รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัยที่ 171 : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 : พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปุ๋ย

3. ชื่อการทดลองที่ 1.1.14 : ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี
Method Validation on Analysis of Total Nitrogen in Chemical Fertilizers

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสรัญญา ช่วงพิมพ์	สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8
ผู้ร่วมงาน : นางเยาวลักษณ์ แสงแก้ว	สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8
ว่าที่ร้อยตรีพิรุณ ติระพัฒน์	สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8
นายอนนท์ สุขสวัสดิ์	สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่น่าเชื่อถือ สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากลนั้น จำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย ได้ดัดแปลงวิธีการของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005) ทำการประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างรับรอง (Certified reference material, CRM) BCR 178 และ BCR 179 ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรองเท่ากับ 26.019 เปอร์เซ็น และ46.54 เปอร์เซ็น ตามลำดับ และวิเคราะห์ตัวอย่างรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank + CRM) ผลการวิเคราะห์ CRM และ Sample Blank + CRM 3 ระดับความเข้มข้น คือต่ำ (1.0002 เปอร์เซ็น) กลาง (26.019 เปอร์เซ็น) และสูง (46.54 เปอร์เซ็น) เพื่อประเมินค่าความถูกต้องจากค่า Recovery ใน CRM ได้เท่ากับ 99.98, 99.47 และ 99.91 เปอร์เซ็น ตามลำดับ ใน Sample Blank + CRM ได้เท่ากับ 99.98, 100.12 และ 100.13 เปอร์เซ็น ตามลำดับ ประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability Precision ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง โดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio ได้ค่า HORRAT ใน CRM เท่ากับ 0.38, 0.69 และ 0.86 ตามลำดับ ใน Sample Blank + CRM ได้เท่ากับ 0.38, 0.66 และ 0.72 ตามลำดับ ประเมินความเที่ยงแบบ Intermediate Precision ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง ใน CRM ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.24,

0.33 และ 0.09 ตามลำดับ ใน Sample Blank + CRM ได้เท่ากับ 0.25, 0.39 และ 0.16 ตามลำดับ หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.45 % และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.79% ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดนั้นผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์นี้เหมาะกับการใช้งานตามวัตถุประสงค์

Abstract

Development of method on analysis of total nitrogen in chemical fertilizers in order to achieve the result which is accurate, precise, reliable and referable to international standards, the analysis method validation is needed. The Fertilizers Analysis Laboratory, Office of Agricultural Research and Development Region 8 has modified method based on AOAC, 2005 to assess the accuracy, precision and limit of detection. The certified reference material (CRM) including BCR 178 and BCR 179 which contain 26.019 % and 46.54 % of total nitrogen and CRM with matrix sample (Sample blank + CRM) were analyzed. The characteristics of the method showed that the percentage of recovery of CRM at 3 levels of its concentration including low (1.0002 %N), moderate (26.019 %N) and high (46.54 %N) were 99.98, 99.47 and 99.91% respectively. Percentage of recovery of Sample blank + CRM at low, moderate and high concentration were 99.98, 100.12 and 100.13 % respectively. The repeatability precision at low, moderate and high level, which were evaluated by HORRAT values in CRM were 0.38, 0.69 and 0.86 respectively, while Sample blank + CRM were 0.38, 0.66 and 0.72 respectively. The Intermediate precision at low, moderate and high level, which were evaluated by HORRAT values in CRM were 0.24, 0.33 and 0.09 respectively, Sample blank + CRM were 0.25, 0.39 and 0.16 respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.45% and 0.79% 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 สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง

การเกษตร คือ คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (2551) ดังนั้นห้องปฏิบัติวิเคราะห์ปุ๋ยจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ปุ๋ย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้

การวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี เป็นหัวข้อในตรวจประเมินคุณภาพปุ๋ย ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ย โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้น ห้องปฏิบัติการได้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ AOAC (2005) ร่วมกับคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (2551) โดยตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ คือ ความถูกต้องของการวัด (Accuracy) ที่ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดระดับสูง กลาง และต่ำ และความเที่ยงของการวัด (Precision) ทั้งแบบ Repeatability precision และ Intermediate precision ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ) (ทิพวรรณ 2549) เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล และสามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวเพื่อขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการในโอกาสต่อไป

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 เครื่องย่อยไนโตรเจน Gerhardt รุ่น Kjeldatherm

7.1.1.4 เครื่องกลั่นไนโตรเจน Gerhardt รุ่น VAP20

7.1.1.5 ตู้อบลมร้อน Memmert รุ่น UM500

7.1.1.6 ตู้ดูดควัน Major รุ่น Super Flow Fume Cupboard

7.1.1.7 Burette Class A ขนาด 50 ml

7.1.1.8 Kjeldahl tube ขนาด 300 ml

7.1.1.9 Erlenmeyer Flask ขนาด 250 ml

7.1.1.10Volumetric flask ขนาด 5000 ml

7.1.1.11เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์

7.1.2 สารเคมีและวัสดุอ้างอิง

7.1.2.1ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM)

- Urea 46.54 ± 0.8% (CRM-BCR 179)
- Calcium ammonium nitrate 26.019 ± 0.54 %Nitrogen (CRM-BCR 178)
- Sodium Carbonate (Na_2CO_3) 99.970 ± 0.014 % (SRM 351a)

7.1.2.2 Boric acid (H_3BO_3), AR grade

7.1.2.3 Mixed catalyst (K_2SO_4 1.5 g + Se 7.5 mg)

7.1.2.4 Alcohol $\geq$ 90 % , AR grade

7.1.2.5 Hydrochloric acid (HCl) 1 N, AR grade

7.1.2.6 Methylene blue ($C_{16}H_{18}ClN_3S$), Indicator grade หรือ AR grade

7.1.2.7 Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$), Indicator grade หรือ AR grade

7.1.2.8 Sodium hydroxide (NaOH), Commercial grade หรือสูงกว่า

7.1.2.9 Salicylic acid [$(C_6H_4)(OH)\cdot COOH$], AR grade

7.1.2.10 Sulfuric acid >93 % (H_2SO_4), AR grade

7.1.2.11 Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3\cdot 5H_2O$), AR grade

7.1.2.12 Ammonium Sulfate [$(NH_4)_2SO_4$], AR grade

7.1.2.13 Sample Blank (ใช้ตัวอย่างปุ๋ย สูตร 0-0-50)

7.2 วิธีการ

7.2.1 วิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด

7.2.1.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่ผ่านบดบนกระดาษชั่งสารให้ได้น้ำหนักระหว่าง 0.2xxx – 10.xxxx g ใส่ Kjeldahl tube บันทึกน้ำหนักตัวอย่างปุ๋ย

7.2.1.2 เติมกรดย่อยตัวอย่าง 20 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ 1 คืน

7.2.1.3 เติม mixed catalyst 1 เม็ด

7.2.1.4 เติมสาร sodium thiosulphate 1 ช้อน (ประมาณ 2 g)

7.2.1.5 ย่อยตัวอย่างในเครื่องย่อยไนโตรเจน จนได้สารละลายใส ตั้งให้เย็น

7.2.1.6 นำ Kjeldahl tube ใส่เครื่องกลั่นไนโตรเจน

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

7.2.1.8 นำสารละลายที่ได้ไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 N จนถึงจุดยุติ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสารละลายสีชมพูม่วง บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.2 N

7.2.1.9 ทำ Reagent Blank โดยไม่ใส่ตัวอย่างปุ๋ย ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง

7.2.1.10 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 วิธีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

7.2.2.1 ศึกษาความถูกต้องของการวัด (Accuracy) ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่มีปริมาณไนโตรเจนระดับ ต่ำ กลาง และสูง โดยดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM) และตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank +CRM) เพื่อศึกษา Matrix effect ดังนี้

-ชั่ง CRM และ Sample blank + CRM ที่ปริมาณไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ พร้อมวิเคราะห์ Reagent Blank

- ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ 1.0002 % TN เตรียมจาก BCR 179
- ปริมาณไนโตรเจนระดับกลาง 26.019 % TN โดยใช้ BCR 178
- ปริมาณไนโตรเจนระดับสูง 46.50 %TN โดยใช้ BCR 179

- วิเคราะห์ตามข้อ 7.2.1.2-7.2.1.9

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

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ } (\bar{x})}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง}} \times 100$$

7.2.2.2 ศึกษาความเที่ยงของการวัด (Precision) ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ที่ปริมาณไนโตรเจนระดับ ต่ำ กลาง และสูง

- ชั่ง CRM และ Sample blank + CRM ที่ปริมาณไนโตรเจนต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ พร้อมวิเคราะห์ Reagent Blank ในวัน เวลาเดียวกัน เพื่อประเมินค่า Repeatability precision

-ชั่ง CRM และ Sample blank + CRM ที่ปริมาณไนโตรเจนต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ พร้อมวิเคราะห์ Reagent Blank ในวัน เวลาต่างกัน เพื่อประเมินค่า Intermediate precision

- ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ 1.0002 % TN เตรียมจาก BCR 179
- ปริมาณไนโตรเจนระดับกลาง 26.019 % TN โดยใช้ BCR 178
- ปริมาณไนโตรเจนระดับสูง 46.50 %TN โดยใช้ BCR 179

- วิเคราะห์ตามข้อ 7.2.1.2-7.2.1.9

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

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

ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ ($\bar{x}$)

Repeatability precision

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

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

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

- ชั่ง Sample Blank จำนวน 10 ซ้ำ ใส่ใน Kjeldahl tube
- วิเคราะห์ตามข้อ 7.2.1.2-7.2.1.9
- คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

LOD = 3SD

LOQ = 10SD

7.2.3 สรุป และรายงานผลการทดลอง

7.3. เวลาและสถานที่

7.3.1 ระยะเวลา

เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2556 - สิ้นสุด เดือนกันยายน 2557

7.3.2. สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยศึกษาคุณลักษณะต่างๆ คือ Accuracy, Precision, LOD และ LOQ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ซึ่งได้ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ AOAC (2005) ร่วมกับคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (2551) ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material : CRM) และตัวอย่างรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank +CRM) ได้ผลการทดลอง ดังนี้

8.1 ศึกษาความถูกต้องของการวัด (Accuracy) ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

8.1.1 วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดใน CRM BCR 178 และ BCR 179 ที่ 3 ระดับคือ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1.0002 %N) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (26.019 %N) และที่ความเข้มข้นระดับสูง (46.54 %N) ระดับละ 10 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 2 ประเมินค่าความถูกต้องโดยหาค่า Recovery ในระดับ ต่ำ กลาง และสูงใน CRM จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ } (\bar{x})}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง}} \times 100$$

พบว่า ได้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเฉลี่ย เท่ากับ 1.0, 25.88 และ 46.50 ตามลำดับ และเปอร์เซ็น Recovery ที่ได้เท่ากับ 99.98, 99.47 และ 99.91 เปอร์เซ็น ตามลำดับตารางที่ 1 ซึ่งค่าทั้งหมดผ่านเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, 2012 คือ ความเข้มข้นมากกว่า 10 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 98-102 % และความเข้มข้นมากกว่า 1 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 97-103 %

ตารางที่ 1 การหา Accuracy ของการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ CRM

ระดับ	CRM	ค่าที่วิเคราะห์ได้ ($\bar{x}$)	ค่าจริง (จากใบ cert./คำนวณ*)	% Recovery	เกณฑ์การยอมรับ
ต่ำ	1.0002 %N จาก CRM Urea	% N = 1.00	% N = 1.0002*	99.98	97-103%
กลาง	Calcium ammonium nitrate	% N = 25.88	% N = 26.019	99.47	98-102%
สูง	Urea	% N = 46.50	% N = 46.54	99.91	98-102%

8.1.2 วิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (Matrix effect) โดยการวิเคราะห์ Sample Blank + CRM BCR 178 และ BCR 179 ที่ 3 ระดับคือ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (1.0002 %N) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (26.019 %N) และที่ความเข้มข้นระดับสูง (46.54 %N) ระดับละ 10 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ตาม ตารางภาคผนวกที่ 3 ประเมินค่าความถูกต้องโดยหาค่า Recovery ในระดับ ต่ำ กลาง และสูงใน Sample Blank + CRM จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ } (\bar{x})}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง}} \times 100$$

พบว่า ได้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเฉลี่ย เท่ากับ 1.00, 26.05 และ 46.60 ตามลำดับ และเปอร์เซ็น Recovery ที่ได้เท่ากับ 99.98, 100.12 และ 100.13 เปอร์เซ็น ตามลำดับตารางที่ 2 ซึ่งค่าทั้งหมดผ่านเกณฑ์ยอมรับตาม AOAC, 2012 คือ ความเข้มข้นมากกว่า 10 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 98-102 % และความเข้มข้นมากกว่า 1 % เกณฑ์ยอมรับเท่ากับ 97-103 %

ตารางที่ 2 การหา Accuracy ของการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมีในสารตัวเติม โดยวิเคราะห์ Sample Blank + CRM

ระดับ	Sample Blank+ CRM	ค่าที่วิเคราะห์ได้ ($\bar{x}$)	ค่าจริง (จากใบ cert./คำนวณ*)	% Recovery	เกณฑ์การยอมรับ
ต่ำ	1.0002 %N จาก CRM Urea	% N = 1.00	% N = 1.0002*	99.98	97-103%
กลาง	Calcium ammonium nitrate	% N = 26.05	% N = 26.019	100.12	98-102%
สูง	Urea	% N = 46.60	% N = 46.54	100.13	98-102%

8.2 ศึกษาความเที่ยงของการวัด (Precision) ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

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

8.2.1 การประเมิน Repeatability precision โดยการวิเคราะห์ CRM และ Sample Blank +CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ ในวัน เวลาเดียวกัน ได้ผลการวิเคราะห์ตามตารางภาคผนวกที่ 4 คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz' Ratio จากสูตร

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

Repeatability precision

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

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

จากคำนวณค่า HORRAT แบบทวนซ้ำที่ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง ใน CRM ได้ค่าเท่ากับ 0.38, 0.69 และ 0.86 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ **HORRAT** ≤ 2 (ตติย, 2548) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การหา Precision แบบ Repeatability ของการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ CRM

ระดับ	CRM	RSD (%)	Predicted Horwitz RSD	HORRAT (เกณฑ์ยอมรับ < 2)
ต่ำ	1.0002 %N จาก CRM- Urea	1.00	2.64	0.38 , ยอมรับ
กลาง	Calcium ammonium nitrate	1.12	1.62	0.69 , ยอมรับ
สูง	Urea	1.27	1.48	0.86 , ยอมรับ

จากคำนวณค่า HORRAT แบบทวนซ้ำที่ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง ใน Sample Blank+ CRM ได้ค่าเท่ากับ 0.38, 0.66 และ 0.72 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT ≤ 2 (ตติย, 2548) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การหา Precision แบบ Repeatability ของการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ Sample Blank+CRM

ระดับ	**Sample blank + CRM**	**RSD (%)**	**Predicted Horwitz RSD**	**HORRAT (เกณฑ์ยอมรับ < 2)**
ต่ำ	1.0002 %N จาก CRM- Urea	1.00	2.64	0.38 , ยอมรับ
กลาง	Calcium ammonium nitrate	1.07	1.62	0.66 , ยอมรับ
สูง	Urea	1.06	1.48	0.72 , ยอมรับ

8.2.2 การประเมิน Intermediate precision โดยการวิเคราะห์ CRM และ Sample Blank +CRM ที่มีปริมาณไนโตรเจน ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ ในวัน และเวลาต่างกัน ได้ผลการวิเคราะห์ตามตารางภาคผนวกที่ 5 คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz' Ratio จากสูตร

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

Intermediate precision

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

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

จากคำนวณค่า HORRAT แบบทำซ้ำที่ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง ใน CRM ได้ค่าเท่ากับ 0.24, 0.33 และ 0.09 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT ≤ 2 (ตติย, 2548) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การหา Intermediate Precision ของการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ CRM

ระดับ	**CRM**	**RSD (%)**	**Predicted Horwitz RSD**	**HORRAT (เกณฑ์ยอมรับ < 2)**
ต่ำ	1.0002 %N จาก CRM- Urea	1.00	4.00	0.24 , ยอมรับ
กลาง	Calcium ammonium nitrate	0.81	2.45	0.33 , ยอมรับ
สูง	Urea	0.21	2.24	0.09 , ยอมรับ

จากคำนวณค่า HORRAT แบบทำซ้ำที่ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง ใน Sample Blank+ CRM ได้ค่าเท่ากับ 0.24, 0.39 และ 0.16 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT ≤ 2 (ตติย, 2548) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การหา Intermediate Precision ของการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยวิเคราะห์ Sample Blank +CRM

ระดับ	**Sample blank + CRM**	**RSD (%)**	**Predicted Horwitz RSD**	**HORRAT (เกณฑ์ยอมรับ < 2)**
ต่ำ	1.0002 %N จาก CRM- Urea	1.00	4.00	0.25 , ยอมรับ
กลาง	Calcium ammonium nitrate	0.96	2.45	0.39 , ยอมรับ
สูง	Urea	0.36	2.24	0.16 , ยอมรับ

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

จากการวิเคราะห์ sample blank พบว่า ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) เท่ากับ 0.3 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.05 (ตารางภาคผนวกที่ 1) และนำค่า SD คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ค่าดังนี้

LOD = $\bar{x}$ + 3 SD = 0.45 %TN

LOQ = $\bar{x}$ + 10SD = 0.79 %TN

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005) โดยวิเคราะห์ CRM และตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (Sample Blank +CRM) เพื่อศึกษา Matrix effect ที่มีปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ CRM คือ BCR 178 (Calcium ammonium nitrate) และ BCR 179 (Urea) มีไนโตรเจนทั้งหมดรับรองเท่ากับ 26.019% และ 46.54 % ตามลำดับ ได้ผลการตรวจสอบดังนี้

1) ประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ของการวัดจากค่า Recovery ที่ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง

ใน CRM ได้ค่า Recovery เท่ากับ 99.98, 99.47 และ 99.91 % ตามลำดับ

ใน Sample Blank + CRM ได้ค่า Recovery เท่ากับ 99.98, 100.12 และ 100.13 % ตามลำดับ

2) ความเที่ยงของการวัด (Precision) ที่ปริมาณไนโตรเจนระดับต่ำ กลาง และสูง

4.1) Repeatability precisionโดยใช้ Horwitz's equation

ใน CRM ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.38, 0.69 และ 0.86 % ตามลำดับ

ใน Sample Blank + CRM ได้ค่า Horrat เท่ากับ 0.38, 0.66 และ 0.72 % ตามลำดับ

4.2) Intermediate precision โดยใช้ Horwitz's equation

ใน CRM ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.24, 0.33 และ 0.09 % ตามลำดับ

ใน Sample Blank + CRM ได้ค่า Horrat เท่ากับ 0.25, 0.39 และ 0.16 % ตามลำดับ

3) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) คือ 0.45 % TN

4) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) คือ 0.79 % TN

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

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำวิธีที่ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด มาเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8

2. นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบมาใช้ประกอบในการยื่นขยายขอบข่ายการรับรอง ISO/IEC 17025 : 2005 ในขอบข่ายการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมีกับหน่วยรับรอง

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18thEd. Official Method 957.02, 958.01. AOAC International Gaithersburg, MD.

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

คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. 2551 กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 66 หน้า

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

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

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการวิเคราะห์ ไนโตรเจนทั้งหมด ของ Sample blank เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

ซ้ำที่	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาตร HCl (ml)	%TN
1	0.5009	0.80	0.23
2	0.5006	0.90	0.25
3	0.5012	1.30	0.37
4	0.5026	1.00	0.28
5	0.5007	0.90	0.25
6	0.5030	1.30	0.37
7	0.5000	1.10	0.31
8	0.5013	0.95	0.27
9	0.5012	1.20	0.34
10	0.5000	1.15	0.32
Average			**0.30**
SD			**0.05**

3SD	0.15
10SD	0.50
LOD=ค่าเฉลี่ย+3SD	0.45
LOD=ค่าเฉลี่ย+10SD	0.79

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ CRM- BCR 179 และ BCR 178 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง 1.0002, 26.019 และ 46.54 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความเที่ยงแบบ Repeatability precision

ซ้ำที่	ความเข้มข้นระดับต่ำ			ความเข้มข้นระดับกลาง			ความเข้มข้นระดับสูง		
	น้ำหนัก CRM (g)	ปริมาตร HCl (ml)	Total N (%)	น้ำหนัก CRM (g)	ปริมาตร HCl (ml)	Total N (%)	น้ำหนัก CRM (g)	ปริมาตร HCl (ml)	Total N (%)
1	9.9159	34.55	0.99	0.2031	0.80	25.92	0.2033	33.85	47.16
2	10.0232	35.60	1.01	0.2000	1.80	25.55	0.2027	33.20	46.39
3	10.0044	34.90	0.99	0.2020	2.80	26.20	0.2007	32.80	46.29
4	10.0067	34.70	0.98	0.2014	3.80	25.65	0.2022	32.65	45.73
5	9.9972	35.05	0.99	0.203	4. 0	25.77	0.2043	34.20	47.41
6	9.9897	35.75	1.01	0.2025	5.80	26.42	0.2026	33.15	46.34
7	9.9921	35.70	1.01	0.2037	6.80	26.05	0.2009	32.85	46.31
8	9.9913	35.10	0.99	0.2017	7.80	25.54	0.2019	32.55	45.66
9	9.9791	35.65	1.01	0.2027	8.80	25.97	0.2022	33.25	46.57
10	9.9971	35.15	1.00	0 2034	9.80	25.75	0.2037	33.90	47.13
ค่าเฉลี่ย			**1.00**			**25.88**			**46.50**
SD			**0.01**			**0.29**			**0.59**

% RSD	**1**	**1.12**	**1.27**

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างอ้างอิงรับรองในสารตัวเติม (matrix effect) ที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ Sample Blank+ CRM- BCR 179 และ BCR 178 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง 1.0002, 26.019 และ 46.54 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความเที่ยงแบบ Repeatability precision

ซ้ำที่	ความเข้มข้นระดับต่ำ				ความเข้มข้นระดับกลาง				ความเข้มข้นระดับสูง			
	น้ำหนัก CRM (g)	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาตร HCl (ml)	Total N (%)	น้ำหนัก CRM (g)	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาตร HCl (ml)	Total N (%)	น้ำหนัก CRM (g)	น้ำหนักตัวอย่าง (g)	ปริมาตร HCl (ml)	Total N (%)
1	9.8954	0.5035	35.35	9.8954	0.2019	0.5009	18.95	26.42	0.2035	0.5000	33.40	46.53
2	9.9932	0.5005	36.05	9.9932	0.2029	0.5019	18.85	26.15	0.2007	0.5028	32.55	45.97
3	9.9847	0.5041	36.20	9.9847	0.2013	0.5023	18.90	26.43	0.2014	0.5009	33.10	46.59
4	10.0047	0.5024	35.95	10.0047	0.2006	0.5024	18.55	26.03	0.2043	0.5017	33.05	45.86
5	9.9978	0.5065	35.60	9.9978	0.2018	0.5003	18.45	25.74	0.2012	0.5017	33.55	47.27
6	10.0113	0.5065	36.25	10.0113	0.2000	0.5003	18.65	26.25	0.2009	0.5025	33.20	46.85
7	9.9879	0.5028	36.00	9.9879	0.2007	0.5019	18.45	25.88	0.2045	0.5017	33.45	46.37
8	9.9514	0.5018	35.95	9.9514	0.2019	0.5033	18.35	25.58	0.2022	0.5013	33.80	47.39
9	10.0346	0.5010	36.75	10.0346	0.2064	0.5003	19.10	26.05	0.2036	0.5010	33.35	46.43

10	9.9716	0.5033	35.90	9.9716	0.2065	0.5009	19.05	25.97	0.2044	0.5012	33.70	46.74
ค่าเฉลี่ย				**1.00**				**26.05**				**46.60**
SD				**0.01**				**0.28**				**0.49**
% RSD				**1**				**1.07**				**1.06**

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ CRM- BCR 179 และ BCR 178 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง 1.0002, 26.019 และ 46.54 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาความความเที่ยงแบบ Intermediate precision

ครั้งที่	**ความเข้มข้นระดับต่ำ**			**ความเข้มข้นระดับกลาง**			**ความเข้มข้นระดับสูง**		
	น้ำหนัก CRM (g)	**ปริมาตร HCl (ml)**	**Total N (%)**	**น้ำหนัก CRM (g)**	**ปริมาตร HCl (ml)**	**Total N (%)**	**น้ำหนัก CRM (g)**	**ปริมาตร HCl (ml)**	**Total N (%)**
1	9.8520	34.40	1.00	0.2033	18.45	26.05	0.2043	33.10	46.41
2	9.8695	34.70	1.00	0.2032	18.60	26.07	0.2015	32.60	46.59
3	9.8615	34.60	1.00	0.2025	18.30	25.91	0.2001	32.20	46.48
4	9.8974	34.30	0.99	0.2066	18.45	25.66	0.2019	32.60	46.50
5	9.8897	34.50	1.00	0.2019	18.15	25.83	0.2006	32.30	46.44
6	9.9648	35.15	1.00	0.2021	18.35	25.84	0.2037	32.80	46.46
7	9.9137	34.75	0.99	0.2022	18.70	26.13	0.2018	32.60	46.57

8	9.9446	35.00	0.99	0.2027	18.60	25.77	0.2008	32.55	46.73
9	9.9583	35.90	1.01	0.2006	18.40	25.80	0.2008	32.50	46.43
10	10.0198	36.35	1.02	0.2025	18.95	26.37	0.2016	32.70	46.55
ค่าเฉลี่ย			**1.00**			**25.94**			**46.52**
SD			**0.01**			**0.21**			**0.10**
% RSD			**1**			**0.81**			**0.21**

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับระดับต่ำ กลาง และสูงโดยใช้ Sample Blank+ CRM- BCR 179 และ BCR 178 มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดรับรอง 1.0002, 26.019 และ 46.54 % ตามลำดับ เพื่อวิเคราะห์หาความเที่ยงแบบ Intermediate precision

ครั้งที่	**ความเข้มข้นระดับต่ำ**				**ความเข้มข้นระดับกลาง**				**ความเข้มข้นระดับสูง**			
	น้ำหนัก CRM (g)	**น้ำหนักตัวอย่าง (g)**	**ปริมาตร HCl (ml)**	**Total N (%)**	**น้ำหนัก CRM (g)**	**น้ำหนักตัวอย่าง (g)**	**ปริมาตร HCl (ml)**	**Total N (%)**	**น้ำหนัก CRM (g)**	**น้ำหนักตัวอย่าง (g)**	**ปริมาตร HCl (ml)**	**Total N (%)**
1	9.9950	0.5046	35.60	0.99	0.2037	0.5002	18.50	26.04	0.2051	0.5007	33.20	46.31
2	9.9715	0.5010	35.90	1.00	0.2037	0.5019	18.60	25.97	0.2010	0.5016	32.50	46.50
3	9.8960	0.5018	36.25	0.99	0.2009	0.5017	18.25	25.99	0.2009	0.5023	32.40	46.52
4	9.9634	0.5021	36.25	0.99	0.2042	0.5004	18.65	26.18	0.2004	0.5003	32.60	46.79

5	10.0161	0.5032	36.00	1.00	0.2016	0.5012	18.30	26.05	0.2030	0.5001	32.90	46.68
6	9.9924	0.5007	36.90	0.99	0.2015	0.5022	18.30	25.79	0.2025	0.5006	32.90	46.82
7	9.9654	0.5007	35.95	1.02	0.2019	0.5046	18.80	26.31	0.2002	0.5021	32.40	46.59
8	9.9978	0.5031	37.10	1.01	0.2017	0.5009	18.95	26.36	0.2030	0.5006	33.00	46.80
9	9.9434	0.5026	35.95	0.99	0.2018	0.5020	18.40	25.62	0.2014	0.5012	32.90	46.80
10	9.8954	0.5035	35.35	1.01	0.2018	0.5009	18.40	25.70	0.2027	0.5026	32.90	46.52
ค่าเฉลี่ย				**1.00**				**26.00**				**46.63**
SD				**0.01**				**0.25**				**0.17**
% RSD				**1**				**0.96**				**0.36**