

ศึกษาหาค่ากำหนดของเหล็ก และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค
Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry
(ICP–IDMS)

Study of the certified value of total iron and copper in chemical
fertilizer by inductively coupled plasma–isotope dilution mass
spectrometry (ICP–IDMS)

กัญจณา คล้ายแก้ว สงกรานต์ มะลิสอน สุภา โพธิจันทร์ ญาณธิชา จิตต์สะอาด พจมาลย์ ภู่อสาร
จิตติรัตน์ ชูชาติ จรีรัตน์ กุศลวิริยะวงศ์
Kanthana Klaigaew Songkrant Malisorn Yarnthicha Jittsa-aad Supha Photichan
Pojjamarn Poosarn Jittirat Choochat Charirat Kusonwiriyaong

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Reference material for determination total iron and total copper in chemical fertilizer was investigated. Characterization and evaluation of the uncertainty of chemical fertilizer laboratory reference material were proposed following the recommendations of the ISO Guide 35. The chemical fertilizer was crushed, finely ground, sieved through a <math><40\ \mu\text{m}</math> sieve, and well mixed in a plastic bag, prior to divided into 30 ml bottles. Characterization of the reference material was carried out by inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) with acid digestion. The validated method was accurate and precise enough for determination of total iron and copper in fertilizer as indicated by acceptable values of recovery and HorRat. The homogeneity testing shown that ten bottles with duplicate analysis are enough to demonstrate the homogeneity of this reference material. The statistical results also showed no significant trends in both transportation stability test and long-term stability test for twelve months. Homogeneity and stability assessment of the material demonstrated that the relative standard uncertainties due to the inhomogeneity, the instability for transportation and the instability for twelve months were 0.97–1.27, 0.05–0.14 and 3.12–4.60%, respectively. The certified values of total Fe and Cu concentrations with expanded uncertainties (coverage factor $k=2$, approximate 95% confidence interval) calculated using the results of the characterization, homogeneity and stability assessment were 12478 ± 1075 mg/kg for total iron and 1028 ± 68 mg/kg for total copper.

Keywords : Reference material, Chemical fertilizer, Total iron, Total copper

บทคัดย่อ

การศึกษาวัสดุอ้างอิงสำหรับหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง ได้ทำการศึกษาและประมาณค่าความไม่แน่นอนของตัวอย่างอ้างอิงปุ๋ยอ้างอิงตามแนวทางของ ISO Guide 35 ตัวอย่างปุ๋ยเคมีที่จัดทำได้นำมาบด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร การวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงทำโดยการนำตัวอย่างไปย่อย และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Inductively coupled plasma–isotope dilution mass spectrometry (ICP–IDMS) จากการศึกษาพบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยได้ด้วยเทคนิค ICP–IDMS โดยการพิสูจน์ความแม่นยำและความเที่ยง พบว่าค่า % Recovery และ HorRat อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด การศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกันโดยทำการวิเคราะห์ 10 ตัวอย่าง จำนวน 2 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันเพียงพอ และจากการประเมินทางสถิติพบว่าตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงมีความเสถียรเพียงพอในการขนส่ง และมีความเสถียรเพียงพอเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 12 เดือน ค่าความไม่แน่นอนจากความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียรในการขนส่ง และความเสถียรระยะยาวเท่ากับ 0.97–1.27, 0.05–0.14 และ 3.12–4.60% ตามลำดับ ตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงที่เตรียมขึ้น มีค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอน (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $k=2$) ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 12478 ± 1075 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 1028 ± 68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

คำหลัก: วัสดุอ้างอิง ปุ๋ยเคมี เหล็กทั้งหมด ทองแดงทั้งหมด

คำนำ

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย เป็นอีกหนึ่งส่วนงานที่สำคัญในกระบวนการผลิตและขึ้นทะเบียนปุ๋ย ปุ๋ยที่มีปริมาณธาตุอาหารที่ไม่ตรงตามสูตรที่ขอขึ้นทะเบียน จะไม่สามารถซื้อขายได้ นอกจากนี้ยังเป็นการประกันคุณภาพของปุ๋ยว่าเกษตรกรจะได้ใช้ปุ๋ยที่มีปริมาณธาตุอาหารตรงตามที่ระบุในฉลาก ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยจึงมีความสำคัญอย่างมาก เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเกิดประโยชน์สูงสุดแก่เกษตรกร ซึ่งการควบคุมคุณภาพแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control) และการประเมินคุณภาพโดยองค์กรภายนอก (External Quality Assessment) ซึ่งการควบคุมคุณภาพภายในห้องปฏิบัติการเป็นกระบวนการที่สำคัญในการวิเคราะห์ทดสอบในห้องปฏิบัติการ ห้องปฏิบัติการจะต้องมีการดำเนินการในการเฝ้าระวังตรวจสอบความถูกต้องของการทดสอบ เพื่อให้เกิดความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบก่อนการรายงานผล และเพื่อให้การดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเป็นไปตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 (2017) ในปัจจุบันมีเทคนิคการควบคุมคุณภาพภายในมากมายหลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ตัวอย่างควบคุม (QC sample) ได้แก่ วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Materials, CRM), การวิเคราะห์รีเอเจนต์แบลнкหรือแบลнкของวิธีทดสอบ (Reagent Blank or Method Blank), การวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน (Duplicate Analysis Pair), การวิเคราะห์ Spiked Sample หรือ การหาค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เป็นต้น

วัสดุอ้างอิง (Reference Materials, RM) และวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Materials, CRM) มีความสำคัญและมีบทบาทอย่างมากในกระบวนการวิเคราะห์ทดสอบตัวอย่างสำหรับทุกห้องปฏิบัติการ โดยวัตถุประสงค์ของการใช้งานแตกต่างกันออกไป ผู้วิเคราะห์จะต้องมีการเลือกใช้ประเภทของวัสดุอ้างอิงที่เหมาะสมตามลักษณะงานที่ปฏิบัติ โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการจะใช้วัสดุอ้างอิง หรือสารมาตรฐานประกอบในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารในตัวอย่าง วัสดุอ้างอิง หมายถึงวัสดุหรือสารที่มีสมบัติหนึ่งอย่างหรือหลายอย่างที่จัดทำมาอย่างดี มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneity) และความเสถียร (Stability) (Quevauviller, 2019) และสำหรับใช้สอบเทียบอุปกรณ์ใช้ในการประเมินวิธีหรือใช้ในการกำหนดค่าวัสดุต่างๆ สำหรับวัสดุอ้างอิงรับรอง หมายถึงวัสดุอ้างอิงที่มีคุณสมบัติที่ครอบคลุมและ

ผ่านมาตรฐานการผลิตและทดสอบที่เข้มงวด และมีค่าระบุที่มีการรับรองสามารถตรวจสอบย้อนกลับทางมาตริวิทยา (Traceability) และมีความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty) (Quevauviller, 2019) เพิ่มเติมจากความเป็นเนื้อเดียวกัน และความเสถียร

การผลิตวัสดุอ้างอิงเพื่อให้ได้คุณสมบัติที่เป็นที่ยอมรับจะต้องจัดเตรียมและประเมินผลทางสถิติตามมาตรฐาน ISO 17034 (2016) และ ISO Guide 35 (2017) ซึ่งจะต้องมีการศึกษาความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเสถียร และค่าคุณสมบัติของตัวอย่างที่เตรียมขึ้น การหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิงตาม ISO 17034 (2016) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์ด้วยหลายห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธีวิเคราะห์ต่างๆ กัน การวิเคราะห์หลายห้องปฏิบัติการโดยกำหนดวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีเดียวกัน (Kawamoto *et al.*, 2019; Santana Santos *et al.*, 2020) หรือการวิเคราะห์ด้วยห้องปฏิบัติการเดียวโดยวิธี Primary method เป็นต้น (Olivares *et al.*, 2018; Linsinger *et al.*, 2019) Primary method เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังระบบหน่วยสากล (SI) ได้ (Olivares *et al.*, 2018) และจัดเป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง ซึ่งวิธีที่ได้รับการยอมรับจาก Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology (CCQM) ให้เป็น Primary method มีหลายวิธี ดังนี้ Gravimetry, Titrimetry, Coulometry, Isotope dilution mass spectrometry (IDMS), Two-step IDMS และ Freezing-point depression (Milton and Quinn, 2001) มีหลายงานวิจัยที่นำวิธี IDMS มาประยุกต์ใช้ในการหาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิงที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างเช่น การพัฒนาวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ Ethyl carbamate ในอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยใช้วิธี IDMS ร่วมกับ Gas chromatography (GC) (Vicentim *et al.*, 2019) และการพัฒนาวัสดุอ้างอิงรับรองสำหรับวิเคราะห์ธาตุในน้ำทะเล โดยใช้วิธี IDMS ร่วมกับ ICP-MS (Ari and Bakirdere, 2020; Lee *et al.*, 2011) เป็นต้น

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมีนั้น ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องทำการซื้อวัสดุอ้างอิงรับรองจากต่างประเทศ ซึ่งมีผู้จำหน่ายน้อยรายและมีราคาแพง คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะผลิตวัสดุอ้างอิงสำหรับวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยเคมี เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ซึ่งช่วยเพิ่มความเชื่อมั่นในการตรวจวิเคราะห์ ช่วยประหยัดงบประมาณ และลดระยะเวลาในการจัดซื้อวัสดุอ้างอิงรับรองของห้องปฏิบัติการ การจัดทำวัสดุอ้างอิงปุ๋ยเคมีสำหรับวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมด จะดำเนินการตามแนวทาง ISO Guide 35 (2017) เพื่อให้ได้วัสดุอ้างอิงที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความเสถียร มีค่าปริมาณเหล็กและทองแดง และค่าความไม่แน่นอนของการวัด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) เครื่อง Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS ; PerkinElmer ; NexION 350D)
- 2) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo; AB204-S)
- 3) เตาให้ความร้อน
- 4) เครื่องบดตัวอย่าง (Retsch; ZM 200)
- 5) ตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร (Retsch)
- 6) ขวดพลาสติกพร้อมฝาปิด
- 7) Nitric acid (concentrated), HNO₃, AR grade
- 8) Hydrochloric acid (concentrated), HCl, AR grade
- 9) ⁶⁵Cu in 1 M nitric acid (ERM – AE633)
- 10) ⁵⁶Fe solution (IRMM-634)

วิธีการ

1) ศึกษาการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP-IDMS โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP-IDMS เช่น อัตราการไหลของเชื้อเพลิง อัตราการไหลของตัวพา อัตราการไหลของสารละลายตัวอย่าง และอัตราการดูดสารละลายตัวอย่าง ศึกษา Mass spectral interferences หาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) หาค่าขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ตรวจสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยด้วยเทคนิค ICP-IDMS

2) เตรียมตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง โดยจัดหาตัวอย่างปุ๋ยจากท้องตลาด และนำตัวอย่างมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน ทำการบดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ผ่านการบดแล้ว มาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช จากนั้นนำตัวอย่างที่ร่อนแล้วทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และตักใส่ขวดพลาสติกขนาด 30 มิลลิลิตร และกำหนดหมายเลขตัวอย่างในแต่ละขวด

3) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง โดยการสุ่มตัวอย่างแบบ Random จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559, 2560) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ จากนั้นประเมินผลทางสถิติด้วย Cochran's test และ One-way ANOVA และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (U_{bb}) ตามแนวทาง ISO Guide 35 (2017)

4) ทดสอบความเสถียรระยะสั้น (Short-term stability) ของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง โดยการทดลองส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเบียนเป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และนำผลวิเคราะห์มาประเมินทางสถิติ และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) ตามแนวทาง ISO Guide 35 (2017)

5) ทดสอบความเสถียรระยะยาว (Long-term stability) ของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 12 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างในช่วงเวลา 0, 1, 3, 6 และ 12 เดือน ครั้งละ 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด และนำผลวิเคราะห์มาประเมินทางสถิติ และคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว (U_{lts}) ตามแนวทาง ISO Guide 35 (2017)

6) ศึกษาหาค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง โดยทำการสุ่มตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงมาจำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ จากนั้นคำนวณค่าคุณสมบัติด้วยวิธี Weighted mean ดังนี้

$$y_{char} = \sum w_i x_i / \sum w_i$$

โดย

$$w_i = 1/u_i^2$$

และคำนวณค่าความไม่แน่นอนของการหาค่าคุณสมบัติจากสมการ

$$U_{char} = \sqrt{\sum w_i^2 u_i^2}$$

7) ประเมินความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง ตามแนวทาง ISO Guide 35 (2017) ตามสมการ

$$U_{RM} = k \sqrt{U_{char}^2 + U_{bb}^2 + U_{lts}^2 + U_{sts}^2}$$

เมื่อ	U_{RM}	=	ค่าความไม่แน่นอนขยายของวัสดุอ้างอิง
	U_{char}	=	ค่าความไม่แน่นอนจากการศึกษาค่าคุณสมบัติของวัสดุอ้างอิง
	U_{bb}	=	ค่าความไม่แน่นอนจากความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
	U_{lts}	=	ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว
	U_{sts}	=	ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น
	k	=	Coverage factor (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $k=2$)

ระยะเวลา เริ่มต้น เดือน ตุลาคม 2562 สิ้นสุด เดือน กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1) การหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP-IDMS

1.1) สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ในการหาปริมาณเหล็ก และทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง จากการศึกษาได้สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ที่ใช้สำหรับการวัดปริมาณเหล็กและทองแดงในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง ดังนี้ ค่า Plasma gas flow, Auxiliary gas flow และ Nebulizer gas flow เท่ากับ 18.0, 1.2 และ 0.86 L/min ตามลำดับ ค่า Sample uptake rate เท่ากับ 270 $\mu\text{L}/\text{min}$ ค่า RF power เท่ากับ 1600 W ค่า Dead time เท่ากับ 35 ns โดยใช้ Ge เป็น Internal standard และวัดปริมาณไอโซโทปดังนี้ ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu , และ ^{65}Cu ดังตาราง 1

ตาราง 1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ICP-MS ที่ใช้ในการหาปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

Parameter	Value
Plasma gas flow	18.0 L/min
Auxiliary gas flow	1.2 L/min
Nebulizer gas flow	0.86 L/min
Sample uptake rate	270 $\mu\text{L}/\text{min}$
RF power	1600 W
Dead time	35 ns
Internal standard	Ge
Measured isotopes	^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu

1.2) การรบกวนของแคลเซียมและโซเดียมต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP-IDMS

ในการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP-IDMS นั้น มีสารรบกวนที่สำคัญ คือ แคลเซียมและโซเดียม ซึ่งจะมีผลทำให้สัญญาณของเหล็กและทองแดงเพิ่มขึ้น (Thomas and Wiedmeyer, 1998; Lum and Kelvin, 2016) แต่ในตัวอย่างปุ๋ยธาตุอาหารเสริมโดยทั่วไปจะไม่มีส่วนผสมของแคลเซียมหรือโซเดียมในตัวอย่าง จึงไม่จำเป็นต้องศึกษาการรบกวนของแคลเซียมและโซเดียมต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP-IDMS ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลกระทบของสารรบกวนในตัวอย่างปุ๋ย ต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP-IDMS โดยนำตัวอย่างปุ๋ย 4 ตัวอย่าง คือ F1, F2, F3 และ F4 มาเติมด้วยสารละลายมาตรฐานเหล็ก ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสารละลายมาตรฐานทองแดง ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นไปวิเคราะห์หาปริมาณ ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu และ ^{65}Cu ด้วยเทคนิค ICP-IDMS และคำนวณค่า Recovery ซึ่งค่า Recovery ของการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1–10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต้องอยู่ในช่วง 80–110% จึงเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) ตาราง 2 แสดงค่า Recovery ของการวิเคราะห์ ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu และ ^{65}Cu ในตัวอย่างปุ๋ย โดยพบว่าค่า Recovery ของการวิเคราะห์ ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe , ^{63}Cu และ ^{65}Cu อยู่ในช่วง 93–104, 94–103, 101–109, 89–98 และ 91–96% ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC (2016) ดังนั้นสารรบกวนในตัวอย่างปุ๋ยไม่มีผลต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงด้วยเทคนิค ICP-IDMS

ตาราง 2 ผลการศึกษาการรบกวนของแคลเซียมและโซเดียมต่อการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP-IDMS

Samples	Recovery (%)				
	⁵⁴ Fe	⁵⁶ Fe	⁵⁷ Fe	⁶³ Cu	⁶⁵ Cu
F1	103	101	109	96	96
F2	104	103	107	90	95
F3	101	103	102	98	91
F4	93	94	101	89	91

1.3) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ของการทดสอบเหล็กและทองแดงทั้งหมดในปุ๋ยอ้างอิง

การทดสอบหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ย โดยการทดสอบ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่า LOD และ LOQ ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 6.42 และ 12.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 4.17 และ 5.49 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ผลการทดสอบค่า LOD และ LOQ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu
Mean (mg/kg)	3.88	3.60
S ₀	0.85	0.19
LOD	6.42	4.17
LOQ	12.33	5.49

1.4) ตรวจสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP-IDMS

การทดสอบ Precision ของวิธีวิเคราะห์ทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 1208.88, 2611.40 และ 4456.62 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 4 และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า HorRat ได้ค่า HorRat ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 0.46, 0.82 และ 0.94 ตามลำดับ โดยค่า HorRat ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.3 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) สำหรับการตรวจสอบ Trueness ทำโดยการหา Recovery ในตัวอย่างปุ๋ยที่เติมสารละลายมาตรฐานลงไป 3 ระดับความเข้มข้น คือ 400, 1800 และ 3600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการทดสอบระดับละ 10 ซ้ำ ได้ค่า Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 101.09, 100.38 และ 101.45% ตามลำดับ ซึ่งค่าอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 95–105% ตามมาตรฐาน AOAC (2016)

ตาราง 4 ผลการทดสอบ Trueness และ Precision ของวิธีทดสอบทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Low concentration	Medium concentration	High concentration
Mean (mg/kg)	1208.88	2611.4	4456.62
SD	6.29	24.21	47.09
%RSD	0.52	0.93	1.06
%Recovery	101.09	100.38	101.45
HorRat	0.46	0.82	0.94

2) ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์หาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมด ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ และทำการประเมินผลทางสถิติ ผลการประเมินด้วยสถิติ Cochran's test สำหรับศึกษาความเบี่ยงเบนภายในตัวอย่างอ้างอิงที่เตรียมขึ้น แสดงอยู่ในตาราง 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมด มีค่า C_{cal} เท่ากับ 0.169 และ 0.334 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า C_{crit} ซึ่งเท่ากับ 0.602 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้งเหล็กและทองแดงที่ค่า $C_{cal} < C_{crit}$ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างเดียวกันไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่างต่อไป

ผลการประเมินด้วยสถิติ One-way ANOVA สำหรับศึกษาความเบี่ยงเบนระหว่างตัวอย่าง แสดงอยู่ในตาราง 5 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดและทองแดงทั้งหมด มีค่า F_{cal} เท่ากับ 2.154 และ 0.682 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า F_{crit} ซึ่งเท่ากับ 3.020 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าทั้งเหล็กและทองแดงที่ค่า $F_{cal} < F_{crit}$ แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกันอย่างเพียงพอ ผลการคำนวณค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบน (U_{bb}) พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงมีค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบนน้อยกว่า 1.27% สำหรับทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงมีค่าความไม่แน่นอนจากความเบี่ยงเบนน้อยกว่า 0.97%

ตาราง 5 ผลการทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu
$\sum D_i^2$	601967.35	5931.57
D_{MAX}^2	118115.94	1982.03
C_{cal}	0.196	0.334
C_{crit}	0.602	0.602
Conclusion: $C_{cal} < C_{crit}$	No outlier	No outlier
$MS_{between}$	64843.545	202.258
MS_{within}	30098.368	296.578
F_{cal}	2.154	0.682
F_{crit}	3.020	3.020
Conclusion: $F_{cal} < F_{crit}$	Homogeneous	Homogeneous
U_{bb} (mg/kg)	131.80	8.14
U_{bb} (%)	1.27	0.97

D_i = Difference of each pair of duplicate, D_{MAX} = The maximum difference of the duplicate,

C_{cal} = Cochran calculation value, C_{crit} = Cochran critical value at 95% confidence level ($n=10$),

MS_{within} = Mean squares within sample, $MS_{between}$ = Mean squares between sample,

F_{cal} = F calculation value, F_{crit} = F critical value at 95 confidence level and

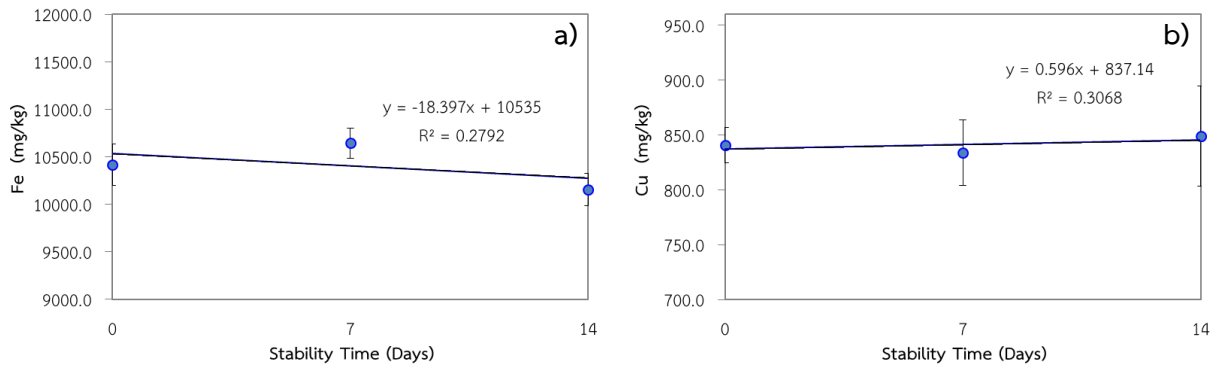
U_{bb} = Standard uncertainty associated with between-unit variability

3) ความเสถียรระยะสั้นของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

การทดสอบความเสถียรระยะสั้นเพื่อศึกษาความเสถียรของตัวอย่างในการขนส่ง ได้กราฟระหว่างปริมาณของเหล็กและทองแดงทั้งหมด และระยะเวลาในการจัดส่งตัวอย่าง ดังภาพ 1 และได้ผลการทดสอบทางสถิติดังแสดงในตาราง 6 พบว่าปริมาณเหล็กทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ $y = -18.397x + 10535.08$ โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 18.397 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 29.562 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.622 สำหรับปริมาณทองแดงทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ $y = 0.596x + 837.14$ โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 0.596 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ

0.896 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.665 ซึ่งค่า $|b_1|/s(b_1)$ ของเหล็กและทองแดงทั้งหมดน้อยกว่าค่า $t_{0.95,n-2}$ แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเสถียรเพียงพอเมื่อทำการจัดส่งตัวอย่างทางไปรษณีย์ลงทะเลเป็นระยะเวลา 14 วัน

ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้น (U_{sts}) คำนวณจาก $U_{sts} = s(b_1) \times t$ เมื่อ t คือระยะเวลาในการจัดส่งตัวอย่าง 14 วัน โดยค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะสั้นของเหล็กและทองแดงทั้งหมด เท่ากับ 0.14 และ 0.05% ตามลำดับ



ภาพ 1 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของ a) เหล็กทั้งหมด และ b) ทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปู้อย่างอิง

ตาราง 6 ผลการทดสอบความเสถียรระยะสั้นของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปู้อย่างอิง

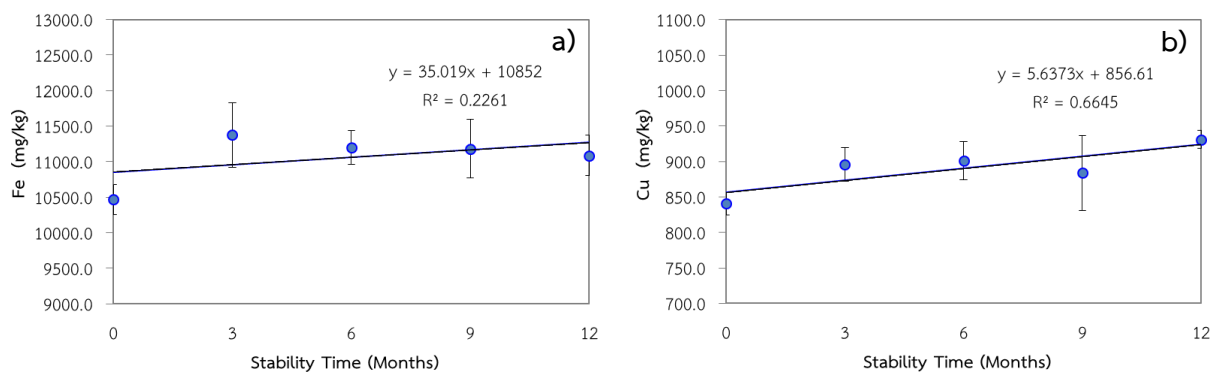
	Fe	Cu
$ b_1 $	18.397	0.596
b_o	10535.08	837.14
$s(b_1)$	29.562	0.896
$ b_1 /s(b_1)$	0.622	0.665
$t_{0.95,n-2}$	12.706	12.706
Conclusion: $ b_1 /s(b_1) < t_{0.95,n-2}$	Stable	Stable
U_{sts} (mg/kg)	14.78	0.45
U_{sts} (%)	0.14	0.05

b_1 = Slope of stability data, b_o = Intercept of stability data, $s(b_1)$ = Standard deviation of slope (associated uncertainty), $t_{0.95,n-2}$ = t critical value at 95% confidence level and U_{sts} = Standard uncertainty associated with short term stability

4) ความเสถียรระยะยาวของตัวอย่างปู้อย่างอิง

จากการศึกษาความเสถียรของตัวอย่างขณะการเก็บรักษาทำโดยเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง ได้กราฟระหว่างปริมาณของสารและระยะเวลาการเก็บรักษาตัวอย่าง และสมการถดถอย ดังแสดงใน 2 และตาราง 7 พบว่าเหล็กทั้งหมดได้สมการถดถอย คือ $y = 35.091x + 10852.05$ โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 35.091 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 37.406 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 0.936 สำหรับปริมาณทองแดงทั้งหมด ได้สมการถดถอย คือ $y = 5.637x + 856.61$ โดยค่าสัมบูรณ์ของความชัน ($|b_1|$) เท่ากับ 5.637 และค่า $s(b_1)$ เท่ากับ 2.313 จะได้ค่า $|b_1|/s(b_1)$ เท่ากับ 2.437 ซึ่งค่า $|b_1|/s(b_1) < t_{0.95,n-2}$ ทั้งเหล็กและทองแดง แสดงว่าตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมีความเสถียรเพียงพอเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 12 เดือน

ค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาว U_{lts} คำนวณจาก $U_{lts} = s(b_1) \times t$ เมื่อ t คือระยะเวลาในการจัดเก็บตัวอย่าง 12 เดือน โดยค่าความไม่แน่นอนจากความเสถียรระยะยาวของเหล็กและทองแดงทั้งหมด เท่ากับ 4.06 และ 3.12% ตามลำดับ



ภาพ 2 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของ a) เหล็กทั้งหมด และ b) ทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

ตาราง 7 ผลการทดสอบความเสถียรระยะยาวของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu
b_1	35.019	5.637
b_0	10852.05	856.61
$s(b_1)$	37.406	2.313
$ b_1 /s(b_1)$	0.936	2.437
$t_{0.95,n-2}$	3.182	3.182
Conclusion: $ b_1 /s(b_1) < t_{0.95,n-2}$	Stable	Stable
U_{lts} (mg/kg)	448.87	27.75
U_{lts} (%)	4.06	3.12

b_1 = Slope of stability data, b_0 = Intercept of stability data, $s(b_1)$ = Standard deviation of slope (associated uncertainty), $t_{0.95,n-2}$ = t critical value at 95% confidence level and U_{lts} = Standard uncertainty associated with long term stability

5) คุณสมบัตินี้และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง จากการศึกษาค่าคุณสมบัตินี้และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง ได้ค่าดังแสดงในตาราง 8 พบว่า ค่าคุณสมบัตินี้ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 12478 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์เหล็กทั้งหมดเท่ากับ 0.68% ค่าคุณสมบัตินี้ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 1028 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่าความไม่แน่นอนจากการวิเคราะห์ทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 0.37%

ตาราง 8 ผลการหาค่าคุณสมบัติของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu
$\Sigma w_i^2 u_i^2$	7106.90	14.81
y_{char} (mg/kg)	12478	1028
U_{char} (mg/kg)	84	4
U_{char} (%)	0.68	0.37

x_i = Analytical results of laboratory, u_i = Associated standard uncertainty of the results,

w_i = Final weighting, y_{char} = Property values and

U_{char} = Standard uncertainty associated with a value assigned in a characterization study

6) ค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงตามแนวทางของ ISO Guide 35 (2017) ได้ค่าตามตาราง 9 โดยค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของเหล็กทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 12478±441 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของทองแดงทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 1028±98 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตาราง 9 ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง

	Fe	Cu
U_{bb} (%)	0.71	0.98
U_{sts} (%)	0.02	0.11
U_{lts} (%)	1.62	4.64
U_{char} (%)	0.0004	0.3742
U_{RM} (%)	3.54	9.52
y_{char} (mg/kg)	12478	1028
U_{RM} (mg/kg)	441	98
Property values ± U_{RM} (mg/kg)	12478±441	1028±98

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ


จากการเตรียมตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิง และศึกษาการหาปริมาณทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงด้วยเทคนิค ICP-IDMS พบว่าสามารถหาปริมาณเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงได้ด้วยเทคนิค ICP-IDMS โดยได้ค่า LOD และ LOQ ของเหล็กทั้งหมดเท่ากับ 6.42 และ 12.33 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของทองแดงทั้งหมดเท่ากับ 4.17 และ 5.49 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า HorRat และ % Recovery ของปริมาณทองแดงทั้งหมด เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) และจากการศึกษาคุณสมบัติของตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงที่เตรียมขึ้น พบว่าตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความเสถียรเมื่อทำการขนส่ง และมีความเสถียรเมื่อเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 12 เดือน ค่าคุณสมบัติและค่าความไม่แน่นอนของเหล็กและทองแดงทั้งหมดในตัวอย่างปุ๋ยอ้างอิงเท่ากับ 12478±1075 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 1028±68 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการศึกษาตัวอย่างปูอ้างอิงที่เตรียมขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้ เนื่องจากตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน มีความเสถียรที่เพียงพอ และมีค่าคุณสมบัติที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยเพิ่มความเชื่อมั่นในการตรวจวิเคราะห์ และช่วยประหยัดงบประมาณในการจัดซื้อวัสดุอ้างอิงรับรองของห้องปฏิบัติการ และยังสามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่งสำหรับการจัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปูเคมี พ.ศ. 2559. (2560, 4 มกราคม). **ราชกิจจานุเบกษา**. เล่มที่ 134 ตอนพิเศษ 2 ง, หน้า 24.
- AOAC. 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International Gaithersburg, MD, USA, Official Method 20th Ed.
- Ari, B. and S. Bakirdere. 2020. A primary reference method for the characterization of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a candidate certified reference seawater material: TEA/Mg(OH)₂ assisted ID³MS by triple quadrupole ICP-MS/MS. *Analytica Chimica Acta* 1140:178–189.
- ISO 17034. 2016. *ISO 17034:2016 - General requirements for the competence of reference material producers*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- ISO Guide 35. 2017. *ISO Guide 35:2017 - Reference materials – guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- ISO/IEC 17025. 2017. *ISO/IEC 17025:2017 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva.
- Kawamoto, M. S., G. B. de Souza and A. R. de Araujo Nogueira. 2019. Preparation and evaluation of a new reference material for macro- and micronutrients in fish feed. *Microchemical Journal* 149:104027.
- Lee, J.-M., E. A. Boyle, Y. Echegoyen-Sanz, J. N. Fitzsimmons, R. Zhang and R. A. Kayser. 2011. Analysis of trace metals (Cu, Cd, Pb, and Fe) in seawater using single batch nitrilotriacetate resin extraction and isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 686(1-2):93–101.
- Linsinger T.P.J. and A. Botha. 2019. Principles for the characterisation and the value assignment of the candidate reference material in the new ISO Guide 35:2017. *Accreditation and Quality Assurance* 24:157–161.
- Lum, T., and S. L. Kelvin. 2016. Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection. *Journal of analytical atomic spectrometry* 31:1078-1088.
- Milton, M. J. T. and T. J. Quinn. 2001. Primary methods for the measurement of amount of substance. *Metrologia* 38(4):289–296.
- Olivares, I. R. B., G. B. Souza, A. R. A. Nogueira, G. T. K. Toledo and D. C. Marcki. 2018. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 100:53–64.



Quevauviller, P. 2019. Quality Assurance | Reference Materials. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*:514-518.

Santana Santos, A., L. Oliveira dos Santos, J. B. Pereira Junior, F. M. de Oliveira and S. L. C. Ferreira. 2020. Development of reference material from powdered milk: uncertainties and interlaboratory evaluation through confidence ellipses. *Microchemical Journal* 159:105330.

Thomas, W. M., and R. H. Wiedmeyer. 1998. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *Atomic spectroscopy* 19(5):150-155.

Vicentim, M. P., T. M. Monteiro, R. R. R. de Almeida, A. D. A. Soares, J. M. Rodrigues and E. C. P. do Rego. 2019. Isotope dilution gas chromatography - mass spectrometry for the development of certified reference material of ethyl carbamate in hydroalcoholic matrix. *Microchemical Journal* 147:497–506.