

## รายงานผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2556

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช  
สารสกัด และวัตถุดิบทรายทางการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การทดลองที่ 1.1.13 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน  
ทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Method Validation of Analysis of Total Nitrogen in Fertilizer

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการ นางจิตติมา ยถาภูชานนท์ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สปพ.

หัวหน้าการทดลอง นางสาวอาภรณ์ ทองบุราณ สังกัด สวพ.5

ผู้ร่วมงาน นางสาวจิราภา เมืองคล้าย สังกัด สวพ.5

นางสาวทิตยา ประเสริฐกุล สังกัด สวพ.5

5. บทคัดย่อ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่พัฒนาโดยกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ซึ่งดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ AOAC ปี 2000 และ OMAF ปี 1987 เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์และให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นไปตามข้อกำหนด ISO/IEC 17025: 2005 โดยศึกษาค่าความแม่นยำของผลการทดสอบ (Accuracy) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection ; LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานผลได้อย่างแม่นยำ Limit of Quantitative ; LOQ) จากการวิเคราะห์ Certified Reference Material (CRM) ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17% พบว่าค่าความแม่นยำของผลการทดสอบ (Accuracy) ประเมินความจากเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (%Recovery) ได้เท่ากับ 99.99, 100.05 และ 100.65 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 98-102% และหาค่าแสดงความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริง (T - test) พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) ประเมินโดยใช้สมการของ HORRAT ได้เท่ากับ 0.44, 0.68 และ 0.66 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ HORRAT < 2 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.2 % และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานผลได้อย่างแม่นยำ เท่ากับ 0.4% จากผลการประเมิน แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนมีความแม่นยำของผลการทดสอบ (Accuracy) และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้

## Abstract

Method validation analysis of total nitrogen in fertilizer. Study accuracy ,precision, limit of detection (LOD) and limit of quantitative (LOQ) by analysis of Certified Reference Material (CRM) with value total nitrogen 46.54%, 26.02% and 1.17%. The method showed accuracy with %recover amount 99.99, 100.05 and 100.65. Estimate that precision by equation's HORRAT found that precision amount 0.44, 0.68 and 0.66. LOD is 0.2% and LOQ is 0.4% with validation method is acceptability.

## คำนำ

ด้วยกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 (สวพ.5) ได้เปิดบริการวิเคราะห์ปุ๋ยให้กับบุคคลทั่วไปและรองรับการทำงานด้านการควบคุมคุณภาพของปัจจัยการผลิต ให้กับกลุ่มควบคุมตามพระราชบัญญัติของ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 ซึ่งการให้บริการดังกล่าวต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามมาตรฐานสากล อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าทางห้องปฏิบัติการจะดำเนินการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมีตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี, 2551) ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงและปรับปรุงจากวิธีมาตรฐานของ AOAC 2000, 17<sup>th</sup> Ed และ OMAF 1987 ห้องปฏิบัติการปุ๋ยของ สวพ.5 ต้องทำการพิสูจน์ให้ได้ว่าวิธีที่นำมาใช้สามารถใช้ได้จริงกับห้องปฏิบัติการของ สวพ.5

## วิธีการดำเนินงาน

### เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
3. เครื่องย่อยและเครื่องกลั่นไนโตรเจน
4. Burette ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. Beaker ขนาด 3000 มิลลิลิตร
6. Cylinder ขนาด 100 มิลลิลิตร
7. Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
8. Volumetric Flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร
9. Volumetric Flask ขนาด 2000 มิลลิลิตร
9. Volumetric pipette ขนาด 50 มิลลิลิตร
10. Magnetic stirrer
11. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆที่ใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์

## สารเคมี

1. Boric acid, AR Grade
2. Copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), AR Grade
3. Ethyl alcohol 90% ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), AR Grade
4. Methylene blue, AR Grade
5. Metyl red, AR Grade
6. Potassium sulfate ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), AR Grade
7. Salicylic acid  $\{\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH}).\text{COOH}\}$ , AR Grade
8. Sulfuric acid 98% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), AR Grade
9. Standard hydrochloric acid 1 N, AR Grade
10. Sodium hydroxide, AR Grade
11. Sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), AR Grade
12. วัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน
  - 12.1 Urea  $46.54 \pm 0.08$  % (CRM-BCR 179)
  - 12.2 Calcium Ammonium Nitrate  $26.019 \pm 0.054$  % Nitrogen (CRM-BCR 178)
  - 12.3 Sodium Carbonate  $99.970 \pm 0.014$  % (SRM 351a)

## วิธีการ

### 1. การหา Accuracy

11. การหาค่า Accuracy ของการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใน CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17%

1.1 ชั่ง CRM น้ำหนัก 0.2xxx - 0.3xxx กรัม ความเข้มข้นละ 10 ช้ำ พร้อมทำ Blank

1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด ของกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

1.3 บันทึกข้อมูล และคำนวณผล

1.4 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่าที่รับรองของ CRM

1.5 เกณฑ์ยอมรับ

- % Recovery เกณฑ์การยอมรับ เท่ากับ 98-102 % (AOAC, 2012)

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

- ประเมินความแตกต่างโดยใช้ T-test เกณฑ์การยอมรับ  $t < T_c$

ที่ความเชื่อมั่น 95 %

t	=	$(x - \mu) / (s / \sqrt{n})$
เมื่อ x	=	ค่าเฉลี่ยผลวิเคราะห์ของชุดทดสอบ
$\mu$	=	ค่าอ้างอิง
n	=	จำนวนซ้ำ
s	=	Standard Deviation ของชุดทดสอบ

## 2. การหาค่า Precision

2.1 ชั่ง CRM น้ำหนัก 0.2xxx - 0.3xxx กรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พร้อมทำ Blank โดยทดสอบด้วยเครื่องมือเดียวกันและระยะเวลาใกล้เคียงกัน

2.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด ของกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2.3 บันทึกข้อมูล และคำนวณผล

2.4 คำนวณหาค่า Precision โดยใช้ Horwitz equation คำนวณแบบ Repeatability

2.5 การประเมินค่า Precision ของการวิเคราะห์ CRM โดยการคำนวณหาค่า % RSD แล้วประเมินโดยใช้ HORRAT เกณฑ์การยอมรับ HORRAT < 2 (AOAC, 2012)

$$\%RSD = (SD / \bar{x}) \times 100$$

$$HORRAT = \%RSD / \text{Predicted Horwitz RSD}$$

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

$$C = \text{Concentration ratio}$$

$$= \text{Concentration} / 100$$

## 3. การหา Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

3.1 ชั่ง sample blank 0.2XXX กรัม จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด ตามตามคู่มือวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี

3.2 บันทึกผลไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ คำนวณหาค่า LOD และ LOQ

เวลา 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

สถานที่ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.5

### ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การหาค่า Accuracy ของการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใน CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17%

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใน CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17% พบว่าค่า %Recovery ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด และเมื่อเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริงโดยใช้ t-test พบว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่แตกต่างกัน (ตาราง 1)

ตาราง 1 ค่า Accuracy ของการวิเคราะห์ CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17%

ค่าจริง (จากใบ Cer.)	ค่าที่วิเคราะห์ ได้	%Recovery	เกณฑ์การ ยอมรับ	t-test ที่ 95%	เกณฑ์การยอมรับ	ผลการประเมิน
1.17 %TN	1.1733	100.65	98 -102	1.75ยอมรับ	$t_{cal} \leq t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน
26.02 %TN	26.03	100.05	98 -102	0.15ยอมรับ	$t_{cal} \leq t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน
46.54 %TN	46.53	99.99	98 -102	0.16ยอมรับ	$t_{cal} \leq t_{cri}$ $t_{cri} = 2.26$	ผ่าน

## 2. การหาค่า Precision ของการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใน CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17%

การหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด ใน CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17% ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยทดสอบด้วยเครื่องมือเดียวกันและระยะเวลาใกล้เคียงกัน หาค่า Precision โดยใช้ Horwitz equation คำนวณแบบ Repeatability พบว่า ค่า HORRAT ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด แสดงว่า ค่า Precision ของการวิเคราะห์ CRM ที่วิเคราะห์ในเวลาใกล้เคียงกันมีความเที่ยงที่สามารถยอมรับได้ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ค่า Precision ของการวิเคราะห์ CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ 46.54%, 26.02% และ 1.17%

CRM	%RSD	%RSD expected	HORRAT	เกณฑ์การ ประเมิน	ผลการประเมิน
1.17 %TN	1.69	2.57	0.66	< 2	ยอมรับ
26.02 %TN	1.10	1.62	0.68	< 2	ยอมรับ
46.54 %TN	0.64	1.48	0.44	< 2	ยอมรับ

### 3. การหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quatitation (LOQ)

โดยวิเคราะห์ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

คำนวณหาค่า	$\bar{X}$	=	0.08
	SD	=	0.03
เพราะฉะนั้น	LOD	=	$\bar{X} + 3SD = 0.08 + 3(0.03) = 0.2 \%$
	LOQ	=	$\bar{X} + 10SD = 0.08 + 10(0.03) = 0.4 \%$

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย สวพ.5 พบว่า การวิเคราะห์หาความถูกต้อง (Accuracy), ความแม่นยำ (Precision) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection; LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ และสามารถรายงานผลได้ (Limit of Quatitation; LOQ ) โดยทำการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็น Certified Reference Material (CRM) และนำมาประเมินความถูกต้อง จาก 2 วิธี คือ หาค่า Recovery พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และหาค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริงของ CRM โดย T-test พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน ประเมินความแม่นยำโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio (HORRAT) ได้ ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOQ) เท่ากับ 0.2% และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.4 % ซึ่งค่าทั้งหมดนั้น ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานสากล

#### การนำไปใช้ประโยชน์

เพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.5

#### เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. **คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี**. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร, กรุงเทพฯ.
- AOAC. 2000. **Official Method of Analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup> Ed. AOAC International Inc., Gaithersberg, MD.
- AOAC. 2012. **Official Method of Analysis of AOAC International**. 19<sup>th</sup> Ed. AOAC International Inc., Gaithersberg, MD.
- ASTM. 2007. Standard Test Method for Total Nitrogen in Peat Material. D 2973-71. Pages 311-312 . In : **Annual Book of ASTM Standard 2007**. ASTM International, West Conshohoken, PA.

- EURACHEM Guide. 1998. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**. 1<sup>st</sup> edition, United Kingdom.
- NATA Technical Note 17. 1998. **Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods**, Australia.
- The National Institute of Agro-environmental Sciences. 1987. **Official Methods of Analysis of Fertilizers**. Foundation Norin Kosaikai, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken. 130 pp.