รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. **โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ ปุ๋ย พืช ดิน และน้ำ

   กิจกรรมที่ 3 พัฒนาเทคนิคระบบการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พืช
3. **ชื่อการทดลอง** พัฒนาวิธีวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืช

   Development and Method Validation on Analysis of Nitrate in Plant
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุวลักษมิ์ ไชยทอง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวนันทกานต์ ขุนโหร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายมนต์ชัย อินทร์ท่าอิฐ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวเรวดี ศิริยาน	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาธิดา โพธิ์น้อย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืช เพื่อหาวิธีวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ และสามารถอ้างอิงได้ตามวิธีมาตรฐานสากล โดยทำการทดสอบวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Brucine และวิธี Salicylic acid ผลการทดสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธี Brucine พบว่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร และวิธี Salicylic acid อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) ของทั้งสองวิธี เท่ากับ 0.9835 และ 0.9994 ตามลำดับ จากผลการทดสอบจึงเลือกวิธี Salicylic acid เพื่อวิเคราะห์หา ไนเตรทในพืชสำหรับห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี Salicylic acid โดยการทดสอบช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity) ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (Precision) ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ) ผลการทดสอบพบว่า Linearity อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998 การตรวจสอบ Precision ได้ค่า HorRat (Horwitz’s ratio) เท่ากับ 0.42 0.36 และ 0.29 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ การตรวจสอบ Accuracy โดยประเมินจาก %recovery พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 99.87 – 108 % การหาค่า LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 0.041 และ 0.102 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid เป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์

Abstract

Development and validation method for determination of nitrate in plant was conducted for using as standard method with satisfactory accuracy and precision. Brucine method was compared with Salicylic acid method. Linear range of Brucine method was 0-1.0 mg/L with correlation coefficient (r) 0.9835 while Salicylic acid method was 0-2.0 mg/L with correlation coefficient (r) 0.9994. Consequently, Salicylic acid method was chosen as nitrate determination method with wider linear range. Salicylic acid method for determination of nitrate in plant for laboratory was validated. The results showed linear range 0-1.25 mg/L with correlation coefficient (r) 0.9998. HorRat values of precision were 0.42, 0.36 and 0.29 which were accepted. The accuracy was evaluated by % recovery in range 99.87-108%. Limit of detection (LOD) and Limit of quantitation (LOQ) were 0.041 and 0.102 mg/L, respectively. Accordingly, analysis of nitrate in plant by Salicylic acid method was suitable for operating in laboratory.

6. คำนำ

ไนเตรท เป็นเกลือของกรดไนตริค ซึ่งเป็นกรดแก่ เกลือไนเตรทที่ใช้ในทางการเกษตรและอุตสาหกรรม ได้แก่ เกลือไนเตรทของโซเดียม โปตัสเซียม แอมโมเนียม ทองแดง เหล็ก อลูมิเนียม โครเมียม ปรอท และตะกั่ว นอกจากนี้สารไนเตรทถูกนำมาใช้ในทางด้านเกษตรกรรม เป็นปุ๋ยในพืชบางชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรท โปตัสเซียมไนเตรท และแคลเซียมไนเตรท ไนเตรทเป็นรูปหนึ่งของไนโตรเจนที่เป็นประโยชน์ต่อพืช สารไนเตรทที่พืชดูดขึ้นไปใช้ส่วนใหญ่พืชนำไปใช้ในการสร้างสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด ส่วนที่ไม่สามารถนำไปใช้ยังคงเป็นไนเตรทไอออนสะสมอยู่ในเซลล์พืช หากสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการสะสมไนเตรท เช่น การปลูกพืชในสภาพแสงน้อย พืชจะมีการดูดสารไนเตรทจากดินเข้าไปมาก เนื่องจากพืชมีการกระตุ้นการสะสมไนเตรทเป็นการชดเชยแรงดันออสโมติก ทดแทนความเข้มของอินทรีย์สาร(คาร์โบไฮเดรต) ที่ลดลงซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงเมื่อความเข้มแสงลดลง นอกจากนี้ไนเตรทที่พืชดูดเข้าไปจะถูกรีดิวซ์ให้เป็นไนไทรต์และแอมโมเนียมตามลำดับ หลังจากนั้นแอมโมเนียมจะถูกนำไปสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโน และอะไมด์ต่อไป (ศุภลักษณ์, 2549)

สารไนเตรทจะสะสมในส่วนต่างๆของพืชแตกต่างกันไป ในพืชต้นเดียวกันส่วนที่แก่กว่าจะมีการสะสมมากกว่าส่วนที่อ่อนกว่า ดอกจะมีความเข้มข้นของสารไนเตรทน้อยที่สุด รองลงมาคือ ผล ใบ รากและก้านใบจะมีการสะสมของไนเตรทมากที่สุด ในผักบางชนิดจะมีการสะสมของไนเตรทค่อนข้างสูงเช่น ปวยเล็ง ผักกาดเขียว ผักกาดหอม บีท เป็นต้น

การบริโภคผักหรืออาหารที่มีไนเตรทสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายมนุษย์ได้ สารไนเตรท เมื่อเข้าสู่กระเพาะอาหารบางส่วนจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสารไนไตรท์สามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดไปทำปฏิกิริยากับเม็ดโลหิตโดยกระบวนการ oxidation เปลี่ยนแปลงเม็ดโลหิตจาก hemoglobin ให้กลายเป็น Methaemoglobin โดย oxidize Fe^{2+} ในโมเลกุลของเม็ดเลือดในรูปของ hemoglobin ให้กลายเป็น Fe^{3+} เม็ดโลหิตที่เปลี่ยนแปลงไปนี้จะไม่มีคุณสมบัติในการ

รับและนำพาออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ต่างๆในร่างกาย ทำให้เกิดอาการตัวเขียว อ่อนเพลีย หายใจหอบ ปวดศีรษะ และหัวใจเต้นแรง ดังนั้นการบริโภคสารไนเตรทเข้าไปจำนวนมาก ร่างกายจะเกิดภาวะขาดออกซิเจนอย่างฉับพลันได้ (กรรณิกา, 2555)

การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในพืชจึงมีความสำคัญเพื่อจะได้รวบรวมข้อมูล และบ่งชี้ว่าพืชชนิดใดที่มีปริมาณไนเตรทสูง จะได้หลีกเลี่ยงในการบริโภคพืชเหล่านั้น การวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในพืชของกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร โดยใช้วิธี SALICYLIC ACID METHOD ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในพืช และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนาวิธี ปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีให้เหมาะสมแล้ว และมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นหรือเลือกมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์เฉพาะที่ตั้งไว้ การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และประเมินด้วยวิธีการทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเหล่านี้ได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity) ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ช่วงของการใช้งาน(working range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ขีดจำกัดของวิธีเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (limit of detection และ limit of quantitation)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 และ 5 ตำแหน่ง
3. Water bath
4. Auto pipet
5. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์อื่น ๆ ที่จำเป็นในการวิเคราะห์
6. สารเคมี
   - 6.1 Sodium chloride
   - 6.2 Sulfuric acid
   - 6.3 Brucine sulfate.7H_2O
   - 6.4 Sulfanilic acid.H_2O
   - 6.5 Potassium nitrate
   - 6.6 Salicylic acid

6.7 Sodium hydroxide

วิธีการ

1. การเตรียมสารเคมีและสารละลายมาตรฐานสำหรับ วิธี Brucine method (AOAC, 1980)

1.1 สารละลาย Brucine-Sulfanilic acid

ละลาย brucine sulfate.7H_2O 1.0 กรัม และ Sulfanilic acid. H_2O 0.1 กรัม ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Type-1-water) ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมกรด Hydrochloric ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในที่มืด และมีอุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลายมาตรฐาน NO_3^--N 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1) ละลาย Potassium nitrate 0.07128 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ปริมาตร 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย 30% Sodium chloride ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด Sulfuric ความเข้มข้น 13 N ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด Brucine-Sulfanilic ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออนให้ปริมาตรรวมได้ 20 มิลลิลิตร (เตรียมแต่ละความเข้มข้นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 0-10 องศาเซลเซียส)

1.3 นำสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที

1.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

2. การเตรียมสารเคมีและสารละลายมาตรฐานสำหรับวิธี salicylic acid (Cataldo et al., 1975)

2.1 สารละลาย Salicylic acid-H_2SO_4

ละลาย salicylic acid 5.0 กรัม ในกรด sulfuric ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 สารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ความเข้มข้น 0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1) ละลาย Potassium nitrate 0.1805 กรัม ใน Type-1- water ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ปริมาตร 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 5% Salicylic acid-H_2SO_4 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 19 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.3 นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3. วิธีการวิเคราะห์ไนเตรทในพืช

3.1 ชั่งตัวอย่างพืชที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และบดละเอียดประมาณ 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2 นำตัวอย่างจากข้อ 3.1 กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

3.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรอง (ข้อ 3.2) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5% Salicylic acid-H_2SO_4 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 19 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.4 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid

4.1 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ความเข้มข้น 0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2. ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างปริมาณ NO_3^--N กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง

3) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า Correlation coefficient (r) ต้องมีค่า $r > 0.995$ เพื่อนำช่วงที่ได้มาศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity)

4.2 การศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity)

1) เลือกช่วงที่เป็นเส้นตรงจากการศึกษา Range โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน NO_3^--N ความเข้มข้น 0-1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ดำเนินตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2. ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

2) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างปริมาณ NO_3^--N กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสง

3) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยพิจารณาจากค่า Correlation coefficient (r) ต้องมีค่า $r > 0.995$

4.3 การศึกษา ความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณ NO_3^--N จากการ spike sample ที่ระดับต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ

1) ดำเนินการวิเคราะห์ NO_3^--N ในพืชตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2. โดยทำวันละ 1 ซ้ำใช้บุคคล และเครื่องมือเดียวกัน

2) บันทึกข้อมูล และคำนวณหาค่า Precision

4.4 ศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณ NO_3^--N จากการ spike sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และ สูง ระดับละ 10 ซ้ำ

1) ดำเนินการวิเคราะห์ NO_3^--N ในพืชตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2. โดยทำวันละ 1 ซ้ำใช้บุคคล และเครื่องมือเดียวกัน

2) บันทึกข้อมูล และประเมิน %Recovery

4.5 การศึกษาหาค่า Limit of detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

1) ชั่งตัวอย่างพืชที่มีปริมาณไนเตรทต่ำๆ (sample blank) จำนวน 10 ซ้ำ

2) ดำเนินการตามขั้นตอนการวิเคราะห์ ข้อ2 โดยทำวันละ 1 ซ้ำใช้บุคคล และเครื่องมือเดียวกัน

3) คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4) คำนวณหาค่า LOD และ LOQ

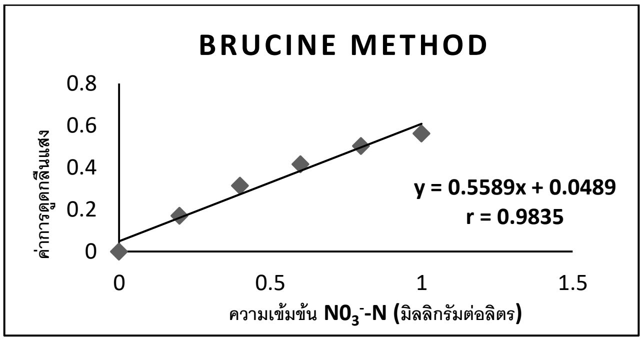
ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2560

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตร และนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

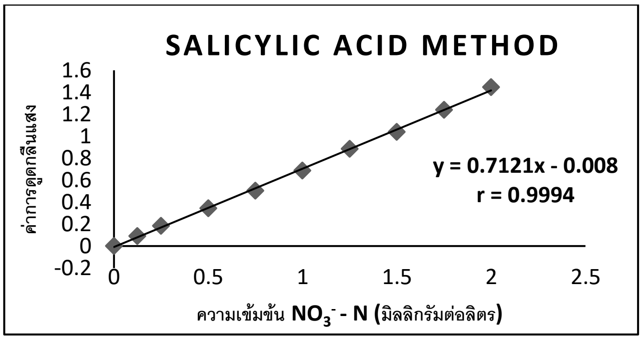
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การศึกษา Range ของวิธีวิเคราะห์

โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณ NO_3^--N (แกนx) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกนy) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับวิธี brucine ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9835 (ภาพที่ 1) และช่วง 0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับวิธี Salicylic acid ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9994 (ภาพที่ 2) วิธี Salicylic acid มีค่า correlation coefficient (r) > 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับจึงเลือกเป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ



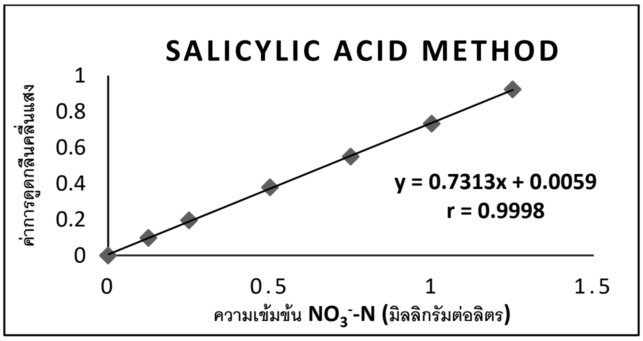
ภาพที่ 1 การหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Range) ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Brucine (AOAC,1980) ความเข้มข้น NO_3^--N ตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2 การหาช่วงความเป็นเส้นตรง (Range) ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid (Cataldo et al., 1975) ความเข้มข้น NO^-_3-N ตั้งแต่ 0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

8.2 การศึกษา Linearity ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid

โดยสร้างกราฟระหว่างปริมาณ NO_3^--N (แกนx) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกนy) โดยเลือกเอาช่วงความเข้มข้น 0-1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9998



ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาค่า Linearity ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid ความเข้มข้น NO^-_3-N ตั้งแต่ 0-1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

8.3 การศึกษาหาค่า Precision ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid

หาค่า Precision โดยวิเคราะห์ปริมาณ NO_3^--N จากการ spike sample ที่ระดับ ต่ำ กลาง และสูง ระดับละ 10 ซ้ำ โดยทำวันละ 1 ซ้ำใช้บุคคลและเครื่องมือเดียวกัน คำนวณหาค่า %RSD แล้วประเมินโดยใช้ Horwitz’s Ratio (ทิพวรรณ, 2549)

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

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

เกณฑ์การประเมิน HorRat < 2 แสดงว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ

C = Concentration ratio

ระดับความเข้มข้นต่ำ : Spike sample (0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร)

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 1.34E-07)}$$

$$= 14.32$$

HorRat (Horwitz's Ratio) = 5.97/14.32

= 0.42

ระดับความเข้มข้นปานกลาง : Spike sample (0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร)

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5\log 2.87E-07)}$

= 12.73

HorRat (Horwitz's Ratio) = 4.53/12.73

= 0.36

ระดับความเข้มข้นสูง : Spike sample (0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร)

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5\log 7.75E-07)}$

= 11.01

HorRat (Horwitz's Ratio) = 3.22/11.01

= 0.29

ค่า HorRat < 2 ทั้งช่วงความเข้มข้นไนเตรท ต่ำ กลาง และสูง แสดงว่า Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (ตารางภาคผนวกที่ 1)

8.4 การศึกษาหาค่า Accuracy ของวิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์หาปริมาณ NO_3^--N จากการ spike sample ที่ระดับ ต่ำ กลาง และ สูง ระดับละ 10 ซ้ำ พร้อมทั้ง หาค่า sample blank 10 ซ้ำ โดยทำวันละ 1 ซ้ำใช้บุคคลและเครื่องมือเดียวกัน

ค่า sample blank มีค่า 0.026 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางผนวกที่ 1)

หา %Recovery

$$\%\text{Recovery} = \frac{\text{C1} - \text{C2}}{\text{C3}} \times 100$$

C1 = ความเข้มข้นของสารใน spiked sample

C2 = ความเข้มข้นของ sample blank

C3 = ความเข้มข้นของ analyte ที่เติม

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ C1 = 0.134 C2 = 0.026 และ C3 = 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{0.134 - 0.026}{0.1} \times 100$$

= 108 %

ที่ระดับความเข้มข้นปานกลาง C1 = 0.287 C2 = 0.026 และ C3 = 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{0.287 - 0.026}{0.25} \times 100$$

= 104.4 %

ที่ระดับความเข้มข้นสูง C1 = 0.775 C2 = 0.026 และ C3 = 0.75 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$\%\text{Recovery} = \frac{0.775 - 0.026}{0.75} \times 100$$

= 99.87 %

เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าผลการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

8.5 การศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ และรายงานผลได้ (LOQ)

8.5.1 จากการวิเคราะห์ sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

LOD = mean + 3SD = 0.026 + (3×0.005) = 0.041 มิลลิกรัมต่อลิตร

LOQ = (mean + 10SD) = 0.026 + (10 ×0.005) = 0.076 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อพิสูจน์ LOQ ด้วยการ spike sample ที่ความเข้มข้น 0.076 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน sample blank ซึ่งมีค่า 0.026 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้ค่าความเข้มข้นของ $N0_3^-$-N เท่ากับ 0.102 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีค่า LOQ = 0.102 มิลลิกรัมต่อลิตร

8.5.2 ผลการพิสูจน์ LOQ ด้วยการ spike sample ที่ความเข้มข้น 0.076 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงใน sample blank ซึ่งมีค่า 0.026 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 105.26 % ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 %) และ ได้ค่า HorRat = 0.38 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ HorRat < 2) (ตารางภาคผนวกที่ 2)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืช ได้ผลการตรวจสอบดังนี้

9.1 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range) สำหรับวิธี Brucine อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดสอบความสัมพันธ์ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) กับความเข้มข้นของ NO_3^--N (มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าค่า r = 0.9835 ซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ r >0.995

9.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Range) สำหรับวิธี Salicylic acid อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดสอบความสัมพันธ์ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) กับความเข้มข้นของ NO_3^--N (มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าค่า r = 0.9994 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ r >0.995

9.3 ช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่จะนำมาใช้งาน (Linearity): เลือกช่วงความเข้มข้น 0-1.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดสอบความสัมพันธ์ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbance) กับความเข้มข้นของ NO_3^--N (มิลลิกรัมต่อลิตร) พบว่าค่า r = 0.9998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ r >0.995

9.4 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ (Precision) จากการ spike sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ประเมินจากค่า%RSD โดยใช้ HorRat (Horwitz's ratio) พบว่าได้ค่า HorRat คือ 0.42 0.36 0.29 ตามลำดับ ซึ่งค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ HorRat < 2

9.5 ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) จากการ spike sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง พบว่าได้ค่า %Recovery เท่ากับ 108, 104.4 และ 99.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

9.6 ปริมาณต่ำที่สุดสามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) คือ 0.041 มิลลิกรัมต่อลิตร

9.7 ปริมาณต่ำที่สุดสามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ) คือ 0.102 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ไนเตรทในพืชด้วยวิธี Salicylic acid เป็นวิธีที่เหมาะสมและยอมรับได้สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การวิเคราะห์ไนเตรทในพืช ตามวิธี Salicylic acid (Cataldo et al., 1975) สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืช วัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

กรรณิกา จ้าเสียง. 2555. ปริมาณไนเตรทที่ตกค้างในผักสลัด (Green oak). คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. ปทุมธานี.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพมหานคร.

ศุภลักษณ์ สิงหบุตร. 2549. โรคขาดธาตุอาหารของพืช. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพมหานคร.

AOAC. 1980. Brucine Colorimetric Method. 1980. pp.554-555 *In* William Horwitz(ed.) Methods of Analysis, 13th edition. Washington, DC.

Catado DA., M. Haroon, L.E.Schrader and V.L.Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Comun. Soil Sci. Plant Anal. 6(1): 71-80

13. ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลวิเคราะห์ปริมาณ NO_3^--N ของ sample blank และ spike sample ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง

ซ้ำที่	Sample blank (mg/L)	Spike sample (mg/L)		
		0.1	0.25	0.75
1	0.028	0.128	0.276	0.778
2	0.032	0.132	0.282	0.782
3	0.028	0.129	0.270	0.780
4	0.032	0.132	0.289	0.770
5	0.033	0.130	0.302	0.730
6	0.024	0.150	0.303	0.800
7	0.025	0.140	0.300	0.821
8	0.020	0.145	0.294	0.769
9	0.021	0.128	0.279	0.750
10	0.020	0.130	0.271	0.770
Mean	0.026	0.134	0.287	0.775
SD	0.005	0.008	0.013	0.025
%RSD	19.23	5.97	4.53	3.22

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลการพิสูจน์ค่า LOQ

ซ้ำที่	Spike sample 0.076 mg/L
1	0.098
2	0.110
3	0.108
4	0.104
5	0.111
6	0.100
7	0.106
8	0.112
9	0.101
10	0.115
mean	0.106
SD	0.006

%RSD	5.66
%recovery	105.26

Predicted Horwitz RSD = 0.66 x $2^{(1-0.5\log 1.06E-07)}$

= 14.83

HorRat (Horwitz's Ratio) = 5.66/14.83

= 0.38

$$\%\text{Recovery} = \frac{0.106 - 0.026}{0.076} \times 100$$

= 105.26