

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยเทคนิค
อินดักทีฟพลาสมาสเปกโตรเมทรี
Development and Method Validation of Boron in soil by Inductively
Coupled Plasma Emission Spectrometry Techniques

จิตติรัตน์ ชูชาติ สกกรานต์ มะลิสอน พจมาลย์ ภู่อสาร ญาณธิชา จิตต์สะอาด
สุภา โพธิจันทร์ กัณฐณา คล้ายแก้ว
Jittirat Choochat Songkrant Malisorn Pojjamarn Poosarn Yamticha Jittsa-aad
Supha Photichan Kanthana Klaigaew

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Development and Method Validation of boron in soil by using Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) found that validated range from 0.05 - 1.90 mg/kg boron, the Limit of Detection (LOD) was 0.03 mg/kg and Limit of Quantitation (LOQ) was 0.04 mg/kg. To prove the trueness and precision at LOQ concentration (0.05 mg/kg) was 99.06% Recovery and HorRat (Horwitz'Ratio) was 0.91. The CRM analysis to prove concentrations (0.17, 0.56, 1.90 mg/kg) %Recovery were 95.29, 101.61 and 100.05 % respectively. HorRat (Horwitz'Ratio) were 0.43, 0.38 and 0.46 respectively. The results of analysis showed that the acceptance criteria (% Recovery in the ranges from 80-110% and HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3). When studying ruggedness using. It was found that the boron analysis was not affected by changes in the environment. Therefore, this method is effective and suitable for use in the analysis of boron in soil. That is routine work and needs fast, accurate analysis results with Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry Techniques.

Keywords : Method validation, Boron in soil, Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry

บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินในรูปของ Extractable Boron โดยการสกัดดินด้วยวิธี Hot-CaCl₂ soluble Boron และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer โดยมีขอบข่ายของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินอยู่ในช่วง 0.05 – 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีผลการทดสอบ พบว่า ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อพิสูจน์ค่าความถูกต้อง (Trueness) และค่าความเที่ยง (Precision) ของ LOQ ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 99.06 และ HorRat (Horwitz'Ratio) เท่ากับ 0.91 ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง (Trueness) และค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 95.29, 101.61 และ 100.05 ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.40, 0.38 และ 0.46 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ทั้งหมด โดย %Recovery อยู่ในช่วง 80-110% และ HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3 ผลการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลง

สภาวะแวดล้อม Ruggedness พบว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของการทดสอบ ไม่มีผลกระทบต่อวิธีวิเคราะห์ โบรอน และวิธีมีความคงทนต่อการนำไปใช้เป็นวิธีอ้างอิงของห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์โบรอนที่สกัดได้ในดิน ด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry จึงมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจ ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ

คำสำคัญ : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี, โบรอนในดิน, เทคนิคอินดักทีฟเพลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

คำนำ

โบรอนเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เป็นธาตุอาหารเพียงธาตุเดียวที่ให้ผลตอบสนองสูงมากเมื่อใส่ให้พืชในปริมาณที่น้อย แต่ถ้าใส่โบรอนในปริมาณที่สูงเพียงเล็กน้อยจากอัตราที่แนะนำ โบรอนก็อาจเป็นพิษหรือทำให้เกิดความเสียหายได้ ในดินทั่วไปโบรอนในสารละลายดินอยู่ในรูป H_3BO_3 หรือ $B(OH)_3$ โบรอนละลายได้ดีในสภาพดินเป็นกรด และสามารถถูกชะละลายออกจากดินได้ง่าย โบรอนมีบทบาทอย่างมากต่อการสร้างและคงรูปของผนังเซลล์และการผสมของละอองเกสร นอกจากนี้ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังเซลล์ พืชที่ขาดโบรอนมักมีรูปทรงผิดปกติที่ผล การใส่โบรอนและแคลเซียมมีผลทำให้เมล็ดมีความแข็งแรงขึ้น ในพืชหลายชนิดอาการขาดแคลเซียมและโบรอนมีลักษณะใกล้เคียงกัน เนื่องจากธาตุทั้งสองมีบทบาทและหน้าที่หลายอย่างร่วมกัน (Marschner, 1995) โดยถั่วลิสงเป็นพืชที่แสดงอาการขาดโบรอนได้อย่างชัดเจน ถั่วลิสงที่ปลูกในดินที่ขาดโบรอนทำให้เกิดเมล็ดกลวง หรือ Hollow heart seed (Cox *et al.*, 1982) ซึ่งเป็นเมล็ดที่มีเนื้อเยื่อตันใน (เมื่อแยกเมล็ดออกเป็น 2 ซีก) มีลักษณะผิวขรุขระ หากอาการขาดรุนแรงมากขึ้นเนื้อเยื่อเจริญไม่เต็มพื้นผิวเมล็ดและเกิดเป็นหลุม สีของเนื้อเยื่อบริเวณนี้อาจเป็นสีเหลือง จนถึงสีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม โดยปริมาณโบรอนที่สกัดได้ที่เพียงพอในดินจะอยู่ระหว่าง 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอน ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ การสกัดดินด้วยวิธี Hot- $CaCl_2$ soluble Boron แล้วสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer โดยตรง ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Method of soil analysis (Sparks *et al.*, 1996) ซึ่งดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งต้องผ่านการทำให้เกิดสีด้วยวิธี Curcumin หรือ Azomethine H แล้ววัดด้วยความยาวคลื่น 550 nm (Keren, 1996) ซึ่งพบว่าการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณโบรอนด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer ซึ่งใช้หลักการ Emission spectroscopy (แมน และคณะ, 2552) สามารถลดขั้นตอนการเจือจางความเข้มข้นและการทำให้สารละลายเกิดสีด้วย Azomethine H และ Curcumin ตามแบบวิธีเดิม และพบว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer มีความไวในการตรวจพบ และสามารถตรวจพบได้ในระดับที่ต่ำกว่าการใช้วิธี Spectrophotometer และ Flame photometer อีกด้วย (Sah and Brown, 1997) การทดลองนี้จึงมุ่งเน้นในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์โบรอนในดินด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยพิสูจน์ความแม่นยำ (Trueness) ความเที่ยง (Precision) ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (Range, Linearity) ปริมาณต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวัด (Limit of detection ; LOD) และรายงานผลได้ (Limit of Quantitation ; LOQ) เพื่อนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ดินในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
3. เครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer (ICP)
4. เครื่อง Hot plate
5. สาร Calcium chloride (CaCl_2)
6. สารละลายมาตรฐานโบรอน (Standard Boron) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
7. ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง NCS DC 85106a (0.17 ± 0.05 mg/kg Available Boron)
8. ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง GBW 07458 (0.56 ± 0.08 mg/kg Available Boron)
9. ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง GBW 07459 (1.90 ± 0.30 mg/kg Available Boron)
10. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทดสอบ

วิธีการ

1. หาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ในการวิเคราะห์โบรอนในดิน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้สารละลาย 0.02 M CaCl_2 นำสารละลายมาตรฐานไปวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ทำการปรับสภาวะของเครื่อง ได้แก่ wavelength plasma view ใช้มุมมอง Radial ค่า plasma flow, auxiliary flow, nebulizer flow, RF-power, Pump flow และ Uptake สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับสัญญาณของเครื่องมือ (Intensity) และเลือกสภาวะที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient (r) ที่สูงที่สุด

2. ศึกษา matrix effect โดยเปรียบเทียบความชันของกราฟมาตรฐานระหว่างสารละลายมาตรฐานโบรอนที่เตรียมในสารละลาย 0.02 M CaCl_2 ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Standard Boron) กับกราฟของสารละลายตัวอย่างดิน sample blank ที่เติมสารละลายมาตรฐานโบรอนที่เตรียมในสารละลาย 0.02 M CaCl_2 ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Spiked standard Boron) ดำเนินการตามวิธีวิเคราะห์โบรอนในดินที่สกัดด้วยวิธี Hot- CaCl_2 soluble Boron ตามวิธีการวิเคราะห์ของ Method of soil analysis (Sparks *et al.*, 1996) โดยชั่งตัวอย่างดิน sample blank จำนวน 25 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม สารละลายมาตรฐานโบรอนที่เตรียมในสารละลาย 0.02 M CaCl_2 ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วนดินต่อน้ำยาสกัด 0.02 M CaCl_2 เท่ากับ 1: 2) ปิดด้วย reflux condenser ต้มให้เดือด 5 นาที บนเตา Hot plate ยกออกจากเตา ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายด้วยกระดาษเบอร์ 42 และวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer พิจารณาความชันของกราฟ Standard Boron เทียบกับ Spiked Standard Boron ถ้าพบว่าผลต่างของค่าความชันของกราฟ หรือ %RPD น้อยกว่า 10% แสดงว่าไม่มี Matrix effect (Nata, 2018)

3. ศึกษาการรบกวนของธาตุเหล็ก ที่มีผลต่อปริมาณโบรอนในการวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้เหล็กเป็นตัวรบกวนการวิเคราะห์โบรอน โดยชั่งตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่มีปริมาณโบรอนความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง (0.17, 0.56 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 25 กรัม เติมสารละลายมาตรฐานเหล็กที่เตรียมในสารละลาย 0.02 M CaCl_2 ที่มีความเข้มข้นของเหล็ก 0, 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ปิดด้วย reflux condenser ต้มให้เดือด 5 นาที บนเตา Hot plate ยกออกจากเตา ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายด้วยกระดาษเบอร์ 42 และ

วัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer เปรียบเทียบ Intensity และความเข้มข้นของโบรอนที่วัดได้เมื่อมีการเติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก

4. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน ที่สกัดด้วยวิธี Hot-CaCl₂ soluble Boron และวัดปริมาณด้วยวิธี เครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ดังนี้

4.1. ศึกษาความเป็นเส้นตรง (Linearity)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลาย 0.02 M CaCl₂ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างดิน sample blank ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2) ปิดด้วย reflux condenser ต้มให้เดือด 5 นาที บนเตา Hot plate ยกออกจากเตา ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายด้วยกระดาษเบอร์ 42 วัดปริมาณโบรอนด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer

3) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้น หาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับที่ค่า $r \geq 0.995$

4) นำช่วงที่มีความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Range)

4.2. ศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Working range)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสารละลาย 0.02 M CaCl₂ เติมลงในตัวอย่างดิน sample blank ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2) ปิดจุกด้วย reflux condenser ต้มให้เดือด 5 นาที บนเตา Hot plate ยกออกจากเตา ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายด้วยกระดาษเบอร์ 42 วัดปริมาณโบรอนด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer

3) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง intensity กับความเข้มข้น หาช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับที่ค่า $r \geq 0.995$

4.3. พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material; CRM) โดยซึ่ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง ที่มีความเข้มข้นของโบรอน 0.17, 0.56 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จำนวน 25 กรัม เติมสารละลาย 0.02 M CaCl₂ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดด้วย reflux condenser ต้มให้เดือด 5 นาที บนเตา Hot plate ยกออกจากเตา ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายด้วยกระดาษเบอร์ 42 และวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer โดยทำการทดสอบระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery และ HorRat < 1.3 ตามมาตรฐานสากล Eurachem และ Official Method of Analysis of AOAC International (AOAC) (Eurachem, 2014; Latimer, 2016)

- การคำนวณ % Recovery จากสูตร

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

- การคำนวณ Precision

$$\text{HorRat (Horwitz' Ratio)} = \frac{\text{RSD}(r)}{\text{PRSD}(R)}$$

RSD(r) และ PRSD(R) คำนวณจากสูตรดังนี้

$$RSD(r) = \frac{SD \times 100}{\text{mean}}$$

$$PRSD(R) = \frac{2C^{-0.15} (C = \text{mean})}{100}$$

- 4.4. หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยใช้ค่า Standard deviation ของการวิเคราะห์ตัวอย่างดิน sample blank จำนวน 25 กรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และต่างวันเวลา เติมสารละลาย 0.02 M CaCl₂ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดด้วย reflux condenser ต้มให้เดือด 5 นาที บนเตา Hot plate ยกออกจากเตา ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายด้วยกระดาษเบอร์ 42 บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$LOD = 3S_0'$$

$$LOQ = 10S_0'$$

- 4.5. ตรวจสอบความคงทนของวิธีทดสอบโดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ
หาความคงทนของวิธีวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อย ของการวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่มีความเข้มข้นของโบรอน 0.17, 0.56 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน จำนวน 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 10 ซ้ำ ได้แก่ น้ำหนักตัวอย่าง ปริมาตรน้ำยาสกัด อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ จำนวน 3 ปัจจัย

ปัจจัย	สภาวะ	วิธีมาตรฐานที่ปฏิบัติ	วิธีที่มีเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย
1	น้ำหนักตัวอย่าง	25 กรัม	25.05 กรัม
2	ปริมาตรน้ำยาสกัด	50 มิลลิลิตร	51 มิลลิลิตร
3	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	100 °C	98 °C

ประเมินผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน โดยใช้ t-test เปรียบเทียบข้อมูล 2 กลุ่มที่สัมพันธ์กัน หรือไม่เป็นอิสระจากกัน (t-test dependent) โดยนำค่าที่คำนวณได้ (t-Stat) ไปเปรียบเทียบกับค่าที่จากตาราง (t-Critical) โดยมีเกณฑ์ว่าค่า t-Stat น้อยกว่าค่า t-Critical แสดงว่าค่าเฉลี่ยของการวัดจากข้อมูลทั้ง 2 ชุด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพดินและน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ในการวิเคราะห์โบรอนในดิน พบว่า ใช้ค่า wavelength ที่ 249.772 นาโนเมตร, plasma view ใช้มุมมอง Axial, Plasma flow เท่ากับ 14.0 ลิตรต่อนาที, Auxiliary flow เท่ากับ 0.8 ลิตรต่อนาที, Nebulizer flow เท่ากับ 1.20 ลิตรต่อนาที, RF-power 1.2 กิโลวัตต์, Pump Flow เท่ากับ 25 รอบต่อนาที และ Uptake เท่ากับ 25 วินาที ดังตารางที่ 2

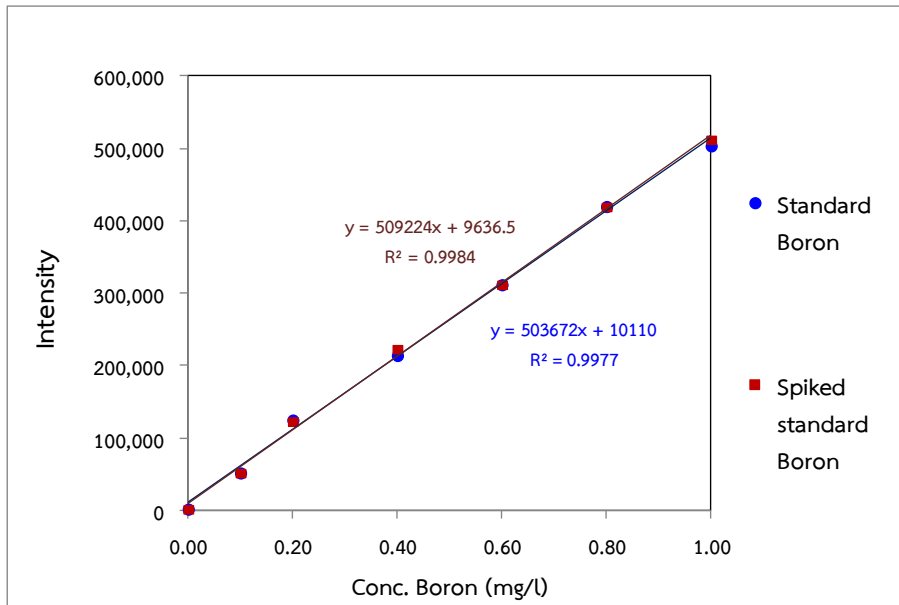
ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง Inductively Coupled Plasma Spectrometer ในการวิเคราะห์โบรอนในดิน

Parameter	Boron
Wave Length (nm)	249.772
Plasma View	Axial
Plasma (LPM)	14
Aux (LPM)	0.8
Neb (LPM)	1.2
RF Power (kW)	1.2
Pump Flow (RPM)	25
Uptake (sec)	25
Conc. of STD (mg/l)	0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0

2. ผลการทดสอบ matrix effect โดยเปรียบเทียบความชันของกราฟมาตรฐานระหว่าง Standard Boron กับ Spiked Standard Boron ลงใน Sample blank พบว่า ความชันของกราฟ Standard Boron มีค่าความแตกต่าง (%RPD) เท่ากับ 1.10% ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด % RPD ของความชันของกราฟต่างกันไม่เกิน 10% (NATA, 2018) แสดงว่า ไม่มีการรบกวนการวิเคราะห์โบรอนในช่วง 0 - 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 1

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียม (Concentration) กับสัญญาณจากเครื่องมือ (intensity) 7 ระดับ

standard Boron (mg/l)	Intensity of standard Boron	Intensity of spiked standard Boron
0.0	2345	2123
0.1	52341	52145
0.2	125435	123453
0.4	214678	223443
0.6	312456	312343
0.8	420543	419866
1.0	504356	512678



ภาพที่ 1 ความชันของ standard Boron และ spiked standard Boron ในช่วงความเข้มข้นของโบรอน 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การรบกวนของธาตุเหล็กที่มีผลต่อปริมาณโบรอนที่สกัดดินด้วยวิธี Hot-CaCl₂ soluble Boron และวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง โดยใช้เหล็กเป็นตัวรบกวนการวิเคราะห์โบรอน ซึ่งปริมาณเหล็กจะส่งผลให้ปริมาณโบรอนที่วิเคราะห์ได้มีค่าสูงกว่าความเป็นจริง (Keren, 1996) จากการทดลอง พบว่า ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ที่เติมสารละลายมาตรฐานเหล็ก 0, 5, 10, 20 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มี % Recovery อยู่ระหว่าง 82.35 – 108.93% ผ่านเกณฑ์กำหนดตามมาตรฐาน Official Method of Analysis of AOAC International (AOAC) (Latimer, 2016) (% Recovery 80-110) ในขณะที่การวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่มีการเติมเหล็กปริมาณมากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะส่งผลต่อการวิเคราะห์โบรอน เนื่องจากให้ผล % Recovery ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 4, 5 และ 6) ใดๆก็ตาม จากการศึกษาปริมาณเหล็กในดินเขตร้อนของ Sillanpaa (1982) พบว่า ปริมาณเหล็กที่สกัดได้ในดินด้วยวิธี AAC-EDTA extracts ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 2.2-104 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ Mielki *et al.* (2016) ที่ทำการศึกษาน้ำยาที่ใช้สกัดเหล็กชนิดต่างๆ ในดินเขตร้อน ได้แก่ น้ำยาสกัด Pyrophosphate, Ammonium oxalate, Dithionite-citrate, 0.01 M CaCl₂, Mehlich- I และ Mehlich-III พบว่า น้ำยาสกัด 0.01 M CaCl₂ ซึ่งเป็นน้ำยาสกัดชนิดเดียวกับการสกัดโบรอนในดิน ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กในดินเขตร้อนน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับน้ำยาสกัดชนิดอื่น โดยพบว่ามีปริมาณเหล็กอยู่ระหว่าง 2.29 – 4.65 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (< 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ในขณะที่น้ำยาสกัด Mehlich- I ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณเหล็กสูงสุดอยู่ในช่วง 36.4 – 196.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สอดคล้องกับการศึกษาของ Turner *et al.*, (2016) พบว่าสกัดโบรอนในดินด้วยวิธี Hot- CaCl₂ extracts ซึ่งสกัดดินด้วย CaCl₂ ไม่ส่งผลให้ปริมาณเหล็กรบกวนการวิเคราะห์โบรอน แต่การวิเคราะห์โบรอนด้วย Mehlich-III Extracts และ Total Boron ซึ่งการสกัดมีการใช้สารละลายที่มีความเป็นกรดสูง จะส่งผลให้ธาตุเหล็กละลายออกมาได้สูงจึงรบกวนการวิเคราะห์โบรอนได้ นอกจากนี้การศึกษาต่อมาของ Turner *et al.*, (2017) พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนที่สกัดดินด้วยวิธี Hot-CaCl₂ soluble Boron และวัดด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer ที่ wavelength 249.772 นาโนเมตร ไม่พบการรบกวนของธาตุเหล็กที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์โบรอนในดิน เนื่องจากปริมาณเหล็กที่ละลายออกมาจากการสกัดโบรอนมีปริมาณน้อยมาก ทั้งนี้หากวิเคราะห์ปริมาณโบรอนด้วยวิธี Mehlich-III Extracts และ Total Boron จะพบการรบกวนของเหล็ก และสามารถลดการรบกวนของเหล็กได้โดยใช้ wavelength 208.597 นาโนเมตร

ตารางที่ 4 % recovery ของการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่มีโบรอน 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Analyte	Soil with Boron 0.17 mg/kg			
	Fe Concentration (mg/l)	Intensity	Conc. Boron (mg/kg)	% Recovery
1	0	77404	0.17	100.00
2	5	77246	0.16	94.12
3	10	77335	0.15	88.24
4	20	77654	0.18	105.88
5	50	77168	0.14	82.35
6	100	77123	0.12	70.59
7	200	77098	0.10	58.82

ตารางที่ 5 % recovery ของการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่มีโบรอน 0.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Analyte	Soil with Boron 0.56 mg/kg			
	Fe Concentration (mg/l)	Intensity	Conc. Boron (mg/kg)	% Recovery
1	0	221741	0.57	101.79
2	5	222343	0.60	107.14
3	10	219236	0.49	87.50
4	20	222068	0.58	103.57
5	50	224353	0.61	108.93
6	100	218754	0.40	71.43
7	200	216451	0.39	69.64

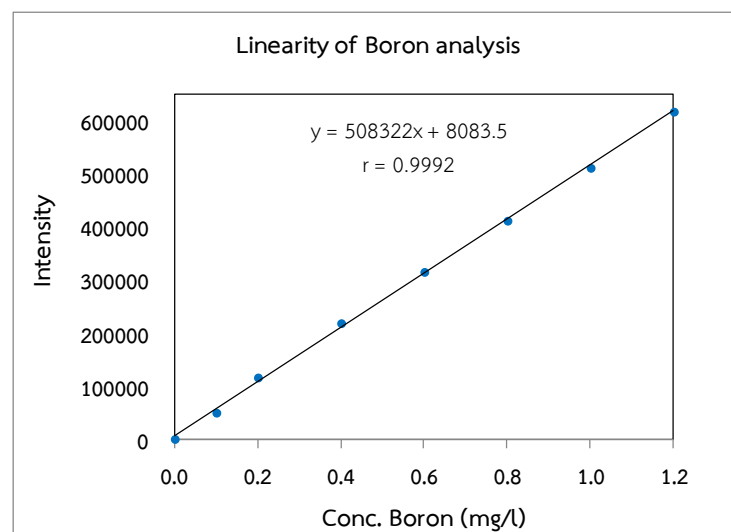
ตารางที่ 6 % recovery ของการวิเคราะห์ปริมาณโบรอนในตัวอย่างดินอ้างอิงรับรองที่มีโบรอน 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Analyte	Soil with Boron 1.90 mg/kg			
	Fe Concentration (mg/l)	Intensity	Conc. Boron (mg/kg)	% Recovery
1	0	952732	1.98	104.21
2	5	964532	2.01	105.79
3	10	933341	1.88	98.95
4	20	954567	1.99	104.74
5	50	965314	2.06	108.42
6	100	925743	1.68	88.42
7	200	901236	1.54	75.79

4. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน ที่สกัดด้วยวิธี Hot- CaCl_2 soluble Boron และวัดปริมาณด้วยวิธี เครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer

4.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรง (Linearity)

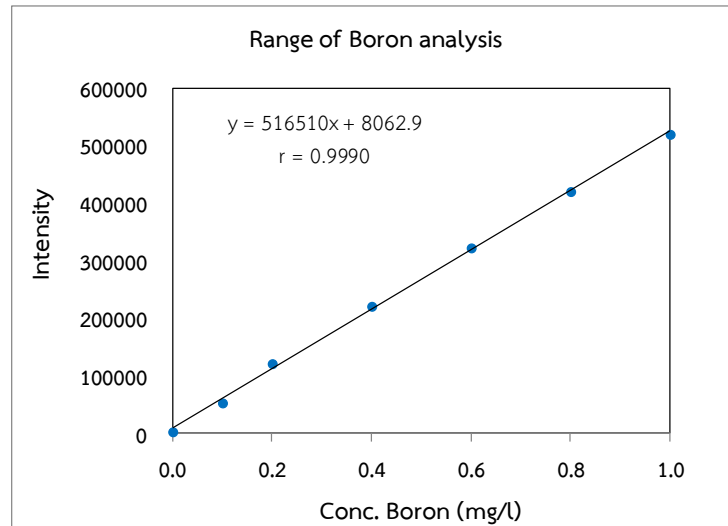
จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของการวิเคราะห์โบรอนในดินที่ความเข้มข้นของโบรอนในช่วง 0 -1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) เท่ากับ 0.9992 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) ≥ 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์โบรอนในช่วงความเข้มข้น 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.2 การศึกษาหาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Working range)

จากการศึกษาความเข้มข้นที่ใช้งาน (Working range) ของการวิเคราะห์โบรอนในดินที่ความเข้มข้นของโบรอนในช่วง 0 -1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) เท่ากับ 0.9990 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient : r) ≥ 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Working range) ของกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์โบรอนในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

4.3 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ความเข้มข้นโดยวิเคราะห์ตัวอย่างดินอ้างอิงรับรอง ที่มีความเข้มข้นของโบรอน 0.17, 0.56 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ประเมินผลความถูกต้อง จาก % Recovery และความเที่ยง จาก HorRat พบว่า ความถูกต้องที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มี % Recovery เท่ากับ 95.29, 101.61 และ 100.05 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 และความเที่ยงมี HorRat เท่ากับ 0.40, 0.38 และ 0.46 ตามลำดับอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ HorRat < 1.3 ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง

รายการ	ผลวิเคราะห์โบรอนในดิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	ความเข้มข้นต่ำ	ความเข้มข้นกลาง	ความเข้มข้นสูง
1	0.17	0.57	1.80
2	0.16	0.60	2.01
3	0.15	0.52	1.88
4	0.18	0.58	1.99
5	0.16	0.61	1.85
6	0.14	0.57	1.76
7	0.15	0.54	1.99
8	0.14	0.59	2.05
9	0.17	0.61	2.00
10	0.20	0.50	1.68
ค่าเฉลี่ย	0.16	0.57	1.90
SD	0.01	0.04	0.01
% recovery	95.29	101.61	100.05
HorRat	0.40	0.38	0.46

4.4 หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

หาขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยวิเคราะห์ Sample blank ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบปริมาณโบรอนในดิน 10 ซ้ำ บันทึกข้อมูลคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง (Sample blank)

ซ้ำที่	Intensity	ปริมาณ Boron (mg/kg)
1	2334	0.0344
2	2405	0.0424
3	2375	0.0378
4	2021	0.0184
5	2044	0.0188
6	2287	0.0292
7	2213	0.0244
8	2256	0.0276
9	2241	0.0262
10	2228	0.0252
Mean (\bar{x})		0.0258
SD		0.0020

คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \bar{X} + 3 S_0' \\ \text{LOQ} &= \bar{X} + 10 S_0' \\ S_0' &= \frac{SD}{\sqrt{n}} = \frac{0.0020}{\sqrt{2}} = 0.0014 \\ \text{LOD} &= 0.0258 + (3 \times 0.0014) = 0.03 \text{ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม} \\ \text{LOQ} &= 0.0258 + (10 \times 0.0014) = 0.04 \text{ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม} \end{aligned}$$

ได้ขีดความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีสามารถวิเคราะห์ และรายงานผลได้ (LOD และ LOQ) คือ 0.03 และ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ดังนั้น ทำการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ = 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยการประเมิน % Recovery และ HorRat ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์ ที่ระดับ LOQ

LOQ	Accuracy		Precision	
	%Recovery (80-110)	ผลการประเมิน	HorRat (< 1.3)	ผลการประเมิน
0.05 mg/kg	99.06	ผ่าน	0.91	ยอมรับ

ประเมินผลการทดสอบค่า Accuracy และ Precision ที่ระดับ LOQ = 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า % Recovery และ HORRAT ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 9)

4.5 ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสถานะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน (Ruggedness) จากสถานะปกติ ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง สูง จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำหนักตัวอย่าง ปริมาณน้ำยาสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงสถานะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน

ปัจจัย	สถานะ	ความเข้มข้นต่ำ		ความเข้มข้นกลาง		ความเข้มข้นสูง		การประเมิน
		t- Stat	t - Critical	t -Stat	t - Critical	t- Stat	t - Critical	
1	น้ำหนักตัวอย่าง	0.7276	2.2622	0.9097	2.2622	0.7701	2.2622	t- Stat < t - Critical
2	ปริมาณน้ำยาสกัด	0.2308	2.2622	0.2750	2.2622	-0.2657	2.2622	t- Stat < t - Critical
3	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	1.1721	2.2622	0.2641	2.2622	0.2447	2.2622	t- Stat < t - Critical

ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสถานะและสิ่งแวดล้อมของวิธีวิเคราะห์โบรอนในดิน ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง จำนวน 3 ปัจจัย ได้แก่ น้ำหนักตัวอย่าง ปริมาณน้ำยาสกัด และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด พบว่า ค่า t-Stat < t Critical แสดงว่าค่าเฉลี่ยของการวัดจากข้อมูลทั้ง 2 ชุด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสถานะเพียงเล็กน้อยไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์โบรอน (ตารางที่ 10)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์โบรอนโดยการสกัดดินด้วยวิธี Hot-CaCl₂ soluble Boron และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometer มีข้อบ่งชี้ของการวิเคราะห์โบรอนในดินอยู่ในช่วง 0.05 – 1.90 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยมีค่า Limit of Detection (LOD) เท่ากับ 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Limit of Quantitation (LOQ) เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อพิสูจน์ค่าความถูกต้อง (Trueness) และค่าความเที่ยง (Precision) ของ LOQ ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 99.06% และ HorRat (Horwitz'Ratio) เท่ากับ 0.91 ทำการวิเคราะห์ CRM ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง มาคำนวณ %Recovery เพื่อความถูกต้อง (Trueness) และค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน เพื่อพิสูจน์ความเที่ยง ได้ผลการทดลองดังนี้ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และระดับความเข้มข้นสูง มี % Recovery เท่ากับ 95.29, 101.61 และ 100.05 ตามลำดับ ตามลำดับ ค่า HorRat (Horwitz'Ratio) ของการวิเคราะห์ซ้ำแบบต่างเวลากัน (Intermediate) เท่ากับ 0.40, 0.38 และ 0.46 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ตาม AOAC) ทั้งหมด (%Recovery อยู่ในช่วง 80-110% และ HorRat (Horwitz'Ratio) < 1.3) ผลการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสถานะแวดล้อม Ruggedness พบว่า การเปลี่ยนแปลงสถานะแวดล้อมของการทดสอบ ไม่มีผลกระทบต่อวิธีวิเคราะห์โบรอน และวิธีมีความคงทนต่อการนำไปใช้เป็นวิธีอ้างอิงของห้องปฏิบัติการได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการวิเคราะห์โบรอนในดิน สามารถใช้เป็นวิธีอ้างอิงแก่ห้องปฏิบัติการอื่นได้ รวมทั้งใช้เป็นวิธีมาตรฐานที่มีความน่าเชื่อถือของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดินตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017 เป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการให้ได้มาตรฐานสากล สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ และสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในงานบริการวิเคราะห์โบรอนในดินให้แก่ผู้รับบริการวิเคราะห์ โดยปัจจุบันได้ให้ความอนุเคราะห์การวิเคราะห์โบรอนในดินแก่สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

เอกสารอ้างอิง

- แมน อมรสิทธิ์ อมร เพชรสม ยวดี เชี่ยววัฒนา อติตยา ศิริภิญญานนท์ ศรีวิไล โอมอภิญญาณ และ อุมภาพร สุขม่วง. 2552. *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ Principle and Techniques of Instrumental Analysis Spectroscopy*. ชวนพิมพ์ กรุงเทพมหานคร. 676 หน้า.
- Latimer, G.W. 2016. *Official Method of Analysis of AOAC International*. 20thEd. AOAC International Gaithersburg, Maryland. USA.
- Cox, F. R., F. Adams, and B.B. Tucker. 1982. Liming, fertilization and mineral nutrition. *In H.E. Pattee and C.T. Young. Peanut Science and Technology*. Amer. Peanut Res. And Ed. Soc., Inc. Texas, U.S.A. p.139-163.
- Eurachem. 2014. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- Keren, R. 1996. Chapter 21 Boron, pp. 603-626. In Sparks, D. L., J. M. Bartels and J. M. Bigham, eds. *Methods of Soil Analysis, Part 3 : Chemical Methods*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd ed. Academic Press, New York. pp. 405-435.
- Mielki G.F., R.F. Novais, J.C. Ker, L. Vergütz and G.F. Castro. 2016. Iron Availability in Tropical Soils and Iron Uptake by Plants. *Rev. Bras. Cienc. Solo*. 1: 1-14.
- National Association of Testing Authorities (NATA). 2018. *General Accreditation Guidance - Validation and Verification of Quantitative and Qualitative test Methods*. Australia. Eftichia Karageorgou, Victoria Samanidou. 2014. Youden test application in robustness assays during method.
- Sah, R.N. and P.H. Brown. 1997. Boron Determination-A Review of Analytical Methods. *Microchemical Journal*. 56 : 258-304.
- Sillanpaa, M. 1982. *Micronutrients and the Nutrient Status of Soils: A Global Study*. FAO Soil Bulletin No. 48, FAO/ Finnish International Development agency, Rome.
- Sparks, D.L., A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P.N. Soltanpour, M.A. Tabatabai, C.T. Johnston and M.E. Sumnerane. 1996. *Methods of Soil Analysis, Part 3 : Chemical Method*. Madison, WI, Soil Science Society of America, Soil Science Society of America Book Series Number 5, 494 p.
- Turner, B.L., A. Bielnicka, J. W. Dalling and J.A. Wolf. 2016. Interference by Iron in the Determination of Boron by ICP-OES in Mehlich-III Extracts and Total Element Digests of Tropical Forest Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 47 (21) : 2378-2386.
- Turner, B.L., P.C. Zalamea, R. Condit, K. Winter, S.J. Wright and J. W. Dalling. 2017. No evidence that boron influences tree species distributions in lowland tropical forests of Panama. *New Phytologist*. 214: 108-119.