

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี
Method Validation on Analysis of Ammonium Nitrogen in Fertilizer

นางสาวจิราภา เมืองคล้าย¹ นางอาภรณ์ ภาควงษ์¹ นางสาวทวีพร สุกใส¹

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี โดยมีเกณฑ์มาตรฐานสากล และค่าคำนวณทางสถิติพบว่า การวิเคราะห์หาความถูกต้อง (Accuracy), ความแม่นยำ (Precision), ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection; LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์และสามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยทำการวิเคราะห์ แอมโมเนียมไนโตรเจนที่เป็น Certified Reference Material (CRM) และนำมาประเมินความถูกต้อง จาก 2 วิธี คือ หาค่า Recovery พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และหาค่าแสดงความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริงของ CRM โดย T-test พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน ประเมินความแม่นยำโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio (HORRAT) ได้ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ หาค่า Linearity พบว่าช่วงที่เหมาะสมและเป็นเส้นตรงสำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน คือ 0-26.18% หาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.15% และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.22% ซึ่งค่าทั้งหมดนั้น ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานสากล

คำนำ

ด้วยกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 (สวพ.5) ได้เปิดบริการวิเคราะห์ปุ๋ยให้กับบุคคลทั่วไปและรองรับการทำงานด้านการควบคุมคุณภาพของปัจจัยการผลิตให้กับกลุ่มควบคุมตามพระราชบัญญัติของ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 ซึ่งการให้บริการดังกล่าวต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ เป็นไปตามมาตรฐานสากล อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าทางห้องปฏิบัติการจะดำเนินการวิเคราะห์หาปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมีตามคู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี (กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี, 2551) ซึ่งเป็นวิธีที่ดัดแปลงและปรับปรุงจากวิธีมาตรฐานของ AOAC 2005th Ed Method 920.03 ข้อ 2.4.07 ก็ตาม ห้องปฏิบัติการปุ๋ยของ สวพ.5 ต้องทำการพิสูจน์ให้ได้ว่าวิธีที่นำมาใช้สามารถใช้ได้จริงกับห้องปฏิบัติการของ สวพ.5

วิธีการดำเนินงาน

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
2. Digestion and Distilling Apparatus
3. เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการปฏิบัติการวิเคราะห์

สารเคมี

1. Ethyl Alcohol 90% AR Grade
2. Boric Acid, AR Grade
3. Methylene Blue, AR Grade
4. Methyl Red, AR Grade
5. Standard Hydrochloric acid 1 N, AR grade
6. Sodium Hydroxide, AR grade
7. Sodium Carbonate 99.970±0.014% (SRM 351a)
8. Calcium Ammonium Nitrate 13.04% Nitrogen (CRM-BCR 178)
9. Ammonium Sulphate 99.999% Purity 21.20% Nitrogen (Aldrich Chem. 204501)
10. Ammonium Chloride 26.18% Nitrogen (Aldrich Chem. 326372)

วิธีการ

1. การหา Linearity และ Accuracy

- 1.1 นำวัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน มาอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 1.2 ชั่งสารในข้อ 1.1 น้ำหนัก 0.3XXX กรัม จำนวน 10 ซ้ำ ใส่ Tube ขนาด 250 ml ดำเนินการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ตามคู่มือวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี
- 1.3 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- 1.4 คำนวณค่า Linearity และ Accuracy

2. การหาค่า Precision

- 2.1 ชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน 0.3XXX กรัม ที่ความเข้มข้น สูง กลาง ต่ำ อย่างละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล เวลา และเครื่องมือเดียวกัน
- 2.2 ดำเนินการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ตามตามคู่มือวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี
- 2.3 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ คำนวณหาค่า Precision โดยใช้ Horwitz's Ratio (HORRAT) คำนวณแบบ Repeatability

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

- 3.1 ชั่ง sample blank 0.3XXX กรัม จำนวน 10 ซ้ำ วิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน ตามตามคู่มือวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี
- 3.2 บันทึกผลแอมโมเนียมไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้ คำนวณค่า LOD และ LOQ

เวลา 1 ตุลาคม 2553 – 30 กันยายน 2554

สถานที่ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.5

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การหา Linearity และ Accuracy

1.1 การหา Linearity

จากการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง/วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ Ammonium Chloride, Ammonium Sulphate และ Calcium Ammonium Nitrate อย่างละ 10 ซ้ำ พบว่ามี SD อยู่ระหว่าง 0.04-0.11 และ Bias อยู่ระหว่าง 0.00 ถึง +0.03 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ Calcium Ammonium Nitrate, Ammonium Sulphate และ Ammonium Chloride

ลำดับ ที่	Calcium Ammonium Nitrate 13.04% Nitrogen	Ammonium Sulphate 21.20% Nitrogen	Ammonium Chloride 26.18% Nitrogen
1	13.13	21.16	26.33
2	13.21	21.25	26.24

3	13.09	21.20	26.29
4	13.15	21.28	26.24
5	13.15	21.25	26.17
6	12.99	21.20	26.23
7	13.04	21.23	26.11
8	12.94	21.20	26.07
9	13.00	21.19	25.97
10	12.98	21.21	26.18
$\bar{x}$	13.07	21.22	26.18
SD	0.09	0.04	0.11
Bias	+0.03	+0.02	0.00

นอกจากนี้เมื่อนำค่าจริงจากใบรับรองและค่าที่วิเคราะห์ได้มาสร้างกราฟ และพิจารณาค่า r โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ จะต้องมากกว่า 0.995 จากการทดสอบพบว่า $r = 1.000$ แสดงว่าช่วงการวิเคราะห์ที่ 0 – 26.18% มีความเป็นเส้นตรง สามารถวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจนในช่วงดังกล่าวได้

1.2 การหา Accuracy

การหา Accuracy ได้จากการคำนวณ % Recovery และเปรียบเทียบค่าทดสอบกับค่าอ้างอิง โดยใช้ t-test

การคำนวณ Recovery คำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าอ้างอิงจากใบรับรอง}} \times 100$$

เกณฑ์ของ % Recovery ที่ยอมรับได้ต้องอยู่ระหว่าง 98 – 108% (AOAC, 1998)

จากการคำนวณ % Recovery และเปรียบเทียบค่าทดสอบกับค่าอ้างอิงโดยใช้ t-test ของ Calcium Ammonium Nitrate, Ammonium Sulphate และ Ammonium Chloride พบว่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน

CRM	ค่าที่วิเคราะห์ได้	ค่าจริง (จากใบ cer)	% Recovery	t-test ที่ 95%
Calcium Ammonium Nitrate	13.07	13.04	100.22	1.05, ยอมรับ
Ammonium Sulphate	21.22	21.20	100.09	1.58, ยอมรับ

Ammonium Chloride	26.18	26.18	100.01	0.00, ยอมรับ
-------------------	-------	-------	--------	--------------

2. การหาค่า Precision

การหา Precision ได้จากประเมินโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio (HORRAT)

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

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

C = concentration ratio

เกณฑ์ของ HORRAT ที่ยอมรับได้จะต้อง ≤ 2

จากการประเมินค่า Precision ของ CRM ที่ระดับต่ำปานกลาง และสูง โดยใช้สมการ Horwitz's Ratio พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ ทั้ง 3 ระดับ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน

CRM	% RSD	% RSD expected	HORRAT
Calcium Ammonium Nitrate	0.69	1.79	0.39, ยอมรับ
Ammonium Sulphate	0.17	1.67	0.10, ยอมรับ
Ammonium Chloride	0.42	1.62	0.26, ยอมรับ

3. การหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

จากการวิเคราะห์ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ พบว่ามีค่า $\bar{x} = 0.12$ และ $SD = 0.01$ ทั้งนี้ $LOD = \bar{x} + 3SD$ และ $LOQ = \bar{x} + 10SD$ ดังนั้น จากการวิเคราะห์จึงมีค่า LOD และ LOQ 0.15% และ 0.22% ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย สวพ.5 พบว่า การวิเคราะห์หาความถูกต้อง (Accuracy), ความแม่นยำ (Precision), ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection; LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ และสามารถรายงานผลได้ (Limit of Quantitation; LOQ) โดยทำการวิเคราะห์ แอมโมเนียมไนโตรเจนที่เป็น Certified Reference Material (CRM) และนำมาประเมินความถูกต้อง จาก 2 วิธี คือ หาค่า Recovery พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และหาค่าความแตกต่างระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริงของ CRM โดย T-test พบว่าค่าที่ได้ไม่แตกต่างกัน ประเมินความแม่นยำโดยใช้สมการของ Horwitz's Ratio (HORRAT) ได้ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีช่วงที่เหมาะสมและเป็นเส้นตรง (Linearity) สำหรับการวิเคราะห์แอมโมเนียมไนโตรเจน คือ 0-26.18% มีปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (LOQ) เท่ากับ 0.15% และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) เท่ากับ 0.22% ซึ่งค่าทั้งหมดนั้น ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานสากล

การนำไปใช้ประโยชน์

เพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียมไนโตรเจนในปุ๋ยเคมี ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.5

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี. 2551. คู่มือวิธีวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 66 หน้า
- AOAC peer – Virified method, Nov. 1998. Association of Official Analytical Chemises (AOAC). 2005. Official Method of Anaysis 955.04. 18th ed. International Gaithersburg, MD, USA. P. 13 - 14