

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี
ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559
กรรมวิธีที่ 1.09.01 เพื่อการรับรอง ISO/IEC 17025 : 2005

Method Validation on Analysis of Total Phosphorus in Chemical Fertilizers
follow the Notification of Ministry of Agriculture and Cooperatives
Re: Prescribing the methods of analysis of chemical fertilizer, B.E. 2559,
method 1.09.01 for accreditation to ISO/IEC 17025 : 2005

พิรุณ ตีระพัฒน์¹ เยาวลักษณ์¹ แสงแก้ว และสร้อยญา ช่วงพิมพ์¹

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ สามารถอ้างอิงได้ตามมาตรฐานสากล ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และเพื่อเป็นมาตรฐานเดียวกันของกรมวิชาการเกษตร ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืช และปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ได้เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ ตามประกาศกระทรวง เกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี วิธีการทดสอบที่ 1.09.01 เพื่อ ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมด โดยตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ ดังนี้ 1) ตรวจสอบ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Range), 2) พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับใช้ งาน (Linearity), 3) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่ สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantification, LOQ), 4) ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ที่ระดับสูง กลาง และต่ำ, 5) ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบ ทวนซ้ำ (Repeatability precision) และ 6) ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทำซ้ำ (Intermediate precision) โดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material, CRM) เป็นสิ่งอ้างอิงผลวิเคราะห์ ซึ่งวัสดุอ้างอิงที่ใช้ คือ Ammonium dihydrogen phosphate (SRM 194a) และ Super phosphate (BCR 033) มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 61.70 และ 19.34 % P_2O_5 ตามลำดับ จากการตรวจสอบความ ใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า Range ที่ช่วงความเข้มข้น 0 - 18 mg/L ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง และได้เลือกช่วงความเข้มข้น 1-12 mg/L เพื่อพิสูจน์ Linearity พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง โดยมีค่า $R^2 = 1.0000$, LOD และ LOQ ของวิธีวิเคราะห์ ได้ค่าเท่ากับ 0.45 และ 1.51 % P_2O_5 ตามลำดับ, Accuracy ที่ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดระดับสูง (SRM 194a, 61.70 % P_2O_5) กลาง (BCR 033, 19.34 % P_2O_5) และต่ำ (2.00 % P_2O_5 เตรียมจาก SRM 194a) ได้ผลวิเคราะห์เท่ากับ 61.39, 19.29

¹ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

และ 1.99 %P₂O₅ ตามลำดับ โดยมี %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.50, 99.72 และ 99.42 % ตามลำดับ, Repeatability precision ที่ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดระดับสูง กลาง และต่ำ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.16, 0.15 และ 0.06 ตามลำดับ และ Intermediate precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.08, 0.14 และ 0.14 ตามลำดับ ซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล

Abstract

Analysis method of total phosphorus in chemical fertilizers in order to achieve the result which is accurate, precise, reliable and referable to international standard, the analysis method validation is needed. The Fertilizer Analysis laboratory, Office of Agricultural Research and Development Region 8 has followed method of the Notification of Ministry of Agriculture and Cooperatives Re: Prescribing the method of analysis of chemical fertilizers, B.E. 2559, method 1.09.01. There were six characteristics assessed according to the Certified Reference Material (CRM). They are including 1) Range, 2) Linearity, 3) Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ), 4) Accuracy, 5) Repeatability precision and 6) Intermediate precision. The validation used certified reference material (CRM): Ammonium dihydrogen phosphate (SRM 194a) and Super phosphate (BCR 033), CRM with Matrix sample (CRM + Matrix sample) were analyzed. Results of the assessment can be summarized as follow. The Range period 0-18 mg/L was linearity. The Linearity period 1-12 mg/L was linearity ($R^2=1.0000$). The LOD and LOQ were 0.45 and 1.51 % P₂O₅, respectively. The Accuracy at high (SRM 194a, 61.70 % P₂O₅), medium (BCR 033, 19.34 % P₂O₅) and low (2.00 diluted from SRM 194a) levels were 99.50, 99.72 and 99.42 % of mean recovery, respectively. The HORRAT values for repeatability precision at high, medium and low levels were 0.16, 0.15 and 0.06, respectively. And the HORRAT values for Intermediate precision at high, medium and low levels were 0.08, 0.14 and 0.14, respectively. Most of the values achieved from the analysis were accepted when referred to the international standard.

บทนำ

กรมวิชาการเกษตรในฐานะผู้รับผิดชอบหลักในการกำกับดูแล ตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 และแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2550 เพื่อควบคุมคุณภาพปุ๋ย ที่นำเข้า ผลิตและจำหน่ายในประเทศไทยให้มีคุณภาพ ให้เป็นไปตามที่ขออนุญาตนั้น ทั้งนี้เพื่อผลประโยชน์ของเกษตรกร จำเป็นต้องอาศัยผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 เป็นตัวแทนของกรมวิชาการเกษตรที่ให้บริการวิเคราะห์ปุ๋ย ในเขตพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง โดยได้ใช้วิธีการวิเคราะห์ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 เป็นสำคัญ แต่ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validate Method) ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์เสียก่อน ทั้งนี้ เพื่อให้ได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำ เพราะการได้มาซึ่งผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำนั้น ต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้องกัน เช่น ประสิทธิภาพของบุคลากร สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ และสภาพแวดล้อมในการวิเคราะห์ เป็นต้น ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นั้น จะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ ส่งผลให้ผลวิเคราะห์ที่ได้ความถูกต้องและแม่นยำ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ต้องตรวจสอบคุณลักษณะต่างๆ เหล่านี้ คือ ความถูกต้องของการวัด (Accuracy) ความแม่นยำของการวัด (Precision) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ) (จิราพรธ, 2549, ทิพรธ, 2549, นันทนา และนุชนาท, 2555, NATA, 2013, EURACHEM, 2014, AOAC, 2016) เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล และสามารถ ใช้ผลการวิเคราะห์ดังกล่าว ขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการในโอกาสต่อไป

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์ สารเคมี วัสดุอ้างอิง และเครื่องมือวิทยาศาสตร์
 - 1.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP221S)
 - 1.2 เครื่อง Spectrophotometer (PerkinElmer รุ่น Lambda 35)
 - 1.3 เตาย่อยตัวอย่าง (Thermolyne รุ่น RC2240)
 - 1.4 Volumetric pipette ขนาด 1, 2, 3, 4, 5, 10 ml
 - 1.5 Volumetric flask ขนาด 100, 250 และ 2000 ml
 - 1.6 เครื่องแก้วและวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์
 - 1.7 วัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material, CRM) และสารเคมี
 - Ammonium dihydrogen phosphate (SRM 194a) มีฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 61.70 %P₂O₅
 - Super phosphate (BCR 033) มีฟอสฟอรัสทั้งหมดรับรอง 19.34 % P₂O₅
 - Matrix sample (ตัวอย่างที่ไม่มีฟอสฟอรัสปนเปื้อนหรือปนเปื้อนเล็กน้อย, MS)

- Nitric acid (HNO₃) 69-70 %, AR grade
- Perchloric acid (HClO₄) 69-72 %, AR grade
- Ammonium molybdate [(NH₄)₆Mo₇•4H₂O] , AR grade
- Ammonium metavanadate (NH₄VO₃) , AR grade
- Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), AR grade

2 วิธีการ

2.1 การเตรียมสารละลาย

2.1.1 กรดผสม HNO₃ : HClO₄ อัตราส่วน 1 : 1

ผสม 69-70 % HNO₃ กับ 69-72 % HClO₄ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร

2.1.2 สารละลาย Molybdovanadate

2.1.2.1 ชั่ง Ammonium molybdate 40 g ใส่บีกเกอร์ ขนาด 500 ml เติมน้ำกลั่นร้อน 400 ml คนให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้เย็น

2.1.2.2 ชั่ง Ammonium metavanadate 2 g ใส่บีกเกอร์ ขนาด 1,000 ml เติมน้ำกลั่นร้อน 300 ml ตั้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม 69 - 72 % HClO₄ 450 ml คนให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายใส่ Volumetric flask ขนาด 2,000 ml

2.1.2.3 ค่อยๆ รินสารละลายข้อ 2.1.2.1 ลงในสารละลายข้อ 2.1.2.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2,000 ml ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายเก็บในขวดแก้วสีชา

2.1.3 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 mg/L

ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate 1.0984 g ใส่ภาชนะ ละลายด้วยน้ำกลั่นเล็กน้อย ถ่ายใส่ Volumetric flask ขนาด 250 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

หมายเหตุ Potassium dihydrogen phosphate ที่ใช้ต้องอบที่อุณหภูมิ 105 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง และตั้งไว้ให้เย็น ในโถดูดความชื้น (Desicator)

2.1.4 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 mg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1,000 mg/L ปริมาตร 10 ml ด้วย Volumetric pipette ใส่ Volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน

2.1.5 สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/L ใช้เป็น Working standard

ปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัส 100 mg/L ปริมาตร 1, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ml ด้วย Volumetric pipette ใส่ Volumetric flask ขนาด 100 ml

2.2 วิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

2.2.1 ชั่งตัวอย่าง (sample wt.) ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml

2.2.2 เติมกรดผสม 20 ml นำไปย่อยบนเตาย่อยตัวอย่าง จนมีควันสีขาวเกิดขึ้นเหนือสารละลาย หรือสารละลายมีลักษณะใส ระวังอย่าให้สารละลายแห้ง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30–40 นาที จากนั้นยกออกจากเตาย่อยตัวอย่าง ตั้งไว้ให้เย็น

2.2.3 ถ่ายตัวอย่างที่ย่อยได้ใส่ Volumetric flask ขนาด 250 ml (make vol.) และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml (สารละลายตัวอย่าง)

2.2.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (aliquot) ให้มีปริมาณฟอสฟอรัสในช่วงการวัดด้วย Volumetric pipette ใส่ Volumetric flask ขนาด 100 ml (total vol.) เติมสารละลาย Molybdovanadate 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน และตั้งไว้อย่างน้อย 30 นาที

2.2.5 นำ working standard เติมสารละลาย Molybdovanadate 10 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน และตั้งไว้อย่างน้อย 30 นาที

2.2.6 นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียม วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 420 นาโนเมตร (nm) บันทึกค่า Absorbance (Abs)

2.2.7 หาค่าความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (conc. from curve) โดยเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ของสารละลายตัวอย่าง กับกราฟมาตรฐาน ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสฟอรัส กับ ค่า Abs ของ working standard

2.2.8 คำนวณปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด รายงานในรูปแบบ %P₂O₅ ตามสูตร

$$\%P_2O_5 = \frac{\text{conc. from curve (mg/L)} \times \text{make vol. (ml)} \times \text{total vol. (ml)} \times 100 \times 2.2914}{1,000,000 \times \text{aliquot (ml)} \times \text{sample wt. (g)}}$$

2.2914 คือ ค่าคงที่สำหรับเปลี่ยนปริมาณ % P เป็น % P₂O₅

2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

2.3.1 ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Range) ที่ความเข้มข้น 0 - 18 mg/L

2.3.1.1 ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate 5.4920 g และ Matrix sample (MS) 0.4xxx–0.5xxx g ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml เดียวกันจำนวน 1 ซ้ำ และปฏิบัติตามข้อ 2.2.2 – 2.2.3 (สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นของฟอสฟอรัส เท่ากับ 5,000 mg/L)

หมายเหตุ Potassium dihydrogen phosphate ที่ใช้ต้องนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง และตั้งไว้ให้เย็น ในโถดูดความชื้น

- 2.3.1.2 ปิเปตสารละลายข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 ml ด้วย Volumetric pipette ใส่ Volumetric flask 250 ml ปรับปริมาตรและเขย่าให้เข้ากัน
- 2.3.1.3 ปิเปตสารละลายฟอสฟอรัสข้อ 2.3.1.2 ด้วย Volumetric pipette ขวดละ 5 ml ใส่ Volumetric flask ขนาด 100 ml เติมสารละลาย Molybdovanadate 10 ml ปรับปริมาตรและเขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้อย่างน้อย 30 นาที สารละลายที่ได้มีปริมาณฟอสฟอรัส 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 mg/L ตามลำดับ
- 2.3.1.4 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลาย ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 nm บันทึกค่าดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลาย
- 2.3.1.5 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (แกน y) และความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (แกน x)
- 2.3.1.6 พิจารณากราฟความสัมพันธ์และหาช่วงที่เป็นเส้นตรง เพื่อนำมาพิสูจน์ความ เป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Linearity)
- 2.3.2 พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับใช้งาน (Linearity) ที่ความเข้มข้น 1 - 12 mg/L
- 2.3.2.1 เตรียมสารละลายฟอสฟอรัสความเข้มข้น 5,000 mg/L
เตรียมเช่นเดียวกับ ข้อ 2.3.1.1 จำนวน 3 ขี้
- 2.3.2.2 เตรียมสารละลายฟอสฟอรัสให้มีความเข้มข้น 1, 2 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/L
เตรียมเช่นเดียวกับ ข้อ 2.3.1.2 - 2.3.1.2 จำนวน 3 ขี้ แต่ไม่ต้องปิเปต สารละลายที่ปริมาตร 14, 16 และ 18 ml
- 2.3.2.3 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง สร้างกราฟความสัมพันธ์ ตามข้อ 2.3.1.4 และ 2.3.1.5 และคำนวณหาความสัมพันธ์ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) หรือ สัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Correlation of determination, R²) โดยมีเกณฑ์ยอมรับ $r \geq 0.997$ หรือ $R^2 \geq 0.995$ (อุ มาพร, 2556)
- 2.3.3 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantification, LOQ)

ชั่ง MS 0.4xxx – 0.5xxx g จำนวน 10 ซ้ำ ใส่ Erlenmeyer flask ขนาด 125 ml (กรณีที่ MS ไม่มีฟอสฟอรัสให้เติมฟอสฟอรัสลงไปเล็กน้อย) นำไปวิเคราะห์ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดตาม ข้อ 2.2 คำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ของปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้ และคำนวณค่า LOD และ LOQ จากสูตร

$$\text{LOD} = 3 \text{ SD}$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD}$$

2.3.4 ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

2.3.4.1 เตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดใกล้เคียง LOQ ($\pm 10\%$ LOQ)

2.3.4.2 ชั่งตัวอย่างข้อ 2.3.4.1 ใส่ Erlenmeyer flask 125 ml และชั่ง MS 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่ Erlenmeyer flask เดียวกัน จำนวน 10 ซ้ำ และวิเคราะห์ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ตามข้อ 2.2

2.3.4.3 คำนวณความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์ ได้ดังนี้

- ความถูกต้องของการวิเคราะห์ พิจารณา %recovery ของผลวิเคราะห์ ซึ่ง เป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับของ Peer-Verified Methods Program (AOAC, 2016) ตารางที่ 1
- ความแม่นยำของการวิเคราะห์ พิจารณา % Relative standard deviation (% RSD) ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับของ Peer-Verified Methods Program (AOAC, 2016) ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์การยอมรับ % Recovery และ %RSD ของ Peer-Verified Methods Program (AOAC, 2016)

ความเข้มข้น	Mean recovery (%)	% RSD
100 %	-	1.3
>10 - 100 %	98-102	-
>10 - <100 %	-	1.9
>1 - 10 %	97-103	2.7
>0.01 - 1 %	95-105	3.7

2.3.5 ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ที่ระดับสูง กลาง และต่ำ

ชั่งวัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ระดับละ 10 ซ้ำ ใส่ Erlenmeyer flask 125 ml และชั่ง MS 0.4xxx – 0.5xxx g ใส่ Erlenmeyer flask เดียวกัน วิเคราะห์ปริมาณ ฟอสฟอรัส และคำนวณ % Recovery และ % Mean recovery จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\% \text{ ปริมาณที่วิเคราะห์ได้}}{\% \text{ ปริมาณที่วิเคราะห์}} \times 100$$

$$\% \text{ Mean Recovery} = \frac{\% \text{ ปริมาณรับรองของ CRM}}{\text{ผลรวม \% Recovery}} \times \text{จำนวนซ้ำ}$$

เกณฑ์มีเกณฑ์ยอมรับของ % Recovery และ % Mean recovery ตามตารางที่ 1

หมายเหตุ กรณี MS มีปริมาณฟอสฟอรัสปนเปื้อน ให้นำ “ \bar{x} ของปริมาณฟอสฟอรัสใน MS” ลบออกจาก “%ฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ได้จากวัสดุอ้างอิงของแต่ละซ้ำ”

2.3.6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทวนซ้ำ (Repeatability Precision)

วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่ระดับสูง กลาง และต่ำ ระดับละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล เวลา และเครื่องมือเดียวกัน นำปริมาณที่ได้ คำนวณค่า Horwitz ratio (HORRAT) ตามสูตร

$$\%RSD_r = \frac{SD_{CRM}}{\bar{x} \%P_2O_5 \text{ ที่วิเคราะห์ได้}} \times 100$$

$$\text{Predicted Horwitz } RSD_r = 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}, \quad C = \text{concentration}/100$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD_r}{\text{Predicted Horwitz } RSD_r}$$

โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT \leq 2 AOAC (2016)

2.3.7 ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทำซ้ำ (Intermediate precision)

วิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่ระดับสูง กลาง และต่ำ ระดับละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล และเครื่องมือเดียวกัน ในระยะเวลาต่างกัน นำปริมาณที่ได้ คำนวณค่า Horwitz ratio (HORRAT) ตามสูตร

$$\%RSD_R = \frac{SD_{CRM}}{\bar{x} \%P_2O_5 \text{ ที่วิเคราะห์ได้}} \times 100$$

$$\text{Predicted Horwitz } RSD_r = 2^{(1 - 0.5 \log C)}, \quad C = \text{concentration}/100$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% RSD_r}{\text{Predicted Horwitz } RSD_R}$$

โดยมีเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT \leq 2 AOAC (2016)

ผลการทดลองและวิจารณ์

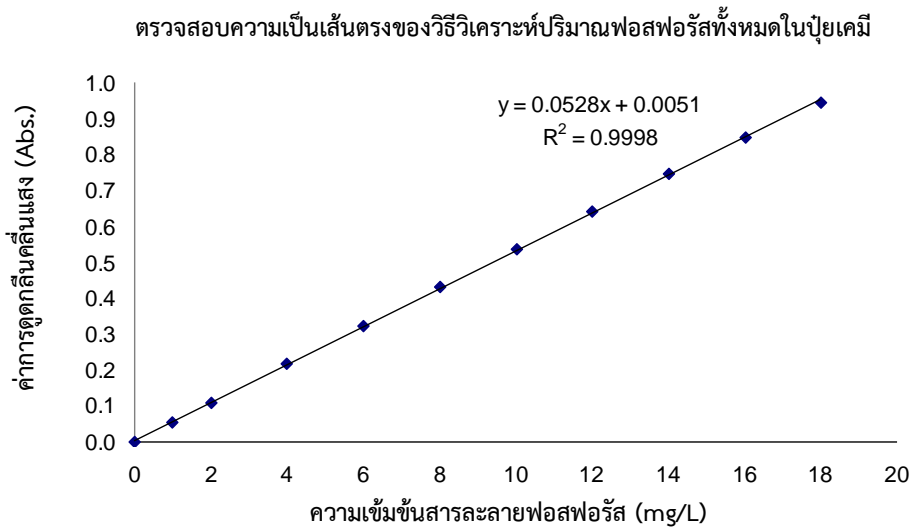
จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 เพื่อตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Range), พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับใช้งาน (Linearity), ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantification, LOQ), ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ, ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy), ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์แบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) และแบบทำซ้ำ (Intermediate precision) ได้ผลการพิสูจน์ ดังนี้

1. ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Range)

โดยการย่อยสารละลายฟอสฟอรัสความเข้มข้น 5,000 mg/L ร่วมกับ Matrix sample และนำสารละลายที่ได้มาเจือจาง ให้ได้สารละลายฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0-18 mg/L เพื่อหาช่วงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณฟอสฟอรัส (mg/L) กับ ค่าการดูดกลืนคลีนแสง (Abs) พบว่า ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 1 โดยได้ค่า $R^2 = 0.9998$ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การดูดกลืนคลีนแสง (Abs) กับความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (mg/L) ที่ระดับต่างๆ เพื่อตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Rang)

	ความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (mg/L) ที่เติม Matrix sample										
	0	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18
ค่าการดูดกลืนคลีนแสง (Abs)	0.0000	0.0547	0.1092	0.2172	0.3246	0.4317	0.5378	0.6423	0.7463	0.8484	0.9456
สมการความสัมพันธ์	$y = 0.0528x + 0.0051, R^2 = 0.9998$										



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (Abs) กับความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (mg/L) ที่ระดับต่างๆ เพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Rang)

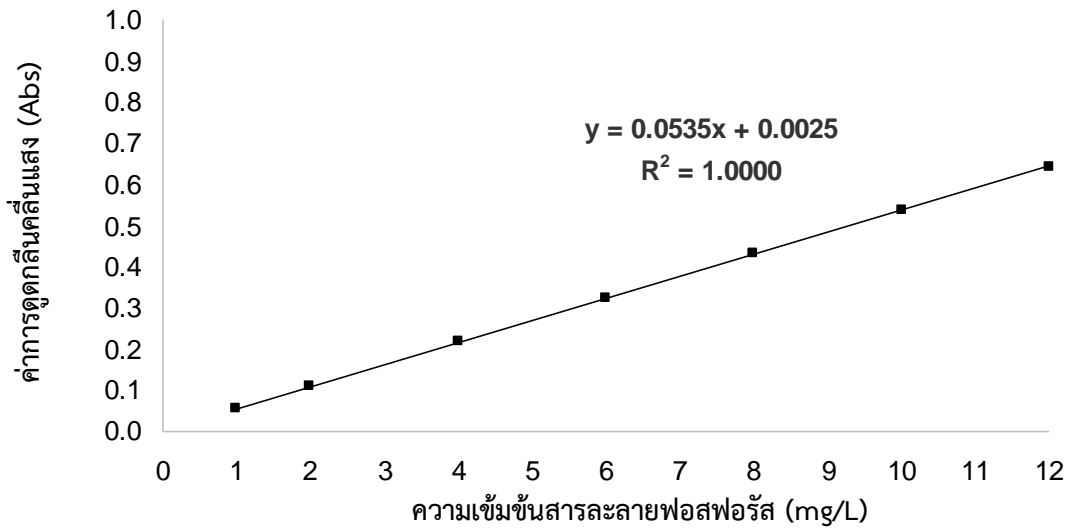
2. พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับใช้งาน (Linearity)

จากการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และได้เลือกช่วงความเข้มข้นของสารละลายฟอสฟอรัสที่ 1 -12 mg/L เพื่อพิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับใช้งาน พบว่าช่วงความเข้มข้นดังกล่าว มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตลอดช่วง โดยมีค่า $R^2 = 1.0000$ ซึ่งค่า R^2 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ $R^2 \geq 0.995$ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 3 การดูดกลืนคลีนแสง กับความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (mg/L) ที่ระดับต่างๆ เพื่อพิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ของวิธีวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Linearity)

	ซ้ำที่	ความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (mg/L) ที่เติม MS						
		1	2	4	6	8	10	12
ค่าการดูดกลืนคลีนแสง (Abs)	1	0.0547	0.1092	0.2172	0.3246	0.4317	0.5378	0.6423
	2	0.0546	0.1090	0.2166	0.3242	0.4308	0.5384	0.6432
	3	0.0549	0.1095	0.2175	0.3248	0.4306	0.5380	0.6423
	ค่าเฉลี่ย	0.0547	0.1092	0.2171	0.3245	0.4310	0.5381	0.6426
สมการความสัมพันธ์		$y = 0.0535x + 0.0025, R^2 = 1.0000$						

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (Abs) กับความเข้มข้นสารละลายฟอสฟอรัส (mg/L) ที่ระดับต่างๆ เพื่อพิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี (Linearity)

- ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantitation, LOQ)

จากการวิเคราะห์ Matrix sample พบว่า ไม่มีฟอสฟอรัสปนเปื้อน ดังนั้นจึงได้เติมสารละลายฟอสฟอรัส ความเข้มข้น 5,000 mg/L 0.5 ml และนำไปเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด พบว่า มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.1505 (ตารางที่ 4) และนำค่า SD คำนวณหา LOD และ LOQ ได้ค่าดังนี้

$$SD = 0.1505$$

$$LOD = 3SD = 3 \times 0.1505 = 0.45 \% P_2O_5$$

$$LOQ = 10SD = 10 \times 0.1505 = 1.51 \% P_2O_5$$

ตารางที่ 4 ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (LOQ) ของการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี

ซ้ำที่	Matrix sample ไม่เติมสารละลายฟอสฟอรัส		Matrix sample เติมสารละลายฟอสฟอรัส ความเข้มข้น 5000 mg/L 0.5 ml	
	Matrix sample wt. (g)	% P ₂ O ₅	Matrix sample wt. (g)	% P ₂ O ₅
1	0.5090	0.00	0.5095	0.5127
2	0.5046	0.00	0.5016	0.7608
3	0.5025	0.00	0.5010	0.4656
4	0.5060	0.00	0.5027	0.7384
5	0.5041	0.00	0.5029	0.7279
6	0.5020	0.00	0.5178	0.7149
7	0.5017	0.00	0.5018	0.8000
8	0.5066	0.00	0.5063	0.7945
9	0.5062	0.00	0.4934	0.9883
10	0.5022	0.00	0.5026	0.8286
ค่าเฉลี่ย		0.0000		0.7332
SD		0.0000		0.1505
LOD (3SD)		0.00		0.45
LOQ (10SD)		0.00		1.51

4. ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้นของ LOQ

จากผลการวิเคราะห์พบว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีค่า LOQ เท่ากับ 1.51 %P₂O₅ ดังนั้นจึงได้เตรียมสารละลายฟอสฟอรัสให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับ LOQ คือ 1.50 %P₂O₅ และย่อยร่วมกับ Matrix sample เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์ โดยใช้ %Recovery เฉลี่ย เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาความถูกต้อง และ Relative standard deviation (% RSD) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาความแม่นยำ พบว่า ได้ค่า %Recovery อยู่ระหว่าง 99.42 – 99.99 % และมีค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.60 % และ Relative standard deviation (%RSD) มีค่าเท่ากับ 0.20 % (ตารางที่ 5) ซึ่งทั้ง 2 ค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ ที่ความเข้มข้นระหว่าง $\geq 1 - 10$ % ต้องได้ค่า %Recovery เท่ากับ 97-103 % และ %RSD < 2.7 % ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำในการวิเคราะห์ ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ

ซ้ำที่	Matrix Sample wt. (g)	1.50 %P ₂ O ₅ wt. (g)	Total P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)
1	0.4931	1.5865	1.49	99.42
2	0.4787	1.5092	1.49	99.60
3	0.4625	1.5438	1.49	99.43
4	0.4593	1.5298	1.49	99.45
5	0.4710	1.5264	1.49	99.54
6	0.4917	1.5320	1.50	99.56
7	0.4683	1.5532	1.50	99.99
8	0.4669	1.5575	1.49	99.94
9	0.4952	1.5923	1.49	99.52
10	0.4844	1.5689	1.49	99.53
ค่าเฉลี่ย			1.49	99.60
SD			0.0030	0.20
% RSD			0.20	

5. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy)

การตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ กระทำโดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ที่ความเข้มข้นระดับสูง (SRM 194a, 61.70 %P₂O₅) ระดับกลาง (BCR 033, 19.34 %P₂O₅) และระดับต่ำ (2 %P₂O₅ เตรียมจาก SRM 194a) ย่อยร่วมกับ Matrix sample (MS) ระดับ 10 ซ้ำ พบว่า ที่ระดับสูง กลาง และต่ำ มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดเฉลี่ยที่วิเคราะห์ได้ เท่ากับ 61.39, 19.29 และ 1.99 %P₂O₅ ตามลำดับ โดยมี %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.50, 99.72 และ 99.42 % ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่ง %Recovery ที่วิเคราะห์ได้ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ตาม AOAC (2016) คือ ที่ความเข้มข้นระหว่าง $\geq 10 - 100$ % และที่ความเข้มข้นระหว่าง $\geq 1 - 10$ % ต้องได้ %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 98-102 % และ 97-103 % ตามลำดับ

6. ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทวนซ้ำ (Repeatability Precision)

ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทวนซ้ำ ทดสอบโดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ที่ความเข้มข้นระดับสูง (SRM 194a, 61.70 %P₂O₅) ระดับกลาง (BCR 033, 19.34 %P₂O₅) และระดับต่ำ (2 %P₂O₅ เตรียมจาก SRM 194a) ย่อยร่วมกับ Matrix sample (MS) ระดับละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล เวลา และเครื่องมือเดียวกัน นำปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ คำนวณค่า HORRAT ด้วยสมการ Horwitz's equation แบบทวนซ้ำ พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT ≤ 2 (ตารางที่ 6)

ตัวอย่างการคำนวณ Horwitz's equation แบบทวนซ้ำ ของการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสที่
ระดับสูง

$$\begin{aligned} \%RSD &= (SD/\bar{x}) \times 100 \\ &= (0.14/61.39) \times 100 = 0.23 \end{aligned}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log C)}, \text{ C=concentration ratio} = (61.70/100) = 0.6170$$

$$= 0.66 \times 2^{(1 - 0.5 \log 0.6259)} = 1.42$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% \text{ RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.23}{1.42} = 0.16$$

ตารางที่ 6 ความถูกต้องและความแม่นยำแบบทวนซ้ำ ของการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในวัสดุอ้างอิง
รับรอง

ซ้ำที่	ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในวัสดุอ้างอิง											
	ระดับสูง (61.70 % P ₂ O ₅)				ระดับกลาง (19.34 % P ₂ O ₅)				ระดับต่ำ (2.00 % P ₂ O ₅)			
	CRM wt. (g)	MS wt. (g)	P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)	CRM wt. (g)	MS wt. (g)	P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)	CRM wt. (g)	MS wt. (g)	P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)
1	0.3031	0.4622	61.42	99.55	0.4255	0.3544	19.34	99.99	0.4490	1.1676	1.98	99.25
2	0.3043	0.4495	61.32	99.38	0.4237	0.3536	19.32	99.90	0.4502	1.1593	1.99	99.46
3	0.3018	0.4452	61.74	100.06	0.4313	0.3553	19.26	99.61	0.4457	1.1657	1.99	99.33
4	0.3023	0.4436	61.36	99.45	0.4140	0.3625	19.33	99.94	0.4549	1.1451	1.99	99.34
5	0.3035	0.4512	61.38	99.47	0.4170	0.3567	19.28	99.69	0.4682	1.1617	1.99	99.52
6	0.3011	0.4558	61.38	99.47	0.4245	0.3627	19.26	99.60	0.4520	1.1425	1.99	99.73
7	0.3042	0.4485	61.21	99.21	0.4267	0.3591	19.23	99.45	0.4630	1.1532	1.99	99.26
8	0.3082	0.4515	61.34	99.41	0.4306	0.3630	19.32	99.88	0.4529	1.1537	1.99	99.35
9	0.3027	0.4582	61.36	99.44	0.4276	0.3636	19.18	99.20	0.4535	1.1601	1.99	99.60
10	0.3054	0.4483	61.40	99.51	0.4467	0.3586	19.34	99.97	0.4591	1.1745	1.99	99.37
เฉลี่ย			61.39	99.50			19.29	99.72			1.99	99.42
SD			0.14	0.22			0.05	0.26			0.003	0.16
%RSD			0.23				0.26				0.15	
Predicted Horwitz RSD			1.42				1.69				2.38	
HORRAT			0.16				0.15				0.06	
การประเมิน (HORRAT < 2)			✓				✓				✓	

7. ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทำซ้ำ (Intermediate precision)

ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทำซ้ำ ทดสอบโดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง (CRM) ที่ความเข้มข้นระดับสูง (SRM 194a, 61.70 %P₂O₅) ระดับกลาง (BCR 033, 19.34 %P₂O₅) และระดับต่ำ (2 %P₂O₅ เตรียมจาก SRM 194a) ย่อยร่วมกับ Matrix sample (MS) ระดับละ 10 ซ้ำ โดยบุคคล และเครื่องมือเดียวกัน ที่ระยะเวลาต่างกัน นำปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ คำนวณค่า HORRAT ด้วยสมการ Horwitz's equation แบบทำซ้ำ พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ HORRAT ≤ 2 (ตารางที่ 7)

ตัวอย่างการคำนวณ Horwitz's equation แบบทำซ้ำ ของการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสระดับสูง (ข้อมูลจากตารางที่ 7)

$$\begin{aligned} \%RSD &= (SD/\bar{x}) \times 100 \\ &= (0.11/61.47) \times 100 &= 0.18 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 2^{(1 - 0.5 \log C)}, \quad C = \text{concentration ratio} = (61.70/100) = 0.6170 \\ &= 2^{(1 - 0.5 \log 0.5317)} &= 2.15 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT (Horwitz's Ratio)} = \frac{\% \text{ RSD}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{0.18}{2.15} = 0.08$$

ตารางที่ 7 ความแม่นยำแบบทำซ้ำ ของการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในวัสดุอ้างอิงรับรอง

วันที่	ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในวัสดุอ้างอิง											
	ระดับสูง (61.70 % P ₂ O ₅)				ระดับกลาง (19.34 % P ₂ O ₅)				ระดับต่ำ (2.00 % P ₂ O ₅)			
	CRM wt. (g)	MS wt. (g)	P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)	CRM wt. (g)	MS wt. (g)	P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)	CRM wt. (g)	MS wt. (g)	P ₂ O ₅ (%)	Recovery (%)
1	0.3031	0.4622	61.37	99.47	0.4255	0.3544	19.34	100.01	0.4490	1.1676	1.98	99.01
2	0.3043	0.4495	61.37	99.46	0.4237	0.3536	19.33	99.94	0.4502	1.1593	1.99	99.45
3	0.3018	0.4452	61.53	99.72	0.4313	0.3553	19.33	99.96	0.4457	1.1657	1.99	99.39
4	0.3023	0.4436	61.52	99.71	0.4140	0.3625	19.34	100.00	0.4549	1.1451	1.98	98.78
5	0.3035	0.4512	61.52	99.71	0.4170	0.3567	19.30	99.78	0.4682	1.1617	1.99	99.47
6	0.3011	0.4558	61.60	99.83	0.4245	0.3627	19.34	100.02	0.4520	1.1425	2.00	99.79
7	0.3042	0.4485	61.57	99.80	0.4267	0.3591	19.28	99.68	0.4630	1.1532	1.98	98.90
8	0.3082	0.4515	61.57	99.79	0.4306	0.3630	19.32	99.89	0.4529	1.1537	1.99	99.65
9	0.3027	0.4582	61.32	99.38	0.4276	0.3636	19.13	98.90	0.4535	1.1601	1.97	98.58
10	0.3054	0.4483	61.33	99.39	0.4467	0.3586	19.25	99.53	0.4591	1.1745	1.97	98.62
เฉลี่ย			61.47	99.63			19.30	99.77			1.98	99.16
SD			0.11	0.18			0.07	0.34			0.01	0.44
%RSD			0.18				0.36				0.51	
Predicted Horwitz RSD			2.15				2.56				3.60	
HORRAT			0.08				0.14				0.14	
การประเมิน (HORRAT < 2)			✓				✓				✓	

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลการทดสอบดังนี้

1. ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Range) ที่ช่วงความเข้มข้น 0 – 18 mg/L ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นเป็นเส้นตรง (รูปที่ 1)
2. พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานสำหรับใช้งาน (Linearity) โดยได้เลือกช่วงความเข้มข้น 1 – 12 mg/L พบว่า ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Correlation of determination, R²) เท่ากับ 1.0000 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ (รูปที่ 2)
3. ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of detection, LOD) เท่ากับ 0.45 %P₂O₅
4. ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้ (Limit of quantification, LOQ) เท่ากับ 1.51 %P₂O₅

5. ตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้นของ LOQ (1.50 %P₂O₅) โดยใช้ %Recovery เฉลี่ยเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาความถูกต้อง และ Relative standard deviation (% RSD) เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาความแม่นยำ พบว่า ได้ % Recovery เฉลี่ย และ % RSD เท่ากับ 99.60 % และ 0.20 % ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ
6. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ (Accuracy) ของปริมาณฟอสฟอรัสที่ระดับสูง (61.70 %P₂O₅) กลาง (19.34 %P₂O₅) และต่ำ (2.00 %P₂O₅) โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง ย่อยร่วมกับ Matrix sample ได้ค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.50, 99.72 และ 99.42 % ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ
7. ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทวนซ้ำ (Repeatability precision) ของปริมาณฟอสฟอรัสที่ระดับระดับสูง (61.70 %P₂O₅) กลาง (19.34 %P₂O₅) และต่ำ (2.00 %P₂O₅) โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง ย่อยร่วมกับ Matrix sample ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.16, 0.15 และ 0.06 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ
8. ความแม่นยำของการวิเคราะห์แบบทำซ้ำ (Intermediate precision) ของปริมาณฟอสฟอรัสที่ระดับระดับสูง (61.70 %P₂O₅) กลาง (19.34 %P₂O₅) และต่ำ (2.00 %P₂O₅) โดยการวิเคราะห์วัสดุอ้างอิงรับรอง ย่อยร่วมกับ Matrix sample ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.08, 0.14 และ 0.14 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 ให้ผลการประเมินแต่ละคุณลักษณะที่ดี คือ ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการวิเคราะห์ฟอสฟอรัสทั้งหมดในปุ๋ยเคมี ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559 กรรมวิธีที่ 1.09.01 มาใช้ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 ได้
2. ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ประกอบการขอการรับรอง ISO/IEC 17025: 2005

เอกสารอ้างอิง

- AOAC, 2016. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 19thEd. AOAC International Inc. Gaithersberg MD.
- EURACKEM. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods–A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed. editor Magnusson, B and Örnemark,U. 70 หน้า.
- NATA. 2013. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods (Technical Note 17-October 2013). National Association of Testing Authorities (NATA), Australia. 32 หน้า.
- จิราพรรณ ทองหยด. 2549. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ. กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 15 หน้า.
- นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. 2555. แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐาน กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. 113 หน้า.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดกรรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี พ.ศ. 2559. ประกาศใน ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 2 ง เมื่อวันที่ 4 มกราคม 2560.
- พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ.2518. ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 92 ตอนที่ 5 ฉบับพิเศษ เมื่อวันที่ 9 มกราคม 2518.
- พระราชบัญญัติปุ๋ย (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2550. ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนที่ 7ก เมื่อวันที่ 11 มกราคม 2551.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า.
- อุมาพร สุขม่วง. 2556. การใช้ประโยชน์จากความสัมพันธ์เชิงเส้น. กรมวิทยาศาสตร์บริการ 1 หน้า (http://blpd.dss.go.th/knowledge_el/knowledge_uma.pdf, 23 สิงหาคม 2556)