เล่ม 2

ผลการปฏิบัติงาน
ประจำปีงบประมาณ 2556
สปผ.



สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ISBN : 978-974-436-857-7

เล่ม 2

ผลการปฏิบัติงาน
ประจำปีงบประมาณ 2556

สปผ.



สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการปฏิบัติงาน
ประจำปีงบประมาณ 2556

เล่ม 2

ISBN : 978-974-436-857-7

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

คณะผู้จัดทำ

- ที่ปรึกษา:

อัจฉรา	นันทกิจ	ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ปรีชา	ฉัตรสันติประภา	ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
อมรา	หาญจวณิช	ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี
ให้พร	กิตติกูล	หัวหน้ากลุ่มบริหารโครงการวิจัย

- รวบรวมข้อมูล:

ศิลดา	ประนาโส	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ณัฐธิดา	ทองนาค	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย

- จัดทำรูปเล่ม:

ปัญจพร	เลิศรัตน์	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
สุปรานี	มั่นหมาย	กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา
ผกาสินี	คล้ายมาลา	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
ศิลดา	ประนาโส	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ณัฐธิดา	ทองนาค	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
วรวุฒิ	อริยทรัพย์เจริญ	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย
ฤทัยรัตน์	น้อยจาด	กลุ่มบริหารโครงการวิจัย

- จำนวนพิมพ์: 250 เล่ม
- พิมพ์เมื่อ: ตุลาคม 2557
- สถานที่ติดต่อ: กลุ่มบริหารโครงการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
  กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
  โทรศัพท์ 0 2940 5754 ต่อ 2101-5
  โทรสาร 0 2579 1577
- พิมพ์ที่: โพสต์เทค กรุงเทพฯ (โทรศัพท์/โทรสาร 02 982 8035)

คำนำ

เอกสาร “ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2556 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร” ได้จัดทำขึ้นโดยกลุ่มบริหารโครงการวิจัยร่วมกับ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร และศูนย์วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรขอนแก่น วัตถุประสงค์ของการจัดทำเอกสารครั้งนี้เพื่อเผยแพร่ผลการปฏิบัติงานที่ได้ดำเนินการในรอบปีงบประมาณ 2556 ของสำนักฯ

เอกสารผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2556 ของสำนักฯ มีทั้งหมด 2 เล่ม โดยเอกสารเล่มนี้เป็นเอกสารเล่มที่ 2 เนื้อหาภายในเล่มเป็นการรายงานผลการปฏิบัติงานด้านวิจัยและพัฒนาของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร จำนวน 8 เรื่อง กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี จำนวน 6 เรื่อง และกลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา จำนวน 7 เรื่อง ตามลำดับ

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ขอขอบคุณกลุ่มบริหารโครงการวิจัยและนักวิชาการจากกลุ่มวิจัยและศูนย์ฯ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือด้านการประสานงาน รวบรวมและส่งข้อมูลผลการปฏิบัติงานให้กลุ่มบริหารโครงการวิจัยตลอดจนร่วมจัดทำรูปเล่มจนสำเร็จ ในการนี้สำนักฯ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารฉบับนี้จะเกิดประโยชน์แก่ผู้บริหาร นักวิชาการ อาจารย์ นักศึกษา และตลอดจนผู้ที่สนใจในการนำความรู้ไปปรับใช้และต่อยอดงานวิจัยในอนาคตหรือใช้ในธุรกิจและชีวิตส่วนตัวของท่านนอกจากนี้ยังส่งผลต่อประสิทธิภาพ ประสิทธิผล ของการใช้จ่ายงบประมาณแผ่นดินอันจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศชาติเป็นส่วนรวมด้วย

(นางอัจฉรา นันทกิจ)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
ตุลาคม 2557

สารบัญ

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

หน้า

1. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร chlorpyrifos+cypermethrin 1
   โดย : จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม และ สุกัญญา คำคง
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Captan 16
   โดย : จิราพรรณ ทองหยอด และ ฉลองรัตน์ หมื่นขวา
3. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง อีมาเม็กตินเบ็นโซเอทในมะพร้าว 31
   โดย : ชนิตา ทองแซม และ อนุชา ผลไสว
4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มสารกำจัดแมลง Clomazone 37
   โดย : ทัศนี จงกลาง และ พิเชษฐ์ ทองละเอียด
5. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Dinotefuran 51
   โดย : ฉลองรัตน์ หมื่นขวา และ พนิดา มงคลวุฒิกุล
6. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร สารกำจัดวัชพืช pretilachlor 66
   โดย : มนัสนันท์ อรชุน และคณะ
7. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม neonicotinoid ในผลไม้ 82
   โดย : วิทยา บัวศรี และคณะ
8. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชที่มีความเป็นกรดสูง 93
   โดย : ศศิมา มั่งนิมิตร์ และคณะ

สารบัญ

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

หน้า

9. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืช 99
โดย : นันทกานต์ ขุนโหร และคณะ

10. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ลิกนินในพืช 106
โดย : สุพิศสา ทองเขียว และคณะ

11. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช 113
โดย : สุภานันทน์ จันทร์ประอบ และคณะ

12. พัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างปุ๋ยเพื่อการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ 123
โดย : จริยา วงศ์ตรี และคณะ

13. พัฒนาเทคนิคและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี 136
โดย : สงกรานต์ มะลิสอน และคณะ

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

14. อิทธิพลของขนาดเม็ดปุ๋ยเคมีชนิดคลุกเคล้าที่มีต่อผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเคมี 148
โดย : จริยา วงศ์ตรี และคณะ

สารบัญ

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา หน้า

15. ผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตมันสำปะหลัง 163
โดย : ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง และคณะ

16. การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิต ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 178
โดย : กัลยกร โปร่งจันทึก และคณะ

17. การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิต ข้าวโพดฝักสด 185
โดย : กัลยกร โปร่งจันทึก และคณะ

18. การคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ 192
โดย : กัลยกร โปร่งจันทึก และคณะ

19. ศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นแบบเม็ดลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น 200
โดย : มณฑิกานธิ์ สงบจิต

20. การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดิน ในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ ของถั่วเหลืองฝักสด 208
โดย : ศิริลักษณ์ จิตรอักษร และ ศศิษา สังวิเศษ

21. การพัฒนาเทคนิคการจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม 230
โดย : ศิริลักษณ์ จิตรอักษร และ ศศิษา สังวิเศษ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร chlorpyrifos+cypermethrin

Method Validation of chlorpyrifos+cypermethrin in Pesticide Formulations

จิตตานันท์ สรวยเอี่ยม สุกัญญา คำคง

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ chlorpyrifos+cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สาร กำจัดแมลง สูตรผสม 50% + 5% W/V EC ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยมีตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) ด้วยแคพิลลารี่คอลัมน์ HP-5 (30 ม. x 0.25 มม. (id.) 0.25 µm film thickness) ใช้ He เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 มล./นาที อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 190 °C อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 °C/นาที จนถึง 220 °C นาน 2 นาที อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 20 °C/นาที จนถึง 260 °C นาน 8 นาที อุณหภูมิการฉีด 250 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270 °C โหมดการฉีด Split ratio 25 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µl วิธีทดสอบนี้ ให้ผลการทดสอบปริมาณสาร chlorpyrifos ที่มีช่วงการวัด ในช่วงความเข้มข้น 0.418 - 5.235 มก./มล. ให้ค่าช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.418 - 3.141 มก./มล. ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99996 ปริมาณสาร cypermethrin มีช่วงการวัด ในช่วงความเข้มข้น 0.054 - 2.170 มก./มล. ให้ค่าช่วงความเป็นเส้นตรง ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.054 - 0.542 มก./มล. ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$

การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของปริมาณสาร chlorpyrifos เมื่อพิจารณาจาก %Recovery เท่ากับ 98.8 99.8 และ 101.9 ตามลำดับ ปริมาณสาร cypermethrin ได้ %Recovery เท่ากับ 99.0 99.4 และ 101.4 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC : %Recovery เท่ากับ 98 - 102

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ประเมิน Repeatability และ Intra-laboratory reproducibility ของ chlorpyrifos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.697 0.560 0.628 และ 0.594 0.526 0.581 ตามลำดับ สำหรับ cypermethrin ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.347 0.449 0.207 และ 0.613 0.656 0.565 ตามลำดับ สำหรับค่าความแข็ง (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร chlorpyrifos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.744 0.396 และ 0.505 และ cypermethrin ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.386 0.188 และ 0.261 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ได้ที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

คำนำ

สารป้องกันและกำจัดแมลง chlorpyrifos เป็นสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตายมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โคลีนเอสเทอเรสแบบถาวร มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น O,O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate สำหรับ cypermethrin เป็นสารกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (pyrethriods) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตาย มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น Cyano (3-phenoxyphenyl) methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclo propanecarboxylate ; Cyano-3-phenoxybenzyl 2,2-dimethyl-3-(2,2-dichlorovinyl) cyclopropanecarboxylate (Anonymous, 1993) สารทั้งสองชนิดนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งทางด้านการเกษตร และสาธารณสุข

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos และ cypermethrin มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol.1C โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ระบบ Reverse phase สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ใช้ได้ทั้งเทคนิค GC และ HPLC ซึ่งเทคนิค GC ใช้คอลัมน์แก้วภายในบรรจุด้วย OV-101 เทคนิค HPLC ระบบ Normal phase (Henriet *et al*., 1985) ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง อีกทั้งวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร cypermethrin ด้วยเทคนิค GC ใช้คอลัมน์แก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ ทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารไม่ดีเท่าแคพิลลารี่คอลัมน์

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีความแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน เพื่อสามารถวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดได้ในสภาวะเดียวกัน เพื่อประหยัดสารเคมี ประหยัดเวลาของผลิตภัณฑ์ที่มีสูตรผสมแบบ mixture ในการขอขึ้นทะเบียนในประเทศไทยด้วยสูตรผสม chlorpyrifos + cypermethrin 50% + 5% W/V EC โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ที่สามารถให้ผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector (FID)

2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มม. และ 0.32 มม. ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

3. เครื่องชั่งละเอียด 4-5 ตำแหน่ง ที่ผ่านการสอบเทียบ

4. ขวดปริมาตร และปิเปต (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ

5. สารมาตรฐาน chlorpyrifos และ cypermethrin ความบริสุทธิ์ 98.5% และ 97.0% ตามลำดับ

6. สารเข้มข้น (Technical material หรือ TC) ของ chlorpyrifos 98% min.Tech. และ cypermethrin 92% min. Tech.

7. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5% W/V EC

8. Acetone AR grade

9. Ultrasonic bath

วิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง GC-FID

Capillary column : HP-5 (30 m x 0.25 mm (i.d.), 0.25 µm)

Oven temperature : 190 ºC,10 ºC/min- 220 ºC (2 min), 20 ºC/min- 260 ºC (8 min)

Injector temperature : 250 ºC

Detector temperature : 270 ºC

Split injection : Split ratio 25 : 1

Carrier gas : Helium 2.0 ml/min

Injection volume : 1 µl

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos และ cypermethrin โดยชั่งสารให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างละ 10 มก. ($\pm$ 2.0 มก.) จำนวนอย่างละ 2 ซ้ำ (C_A,C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin โดยชั่งสารเข้มข้น ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างละ 10 มก. ($\pm$2.0 มก.) จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ (TC_1-TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor เฉลี่ยไม่เกิน 1%

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos และ cypermethrin ในสูตรสารเข้มข้น

$$f = S \times P / H_S$$

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ (\% w/w)} = \frac{f_{avr.} \times H_W}{W}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน

W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น หน่วยเป็นมิลลิกรัม

$f_{avr.}$ = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้น

2. การตรวจสอบความใช้ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5%W/V EC

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ตรวจสอบค่า Range

2.1.1.1 ชั่งสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการวัด 6 ความเข้มข้น คือ 0.418 1.047 1.675 2.094 3.141 5.235 มก./มล. และ 0.054 0.217 0.542 1.085 1.736 และ 2.170 มก./มล. ละลายด้วย acetone

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ที่เตรียมสภาวะเครื่องตามข้อ 1 (1.1)

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย chlorpyrifos และ cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 3 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ chlorpyrifos ความเข้มข้น 0.418 – 3.141 มก./มล. และ cypermethrin ความเข้มข้น 0.054 – 0.542 มก./มล. ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetone ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย chlorpyrifos และ cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

2.2.1 การเตรียม Stock สารละลายของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 10.27 และ 1.071 มก./มล. โดยชั่งปริมาณ 5,229.5 และ 568.5 มก. ตามลำดับ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มล. ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 500 มล. กลั้วด้วย acetone หลายๆ ครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 2 5 และ 10 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ของ chlorpyrifos ความเข้มข้น 0.822 2.054 และ 4.108 มก./มล. สำหรับ cypermethrin ความเข้มข้น 0.086 0.214 และ 0.428 มก./มล. นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5 % W/V EC ปริมาณ 4,393.0 มก. ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มล. ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 5 มล. ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มล. นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า O

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample สำหรับ chlorpyrifos ที่ความเข้มข้น 1.232 2.054 และ 2.876 มก./มล. และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.128 0.214 และ 0.300 มก./มล. ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 5 มล. ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. จำนวน 30 ซ้ำ จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin จากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 3 5 และ 7 มล. ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า F

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก %Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{F - O \times 100}{C}$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร ในสารละลาย fortified sample (มก./25 มล.)

O คือ ปริมาณสาร ในสารละลาย original sample (มก./25 มล.)

C คือ ปริมาณ added sample (มก.)

ค่าความแม่น ต้องได้ %Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102 ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

ประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability (การทำซ้ำ) และ Intra-laboratory reproducibility (การทำซ้ำต่างวันเวลา) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 10.27 และ 1.071 มก./มล. โดยชั่งปริมาณ 5,229.5 และ 568.5 มก. ตามลำดับ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มล. ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 500 มล. กลั้วด้วย acetone หลายๆ ครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 2 5 และ 10 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันจะได้ standard calibration curve ของ chlorpyrifos ความเข้มข้น 0.822 2.054 และ 4.108 มก./มล. สำหรับ cypermethrin ความเข้มข้น 0.086 0.214 และ 0.428 มก./มล. นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5% W/V EC

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5% W/V EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50 100 และ 150 มก. (± 5.0 มก.) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มล. เขย่าและปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos และ cypermethrin เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

2.3.4 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความแข็ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือที่มีคอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มม. และสภาวะเงื่อนไขของการวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนอัตราการเพิ่มอุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นจาก 10 °C/นาที เป็น 20 °C/นาที

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น chlorpyrifos และ cypermethrin เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5 % W/V EC ดำเนินการตามข้อ 2.3.2

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ และการคำนวณค่า HORRAT ดำเนินการตามข้อ 2.3.3-2.3.4

ระยะเวลา : ตุลาคม - กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos และ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง chlorpyrifos 98% min. Tech. และ cypermethrin 92% min. Tech. เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 98.2 และ 94.2 ตามลำดับ

พิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos พบว่า มีช่วงของการวัดครอบคลุมความเข้มข้น 0.418 - 5.235 มก./มล. และ cypermethrin มีช่วงของการวัดครอบคลุมความเข้มข้น 0.054 - 2.170 มก./มล.

ตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งาน ความเข้มข้น 0.418 – 3.141 มก./มล. พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99996 และ cypermethrin ในช่วงความเข้มข้น 0.054 – 0.542 มก./มล. พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 ซึ่งค่าทั้งสองผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

การตรวจสอบค่าความแม่น (Accuracy) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับของ chlorpyrifos คือ 1.232 2.054 และ 2.876 มก./มล. จำนวน 30 ซ้ำ คำนวณค่า %Recovery เท่ากับ 98.8 99.8 และ 101.9 (ตารางที่ 1) และที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ของ cypermethrin คือ 0.128 0.214 และ 0.300 มก./มล. จำนวน 30 ซ้ำ คำนวณค่า %Recovery เท่ากับ 99.0 99.4 และ 101.4 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง %Recovery เท่ากับ 98 - 102 ค่าความแม่นทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถครอบคลุมช่วงที่ใช้งานการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ที่ความเข้มข้น 2 มก./มล. และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.2 มก./มล. นั่นหมายความว่าถ้าสารละลายที่เตรียมมีความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้งานจริง ก็ยังคงให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องเช่นกัน

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ประเมินแบบ Repeatability ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ของ chlorpyrifos คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มก./มล. จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.697 0.560 และ 0.628 (ตารางที่ 3) และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มก./มล. ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.347 0.449 และ 0.207 (ตารางที่ 4) ประเมินแบบ Intra-laboratory reproducibility ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ของ chlorpyrifos คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มก./มล. จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.594 0.526 และ 0.581 (ตารางที่ 5) และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มก./มล. ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.613 0.656 และ 0.565 (ตารางที่ 6) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

การตรวจสอบความแข็ง (Robustness/Ruggedness) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ของ chlorpyrifos คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มก./มล. จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.744 0.396 และ 0.505 (ตารางที่ 7) และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.1 0.2 และ 0.3 มก./มล. ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.386 0.188 และ 0.261 (ตารางที่ 8) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 1. การตรวจสอบ %Recovery ของปริมาณ chlorpyrifos ในผลิตภัณฑ์

Number	Active ingredient content (มก./25 มล.)								
	Concn.(1.232 มก./มล.)			Concn.(2.054 มก./มล.)			Concn.(2.876 มก./มล.)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.82	40.229	30.81	9.82	60.653	51.35	9.82	82.927	71.89
2	9.82	40.161	30.81	9.82	61.215	51.35	9.82	83.088	71.89
3	9.82	40.312	30.81	9.82	60.215	51.35	9.82	83.195	71.89
4	9.82	40.080	30.81	9.82	61.325	51.35	9.82	83.492	71.89
5	9.82	40.204	30.81	9.82	61.093	51.35	9.82	82.919	71.89
6	9.82	40.352	30.81	9.82	60.884	51.35	9.82	82.770	71.89
7	9.82	40.432	30.81	9.82	61.214	51.35	9.82	83.322	71.89
8	9.82	40.169	30.81	9.82	61.316	51.35	9.82	82.799	71.89
9	9.82	40.457	30.81	9.82	61.756	51.35	9.82	83.588	71.89
10	9.82	40.243	30.81	9.82	61.037	51.35	9.82	83.086	71.89
% Recovery		98.8			99.8			101.9	

ตารางที่ 2. การตรวจสอบ %Recovery ของปริมาณ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์

Number	Active ingredient content (มก./25 มล.)								
	Concn. (0.128 มก./มล.)			Concn. (0.214 มก./มล.)			Concn. (0.300 มก./มล.)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.962	4.153	3.21	0.962	6.282	5.36	0.962	8.578	7.50
2	0.962	4.129	3.21	0.962	6.230	5.36	0.962	8.538	7.50
3	0.962	4.104	3.21	0.962	6.231	5.36	0.962	8.517	7.50
4	0.962	4.113	3.21	0.962	6.285	5.36	0.962	8.562	7.50
5	0.962	4.235	3.21	0.962	6.305	5.36	0.962	8.572	7.50
6	0.962	4.108	3.21	0.962	6.294	5.36	0.962	8.646	7.50
7	0.962	4.116	3.21	0.962	6.300	5.36	0.962	8.613	7.50
8	0.962	4.145	3.21	0.962	6.310	5.36	0.962	8.541	7.50
9	0.962	4.122	3.21	0.962	6.324	5.36	0.962	8.639	7.50
10	0.962	4.136	3.21	0.962	6.362	5.36	0.962	8.500	7.50
% Recovery		99.0			99.4			101.4	

ตารางที่ 3. การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Repeatability ของปริมาณ chlorpyrifos ในผลิตภัณฑ์

Number	Concn.(1.0 มก./มล.)		Concn.(2.0 มก./มล.)		Concn.(3.0 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	55.8	44.86	105.0	44.92	155.3	45.42
2	59.3	44.18	110.8	44.73	158.6	45.73
3	47.4	44.36	101.3	44.98	144.1	45.61
4	54.4	44.80	98.1	44.91	159.7	45.60
5	47.4	44.57	105.6	44.62	158.2	45.70
6	54.8	45.12	94.6	45.83	158.4	45.35
7	54.8	45.21	99.4	45.23	170.6	45.58
8	46.3	45.01	108.9	45.13	158.6	45.93
9	46.3	43.74	98.1	45.55	155.3	45.50
10	45.2	44.60	120.0	44.88	158.4	44.39
Mean	-	44.6	-	45.1	-	45.5
SD		0.456		0.372		0.417
$\%RSD_{exp.}$		1.020		0.820		0.920
Horwitz		1.464		1.464		1.464
HORRAT		0.697		0.560		0.628

ตารางที่ 4. การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Repeatability ของปริมาณ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์

Number	Concn.(0.1 มก./มล.)		Concn.(0.2 มก./มล.)		Concn.(0.3 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	55.8	4.62	105.0	4.61	155.3	4.61
2	51.4	4.60	110.8	4.64	158.6	4.64
3	47.4	4.61	101.3	4.65	144.1	4.62
4	59.3	4.57	98.1	4.69	159.7	4.65
5	47.4	4.61	105.6	4.54	158.2	4.66
6	54.8	4.56	94.6	4.68	158.4	4.61
7	54.8	4.57	99.4	4.62	170.6	4.65
8	46.3	4.54	108.9	4.61	158.6	4.61
9	46.3	4.56	98.1	4.63	155.3	4.61
10	45.2	4.52	120.0	4.60	158.4	4.61
Mean	-	4.58	-	4.63	-	4.63
SD		0.033		0.043		0.020
$\%RSD_{exp.}$		0.720		0.930		0.430
Horwitz		2.072		2.072		2.072
HORRAT		0.347		0.449		0.207

ตารางที่ 5. การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Intra-laboratory Reproducibility ของปริมาณ chlorpyrifos

Number	Concn.(1.0 มก./มล.)		Concn.(2.0 มก./มล.)		Concn.(3.0 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	54.5	46.42	117.2	46.27	154.3	46.28
2	48.1	46.63	91.6	45.91	154.2	46.14
3	52.6	46.12	105.0	46.11	149.2	45.37
4	50.4	46.71	91.9	45.75	144.5	46.34
5	51.6	45.63	99.6	45.81	152.8	45.89
6	54.6	45.74	111.9	45.78	142.5	45.44
7	48.2	45.63	102.5	46.43	143.0	45.82
8	45.7	46.06	117.3	46.11	151.2	46.64
9	45.7	45.96	91.8	45.82	142.5	45.93
10	54.5	46.42	91.9	46.86	143.0	46.10
Mean	-	46.1	-	46.1	-	46.0
SD		0.400		0.355		0.393
$\%RSD_{exp.}$		0.870		0.770		0.850
Horwitz		1.464		1.464		1.464
HORRAT		0.594		0.526		0.581

ตารางที่ 6. การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Intra-laboratory Reproducibility ของปริมาณ Cypermethrin

Number	Concn.(0.1 มก./มล.)		Concn.(0.2 มก./มล.)		Concn.(0.3 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	54.5	4.59	105.2	4.68	152.7	4.68
2	48.1	4.53	91.6	4.67	144.5	4.60
3	52.6	4.59	105.0	4.72	149.2	4.63
4	50.4	4.55	91.9	4.63	142.9	4.59
5	51.7	4.61	99.6	4.58	151.2	4.53
6	54.6	4.60	111.9	4.58	142.5	4.62
7	48.2	4.48	102.5	4.63	143.0	4.54
8	45.7	4.49	99.7	4.54	151.2	4.67
9	50.5	4.54	91.8	4.54	142.5	4.54
10	51.7	4.67	91.9	4.68	152.8	4.64
Mean	-	4.56	-	4.62	-	4.60
SD		0.058		0.063		0.054
$\%RSD_{exp.}$		1.270		1.360		1.170
Horwitz		2.072		2.072		2.072
HORRAT		0.613		0.656		0.565

ตารางที่ 7. การตรวจสอบ Robustness/ Ruggedness ของปริมาณ chlorpyrifos ในผลิตภัณฑ์

Number	Concn.(1.0 มก./มล.)		Concn.(2.0 มก./มล.)		Concn.(3.0 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	60.1	44.27	105.0	45.80	144.1	46.81
2	46.3	45.81	110.8	46.43	159.7	46.80
3	58.4	44.80	101.3	46.57	158.4	46.51
4	54.8	45.40	119.8	46.71	170.6	46.30
5	46.3	44.77	105.6	46.41	175.4	46.79
6	46.3	45.15	120.0	46.79	158.6	46.31
7	45.2	45.36	99.4	46.48	159.7	47.20
8	51.4	45.53	108.9	46.66	158.2	47.13
9	47.4	45.74	105.0	46.39	180.6	47.04
10	46.3	45.61	101.3	46.48	158.6	47.21
Mean	-	45.2	-	46.5	-	46.8
SD		0.494		0.272		0.344
%RSDexp.		1.090		0.580		0.740
Horwitz		1.464		1.464		1.464
HORRAT		0.744		0.396		0.505

ตารางที่ 8. การตรวจสอบ Robustness/ Ruggedness ของปริมาณ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์

Number	Concn.(0.1 มก./มล.)		Concn.(0.2 มก./มล.)		Concn.(0.3 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	60.1	4.69	105.0	4.64	144.1	4.67
2	46.3	4.64	110.8	4.65	159.7	4.67
3	58.4	4.62	101.3	4.64	158.4	4.64
4	54.8	4.67	119.8	4.65	170.6	4.62
5	46.3	4.63	105.6	4.67	175.4	4.68
6	46.3	4.62	120.0	4.62	158.6	4.61
7	45.2	4.65	99.4	4.62	159.7	4.62
8	51.4	4.67	108.9	4.67	158.2	4.65
9	47.4	4.56	105.0	4.63	180.6	4.63
10	46.3	4.67	101.3	4.65	158.6	4.62
Mean	-	4.64	-	4.64	-	4.64
SD		0.037		0.018		0.025
$\%RSD_{exp.}$		0.800		0.390		0.540
Horwitz		2.072		2.072		2.072
HORRAT		0.386		0.188		0.261

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos และ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดแมลง โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) มีตัวตรวจจับ (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย Capillary column ชนิด HP-5 (30 m × 0.25 mm (i.d.), 0.25 µm) มีสภาวะเครื่องการใช้งานที่ Oven 190 °C, 10 °C/min- 220 °C (2 min), 20 °C/min- 260 °C (8 min), Injector 250 °C, Detector 270 °C, Split ratio 25 : 1, Helium 2.0 ml/min, Injection volume 1 µl, Run time 15 min

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ของการวิเคราะห์ปริมาณ chlorpyrifos และ cypermethrin ในช่วงความเข้มข้น 0.418 - 5.235 มก./มล. และ cypermethrin ความเข้มข้น 0.054 - 2.170 มก./มล. สำหรับค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.418 – 3.141 มก./มล. ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่ามีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99996 และ cypermethrin ในช่วงความเข้มข้น 0.054 – 0.542 มก./มล. พบว่ามีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 ซึ่งค่าทั้งสองผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

3. การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos + cypermethrin 50% + 5% W/V EC พบว่า chlorpyrifos ได้ค่า %recovery เท่ากับ 98.8 99.8 และ 101.9 และ cypermethrin ได้ค่า %recovery เท่ากับ 99.0 99.4 101.4 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98–102% สำหรับปริมาณสารในตัวอย่าง 1-100%

4. การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos+cypermethrin 50% + 5% w/v EC ประเมินแบบ Repeatability ซึ่ง chlorpyrifos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.697 0.560 และ 0.628 และ cypermethrin ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.347 0.449 และ 0.207 ประเมินแบบ Intra-laboratory reproducibility ซึ่ง chlorpyrifos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.594 0.526 0.581 และ cypermethrin ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.613 0.656 และ 0.565 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT $\leq$ 2

5. การตรวจสอบความแข็ง (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos + cypermethrin 50% + 5% w/v EC ซึ่ง chlorpyrifos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.744 0.396 0.505 และ cypermethrin ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.386 0.188 0.261 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT $\leq$ 2

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐาน ในห้องปฏิบัติการตามการขอรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2005

2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธีตามมาตรฐาน

3. สามารถใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสูตรผสม chlorpyrifos + cypermethrin 50% + 5% W/V EC เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ที่มีจำหน่ายในร้านค้าจำหน่ายทั่วประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. **แนวทางการปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์**. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

Anonymous. 1993. **The Agrochemicals Handbook 3rd. ed.** The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.

Ellison S.L.R. and A Williams. 2012. **Eurachem/Citac Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement.** 3 rd ed. BAM, Germany.

Henriet J., A Martijn and H Povlsen. 1985. **CIPAC Handbook Vol. 1C : Analysis of Technical and Formulated Pesticides.** Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Heffers Printers Ltd, Cambride, England.

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Captan

Method Validation of Captan in Pesticide Formulations

จิราพรรณ ทองหยอด ฉลองรัตน์ หมื่นขวา

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

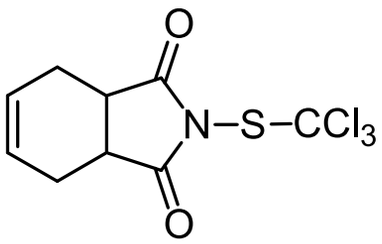
บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์แคปแทน (Captan) ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) ใช้ตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) คอลัมน์ Capillary ชนิด HP-5 (30 m x 0.32 mm (id.) 0.25 µm film thickness) ใช้แก๊สฮีเลียม (He) เป็นแก๊สตัวพา ได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ดังนี้ อัตราการไหล 2 มล./นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C เวลา 3.5 นาที อุณหภูมิการฉีด 270 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 ไมโครลิตร ผลการทดลอง ได้ค่า Rang ได้ช่วงความเข้มข้น 0.50 – 2.50 มก./มล. ค่า Linearity ได้ช่วงความเข้มข้น 0.50 – 1.50 มก./มล. มีค่า Correlation coefficient r เท่ากับ 0.99994 โดยเกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ ค่า Accuracy หาได้จาก %Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. มีค่าเท่ากับ 99.5 เกณฑ์ยอมรับ AOAC %Recovery เท่ากับ 98 – 102 การวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) โดยใช้ Repeatability/ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.55 และ 0.81 ตามลำดับ และตรวจสอบความแข็งของวิธี โดยใช้ Robustness/Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.55 และ 0.62 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 จากผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ดังนั้น จึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์แคปแทนในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาค

คำนำ

แคปแทน เป็นสารกำจัดเชื้อราจัดอยู่ในกลุ่ม dicarboximide ที่ให้ผลในทางป้องกัน รักษาและกำจัดโรคพืช จัดได้ว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อย มีพิษเฉียบพลันทางปาก (หนู) 9,000 มก./กก. ทางผิวหนัง มากกว่า 4,500 มก./กก. สามารถใช้กำจัดโรคพืชได้หลายชนิด เช่น โรคสเคป โรคเน่าดำ โรคเน่าสีน้ำตาล โรคใบจุด โรค leaf spot, dead arm โรคราน้ำค้าง โรคใบไหม้ โรคแอนแทรคโนส โรคเน่าคอดินและโรคอื่นๆ นำมาใช้กับพืชได้หลายประเภท เช่น องุ่น หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา คะน้า บร็อคโคลี กะหล่ำปลี ส้ม มะม่วง พริกไทย ข้าว ปอ ฝ้าย แตงโม ไม้ดอกและไม้ประดับทั่วไป (ปรีชา, 2537) แคปแทน มีชื่อทางเคมี คือ N-(trichloromethylthio) cyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide (ตามระบบ IUPAC) มีสูตรทางเคมี คือ $C_9H_8Cl_3NO_2S$ มีสูตรโครงสร้างตามภาพที่ 1 สารบริสุทธิ์มีลักษณะผลึกสี

มีกลิ่นฉุน มีจุดหลอมเหลว 178 °C คงสภาพได้ดีในสภาวะที่ pH เป็นกลาง สลายตัวได้เร็วในสภาวะที่เป็นด่างสูงๆ (Anonymous, 1993)



ภาพที่ 1. สูตรโครงสร้างของแคปแทน (Anonymous, 1993)

การตรวจสอบคุณภาพปริมาณแคปแทน มีวิธีวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน CIPAC Handbook Vol.1C สภาวะของเครื่องตามวิธีมาตรฐาน คือ อุณหภูมิคอลัมน์ 220 °C อุณหภูมิการฉีดสาร สูงกว่าอุณหภูมิคอลัมน์ 10 – 30 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับสูงกว่าอุณหภูมิคอลัมน์ 20 °C ใช้แก๊สตัวพาเป็นฮีเลียมหรือไนโตรเจนอัตราการไหล 30-40 มล./นาที เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที ใช้ Dieldrin เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) และใช้ 1,4-Dioxane เป็นตัวทำละลาย (Dobrat and A Martijn, 1988) จะพบว่าวิธีการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานใช้มาเป็นระยะเวลานานตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1990 สารละลายและอุปกรณ์บางอย่าง หาได้อยากในปัจจุบัน โดยเฉพาะ column ใช้ Glass column 1.5 m X 6 mm (o.d) packed (3% XE-60 silicone nitrile) ซึ่งในปัจจุบัน column ชนิดนี้บริษัทผู้ผลิตเลิกผลิตแล้ว และสารละลาย 1,4-Dioxane เป็นสารก่อมะเร็ง (Anonymous,1993) มีความเป็นพิษสูงเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ขั้นตอนวิธีการมีความยุ่งยาก ดังนั้นการปรับปรุงพัฒนาวิธีวิเคราะห์จึงมีความสำคัญ และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพอย่างหนึ่งของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบที่ประเมินคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับทั้งระหว่างห้องปฏิบัติการและผู้รับบริการ

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สูตร WP โดยเทคนิค Gas liquid chromatography ใช้ตัวตรวจจับ flame ionization (GC-FID) ใช้ Capillary column แทน column packing ปรับเปลี่ยนสภาวะของเครื่อง โดยเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามข้อกำหนดต่างๆ ของ Method Validation ทำการทดสอบในหัวข้อต่างๆ ดังนี้ ช่วงของการวัด (Range) ช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) และการตรวจความเที่ยง (Precision) และความแข็งของวิธี (Robustness/Ruggedness) (Huber, 1998) นอกจากนี้การทดสอบยังเป็นไปตามข้อกำหนดตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC:17025 ข้อที่ 5.4.2 และ 5.4.2 (นิรนาม, 2554)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph มีตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector

2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มม. ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มก.) ที่ผ่านการสอบเทียบ

4. Ultrasonic bath

5. ขวดปริมาตร ขนาด 25 50 500 และ 1,000 มล. (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ

6. ปิเปตชนิด ขนาด 2 3 4 5 และ 10 มล. (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ

7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มล.

8. Vial ขนาด 2 มล.

9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Captan ความบริสุทธิ์ 99.5%

2. สารเข้มข้นสูง (Technical material) ของ Captan สูตร 98.5% min. Tech.

3. สารละลาย Acetone AR grade

วิธีการ

1. **การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์** Technical grade Captan

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง GC-FID

Capillary column	: HP-5 (30 m x 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm)
Oven temperature	: 250 °C
Injector temperature	: 270 °C
Detector temperature	: 270 °C
Split injection	: Split ratio 50 : 1
Carrier gas	: Helium 2.0 ml/min
Injection volume	: 1 µl
Run time	: 3.5 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Captan

ชั่งสารมาตรฐาน Captan ปริมาณสารออกฤทธิ์ 25 มก. จำนวน 2 ซ้ำ (C_A,C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายสาร Captan

1.3.1 ชั่งสารเข้มข้น Captan คลุกสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 25 มก. จำนวน 10 ซ้ำ (TC_1-TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3.2 ชั่งสารผลิตภัณฑ์ Captan คลุกสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 100 มก. จำนวน 10 ซ้ำ (tC_1-tC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID

เมื่อปรับตั้งสภาวะของเครื่อง GC-FID เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1% จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น Captan ตามลำดับ ดังนี้

สารเข้มข้นสูง $C_A C_A$, TC_1TC_1, T_2C_2, TC_3TC_3, C_BC_B ,……..

สารผลิตภัณฑ์ $C_A C_A$, tC_1tC_1 ,$t_2 C_2$, tC_3tC_3, C_BC_B ,……

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

$$f = \frac{S \times P}{H_S}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็น มก.

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Captan หน่วยเป็น กรัม/กก.

H_S = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน Captan

จากนั้นคำนวณค่า %RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า %RPD แตกต่างกันไม่เกิน 3% จากสูตร

$$\%RPD = \frac{(\text{f of maximum - f of minimum}) \times 100}{\text{f of average}}$$

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan (\% w/w)} = \frac{f_{avr.} \times H_W}{W}$$

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น Captan หน่วยเป็น มก.

$f_{avr.}$ = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายของสารเข้มข้น Captan

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan สูตร WP

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 เตรียมสารเข้มข้น Captan ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และคลุกให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วชั่งสารให้มีสารออกฤทธิ์ Captan ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 5 ความเข้มข้น นั่นคือ 0.50 - 2.50 มก./มล. ละลายด้วย acetone

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ที่เตรียมสภาวะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Captan (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 5 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ ความเข้มข้น 0.5 - 1.5 มก./มล. ละลายด้วย acetone โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Captan (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r) ≥0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง Captan ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve โดยเตรียมสารเข้มข้น Captan ที่ความเข้มข้น 5.00 มก./มล. ละลายด้วย acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID จะได้ calibration curve ของ standards

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มก./มล. ชั่งผลิตภัณฑ์ Captan สูตร WP ปริมาณ 2,016.4 มก. ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มล. ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มล. ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันและแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มล. นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID (ได้ค่า O)

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มล. ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น Captan จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 5 15 และ 25 มล. ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID (ได้ค่า F)

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก %Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\%F - O \times 100}{C}$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร Captan ในสารละลาย fortified sample, มก./50มล.

O คือ ปริมาณสาร Captan ในสารละลาย original sample, มก./50มล.

C คือ ปริมาณ added sample, มก.

ค่าความแม่น ต้องได้ %Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision and Reproducibility)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น Captan ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve โดยเตรียมสารเข้มข้น Captan ที่ความเข้มข้น 0.50 1.00 และ 1.50 มก./มล. ละลายด้วย acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID จะได้ calibration curve ของ standards

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ Captan สูตร WP เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. โดยชั่งผลิตภัณฑ์ Captan WP ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50 100 และ 150 มก. จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 2 ชุด (Repeatability) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone และฉีดเข้าเครื่อง GC และเตรียบอีกชุดหนึ่ง โดยเปลี่ยนเครื่องมือและผู้วิเคราะห์ (Reproducibility)

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1

2.3.4 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่งโดย ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน ภายใต้สภาวะเงื่อนไขอย่างเดียวกัน (Robustness) และทำการปรับเปลี่ยนสภาวะของเครื่องเล็กน้อย (Ruggedess) คือเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์ จาก 250 °C เป็น 240 °C

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น Captan ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ Captan สูตร WP เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. โดยชั่งผลิตภัณฑ์ Captan สูตร WP ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50 100 และ 150 มก. จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มล. ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC-FID เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 - กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ Technical grade Captan

เนื่องจากสารมาตรฐานที่มีราคาแพง มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี จึงนำสารความเข้มข้นสูง (Technical material) มาใช้แทน ซึ่งกระบวนการตรวจสอบต้องวิเคราะห์หาปริมาณสาร Captan เพื่อทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Captan ความบริสุทธิ์ 98.5% W/W มาเป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade ซึ่งตามฉลากระบุเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 98.0% W/W จากการทดลองได้ผลดังตารางที่ 1 และมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ 98.65%

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์ของสาร Technical grade Captan

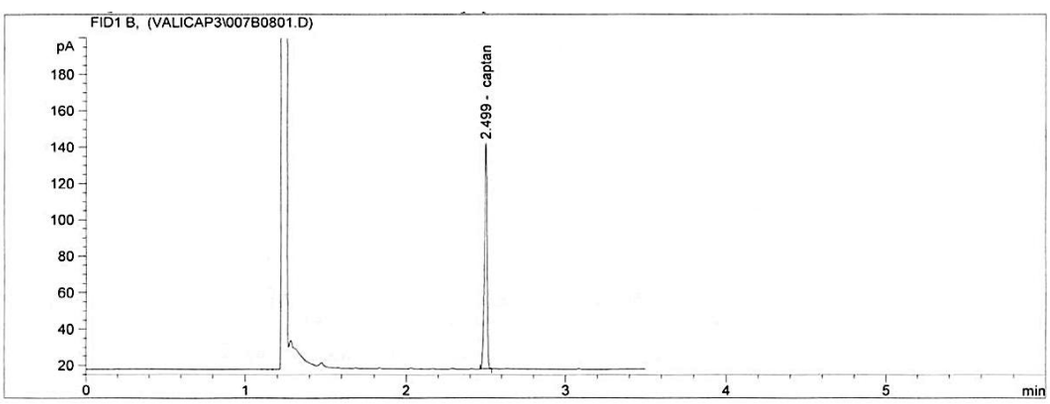
สารละลาย Technical grade Captan	**เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์**
TC1	98.62
TC2	99.08
TC3	98.46
TC4	99.42
TC5	99.18
TC6	98.26
TC7	98.07
TC8	99.04
TC9	98.16
TC10	98.21
เฉลี่ย	**98.65**
SD	0.49

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan **สูตร** WP

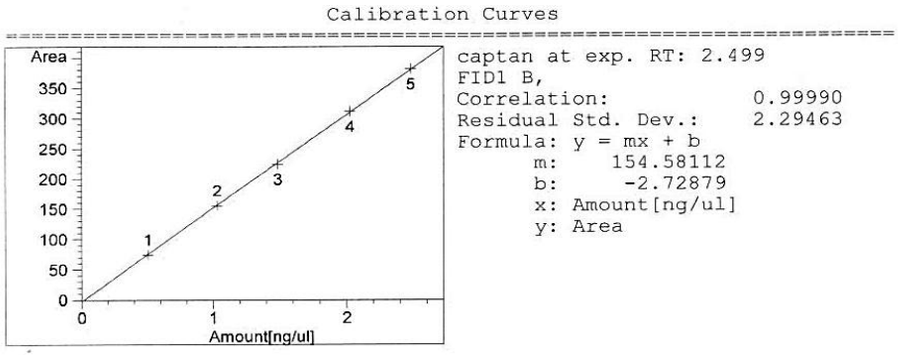
2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 การตรวจสอบ Range

การตรวจสอบ Range เป็นการหาช่วงความเข้มข้น หรือปริมาณสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (จิราพรรณ และกัญจนา, 2549) การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ โดยการชั่งสารให้มีเนื้อสาร 0.50 1.00 1.50 2.00 และ 2.50 พบว่า ได้โครมาโทแกรม ดังภาพที่ 2 และเมื่อพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง จากการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน X) กับ response (แกน Y) (ภาพที่ 3) ได้ช่วงที่เป็นเส้นตรง จะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.50 - 1.50 มก./มล. จะมีความเป็นเส้นตรงมากสุด จะพบว่าจากการทำ range ในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 2.50 มก./มล. มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99990



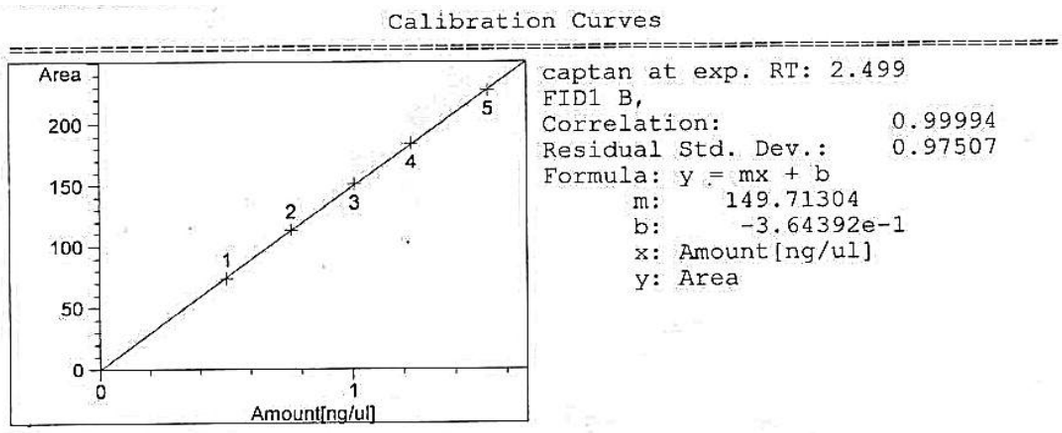
ภาพที่ 2. โครมาโทแกรมของ แคปแทน



ภาพที่ 3. กราฟมาตรฐานค่า Range ของแคปแทน

2.1.2 การตรวจสอบ Linearity

Linearity คือ การหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น หรือปริมาณสารที่ทดสอบกับสัญญานที่ตรวจวัดได้ที่มีความเป็นเส้นตรง โดยเลือกมาจากความเข้มข้นที่ได้จาก Range ซึ่งจะอยู่ในช่วง 0.50 -1.50 มก./มล. นำมาขยาย เป็น 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.50 0.75 1.00 1.25 และ 1.50 มก./มล. แล้วนำมาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน X) กับ response (แกน Y) (ภาพที่ 4) จะพบว่าจากการทำ Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 1.50 มก./มล. มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$



ภาพที่ 4. กราฟมาตรฐานค่า linearity ของแคปแทน

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

การหาความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ จะสามารถหาได้จากการทำ Accuracy โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้กับวัสดุอ้างอิง จากตัวอย่างเดียวกัน โดยคำนวณ % Recovery ตามสูตรในข้อ 2.2.5

โดยใช้สารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Captan 50% W/W ชั่งสาร Captan สูตร WP ให้มีที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง GC ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Captan

ลำดับ	Active ingredient content (มก./50 มล.)								
	Concn.(0.5 มก./มล.)			Concn.(1.0 มก./มล.)			Concn.(1.5 มก./มล.)		
	Origin	Spilke	%Recovery	Origin	Spilke	%Recovery	Origin	Spilke	%Recovery
1	44.27	35.11	99.39	44.27	55.03	99.44	44.27	101.12	99.57
2	44.27	35.11	99.21	44.27	55.03	99.82	44.27	101.12	101.21
3	44.27	35.11	99.68	44.27	55.03	100.42	44.27	101.12	101.53
4	44.27	35.11	101.31	44.27	55.03	99.93	44.27	101.12	101.91
5	44.27	35.11	99.76	44.27	55.03	99.97	44.27	101.12	99.30
6	44.27	35.11	98.76	44.27	55.03	99.14	44.27	101.12	100.81
7	44.27	35.11	100.42	44.27	55.03	99.53	44.27	101.12	101.03
8	44.27	35.11	100.29	44.27	55.03	98.50	44.27	101.12	100.89
9	44.27	35.11	100.93	44.27	55.03	99.38	44.27	101.12	100.811
10	44.27	35.11	100.28	44.27	55.03	101.18	44.27	101.12	100.63
% Recovery	100.00			99.53			100.77		
SD	0.79			0.91			0.802		
%Recovery เฉลี่ย	100.1								

จากการทดลองใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. ได้ค่า % Recovery เท่ากับ 100.00 99.53 และ 100.77 ตามลำดับ และได้ค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 101.2 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง %Recovery เท่ากับ 98-102 จากการทดลองสารละลายอัตราส่วนของแคปแทนผ่านเกณฑ์ทั้ง 3 ความเข้มข้น ดังนั้นสภาวะการทดลองนี้สามารถใช้ได้และมีค่าความความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision/Repeatability and Reproducibility)

เป็นการตรวจสอบค่าความใกล้เคียงกันระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูลซ้ำ โดย Precision/ Repeatability และ Reproducibility โดยที่ Reproducibility ใช้ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน และทำการทดสอบในวันเดียวกันหรือเป็นการทดลองซ้ำในช่วงเวลาสั้นๆ และการทดสอบ Reproducibility ทำการทดสอบเปรียบเทียบโดยเปลี่ยนผู้ทดสอบเปลี่ยนเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (นิรนาม, 2554) ซึ่งจะแสดงออในรูป %RSD ของการทดลอง ประเมินโดยใช้ HORRAT equation สามารถคำนวณได้จาก ข้อ 2.3.5 จากการทดลอง ได้ค่า Precision และ Reproducibility ดังตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3. การตรวจสอบ Precision ในผลิตภัณฑ์สูตร WP

Number	Concn. (0.5 มก./มล.)		Concn. (1.0 มก./มล.)		Concn. (1.5 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (มก.)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (มก.)	AI.Content % (w/w)
1	25.5	51.82	50.4	52.06	75.9	51.32
2	25.4	51.75	50.6	51.55	74.0	50.92
3	24.6	51.42	48.5	51.88	76.4	51.00
4	24.7	51.87	50.6	51.89	75.8	50.93
5	26.3	51.82	50.6	51.42	74.3	51.30
6	26.1	51.96	49.0	51.28	75.5	50.90
7	25.4	51.22	49.4	51.56	75.3	51.61
8	25.1	50.88	51.9	51.34	74.6	51.72
9	24.2	51.42	50.6	51.68	78.1	51.27
10	26.1	50.13	53.0	51.09	76.2	51.78
Mean	-	51.40	-	51.63	-	51.27
SD		0.55		0.27		0.34
$\%RSD_{exp.}$		1.07		0.52		0.66
Horwitz		1.47		1.32		1.24
HORRAT		0.73		0.40		0.53
HORRAT เฉลี่ย			0.55			

จากการวิเคราะห์ค่า Repeatability ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 51.40 51.63 และ 51.27 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% $RSD_{exp.}$) เท่ากับ 1.07 0.52 และ 0.66 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จากทฤษฎี (% $RSD_{Horwitz.}$) เท่ากับ 1.47 1.32 และ 1.24 ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.73 0.40 และ 0.53 และค่า HORRAT เฉลี่ย 0.55 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ

ตารางที่ 4. การตรวจสอบ Reproducibility ในผลิตภัณฑ์สูตร WP

Number	Concn. (0.5 มก./มล.)		Concn. (1.0 มก./มล.)		Concn. (1.5 มก./มล.)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	25.5	52.3	50.3	51.23	76.0	52.92
2	25.3	52.45	50.8	51.19	73.8	52.73
3	24.3	53.15	48.9	52.75	76.4	52.82
4	24.7	52.39	50.6	52.69	75.9	52.53
5	26.2	53.10	50.3	52.30	74.3	53.26
6	26.0	52.16	49.1	52.11	75.6	53.04
7	25.0	52.32	49.3	52.21	75.3	53.31
8	25.5	55.31	52.0	52.91	74.4	53.40
9	24.2	52.59	50.7	52.48	78.3	53.06
10	26.0	52.59	51.8	52.34	77.0	53.50
Mean	-	52.83	-	52.29	-	53.06
SD		0.93		0.51		0.31
$\%RSD_{exp.}$		1.76		0.98		0.59
Horwitz		1.47		1.32		1.24
HORRAT		1.20		0.74		0.48
HORRAT เฉลี่ย				0.81		

จากการวิเคราะห์ค่า Repeatability ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 52.83 52.29 และ 53.06 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ ($\%RSD_{exp}$) เท่ากับ 1.76 0.98 และ 0.59 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จากทฤษฎี ($\%RSD_{Horwitz.}$) เท่ากับ 1.47 1.32 และ 1.24 ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.20 0.74 และ 0.48 และค่า HORRAT เฉลี่ย 0.81 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ

2.4 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness

Robustness เป็นคุณสมบัติที่แสดงว่าวิธีทดสอบมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ pH เวลาที่ใช้ และ Ruggedness เป็นคุณสมบัติ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนวันที่ทดสอบ สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness และ Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1.0 และ 1.5 มก./มล. ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

โดยการทำ Robustness ได้ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิ column จากปกติใช้ 250 °C เป็น 240 °C และ Robustness ทดลองโดยการเปลี่ยนผู้ทดสอบเป็นนักวิเคราะห์อีกคน ผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์สูตร WP

Number	Concn. (0.5 มก./มล.)		Concn. (1.0 มก./มล.)		Concn. (1.5 มก./มล.)	
	AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)	
	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness
1	51.72	51.92	52.12	52.06	51.23	51.41
2	51.86	51.65	51.52	52.81	50.84	51.00
3	51.36	51.49	52.02	52.01	51.00	51.00
4	51.69	52.05	52.13	52.15	50.68	51.17
5	51.81	51.83	51.65	51.65	51.26	51.32
6	51.92	52.00	51.31	51.32	50.69	51.10
7	51.16	51.28	51.62	51.57	51.64	51.58
8	50.85	50.91	51.32	51.31	51.66	51.77
9	51.36	51.48	51.70	51.75	51.11	51.43
10	52.54	50.42	51.80	51.66	51.54	52.03
Mean	51.63	50.50	51.72	51.83	51.17	51.38
SD	0.47	0.52	0.30	0.45	0.37	0.34
% $RSD_{exp.}$	0.91	1.01	0.58	0.87	0.72	0.66
Horwitz	1.47	1.47	1.32	1.32	1.24	1.24
HORRAT	0.62	0.69	0.44	0.66	0.58	0.53
HORRAT เฉลี่ย Robustness				0.55		
HORRAT เฉลี่ย Ruggedness				0.62		

จากตารางที่ 5 พบว่า สำหรับ Robustness ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 51.63 51.72 และ 51.17 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.62 0.44 และ 0.58 ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.55 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 50.50 51.83 และ 51.38 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.69 0.66 และ 0.53 ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.62 เมื่อพิจารณาจากค่า HORRAT จะพบว่า ทั้ง Robustness/Ruggedness ผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งหมด ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Captan ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดโรคพืชโดยใช้เทคนิค Gas Liquid Chromatography ใช้ตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector ด้วย Capillary column ชนิด HP-5 (30 m x 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm) ได้สภาวะของเครื่อง ดังนี้ ใช้แก๊ส He เป็นตัวพา อัตราการไหลของแก๊ส 2 มล./นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C เวลา 3.5 นาที อุณหภูมิการฉีด 270 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µl การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 2.50 มก./มล. และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 1.50 มก./มล. โดยมีค่า correlation coefficient r เท่ากับ 0.99994 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan ในผลิตภัณฑ์ พบว่าได้ค่า %recovery เท่ากับ 100.00 99.53 และ 100.77 และได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 100.1 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98 – 102% สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10% สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.62 0.40 0.53 และได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.55 การตรวจสอบค่าความแข็ง Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.62 0.44 0.58 และได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.55 ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Captan โดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน เวลา (reproducibility) ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.69 0.66 0.53 และได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.62 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามทั้งสิ้น AOAC (ค่า HORRAT $\leq$ 2) ดั้งนั้น วิธีที่ใช้ตรวจสอบ Captan ในการทดสอบนี้ที่ดัดแปลงมาจาก วิธีมาตรฐาน CIPAC HANDBOOK Vol.1C เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆ ตาม Method Validation ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งสิ้น ดังนั้น วิธีนี้จึงสามารถนำมาเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเปอร์เซ็นต์ สารออกฤทธิ์ Captan ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดโรคพืชได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และ มีประสิทธิภาพ

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาคเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ Captan

เอกสารอ้างอิง

จิราพรรณ ทองหยอด และ ณัญจนา ลือตระกูล. 2549. ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคาร์โบฟูแรนในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช. ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2549 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. 453 น.

ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์. 2537. สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย. ฝ่ายสารสารวัตรเกษตร. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. 371 น.

นิรนาม. 2554. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี เอกสารการฝึกอบรมปฏิบัติการ. ณ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ. จังหวัดปทุมธานี. 28 – 29 กรกฎาคม 2554.

Anonymous. 1993. The Agrochemicals Handbook 3rd. ed. The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.

Dobrat W. and H.A. Martijn, 1988. CIPAC Handbook Vol.1C : Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, The Black Bear Press, England.

Huber. L. 1998. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, Illinois. 318 p.

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง อีมาเม็กติน เบ็นโซเอท ในมะพร้าว

Method development and Method validationof emamectin benzoate in coconut

ชนิตา ทองแซม ลมัย ชูเกียรติวัฒนา ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร

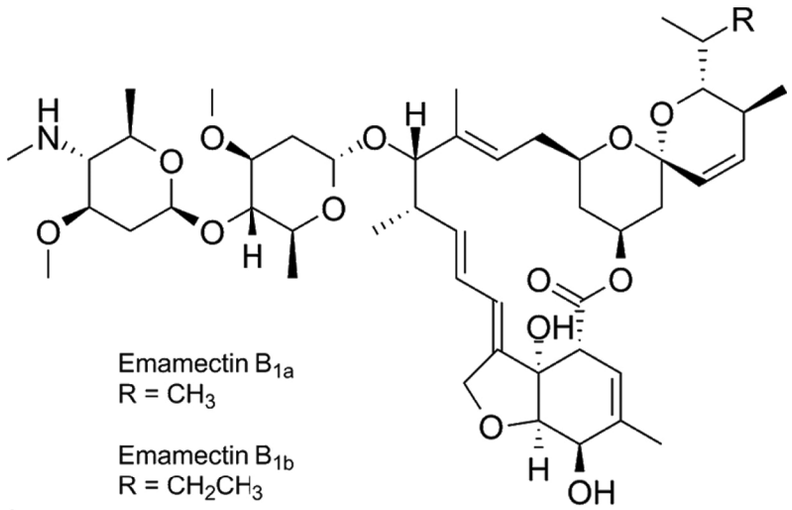
กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นวิธีการในการยืนยันความสามารถของวิธีวิเคราะห์ว่า มีความถูกต้อง แม่นยำตามหลักสากล โดยทำการพิสูจน์ตาม parameter ต่างๆ คือ linearity/range, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าวจากวิธีสกัดปรับจากวิธี QuEChERS ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งผลการทดสอบ parameter ต่างๆ ดังนี้ linearity/range ทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 4 ระดับ ที่ความเข้มข้น 0.002-0.250 มก./กก. พบว่ามีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($R^2 \geq 0.995$) และมี %Recovery ในช่วง 85-97 สำหรับ accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างระดับต่างๆ รวม 10 ซ้ำ ผลการทดสอบมีดังนี้ ที่ 0.004 มก./กก. มี %Recovery ในช่วง 93 -102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 ที่ 0.020 มก./กก. มี %Recovery ในช่วง 85-90 มี %RSD เท่ากับ 2.00 และที่ 0.100 มก./กก. มี %Recovery ในช่วง 83-87 มี %RSD เท่ากับ 1.57 ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %Recovery ในช่วง 60-120 และ %RSD มีค่าน้อยกว่า 20 ส่วนการทดสอบ LOQ พบว่าอยู่ที่ระดับ 0.004 มก./กก. มี %Recovery ในช่วง 93-102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 และค่า LOD เท่ากับ 0.002 มก./กก. วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าวที่ได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

คำนำ

อิมาเม็กติน เบ็นโซเอท (Emamectin benzoate) (ภาพที่ 1) เป็นสารกำจัดแมลง (Insecticide) ที่ผลิตจากเชื้อราอยู่ในดินชื่อ *Streptimyces avermitilis* ซึ่งเป็นสารประกอบตระกูลเดียวกับ avermectin สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพและความเป็นพิษคล้ายคลึงกัน



ภาพที่ 1. สูตรโครงสร้างของ emamectin (http://en.wikipedia.org/wiki/Emamectin)

ค่าความเป็นพิษของสาร emamectin benzoate อยู่ในระดับมีพิษเล็กน้อยโดยมีค่าความเป็นพิษทางปาก (Oral LD_{50}) 2,950 มก./กก. ส่วนค่าพิษทางผิวหนัง (Dermal LD_{50}) มากกว่า 2,000 มก./กก. ในส่วนของผลต่อศัตรูธรรมชาติและแมลงมีประโยชน์ (Janssan *et al*.,) (no year) รายงานว่าสาร emamectin benzoate มีพิษน้อยต่อผึ้ง ตัวห้ำและตัวเบียนโดยมีความเป็นพิษต่อหนู (rat) ทางปากที่ระดับ 10 มก./กก. จัดอยู่ในระดับสารเคมีที่เป็นพิษมากต่อหนูแต่มีพิษน้อยต่อกระต่ายที่ระดับมากกว่า 2,000 มก./กก. เป็นพิษน้อยต่อนกกระทา (quail) ที่ระดับมากกว่า 2,000 มก./กก. แต่เป็นพิษสูงต่อปลาและผึ้งที่ระดับ>0.003 มก./ลิตร และ >0.009 μg/bee ตามลำดับ

ซึ่งจากการทดลองวิธีการใช้สาร emamectin benzoate กำจัดหนอนหัวดำในมะพร้าวโดยวิธี Trunk injectionของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา (2545) ซึ่งเป็นวิธีที่ประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดหนอนหัวดำในปัจจุบัน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัตถุมีพิษมาตรฐาน Emamectin benzoate มี %purity เท่ากับ 90

2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง

3. สารเคมี ได้แก่ acetonitrile, Sodium chloride, magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$), sodium chloride (NaCl), sodium citrate dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) และdi-sodium hydrogen citrate esequihydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1, 5H_2O$)

4. syringe filter membraneชนิด PTFE

5. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Food Processor

6. เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Teflon centrifuge tube, Autopipette และ volumetric flask เป็นต้น

วิธีการ

1. การวางแผนการทดลอง โดยการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ Emamectin benzoate พร้อมทั้งทำการทดลองสกัดสารพิษตกค้าง Emamectin benzoate

2. พิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) โดยกำหนด parameter ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ได้แก่

2.1 Linearity/working range

Linearity เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารมา plot เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 4 ความเข้มข้น (0.002 0.010 0.050 และ 0.250 มก./กก.) ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ส่วน range เป็นค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่อยู่ใน linearity ซึ่งมีค่า accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการทดสอบ linearity/working range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 4 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ

2.2 Accuracy precision

การทดสอบ accuracy โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (%recovery) ของวัตถุมีพิษที่เติมลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับ คือ ต่ำ (0.004 มก./กก.) กลาง (0.020 มก./กก.) และสูง (0.010 มก./กก.) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ส่วน precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยนำผลการวิเคราะห์ accuracy มาหา %RSD (relative standard deviation)

2.3 Limit of Quantitation (LOQ)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมีความถูกต้อง (accuracy) และ แม่นยำ (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทำการประมาณค่า LOQ จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.004 มก./กก. รวม 10 ซ้ำ

2.4 Limit of Detection (LOD)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องพิสูจน์ accuracy และ precision ทำการประมาณค่า และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.002 มก./กก. รวม 10 ซ้ำ

3. การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

3.1 การเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างเนื้อมะพร้าวและน้ำมะพร้าวมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.2 วิธีวิเคราะห์ สกัด ปรับจากวิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.2.1 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ที่ homogenize แล้วลงใน 50 ml Teflon centrifuge tube.

3.2.2 เติม 10 มล. acetonitrile (ACN) แล้วเขย่าโดยใช้ vortex mixer เป็นระยะเวลา 1 นาที

3.2.3 เติม 4 กรัม magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 1 กรัม sodium chloride (NaCl) 1 กรัม sodium citrate dehydrate ($C_6H_5Na_3O_7*2H_2O$) และ 0.5 กรัม di-sodium hydrogen citrate esequihydrate ($C_6H_6Na_2O_7*1,5H_2O$) แล้วนำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที

3.2.4 Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3.2.5 Aliquot สารละลายส่วนใสปริมาตร 6 มล. ใส่ใน 15 มล. Teflon centrifuge tube ที่มี 150 มก. PSA 950 มก. $MgSO_4$ และ 75 มก. C18

3.2.6 Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3.2.7 กรองผ่านกระดาษกรอง 0.2 ไมครอน แล้วถ่ายสารละลายที่สกัดได้ใส่ใน autosampler vial ที่มีสารละลาย 5% formic acid 10 µl (เพื่อกันสารละลายที่สกัดได้เกิดการสลายตัว)

3.2.8 วางทิ้งไว้ในตู้แช่แข็งเป็นเวลา 1 คืน

3.3 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจะใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ คือ Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS system ที่มีระบบเชื่อมต่อแบบ Electrospray Ionization โดยปรับสภาวะของเครื่อง ให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ความสามารถในการตรวจได้สูงสุด (Optimized condition) ดังนี้

• สภาวะของเครื่อง HPLC

Column	: Phenomenex Kinetex 26µ x B-C18 100A
	100 x 2.1 mm
Flow rate	: 0.4 mL/min
Column Temperature	: 40°C
Injection volumn	: 5 µL
Mobile Phase	: A ; 10 mM Ammonium formate+0.1% Formic acid
	B ; Acetonitrile
Post run	: 4 min
Total cycle time	: 18 min

• สภาวะของเครื่อง MS

Positive modeGas temp	: 350°C
Gas flow	: 10 L/min
Nebulize r	: 45 Psi
Capillary	: 4000 V

3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยเตรียม working standard solutionของ Emamactin benzoate ใน acetonotrile เพื่อทำ calibration curve รวม 4 ระดับ ความเข้มข้นครอบคลุมช่วงของการวิเคราะห์คือที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.002-0.250 มก./กก.

ระยะเวลา : เดือน ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Emamactin benzoate ในมะพร้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัดปรับจากวิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งผลการทดสอบ parameter ต่างๆ (ตารางที่ 1-2) สรุปได้ดังนี้

1. linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.002-0.250 มก./กก. มีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า $R^2 \geq 0.995$ (FDA, 2005) และ %recovery ของระดับความเข้มข้นที่ทดสอบรวม 3 ระดับ อยู่ในช่วง 70-102 (ตารางที่ 1) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %recovery ในช่วง 60-120 (Codex, 1995)

2. accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างระดับต่างๆ มีดังนี้ ที่ 0.004 มก./กก. มี %recovery ในช่วง 93-102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 ที่ 0.020 มก./กก. มี %recovery ในช่วง 85-90 มี %RSD เท่ากับ 2.00 และที่ 0.100 มก./กก. มี %recovery ในช่วง 83 -87 มี %RSD เท่ากับ 1.57

3. LOD และ LOQ พบว่า LOD พบว่ามีที่ระดับ 0.002 มก./กก. ยังพบว่าที่ระดับ LOD มีค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %recovery ในช่วง 89-104 และมี %RSD เท่ากับ 8.30 ส่วนการทดสอบ LOQ ที่ระดับ 0.004 มก./กก. มี %recovery ในช่วง 93 – 102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 1-2)

ตารางที่ 1. ผลการทดสอบ linearity/working range, LOD และ LOQ

parameter	conc.(มก./กก.)	R^2	replication	level no.
linearity and	0.002-0.250	0.9999	1	4
working range		0.9998	3	4
level no.	**conc.(มก./กก.)**	**average % recovery (3 rep.)**		
1	0.004	97		
2	0.02	90		
3	0.10	85		

ตารางที่ 2. ผลการทดสอบ acuracy และ precision ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ ระดับ LOD และ LOQ จากการทดลอง 10 ซ้ำ

parameter	% recovery		precision		
conc.(มก./กก.)	average	range	average conc.	sd	%RSD
LOD (0.002)	97	89-104	0.0019	8.05	8.3
LOQ (0.004)	97	93-102	0.0039	2.72	2.8
0.02	88	85-90	0.0175	1.78	2

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัด ปรับจากวิธี QuEChERS ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LCMS/MS ซึ่งช่วงของการตรวจวิเคราะห์อยู่ที่ 0.002-0.250 มก./กก. มี accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %recovery อยู่ในช่วง 83-104 วิธีการนี้มีค่า LOQ = 0.004 มก./กก. และ LOD = 0.002 มก./กก. ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องแม่นยำแม้ที่ระดับ LOD สามารถให้ค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัด ปรับจากวิธี QuEChERS ตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS เป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรใช้ในการตรวจสารพิษตกค้างแบบ multiresidue จึงทำให้ง่ายต่อการปฏิบัติ อีกทั้งเทคนิคการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Emamectin benzoate ในมะพร้าว
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Emamectin benzoateในพืชอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

กองกีฏและสัตววิทยา. 2545. คำแนะนำ การป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช ปี 2545. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Anastassiades, M., and S. Lehotay, 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive SPE” for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International, 86, 412-431.

Codex. 1995. codex Alimentarius volume 3. Residues of Veterinary Drug’s in Food.

FAO / WHO. 2005. Codex Alimentarius Commission. CX/PR 05/37/5 March 2005.

Food and Drug Administration (FDA). 2005. Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Method. ORA Laboratory Procedure. USA.

Food Standard Agency. 2004. Food Standard Agency Information Bulletin on Methods of Analysis and Sampling for Foodstuffs. Institute of Food Research, UK. www.food.gov.uk.

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มสารกำจัดแมลง Clomazone

Method validation of Clomazone in Insecticide Formulation

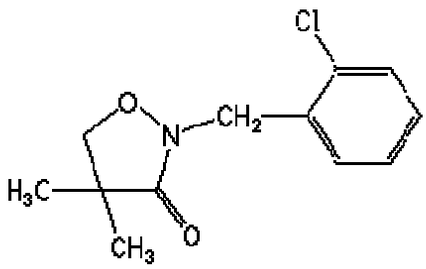
ทัศนี จงกลาง อนุชา ผลไสว

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Clomazone ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร film thickness 0.25 ไมโครเมตร อัตราของการ split injection เท่ากับ 50 ต่อ 1 ปริมาตรของการฉีดตัวอย่างต่อครั้งเท่ากับ 1 ไมโครลิตร อัตราการไหลของก๊าซตัวพา (Helium) เท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ชนิดของดีเทคเตอร์ที่ใช้คือ Flame ionization detector (FID) อุณหภูมิของสภาวะในการวิเคราะห์มีรายละเอียดดังนี้ อุณหภูมิของ Oven เท่ากับ 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ injection เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ใช้ในการทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ Clomazone โดยได้ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ดังนี้ ค่า Rang หรือปริมาณของสาร Clomazone ที่ได้จากการใช้สภาวะดังกล่าวในการวิเคราะห์สามารถวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99991 เกณฑ์ยอมรับค่า Correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995 และให้ค่า Linearity หรือค่าความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสาร Clomazone ที่วิธีวิเคราะห์สามารถทำได้ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 เกณฑ์ยอมรับค่า Correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995 ผลการตรวจสอบค่า Pricision หรือค่าความแม่นของวิธีวิเคราะห์ Clomazone ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืช EC ให้ค่า HORRAT ดังนี้ ค่า Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.194, Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.201, Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.832 และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.748 ซึ่งทั้งหมดไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex และการตรวจสอบค่า Accuracy ของวิธีการวิเคราะห์ได้ผลของ %Recovery เท่ากับ 101.7% ซึ่งอยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC

คำนำ



Clomazone มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC ว่า 2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{12}H_{14}ClNO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 239.7 จุดหลอมเหลว 25 จุดเดือด: 275.4 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวข้นหนืด สีน้ำตาลอ่อน ละลายได้ในอะซิโตน, Acetonitrile, methylene คลอโรฟอร์ม cyclohexanone, formamide dimethyl, dioxane, Heptane เฮกเซน เมทานอล เป็นสารกำจัดวัชพืชใช้สำหรับการควบคุมหญ้าและวัชพืช ในฝ้าย ถั่ว ฟักทอง ถั่วเหลือง มันเทศ ยาสูบ เป็นพิษเล็กน้อย ชนิดของสูตรผสม เช่น TC (Technical grade), EC (Emulsifiable concentrate) มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ($LD_{50\ rat,\ oral,\ acute}$)135-163 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นพิษต่อปลา LD_{50} (96hours)$_{rainbow\ \ trout}$ 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นพิษต่อผึ้งค่อนข้างต่ำ (Agrochemicals Handbook,1993)

การควบคุมคุณภาพของสารกำจัดวัชพืช ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 นั้น จะต้องตรวจวิเคราะห์ชนิดและสารออกฤทธิ์ ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุไว้บนฉลากหรือข้อมูลที่แสดงไว้ก่อนการขึ้นทะเบียนหรือไม่ และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช วิธีการตรวจวิเคราะห์ Clomazone นั้น มีวิธีมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council) แต่วิธีมาตรฐานนั้นบางครั้งไม่สามารถทำตามได้ทั้งหมด และเพื่อเป็นการประหยัดงบประมาณ จึงจำเป็นต้องประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีใช้อยู่จริงในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีตามข้อกำหนด ISO 17025 เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบที่นำมาใช้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Liquid Chromatography (GLC)
2. คอลัมน์ ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิลิตร ยาว 30 เมตร หรือเทียบเท่า
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 หรือ 5 ตำแหน่ง (± 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50,100, 250, 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. ปิเปต ขนาด 2, 3, 4, 5, 8, 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Clomazone 95.5%
2. สาร Clomazone ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical grade)
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Clomazone 48%
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Clomazone

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ดังนี้

Column	: Capillary, HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane) 30 m. x 0.32 mm. (id.),0.25 µm, film thickness
Injector system	: Split injection,
Split ratio	: 50 :1
Split flow.	: 100 ml/min
Injection volume	: 1 µl.
Detector	: Flame ionization detector (FID)
Temperature	: oven : 210°C
Injection port	: 250°C
Detector	: 250°C
Gas flow rate	: Helium (carrier) : 2.0 ml/min
Hydrogen	: about 30 ml/min
Air	: about 300 ml/min Nitrogen : about 30 ml/min

2. การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Clomazone

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Clomazone 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 26 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

ชั่งสาร Technical grade 10 ซ้ำ (T_1-T_{10}) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 26 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสภาวะการใช้งาน และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ จึงทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องซ้ำหลายๆ ครั้ง จนได้ค่าพื้นที่ใต้ peak หรือความสูง peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1% เครื่อง GLC จึงพร้อมใช้งาน แล้วฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลายของสารความเข้มข้นสูง เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอน ตามลำดับ ดังนี้

$C_1,C_1,T_1,T_1,C_2,C_2,T_2,T_2,C_1,C_1,T_3,T_3$.....

สารละลายมาตรฐาน ทั้ง 2 ต้องมีค่า %Relative Percent Different (RPD) ไม่เกิน 3%

$$\% = \frac{(\text{factor max} - \text{factor min}) \times 100}{\text{factor mean}}$$

2.4 การคำนวณ Response factor

$$\text{response factor} = \frac{\text{น้ำหนัก x Purity}}{\text{Peak area}} \quad \text{หรือ} \quad f = \frac{S \times P}{Hs}$$

S = น้ำหนักของ Clomazone ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม)

P = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Clomazone (%)

Hs = พื้นที่ใต้พีคของ Clomazone ในสารละลายมาตรฐาน

2.5 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ Clomazone ในสารละลาย Technical grade ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Clomazone content} = \frac{HW \times f}{W}$$

HW = พื้นที่ใต้พีคของ Clomazone ในสารละลาย Technical grade

F = ค่าเฉลี่ย response factor

W = น้ำหนักของ Clomazone ในสารละลาย Technical grade

2.6 นำค่า เปอร์เซ็นต์ ของ Technical grade ที่ได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของ Technical grade

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linear) ของวิธีการ

3.1 หาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ Clomazone ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มี 6 ความเข้มข้น ตามที่เลือกดังนี้ 25 50 75 100 125 และ 150 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

3.2.5 คำนวณหาค่า Correlation coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$

4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการ

4.1 Repeatability (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Repeatability ซึ่งป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน)

4.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการใช้งาน (ภายใน range ที่หาได้ จากข้อ 3.1) จำนวน 3 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ได้แก่ 50 100 และ 150 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 ชั่งสาร Clomazone ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการใช้งาน (ภายใน range ที่หาได้ จากข้อ 3.1) จำนวน 3 ความเข้มข้นๆ ละ 10 ซ้ำ ได้แก่ 50,100 และ 150 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีด ข้อ 4.1.1, 4.1.2 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Clomazone ในสารละลายของผลิตภัณฑ์

4.2 Reproducibility (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Reproducibility ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการในระยะเวลาที่แตกต่างกัน) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.1

5. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการ

5.1 Robustness (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Robustness ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการแต่เปลี่ยน Oven) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.1

5.2 Ruggedness (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Ruggedness ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการแต่เปลี่ยนเครื่อง) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.1

6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ (5 mg AI /ml)

ชั่งสาร Technical grade ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1,255.02 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย Stock Sample ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ (1 mg AI /ml)

เตรียมสารละลายเหมือนข้อ 6.1 โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Clomazone ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 2,083.33 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

6.3 เตรียมสารละลายเพื่อ Plot กราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) ปริมาตร 2 5 และ 8 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของ Technical grade ที่มีความเข้มข้นของ Clomazone เป็น 0.4 1.0 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงลำดับตามความเข้มข้น

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Clomazone เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.3)

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

6.5.1 ปิเปตสารละลาย Stock Sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) ปริมาตร 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ที่มี Stock Sample (ข้อ 6.5.1) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากันนำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Clomazone เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.3)

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก %Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Clomazone ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4-6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc}_{\text{spiked sample}} - \text{Conc}_{\text{original sample}})}{\text{Conc}_{\text{added}}} \times 100$$

7. การหา Specificity/selectivity

ระยะเวลาดำเนินการ : ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

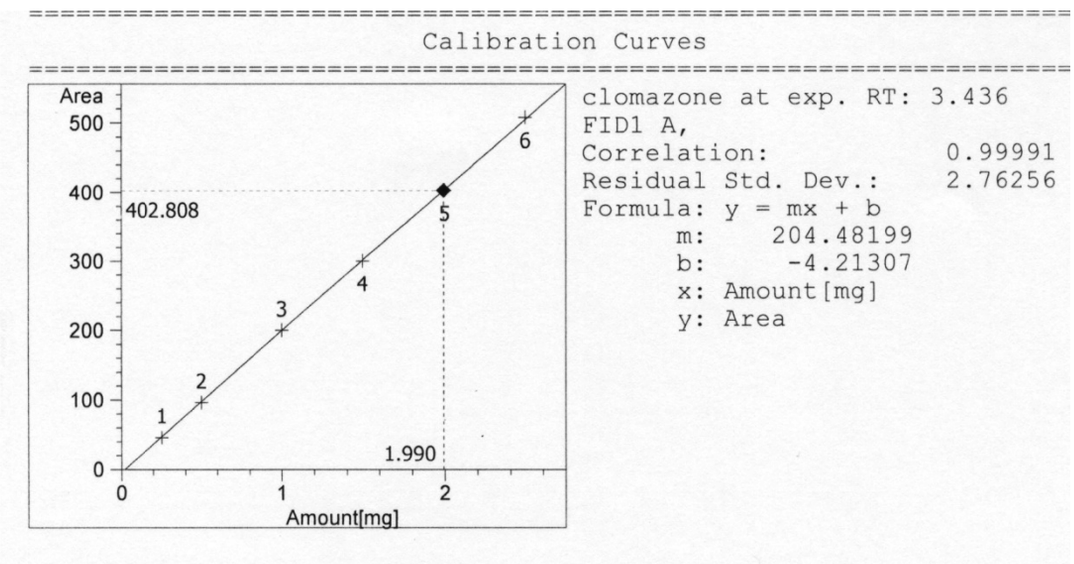
ตารางที่ 1. ผลการประเมินค่า เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Technical grade และค่า %Relative Percent Different (RPD) ของสารมาตรฐาน

สารละลาย Technical grade	%ของสาร Technical grade	std.sol.	mg.	Area of STD	%RPD
T1	99.99	C 1	25.3	222.97653	0.573
		C 2	25.6	226.92027	
T2	99.92	C 1	25.3	223.34921	0.454
		C 2	25.6	227.03841	
T3	99.73	C 1	25.3	223.00333	0.110
		C 2	25.6	225.89865	
T4	99.54	C 1	25.3	222.69939	0.249
		C 2	25.6	225.89865	
T5	99.49	C 1	25.3	222.69939	1.326
		C 2	25.6	228.34103	
T6	99.66	C 1	25.3	221.08217	1.753
		C 2	25.6	227.64128	
T7	99.22	C 1	25.3	221.08217	1.725
		C 2	25.6	227.60172	
T8	99.84	C 1	25.3	222.31111	1.511
		C 2	25.6	228.36958	
T9	99.33	C 1	25.3	225.77821	0.239
		C 2	25.6	229.00037	
T10	99.38	C 1	25.3	224.98322	1.133
		C 2	25.6	230.24026	
เฉลี่ย	99.6				

จากตารางที่ 1 เมื่อหาค่าเฉลี่ยปริมาณของสาร Technical grade ที่ตรวจได้ทั้ง 10 ค่า จะได้เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade เท่ากับ 99.6% ได้ค่า SD เท่ากับ 0.261 ค่า %RSD เท่ากับ 0.262 และเมื่อหาค่า %Relative Percent Different (RPD) แล้ว พบว่าสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 มีค่าไม่เกิน 3%

ตารางที่ 2. การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

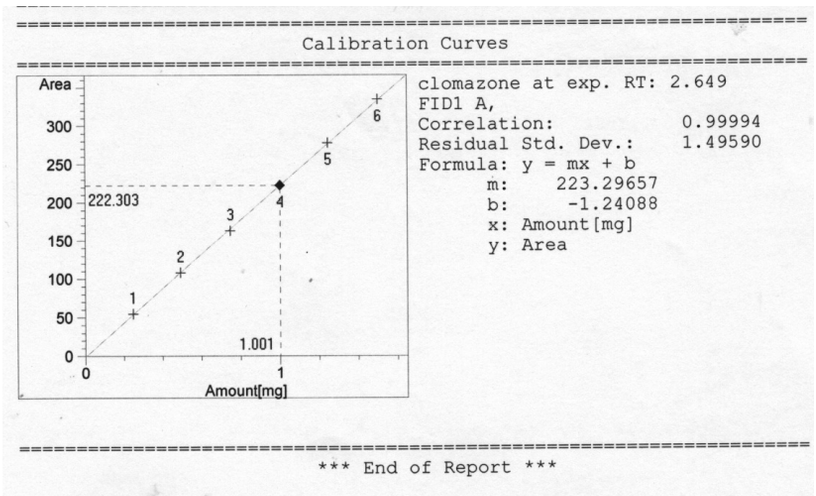
การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Clomazone	
mg/ml	Area
0.25	45.92103
0.50	96.14136
1.00	199.76093
1.50	300.21976
2.00	402.80780
2.50	507.92905



จากการทดลองหาช่วงของการวัด Clomazone ได้ Range มีค่า 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.99991

ตารางที่ 3. การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การหา Linearity ที่ความเข้มข้น 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Clomazone	
mg/ml	**Area**
0.25	54.64037
0.50	108.20332
0.75	163.02284
1.00	222.30299
1.25	277.63541
1.50	334.24759



จากการทดลองหา Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.99994

ตารางที่ 4. การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	26.2	47.12	52.2	46.98	78.2	46.96
2	26.3	47.54	52.3	48.64	78.3	47.32
3	26.4	46.86	52.5	47.07	78.3	47.99
4	26.4	46.77	52.6	47.18	78.4	48.11
5	26.6	46.45	52.9	46.32	78.5	47.98
6	26.6	45.84	52.9	46.26	78.6	47.26
7	26.6	45.10	52.9	47.08	78.6	48.39
8	26.7	46.33	53.1	46.25	78.6	47.49
9	26.8	45.90	53.6	46.20	78.7	47.86
10	26.9	46.99	53.6	46.51	78.9	47.91
mean		46.49		46.85		47.73
SD		0.722		0.742		0.447

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$\overline{X} = 46.49$ และได้ค่า SD =0.821

คำนวณ % RSD ตามสูตร $\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.821 \times 100}{46.49} = 1.765$$

การประเมิน Precision โดยใช้ (HORRAT) $\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$

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

เมื่อค่า C = Concentration ration ได้ค่า = 0.470

$\text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$ ได้ค่า = 1.478

$$\text{HORRAT} = \frac{1.765}{1.478} = 1.194$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 1.194

เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT มีดังนี้

AOAC ยอมรับ ≤ 2

EU, Codex ยอมรับ < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Clomazone ให้ผลการทดสอบค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5. การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Reproducibility)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	26.2	47.46	52.2	47.51	78.2	48.30
2	26.3	47.73	52.3	49.66	78.3	49.06
3	26.4	46.98	52.5	48.12	78.3	49.93
4	26.4	47.63	52.6	48.88	78.4	49.51
5	26.6	46.89	52.9	48.23	78.5	49.32
6	26.6	48.22	52.9	48.08	78.6	49.83
7	26.6	48.31	52.9	47.87	78.6	47.77
8	26.7	47.63	53.1	47.98	78.6	48.92
9	26.8	47.13	53.6	48.55	78.7	49.52
10	26.9	47.71	53.6	48.16	78.9	47.76
mean		47.57		48.30		48.99
SD		0.475		0.602		0.798

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 1.201

ตารางที่ 6. การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Robustness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	26.2	46.16	52.2	47.53	78.2	49.17
2	26.3	46.60	52.3	49.31	78.3	49.05
3	26.4	46.34	52.5	47.04	78.3	50.17
4	26.4	46.68	52.6	48.22	78.4	49.50
5	26.6	46.05	52.9	48.08	78.5	49.40
6	26.6	46.40	52.9	48.27	78.6	49.07
7	26.6	47.25	52.9	48.52	78.6	49.02
8	26.7	47.10	53.1	47.66	78.6	50.31
9	26.8	46.63	53.6	48.10	78.7	49.08
10	26.9	46.94	53.6	48.22	78.9	48.65
mean		46.62		48.10		49.34
SD		0.393		0.609		0.526

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 0.832

ตารางที่ 7. การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Ruggedness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง g/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	26.2	47.87	52.2	48.15	78.2	47.83
2	26.3	47.96	52.3	50.08	78.3	47.65
3	26.4	47.67	52.5	47.98	78.3	48.09
4	26.4	47.74	52.6	48.03	78.4	47.16
5	26.6	47.62	52.9	47.65	78.5	47.92
6	26.6	48.26	52.9	47.92	78.6	48.12
7	26.6	47.55	52.9	47.58	78.6	48.03
8	26.7	48.36	53.1	47.67	78.6	49.52
9	26.8	47.87	53.6	47.43	78.7	48.21
10	26.9	47.82	53.6	47.49	78.9	48.16
mean		47.87		48.00		48.07
SD		0.263		0.770		0.598

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 1.748

ตารางที่ 8. ตรวจสอบ % Recovery ของ **Clomazone**

N	AI content (mg / 25 ml)								
	Conc.added(10.04mg/ml)			Conc.added(15.07 mg/ml)			Conc.added(20.09 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.84	20.08	10.04	9.82	25.11	15.07	9.85	30.21	20.09
2	9.81	20.17	10.04	9.83	25.31	15.07	9.82	30.30	20.09
3	9.87	20.02	10.04	9.83	25.28	15.07	9.84	30.32	20.09
4	9.83	20.01	10.04	9.85	25.14	15.07	9.81	30.14	20.09
5	9.82	20.15	10.04	9.84	25.24	15.07	9.84	30.31	20.09
6	9.84	20.16	10.04	9.82	25.19	15.07	9.82	30.24	20.09
7	9.82	20.08	10.04	9.87	25.10	15.07	9.81	30.15	20.09
8	9.83	20.13	10.04	9.81	25.11	15.07	9.80	30.21	20.09
9	9.81	20.04	10.04	9.86	25.16	15.07	9.83	30.12	20.09
10	9.83	20.05	10.04	9.86	25.14	15.07	9.79	30.27	20.09
mean	9.83	20.09	10.04	9.84	25.18	15.07	9.82	30.23	20.09
SD	0.018	0.060		0.020	0.074		0.019	0.073	
% RSD	0.183	0.298		0.203	0.294		0.193	0.241	
%Recovery			102.1			101.7			101.5

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc}_{\text{spiked sample}} - \text{Conc}_{\text{original sample}})}{\text{Conc}_{\text{added}}} \times 100$$

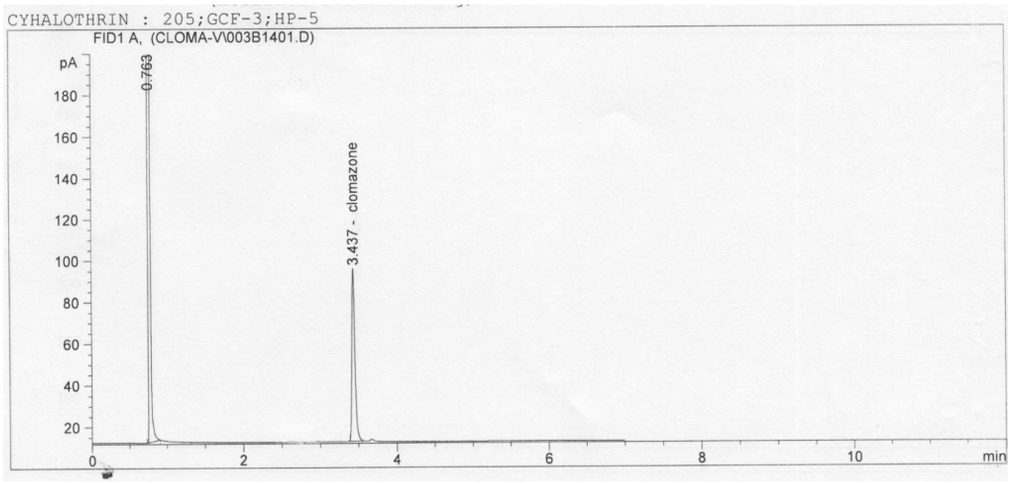
$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นต่ำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{20.09 - 9.83}{10.04} \times 100 = 102.1$$

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นกลาง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{25.18 - 9.84}{15.07} \times 100 = 101.7$$

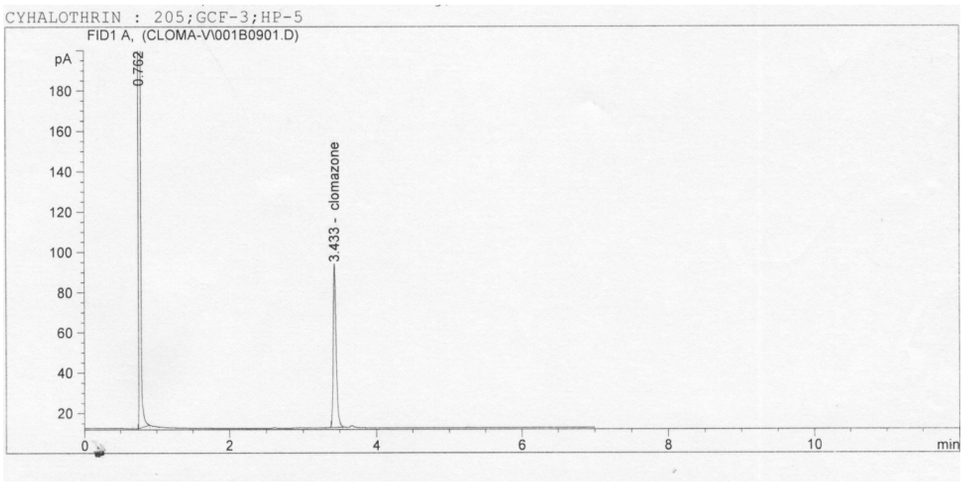
$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นสูง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{30.23 - 9.82}{20.09} \times 100 = 101.5$$

% Recovery เฉลี่ย = 101.7

ผลการศึกษา Specification/Selectivity



ภาพที่ 1. แสดง Chromatogram ของสารมาตรฐาน **Clomazone**



ภาพที่ 2. แสดง Chromatogram ของสารตัวอย่าง **Clomazone**

จาก Chromatogram ไม่มี Peak อื่นใดรบกวน Peak ของ **Clomazone** แสดงว่า Specification / Selectivity ดี

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ **Clomazone** โดยวิธี Gas Liquid Chomatography (GLC) ได้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

Column	: Capillary,HP-5(5% Phenyl methyl siloxane)
	30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 µm, film thickness
Split injection	: Split ratio : 50:1, Injection volume : 1 µl.
Detector	: Flame ionization
Temperature	: Colum oven : 210°C
	Injection port : 250°C
	Detector : 250°C

ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์นี้ ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้

ค่า Range หรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วง 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99991 เกณฑ์ยอมรับค่า Correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

ค่า Linearity หรือค่าความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิธีวิเคราะห์สามารถทำได้ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 เกณฑ์ยอมรับค่า Correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

การตรวจสอบค่า Pricision ได้ผลดังนี้ ค่า Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.194, Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.201, Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.832 และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.748 ซึ่งทั้งหมดไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

การตรวจสอบค่า Accuracy ของวิธีการวิเคราะห์ได้ %Recovery เท่ากับ 101.7% ซึ่งอยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ Clomazone ได้อย่างถูกต้อง

การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ Clomazone ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อการควบคุมคุณภาพตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535

วิธีวิเคราะห์ที่ได้ศึกษานี้ สามารถถ่ายทอดให้แก่หน่วยงานราชการอื่นๆ และหน่วยงานเอกชนที่จะนำไปใช้ในการตรวจ Clomazone เพื่อการควบคุมคุณภาพในการผลิตและจำหน่ายต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษการเกษตรในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชาลีธุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.

Kidd, H. and D.R. James (Eds). 1993. The Agrochemicals Handbook.3rd.ed. Royal Society of chemistry, England

Henriet, J., A. Martijn, and H.H. Povlsen, 1985. CIPAC Handbook, Vol.1 C, Analysis of Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical Council. Limited.

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Dinotefuran

Method Validation of Dinotefuran in Pesticide Formulations

ฉลองรัตน์ หมื่นขวา พิเชษฐ์ ทองละเอียด

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

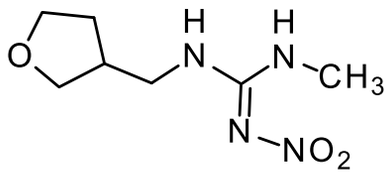
บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ไดโนทีฟูแรน (Dinotefuran) ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้ตัวตรวจจับชนิด UV detector (VWD) คอลัมน์ C-18 (AEC-C18-PFP) ได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ คือ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วน Mobile phase น้ำต่อเมทานอล (70 : 30) ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 10 ไมโครลิตร เวลาในการฉีด 4.0 นาที ผลการทดลอง ได้ค่า Rang ช่วงความเข้มข้น 0.025 – 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรค่า Linearity ได้ช่วงความเข้มข้น 0.050 – 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 โดยเกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ ค่า Accuracy หาได้จาก %Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 99.74 เกณฑ์ยอมรับ AOAC %Recovery เท่ากับ 98 – 102 การวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) โดยใช้ Repeatability/Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.32 และ 0.44 ตามลำดับ และตรวจสอบความแข็งของวิธี โดยใช้ Robustness/ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.31 และ 0.35 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 จากผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ดังนั้น จึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาค ตลอดจนห้องปฏิบัติการอื่นๆ

คำนำ

ไดโนทีฟูแรน เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืช จัดอยู่ในกลุ่ม neonicotinoid เป็นสารกำจัดแมลงชนิดดูดซึม มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางของแมลงศัตรูพืช จะเข้าไปยับยั้งการส่งผ่านคำสั่งจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปอีกเซลล์ประสาทหนึ่งทำให้แมลงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด ออกฤทธิ์กำจัดแมลงทั้งแบบถูกตัวตายและกินตาย จัดได้ว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษน้อย มีพิษเฉียบพลันทางปาก (หนูเรทตัวผู้) 2,804 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางผิวหนังมากกว่า 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยไก่แจ้ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟข้าว เป็นต้น นำมาใช้กับพืชได้หลายประเภท เช่น ข้าว ข้าวโพด คะน้า บรอคโคลี กะหล่ำปลี ส้ม มะม่วง พริกไทย ข้าว ปอ ฝ้าย แตงโม ไม้ดอกและไม้ประดับทั่วไป (นิรนาม, 2553) ไดโนทีฟูแรนมีชื่อทางเคมี คือ (*RS*)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl) guanidine (ตามระบบIUPAC) มีสูตรทางเคมี คือ $C_7H_{14}N_4O_3$ มีสูตรโครงสร้างตามภาพที่ 1 สารบริสุทธิ์มีลักษณะ

ผงสีขาว ละลายน้ำ และละลายในตัวทำละลาย (Solvent) ได้ดี มีจุดหลอมเหลว 107.5 องศาเซลเซียส คงสภาพได้ดีในสภาวะที่ pH ตั้งแต่ 1.4 – 12.3 (Anonymous,1993)



ภาพที่ 1. สูตรโครงสร้างของไดโนทีฟูแรน (Anonymous, 1993)

การตรวจสอบคุณภาพปริมาณไดโนทีฟูแรน มีวิธีวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน CIPAC Handbook Vol.L ภาวะของเครื่องตามวิธีมาตรฐาน คือ ใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้ตัวตรวจจับชนิด UV detector (VWD) คอลัมน์ 250 X 4.6 mm (i.d.) Water Symmetry Shield RP8, 5µM ใช้ภาวะของวิธีวิเคราะห์อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วน Mobile phase น้ำต่อเมทานอล (80 : 20) Wavelength 270 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 10 ไมโครลิตร เวลาในการ 15 นาที (Dobrat W. and A Martijn H., 1988) ซึ่งบางครั้งการทำตามวิธีมาตรฐานไม่สามารถทำตามได้ทั้งหมด เนื่องจากขาดเครื่องมือและอุปกรณ์ เช่น อุปกรณ์ที่ตรงกับวิธีมาตรฐานไม่มี ขั้นตอนวิธีการมีความยาก การวิเคราะห์ใช้เวลานาน ดังนั้นการปรับปรุงพัฒนาวิธีวิเคราะห์จึงมีความสำคัญกับผู้วิเคราะห์ และ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีความคุมคุณภาพอย่างหนึ่งของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ ที่ประเมินคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับ ทั้งระหว่างห้องปฏิบัติการเองและผู้รับบริการ

งานวิจัยนี้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ไดโนทีฟูแรนในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สูตร WP โดยเทคนิค High Performance liquid chromatography (HPLC-UV) ใช้ Column C-18 (AEC-C18-PFP) แทน Column Water Symmetry Shield RP8, 5µM ปรับเปลี่ยนภาวะของเครื่อง โดยเพิ่มอัตราส่วนน้ำต่อเมทานอล เป็น 30 ต่อ 70 โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ตามข้อกำหนดต่างๆ ของ Method Validation ทำการทดสอบ ได้แก่ ช่วงของการวัด (Range) ช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) และการตรวจความเที่ยง (Precision) และความแข็งของวิธี (Robustness/Ruggedness) (Huber, 1998) นอกจากนี้การทดสอบยังเป็นไปตามข้อกำหนดตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC:17025 ครอบคลุมข้อที่ 5.4.2 และ 5.4.2 (นิรนาม, 2554)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance liquid Chromatograph มีตัวตรวจจับชนิด UV Detector
2. คอลัมน์ชนิด ACE 5 C-18 – PFP (C-18)
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath

5. ขวดปริมาตร ขนาด 25, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ

6. ปิเปต ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ

7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร

8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐานไดโนทีฟูแรนความบริสุทธิ์ 99.9 %

2. สารเข้มข้นสูง (Technical material) ของ ไดโนทีฟูแรน สูตร 99.9% min. Tech.

3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของไดโนทีฟูแรน สูตร WP (10% w/w)

4. สารละลายเมทานอล (Methanol HPLC grade)

วิธีการ

1. **การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์** Technical grade Dinotefuran

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง HPLC-UV

Column	: ACE 5 C-18-PFP
Mobile phase	: Water : Methanol (70 : 30)
Flow rate	: 1.0 ml/min
Column temperature	: 40 ºC
Wavelength	: 270 nm
Injection volume	: 10 µl
Run time	: 4.0 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไดโนทีฟูแรน

ชั่งสารมาตรฐานไดโนทีฟูแรนปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม จำนวน 2 ซ้ำ (C_A,C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

1.3 การเตรียมสารละลายสารไดโนทีฟูแรน

1.3.1 ชั่งสารเข้มข้นไดโนทีฟูแรนคลุกสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 10 มิลลิกรัม จำนวน 10 ซ้ำ (TC_1-TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลเขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

1.3.2 ชั่งสารผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน คลุกสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 100 มิลลิกรัม จำนวน 10 ซ้ำ (TC_1 -TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลเขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC-UV

เมื่อปรับตั้งสภาวะของเครื่อง HPLC-UV เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1% จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น ไดโนทีฟูแรน ตามลำดับ ดังนี้

สารเข้มข้นสูง $C_A C_A$, TC_1TC_1,T_2C_2, TC_3TC_3, C_BC_B ,.....

สารผลิตภัณฑ์ $C_A C_A$, tC_1tC_1 ,$t_2 C_2$, tC_3tC_3, C_BC_B ,.....

1.4 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

$$f = \frac{S \times P}{H_S}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน ไดโนทีฟูแรน หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐาน ไดโนทีฟูแรน

จากนั้นคำนวณค่า %RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า %RPD แตกต่างกันไม่เกิน 3% จากสูตร

$$\%RPD = \frac{(\text{f of maximum - f of minimum}) \times 100}{\text{f of average}}$$

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน (\% w/w)} = \frac{f_{avr.} \times H_W}{W}$$

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น ไดโนทีฟูแรน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

$f_{avr.}$ = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีกของสารละลายของสารเข้มข้น ไดโนทีฟูแรน

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ไดโนทีฟูแรนสูตร WP

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 เตรียมสารเข้มข้นไดโนทีฟูแรนที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และคลุกให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วชั่งสารให้มีสารออกฤทธิ์ไดโนทีฟูแรนครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 5 ความเข้มข้น นั่นคือ 0.025 - 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วย เมทานอล

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV ที่เตรียมภาวะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ไดโนทีฟูแรน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 5 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ ความเข้มข้น 0.050 - 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอล โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมากเข้าเครื่อง HPLC-UV

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย ไดโนทีฟูแรน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r) ≥0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูงไดโนทีฟูแรนที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อเตรียมทำ blank sample โดยเตรียมสารเข้มข้นไดโนทีฟูแรนที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอล เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเขย่าให้เข้ากัน

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน สูตร WP ปริมาณ 10,002.4 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย เมทานอล เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย เมทานอล เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV (ได้ค่า O)

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.050, 0.100 และ 0.150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น ไดโนทีฟูแรน จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 5, 15 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV (ได้ค่า F)

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{F - O \times 100}{C}$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสารไดโนทีฟูแรนในสารละลาย fortified sample, มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

O คือ ปริมาณสารไดโนทีฟูแรนในสารละลาย original sample, มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

C คือ ปริมาณ added sample, มิลลิกรัม

ค่าความแม่น ต้องได้ %Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102 ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision and Reproducibility)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นไดโนทีฟูแรนที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve โดยเตรียมสารเข้มข้นไดโนทีฟูแรน ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วย เมทานอล เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV จะได้ calibration curve ของ standards

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน สูตร WP เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.05 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรนสูตร WP ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50 100 และ 150 มิลลิกรัม จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จำนวน 2 ชุด (Repeatability) ลงในขวด ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย เมทานอล ปริมาตร 35 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย เมทานอล และฉีดเข้าเครื่อง GC และเตรียมอีกชุดหนึ่ง โดยเปลี่ยนเครื่องมือและผู้วิเคราะห์ (Reproducibility)

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard alibration curve ข้อ 2.3.1

2.3.4 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่งโดย ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน ภายใต้สภาวะเงื่อนไขอย่างเดียวกัน (Robustness) และทำการปรับเปลี่ยนสภาวะของเครื่องเล็กน้อย (Ruggedess) คือเปลี่ยนอัตราส่วน Mobile phase น้ำต่อเมทานอล (80 : 20)

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น ไดโนทีฟูแรน ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน สูตร WP เตรียมความเข้มของสารละลายตัวอย่างที่ 0.05 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/ต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน สูตร WP ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50 100 และ 150 มิลลิกรัม จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย เมทานอล เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย เมทานอล

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง HPLC-UV เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 - กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง การเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงโดยเทคนิค HPLC-UV โดยการเตรียมภาวะของเครื่อง HPLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบตรวจสอบความพร้อมของเครื่องโดยคำนวณ ค่า response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกินร้อยละ 1 และดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่างๆได้ผลการทดลอง ดั้งนี้

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ Technical grade Dinotefuran

จากการที่สารมาตรฐานมีปริมาณน้อย ราคาแพง และไม่เพียงพอต่อกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ผู้ทดลองจึงได้นำสารความเข้มข้นสูงมาใช้แทน และก่อนที่จะทำกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจะต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารไดโนทีฟูแรนความเข้มข้นสูง เพื่อให้ทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอน โดยใช้สารละลายมาตรฐาน ไดโนทีฟูแรน ความบริสุทธิ์ 99.9 %W/W มาเป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade ซึ่งตามฉลากระบุเปอร์เซนต์เท่ากับ 99.9% W/W จากการทดลองได้ผลดังตารางที่ 1 และมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ 99.21%

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์ของสาร Technical grade Dinotefuran

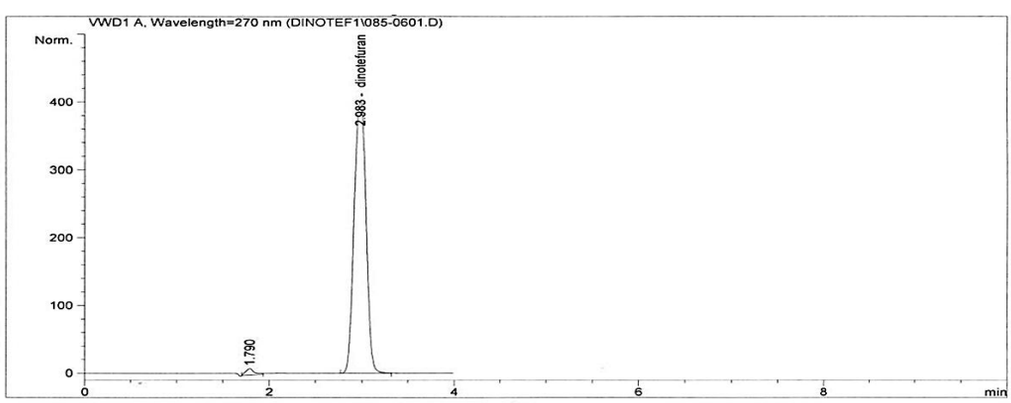
สารละลาย Technical grade Dinotefuran	เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์
TC1	99.93
TC2	99.68
TC3	99.96
TC4	98.23
TC5	98.40
TC6	98.26
TC7	99.79
TC8	99.01
TC9	99.42
TC10	99.46
เฉลี่ย	**99.21**
SD	0.69

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน สูตร WP

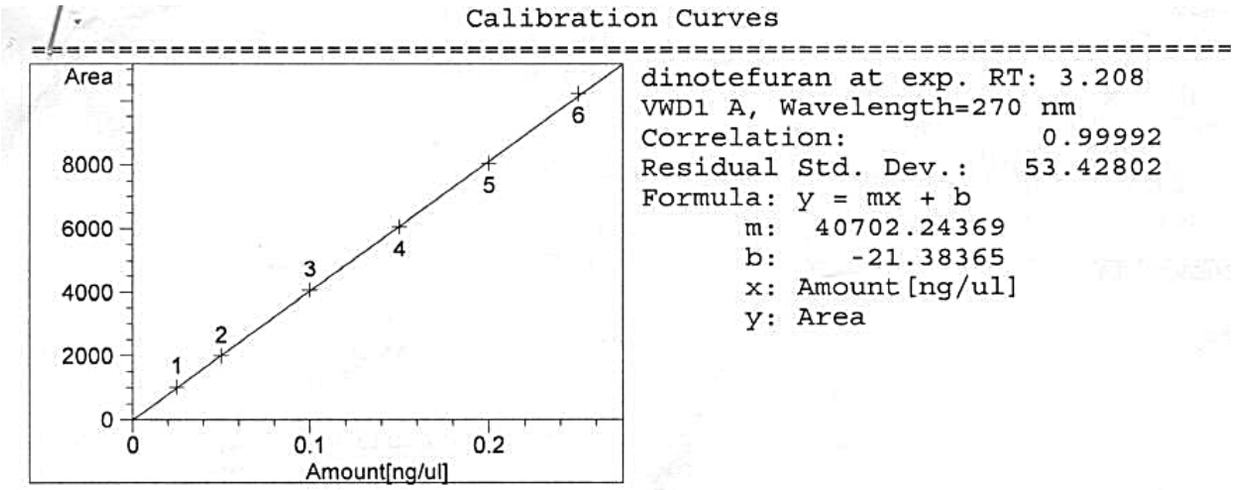
2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 การตรวจสอบ Range

Range เป็นการหาช่วงความเข้มข้นหรือปริมาณสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ (จิราพรรณ และ ณัญจนา, 2549) การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) โดยชั่งสารให้มีเนื้อสาร 0.025, 0.050, 0.100, 0.200 และ 0.250 พบว่า ได้โครมาโทแกรม ดังภาพที่ 2 และเมื่อพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน X) กับ response (แกน Y) (ภาพที่ 3) ได้ช่วงที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.050 - 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีความเป็นเส้นตรงมากสุด จะพบว่าจากการทำ range ในช่วงความเข้มข้น 0.025 – 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992



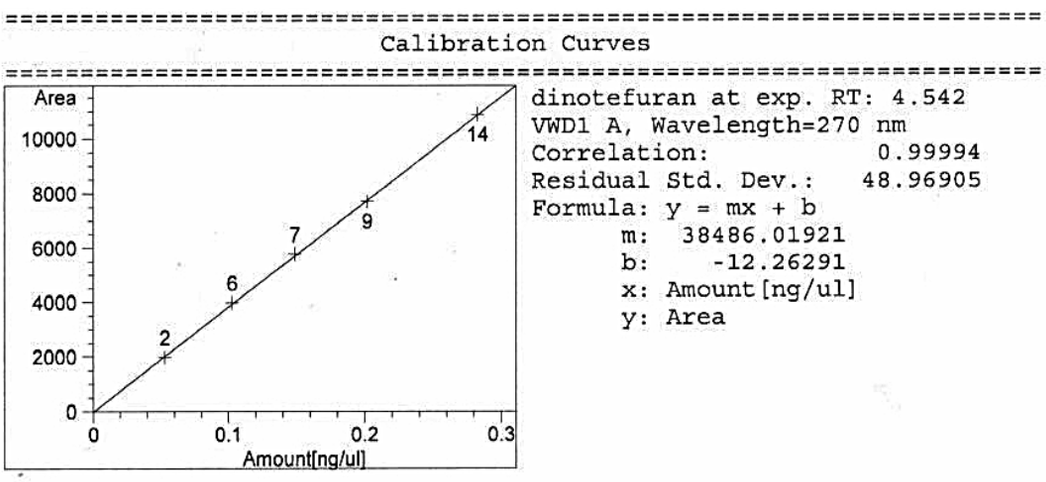
ภาพที่ 2. โครมาโทแกรมของ ไดโนทีฟูแรน



ภาพที่ 3. กราฟมาตรฐานค่า Range ของของไดโนทีฟูแรน

2.1.2 การตรวจสอบ Linearity

Linearity หาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น หรือปริมาณสารที่ทดสอบกับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ ซึ่งเป็นช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยเลือกมาจากความเข้มข้นที่ได้จาก Range ซึ่งจะอยู่ในช่วง 0.050 - 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขยายความเข้มข้น ดังนี้ 0.050 0.075 0.100 0.200 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำมาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน X) กับ response (แกน Y) (ภาพที่ 3) จะพบว่าจากการทำ Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.050 – 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า r $\geq$ 0.995



ภาพที่ 4. กราฟมาตรฐานค่า linearity ของของไดโนทีฟูแรน

2.2 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy)

ความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์หรือการตรวจสอบความแม่นจะสามารถหาได้จากการทำ Accuracy โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้กับวัสดุอ้างอิง จากตัวอย่างเดียวกัน โดยพิจารณาจาก %Recovery ตามสูตรในข้อ 2.2.5 ดำเนินการโดยใช้สารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน 10% W/W สูตร WP ให้มีที่ความเข้มข้น

3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-UV ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ไดโนทีฟูแรน

ลำดับ	Active ingredient content (mg/100 ml)								
	Concn.(0.05 mg/ml)			Concn.(0.10 mg/ml)			Concn.(0.15mg/ml)		
	Origin	Spilke	%Recovery	Origin	Spilke	%Recovery	Origin	Spilke	%Recovery
1	11.40	10.77	99.73	11.40	32.47	100.43	11.40	54.12	98.31
2	11.40	10.77	101.72	11.40	32.47	100.16	11.40	54.12	98.11
3	11.40	10.77	100.100	11.40	32.47	101.31	11.40	54.12	98.58
4	11.40	10.77	102.13	11.40	32.47	100.01	11.40	54.12	98.78
5	11.40	10.77	100.31	11.40	32.47	99.79	11.40	54.12	98.27
6	11.40	10.77	98.12	11.40	32.47	100.32	11.40	54.12	98.46
7	11.40	10.77	98.04	11.40	32.47	99.61	11.40	54.12	98.68
8	11.40	10.77	103.27	11.40	32.47	100.12	11.40	54.12	97.15
9	11.40	10.77	100.68	11.40	32.47	100.15	11.40	54.12	98.87
10	11.40	10.77	102.77	11.40	32.47	99.13	11.40	54.12	98.67
% Recovery		100.73			100.10			98.39	
SD		1.79			0.57			0.49	
% Recovery เฉลี่ย					99.74				

จากการทดลองใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 100.73, 100.10 และ 98.39 ตามลำดับ และได้ค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.74 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง %Recovery เท่ากับ 98 -102 จากการทดลองสารละลายอัตราส่วนของ ไดโนทีฟูแรน ผ่านเกณฑ์ทั้ง 3 ความเข้มข้น

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision/Repeatability and Reproducibility) เป็นการตรวจสอบค่าความใกล้เคียงกันระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูลซ้ำ โดย Precision/Repeatability และ Reproducibility โดยที่ Reproducibility ใช้แลปเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน และทำการทดสอบในวันเดียวกันหรือเป็นการทดลองซ้ำในช่วงเวลาสั้นๆ และการทดสอบ Reproducibility ทำการทดสอบเปรียบเทียบโดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (นิรนาม, 2554) ซึ่งจะแสดงออกในรูป %RSD ของการทดลอง ประเมินโดยใช้ HORRAT equation สามารถคำนวณได้จาก ข้อ 2.3.5 จากการทดลอง ได้ค่า Precision และ Reproducibility ดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 3. การตรวจสอบ Precision/Repeatability ในผลิตภัณฑ์สูตร WP

Number	Concn.(0.05 mg/ml)		Concn.(0.10 mg/ml)		Concn.(0.15mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	50.2	10.35	101.1	10.45	154.1	10.49
2	51.0	10.29	103.0	10.43	153.3	10.100
3	52.8	10.57	101.6	10.48	152.7	10.52
4	50.1	10.41	100.4	10.52	158.0	10.45
5	52.4	10.40	102.3	10.49	149.8	10.53
6	49.6	10.34	102.8	10.45	151.3	10.52
7	55.5	10.40	102.4	10.54	152.4	10.49
8	49.8	10.75	103.9	10.100	153.5	10.45
9	52.6	10.40	104.5	10.47	152.6	10.46
10	50.4	10.42	103.5	10.47	156.0	10.53
Mean	-	10.43	-	10.48	-	10.49
SD		0.13		0.03		0.03
$\%RSD_{exp.}$		1.26		0.32		0.30
Horwitz		2.07		1.87		1.76
HORRAT		0.61		0.17		0.17
HORRAT **เฉลี่ย**			0.32			

จากการวิเคราะห์ค่า Repeatability ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.43 10.48 และ 10.49 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% $RSD_{exp.}$) เท่ากับ 1.26 0.32 และ 0.30 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จากทฤษฎี (% $RSD_{Horwitz.}$) เท่ากับ 2.07, 1.87 และ1.76 ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.61 0.17 และ 0.17 และค่า HORRAT เฉลี่ย 0.32 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT $\leq$2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ

ตารางที่ 4. การตรวจสอบ Reproducibility ในผลิตภัณฑ์สูตร WP

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	50.6	10.58	99.2	10.44	152.9	10.53
2	51.3	10.35	100.3	10.49	153.6	10.52
3	53.0	10.40	105.0	10.45	152.3	10.52
4	49.0	10.49	101.6	10.72	158.5	10.47
5	52.3	10.69	100.1	10.55	156.3	10.57
6	49.3	10.41	102.1	10.54	151.6	10.57
7	56.6	10.52	103.8	10.68	153.2	10.54
8	49.3	10.77	102.0	10.56	153.8	10.45
9	54.6	10.45	103.9	10.53	152.4	10.46
10	50.4	10.51	107.0	10.49	155.5	10.53
Mean	-	10.52	-	10.54	-	10.52
SD		0.13		0.09		0.04
$\%RSD_{exp.}$		1.26		0.88		0.41
Horwitz		2.07		1.87		1.76
HORRAT		0.61		0.47		0.23
HORRAT เฉลี่ย	0.44					

จากการวิเคราะห์ค่า Repeatability ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.52, 10.54 และ 10.52 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ ($\%RSD_{exp.}$) เท่ากับ 1.26, 0.88 และ 0.41 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จากทฤษฎี ($\%RSD_{Horwitz.}$) เท่ากับ 2.07, 1.87 และ1.76 ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.61, 0.47 และ 0.23 และค่า HORRAT เฉลี่ย 0.44 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT $\leq$ 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ

2.4 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness Robustness เป็นคุณสมบัติที่แสดงว่าวิธีทดสอบมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ pH เวลาที่ใช้ และ Ruggedness เป็นคุณสมบัติ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้ภาวะการทดสอบปกติ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนวันที่ทดสอบ สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness และ Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.05 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยการทำ Robustness ได้ทำการเปลี่ยนอัตราส่วน Mobile phase จาก น้ำต่อเมทานอล (70 : 30) เป็นน้ำต่อเมทานอล (80 : 20) และ Robustness ทดลองโดยการเปลี่ยนผู้ทดสอบเป็นนักวิเคราะห์อีกคน ผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์สูตร WP

Number	Concn.(0.05 mg/ml)		Concn.(0.10 mg/ml)		Concn.(0.15 mg/ml)	
	AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)		AI. Content % (w/w)	
	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness
1	10.32	10.45	10.44	10.44	10.49	10.58
2	10.29	10.34	10.43	10.51	10.47	10.51
3	10.48	10.39	10.48	10.44	10.51	10.53
4	10.41	10.48	10.52	10.59	10.44	10.48
5	10.39	10.58	10.49	10.54	10.53	10.56
6	10.35	10.41	10.45	10.53	10.100	10.56
7	10.40	10.48	10.51	10.58	10.48	10.52
8	10.74	10.77	10.48	10.55	10.44	10.44
9	10.39	10.44	10.46	10.53	10.43	10.43
10	10.41	10.47	10.42	10.51	10.51	10.51
Mean	10.42	10.48	10.47	10.52	10.48	10.51
SD	0.13	0.12	0.03	0.05	0.03	0.05
% $RSD_{exp.}$	1.20	1.15	0.32	0.46	0.32	0.45
Horwitz	2.07	2.07	1.87	1.87	1.76	1.76
HORRAT	0.58	0.56	0.17	0.25	0.18	0.26
HORRAT เฉลี่ย Robustness				0.31		
HORRAT เฉลี่ย Ruggedness				0.35		

จากตารางที่ 5 พบว่า สำหรับ Robustness ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.42, 10.47 และ 10.48 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.58, 0.17 และ 0.18 ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.31 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.48, 10.52 และ 10.51 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.56, 0.25 และ 0.26 ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.35 เมื่อพิจารณาจากค่า HORRAT จะพบว่า ทั้ง Robustness/Ruggedness ผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งหมด ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT $\leq$ 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ไดโนทีฟูแรน ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยใช้เทคนิค High Perfomence Liquid Chromatography ใช้ตัวตรวจจับชนิด UV-Detector ด้วย column ชนิด ACE 5 C18-PFP ได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วน Mobile phase น้ำต่อเมทานอล (70 : 30) ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 10 ไมโครลิตร เวลาในการฉีด 4.0 นาที ปริมาณการฉีด 10 ไมโครลิตร การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.025 – 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.050 – 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน ในผลิตภัณฑ์ พบว่า ได้ค่า %recovery เท่ากับ 100.73, 100.10 และ 99.74 และได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 99.74 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98 – 102% สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10% สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.61, 0.17, 0.17 และได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.32 การตรวจสอบค่าความแข็ง Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.61, 0.47, 0.23 และได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.44 ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน โดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวันเวลา (reproducibility) ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.56, 0.25 0.26 และได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.35 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามทั้งสิ้น AOAC (ค่า HORRAT $\leq$ 2) ดั้งนั้น วิธีที่ใช้ตรวจสอบ ไดโนทีฟูแรน ในการทดสอบนี้ที่ดัดแปลงมาจาก วิธีมาตรฐาน CIPAC HANDBOOK Vol. L เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆ ตาม Method Validation ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งสิ้น ดังนั้น วิธีนี้จึงสามารถนำมาเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาร้อยละสารออกฤทธิ์ ไดโนทีฟูแรน ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาคได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาคเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงศัตรูพืช ไดโนทีฟูแรน

2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ ถ่ายทอดให้หน่วยงานราชการให้แก่หน่วยงานอื่นๆ และหน่วยงานเอกชนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไดโนทีฟูแรน เพื่อควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์และผลิตจำหน่ายได้

เอกสารอ้างอิง

จิราพรรณ ทองหยอด และ ณัญจนา ลือตระกูล. 2549. ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคาร์โบฟูแรนในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช. ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2549 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 453 น.

นิรนาม. 2553. เอกสารวิชาการเกษตร การป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2553. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. 303 น.

นิรนาม. 2554. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี เอกสารการฝึกอบรมปฏิบัติการ. ณ สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ. จังหวัดปทุมานี. 28 – 29 กรกฎาคม 2554.

Anonymous. 1993. The Agrochemicals Handbook 3rd. ed. The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.

Dobrat W. and A. Martijn H. 1988. CIPAC Handbook Vol.L : Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, The Black Bear Press, England.

Huber. Ludwig. 1999. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, Illinois. 318 p.

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร สารกำจัดวัชพืช pretilachlor

Method Validation of pretilachlor Pesticide Products

มนัสนันท์ อรชุน พนิดา มงคลวุฒิกุล

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

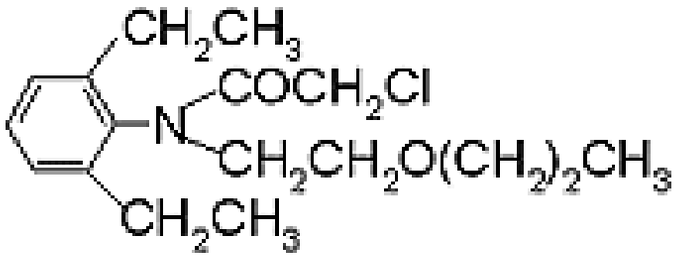
บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (pretilachlor) ดังนี้ ตรวจสอบ Range หรือช่วงที่เป็นเส้นตรงจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.3023 – 2.2686 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.99999 เกณฑ์ยอมรับr > 0.995 ตรวจสอบ Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.3023 – 1.5124 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.99998 เกณฑ์ยอมรับ r > 0.995 ตรวจสอบ Precision ทั้ง 3 ระดับของความเข้มข้น ได้ค่า Horrat = 0.467 การตรวจสอบ Accuracy จากค่าเปอร์เซ็นต์ Recovery ได้ 99.90 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ การประเมินหาค่า Precision ความแตกต่างของวิธีโดยใช้ (GLC) ชนิด FID Column HP-5 ต่างเครื่อง ผลการทดลอง Robustness/Ruggedness ทั้ง 3 ระดับของความเข้มข้น ได้ค่า Horrat เท่ากับ 0.336 การประเมินค่า Precision โดยใช้วิธี HORRAT เกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับค่า HORRAT $\leq$ 2 และ EU, Codex ยอมรับค่า HORRAT < 2 ผลการทดลองยอมรับได้ และสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ pretilachlor ได้ โดยใช้วิธีดังนี้

ใช้เครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID Conditions : Capillary Column HP-5% Phenyl Methyl Siloxane 30 m x 0.32 mm (id) 0.25 µm film thickness Split injection split ration 50 : 1 Helium, Flow rate 2 ml/min, Oven Temperature 250 °C, Injector Temperature 250 °C, Detector Temperature 270 °C, Detector H_2 flow 30.0 ml/min, Air flow 300.0 ml/min, Makeup flow N_2 30.0 ml/min การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ประมาณ 1 mg/ml ละลายด้วย acetone ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันอย่างดี แล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร

การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GLC โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ซ้ำกันหลายๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2% จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ฉีดสารละลายความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

คำนำ



(pretilachlor) มีชื่อทางเคมีว่า Chemical name 2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-N-(2-propoxyethyl) = acetamide มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{17}H_{26}ClNO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 311.9 ประโยชน์ใช้ก่อนวัชพืชงอก (pre-emergence) ในนาหว่าน น้ำตม เพื่อกำจัดวัชพืชใบแคบ ใบกว้างและกก ชนิดต่างๆ ได้แก่ หญ้าข้าวนก หญ้าดอกขาว ผักแว่น ผักปอดนา ขาเขียด แห้วทรงกระเทียม หนวดปลาดุก กกทราย และกกขนาด เป็นต้น

การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช ที่ได้ค่าผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำนั้น จำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม วิธีวิเคราะห์บางวิธีที่พบ อยู่ในเอกสารเผยแพร่ ถ้าห้องปฏิบัติการมีเครื่องมือวิเคราะห์พร้อมก็สามารถทำตามวิธีมาตรฐานนั้นได้ แต่บางวิธีวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ไม่มีเครื่องมือพร้อมที่จะทำตาม วิธีนั้นได้หรือไม่มีวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาพัฒนา วิธีวิเคราะห์ขึ้นมาใหม่ เพื่อสะดวกกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการ และได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำจำเป็นต้อง มีการศึกษาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สำหรับนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID 2 เครื่อง
2. capillary column HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane 30 m x 0.32 mm (id) 0.25 µm film thickness
3. เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 4 หรือ 5 ตำแหน่ง ($\pm$0.1 mg) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath และ ปิเปตขนาด 2, 3, 4, 5,10 ml
5. Volumetric flask ขนาด 10, 25, 100 ml ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว

สารเคมี

1. Acetone ชนิด GR grade
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (pretilachlor)
3. สารมาตรฐาน (Standard pretilachlor)
4. สาร (pretilachlor) ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical grade)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID

Conditions : Capillary Column HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane 30 m. x 0.32 mm. (id) 0.25 µm film thickness Split injection split ration 50 : 1 Flow rate 2 ml/min

Oven Temperature	: 250 °C	Detector	: H_2 flow 30.0 ml/min
Injector Temperature	: 250 °C	Air flow	: 300.0 ml/min
Detector Temperature	: 270 °C	Makeup flow N_2	: 30.0 ml/min

2. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade

เนื่องจากสารมาตรฐาน (pretilachlor) มีปริมาณน้อยและ ราคาแพง ไม่เพียงพอที่จะนำมาทำ Method Validation จึงใช้สาร Technical grade แทน โดยการใช้สารมาตรฐาน (pretilachlor) เป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร (Technical pretilachlor)

2.1 ชั่งสาร Standard pretilachlor 2 ซ้ำ (Ca1, Ca2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 25 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด10 ml เติม Acetone 5 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 10 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี

2.2 ชั่งสาร Technical grade 10 ซ้ำ (TC1-TC10) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 25 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml เติมสารละลาย Acetone 15 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุกแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 - 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 25 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดีแล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร

2.3 การฉีดสารมาตรฐาน (pretilachlor) และสาร Technical grade เข้าเครื่อง GLC โดยตั้ง sequence ในการ ฉีดดังนี้ Ca1, TC1, TC2, Ca2, TC3, TC4, Ca1, TC5, TC6, Ca2…TC10 แล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร โดยการฉีดความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

การฉีดสารเข้าเครื่อง GLC โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ซ้ำกันหลายๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2% จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

2.4 คำนวณค่า response factor (fi) ตามสูตร

$$fi = \frac{S \times P}{Hs}$$

เมื่อ fi = ค่า response factor ของสารมาตรฐาน

Hs = พื้นที่ใต้ peak ของ (pretilachlor) ในสารมาตรฐาน

S = น้ำหนักของ (pretilachlor)ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (pretilachlor) (%)

2.5 หาค่าเปอร์เซ็นต์ของสารออกฤทธิ์ (pretilachlor) จากสูตรดังนี้

$$\text{(pretilachlor) content} = \frac{Hw \times f}{w}$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ (pretilachlor)ในสารละลายตัวอย่าง(มก.)

f = ค่าเฉลี่ย response factor

w = น้ำหนักของ (pretilachlor)ในสารละลาย ตัวอย่าง(มก.)

2.6 นำค่าเปอร์เซ็นต์ของ Technical grade หรือตัวอย่าง (mg) ที่ได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ย จะได้เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของ Technical grade หรือตัวอย่าง (mg)

3. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness เพื่อหาค่าความต่าง โดยใช้ Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID Conditions : Capillary Column HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane 30 m x 0.32 mm (id) 0.25 µm film thickness Split injection split ration 50 : 1 Flow rate 2 ml/min

Oven Temperature 250°C	Detector H_2 flow 30.0 ml/min
Injector Temperature 250°C	Air flow 300.0 ml/min
Detector Temperature 270°C	Makeup flow N_2 30.0 ml/min

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุมีพิษ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตารางที่ 1. เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Technical grade

สารละลาย Technical grade	**เปอร์เซ็นต์ของสาร** Technical grade
TC1	95.57
TC2	95.71
TC3	95.66
TC4	95.68
TC5	95.56
TC6	95.34
TC7	95.45
TC8	95.40
TC9	95.34
TC10	95.66
เฉลี่ย	**95.537**
SD.	**0.144**
%RSD	**0.151**

ตารางที่ 2. เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร ตัวอย่าง (pretilachlor)

สารละลาย (pretilachlor)	**เปอร์เซ็นต์ของสาร** (pretilachlor)
1	30.85
2	30.59
3	30.66
4	30.98
5	30.99
6	30.94
7	30.52
8	30.74
9	30.56
10	30.87
เฉลี่ย	**30.77**
SD.	**0.179**
%RSD	**0.583**

ตารางที่ 3. การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.		ความเข้มข้น 1.0 มก./มล.		ความเข้มข้น 1.5 มก./มล.	
	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ
1	46.2	30.26	89.2	30.85	126.7	30.68
2	50.0	30.41	94.5	30.59	111.2	30.83
3	43.9	30.83	81.1	30.66	116.4	30.52
4	47.0	30.34	91.5	30.98	121.5	30.40
5	46.6	30.24	92.0	30.99	126.4	30.46
6	49.1	30.74	82.8	30.94	133.4	30.47
7	50.8	30.19	82.5	30.52	128.1	30.47
8	43.1	30.81	84.0	30.74	113.0	30.57
9	40.7	30.68	82.7	30.56	101.5	30.35
10	52.4	30.44	87.3	30.87	125.2	30.50
mean		**30.49**		**30.77**		**30.53**
SD		**0.248**		**0.179**		**0.139**

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$\overline{X} = 30.596$ และได้ค่า SD = 0.226

คำนวณ %RSD ตามสูตร $\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.226 \times 100}{30.596} = 0.737$$

การประเมิน Precision โดยใช้ (HORRAT) $HORRAT = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร RSD $= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$

เมื่อค่า C = Concentration ration ได้ค่า = 0.300

% RSD $= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$ ได้ค่า = 1.578

$HORRAT = \frac{0.737}{1.578}$ ได้ค่า = 0.467

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.467

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ pretilachlor ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4. การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Reproducibility)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.		ความเข้มข้น 1.0 มก./มล.		ความเข้มข้น 1.5 มก./มล.	
	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ
1	53.2	31.81	90.0	31.76	128.9	31.84
2	48.7	31.74	88.0	32.53	130.6	32.48
3	51.1	31.02	85.0	32.28	125.6	32.51
4	44.7	31.00	89.0	32.12	129.2	31.96
5	54.3	32.10	89.6	31.57	127.5	32.07
6	53.4	32.14	92.5	32.13	129.1	32.32
7	59.4	31.78	87.2	31.22	125.3	31.75
8	52.3	31.69	89.2	31.12	128.3	31.81
9	55.3	31.41	91.4	31.58	129.8	31.42
10	48.5	31.57	89.4	31.33	125.5	31.06
mean		31.63		31.76		31.92
SD		0.391		0.481		0.457

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$\overline{X} = 31.77$ และได้ค่า SD = 0.446

คำนวณ %RSD ตามสูตร $\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.446 \times 100}{31.77} = 1.404$$

การประเมิน Precision โดยใช้ (HORRAT) $HORRAT = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร $RSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$

เมื่อค่า C = Concentration ration ได้ค่า = 0.300

$\% RSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$ ได้ค่า = 1.578

$HORRAT = \frac{1.404}{1.578}$ ได้ค่า = 0.889

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.889

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ pretilachlor ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5. การหา Precision ตรวจสอบการทวนซ้ำ Robustness / Ruggedness ที่ 3 ความเข้มข้น

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 มก./มล.		ความเข้มข้น 1.0 มก./มล.		ความเข้มข้น 1.5 มก./มล.	
	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง มก./มล.	% ที่ตรวจพบ
1	50.0	30.76	94.5	30.62	126.7	30.84
2	43.9	30.46	91.5	30.63	120.8	30.69
3	47.0	30.87	81.1	30.68	111.2	30.57
4	46.6	30.59	82.1	30.90	129.4	30.74
5	51.4	30.80	92.0	30.86	116.4	30.80
6	49.1	30.86	82.8	30.97	121.5	30.74
7	50.8	30.68	82.5	30.85	133.4	30.73
8	43.1	30.32	84.0	30.80	113.0	30.76
9	48.2	30.30	82.7	30.71	101.5	30.66
10	40.7	30.64	87.3	30.98	115.5	30.83
mean		30.628		30.80		30.74
SD		0.209		0.134		0.081

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness / Ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำโดยเปลี่ยนเครื่องมือ ซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$\overline{X}$ = 30.721 และได้ค่า SD = 0.163

คำนวณ %RSD ตามสูตร $\%RSD = \frac{SD \times 100}{\overline{X}}$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.163 \times 100}{30.721} = 0.530$$

การประเมิน Precision โดยใช้ (HORRAT) $HORRAT = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร RSD $= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$

เมื่อค่า C = Concentration ration ได้ค่า = 0.300

$$\% \text{ RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \text{ ได้ค่า } = 1.578$$

$$\text{HORRAT} = \frac{0.530}{1.578} \text{ ได้ค่า } = 0.336$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness/Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.87

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ HORRAT < 2 และ EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ pretilachlor ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6. ตรวจสอบ %Recovery

N	AI content (mg/ 25 ml)								
	Conc.added (3.0 mg)			Conc. added (9.0 mg)			Conc. added (15.0 mg)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	13.48	16.42	3.00	13.69	22.55	9.00	13.49	28.69	15.01
2	13.40	16.39	3.00	13.74	22.66	9.00	13.42	28.95	15.01
3	13.44	16.43	3.00	13.94	22.49	9.00	13.46	28.99	15.01
4	13.45	16.55	3.00	13.79	22.28	9.00	13.52	28.99	15.01
5	13.50	16.46	3.00	13.82	22.79	9.00	13.52	28.99	15.01
6	13.51	16.34	3.00	13.83	22.53	9.00	13.50	28.68	15.01
7	13.49	16.29	3.00	13.76	22.77	9.00	13.66	28.72	15.01
8	13.64	16.56	3.00	13.84	22.77	9.00	13.42	28.78	15.01
9	13.40	16.53	3.00	13.81	22.80	9.00	13.54	28.62	15.01
10	13.52	16.60	3.00	13.72	22.81	9.00	13.40	28.59	15.01
mean	13.48	16.46	3.00	13.79	22.65	9.00	13.50	28.80	
SD	0.070	.102		0.715	0.177		0.070	0.162	
%RSD	.517	0.618		0.519	0.783		0.521	.563	
%Recovery			99.33			98.44			101.93

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc}_{\text{spiked sample}} - \text{Conc}_{\text{original sample}})}{\text{Conc}_{\text{added}}} \times 100$$

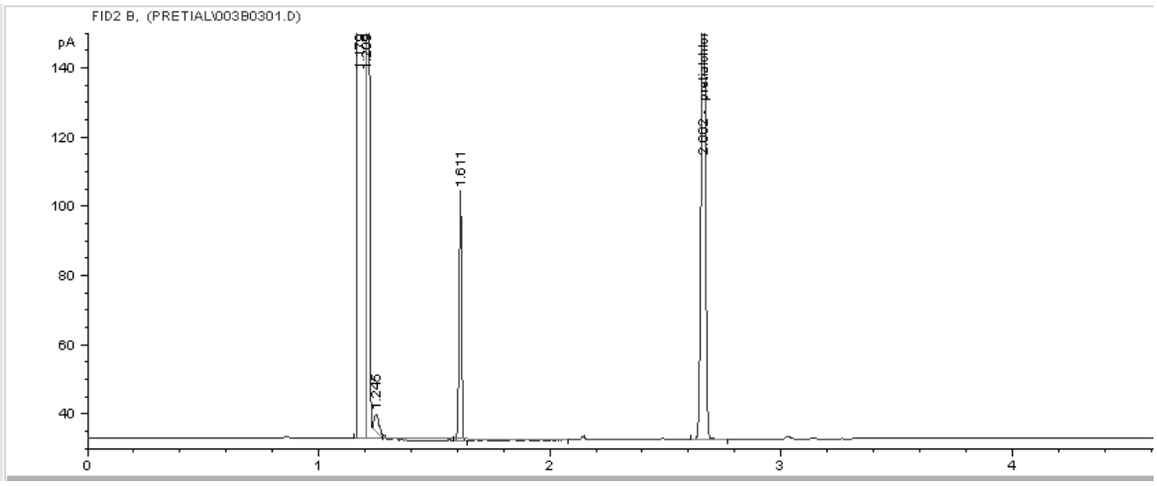
$$\%\text{Recovery ที่ความเข้มข้น ต่ำ} = \frac{16.46 - 13.48}{3.00} \times 100 = 99.33$$

$$\%\text{Recovery ที่ความเข้มข้น กลาง} = \frac{22.65 - 13.79}{9.00} \times 100 = 98.44$$

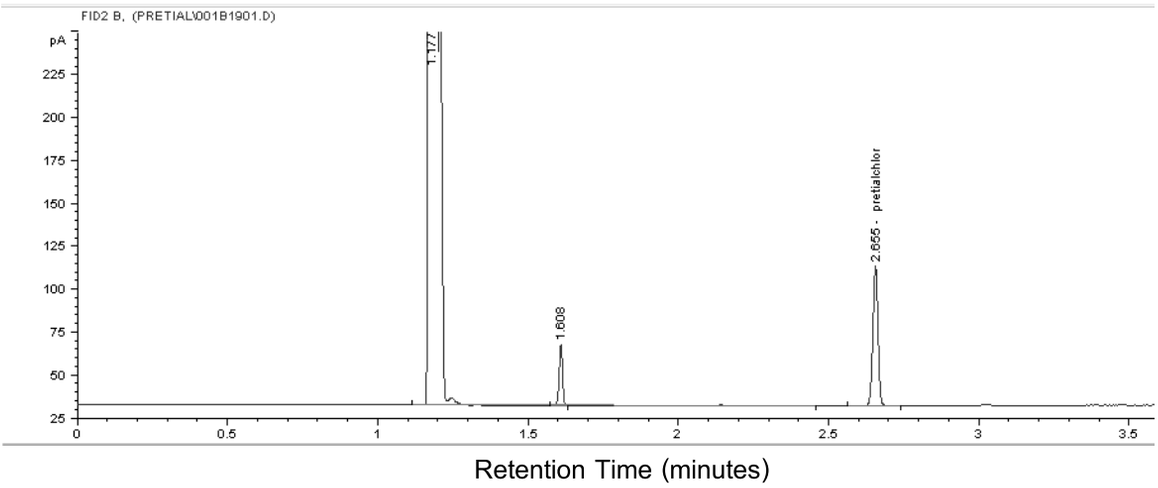
$$\%\text{Recovery ที่ความเข้มข้น สูง} = \frac{28.80 - 13.50}{15.01} \times 100 = 101.93$$

%Recovery เฉลี่ย = 99.9

เกณฑ์ยอมรับ 98 – 102



รูปที่ 1. Chromatogram of Standard solution



รูปที่ 2. Chromatogram of Sample solution

1. ตรวจสอบ Range ดังแสดงในรูปที่ 3

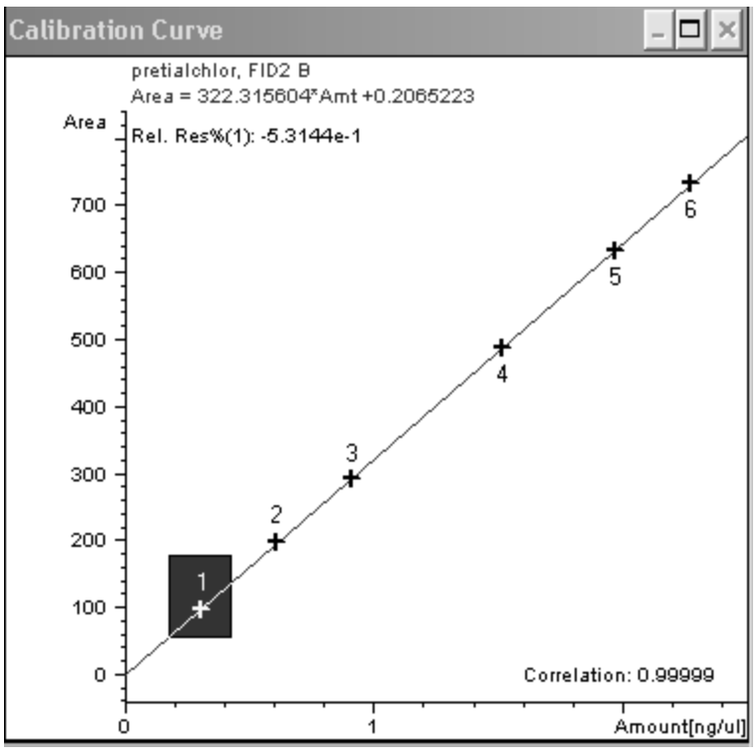
1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนและมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ 6 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน เช่น 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วเติมสารละลายacetone 15 ml เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร 25 ml เขย่าให้เข้ากัน

1.2 ฉีดสารละลายในข้อ 1.1 เข้าเครื่อง GLC ชนิด FID

1.3 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน X) กับ response (แกน Y)

1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.3023 – 2.2686 mg/ml ของ (pretilachlor)	
mg/ml	Area
0.3023	97.18133
0.6049	197.28212
0.9074	291.55023
1.5124	487.58417
1.9661	632.35504
2.2686	732.80469



รูปที่ 3. Range ที่ความเข้มข้น 0.3023, 0.6049, 0.9074, 1.5124, 1.9661, 2.2686 mg/ml ของ (pretilachlor)

2. ตรวจสอบ Linearity ดังแสดงในรูปที่ 4

2.1 เลือกความเข้มข้นจาก range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

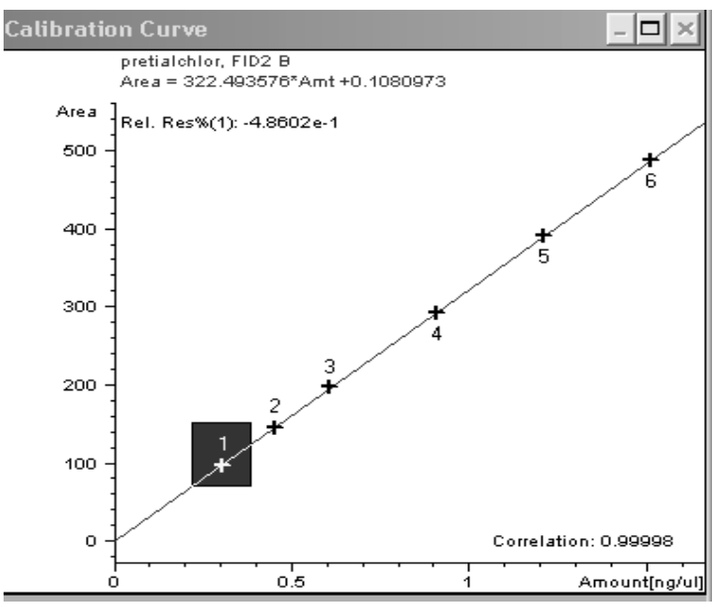
2.2 เตรียมสารละลาย Technical grade ให้มีความเข้มข้น 6 ความเข้มข้น ให้อยู่ในช่วงที่เลือกไว้

2.3 ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GLC ชนิด FID

2.4 Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Technical grade (แกน X) กับ response (แกน Y)

2.5 คำนวณหาค่า correlation coefficient (r) $r \geq 0.995$

การหา Linearity ที่ความเข้มข้น 0.4032– 1.2096 mg/ml ของ pretilachlor	
mg/ml	Area
0.3023	97.18133
0.4537	145.93674
0.6048	197.28212
0.9074	291.55023
1.2099	398.58960
1.5124	487.58417



รูปที่ 4. Linearity ที่ความเข้มข้น 0.3023, 0.4537, 0.6048, 0.9074, 1.2099, 1.5124 mg/ml ของ (pretilachlor)

3. ตรวจสอบ Precision

3.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง (pretilachlor) ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ที่ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงการ ทดสอบ 3 ความเข้มข้นๆ ละ อย่างน้อย 10 ซ้ำ

3.2 คำนวณค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) และ SD ของผลการทดสอบ

3.3 คำนวณ % RSD ตามสูตร

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{X} \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณ เช่น $\% \text{ RSD} = \frac{0.144}{95.537} \times 100 = 0.151$

3.4 ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

3.5 คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

C = Concentration ratio(0.300%)

$= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.306)}$

$= 0.66 \times 2^{1.2571}$

$= 0.66 \times 2.39025$

% RSD = 1.578

$$\text{HORRAT} = \frac{0.737}{1.578} = 0.467$$

3.6 เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

4. ตรวจสอบหา % Recovery เพื่อประเมินค่า Accuracy (จากตารางที่ 5)

$$\%\ \text{Recovery เฉลี่ย} = \frac{99.33 + 98.44 + 101.93}{3} = 99.90$$

เกณฑ์ยอมรับ 98 – 102

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade 95 % w/w ค่าที่ได้ = 95.53% w/w

2. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของตัวอย่าง (pretilachlor) ค่าที่ได้ = 30.77% w/w

3. ตรวจสอบ Range หรือช่วงที่เป็นเส้นตรง จะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.3023-2.2686 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient ® (r) = 0.99999 เกณฑ์ยอมรับ $r \geq 0.995$

4. ตรวจสอบ Linearity ได้ค่าcorrelation coefficient®(r)=0.99998 เกณฑ์ยอมรับ $r \geq 0.995$

5. ตรวจสอบ Repeatability ที่ 3 ความเข้มข้นได้ค่า HORRAT = 0.467 เกณฑ์ยอมรับ ≤ 2 ตรวจสอบ Reproducibility ที่ 3 ความเข้มข้นได้ค่า HORRAT = 0.889เกณฑ์ยอมรับ ≤ 2

6. ตรวจสอบ Accuracy จากค่าเปอร์เซ็นต์ Recoveryได้ 99.90 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

7. การหาค่าความแตกต่างของวิธี (Robustness/Ruggedness) โดยใช้ GC-FIDต่าง เครื่องกัน การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT ได้ค่าเท่ากับ 0.336

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

8. สรุปวิธีที่นำไปใช้วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ (pretilachlor) โดยใช้วิธีการดังนี้

Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID Conditions : Capillary Column HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane 30 m x 0.32 mm (id) 0.25 µm film thickness Split injection split ration 50 : 1 Flow rate 2 ml/min

Oven Temperature 250°C Detector H_2 flow 30.0 ml/min

Injector Temperature 250°C Air flow 300.0 ml/min

Detector Temperature 270°C Makeup flow N_2 30.0 ml/min

Retention Time ประมาณ 2.665 min

การเตรียมสารมาตรฐาน (pretilachlor) 2 ซ้ำ (Ca1, Ca2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 ml เติม Acetone 5 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุกแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 10 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดีแล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร

การเตรียมสารตัวอย่าง (pretilachlor) 2 ซ้ำ (S1, S2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 ml เติม Acetone 5 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุกแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 10 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดีแล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร

การฉีดสารเข้าเครื่อง GLC โดยฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำกันหลายๆ ครั้ง จนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2% จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ฉีดสารละลายความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ 2. สามารถเผยแพร่และเป็นที่ยอมรับระดับสากล

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ดุษฎี มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation), เอกสารประกอบการฝึกอบรมกรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรมวิทยาศาสตร์บริการ

นิรนาม. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

สถาบันอาหาร. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี, เอกสารประกอบการอบรมสัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร.

Kidd, H. and D.R. James (Eds). 1993. The Agrochemicals Handbook. 3rd. ed. Royal Society of Chemistry, England.

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม neonicotinoid ในผลไม้

Development and method validation of neonicotinoid pesticide residues in fruit

วิทยา บัวศรี ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล ศศิมา มั่งนิมิตร์

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มนีโอนิโคตินอยด์ (neonicotinoid) ในผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS ทำการตรวจสอบความใช้โดยใช้เครื่องมือ 2 ชนิด คือ HPLC UV-detector และ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ โดยเลือกตัวอย่างมะม่วงซึ่งเป็นตัวแทนของผลไม้ ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง HPLC UV-detector สาร acetamiprid, chlothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid และ thaimethoxam สารอนุพันธ์ของ imidacloprid คือ 6-chloronicotinic acid ซึ่งอนุพันธ์ตัวอื่นไม่สามารถวิเคราะห์เป็น multi residue ได้ พบว่ามีค่า Linearity/working range อยู่ในช่วง 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 74-110% มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในมะม่วงด้วย LC-MS/MS ได้วิเคราะห์สาร acetamiprid, chlothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid และ thaimethoxam สารอนุพันธ์ของ imidacloprid จำนวน 5 สาร คือ imidacloprid-dihydroxy, imidacloprid-5-hydroxy, imidacloprid-olefin, imidacloprid-urea และ 6-chloronicotinic acid ซึ่งวิธีนี้สามารถวิเคราะห์สารอนุพันธ์ของ imidacloprid ได้ทุกสาร พบว่ามีค่า Linearity/working range อยู่ในช่วง 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 67-109% จะเห็นได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV-detector มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ของ imidacloprid ซึ่งทำให้ไม่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้อย่างถูกต้องตาม residue definition หากแต่วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์สารกลุ่ม neonicotinoid ทุกสารและอนุพันธ์ของ imidacloprid ได้ทุกสาร

คำนำ

สารในกลุ่มนีโอนิโคตินอยด์ ได้แก่ สารฆ่าแมลง acetameprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid และ thiamethoxam เป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoids, chloronicotinyl insecticides เป็นสารออกฤทธิ์ดูดซึม และมีพิษต่ำต่อสัตว์เลือดอุ่น Mode of action จะทำลายระบบประสาทของแมลงโดยไปขัดขวางจุดรับกระแสประสาทของแมลงตรงส่วนที่เรียกว่า nicotinic acetylcholine receptor มีความเฉพาะเจาะจงสูงในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว และเพลี้ยจักจั่น นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพ

ในการป้องกันกำจัดแมลงชนิดอื่นๆ ทั้งในอันดับ Homoptera, Hemiptera, Coleoptera และ Lepidotera ได้หลายชนิด (Hirotakg Obana. And ect., 2002)

ค่าครึ่งชีวิตของสารกลุ่มนี้ประมาณ 34 วัน หากถูกแสงแดด และหากถูกดูดเข้าไปในต้นพืชหรือตกค้างอยู่ในดินโดยไม่ถูกแสงแดดเข้าทำลาย จะสามารถอยู่ได้ถึง 1,386 วัน หรือประมาณ 3.8 ปี และผลการศึกษาจากบางแหล่งพบว่าสามารถสะสมในห่วงโซ่อาหารและในสัตว์น้ำได้ด้วย ทั้งนี้มีค่า LD_{50} ทางปากสำหรับหนู (rat) อยู่ที่ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งโดยทั่วไปอัตราการใช้ของสารกลุ่มนี้จะอยู่ระหว่าง 90-220 กิโลกรัมต่อไร่ สารกลุ่มนี้ที่ใช้ในการเกษตรอย่างแพร่หลาย คือ imidacloprid มีสูตรทางเคมี คือ $C_9H_{15}ClN_5O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 255.661 เป็นผลึกไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ความหนาแน่น 1.54 ที่อุณหภูมิ 25 °C จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 144 °C ความสามารถในการละลายได้ในน้ำที่ 0.61 กรัมต่อลิตร ค่า LD_{50} ทางปากสำหรับหนู (rat) อยู่ที่ 450 สำหรับ (mouse) อยู่ที่ 98 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LC_{50} ทางการสูดดมสำหรับหนู (rat) มากกว่า 5,323 มิลลิลิตรต่อลูกบาศก์เมตร และค่า LD_{50} ทางผิวหนังสำหรับหนู (rat) มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลความเป็นพิษเชิงนิเวศวิทยา พบว่า ค่า LC_{50} ของปลาเรนโบว์เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ระยะเวลา 98 ชั่วโมง อยู่ที่ 211 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่วนปลาชนิดอื่นๆ ระยะเวลาเท่ากันอยู่ที่ 237 มิลลิลิตรต่อลิตร (zywitz, Anastassiades and Scherbaum, 2004)

สารในกลุ่มนีโอนิโคตินอยด์นี้เกษตรกรมีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาสารในกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชจำพวกปากดูดหลายชนิด เป็นเหตุให้เกษตรกรนิยมใช้และมีการพ่นสารติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้แมลงได้รับการคัดเลือกสารกลุ่มดังกล่าวหลายชั่วอายุ แล้วสร้างความต้านทานต่อสารกลุ่มนี้ โดยเฉพาะสาร imidacloprid ที่วางจำหน่ายชนิดแรก แล้วสร้างความต้านทานข้ามกลุ่มไปสู่สารอนุพันธ์ตัวอื่น เช่น thiamethoxam และ dinotefuran ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกัน (Ralf Schoning and Richard Scheruck, 2003)

สารเคมีกลุ่มดังกล่าวจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และที่แก้ไขเพิ่มเติม โดยมีหน่วยงานที่รับผิดชอบกำกับดูแลรวมสามหน่วยงาน คือ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา สำหรับใช้ในทางสาธารณสุข กรมปศุสัตว์ สำหรับการใช้ในการปศุสัตว์ และกรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้ในการควบคุมกำจัดศัตรูพืช ซึ่งเป็นวัตถุอันตรายที่การผลิต การนำเข้า การส่งออก และการมีไว้ในครอบครองต้องได้รับใบอนุญาต และอยู่ภายใต้ภาคผนวกที่ 6 (Annex VI) ของกฎหมายสหภาพยุโรปว่าด้วยการจำแนก การติดฉลาก และบรรจุภัณฑ์ของสารเคมีและเคมีภัณฑ์

เนื่องจากการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid insecticide ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญมีปริมาณการนำเข้าที่สูงมาก และมีคำแนะนำการให้ใช้ตามเอกสารคำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช 2553 กับพืชหลายชนิด โดยเฉพาะสาร imidacloprid ซึ่งตาม residue definition กล่าวว่าการวิเคราะห์สาร imidacloprid ต้องรวมอนุพันธ์ของสารตัวนี้ด้วย เป็นการยากที่จะสั่งซื้ออนุพันธ์ของสาร imidacloprid ที่มีราคาสูงมากเมื่อเทียบกับปริมาณและใช้ระยะเวลาในการนำเข้านาน หากพิจารณาถึงความสำคัญของมาตรฐานห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC17025 : 2005 ที่ได้รับการรับรองมาแล้วนั้น หากลูกค้าร้องขอให้วิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มดังกล่าว ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีวิธีการที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้และมีสารมาตรฐานไว้รองรับให้เพียงพอต่อความต้องการลูกค้า ห้องปฏิบัติการจึงได้กำหนดให้ต้องดำเนินการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ

วัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้อง แม่นยำ ตามหลักสากล และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในผลไม้นี้ขึ้น

วิธีดำเนินการ

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 Teflon centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.2 Micro centrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.3 Auto sampler vials for HPLC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

1.4 Auto pipette ขนาด 0.1-1 มิลลิลิตร

1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง

1.6 เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor) และ Vortex mixer

1.7 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder

2. สารเคมี

2.1 สารมาตรฐานกลุ่ม neonicotinoid ได้แก่ acetamiprid 99%, chlothianidin 99.5%, dinotefuran 99.5%, imidacloprid 99%, thiacloprid 98% และ thaimethoxam 99% สารมาตรฐานอนุพันธ์ของ imidacloprid ได้แก่ 6-chloronicotinic acid 99.5%, olefin 97.9%, 5-hydroxy 96.7%, dihydoxy 92% และ urea 99.4%

2.2 Acetonitrile, Hexane, Methanol, Ultrapure water, และ Toluene ชนิด Pesticide grade (J.T baker)

2.3 Anhydrous Magnesium sulfate (ACS powder-Fisher) เผาที่ 500 °C นาน 5 ชั่วโมง

2.4 Sodium chloride (NaCl) ชนิด Analytical grade (Merck)

2.5 SPE sorbent ชนิด Primary-Secondary-Amine (PSA varian)

2.6 Graphite Carbon Black (GCB)

3. วิธีการ

3.1 วางแผนการดำเนินการ

3.1.1 ศึกษาข้อมูลและวิธีการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบทดสอบค่าที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ ได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) (กนกพร และทิพวรรณ, 2547)

3.1.2 วางแผนการทดลอง ค้นคว้าจากเอกสารรายงานผลการทดลองที่ผ่านมา และเอกสารวิธีทดสอบ ได้แก่ วิธี HPLC UV detector และ LC-MS/MS

3.1.3 หาข้อมูลสารพิษกลุ่ม neonicotinoid insecticide ประกอบด้วย acetameprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid & methabolite (Alaa Kamel. 2010), thiacloprid, thiamethoxam และเอกสารการใช้จากเอกสารคำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช (2553)

3.1.4 เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำการทดสอบ ได้แก่ separatory funnel, funnel, round bottom flask, Erlenmeyer flask, hexane, ethyl acetate, acetone, dichloromethane, anhydrous sodium sulfate

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution

3.2.1 เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม neonicotinoid โดยชั่งสารมาตรฐานให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำค่า %purity มาคำนวณกลับเป็นน้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ toluene PR grade เป็นตัวทำละลาย

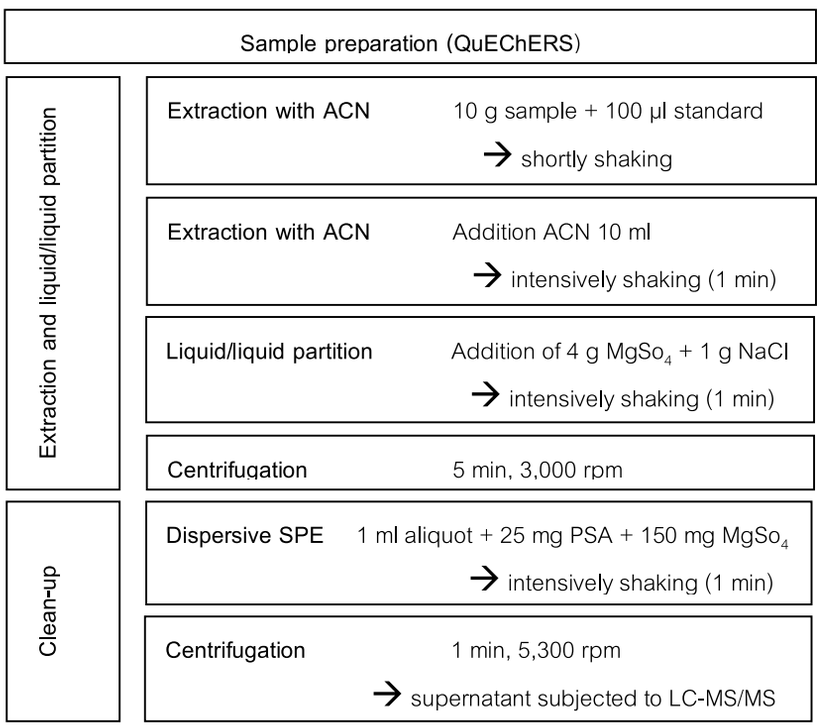
3.2.2 เตรียม intermediate solution ของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม neonicotinoid แต่ละชนิด จากข้อ 3.2.1 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลาย

3.2.3 เตรียม mix neonicotinoid spike solution จาก intermediate solution ให้ได้ความเข้มข้นของ mix neonicotinoid spike solution เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.2.4 เตรียม mix calibration standard solution เตรียมจากเจือจาง mix neonicotinoid spike solution ด้วยสารสกัดมะม่วงใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้นระดับ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3.3 การสกัดตัวอย่าง

ดำเนินการเตรียมและสกัดตัวอย่างตามวิธีการ QuEChERS multi-residue method (Anasstasiades, 2003), (Lechotay, 2007) ดังนี้



แผนภาพที่ 1. ขั้นตอนวิธี QuEChERS multi-residue method นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดตัวอย่างที่บรรจุอยู่ในขวด HPLC-vial นำไปด้วยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV-detector และเครื่อง LC-MS/MS

3.3.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) UV parameter for *neonicotinoid*

1. Instrument : Agilent Technologies 1200 series
2. Detector : UV wavelength 270 nm.
3. Column : Lichrospher®60 RP-select B (5µm)
4. Mobile phase : gradient elution methanol : 0.05 M KH_2PO_4
5. Flow rate : 0.8 ml/min
6. Inject volume : 10 µl
7. Stop time : 35 min.
8. Column temp. : 50^{O}C

3.3.2 LC-MS/MS determination for *neonicotinoid*

1. Equipment : LC-MS/MS Agilent 1100 series
2. Column : Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 x 75 mm, 1.8 µm
3. Mobile phase :
   a. A : 5 mM CH_5NO_2
   b. B : ACN
   c. Time table:

time (min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
3.00	95	5
4.00	60	40
6.00	60	40
7.00	5	95
9.00	5	95
10.00	95	5

4. Flow: 0.4 ml/min, Temp. 40^{O}C, Injection volume: 5 µl

3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์และทดสอบ Range, Linearity, Accuracy, Precision, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ) ที่กำหนดการตรวจสอบ parameter ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) (ISO/IEC17025 : 2005) ได้แก่

3.4.1 linearity/working range

linearity เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารมา plot เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ส่วน range เป็นค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้

ต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่อยู่ใน linearity ซึ่งมี ค่า accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการทดสอบ linearity/working range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างอย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ (สถาบันอาหาร, 2547)

3.4.2 accuracy/precision การทดสอบ accuracy โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) ของวัตถุมีพิษที่เติมลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับ คือ สูง กลาง และต่ำ ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยนำผลการวิเคราะห์ accuracy มาหา %RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบ %RSD ที่ได้จากการทดลองกับ Predicted Horwitz RSD ของ repeatability ซึ่ง Predicted Horwitz RSD มีสูตรคำนวณ(Horwitz, W., 2000) ดังนี้

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66x2^{(1-0.5\log C)}$$

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของวัตถุมีพิษในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์ (เช่น 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, $C= 0.5x10^{-6}$)

3.4.3 Limit of Detection (LOD) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องพิสูจน์ accuracy และ precision โดยค่า LOD = 3SD และ ค่าสัญญาณการวัดต้องมีค่า signal to noise ratio $\geq$ 3 ทำการประมาณค่า LOD จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ (ดุษฎี และ อุมาพร, 2544)

3.4.4 Limit of Quantitation (LOQ) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยมีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยค่า LOQ = 10 SD (SD ; standard deviation ของความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำการทดสอบ) ทำการประมาณค่า LOQ จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ (ทิพวรรณ, 2549)

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 - กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ : กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในมะม่วงซึ่งเป็นตัวแทนของผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS เพื่อเลือกเป็นวิธีการในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง HPLC UV-detector และ LC-MS/MS โดยตรวจสอบ parameter ต่างๆ ได้แก่ linearity, working range, LOD, LOQ, precision และ accuracy โดยมีเกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

parameter	criteria	
linearity	$R^2 \geq 0.995$	
working range	$R^2 \geq 0.995$ % recovery = 50-120 (≤ 1 µg/kg), 60-120 (> 1 ug/kg ≤ 0.01 ug/kg)	
LOD	LOD= 3SD และ S/N ≥ 3	
LOQ	LOQ = 10 SD	
precision	HORRAT ≤ 2	
accuracy	conc. (mg//kg)	% recovery
	≤ 1µg/kg	50-120
	> 1µg/kg ≤ 0.1 mg//kg	60-120
	> 0.01มก./กก. ≤ 0.1 mg//kg	70-110
	> 1 mg//kg	70-110

1. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในมะม่วงด้วย HPLC UV-detector

ตัวอย่างซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid

ดำเนินการทำการวิเคราะห์และทดสอบสารพิษมาตรฐานกลุ่ม neonicotinoid insecticide ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) HPLC-UV parameter ได้ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร acetamiprid, chlothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid และ thaimethoxam สารอนุพันธ์ของ imidacloprid คือ 6-chloronicotinic acid ซึ่งอนุพันธ์ตัวอื่นไม่สามารถวิเคราะห์เป็น multi residue โดยใช้เครื่อง HPLC-UV detecter ได้ ซึ่งตรวจสอบ parameter ต่างๆ แล้วพบว่าให้ค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ด้วย HPLC-UV detector

Analyte	RT (min)	Linearity/ working range	R^2	Accuracy %recovery	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
acetamiprid	16.966	0.01-2.0	0.9995	92 – 105	0.005	0.01
chlothianidin	13.619	0.01-2.0	0.9994	85 – 102	0.005	0.01
dinotefuran	10.100	0.01-2.0	0.9997	81 – 101	0.005	0.01
imidacloprid	13.781	0.01-2.0	0.9992	86 – 110	0.005	0.01
thiacloprid	17.377	0.01-2.0	0.9998	95 – 101	0.005	0.01
thaimethoxam	12.327	0.01-2.0	0.9995	85 – 107	0.005	0.01
6-chloronicotinic acid	8.432	0.01-2.0	0.9993	74 – 82	0.005	0.01

1.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า มีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9992-0.9998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า $R^2 \geq 0.995$ และ % recovery 74 -110 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery ในช่วง 70-110

ตารางที่ 3. ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างมะม่วงจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Analyte	conc. (mg//kg)											
	0.01				0.1				0.5			
	%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT
acetamiprid	88.4	96.1	2.65	0.50	95.5	102.2	2.58	0.69	100.2	108.7	2.89	0.99
chlothianidin	76.1	97.0	6.44	1.22	87.6	98.3	3.12	0.84	98.5	100.5	0.64	0.22
dinotefuran	76.3	91.6	6.29	1.19	82.5	95.5	4.89	1.31	88.7	99.5	3.67	1.25
imidacloprid	80.0	96.3	5.07	0.96	91.3	100.7	3.33	0.89	95.8	106.8	3.27	1.12
thiacloprid	76.2	96.2	6.51	1.23	87.6	98.8	3.44	0.92	98.1	104.4	1.80	0.62
thaimethoxam	81.4	91.3	4.65	0.88	87.2	98.4	4.22	1.13	93.1	105.6	4.22	1.44
6-chloronicotinic acid	79.8	90.7	5.50	1.40	80.6	91.7	4.20	1.12	80.0	96.3	5.53	1.89

1.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า %recovery ในช่วง 76.1 - 108.7 มี %RSD ในช่วง 0.64 - 6.51 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.22 - 1.89 (ตารางที่ 3) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %recovery ในช่วง 70 - 110 และมีค่า HORRAT ≤ 2

1.3 LOD และ LOQ พบว่า LOD มีความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในมะม่วงด้วย LC-MS/MS

ดำเนินการวิเคราะห์สารพิษมาตรฐานกลุ่ม neonicotinoid และสารมาตรฐานอนุพันธ์ของ imidacloprid คือ dihydroxy, 5-hydroxy, olefin, urea และ 6-chloronicotinic acid รวมทั้งหมด 11 สาร ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยทำการ optimize สารแต่ละตัว เพื่อกำหนดค่า MRM Precursor/Product Ion Transitions and Instrument Condition ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. MRM Precursor/Product Ion Transitions and Instrument Condition

Analyte	Molecular formula	RT (min)	Ion transition (primary)	Dwell time	Frag (V)	CE (V)	Ion transition (secondary)	Dwell time	Frag (V)	CE (V)
acetameprid	$C_{10}H_{11}ClN_4$	5.110	223.07 > 126.01	20	80	20	223.07 > 56.04	20	80	15
chlothianidin	$C_6H_8ClN_5O_2S$	4.925	250.00 > 169.00	15	90	12	250.00 > 132.00	15	90	16
dinotefuran	$C_7H_{14}N_4O_3$	1.655	203.12 >129.00	90	90	8	203.12 > 58.10	90	90	28
imidacloprid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	5.008	256.05 > 209.05	15	90	15	256.05 > 175.02	15	90	15
thiacloprid	$C_{10}H_9ClN_4S$	5.342	253.03 > 186.01	100	90	22	253.03 > 126.01	100	90	22
thiamethoxam	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	4.741	292.02 > 211.03	15	80	17	292.02 > 181.02	15	80	10
imidacloprid dihydroxy	$C_9H_{10}ClN_5O_4$	4.630	288.10 > 288.90	100	80	112	288.10 > 176.20	100	80	64
imidacloprid 5-hydroxy	$C_9H_{10}ClN_5O_3$	4.803	272.14 > 225.08	15	80	20	272.14 > 190.99	15	80	14
imidacloprid olefin	$C_9H_8ClN_5O_2$	4.734	254.07 > 205.17	15	80	18	254.07 > 171.07	15	80	24
imidacloprid urea	$C_9H_{10}ClN_3O$	4.808	121.10 > 128.10	15	80	18	121.10 > 78.01	15	80	40
6-chloronicotinic acid	$C_6H_4ClNO_2$	1.860	158.00 >121.95	15	80	18	158.00 > 77.90	15	80	80

ทำการวิเคราะห์และทดสอบสารพิษมาตรฐานกลุ่ม neonicotinoid insecticide ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ได้ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ใน parameter คือ linearity, working range, precision และ accuracy ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ด้วย LC-MS/MS

Analyte	RT (min)	Linearity/ working range	R^2	Accuracy %recovery
acetameprid	5.110	0.01-1.0	0.9954	96 - 104
chlothianidin	4.925	0.01-1.0	0.9998	95 - 103
dinotefuran	1.655	0.01-1.0	0.9968	69 - 92
imidacloprid	5.008	0.01-1.0	0.9990	89 - 101
thiacloprid	5.342	0.01-1.0	0.9954	101 - 108
thiamethoxam	4.741	0.01-1.0	0.9952	89 - 109
imidacloprid dihydroxy	4.630	0.01-1.0	0.9950	67 - 72
imidacloprid 5-hydroxy	4.803	0.01-1.0	0.9962	99 - 103
imidacloprid olefin	4.734	0.01-1.0	0.9950	98 - 107
imidacloprid urea	4.808	0.01-1.0	0.9969	92 - 99
6-chloronicotinic acid	1.860	0.01-1.0	0.9988	72 - 93

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในมะม่วงซึ่งเป็นตัวแทนของผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS เพื่อเลือกเป็นวิธีการในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง HPLC UV-detector สาร acetamiprid, chlothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid และ thaimethoxam สารอนุพันธ์ของ imidacloprid คือ 6-chloronicotinic acid ซึ่งอนุพันธ์ตัวอื่นไม่สามารถวิเคราะห์เป็น multi residue ได้ พบว่ามีค่า Linearity/working range อยู่ในช่วง 0.01-2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 74-110% มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในมะม่วงด้วย LC-MS/MS ได้วิเคราะห์สาร acetamiprid, chlothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid and thaimethoxam สารอนุพันธ์ของ imidacloprid จำนวน 5 สาร คือ imidacloprid-dihydroxy, imidacloprid-5-hydroxy, imidacloprid-olefin, imidacloprid-urea and 6-chloronicotinic acid ซึ่งวิธีนี้สามารถวิเคราะห์สารอนุพันธ์ของ imidacloprid ได้ทุกสาร พบว่ามีค่า Linearity/working range อยู่ในช่วง 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 67-109% ค่า LOD และค่า LOQ มีค่าน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จะเห็นได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV-detector มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์สารอนุพันธ์ของ imidacloprid ซึ่งทำให้ไม่สามารถรายงานผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้อย่างถูกต้องตาม residue definition ส่วนสารกลุ่มนี้ที่ไม่ต้องรายงานผลการวิเคราะห์รวมสารที่เป็นอนุพันธ์นั้น วิธีการนี้สามารถตรวจวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งวิธีนี้สามารถวิเคราะห์สารกลุ่ม neonicotinoid ทุกสารและอนุพันธ์ของ imidacloprid ได้ทุกสารเช่นกัน และเนื่องจากการวิเคราะห์อนุพันธ์ของสาร imidacloprid มีการพิจารณาอนุพันธ์หลายตัว หากทำการวิเคราะห์แยกแบบ single residue ก็จะทำให้การวิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม neonicotinoid ในผลไม้
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการ
4. จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการภาครัฐและเอกชนนำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณพนิดา ไชยยันต์บูรณ์ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ ที่แนะนำวิธีการเขียนรายงานการวิจัยให้ถูกต้องเหมาะสม คุณวิษณุ แจ้งใบ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ คุณปิยะศักดิ์ อรรคบุตร นักวิทยาศาสตร์

ชำนาญการ คุณบุญทวีศักดิ์ บุญทวี นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ และคุณวะนิดา สุขประเสริฐ นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ ที่สละเวลาการทำงานช่วยสอนและแนะนำวิธีการใช้งานเครื่อง LC-MS/MS ให้กับคณะผู้วิจัยจนสามารถใช้งานเครื่องได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. ***Method Validation***. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ดุษฎี มั่นความดี และ อุมาพร สุขม่วง. 2544. ***การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี*** *(Chemical Method Validation)*. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. ***แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว***. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี.

สถาบันอาหาร. 2547. ***การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี***. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนาด้านอุตสาหกรรมอาหาร

Alaa Kamel. 2010. ***Refined Methodology for the Determination of neonicotinoid pesticides and Their Metabolites in Honey Bees and Bee Products by Liquid Chromatography Tandam Mass Spectrometry (LC-MS/MS)***. Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaher. D. and Schenck F.J. 2003. ***Fast and Easy Multiresidue method employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive solid-Phase Extraction for determination of Pesticide Residue in Produce.*** Journal AOAC. Int. 86(2), 412-431.

Lehotay, S.J. 2007 ***Determination of Pesticide Residue in Food by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study.*** Journal AOAC. Int. 90(2), 485-520.

Zywitz D., Anastassiades M. and Scherbaum E. 2004 ***Analytical of Neonicotinoid Insecticides in Fruits and Vegetables using LC-MS(MS).***

Internatianal Organization for Standardization. 2005. ISO/IEC 1705 : General requirements for the competence of testing and calibration Laboratories, Geneva, Switzerland

Horiwtz.W., 2000 (editor). Official Methol of Analysis. Of AOAC International. 17th Edition. AOAC international Maryland, USA.

Hirotaka Obana. and ect., 2002. ***Determination of Acetamiprid Imidacloprid and Nitenpyram Residues in Vegetables and Fruits by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection.*** Osaka, Japan.

Ralf Schoning and Richard Schmuck. 2003. ***Analytical determination of imidacloprid and relevant metabolite residues by LC MS/MS***. Bulletin of Insectology 56 (1): 41-50. Monheim, Germany.

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในพืชที่มีความเป็นกรดสูง

Method Development for Pesticide Analysis in High Acid Content Plant

ศศิมา มั่งนิมิตร์ ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล วิทยา บัวศรี

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในพืชที่มีความเป็นกรดสูงโดยวิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) โดยใช้เครื่องแกสโครมาโตกราฟ (Gas chromatography) ที่มีหัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD) และ Micro-cell Electron Capture Detector (μECD) เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ โดยใช้ส้มเปลือกล่อน (Mandalins) เป็นตัวแทนของในพืชตระกูลส้ม(citrus fruits) ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์โดยรวมตามวิธี QuEChERS สกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile magnesium sulfate และ sodium chorlide จากนั้นขจัดสิ่งรบกวน (clean up) ด้วย primary secondary amine และ magnesium sulfate ตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ จำนวน 5 ชนิดได้แก่ diazinon α –Endosulfan β-Endosulfan Endosulfan sulfate และ Bifenthrin ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.05, 0.01, 0.01, 0.02 และ 0.02 mg/kg ตามลำดับ ผลการทดสอบความแม่น (accuracy) ได้ค่า %recovery ในช่วง 70-110 มีความเที่ยง (precision) แสดงด้วย HORRAT อยู่ในช่วง 0.2-1.2 จากผลการทดสอบพบว่าวิธีดังกล่าวสามารถนำไปตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชที่มีความเป็นกรดสูงได้

คำนำ

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวม (Multiresidues method) ในอาหาร ส่วนใหญ่จะเป็นวิธีการสิ้นเปลืองเวลาและแรงงานในการตรวจวิเคราะห์ เพราะความซับซ้อนของโครงสร้างสารของวัตถุมีพิษและองค์ประกอบของสารที่มีในตัวอย่างทำให้การตรวจวิเคราะห์มีความยุ่งยาก จำเป็นต้องใช้สารเคมีหลายชนิด ทั้งในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างและการกำจัดสิ่งปนเปื้อน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของผลของการคืนกลับได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่าสูงสุด จนในปี 2003 Anatassiades และคณะได้นำเสนอวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวมแบบใหม่ชื่อ QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งได้พัฒนาวิธีการนี้ขึ้นเพื่อใช้แทนวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวมแบบที่ใช้กันอยู่เดิมซึ่งสิ้นเปลืองเวลาและใช้สารเคมีจำนวนมาก โดยใช้วิธีการสกัด (extraction) ด้วย acetonitrile แยกส่วนสารสกัด (liquid-liquid partition) ด้วย magnesium sulfate และ sodium chloride กำจัดสิ่งปนเปื้อน (clean-up) ด้วยmagnesium sulfate และ primary secondary amine ตรวจวัดด้วยเครื่อง Gas chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างและสารสกัดที่น้อยกว่าวิธีสกัด

แบบเดิม ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องแก้วหลายชนิด ใช้เพียงการเขย่าด้วยมือหรือเครื่องเขย่า และการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ซึ่งลดค่าใช้จ่ายและปริมาณของเสียที่เกิดจากการสกัดตัวอย่าง ได้เป็นจำนวนมาก การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) คือการยืนยันโดยการตรวจสอบ และ จัดทำหลักฐานที่เป็นวิทยาศาสตร์ที่พิสูจน์ได้ว่า วิธีที่วางแผนจะทดสอบนั้นเป็นไปตามข้อกำหนดที่วางไว้ ผลวิเคราะห์ต้องให้ข้อมูลที่แสดงว่าวิธีที่ใช้ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำ ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชนิดของพืชหรือสิ่งที่ทดสอบ ในสถานการณ์โลกปัจจุบันแต่ละประเทศทั่วโลกพยายามใช้วิธีกีดกันการค้าโดยทางอ้อม โดยใช้ข้อมูลด้านสุขอนามัยของประชาชนแต่ละประเทศเป็นข้อกำหนด ทำให้ข้อมูลจากผลการวิเคราะห์ถูกนำมาเป็นข้ออ้างในการตรวจสอบสินค้าในการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งจำเป็นต้องพิสูจน์ให้เห็นว่า การตรวจวิเคราะห์นั้นเป็นไปตามหลักมาตรฐานสากล

ตามข้อกำหนดของ OECD ในเอกสารหมายเลข 72 ชุดของ pesticide หมายเลข 39 และ SANCO 2011 ได้แบ่งกลุ่มของตัวแทนพืช ได้แก่ ผัก ผลไม้ ธัญพืชและเนื้อสัตว์ เป็นกลุ่มย่อยๆ 10 กลุ่ม ได้แก่ พืชที่มีปริมาณน้ำสูง พืชที่มีปริมาณน้ำมันสูง พืชที่มีแป้งและหรือโปรตีนและมีปริมาณน้ำน้อย พืชที่มีความเป็นกรดสูงและมีปริมาณน้ำมาก เป็นต้น โดยพืชในกลุ่มมีความเป็นกรดสูงนี้มีตัวแทนคือพืชตระกูลส้ม (citrus fruit) พืชที่ทีผลเล็กและกลุ่มเบอร์รี่ จึงเลือกส้มเปลือกล่อน (Mandalins) เป็นตัวแทน และทำการทดสอบพืชที่มีความเป็นกรดสูงโดยวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาปรับใช้ ในงานตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารมาตรฐาน กลุ่มสารออร์กาโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และ ไพรีทรอยด์ 5 ชนิด ความบริสุทธิ์ 93.5-98.9% ผลิตภัณฑ์ของ Dr.Ehrenstorfer

2. สารเคมีได้แก่ acetonitrile, ethyl acetate, hexane, magnesium sulfate, sodium chloride, sodium sulfate, SPE sorbent ชนิด primary-secondary-amine (PSA)

3. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette, beaker, cylinder, funnel, round bottom flask, centrifuge tubes ขนาด 1.5 และ 50 ml vials for GC ขนาด 1.5 ml auto-pipette ขนาด 0.1- 1 ml และ 1-10 ml

4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง, Food processor, Vortex mixer, เครื่องcentrifuge

5. เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษเครื่อง Gas Chromatography รุ่น 6890N Agilent Technologies) ที่มีหัวตรวจวัด 2 ชนิดคือ Flame Photometric Detector (FPD) ใช้ analytical column : DB-1701P ความยาว 30 m 0.25 mm id. 0.25 µm film thickness และชนิด Micro-cell Electron Capture Detector (µECD) และใช้ analytical column: HP-Ultra 1 ความยาว 25 m 0.32 mm id. 0.17µm film thickness carrier gas: He 1.2 ml/min กำหนดสภาวะของเครื่องมือดังนี้

Inlet : Splitless at 250 ºC

Oven : Initial temp. 100 ºC hold 1 min, ramp 15 ºC/min to 180 hold 3 min, ramp 25 ºC/min to 250 hold 35 min, ramp 30 ºC/min to 260 hold 2 min

Detector : 1. FPD with H_2 flow 150.0 ml/min, Air flow 110.0 ml/min and N_2 make up flo 60 ml/min.

2. μECD with N_2 make up flow 60 ml/min.

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารและวางแผนการการทดลอง

2. เตรียมสารมาตรฐานกลุ่มต่างๆ ที่ใช้ทดสอบคือ ออร์กาโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และ ไพรีทรอยด์ ที่ใช้ในการทดสอบให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.02-2.0 ug/ml สำหรับ diazinon ที่เป็นตัวแทนกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ความเข้มข้นระหว่าง 0.01-1.0 ug/ml สำหรับ α -Endosulfan β -Endosulfan Endosulfan sulfate ที่เป็นตัวแทนกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและความเข้มข้นระหว่าง 0.02-2.0 ug/ml สำหรับ Bifenthrin ที่เป็นตัวแทนกลุ่มไพรีทรอยด์

3. เลือกตัวอย่างพืชที่เป็นตัวแทนของพืชมีความเป็นกรดสูง เช่น ส้มเปลือกล่อน ทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่าง 3 ระดับ คือ 0.010 0.100 และ 0.200 mg/kg สำหรับ α-Endosulfan β-Endosulfan 0.025 0.250 0.500 mg/kg สำหรับ Endosulfan sulfate 0.025 0.050 0.500 mg/kg สำหรับ Bifenthrin และ 0.050 0.100 0.200 mg/kg สำหรับ diazinon ลงในตัวอย่างส้ม ความเข้มข้นระดับละ 6 ซ้ำ

3.1 การสกัดโดยวิธีQuECHERSจาก Anastassiades, 2003

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 ml สกัดตัวอย่างด้วย acetonitile จำนวน 10 ml แล้วเขย่าด้วย vortex mixer ที่ความเร็วรอบสูงสุด 1 นาที เติม NaCl 1.0 กรัม และ $MgSO_4$ 4 กรัม เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาทีนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm. นาน 5 นาที จากนั้นนำไปขจัดสารรบกวนโดยใช้ autopipette ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง 1 ml ใส่ micro centrifuge tube 1.5 ml ที่ ใส่ PSA 0.025 กรัม $MgSO_4$ 0.15 กรัม เขย่าด้วย vortex 30 วินาที นำไป centrifuge อีกครั้ง จากนั้นใช้ auto pipette ดูดสารละลายส่วนบน ปริมาตร 0.5 ml นำไปลดปริมาตรด้วยแกสไนโตรเจนจนแห้งแล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 ml ด้วย ethyl acetateใส่ GC-vial นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-FPD ส่วนตัวอย่างสำหรับตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-μECD ทำขั้นตอนการขจัดสารรบกวนเช่นเดียวกับตัวอย่างสำหรับ GC-FPD แต่เปลี่ยนตัวทำละลายในการปรับปริมาตรเป็น hexane

4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

4.1 การทดสอบและประเมินค่า Performance Characteristics ต่างๆ

ทดสอบค่าที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ได้แก่ Range, Linearity, Accuracy, Precision, Limit of Quantification (LOQ) และ Limit of Detection (LOD)

4.1.1 Range/Linearity

ทดสอบ sample blank และ fortified sample blank รวม 5 ระดับ ให้ครอบคลุมช่วงการวิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่า response ไปเขียนกราฟและ

คำนวณค่า correlation coefficient (R^2) จากความสัมพันธ์เชิงเส้น ใช้เกณฑ์การยอมรับ ค่า $R^2 \geq 0.995$ (Codex, 2003)

4.1.2 Accuracy

การตรวจสอบ Accuracy ใช้เกณฑ์กำหนด คือ mean recovery อยู่ระหว่าง 70 – 110% (FAO/IAEA/AOAC/IUPAC 1999, Ambrus 2000) ทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง ลงในตัวอย่างส้มความเข้มข้นระดับละ 6 ซ้ำ

4.1.3.Precision

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ใช้การทวนซ้ำ (repeatability) แสดงผลในรูปของ $\%RSD_r$ (Relative Standard Deviation) ทำการทดสอบ fortified sample ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงในตัวอย่างส้ม ความเข้มข้นระดับละ 6 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ตัวอย่างแล้วนำมา คำนวณหาค่า $\%RSD_r$ ตามวิธี ISO-5725-2 ประเมินการยอมรับโดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้คำนวณจากสมการHorwitz (Horwitz's equation) ซึ่งเกณฑ์กำหนด คือ $\%RSD_r$

ค่านี้ต้องน้อยกว่าค่า $\%RSD_{Horwitz}$ ซึ่งได้จากการคำนวณจากสมการ Horwitz

สมการ Horwitz สำหรับ repeatability $\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

นอกจากนี้ยังใช้เกณฑ์พิจารณาค่าความเที่ยงจากค่าที่ได้จากการคำนวณค่าHORRATหรือ Horwitz ratio น้อยกว่า 2 (AOAC, 2002) เป็นเกณฑ์ยอมรับด้วย

4.1.4 Limit of Quantitation (LOQ)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 - 0.02 mg/kg สำหรับกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg สำหรับกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และระดับความเข้มข้น 0.02 mg/kg สำหรับกลุ่มไพรีทรอยด์ ในตัวอย่างส้มจำนวน 6 ซ้ำ

4.1.5 Limit of Detection (LOD)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ การทดสอบ LOD สามารถทำได้หลายวิธีโดยเลือกใช้จากความเหมาะสมและเป็นไปได้ เนื่องจากการทดสอบทางเคมีการทำซ้ำมากๆ จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมาก เสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลาโดยไม่จำเป็น การแจกแจงของข้อมูลถือว่าเป็นแบบ t-distribution ดังนั้น LOD จึงเท่ากับ $t_{(one\ tail\ 0.01,\ n-1)} \times SD$ เพื่อให้ค่า t มีค่าเท่ากับ 3 โดยประมาณจึงต้องมีการทดสอบ 7-10 ซ้ำ (ทิพวรรณ, 2549) ค่า LOD ของแต่ละสารได้จากการคำนวณค่า standard deviation (SD) ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ทดสอบ ซึ่งต้องมีผลทดสอบผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือมีผลทดสอบค่าเฉลี่ยของ recovery อยู่ในช่วง 70-110% (truness, 96/46 EC) ค่าaccuracy และ precision และอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %RSD น้อยกว่า 20% (repeatability, 96/46EC) (FAO/IAEA/AOAC/IUPAC, 1999) และ HORRAT ไม่เกิน 2 (AOAC, 2002) จึงคำนวณค่า LOD จากสูตร $LOD = 3 \times SD$

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษชนิดต่างๆ ในส้มโดยวิธี QuEChERS ด้วย Gas Chromatograph การทดสอบและประเมินค่า Performance Characteristics ต่างๆ ได้แก่ Range, Linearity, Accuracy, Precision, LOQ และ LOD มีผลการทดสอบดังนี้

1. Range และ linearity ผลการประเมินค่า Correlation coefficient (R^2) จากความสัมพันธ์เชิงเส้นใช้เกณฑ์ ยอมรับ ค่า $R^2 \geq 0.995$ พบว่าการวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ มี ค่า $R^2 \geq 0.995$ และมี range อยู่ในช่วงต่างๆ ตามแต่ชนิดของสาร ดังนี้ diazinon 0.02-2.0 mg/kg, α-Endosulfan, β -Endosulfan, Endosulfan sulfate 0.01-1.0 mg/kg, Bifenthrin 0.02-2.0 mg/kg

2. Accuracy การตรวจสอบ accuracy ใช้เกณฑ์ยอมรับคือ ค่าเฉลี่ยของ recovery อยู่ระหว่าง 70 – 110% จากการวิเคราะห์ส้มที่เติมสารมาตรฐาน พบว่ามีความแม่นจาก %recovery ในช่วง 78-107%

3. Precision การตรวจสอบ precision ใช้เกณฑ์ยอมรับจากค่า relative standard deviation $\%RSD_{Horwitz}$ และHORRATพบว่าวัตถุมีพิษที่ทดสอบที่มีผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับดังกล่าว คือ %RSD น้อยกว่า $\%RSD_{Horwitz}$ และมีค่า HORRAT < 2 รวม ตามตารางที่ 1

4. Limit of Quantitation (LOQ) จากการทดสอบพบว่า fortified sample blank ด้วย ความเข้มข้นระดับ 0.01-0.05 mg/kg ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัสและไพรีทรอยด์นี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ทดสอบมีค่า $\%RSD_r \leq \%RSD_{Horwitz}$ และ มีค่า HORRAT < 2 โดยมีค่า LOQ ดังนี้ diazinon 0.05 mg/kg α Endosulfan 0.01มก./กก., β -Endosulfan 0.01 mg/kg Endosulfan sulfate 0.02 mg/kg bifenthrin 0.02 mg/kg

5. Limit of Determination (LOD) ผลของการทดสอบกลุ่มสารต่างๆ ที่ผ่านเกณฑ์ทดสอบ accuracy และ precision ตามเกณฑ์ที่กำหนดดังกล่าว พบว่ามีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.01-0.02 mg/kg (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างส้มโดยวิธี QuECHERS

No.	Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery (n=6) mean ± SD	% RSD	HORRAT	LOD	LOQ
1	α -Endosulfan	0.010	78 ± 0.001	9.6	0.5	0.01	0.010
		0.100	83 ± 0.007	8.6	0.6		
		0.200	85 ± 0.017	9.9	0.7		
2	β -Endosulfan	0.010	83 ± 0.008	19.4	0.9	0.01	0.010
		0.100	84 ± 0.002	9.5	0.6		
		0.200	99 ± 0.013	6.6	0.5		
3	Endosulfan sulfate	0.025	83 ± 0.008	15.5	0.9	0.01	0.025
		0.250	84 ± 0.002	9.5	0.6		
		0.500	99 ± 0.013	6.6	0.5		
4	bifenthrin	0.025	80± 0.024	10.1	0.6	0.01	0.025
		0.050	85 ± 0.002	5.8	0.4		
		0.500	86 ± 0.059	13.7	1.2		
5	diazinon	0.050	100 ± 0.053	6.6	0.4	0.02	0.050
		0.100	107 ± 0.004	3.3	0.2		
		0.200	104 ± 0.016	7.8	0.6		

สรุปผลการทดลอง

วัตถุมีพิษที่นำมาทดสอบ 5 ชนิด ผ่านเกณฑ์ทดสอบได้ทั้งหมด ตามพารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนดคือ range/linearity มีค่า $R^2 \geq 0.995$ การทดสอบค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ mean recovery อยู่ในช่วง 70-110% ค่า HORRAT ไม่เกิน 2 ค่า% RSD ของrepeatability น้อยกว่า 20% โดยมีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.01-0.05 mg/kg

การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์สารพิษชนิดต่างๆ ในส้มโดยวิธี QuEChERS ด้วย Gas Chromatograph ตามค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนดสำหรับวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ เพื่อนำไปขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลไม้เพื่อการรับรองสำหรับการส่งออก และเผยแพร่ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร และผู้สนใจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 124 หน้า

Ambrus. A., 2000. Worked Example for Validation of a Multi-residue Method. in Principle and Practices of Method Validation. The Royal Society of Chemistry, London, U.K. 157 175

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaher. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Actonitrile Extraction/Paritioning and “Dispersive solid-Phase Extraction” for determination of Pesticide Residues in Produce. J.AOAC. Int.86, 412 – 431

Anonymous. 1994. ISO 5725-2-1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and result- part 2. First edition.

AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf 2002

Codex Alimentarius. 2003. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis CAC/GL 40- 1993, REV.1-2003 P.1 of 36 www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0046:EN:HTml

Fajgelli. A. and Ambrus. A. 2000. Principle and Practice of Method Validation. The Royal Society of Chemistry, London, U.K.

FAO/IAEA/AOAC/IUPAC. 1999. Guidelines for single laboratory validation of analytical method for trace-level concentration of organic chemicals. International workshop on principle and practice of method validation. Nov 4-6. Budapest

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืช

Method Validation of Phytate in Plant

นันทกานต์ ขุนโหร มนต์ชัย อินทร์ท่าอิฐ จุลศักดิ์ บุญรัตน์

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืชเพื่อห้องปฏิบัติการใช้วิธีที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล โดยห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ปี 2556 จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืช พบว่าการวิเคราะห์ไฟเตทในพืชโดยวิธี Anion-Exchange มีปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limited of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ) มีค่า 0.16 และ 0.26 มก./ก. ตามลำดับ %recovery ที่ spike ไฟเตทมีค่า 93.51 อยู่ในช่วง 92-105 การประเมินความแม่นยำ (Precision) โดยใช้ HORRAT เท่ากับ 1.56 ซึ่งค่าที่ตรวจสอบต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืชวิธีดังกล่าวสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการต่อไป

คำนำ

ไฟเตทมีโครงสร้างเป็นรูปหกเหลี่ยมของ inositol ring โดยจับตัวกับฟอสฟอริก 6 กลุ่ม มักพบสะสมอยู่ในพืชโดยเฉพาะในเมล็ด ซึ่งฟอสฟอรัสที่อยู่ในรูปนี้จะสามารถย่อยได้ไม่ดีนักในสัตว์กระเพาะเดี่ยว ทำให้การนำฟอสฟอรัสไปใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่ และยังมีคุณสมบัติที่ยังมีความสามารถจับตัวกับสารที่มีประจุบวกและธาตุอื่นๆ เช่น Ca Mg Fe และ Zn ทำการดูดซึมธาตุเหล่านี้ไปใช้ไม่ได้ คุณสมบัตินี้ทำให้ไฟเตทมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน ในการวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช เพื่อประเมินความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชเราจึงควรทราบปริมาณไฟเตท เพื่อประกอบการประเมินห้องปฏิบัติการกลุ่มวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร จึงได้ทำการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืชเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพให้ผลวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำ และมีการควบคุมคุณภาพให้มีความผิดพลาดน้อยที่สุด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์

2. สารเคมี Conc. H_2SO_4, Conc. HNO_3, สารละลาย 0.1 M NaCl, สารละลาย 0.7 M NaCl, สารละลาย 2.4% HCl, สารละลายมาตรฐานฟอสเฟต, สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 2.5%, สารละลายกรดซัลโฟนิค, สารละลาย Na_2EDTA-NaOH, สารละลาย 10 N H_2SO_4 และ Anion exchange resin

3. วัสดุมาตรฐาน Phytic acid sodium salt hydrate from rice และ Hay powder

4. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เตาย่อย Micro-Kjeldahl และเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์

วิธีการ

1. การเตรียมสารมาตรฐานฟอสเฟต

1.1 ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต 1.0 3.0 และ 5.0 มล. จากสารละลายมาตรฐานฟอสเฟต ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัม/มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มล.

1.2 เติมน้ำ 20 มล. สารละลายโมลิบเดท 2 มล. และสารละลายกรดซัลโฟนิค 1 มล. ปรับปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

1.3 นำสารละลายที่ได้ไปสแกนเพื่อหา wavelength ที่เหมาะสม

1.4 ตั้งค่า waveleangth ที่ได้จากการสแกน แล้วนำสารละลายมาวัดค่า Absorbance

1.5 นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของ concentration/Absorbance (Mean K) ดังสมการ

$$\text{Mean K} = \frac{\sum \mu g\ P/A}{N}$$

A = ค่า Absorbance ที่อ่านได้ N = จำนวน standard ที่วิเคราะห์

2. หาปริมาณที่แน่นอนของสารมาตรฐาน

2.1 ชั่งสารมาตรฐานหนัก 0.1xxx กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มล.จำนวน 20 ซ้ำ

2.2 เติม 2.4% HCl ปริมาตร 20 มล. ปิดฝาและเขย่าที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง

2.3 นำตัวอย่างออกจากเครื่องเขย่าและนำไปกรองสุญญากาศด้วยกระดาษกรองเบอร์ 541

2.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ 1 มล. เติมสารละลาย Na_2EDTA-NaOH ปริมาตร 1 มล. ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2.5 นำสารละลายที่ได้ ใส่ในคอลัมน์ที่มี Anion exchange resin ที่เตรียมสำหรับการชะตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว

2.6 ทำการชะคอลัมน์ดังนี้ ทิ้งสารละลายแล้วชะด้วยน้ำกลั่น 15 มล. ทิ้งสารละลายที่ได้ จากนั้นชะด้วยสารละลาย 0.1 M NaCl ปริมาตร 15 มล. ทิ้งสารละลาย จากนั้นชะด้วยสารละลาย 0.7 M NaCl ปริมาตร 15 มล. ใส่ในหลอดสำหรับย่อย

2.7 นำสารละลายที่เก็บไว้มาย่อยด้วย กรดซัลฟุลลิกเข้มข้น 0.5 มล. และกรดไนตริกเข้มข้น 3.0 มล. เติมลูกปัดแก้ว 3 เม็ด ย่อยภายในตู้ดูดควัน บนเตาย่อย Micro-Kjeldahl

2.8 นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยถ่ายใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มล. เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายกรดซัลโฟนิค 1 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

2.9 นำไปอ่านค่า absorbance ที่ 320 นาโนเมตร

2.10 ค่าที่ได้นำไปคำนวณ ความเข้มข้นของไฟเตท จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นไฟเตท (มก./ก.ตัวอย่าง)} = \frac{\text{mean K x A x 20 x 10}}{0.282 \times 1000}$$

A = ค่า Absorbance Mean K = ∑ µg P/A

3. หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (LOQ)

3.1 ปิเปตสารละลาย 2.4% HCl ปริมาตร 1 มล. และสารละลาย Na_2EDTA-NaOH ปริมาตร 1 มล. ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

3.2 ทำตามขั้นตอนที่ 2.5-2.9

3.3 ค่าที่ได้นำไปคำนวณ ความเข้มข้นของไฟเตท จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นไฟเตท (มก./ก.ตัวอย่าง)} = \frac{\text{mean K x A x 20}}{0.282 \times 1000}$$

A = ค่า Absorbance

3.4 ค่าของไฟเตทที่ได้นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำมาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสูตร

LOD = X + 3SD

LOQ = X + 10SD

X = ค่าเฉลี่ยปริมาณไฟเตท

4. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

4.1 ชั่งวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน 2 กรัม จำนวน 10 ซ้ำ และวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน 2 กรัม + สารมาตรฐาน 0.1xxx กรัม จำนวน 10 ซ้ำ ใส่ในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 125 มล.

4.2 ทำตามข้อ 2.2 – 2.9

4.3 ค่าที่ได้นำไปคำนวณ ความเข้มข้นของไฟเตท จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นไฟเตท (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง)} = \frac{\text{mean K x A x 20}}{0.282 \times 1000}$$

A = ค่า Absorbance Mean K = ∑ µg P/A

4.4 นำค่าที่บันทึก ไปคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_2 - C_1 \times 100}{\text{ความเข้มข้นของไฟเตทที่ Spike}}$$

C_2 = ความเข้มข้นของไฟเตทในวัสดุอ้างอิง

C_1 = ความเข้มข้นของไฟเตทในวัสดุอ้างอิง+สารมาตรฐาน

5. **ตรวจสอบความแม่นยำ** (Precision)

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความถูกต้อง มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย SD และ %RSD ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์

ตัวอย่างการคำนวณ

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{Mean}$$

เกณฑ์ยอมรับ precision ของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\%\ \text{RSD Experiment}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \leq 2 \text{ (Horwitz } et\ al.\text{, 2000)}$$

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

$$C = \text{Concentration}$$

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 – เมษายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืชโดยวิธี Anion exchange ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้ ปริมาณไฟเตทในสารมาตรฐานเท่ากับ 20.34% ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ) มีค่า 0.16 และ 0.26 มก./กรัม ตามลำดับ %recovery ที่ spike ไฟเตท มีค่า 93.51 ซึ่งอยู่ในช่วง 92-105 (AOAC, 2002) การประเมินความแม่นยำ (Precision) โดยใช้ HORRAT เท่ากับ 1.56

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไฟเตทในพืชโดยวิธี Anion exchange มีค่า Accuracy อยู่ในช่วง 80-110 และค่า Precision มีค่า HORRAT ≤ 2 ซึ่งค่า Accuracy และ ค่า Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ไฟเตทดังกล่าวสามารถเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร

2. เผยแพร่ให้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณไฟเตทในพืช

เอกสารอ้างอิง

จิตรา ชัยวิมล. 2545. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. **เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ “การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี”** กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlington, VA.

AOAC. 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ Standards_Development /SLV Guidelines_Dietary_Supplements.pdf Available online 15 Oct 2013

http://www.doctor.or.th/article/detail/3738

Horwitz, w. and Latimer, G.E. (eds). 2000. Official Method of Analysis of AOAC International Inc., Gaitherberg, MD.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. การคำนวณค่ามาตรฐานฟอสเฟต

ปริมาตรสารมาตรฐาน(ml)	µg **ฟอสฟอรัส**	**ค่า** Absorbance (A)	Concentration/A (K)
1.0	80	0.7024	113.9
3.0	240	2.085	115.1
5.0	400	3.2332	123.7
“mean K”			**117.6**

ตารางผนวกที่ 2. ผลการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (LOQ)

ซ้ำที่	**ค่า** Absorbance	**ปริมาณไฟเตท** ($mg.g^{-1}$)
1	0.0143	0.12
2	0.0151	0.13
3	0.0120	0.10
4	0.0144	0.12
5	0.0176	0.15
6	0.0154	0.13
7	0.0140	0.12
8	0.0117	0.10
9	0.0136	0.11
10	0.0147	0.12
ค่าเฉลี่ย (X)		**0.12**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD)		**0.01**

ตารางผนวกที่ 3. ผลการวิเคราะห์เพื่อหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) และ ความแม่นยำ (Precision)

ปริมาณไฟเตทในวัสดุอ้างอิง ($mg.g^{-1}$)	ปริมาณไฟเตทในวัสดุอ้างอิง+สารมาตรฐาน ($mg.g^{-1}$)	ปริมาณไฟเตทในวัสดุอ้างอิง+สารมาตรฐาน-ปริมาณไฟเตทในวัสดุอ้างอิง ($mg.g^{-1}$)
0.59	10.20	9.62
0.60	10.14	9.54
0.56	10.25	9.69
0.58	10.18	9.59
0.61	9.97	9.36
0.63	9.98	9.36
0.61	10.26	9.65
0.58	9.92	9.34
0.60	10.01	9.40
0.56	10.10	9.54
ค่าเฉลี่ย		**9.51**
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		**0.14**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ลิกนินในพืช

Method Validation of Lignin in Plant

สุพิศสา ทองเขียว นันทกานต์ ขุนโหร มนต์ชัย อินทร์ท่าอิฐ

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ลิกนิน โดยเลือกวิธีมาตรฐานของ TAPPI คือ วิธีคลาสัน (Klason method) เพื่อวิเคราะห์ความถูกต้อง และความแม่นยำของวิธี โดยศึกษาปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of Detection : LOD) ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ค่าได้และรายงานผลอย่างถูกต้อง แม่นยำ (Limit of Quantitation : LOQ) ช่วงการใช้งาน (Range) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำของวิธี (Precision) ผลการวิเคราะห์ พบว่า วิธีวิเคราะห์ลิกนิน มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.097 และ 0.16% (W/W) ช่วงการใช้งาน เท่ากับ 0.5 - 10% (W/W) ช่วงความเป็นเส้นตรง เท่ากับ 0.5 - 5.0% (W/W) ตรวจสอบความถูกต้องโดยการประเมิน %Recovery อยู่ในช่วง 96.95 - 97.20% การประเมิน Precision โดยพิจารณาจากสมการของ Horwitz's Ratio ที่ 3 ระดับความเข้มข้น อยู่ในช่วง 1.15 - 1.82 ค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ลิกนินในพืชนี้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพื่อเป็นแนวทางในการขอรับรองห้องปฏิบัติการต่อไป

คำนำ

ปัจจุบันความต้องการพลังงานสูงขึ้น พืชพลังงานเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาผลิตเชื้อเพลิงเพื่อทดแทนพลังงานจากปิโตรเคมีเพื่อใช้ในอนาคต ในเซลล์พืชมีองค์ประกอบของลิกนินโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ปริมาณของลิกนินที่พบในเนื้อไม้ประมาณ 10 - 30% (Hon *et al.*, 1991) ซึ่งเป็นปริมาณที่สูง สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในโรงงานอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ลิกนินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงยังใช้กันมากในอุตสาหกรรมการขุดเจาะน้ำมัน ทำสี ทำสารกำจัดแมลง ทำซีเมนต์ ทำยาง และอาจใช้เป็นตัวเพิ่ม (Extenders) ในกาวฟีนอล ลิกนินเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไม่มีรูปผลึก จะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน และมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย โครงสร้างพื้นฐานของลิกนิน คือ phenylpropane หรือสารประกอบ hydrocarbon ที่มี carbon 9 อะตอม ประมาณร้อยละ 65 ปัจจุบันยังไม่สามารถแยกลิกนินบริสุทธิ์ออกมาได้ การวิเคราะห์หาปริมาณลิกนินจึงมีความยากที่จะหาวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวิเคราะห์ในพืชแต่ละชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการที่จะพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลิกนินที่มีในตัวอย่างพืชพลังงาน เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสม และถูกต้อง โดยเพิ่มการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้วิธีการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้อง และแม่นยำ มีประสิทธิภาพ เหมาะที่จะนำวิธีการวิเคราะห์นี้มาใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.1 เครื่องชั่งความละเอียด 0.1 มก.

1.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

1.3 ตู้อบ

2. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์

2.1 บีกเกอร์ ขนาด 50 250 และ 500 มล.

2.2 ขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มล.

2.3 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 และ 1,000 มล.

2.4 ปิเปต ขนาด 20 มล.

2.5 โถดูดความชื้น

2.6 กระจกนาฬิกา

2.7 กระดาษฟร์อย

2.8 แท่งแก้ว

2.9 กรวยกรอง

2.10 Sintered glass crucible filter

3. สารเคมี

3.1 72% H_2SO_4

3.2 Lignin technical grade

3.3 น้ำปราศจากไอออน

3.4 เซลลูโลส

3.5 ตัวอย่างพืช

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง ประมาณ 1,000 กรัม (Ws) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. เติมสารละลาย 72% H_2SO_4 ปริมาตร 20 มล. จากนั้นใช้แท่งแก้วคนสารละลายให้เข้ากันและปิดปากบีกเกอร์ด้วยกระจกนาฬิกา

2. นำบีกเกอร์ไปวางในอ่างน้ำ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20±1°C และใช้แท่งแก้วคนสารละลายตัวอย่างเป็นระยะๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 20±1°C โดยเติมน้ำแข็งก้อนเล็กๆ ลงไปทีละน้อย)

3. ถ่ายสารละลายในบีกเกอร์ ลงในขวดรูปชมพู่และปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ถึง 785 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายเป็น 3% (w/w) H_2SO_4 ;d_{15}=1.020

4. ปิดปากขวดแบบหลวมๆ โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาดเล็ก (ขนาด 50 มล.) นำไปย่อยในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที

5. วางขวดรูปชมพู่ไว้ในลักษณะเอียง เพื่อให้ตะกอนตกรวมกันตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน

6. อบ sintered glass crucible filter (1G4) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C และชั่งน้ำหนัก บันทึก (Wg)

7. นำสารละลายมากรองด้วย sintered glass crucible (1G4) ที่ผ่านการอบและทำการชั่งน้ำหนักแล้วโดยการใช้ water flow aspirator (ห้ามใช้ vacuum pump)

8. ล้างส่วนที่เหลือด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 50-60°C ปริมาตร 100-200 มล.

9. นำ crucible พร้อมตัวอย่างใส่ตู้อบอุณหภูมิ 105 $\pm$ 3 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

10. นำออกมาวางไว้ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก ($W_{(g+L)}$) บันทึกค่า

คำนวณหา % ปริมาณของลิกนิน

$$\% \text{ Klason lignin} = \frac{100 \times (W_{(g+L)} - W_g)}{Ws}$$

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1. การหาค่าต่ำสุดที่สามารถวัดค่าได้ (LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถวัดและรายงานค่าได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (LOQ)

1.1 เตรียมสารละลาย sample blank โดยชั่งสารเซลลูโลสปริมาณ 1,000 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. จำนวน 10 ซ้ำ

1.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ลิกนิน

1.3 คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation), LOD เท่ากับ 3SD และ LOQ เท่ากับ 10SD

2. การหาค่าช่วงการใช้งาน (Range)

2.1 ชั่งสารชนิด Technical grade จำนวน 6 ระดับๆ ละ 3 ซ้ำ ปริมาณ 0 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. นำมาเติมกรด 72% H_2SO_4 ซึ่งคำนวณปริมาตรตามน้ำหนักที่ชั่ง

2.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ลิกนิน

2.3 ค่าที่ได้นำมาพล็อตกราฟระหว่าง ความเข้มข้นของสาร Tech.(x) กับ Response(y) (% ลิกนิน) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยดูจากค่า correlation coefficient ($r \geq 0.995$)

3. การหาค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity)

3.1 เลือกความเข้มข้นในช่วง Range โดยเตรียม 6 ระดับๆ ละ 3 ซ้ำ ชั่ง Technical grade ปริมาณ 0 0.1 0.2 0.4 0.8 และ 1.0 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. นำมาเติมกรด 72% H_2SO_4 ซึ่งคำนวณปริมาตรตามน้ำหนักที่ชั่ง

3.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ลิกนิน

3.3 ค่าที่ได้นำมาพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Tech.(x) กับ Response(y) (% ลิกนิน) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยดูจากค่า Correlation coefficient ($r \geq 0.995$)

4. การหาค่า Accuracy

4.1 เตรียมสาร 2 ชุดการทดลอง ชุดที่ 1 ชั่ง sample blank ปริมาณ 1,000 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. นำมาเติมกรด 72% H_2SO_4 ปริมาตร 20 มล.

4.2 ชุดที่ 2 ชั่ง sample blank ปริมาณ 1.000 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. และชั่ง Technical grade ปริมาณ 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์เดิม นำมาเติมกรด 72% H_2SO_4 ปริมาตร 20 มล.

4.3 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ลิกนิน

4.4 บันทึกข้อมูล และคำนวณผล

4.5 ประเมิน Accuracy โดยหา %Recovery ดังสูตร

$$\%Recovery = [X_2-X_1] / C \times 100$$

โดย X_2 = Spike sample

X_1 = Sample blank

C = Conc. Standard

5. การหาค่า Precision

5.1 เตรียมสาร 2 ชุดการทดลอง ชุดที่ 1 ชั่ง sample blank ปริมาณ 1,000 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. นำมาเติมกรด 72% H_2SO_4 ปริมาตร 20 มล.

5.2 ชุดที่ 2 ชั่ง sample blank ปริมาณ 1,000 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มล. และชั่ง Technical grade ปริมาณ 1.000 กรัม นำมาเติมกรด 72% H_2SO_4 ปริมาตร 20 มล.

5.3 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ลิกนิน

5.4 บันทึกข้อมูล และคำนวณผล ประเมิน Precision จากค่า HORRAT $\leq$ 2 (Horwitz *et al.*, 2000) คำนวณหาค่า Mean, SD และ %RSD ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หรือความใกล้เคียงกันของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์

ตัวอย่างการคำนวณ

$$\%\ RSD = \frac{SD \times 100}{Mean}$$

เกณฑ์ยอมรับ Precision ของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

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

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

C = concentration ratio

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ : ณ กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยวัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.097 และ 0.16% (W/W) การหาค่า Range อยู่ในช่วง 0.5 – 10% (W/W) ตรวจสอบค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9970 การหาค่า Linearity อยู่ในช่วง 0.5-5.0% (W/W) และพิสูจน์ความเป็นเส้นตรง มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9961 การหาค่า Accuracy จากการตรวจสอบ %Recovery ที่มีการ spike sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 2.5 และ 5.0% เท่ากับ 97.14 96.95 และ 97.20% ตามลำดับ และประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT ที่ความเข้มข้น 0.5 2.5 และ 5.0% เท่ากับ 1.15 1.82 และ 1.63 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งสิ้น

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณลิกนินในตัวอย่างพืช ด้วยวิธีมาตรฐาน TAPPI พบว่า ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.097 และ 0.16% (W/W) ค่า Range เท่ากับ 0.5-10% (W/W) ค่า Linearity เท่ากับ 0.5-5.0% (W/W) โดยพิจารณาค่า Correlation coefficient ($r \geq 0.995$) Accuracy อยู่ในช่วง 92-105 (AOAC, 2002) และ Precision ประเมินจากค่า HORRAT ≤ 2 ซึ่งค่า Range, Linearity, Accuracy และ Precision ค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ทั้งหมดนี้สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพื่อเป็นแนวทางในการขอรับรองห้องปฏิบัติการต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อนำมาเป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ลิกนินในพืช
2. เพื่อเป็นแนวทางในการขอรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

เอกสารอ้างอิง

สถาบันอาหาร. 2547. เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีการทดสอบทางเคมี ฝ่ายบริการห้องปฏิบัติการ. สถาบันอาหาร.

อุมาพร สุขม่วง และอารีย์ คชฤทธิ์. 2553. เอกสารประกอบการฝึกอบรมตามแผนพัฒนาบุคลากรของกรมวิชาการ ปี 2553 หลักสูตร ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ. วันที่ 28-29 มิถุนายน 2553 ณ ห้องประชุมกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. 33 น.

Horwitz, W. and Latimer, G.E.(eds.). 2000. Official Method of Analysis of AOAC International. 17th ed. AOAC International Inc., Gaitherberg, MD.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 1988. Tappi test method. Tappi press. Alanta Georgia, USA. (TAPPI T203 om– 88, T264 om-88)

Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). 2006. Tappi test method. Tappi press. Alanta Georgia, USA. (TAPPI T222 om-06)

Hon, N. S., Devid and Shiraishi. 1991. Wood and cellulosic chemistry. New York: Marcel Dakker.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. ค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และค่าต่ำสุดของปริมาณลิกนินที่สามารถตรวจหาปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (LOQ)

รายการวิเคราะห์	**ผลวิเคราะห์**
Mean	0.07% (W/W)
SD	0.009
3SD	0.027
10SD	0.090
LOD	0.097 % (W/W)
LOQ	0.16 % (W/W)

ตารางผนวกที่ 2. การประเมินค่า Accuracy โดยพิจารณา % Recovery

ลำดับที่	% Recovery		
	Spike sample **ที่** 0.5%	Spike sample **ที่** 2.5%	Spike sample **ที่** 5%
1	95.21	97.06	97.96
2	98.56	97.67	97.54
3	97.80	95.39	96.76
4	98.55	95.80	98.87
5	95.89	96.36	95.04
6	97.77	96.26	96.83
7	96.57	97.98	97.83
8	95.67	97.87	97.77
9	97.19	96.76	97.05
10	98.35	98.33	96.31
Mean	97.14	96.95	97.20
SD	1.26	1.00	1.05
RSD	1.30	1.03	1.09

ตารางผนวกที่ 3. การประเมินค่า Precision โดยพิจารณาค่า HORRAT

ลำดับที่	% Recovery		
	Spike sample ที่ 0.5%	Spike sample ที่ 2.5%	Spike sample ที่ 5%
1	0.62	2.53	4.93
2	0.62	2.59	5.08
3	0.60	2.57	5.11
4	0.62	2.65	5.00
5	0.60	2.58	4.96
6	0.63	2.58	5.18
7	0.63	2.63	5.07
8	0.62	2.48	5.15
9	0.61	2.59	5.09
10	0.61	2.49	4.95
Mean	0.62	2.57	5.05
SD	0.01	0.05	0.09
RSD	1.52	2.10	1.69
HORRAT	1.15	1.82	1.63

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

Method Validation on Analysis of Phosphorus in Plant

สุภานันทน์ จันทร์ประอบ เรวดี ศิริยาน จุลศักดิ์ บุญรัตน์

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ด้วยวิธี Vanadomolybdate พบว่า ช่วงการใช้งาน (Rang) อยู่ในช่วง 1 - 9 มก./ลิตร ช่วงซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) อยู่ในช่วง 1- 5 มก./ลิตร ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limited of Detection ; LOD) เท่ากับ 375 มก./กก. ปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (Limited of Quantitative ; LOQ) เท่ากับ 397 มก./กก. เมื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสใน CRM จากใบมะเขือเทศ ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัส 0.216% และ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.04 1.00 และ 2.00% ใน sample blank พบว่า มีค่า %recovery เท่ากับ 97.92 99.00 98.44 และ 98.85% ตามลำดับ มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.85 0.41 0.46 และ 0.31 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้น การวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ด้วยวิธี vanadomolybdate จึงสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการได้

คำนำ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลาย ในปัจจุบันนิยมใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotomety) โดยจะต้องนำฟอสฟอรัสในสารละลายมาทำปฏิกิริยาให้เกิดเป็นสารดูดกลืนแสงก่อน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer วิธีทำปฏิกิริยามี 2 วิธี คือ

Molybdenum blue method วิธีนี้วิเคราะห์โดยนำสารละลายที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับ Ammonium molybdate เพื่อให้ฟอสฟอรัสกลายเป็นสารประกอบ Ammonium phosphomolybdate จากนั้นรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนนี้ด้วย $SnCl_2$ hydrazine หรือ Ascobic acid เพื่อให้ได้สารประกอบ Molybdenum blue จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 625 - 730 nm หรือ 840-880 nm ค่า molar absorptivity ในช่วงความยาวคลื่น 840-880 nm มีค่าสูงกว่า ทำให้มีความไวในการวัดดีกว่า อย่างไรก็ตามเครื่องมือวัดบางเครื่องอาจไม่สามารถวัดได้ในช่วงนี้ หรือมีเสถียรภาพต่ำ จึงควรเลือกใช้อย่างระมัดระวัง

Vanadomolybdate method วิธีนี้วิเคราะห์โดยนำสารละลายที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Ammonium molybdate และ Ammonium metavanadate หากมีฟอสฟอรัสอยู่จะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 400 - 490 nm วิธีนี้มีความไวน้อยกว่า Molybdenum blue ประมาณ 1 ใน 10 แต่มีเสถียรภาพของสีที่เกิดขึ้นดีกว่า และมีการรบกวนจากไอออนอื่นน้อยกว่า วิธีนี้จึงเหมาะที่จะใช้

วิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งมีความเข้มข้นของฟอสฟอรัสสูง เช่น พืช ปุ๋ย และอาหารสัตว์ เป็นต้น ดังนั้นจึงเลือก Vanadomolybdate method มาทำการทดลองเพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

วิธีดำเนินการ

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 และ 100 มล.
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.
3. ปิเปตอัตโนมัติ
4. บีกเกอร์
5. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
6. เครื่อง UV/vis spectrophotometer รุ่น U-2001 ยี่ห้อ HITACHI
7. แผ่นให้ความร้อน (hot plate)

สารเคมี

1. Ammonium molybdate [$(NH_4)_6Mo_7{\cdot}4H_2O$], AR grade
2. Ammonium metavanadate (NH_4VO_3), AR grade
3. Nitric acid 69-70 % (HNO_3), AR grade
4. Perchloric acid 69-70 % ($HClO_4$), AR grade
5. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

วัสดุอ้างอิงรับรอง

CRM จากใบมะเขือเทศ ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัส 0.216%

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างและสารละลาย

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืช (sample blank) นำตัวอย่างใบยางพาราที่ทำความสะอาดแล้ว มาอบที่อุณหภูมิ 60 °C จนแห้ง แล้วบดให้ละเอียด เก็บในภาชนะที่แห้งสนิท เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

1.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1.2.1 ชั่งตัวอย่างพืชจำนวน 1.000 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล.

1.2.2 เติมกรดไนตริก (HNO_3) 18 มล.

1.2.3 เติมกรดเปอร์คลอริก ($HClO_4$) 7 มล.

1.2.4 นำไปย่อยบนแผ่นให้ความร้อน (hot plate) จนมีควันสีขาวเกิดขึ้นเหนือสารละลาย หรือสารละลายมีลักษณะสีใส จากนั้นยกลงจากแผ่นให้ความร้อน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

1.2.5 ถ่ายสารละลายตัวอย่าง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มล.

1.3 การเตรียมสารละลาย Barton's solution

1.3.1 ชั่ง Ammonium molybdate 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 400 มล.

1.3.2 ชั่ง Ammonium metavanadate 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มล. เติมกรดไนตริก (HNO_3) 250 มล. เติม Ammonium molybdate (จากข้อ 1.1) ปรับปริมาตรเป็น 1.000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

2.1 การตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Rang) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

2.1.1 spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (standard P) ลงใน sample blank (จากข้อ 1.1) แล้วนำไปย่อยด้วยกรดผสม (ตามข้อ 1.2)

2.1.2 ตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Rang) ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 7 และ 9 ppm ในแต่ละระดับความเข้มข้น ทำ 3 ซ้ำ

2.1.3 นำไปทำให้เกิดสีด้วย Barton's solution ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตรสุดท้าย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที

2.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm

2.1.5 plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของ sample blank ที่ spike standard (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y)

2.2 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

2.2.1 spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (standard P) ลงใน sample blank (จากข้อ 1.1) แล้วนำไปย่อยด้วยกรดผสม (ตามข้อ 1.2)

2.2.2 ตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธี โดยเลือกความเข้มข้นจาก Rang มา 5 ความเข้มข้น คือ 1 2 3 4 และ 5 ppm ในแต่ละระดับความเข้มข้นทำ 10 ซ้ำ นำไปทำให้เกิดสีด้วย Barton's solution ในอัตราส่วน 1 : 10 ของปริมาตรสุดท้าย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที

2.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm

2.2.4 plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของ sample blank ที่ spike standard (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y)

2.3 การทดสอบค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) และการทดสอบค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (LOQ)

2.3.1 นำ sample blank (จากข้อ 1.1) แล้วนำไปย่อยด้วยกรดผสม (ตามข้อ 1.2) ทำการทดลอง 10 ซ้ำ

2.3.2 ทำให้เกิดสีด้วย Barton's solution ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตรสุดท้าย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที

2.3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm

2.3.4 plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y)

2.3.5 คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ sample blank

2.3.6 คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

LOD = mean + 3 (SD)

LOQ = mean + 10 (SD)

2.4 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

2.4.1 ชั่ง CRM 1.000 g จำนวน 10 ซ้ำ

2.4.2 spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.04 1.00 และ 2.00% ใน sample blank 1.000 g ในแต่ละระดับความเข้มข้นทำ 10 ซ้ำ

2.4.3 นำตัวอย่างจากข้อที่ 2.4.1 และ 2.4.2 ไปย่อยด้วยกรดผสม (ตามข้อ 1.2)

2.4.4 ทำให้เกิดสีด้วย Barton's solution ในอัตราส่วน 1:10 ของปริมาตรสุดท้าย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วเขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 นาที

2.4.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm

2.4.6 plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y) คำนวณหาปริมาณฟอสฟอรัส

2.4.7 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หา %Relative Accuracy หรือ %Recovery

2.5 การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช

2.5.1 นำข้อมูลผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส จากข้อ 2.4 มาวิเคราะห์โดยใช้ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากสูตร

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

$$\text{\%RSD} = (\text{SD} \times 100)/\text{Mean}$$

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

$$C = \text{Concentration}$$

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ : ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี Vanadomolybdate ได้ผลวิเคราะห์ดังนี้

1. ช่วงการใช้งาน (Rang) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ช่วง 1 - 9 มก./ลิตร มีค่า correlation coefficient (r) = 1.000

2. ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ช่วง 1- 5 มก./ลิตรมีค่า correlation coefficient (r) = 1.000

2.1 ค่าต่ำสุดของปริมาณที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) เท่ากับ 375 มก./กก.

2.2 ค่าต่ำสุดที่สามารถรายงานได้อย่างถูกต้อง (LOQ) เท่ากับ 397 มก./กก.

3. การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ด้วยการคำนวณ %Recovery จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในใบมะเขือเทศ (CRM) ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัส 0.216% และ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.04 1.00 และ 2.00% ใน sample blank พบว่า ค่า %recovery เท่ากับ 97.92 99.00 98.44 และ 98.85 % ตามลำดับ

4. การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) ด้วยการคำนวณ HORRAT (Horwitz's Ratio) จากการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในใบมะเขือเทศ (CRM) ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัส 0.216% และ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.04 1.00 และ 2.00% ใน sample blank พบว่า มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.85 0.41 0.47 และ 0.31 ตามลำดับ

สรุปผลการดำเนินงานและคำแนะนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี vanadomolybdate พบว่า ช่วงการใช้งาน (Rang) และความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) มีค่า $R^2 \geq 0.995$ ความถูกต้อง (Accuracy) อยู่ในช่วง 95 - 105 และความแม่นยำ (Precision) มีค่า HORRAT ≤ 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล ดังนั้น การวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ด้วยวิธี Vanadomolybdate จึงสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการได้

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เผยแพร่วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในพืช ให้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตร
2. ใช้เป็นแหล่งข้อมูลให้กับนักวิจัย นักศึกษาและผู้ที่สนใจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

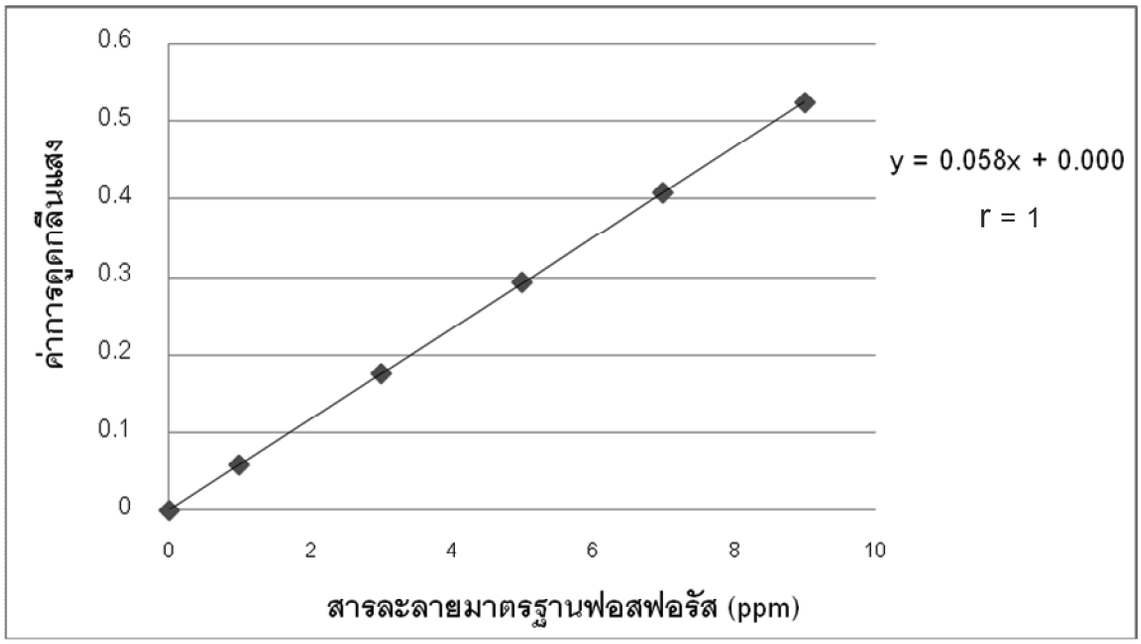
นิรนาม. 2556. http://agri.wu.ac.th/msomsak/Soil/Lab/Lab05.htm.12 ธันวาคม 2556.

จิตรา ชัยวิมล. 2545. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ “การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี” กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

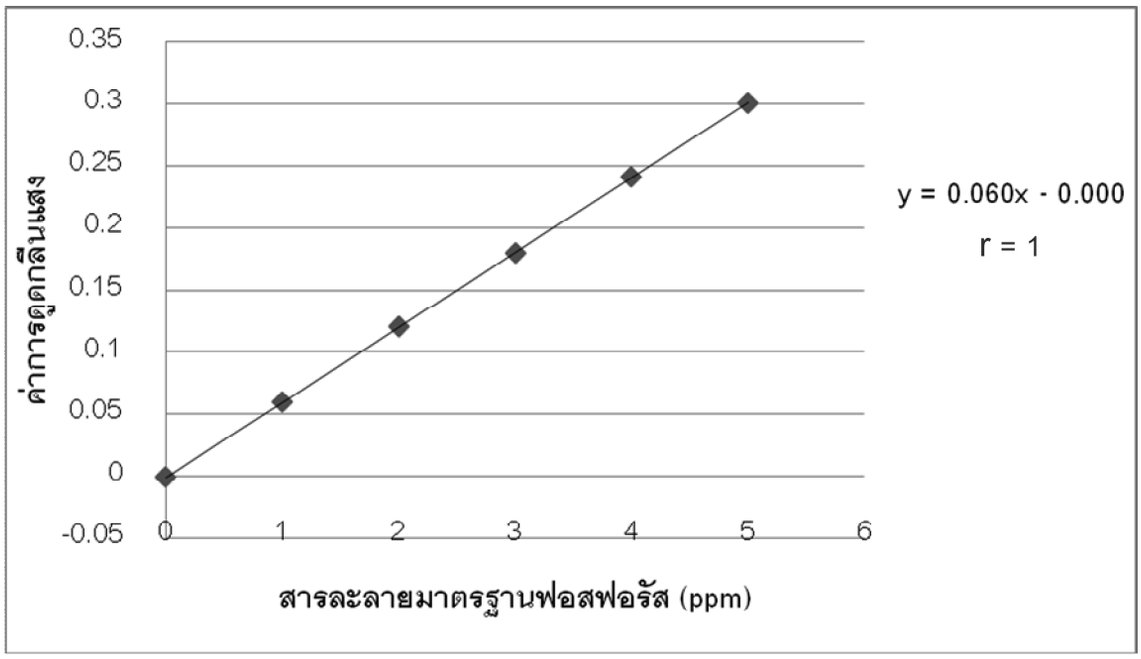
ไพลิน เหล็กคง. 2546. เอกสารวิชาการคู่มือการวิเคราะห์พืช. กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยเคมีสรีรวิทยาพืช. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.

AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

ภาคผนวก



รูปที่ 1. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ในช่วง 1- 9 มก./ลิตร กับค่าการดูดกลืนแสง



รูปที่ 2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ในช่วง 1- 5 มก./ลิตร กับค่าการดูดกลืนแสง

ตารางผนวกที่ 1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสในใบมะเขือเทศ (CRM) ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัส 0.216%

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (g)	ปริมาณฟอสฟอรัส (%)
1	1.000	0.216
2	1.000	0.211
3	1.000	0.215
4	1.000	0.212
5	1.000	0.207
6	1.000	0.208
7	1.000	0.213
8	1.000	0.211
9	1.000	0.213
10	1.000	0.209
เฉลี่ย		**0.212**
SD.		**0.003**

การคำนวณ

$$\% P = [\text{ ppm equi x dilution factor x original solution x } 100]/[10^6 \text{ x wt. sample}]$$

เมื่อ ppm equi หมายถึง ค่าที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer มีหน่วยเป็น ppm หรือ มก./ลิตร

wt. sample หมายถึง น้ำหนักของตัวอย่างมีหน่วยเป็น กรัม

ตารางผนวกที่ 2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส ใน sample blank

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (g)	ปริมาณฟอสฟอรัส (%)
1	1.000	0.0367
2	1.000	0.0363
3	1.000	0.0365
4	1.000	0.0369
5	1.000	0.0359
6	1.000	0.0370
7	1.000	0.0366
8	1.000	0.0366
9	1.000	0.0366
10	1.000	0.0367
ค่าเฉลี่ย		**0.0366**
SD		**0.0003**

ตารางผนวกที่ 3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส เมื่อ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 0.04 1.00 และ 2.00% ใน sample blank

ตัวอย่าง	ปริมาณฟอสฟอรัสใน sample blank (%)	ปริมาณฟอสฟอรัส เมื่อ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน sample blank		
		0.04%	1.00 %	2.00 %
1	0.0367	0.0755	1.0335	2.0090
2	0.0363	0.0755	1.0160	2.0180
3	0.0365	0.0755	1.0205	2.0230
4	0.0369	0.0771	1.0270	2.0050
5	0.0359	0.0773	1.0115	2.0180
6	0.0370	0.0766	1.0160	2.0090
7	0.0366	0.0762	1.0225	2.0090
8	0.0366	0.0764	1.0245	2.0270
9	0.0366	0.0762	1.0180	2.0090
10	0.0367	0.0757	1.0205	2.0090
ค่าเฉลี่ย	**0.0366**	**0.0762**	**1.021**	**2.0136**
SD	**0.0003**	**0.0007**	**0.0063**	**0.0074**

ตัวอย่างการคำนวณ เมื่อ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 2.00% ใน sample blank ที่ 1

% Recovery = {(2.0090 % - 0.0366 %) / 2.00 %} x 100

โดย 2.0090 % เท่ากับ ปริมาณฟอสฟอรัส เมื่อ spike สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสที่ความเข้มข้น 2.00 % ใน sample blank ตัวอย่างที่ 1

0.0366 % เท่ากับ ปริมาณฟอสฟอรัสเฉลี่ยใน sample blank

2.00 % เท่ากับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส

พัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างปุ๋ยเพื่อการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

Technique Development of Fertilizer Sample Preparation for Analysis in Laboratory

จริยา วงศ์ตรี ทองจันทร์ พิมพ์เพชร ชฎาพร คงนาม ปรียาภรณ์ บุญขจาย

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

จากผลการทดลองในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) สูตร 8-8-8 15-15-15 และ 19-19-19 (ให้เป็นตัวแทนของช่วงสูตร ต่ำ กลาง สูง ตามลำดับ) ที่บดผ่านตะแกรง (Sieve) ขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม. พบว่าการบดตัวอย่างปุ๋ยผ่านตะแกรงขนาดเดียวกัน ในแต่ละขนาดทำให้ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน ครอบคลุมทั้ง 3 สูตร

การบดตัวอย่างปุ๋ยผ่านตะแกรง ขนาดต่างกัน คือ ขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม. มีผลทำให้ผลวิเคราะห์ส่วนใหญ่แตกต่างกัน โดยธาตุไนโตรเจน สูตร 8-8-8 ตัวแทนช่วงสูตรต่ำ และสูตร 19-19-19 ตัวแทนช่วงสูตรสูง ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน แต่ในสูตร 15-15-15 ตัวแทนช่วงสูตรกลาง ผลวิเคราะห์แตกต่างกัน ส่วนฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม พบว่าการบดตัวอย่างผ่านตะแกรง ขนาดต่างกันมีผลทำให้ผลวิเคราะห์แตกต่างกัน ครอบคลุมทั้ง 3 ช่วงสูตร

เมื่อทำการเปรียบเทียบต่อไปว่าการบดผ่านตะแกรง ขนาดใดที่มีผลทำให้ผลวิเคราะห์มีการกระจายน้อยที่สุด โดยใช้เส้นกราฟความสัมพันธ์ของค่า SD ในการพิจารณา พบว่าเส้นกราฟความสัมพันธ์ค่า SD ของผลวิเคราะห์ของ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 0.5 มม. มีค่าต่ำและแคบกว่าเส้นกราฟความสัมพันธ์ของค่า SD ที่บดด้วยตะแกรงขนาด 0.25 และ 1.0 มม. ครอบคลุมทั้ง 3 สูตร ที่เป็นตัวแทนของช่วงสูตรต่ำ กลาง สูง จึงเป็นขนาดตะแกรงที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขั้นตอนการบดตัวอย่างที่ทำให้ผลวิเคราะห์มีค่าการกระจายน้อยที่สุด

คำนำ

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีความสำคัญอย่างมากต่อผลวิเคราะห์ หากการเตรียมตัวอย่างไม่ดีอาจมีผลทำให้ค่าวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง เนื่องจากไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) การบดตัวอย่างให้มีความละเอียด จึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์เป็นอย่างยิ่ง แต่การบดตัวอย่างให้มีความละเอียดนั้นทำได้หลายขนาด โดยการบดผ่านตะแกรงขนาดต่างๆ ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่า การบดตัวอย่างโดยผ่านตะแกรงขนาดใด ที่มีผลต่อการกระจายของข้อมูลมากและน้อยที่สุด โดยการบดผ่านตะแกรงขนาดแตกต่างกัน เพื่อหาขนาดที่เหมาะสม สามารถนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและทำให้ข้อมูลมีการกระจายน้อยที่สุด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม อ้างอิงตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (กรมวิชาการเกษตร, 2551) ของกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2. แม่ปุ๋ยที่ใช้ ได้แก่ ยูเรีย (Urea) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) และ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

วิธีการ

1. ศึกษาความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง (Sieve) ขนาด 0.25 มม.

1.1 เตรียมตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า จำนวน 3 สูตรๆ ละ 5 ถุงๆ ละ 1 กก. ครอบคลุมทั้งระดับต่ำ กลาง สูง (ช่วงของปริมาณธาตุอาหารรับรอง ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518) ดังนี้สูตร 8-8-8 15-15-15 และ 19-19-19 โดยใช้แม่ปุ๋ยของธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ได้แก่ ยูเรีย (Urea : 46-0-0) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP : 18-46-0) และ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl : 0-0-60) ตามลำดับ

1.2 แบ่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ถุงละ 1 กก. ออกเป็น 4 ส่วน ในอัตราส่วนเท่าๆ กัน สุ่มมา 3 ส่วน บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม. ทำขั้นตอนเดียวกัน จนครบทั้งหมด 5 ถุง ได้จำนวนตัวอย่างปุ๋ยที่บดแล้ว จำนวน 15 ถุงย่อย

1.3 วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างที่บดไว้แล้ว ในข้อ 1.2

1.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA)

1.5 สรุปผล

2. ศึกษาความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

2.1 เตรียมตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า จำนวน 3 สูตรๆ ละ 5 ถุงๆ ละ 1 กิโลกรัม ครอบคลุมทั้งระดับต่ำ กลาง สูง (ช่วงของปริมาณธาตุอาหารรับรอง ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518) ดังนี้สูตร 8-8-8 15-15-15 และ 19-19-19 โดยใช้แม่ปุ๋ยของธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ยูเรีย (Urea : 46-0-0) ไดแอมโมเนียม ฟอสเฟต (DAP : 18-46-0) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl : 0-0-60) ตามลำดับ

2.2 แบ่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ถุงละ 1 กิโลกรัม ออกเป็น 4 ส่วน ในอัตราส่วนเท่าๆ กัน สุ่มมา 3 ส่วน บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. ทำขั้นตอนเดียวกัน จนครบทั้งหมด 5 ถุง ได้จำนวนตัวอย่างปุ๋ยที่บดแล้ว จำนวน 15 ถุงย่อย

2.3 วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างที่บดไว้แล้ว ในข้อ 2.2

2.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA)

2.5 สรุปผล

3. ศึกษาความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 1.0 มม.

3.1 เตรียมตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า จำนวน 3 สูตรๆ ละ 5 ถุงๆ ละ 1 กก. ครอบคลุมทั้งระดับต่ำ กลาง สูง (ช่วงของปริมาณธาตุอาหารรับรอง ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518) ดังนี้สูตร 8-8-8 15-15-15 และ

19-19-19 โดยใช้แม่ปุ๋ยของธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม ได้แก่ ยูเรีย (Urea : 46-0-0) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP: 18-46-0) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl: 0-0-60) ตามลำดับ

3.2 แบ่งตัวอย่างที่เตรียมไว้ถุงละ 1 กก. ออกเป็น 4 ส่วน ในอัตราส่วนเท่าๆ กัน สุ่มมา 3 ส่วน บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม. ทำขั้นตอนเดียวกัน จนครบทั้งหมด 5 ถุง ได้จำนวนตัวอย่างปุ๋ยที่บดแล้วจำนวน 15 ถุงย่อย

3.3 วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างที่บดไว้แล้ว ในข้อ 3.2

3.4 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA)

3.5 สรุปผล

4. เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า คลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม.

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 - กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ณ กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **ศึกษาความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 0.25 มม.** (ตารางผนวกที่ 1) สรุปผลได้ดังนี้

1.1 ไนโตรเจน (%N)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไนโตรเจน (%N) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่ละสูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของไนโตรเจน จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

1.2 ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่ละสูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

1.3 โพแทสเซียม ($\%K_2O$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโพแทสเซียม ($\%K_2O$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่สูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของโพแทสเซียม จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

2. **ศึกษาความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 0.5 มม.** (ตารางผนวกที่ 2) สรุปผลได้ดังนี้

2.1 ไนโตรเจน (%N)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไนโตรเจน (%N) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่ละสูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของไนโตรเจน จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

2.2 ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่ละสูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

2.3 โพแทสเซียม ($\%K_2O$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโพแทสเซียม ($\%K_2O$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่ละสูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของโพแทสเซียม จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

3. ศึกษาความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 1.0 มม. (ตารางผนวกที่ 3) สรุปผลได้ดังนี้

3.1 ไนโตรเจน (%N)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไนโตรเจน (%N) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่ละสูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของไนโตรเจน จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

3.2 ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าในแต่สูตร ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

3.3 โพแทสเซียม ($\%K_2O$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโพแทสเซียม ($\%K_2O$)) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 8-8-8 15-15-15 และ สูตร 19-19-19 สูตรละ 5 ถุง พบว่าค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดง ว่าค่าเฉลี่ยของโพแทสเซียม จากทั้ง 5 ถุง ในแต่ละสูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม. มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

4. เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณธาตุอาหารหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) ที่บดผ่านตะแกรง ขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม.

4.1 เปรียบเทียบโดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ตารางผนวกที่ 4) สรุปผลได้ดังนี้

4.1.1 ไนโตรเจน (%N)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณไนโตรเจน ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม. ตัวอย่างละ 5 ถุง ตามลำดับ พบว่า

สูตร 8-8-8 มีค่า $F_{cal} < F_{crit(0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของไนโตรเจน ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

สูตร 15-15-15 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.01)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของไนโตรเจน ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant)

สูตร 19-19-19 มีค่า $F_{cal} < F_{crit(0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของไนโตรเจน ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

4.1.2 ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัส ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม. ตัวอย่างละ 5 ถุง ตามลำดับ พบว่า

สูตร 8-8-8 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.01)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant)

สูตร 15-15-15 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.01)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant)

สูตร 19-19-19 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.01)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของฟอสฟอรัส ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant)

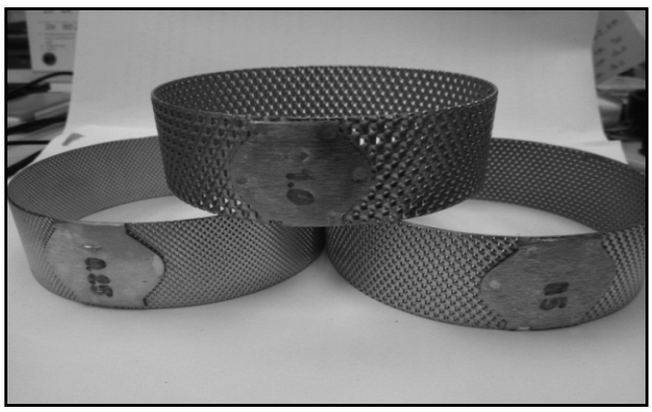
4.1.3 โพแทสเซียม ($\%K_2O$)

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโพแทสเซียม ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม. ตัวอย่างละ 5 ถุง ตามลำดับ พบว่า

สูตร 8-8-8 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.01)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของโพแทสเซียม ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant)

สูตร 15-15-15 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของโพแทสเซียมที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (significant)

สูตร 19-19-19 มีค่า $F_{cal} > F_{crit(0.01)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของโพแทสเซียม ที่บดผ่านตะแกรงต่างกัน 3 ขนาด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant)



ภาพที่ 1. แสดงขนาดของตะแกรงบด (Sieve) ขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม.



ภาพที่ 2. แสดงขั้นตอนการประกอบชิ้นส่วนอุปกรณ์ต่างๆ และตะแกรงบด (Sieve) ลงในเครื่องบดตัวอย่างปุ๋ย

4.2 เปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ตารางผนวกที่ 5-7)

4.2.1 เปรียบเทียบ SD ของค่าวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ย ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม.

4.2.1.1 ไนโตรเจน (N) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.0–0.2

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.2–0.7

สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.5

4.2.1.2 ฟอสฟอรัส (P_2O_5) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.0–0.3

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.2–0.6

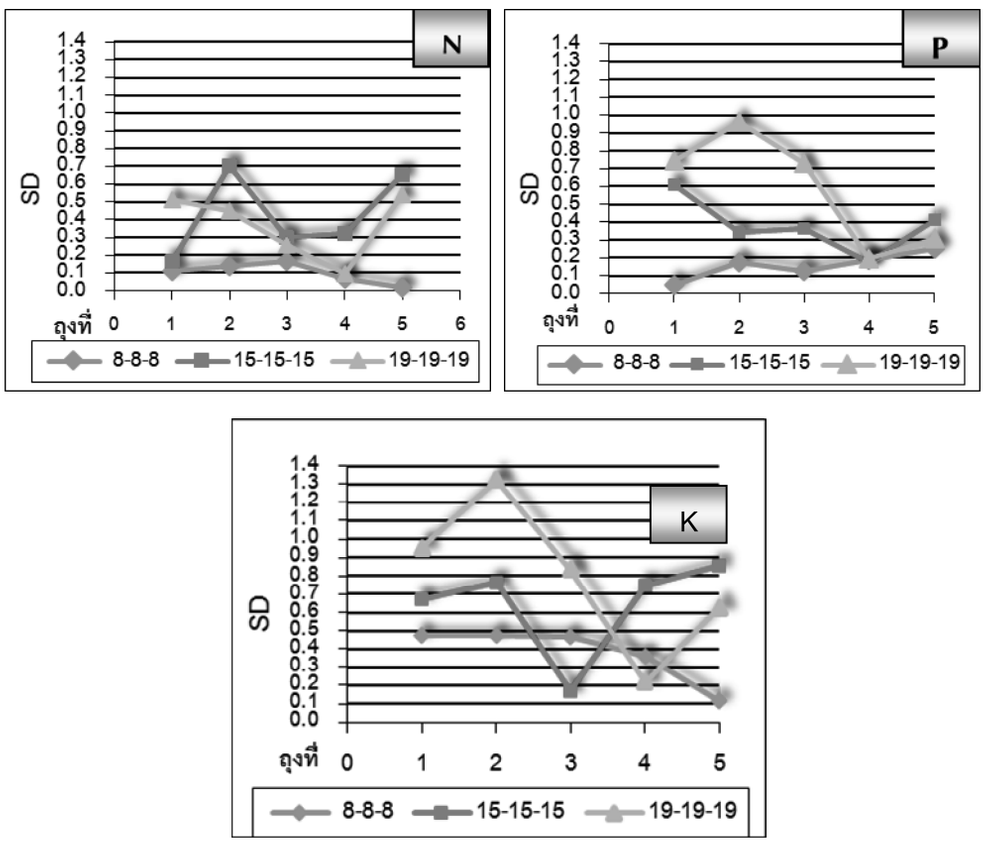
สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.2–1.0

4.2.1.3 โพแทสเซียม (K_2O) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1–0.5

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.2–0.9

สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.2–1.3



ภาพที่ 3. เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ค่า SD ของผลวิเคราะห์ N P K ในตัวอย่างปุ๋ย 3 สูตรที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม.

4.2.2 เปรียบเทียบ SD ของค่าวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ย ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

4.2.2.1 ไนโตรเจน (%N) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.3

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.2

สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.3

4.2.2.2 ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.4

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.2–0.3

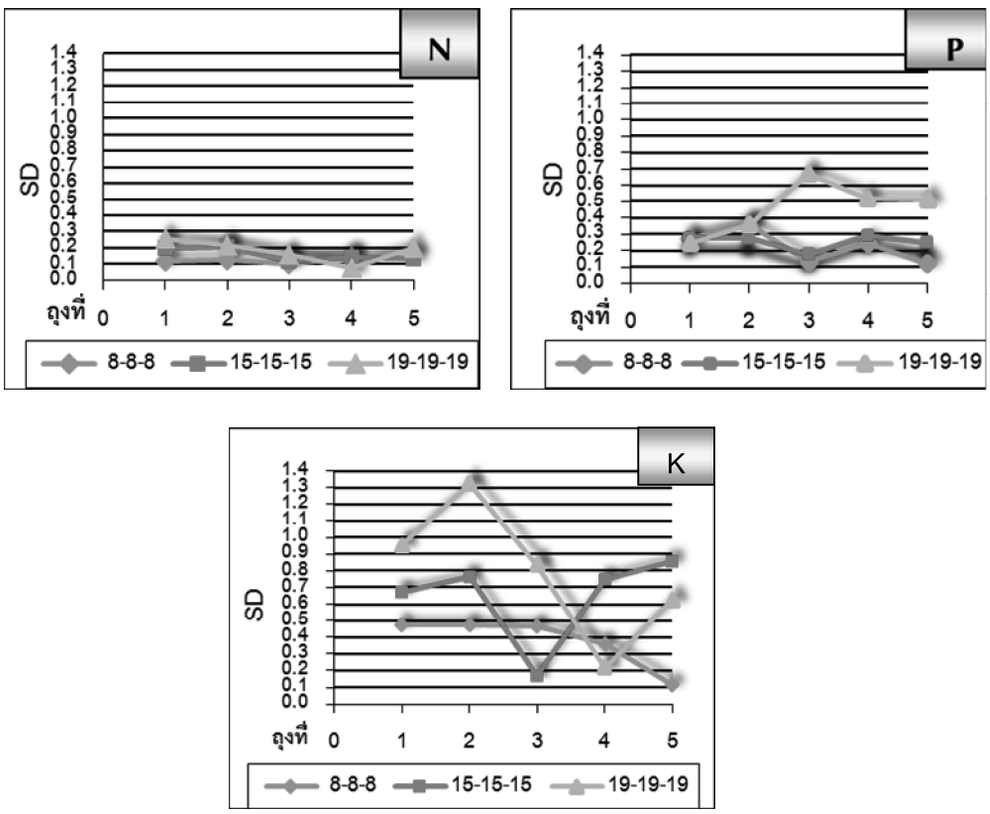
สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.2–0.7

4.2.2.3 โพแทสเซียม (%K_2O) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1–0.3

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1–0.3

สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.2–0.5



ภาพที่ 4. เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ SD ของผลวิเคราะห์ N P K ในตัวอย่างปุ๋ย 3 สูตร ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

4.2.3 เปรียบเทียบ SD ของค่าวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ย ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม.

4.2.3.1 ไนโตรเจน (%N) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.2

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.6

สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.0–0.3

4.2.3.2 ฟอสฟอรัส (%P_2O_5) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.0–0.3

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.1–0.4

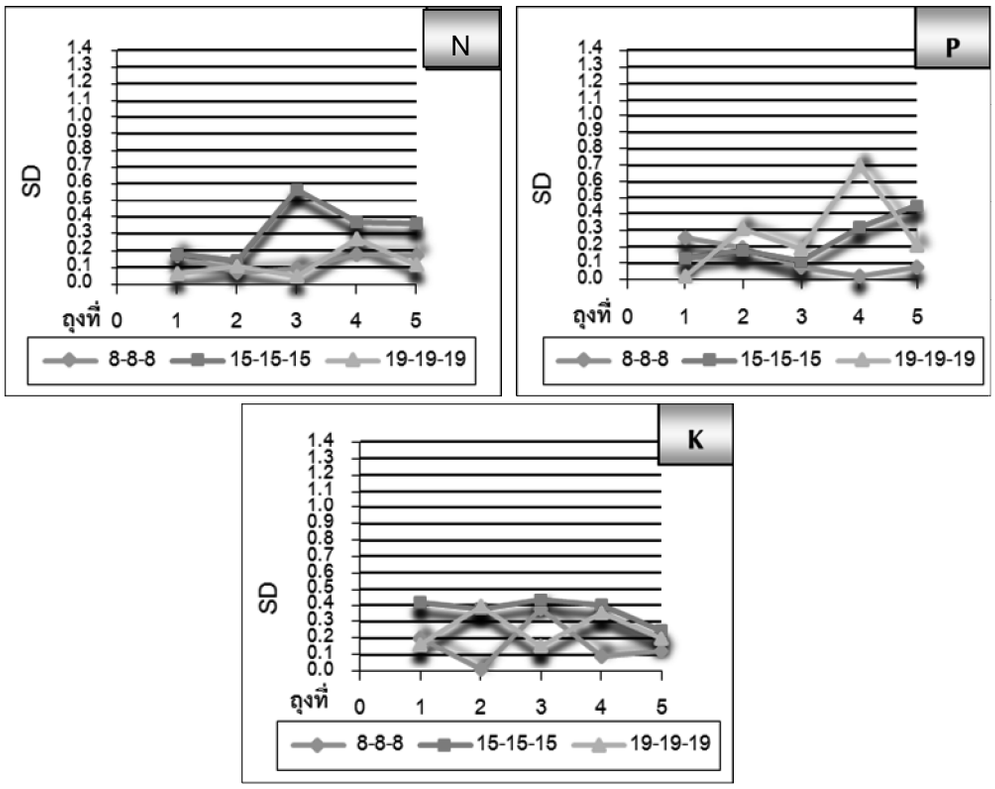
สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลง อยู่ในช่วง 0.0–0.7

4.2.3.3 โพแทสเซียม (%K_2O) ในตัวอย่างปุ๋ยที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม.

สูตร 8-8-8 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.0–0.4

สูตร 15-15-15 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.2–0.4

สูตร 19-19-19 เส้นกราฟค่า SD วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1–0.4



ภาพที่ 5. เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ SD ของผลวิเคราะห์ N P K ในตัวอย่างปุ๋ย 3 สูตร ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม.

สรุปผลการทดลอง

การบดตัวอย่างปุ๋ยด้วยตะแกรง (Sieve) ขนาดเดียวกันแต่ละขนาด (0.25 0.5 และ 1.0 มม.) ทำให้ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน ครอบคลุมทั้ง 3 สูตร คือ สูตร 8-8-8 15-15-15 และ 19-19-19 ที่เป็นตัวแทนของช่วงสูตรต่ำ กลาง สูง

การบดตัวอย่างปุ๋ยด้วยตะแกรงขนาดต่างกัน คือ ขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม. มีผลทำให้ผลวิเคราะห์ส่วนใหญ่แตกต่างกัน_โดยธาตุไนโตรเจน สูตร 8-8-8 ตัวแทนช่วงสูตรต่ำ และ19-19-19 ตัวแทนช่วงสูตรสูง มีผลทำให้ผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน แต่สูตร 15-15-15 ตัวแทนช่วงสูตรกลาง มีผลทำให้ผลวิเคราะห์แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนธาตุฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม พบว่าการบดตัวอย่างด้วยตะแกรงขนาดต่างกัน มีผลทำให้ผลวิเคราะห์แตกต่างกันครอบคลุมทั้ง 3 ช่วงสูตร

เมื่อทำการเปรียบเทียบต่อไปว่าการใช้ตะแกรงขนาดใด ที่มีผลทำให้ผลวิเคราะห์มีการกระจายน้อยที่สุดโดยเส้นกราฟความสัมพันธ์ของค่า SD พบว่าเส้นกราฟความสัมพันธ์ค่า SD ของผลวิเคราะห์ของไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่บดด้วยตะแกรง ขนาด 0.5 มม. มีค่าต่ำและแคบกว่าเส้นกราฟความสัมพันธ์ของค่า SD ที่บดด้วย

ตะแกรงขนาด 0.25 และ 1.0 มม. ครอบคลุมทั้ง 3 สูตร ที่เป็นตัวแทนของช่วงสูตร ต่ำ กลาง สูง จึงเป็นขนาดตะแกรงที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขั้นตอนการบดตัวอย่าง ที่ทำให้ผลวิเคราะห์มีการกระจายน้อยที่สุด

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงขนาดของตะแกรงที่เหมาะสมและขนาดที่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างปุ๋ย เป็นข้อมูลยืนยันความเหมาะสมของขนาดตะแกรงที่ใช้งานอยู่ในงานวิเคราะห์ตรวจสอบปุ๋ย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี.2551. **คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี**. กรุงเทพฯ.

สายชล สินสมบูรณ์ทอง. 2546. **สถิติกับการวางแผนการทดลองทางการเกษตร**. พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. ตารางสรุปค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 มม.

ถุงที่	วิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K								
	N			P			K		
	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
1	7.80a	15.60a	18.87a	8.07a	15.13a	19.06a	8.53a	15.73a	21.37a
2	7.77a	15.27a	18.90a	8.03a	14.93a	18.66a	8.40a	15.73a	21.47a
3	7.80a	15.73a	19.00a	8.13a	14.93a	19.03a	8.57a	15.80a	21.23a
4	7.87a	15.37a	19.20a	8.10a	15.30a	19.67a	8.43a	15.50a	20.33a
5	7.93a	15.40a	19.10a	8.27a	15.17a	19.30a	8.43a	15.83a	20.80a
เฉลี่ย	**7.83**	**15.47**	**19.01**	**8.12**	**15.09**	**19.15**	**8.47**	**15.72**	**21.04**
F-cal	0.83 (ns)	0.47 (ns)	0.35 (ns)	0.79 (ns)	0.51 (ns)	0.93 (ns)	0.09 (ns)	0.10 (ns)	0.88 (ns)
F-Crit	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48
%CV	**1.61**	**3.09**	**2.13**	**2.16**	**2.70**	**3.45**	**4.85**	**4.43**	**4.13**

ตารางผนวกที่ 2. ตารางสรุปค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า ที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม.

ถุงที่	วิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K								
	N			P			K		
	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
1	8.00a	15.23a	18.83a	8.37a	15.70a	19.70a	8.27a	15.43a	19.90a
2	7.83a	15.40a	18.97a	8.40a	15.53a	19.73a	8.20a	15.27a	20.03a
3	8.03a	15.33a	18.97a	8.40a	15.60a	19.93a	8.27a	15.77a	20.03a
4	8.03a	15.57a	18.90a	8.37a	15.40a	19.87a	8.13a	15.40a	20.00a
5	8.07a	15.37a	19.07a	8.30a	15.47a	20.17a	8.23a	15.60a	20.23a
เฉลี่ย	**7.99**	**15.38**	**18.95**	**8.37**	**15.54**	**19.88**	**8.22**	**15.49**	**20.04**
F-cal	0.87	1.45	0.59	0.09	0.64	0.47	0.15	2.67	0.42
	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
F-Crit	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48
%CV	**2.10**	**1.14**	**1.04**	**2.86**	**1.62**	**2.37**	**3.0**	**1.32**	**1.61**

ตารางผนวกที่ 3. ตารางสรุปค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่บดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม.

ถุงที่	วิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K								
	N			P			K		
	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
1	8.10a	15.87a	18.96a	8.50a	15.43a	19.60a	8.17a	15.47a	19.70a
2	7.83a	15.43a	18.80a	8.40a	15.40a	19.73a	8.20a	15.23a	19.83a
3	7.93a	15.97a	18.77a	8.50a	15.27a	19.47a	8.17a	15.33a	19.97a
4	7.97a	15.97a	18.90a	8.40a	15.40a	19.47a	8.27a	15.47a	19.83a
5	8.17a	16.23a	18.60a	8.33a	15.47a	19.50a	8.23a	15.23a	19.97a
เฉลี่ย	**8.00**	**15.89**	**18.80**	**8.43**	**15.39**	**19.55**	**8.21**	**15.35**	**19.86**
F-cal	3.2	1.91	3.05	0.64	0.22	0.30	0.15	0.28	0.51
	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
F-Crit	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48
%CV	**1.61**	**2.30**	**0.74**	**1.86**	**1.84**	**1.84**	**2.40**	**2.48**	**1.36**

ตารางผนวกที่ 4. แสดงผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าสูตรเดียวกันที่บดผ่านตะแกรง (Sieve) ที่มีขนาดแตกต่างกัน

ขนาดตะแกรง (มม.)	วิเคราะห์ความแปรปรวนของ N P K								
	N			P			K		
	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
0.25	7.86a	15.48b	19.02a	8.12 b	15.08 b	19.16c	8.48a	15.72a	21.04a
0.5	8.02a	15.36b	18.96a	8.38 a	15.54 a	19.90a	8.24b	15.50ab	20.02b
1.0	7.98a	15.88a	18.82a	8.42 a	15.40 a	19.54b	8.20b	15.34b	19.86b
เฉลี่ย	**7.95**	**15.57**	**18.9**	**8.31**	**15.33**	**19.53**	**8.31**	**15.52**	**20.31**
F-cal	3.25 (ns)	8.76**	3.04 (ns)	18.95**	16.68**	11.04**	22.93**	6.82*	22.51**
F-Crit (0.05)	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89
F-Crit (0.01)	6.93	6.93	6.93	6.93	6.93	6.93	6.93	6.93	6.93
%CV	1.30	1.32	0.70	1.0	0.84	1.27	0.85	1.05	1.49

ตารางผนวกที่ 5. แสดงค่า SD ของธาตุไนโตรเจน (%N) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าทั้ง 3 สูตร โดยบดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม.

SD ของธาตุไนโตรเจน									
	ขนาด 0.25 มม.			ขนาด 0.5 มม.			ขนาด 1.0 มม.		
ถุงที่	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
1	0.1	0.2	0.5	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
2	0.1	0.7	0.5	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
3	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.6	0.0
4	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.3
5	0.0	0.7	0.5	0.1	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1

ตารางผนวกที่ 6. แสดงค่า SD ของธาตุฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าทั้ง 3 สูตร โดยบดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม.

SD ของธาตุฟอสฟอรัส									
	ขนาด 0.25 มม.			ขนาด 0.5 มม.			ขนาด 1.0 มม.		
ถุงที่	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
1	0.0	0.6	0.7	0.3	0.3	0.2	0.3	0.1	0.0
2	0.2	0.3	1.0	0.4	0.3	0.4	0.2	0.2	0.3
3	0.1	0.4	0.7	0.1	0.2	0.7	0.1	0.1	0.2
4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.5	0.0	0.3	0.7
5	0.3	0.4	0.3	0.1	0.2	0.5	0.1	0.4	0.2

ตารางผนวกที่ 7. แสดงค่า SD ของธาตุ โพแทสเซียม ($\%K_2O$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าทั้ง 3 สูตร โดยบดผ่านตะแกรงขนาด 0.25 0.5 และ 1.0 มม.

SD ของธาตุโพแทสเซียม									
	ขนาด 0.25 มม.			ขนาด 0.5 มม.			ขนาด 1.0 มม.		
ถุงที่	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19	8-8-8	15-15-15	19-19-19
1	0.5	0.7	1.0	0.3	0.2	0.4	0.2	0.4	0.2
2	0.5	0.8	0.6	0.3	0.1	0.2	0.0	0.4	0.4
3	0.5	0.2	0.8	0.1	0.1	0.3	0.4	0.4	0.1
4	0.4	0.7	0.2	0.2	0.3	0.5	0.1	0.4	0.4
5	0.1	0.9	1.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2

พัฒนาเทคนิคและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

Development and Increase Efficiency Techniques Determination of Total Nitrogen in Fertilizer

สงกรานต์ มะลิสอน วรรณรัตน์ ชุติบุตร ทองจันทร์ พิมพ์เพชร อาธิยา ปุ่นประโคน
กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ทำการศึกษาระดับความร้อนและระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างที่เหมาะสม ตลอดจนตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ที่ระดับความร้อน 6 10 และ 14 ซม. ระดับความเข้มข้นไนโตรเจน 13.85 26.019 และ 46.535% มี %Recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และทำการประเมินความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบกับค่าจริง และจากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยตัวอย่าง พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยโดยย่อยที่เวลาปกติ และย่อย 1 ชั่วโมง ของระดับความร้อน 14 ซม. มี %Recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และทำการประเมินความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบกับค่าจริง จึงสามารถสรุปได้ว่าระดับความร้อน 14 ซม. ที่ระยะเวลาในการย่อย 1 ชั่วโมง เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความถูกต้อง และใช้ระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างน้อยที่สุด และจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการพิสูจน์ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวัดได้ (Limited of detection, LOD) เท่ากับ 0.58% ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (Limited of quantitative, LOQ) เท่ากับ 0.93% พิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy) มี %Recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และพิสูจน์ความเที่ยง (Precision) มีค่า HORRAT ผ่านเกณฑ์ยอมรับ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง เที่ยงตรง

คำนำ

ปุ๋ยถือเป็นปัจจัยหนึ่งในการเพาะปลูกพืชของเกษตรกรไทยเพราะมีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตพืช อาทิ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ซึ่งถือเป็นธาตุอาหารหลัก การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารในปุ๋ยจึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมคุณภาพปุ๋ยที่ผลิต หรือนำเข้า เพื่อให้เกษตรกรมีความมั่นใจและได้ใช้ปุ๋ยที่มีคุณภาพ ตลอดจนการตรวจสอบควบคุมคุณภาพปุ๋ยตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 พ.ศ. 2552

เมื่อกล่าวถึงธาตุอาหารที่พืชต้องการเป็นปริมาณมากแล้ว ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีบทบาทในการเจริญเติบโตของพืชอย่างเห็นได้ชัดที่สุด (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548) ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ประกอบด้วยไนโตรเจน

รูปต่างๆ ที่มีอยู่ในปุ๋ยเคมี ได้แก่ ไนเตรทไนโตรเจน แอมโมเนียมไนโตรเจน ยูเรียไนโตรเจน หรือแม้กระทั่งไบยูเร็ตไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยใช้วิธี Kjeldahl Method โดยการย่อยตัวอย่างปุ๋ยด้วย Sulfuric acid เข้มข้น Salicylic acid และ Sodium thiosulfate มี Potassium sulfate และ Copper sulfate เป็นสารเร่งปฏิกิริยา แล้วนำไปกลั่นด้วย Sodium hydroxide เพื่อไล่แอมโมเนีย แล้วจับด้วยกรดบอริกอิ่มตัว ไทเทรตสารละลายที่ได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากขั้นตอนการวิเคราะห์ข้างต้นนั้น กระบวนการย่อยตัวอย่างถือเป็นขั้นตอนสำคัญที่ต้องคำนึงถึง ซึ่งปัจจัยต่างๆ ประกอบด้วยปริมาณกรด และสารเคมี นอกจากนี้ความร้อนและระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างถือเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากความร้อนที่มากหรือน้อยเกินไป ระยะเวลาที่สั้นหรือยาวเกินไป อาจส่งผลทำให้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาระดับความร้อนและระยะเวลาที่มีอิทธิพลต่อผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเพื่อให้ได้ระดับความร้อนและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยตัวอย่าง และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยพิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (LOQ) เพื่อให้มั่นใจในความถูกต้อง เที่ยงตรง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
3. Macro Kjeldahl Digestion Apparatus and Distillation Apparatus
4. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์
5. สารเคมี และวัสดุอ้างอิงรับรอง

วิธีการ

1. ศึกษาระดับความร้อนในการย่อยตัวอย่างที่เหมาะสม

1.1 วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี กรมวิชาการเกษตร (2551) ที่ระดับความเข้มข้น 13.85% TN 26.019% TN 46.535% TN ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเปลี่ยนระดับความร้อนในการย่อยตัวอย่าง 6 ซม. 10 ซม. และ 14 ซม. ตามลำดับ

1.2 บันทึกผลการคำนวณค่าความถูกต้อง %Recovery และประเมินความแตกต่างผลการวิเคราะห์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริง โดยใช้สถิติ t-test

$$t = \frac{(\text{ค่าเฉลี่ย} - \text{ค่าจริง})}{(SD/\sqrt{n})}$$

เกณฑ์ยอมรับ $t < t_c$ ที่ $df = n-1$ ที่ความเชื่อมั่น 95%

1.3 พิจารณาระดับความร้อนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดโดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ที่ให้ค่าความถูกต้องมากที่สุด

2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยตัวอย่าง

2.1 วิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ที่ระดับความเข้มข้น 13.85% TN 26.019% TN 46.535% TN ระดับความร้อน 6 10 และ 14 ซม. ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ปรับเปลี่ยนระยะเวลาในการย่อยตัวอย่าง โดยย่อยที่เวลาปกติ 1 ชั่วโมง 45 นาที และ 30 นาที ตามลำดับ

หมายเหตุ ย่อยเวลาปกติ หมายถึง ย่อยตัวอย่างตามข้อ 1

2.2 บันทึกผลการคำนวณค่าความถูกต้อง %Recovery และประเมินความแตกต่างผลการวิเคราะห์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริง โดยใช้สถิติ t-test

$$t = \frac{(\text{ค่าเฉลี่ย} - \text{ค่าจริง})}{(SD/\sqrt{n})}$$

เกณฑ์ยอมรับ $t < t_c$ ที่ df = n-1 ที่ความเชื่อมั่น 95%

2.3 พิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดโดยพิจารณาจากผลการวิเคราะห์ที่ให้ค่าความถูกต้องมากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่พัฒนาขึ้น

3.1 ศึกษาหาค่าปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวัดได้ (LOD) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (LOQ)

3.1.1 วิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยโดโลไมท์ที่ไม่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมด จำนวน 10 ซ้ำ

3.1.2 บันทึกผลการทดลอง คำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.1.3 คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

LOD = X + 3SD

LOQ = X + 10SD

3.2 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy)

3.2.1 ชั่ง CRM ที่มีระดับความเข้มข้นสูงคือ Urea 46.535 ± 0.77% Nitrogen (CRM-BCR 179) ความเข้มข้นกลางคือ Calcium Ammonium Nitrate 26.019± 0.54% Nitrogen (CRM-BCR 178) และความเข้มข้นต่ำคือ การเตรียมโดยชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง Urea 46.535 ± 0.77% Nitrogen น้ำหนัก 1.8475 กรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน คำนวณความเข้มข้นได้เท่ากับ 0.8597% Nitrogen แต่ละความเข้มข้นวิเคราะห์ 10 ซ้ำ พร้อมทำ Reagent Blank

3.2.2 ดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมีตามคู่มือวิธีวิเคราะห์กรมวิชาการเกษตร (2551)

3.2.3 พิจารณา %Recovery โดยมีเกณฑ์การยอมรับ 98 - 102% (AOAC, 2012)

3.2.4 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะเนื้อสาร (Matrix) เติม CRM ดำเนินการตามข้อ 3.2.1-3.2.2

3.2.5 บันทึกผล คำนวณค่า %Recovery และ HORRAT

3.3 การพิสูจน์ความเที่ยง (Precision)

3.3.1 ชั่งตัวอย่างปุ๋ยและชั่ง CRM วิเคราะห์ตามขั้นตอนเดียวกับข้อ 3.2.1 - 3.2.2 โดยทำการวิเคราะห์ที่เวลาแตกต่างกัน

3.3.2 บันทึกผล คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และอัตราส่วน HORRAT เพื่อพิสูจน์ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยมีเกณฑ์ยอมรับ HORRAT < 2 (AOAC, 2012)

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

$$\%\text{RSD} = (\text{SD} / \text{X-bar}) \times 100$$

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

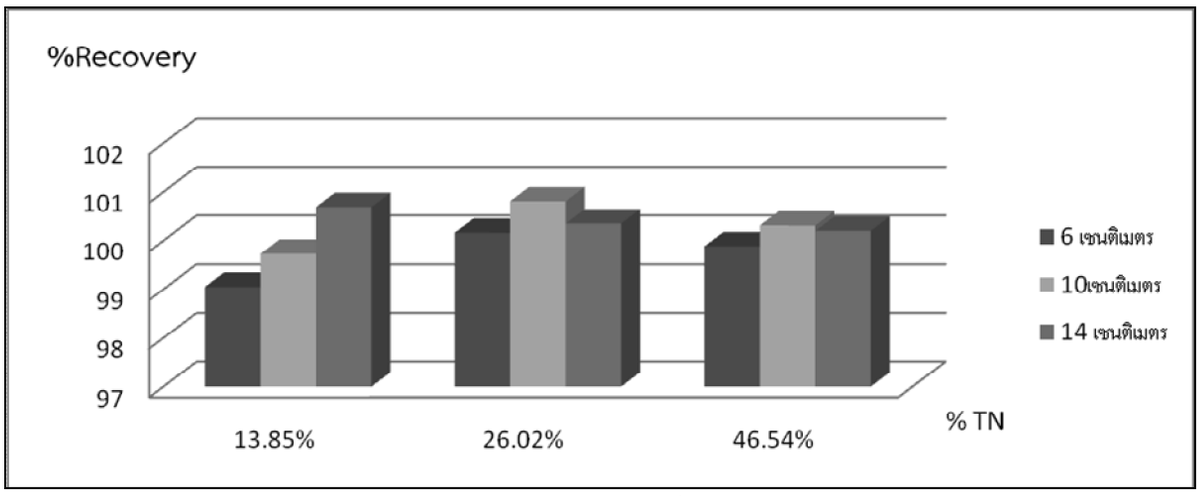
ระยะเวลา : 1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ : ณ กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาระดับความร้อน ระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างที่เหมาะสม และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมีโดยวิธี Kjeldahl Method พบว่า

1. จากการศึกษาระดับความร้อนในการย่อยตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมีโดยเปรียบเทียบค่า %Recovery ของการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ที่ความเข้มข้น 13.85% TN 26.019% TN 46.535% TN ระดับความร้อน 6 ซม. 10 ซม. และ14 ซม. ตามลำดับ มี %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 98 - 102% และทำการประเมินความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบกับค่าจริง



แผนภูมิที่ 1. แสดง % Recovery ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับความร้อน 6 10 และ14 ซม.

2. ศึกษาระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยเปรียบเทียบ %Recovery ของการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) พบว่า ที่ระยะเวลาการย่อยปกติและการย่อยที่เวลา 1 ชั่วโมง %Recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 98 - 102% ทุกระดับความเข้มข้น ของระดับความร้อน 14 ซม. และทำการประเมินความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบกับค่าจริง

ตารางที่ 1. แสดงช่วง %Recovery ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกัน

ระยะเวลาที่ใช้ย่อย	ช่วง %Recovery		
	13.85% ($CRM\ KNO_3$)	26.019% ($CRMCaNH_4NO_3$)	46.535% (CRM Urea)
ย่อยปกติ (1 ซม. 20 นาที)	100 -101	99 -100	99 -101
ย่อย 1 ชั่วโมง	98 -100	99 -101	99 -101
ย่อย 45 นาที	96 -101	99 -101	101 -102
ย่อย 30 นาที	94 -99	98 -100	100 -101

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ระดับความร้อน 14 ซม. ระยะเวลาย่อย 1 ชั่วโมง โดยการศึกษาปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) ความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

3.1 หาปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection ; LOD) และปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantitation ; LOQ)

LOD = X + 3SD = 0.43 + 0.15 = 0.58% TN

LOQ = X + 10SD = 0.43 + 0.50 = 0.93% TN

พิสูจน์ Accuracy และ Precision ของ LOQ

จากการวิเคราะห์สารละลายความเข้มข้น 0.8597% TN ได้ค่า

%TN = 0.85

SD = 0.02

%Recovery = 98.95

HORRAT (Horwitz' Ratio)= 1.66

เกณฑ์ยอมรับ %Recovery 95-105% (AOAC, 2012) แสดงว่า %Recovery ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

เกณฑ์ยอมรับ HORRAT (Horwitz' Ratio) < 2 แสดงว่า ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

3.2 พิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy)

3.3 พิสูจน์ความเที่ยง (Precision)

ตารางที่ 2. แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy) ความเที่ยง (Precision)

ซ้ำที่ 1-10	CRM Urea (46.535%TN)	CRM $CaNH_4NO_3$ (26.019%TN)	STD (0.8596%TN)
ค่าเฉลี่ย	46.42	26.08	0.86
SD	0.45	0.22	0.02
%Recovery	99.76	100.22	100.05
HORRAT	1.3	1.06	1.85

ตารางที่ 3. แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะของเนื้อสาร (Matrix)

ซ้ำที่ 1-10	CRM Urea (46.535%TN)	CRM $CaNH_4NO_3$ (26.019%TN)	STD (0.8596%TN)
ค่าเฉลี่ย	46.49	26.05	0.85
SD	0.28	0.27	0.03
%Recovery	99.9	100.1	99.07
HORRAT	0.51	1.30	1.41

จากตารางที่ 2 และ 3 จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์ CRM มี %Recovery และ HORRAT ผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกระดับความเข้มข้น แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง (Accuracy) ความเที่ยง (Precision)

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาเทคนิคและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี โดยทำการศึกษาระดับความร้อนและระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างที่เหมาะสม ตลอดจนตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า ที่ระดับระดับความร้อน 6 10 และ14 ซม. ระดับความเข้มข้นไนโตรเจน 13.85 26.019 และ 46.535% มี %Recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และทำการประเมินความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบกับค่าจริง และจากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยตัวอย่าง พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยโดยย่อยที่เวลาปกติ และ ย่อย 1 ชั่วโมง ของระดับความร้อน 14 ซม. มี %Recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และทำการประเมินความแตกต่างโดยใช้ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างผลการทดสอบกับค่าจริง จึงสามารถสรุปได้ว่า ระดับความร้อน 14 ซม. ที่ระยะเวลาในการย่อย 1 ชั่วโมง เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความถูกต้อง และใช้ระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างน้อยที่สุด จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยการพิสูจน์ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.58% ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.93% พิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy) มี %Recovery

ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และพิสูจน์ความเที่ยง (Precision) มีค่า HORRAT ผ่านเกณฑ์ยอมรับแสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง เที่ยงตรง

การนำไปใช้ประโยชน์

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ประจำวัน ทำให้สะดวก รวดเร็ว ตลอดจนผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าวิธีนี้เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

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

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. คณะเกษตร. ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น 547 หน้า

ดุษฎี มั่นความดี. 2544. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี. กองเคมี. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ. 27 หน้า

อุมาพร สุขม่วง และ อารีย์ คชฤทธิ์. 2553. เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตร “ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ”. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. กรุงเทพฯ. 33 หน้า

AOAC Peer – Verified method, Nov. 2012

Association of Official Analytical Chemises (AOAC). 2012. Official Method of Analysis 955.04 18th ed. International Gaithersburg, MD, USA. P. 13-14

ASTM 2001. Standard Practice for Preparation, Standardization, and Storage of Standard and Reagent Solutions for Chemical Analysis. Washington. Oct. 2001.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ระดับความร้อน 6 10 และ 14 ซม.

CRM	6 ซม.		10 ซม.		14 ซม.	
	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery
	13.81	99.71	13.60	98.19	13.87	100.14
	13.86	100.07	13.89	100.29	13.85	100.00
KNO_3	13.65	98.56	13.59	98.12	13.95	100.72
	13.68	98.77	13.92	100.51	14.01	101.16
	13.83	99.86	14.06	101.52	13.99	101.01
Recovery		99.39		99.73		100.61
t-test		-1.99		-0.41		2.64
	26.47	101.73	26.20	100.70	26.20	100.70
	25.77	99.04	26.30	101.08	26.03	100.04
$CaNH_4NO_3$	25.96	99.77	26.36	101.31	26.24	100.85
	26.47	101.73	25.94	99.70	26.11	100.35
	25.63	98.50	26.35	101.27	25.97	99.81
%Recovery		100.16		100.81		100.35
t-test		0.23		2.71		1.80
	46.71	100.38	46.46	99.84	46.58	100.10
	46.26	99.41	47.11	101.24	46.69	100.33
Urea	46.56	100.05	46.26	99.41	46.54	100.01
	46.51	99.95	46.58	100.10	47.07	101.15
	46.35	99.60	46.98	100.96	46.26	99.41
%Recovery		99.88		100.31		100.20
t-test		-0.72		0.90		0.71

ตารางผนวกที่ 2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ระดับความร้อน 6 ซม.

ระยะเลาที่ใช้ย่อย	KNO_3		$CaNH_4NO_3$		Urea	
	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery
ย่อยเวลาปกติ (3 ชั่วโมง 30 นาที)	13.81	99.71	26.47	101.73	46.71	100.38
	13.86	98.34	25.77	99.04	46.26	99.41
	13.65	98.56	25.96	99.77	46.56	100.05
	13.68	98.77	26.47	101.73	46.51	99.95
	13.83	99.86	25.63	98.50	46.35	99.60
%Recovery		99.05		100.16		99.88
t-test		-1.99		0.23		-0.72
ย่อยเวลา 1 ชั่วโมง	13.65	98.56	25.22	96.93	46.46	99.84
	13.81	99.71	26.28	101.00	46.63	100.20
	13.86	100.07	25.91	99.58	46.49	99.90
	13.13	94.80	26.88	103.31	46.16	99.19
	13.04	94.15	24.41	93.82	46.98	100.96
%Recovery		97.46		98.93		100.02
t-test		2.04		-0.65		0.07
ย่อยเวลา 45 นาที	13.93	100.58	24.85	95.51	47.16	101.34
	13.80	99.64	26.27	100.96	46.81	100.59
	12.74	91.99	26.04	100.08	46.08	99.02
	12.87	92.92	25.80	99.16	46.65	100.25
	13.79	99.57	24.41	93.82	47.30	101.64
%Recovery		96.94		97.91		100.57
t-test		1.66		-1.52		1.24
ย่อยเวลา 30 นาที	12.17	87.87	24.57	94.43	46.75	100.46
	13.54	97.76	26.09	100.27	46.06	98.98
	12.88	93.00	26.30	101.08	46.51	99.95
	13.48	97.33	25.83	99.27	46.49	99.90
	12.44	89.82	22.87	87.90	47.36	101.77
%Recovery		93.16		96.59		100.21
t-test		3.47		-1.39		0.47

ตารางผนวกที่ 3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ระดับความร้อน 10 ซม.

ระยะเลาที่ใช้ย่อย	KNO_3		$CaNH_4NO_3$		Urea	
	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery
ย่อยเวลาปกติ (1 ชั่วโมง 40 นาที)	13.60	98.19	26.20	100.70	46.46	99.84
	13.89	100.29	26.30	101.08	47.11	101.24
	13.59	98.12	26.36	101.31	46.26	99.41
	13.92	100.51	25.94	99.70	46.58	100.10
	14.06	101.52	26.35	101.27	46.98	100.96
%Recovery		99.73		100.81		100.31
t-test		-0.41		2.71		0.90
ย่อยเวลา 1 ชั่วโมง	13.73	99.13	26.51	101.89	46.40	99.71
	13.89	100.29	26.64	10	47.41	101.88
	13.56	97.91	26.52	101.93	47.17	101.36
	13.28	95.88	26.30	101.08	46.71	100.38
	13.74	99.21	25.99	99.89	47.30	101.64
%Recovery		98.48		101.43		100.99
t-test		2.02		3.26		2.42
ย่อยเวลา 45 นาที	14.21	102.60	26.34	101.23	47.60	102.29
	13.38	96.61	26.37	101.35	47.49	102.05
	13.34	96.32	25.87	99.43	47.07	101.15
	13.05	94.22	25.63	98.50	46.98	100.96
	12.41	89.60	26.58	102.16	46.94	100.87
%Recovery		95.87		100.53		101.46
t-test		1.97		0.79		4.97
ย่อยเวลา 30 นาที	13.20	95.31	26.00	99.93	46.73	100.42
	13.06	94.30	25.22	96.93	46.99	100.98
	12.33	89.03	25.95	99.73	46.90	100.78
	12.96	93.57	25.99	99.89	46.95	100.89
	13.46	97.18	23.76	91.32	45.51	97.80
%Recovery		93.88		97.56		100.17
t-test		4.51		-1.47		0.29

ตารางผนวกที่ 4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ระดับความร้อน 14 ซม.

ระยะเลาที่ใช้ย่อย	KNO_3		$CaNH_4NO_3$		Urea	
	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery	%TN	%Recovery
ย่อยเวลาปกติ (1 ชั่วโมง 20 นาที)	13.87	100.14	26.20	100.70	46.58	100.10
	13.85	100.00	26.03	100.04	46.69	100.33
	13.95	100.72	26.24	100.85	46.54	100.01
	14.01	101.16	26.11	100.35	47.07	101.15
	13.99	101.01	25.97	99.81	46.26	99.41
%Recovery		100.61		100.35		100.20
t-test		2.64		1.80		0.71
ย่อยเวลา 1 ชั่วโมง	13.74	99.21	25.80	99.16	46.90	100.78
	13.73	99.13	26.23	100.81	47.36	101.77
	13.77	99.42	26.47	101.73	46.51	99.95
	13.59	98.12	25.97	99.81	46.35	99.60
	13.88	100.22	26.26	100.93	46.58	100.10
%Recovery		99.22		100.49		100.44
t-test		2.33		1.08		1.15
ย่อยเวลา 45 นาที	14.07	101.59	26.05	100.12	47.60	102.29
	14.02	101.23	26.02	100.00	47.27	101.58
	13.70	98.92	25.79	99.12	47.04	101.09
	13.33	96.25	26.00	99.93	47.30	101.64
	13.67	98.70	26.33	101.20	47.39	101.84
%Recovery		99.34		100.07		101.69
t-test		0.69		0.22		8.65
ย่อยเวลา 30 นาที	13.14	94.87	25.74	98.93	46.68	100.31
	13.70	98.92	26.01	99.97	46.58	100.10
	13.78	99.49	26.13	100.43	46.59	100.12
	13.20	95.31	26.00	99.93	47.16	101.34
	13.32	96.17	26.22	100.77	46.74	100.44
%Recovery		96.95		100.00		100.46
t-test		3.22		0.01		2.02

ตารางผนวกที่ 5. ผลการวิเคราะห์ CRM ของการศึกษาค่า Accuracy และ Precision ของวิธีวิเคราะห์

ซ้ำที่	CRM Urea (46.535%TN)	CRM CAN (26.019%TN)	STD (0.8597%TN)
1	45.65	26.30	0.84
2	46.08	26.32	0.85
3	46.04	26.11	0.88
4	46.16	26.27	0.88
5	47.21	26.30	0.85
6	46.78	25.83	0.88
7	46.45	25.97	0.85
8	46.63	25.97	0.83
9	46.56	26.03	0.84
10	46.66	25.67	0.89
ค่าเฉลี่ย	**46.42**	**26.08**	**0.86**
SD	0.45	0.22	0.02

ตารางผนวกที่ 6. ผลการวิเคราะห์ไนโตรเจนทั้งหมดของตัวอย่างปุ๋ยที่มีลักษณะเนื้อสาร (Matrix)

ซ้ำที่	CRM Urea (46.535%TN)	CRM CAN (26.019%TN)	STD (0.8597%TN)
1	46.66	26.28	0.81
2	46.53	26.31	0.89
3	47.01	25.84	0.88
4	45.97	25.98	0.83
5	46.18	26.09	0.85
6	46.55	26.14	0.84
7	46.45	25.97	0.86
8	46.58	25.40	0.83
9	46.45	26.18	0.85
10	46.51	26.27	0.88
ค่าเฉลี่ย	**46.49**	**26.05**	**0.85**
SD	0.28	0.27	0.03

อิทธิพลของขนาดเม็ดปุ๋ยเคมีชนิดคลุกเคล้าที่มีต่อผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเคมี

Effect of Fertilizer Particle Size on Primary Nutrients Content in Bulk Blended Fertilizer

จริยา วงศ์ตรี วรรณรัตน์ ชุติบุตร ทองจันทร์ พิมพ์เพชร ชฎาพร คงนาม ปรียาภรณ์ บุญขจาย
กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ศึกษาอิทธิพลของขนาดเม็ดปุ๋ยเคมีชนิดคลุกเคล้าที่มีต่อผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเคมี โดยใช้แม่ปุ๋ยของ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ได้แก่ ยูเรีย (Urea) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า 1) การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้า โดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาดเท่ากัน 2 มม. ทำให้ผลวิเคราะห์ของ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มีการกระจายต่ำ ไม่มีผลกระทบต่อผลวิเคราะห์ ซึ่งเป็นไปตามหลักการโดยทั่วไป ในการประเมินการกระจายของข้อมูลคำนวณจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เทียบกับเกณฑ์คลาดเคลื่อนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 พิจารณาผลที่เกินและไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนเป็นเปอร์เซ็นต์ 2) การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าขนาด 2 – 3 มม. ที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาด 2 และ 3 มม. ผสมสลับกันไปมาแบบแฟคทอเรียลจำนวน 16 ทรีทเมนต์ พบว่าผลวิเคราะห์เริ่มมีการกระจายสูงขึ้น โดยไนโตรเจนมีการกระจายสูงที่สุดเท่ากับ 31.25% ส่วนฟอสฟอรัสมีการกระจาย 25% และโพแทสเซียมมีการกระจายเพียงเล็กน้อย 6.25% 3) การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าขนาด 2 – 4 มม. ที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาด 2 และ 4 มม. ตามแบบทรีทเมนต์ T1 : U2D2K4 (Urea 2, DAP 2, KCl 4 มม.) ทำให้ผลวิเคราะห์ของฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมมีการกระจาย 20% เท่ากัน โดยโพแทสเซียมไม่เป็นไปตามสมมุติฐาน ผลวิเคราะห์มีการกระจายของข้อมูลไม่แตกต่างจากธาตุอื่นมากนักทั้งที่ใช้ขนาดเม็ด (KCl) แตกต่าง คือมีขนาดใหญ่ที่สุดจากทั้งสามแม่ปุ๋ย ส่วนธาตุไนโตรเจนไม่มีผลกระทบใดๆ ในการผสมแบบทรีทเมนต์ T2 : U2D4K2 (Urea 2, DAP 4, KCl 2 มม.) พบว่ามีผลทำให้ผลวิเคราะห์ฟอสฟอรัสมีการกระจายสูงที่สุดถึง 60% เป็นไปตามสมมุติฐาน เพราะใช้แม่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (DAP) แตกต่างคือมีขนาดเม็ดใหญ่ที่สุดจากทั้งสามแม่ปุ๋ย รองลงมาคือโพแทสเซียมมีการกระจายเท่ากับ 20% ส่วนผลวิเคราะห์ไนโตรเจนไม่มีผลกระทบจากการผสมของทั้ง 2 แบบทรีทเมนต์ 4) การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าขนาด 1 – 3 มม. ที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาดเม็ด 1 และ 3 มม. ผสมตามแบบทรีทเมนต์ T3 : U3D3K1 (Urea 3, DAP 3, KCl 1 มม.) เป็นการผสมของขนาดเม็ดที่ทำให้ผลวิเคราะห์ของธาตุหลัก มีการกระจายทั้งหมด และเป็นการกระจายที่สูงเกือบทุกธาตุ โดยเฉพาะธาตุโพแทสเซียมที่มีการกระจายสูงถึง 75% เช่นเดียวกับธาตุไนโตรเจนที่มีการกระจายสูงถึง 50% ส่วนฟอสฟอรัสเท่ากับ 25% จึงเป็นขนาดเม็ดที่ไม่เหมาะสมของแม่ปุ๋ย ที่จะนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยเคมีเชิงผสมชนิดคลุกเคล้า

คำนำ

ปุ๋ยเคมีเชิงผสมแบบคลุกเคล้า คือปุ๋ยเคมีที่ได้จากการนำแม่ปุ๋ยที่มีธาตุอาหาร คือ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และสารตัวเติมมาผสมกัน ให้ได้ธาตุอาหารตามต้องการ แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันซึ่งเป็นกระบวนการผลิตที่ง่ายไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่การที่จะผลิตปุ๋ยชนิดนี้ให้มีคุณภาพและธาตุอาหารมีความสม่ำเสมอนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อคุณภาพการผลิตซึ่ง ได้แก่ ขนาดของเม็ด รูปร่าง และความหนาแน่นของเม็ดปุ๋ย โดยปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพในการผลิตปุ๋ยชนิดนี้มากที่สุดคือขนาดเม็ด (Hoffmeister *et al*., 1964, Schenkel, Y. *et al*., 2008) เนื่องจากปุ๋ยชนิดนี้เกิดจากการผสมกันแล้วเกิดความไม่เข้ากันของเนื้อปุ๋ยและเกิดการแยกชั้นเมื่อขนย้าย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลของขนาดเม็ดปุ๋ยที่มีต่อปริมาณธาตุหลักในปุ๋ย เพื่อให้ทราบถึงความแปรปรวนของธาตุอาหารหลักในปุ๋ย เมื่อปุ๋ยมีขนาดเม็ดแตกต่างกัน และนำไปใช้ในการกำหนดขนาดเม็ดแม่ปุ๋ยที่ถูกนำไปใช้ในการผลิตปุ๋ยเคมีเชิงผสมแบบคลุกเคล้าให้ได้ปุ๋ยที่มีความสม่ำเสมอเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปุ๋ยให้ได้มาตรฐานมากขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม อ้างอิงตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี, 2551) ของกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

แม่ปุ๋ยที่ใช้ ได้แก่ ยูเรีย (Urea), ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) และ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

วิธีการ

1. **ศึกษาความแปรปรวนของผลวิเคราะห์ธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้า** (bulk blended fertilizer) **ตามช่วงขนาดเม็ดของแม่ปุ๋ยที่ส่งมาวิเคราะห์** 2 – 3 **มม.**

1.1 วิเคราะห์หาขนาดของตัวอย่างปุ๋ยที่ส่งเข้ามาวิเคราะห์ เก็บเป็นข้อมูลที่จะใช้ในการผสมตัวอย่างปุ๋ย

1.2 นำแม่ปุ๋ย ยูเรีย ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ และ สารตัวเติม (filler) มาคัดแยกขนาดโดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 1 2 3 4 และ 5 มม. ได้แม่ปุ๋ยที่มีขนาดต่างๆ เก็บไว้

1.3 กำหนดทรีทเมนต์ โดยจัดรูปแบบให้เป็นแบบแฟคทอเรียล ให้ขนาดเป็นระดับ (ขนาดได้จากข้อมูลในข้อ 1.1) ได้จำนวนทรีทเมนต์ ทั้งหมด 16 ทรีทเมนต์ โดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาดเม็ด 2 ขนาด คือ 2 และ 3 มม. นำข้อมูลที่ได้มากำหนดทรีทเมนต์การทดลอง ได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงทรีทเมนต์ทั้ง 16 ทรีทเมนต์

ทรีทเมนต์			
T1= U3D3K3F3	T5= U3D2K3F3	T9= U2D3K3F3	T13= U2D2K3F3
T2= U3D3K3F2	T6= U3D2K3F2	T10= U2D3K3F2	T14= U2D2K3F2
T3= U3D3K2F3	T7= U3D2K2F3	T11=U2D3K2F3	T15= U2D2K2F3
T4= U3D3K2F2	T8= U3D2K2F2	T12=U2D3K3F2	T16= U2D2K2F2

1.4 นำแม่ปุ๋ยและสารตัวเติมที่คัดแยกขนาดแล้ว มาผสมกันให้ได้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 16 ทรีทเมนต์

1.5 นำปุ๋ย (ข้อ 1.4) มาวิเคราะห์หาขนาดครั้งละ 1 ถุง (1 ถุงใหญ่แบ่งเป็น 3 ส่วน) โดยใช้ตะแกรงร่อนแล้วนำปุ๋ยที่วิเคราะห์ขนาดเสร็จแล้ว เทคืนกลับถุงเดิมรวมกันผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง

1.6 นำปุ๋ยที่วิเคราะห์ขนาดแล้ว (ข้อ 1.5) มาแบ่งเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน แล้วสุ่มมา 3 ส่วน ไปบดให้ละเอียด

1.7 วิเคราะห์ปริมาณธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม

1.8 นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance: ANOVA)

2. ศึกษาความแปรปรวนของผลวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก ในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาดเท่ากันขนาด 2 มม.

2.1 นำแม่ปุ๋ย ยูเรีย ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ และ สารตัวเติม ที่คัดแยกขนาดแล้วจากข้อ 1.2 เลือกขนาดเม็ด 2 มม. นำมาผสมกันให้ได้สูตร 15-15-15 จำนวน 10 ถุงๆ ละ 1 กก.

2.2 นำแต่ละถุงมาวิเคราะห์หาขนาดโดยแบ่งตัวอย่างจาก 1 กก. ออกเป็น 3 ส่วน วิเคราะห์หาขนาดทีละส่วน

2.3 หลังจากวิเคราะห์ขนาดเสร็จแล้วนำตัวอย่างทั้ง 3 ส่วน เทคืนกลับถุงเดิมเป็น 1 กก. ผสมคลุกคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วนำมาแบ่งเป็น 4 ส่วน แล้วนำตัวอย่าง 3 ส่วน ไปบดให้ละเอียด

2.4 นำ 3 ส่วน ที่บดแล้ว มาวิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม

2.5 นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance: ANOVA)

3. ศึกษาความแปรปรวนของผลวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก ในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้าขนาด 2 - 4 มม. และขนาด 1 - 3 มม.

3.1 นำแม่ปุ๋ย ยูเรีย ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และ โพแทสเซียมคลอไรด์ มาคัดแยกขนาดโดยใช้ตะแกรงร่อนขนาด 1 2 3 4 และ 5 มม. ได้แม่ปุ๋ยขนาดต่างๆ นำไปใช้ผสมกันเป็นทรีทเมนต์ต่างๆ

3.2 ผสมปุ๋ยสูตร 19-19-19 กำหนดเป็นทรีทเมนต์ดังนี้

T1: U2D2K4 ผสมกันถุงละ 1 กก. จากปริมาณที่คัดแยกขนาดผสมได้จำนวน 5 ถุง

T2: U2D4K2 ผสมกันถุงละ 1 กก. จากปริมาณที่คัดแยกขนาดผสมได้จำนวน 5 ถุง

T3: U3D3K1 ผสมกันถุงละ 1 กก. จากปริมาณที่คัดแยกขนาดผสมได้จำนวน 4 ถุง

3.3 นำแต่ละถุงมาวิเคราะห์หาขนาดโดยแบ่งตัวอย่างจาก 1 กก. ออกเป็น 3 ส่วน วิเคราะห์หาขนาดทีละส่วน

3.4 หลังจากวิเคราะห์ขนาดเสร็จ นำตัวอย่างทั้ง 3 ส่วน เทคืนกลับถุงเดิมเป็น 1 กก. ผสมคลุกคล้าให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วนำมาแบ่งเป็น 4 ส่วน แล้วนำตัวอย่าง 3 ส่วน ไปบดให้ละเอียด

3.5 นำ 3 ส่วนที่บดแล้ว มาวิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม

3.6 นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance: ANOVA)

4. เปรียบเทียบค่า SD ของการผสมปุ๋ยแบบคลุกเคล้าที่มีขนาด 2 – 3 2 2 - 4 และ 1 – 3 มม. (เปรียบเทียบค่า SD ข้อมูลการทดลองที่ 1 - 3)

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 - กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ณ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาความแปรปรวนของผลวิเคราะห์ธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้า (bulk blended fertilizer) เมื่อผสมปุ๋ยตามช่วงขนาดเม็ดของแม่ปุ๋ย ที่ส่งมาวิเคราะห์

จากการสุ่มตัวอย่างปุ๋ยที่ส่งมาวิเคราะห์ในหน่วยงาน นำมาวิเคราะห์หาขนาดเม็ดในตัวอย่างปุ๋ย นำเข้า (I) ขึ้นทะเบียน (R) และปุ๋ยทั่วไป (G) ได้ข้อมูลขนาดเม็ดของแม่ปุ๋ยดังนี้ ยูเรีย (Urea : 46-0-0) พบว่ามีขนาด 2 มม. มากที่สุดคิดเป็น 68.8% รองลงมาคือมีขนาด 3 มม. 13.7% ส่วนแม่ปุ๋ยไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP : 18-46-0) พบว่ามีขนาด 2 มม. มากที่สุดคิดเป็น 75% รองลงมาคือมีขนาด 3 มม. 17.5% และ ในแม่ปุ๋ย โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl : 0-0-60) พบว่ามีขนาด 2 มม. มากที่สุดคิดเป็น 67.4 % รองลงมาคือมีขนาด 3 มม. 21.6%

เมื่อทราบข้อมูลขนาดเม็ดของแม่ปุ๋ย ยูเรีย ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และโพแทสเซียมคลอไรด์ ที่ส่งมาวิเคราะห์แล้วว่ามีขนาด 2 มม. มากที่สุด รองลงมาคือขนาด 3 มม. นำข้อมูลขนาดเม็ดที่วิเคราะห์ได้ของแม่ปุ๋ยแต่ละตัวมากำหนดเป็นทรีทเมนต์ โดยเลือกใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาด 2 และ 3 มม. ที่คัดแยกรอไว้แล้ว นำมาผสมคลุกเคล้าสลับกันไปมาแบบแฟคทอเรียล ได้ทรีทเมนต์ดังตารางที่ 1 เป็นตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกคล้าแบบต่างๆ ที่มีขนาด 2-3 มม. จำนวน 16 ทรีทเมนต์ นำมาวิเคราะห์ธาตุหลัก แล้วนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางผนวกที่ 1) สรุปข้อมูลได้ดังนี้

ปริมาณไนโตรเจน (%N) ฟอสฟอรัส (%P_2O_5) และโพแทสเซียม (%K_2O) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าโดยใช้แม่ปุ๋ย และสารตัวเติมที่มีขนาด 2 และ 3 มม. ผสมสลับกันไปมาแบบแฟคทอเรียล จำนวน 16 ทรีทเมนต์ จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่า ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของธาตุหลักในแต่ละธาตุ ทั้ง 16 ทรีทเมนต์ มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

2. ศึกษาความแปรปรวนของผลวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก ในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาดเม็ดแม่ปุ๋ยเท่ากัน 2 มม.

การผสมปุ๋ยโดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาดเท่ากันเลือกขนาด 2 มม. ผสมจำนวน 10 ถุง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณธาตุหลักแล้วนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) (ตารางผนวกที่ 2) สรุปข้อมูลได้ดังนี้ ปริมาณไนโตรเจน (%N) ฟอสฟอรัส (%P_2O_5) และ โพแทสเซียม (%K_2O) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกคล้าโดยใช้ แม่ปุ๋ย และสารตัวเติมที่มีขนาดเท่ากัน 2 มม. ผสมจำนวน 10 ถุง จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่า ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของธาตุหลักในแต่ละธาตุทั้ง 10 ถุง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

3. ศึกษาความแปรปรวนของผลวิเคราะห์ธาตุอาหารหลัก ในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้าขนาด 2-4 มม. และ ในปุ๋ยเชิงผสมแบบคลุกเคล้าขนาด 1-3 มม.

นำตัวอย่างปุ๋ยผสมตามทรีทเมนต์ข้อ 3.2 มาวิเคราะห์ปริมาณธาตุหลักและนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางผนวกที่ 3) สรุปข้อมูลได้ ดังนี้

3.1 ทรีทเมนต์ T1 : U2D2K4 (Urea 2 **มม.**, DAP 2 **มม.**, KCl 4 **มม.**)

ปริมาณไนโตรเจน (%N) ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) และโพแทสเซียม ($\%K_2O$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า โดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาด 2 - 4 มม. ผสมจำนวน 5 ถุง จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่าค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของธาตุหลักในแต่ละธาตุ ทั้ง 5 ถุง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

3.2 ทรีทเมนต์ T2 : U2D4K2 (Urea 2 **มม.**, DAP 4 **มม.**, KCl 2 **มม.**)

ปริมาณไนโตรเจน (%N) ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) และ โพแทสเซียม ($\%K_2O$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า โดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาด 2-4 มม. ผสมจำนวน 5 ถุง จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่าค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของธาตุหลักในแต่ละธาตุ ทั้ง 5 ถุง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

3.3 ทรีทเมนต์ T3 : U3D3K1 (Urea 3 **มม.**, DAP 3 **มม.**, KCl 1 **มม.**)

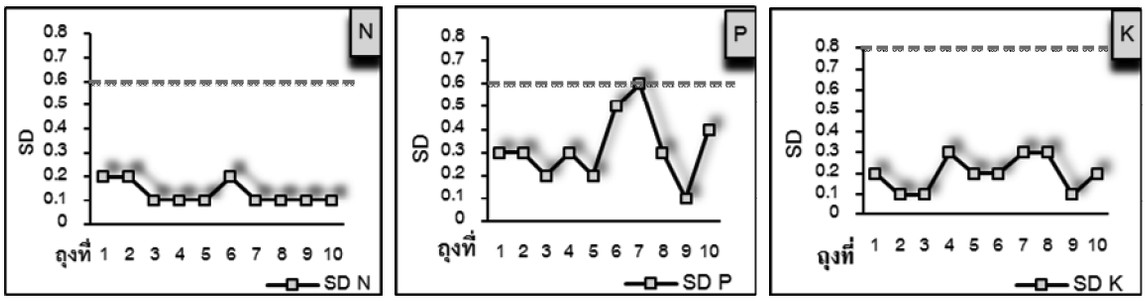
ปริมาณไนโตรเจน (%N) ฟอสฟอรัส ($\%P_2O_5$) และโพแทสเซียม ($\%K_2O$) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกคล้า โดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาด 1-3 มม. ผสมจำนวน 4 ถุง จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่า ค่า $F_{cal} < F_{crit\ (0.05)}$ แสดงว่าค่าเฉลี่ยของธาตุหลักในแต่ละธาตุ ทั้ง 4 ถุง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (nonsignificant)

4. เปรียบเทียบค่า SD ของการผสมปุ๋ยแบบคลุกเคล้าขนาด 2-3 2 2 - 4 และ 1 - 3 มม.

นำข้อมูลจากการศึกษาที่ 1 - 3 มาหาความสัมพันธ์ของค่า SD และเปรียบเทียบกับเกณฑ์คลาดเคลื่อนตาม **พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550** ปี 2555 ได้กำหนดเกณฑ์คลาดเคลื่อนของปริมาณธาตุอาหารรับรองที่มีในปุ๋ยเคมีทุกชนิดที่อนุญาตให้คลาดเคลื่อน หรือแตกต่างในการนำ การเตรียมการ และการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยเคมีเพื่อตรวจสอบปริมาณธาตุอาหารรับรอง (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2555)

4.1 การผสมปุ๋ยแบบคลุกเคล้าโดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาดเม็ดเท่ากัน 2 มม.

ขนาดเม็ด 2 มม. เป็นขนาดที่ใช้เป็นมาตรฐานทั่วไปในการผลิตปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า เมื่อนำค่า SD ของตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 15-15-15 ที่มีขนาดเม็ดเท่ากัน 2 มม. เพียงขนาดเดียวของแต่ละถุงทั้ง 10 ถุง นำมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ (ตารางผนวกที่ 4)



ภาพที่ 1. แสดงเส้นกราฟค่า SD ของผลวิเคราะห์ ปริมาณธาตุหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาดเท่ากัน 2 มม. จากแต่ละถุงจำนวน 10 ถุง

หมายเหตุ : เส้นประ หมายถึง เกณฑ์คลาดเคลื่อนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518

จากภาพที่ 1 แสดงเส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาดเท่ากัน 2.0 มม. สูตร 15-15-15 ในแต่ละถุงจำนวน 10 ถุง และนำค่า SD แต่ละถุงมาเทียบค่ากับเกณฑ์คลาดเคลื่อน (พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518) คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ที่ไม่เกินและเกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน ได้ผลดังนี้

เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจน วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 0.2

SD $<$ 0.6 ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (10/10) x 100 = 100%

เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ฟอสฟอรัส วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 0.6

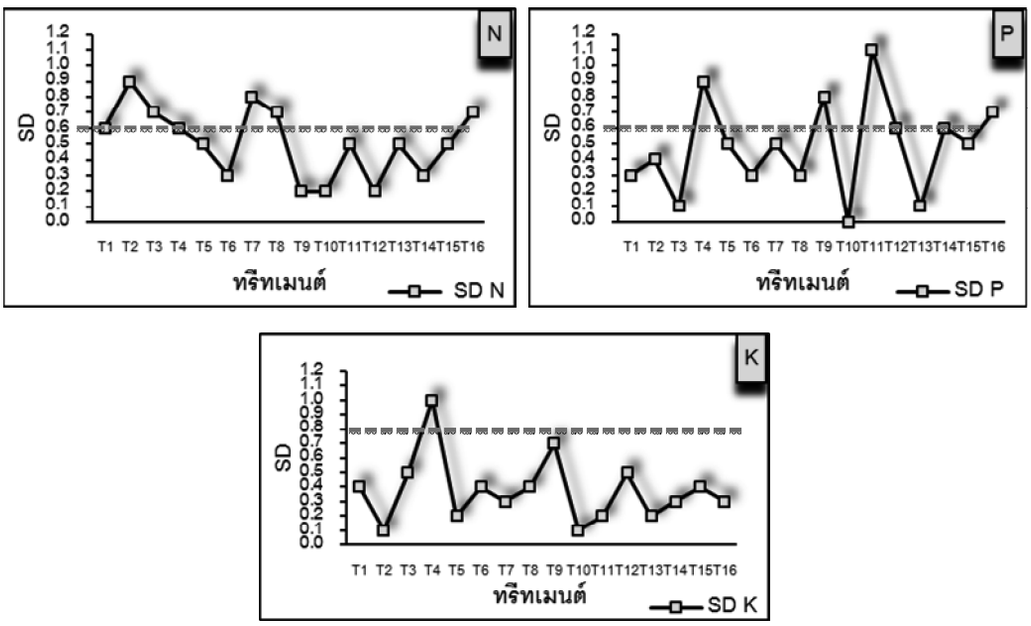
SD $\leq$ 0.6 ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (10/10) x 100 = 100%

เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์โพแทสเซียม วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 0.3

SD $<$ 0.8 ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (10/10) x 100 = 100%

4.2 การผสมปุ๋ยแบบคลุกเคล้าช่วง 2 – 3 มม.

เมื่อผสมปุ๋ยโดยเลียนแบบตัวอย่างปุ๋ยที่ส่งมาวิเคราะห์คือมีขนาดเม็ดของแม่ปุ๋ย 2 และ 3 มม. โดยผสมสลับไปมาแบบแฟคทอเรียล เป็นทรีทเมนต์ต่างๆ ได้ทั้งหมด 16 ทรีทเมนต์ เมื่อนำค่า SD ของค่าวิเคราะห์ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าสูตร 15 – 15 – 15 ที่มีขนาดเม็ด 2 – 3 มม. ของแต่ละถุงทั้ง 16 ถุง (ทรีทเมนต์) นำมาพล็อตกราฟ (ตารางผนวกที่ 5)



ภาพที่ 2. แสดงเส้นกราฟค่า SD ของผลวิเคราะห์ ปริมาณธาตุหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาด 2 - 3 มม. จำนวน 16 ทรีทเมนต์

หมายเหตุ : เส้นประ หมายถึง เกณฑ์คลาดเคลื่อนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518

จากภาพที่ 2 แสดงเส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า ที่มีขนาด 2 - 3 มม. สูตร 15 – 15 - 15 ในแต่ละทรีทเมนต์ (ถุง) 16 ทรีทเมนต์ คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ที่ไม่เกินและเกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน ได้ผลดังนี้

เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจน วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.2 – 0.9

ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (11/16) x 100 = 68.75%

มี 5 ทรีทเมนต์ SD > 0.6 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (5/16) x 100 = 31.25%

เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ฟอสฟอรัส วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.0 – 1.1

ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (12/16) x 100 = 75.0%

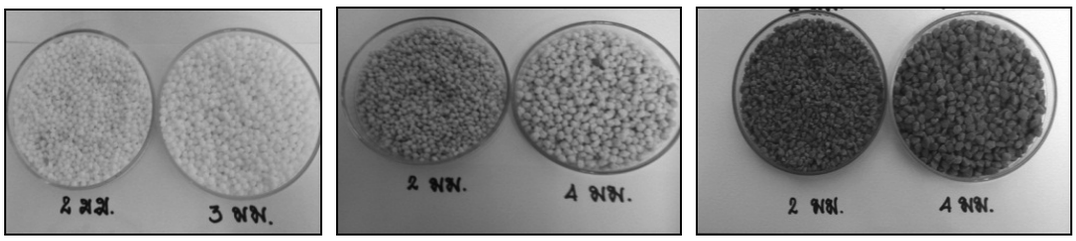
มี 4 ทรีทเมนต์ SD > 0.6 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (4/16) x 100 = 25.0%

เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์โพแทสเซียม วิ่งขึ้น-ลงอยู่ในช่วง 0.1–1.0

ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (15/16) x 100 = 93.75%

มี 1 ทรีทเมนต์ SD > 0.8 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (1/16) x 100 = 6.25%

4.3 การผสมปุ๋ยแบบคลุกเคล้าขนาด 2-4 มม. และ 1-3 มม.



ภาพที่ 3. แสดงขนาดเม็ดของแม่ปุ๋ย Urea, DAP และ KCl ที่ได้จากการร่อนคัดแยกขนาด

เมื่อนำ SD ของค่าวิเคราะห์ ไนโตรเจน ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าสูตร 19 – 19 – 19 ที่มีขนาดเม็ดตามทรีทเมนต์ นำมาพล็อตกราฟ จากภาพที่ 4 แสดงเส้นกราฟ SD (ตารางผนวกที่ 6) ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจนในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาด 2 - 4 มม. (T1, T2) และขนาด 1-3 มม. (T3) สูตร 19 – 19 – 19

นำค่า SD แต่ละทรีทเมนต์มาเทียบค่ากับเกณฑ์คลาดเคลื่อน (ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518) คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ไม่เกินและเกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนได้ผลดังนี้

1) **ไนโตรเจน**

T1: U2D2K4 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจน วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 0.5
SD < 0.8 ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (5/5) x 100 = 100%

T2: U2D4K2 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจน วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 0.2
SD < 0.8 ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (5/5) x 100 = 100%

T3: U3D3K1 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ไนโตรเจน วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 1.1
มีค่า SD 2 ถุง > 0.8 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (2/4) x 100 = 50%

2) **ฟอสฟอรัส**

T1: U2D2K4 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ฟอสฟอรัส วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.3 – 1.2
มีค่า SD 1 ถุง > 0.8 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (1/5) x 100 = 20%

T2: U2D4K2 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ฟอสฟอรัส วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 1.2
มีค่า SD 3 ถุง > 0.8 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (3/5) x 100 = 60%

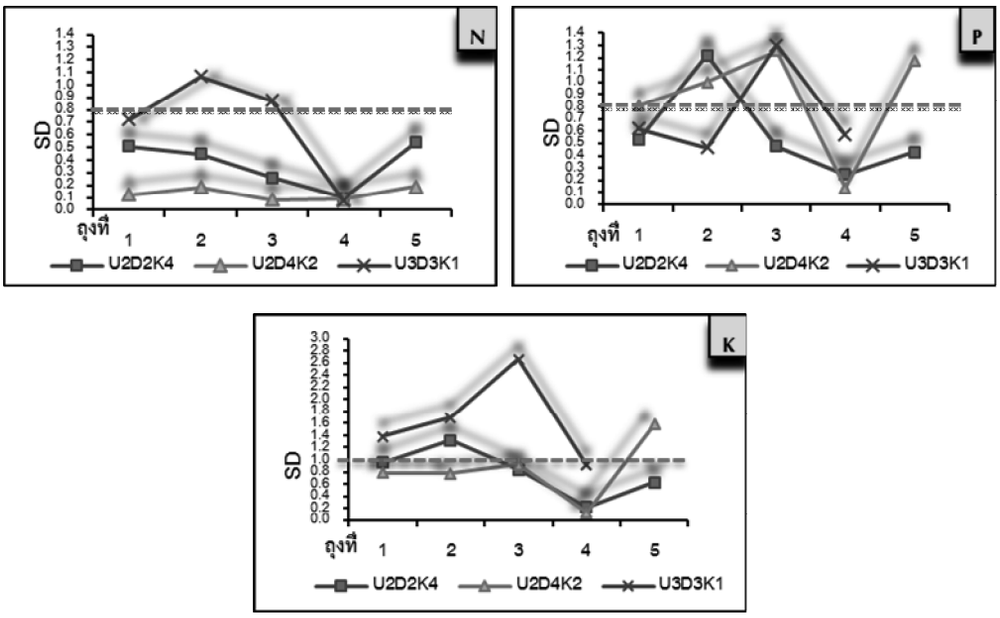
T3: U3D3K1 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์ฟอสฟอรัส วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.5 – 1.3
มีค่า SD 1 ถุง > 0.8 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (1/4) x 100 = 25%

3) **โพแทสเซียม**

T1: U2D2K4 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์โพแทสเซียม วิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.2 – 1.3
มีค่า SD 1 ถุง > 1.0 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (1/5) x 100 = 20%

T2: U2D4K2 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์โพแทสเซียมจะวิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.1 – 1.6
มีค่า SD 1 ถุง > 1.0 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (1/5) x 100 = 20%

T3: U3D3K1 เส้นกราฟ SD ของค่าวิเคราะห์โพแทสเซียมจะวิ่งขึ้น - ลงอยู่ในช่วง 0.9 – 2.7
มีค่า SD 3 ถุง > 1.0 เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน (3/4) x 100 = 75%



ภาพที่ 4. เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ SD ของค่าวิเคราะห์ N P K ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าสูตร 19-19-19 ของทั้ง 3 ทรีทเมนต์

หมายเหตุ : เส้นประ หมายถึง เกณฑ์คลาดเคลื่อนตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อผสมปุ๋ยแบบคลุกเคล้าโดยใช้แม่ปุ๋ย ยูเรีย ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต โพแทสเซียมคลอไรด์ และสารตัวเติม ผสมโดยใช้ขนาดเม็ดเท่ากัน 2 มม. นำผลวิเคราะห์ของธาตุหลักในตัวอย่างปุ๋ยแต่ละธาตุมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) พบว่าค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ทั้ง 10 ถุง ไม่แตก ต่างกันทางสถิติ %CV หรือสัมประสิทธิ์ของความแปรผัน : coefficient of variation ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการวัดการกระจายของข้อมูลทั้ง 3 ธาตุ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 0.93-2.28 % แต่เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่มีขนาดเม็ดช่วง 2-3, 2-4 และ1-3 มม. แล้ว %CV เริ่มสูงขึ้นโดย เฉพาะในการทดลองที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาด 1 และ 3 มม. %CV ของค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนสูงมากถึง 9.15 % แต่ปรากฏว่า $F_{cal} < Fcrit_{(0.05)}$ ซึ่งหมายถึงค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งๆ ที่ข้อมูลมีการกระจายมาก ในการวัดการกระจาย (อนุสิทธิ์ และจันทรัตน์, 2554) ของข้อมูลสามารถวัดได้หลายวิธีโดยการวัดค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) คือค่าเฉลี่ยของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานระหว่างข้อมูลแต่ละจำนวนกับค่าเฉลี่ยเลขคณิตของข้อมูลชุดนั้นเป็นค่าสถิติที่ใช้ในการวัดการกระจายของข้อมูลได้เช่นกัน ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมาใช้ในการประเมินอีกค่าหนึ่ง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาอิทธิพลของขนาดเม็ดปุ๋ยเคมีชนิดคลุกเคล้า ที่มีต่อผลการวิเคราะห์ ปริมาณธาตุอาหารหลักในปุ๋ยเคมี โดยใช้แม่ปุ๋ยของ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม คือยูเรีย (Urea) ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) และ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ผลการทดลองพบว่า

1. การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้า โดยใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาดเท่ากัน 2 มม. ทำให้ผลวิเคราะห์ของธาตุหลัก ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม มีค่าการกระจายของข้อมูลต่ำ โดยพิจารณาจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนทั้งหมดคิดเป็น 100% จึงไม่มีผลกระทบต่อค่าการวิเคราะห์ซึ่งเป็นตามหลักการทั่วไป

2. การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าขนาด 2 – 3 มม. ที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาด 2 และ 3 มม. ผสมสลับกันไปมาแบบแฟคทอเรียล จำนวน 16 ทรีทเมนต์ พบว่าผลวิเคราะห์เริ่มมีการกระจายสูงขึ้น โดยไนโตรเจนมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนมากที่สุดคิดเป็น 31.25% ผลของฟอสฟอรัสค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนคิดเป็น 25% ส่วนโพแทสเซียม ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อยคิดเป็น 6.25%

3. การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าขนาด 2 – 4 มม. ที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาด 2 และ 4 มม. ตามทรีทเมนต์ T1 : U2D2K4 (Urea 2, DAP 2, KCl 4 มม.) ทำให้ธาตุฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มีการกระจายของข้อมูลวิเคราะห์โดยพิจารณาจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนคิดเป็น 20% เท่ากัน โดยโพแทสเซียมไม่เป็นไปตามสมมุติฐานข้อมูลผลวิเคราะห์มีการกระจายไม่แตกต่างจากธาตุอื่นมากนัก ทั้งที่ใช้ขนาดเม็ด (KCl) ใหญ่ที่สุด ธาตุไนโตรเจน มีการกระจายน้อย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ไม่เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อน 100% ในการผสมปุ๋ยตามทรีทเมนต์ T2 : U2D4K2 (Urea 2, DAP 4, KCl 2 มม.) พบว่ามีผลทำให้ธาตุฟอสฟอรัส มีการกระจายมากที่สุด ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนมากที่สุดถึง 60% ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานเพราะใช้แม่ปุ๋ยฟอสฟอรัส (DAP) แตกต่างและมีขนาดเม็ดใหญ่ที่สุด รองลงมาคือโพแทสเซียมมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนคิดเป็น 20% ส่วนไนโตรเจน ไม่มีผลกระทบจากการผสมของทั้ง 2 แบบทรีทเมนต์

4. การผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าขนาด 1 – 3 มม. ที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาดเม็ด 1 และ 3 มม. ตาม ทรีทเมนต์ T3 : U3D3K1 (Urea 3, DAP 3, KCl 1 มม.) เป็นการผสมของขนาดเม็ด ที่ทำให้ผลวิเคราะห์ของธาตุหลักมีการกระจายสูงเกือบทุกธาตุโดยเฉพาะธาตุโพแทสเซียมที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนมากถึง 75% เช่นเดียวกับธาตุไนโตรเจน ที่ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเกินเกณฑ์คลาดเคลื่อนมากถึง 50% ฟอสฟอรัสเท่ากับ 25% จึงเป็นขนาดเม็ดที่ไม่เหมาะสมของแม่ปุ๋ยที่จะนำมาใช้ในการผลิตปุ๋ยเคมีเชิงผสมชนิดคลุกเคล้า ซึ่งสอดคล้องกับ (ยงยุทธ, 2554) กล่าวไว้ว่าโดยปรกติปุ๋ยเม็ดมักมีขนาด 1.0 – 3.3 มม. หากสามารถคัดขนาดได้การใช้แม่ปุ๋ยที่มีขนาด 2.0 – 3.3 มม. มาผสมแบบคลุกเคล้าจะมีการแยกตัวน้อยกว่าใช้ขนาด 1.0 – 3.3 มม.

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ ไม่สามารถผสมปุ๋ยให้เป็นล็อตใหญ่ๆ เสมือนในโรงงานได้เพราะมีข้อจำกัดหลายอย่าง แต่รูปแบบที่ทำการทดลอง ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ประกอบในการผสมปุ๋ยชนิดคลุกเคล้าให้มีคุณภาพได้ เนื่องจากการทดลองนี้ทำการผสมครั้งละหนึ่งถุงๆ ละ 1 กิโลกรัม แล้วนำมาคำนวณการกระจายของข้อมูล โดยพิจารณาจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของปริมาณธาตุอาหารคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ไม่ผ่านเกณฑ์จากจำนวนทั้งหมดหากการผสมทีละน้อยๆ ยังให้ผลการกระจายสูงแล้วก็ย่อมส่งผลต่อการผสมล็อตการผลิตใหญ่ๆ ทำให้มีค่าการกระจายสูงเช่นเดียวกัน

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อให้ทราบถึงความแปรปรวนของธาตุอาหารหลักในปุ๋ย เมื่อขนาดเม็ดปุ๋ยมีขนาดแตกต่างกันและนำไปใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดขนาดเม็ดแม่ปุ๋ย ที่นำไปใช้ในการผลิตปุ๋ยเคมีเชิงผสมชนิดคลุกเคล้า ให้มีคุณภาพธาตุอาหารมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปุ๋ยให้ได้มาตรฐานมากยิ่งขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. กองเกษตรเคมี. 2543. **พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 พร้อมด้วย กฎกระทรวง ประกาศกระทรวง ประกาศกรมที่เกี่ยวข้อง และ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปุ๋ย**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. **คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี**. กรุงเทพฯ

กรมวิชาการเกษตร. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2555. **พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 และกฎหมายลำดับรองที่บังคับใช้ในปัจจุบัน**. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา. กรุงเทพฯ

สายชล สินสมบูรณ์ทอง. 2546. **สถิติกับการวางแผนการทดลองทางการเกษตร**. พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ

ยงยุทธ โอสถสภา อรรถศิษญ์ วงศ์มณีโรจน์ และชวลิต ฮงประยูร. 2554. **ปุ๋ยเพื่อการเกษตรยั่งยืน**. พิมพ์ครั้งที่2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 168

อนุสิทธิ์ สุขม่วง และจันทรัตน์ วรสรรพสิทธิ์.2554. การประเมินผลการทดสอบทางสถิติในระบบคุณภาพ. เอกสารประกอบการฝึกอบรมวันที่ 3 – 4 พฤษภาคม 2554. กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กรุงเทพฯ.

George Hoffmeister, S.C. Watkins, Julius Silverberg. 1964. Fertilizer Consistency, Bulk Blending of Fertilizer Material: Effect of Size, Shape, and Density on Segregation. J. Agric. Food Chem., pp 64–69. Available Source: http://pubs.acs.org/doi/abs/ 10.1021/ jf60131a020. December 10, 2013

Schenkel, Y. Huyghebaert, B. Mostade, O. Pirard, E. and Miserque, O. . 2008. Spreading Segregation of Blended Fertilizers: Influence of the Particles Properties [2008]. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available Source: http://agris.fao. org/agris-search/ . December 10, 2013.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1. ตารางสรุปค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณธาตุหลัก (NPK) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาด 2 และ 3 มม. จำนวน 16 ทรีทเมนต์

(ทรีทเมนต์) %N		**(ทรีทเมนต์) %P_2O_5**		**(ทรีทเมนต์) %K_2O**	
(T_1) 15.43a	(T_9) 14.99a	(T_1) 15.40a	(T_9) 15.20a	(T_1) 15.43b	(T_9) 15.32b
(T_2) 15.43a	(T_{10}) 15.06a	(T_2) 15.37a	(T_{10}) 15.05a	(T_2) 15.45b	(T_{10}) 15.19b
(T_3) 15.35a	(T_{11}) 15.15a	(T_3) 15.64a	(T_{11}) 15.40a	(T_3) 15.43b	(T_{11}) 15.27b
(T_4) 15.34a	(T_{12}) 15.13a	(T_4) 15.47a	(T_{12}) 15.74a	(T_4) 15.49b	(T_{12}) 15.41b
(T_5) 15.29a	(T_{13}) 15.24a	(T_5) 15.10a	(T_{13}) 15.00a	(T_5) 15.37b	(T_{13}) 16.37a
(T_6) 15.37a	(T_{14}) 15.01a	(T_6) 14.95a	(T_{14}) 15.40a	(T_6) 15.61b	(T_{14}) 15.32b
(T_7) 15.42a	(T_{15}) 15.27a	(T_7) 15.16a	(T_{15}) 15.19a	(T_7) 15.43b	(T_{15}) 15.53b
(T_8) 15.27a	(T_{16}) 14.83a	(T_8) 15.14a	(T_{16}) 14.95a	(T_8) 15.52b	(T_{16}) 15.30b
เฉลี่ย = 15.22		**เฉลี่ย = 15.31**		**เฉลี่ย = 15.47**	
F-cal	0.33 (ns)	F-cal	0.58 (ns)	F-cal	1.14 (ns)
F-crit (0.05)	2.01	F-crit (0.05)	2.01	F-crit (0.05)	2.01
%CV	3.55	%CV	3.72	%CV	2.75

ตารางผนวกที่ 2. ตารางสรุปค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณธาตุหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าที่ใช้แม่ปุ๋ยขนาดเท่ากันเลือกใช้ขนาด 2 มม. จำนวน 10 ถุง

(ถุงที่) %N		(ถุงที่) $\%P_2O_5$		(ถุงที่) $\%K_2O$	
(1) 15.22b	(6) 15.30ab	(1) 15.69a	(6) 15.43a	(1) 15.45ab	(6) 15.44ab
(2) 15.37ab	(7) 15.44ab	(2) 15.52a	(7) 15.38a	(2) 15.29b	(7) 15.38ab
(3) 15.33ab	(8) 15.33ab	(3) 15.64a	(8) 15.43a	(3) 15.74a	(8) 15.40ab
(4) 15.54a	(9) 15.25b	(4) 15.41a	(9) 15.74a	(4) 15.43ab	(9) 15.28b
(5) 15.37ab	(10) 15.31ab	(5) 15.49a	(10) 15.60a	(5) 15.60ab	(10) 15.33ab
เฉลี่ย	15.35	**เฉลี่ย**	15.53	**เฉลี่ย**	15.43
F-cal	1.24 (ns)	F-cal	0.38 (ns)	F-cal	1.29 (ns)
F-crit (0.05)	2.39	F-crit (0.05)	2.39	F-crit (0.05)	2.39
%CV	0.93	%CV	2.28	%CV	1.42

ตารางผนวกที่ 3. ตารางสรุปค่าวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณธาตุหลัก (N P K) ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าขนาด 2 – 4 และ 1 – 3 มม.

ถุงที่	%N			$\%P_2O_5$			$\%K_2O$		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
1	18.88a	19.16a	19.59a	18.38a	19.77a	18.91a	21.36a	19.96a	19.42a
2	18.89a	19.07a	19.44a	18.19a	19.40a	18.61a	21.45a	20.12a	19.82a
3	19.00a	19.07a	19.72a	18.45a	19.16a	19.12a	21.23a	20.25a	19.00a
4	19.21a	19.27a	19.43a	18.45a	19.09a	19.07a	20.30a	20.27a	19.69a
5	19.08a	19.08a	-	18.78a	19.57a	-	20.80a	19.70a	-
เฉลี่ย	19.01	19.13	19.54	18.45	19.40	18.93	21.03	20.06	19.48
F-cal	0.36 (ns)	1.08 (ns)	0.09 (ns)	0.28 (ns)	0.26 (ns)	0.24 (ns)	0.90 (ns)	0.18 (ns)	0.12 (ns)
F-crit (0.05)	3.48	3.48	4.07	3.48	3.48	4.07	3.48	3.48	4.07
%CV	2.14	0.73	3.99	3.76	4.97	4.29	4.14	4.76	9.15

ตารางผนวกที่ 4. แสดงค่า SD ของผลวิเคราะห์ ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าสูตร 15 – 15 – 15 ขนาดเม็ดเท่ากัน 2 มม. จำนวน 10 ถุง

SD ของผลวิเคราะห์ N P K (3 rep)							
ถุงที่	N	P_2O_5	K_2O	**ถุงที่**	N	P_2O_5	K_2O
1	0.2	0.3	0.2	6	0.2	0.5	0.2
2	0.2	0.3	0.1	7	0.1	0.6	0.3
3	0.1	0.2	0.1	8	0.1	0.3	0.3
4	0.1	0.3	0.3	9	0.1	0.1	0.1
5	0.1	0.2	0.2	10	0.1	0.4	0.2

ตารางผนวกที่ 5. แสดงค่า SD ของผลวิเคราะห์ NPKในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้าสูตร 15 – 15 – 15 ที่มีขนาดเม็ด 2 – 3 มม. จำนวน 16 ทรีทเมนต์

ทรีทเมนต์	N	P_2O_5	K_2O	**ทรีทเมนต์**	N	P_2O_5	K_2O
T1= U3D3K3F3	0.6	0.3	0.4	T9= U2D3K3F3	0.2	0.8	0.7
T2= U3D3K3F2	0.9	0.4	0.1	T10= U2D3K3F2	0.2	0.0	0.1
T3= U3D3K2F3	0.7	0.1	0.5	T11=U2D3K2F3	0.5	1.1	0.2
T4= U3D3K2F2	0.6	0.9	1.0	T12=U2D3K3F2	0.2	0.6	0.5
T5= U3D2K3F3	0.5	0.5	0.2	T13= U2D2K3F3	0.5	0.1	0.2
T6= U3D2K3F2	0.3	0.3	0.4	T14= U2D2K3F2	0.3	0.6	0.3
T7= U3D2K2F3	0.8	0.5	0.3	T15= U2D2K2F3	0.5	0.5	0.4
T8= U3D2K2F2	0.7	0.3	0.4	T16= U2D2K2F2	0.7	0.7	0.3

ตารางผนวกที่ 6. แสดงค่า SD ของผลวิเคราะห์ N P K ในตัวอย่างปุ๋ยผสมแบบคลุกเคล้า สูตร 19 – 19 – 19 ที่มีขนาด 2 – 4 (T1,T2) และ 1 – 3 มม. (T3) จำนวน 3 ทรีทเมนต์

	N			P			K		
ถุงที่	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
1	0.5	0.1	0.7	0.5	0.8	0.6	1.0	0.8	1.4
2	0.4	0.2	1.1	1.2	1.0	0.5	1.3	0.8	1.7
3	0.3	0.1	0.9	0.5	1.3	1.3	0.8	0.9	2.7
4	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.6	0.2	0.1	0.9
5	0.5	0.2	-	0.4	1.2	-	0.6	1.6	-

ตารางผนวกที่ 7. แสดงเกณฑ์คลาดเคลื่อนขั้นต่ำของเกรดปุ๋ยตาม พระราชบัญญัติปุ๋ย พ. ศ.2518

ธาตุอาหารหลัก	ปริมาณธาตุอาหารรับรองร้อยละของน้ำหนัก	เกณฑ์ความคลาดเคลื่อนร้อยละของน้ำหนัก	
		ปุ๋ยเชิงเดี่ยวหรือเชิงประกอบ	ปุ๋ยเชิงผสม
ไนโตรเจน (N)	น้อยกว่า 8.0	0.4	0.4
	8.0 – 16.0	0.5	0.5
	16.1 – 24.0	0.6	0.6
	มากกว่า 24.0	0.8	1.0
ฟอสเฟต (P_2O_5)	น้อยกว่า 8.0	0.4	0.4
	8.0 – 16.0	0.5	0.5
	16.1 – 24.0	0.6	0.6
	มากกว่า 24.0	0.8	1.0
โพแทช (K_2O)	น้อยกว่า 8.0	0.5	0.5
	8.0 – 16.0	0.8	0.8
	16.1 – 24.0	0.8	1.0
	มากกว่า 24.0	1.0	1.2

ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร (2555)

ผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตมันสำปะหลัง

Effect of Utilization of PGPR biofertilizer for Increase Quality and Yield of Cassava

ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง[1] สุวลักษณ์ อะมะวัลย์[2] ประไพ ทองระอา[1] กัลยกร โปร่งจันทึก[1]
ชัชธนพร เกื้อหนุน[3] วัลลีย์ อมรพล[2] ศรีสุดา ทิพย์รักษ์[4]
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การศึกษาผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตมันสำปะหลัง มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ปุ๋ยชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณภาพและผลผลิตมันสำปะหลัง โดยดำเนินการในแปลงทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง โดยปี 2554 ดำเนินการทดลองในดินทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ 1 แปลง และดินร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์ปานกลาง 1 แปลง วางแผนการทดลองแบบ Splits plot in RCB รวม 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ Main plot การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 2 แบบ โดยกรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ และกรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อัตรา 1 กก./ไร่ ส่วน Sub plot ประกอบด้วยการใส่ปุ๋ยเคมี 4 อัตรา ในแปลงที่ 1 ดินทราย กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 12-4-16 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 12-3-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ส่วนแปลงที่ 2 ดินร่วนปนทราย กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 8-4-8 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 6-4-8 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 6-3-8 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ส่วนในปี 2555-2556 ในดินทราย วางแผนการทดลองแบบ Splits plot in RCB รวม 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ Main plot ประกอบด้วยการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 2 แบบ คือ กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 1 กก./ไร่ Sub plot การใส่ปุ๋ยเคมี 4 อัตรา ประกอบด้วย กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 8-4-8 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ และในดินร่วนปนทราย วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี 8 ซ้ำ ประกอบด้วย กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 4.6-0-0 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และปุ๋ยเคมีอัตรา 4.6-0-0 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ดำเนินการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ระยะปลูก 1x1 ม.^{2} รวม 1,600 ต้น/ไร่ กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ก่อนปลูกแช่ท่อนพันธุ์ในสารละลายปุ๋ยชีวภาพสัดส่วน 1 กก./น้ำ 20 ลิตร นาน 30 นาที ส่วนที่ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพแช่น้ำเปล่า 30 นาที ใส่ปุ๋ยเคมีตามอัตราที่กำหนดเมื่ออายุ 30 วันหลังปลูก

---

[1] กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ
[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชพลังงานทดแทน อ. เมือง จ.ระยอง
[3] กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ
[4] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชพลังงานทดแทน อ. เมือง จ.ขอนแก่น

ผลการทดลองพบว่า ในปี 2554 ในดินทราย การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ไม่มีผลทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังแตกต่างจากการไม่ใช้แต่ไม่เด่นชัด แต่การใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยทุกอัตรามีแนวโน้มทำให้อัตราผลตอบแทนทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้น ส่วนในดินร่วนทราย ซึ่งดินมีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างสูงพบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 6-4-8 กก. N-P_2O_5-K_2O ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงสุด ในปี 2555-2556 ในดินทรายพบว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทำให้น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังมีความแตกแตกต่างกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใส่ปุ๋ยชีวภาพทำให้น้ำหนักหัวสดเพิ่มขึ้น 16.2% ส่วนการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่างกันทำให้น้ำหนักหัวสดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่ปุ๋ย โดยการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ทำให้น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังสูงที่สุด 7,222 กก./ไร่ แต่ไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 8-4-8 และ 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ซึ่งมีน้ำหนักหัวสด 6,667 และ 6,053 กก./ไร่ ตามลำดับ ส่วนผลผลิตแป้งพบว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทำให้ผลผลิตแป้งไม่มีความแตกแตกต่างกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ และพบว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีทุกอัตราทำให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นจนเกิน 2.0 โดยการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่ำสุด 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงขึ้นถึง 3.40 และค่า VCR ของกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียวให้ผลตอบแทนสูงสุด 39.2 ทั้งนี้เพราะมีต้นทุนค่าปุ๋ยชีวภาพอย่างเดียวเพียง 40 บาท/ไร่ ในดินร่วนทราย พบว่า การใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนเพราะเมื่อใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนอัตรา 4.6 กก./ไร่ ทำให้ผลผลิตสูงกว่าการใส่ไนโตรเจนอัตรา 4.6 กก./ไร่ อย่างเดียว 11.5% และช่วยให้การดูดดึงธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ของมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น 34.6% 15.4% และ 12.2% ตามลำดับ และให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดทั้งการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียวและการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับไนโตรเจนอัตรา 4.6 กก./ไร่

คำสำคัญ : มันสำปะหลัง ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ *Azospirillum* Biofertilizer

คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญยิ่งของการเกษตรในเขตอาศัยน้ำฝนของไทย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเกือบทุกสภาพภูมิอากาศ มีความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศแห้งแล้งหรือฝนทิ้งช่วงนานๆ มีต้นทุนในการผลิตต่ำ และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในการทำรายได้ให้กับประเทศไทย จากข้อมูลการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในปี 2553 สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่าการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง 3 ชนิด คือ มันเส้น มันสำปะหลังอัดเม็ด และแป้งมันสำปะหลัง มีมูลค่า 66,140 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากปี 2552 ที่มีมูลค่าส่งออก 49,941 ล้านบาท หรือเพิ่มขึ้น 32% ซึ่งในปี 2553 ประเทศไทยมีส่วนแบ่งการตลาดโลก 69% จึงเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ที่สุดของโลก อย่างไรก็ตามราคาหัวมันสดที่เกษตรกรขายได้โดยทั่วไปมีราคาต่ำ ทำให้ผลตอบแทนสุทธิในปี 2553 เพียง 244 บาท/ตัน และมีต้นทุนการผลิตถึง 1,596 บาท/ตัน ขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 3,013 กก./ไร่ ในอนาคตความต้องการมันสำปะหลังมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ผลิตพลังงานทดแทน ชุมพล (2543) รายงานว่ามันสำปะหลังตอบสนองต่อไนโตรเจนมากที่สุด ธาตุไนโตรเจนจึงเป็นธาตุที่จำกัดการเจริญเติบโตของมันสำปะหลัง ซึ่งควรใช้ในอัตรา 8-24 กก.N/ไร่ รองลงมาคือโพแทสเซียมควรใช้ในอัตรา 8-16 กก. K_2O /ไร่ และมีการ

ตอบสนองต่อฟอสฟอรัสต่ำสุด ควรใส่ในอัตรา 4-8 กก. P_2O_5 /ไร่ แต่ทั้งนี้ก็ควรพิจารณาควบคู่ไปกับผลการวิเคราะห์ดิน อย่างไรก็ตามหากสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการอินทรียวัตถุและสมบัติดินทางชีวภาพหรือความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพควบคู่กันไป ก็จะเป็นโอกาสที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเพิ่มศักยภาพในการจัดการดินปลูกมันสำปะหลัง เพื่อเสริมสร้างคุณภาพของดินและเพิ่มผลผลิตมันสำปะหลังให้มากขึ้น กรมวิชาการเกษตร (2548) ได้รายงานว่าปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชหรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ เป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบๆ ราก ผิวราก ภายในราก ต้นและใบพืช โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ได้ด้วยการสร้างธาตุอาหารหรือเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชบางชนิด มีแบคทีเรียหลายชนิดที่พบว่าอาศัยอยู่ใน ดิน ราก และต้น (Mehnaz, 2001) ซึ่งประโยชน์ที่สำคัญของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่รอบๆ รากพืชเหล่านี้ คือ การตรึงไนโตรเจน (Boddy, 1995 ; Meunchang *et al*., 2004) ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid (IAA) (Meunchang *et al*., 2004) ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวรากให้มากขึ้น จึงมีผลทำให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ (Jacoud, 1999) แต่ประสิทธิภาพในการใช้ปุ๋ยชีวภาพแต่ละชนิดนั้นก็ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายประการ เช่น สกุลหรือสายพันธุ์แบคทีเรีย ชนิดของพืช สมบัติของดิน ประชากรจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ในดิน และเงื่อนไขทางสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปพบว่าหลังการใส่ปุ๋ยชีวภาพปริมาณแบคทีเรียจะลดอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของสภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ จึงมักพบว่าผลการทดลองในสภาพปลอดเชื้อกับในธรรมชาติมีความแตกต่างกันมาก (Bashan and Levanony, 1990) การศึกษาเกี่ยวกับปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในมันสำปะหลังยังมีน้อย จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาให้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการวิจัยพัฒนาผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในระดับเรือนทดลองและแปลงทดลอง เพื่อนำผลงานวิจัยไปใช้เป็นข้อมูลทางวิชาการสำหรับถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตและการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในมันสำปะหลัง ให้สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มศักยภาพในด้านการผลิตทั้ง ปริมาณ คุณภาพ และการลดต้นทุนการผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทยได้อย่างจริงจัง วัตถุประสงค์ในการทดลองนี้เพื่อศึกษาผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในระบบการผลิตมันสำปะหลัง เพื่อให้ทราบศักยภาพในการลดปริมาณและต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมี เพื่อได้มีการใช้ปุ๋ยชีวภาพผสมผสานกับปุ๋ยเคมีอัตราๆ ต่างกันในดินทรายและดินร่วนปนทรายที่มีคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินที่แตกต่างกัน เนื่องจากดินในแหล่งเพาะปลูกต่างๆ มีธาตุอาหารตกค้างอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน

วิธีดำเนินการ

วิธีการทดลองปี 2554

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Splits plot in RCB รวม 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย คือ Main plot การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 2 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ และกรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ อัตรา 1 กก./ไร่ Sub plot การใส่ปุ๋ยเคมี 4 อัตรา คือ แปลงที่ 1 ดินทราย กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 16-4-16 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 12-4-16 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 12-3-16 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ แปลงที่ 2 ดินร่วนปนทราย กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยเคมีทุกชนิด กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 8-4-8 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 6-4-8 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 6-3-8 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่

วิธีปฏิบัติการทดลองปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ประกอบด้วย ไรโซแบคทีเรีย 3 สกุล คือ *Gluconacetobacter diazotrophicus, Azospirillum* spp. และ *Burkholderia* spp. ซึ่งมีปริมาณเชื้อแต่ละสกุลเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 วัน $1.26x10^8$ $1.07x10^7$ และ $5.3x10^7$ เซลล์/กรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ โดยใช้ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด และซีโอไลด์อัตราส่วน 1 : 1 โดยน้ำหนักเป็นวัสดุพา ก่อนใส่เชื้อนึ่งฆ่าเชื้อวัสดุพาที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 นาน 45 นาที 1 ครั้ง ดำเนินการทดลองใน ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ทั้ง 2 แปลง ขนาดแปลงทดลอง 7x8 ม.^{2} จุ่มท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ก่อนปลูกด้วยสารละลายปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ สัดส่วน 1 กก./น้ำ 20 ลิตร นาน 30 นาที กรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อแช่ด้วยน้ำเปล่า 30 นาที ระยะปลูก 1x1 ม.^{2} แปลงละ 7 แถวๆ ละ 8 ต้น รวม 56 ต้น เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิต แปลงที่ 1 อายุ 9 เดือน (เนื่องจากฝนตกหนักและน้ำท่วมแปลง) และแปลงที่ 2 อายุ 12 เดือน มีพื้นที่เก็บเกี่ยว 5x6 ม.^{2} หรือ 30 ต้น/แปลง เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต น้ำหนักต้น เหง้าและใบ ผลผลิตหัวมันสำปะหลัง และผลผลิตแป้ง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT และวิเคราะห์ผลตอบแทนโดยการคำนวณค่า อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR) ตามสูตร VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัดระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ระดับ 2 (วิวัตน์ และคณะ, 2542)

วิธีการทดลองปี 2555-2556

แปลงทดลอง มี 2 แปลง เป็นดินทรายและดินร่วนปนทราย อย่างละ 1 แปลง ในแปลงดินทราย วางแผนการทดลองแบบ Splits plot in RCB รวม 2x4 รวม 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ Main plot คือ การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 2 แบบ คือ 1) ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (B0) 2) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 1 กก./ไร่ (B1) Sub plot คือ การใส่ปุ๋ยเคมี 4 อัตรา คือ F0 ไม่ใส่ปุ๋ย F1 ใส่ 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O F2 ใส่ 8-4-8 กก.N-P_2O_5-K_2O F3 ใส่ 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O และในดินร่วนปนทราย วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 กรรมวิธี 8 ซ้ำ กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี กรรมวิธีที่ 2 ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ +4.6-0-0 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ +ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ + 4.6-0-0 กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ดำเนินการทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ขนาดแปลงทดลอง 7x8 ม.^{2} ปลูกมันสำปะหลัง โดยแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารละลายปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (1:20) ร่วมกับปุ๋ยเคมีตามอัตราที่กำหนดภายใต้หลักเกณฑ์การใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน บนพื้นฐานค่าความอุดมสมบูรณ์ของดินก่อนปลูกในตารางที่ 2.1 โดยใช้ระยะปลูก 1x1 ม.^{2} รวม 7 แถวๆ ละ 8 ต้น เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและผลผลิต เมื่ออายุ 12 เดือน พื้นที่เก็บเกี่ยว 5x6 ม.^{2} หลังเก็บเกี่ยวหาน้ำหนักต้นแห้ง น้ำหนักรากแห้ง การสะสมไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม ในต้น ใบ เหง้า และหัวมันสำปะหลัง

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553- กันยายน 2556

สถานที่ทำการทำลอง : ณ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จ. ระยอง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองปี 2554

ดินทราย

การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในระบบการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ในดินร่วนทรายที่มีสมบัติทางเคมีของดิน ระดับ 0-20 ซม. ประกอบด้วย ปฏิกิริยากรด-ด่าง 6.4 อินทรียวัตถุ 0.26% ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Bray-II P) 15 มก./กก. และโพแทสเซียมที่สกัดได้ 8 มก./กก. โดยอัตราปุ๋ยตามคำแนะค่าวิเคราะห์ดินที่ใช้ในการทดลอง 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ผลการทดลองพบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ไม่มีผลทำให้ค่าเฉลี่ย ความสูง น้ำหนักต้น เหง้าและใบ ผลผลิตหัวมันสด และผลผลิตแป้ง (ตารางที่ 1) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ แต่ทำให้ ความสูงเพิ่มขึ้น 5.06% น้ำหนัก ต้น เหง้าและใบเพิ่มขึ้น 8.84% ผลผลิตหัวมันสดเพิ่มขึ้น 5.84% และผลผลิตแป้งเพิ่มขึ้น 4.18% ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ยังทำให้การเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังไม่เด่นชัด และผลของอัตราปุ๋ยเคมีพบว่าทำให้ค่าเฉลี่ย ความสูง น้ำหนักต้น เหง้าและใบ และผลผลิตหัวมันสด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี แต่ไม่แตกต่างกันกับในแต่ละอัตราปุ๋ย แม้ปฏิกิริยาร่วมระหว่างอัตราปุ๋ยเคมีกับการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์จะไม่ทำให้ความสูง น้ำหนักต้น เหง้าและใบ และผลผลิตหัวมันสด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมีก็ตาม แต่หากพิจารณาเปรียบเทียบผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับปุ๋ยเคมีแต่ละอัตราแล้ว พบว่า การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทำให้ความสูง น้ำหนักต้น เหง้าและใบ และผลผลิตหัวมันสด (ตารางที่ 1) เพิ่มขึ้นในทุกอัตราปุ๋ยเคมีที่ใช้ทดลอง แต่มีเฉพาะกรรมวิธีไม่ใส่ปุ๋ยเคมีแต่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับกรรมวิธีที่ลดปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 20% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน หรือ 12-6-16 N-P_2O_5-K_2O/ไร่ เท่านั้นที่ทำให้มีอัตราผลตอบแทนค่าปุ๋ย หรือ VCR เท่ากับ 17.7 และ 2.1 ตามลำดับ ซึ่งเกษตรกรที่มีทุนจำกัดสามารถนำไปใช้ได้ นอกจากนี้หากพิจารณาจากอัตราผลตอบแทนจากการใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเดียวทุกอัตราพบว่าการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเดียวไม่ทำให้ผลผลิตมีอัตราผลตอบแทนที่เพิ่มขึ้นมากพอที่จะทำให้คุ้มค่า แต่พบว่าเมื่อมีการใส่ปุ๋ยเคมีทุกอัตราร่วมกับการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีผลทำให้อัตราผลตอบแทนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2)

ดินร่วนปนทราย

การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ในดินร่วนปนทราย ที่มีสมบัติทางเคมีของดิน ระดับ 0-20 ซม. ประกอบด้วย ปฏิกิริยากรด-ด่าง 5.9 อินทรียวัตถุ 1.87% ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Bray-II P) 156 มก./กก. และโพแทสเซียมที่สกัดได้ 76 มก./กก. ผลการทดลองพบว่า ความสูง น้ำหนักแห้งต้น เหง้าและใบ ผลผลิตหัวสด และผลผลิตแป้ง ของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ไม่มีผลทำให้มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากดินมีความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างสูง มันสำปะหลังจึงมีการตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยน้อย แต่ก็มีแนวโน้มทำให้มีการเจริญเติบโตและผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่ ส่วนการวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจพบว่าผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ในกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 6-4-8 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ให้ค่า VCR สูงที่สุด (ตารางที่ 4) ทั้งนี้เพราะการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ช่วยลดค่าปุ๋ยให้ต่ำลงและทำให้ผลผลิตและรายได้เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 1. ผลการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ในดินทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2554

การใส่ปุ๋ย	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง ต้น ใบ เหง้า (กก./ไร่)	ผลผลิต หัวสด (กก./ไร่)	ผลผลิตแป้ง (กก./ไร่)
A. ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (1 กก./ไร่)				
B_0 = ไม่ใส่	217	2,036	7,195	2,035
B_1 = แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูก	228	2,216	7,615	2,120
B. อัตราปุ๋ยเคมี (กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่)				
F_0 = 0-0-0	190 b	1,616	6,634 b	1,892
F_1 = 16-8-16	236 a	2,469	7,713 a	2,102
F_2 = 12-8-16	222 ab	1,963	7,556 a	2,134
F_3 = 12-6-16	242 a	2,455	7,716 a	2,182
C. BxF interaction				
B0F0	181	1,557	6,447	1,822
B0F1	228	2,424	7,504	2,097
B0F2	217	1,814	7,231	1,998
B0F3	240	2,323	7,597	2,225
B1F0	198	1,675	6,820	1,962
B1F1	243	2,515	7,922	2,108
B1F2	226	2,086	7,881	2,269
B1F3	244	2,587	7,836	2,140
CV (a) %	13.9	14.4	8.26	8.05
CV (b) %	2.02	22.2	6.19	7.67

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพ (A) หรือปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ (B) ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ LSD

ค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ (C) ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%โดยใช้ DMRT

ตารางที่ 2. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกันในดินทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2554

กรรมวิธี	ผลผลิต	ผลผลิตเพิ่ม	ค่าปุ๋ย[1]	ผลตอบแทนค่าปุ๋ย (VCR)[2]	
(กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่)	(กก./ไร่)	กก./ไร่	(บาทต่อไร่)	VCR	VCR เพิ่ม PGPR[3]
ไม่ใส่ปุ๋ย	6,447	0	0	0.00	0.00
ไม่ใส่ปุ๋ย+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	6,820	373	40	17.7	17.7
16-8-16	7,504	1,057	1,504	1.34	0.00
16-8-16+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	7,902	1,455	1,544	1.79	0.49
12-8-16	7,231	784	1,364	1.09	0.00
12-8-16+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	7,881	1,434	1,404	1.94	0.88
12-6-16	7,597	1,150	1,195	1.83	0.00
12-6-16+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	7,836	1,389	1,235	2.14	0.37

หมายเหตุ : [1] ราคาปุ๋ยเคมี ดังนี้ 15-15-15 กก.ละ 18 บาท 46-0-0 กก.ละ 16 บาท และ 0-0-60 กก.ละ 20 บาท และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ถุงละ 20 บาท (อัตราการใช้ 2 ถุง/ไร่)

[2] ราคามันสำปะหลังเฉลี่ย 1,900 บาทต่อตัน

[3] อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR)
VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัด ระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ ระดับ 2.0

ตารางที่ 3. ผลการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ในดินร่วนปนทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2554

การใส่ปุ๋ย	ความสูง (ซม.)	น้ำหนักแห้ง ต้น ใบ เหง้า (กก./ไร่)	ผลผลิตหัวสด (กก./ไร่)	ผลผลิตแป้ง (กก./ไร่)
A. ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (1 กก./ไร่)				
B_0 = ไม่ใส่	401	4,601	10,541	2,736
B_1 = แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูก	394	4,883	10,724	2,810
B. อัตราปุ๋ยเคมี (กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่)				
F_0 = 0-0-0	371	4,457	10,618	2,814
F_1 = 8-4-8	400	4,695	10,366	2,703
F_2 = 6-4-8	410	4,941	11,355	2,952
F_3 = 4-3-8	410	4,875	10,191	2,621
C. BxF interaction				
B0F0	375	4,320	11,380	3,032
B0F1	397	4,540	9,940	2,613
B0F2	425	4,777	9,959	2,572
B0F3	408	4,767	10,883	2,725
B1F0	366	4,592	9,856	2,596
B1F1	404	4,849	10,793	2,793
B1F2	393	5,106	12,751	3,331
B1F3	405	4,983	9,498	2,517
CV (a) %	17.3	23.2	8.65	9.41
CV (b) %	6.85	7.87	0.16	13.7

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพหรือปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ LSD

ค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ (C) ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ DMRT

ตารางที่ 4. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกันในดินร่วนปนทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2554

กรรมวิธี	ผลผลิต	ผลผลิตเพิ่ม	ค่าปุ๋ย[1]	ผลตอบแทนค่าปุ๋ย (VCR)[2]	
กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	(กก./ไร่)	กก./ไร่	(บาทต่อไร่)	VCR	VCR เพิ่ม PGPR[3]
ไม่ใส่ปุ๋ย	10,889	0	0	0.00	0.00
ไม่ใส่ปุ๋ย+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	9,683	-1,206	40	-57.29	-57.29
8-4-8[1]	9,681	-1,208	759	-3.02	0.00
8-4-8+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	10,602	-287	799	-0.68	2.19
6-4-8	9,691	-1,198	689	-3.30	0.00
6-4-8+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	11,647	-758	729	1.97	5.09
6-3-8	10,496	-393	631	-1.18	0.00
6-3-8+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	9,267	-1,622	671	-4.59	-3.48

หมายเหตุ : [1] ราคาปุ๋ยเคมี ดังนี้ 15-15-15 กก.ละ 18 บาท 46-0-0 กก.ละ 16 บาท และ 0-0-60 กก.ละ 20 บาท และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ถุงละ 20 บาท (อัตราการใช้ 2 ถุง/ไร่)

[2] ราคามันสำปะหลังเฉลี่ย 1,900 บาท/ตัน

[3] อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR) VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัด ระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ระดับ 2.0

ผลการทดลองปี 2555-2556

ดินทราย

การใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทำให้น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังมีความแตกต่างกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทำให้น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น 16.2% (ตารางที่ 6) ส่วนการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่างกันทำให้น้ำหนักหัวสดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่ปุ๋ย (ตารางที่ 6) พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ทำให้น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังสูงที่สุด 7,222 กก./ไร่ แต่ไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 8-4-8 และ 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ซึ่งมีน้ำหนักหัวสด 6,667 และ 6,053 กก./ไร่ ตามลำดับ ส่วนปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย ไม่ทำให้น้ำหนักหัวสดของมันสำปะหลังมีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนผลผลิตแป้งพบว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ผลผลิตแป้งของมันสำปะหลังไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ ส่วนการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่างกันทำให้ผลผลิตแป้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่ปุ๋ย (ตารางที่ 6) พบว่าการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 16-4-16 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่

ให้ผลผลิตแป้งสูงที่สุด 1,989 กก./ไร่ แต่ไม่แตกต่างกับการใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 8-4-8 และ 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ซึ่งมีผลผลิตแป้ง 1,953 และ1,736 กก./ไร่ ตามลำดับ ส่วนปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัยไม่ทำให้ผลผลิตแป้งของมันสำปะหลังมีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนผลการวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ พบว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีทุกอัตราทำให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นจนเกิน 2.0 โดยการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่ำสุด 4-4-4 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงขึ้นถึง 3.40 และค่า VCR ของกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียวให้ผลตอบแทนสูงสุด 39.2 ทั้งนี้เพราะมีต้นทุนค่าปุ๋ยชีวภาพอย่างเดียวเพียง 40 บาท/ไร่ ชี้ให้เห็นประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยชีวภาพ พีจีพีอาร์ในการผลิตมันสำปะหลังในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งจะตอบสนองสูงกว่าดินที่มีการใส่ปุ๋ยมากหรือมีความอุดมสมบูรณ์สูง เนื่องจากพืชจะใช้ปุ๋ยเคมีในการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิตก่อนปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยชีวภาพจะช่วยให้ธาตุอาหารและส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชในช่วงที่มีธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์น้อย หรือ ในดินอุดมสมบูรณ์สูงการตอบสนองของปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีน้อย และดินอุดมสมบูรณ์ต่ำการตอบสนองของปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีมาก รวมทั้งปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ช่วยเพิ่มราก ช่วยดูดน้ำและธาตุอาหาร (Meurchang *et al.,* 2004)

ดินร่วนปนทราย

ค่าวิเคราะห์ดินแปลงดินร่วนปนทรายก่อนปลูก (ตารางที่ 5) พบว่ามีอินทรียวัตถุปานกลาง มีฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสูง ในการทดลองนี้จึงกำหนดใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน 4.6 กก./ไร่ หรือคิดเป็นยูเรีย (46-0-0) 10 กก./ไร่ ตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ (กรมวิชาการเกษตร, 2553) ส่วนฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมมีเพียงพอกับความต้องการของมันสำปะหลังแล้วจึงไม่ได้ใส่เพิ่ม มีการเปรียบเทียบการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และไม่ใส่ เพื่อศึกษาการตอบสนองของมันสำปะหลังต่อปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ในสภาพดินที่มีธาตุอาหารในดินค่อนข้างสูงแล้ว พบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ไม่มีผลทำให้ความสูง น้ำหนักต้นแห้ง เหง้าแห้ง และใบแห้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 8) เป็นไปในแนวทางเดียวกับเปอร์เซ็นต์แป้ง ผลผลิตหัวมันแห้ง และผลผลิตหัวมันสด ที่การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียวและการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน 4.6 กก./ไร่ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่ปุ๋ย (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตามการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยไนโตรเจน 4.6 กก./ไร่ ทำให้ผลผลิตสูงกว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน 4.6 กก./ไร่ อย่างเดียว ประมาณ 11.5% และสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ย 10.5% (ตารางที่ 8) ชี้ให้เห็นในเบื้องต้นว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ไนโตรเจนในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงได้ ทั้งนี้เพราะทำให้ศักยภาพในการดูดดึงธาตุอาหารเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 8) โดยการดูดดึง ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เพิ่มขึ้น 34.6 15.4 และ 12.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 9) การใช้ปุ๋ยชีวภาพในการปลูกมันสำปะหลังทำให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งในตำรับที่มีการใช้ไนโตรเจนอัตรา 4.6 กก./ไร่ และการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียว (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 5. ค่าวิเคราะห์ดินก่อนการทดลอง

แปลงที่	เนื้อดิน	pH (น้ำ 1:1)	OM (%)	Avai-P (มก./กก.)	Ext-K (มก./กก.)	ปุ๋ยอัตราแนะนำ กก,N-P_2O_5-K_2O/ไร่
1	ดินทราย	4.8	0.45	21	14	16-4-16
2	ดินร่วนปนทราย	6.45	2.13	328	146	4.6-0-0

ตารางที่ 6. ผลการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ในดินทราย ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2555/2556

การใส่ปุ๋ย	ผลผลิตหัวสด (กก./ไร่)	ผลผลิตแป้ง (กก./ไร่)
A. ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ (1 กก./ไร่)		
B_0 = ไม่ใส่	5,851 b	1,695
B_1 = แช่ท่อนพันธุ์ก่อนปลูก	6,796 a	1,915
B. อัตราปุ๋ยเคมี (กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่)		
F_0 = 0-0-0	5,343 b	1,541 b
F_1 = 16-4-16	7,222 a	1,737 ab
F_2 = 8-4-8	6,667 ab	1,953 ab
F_3 = 4-4-4	6,053 ab	1,989 a
C. BxF interaction		
B0F0		
B0F1	4,558	1,321
B0F2	6,545	1,703
B0F3	6,479	1,949
B1F0	5,822	1,805
B1F1	6,127	1,760
B1F2	7,898	1,770
B1F3	6,875	1,957
	6,285	2,173
CV (a) %	4.18	7.49
CV (b) %	10.6	12.2

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพหรือปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ LSD

ค่าเฉลี่ยการใช้ปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ (C) ที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ DMRT

ตารางที่ 7. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกันในดินทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2555/2556

กรรมวิธี	ผลผลิต	ผลผลิตเพิ่ม	ค่าปุ๋ย[1]	ผลตอบแทนค่าปุ๋ย (VCR)[2]	
กก.N-P_2O_5-K_2O/ไร่	(กก./ไร่)	กก./ไร่	(บาทต่อไร่)	VCR	VCR เพิ่ม PGPR[3]
ไม่ใส่ปุ๋ย	4,558	0	0	0.00	0.00
ไม่ใส่ปุ๋ย+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	6,127	1,569	40	39.2	39.2
16-4-16	6,545	1,987	1,282	1.55	0.00
16-4-16+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	7,898	3,340	1,322	2.53	0.97
8-4-8	6,479	1,921	739	2.60	0.00
8-4-8+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	6,875	2,317	779	2.97	0.37
4-4-4	5,822	1,264	468	2.70	0.00
4-4-4+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	6,285	1,727	508	3.40	0.70

หมายเหตุ : [1] ราคาปุ๋ยเคมี ดังนี้ 15-15-15 กก.ละ 18 บาท 46-0-0 กก.ละ 16 บาท และ 0-0-60 กก.ละ 20 บาท และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ถุงละ 20 บาท (อัตราการใช้ 2 ถุง/ไร่)

[2] ราคามันสำปะหลังเฉลี่ย 1,900 บาทต่อตัน

[3] อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR)
VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัด ระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ระดับ 2.0

ตารางที่ 8. ผลการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ในดินร่วนปนทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2555/2556

การใส่ปุ๋ย	ความสูง (ซม.)	ผลผลิตหัวสด (กก./ไร่)	ผลผลิตแป้ง (กก./ไร่)	น้ำหนักแห้งทั้งหมด (กก./ไร่)	การดูดดึง N (กก./ไร่)	การดูดดึง P (กก./ไร่)	การดูดดึง K (กก./ไร่)
ไม่ใส่ปุ๋ย	333	8,175	2,441	5,663	30.7	9.5	63.8
ปุ๋ยเคมี 4.6 กก N./ไร่	360	8,102	2,374	5,701	45.5	10.5	66.9
ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	363	8,643	2,490	5,760	41.3	10.9	71.8
ปุ๋ยเคมี 4.6 กก N./ไร่+ ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	350	9,035	2,666	6,250	46.9	11.8	69.6
CV (%)	15.0	12.8	14.9	13.2	22.2	22.5	23.5

หมายเหตุ : การใส่ปุ๋ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ LSD

ตารางที่ 9. มวลชีวภาพน้ำหนักแห้ง การดูดดึงธาตุอาหาร และประสิทธิภาพของการดูดดึงธาตุอาหาร เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีไนโตรเจนในดินร่วนปนทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2555-2556

กรรมวิธี	ความเข้มข้นธาตุอาหารในมวลชีวภาพ[1]			ปริมาณการดูดดึงธาตุอาหาร[2]			การเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดดึงธาตุอาหาร[3]		
	N (%)	P (%)	K (%)	N (กก./ไร่)	P (กก./ไร่)	K (กก./ไร่)	N (%)	P (%)	K (%)
ไม่ใส่ปุ๋ย	0.541	0.167	1.126	30.7	9.5	63.8	0.0	0.0	0.0
ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน 4.6 กก. N/ไร่	0.799	0.183	1.174	45.5	10.5	66.9	48.6	10.4	5.0
ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	0.716	0.190	1.243	41.3	10.9	71.8	34.6	15.4	12.2
ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน 4.6 กก. N/ไร่+ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	0.751	0.189	1.114	46.9	11.8	69.6	53.2	25.1	9.2

หมายเหตุ : [1] ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในมวลชีวภาพน้ำหนักแห้งรวมเฉลี่ยจาก ต้น ใบ เหง้า และหัวมัน

[2] การดูดดึงธาตุอาหารหลักของมวลชีวภาพ (ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลักในมวลชีวภาพ x มวลชีวภาพน้ำหนักแห้ง)

[3] การเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดดึงธาตุอาหาร (การดูดธาตุอาหารเพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/กรรมวิธีไม่ใส่ปุ๋ย) x100

ตารางที่ 10. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน ในดินร่วนปนทราย ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ปี 2555/2556

กรรมวิธี	ผลผลิต (กก./ไร่)	ผลผลิตเพิ่ม กก./ไร่	รายได้เพิ่ม (บาทต่อไร่)	ค่าปุ๋ย[1] (บาทต่อไร่)	ผลตอบแทนค่าปุ๋ย (VCR)[3]
ไม่ใส่ปุ๋ย	8,174	0	0	0	0.00
ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน 4.6 กก.N/ไร่	8,102	-73	-138	160	-0.86
ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	8,643	469	891	40	22.3
ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน 4.6 กก.N/ไร่ +ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์	9,035	861	1,636	200	8.18

หมายเหตุ : [1] ราคาปุ๋ยเคมี ดังนี้ 46-0-0 กก.ละ 16 บาท และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ถุงละ 20 บาท (อัตราการใช้ 2 ถุง/ไร่)

[2] ราคามันสำปะหลังเฉลี่ย 1,900 บาท/ตัน

[3] อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR) VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัดระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ ระดับ 2.0

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลจากการทดลองทำให้ได้ข้อมูลผลตอบสนองของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในมันสำปะหลังในเนื้อดินที่นิยมปลูกมันสำปะหลัง คือ ดินทรายและดินร่วนปนทราย ซึ่งเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ผลการทดลอง ในปี 2554 พบว่าการตอบสนองของปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ให้ผลดีในดินทราย ซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำกว่าดินร่วนปนทราย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร่วมกับการวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ ชี้ให้เห็นว่าปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ช่วยลดปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส 20% ของอัตราแนะนำปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน ส่วนในปีที่ 2555-2556 ซึ่งเป็นการทดลองซ้ำในปีที่ 2 ในเนื้อดินที่ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองปีที่ 2 ให้ผลที่สอดคล้องกับปีที่ 1 ซึ่งผลการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในดินร่วนปนทรายให้ข้อมูลที่ชัดเจนขึ้น โดยพบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ช่วยให้มันสำปะหลังมีการดูดดึงไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เพิ่มขึ้น 34.6 15.4 และ 12.2% ตามลำดับ และเมื่อมีการใส่ไนโตรเจนเพิ่มก็มีผลทำให้การดูดดึงไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นกว่าการใส่เฉพาะไนโตรเจนอย่างเดียว ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ช่วยให้มันสำปะหลังได้รับธาตุอาหารมากขึ้น อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในแปลงทดลองเพิ่มเติม ทั้งในระดับศูนย์วิจัยและในแปลงเกษตรกร และควรจะมีการศึกษาการยอมรับของเกษตรกรเพิ่มเติมด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ. 121 หน้า

----------. 2548. ปุ๋ยชีวภาพและผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ.กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ. 121 หน้า

ชุมพล นาควิโรจน์. 2542. การวิจัยด้านการจัดการดินและการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินกับมันสำปะหลัง. รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการ เรื่อง การจัดการดินไร่และการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินเพื่อเพิ่มผลผลิตพืชไร่. กองปฐพีวิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 1-28.

วิวัตน์ อิงคะประดิษฐ์ ชยงค์ นามเมือง และ เจนวิทย์ สุขทองสา. 2542. เปรียบเทียบการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมฟอสเฟตและปุ๋ยยูเรีย ใส่สลับเป็นปุ๋ยรองพื้นและแต่งหน้าเพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวในภาคกลาง. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยความอุดมสมบูรณ์ของดินและปุ๋ยข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2536-2539. กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 211-229.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ.

Bashan, Y, and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36, 591-608.

Boddey, RM. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice:contributions and prospects for improvement. Plant Soil. 174: 195-209.

Jacoud. C. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. J. Microbiol. 45: 339-342.

Mehnaz, S. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. Can. J. Microbiol. 47: 110-117.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Ando, S., T. Yokoyama, 2004. Phylogenetic and Physiological characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Soil Sci. plant Nutr., 50 (3), 413-421.

การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

Study on Effectiveness of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Cost Deceasing, Quality and Quantity, Increasing of corn yield

กัลยกร โปร่งจันทึก ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา ชัชธนพร เกื้อหนุน
ศุภกาญจน์ ล้วนมณี[1] วีระพงษ์ เย็นอ่วม[2]
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และมีความต้องการเพิ่มขึ้นทุกปี บางปีต้องมีการนำเข้า นักวิชาการได้มีการนำเทคโนโลยีทางด้านการผลิตเข้ามาใช้เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและคุณภาพให้เพียงพอต่อความต้องการในประเทศ การจัดการปุ๋ยก็เป็นอีกเทคโนโลยีหนึ่งที่ได้มีการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะการแนะนำให้เกษตรกรหันมาใช้ปุ๋ยแบบผสมผสาน (ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณ และคุณภาพผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ทำการศึกษาในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์ (ศวพ.นครสวรรค์) ซึ่งเป็นดินร่วนปนทราย มีอินทรียวัตถุต่ำ และขาดฟอสฟอรัส และ ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ (ศวร.นครสวรรค์) ซึ่งเป็นดินร่วนเหนียวสีน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ คือ 1) ไม่ใส่ปุ๋ย 2) ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน 3) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 4) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา ลด N 100% ของปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 5) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 6) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา ลด N-P_2O_5-K_2O 25% ของปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ และ 7) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราลด N-P_2O_5-K_2O 50% ของปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ ผลการทดลองพบว่า แปลงทดลอง ศวร.นครสวรรค์ กรรมวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สามารถลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมได้ 25% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน ส่วนแปลงทดลอง ศวพ.นครสวรรค์ มีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือ การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีแนวโน้มว่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ 50% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน

---

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์

คำนำ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เป็นอย่างมาก ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากหลังจากที่มีการขยายการเลี้ยงสัตว์ตั้งแต่ ปี 2535 เป็นผลให้การส่งออกลดลงตามลำดับ โดย 94% ของผลผลิตข้าวโพดใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ของประเทศ ปัจจุบันการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในและมีปริมาณไม่แน่นอนเนื่องจากการผลิตขึ้นกับดินฟ้าอากาศ ทำให้มีความเสี่ยงต่อความเสียหายจากความแห้งแล้งมากและพื้นที่ปลูกต้องแข่งขันกับพืชเศรษฐกิจอื่นที่ให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า ในระยะ 4 - 5 ปี ที่ผ่านมาประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการการใช้ภายในทั้งๆ ที่ในอดีตไทยเคยเป็นประเทศผู้ส่งออกรายใหญ่รายหนึ่งของโลกและไทยมีศักยภาพด้านการผลิตการตลาดที่สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้ ในปัจจุบันประมาณ 90% ของพื้นที่ปลูกเป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมซึ่งให้ผลผลิตสูง แต่เกษตรกรก็ยังต้องเผชิญกับปัญหาต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นเพราะว่าปัจจัยการผลิต เช่น ปุ๋ย สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืชและศัตรูพืชมีราคาแพง และปัญหาคุณภาพของผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน ทำให้กำไรที่ได้จากการเพาะปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลดลง เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปปลูกพืชอื่นๆ ทดแทน เช่น อ้อย มันสำปะหลัง เป็นต้น จึงเป็นสาเหตุทำให้พื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีแนวโน้มลดลง การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการช่วยเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง รวมไปถึงการแนะนำให้เกษตรกรใช้ปุ๋ยแบบผสมผสาน (ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ) และเทคโนโลยีอื่นๆ เพื่อช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิตและปริมาณผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เพื่อให้เพียงพอต่อการบริโภคในประเทศไทยและเหลือเพื่อส่งออก การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณ และคุณภาพผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

วิธีดำเนินการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3
2. ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
3. ปุ๋ยเคมี

วิธีการ

ก่อนดำเนินการทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในแปลงทดลอง ทั้งสองแห่ง วิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัส (Bray-II) และโพแทสเซียมที่สกัดได้ (ตารางที่ 1) เพื่อคำนวณอัตราปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินของกรมวิชาการเกษตร (2548) และใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์คลุกเมล็ด ซึ่งประกอบด้วย *Azospirillum* 1x10^8 Cell/g, *Beijerinckia* 1x10^6 CFU/g, *Azotobacter* 1x10^6 CFU/g

แปลงที่ 1 ศวร.นครสวรรค์ (ดินร่วนเหนียว)

วางแผนการทดลองแบบ RCBD รวม 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 14-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (อัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน)

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 0-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 14-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 10.5-7.5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 7-5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

ทำการปลูกและใส่ปุ๋ยรองพื้น เมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2556 ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้น เมื่ออายุ 7 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรียเป็นปุ๋ยแต่งหน้าเมื่ออายุ 21 วัน พร้อมพูนโคนและกำจัดวัชพืช ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 30 กันยายน 2556 รวมอายุ 119 วัน

แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย)

วางแผนการทดลองแบบ RCBD รวม 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 13-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (อัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน)

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 0-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 13-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 9.75-7.5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 6.5-5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

ทำการปลูกและใส่ปุ๋ยรองพื้น เมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม 2556 ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้น เมื่ออายุ 7 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรียเป็นปุ๋ยแต่งหน้าเมื่ออายุ 30 วัน พร้อมพูนโคนและกำจัดวัชพืช ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 17 กันยายน 2556 รวมอายุ 113 วัน

ระยะเวลา : เริ่มต้น 2554 สิ้นสุด 2558 รวม 5 ปี

สถานที่ทำการทดลอง : ณ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์

ผลการทดลอง

1. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ผลวิเคราะห์ดินที่ระดับ 0 - 20 ซม. ในแปลงทดลองที่ 1 ศวร. นครสวรรค์ เนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียว (clay loam) มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ประกอบด้วย อินทรียวัตถุ 1.37% ความเป็นกรด-ด่าง 5.65 ฟอสฟอรัส (Bray-II) 11 มก./กก. โพแทสเซียม 180 มก./กก. (ตารางที่ 1) อัตราปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ที่ใช้ในการทดลองนี้ อัตรา 14-10-0 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548) และในแปลงทดลองที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ เนื้อดินเป็นดินร่วนทราย (sandy loam) มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ขาดฟอสฟอรัส ประกอบด้วย อินทรียวัตถุ 1.67% ความเป็นกรด-ด่าง 5.62 ฟอสฟอรัส (Bray-II) 14 มก./กก. โพแทสเซียม 146 มก./กก. (ตารางที่ 1) อัตราปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ที่ใช้ในการทดลองนี้ อัตรา 13-10-0 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2. ความสูง

ความสูงของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ของทั้ง 2 แปลงทดลองที่ 30 60 และวันเก็บเกี่ยว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละกรรมวิธีทดลองทั้งสองแปลงทดลอง โดยค่าเฉลี่ยความสูงของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ของแปลงทดลอง ศวร.นครสวรรค์ (ดินร่วนเหนียว) มีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยความสูงของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ของแปลงทดลอง ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย) ดังตารางที่ 2

3. น้ำหนักต้นสด น้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด

น้ำหนักต้นสด น้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด ของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ของทั้งสองแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แปลงทดลองที่ 1 ศวร.นครสวรรค์ (ดินร่วนเหนียว) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 มีน้ำหนักต้นสด น้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดสูงกว่าแปลงทดลองที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย) นอกจากนี้ในแปลงทดลองที่ 1 ศวร.นครสวรรค์ (ดินเหนียว) กรรมวิธีทดลองที่ 6 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 10.5-7.5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 25%) มีผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 สูงที่สุด เช่นเดียวกับแปลงทดลองที่ 2 ศวพ. นครสวรรค์ (ดินทราย) กรรมวิธีทดลองที่ 6 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 9.75-7.5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 25%) มีผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 สูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อมีการใส่ปุ๋ยถึงระดับสูงตามคำแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน ปริมาณไนโตรเจนและธาตุอาหารอื่นๆ มักเพียงพอต่อความต้องการของข้าวโพดแล้ว ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ จึงไม่ตอบสนองทั้งการตรึงไนโตรเจนและการดูดใช้ธาตุอาหารอื่นๆ แต่เมื่อมีการลดการใช้ปุ๋ย N-P-K ลง 25% และ 50% มีผลทำให้น้ำหนักฝักสดทั้งเปลือกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ชี้ให้เห็นว่าปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยเคมี และมีการให้ไนโตรเจนบางส่วนกับข้าวโพดจากการตรึงไนโตรเจนแบบอิสระและช่วยเพิ่มการดูดธาตุอาหารด้วยการเพิ่มปริมาณรากจากการผลิต IAA ของจุลินทรีย์ จึงทำให้ไม่มีความแตกต่างกันกับการใช้ปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดินเพียงอย่างเดียว (กอบเกียรติและคณะ, 2551; Tangchum and Meunchang, 1992; Fulchieri and Frioni,1994; Meunchang *et al.,* 2012 และ Prongjunthuek *et al.,* 2012)

4. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ

ผลการวิเคราะห์ผลตอบแทนของการลงทุนโดยการวิเคราะห์หาอัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (VCR) ในแปลงทดลองดินร่วนเหนียวให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจต่ำกว่าค่าวิกฤต (2.0) ดังตารางที่ 4 และในแปลงทดลองดินร่วนปนทราย กรรมวิธีที่ใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพียงอย่างเดียวในการปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ให้ผลตอบแทนส่วนเพิ่มดีที่สุด 110.63 ส่วนกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดินเพียงอย่างเดียวให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ 3.04 และกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 6.5-5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 50%) ให้ผลตอบแทนส่วนเพิ่มใกล้เคียงกัน คือ 3.44 (ตารางที่ 4)

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองในปี 2556 ในแปลงทดลองดินร่วนปนทรายการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพียงอย่างเดียวให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่สูงกว่า และมีแนวโน้มว่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ประมาณ 50% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดินของกรมวิชาการเกษตร (2548) ส่วนในแปลงทดลองดินร่วนเหนียวมีแนวโน้มว่าสามารถลดการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน และโพแทสเซียมได้ประมาณ 25% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดินของกรมวิชาการเกษตร (2548)

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 121 หน้า

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ อัจฉรา นันทกิจ สมปอง หมื่นแจ้ง และไพโรจน์ พันธุ์พฤกษ์. 2551. การใช้ปุ๋ย อินทรีย์ ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยชีวภาพกับการผลิตข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 2 ในชุดดินวังสะพุง. วารสารวิชาการเกษตร 26:1. มกราคม – เมษายน. หน้า 82-90.

Fulchieri, M. and L. Frioni, 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): Effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biol. Biochem. 26: 921-923.

Meunchang, P., Thongra-ar, P. and K. Prongjunthuek, 2012. PGPR biofertilizer research, development and utilization in integrated soil fertility management on some economic crops production in Thailand. Proceeding of The 2nd Asain Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 28-31 October. Phuket, Thailand.

Prongjunthuek. K., Arreerak, S., Yenoum, W., Meunchang, S., Thongra-ar, P. and S. Kernoon, 2012. Study on effectiveness of PGPR on cost decreasing, quality and quantity increasing of forage corn yield. Proceeding of The 2nd Asain Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 28-31 October. Phuket, Thailand.

Tangchum, B. and S. Meunchang, 1992. Association between non-symbiotic nitrogen- fixing Bacteria with nitrogen fertilizer rates to nitrogen fixation and growth of corn, rice and sorghum in field growing. Proceeding of soil science division symposium 1992. Department of Agriculture, Bangkok.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. ผลวิเคราะห์ดินก่อนปลูกแปลงทดลองข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ศวร.นครสวรรค์ และศวพ.นครสวรรค์

ตัวอย่าง	pH (water 1:1)	อินทรียวัตถุ (%)	ฟอสฟอรัส (Bray II-P มก./กก.)	โพแทสเซียมที่สกัดได้ (มก./กก.)
แปลงที่ 1 ศวร.นครสวรรค์				
0-20 ซม.	5.65	1.37	11	180
แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์				
0-20 ซม.	5.62	1.67	14	146

ตารางที่ 2. ความสูงเมื่ออายุ 30 60 วัน และวันเก็บเกี่ยว ของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 (เซนติเมตร) เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วันร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน

กรรมวิธี	แปลงที่ 1 ศวร.นครสวรรค์ (ดินร่วนเหนียว)			แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย)		
	30 วัน	60 วัน	119 วัน	30 วัน	60 วัน	113 วัน
1	59.0 a	164.1 a	164.1 a	19.7 a	132.2 a	132.2 a
2	59.0 a	143.6 a	143.6 a	20.6 a	140.4 a	140.4 a
3	58.2 a	156.6 a	156.6 a	18.1 a	146.0 a	146.0 a
4	58.5 a	157.0 a	157.0 a	16.6 a	118.2 a	118.2 a
5	62.0 a	152.7 a	152.7 a	15.6 a	125.2 a	125.2 a
6	62.3 a	156.6 a	156.6 a	22.0 a	144.8 a	144.8 a
7	60.2 a	157.9 a	157.9 a	19.0 a	132.7 a	132.7 a
CV (%)	9.69	8.55	8.55	25.88	26.82	26.82

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 3. น้ำหนักต้นสด น้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วันร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน

ตำรับทดลอง	แปลงที่ 1 ศวร.นครสวรรค์ (ดินเหนียว)				แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินทราย)			
	น้ำหนักต้นสด	น้ำหนักฝักสด	น้ำหนักเมล็ด	น้ำหนัก 100 เมล็ด	น้ำหนักต้นสด	น้ำหนักฝักสด	น้ำหนักเมล็ด	น้ำหนัก 100 เมล็ด
		กก/ไร่		กรัม		กก/ไร่		กรัม
1	1,345 a	1,059 a	850 a	30.49 a	570 a	403 a	329 a	23.14 a
2	1,324 a	1,048 a	835 a	29.54 a	1,185 a	906 a	742 a	26.82 a
3	1,344 a	1,045 a	833 a	31.97 a	928 a	759 a	624 a	27.60 a
4	1,398 a	1,048 a	836 a	28.89 a	759 a	627 a	511 a	26.98 a
5	1,450 a	874 a	693 a	30.33 a	1,036 a	768 a	628 a	26.95 a
6	1,560 a	1,187 a	951 a	31.41 a	1,354 a	963 a	653 a	29.46 a
7	1,390 a	1,058 a	849 a	29.84 a	901 a	680 a	572 a	26.44 a
CV (%)	15.39	13.48	13.78	6.81	30.77	28.69	31.01	10.26

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วัน ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน

ตำรับทดลอง	แปลงที่ 1 ศวร.นครสวรรค์ (ดินร่วนเหนียว)					แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย)				
	ผลผลิต	ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น	รายได้ที่เพิ่มขึ้น[1/]	ราคาปุ๋ย[2/]	ผลตอบแทน[3/]	ผลผลิต	ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น	รายได้ที่เพิ่มขึ้น[1/]	ราคาปุ๋ย[2/]	ผลตอบแทน[3/]
	กก/ไร่		บาท		VCR	กก/ไร่		บาท		VCR
1	850	0.00	0.00	0.00	0.00	329	0.00	0.00	0.00	0.00
2	835	-15.00	-112.50	1,058.78	-0.11	742	413.00	3,097.50	1,018.87	3.04
3	833	-17.00	-127.50	20.00	-6.38	624	295.00	2,212.50	20.00	110.63
4	836	-14.00	-105.00	520.00	-0.20	511	182.00	1,365.00	520.00	2.63
5	693	-157.00	-1,177.50	1,078.78	-1.09	628	299.00	2,242.50	1,038.87	2.16
6	951	101.00	757.50	814.09	0.93	653	324.00	2,430.00	784.15	3.10
7	849	-1.00	-7.50	549.39	-0.01	572	243.00	1,822.50	529.43	3.44

หมายเหตุ :

[1/]ราคาเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ความชื้น 14.5% ราคา 8,000 บาท/ตัน

[2/]ราคาปุ๋ยเคมี ดังนี้ 46-0-0 กก.ละ 18.36 บาท 15-15-15 กก.ละ 20 บาท และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วัน ถุงละ 20 บาท (อัตราการใช้ คลุกเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูก 1 ถุงต่อไร่)

[3/]อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR) VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัด ระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ระดับ 2.0

การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิตข้าวโพดฝักสด

Study on Effectiveness of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Cost Deceasing, Quality and Quantity, Increasing of sweet corn yield

กัลยกร โปร่งจันทึก ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา ชัชธนพร เกื้อหนุน
นงลักษณ์ ปั้นลาย[1] วีระพงษ์ เย็นอ่วม[2]
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ข้าวโพดหวานเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ มีตลาดรองรับทั้งในประเทศและต่างประเทศ สามารถจำหน่ายได้ทั้งฝักสดและส่งโรงงานเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดหวานมีจำกัดและปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอต่อการบริโภค การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวโพดหวานจึงเป็นสิ่งจำเป็น การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการช่วยเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุน เพิ่มปริมาณ และคุณภาพผลผลิตข้าวโพดหวาน โดยทำการศึกษาในข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 ในแปลงทดลองศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์ (ศวพ.นครสวรรค์) (ดินร่วนปนทราย อินทรียวัตถุต่ำ และขาดฟอสฟอรัส) และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี(ศวพ.ลพบุรี) (ดินร่วนปนเหนียวมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูง และไม่จำเป็นต้องใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสเพิ่ม) วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้ 1) ไม่ใส่ปุ๋ย 2) ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน 3) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ 4) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา ลด N 100% ของปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 5) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ 6) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา ลด N-P_2O_5-K_2O 25% ของปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ และ 7) ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา ลด N-P_2O_5-K_2O 50% ของปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำ จากผลการทดลองพบว่า แปลงทดลอง ศวพ.ลพบุรี กรรมวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สามารถลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและโพแทสเซียมได้ 25% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ ส่วนแปลงทดลอง ศวพ.นครสวรรค์ มีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน คือ กรรมวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีแนวโน้มว่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ 50% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน

---

[1]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี
[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์

คำนำ

ข้าวโพดหวานเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากมีอายุเก็บเกี่ยวสั้น มีตลาดรองรับทั้งในประเทศและต่างประเทศ สามารถจำหน่ายได้ทั้งฝักสดและส่งโรงงานเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ข้าวโพดหวานมีคุณประโยชน์มากมาย นอกจากจะใช้รับประทานเป็นผักสดแล้ว ยังสามารถนำไปแปรรูปได้หลายรูปแบบ เช่น ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องทั้งฝัก หรือบรรจุกระป๋องเฉพาะเมล็ด ทำครีมข้าวโพดหวาน ข้าวโพดแช่แข็ง ซึ่งผลิตภัณฑ์ต่างๆ เหล่านี้สามารถส่งไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีน และกลุ่มประเทศในแถบยุโรป ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดหวานมีจำกัดและปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอต่อการบริโภคพื้นที่เพาะปลูกสำคัญอยู่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคกลาง ถึงแม้ว่าเกษตรกรนิยมการเพาะปลูกข้าวโพดหวานเป็นจำนวนมากแต่ก็ยังต้องเผชิญกับปัญหาต่างๆ เช่น ผลผลิตต่ำ ต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นเพราะว่าปัจจัยการผลิต เช่น ปุ๋ย สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืชและศัตรูพืชมีราคาแพง และปัญหาคุณภาพของผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน ทำให้กำไรที่ได้จากการเพาะปลูกข้าวโพดหวานของเกษตรกรลดลง เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปปลูกพืชอื่นๆ ทดแทน เช่น อ้อย มันสำปะหลัง เป็นต้น จึงเป็นสาเหตุทำให้พื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตข้าวโพดหวานมีแนวโน้มลดลง การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตข้าวโพดหวานจึงเป็นสิ่งจำเป็น การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในการช่วยเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนการผลิตจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ต่อการลดต้นทุนเพิ่มปริมาณ และคุณภาพผลผลิตข้าวโพดหวาน

วิธีดำเนินการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3
2. ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์
3. ปุ๋ยเคมี

วิธีการ

ก่อนดำเนินการทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างดินในแปลงทดลองทั้งสองแห่ง วิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการ ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัส (Bray-II) และโพแทสเซียมที่สกัดได้ (ตารางที่ 1) เพื่อคำนวณอัตราปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดินของกรมวิชาการเกษตร (2548) และใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์คลุกเมล็ด ซึ่งประกอบด้วย *Azospirillum* 1x10^8 Cell/g, *Beijerinckia* 1x10^6 CFU/g, *Azotobacter* 1x10^6 CFU/g

แปลงที่ 1 ศวพ.ลพบุรี [ดินร่วนเหนียว]

วางแผนการทดลองแบบ RCBD รวม 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 20-0-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (อัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน)

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 20-0-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 15-0-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O

กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 10-0-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 5-0-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

ทำการปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 และใส่ปุ๋ยรองพื้น เมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม 2556 ขนาดแปลงทดลอง 6x5 ตร.ม. ระยะปลูก 0.75x0.25 ตร.ม. แปลงละ 8 แถวๆ ละ 20 หลุมๆ 1 ต้น ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้น เมื่ออายุ 7 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรียเป็นปุ๋ยแต่งหน้าเมื่ออายุ 30 วัน พร้อมพูนโคนและกำจัดวัชพืช ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 6 สิงหาคม 2556 อายุ 69 วันหลังปลูก

แปลงที่ 2 ศวพ. นครสวรรค์ [ดินร่วนปนทราย]

วางแผนการทดลองแบบ RCBD รวม 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ปุ๋ย

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ปุ๋ย 30-10-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$ (อัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน)

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 0-10-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 30-10-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

กรรมวิธีที่ 6 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 22.5-7.5-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ย 15-5-0 กก./ไร่ $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$

ทำการปลูกโดยข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 และใส่ปุ๋ยรองพื้น เมื่อวันที่ 28 พฤษภาคม 2556 ขนาดแปลงทดลอง 6x5 ม.^{2} ระยะปลูก 0.75x0.25 ม.^{2} ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้น เมื่ออายุ 7 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรียเป็นปุ๋ยแต่งหน้าเมื่ออายุ 30 วัน พร้อมพูนโคนและกำจัดวัชพืช ทำการเก็บเกี่ยวเมื่อวันที่ 7 สิงหาคม 2556 อายุ 71 วันหลังปลูก

ระยะเวลา : เริ่มต้น 2554 สิ้นสุด 2558 รวม 5 ปี

สถานที่ทำการทดลอง : ณ กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี จังหวัดลพบุรี

ผลการทดลอง

1. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน

ผลวิเคราะห์ดินที่ระดับ 0-20 ซม. ในแปลงทดลองที่ 1 ศวพ. ลพบุรี เนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียว (clay loam) มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ประกอบด้วย อินทรียวัตถุ 1.51% ความเป็นกรด-ด่าง 7.36 ฟอสฟอรัส (Bray-II) 248 มก./กก. โพแทสเซียม 155 มก./กก. (ตารางที่ 1) อัตราปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ที่ใช้ในการทดลองนี้ อัตรา 20-0-0 กก. $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$/ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548) และในแปลงทดลองที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ เนื้อดินเป็นดินร่วนทราย (sandy loam) มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ประกอบด้วย อินทรียวัตถุ 1.05% ความเป็นกรด-ด่าง 5.8 ฟอสฟอรัส (Bray-II) 11 มก./กก. โพแทสเซียม 140 มก./กก. (ตารางที่ 1) อัตราปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ที่ใช้ในการทดลองนี้ อัตรา 30-10-0 กก. $N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$/ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

2. ความสูง

จากตารางที่ 2 พบว่าต้นข้าวโพดในแปลงทดลองดินร่วนเหนียวทุกกรรมวิธีมีค่าเฉลี่ยความสูงที่ทั้งสองระยะสูงกว่าทุกกรรมวิธีในแปลงทดลองดินร่วนปนทราย โดยในแปลงทดลองดินร่วนเหนียว (ศวพ.ลพบุรี) พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดินอย่างเดียว (20-0-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O) มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นข้าวโพด ณ วันเก็บเกี่ยวสูงที่สุด 189.0 ซม. และใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราอื่นๆ รวมไปถึงกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ย (181.6 ซม.) และทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าในแปลงทดลองดินร่วนปนทราย (ศวพ.นครสวรรค์) กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดินเพียงอย่างเดียว (30-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O) มีค่าเฉลี่ยความสูงต้นข้าวโพดสูงที่สุด 163.9 ซม. (ตารางที่ 2) ซึ่งใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 22.5-7.5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 25%) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับผลการทดลองของเทียนชัย (2537) ที่รายงานว่า การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนทำให้ความสูงของต้นข้าวโพด เมื่ออายุ 60 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

3. น้ำหนักฝักรวมเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก ความยาวส่วนติดเมล็ด ความยาวฝัก และเปอร์เซ็นต์ความหวาน

จากตารางที่ 3 พบว่า แปลงทดลองที่ 1 ศวพ.ลพบุรี (ดินร่วนเหนียว) ข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 มีน้ำหนักฝักรวมเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก ความยาวฝักส่วนติดเมล็ด และความยาวฝักสูงกว่าแปลงทดลองที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดิน (30-10-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความหวานสูงที่สุด คือ 15.6 % brix และทุกกรรมวิธีมีค่าเปอร์เซ็นต์ความหวานแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนแปลงทดลองที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย) ข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 มีน้ำหนักฝักรวมเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก ความยาวฝักส่วนติดเมล็ด และความยาวฝักน้อยกว่าแปลงทดลองที่ 1 ศวพ.ลพบุรี (ดินร่วนเหนียว) แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความหวานสูงกว่าและทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 22.5-7.5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 25%) มีค่าเปอร์เซ็นต์ความหวานสูงที่สุด คือ 17.3% brix นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งสองแปลงทดลองกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดินเพียงอย่างเดียวข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 มีน้ำหนักฝักรวมเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือกสูงที่สุด

4. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ

ผลการวิเคราะห์ผลตอบแทนของการลงทุนโดยการวิเคราะห์หาอัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (VCR) ในแปลงทดลองดินร่วนเหนียว พบว่า กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน 20-0-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O มี VCR สูงที่สุด 6.76 ซึ่งใกล้เคียงกับกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 15-0-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 25%) มีค่า VCR เท่ากับ 6.66 (ตารางที่ 4) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมี สามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีลงได้ 25% โดยที่ผลตอบแทนของการลงทุนใกล้เคียงกับการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราตามค่าวิเคราะห์ดิน ส่วนในแปลงทดลองดินร่วนปนทราย พบว่า กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์เพียงอย่างเดียวมีค่า VCR สูงที่สุด 97.20 รองลงมา คือกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตรา 15-5-0 กก./ไร่ N-P_2O_5-K_2O (ลด N-P-K 50%) 10.53 จากผลการวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจนี้ทำให้เห็นว่าการปุ๋ยชีวภาพพีจี

พีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราลด N-P-K 50% ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยเคมีอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน (ตารางที่ 4)

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองในปี 2556 ทำให้ได้ข้อมูลผลการใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีในอัตราที่เหมาะสม โดยพบว่าในดินร่วนเหนียวที่มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินสูงมากเพียงพอจนไม่ต้องใส่ปุ๋ยฟอสเฟตแล้ว การใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์สามารถลดการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจน และโพแทสเซียมได้ประมาณ 25% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน ส่วนในดินร่วนปนทรายที่มีอินทรียวัตถุต่ำ และฟอสฟอรัสต่ำ การใช้ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์มีแนวโน้มว่าสามารถลดการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ได้ประมาณ 50% ของอัตราแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดินกรมวิชาการเกษตร (2548)

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 121 หน้า

เทียนชัย สุวรรณเวช. 2537. อิทธิพลของจำนวนประชากรและการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของผลผลิตข้าวโพดในดินเหนียวสีดำ. บทคัดย่องานวิจัยประจำปีงบประมาณ 2535-2537 ของคณาจารย์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 92-93.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. ผลวิเคราะห์ดินก่อนปลูกแปลงทดลองข้าวโพดหวาน ปี 2556 ศวพ.ลพบุรี และศวพ.นครสวรรค์

ตัวอย่าง (0-20 ซม.)	pH (water 1:1)	อินทรียวัตถุ (%)	ฟอสฟอรัส (Bray II-P มก./กก.)	โพแทสเซียมที่สกัดได้ (มก./กก.)
แปลงที่ 1 ศวพ.ลพบุรี				
ดินร่วนเหนียว	7.36	1.51	248	155
แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์				
ดินร่วนปนทราย	5.8	1.05	11	140

ตารางที่ 2. ความสูงของข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน

กรรมวิธีทดลอง	แปลงที่ 1 ศวพ.ลพบุรี (ดินร่วนเหนียว)		แปลงที่ 1 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย)	
	30 วัน	69 วัน	30 วัน	71 วัน
1	83.3 ab	181.6 ab	19.4 ab	99.8 c
2	92.7 a	184.7 a	30.6 a	163.9 a
3	82.9 b	173.5 b	20.5 c	124.2 b
4	92.0 ab	189.0 a	21.2 c	125.2 b
5	91.8 ab	187.5 a	19.8 c	142.8 ab
6	89.7 ab	186.0 a	27.1 ab	156.6 a
7	88.2 ab	179.7 ab	24.3 bc	142.9 ab
CV (%)	6.54	3.65	12.54	8.79

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 3. น้ำหนักฝักรวมเปลือก น้ำหนักฝักสดปอกเปลือก และความยาวส่วนติดเมล็ดของข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน

ตำรับทดลอง	แปลงที่ 1 ศวพ.ลพบุรี (ดินร่วนเหนียว)					แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย)				
	น้ำหนักฝักรวมเปลือก	น้ำหนักฝักสด	ความยาวฝักส่วนติดเมล็ด	ความยาวฝัก	ความหวาน	น้ำหนักฝักรวมเปลือก	น้ำหนักฝักสด	ความยาวฝักส่วนติดเมล็ด	ความยาวฝัก	ความหวาน
	กก/ไร่		เซ็นติเมตร		% Brix	กก/ไร่		เซ็นติเมตร		% Brix
1	3,787 a	2,649 a	17.53 a	54.78 a	13.8 cd	516 b	667 b	8.90 c	32.67 c	14.7 c
2	4,462 a	3,062 a	18.14 a	55.90 a	14.8 abc	1,920 a	1,517 a	17.47 a	49.13 a	15.1 bc
3	3,533 a	2,418 a	17.61 a	54.45 a	15.3 ab	759 b	545 b	11.46 b	40.17 b	16.2 ab
4	4,253 a	2,706 a	18.12 a	55.90 a	15.6 a	842 b	610 b	12.12 b	39.93 b	15.8 bc
5	4,302 a	2,982 a	18.50 a	54.05 a	14.4 bcd	1,600 a	1,135 a	17.10 a	46.73 a	15.0 bc
6	3,973 a	2,742 a	18.73 a	56.63 a	15.0 ab	1,879 a	1,487 a	18.10 a	49.30 a	17.3 a
7	3,858 a	2,618 a	17.93 a	54.83 a	13.6 d	1,659 a	1,319 a	16.53 a	48.00 a	16.0 abc
CV (%)	12.51	15.53	4.59	4.57	4.54	17.66	21.06	9.78	6.67	4.75

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4. ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจของข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 เมื่อใส่ปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วันร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างกัน

ตำรับทดลอง	แปลงที่ 1 ศวพ.ลพบุรี (ดินร่วนเหนียว)					แปลงที่ 2 ศวพ.นครสวรรค์ (ดินร่วนปนทราย)				
	ผลผลิต	ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น	รายได้ที่เพิ่มขึ้น[1/]	ราคาปุ๋ย[2/]	ผลตอบแทน[3/]	ผลผลิต	ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น	รายได้ที่เพิ่มขึ้น[1/]	ราคาปุ๋ย[2/]	ผลตอบแทน[3/]
	กก/ไร่		บาท		VCR	กก/ไร่		บาท		VCR
1	3,787	0.00	0.00	0.00	0.00	516	0.00	0.00	0.00	0.00
2	4,462	675.00	5,400.00	798.26	6.76	1,920	1,404.00	11,232.00	1,697.39	6.62
3	3,533	-254.00	-2,032.00	20.00	-101.60	759	243.00	1,944.00	20.00	97.20
4	4,253	466.00	3,728.00	818.26	4.56	842	326.00	2,608.00	520.00	5.02
5	4,302	515.00	4,120.00	618.70	6.66	1,600	1,084.00	8,672.00	1,717.39	5.05
6	3,973	186.00	1,488.00	419.13	3.55	1,879	1,363.00	10,904.00	1,293.04	8.43
7	3,858	71.00	568.00	219.57	2.59	1,659	1,143.00	9,144.00	868.70	10.53

[1/]ราคาฝักสดทั้งเปลือกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริกซ์ 3 ราคา 8,000 บาทต่อตัน (ราคาที่เกษตรกรขายได้ในพื้นที่ จังหวัดนครสวรรค์และลพบุรี ตุลาคม 2556)

[2/]ราคาปุ๋ยเคมี ดังนี้ 46-0-0 กก.ละ 18.36 บาท และ 0-40-0 กก.ละ 20 บาท และปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วันถุงละ 20 บาท (อัตราการใช้ คลุกเมล็ดข้าวโพดก่อนปลูก 1 ถุงต่อไร่)

[3/]อัตราส่วนระหว่างรายได้จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย (Value to Cost Ratio, VCR)

VCR = (รายได้ที่เพิ่มขึ้นจากการใส่ปุ๋ย/รายจ่ายจากการใส่ปุ๋ย) สำหรับเกษตรกรที่มีทุนจำกัด ระดับค่าวิกฤตอยู่ที่ระดับ 2.0

การคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ

Selection of suitable carriers without contaminate for new PGPR biofertilizer

กัลยกร โปร่งจันทึก ภัสชญภณ หมื่นแจ้ง ประไพ ทองระอา จินดารัตน์ ชื่นรุ่ง พีรพงษ์ เชาวนพงษ์
กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ดินพีทเป็นวัสดุที่มีการนำมาใช้เป็นวัสดุพา (carrier) ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพอย่างแพร่หลาย แต่ในปัจจุบันดินพีทมีราคาแพงและหายาก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวัสดุพาที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้ผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ น้อย ราคาถูก หาง่าย และมีคุณสมบัติใกล้เคียงดินพีท ผลการทดลอง พบว่าปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์อัตราส่วน 1:1 เป็นวัสดุที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์แบบใหม่ เนื่องจากสามารถรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้งสามกลุ่มไว้ได้นานกว่าวัสดุชนิดอื่นและมีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นน้อย อีกทั้งยังมีราคาถูก หาง่ายและยังสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพชนิดอื่นได้

คำนำ

ปัจจุบันปุ๋ยชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่สำหรับการเกษตร นอกจากจะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตแล้วยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย และเมื่อกล่าวถึงปุ๋ยชีวภาพ ทุกคนจะนึกถึงปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ช่วยตรึงไนโตรเจน ละลายฟอสฟอรัส หรือคุณสมบัติอื่นๆ มีลักษณะเป็นผงใช้ในการคลุกเมล็ดหรือใส่ลงในดิน ซึ่งปุ๋ยชีวภาพที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจนหรือจุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในประเทศไทยปุ๋ยชีวภาพแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช หรือปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ซึ่งผลิตและจำหน่ายโดยกรมวิชาการเกษตรเป็นปุ๋ยชีวภาพที่ประกอบด้วยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ทั้งบริเวณดินรอบๆ ราก ผิวราก ภายในราก ต้นและใบพืช แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วยการสร้างธาตุอาหารหรือเพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชบางชนิด ซึ่งมีแบคทีเรียหลายชนิดที่พบว่าอาศัยอยู่ในดิน ราก และต้นพืช (Mehnaz *et al*., 2001) โดยประโยชน์ที่สำคัญของแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่อาศัยอยู่รอบๆ รากพืชเหล่านี้ คือ การตรึงไนโตรเจน (Meunchang *et al*., 2004) ผลิตฮอร์โมนสำหรับพืช เช่น indole acetic acid (IAA) (Boddey *et al*., 1995 และ Meunchang *et al*., 2004) ทั้งยังช่วยให้รากมีพื้นที่ผิวมากขึ้นส่งผลช่วยให้พืชดูดน้ำและธาตุอาหารได้เพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม (Jacoud *et al*., 1999) ในช่วงแรกของการผลิตปุ๋ยชีวภาพนักวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้ดินพีท ลิกไนต์ ถ่านหิน หรือดินที่มีเนื้อละเอียด เป็นวัสดุพา (carrier) วัสดุเหล่านี้มีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง มีขนาดเล็ก เนื้อละเอียดทำให้มีพื้นที่ผิวมากซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี (Gandhi and Sivakumar, 2010) การผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ให้มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องมีวัสดุพาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

เพื่อให้จุลินทรีย์เป้าหมายสามารถมีปริมาณการรอดชีวิตสูงอย่างยาวนาน โดยทั่วไปวัสดุพาที่ดีควรมีอินทรียวัตถุสูง มีไนโตรเจนเหมาะสม ไม่เป็นพิษกับจุลินทรีย์ ราคาไม่แพง และหาง่าย แม้พีทจะเป็นวัสดุที่ดีแต่ปัจจุบันในประเทศไทยหาได้ยากมาก นักวิจัยจึงมีความพยายามวิจัยเพื่อใช้วัสดุอื่นๆ มาทดแทน เช่น ดินเหนียว มูลสัตว์ ปุ๋ยหมัก และวัสดุอินทรีย์อื่นๆ (Stephens and Rask, 2000) ในประเทศไทยมีวัสดุอินทรีย์ราคาถูกจำนวนมากแต่เมื่อนำมาใช้ในเป็นวัสดุพากับประสบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น และสารพิษที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ด นักวิจัยบางส่วนกล่าวว่าปุ๋ยหมักที่มีการหมักสมบูรณ์มีความเหมาะสำหรับการใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพเพราะสามารถช่วยในการคงจำนวนจุลินทรีย์ได้ดี แต่งานวิจัยที่เกี่ยวกับเรื่องนี้ยังมีน้อย (Gandhi and Sivakumar, 2010) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีความประสงค์จะศึกษาสมบัติของวัสดุเหล่านี้ อย่างละเอียด เพื่อหาวัสดุที่เหมาะสมสำหรับคัดเลือกเป็นวัสดุพาสำหรับผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ปลอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วัน ประกอบด้วย *Azospirillum* sp. *Azotobacter* sp. และ *Beijerinkia* sp.

2. วัสดุพาที่ทำการศึกษา ได้แก่

   1) ดินเหนียวชุดองครักษ์
   2) ซีโอไลต์ผง
   3) ดินเหนียวชุดองครักษ์ + ถ่านบดละเอียด (2:1 โดยปริมาตร)
   4) ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด
   5) ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด
   6) ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)
   7) ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)
   8) ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)
   9) ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)

3. อุปกรณ์เครื่องแก้วและสารเคมีที่จำเป็นในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการ

1. ศึกษาสมบัติทางเคมี และฟิสิกส์บางประการของวัสดุพา

นำวัสดุไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร นำมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมด ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และค่าการนำไฟฟ้าของวัสดุ (EC) วิเคราะห์สมบัติทางฟิสิกส์ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ความหนาแน่น (bulk density) ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) และปริมาณน้ำที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ (Plant available water)

2. ทดสอบดัชนีการงอก (Germination Index) ของวัสดุพา

ทำการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน โดยใช้เมล็ดพันธุ์กวางตุ้ง และทำการเพาะเมล็ดเป็นเวลา 2 วัน

3. ทำการคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับดินพีทจากผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ฟิสิกส์และดัชนีการงอก ได้วัสดุพาที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงดินพีทจำนวน 4 ชนิด ได้แก่

1) ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)
2) ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)
3) ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)
4) ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)

4. ทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ในวัสดุพา

ได้ทำการทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียในวัสดุพา โดยใช้วัสดุพา 2 แบบ คือ นึ่งฆ่าเชื้อและไม่นึ่งฆ่าเชื้อ นำวัสดุพาทั้ง 4 ชนิด ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดด้วยเครื่องบดละเอียดแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร บรรจุในถุงพลาสติกโพลิเอทธิลีนปริมาณ 200 กรัม โดยส่วนหนึ่งทำการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์-วัน ซึ่งประกอบด้วย *Azospirillum* sp. *Azotobacter* sp. และ *Beijerinkia* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว โดยเขย่าที่ความเร็ว 125 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน หรือได้เซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับ *Azospirillum* sp. และ *Azotobacter* sp. ส่วน *Beijerinkia* sp. ใช้เวลา 4-5 วัน หรือได้เซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใส่เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในวัสดุพาผสมเข้ากันให้ความชื้นเทียบเท่า 50–60 Water holding capacity เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทดสอบบนอาหารแบบวุ้นแข็งภายหลังเก็บรักษาเป็นเวลา 1 2 3 4 8 และ 12 สัปดาห์

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554- กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการของวัสดุพา พบว่า pH ที่อัตราส่วนระหว่างน้ำต่อวัสดุพา 1:1 มีค่าอยู่ระหว่าง 4.38 – 9.20 ที่อัตราส่วน 1:5 มีค่าอยู่ระหว่าง 4.47 – 9.79 และที่อัตราส่วน 1:10 มีค่าอยู่ระหว่าง 4.55 – 9.88 โดยถ่านบดมีค่า pH สูงที่สุดทั้งสามอัตราส่วน (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่า ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดมีปริมาณอินทรียวัตถุ อินทรีย์คาร์บอน ฟอสฟอรัสทั้งหมด และค่าการนำไฟฟ้าสูงที่สุด ดังตารางที่ 2 แต่ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงสุด คือ 1.50% และถ่านบดมีปริมาณโพแทสเซียมทั้งหมดสูงที่สุด 3.08 % (ตารางที่ 2) เมื่อศึกษาสมบัติทางฟิสิกส์บางประการของวัสดุพา พบว่า ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์มีความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ที่ระดับ 31.1 kPa ซึ่งเป็นระดับความชื้นที่ความจุสนาม (Field capacity) สูงที่สุด คือ 62% รองลงมาคือปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสม

ซีโอไลต์ผง 60.90% ส่วนปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดผสมซีโอไลต์ผงมีค่าปริมาณน้ำที่พืชสามารถนำไปใช้ได้สูงที่สุด 8.88% (ตารางที่ 3) ดัชนีการงอกของวัสดุพาเป็นตัวบ่งชี้ถึงการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยหมักและยังสามารถบอกได้ว่าในวัสดุต่างๆ มีสารพิษที่มีผลต่อการงอกของเมล็ดหรือไม่โดยเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น จากตารางที่ 4 พบว่าปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดมีค่าดัชนีการงอกสูงที่สุด คือ 310.11 และซีโอไลต์ผงมีค่าดัชนีการงอกต่ำที่สุด คือ 86.57 ซึ่งหมายความว่าปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผ่านการหมักที่สมบูรณ์และไม่มีสารพิษที่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ส่วนซีโอไลต์ผงมีสารพิษเพียงเล็กน้อยที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ด ผลการวิเคราะห์สมบัติดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถคัดเลือกวัสดุพาที่มีคุณสมบัติเหมาะสมได้ 4 ชนิด คือ ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์ ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมซีโอไลต์ผง ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์ และปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดผสมซีโอไลต์ผง

ผลการทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์หลังการเก็บรักษาที่อายุต่างๆ ในวัสดุพาทั้ง 2 แบบ ปรากฏว่า แบคทีเรียทั้งสามกลุ่มมีแนวโน้มการเจริญเติบโตในวัสดุพาทั้ง 4 ชนิด ในวัสดุนึ่งฆ่าเชื้อและไม่นึ่งฆ่าเชื้อเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีจำนวนลดลงจากสัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 12 โดยในวัสดุพาแบบนึ่งฆ่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Azospirillum* มีจำนวนการรอดชีวิตในปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์มากที่สุด (กราฟที่ 1(ก)) ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่ม *Azotobacter* และ *Beijerinkia* มีจำนวนการรอดชีวิตในปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์มากที่สุด (กราฟที่ 2(ก) และ 3(ก)) ส่วนในวัสดุพาที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Azospirillum* และ *Azotobacter* มีจำนวนการรอดชีวิตในปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์มากที่สุด (กราฟที่ 1(ข) และ 2(ข)) และแบคทีเรียกลุ่ม *Beijerinkia* มีจำนวนการรอดชีวิตในปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์มากที่สุดดังกราฟที่ 3(ข) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Azospirillum* และ *Azotobacter* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียดผสมซีโอไลต์ผงทั้ง 2 แบบ ดังนั้น ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์จึงเป็นวัสดุที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ เนื่องจากสามารถรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ ทั้งสามกลุ่มไว้ได้นานและมีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ น้อย

ตารางที่ 1. ค่าความเป็นกรด-ด่างของวัสดุต่างๆ

วัสดุพา	pH (น้ำ : วัสดุ)		
	1 : 1	1 : 5	1 : 10
ดินเหนียวชุดองครักษ์	4.38	4.47	4.55
ซีโอไลต์ผง	6.52	6.59	6.88
ดินเหนียวชุดองครักษ์ + ถ่านบดละเอียด (2:1 โดยปริมาตร)	6.46	6.56	7.27
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด	7.64	7.78	7.75
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด	7.55	7.89	8.12
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)	6.62	6.99	7.20
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)	7.35	7.82	7.80
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)	6.80	7.05	7.23
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)	7.13	7.65	7.50
ถ่านบด	9.20	9.79	9.88

ตารางที่ 2. คุณสมบัติทางเคมีของวัสดุต่างๆ

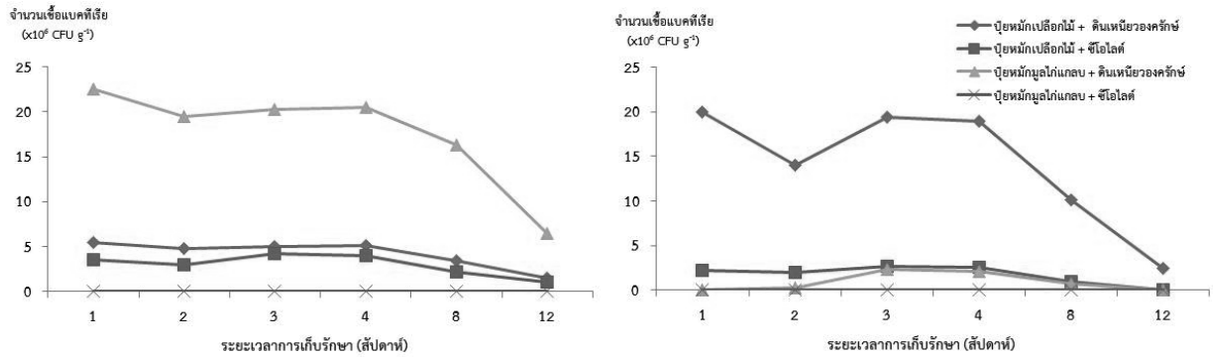
วัสดุพา	EC (dS/m)	OC (%)	OM (%)	Total N (%)	Total P (%)	Total K (%)
ดินเหนียวชุดองครักษ์	0.763	3.49	6.02	0.41	0.18	1.19
ซีโอไลต์ผง	0.037	2.04	3.51	0.08	0.00	0.69
ดินเหนียวชุดองครักษ์ + ถ่านบดละเอียด (2:1 โดยปริมาตร)	0.987	7.78	13.42	0.29	0.22	1.48
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด	2.040	22.01	37.94	1.50	0.70	0.40
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด	5.130	33.30	57.41	1.39	1.66	2.32
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)	1.380	12.22	21.06	0.77	0.44	0.84
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)	0.978	9.38	16.18	0.69	0.34	0.70
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)	2.890	17.88	30.83	0.93	0.83	1.71
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)	2.230	14.96	25.79	0.71	0.72	1.45
ถ่านบด	2.590	5.31	9.16	0.55	0.30	3.08

ตารางที่ 3. คุณสมบัติทางฟิสิกส์ของวัสดุต่างๆ

วัสดุพา	Moisture content (%wt)	Bulk density (g/cm^3)	Water holding capacity (%Vol.)							Plant Available water (%Vol.)
			Tension (kPa)							
			0.1	1	3.1	9.8	31.1	98.1	1,569.60	
ดินเหนียวชุดองครักษ์	6.13	1.1	63.33	55.72	53.01	51.21	48.6	47.91	45.59	3.01
ซีโอไลต์ผง	5.11	0.9	51.85	46.79	45.71	45.16	43.6	43.1	41.11	2.49
ดินเหนียวชุดองครักษ์ + ถ่านบดละเอียด (2:1)	6.86	0.8	60.45	52.73	51.39	48.92	46.6	45.89	44.81	1.79
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด	18.25	0.7	82.5	78.17	73.87	70.67	66	62.26	58.79	7.21
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด	17.57	0.4	69.37	46.79	44.97	42.47	41.7	41.25	41.11	0.59
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1)	10.25	0.9	75.9	72.02	69.46	65.06	62	58.18	54.93	7.07
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1)	8.02	0.8	72.75	68.92	67.14	63.6	60.9	56.95	52.02	8.88
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1)	10.28	0.7	61.77	50.57	49.24	45.1	42.6	42.06	41.22	1.38
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1)	9.75	0.7	63.48	51.33	49.78	46.35	46	45.5	44.13	1.87
ถ่านบด	6.37	0.3	54.76	45.29	44.51	43.76	43.6	43.35	42.44	1.16

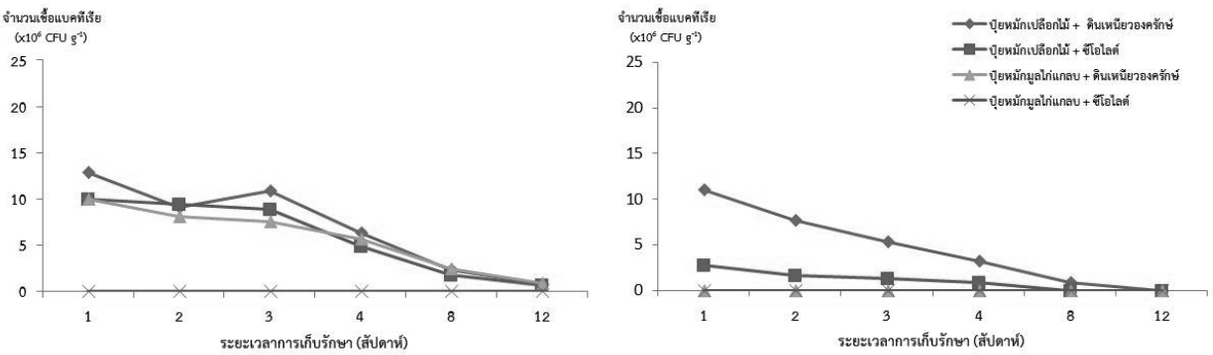
ตารางที่ 4 ดัชนีการงอก (Germination Index: GI) ของวัสดุต่างๆ

วัสดุพา	GI (%)
ดินเหนียวชุดองครักษ์	95.88
ซีโอไลต์ผง	86.57
ดินเหนียวชุดองครักษ์ + ถ่านบดละเอียด (2:1 โดยปริมาตร)	172.00
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด	347.80
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด	196.10
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)	174.50
ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)	120.50
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ดินเหนียวชุดองครักษ์ (1:1 โดยปริมาตร)	151.50
ปุ๋ยหมักมูลไก่แกลบบดละเอียด + ซีโอไลต์ผง (1:1 โดยปริมาตร)	164.50
ถ่านบด	149.10



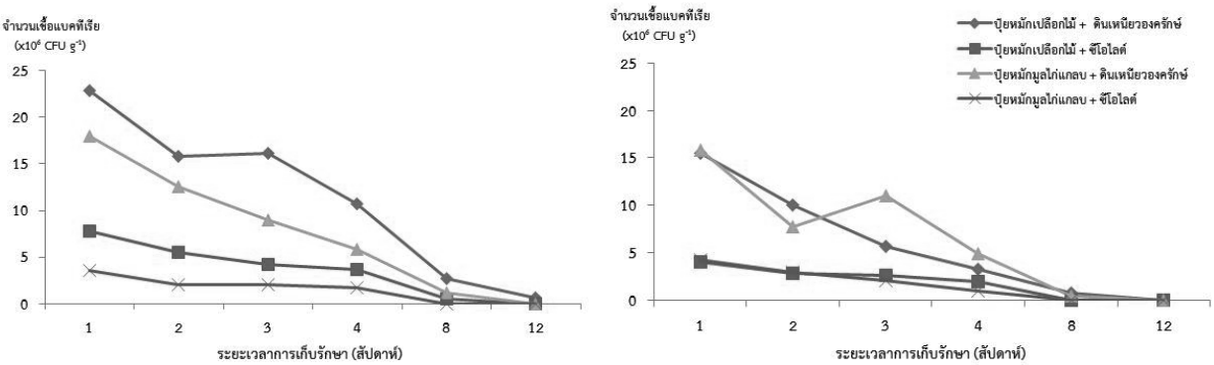
(ก) นึ่งฆ่าเชื้อ **(ข) ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ**

กราฟที่ 1. แสดงจำนวนการอยู่รอดของแบคทีเรียกลุ่ม *Azospirillum* ในวัสดุพาชนิดต่างๆ



(ก) นึ่งฆ่าเชื้อ **(ข) ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ**

กราฟที่ 2. แสดงจำนวนการอยู่รอดของแบคทีเรียกลุ่ม *Azotobacter* ในวัสดุพาชนิดต่างๆ



(ก) นึ่งฆ่าเชื้อ **(ข) ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ**

กราฟที่ 3. แสดงจำนวนการอยู่รอดของแบคทีเรียกลุ่ม *Beijerinckia* ในวัสดุพาชนิดต่างๆ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์จึงเป็นวัสดุที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ เนื่องจากสามารถรักษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์ทั้งสามกลุ่มไว้ได้นาน อีกทั้งยังเป็นวัสดุที่หาง่าย ราคาถูก และบดเป็นผงได้ละเอียด

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำปุ๋ยหมักเปลือกไม้บดละเอียดผสมดินเหนียวชุดองครักษ์ไปวิจัยและพัฒนาต่อในด้านอื่นๆ เช่น สัดส่วนที่ใช้ การนำไปผสมกับวัสดุอื่นเพิ่มเติม และกรรมวิธีการทำให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุพาในการผลิตปุ๋ยชีวภาพพีจีพีอาร์และปุ๋ยชีวภาพชนิดอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

Boddey, R. M., Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Reis, V. M., Olivares, F. S., Baldani, V. L. D., and J. Dobereiner, 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil., 174, 195-209

Gandhi, A. and K. Sivakumar, 2010. Impact of vermicompost carrier based bioinoculants on the growth, yield and quality of rice (*Oryza sativa L.*) c.v. NLR 145. The Ecoscan 4(1) : 83-88.

Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux and R. Bally, 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. J. Microb., 45: 339-342.

Mehnaz, S., Mirza, M. S., Huarat, J., Bally. R., Normand, P. and K. A. Malik. 2001. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. *Can J Microbiol* 47: 110–117.

Meunchang, S., Panichsakpatana, S., Ando, S., T. and Yokoyama, 2004. Phylogenetic and physiological Characterization of indigenous *Azospirillum* isolates in Thailand. Soil Sci. Plant Nutr., 50 (3), 413-421.

Stephens, J. H. G. and H.M. Rask. 2000. Inoculant production and formulation. Field crops Research. 65:249-258.

ศึกษาวิธีการผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นแบบเม็ด ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น

Study on Arbuscular Mycorrhiza fungus granular inoculums Production for reduce microbial contamination

มณฑิกานธิ์ สงบจิต

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

วิธีการผลิตราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นแบบเม็ดลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพรูปแบบใหม่ คือ แบบเม็ดซึ่งผลิตด้วยวิธีการตรึงเซลล์ และใช้ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า สกุล *Glomus intraradices* ที่อยู่ในชิ้นรากพืชเป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดมาวัดปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนอาหาร Potato dextrose agar (NA) และบนอาหาร Nutrient agar (PDA) ด้วยวิธี plate count เปรียบเทียบกับการผลิตปุ๋ยชีวภาพในรูปแบบเดิม (แบบผง) พบว่า ชิ้นรากพืชที่ใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 20 กรัม สามารถผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดได้น้ำหนักรวม 125 กรัม เม็ดเจลที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.7 มม.

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในดิน พบว่าดินที่ใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์แบบผงมีการปนเปื้อนเชื้อราบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 3.6×10^5 cfu/g และจำนวนแบคทีเรียบนอาหาร Nutrient agar (NA) โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 5.5×10^5 cfu/g ส่วนผลิตภัณฑ์แบบเม็ดพบมีการปนเปื้อนเชื้อราบนอาหาร PDA โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 4.76×10^3 cfu/g และจำนานแบคทีเรียบนอาหาร NA โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 5.1×10^3 cfu/g

คำนำ

ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าดำรงชีวิตแบบ obligated symbiosis จึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การเพิ่มปริมาณของเชื้อได้จากการใช้สปอร์เลี้ยงในต้นพืชอาศัยเป็นเวลา 4 เดือน ดังนั้นหลังจากปลูกย่อมมีจุลินทรีย์อื่นปะปน การผลิตราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นหัวเชื้อนั้นส่วนใหญ่ใช้สปอร์เลี้ยงในต้นพืชอาศัยซึ่งปลูกในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อมีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นในดิน นำดินนั้นมาตรวจนับปริมาณสปอร์เมื่อได้ปริมาณตามต้องการก็ใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป (Menge, 1983 ; Menge, 1984 ; Schenck and Perez, 1990) ต่อมามีการใช้วัสดุอื่นแทนดิน ได้แก่ เปลือกไม้ พีท เพอร์ไลท์ เวอร์มิคูไลท์ (Biermann and Linderman, 1983) ทราย (Ojala and Jarrell, 1980) แคลซีนมอนท์มอริลโลไนท์เคลย์ (Plenchtte *et al*., 1982) และเอ็กซ์แพนเด็ดเคลย์แอกกรีเกทส์ (Dehne and Backhaus, 1986) นอกจากนี้ยังมีการผลิตหัวเชื้อ Sheared-Root จาก Aeroponic cultures และการผลิตหัวเชื้อโดยอยู่ในรูปเม็ดที่บรรจุชิ้นส่วนของรากพืชที่มีราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าอยู่ภายใน (Strullu and Plenchtte, 1991) ดังนั้นการผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าให้ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นควรจะใช้วิธีการผลิตเป็นแบบเม็ดที่บรรจุชิ้นส่วนของ

รากพืชที่มีราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าอยู่ภายในซึ่งวิธีนี้จะทำให้เส้นใยของราที่อยู่ภายในเม็ดสามารถเจริญต่อไปได้ (Kuek *et al*., 1992) ทำให้ผลิตภัณฑ์แบบเม็ดที่ได้มีประสิทธิภาพในการงอกเข้าสู่พืชได้เร็ว

Jung (1979) เป็นคนแรกที่อธิบายการนำสารพวกโพลิเมอร์มาใช้ประโยชน์ร่วมกับจุลินทรีย์ ต่อมาได้มีการผลิตหัวเชื้อเอคโตไมโคไรซ่าในเฟอเมนเตอร์และใช้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มเส้นใยราด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Le Tacon *et al*., 1985) ใช้ในการผลิตหัวเชื้ออาบัสคูลาไมโคไรซ่า (Strullu and Plenchette, 1990 ; Calvet *et al*.,1996) การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งแวดล้อม และทางด้านการเกษตรอย่างกว้างขวาง (Vassilev and Vassileva,1992 ; Federici, 1993 ; Van Elsas and Heijnen, 1990 ; Cassidy *et al*., 1996; Bashan, 1998; Vassilev *et al*., 2001) เนื่องจากมีคุณสมบัติช่วยให้เกิดลักษณะเหนียวข้น เกิดความคงตัว เป็นสารที่ปลอดภัย ไม่เป็นพิษเหมาะจะใช้ในขั้นตอนของการผลิต (Gemeiner *et al*.,1994)

การตรึงเซลล์ (cell immobilization) คือ การนำเซลล์มายึดติดกับวัสดุใดๆ เพื่อเพิ่มความทนทานของเซลล์ในการใช้งาน และผลผลิตที่ได้ยังมีการปนเปื้อนน้อยลง แบ่งได้ 4 วิธี ดังนี้ 1) การดูดติดผิวทางกายภาพและการยึดติดด้วยประจุ (Physical Adsorption and Ionic Binding) 2) การยึดติดด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent Binding) 3) การเชื่อมแบบไขว้ (Cross-linking) 4) การห่อหุ้ม (Entrapment) (Kok and Hasirci, 2000) ในการวิจัยนี้ใช้การตรึงเซลล์ด้วยวิธี Entrapment แบบ Lattices Type ซึ่งเป็นการห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในช่องสามมิติในเจลของสารพวกโพลิเมอร์ วัสดุที่นิยมใช้ในการตรึงประกอบด้วยพอลิเมอร์จากธรรมชาติหรือสังเคราะห์ เช่น สารประกอบอัลจีเนต สารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

อัลจิเนต (alginate) เป็นสารที่สกัดจากผนังเซลล์ของสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล สกุล *Laminaria* มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วย D-mannuronic acid และ L-guluronic acid อัลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลาย ที่มีไอออนของโลหะ เช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) (Wade and Weller, 1994) การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ทำได้โดยการผสมเซลล์ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตแล้วหยดลงบนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นทันที เทคนิคการห่อหุ้มเซลล์ที่มีชีวิตโดยการใช้แคลเซียมอัลจิเนต มีการใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มและเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นสารสำหรับแต่งอาหาร (Bickerstaff, 1997)

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตปุ๋ยชีวภาพรูปแบบใหม่ โดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ ทำให้ได้ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดและสามารถลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เกิดจากขบวนการผลิตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดข้าวโพด (*Zea mays* L.)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
3. ถ้วยเพาะขนาด 12 ออนซ์
4. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
5. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน

6. ดินผสมทรายอัตรา 1 : 1 นึ่งฆ่าเชื้อ

7. กระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว

8. น้ำยาย้อมราก Trypan Blue Lactic-Glycerol Solution

9. ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าสกุล *Glomus intraradices*

10. ตะแกรงร่อนสปอร์ขนาด 63 - 450 ไมครอน

11. สารเคมีและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง

12. เครื่องปั่นเหวี่ยง ที่มีความเร็วจะไม่ต่ำกว่า 2,000 รอบ/นาที

วิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าสกุล *Glomus intraradices* โดยนำสปอร์ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าสกุล *Glomus intraradices* เพิ่มปริมาณสปอร์ในถ้วยเพาะจำนวน 40 ถ้วย ซึ่งใส่ดินผสมทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วอัตราส่วน 1:1 ความสูงประมาณ 12 ซม. ของถ้วยเพาะ นำเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดเพาะให้งอกก่อนล่วงหน้า 2-3 วัน ใส่ลงในถ้วยเพาะจากนั้นใช้ปิเปตดูดสปอร์จำนวน 100 สปอร์ วางไว้บนเมล็ดข้าวโพด แล้วกลบด้วยดิน รดน้ำเช้าเย็น เมื่ออายุครบ 1 สัปดาห์ จึงย้ายปลูกลงในกระถางดินเผาเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว ซึ่งใช้ดินและทรายผสมกันอัตราส่วน 1:1 เมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 3 เดือน สุ่มเก็บตัวอย่างดินและรากไปตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในดินและการเข้าอาศัยในราก

2. การวัดการเข้าอาศัยในรากด้วยวิธีของ Philips and Hayman (1970) โดยนำตัวอย่างรากมาล้างดินออกแล้วต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดอกไซด์ 10% เพื่อให้รากใสเห็นเซลล์รากได้ชัดเจนขึ้นที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง แล้วย้อมสีรากด้วย trypan blue lactic –glycerol solution ตรวจสอบการเข้าอาศัยในราก โดยตรวจสอบจำนวนเวสสิเคิล เส้นใย และอาบัสคูล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยวิธี slide method (Giovanetti and Mosse, 1980) คัดเลือกเฉพาะกระถางที่พบเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยของ *Glomus intraradices* สูง (>95%) เพื่อนำมาใช้ในการตรึงเซลล์ต่อไป

3. การตรึงเซลล์เพื่อผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด ดัดแปลงจาก Vassilev *et al.* (2001) นำรากปริมาตร 20 กรัม จากกระถางที่คัดเลือกไว้ ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และแช่ในสารละลาย (Tween 80, Karnamycin, Chloramin-T) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดรากพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วผสมชิ้นรากพืชปริมาตร 20 กรัม กับสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 200 มล. แล้วใช้ปิเปตดูดให้หยดลงสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 500 มล. ซึ่งอยู่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มล. โดยกวนผสมที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที อย่างต่อเนื่อง เพื่อแลกเปลี่ยนอิออนให้เกิดเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนต โดยการทำราอาบัสคูลาไมโคไรซ่า แบบเม็ดนี้จะต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เมื่อหยดหมดแล้ว จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ล้างราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 1 ครั้ง กรองแยกด้วยกระแกรงขนาด 2 มล. นำราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดไปตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อน

4. การตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อน ด้วยเทคนิค Pour plate ใช้ตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นหลายๆ ระดับด้วยวิธี Serial dilution โดยนำดิน 10 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 90 มล. จากนั้นเขย่าขวดประมาณ 5 นาที แล้วทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที เพื่อให้ตะกอนของดินตกลงสู่ก้นขวด

ใช้ปิเปตดูดของเหลวปริมาณ 1 มล. ใส่ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 9 มล. ทำการเจือจางต่อไป โดยดูดของเหลวครั้งละ 1 มล. จากขวดที่ทำเจือจางใส่ลงในขวดถัดไป ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนได้ความเจือจางสุดท้ายเป็น 10^{-5} เตรียมจานสำหรับเลี้ยงเชื้อ โดยดูดของเหลวแต่ละระดับการเจือจาง ปริมาณ 1 มล. ใส่ลงในแต่ละจานเพาะเชื้อ แล้วทำการเทอาหารวุ้น PDA ลงไปและหมุนจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน เพื่อนับจำนวนโคโลนี ปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนจากอาหาร PDA เป็น NA นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเลือกนับจานที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวน colony-forming unit (cfu) ต่อ 1 มล. หรือ 1 กรัม

5. นำราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดไปตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อน ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4 โดยเปลี่ยนจากตัวอย่างดินเป็นราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 - กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : ในเรือนกระจกและในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเพิ่มปริมาณราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าสกุล *Glomus intraradices* โดยใช้ข้าวโพดเป็นพืชอาศัย จำนวนทั้งหมด 40 กระถาง พบปริมาณสปอร์มากที่สุดคือ 2,915 สปอร์/น้ำหนักดิน 100 กรัม ปริมาณสปอร์น้อยที่สุดคือ 75 สปอร์/น้ำหนักดิน 100 กรัม โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์เท่ากับ 751 สปอร์/น้ำหนักดิน 100 กรัม และพบเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยในรากมากที่สุดคือ 98.33% เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยในรากน้อยที่สุดคือ 0% โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยในรากคือ 56.08% หลังจากการตรวจเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยในรากของอาบัสคูลาไมโคไรซ่าพบว่ามีจำนวน 19 กระถาง ที่พบเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยในรากมากกว่า 80% และมี 2 กระถางที่พบเปอร์เซ็นต์การเข้าอยู่อาศัยในราก 98.33% นำรากจาก 2 กระถาง นี้มาดำเนินการผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด และสุ่มดินในกระถางนั้นมาตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในดิน

Entrapment เป็นวิธีที่สามารถใช้ตรึงเซลล์ได้ดี และเป็นวิธีที่ใช้อย่างกว้างขวางกับเซลล์จุลินทรีย์ (Shuler and Kargi, 2002) โดยเซลล์จะเข้าไปอยู่ในโครงร่างตาข่ายของอัลจิเนต ซึ่งเป็นการเกิดเจลแบบไอโอโทรปิก (ionotropic gel) ของโมเลกุลอัลจิเนต กับ multivalent cation (Fukuda, 1995)

จากการทดลองการตรึงเซลล์เพื่อผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด พบว่า ชิ้นรากพืชที่ใช้เป็นหัวเชื้อปริมาตร 20 กรัม สามารถผลิตราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดได้น้ำหนักรวม 125 กรัม เม็ดเจลที่ได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.7 มม.

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในดินด้วยวิธี plate count พบว่าดินที่จะใช้ผลิตภัณฑ์แบบผงมีการปนเปื้อนเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 3.6×10^{5} cfu/g และจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงบน NA เท่ากับ 5.5×10^{5} cfu/g ส่วนผลิตภัณฑ์แบบเม็ดพบมีการปนเปื้อนเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA โดยรวมเฉลี่ยเท่ากับ 4.76×10^{3} cfu/g และจำนวนแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร NA เท่ากับ 5.1×10^{3} cfu/g กระบวนการผลิตแบบผงมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากกว่าการผลิตแบบเม็ด เนื่องจากการผลิตแบบผงจะนำหัวเชื้อมาเพิ่มปริมาณ

ในพืชอาศัยซึ่งปลูกอยู่ในดิน ถึงแม้ดินนี้ก่อนนำมาขยายเชื้อจะมีการทำให้ปลอดเชื้อแล้วก็ตาม แต่การปนเปื้อนของจุลินทรีย์อาจจะปนเปื้อนมากับน้ำ และอากาศ ช่วงระหว่างที่ขยายในพืชอาศัย ดังนั้นการผลิตแบบเม็ดจึงมีปริมาณการปนเปื้อนน้อยกว่าแบบผง ซึ่งเป็นผลมาจากที่มีการทำความสะอาด และการล้างฆ่าเชื้อของชิ้นรากที่จะนำมาใช้ผลิตหัวเชื้อ อีกทั้งขบวนการผลิตยังดำเนินการในที่ปลอดเชื้อ

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ยปริมาณจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนจากขั้นตอนการผลิตอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบผง และแบบเม็ด

กรรมวิธีการผลิต	Dilution	จำนวนโคโลนี			
		Potato Dextrose Agar		Nutrient Agar	
		จำนวนโคโลนี	โคโลนีทั้งหมด (CFU)	จำนวนโคโลนี	โคโลนีทั้งหมด (CFU)
แบบผง	10^{-1}	>300	3.6×10^{5}	>300	5.5×10^{5}
	10^{-2}	220		193	
	10^{-3}	36		55	
แบบเม็ด	10^{-1}	48	4.76×10^{3}	51	5.1×10^{3}
	10^{-2}	8		23	
	10^{-3}	3		3	

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพรูปแบบใหม่ คือราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ด ซึ่งผลิตด้วยวิธีการตรึงเซลล์ มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นน้อยกว่าการผลิตแบบเดิม ถ้าต้องการผลิตราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าที่บริสุทธิ์ โดยปราศจากการปนเปื้อนของเชื้ออื่นควรผลิตโดยวิธี root culture จากนั้นจึงนำรากที่ได้ไปตรึงเซลล์ต่อไป แต่การผลิตโดยวิธี root culture ก็ยังมีข้อจำกัดซึ่งจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าแบบเม็ดที่ปลอดเชื้อ สามารถนำไปใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จะทำให้ได้พืชที่มีราอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเข้าอาศัยตั้งแต่ระยะแรก ซึ่งจะช่วยทำให้อัตราการตายของพืชลดลง

เอกสารอ้างอิง

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnol. Adv. 16: 729–770.

Bickerstaff, G. F. 1997. Method in biotechnology Vol1: Immobilization of enzyme and cell 1-11 Totowa, NJ: Human Press.

Biermann, B. J. and R. G. Linderman. 1983. Effect of container plant growth medium and fertilizer phosphorus on establishment and host growth response to vesicular-arbuscular mycorrhizae. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 108: 962-971.

Calvet, C., A. Camprubi and R. Rodriguez-Kabana. 1996. Inclusion of arbuscular mycorrhizal fungi in alginate films for experimental studies and plant inoculation. Hortic. Sci. 31: 285.

Cheetham, P. S. J., K.W. Blunt and C. Bucke. 1979. Phisical studies on cell immobilation using calcium alginate gels. Biotech And Bioeng. 21: 2155-2618.

Cassidy, M. B., H. Lee and J. T. Trevors. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells. J. Ind. Microbiol. 16: 79–101.

Dehne, H. W. and G. F. Backhaus. 1986. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production. Z. Pflazenkr. Pflanzenschutz 93: 415-424.

Federici, F. 1993. Potential application of viable, immobilized fungal cell systems. W. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 495–502.

Fukuda, H. 1995. Immobilized Microorganism Bioreactor. Pages 339-375. In: Bioreactor System Design. J. A. Asenjo and J. C. Merehuk (eds.) Mareel dekker,INC.

Gemeiner, P., L. Rexova-Benkova, F. Svec and O. Norrlow. 1994. Natural and Synthetic Carriers Suitable for Immobilization of Viable Cells, Active Organelles, and Molecules. Pages 1-128. In: Immobilized Biosystems. Chapman and Hall. Immobilized Biosystems. I.A. Veliky and R.J.C. Mclean (eds.) Chapman and Hall.

Giovannetti, M. and B. Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular- arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500

Jung, G. 1979. Procédé d'inclusion de microorganisms dans une matrice de polymères et produit ainsi obtenu. French patent 7,908,597, 5 Apr. 1979.

Kok, F. N. and Hasirci V. 2000. In: situ bioremediation of xenobiotics: immobilized biocatalysts in bioreactors. Pages 465-535. D.L., Wise D.J., Trantolo E.J., Cichon H.I., Inyang and U., Stottmeieter. (eds.) Bioremediation of contaminated soils, New York: Marcel Dekker.

Kuek. C., IC. Tommerup and N. Malajczuk. 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. Mycological Research 96: 273-277.

Le Tacon, F., G. Jung, J. Mugnier, P. Michelot and C. Mauperin. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. Can. J. Bot. 63:1664–1668.

Menge, J. A. 1983. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. Can. J. Bot. 61: 1015-1024.

Menge, J. A. 1984. Inoculum production. Pages 187-203. In: VA mycorrhiza. C.L. Powell and D.J. Bagyaraj (eds.) CRC Press, Boca Raton. FL.

Ojala, J.C. and W. M. Jarrell. 1980. Hydroponic sand culture systems for mycorrhizal research. Plant Soil. 57: 297-303.

Phillips, J. A. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol.Soc. 55: 158-161.

Plenchette, C., V. Furlan and J. A. Fortin. 1982. Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. Journal of the American Society for Horticultural Science. 107: 535-538.

Schenck, N.C., and Y. Perez. 1990. Isolation and culture of VA mycorrhizal fungi. Pages 237-258. In : Isolation of biotechnological organisms from nature. D.P. Labeda (ed.) McGraw Hill Publ. Co., New York.

Shuler, M. L. and F. Kargi. 2002. Bioprocess Engeneering. Prentice Hall, Inc., USA.

Strullu, D. G. and C. Plenchette. 1990. Encapsulation de la forme intraracinaire de Glomus dans l'alginate et utilization des capsules comme inoculums. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Ser. III, 310: 447-452.

Strullu, DG. and C. Plenchette. 1991. The entrapment of *Glomus* sp. In alginate beads and their use as root inoculum. Mycological Research 95: 1194-1196.

Van Elsas, J. D., and C. E. Heijnen. 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil. Biol. Fert. Soils 10: 127–133.

Vassilev, N., M. Vassileva. 1992. Production of organic acids by immobilized filamentous fungi. Mycol. Res. 96: 563–570.

Vassilev, N., M. Vassileva, R. and A. AzconMedina. 2001. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomusdeserticola* and *Yarowia lipolytica* in a soil–plant system Journal of Biotechnology. 91: 237–242.

Wade, A., and P. J. Weller. 1994. Handbook of pharmaceutical excipients 2nd ed The Pharmaceutical Press: London. 428-430 p.



ภาพที่ 1. การผลิตปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมโคไรซ่าเป็นแบบเม็ดโดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสด

Application of Rhizobium Biofertilizer and Chemical Fertilizer As a Recommendation Based on Soil Analysis for Enhancement of Yield and Quality of Vegetable Soybean

ศิริลักษณ์ จิตรอักษร[1] ศฬิษา สังวิเศษ[2]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมเพื่อนำมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมและใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสด 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เอจีเอส 292 และพันธุ์นัมเบอร์ 75 ดำเนินการในสภาพเรือนทดลองปี 2554 แปลงทดลองฤดูฝนปี 2555 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิษณุโลก (ศวพ.พิษณุโลก) และปี 2556 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี (ศวพ.ลพบุรี) พบว่าการใช้ ไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ย 6-9 กก. K_2O/ไร่ (สองถึงสามเท่าคำแนะนำการใช้ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์ดิน) ปลูกในดินร่วนทรายที่ ศวพ.พิษณุโลก ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์ เอจีเอส 292 ปริมาณ 350.67 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 84.73% เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ยแต่ลดลง 48.81% เมื่อเทียบกับ GAP (22-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่) ผลผลิตฝักสดรวม 1,396 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 24.83% เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ย แต่ลดลง 31.93% เทียบกับ GAP การใช้ไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา GAP (11-11-13) ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์นัมเบอร์ 75 สูงสุด 903.93 กก./ไร่ และเมื่อใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ย 6 กก. K_2O /ไร่ หรือ 9-9-9 กก. N-P_2O_5-K_2O /ไร่ ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 461.47 - 667.01 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 20.99-45.34% เทียบกับไม่ใส่ปุ๋ยและมากกว่า GAP 16.90-42.50%

เมื่อนำมาใช้ทดสอบในแปลงฤดูฝนปี 2556 ศวพ.ลพบุรี เนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย พบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา GAP ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์เอจีเอส 292 สูงสุด 346 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 45.08 และ 13.87% เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ยและ GAP ตามลำดับ และให้ผลผลิตฝักสดรวม 1,500 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 21.6% เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ย แต่ลดลง 12.79% เทียบกับ GAP การใส่ปุ๋ย 0-18-6 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสองเท่าของคำแนะนำการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) ร่วมด้วยทำให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์นัมเบอร์ 75 สูงสุด 267 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 38.20 และ 10.11% เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ยและ GAP ตามลำดับ ผลผลิตฝักสดรวม 1,160 กก./ไร่ เพิ่มขึ้น 11.03% เทียบกับไม่ใส่ปุ๋ย

คำสำคัญ: ถั่วเหลืองฝักสด ไรโซเบียม ค่าวิเคราะห์ดิน

---

[1] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น

Abstract

Selection on effective rhizobial strains used for rhizobium biofertilizer production and applied with various chemical fertilizer rates for enhancement of yield and quality of vegetable soybean variety AGS292 and No. 75 was carried out under greenhouse condition in 2011, field trials in rainy season of 2012 at Phitsanulok Agricultural Research and Development Centre (PARDC) and of 2013 at Lopburi Agricultural Research and Development Centre (LARDC). The results obtained from PARDC indicated that application of rhizobium biofertilizer with 6-9 K_2O kg/rai (two-three times as a recommendation based on soil analysis) produced marketable pod yield for AGS292 of 350.67 kg/rai, which was higher than the control by 84.73% but lower than GAP (22-11-13 N-P_2O_5-K_2O kg/rai) by 48.81% as grown in sandy loam. Such application gave total pod yield by 1,396 kg/rai, higher 24.83% and lower 31.93% than those of control and GAP, respectively. Application of rhizobium biofertilizer with1/2NGAP (11-11-13 N-P_2O_5-K_2O kg/rai) produced the highest marketable pod yield of no.75 at 903.03 kg/rai. The combination rhizobium with 6K_2O or 9-9-9 N-P_2O_5-K_2O kg/rai obtained marketable pod yield approximately 461.47-667.01 kg/rai. It was greater than those of control up to 20.99-45.34% and GAP 16.90-42.50%. In case of LARDC trial in sandy clay loam, the highest marketable pod yield of AGS292 of 346 kg/rai was observed in treatment receiving rhizobium with 1/2NGAP, higher by 45.08% and 13.87% than the control and GAP, respectively. Total pod yield was about 1,500 kg/rai, which was 21.6% greater than the control, but 12.79% lower than the GAP. Application of 0-18-6 (two times of P and K rate as a recommendation based on soil analysis) enhanced the highest marketable pod yield of no.75 at 267 kg/rai, higher by 38.20% and 10.11% as compared to the control and GAP. In addition, it also contributed to increase total pod yield (1,160 kg/rai) up to 11.03% as compared to the control.

Key words: vegetable soybean, rhizobium, soil analysis

คำนำ

เกษตรกรให้ความสนใจปลูกถั่วเหลืองฝักสดเพิ่มขึ้นซึ่งสามารถส่งออกผลผลิตไปยังประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันมากกว่าปีละ 10,000 ตันต่อปี สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยมูลค่ากว่า 1,000 ล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2548 ข) ปริมาณและคุณภาพผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดเกี่ยวข้องกับปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ซึ่งพืชต้องการในปริมาณมาก คำแนะนำการใส่ปุ๋ยแก่ถั่วเหลืองฝักสดแก่เกษตรกรแตกต่างกันตามพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดและวัตถุประสงค์ คือ พันธุ์สำหรับการส่งออก เช่น เอจีเอส 292 และ นัมเบอร์ 75 ใส่ปุ๋ยเคมี 3 ครั้ง รวม 80-100 กก./ไร่ พันธุ์สำหรับบริโภคในประเทศใส่ปุ๋ยเคมี 2 ครั้ง รวม 55 กก./ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ซึ่งใส่ปุ๋ยเคมีปริมาณมาก จึงทำให้ต้นทุนค่าปุ๋ยเคมีสูง ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียปมรากหรือลำต้นของพืชตระกูลถั่วสามารถเปลี่ยนรูปก๊าซไนโตรเจนในอากาศให้เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้โดยผ่านกระบวนการตรึง

ไนโตรเจนทางชีวภาพ การอยู่ร่วมกันระหว่างไรโซเบียมกับพันธุ์ถั่วมีความจำเพาะเจาะจง เมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสม ไรโซเบียมสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับพันธุ์ถั่วเหลืองสามารถตรึงไนโตรเจนได้สูงถึง 19.2 กก. ไนโตรเจนต่อฤดูปลูก (Vance, 1998) การใช้ไรโซเบียมจึงสามารถทดแทนการใส่ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนได้

การวิเคราะห์ดินเป็นวิธีการที่บอกให้ทราบว่าในดินมีปริมาณธาตุอาหารเพียงพอต่อความต้องการของพืชและการเพิ่มผลผลิตพืชหรือไม่ ต้องใส่ธาตุอาหารใดเพิ่ม ปริมาณเท่าใดจึงจะได้ผลตอบแทนที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เช่น การปลูกพืชตระกูลถั่วที่มีค่าวิเคราะห์ดินปริมาณอินทรียวัตถุต่ำกว่า 1% P_2O_5 น้อยกว่า 8% และ K_2O 40% ต้องใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 3-9-6 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548ก) แต่ไม่มีข้อมูลการใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับคำแนะนำการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินให้แก่ถั่วเหลืองฝักสด ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพถั่วเหลืองฝักสด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เมล็ดถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 และพันธุ์นัมเบอร์ 75 เชื้อไรโซเบียม 18 สายพันธุ์ ขวดแก้วและกระถางสำหรับปลูก ปุ๋ยเคมี สารเคมีที่จำเป็นในการเพาะเลี้ยงไรโซเบียมและวิเคราะห์สมบัติของดิน เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟฟี และอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็นในการวิจัย

วิธีการ

การคัดเลือกไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนแก่ถั่วเหลืองฝักสด

การทดลองมี 2 ชุด คือ ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 และนัมเบอร์ 75 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 19 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ใช้สายพันธุ์ไรโซเบียมแทนกรรมวิธี ดังนี้ DASA19001 DASA19002 DASA19003 DASA19006 DASA19008 DASA19009 DASA19010 DASA19011 DASA19012 DASA19013 DASA19014 DASA19015 DASA19017 DASA19018 DASA19019 DASA19021 DASA19022 DASA19023 และ Control (ควบคุมไม่ใส่ไรโซเบียม) ปลูกถั่วเหลืองฝักสดแต่ละพันธุ์ในขวดแก้วบรรจุทรายที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อนที่มีสารละลายธาตุอาหารพืชทุกธาตุยกเว้นไนโตรเจนขวดละ 2 ต้น และใส่ไรโซเบียมตามกรรมวิธี บันทึกค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) และน้ำหนัก ต้นแห้ง เมื่อถั่วเขียวออกดอกได้ประมาณ 50% คัดเลือกไรโซเบียม 5 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนและให้น้ำหนักต้นแห้งสูง

การทดสอบวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดในกระถางทดลอง

ดำเนินการที่กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการผลิตปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ปี 2554 ฤดูฝน โดยวิเคราะห์สมบัติของดินก่อนปลูกที่นำมาจาก ศวพ.พิษณุโลก ได้แก่ ค่า pH ปริมาณอินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัส (BrayII-P) โพแทสเซียม (Exch. K^+) ลักษณะเนื้อดิน และปริมาณไรโซเบียม การทดลองมี 2 ชุด ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 และนัมเบอร์ 75 วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธี 1 Control (กรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ย)

กรรมวิธี 2 ใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) สำหรับถั่วเหลืองฝักสด (กรมวิชาการเกษตร, 2545) รองก้นหลุม 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ ที่ 25 วันใส่ 13-13-21 อัตรา 25 กก./ไร่ ที่ 45 วันใส่ 46-0-0 อัตรา 25 กก./ไร่ (รวม 22-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O /ไร่)

กรรมวิธี 3 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ย N ครึ่งอัตราและ ปุ๋ยฟอสฟอรัสกับโพแทสเซียมอัตราตาม GAP

กรรมวิธี 4 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน

กรรมวิธี 5 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราสองเท่าตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน

กรรมวิธี 6 ใส่ไรโซเบียม + ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ ใส่ 2 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 3 4 และ 5 แบ่งใส่ปุ๋ยเคมี 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกพร้อมปลูก ครั้งที่สองใส่เมื่อถั่วเหลืองออกดอก

ดำเนินการทดลองในกระถาง ปี 2554 ฤดูฝน เตรียมไรโซเบียมเชื้อผสม 5 สายพันธุ์ ในรูปของปุ๋ยชีวภาพชนิดผง คลุกเคล้าเมล็ดถั่วเหลืองฝักสด ดำเนินการใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธีทดลอง จากนั้นปลูกในดินที่บรรจุในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว จำนวน 4 ต้น/กระถาง บันทึกข้อมูลที่ระยะออกดอก 50% บันทึกค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) จำนวนปม และน้ำหนักต้นแห้ง จำนวน 2 ต้น/กระถาง ที่ระยะเก็บเกี่ยวบันทึกข้อมูลผลผลิต 2 ต้น/กระถาง ได้แก่ จำนวนฝักสดรวม จำนวนฝักสดมาตรฐาน (มีจำนวน 2-3 เมล็ด/ฝัก ความยาวฝักไม่น้อยกว่า 4.5 ซม. และความกว้างไม่น้อยกว่า 1.5 ซม.) ผลผลิตฝักสดรวม วิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อนำไปปรับกรรมวิธีสำหรับการทดสอบในแปลงทดลอง ณ ศวพ.พิษณุโลก ปี 2555

การทดสอบวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสดในสภาพแปลง ณ ศวพ.พิษณุโลก

วิเคราะห์สมบัติของดินก่อนปลูก ได้แก่ ค่า pH ปริมาณอินทรียวัตถุ ฟอสฟอรัส (BrayII-P) โพแทสเซียม (Exch. K^+) ลักษณะเนื้อดิน และปริมาณไรโซเบียม การทดลองมี 2 ชุด คือ ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 และนัมเบอร์ 75 ดำเนินการในแปลงทดลอง ณ ศวพ.พิษณุโลก ปี 2555 ฤดูฝน ขนาดแปลงย่อย 3x5 เมตร ระยะปลูก 50x20 ซม. ปลูก 2-3 ต้น/หลุม พื้นที่เก็บเกี่ยว 2x4 เมตร โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธี 1 Control (กรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ย)

กรรมวิธี 2 ใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) สำหรับถั่วเหลืองฝักสด (กรมวิชาการเกษตร, 2545) รองก้นหลุม 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ ที่ 25 วัน ใส่ 13-13-21 อัตรา 25 กก./ไร่ ที่ 45 วันใส่ 46-0-0 อัตรา 25 กก./ไร่ (รวม 22-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O /ไร่)

กรรมวิธี 3 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ย N ครึ่งอัตราและ ปุ๋ยฟอสฟอรัสกับโพแทสเซียมอัตราตาม GAP

กรรมวิธี 4 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยไนโตรเจน ปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามลักษณะเนื้อดิน

กรรมวิธี 5 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยไนโตรเจน ปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน

กรรมวิธี 6 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราสองเท่าตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน

กรรมวิธี 7 ใส่ไรโซเบียม + ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ ใส่ 2 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 4 5 6 และ 7 แบ่งใส่ปุ๋ยเคมี 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกพร้อมปลูก ครั้งที่สองใส่เมื่อถั่วเหลืองออกดอก

บันทึกข้อมูลจำนวนฝักสดมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดรวม ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน

การทดสอบวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสดในสภาพแปลง ณ ศวพ.ลพบุรี

ดำเนินการในปี 2556 ฤดูฝน ณ ศวพ.ลพบุรี ดำเนินการทำนองเดียวกับการทดสอบที่ ศวพ.พิษณุโลก โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย

กรรมวิธี 1 Control (กรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ย)

กรรมวิธี 2 ใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) สำหรับถั่วเหลืองฝักสด (กรมวิชาการเกษตร, 2545) รองก้นหลุม 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ ที่ 25 วันใส่ 13-13-21 อัตรา 25 กก./ไร่ ที่ 45 วันใส่ 46-0-0 อัตรา 25 กก./ไร่ (รวม 22-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่)

กรรมวิธี 3 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ย N ครึ่งอัตราและ ปุ๋ยฟอสฟอรัสกับโพแทสเซียมอัตราตาม GAP

กรรมวิธี 4 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยไนโตรเจน ปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามลักษณะเนื้อดิน

กรรมวิธี 5 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยไนโตรเจน ปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน

กรรมวิธี 6 ใส่ไรโซเบียมและปุ๋ยฟอสฟอรัสและปุ๋ยโพแทสเซียมอัตราสองเท่าตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ย ตามค่าวิเคราะห์ดิน

กรรมวิธี 7 ใส่ไรโซเบียม + ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ ใส่ 2 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 4 5 6 และ 7 แบ่งใส่ปุ๋ยเคมี 2 ครั้ง คือ ครั้งแรกพร้อมปลูก ครั้งที่สองใส่เมื่อถั่วเหลืองออกดอก

บันทึกข้อมูลที่ระยะออกดอก ได้แก่ ค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) จำนวนปม น้ำหนักต้นแห้ง ที่ระยะเก็บเกี่ยวบันทึกจำนวนฝักสดมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดรวม ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน และผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554- กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิษณุโลก และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การคัดเลือกไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนแก่ถั่วเหลืองฝักสด

ไรโซเบียมที่ทดสอบมีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดพบว่าไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA19010 DASA19011 DASA19014 DASA19022 และ DASA19023 มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 และให้น้ำหนักต้นแห้งสูง โดยมีค่าการตรึงไนโตรเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ARA เฉลี่ย 46.444-52.806 ไมโครโมล C_2H_4 ต่อชั่วโมงต่อ 2 ต้น (ตารางที่ 1) และน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ย 6.50-7.71 กรัมต่อ 2 ต้น ในขณะที่ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA19001 DASA19002 DASA19006 DASA19010 และ DASA19014 มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 โดยให้ค่าเฉลี่ยการตรึงไนโตรเจน (ARA) 19.559-37.526 ไมโครโมล C_2H_4 ต่อชั่วโมงต่อ 2 ต้น และมีน้ำหนักต้นแห้งเฉลี่ย 4.26-5.28 กรัมต่อ 2 ต้น (ตารางที่ 2)

การทดสอบวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดในกระถางทดลอง

ดินปลูกมีสมบัติดังนี้ มีค่า pH 5.96 อินทรียวัตถุ 0.55% ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (BrayII-P) 103 มก./กก. ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exch. K^+) 72 มก./กก. เนื้อดินร่วนทราย และมีปริมาณไรโซเบียม 8 เซลล์/กรัมดินแห้ง (ตารางที่ 3) ผลวิเคราะห์สมบัติดินนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณธาตุอาหารที่ต้องใส่ให้แก่พืชตามกรรมวิธี (ตารางที่ 4) ผลการทดลองพบว่าที่ระยะออกดอกวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยเคมีมีผลทำให้ค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) จำนวนปมของไรโซเบียมกับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 แตกต่างกันแต่น้ำหนักต้นแห้งไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5) โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ 3 กก. K_2O/ไร่ (คำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) และร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมตามคำแนะนำ GAP (11-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่) ทำให้ตรึงไนโตรเจนได้สูง 60.50-65.04 ไมโครโมล C_2H_4 ต่อ 2 ต้น/ชม. และจำนวนปมสูง 108-122 ปมต่อ 2 ต้น ที่ระยะเก็บเกี่ยวการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยเคมีมีผลทำให้จำนวนฝักสดรวม จำนวนฝักมาตรฐาน และผลผลิตฝักสดรวมแตกต่างกัน (ตารางที่ 6) โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ย 6K_2O กก./ไร่ (2 เท่าของคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) ให้จำนวนฝักสดรวม จำนวนฝักสดมาตรฐาน และผลผลิตฝักสดรวมสูงสุด คือ 94 ฝักต่อ 2 ต้น 46 ฝักต่อ 2 ต้น และ 109.90 กรัมต่อ 2 ต้น ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีมีผลทำให้จำนวนปม ค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) ของไรโซเบียมและน้ำหนักต้นแห้งของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ นัมเบอร์ 75 แตกต่างกันที่ระยะออกดอก (ตารางที่ 7) พบว่าการใช้ไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ย 3K_2O กก./ไร่ (ตามคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) และการใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตราทั่วไปที่เกษตรกรใช้ 9-9-9 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ทำให้ต้นถั่วเหลืองมีจำนวนปมสูง 100-129 ปมต่อ 2 ต้น น้ำหนักต้นแห้งสูง 10.26-13.97 กรัมต่อ 2 ต้น และค่าการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมสูง 37.42-39.26 ไมโครโมล C_2H_4 ต่อ 2 ต้น/ชม. และมีผลทำให้จำนวนฝักสดรวมสูง 79-103 ฝักต่อ 2 ต้น จำนวนฝักสดมาตรฐาน 65-91 ฝักต่อ 2 ต้นสูงกว่ากรรมวิธี GAP ที่ได้ 57 ฝักต่อ 2 ต้น และผลผลิตฝักสดรวมสูง 95.31-107.52 กรัมต่อ 2 ต้น ซึ่งไม่แตกต่างจากการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำ GAP ที่ให้ผลผลิตฝักสดรวม 114.18 กรัมต่อ 2 ต้น (ตารางที่ 8)

การทดสอบวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสดในสภาพแปลง ณ ศวพ.พิษณุโลก

ดำเนินการทดสอบในแปลงที่ ศวพ. พิษณุโลก ปี 2555 ฤดูฝน ดินปลูกมีสมบัติดังนี้ เนื้อดินเป็นดินร่วนทราย ค่า pH 5.41 ปริมาณอินทรียวัตถุ 0.245% ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ (BrayII-P) 49.75 มก./กก. ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exch.K^+) 35.7 มก./กก. ปริมาณเชื้อไรโซเบียม 18 เซลล์/กรัมดินแห้ง (ตารางที่ 9) และดำเนินการใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธี (ตารางที่ 10) พบว่าการปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ทำให้ได้ จำนวนปม และค่าการตรึงไนโตรเจนที่ระยะออกดอกแตกต่างกัน (ตารางที่ 11) ไรโซเบียมสามารถสร้างปมได้สูงสุด 100 ปม/ 4 ต้น และตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด 63.813 ไมโครโมล C_2H_4 / 4 ต้น/ชม. เมื่อใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 3-0-3 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (คำแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน) แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักต้นแห้งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ที่ระยะเก็บเกี่ยว พบว่าการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยวิธีต่างๆ มีผลทำให้จำนวนฝักสดมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดรวมและผลผลิตฝักสดมาตรฐานแตกต่างกัน (ตารางที่ 12) โดยการใส่ปุ๋ยเคมีอย่างเดียวอัตรา 22-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (ตามคำแนะนำ GAP) ให้จำนวนฝักมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดรวม และผลผลิตฝักสดมาตรฐานสูงสุด คือ 8 ฝัก/ต้น 2,051.48 กก./ไร่ และ 685.10 กก./ไร่ ตามลำดับ อันดับรองมา คือ การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ย 6 K_2O กก./ไร่ (สองเท่าของคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) ที่ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 350.67 กก./ไร่ ซึ่งน้อยกว่า GAP 48.81% แต่มากกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ได้ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 53.53 กก./ไร่ หรือมากกว่า 84.73% และผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐานมีค่าเฉลี่ย 995.93-1,405.51 กก./ไร่ การปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ นัมเบอร์ 75 โดยใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมี มีผลทำให้พบว่าการปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ทำให้ได้จำนวนปม ค่าการตรึงไนโตรเจนและน้ำหนักต้นแห้งที่ระยะออกดอกแตกต่างกัน (ตารางที่ 13) เมื่อปลูกถั่วเหลืองโดยใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 0-9-6 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (คำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามลักษณะเนื้อดิน) ทำให้ไรโซเบียมสร้างปมได้สูงสุด 171 ปม/ 4 ต้น และตรึงไนโตรเจนได้สูงสุด 126.286 ไมโครโมล C_2H_4 / 4 ต้น/ชม. แต่การใช้ปุ๋ยชีวภาพ ไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยอัตรา 11-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (ไนโตรเจนครึ่งอัตราของ GAP) ทำให้น้ำหนักต้นแห้งสูงสุด 90.05 กรัม/ 4 ต้น ที่ระยะเก็บเกี่ยวพบว่าจำนวนฝักสดมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดรวม ผลผลิตฝักสดมาตรฐานและผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐานแตกต่างกัน (ตารางที่ 14) การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 11-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (1/2N+P+K ตามคำแนะนำ GAP) ให้จำนวนฝักสดมาตรฐานสูง 12 ฝัก/ต้น ผลผลิตฝักสดรวม 2,025.33 กก./ไร่ ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 903.93 กก./ไร่ ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 9-9-9 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ที่ให้จำนวนฝักสดมาตรฐาน 13 ฝัก/ต้น ผลผลิตฝักสดรวม 1,740.18 กก./ไร่ และผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 667.01 กก./ไร่ แต่มากกว่ากรรมวิธีควบคุมซึ่งให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 364.57 กก./ไร่ (มากกว่า 45.34%) และการใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับ 6K_2O กก./ไร่ ให้ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐานสูงสุด 1,636.26 กก./ไร่ อย่างไรก็ตามการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินที่อัตราน้อยกว่า 3-9-6 กก. N-P_2O_5-K_2O /ไร่ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานไม่แตกต่างกันโดยมีค่าเฉลี่ย 406.77-559.50 กก./ไร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยอัตรา 0-0-6 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่

(ใส่โพแทสเซียมสองเท่าของคำแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน) ให้ผลผลิตฝักสดรวมและผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐานสูงสุด 2,097.73 และ 1,636.26 กก./ไร่ ตามลำดับ

การทดสอบวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับค่าวิเคราะห์ดินในการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสดในสภาพแปลง ณ ศวพ.ลพบุรี

ดำเนินการทดสอบในแปลงที่ ศวพ. ลพบุรี ปี 2556 ฤดูฝน ดินปลูกมีสมบัติดังนี้ เนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย ค่า pH 6.30 ปริมาณอินทรียวัตถุ 1.343% ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ได้ (BrayII-P) 2 มก./กก. ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exch.K^+) 78.11 มก./กก. ปริมาณเชื้อไรโซเบียม 22 เซลล์/กรัมดินแห้ง (ตารางที่ 15) และดำเนินการใส่ปุ๋ยตามกรรมวิธี (ตารางที่ 16) พบว่าการปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 ในดินร่วนเหนียวปนทรายโดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ทำให้ที่ระยะออกดอกมีจำนวนปม และค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) แตกต่างกัน ยกเว้นน้ำหนักต้นแห้ง (ตารางที่ 17) โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 0-18-6 กก. N-P_2O_5-K_2O /ไร่ (ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสองเท่าของคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) มีค่าการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 13.237 ไมโครโมล C_2H_4 ต่อชั่วโมงต่อ 4 ต้น และจำนวนปมสูงสุด 89 ปม/ 4 ต้น ที่ระยะเก็บเกี่ยวพบว่ากรรมวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมมีผลทำให้จำนวนฝักสดมาตรฐาน ผลผลิตฝักสดรวม ผลผลิตฝักสดมาตรฐานและผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐานแตกต่างกัน (ตารางที่ 18) โดยการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำ GAP ให้จำนวนฝักสดมาตรฐานสูงสุด 8 ฝัก/ต้น การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมการใส่ปุ๋ยอัตรา 9-9-9 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ให้ผลผลิตฝักสดรวมและผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐานสูงสุด 1,776 และ 1,502 กก./ไร่ ตามลำดับ การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 11-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (ไนโตรเจนครึ่งอัตรา ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมตามคำแนะนำ GAP) ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานสูงสุด 346 กก./ไร่ ซึ่งมากกว่าการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำ GAP 48 กก. หรือ 13.87% พบว่าการปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 ในดินร่วนเหนียวปนทรายโดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพร่วมกับปุ๋ยเคมีอัตราต่างๆ ทำให้ที่ระยะออกดอกมีจำนวนปม และค่าการตรึงไนโตรเจน (ARA) แตกต่างกัน ยกเว้นน้ำหนักต้นแห้ง (ตารางที่ 19) โดยการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 0-6-3 กก. N-P_2O_5-K_2O /ไร่ (คำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามลักษณะเนื้อดิน) มีค่าการตรึงไนโตรเจนสูงสุด 29.439 ไมโครโมล C_2H_4 /ชม./ 4 ต้น และจำนวนปมสูง 91 ปม/ 4 ต้น แต่การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยอัตรา 11-11-13 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (ไนโตรเจนครึ่งอัตรา ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมตามคำแนะนำ GAP) ให้จำนวนปมสูงสุด 115 ปม/ 4 ต้น ที่ระยะเก็บเกี่ยวพบว่ากรรมวิธีการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมไม่มีผลทำให้จำนวนฝักสดมาตรฐานค่าเฉลี่ย 4-6 ฝัก/ต้น ผลผลิตฝักสดรวม 1,032-1,353 กก./ไร่ ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน 867-1,105 กก./ไร่ แตกต่างกัน แต่การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 0-18-6 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ทำให้ได้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานสูงสุด 267 กก./ไร่ ซึ่งมากกว่าไม่ใส่ปุ๋ย 38.20% และมากกว่า GAP 10.11% (ตารางที่ 20)

ผลการทดลองเมื่อไม่ใส่ปุ๋ยไนโตรเจนแต่ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมที่คัดเลือกได้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในอัตราต่างๆ สามารถให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานไม่แตกต่างจากการใส่ปุ๋ยตาม GAP แสดงให้เห็นว่าไรโซเบียมสามารถตรึงไนโตรเจนให้แก่ต้นถั่วเหลืองและทดแทนปุ๋ยไนโตรเจนได้จำนวนหนึ่ง ไนโตรเจนปริมาณเล็กน้อยจำเป็นอย่างยิ่งในการเจริญของไรโซเบียมก่อนเข้าสู่กระบวนตรึงไนโตรเจนดังนั้นการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนปริมาณ

เล็กน้อย (กรรมวิธีไนโตรเจนครึ่งอัตรา GAP) จึงส่งเสริมให้ไรโซเบียมตรึงไนโตรเจนได้สูงและทำให้ได้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์นัมเบอร์ 75 ที่ปลูกในดินร่วนทรายและพันธุ์เอจีเอส 292 ที่ปลูกในดินร่วนเหนียวสูงกว่าการใส่ปุ๋ยตาม GAP การแบ่งใส่ปุ๋ยที่ 25 วัน (GAP) หรือออกดอก 35 วัน (ไรโซเบียม) หรือติดฝัก 45 วัน (GAP) ทำให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานไม่แตกต่างจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา GAP สอดคล้องกับผลงานวิจัย Gan *et al.* (2003) ที่พบว่าการปลูกถั่วเหลืองโดยการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนรองพื้น 4 กก./ไร่ และใส่เพิ่มที่ระยะออกดอกทำให้การสะสมไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนที่ถูกตรึง ผลผลิตเมล็ดถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ เพิ่มขึ้น 21-27% นอกจากนี้ Gan *et al.* (1997) พบว่าเมื่อปลูกถั่วเหลืองฝักสดโดยใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนพร้อมปลูก 4 กก./ไร่และใส่เพิ่ม 4 กก./ไร่ ที่ระยะออกดอกหรือติดฝักส่งเสริมการเพิ่มผลผลิตฝักสด cultivar 301 เพิ่มขึ้น 44% และผลผลิตฝักสดมาตรฐานเพิ่มขึ้น 20% การให้ผลผลิตฝักสดพันธุ์เอจีเอส 292 และนัมเบอร์ 75 ค่อนข้างต่ำในกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยคำแนะนำ GAP สำหรับถั่วเหลืองฝักสด (กรมวิชาการเกษตร, 2545) เนื่องจากสภาพภูมิอากาศต่างกันและเมล็ดพันธุ์ที่ใช้มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำและเมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยการผลิตถั่วเหลืองฝักสดกลิ่นหอมโดยใช้ปุ๋ยแบบผสมผสานของ พรพรรณ และคณะ (2554) พบว่าการใช้ปุ๋ยสูตร กวก.15-13-11 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ร่วมกับการใส่ปุ๋ยหมัก 2 ตัน/ไร่ ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์ MJ0108-11-5 และ Kaori ในฤดูแล้ง 158.2 และ 55.8 กก./ไร่ ซึ่งต้นถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์สำหรับส่งออกที่ทดลอง สาเหตุเนื่องจากใช้พันธุ์ต่างกัน ลักษณะดินและภูมิอากาศแตกต่างกัน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA19010 DASA19011 DASA19014 DASA19022 และ DASA19023 มีประสิทธิภาพในการไนโตรเจนสูงกับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 ให้ค่าเฉลี่ย ARA ระหว่าง 46.44-52.80 ไมโครโมล C_2H_4 /ชม./ 2 ต้น ในสภาพปลอดเชื้อปนเปื้อน และไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA19001 DASA19002 DASA19006 DASA19010 และ DASA19014 มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนร่วมกับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 โดยให้ค่าเฉลี่ย ARA ระหว่าง 19.55-37.52 ไมโครโมล C_2H_4 /ชม./ 2 ต้นในสภาพปลอดเชื้อปนเปื้อน เมื่อนำไรโซเบียมสายพันธุ์ดังกล่าวมาผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเชื้อผสมและใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยโพแทสเซียม 6 กก./ไร่ (สองเท่าของคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) ในการปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 ในดินร่วนทราย ฤดูฝน ณ ศวพ.พิษณุโลกให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 350.67 กก./ไร่ ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธี GAP ประมาณ 48.81% แต่มากกว่ากรรมวิธีควบคุม 84.73% และให้ผลผลิตฝักสดรวม 1,396 กก./ไร่ ซึ่งน้อยกว่ากรรมวิธี GAP ประมาณ 31.93% แต่มากกว่ากรรมวิธีควบคุม 24.83% การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมเชื้อผสมร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 9-9-9 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ ทำให้ได้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานพันธุ์นัมเบอร์ 75 ถึง 667.01 กก./ไร่ ซึ่งมากกว่าไม่ใส่ปุ๋ย 45.34% และกรรมวิธี GAP 42.50% ให้ผลผลิตฝักสดรวม 1,740.18 กก./ไร่ มากกว่า GAP และไม่ใส่ปุ๋ย 15.05 และ 16.76% ตามลำดับ เมื่อใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยอัตรา 11-11-13 (ไนโตรเจนครึ่งอัตราแนะนำ GAP) ปลูกถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์เอจีเอส 292 ในดินร่วนเหนียวปนทราย ณ ศวพ.ลพบุรีให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 346 กก./ไร่ มากกว่ากรรมวิธี GAP 13.87% และมากกว่าไม่ใส่ปุ๋ย 45.08% การใช้ปุ๋ยชีวภาพ

ไรโซเบียมร่วมกับปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำการใส่ปุ๋ยลักษณะเนื้อดินหรือค่าวิเคราะห์ดินก็ให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานไม่แตกต่างจากกรรมวิธีใส่ปุ๋ยตาม GAP และเมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยอัตรา 0-18-6 กก. N-P_2O_5-K_2O/ไร่ (ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมสองเท่าของคำแนะนำค่าวิเคราะห์ดิน) เพิ่มผลผลิตฝักสดมาตรฐาน 33.33% และผลผลิตฝักสดรวม 28.29 % เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ย และทำให้ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 มีผลผลิตฝักสดมาตรฐานสูงสุด 267 กก./ไร่ ซึ่งมากกว่ากรรมวิธี GAP 10.11% และ 38.20% เมื่อเทียบกับไม่ใส่ปุ๋ย แต่ผลผลิตฝักสดรวมน้อยกว่ากรรมวิธี GAP 4.60% แต่มากกว่าไม่ใส่ปุ๋ย 11.03% การใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมกับการใช้ปุ๋ยตามลักษณะเนื้อดินหรือค่าวิเคราะห์ดินให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานของถั่วเหลืองพันธุ์เอจีเอส 292 และนัมเบอร์ 75 ไม่แตกต่างกันเมื่อปลูกในดินร่วนทรายหรือดินร่วนเหนียวปนทราย

ข้อเสนอแนะก่อนปลูกถั่วเหลืองฝักสดควรวิเคราะห์สมบัติของดินบางประการเพื่อให้มั่นใจว่าในดินมีธาตุอาหารพืชชนิดใดบ้างโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม และมีอยู่ในปริมาณเท่าใดเพียงพอต่อความต้องการของพืชหรือไม่ ต้องใส่เพิ่มเท่าใดและมีปัจจัยการผลิตใดที่ทดแทนการได้มาซึ่งธาตุอาหารพืชจากปุ๋ยเคมีหรือไม่ประการใด ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมจำเป็นอย่างยิ่งในการทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีไนโตรเจนสำหรับการผลิตถั่วเหลืองฝักสดซึ่งต้องเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่จำเพาะเจาะจงที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรึงไนโตรเจนต่อพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่ต้องการปลูก หลังจากออกดอกควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มเพื่อให้เมล็ดเต็มฝัก ในขณะเดียวกันช่วยเพิ่มปริมาณปุ๋ยฟอสฟอรัสให้แก่พืชและไรโซเบียม เนื่องจากกระบวนการตรึงไนโตรเจนจำเป็นต้องใช้ฟอสฟอรัส เพื่อให้ตรึงไนโตรเจนเกิดประสิทธิภาพสูงสุด การปลูกถั่วเหลืองฝักสดทั้ง 2 พันธุ์ : เอจีเอส 292 และนัมเบอร์ 75 แนะนำให้ใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมร่วมด้วย โดยการปลูกในดินร่วนทราย ควรใส่ปุ๋ยโพแทสเซียม 6-9 กก./ไร่ (สองถึงสามเท่าของคำแนะนำการใช้ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน) และควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มที่ระยะออกดอก แต่เมื่อปลูกในดินร่วนเหนียวปนทราย ควรใส่ปุ๋ยโพแทสเซียม 6 กก./ไร่ และใส่ปุ๋ยฟอสฟอรัสมากกว่า 11 กก./ไร่ จึงจะให้ผลผลิตฝักสดมาตรฐานสูงในถั่วเหลืองฝักสดทั้งสองพันธุ์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ดังกล่าวไปผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมสำหรับถั่วเหลืองฝักสดเพื่อวิจัยขยายผลนำไปใช้ทดสอบในพื้นที่เพื่อพัฒนาเป็นคำแนะนำการใช้ร่วมกับการใส่ปุ๋ยเคมีสำหรับการปลูกถั่วเหลืองฝักสดในดินที่มีลักษณะเนื้อดินประเภทต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2545. ***เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับถั่วเหลืองฝักสด***. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 26 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2548 ก. ***คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ***. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานเลขานุการกรม. 121 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2548ข. ***เทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออก***. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์พิมกอ. เชียงใหม่. 15 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. ***คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ***. พิมพ์ครั้งที่ 2 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สำนักงานเลขานุการกรม. 122 หน้า.

พรพรรณ สุทธิแย้ม กัลยา วิธี ละอองดาว แสงหล้า และณัฐดนัย ตั้งมั่นคงวรกูล. 2554. การใช้ปุ๋ยแบบผสมผสานในการผลิตถั่วเหลืองฝักสดกลิ่มหอม. ***แก่นเกษตร***. 39(3):132-145.

Gan, Y., M. B. Peoples, and B. Rerkasem. 1997. The effect of N fertilizer strategy on N_2 fixation, growth and yield of vegetable soybean. ***Field Crops Research***. 51:221-229.

Gan, Y., I. Stulen, H. van Keulen, and P. J. C. Kuiper. 2003. Effect of N fertilizer top-dressing at various reproductive stages on growth, N_2 fixation and yield of three soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes. ***Field Crops Research***. 80:147-155.

Vance, C.P. 1998. Legume sgmbiosis nitrogen Fixation : Agronomic aspects, p.518. *In* H.P. spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykass (eds.), *The Rhizobiaceae : molecular biology* of model plant associated bacteria, KWwer Academic Publisher, The Netherlands.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม 18 สายพันธุ์ กับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส292 ในวัสดุปลูกที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

สายพันธุ์ไรโซเบียม	**ค่าการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี** ARA (µmole C_2H_4/**ชม.**/2 **ต้น**)	**น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/2 ต้น)**
Control	0.991f	2.45d
DASA19001	24.938cd	6.87ab
DASA19002	28.755cd	7.70a
DASA19003	35.658bc	6.84ab
DASA19006	30.691cd	7.05ab
DASA19008	4.392ef	2.10d
DASA19009	16.079de	4.94c
DASA19010	52.806a	6.80ab
DASA19011	51.461a	6.50abc
DASA19012	22.765cd	5.77bc
DASA19013	32.713c	6.93ab
DASA19014	51.625a	7.33ab
DASA19015	29.608cd	6.10abc
DASA19017	24.663cd	5.95bc
DASA19018	23.921cd	6.32abc
DASA19019	35.294bc	7.61a
DASA19021	26.886cd	6.51abc
DASA19022	47.741ab	7.70a
DASA19023	46.444ab	7.71a
F-test	**	**
CV	24.7	13.4

หมายเหตุ : **ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2. ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียม 18 สายพันธุ์ กับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ นัมเบอร์ 75 ในวัสดุปลูกที่ปราศจากเชื้อปนเปื้อน

สายพันธุ์ไรโซเบียม	ค่าการตรึงไนโตรเจนด้วยวิธี ARA (μmole C_2H_4/ชม./2 ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/2 ต้น)
Control	1.232i	1.43f
DASA19001	19.559c	4.26b-e
DASA19002	37.526a	4.47a-d
DASA19003	5.830hi	4.07b-e
DASA19006	36.892a	5.28abc
DASA19008	7.024ghi	2.64ef
DASA19009	6.912ghi	3.37de
DASA19010	20.051c	4.31b-e
DASA19011	9.727fgh	3.65cde
DASA19012	11.845e-h	4.18b-e
DASA19013	6.004hi	3.33de
DASA19014	29.532b	4.62a-d
DASA19015	18.854cd	4.36a-e
DASA19017	15.767c-f	4.20b-e
DASA19018	11.134fgh	4.75a-d
DASA19019	14.787c-f	4.89a-d
DASA19021	15.208c-f	5.69ab
DASA19022	13.168d-g	5.47ab
DASA19023	17.815cde	
F-test	**	**
CV	21.4	21.1

หมายเหตุ : **ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3. สมบัติของดินบางประการที่ใช้ในการทดลองกระถาง

สมบัติของดิน	**ผลวิเคราะห์**
ค่า pH	5.96
ปริมาณอินทรียวัตถุ	0.55%
ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (BrayII-P)	103 มก./กก.
ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exch.K^+)	41.7 มก./กก.
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วนทราย
จำนวนไรโซเบียม	8 เซลล์/กรัมดินแห้ง

ตารางที่ 4. ปริมาณปุ๋ยที่ต้องใส่ตามกรรมวิธีสำหรับการทดลองในกระถาง ปี 2554

กรรมวิธี	**ปริมาณปุ๋ยเคมีที่ใส่เพิ่ม** (N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่)
Control[1/]	0-0-0
GAP[2/]	22-11-13
R+1/2NPK(GAP)[3/]	11-11-13
R+P-KSA[4/]	0-0-3
R+2P2KSA[5/]	0-0-6
R+GP[6/]	9-9-9

หมายเหตุ : [1/] กรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยเคมี

[2/] ใส่ปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำ GAP (กรมวิชาการเกษตร, 2545) แบ่งใส่ 3 ครั้ง

[3/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ตามคำแนะนำ GAP (กรมวิชาการเกษตร, 2545) แบ่งใส่ 3 ครั้ง

[4/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมคำแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[5/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมอัตรา 2 เท่า ตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[6/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ แบ่งใส่ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

ตารางที่ 5. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อการตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสด พันธุ์ เอจีเอส 292 ที่ปลูกในกระถาง ปี 2554

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนปม (ปม/2ต้น)	ค่า ARA ($\mu mole C_2H_4$/ชม./2ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/2ต้น)
Control	9d	9.33c	9.73a
GAP (22-11-13)[1/]	22c	20.76b	12.06a
R+1/2NPK(GAP) (11-11-13)	122a	60.50a	12.27a
R+P-KSA (0-0-3)	108a	65.04a	15.94a
R+2P2KSA (0-0-6)	66b	55.10a	14.62a
R+GP (9-9-9)	62b	55.73a	13.00a
F-test	**	**	ns
CV	10.9	16.1	24.0

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีDMRT

ตารางที่ 6. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์เอจีเอส 292 ที่ปลูกในกระถาง ปี 2554

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนฝักรวม (ฝัก/2ต้น)	ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน (ผัก/2ต้น)	ผลผลิตฝักสดรวม (กรัม/2ต้น)
Control	58b	8c	76.62b
GAP (22-11-13)[1/]	61b	15c	78.99b
R+1/2NPK(GAP) (11-11-13)	63b	14c	76.33b
R+P-KSA (0-0-3)	64b	29b	77.32b
R+2P2KSA (0-0-6)	94a	46a	109.90a
R+GP (9-9-9)	69b	34b	93.33b
F-test	**	**	ns
CV	19.7	20.8	12.4

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อการตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 ที่ปลูกในกระถาง ปี 2554

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนปม (ปม/2ต้น)	ค่า ARA ($\mu mole C_2H_4$/ชม./2ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/2ต้น)
Control	19d	6.73d	8.01c
GAP (22-11-13)[1/]	18d	13.31c	10.94b
R+1/2NPK(GAP) (11-11-13)	88bc	21.73b	11.43b
R+P-KSA (0-0-3)	129a	39.26a	10.26b
R+2P2KSA (0-0-6)	80c	25.53b	9.46bc
R+GP (9-9-9)	100b	37.42a	13.97a
F-test	**	**	**
CV	20.8	13.1	11.7

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นับเบอร์ 75 ที่ปลูกในกระถาง ปี 2554

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนฝักรวม (ฝัก/2ต้น)	ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน (ผัก/2ต้น)	ผลผลิตฝักสดรวม (กรัม/2ต้น)
Control	60b	32c	66.63c
GAP (22-11-13)[1/]	74b	57b	114.18a
R+1/2NPK(GAP) (11-11-13)	69b	30c	84.87bc
R+P-KSA (0-0-3)	79b	65ab	95.31ab
R+2P2KSA (0-0-6)	74b	35c	79.01bc
R+GP (9-9-9)	103a	91a	107.52a
F-test	*	*	**
CV	5.5	12.5	15.3

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

** ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ * ระดับนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 9. สมบัติบางประการของดินก่อนปลูก ศวพ.พิษณุโลก ปี 2555 ฤดูฝน

สมบัติของดิน	**ผลวิเคราะห์**
ค่า pH	5.41
ปริมาณอินทรียวัตถุ	0.245%
ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (BrayII-P)	49.75 มก./กก.
ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exch.K^+)	35.7 มก./กก.
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วนทราย
จำนวนไรโซเบียม	18 เซลล์/กรัมดินแห้ง

ตารางที่ 10. ปริมาณปุ๋ยที่ต้องใส่ตามกรรมวิธี ศวพ.พิษณุโลก ปี 2555 ฤดูฝน

กรรมวิธี	**ปริมาณปุ๋ยเคมีที่ใส่เพิ่ม** (N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่)
Control[1/]	0-0-0
GAP[2/]	22-11-13
R+1/2NPK(GAP)[3/]	11-11-13
R+NPKST[4/]	0-9-6
R+NPKSA[5/]	3-0-3
R+2P2KSA[6/]	0-0-6
R+GP[7/]	9-9-9

หมายเหตุ : [1/]กรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยเคมี

[2/]ใส่ปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำ GAP (กรมวิชาการเกษตร, 2545) แบ่งใส่ 3 ครั้ง

[3/]ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ตามคำแนะนำ GAP (กรมวิชาการเกษตร, 2545) แบ่งใส่ 3 ครั้ง

[4/]ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมคำแนะนำตามลักษณะเนื้อดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[5/]ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมคำแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[6/]ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมอัตรา 2 เท่า ตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[7/]ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ แบ่งใส่ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

ตารางที่ 11. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อการตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์เอจีเอส 292 ฤดูฝน ปี 2555 ศวพ.พิษณุโลก

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนปม (ปม/4ต้น)	ค่า ARA ($\mu mole C_2H_4$/ชม./4ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/4ต้น)
Control	24de	10.859c	20.64
GAP (22-11-13)[1/]	18e	17.071bc	34.02
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	49c	37.829b	25.48
R+NPKST(0-9-6)	74b	34.003b	31.10
R+NPKSA (3-0-3)	100a	63.813a	24.41
R+2P2KSA (0-0-6)	45cd	31.342b	23.31
R+GP (9-9-9)	40cd	20.805bc	31.20
F-test	**	**	ns
CV	17.2	26.2	26.8

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 12. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 ฤดูฝน ปี 2555 ศวพ.พิษณุโลก

กรรมวิธี	จำนวนฝักสดมาตรฐาน (ฝัก/ต้น)	ผลผลิตฝักสดรวม (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน (กก./ไร่)
Control	0f	1,049.46c	53.53d	995.93
GAP (22-11-13)[1/]	8a	2,051.48a	685.10a	1,366.38
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	3bc	1,371.29bc	281.14bc	1,090.14
R+NPKST(0-9-6)	2de	1,368.95bc	190.70cd	1,203.25
R+NPKSA (3-0-3)	2de	1,639.87b	234.36bc	1,405.51
R+2P2KSA (0-0-6)	5ab	1,396.30bc	350.67b	1,070.63
R+GP (9-9-9)	3bc	1,202.41bc	141.21cd	1,061.20
F-test	**	**	**	ns
CV	27.0	18.8	22.2	16.3

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 13. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อการตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 ฤดูฝน ปี 2555 ศวพ.พิษณุโลก

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนปม (ปม/4ต้น)	ค่า ARA ($\mu mole C_2H_4$/ชม./4ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/4ต้น)
Control	38de	15.242c	40.48bc
GAP (22-11-13)[1/]	45d	14.217c	42.61c
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	60de	34.809c	90.05a
R+NPKST(0-9-6)	171a	126.286a	48.21bc
R+NPKSA (3-0-3)	122c	101.613b	57.09b
R+2P2KSA (0-0-6)	151b	95.503b	51.81bc
R+GP (9-9-9)	60e	53.177c	52.28bc
F-test	**	**	**
CV	12.1	23.3	14.1

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 14. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ นัมเบอร์ 75 ฤดูฝน ปี 2555 ศวพ. พิษณุโลก

กรรมวิธี	จำนวนฝักสดมาตรฐาน (ฝัก/ต้น)	ผลผลิตฝักสดรวม (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน (กก./ไร่)
Control	5bc	1,448.40b	364.57b	1,083.83b
GAP (22-11-13)[1/]	5bc	1,478.27b	383.47b	1,094.79b
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	12a	2,025.33a	903.93a	1,121.40b
R+NPKST(0-9-6)	3c	1,412.92b	406.77b	1,006.16b
R+NPKSA (3-0-3)	8ab	1,558.90b	559.50b	999.40b
R+2P2KSA (0-0-6)	4c	2,097.73a	461.47b	1,636.26a
R+GP (9-9-9)	13a	1,740.18ab	667.01ab	944.34b
F-test	**	**	**	*
CV	20.8	14.1	25.9	24.1

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ * ระดับนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 15. สมบัติบางประการของดินก่อนปลูก ศวพ.ลพบุรี ปี 2556 ฤดูฝน

สมบัติของดิน	ผลวิเคราะห์
ค่า pH	6.30
ปริมาณอินทรียวัตถุ	1.343%
ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (BrayII-P)	2 มก./กก.
ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exch.K^+)	78.11 มก./กก.
ลักษณะเนื้อดิน	ดินร่วนเหนียวปนทราย
จำนวนไรโซเบียม	22 เซลล์/กรัมดินแห้ง

ตารางที่ 16. ปริมาณปุ๋ยที่ต้องใส่ตามกรรมวิธี ศวพ.ลพบุรี ปี 2556 ฤดูฝน

กรรมวิธี	ปริมาณปุ๋ยเคมีที่ใส่เพิ่ม (N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่)
Control[1/]	0-0-0
GAP[2/]	22-11-13
R+1/2NPK(GAP)[3/]	11-11-13
R+NPKST[4/]	0-6-3
R+NPKSA[5/]	0-9-3
R+2P2KSA[6/]	0-18-6
R+GP[7/]	9-9-9

หมายเหตุ : [1/] กรรมวิธีควบคุมไม่ใส่ปุ๋ยชีวภาพและปุ๋ยเคมี

[2/] ใส่ปุ๋ยเคมีตามคำแนะนำ GAP (กรมวิชาการเกษตร, 2545) แบ่งใส่ 3 ครั้ง

[3/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยไนโตรเจนครึ่งอัตรา ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม ตามคำแนะนำ GAP (กรมวิชาการเกษตร, 2545) แบ่งใส่ 3 ครั้ง

[4/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมคำแนะนำตามลักษณะเนื้อดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[5/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมคำแนะนำตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[6/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมอัตรา 2 เท่า ตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2552) แบ่งใส่ 2 ครั้งพร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

[7/] ใส่ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ย 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ แบ่งใส่ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและที่ระยะออกดอก

ตารางที่ 17. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อการตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์เอจีเอส 292 ฤดูฝน ปี 2556 ศวพ.ลพบุรี

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนปม (ปม/4ต้น)	ค่า ARA ($\mu mole C_2H_4$/ชม./4ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/4ต้น)
Control	42c	4.520c	0.098
GAP (22-11-13)[1/]	67ab	6.553c	0.085
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	77a	7.804c	0.165
R+NPKST(0-6-3)	68ab	8.383bc	0.148
R+NPKSA (0-9-3)	67ab	12.626ab	0.248
R+2P2KSA (0-18-6)	89a	13.237a	0.270
R+GP (9-9-9)	78a	5.148c	0.215
F-test	*	**	ns
CV	7.9	26.7	36.7

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ * ระดับนัยสำคัญทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 18. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เอจีเอส 292 ฤดูฝน ปี 2556 ศวพ.ลพบุรี

กรรมวิธี	จำนวนฝักสดมาตรฐาน (ฝัก/ต้น)	ผลผลิตฝักสดรวม (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน (กก./ไร่)
Control	5c	1,176b	190c	986c
GAP (22-11-13)[1/]	8a	1,720a	298ab	1,422ab
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	6bc	1,500a	346a	1,154bc
R+NPKST(0-6-3)	6bc	1,568a	238bc	1,330ab
R+NPKSA (0-9-3)	6bc	1,696a	275b	1,420ab
R+2P2KSA (0-18-6)	6bc	1,640a	285b	1,355ab
R+GP (9-9-9)	6bc	1,776a	274b	1,502a
F-test	*	**	**	*
CV	8.1	9.6	19.6	14.0

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ * ระดับนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 19. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อการตรึงไนโตรเจนและการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์นัมเบอร์ 75 ฤดูฝน ปี 2556 ศวพ.ลพบุรี

กรรมวิธีทดลอง	จำนวนปม (ปม/4ต้น)	ค่า ARA ($\mu mole C_2H_4$/ชม./4ต้น)	น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม/4ต้น)
Control	51b	6.750d	35.190
GAP (22-11-13)[1/]	73ab	8.155cd	28.720
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	115a	14.694bcd	31.870
R+NPKST(0-6-3)	91a	29.439a	29.660
R+NPKSA (0-9-3)	63b	10.011bcd	32.650
R+2P2KSA (0-18-6)	95ab	18.313b	35.570
R+GP (9-9-9)	76ab	17.007bc	24.848
F-test	*	**	ns
CV	7.2	29.9	25.8

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ * ระดับนัยสำคัญทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 20. ผลของการใช้ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียมต่อผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ นัมเบอร์ 75 ฤดูฝน ปี 2556 ศวพ.ลพบุรี

กรรมวิธี	จำนวนฝักสดมาตรฐาน(ฝัก/ต้น)	ผลผลิตฝักสดรวม (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดมาตรฐาน (กก./ไร่)	ผลผลิตฝักสดไม่ผ่านมาตรฐาน (กก./ไร่)
Control	4	1,032	165b	867
GAP (22-11-13)[1/]	5	1,216	240a	976
R+1/2NPK(GAP)(11-11-13)	6	1,353	248a	1,105
R+NPKST(0-6-3)	5	1,264	247a	1,017
R+NPKSA (0-9-3)	5	1,232	242a	990
R+2P2KSA (0-18-6)	5	1,160	267a	891
R+GP (9-9-9)	4	1,224	257a	967
F-test	ns	ns	**	ns
CV	11.0	10.5	12.5	13.0

หมายเหตุ : [1/] อัตราปุ๋ย N-P_2O_5-K_2O กก./ไร่

**ระดับนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และ ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

การพัฒนาเทคนิคการจำแนกชนิดแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

Development of an Identification Method for Potassium Solubilizing Bacteria

ศิริลักษณ์ จิตรอักษร[1] ศฟิษา สังวิเศษ[2]

กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการจำแนกแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการจำแนกที่ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง และทำได้อย่างรวดเร็ว ดำเนินการโดยจำแนกชนิดแบคทีเรียอย่างรวดเร็วโดยใช้หลักการใช้แหล่งคาร์บอนร่วมกับระบบ Biolog MicroStation System Microlog version 4.20.05 เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบส 400-500 เบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing) ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ 3 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวก 6 ไอโซเลต และ *Bacillus circulans* ใช้เป็นเชื้ออ้างอิง พบว่าการจำแนกแบคทีเรียแกรมลบโดยใช้เทคนิค Biolog ด้วยอาหาร BUG+GN2 plate โดยบ่มปฏิกิริยาที่ 30 ºC 22 ชั่วโมง มีความเหมือนกับผลการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA ในระดับสกุล *Pseudomonas* จำนวน 2 ไอโซเลต (66.7%) เมื่อใช้อาหาร BUG+GP2 plate และบ่มปฏิกิริยาที่ 30 ºC 20-24 ชั่วโมง พบว่าการจำแนกแบคทีเรีย แกรมบวกมีความเหมือนกันในระดับสกุลและชนิดของ *Bacillus circulans*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium nitrilophilus* และ *Cellulosimicrobium cellulans* จำนวน 5 ไอโซเลต ระบบ Biolog สามารถใช้ในการจำแนกบางสกุลหรือบางสกุลและชนิดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว คิดเป็น 50% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี 16S rDNA sequencing แต่ไม่ครอบคลุมทุกชนิดของแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* และ *Corynebacterium* ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร

คำสำคัญ: การจำแนกชนิดแบคทีเรีย Biolog system 16S rRNA แบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

Abstract

This research was aimed to developing accuracy and rapid identification method for potassium solubilizing bacteria (PSB). The Biolog MicroStation Microlog version 4.20.05 identification system was compared to the 16S rRNA gene (16S rDNA sequencing) about 500 bps. The methods were evaluated using 10 PSB isolates. Three of them are gram negative bacteria and six are of gram positive ones plus *Bacillus circulans* as a reference strain. The results indicated that all gram negative bacteria were identified using BUG+GN2 after incubation at 30 °C for 20 hrs. In addition, it was similar to the results

---

[1] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น

obtained from 16S rDNA method in genus *Pseudomonas* by 2 isolates (66.7%). However, BUG+GP2 incubation for 20-24 hrs. was acceptable for the investigated gram positive strains. Of 5 isolates, 71.4% were identical to genus and species level as fell into the following: *Bacillus circulans*, *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium nitrilophilus* and *Cellulosimicrobium cellulans*. The Biolog system is accuracy and rapid for identification of some genus and species of agricultural bacteria. Its accuracy is approximately 50% in comparison to 16S rDNA sequencing, but not full coverage of *all* species in *Pseudomonas* and *Corynebacterium* determined in this study.

Key words: Biolog system identification, 16S rRNA sequencing, potassium solubilizing bacteria

คำนำ

จุลินทรีย์ดินมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนธาตุอาหารพืชในดินรวมถึงธาตุโพแทสเซียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ละลายธาตุอาหารพืชโดยกิจกรรมการย่อยสลาย จุลินทรีย์ดินหลายชนิดสามารถละลายแร่ที่มีโพแทสเซียมเป็นองค์ประกอบ เช่น เฟลด์สปาร์ ไมกา อิลล์ไลต์ และ ออร์โธแคลส เป็นต้น เช่น แบคทีเรียซิลิเกต ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งที่สามารถละลายโพแทสเซียม ซิลิกอน และอลูมินั่มที่เป็นองค์ประกอบของแร่ที่ไม่ละลายให้สามารถละลายได้และอยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Aleksandrov *et al*., 1967; Vandeviver *et al.,* 1994) วิธีการหนึ่งในการลดค่าใช้จ่ายปุ๋ยเคมีนั่นคือการนำจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายอนินทรีย์โพแทสเซียมให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้มาผลิตในรูปผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพ ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ปุ๋ยชีวภาพที่จำหน่ายในประเทศไทยที่สามารถทดแทนหรือส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้ปุ๋ยเคมีและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมีหลายชนิด เช่น ปุ๋ยชีวภาพไรโซเบียม ปุ๋ยชีวภาพอาบัสคูลาไมคอร์ไรซ่า และปุ๋ยชีวภาพจุลินทรีย์ละลายฟอสเฟต แต่เพื่อความปลอดภัยของผู้ผลิตและผู้บริโภคผลิตผลทางการเกษตรจากการใช้ปุ๋ยชีวภาพนั้น ตลอดจนไม่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม จึงต้องมีข้อบังคับในการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพต้องไม่ก่อให้เกิดโรคต่อคน สัตว์ และพืช

การพิสูจน์เอกลักษณ์หรือการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสามารถทำได้โดยใช้วิธีการต่างๆ ได้แก่ วิธีการทั่วไปทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีแบบอัตโนมัติ และการวิเคราะห์โดยใช้สมบัติพื้นฐานทางชีวโมเลกุล เป็นต้น วิธีการทั่วไปนั้นเป็นที่รู้จักดีและใช้ในการจำแนกแบคทีเรียมาเป็นเวลานานและในปัจจุบันถือเป็นส่วนหนึ่งของวิธีการในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ (phenotypic characteristics) เช่น ลักษณะทางรูปร่าง การติดสีย้อมแบบแกรม การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี เป็นต้น ซึ่งวิธีการนี้ใช้ความรู้พื้นฐานเป็นหลักสำคัญแต่มีข้อเสียคือใช้เวลานานในการพิสูจน์เอกลักษณ์ วิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียโดยใช้ความรู้พื้นฐานทางชีวโมเลกุลมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ คือ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing) จีโนมของแบคทีเรียทุกชนิดมีส่วน highly conserved region ซึ่งความผันแปรภายในบริเวณนี้มีลักษณะที่โดดเด่นและจำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละชนิด (Dubnau *et al*., 1965; Woese, 1987; Woese *et al*., 1985) แต่วิธีการนี้มีความอ่อนไหวมากและเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงซึ่งต้องใช้ผู้ปฏิบัติงานที่มีความรู้เฉพาะทางเรื่อง

เครื่องมือและการแปลผล การวิเคราะห์ต้องกระทำด้วยความละเอียดรอบคอบจึงจะทำให้ได้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ (Clarridge, 2004) ในปี 1991 ได้มีการพัฒนาระบบการพิสูจน์เอกลักษณ์หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ขึ้นมาแบบอัตโนมัติโดยใช้สมบัติทางชีวเคมีในการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด นั่นคือ Biolog system (Biolog, Hayward, CA) ซึ่งประกอบด้วย microstation computer เครื่องวัดความขุ่น โปรแกรม Microlog ถาดหลุมที่บรรจุแหล่งคาร์บอน 95 ชนิด ตัวอย่างการนำ Biolog system มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ เช่น Morgan *et al.,* (2009) ได้เปรียบเทียบวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทางการแพทย์จำนวน 159 ไอโซเลตระหว่าง Biolog system กับ 16S rRNA พบว่าวิธีการ 16S rRNA gene sequencing มีเปอร์เซ็นต์ ความเที่ยงตรงสูง 90.6% ในขณะที่วิธีการ Biolog system มีความเที่ยงตรง 68.3% ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ปฏิบัติได้ง่าย และรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

แบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 10 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมลบ 3 ไอโซเลต แบคทีเรียแกรมบวก 7 ไอโซเลต และ *Bacillus circulans* เป็นแบคทีเรียอ้างอิง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ชุดวิเคราะห์ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05 ถาดหลุมบรรจุแหล่งคาร์บอน 95 ชนิด สำหรับวิเคราะห์แบคทีเรียแกรมลบ (GN2) และแบคทีเรียแกรมบวก (GP2) สารเคมีและอุปกรณ์อื่นที่จำเป็นในการวิเคราะห์

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็งซิลิเกตแบคทีเรียที่เติมสารบรอมไธมอลบูล ที่ 25-30 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกลักษณะรูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นแข็ง Nutrient Agar (NA) ที่ 25-30 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ตามคู่มือปฏิบัติการ Biolog system แบคทีเรียแกรมลบทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase test) โดยหยดน้ำยา Kovac's oxidase reagent บนกระดาษกรอง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อพลาสติกเขี่ยเชื้อลงบนกระดาษกรอง อ่านผลภายใน 10 วินาที แบคทีเรียไอโซเลตใดที่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสจะสังเกตเห็นสีน้ำเงิน สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกย้อมสีเพื่อตรวจสอบการสร้างสปอร์และทดสอบการผลิตเอนไซม์แคตาเลส (catalase test) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อพลาสติกเขี่ยเชื้อแตะลงบนสไลด์จากนั้นหยด H_2O_2 ความเข้มข้น 3% แบคทีเรียไอโซเลตใดสร้างเอนไซม์แคตาเลสจะสังเกตเห็นการเกิดฟอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วย Biolog system

การจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมลบทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร BUG ที่ 30 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักเชื้อใส่ใน inoculating fluid ให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและใส่ thioglycolate 3 หยด และปรับให้มีความขุ่น 52-61% ตามสมบัติการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส จากนั้นหยดสารแขวนลอยของเชื้อใส่ในถาดหลุม GN2 หลุมละ 150 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 ºC ตามลักษณะของแบคทีเรีย เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง จึงนำถาดหลุมนั้นไปวิเคราะห์ผลด้วยระบบ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05

การจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมบวกทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหาร BUG ที่ 30 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักเชื้อใส่ใน inoculating fluid ให้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและใส่ thioglycolate 3 หยดหรือไม่ใส่ในกรณีแบคทีเรียสร้างสปอร์ และปรับให้มีความขุ่น 20-28% จากนั้นหยดสารแขวนลอยของเชื้อใส่ในถาดหลุม GP2 หลุมละ 150 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 ºC ตามลักษณะของแบคทีเรีย เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง จึงนำถาดหลุมนั้นไปวิเคราะห์ผลด้วยระบบ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing)

สกัดแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม จำนวน 10 ไอโซเลต โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ (DNA extraction kit, Promega®) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ f5'-AAA CTY AAA KGA ATT GAC-3' และ r5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3' ส่วนผสม PCR ประกอบด้วย 10 nmole DNA, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 10xbuffer ที่มีส่วนผสมของ 1.5 mM $MgCl_2$ และ 0.5 U Taq DNA polymerase สภาวะการทำ PCR คือ 98 ºC 5 นาที ตามด้วย 95 ºC 30 วินาที 60 ºC 30 วินาที และ 72 ºC 1 นาที 35 รอบ และ 72 ºC 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์ด้วยวิธี BLAST analysis กับ NCBI GenBank database และสรุปผลการเปรียบเทียบกับการจำแนกโดย Biolog system

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553- กันยายน 2556

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

แบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 3 ไอโซเลต ที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) ไอโซเลต K02001 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ cocci ติดสีแกรมลบและผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (ภาพที่ 1) ไอโซเลต K02004 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ cocci ติดสีแกรมลบและไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส ส่วนไอโซเลต K02005 โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ rod ติดสีแกรมลบและไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส แบคทีเรียแกรมบวก 6 ไอโซเลต มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติในการสร้างเอนไซม์เหมือนกัน คือ โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ rod ติดสีแกรมบวก และผลิตเอนไซม์ แคตาเลส (ภาพที่ 2) ยกเว้น *Bacillus circulans* ที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่างเซลล์ bacilli ติดสีแกรมบวกและผลิตเอนไซม์แคตาเลส

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วย Biolog system

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมลบด้วย Biolog system ทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยระบบ Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05 พบว่าสามารถอ่านผลวิเคราะห์ได้เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 30 ºC เป็นเวลา 22 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) สามารถจำแนกได้ 2 สกุล คือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* โดยจำแนกชนิดของแบคทีเรียไอโซเลต K02001

เป็น *Pseudomonas citronellolist* แต่ไม่สามารถแสดงค่า probability ได้ ไอโซเลต K02004 เป็น *Pseudomonas syringae* pv. tabaciA ซึ่งมีค่า probability 81% similarity 0.587 และ distance 4.15 ส่วนไอโซเลต K02005 จำแนกเป็น *Acinetobacter calcoaceticus* ที่ไม่สามารถแสดงค่า probability ได้

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียแกรมบวกด้วย Biolog system ทั้ง 7 ไอโซเลต ด้วยระบบ Biology พบว่าสามารถอ่านผลวิเคราะห์ได้เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 30 ºC เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) และจำแนกได้ 5 สกุล คือ *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Clavibacter*, *Cellulosimicrobium* และ *Bacillus* โดยไอโซเลต K01026 จำแนกชนิดเป็น *Cellulomonas flavigena* ให้ค่า probability 95% ค่า similarity 0.769 distance 3.42 ไอโซเลต K02018 จำแนกเป็น *Corynebacterium nitrilophilus* แต่ไม่สามารถอ่านค่า probability ได้ ไอโซเลต K05078 จำแนกเป็น *Clavibacter agropyri* ค่า probability 98% ค่า similarity 0.625 distance 5.62 ไอโซเลต K06009 จำแนกเป็น *Corynebacterium bovis* แต่ไม่สามารถอ่านค่า probability ได้ ไอโซเลต K07002 จำแนกเป็น *Cellulosimicrobium cellulans* ค่า probability 100% ค่า similarity 0.553 distance 7.00 (ภาพที่ 3) ไอโซเลต K07009 จำแนกเป็น *Cellulosimicrobium cellulans* ค่า probability 33% ค่า similarity 0.293 distance 11.23 และ *Bacillus circulans* เชื้ออ้างอิงจำแนกเป็น *Bacillus circulans* ค่า probability 99% ค่า similarity 0.769 distance 3.42

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA sequencing)

ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยไพร์เมอร์สายสั้นได้ผลผลิต PCR-16S rDNA ที่มีขนาด ประมาณ 500 bp (ภาพที่ 4) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA และเปรียบเทียบกับลำดับเบสของจุลินทรีย์ด้วยวิธี BLAST analysis กับ NCBI GenBank database (ตารางที่ 3) พบว่า ไอโซเลต K02001 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Pseudomonas fluorescens* 100% ไอโซเลต K02004 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Pseudomonas syringae* 100% ไอโซเลต K02005 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Burkholderia cepacia* 99% ไอโซเลต K01026 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulomonas flavigena* 100% ไอโซเลต K02018 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Corynebacterium nitrilophilus* 100% ไอโซเลต K05078 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Corynebacterium nitrilophilus* 99% ไอโซเลต K06009 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 99% ไอโซเลต K07002 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 100% ไอโซเลต K07009 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Cellulosimicrobium cellulans* 100% และ *Bacillus circulans* เชื้ออ้างอิงมีลำดับเบสที่มีความเหมือนกับลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของ *Bacillus circulans* 100%

เมื่อเปรียบเทียบผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วย Biolog system กับ 16S rDNA sequencing (ตารางที่ 4) พบว่า Biology system สามารถใช้ในการจำแนกสกุลของแบคทีเรียแกรมลบได้ตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing จำนวน 2 ใน 3 ไอโซเลต หรือ 66.7% ใน 1 สกุล คือ *Pseudomonas* และตรงกับสกุลและชนิด 1 ไอโซเลต คือ

Pseudomonas syringae และจำแนกสกุลแบคทีเรียแกรมบวกได้ตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing 5 ใน 7 ไอโซเลต หรือ 71.4% ใน 4 สกุล *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Cellulosimicrobium* และ *Bacillus* แต่สามารถจำแนกสกุลและชนิดได้ตรงกัน 4 ไอโซเลต หรือ 57.1% คือ *Corynebacterium nitrilophilus*, *Cellulosimicrobium cellulans* และ *Bacillus circulans* โดยภาพรวม Biolog system สามารถใช้จำแนกแบคทีเรียละลายโพแทสเซียมที่ให้ผลตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing ในระดับ สกุลและชนิด จำนวน 5 ไอโซเลต คิดเป็น 50% ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Morgan *et al.* (2009) ที่เปรียบเทียบระบบการจำแนกระหว่าง Biolog Omnilog กับ 16S rDNA sequencing ของแบคทีเรียทางการแพทย์จำนวน 159 ไอโซเลต พบว่าการจำแนกโดยใช้ 16S rDNA sequencing มีความถูกต้อง เที่ยงตรงสูงกว่าวิธี Biolog โดยวิธีแรกให้ความถูกต้อง 90.6% ในขณะที่วิธี Biolog มีความถูกต้อง 68.3% เป็นที่สังเกตพบว่ามีจำนวน 2 ไอโซเลตที่ใช้ Biolog จำแนกด้วย Biolog system แล้วได้ผลวิเคราะห์สกุลที่แตกต่างจากวิธีของ 16S rDNA เช่น ไอโซเลต K02005 ที่ได้ผลจำแนกเป็น *Acinetobacter* ในขณะที่ใช้ 16S rDNA เป็น *Burkholderia* และไอโซเลต K05078 ได้ผลจำแนกเป็น *Clavibacter* แต่ 16S rDNA เป็น *Corynebacterium* กรณีแรกอาจเป็นเพราะการจัดกลุ่มใหม่ของ *Burkholderia* ที่แยกออกจาก *Pseudomonas* แต่โปรแกรมข้อมูลใน Biolog มีข้อมูลแบคทีเรียชนิดอื่น ในทำนองเดียวกับผลงานวิจัยของ Morgan *et al.* (2009) ที่พบว่า Biolog ไม่สามารถจำแนก *Paenibacillus* sp และ *Bacillus* spp. หลายชนิดได้ (Ko *et al.,* 2008) และด้วยเหตุที่วิธี Biolog นั้นเป็นวิธีที่ต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์เท่านั้น และต้องเลี้ยงให้เจริญ ดังนั้นในกรณีที่เชื้อมีอัตราการเจริญช้าและสร้างเมือกในปริมาณมากซึ่งเป็นอุปสรรคในการเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุดซึ่งจะส่งผลทำให้ผลการวิเคราะห์มีความผิดพลาดสูง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยวิธี Biolog system สามารถใช้กับจุลินทรีย์ทางการเกษตรบางชนิดได้ เช่น จำแนกชนิดของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม ซึ่งให้ผลตรงกับการจำแนกด้วยวิธี 16S rDNA sequencing และเป็นวิธีที่ไม่ซ้ำซ้อน ทำได้ง่าย และรวดเร็ว โดยแบคทีเรียแกรมลบต้องใช้ถาดหลุม GN2 และบ่มปฏิกิริยาที่ 30 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกต้องใช้ถาดหลุม GP2 บ่มปฏิกิริยาที่ 30 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ตรวจสอบและมีความถูกต้องตรงกับวิธี 16S rDNA sequencing ได้แก่ *Pseudomonas syringae* (แบคทีเรียโรคพืช) *Cellulomonas flavigena*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Cellulosimicrobium cellulans* และ *Bacillus circulans* ซึ่งมีความถูกต้อง คิดเป็น 50% น้อยกว่าการจำแนกด้วยวิธี 16S rDNA sequencing อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการซื้ออาหาร BUG agar ตามวิธีของ Biolog ควรวิจัยพัฒนาสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง ตรงกับการใช้ BUG agar

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยต่อยอดวิธีการจำแนกแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการบ่มปฏิกิริยา

เอกสารอ้างอิง

Aleksandrov, V. G., R. N. Blagodry, and I. P. Ilev. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. ***Mikrobiolohichnyi Zhurnal*** (*Kiev*) 29:111-114.

Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. ***Clinical Microbiology Review*** 17: 840-862.

Dubnau, D., I. Smith, P. Morell and J. Marmur. 1965. Gene conservation in Bacillus species. ***Proceeding Natural Academic Science*** U. S. A. 54:491-498.

Ko, K. S., W. Oh, M. Y. Lee, H. Lee, K. R. Peck, N. Y. Lee and J. H. Song. 2008. *Paenibacillus infantis* sp. nov. and *Bacillus idriensis* sp. nov., isolated from a patient with neonatal sepsis. ***International Journal Systematic Evolution Microbiology*** 56:2541-2544.

Morgan, M. C., B. Marilyn, G. Chris, V. S. Katharine and R. G. Shermalyn. 2009. Comparison of the Biolog Omnilog identification system and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. ***Journal of Microbiological Methods*** 79:336-343.

Vandevivere, P., S. A. Welch, W. j. Ullman and D. L. Kirchman.1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. ***Microbial Ecology*** 27:241-251.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. ***Microbiology Molecular Biology Review*** 51:221-271.

Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke and G. E. Fox. 1985. A phylogenetic definition of major eubacterial taxa. ***Systematic Applied Microbiology*** 6:143-151.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียละลายโพแทสเซียม

ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	การสร้างเอนไซม์แคตาเลส
K02001	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง cocci ติดสีแกรมลบ	สร้างเอนไซม์	ไม่ทดสอบ
K02004	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง cocci ติดสีแกรมลบ	ไม่สร้างเอนไซม์	ไม่ทดสอบ
K02005	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมลบ	ไม่สร้างเอนไซม์	ไม่ทดสอบ
K01026	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์
K02018	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์
K05078	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์
K06009	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์
K07002	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์
K07009	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง rod ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์
Bacilllus circulans	โคโลนีสีเหลือง ขอบเรียบ รูปร่าง bacilli ติดสีแกรมบวก	ไม่ทดสอบ	สร้างเอนไซม์

ตารางที่ 2. สภาวะการบ่มปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วย Biolog system

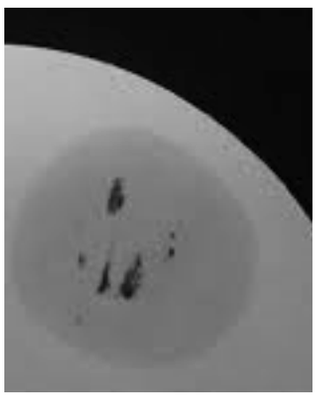
ไอโซเลต	สภาวะการบ่มปฏิกิริยา	ผลการจำแนกโดย Biolog system
K02001	30°ซ, 22 ชม.	*Pseudomonas citronellolist*
K02004	30°ซ, 22 ชม.	*Pseudomonas syringae* pv. tabaciaA
K02005	30°ซ, 22 ชม.	*Acinetobacter calcoaceticus*
K01026	30°ซ, 20 ชม.	*Cellulomonas flavigena*
K02018	30°ซ, 24 ชม.	*Corynebacterium nitrilophilus*
K05078	30°ซ, 22 ชม.	*Clavibacter agropyri*
K06009	30°ซ, 24 ชม.	*Corynebacterium bovis*
K07002	30°ซ, 20 ชม.	*Cellulosimicrobium cellulans*
K07009	30°ซ, 20 ชม.	*Cellulosimicrobium cellulans*
Bacillus circulans	30°ซ, 20 ชม.	*Bacillus circulans*

ตารางที่ 3. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี partial 16S rRNA sequencing (16S rDNA)

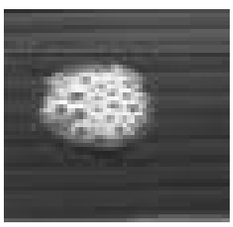
ไอโซเลต	Length (bases)	Identities (%)	Definition
K02001	497	100	*Pseudomonas fluorescens*
K02004	489	100	*Pseudomonas syringae*
K02005	494	99	*Burkholderia cepacia*
K01026	497	100	*Cellulomonas flavigena*
K02018	495	100	*Corynebacterium nitrilophilus*
K05078	499	99	*Corynebacterium nitrilophilus*
K06009	489	99	*Cellulosimicrobium cellulans*
K07002	472	100	*Cellulosimicrobium cellulans*
K07009	485	100	*Cellulosimicrobium cellulans*
Bacillus circulans	493	100	*Bacillus circulans*

ตารางที่ 4. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วย Biolog system กับวิธี 16S rDNA sequencing

ไอโซเลต	Biolog system	16S rDNA sequencing
K02001	*Pseudomonas citronellolist*	*Pseudomonas fluorescens*
K02004	*Pseudomonas syringae* pv. tabaciA	*Pseudomonas syringae*
K02005	*Acinetobacter calcoaceticus*	*Burkholderia cepacia*
K01026	*Cellulomonas inchonesis*	*Cellulomonas flavigena*
K02018	*Corynebacterium nitrilophilus*	*Corynebacterium nitrilophilus*
K05078	*Clavibacter agropyri*	*Corynebacterium nitrilophilus*
K06009	*Corynebacterium bovis*	*Cellulosimicrobium cellulans*
K07002	*Cellulosimicrobium cellulans*	*Cellulosimicrobium cellulans*
K07009	*Cellulosimicrobium cellulans*	*Cellulosimicrobium cellulans*
Bacillus circulans	*Bacillus circulans*	*Bacillus circulans*



ภาพที่ 1. ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสของแบคทีเรีย K02001



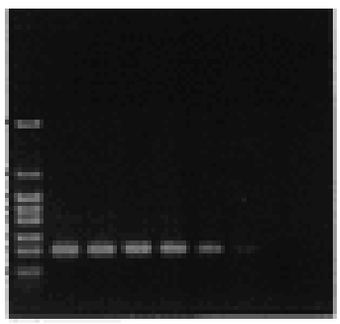
ภาพที่ 2. ทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของแบคทีเรีย K07002



(ก) (ข)

ภาพที่ 3. (ก) ปฏิกิริยารีดักชั่น C-source ในถาดหลุม GP2

(ข) ผลการจำแนกแบบอัตโนมัติโดย Biolog MicroStation System Microlog 4.20.05



ภาพที่ 4. ภาพถ่าย PCR product ชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแกรมบวก จำนวน 6 ไอโซเลต รหัส K01026 K02018 K05078 K06009 K07002 และ K07009


สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร