พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี

Development and Method Validation of Boron Analysis in Plant by Inductively Coupled Plasma Spectrometry technique

สุวลักษมิ์ ไชยทอง สุภานันทน์ จันทร์ประอบ สาธิดา โพธิ์น้อย

Suwaluck Chaitong Supanun Junpra-ob Sathida Phonoy

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Development of boron analysis in plant using inductively coupled plasma spectrometry (ICP) was conducted by following guidelines from the "Handbook of Methods for Plant Analysis". Its analysis condition and matrix effects were studied. Results showed a suitable condition for boron in plant determination at 249.772 Axial wavelength, 1.2 kW RF power, 14.0 LPM plasma flow, 0.8 LPM Auxiliary flow, 1.2 LPM Nebulizer flow, 25 RPM pump speed, and 25 seconds uptake. The slope of boron standard calibration curve and matrix calibration curve at 0-1.2 mg/L boron concentration range with %RPD lower than 10% indicated that there is no matrix effects according to NATA standard. A working range and standard curve linearity were also validated. At 0-1.2 and 0-1.4 mg/L, the curve's correlation coefficients (r) are 0.9999 and 1.0000, respectively. The precision of the technique was determined by HorRat values at low, medium, and high boron concentrations which are 0.5, 0.7, and 0.3, respectively. These values are acceptable according to AOAC standards. %Recovery range is 85.5 - 90.9 % and is also acceptable by AOAC standard. The limit of detection and limit of quantitation are 0.15 and 6.75 mg/kg, respectively. Ruggedness under different temperatures, time, and HCl volume used in washing ashes from sample preparation process, was determined by t-test and found no significant difference in every parameter. Therefore, analysis range is 6.75 – 27.0 mg/kg for ICP technique from the "Handbook of Methods for Plant Analysis" is precise, accurate, reliable, and suitable for use in a laboratory.

Keywords : Boron in plant, Inductively coupled plasma spectrometry technique, Method validation

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis โดยศึกษาสภาวะของการวิเคราะห์ และศึกษาผลของ Matrix effects ต่อการวิเคราะห์โบรอนในพืช พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์โบรอนด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ได้แก่ Wavelength เท่ากับ 249.772 Axail RF power เท่ากับ 1.2 kw Plasma flow เท่ากับ 14.0 LPM Auxiliary flow เท่ากับ 0.8 LPM Nebulizer flow เท่ากับ 1.20 LPM Pump เท่ากับ 25 RPM และ Uptake เท่ากับ 25 sec ผลการศึกษา Matrix effects พบว่าความชันของ Standard calibration curve และ Matrix calibration curve ในช่วงความเข้มข้นโบรอน 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความต่างกันน้อยกว่า 10% (%RPD<10) แสดงว่าการทดสอบไม่มี Matrix effects ตามมาตรฐาน Nata ผลการตรวจสอบช่วงของการวิเคราะห์และช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.2 และ 0-1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 0.9999 และ 1.0000

ตามลำดับ ผลการพิสูจน์ความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ได้ค่า HorRat (Horwitz's ratio) เท่ากับ 0.5 0.7 และ 0.3 ตามลำดับ และการพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจาก %Recovery พบว่า อยู่ในช่วง 85.5 – 90.9 % ทั้งความแม่นยำและความถูกต้อง ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ และปริมาณต่ำสุด ที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ มีค่าเท่ากับ 0.15 และ 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เวลา และปริมาณสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการล้างเถ้าตัวอย่าง โดยการประเมินค่าทางสถิติ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของการเปลี่ยนแปลงทั้งสามสภาวะการทดสอบ ทั้งนี้การวิเคราะห์โบรอนในพืชในช่วงความเข้มข้น 6.75 – 27.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis เป็นวิธีที่เหมาะสมสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์พืชได้ เพราะเป็นวิธีที่ถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ

คำหลัก: โบรอนในพืช เทคนิคอินดักทีพลีคัพเปิลพลาสมาสเปคโตรเมทรี การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

คำนำ

โบรอนเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในต้นพืชและสรีรวิทยาของพืช เช่น การสร้างผนังเซลล์ การสังเคราะห์ลิกนินและเมตาบอลิซึมของสารประกอบคาร์โบไฮเดรต เมื่อพืช ขาดโบรอนจะก่อให้เกิดความผิดปกติของผนังเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญพืช จึงแสดงอาการใบอ่อนหงิกงอ หรือหักเป็นตะขอ ไส้กลวงหรือเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากการตายของเซลล์บริเวณนั้น ผลบิดเบี้ยวเสียรูปทรง พืชที่ขาดโบรอนจะทำให้เกิดการสะสมของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์พืช การขาดโบรอนในพืชตระกูลถั่วทำให้พืช ตึงไนโตรเจนน้อยลง การขาดโบรอนมักส่งผลกระทบรุนแรงในระยะเจริญพันธุ์ของพืช พืชที่ขาดโบรอนมักมีดอกที่ไม่สมบูรณ์ เกสรตัวผู้เป็นหมัน ผลมีเมล็ดน้อยกว่าปกติหรือไม่มีเมล็ด เมล็ดลีบ มีอัตราการงอกต่ำ (สมศักดิ์, 2537)

การวิเคราะห์เนื้อเยื่อของพืช ช่วยให้ทราบถึงการขาดธาตุและความเป็นพิษของธาตุในพืชนั้นได้ ซึ่งมีการวิเคราะห์หลายเทคนิคที่สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของธาตุต่างๆที่มีในเนื้อเยื่อพืชได้ อาทิเช่น เทคนิค Atomic absorption spectrometry (AAS) เทคนิค Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) เทคนิค Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) และเทคนิค Flame atomic absorption spectrometry (FASS) เป็นต้น (Bhandari, 2018)

การวิเคราะห์หาปริมาณโบรอนในพืชสามารถทำโดยการเผาที่อุณหภูมิสูง (High temperature dry oxidation of the organic matter) และทำการละลายเถ้าด้วยกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Atomic absorption spectrometry (AAS) หรือ เทคนิค Inductively coupled plasma spectrometry (ICP-AES) (Bhandari, 2018)

ปัจจุบันการวิเคราะห์โบรอนในพืชของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร เป็นวิธี Azomethine-H ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สารเคมีปริมาณมาก และใช้ระยะเวลานานในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โบรอนในพืช เป็นเทคนิค Inductively coupled plasma spectrometry ซึ่งเป็นวิธีที่มีสภาพไวสูง รวดเร็ว ใช้สารเคมีปริมาณน้อย และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยได้ศึกษาสภาวะการวิเคราะห์ของวิธีและสภาวะที่เหมาะสมของการใช้งานเครื่อง Inductively coupled plasma spectrometer สำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช นอกจากนี้ได้ศึกษา Matrix effects พบว่าวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค inductively coupled plasma spectrometry ตามวิธี Handbook of Methods for Plant Analysis ไม่มี Matrix effects แสดงให้เห็นว่า สารและธาตุอื่นๆ ในตัวอย่างพืชไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณโบรอน

ทั้งนี้ การตรวจหาปริมาณโบรอนในพืชมีความจำเป็นอย่างมาก เพราะจะทำให้ทราบว่าพืชนั้นๆ ขาดธาตุโบรอนหรือมีธาตุโบรอนเพียงพอต่อความต้องการของพืชหรือไม่ ในกรณีที่พืชมีปริมาณธาตุโบรอนที่น้อยเกินไปหรือขาดธาตุโบรอน เกษตรกรจะสามารถเพิ่มธาตุโบรอนให้กับพืช ทำให้แก้ปัญหาการขาดธาตุโบรอนได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุโบรอนที่มีประสิทธิภาพ ต้องมาจากวิธีที่ถูกต้อง แม่นยำและเชื่อถือได้ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ถือเป็นกระบวนการหนึ่งของการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการทดสอบ เป็นกระบวนการที่พิสูจน์ว่าวิธีทดสอบมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบตามวัตถุประสงค์ สำหรับวิธีทดสอบที่ต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ วิธีที่นำไปใช้ต่างห้องปฏิบัติการหรือต่างเครื่องมือกัน วิธีทดสอบที่ไม่ใช่วิธีมาตรฐาน หรือเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการปรับเปลี่ยน ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน วิธีที่ใช้นอกขอบเขตวิธีมาตรฐาน และเมื่อต้องการแสดงให้เห็นว่าวิธีสองวิธีไม่แตกต่างกัน คุณลักษณะเฉพาะโดยทั่วไปที่ใช้ประเมินในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ ความจำเพาะ ขีดจำกัดในการตรวจพบ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ช่วงของการใช้งาน ความเป็นเส้นตรง สภาพไว ความถูกต้อง ความเที่ยง และความคงทนของวิธี (Eurachem, 2014)

เนื่องจาก กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี ได้มีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์โบรอนในพืช เป็นเทคนิค Inductively coupled plasma spectrometry ซึ่งเป็นวิธีใหม่ของห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช เพื่อให้ได้วิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ เพื่อที่จะนำวิธีที่ได้ไปใช้กับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Inductively Coupled Plasma Spectrometer
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 และ 5 ตำแหน่ง
3. เตาเผา
4. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
5. ปิเปต
6. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 50 100 2000 มิลลิลิตร
7. หลอดพลาสติกก้นแหลมขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
8. กระดาษกรองเบอร์ 42
9. กรวยกรองแก้ว
10. Rack สำหรับใส่หลอดพลาสติกก้นแหลม
11. สารเคมี ได้แก่ Boric acid (H_3BO_3), Hydrochloric acid (HCl), น้ำปราศจากไอออน (DI), Certified Reference Materials (CRMs); NIST-1515, NIST-1547

วิธีการ

1. ศึกษาสภาวะของเครื่อง Inductively coupled plasma spectrometer (ICP) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช ได้แก่ Wavelength RF Power Plasma flow Auxiliary flow Nebulizer flow Pump และ Uptake

1.1 พิจารณาค่าความเข้มแสง (Intensity) และค่า Correlation coefficient ของกราฟมาตรฐานสำหรับสารละลายมาตรฐานโบรอนช่วงความเข้มข้น 0-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามวิธี Handbook of methods for plant analysis (Gupta, 1998)

1.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ละลาย Boric acid (H_3BO_3) 0.28580 กรัม ด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

1.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโบรอน 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 2% HCl

1.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอน 0 0.5 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานโบรอน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0 0.5 2 4 6 8 และ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 2% HCl

1.1.4 นำสารละลายมาตรฐานโบรอน ความเข้มข้น 0 0.5 2.0 4.0 6.0 8.0 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มาวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma spectrometer (ICP) ที่ความยาวคลื่น (Wavelength) เท่ากับ 184.641 nm (axial, radial) 208.956 nm (axial, radial) 249.677 nm (axial, radial) และ 249.772 nm (axial, radial)

1.1.5 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของโบรอน (แกน x) และค่าความเข้มแสง (Intensity) (แกน y)

1.1.6 พิจารณาค่าความเข้มแสง (Intensity) ที่ความเข้มข้นโบรอน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานจากการวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ที่ความยาวคลื่นต่างกัน โดยต้องมีค่า Correlation coefficient, $r \geq 0.995$

1.2 หาค่าความถูกต้อง ของการวิเคราะห์ CRMs ; NIST-1547

1.2.1 ชั่ง CRMs; NIST-1547 (ความเข้มข้นของโบรอนเท่ากับ 29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) น้ำหนัก 1.xxxx กรัม ลงในถ้วยกระเบื้อง นำไปเผาด้วยเตาเผา ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

1.2.2 ละลายเถ้า CRMs; NIST-1547 ด้วย 20% HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.2.3 เทสารละลาย CRMs; NIST-1547 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

1.2.4 นำสารละลาย CRMs; NIST-1547 ไปวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง ICP ที่ความยาวคลื่น 184.641 (axial, radial) 208.956 (axial, radial) 249.677 (axial, radial) และ 249.772 (axial, radial)

1.2.5 นำผลวิเคราะห์มาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจากค่า %Recovery (สมการ 1)

$$\%Recovery = (C1 / C2) \times 100 \quad \text{.....} \quad (1)$$

C1 = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

C2 = ความเข้มข้นของสารที่ทราบค่า, 29 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 % (AOAC, 2016)

1.3 เลือก Wavelength RF Power Plasma flow Auxiliary flow Nebulizer flow Pump และ Uptake ที่ทำให้ได้ค่าความเข้มแสง (Intensity) ของโบรอนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าสูงที่สุด ค่า Correlation coefficient, $r \geq 0.995$ และผลการพิสูจน์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ CRMs ต้องผ่านเกณฑ์กำหนด

2. ศึกษาการรบกวนของธาตุและสารอื่นๆ ต่อผลการวิเคราะห์โบรอนในพืช โดยการทดสอบ Matrix Effects

2.1 สร้าง Standard calibration curve

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอน 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

1) ชั่ง Boric acid (H_3BO_3) 0.04773 0.09546 0.14290 0.19063 0.23836 และ 0.28580 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้อง นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น

2) ละลาย Boric acid (H_3BO_3) ที่ได้จากการเผาด้วยน้ำ DI เทสารละลายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร โดยผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 และปรับปริมาตร (จะได้สารละลายมาตรฐานโบรอน 167 334 500 667 834 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร)

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐานโบรอนแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 2% HCl

4) จากนั้นปิเปตสารละลายมาตรฐานโบรอนแต่ละความเข้มข้น (ข้อ 3) ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 2% HCl

2.1.2 นำสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร หาค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง ICP และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานโบรอนและค่าความเข้มแสง (Intensity)

2.2 สร้าง Matrix calibration curve

2.2.1 ชั่งตัวอย่างพืชน้ำหนัก 1.xxxx กรัมลงในถ้วยกระเบื้องและชั่งตัวอย่างพืชน้ำหนัก 1.xxxx กรัม โดยเติม Boric acid (H_3BO_3) ความเข้มข้นเช่นเดียวกับการเตรียมสารมาตรฐานโบรอนในการสร้าง Standard calibration curve

2.2.2 เผาตัวอย่าง ละลายเถ้า เจือจาง และปรับปริมาตรเช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.2.3 นำสารละลายข้อ 2.2.2 หาค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง ICP และนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของโบรอน (แกน x) และค่าความเข้มแสง (Intensity) (แกน y)

2.3 พิจารณาความชันของ Standard calibration curve เทียบกับ Matrix calibration curve ถ้าพบว่าผลต่างของค่าความชัน หรือ %RPD น้อยกว่า 10% แสดงว่าไม่มี Matrix effects (Nata, 2018)

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of methods for plant analysis

3.1 ศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ (Linearity)

3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ

ปิเปตสารละลายมาตรฐานโบรอน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ข้อ 2.1.1) ปริมาตร 0 2 4 6 8 10 12 และ 14 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 2%HCl

3.1.2 นำสารละลายมาตรฐานโบรอน ความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มาวัด ค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma spectrometer (ICP) โดยเลือกความยาวคลื่นเท่ากับ 249.772 nm (axial) และสภาวะอื่นๆที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์โบรอน (จากผลการศึกษาข้อ 1)

3.1.3 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของโบรอน (แกน x) และค่าความเข้มแสง (Intensity) (แกน y)

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยต้องมีค่า Correlation coefficient, $r \geq 0.995$ และ นำช่วงที่ได้มาศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Range)

3.2 หาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่นำมาใช้งาน (Range)

3.2.1 เลือกช่วงที่เป็นเส้นตรงจากการศึกษา Linearity โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโบรอนความเข้มข้น 0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (เตรียมสารละลายมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.1)

3.2.2 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของโบรอน (แกน x) และค่าความเข้มแสง (Intensity) (แกน y)

3.2.3 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง ต้องมีค่า Correlation coefficient, $r \geq 0.995$

3.3 พิสูจน์ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง

3.3.1 ชั่ง CRMs และชั่งตัวอย่างพืช ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง โดยใช้ Trace elements in apple leaves (NIST-1515) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ได้แก่ระดับความเข้มข้นต่ำ 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นกลาง 13.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และระดับความเข้มข้นสูง 27 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เตรียมโดยการเติมตัวอย่าง NIST-1515 ลงไปในตัวอย่างพืช โดยปริมาณ NIST-1515 : ตัวอย่างพืช เป็นดังนี้ 0.25xx : 0.75xx 0.5xxx : 0.5xxx และ 1.xxxx : 0 กรัม ตามลำดับ

3.3.2 ชั่งตัวอย่างพืช Sample blank 0.75xx และ 0.5xxx กรัม

3.3.3 ละลายเถ้าตัวอย่างข้อ 3.3.1, 3.3.2 จากการเผา ด้วย 20%HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเทสารละลาย ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

3.3.4 นำสารละลายตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นโบรอนในระดับต่ำ กลาง และสูง ได้แก่ 6.75 13.5 และ 27 mg/kg ตามลำดับ ไปวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง ICP ที่ความยาวคลื่น 249.772 nm (axial)

3.3.5 นำผลวิเคราะห์ที่ได้จากการหาค่าความเข้มแสง (Intensity) คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่า $\%RSD_r$ ค่า Predicted Horwitz RSD และพิสูจน์ความแม่น โดยประเมินจากค่า HorRat (Horwitz's Ratio) ดังสมการ (2)

$$HorRat = \%RSD_r / \text{Predicted Horwitz RSD} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (2)$$

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

C = Concentration ratio

เกณฑ์การยอมรับ HorRat 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

3.4 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ของวิธีวิเคราะห์

3.4.1 ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.3

3.4.2 นำผลวิเคราะห์มาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจากค่า %Recovery ดังสมการ (3)

$$\text{Total \% recovery} = 100(C_f)/(C_u + C_A) \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (3)$$

C_f = ความเข้มข้นของสารใน fortified samples

C_u = ความเข้มข้นของ Unfortified samples

C_A = ความเข้มข้นของ Analyte ที่เติม

เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 % (AOAC, 2016)

3.5 หาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) จากนั้น พิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

3.5.1 ชั่งตัวอย่างพืชที่มีความเข้มข้นของโบรอนในระดับต่ำๆ น้ำหนัก 1.xxxx กรัม ลงในถ้วยกระเบื้อง จำนวน 10 ซ้ำ นำไปเผาด้วยเตาเผา ที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ ในวันเดียวกัน ใช้บุคคล และเครื่องมือเดียวกัน

3.5.2 ละลายเถ้าตัวอย่างข้อ 3.5.1 ด้วย 20% HCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.5.3 เทสารละลายตัวอย่างลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI

3.5.4 นำสารละลาย 3.5.3 ไปวัดค่าความเข้มแสง (Intensity) ด้วยเครื่อง ICP ที่ความยาวคลื่น 249.772 nm (axial)

3.5.5 นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณค่า S'_0 เพื่อหาค่า LOD และค่า LOQ ดังสมการ (4) และ (5)

$$LOD = 3S'_0 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (4)$$

$$LOQ = 10\ S'_0 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \quad (5)$$

3.5.6 พิสูจน์ความแม่นยำและความถูกต้อง ในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

1) วิเคราะห์ความเข้มข้นของโบรอน จากการ Spiked sample ที่ระดับ LOQ

2) นำผลวิเคราะห์ที่ได้ คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่า $\%RSD_r$ ค่า Predicted Horwitz RSD และพิสูจน์ความแม่นยำ โดยประเมินจากค่า HorRat (Horwitz's Ratio) ดังสมการ (2)

3) นำผลวิเคราะห์มาพิสูจน์ความถูกต้อง โดยประเมินจากค่า %Recovery ดังสมการ (3)

3.6 ศึกษาความคงทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

หาความคงทนของวิธีวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อย ดัง Table 1

Table 1 Boron in plant under slightly changed conditions.

Conditions	Handbook of reference methods for plant analysis	Method for slightly changed conditions
1	Ashing 500° c 4 hr.	Ashing 500° c 3.5 hr.
2	Ashing 500° c 4 hr.	Ashing 498° c 4 hr.
3	- Ashing 500° c 4 hr. - Dissolve the ash in 5 ml 20%HCl - Dilute solution to 50 ml	- Ashing 500° c 4 hr. - Dissolve the ash in 4.98 ml 20%HCl - Dilute solution to 50 ml

3.6.1 ทดสอบการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลองที่ 1 -3 โดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโบรอนจากการ Spiked sample ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร การทดลองละ 10 ซ้ำ

3.6.2 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ของแต่ละการทดลอง มาทดสอบความแตกต่างของความแปรปรวน (F-test) และใช้สถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่มที่เป็นอิสระจากกัน t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

กลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สภาวะของเครื่อง Inductively coupled Plasma spectrometer (ICP) ที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์โบรอนในพืช โดยทำการเลือก Wavelength RF Power Plasma flow Auxiliary flow Nebulizer flow Pump และ Uptake ที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาจากค่า r^2 ของกราฟมาตรฐานและความเข้มแสง (Intensity) ของโบรอนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า %Recovery จากการวิเคราะห์ CRMs พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์โบรอน คือ Wavelength ที่ 249.772 nm (axail), RF Power เท่ากับ 1.2 kw Plasma flow เท่ากับ 14.0 LPM Auxiliary flow เท่ากับ 0.8 LPM Nebulizer flow เท่ากับ 1.20 LPM Pump เท่ากับ 25 RPM Uptake เท่ากับ 25 sec (Table 2) ซึ่งพบค่า r ของกราฟมาตรฐานโบรอน เท่ากับ 0.99992 และ ค่า Intensity ของโบรอนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า Intensity มากที่สุด เมื่อเทียบกับการวัดค่าที่ความยาวคลื่นอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 1,827,244 และพบว่าค่า %Recovery ของการวิเคราะห์ CRMs มีค่าเท่ากับ 97.2 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด (80-110)

Table 2 Optimum conditions of an inductively coupled plasma spectrometer (ICP) for plant's boron analysis.

Wavelength	RF Power (kw)	Plasma flow (LPM)	Auxiliary flow (LPM)	Nebulizer flow (LPM)	Pump (RPM)	Uptake (sec)	r^2	Intensity B 10 mg/l	%Recovery
182.641a	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99972	-2381	-
182.641r	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99868	-911	-
208.956a	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99987	179,690	-
208.956r	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99988	17,295	-
249.677a	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99996	912,654	101.0
249.677r	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99987	127,434	105.9

Table 2 Optimum conditions of an inductively coupled plasma spectrometer (ICP) for plant's boron analysis.

Wavelength	RF Power (kw)	Plasma flow (LPM)	Auxiliary flow (LPM)	Nebulizer flow (LPM)	Pump (RPM)	Uptake (sec)	r^2	Intensity B 10 mg/l	%Recovery
249.772a	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99992	1,827,244	97.2
249.772r	1.2	14.0	0.8	1.20	25	25	0.99987	253,337	100.2

2. การรบกวนของธาตุและสารอื่นๆ ต่อผลการวิเคราะห์โบรอนในพืช

ผลการทดสอบ Matrix effects จาก Figure 1 พบว่า ความชันของ Standard calibration curve เทียบกับ Matrix calibration curve มีค่าความต่าง หรือ %RPD เท่ากับ 2.13% ซึ่งความชันต่างกันไม่เกิน 10% แสดงว่า ไม่มี Matrix effects หรือไม่มีการรบกวนของธาตุและสารอื่นๆต่อการวิเคราะห์โบรอนในช่วง 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

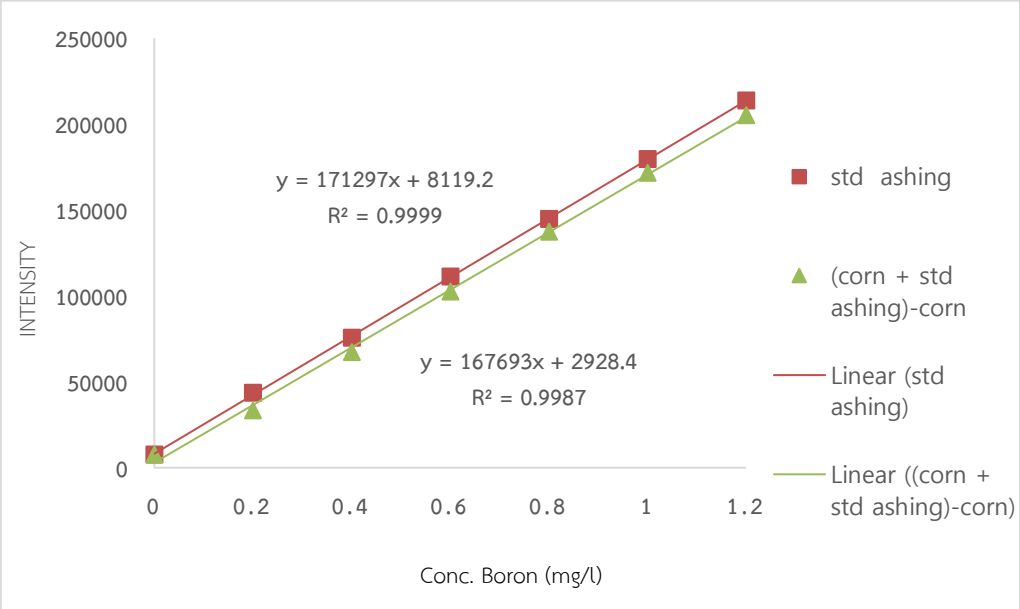

Figure 1 The slope of standard calibration curve and matrix calibration curve in the range of boron at 0-1.2 mg/L

3. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of methods for plant analysis (Gupta, 1998)

3.1 การศึกษา Linearity ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ความเข้มข้นโบรอนอยู่ในช่วง 0-1.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 1.0000 (Figure 2) พบว่า ค่า Correlation coefficient, r ≥ 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

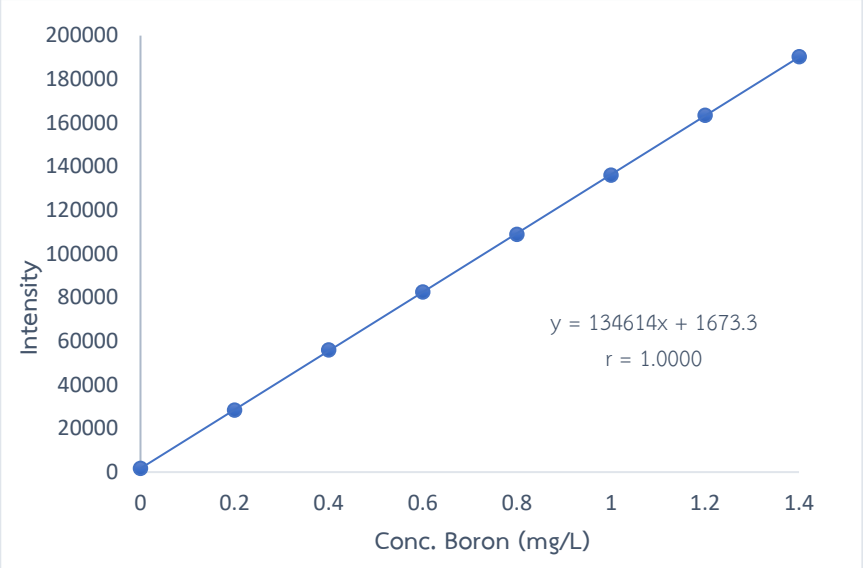

Figure 2 The linearity of calibration curve for boron at 0-1.4 mg/L.

3.2 การศึกษา Range ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชความเข้มข้นโบรอนอยู่ในช่วง 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ค่า Correlation coefficient, r เท่ากับ 0.9999 (Figure 3) พบว่า ค่า Correlation coefficient, r ≥ 0.995 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

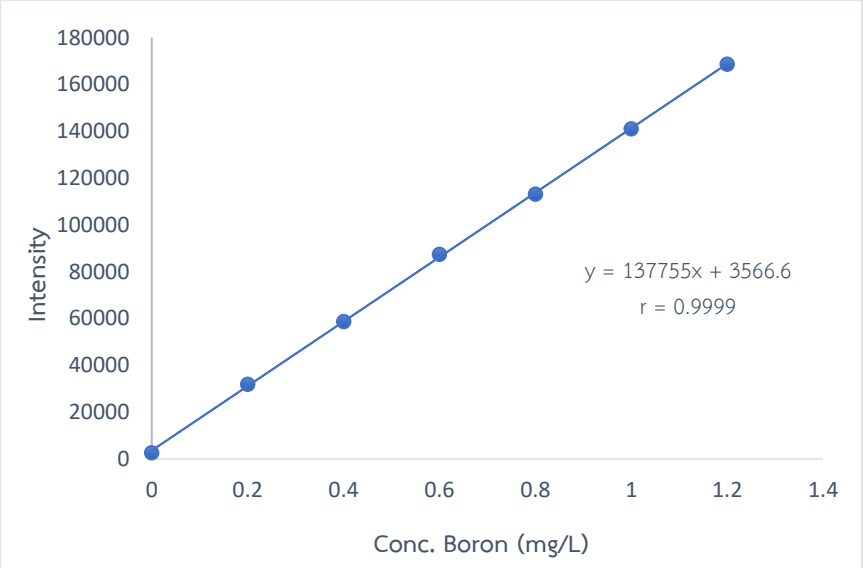

Figure 3 The range of calibration curve for boron at 0-1.2 mg/L.

3.3 พิสูจน์ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of methods for plant analysis ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ประเมินจากค่า HorRat

ระดับความเข้มข้นต่ำ: 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Predicted Horwitz RSD $= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 5.50E-06)}$

$= 8.17$

HorRat (Horwitz's Ratio) $= 4.13/8.17$

$= 0.5$

ระดับความเข้มข้นกลาง: 13.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5\log 1.149E-05)}$

= 7.31

HorRat (Horwitz's Ratio) = 5.37/7.31

= 0.7

ระดับความเข้มข้นสูง: 27.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Predicted Horwitz RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5\log 2.308E-05)}$

= 6.58

HorRat (Horwitz's Ratio) = 1.74/6.58

= 0.3

ค่า HorRat ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 0.5 0.7 และ 0.3 ตามลำดับ พบว่า ค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่าการวิเคราะห์โบรอนในพืชตามวิธี Handbook of methods for plant analysis มีความแม่นยำ

3.4 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) ของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of methods for plant analysis ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ประเมินจากค่า %Recovery

Total % Recovery = $100(C_f)/(C_u + C_A)$

C_f = ความเข้มข้นของสารใน fortified samples

C_u = ความเข้มข้นของ unfortified samples

C_A = ความเข้มข้นของ analyte ที่เติม

เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110 % (AOAC, 2016)

ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ C_f = 12.50 C_u = 7.0 และ C_A = 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

%Recovery = 100(12.50)/(7.0 + 6.75)

= 90.9%

ที่ระดับความเข้มข้นปานกลาง C_f = 18.49 C_u = 7.0 และ C_A = 13.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

%Recovery = 100 (18.49)/(7.0+13.50)

= 90.2 %

ที่ระดับความเข้มข้นสูง C_f= 23.08 C_u = 0 และ C_A = 27.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

%Recovery = 100 (23.08)/(0+27.00)

= 85.5 %

ค่า %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 90.9 90.2 และ 85.5 ตามลำดับ โดยมีเกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 80 - 110 ซึ่งการวิเคราะห์ Trueness ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ผ่านเกณฑ์การยอมรับ แสดงว่า การวิเคราะห์โบรอนในพืชตามวิธี Handbook of methods for plant analysis มีความถูกต้อง

3.5 การหาค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) และการพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

ผลการวิเคราะห์ Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ

LOD = $3S'_0$ = 3 × 0.05 = 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

LOQ = $10S'_0$ = 10 × 0.05 = 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เนื่องจากในตัวอย่างพืชมีค่าโบรอนในปริมาณที่สูง ทำให้ไม่สามารถหาตัวอย่างพืชเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นโบรอน 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมได้ จึงได้พิสูจน์ LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถพบในตัวอย่างพืช

ผลการพิสูจน์ LOQ ด้วยการ Spiked sample ที่ความเข้มข้น 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า %Recovery เท่ากับ 90.9 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ 80 - 110) และได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.5 ผ่านเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์การยอมรับ HorRat 0.3-1.3)

3.6 ทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะเดิม ผลการวิเคราะห์หาความคงทนของวิธี พิจารณาจากค่าทางสถิติ t-test โดยเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงสภาวะ สภาวะที่ 1 2 และ 3 (Table 3) พบว่าทั้งสามสภาวะมี ค่า $t_{cal} < t_{crit}$ ดังนั้นสรุปได้ว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลองจากเดิมเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เป็น เผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง และเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 498 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์โบรอนในพืช นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารละลาย 20% HCl ที่ใช้ล้างเถ้าตัวอย่าง จาก 5 เป็น 4.98 มิลลิลิตร พบว่า ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์โบรอนในพืชเช่นเดียวกัน

Table 3 T-test results between the plant's boron analysis using methods form a 'Handbook of reference methods for plant analysis' and methods with slightly changed conditions.

Conditions	Handbook of Reference Methods for Plant Analysis (1)	Method for slightly changed conditions (2)	Average B mg/L		Statistical Value (t_{crit} 2.10)	Comparison
			(1)	(2)	t_{cal}	
1	Ashing 500° c 4 hr.	Ashing 500° c 3.5 hr.	0.499	0.498	0.49	ns
2	Ashing 500° c 4 hr.	Ashing 498° c 4 hr.	0.499	0.493	1.92	ns
3	- Ashing 500° c 4 hr. - Dissolve the ash in 5 ml 20%HCl	- Ashing 500° c 4 hr. - Dissolve the ash in 4.98 ml 20%HCl	0.499	0.506	1.94	ns

ns = non significant at 95% confidence interval, *s = significant at 95% confidence interval

สรุปได้ว่าการวิเคราะห์โบรอนในพืชตามวิธี Handbook of Reference Methods for Plant Analysis มีความคงทนของวิธี

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ตามวิธี Handbook of reference methods for plant analysis สภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์โบรอนด้วยเทคนิค ICP ไม่มี matrix effects ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Linearity และ Range อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0-1.4 และ 0-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่า r เท่ากับ 1.0000 และ 0.9999 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ $r \geq 0.995$ ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) และความถูกต้อง (Trueness) ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และ สูง ได้ค่า HorRat เท่ากับ 0.5 0.7 และ 0.3 ตามลำดับ พบค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ และได้ค่า %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง เท่ากับ 90.9, 90.2 และ 85.5 % ตามลำดับ พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับซึ่งอยู่ในช่วง 80 - 110 % และ ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า LOQ เท่ากับ 6.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับผลการทดสอบความคงทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) พบว่าการเปลี่ยนแปลงทั้งสามสภาวะมีค่า $t_{cal} < t_{crit}$ แสดงได้ว่าการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยของวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืช ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ ของวิธีวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์โบรอนในพืชช่วงความเข้มข้น 6.75 – 27.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of reference methods for plant analysis เป็นวิธีที่เหมาะสม มีความแม่นยำ ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และยอมรับได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การวิเคราะห์โบรอนในพืช ด้วยเทคนิค ICP ตามวิธี Handbook of reference methods for plant analysis สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี แทนวิธีเดิมที่ใช้ในห้องปฏิบัติการคือวิธี Azomethine-H โดยขอบข่ายการวิเคราะห์จะอยู่ในช่วงความเข้มข้นโบรอน 6.75 – 27.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสามารถนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวไปใช้ในด้านงานวิจัย งานบริการ และงานอื่นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ใช้ระยะเวลาน้อยและลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ มณีพงศ์. 2537. ***การวิเคราะห์ดินและพืช***. สงขลา: ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

AOAC. 2016. Guidelines for standard method performance requirements. Appendix F.

Bhandari, N. 2018. Techniques used in plant tissue analysis for essential elements on horticultural plants and correlate with nutrient requirement. ***North American Academic Research*** 1: 94-113.

EURACHEM. 2014. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, The Fitness for Purpose of Analytical Methods.

Gupta, U.C. 1998. Determination of boron, molybdenum, and selenium in plant tissue. In: Y.P. Kalra (Ed.), Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. First edition. Washington, D. C.

NATA. 2018. General Accreditation Guidance-Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods.