 266 p.

The National Institute of Agro-Environmental Sciences. 1987. Official Methods of Analysis of Fertilizers. Foundation Norin Kosaikai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 130 p.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2553. คู่มือการปฏิบัติงานกระบวนการวิเคราะห์พืช ปุ๋ย และสิ่งปรับปรุงดิน. 52 หน้า.

คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. 2551 กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 66 หน้า.

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

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) และความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mg/L) ของ Matrix sample (0-0-60) ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส เพื่อทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range)

ความเข้มข้น	Matrix sample/	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
-------------	----------------	----------	----------	----------	-----------	----

(mg P/L)	Absorbance					
0	Matrix sample (g)	0.5038	0.5033	0.5250		
	Absorbance	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	Matrix sample (g)	0.5118	0.5195	0.5190		
	Absorbance	0.2694	0.2692	0.2698	0.2695	0.0003
10	Matrix sample (g)	0.5131	0.5005	0.5039		
	Absorbance	0.5321	0.5332	0.5326	0.5326	0.0006
15	Matrix sample (g)	0.5150	0.5206	0.5181		
	Absorbance	0.7952	0.7981	0.7961	0.7965	0.0015
20	Matrix sample (g)	0.5046	0.5016	0.5057		
	Absorbance	1.0476	1.0764	1.0484	1.0575	0.0164
25	Matrix sample (g)	0.5093	0.5294	0.5073		
	Absorbance	1.2615	1.2640	1.2693	1.2649	0.0040
30	Matrix sample (g)	0.5030	0.5092	0.5207		
	Absorbance	1.3804	1.3823	1.3813	1.3813	0.0010
35	Matrix sample (g)	0.5128	0.5194	0.5217		
	Absorbance	1.4158	1.4121	1.4106	1.4128	0.0027

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ % Total P₂O₅ ของ Matrix sample (0-0-60) ที่เติมสารละลายมาตรฐาน ฟอสฟอรัส เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ซ้ำที่	Matrix sample (g)	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquit vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)
1	0.5087	2.1188	250	5	100	4.7720
2	0.5011	2.1113	250	5	100	4.8272
3	0.4915	2.0963	250	5	100	4.8865
4	0.5014	2.0989	250	5	100	4.7960
5	0.5067	2.0987	250	5	100	4.7454

6	0.4950	2.0929	250	5	100	4.8441
7	0.5239	2.0881	250	5	100	4.5664
8	0.4941	2.0998	250	5	100	4.8689
9	0.5229	2.0992	250	5	100	4.5995
10	0.5278	2.0847	250	5	100	4.5253
ค่าเฉลี่ย						4.7431
SD						0.1319
LOD (3SD)						0.3957
LOQ (10SD)						1.3190

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ % Total P₂O₅ ของ Matrix sample (0-0-60)

ซ้ำที่	Matrix sample (g)	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquit vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)
1	0.4993	0.0000	250	5	100	0.0000
2	0.4968	0.0000	250	5	100	0.0000
3	0.5229	0.0000	250	5	100	0.0000
4	0.5047	0.0000	250	5	100	0.0000
5	0.5067	0.0000	250	5	100	0.0000
6	0.5284	0.0000	250	5	100	0.0000
7	0.5196	0.0000	250	5	100	0.0000
8	0.4920	0.0000	250	5	100	0.0000
9	0.4957	0.0000	250	5	100	0.0000
10	0.4960	0.0000	250	5	100	0.0000
ค่าเฉลี่ย						0.0000
SD						0.0000

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ 61.70 % Total P₂O₅ (SRM 194a) ที่เติม Matrix sample (0-0-60)

ซ้ำที่	Matrix sample	SRM 194a	conc.P	Take vol.	Aliquit vol.	Total vol.	Total P ₂ O ₅	Total P ₂ O ₅ - ค่าเฉลี่ย Matrix sample	Recovery
--------	---------------	----------	--------	-----------	--------------	------------	-------------------------------------	---	----------

	(g)	(mg/L)	(ml)	(ml)	(ml)	(%)	(%)	(%)	
1	0.5016	0.1663	8.9481	250	5	100	61.6467	61.6467	99.91
2	0.5013	0.1668	8.9828	250	5	100	61.7002	61.7002	100.00
3	0.5002	0.1670	8.9808	250	5	100	61.6126	61.6126	99.86
4	0.5023	0.1674	8.9944	250	5	100	61.5584	61.5584	99.77
5	0.5003	0.1688	9.0734	250	5	100	61.5841	61.5841	99.81
6	0.5063	0.1665	8.9587	250	5	100	61.6455	61.6455	99.91
7	0.5013	0.1660	8.9481	250	5	100	61.7581	61.7581	100.09
8	0.5045	0.1669	8.9894	250	5	100	61.7085	61.7085	100.01
9	0.5082	0.1667	8.9761	250	5	100	61.6912	61.6912	99.99
10	0.5050	0.1674	9.0090	250	5	100	61.6584	61.6584	99.93
ค่าเฉลี่ย							61.6564	61.6564	99.93
SD							0.0607	0.0607	0.0984
% RSD								0.0984	

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ 19.34 % Total P₂O₅ (BCR 033) ที่เติม Matrix sample (0-0-60)

ซ้ำที่	Matrix sample (g)	BCR 033	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquit vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)	Total P ₂ O ₅ - ค่าเฉลี่ย Matrix sample (%)	Recovery (%)
1	0.5029	0.5347	8.8938	250	5	100	19.0567	19.0567	98.54
2	0.5050	0.5326	8.8897	250	5	100	19.1230	19.1230	98.88
3	0.5023	0.5340	8.8872	250	5	100	19.0675	19.0675	98.59
4	0.5010	0.5324	8.9285	250	5	100	19.2137	19.2137	99.35
5	0.5076	0.5333	8.8980	250	5	100	19.1158	19.1158	98.84
6	0.5011	0.5332	8.8979	250	5	100	19.1191	19.1191	98.86
7	0.5011	0.5331	8.8736	250	5	100	19.0705	19.0705	98.61
8	0.5012	0.5327	8.8691	250	5	100	19.0751	19.0751	98.63
9	0.5026	0.5332	8.9001	250	5	100	19.1239	19.1239	98.88
10	0.5076	0.5333	8.8719	250	5	100	19.0597	19.0597	98.55
ค่าเฉลี่ย							19.1025	19.1025	98.77
SD							0.0479	0.0479	0.2475
% RSD								0.2508	

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ 2.0 % Total P₂O₅* ที่เติม Matrix sample (0-0-60)

ซ้ำที่	Matrix sample (g)	2.0 % Total P ₂ O ₅	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquot vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)	Total P ₂ O ₅ - ค่าเฉลี่ย Matrix sample (%)	Recovery (%)
1	0.5027	5.1521	8.8417	250	5	100	1.9662	1.9662	98.31
2	0.5007	5.1561	8.8702	250	5	100	1.9710	1.9710	98.55
3	0.5081	5.1561	8.8557	250	5	100	1.9678	1.9678	98.39
4	0.5025	5.1677	8.8631	250	5	100	1.9650	1.9650	98.25
5	0.5014	5.1549	8.8506	250	5	100	1.9671	1.9671	98.35
6	0.5066	5.1705	8.8876	250	5	100	1.9693	1.9693	98.47
7	0.5016	5.1576	8.8391	250	5	100	1.9635	1.9635	98.18
8	0.5025	5.1513	8.8476	250	5	100	1.9678	1.9678	98.39
9	0.5035	5.1632	8.8611	250	5	100	1.9663	1.9663	98.31
10	0.5008	5.1561	8.8540	250	5	100	1.9674	1.9674	98.37
ค่าเฉลี่ย							1.9671	1.9671	98.36
SD							0.0021	0.0021	0.1056
% RSD								0.1068	

หมายเหตุ * 2.0% Total P₂O₅ เตรียมจาก SRM 194a

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการวิเคราะห์ % Total P₂O₅ ของ Matrix sample (0-0-60) ทดสอบวันละครั้ง (Intermediate precision)

วันที่	Matrix sample (g)	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquot vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)
1	0.4993	0.0000	250	5	100	0.0000
2	0.4968	0.0000	250	5	100	0.0000
3	0.5229	0.0002	250	5	100	0.0004
4	0.5047	0.0006	250	5	100	0.0014
5	0.5067	0.0000	250	5	100	0.0000
6	0.5284	0.0000	250	5	100	0.0000
7	0.5196	0.0001	250	5	100	0.0002
8	0.4920	0.0000	250	5	100	0.0000
9	0.4957	0.0000	250	5	100	0.0000
10	0.4960	0.0015	250	5	100	0.0035

ค่าเฉลี่ย

0.0005

SD

0.0011

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ 61.70 % Total P₂O₅ (SRM 194a) ที่เติม Matrix sample (0-0-60)
ทดสอบวันละครั้ง (Intermediate precision)

วันที่	Matrix sample (g)	SRM 194a	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquit vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)	Total P ₂ O ₅ - ค่าเฉลี่ย Matrix sample (%)	Recovery (%)
1	0.5016	0.1663	8.9420	250	5	100	61.6026	61.6020	99.84
2	0.5013	0.1668	8.9807	250	5	100	61.6837	61.6832	99.97
3	0.5002	0.1670	9.0287	250	5	100	61.9391	61.9386	100.39
4	0.5023	0.1674	9.0105	250	5	100	61.6666	61.6660	99.95
5	0.5003	0.1688	9.0782	250	5	100	61.6146	61.6141	99.86
6	0.5063	0.1665	8.9670	250	5	100	61.7006	61.7000	100.00
7	0.5013	0.1660	8.9823	250	5	100	61.9920	61.9915	100.47
8	0.5045	0.1669	8.9942	250	5	100	61.7394	61.7389	100.06
9	0.5082	0.1667	8.9858	250	5	100	61.7558	61.7552	100.09
10	0.5050	0.1674	9.0422	250	5	100	61.8835	61.8830	100.30
ค่าเฉลี่ย							61.7578	61.7573	100.09
SD							0.1356	0.1356	0.22
% RSD								0.2196	

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ 19.34 % Total P₂O₅ (BCR 033) ที่เติม Matrix sample (0-0-60)
ทดสอบวันละครั้ง (Intermediate precision)

วันที่	Matrix sample (g)	BCR 033	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquit vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)	Total P ₂ O ₅ - ค่าเฉลี่ย Matrix sample (%)	Recovery (%)
1	0.5029	0.5347	8.8835	250	5	100	19.0340	19.0335	98.41
2	0.5050	0.5326	8.8796	250	5	100	19.1007	19.1001	98.76
3	0.5023	0.5340	8.9300	250	5	100	19.1587	19.1582	99.06
4	0.5010	0.5324	8.9411	250	5	100	19.2402	19.2396	99.48

5	0.5076	0.5333	8.9103	250	5	100	19.1415	19.1410	98.97
6	0.5011	0.5332	8.9035	250	5	100	19.1305	19.1300	98.91
7	0.5011	0.5331	8.9042	250	5	100	19.1356	19.1351	98.94
8	0.5012	0.5327	8.8656	250	5	100	19.0670	19.0664	98.58
9	0.5026	0.5332	8.9070	250	5	100	19.1380	19.1375	98.95
10	0.5076	0.5333	8.9015	250	5	100	19.1226	19.1221	98.87
ค่าเฉลี่ย							19.1269	19.1263	98.89
SD							0.0550	0.0550	0.28
% RSD							0.2876		

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์ 2.0 % Total P₂O₅* ที่เติม Matrix sample (0-0-60) ทดสอบวันละครั้ง (Intermediate precision)

วันที่	Matrix sample (g)	2.0 % Total P ₂ O ₅	conc.P (mg/L)	Take vol. (ml)	Aliquit vol. (ml)	Total vol. (ml)	Total P ₂ O ₅ (%)	Total P ₂ O ₅ - ค่าเฉลี่ย Matrix sample (%)	Recovery (%)
1	0.5027	5.1521	8.8297	250	5	100	1.9634	1.9629	98.17
2	0.5007	5.1561	8.8551	250	5	100	1.9676	1.9670	98.38
3	0.5081	5.1561	8.8914	250	5	100	1.9756	1.9751	98.78
4	0.5025	5.1677	8.8673	250	5	100	1.9658	1.9653	98.29
5	0.5014	5.1549	8.8464	250	5	100	1.9661	1.9655	98.30
6	0.5066	5.1705	8.8880	250	5	100	1.9694	1.9688	98.47
7	0.5016	5.1576	8.8644	250	5	100	1.9691	1.9685	98.45
8	0.5025	5.1513	8.8422	250	5	100	1.9665	1.9660	98.33
9	0.5035	5.1632	8.8631	250	5	100	1.9666	1.9661	98.33
10	0.5008	5.1561	8.8773	250	5	100	1.9725	1.9719	98.62
ค่าเฉลี่ย							1.9683	1.9677	98.41
SD							0.0036	0.0036	0.18
% RSD							0.1830		

หมายเหตุ

* 2.0% Total P₂O₅ เตรียมจาก SRM 194a

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) และความเข้มข้นฟอสฟอรัส (mg/L) ของ Matrix sample ที่เติมสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส เพื่อทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity)

ความเข้มข้น (mg P/L)	Matrix sample/ Absorbance	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6	ซ้ำที่ 7	ซ้ำที่ 8	ซ้ำที่ 9	ซ้ำที่ 10	ค่าเฉลี่ย	SD
0	Matrix sample (g)	0.5160	0.5168	0.5233	0.5115	0.5171	0.4953	0.5058	0.5000	0.5070	0.5074		
	Absorbance	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1	Matrix sample (g)	0.5163	0.5132	0.5055	0.5035	0.5156	0.5039	0.5276	0.5089	0.5110	0.5101		
	Absorbance	0.0539	0.0541	0.0541	0.0541	0.0541	0.0540	0.0544	0.0540	0.0543	0.0542	0.0541	0.0001
3	Matrix sample (g)	0.5072	0.5053	0.5131	0.5050	0.5116	0.5170	0.4999	0.5059	0.5089	0.5009		
	Absorbance	0.1624	0.1623	0.1621	0.1621	0.1623	0.1625	0.1621	0.1622	0.1623	0.1619	0.1622	0.0002
6	Matrix sample (g)	0.5102	0.5010	0.5028	0.5279	0.5272	0.5219	0.5057	0.5101	0.5082	0.5210		
	Absorbance	0.3244	0.3242	0.3241	0.3245	0.3240	0.3238	0.3242	0.3242	0.3238	0.3238	0.3241	0.0002
9	Matrix sample (g)	0.5029	0.5136	0.5018	0.5090	0.5023	0.5130	0.5074	0.5274	0.5255	0.5110		
	Absorbance	0.4831	0.4835	0.4834	0.4827	0.4837	0.4833	0.4825	0.4829	0.4829	0.4831	0.4831	0.0004
12	Matrix sample (g)	0.5122	0.5176	0.5075	0.5223	0.5204	0.5274	0.5222	0.5048	0.5178	0.5230		
	Absorbance	0.6433	0.6402	0.6419	0.6427	0.6427	0.6431	0.6425	0.6432	0.6436	0.6440	0.6427	0.0011
15	Matrix sample (g)	0.5293	0.5137	0.5091	0.5088	0.5025	0.5030	0.5085	0.5125	0.5292	0.5031		
	Absorbance	0.7944	0.8012	0.7937	0.8003	0.8011	0.7993	0.8001	0.7964	0.8011	0.7994	0.7987	0.0028

