



การทดสอบความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำ
โดยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟ (Ion Chromatograph)

ชื่อ นางสาวชिरา ชอโณม

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ ปฏิบัติการ

ตำแหน่งเลขที่ ๒๑๗๒

กลุ่มงานวิชาการทางเคมี-กายภาพ

ส่วนราชการ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย

กรมอนามัย

เพื่อแต่งตั้งให้ดำรง

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ ชำนาญการ

ตำแหน่งเลขที่ ๒๑๗๒

กลุ่มงานวิชาการทางเคมี-กายภาพ

ส่วนราชการ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย

กรมอนามัย

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำบริโภค ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี ตามวิธี Determination of Inorganic Anion by Ion Chromatography ซึ่งเป็นการหาวิธีวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่า ความเป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) เท่ากับ ๐.๙๙๙๘ ช่วงของการวิเคราะห์ เท่ากับ ๐.๑-๑๐ มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความแม่นยำ มีค่า % Recovery อยู่ในช่วง ๘๐-๑๑๐ ความเที่ยง มีค่า HORRAT (Horwitz ratio) ไม่เกิน ๒ ขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ ๐.๑ มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ เท่ากับ ๐.๓๓ มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลการศึกษาอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงให้เห็นว่าเครื่องมือนี้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำบริโภคในห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ : ไนเตรทในน้ำ, ไอออนโครมาโทกราฟี, Method Validate

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากการสนับสนุนการจัดทำโครงการวิจัยจากผู้อำนวยการกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ทั้งอดีตและปัจจุบันและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขทุกท่านที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและให้คำแนะนำอย่างดีที่เป็นประโยชน์เพื่อให้รายงานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์และถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์สารเคมี เครื่องมือ สำหรับการดำเนินงาน

ประโยชน์และคุณค่าของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ที่ได้อบรมสั่งสอนตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาววชิรา ซอโหม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการทดสอบ	18
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	24
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	26

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ.2563	8
ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.8, 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน	16
ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อการควบคุมคุณภาพ	17
ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท ที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่าง (Spike Sample)	17
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	23
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	24
ตารางที่ 7 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร	25
ตารางที่ 8 การยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร	26

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 วัฏจักรไนโตรเจน	5
รูปภาพที่ 2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง Ion Chromatography	10
รูปภาพที่ 3 โคโรมาโตรแกรมสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, คลอไรด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนไตรท์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนเตรท 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซัลเฟต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	21
รูปภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) กับความเข้มข้น (Concentration) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	22
รูปภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น Spike Sample Blank กับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการหาค่า LOD และ LOQ	26

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ไนเตรท (Nitrate) เป็นส่วนหนึ่งของวัฏจักรไนโตรเจนในเปลือกโลกและเกิดขึ้นตามธรรมชาติในสิ่งมีชีวิตประเภทโอออน โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้ค่อนข้างดี มีความเสถียรในสิ่งแวดล้อม มักรวมกับสารโอออนอื่นๆ เช่น โซเดียมและโพแทสเซียม แหล่งปนเปื้อนไนเตรทที่สำคัญมาจากของเสียจากการขับถ่ายของคนและสัตว์ และปุ๋ยเคมีที่มีโพแทสเซียมไนเตรท และแอมโมเนียไนเตรท ดินสามารถดูดซับไนเตรทไว้ได้น้อยมาก ไนเตรทจึงถูกชะและละลายในน้ำได้ดี ซึ่งถูกสะสมในน้ำผิวดิน นอกจากนี้ไนไตรท์ (Nitrite) สามารถรีดิวซ์เป็นไนเตรทได้ด้วยกระบวนการทางชีววิทยา⁽¹⁾ ปริมาณไนเตรทที่สูงในแหล่งน้ำจะก่อให้เกิดปัญหามลพิษด้านสิ่งแวดล้อมที่เรียกว่าปรากฏการณ์ Eutrophication ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่มีปริมาณไนโตรเจนในน้ำมากเกินไปจนส่งผลให้สัตว์ที่อยู่ในน้ำตายเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงและไม่เพียงพอต่อการหายใจ ทำให้ชีวภาพมีความหลากหลายลดลง และทำให้ปริมาณสาหร่ายในน้ำเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ปริมาณไนเตรทที่สูงในน้ำดื่มจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเฉพาะเด็กทารกที่มีอายุต่ำกว่า 4 เดือน ทำให้เกิดโรค Blue-Baby Syndrome หรือ Methemoglobinemia ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียในลำไส้เปลี่ยนรูปของไนเตรทเป็นไนไตรท์ และไนไตรท์จะดูดซับและรวมตัวกับฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เป็นเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ส่งผลให้การลำเลียงออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายลดลง ถ้าอาการมากขึ้น จะส่งผลให้เกิดอาการขาดออกซิเจน (Asphyxia)⁽²⁾ ซึ่งโรค Blue-Baby Syndrome มีสาเหตุเกิดจากโรคหัวใจพิการแต่กำเนิดในทารก (Congenital heart disease) ด้วย ซึ่งในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ 6 ถึง 8 คนต่อ 1000 คนของการเกิดมีชีวิต หรือ 6000-7000 คนต่อปี และประมาณ 1000 คนจะมีอาการรุนแรงเป็นโรคหัวใจพิการแต่กำเนิดชนิดรุนแรง (Critical congenital heart disease) เป็นสาเหตุให้ทารกแรกคลอดเสียชีวิต⁽¹⁵⁾ เหตุนี้เพื่อการคุ้มครองสุขภาพของผู้บริโภค กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขจึงกำหนดเกณฑ์คุณภาพน้ำประปาได้ กรมอนามัย พ.ศ. 2563 กำหนดให้น้ำบริโภคมีค่าไนเตรทไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าไนไตรท์น้อยกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร⁽³⁾ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อหาปริมาณไนเตรทในน้ำบริโภคจึงมีความจำเป็น และผลการตรวจวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย

1. เพื่อทดสอบความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำ โดยเครื่องโอออนโครมาโทกราฟ ที่ใช้ ณ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย
2. เพื่อสร้างหลักประกันคุณภาพผลการทดสอบว่ามีความถูกต้องและน่าเชื่อถือตามหลักวิชาการและลดข้อผิดพลาดในการตัดสินใจ
3. เพื่อยกระดับห้องปฏิบัติการในการเตรียมความพร้อมเพื่อขอรับการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2017

1.3 คำนิยาม

1. ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการจำแนกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสารอื่นๆ รวมถึงสารปนเปื้อน (Impurities) สารที่เกิดจากการสลายตัว (Degradants)

2. ความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ถ้าผลการวิเคราะห์วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด แสดงว่าการวิเคราะห์มีความถูกต้องสูง (High Accuracy) แต่ถ้าค่าที่วัดได้ห่างไกลจากค่าที่แท้จริง แสดงว่าการวิเคราะห์มีความถูกต้องน้อย (Low Accuracy)

3. ความเที่ยง (Precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำๆ กัน หลายๆ ครั้ง โดยความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ จะแสดงเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation, CV)

4. ช่วงของการวิเคราะห์ (Range) หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วิเคราะห์แล้วมีค่าความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) และความเป็นเส้นตรงอยู่ในระดับที่มีความถูกต้อง ยอมรับได้

5. ความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ต้องเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

6. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

7. ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ที่ยอมรับได้

8. น้ำบริโภคน้ำ หมายถึง น้ำประปา น้ำบ่อบาดาล น้ำบ่อน้ำดื่ม น้ำฝน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

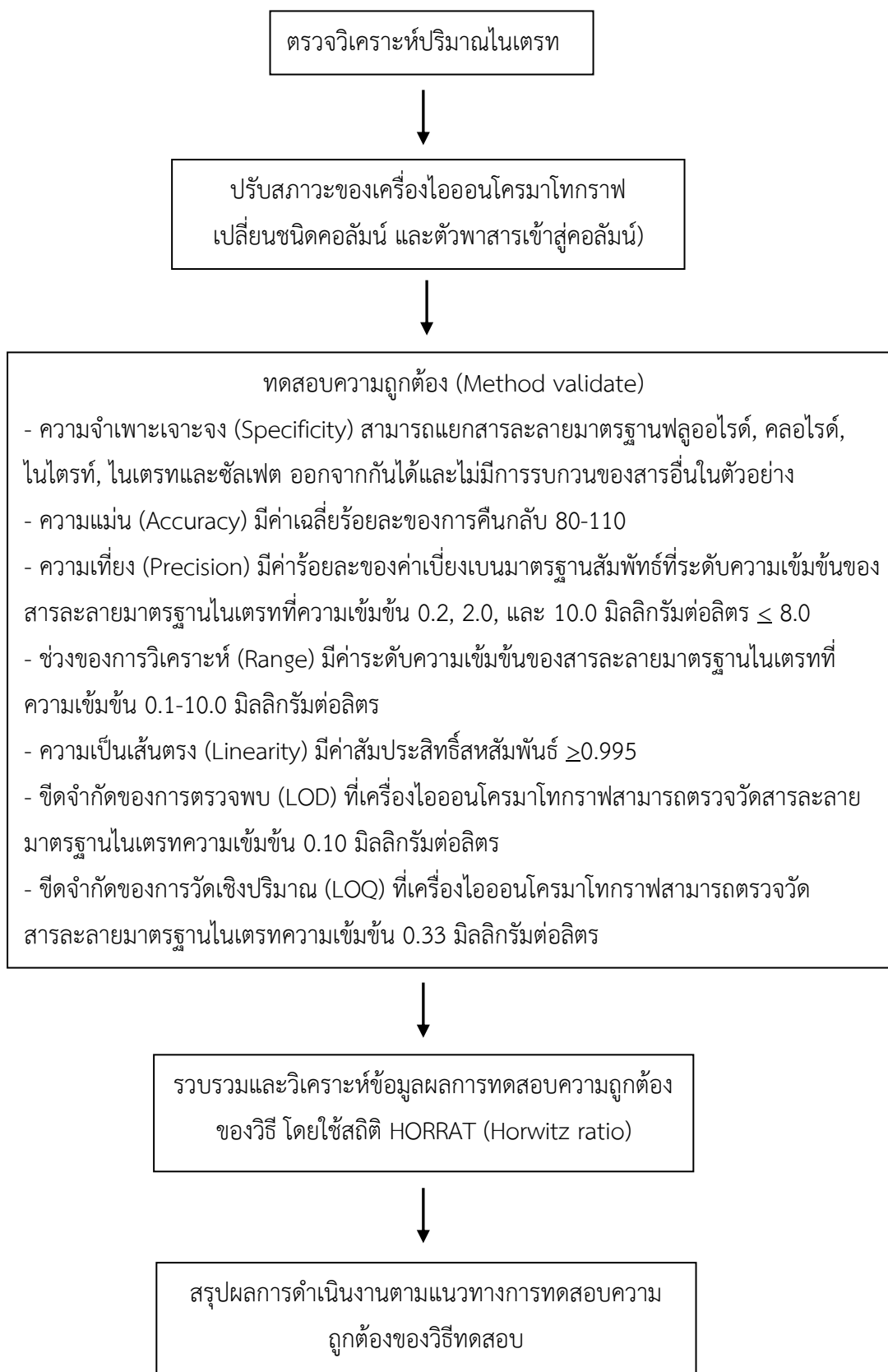
1. ผลการศึกษการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ในเตรทในน้ำด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี สามารถนำไปใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้ซึ่งเป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการให้มีความน่าเชื่อถือตามหลักวิชาการ

2. วิธีการตรวจวิเคราะห์ในเตรทในน้ำที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว สามารถนำมาใช้ในงานตรวจวิเคราะห์และเฝ้าระวังคุณภาพน้ำซึ่งเป็นงานในโครงการสำคัญของกรมอนามัย งานเฝ้าระวังคุณภาพน้ำของกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย

3. นำผลการศึกษามาใช้ประกอบการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 รายการฟลูออไรด์, ซัลเฟต, คลอไรด์, ไนเตรทได้

4. นำแนวทางที่ได้จากการศึกษการทดสอบความถูกต้อง (Method Validation) มาถ่ายทอดให้กับเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการกรมอนามัยและนักศึกษาฝึกงาน

กรอบแนวคิด



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับไนเตรท

ไนเตรท (Nitrate: NO_3^-) เป็นสารเคมีตัวสุดท้ายในวัฏจักรไนโตรเจน (รูปภาพที่ 1) และเป็นธาตุอาหารสำคัญที่พืชใช้ในโครงสร้างและเมตาบอลิซึม (Metabolism) สัตว์กินพืชและผู้บริโภคใช้ไนโตรเจนจากพืชเป็นแหล่งสร้างโปรตีน (Proteins) กรดอะมิโน (Amino acids) และกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid) และอาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid) สำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและเป็นสารพันธุกรรม นอกจากนี้ในอากาศยังมีก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas) มากถึงร้อยละ 78 โดยปริมาตร เป็นก๊าซไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ส่วนใหญ่ไม่สามารถนำก๊าซไนโตรเจนมาใช้ได้โดยตรง จึงต้องเปลี่ยนสภาพจากรูปของก๊าซไปสู่รูปแบบของแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion) และไนเตรท (Nitrate) กระบวนการต่างๆ ที่เกิดในวัฏจักรไนโตรเจนมีดังนี้^[5]

1. กระบวนการตรึงไนโตรเจนในดิน (Nitrogen fixation in soil) โดยแบคทีเรียบางชนิดซึ่งมีอยู่ในดินเปลี่ยนไนโตรเจนจากอากาศเป็นแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion) ซึ่งพืชนำไปใช้ได้

2. กระบวนการตรึงไนโตรเจนในอากาศ (Nitrogen fixation) โดยการใช้พลังงานจากฟ้าแลบและฟ้าผ่าทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างไนโตรเจนและออกซิเจน เกิดเป็นก๊าซไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide: NO) ซึ่งทำปฏิกิริยากับก๊าซออกซิเจน (Oxygen gas: O_2) ต่อไปได้ก๊าซไนโตรเจนไดออกไซด์ (Nitrogen dioxide: NO_2) และทำปฏิกิริยากับน้ำฝนจะทำให้เกิดกรดไนตริก (Nitric acid: HNO_3) กรดไนตริกแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน (Hydrogen ion: H^+) และไนเตรท (Nitrate) ซึ่งไนเตรทที่เกิดขึ้นจะตกลงสู่พื้นดินและพื้นน้ำต่อไป

รูปแบบของไนโตรเจนในน้ำ สารประกอบไนโตรเจนที่สำคัญแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ^[6]

1. สารอินทรีย์ไนโตรเจน (Organic-N) ได้แก่ สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่พบอยู่ในรูปต่างๆ เช่น ยูเรีย โปรตีน ถั่วเหลืองและมูลสัตว์ ในบรรดาไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิด สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนจัดเป็นรูปที่รีดิวซ์มากที่สุด ในทางตรงกันข้ามไนเตรทเป็นชนิดที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์มากที่สุด

2. แอมโมเนีย ($\text{NH}_3\text{-N}$) หมายถึง ไนโตรเจนทั้งหมดที่อยู่ในรูปแอมโมเนีย (Ammonia) และแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion) ที่อุณหภูมิและความดันปกติ แอมโมเนียจะอยู่ในสถานะแก๊ส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น สามารถละลายน้ำได้ดีและพบได้ในน้ำธรรมชาติ แก๊สแอมโมเนีย (NH_3) อยู่ในสถานะสมดุลในน้ำเกิดเป็นแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ส่วนมากอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมคาร์บอเนตและบางส่วนอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเป็นแอมโมเนียอิสระ

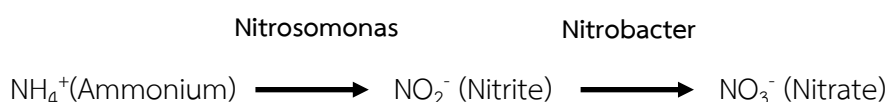
3. ไนไตรท์ ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) เป็นสารที่อยู่กึ่งกลางของวัฏจักรไนโตรเจน ขั้นตอนการออกซิเดชันของแอมโมเนียเป็นไนเตรทและในขั้นตอนการรีดักชันของไนเตรท ซึ่งกระบวนการทั้ง 2 อย่างนี้อาจเกิดขึ้นในระบบบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ ระบบประปาและน้ำในธรรมชาติ ไนไตรท์ปริมาณเล็กน้อยที่พบในน้ำเกิดจากการ

สลายตัวทางชีวเคมีของโปรตีน ซึ่งเป็นตัวชี้ให้ทราบถึงความสกปรกเนื่องจากสารอินทรีย์ อาจพบไนโตรทบางในน้ำเสียที่ผ่านการบำบัดแล้ว แต่มักพบในปริมาณน้อย เนื่องจากถูกแบคทีเรียย่อยสลายกลายเป็นไนเตรท

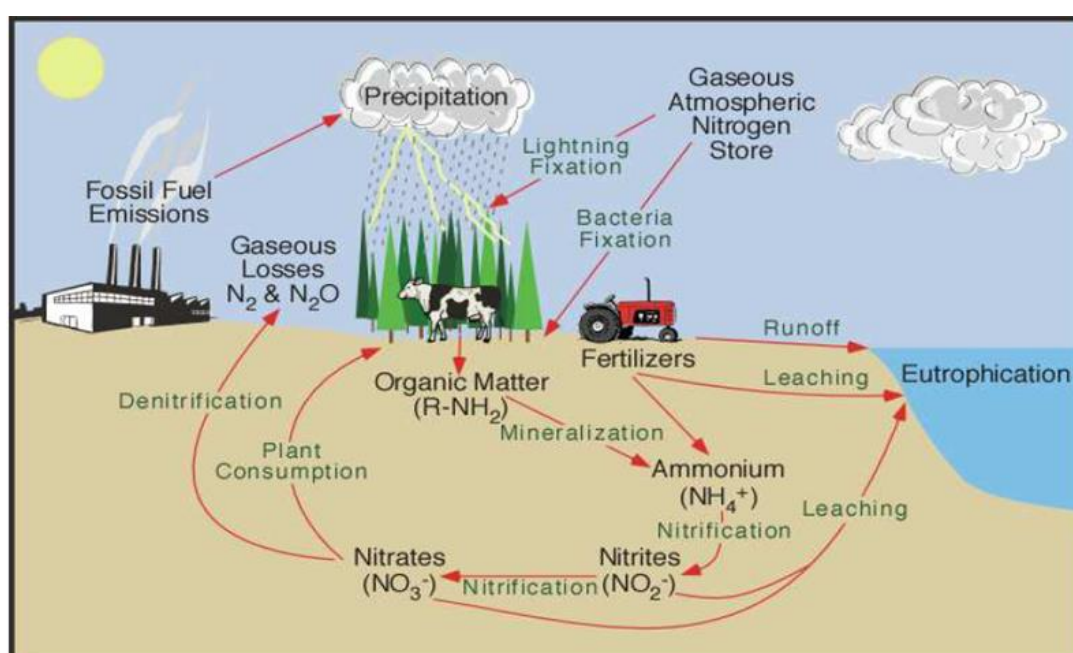
4. ไนเตรท (NO_3^- -N) เป็นสารประกอบที่เกิดขึ้นในขั้นสุดท้ายของการสลายตัวของสารอินทรีย์ไนโตรเจน ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตของพืช สามารถนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนเพื่อเป็นอาหารของคนและสัตว์ต่อไป ไนเตรทเกิดจากการที่สิ่งมีชีวิตปล่อยของเสียซึ่งมีสารประกอบไนโตรเจนออกมาและเมื่อสิ่งมีชีวิตตายลง โปรตีนภายในสิ่งมีชีวิตจะถูกย่อยสลายเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย ซึ่งพืชนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนได้ ถ้ามีปริมาณมากเกินไปเกินความต้องการ แอมโมเนียจะถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียไปเป็นไนไตรท์และไนเตรทต่อไป

ไนโตรเจนในสารอินทรีย์สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นก๊าซไนโตรเจนโดยผ่าน 2 กระบวนการ คือ

1. ไนตริฟิเคชัน (Nitrification) แบคทีเรียบางชนิด (Nitrifying bacteria) เช่น Nitrosomonas และ Nitrobacter ใช้แอมโมเนียมในดินเป็นแหล่งพลังงานและทำให้เกิดไนไตรท์ (NO_2^-) ซึ่งเปลี่ยนเป็นไนเตรท (NO_3^-) ที่พืชใช้สามารถนำไปใช้ได้



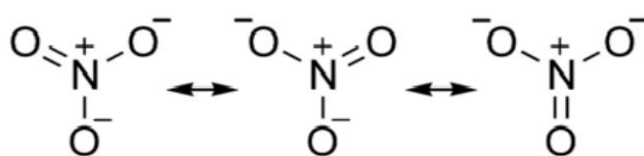
2. ดีไนตริฟิเคชัน (Denitrification) ในสภาพไร้ออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างออกซิเจนได้เองจากไนเตรท และได้ผลิตเป็นก๊าซไนโตรเจนกลับคืนสู่บรรยากาศ



รูปภาพที่ 1 วงจรไนโตรเจน ของการเกิดไนเตรท (NO_3^-)

สารประกอบไนโตรเจนสามารถเปลี่ยนรูปเป็นไนเตรทได้ ทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ โดยแหล่งปนเปื้อนไนเตรทที่สำคัญมาจากของเสียจากการขับถ่ายของคนและสัตว์ และปุ๋ยเคมีที่มีโพแทสเซียมไนเตรทและแอมโมเนียไนเตรท ดินสามารถดูดซับไนเตรทไว้ได้น้อยมาก ไนเตรทจึงถูกชะและละลายในน้ำได้เป็นอย่างดี ซึ่งถูกสะสมในน้ำผิวดิน นอกจากนี้ไนเตรทไม่สามารถกลายเป็นไอได้^[5] โดยธรรมชาติไนเตรทคงตัวอยู่ในน้ำ จนกว่าจะมีการนำไปใช้ประโยชน์โดยพืชและสิ่งมีชีวิต ปริมาณไนเตรทที่สูงในแหล่งน้ำและน้ำดื่มมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ เช่น การเปลี่ยนแหล่งน้ำดิบเพื่อการเตรียมน้ำดื่ม เป็นต้นเหตุความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ เป็นผลมาจากน้ำดื่มหรือเป็นผลจากการรับประทานอาหารที่มีไนเตรทสูง เช่น ผักและเนื้อสัตว์ที่มีการเติมสารไนเตรทเพื่อการปรุงและถนอมอาหาร^[5]

ไนเตรทเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยไนโตรเจนเป็นอะตอมกลางล้อมรอบด้วยอะตอมของออกซิเจน 3 อะตอม มีสูตรเคมีเป็น NO_3^- มีมวลโมเลกุล 62.00 กรัมต่อโมล มีโครงสร้างเป็นสามเหลี่ยมแบนราบ (Trigonal planar) แสดงดังรูป



การปนเปื้อนไนเตรทในน้ำส่งผลกระทบต่อทั้งด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ โดยจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า

- ด้านสิ่งแวดล้อม จากบอกข่าวเล่าความ หนังสือพิมพ์ไทยโพสต์^[2] ประเทศไทยเป็นประเทศที่ใช้ปุ๋ยและสารเคมีในภาคเกษตรมาก มีผลงานวิจัยของกลุ่มกรีนพีซเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่ศึกษาถึงผลกระทบหลังการใช้ปุ๋ยเคมีในภาคเกษตร โดยกรีนพีซฯ ได้ประยุกต์ข้อมูลบางส่วนและวิธีการศึกษาของ Reyes Tirado นักศึกษาจาก University of Exeter ประเทศอังกฤษ ที่ศึกษาถึงพฤติกรรมการใส่ปุ๋ยในปริมาณเกินความจำเป็นของเหล่าเกษตรกรในประเทศอังกฤษ ที่ทำการเกษตรแบบอุตสาหกรรม จนเกิดการรั่วซึมของปุ๋ยและสารเคมีสู่แหล่งน้ำของชุมชน มาประยุกต์สำรวจสภาพการใช้ปุ๋ยเคมีและการปนเปื้อนของปุ๋ยเคมีในแหล่งน้ำสิ่งแวดล้อมต่างๆ ของประเทศไทย โครงการที่สำรวจมีขึ้นใน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ กาญจนบุรีและสุพรรณบุรี ซึ่งผลพบว่าในพื้นที่ 3 จังหวัด มีการปนเปื้อนของสารไนเตรทสะสมอยู่ในแหล่งน้ำและน้ำบาดาลในชุมชนในปริมาณที่เกินมาตรฐาน ทำให้เกิดปรากฏการณ์ Eutrophication ที่เป็นหนึ่งในปัญหามลพิษที่สำคัญ โดยระบบนิเวศทางน้ำมีปริมาณสารอาหารไนโตรเจนมากเกินไปจนความจำเป็น จะเป็นสาเหตุให้สัตว์ที่อยู่ในน้ำตายเป็นจำนวนมาก เนื่องจากปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลงและไม่เพียงพอต่อการหายใจของปลา และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ส่งผลให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดลง และยังเป็นการเพิ่มปริมาณสาหร่ายพิษในหนองน้ำอีกด้วย

- ด้านสุขภาพ องค์การอนามัยโลกรายงานว่าการบริโภคน้ำที่มีไนเตรทเกิดผลกระทบต่อสุขภาพ⁽⁷⁾ และผลการศึกษาจากรัฐมินนิโซตา สหรัฐอเมริกา โดยกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข^[8] รายงานว่าการบริโภคน้ำที่มีไนเตรทมากเกินไปอาจส่งผลต่อการนำพาออกซิเจนของเลือดและทำให้เกิดเมทฮีโมโกลบิน

(Methemoglobin) ในเลือดสูง หรือที่เรียกว่าโรค Blue-baby หรือโรคเมทฮีโมโกลบินนีเมีย (Methemoglobinemia) ซึ่งมักเกิดกับทารกที่มีอายุต่ำกว่า 6 เดือนที่กินนมขวด โรคนี้อาจทำให้ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและส่งผลให้มีอาการป่วยหนักหรือเสียชีวิตได้ อาการอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับ Methemoglobinemia ได้แก่ ความดันโลหิตลดลง อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้น ปวดศีรษะ ปวดท้องและอาเจียน ซึ่งโรค Blue-Baby Syndrome ยังมีสาเหตุเกิดจากโรคหัวใจพิการแต่กำเนิดในทารก (Congenital heart disease) ด้วย ซึ่งในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ 6 ถึง 8 คนต่อ 1000 คนของการเกิดมีชีพ หรือ 6000-7000 คนต่อปี และประมาณ 1000 คนจะมีอาการรุนแรงเป็นโรคหัวใจพิการแต่กำเนิดชนิดรุนแรง (Critical congenital heart disease) เป็นสาเหตุให้ทารกแรกคลอดเสียชีวิต⁽¹⁵⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าไนเตรทมีความสัมพันธ์กับการเกิดเป็นมะเร็ง โดยการศึกษารายงานของ Richards J และคณะ⁽⁹⁾ พบผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งลำไส้ (Colorectal cancer) ของประเทศนิวซีแลนด์ ร้อยละ 3.26 บริโภคน้ำที่มีไนเตรท ซึ่งส่งผลให้เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลถึง 43.2 ล้านดอลลาร์สหรัฐต่อผู้ป่วย 100 ราย และจากการศึกษาของ Picetti R⁽¹⁰⁾ และคณะที่ได้สังเคราะห์งานวิจัยอย่างเป็นระบบ (Systematic review) โดยการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (Meta-analysis) พบว่าการบริโภคน้ำที่มีไนเตรทมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric cancer)

จากการศึกษาที่ผ่านมา สรุปได้ว่าไนเตรทที่อยู่ในน้ำ และน้ำบริโภคมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ดังนั้นการเฝ้าระวังคุณภาพน้ำจึงมีความจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทในน้ำ ซึ่งประเทศไทยตามประกาศกรมอนามัย เรื่อง เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ. 2563 กำหนดให้มีไนเตรทในน้ำบริโภคได้ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร^[3] สรุปดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ.2563

คุณภาพน้ำประปาดื่มได้	รายการวิเคราะห์	เกณฑ์มาตรฐาน
คุณภาพทางกายภาพ	ความขุ่น (Turbidity)	ไม่เกิน 5 เอ็นทียู
	สีปรากฏ (Apparent color)	ไม่เกิน 15 หน่วย แพลตตินัมโคบอลท์
	ความเป็นกรดและด่าง (pH)	ต้องมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-8.5
คุณภาพทางเคมีทั่วไป	ของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids)	ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ความกระด้าง (Hardness as CaCO ₃)	ไม่เกิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ซัลเฟต (Sulfate)	ไม่เกิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร
	คลอไรด์ (Chloride)	ไม่เกิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไนเตรท (Nitrate as NO ₃ ⁻)	ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ไนไตรท์ (Nitrite as NO ₂ ⁻)	ไม่เกิน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ฟลูออไรด์ (Fluoride)	ไม่เกิน 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 1 เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ.2563 (ต่อ)

คุณภาพน้ำประปาดื่มได้	รายการวิเคราะห์	เกณฑ์มาตรฐาน
คุณภาพน้ำทางโลหะหนักทั่วไป	เหล็ก (Iron)	ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร
	แมงกานีส (Manganese)	ไม่เกิน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ทองแดง (Copper)	ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
	สังกะสี (Zinc)	ไม่เกิน 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ตะกั่ว (Lead)	ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร
คุณภาพน้ำทางโลหะหนักที่เป็นพิษ	โครเมียมรวม (Total chromium)	ไม่เกิน 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร
	แคดเมียม (Cadmium)	ไม่เกิน 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร
	สารหนู (Arsenic)	ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร
	ปรอท (Mercury)	ไม่เกิน 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร
	โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total Coliforms bacteria)	ตรวจไม่พบต่อ 100 มิลลิลิตร หรือต้องมีค่า < 1.1 เอ็มพีเอ็นต่อ 100 มิลลิลิตร
	อีโคไล (<i>Escherichia coli</i>)	ตรวจไม่พบต่อ 100 มิลลิลิตร หรือต้องมีค่า < 1.1 เอ็มพีเอ็นต่อ 100 มิลลิลิตร

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำนั้นมีหลายวิธี เช่น Cadmium Reduction, Spectrophotometry และ Ion Chromatography

Kurniawati P^[12] ได้วิเคราะห์ไนเตรทในตัวอย่างน้ำโดยใช้วิธี APHA 2012 Section 4500 NO₃-B สารเคมีที่ใช้ คือ กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid), สารมาตรฐานไนเตรท ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Standard Nitrate 1,000 mg/L) และ Reverse Osmosis (RO) โดยการกรองตัวอย่างเพื่อขจัดสิ่งรบกวนที่เกิดขึ้นจากสารแขวนลอย แล้วทำให้ตัวอย่างน้ำเป็นกรดด้วย กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องยูวี วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร

Altundag H^[13] ได้วิเคราะห์ปริมาณแอนไอออนพร้อมกัน 7 ชนิด คือ ฟลูออไรด์, คลอไรด์, โบรไมด์, ไนไตรท์, ไนเตรท, ฟอสเฟต และซัลเฟต ในตัวอย่างน้ำ จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง Ion-Chromatography โดยมีการศึกษาการทดสอบความถูกต้องและสภาวะที่เหมาะสม ถือเป็นเทคนิคที่ยอดเยียมสำหรับการวิเคราะห์ไอออนในตัวอย่างจำนวนมาก

KIR I^[14] ในการศึกษาวิเคราะห์ไนไตรท์, ไนเตรท, ฟอสเฟต และฟลูออไรด์ในตัวอย่างน้ำและตะกอนของสถานที่ 4 แห่งในทะเลสาบ Egirdir โดยใช้เครื่อง Ion Chromatography

โดยกองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัยเลือกใช้วิธี Ion - Chromatography เนื่องจากมีข้อดีหลายอย่าง เช่น มีความเฉพาะ มีความไวสูง ใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อยและสามารถวิเคราะห์ไอออนได้มากกว่าหนึ่งชนิดในระยะเวลาเดียวกัน ซึ่งเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี (Ion - Chromatograph) เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟี (ชนิด Reacting = ion exchange chromatography) ใช้วิธีการแยกสารผสมในสภาวะการแตกตัวเป็นไอออน โดยเป็นเทคนิคที่ใช้ แยกสารออกจากกัน โดยอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี (Chromatography) จากความแตกต่างในด้านสมบัติที่ต่างกันของสารที่ต้องการแยก สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น หาปริมาณของสารแอนไอออน (Anion), แคตไอออน (Cation) ในตัวอย่างน้ำดื่ม น้ำประปา น้ำบาดาลและน้ำเสีย เป็นต้น

หลักการ

อาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุภายในคอลัมน์ ในระบบประกอบด้วยตัวพาซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ในที่นี้เรียกว่า Eluent (mobile phase เป็น liquid ที่มีขั้ว เป็น polar) ส่วนมากจะเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นตัวพาสารตัวอย่างเข้าสู่ Column (เฟสคงที่) (solid polymer ที่เป็น solid มีขั้ว เป็น polar) ไอออนที่อยู่ในเฟสเคลื่อนที่และไอออนที่ต้องการแยกในสารตัวอย่างจะมีประจุตรงข้ามกับไอออนที่อยู่ผิวของเฟสคงที่ ไอออนในเฟสเคลื่อนที่และไอออนในสารตัวอย่างจะแข่งขันกันเข้าแลกเปลี่ยนกับประจุที่อยู่ผิวของเฟสคงที่ จากนั้นสารจะผ่านเข้าสู่ ตัวตรวจจับ และแปลผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (Chromatogram) ซึ่งแต่ละสารจะมีเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention time RT) เฉพาะตัว ในการวิเคราะห์จะนำพื้นที่ใต้พีคของแต่ละสารมาคำนวณผลเปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐาน (Calibration curve) จะทราบปริมาณของสารตัวอย่าง ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

1. Separation Conditions

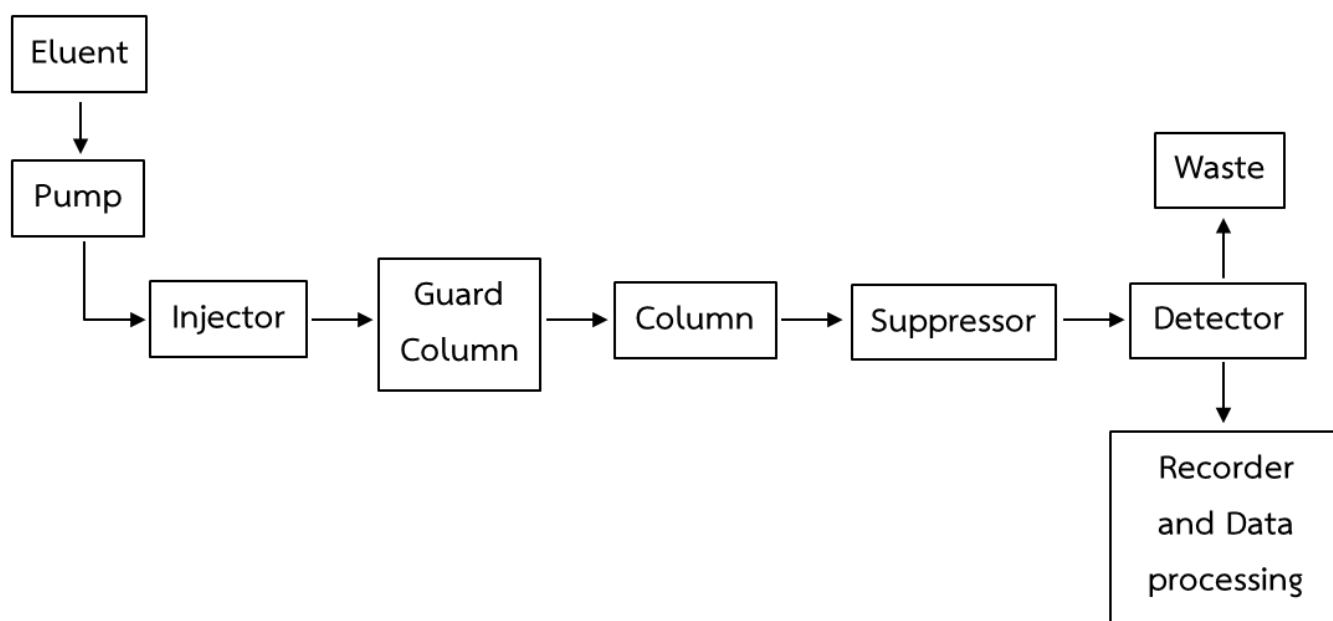
- Column size : 250L x 4.0
- Eluent : 1.7 mM NaHCO₃ + 1.8 mM Na₂CO₃
- Regenerant : 0.25 M H₂SO₄
- Sample loop : 20 uL

2. Pump Setting

- Eluent Flow Rate : 1.3 mL/min
- High pressure limit : 3,000 psi
- Low pressure limit : 200 psi

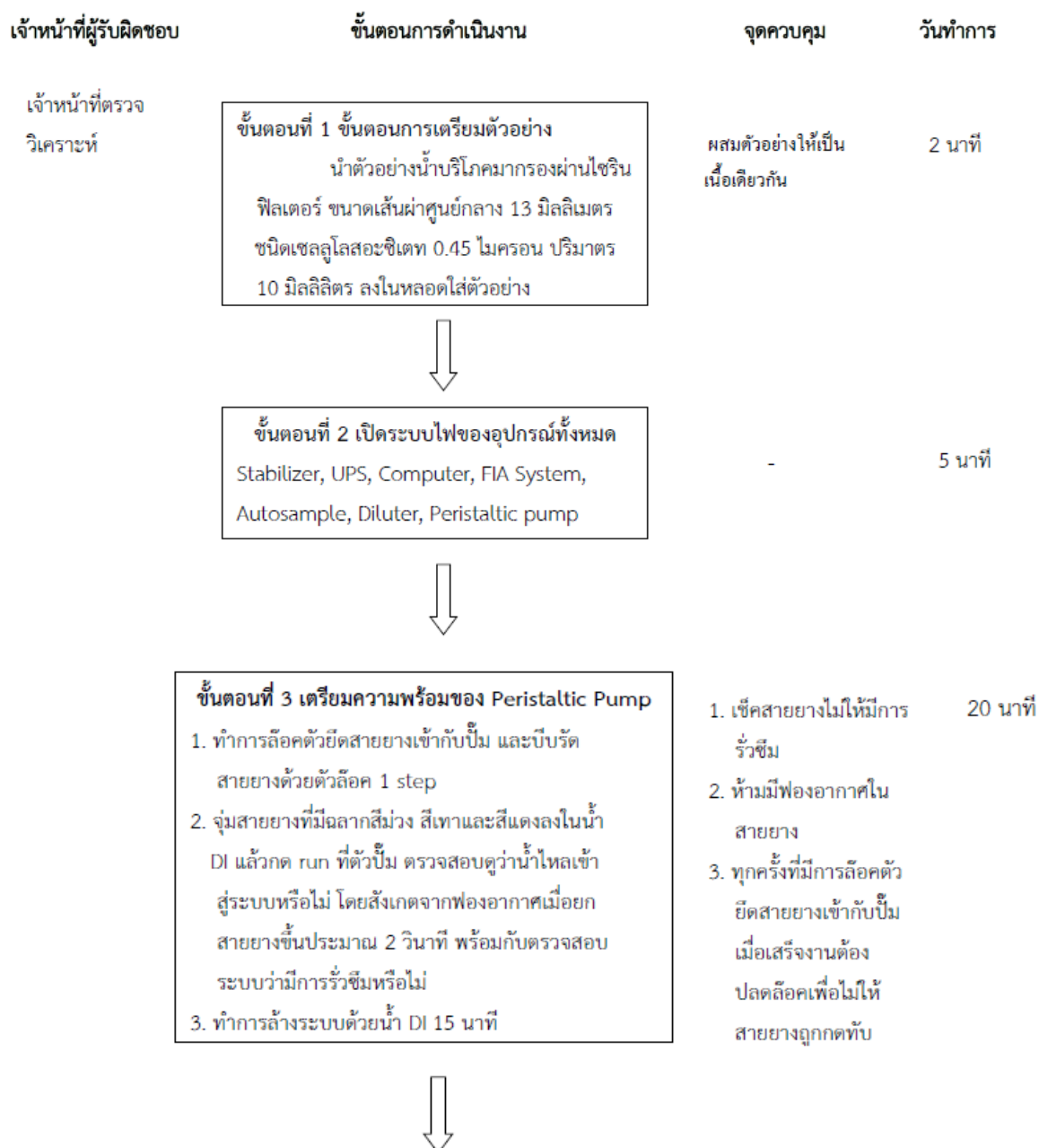
3. Detector Configuration

- Conductivity



รูปภาพที่ 2 แผนภาพแสดงส่วนประกอบของเครื่อง Ion Chromatography

ผังแสดงขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณแอนไอออนในน้ำบริโภค
โดยวิธี Determination of Inorganic Anion by Ion Chromatography



เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบ	ขั้นตอนการดำเนินงาน	จุดควบคุม	วันทำการ
เจ้าหน้าที่ตรวจวิเคราะห์	ขั้นตอนที่ 4 เตรียมความพร้อมของ High Pressure Pump 1. ทำการ Prime pump ด้วยน้ำ DI ดังนี้ 1.1 เสียบ Syringe plastic เข้าที่ output สีดำ ด้านหน้าแล้วคลายสกรูทวนเข็มนาฬิกา 1.2 กดปุ่ม Prime ที่เป็นควบคุม ปลดปล่อยให้ปั๊มผลักดันสารละลายออกมาประมาณ 5 มิลลิลิตร ทำจนกว่าไม่มีฟองอากาศไหลออกมา 1.3 จากนั้นกดปุ่ม Prime อีกครั้งเพื่อหยุดปั๊มแล้วหมุนสกรูตามเข็มนาฬิกาจนแน่น จึงดึง Syringe plastic ออก 2. ตั้งค่าต่างๆของปั๊ม ดังนี้ 2.1 Flow Rate 1.0 ml/min 2.2 High Pressure Limit 1800 psi	ไล่ฟองอากาศออกจาก Pump ให้หมด	10 นาที
	↓		
	ขั้นตอนที่ 5 เตรียมความพร้อมระบบด้วยสารเคมี 1. กดปุ่ม Manual Run/Stop ที่ Peristaltic Pump 2. ยกสายยางที่มีฉลากสีแดงจุ่มลงในกรดซัลฟิวริก 0.25 M ส่วนสายยางฉลากสีเทา สีม่วงจุ่มไว้ในขวดน้ำ DI เหมือนเดิม กด Manual Run/Stop เพื่อให้สารละลายไหลผ่านประมาณ 15 นาที และจุ่มสายจาก High Pressure Pump ลงในขวด Eluent ปลดปล่อยให้สารละลายไหลผ่านประมาณ 30 นาที 3. ครบเวลาที่กำหนดกดปุ่ม Manual Run ที่ Peristaltic	สารละลาย Eluent เมื่อเตรียมเสร็จทุกครั้งต้องทำการกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง-เมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำสารละลายไป Sonicator เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากสารละลาย	40 นาที
	↓		
	ขั้นตอนที่ 6 เตรียมความพร้อมของตัวอย่าง 1. กรองตัวอย่างน้ำด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมครอน ลงในหลอดทดลองประมาณ 10 มิลลิลิตร เรียงใส่ใน Rack 2. นำ Rack ที่ใส่หลอดตัวอย่างวางบนถาด Autosampler ตรวจสอบด้วยว่า Rack วางตรงตำแหน่งที่เลือกไว้บนถาด Autosampler 3. เตรียมสารละลายสำหรับทำ Standard Curve ทั้งหมด	1. กรองตัวอย่างทุกตัว 2. เตรียม QC Sample ดังนี้ NO ₃ ⁻ ความเข้มข้น 0.2 mg/L และ 2 mg/L	3 นาที/ ตัวอย่าง
	↓		

เจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบ	ขั้นตอนการดำเนินงาน	จุดควบคุม	วันทำการ
เจ้าหน้าที่ตรวจวิเคราะห์	ขั้นตอนที่ 7 เปิดโปรแกรม Omnion 3.0 Double click ที่ Icon Omnion 3.0 บน Desktop	-	1 นาที
↓			
	ขั้นตอนที่ 8 ขั้นตอนการวิเคราะห์ 1. คลิก Open เลือก Standard Curve ที่สร้างไว้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2. ทำการป้อนลำดับตัวอย่าง ในช่อง Cup No และชนิดตัวอย่างลงในช่อง Sample ID ให้ตรงกับตำแหน่งหลอดบน Rack และป้อนจำนวนครั้งในการวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่าง 3. หลังจากป้อนข้อมูลครบเรียบร้อยแล้วคลิก Preview เพื่อดู Baseline ถ้ามั่นใจว่า Baseline นิ่งแล้วกด Stop แล้วคลิก Start เพื่อเริ่มการวิเคราะห์ 4. หลังจากเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ทุกครั้งให้ล้างสายยางที่จุ่มกรดซัลฟูริก 0.25 M ประมาณ 15 นาที แล้วไล่น้ำออกจากสายยางทุกสายจนกว่าจะไม่มีน้ำอยู่ในสายยาง	1. ตัวอย่างที่วิเคราะห์เท่ากับอุณหภูมิห้อง 2. ทำ Control Chart 3. ทำ Duplicate คู่ๆ ทุกๆ 10 ตัวอย่างโดยการทำให้ 2 ซ้ำ ค่าที่วิเคราะห์ได้ $\% \text{RPD} \leq 10$	15 นาที/ตัวอย่าง
↓			
	ขั้นตอนที่ 9 การบันทึกผลการวิเคราะห์	รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร	5 นาที/ตัวอย่าง
รวมระยะเวลา	1. การเตรียมความพร้อมของเครื่องใช้เวลา 1 ชั่วโมง 24 นาที 2. การวิเคราะห์ตัวอย่างใช้เวลา 15 นาที/ตัวอย่าง		

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สิ่งที่สำคัญที่สุดของการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ คือผลการตรวจวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้องและแม่นยำ ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบเครื่องมือที่ใช้และกระบวนการตรวจวิเคราะห์ต้องเป็นไปตามมาตรฐาน ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการตรวจวิเคราะห์ในแล็บ ผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบความถูกต้อง (Method validate) ของการตรวจวิเคราะห์ในแล็บในน้ำ ซึ่งการทดสอบความถูกต้อง ประกอบด้วย ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ช่วงของการวิเคราะห์ (Range) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ) โดยใช้ตัวอย่างน้ำบริโภคที่ส่งตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ณ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์แอนไอออนด้วยเทคนิค FIA ควบคู่กับ IC ยี่ห้อ Lachat รุ่น QuikChem 8500
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. บั้มสุญญากาศ ขนาด 1/3 แรงม้า
4. เครื่องล้างความถี่สูง
5. คอลัมน์
6. ซัพเพรสเซอร์
7. หลอดใส่ตัวอย่าง ขนาด 10 มิลลิลิตร
8. ปีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
9. ปิเปตต์แบบปริมาตร ขนาด 2, 4, 20, 50 และ 100 มิลลิลิตรต่อลิตร
10. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
11. ขวดพลาสติก ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
12. ชุดกรองสุญญากาศ
13. กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร
14. ไชรินฟิลเตอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ชนิดเซลลูโลสอะซิเตท 0.45 ไมครอน
15. กระบอกฉีดยาแบบพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร
16. ขวดน้ำปราศจากไอออน
17. ซ้อนตักสาร
18. แท่งแก้วคนสาร

3.2 สารมาตรฐานและสารเคมี

1. สารละลายมาตรฐานไนเตรท ชนิดวัสดุมาตรฐานอ้างอิง (Standard Reference Material) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. สารละลายมาตรฐานไนเตรท ชนิดวัสดุอ้างอิง (Reference Material) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium Carbonate) เกรดวิเคราะห์ (Analytical Grade)
4. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium Bicarbonate) เกรดวิเคราะห์ (Analytical Grade)
5. เมทานอล (Methanol) เกรดวิเคราะห์ (Analytical Grade)
6. กรดซัลฟูริก (Sulfuric Acid) เกรดวิเคราะห์ (Analytical Grade)
7. น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ความต้านทานไฟฟ้าไม่น้อยกว่า 18.2 เมกะโห์ม

3.3 ตัวอย่าง

ตัวอย่างน้ำบริโภคที่ส่งตรวจคุณภาพน้ำ ณ กองห้องปฏิบัติการสาธารณสุขกรมอนามัย ระหว่างเดือน มกราคม - กันยายน 2564

- ขั้นตอนการรักษาสภาพตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 6 องศาเซลเซียส และต้องวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรทภายใน 7 วัน หลังจากเก็บตัวอย่างเนื่องจากจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่าง

- ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำบริโภคมารองผ่านไซรินฟิลเตอร์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ชนิดเซลลูโลสอะซิเตท 0.45 ไมครอน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดใส่ตัวอย่าง

3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard Calibration Curve)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานไนเตรท ชนิดวัสดุมาตรฐานอ้างอิง (Standard Reference Material) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร
ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานไนเตรท ชนิดวัสดุมาตรฐานอ้างอิง (Standard Reference Material) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 1) มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.8, 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
โดยการนำสารละลายมาตรฐานไนเตรท ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2) มาทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 2

ลำดับ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรที่เตรียม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานในเตรท ที่ใช้เตรียม (มิลลิลิตร)
Standard 0	-	-	-
Standard 1	0.1	200	2
Standard 2	0.2	200	4
Standard 3	0.8	200	16
Standard 4	2.0	200	40
Standard 5	6.0	200	120
Standard 6	10.0	200	200

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเตรท ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.8, 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

3.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเตรท เพื่อการควบคุมคุณภาพ (Quality Control)

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานในเตรท (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานในเตรท ชนิดวัสดุอ้างอิง (Standard Reference Material) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานในเตรท (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานในเตรท ชนิดวัสดุอ้างอิง (Reference Material) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 1) มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3. เตรียมสารละลายมาตรฐานในเตรท เพื่อการควบคุมคุณภาพ ความเข้มข้น 0.2 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการนำสารละลายมาตรฐานในเตรท ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (จากข้อ 2) มาทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 3

ลำดับ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรที่เตรียม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานในเตรท ที่ใช้เตรียม (มิลลิลิตร)
QC 1	0.2	50	1
QC 2	2.0	50	10

ตารางที่ 3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเตรท ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อการควบคุมคุณภาพ

3.6 การเติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทในตัวอย่าง (Spike Sample)

1. แบ่งสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน

1.1 ส่วนแรกใช้เป็นตัวอย่างปกติ ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงไป เรียกว่า ตัวอย่างเริ่มต้น (Original Sample)

1.2 ส่วนที่สองนำมาเติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทตามความเข้มข้นที่ต้องการ (Spike Sample) คือ 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเตรียมดังนี้

- เตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานไนเตรท ชนิดวัสดุมาตรฐานอ้างอิง (Standard Reference Material) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สำหรับเตรียมความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

- เตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตต์สารละลายมาตรฐานไนเตรท ชนิดวัสดุมาตรฐานอ้างอิง (Standard Reference Material) ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สำหรับเตรียมความเข้มข้น 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ปริมาตรที่เตรียม (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐานไนเตรท ที่ใช้เตรียม (มิลลิลิตร)
0.2	100	2
2.0	100	2
10.0	100	10

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไนเตรท ที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในตัวอย่าง (Spike Sample)

3.6 การทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation)

1. ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม (Mixed Standard Solution) โดยใช้สารละลายมาตรฐานไนเตรท ที่ความเข้มข้น ฟลูออไรด์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, คลอไรด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนไตรท์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนเตรท 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและซัลเฟต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ion Chromatography ตรวจสอบการแยกของไนเตรทออกจากสารอื่น สารทั้งหมดต้องมีค่าเวลาที่สารเคลื่อนที่ต่างกันและให้พีคที่ไม่ซ้อนทับกัน

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

- ความเป็นเส้นตรง (Linearity) คือ ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ต้องเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

- ช่วงของการวิเคราะห์ (Range) หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวิเคราะห์ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วิเคราะห์แล้วมีค่าความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) และความเป็นเส้นตรงอยู่ในระดับที่มีความถูกต้อง ยอมรับได้

วิธีทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ โดยการวัดสารละลายมาตรฐานในเตรท จากข้อ 3.4 (2) ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.8, 2, 6 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สร้างกราฟมาตรฐานโดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) กับความเข้มข้น (Concentration) ที่ได้จากการวิเคราะห์ และคำนวณหาสมการเส้นตรง ($y = mx + c$) กับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง ซึ่งเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ มากกว่า 0.995

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

- ความแม่นยำ คือ ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ถ้าผลการวิเคราะห์วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด แสดงว่าการวิเคราะห์มีความถูกต้องสูง (High Accuracy) แต่ถ้าค่าที่วัดได้ห่างไกลจากค่าที่แท้จริง แสดงว่าการวิเคราะห์มีความถูกต้องน้อย (Low Accuracy) โดยมีวิธีทดสอบ ดังนี้

เติมสารละลายมาตรฐานในเตรทลงในตัวอย่างน้ำบริโภคที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละระดับให้ทำซ้ำอย่างน้อย 10 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณในเตรท แล้วคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD) โดยที่ค่าเฉลี่ยร้อยละของการคืนกลับ ควรอยู่ในช่วง 80-110 และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ไม่มากกว่า 8 คำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) จากสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำบริโภคที่เติมสารละลายมาตรฐานในเตรท

C_2 คือ ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างน้ำบริโภคที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐานในเตรท

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานในเตรทที่เติมลงในตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (\%RSD)} = \frac{SD \times 100}{\bar{x}}$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ย

4. ความเที่ยง (Precision)

- ความเที่ยง (Precision) คือ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำๆ กันหลายๆ ครั้ง โดยความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ จะแสดงเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน หรือ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation, CV) โดยมีวิธีทดสอบ ดังนี้

เติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงในตัวอย่างน้ำที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ทำซ้ำอย่างน้อย 10 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลมาทำการประเมินการยอมรับค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ โดยเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก HORRAT (Horwitz ratio) ตามที่ระบุใน AOAC กำหนดค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ น้อยกว่า 8

ค่า HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD (measured)}}{\% \text{RSD (Horwitz)}}$$

Horwitz' Equation

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

โดยที่ C = Concentration Ratio

5. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

- ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

- ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี ความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ที่ยอมรับได้

วิธีทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) โดยการคำนวณจากจุดตัดของกราฟเส้นตรงที่ plot ระหว่างค่าความเข้มข้นเฉลี่ยของ Spike Sample Blank กับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ดังนี้

1. เติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงใน Sample blank ให้มีความเข้มข้นหลายระดับ โดยระดับแรกไม่ควรห่างจากศูนย์มากนักและระดับอื่นๆควรมีระยะห่างเท่าๆ กัน คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. วิเคราะห์ Spike Sample Blank ระดับละ 10 ซ้ำ

3. คำนวณค่า $\bar{x}$ และ S ของแต่ละระดับความเข้มข้น

4. Plot graph ระหว่าง $\bar{x}$ และ S โดยให้ $\bar{x}$ อยู่บนแกน X และ S อยู่บนแกน y หาสมการสัมพัทธ์ ระหว่าง $\bar{x}$ และ S

5. ถ้ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ลากเส้นกราฟตัดแกน y จุดตัดคือ S_b (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)

6. คำนวณค่า LOD จากสูตร

$$LOD = 3S_b$$

7. คำนวณค่า LOQ จากสูตร

$$LOQ = 10S_b$$

6. การยืนยันค่า LOQ

เติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงใน Sample blank ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ พิจารณาความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) และค่า HORRAT (Horwitz ratio)

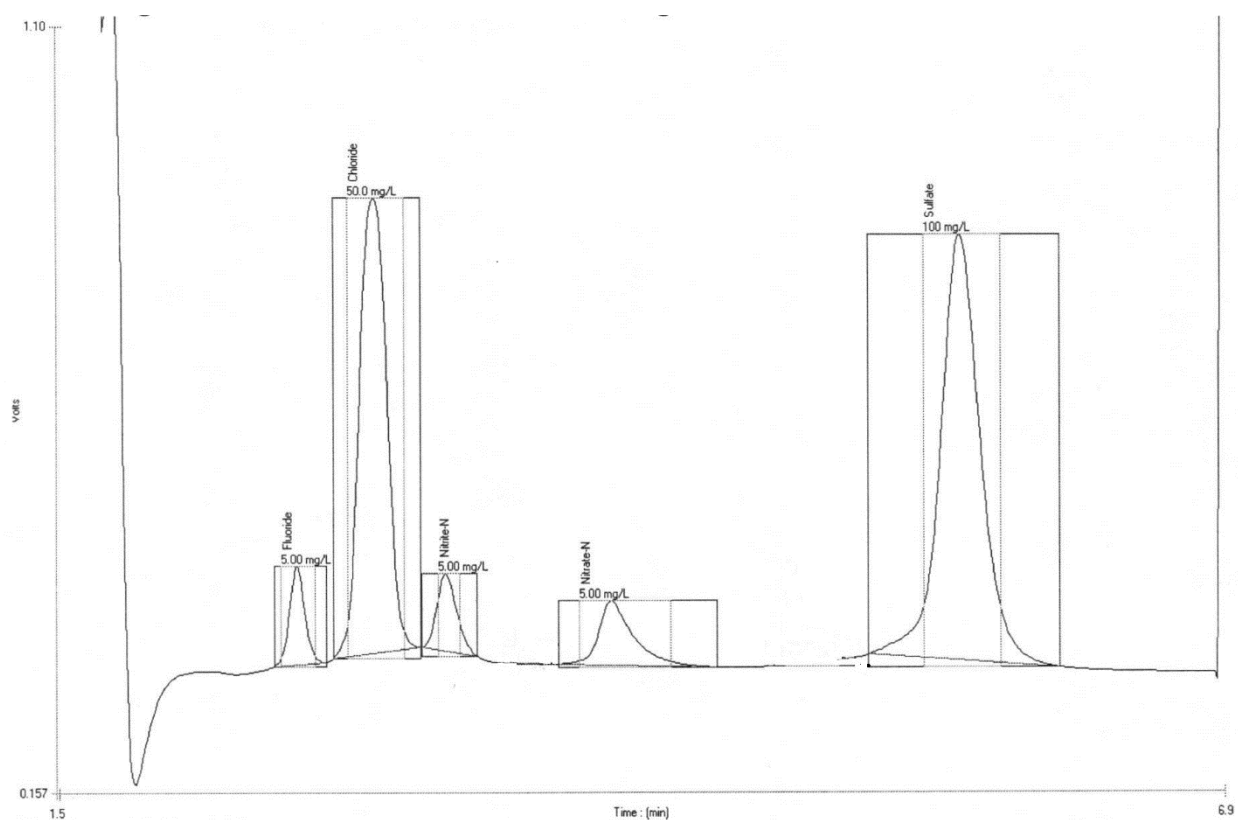
-

บทที่ 4

ผลการทดสอบ

1. ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

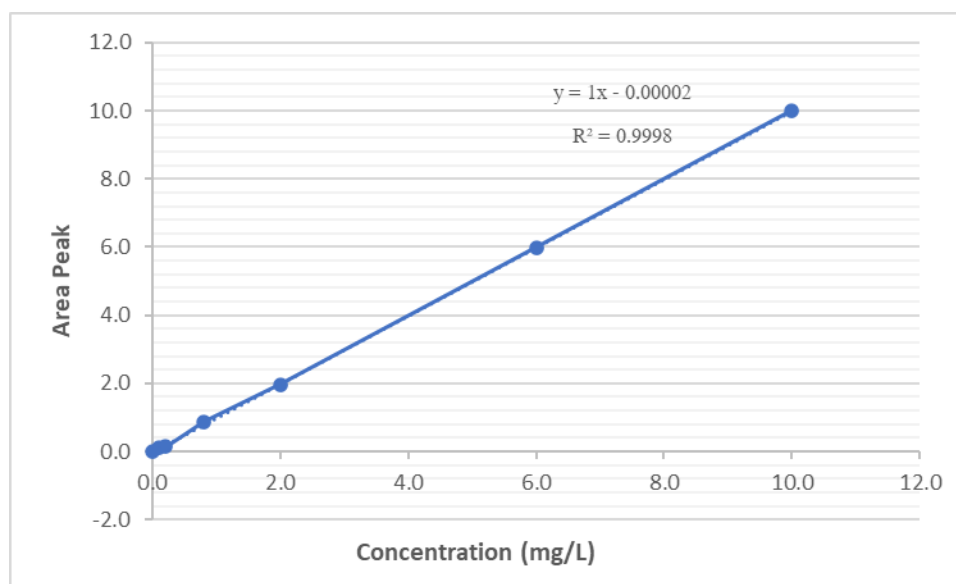
จากการฉีดสารละลายมาตรฐานผสม (Mix Standard Solution) ที่มีสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, คลอไรด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนไตรท์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนเตรท 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และซัลเฟต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ภายใต้สภาวะของเครื่อง Ion chromatography สามารถแยกสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์, คลอไรด์, ไนไตรท์, ไนเตรทและซัลเฟต ออกจากกันได้และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง วิธีการวิเคราะห์นี้มีความสามารถในการวัดที่จำเพาะกับไนเตรท ดังภาพ



รูปภาพที่ 3 โครมาโทแกรมสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, คลอไรด์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนไตรท์ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนเตรท 5 มิลลิกรัมต่อลิตรและซัลเฟต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ทำการวัดสารละลายมาตรฐานไนเตรท ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.8, 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) กับความเข้มข้น (Concentration) พบว่าเป็นเส้นตรง ตลอดช่วงที่ทดสอบ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) เท่ากับ 0.9998 ดังภาพ



รูปภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) กับความเข้มข้น (Concentration) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1–10 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการเติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงในตัวอย่างน้ำบริโภคที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขั้ว พบว่ามีค่าร้อยละ อยู่ในช่วง 80-110 ซึ่งเกณฑ์ของ AOAC⁽¹¹⁾ ระบุว่าควรอยู่ในช่วง 80-110 ดังนั้นค่าไนเตรท มีค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) อยู่ในเกณฑ์ที่ระบุไว้ และค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD) ไม่เกินร้อยละ 8 ดังตาราง

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ	Spike sample + 0.2 mg/L % Recovery	Spike sample + 2.0 mg/L % Recovery	Spike sample + 10.0 mg/L % Recovery
1	107.5	99.3	98.4
2	94.5	95.7	98.0
3	82.0	96.7	97.5
4	100.0	99.3	98.8
5	95.0	97.4	98.0
6	97.0	95.7	97.2
7	103.0	95.7	97.9
8	95.0	97.0	98.0
9	102.5	94.7	98.0
10	109.0	97.5	98.9
Mean	98.55	96.9	98.1
SD	7.7797	1.5515	0.5170
%RSD	7.8942	1.6016	0.5271

4. การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ทำการเติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงในตัวอย่างน้ำที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่ามีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ไม่เกินร้อยละ 8 ค่าที่คำนวณได้จาก HORRAT (Horwitz ratio) ไม่เกิน 2 ตามที่ระบุใน AOAC กำหนดค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ น้อยกว่า 8 ดังตาราง

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความเที่ยง (Precision) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 2.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ	Sample 0.4 mg/L	Sample + Spike 0.2 mg/L	Sample + Spike 2.0 mg/L	Sample + Spike 10.0 mg/L
1	0.500	0.715	2.486	10.340
2	0.523	0.712	2.436	10.326
3	0.532	0.696	2.465	10.278
4	0.454	0.654	2.440	10.331
5	0.492	0.682	2.440	10.290
6	0.512	0.706	2.425	10.236
7	0.493	0.699	2.406	10.284
8	0.490	0.680	2.430	10.293
9	0.492	0.697	2.386	10.293
10	0.402	0.620	2.351	10.293
Mean	0.489	0.686	2.427	10.296
SD	0.037	0.029	0.038	0.030
%RSD	7.616	4.274	1.581	0.293
C	0.000000489	6.861E-07	2.4265E-06	1.02964E-05
1-0.5logC	4.155	4.082	3.808	3.494
Predicted Horwitz RSD	11.760	11.176	9.241	7.434
HORRAT	0.65	0.38	0.17	0.04

5. การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ)

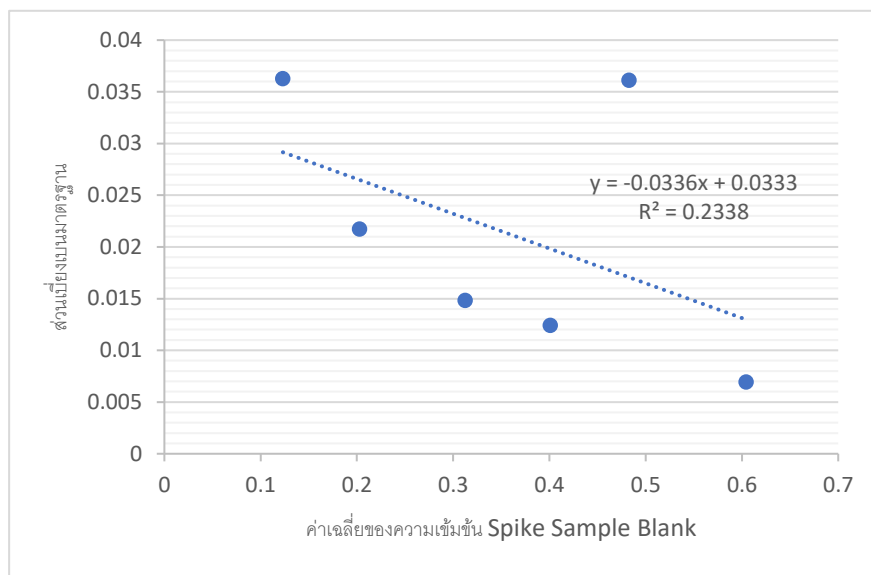
ทำการวัดสารละลายมาตรฐานไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ข้ำ จากภาพที่ 4 พบว่าได้ความสัมพันธ์ $y = 0.0336x + 0.0333$ มีจุดตัดแกน y เมื่อให้ความเข้มข้นเท่ากับศูนย์จะได้ 0.0333 (S_b) นำไปคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสูตร $LOD = 3S_b$ $LOQ = 10S_b$

ตารางที่ 7 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม ต่อลิตร	ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม ต่อลิตร	ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัม ต่อลิตร	ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม ต่อลิตร	ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อลิตร	ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม ต่อลิตร
1	0.105	0.210	0.306	0.404	0.507	0.600
2	0.191	0.190	0.323	0.419	0.494	0.602
3	0.110	0.179	0.306	0.377	0.507	0.607
4	0.192	0.203	0.319	0.406	0.502	0.617
5	0.101	0.240	0.318	0.402	0.499	0.604
6	0.102	0.207	0.300	0.406	0.502	0.614
7	0.103	0.203	0.299	0.403	0.515	0.608
8	0.109	0.233	0.347	0.382	0.421	0.597
9	0.114	0.191	0.304	0.401	0.460	0.598
10	0.104	0.171	0.302	0.409	0.419	0.598

ผลการทดสอบ	สูตรในการคำนวณ	ค่าที่ได้
Limit of Detection	$3S_b$	๐.๑๐
Limit of Quantitation	$10S_b$	๐.๓๓

ดังนั้นขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection, LOD) = 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) = 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร



รูปภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มข้น Spike Sample Blank กับส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในการหาค่า LOD และ LOQ

6. การยืนยันค่า LOQ

เติมสารละลายมาตรฐานไนเตรทลงใน Sample blank ที่ความเข้มข้น 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 10 ซ้ำ พบว่ามีค่าร้อยละ อยู่ในช่วง 80-110 มีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ไม่เกินร้อยละ 8 ค่าที่คำนวณได้จาก HORRAT (Horwitz ratio) ไม่เกิน 2 ตามที่ระบุใน AOAC

ตารางที่ 8 การยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลำดับ	Spike sample (mg/L)	ค่าที่วัดได้ (mg/L)	% Recovery
1	0.33	0.320	97.0
2	0.33	0.324	98.2
3	0.33	0.301	91.2
4	0.33	0.292	88.5
5	0.33	0.290	87.9
6	0.33	0.321	97.3
7	0.33	0.275	83.3

ลำดับ	Spike sample (mg/L)	ค่าที่วัดได้ (mg/L)	% Recovery
8	0.33	0.327	99.1
9	0.33	0.291	88.2
10	0.33	0.276	83.6
Mean		0.302	
SD		0.020	
%RSD		6.596	
C		3.02E-07	
1-0.5logC		4.260	
Predicted Horwitz RSD		12.647	
HORRAT		0.521	

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการดำเนินการทดสอบ

ผลการดำเนินการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. APHA, AWWA, WEF, 23rd Edition, 2017. Part 4110 B. และ U.S. Environmental Protection Agency: EPA ด้วยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟี (Ion Chromatograph) ตามวิธี Determination of Inorganic Anion by Ion Chromatography ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

1. ความจำเพาะเจาะจง (Specificity) สามารถแยกสารละลายมาตรฐานฟลูออไรด์, คลอไรด์, ไนไตรท์, ไนเตรทและซัลเฟต ออกจากกันได้และไม่มีการรบกวนของสารอื่นในตัวอย่าง
 2. ความแม่นยำ (Accuracy) พิจารณาจากค่าการคืนกลับ (% Recovery) พบว่า ผลการทดสอบอยู่ในช่วง 80%-110% ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับที่กำหนดไว้ คือ 90%-110%
 3. ความเที่ยง (Precision) มีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.2, 2.0, และ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ≤ 8.0
 4. ช่วงของการวิเคราะห์ (Range) มีขอบข่ายของการวิเคราะห์ไนเตรท เท่ากับ 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
 5. ความเป็นเส้นตรง (Linearity) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9998
 6. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) ที่เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีสามารถตรวจวัดสารละลายมาตรฐานไนเตรท เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร
 7. ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ) ที่เครื่องไอออนโครมาโทกราฟีสามารถตรวจวัดสารละลายมาตรฐานไนเตรท เท่ากับ 0.33 มิลลิกรัมต่อลิตร
- จากผลการทดสอบดังกล่าวได้วิธีทดสอบที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือตามหลักวิชาการ

อภิปรายผล

การตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธี Cadmium Reduction ร่วมกับ Colorimetric determination, Spectrophotometry และ Chromatography ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี-ข้อเสียที่แตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทขึ้นอยู่กับแต่ละห้องปฏิบัติการ เช่น ถ้าเลือกใช้วิธี Cadmium Reduction ร่วมกับ Colorimetric determination ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง แต่วิธีนี้ต้องใช้สาร chloroform และโลหะ cadmium ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง⁽¹⁶⁾ การตรวจโดยวิธี Spectrophotometry เครื่องมือราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธี Chromatography แต่มีความไวไม่แตกต่างกัน^(12,17) ซึ่งวิธี Chromatography ที่นิยมใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ Ion chromatography และ High performance liquid chromatography สำหรับการศึกษานี้ใช้ Ion chromatography เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Tirumalesh K⁽¹⁸⁾ ที่ใช้วิธีเดียวกัน พบว่าค่า LOD เท่ากับ 0.006 mg/L ซึ่งน้อยกว่าการศึกษานี้ ทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้เครื่องมือต่างยี่ห้อ สภาวะในการ

วิเคราะห์แตกต่างกัน เช่น Separation Conditions, Pump Setting และ Detector Configuration ในการศึกษานี้ใช้เครื่อง ยี่ห้อ Lachat รุ่น QuikChem 8500 ส่วนการศึกษาของ Tirumalesh K ใช้เครื่องยี่ห้อ Dionex ion chromatography รุ่น DX-500 และตัวอย่างที่ใช้ทดสอบเป็นน้ำที่มาจากกาปนเปื้อน

ข้อเสนอแนะ

1) ข้อเสนอเชิงนโยบาย

1. นำผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำ โดยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟ (Ion Chromatograph) ที่ได้ไปใช้ประกอบการขอรับการรับรอง ISO/IEC 17025 : 2017 ขอบข่ายการขอรับการรับรองไนเตรทในน้ำ

2. การทดสอบความถูกต้องของวิธีเป็นสิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการของกรมอนามัยต้องดำเนินการให้ครบทุกรายการทดสอบ เพราะเป็นการสร้างความเชื่อมั่น ความน่าเชื่อถือให้กับรายงานผลการทดสอบและยังส่งผลต่อความพึงพอใจของผู้รับบริการอีกด้วย

2) ข้อเสนอเชิงปฏิบัติการ

1. ควรทำการทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing) สำหรับการทดสอบไนเตรทในน้ำ เพื่อนำไปประกอบการขอรับการรับรอง ISO/IEC 17025 : 2017

2. ควรทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method Validation) วิเคราะห์รายการทดสอบอื่นในกลุ่มแอนไอออน เพื่อความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือตามหลักวิชาการ

3. จากข้อมูลที่ได้ควรจัดทำเป็นแนวทางการทดสอบความถูกต้อง (Method Validation) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำ โดยเครื่องไอออนโครมาโทกราฟ (Ion Chromatograph) เพื่อเป็นแนวทางการดำเนินงานให้กับห้องปฏิบัติการกรมอนามัยในส่วนภูมิภาค เช่น ศูนย์อนามัยที่ 1, ศูนย์อนามัยที่ 8, ศูนย์อนามัยที่ 9, ศูนย์อนามัยที่ 12 และศูนย์อนามัยกลุ่มชาติพันธุ์ ชายขอบและแรงงานข้ามชาติ

3) ข้อเสนอสำหรับงานวิจัยครั้งต่อไป

จากผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ไนเตรทในน้ำ ยังต้องใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการอ้างอิง ซึ่งต้องใช้เวลาดังแต่การสุ่มเก็บตัวอย่าง การนำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ตัวอย่างและการออกรายงานผล ซึ่งรวมระยะเวลาทั้งหมดไม่น้อยกว่า 20 วัน ซึ่งอาจไม่ทันต่อสถานการณ์ในการแก้ปัญหาในพื้นที่ ดังนั้นจึงควรคิดค้นนวัตกรรมชุดทดสอบไนเตรทอย่างง่ายเพื่อให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องและประชาชนสามารถนำไปใช้เพื่อเฝ้าระวังปริมาณไนเตรทในพื้นที่ได้

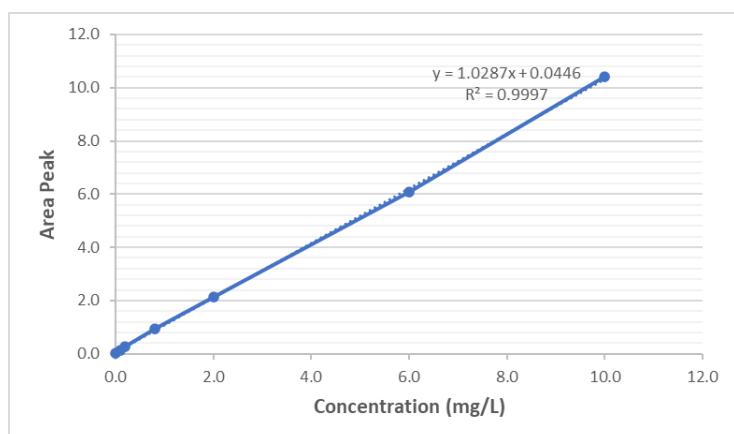
เอกสารอ้างอิง

1. W C Nugraha and Y S Ridwan 2019 Method validation for nitrate analysis in water using spectrophotometer visible with cadmium reduction Research 2019; J. Phys.: Conf. Ser. 1402 055061.
2. บอกข่าวเล่าความ หนังสือพิมพ์ไทยโพสต์ สารในตรรกแหล่งน้ำ ผลพวงเกษตรกรรมใหม่ใส่ปุ๋ย 30 มกราคม 2551.
3. กรมอนามัย. ประกาศกรมอนามัย เรื่อง เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ. 2563. สืบค้นเมื่อ 1 ธันวาคม 2565 จาก <http://laws.anamai.moph.go.th/th/practices/download/?did=201133&id=62575&reload=>.
4. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรกฎาคม 2549 ISBN : 974-7549-97-2.
5. เซิน คำอาจ. ผลกระทบ เมื่อวัฏจักรไนโตรเจนโดนแทรกแซง. โครงการฟิสิกส์และวิศวกรรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ. มกราคม 2558.
6. นางสาวศิริพร พรหมดี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. การพัฒนาชุดทดสอบปริมาณแอมโมเนียและไนเตรทในน้ำภาคสนามสำหรับ โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสิ่งแวดล้อมแหลมผักเบี้ยอันเนื่องมาจากพระราชดำริ. 2555.
7. WHO. Nitrate and nitrite in Drinking-water. Geneva, World Health Organization 1998.^{2nd} ed.
8. Department of Health Nitrate in Drinking water. สืบค้นเมื่อ 12 ธันวาคม 2565 จาก <https://www.health.state.mn.us/communities/environment/water/contaminants/nitrate.html>
9. Richards J, Chambers T, Hales S, et al. Nitrate contamination in drinking water and colorectal cancer: Exposure assessment and estimated health burden in New Zealand. Environmental Research 2022; 204 (Part C). Article 112322.
10. Picetti R, Deeney M, Patorino S, et al. Nitrate and nitrite contamination in drinking water and cancer risk: A systematic review with meta-analysis. Environmental Research 2022; 210. Article 112988.
11. Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis (2019) Appendix F, p. 2
12. Kumiawati P, Gusrianti R, Dwisiwi BB, et al. Verification of spectrophotometric method for nitrate analysis in water samples. AIP Conference Proceedings 1911, 020013. 2017.

13. Altundag H, Agar S, Altintig E, Ates A, Sivrikaya S. Use of ion chromatography method on the determination of some anions in the water collected from Sakarya, Turkey. J. Chem. Metrol. 2019: 13(1): 14-20.
14. KIR I, ERDOGAN M, ENGIN M. Determination of Nitrite, Nitrate, Phosphates and Fluoride Quantities in Water and Sediment of Egirdir Lake, Turkey. Journal of Natural and Applied Science. 2015: 19(2): 129-132.
15. Queen Sirikit National Institute of Child Health, CCHD Screening to Reduce Neonatal Mortality in Thailand, สืบค้นเมื่อ 17 เมษายน 2566 จาก https://publicadministration.un.org/unpsa/Portals/0/UNPSA_Submitted_Docs/2018/889DCF8D-F574-4E1B-9D7D-0B176C8C958C/1.UN2018CCHD-doc1.pdf?ver=2018-02-26-215610-430
16. Baxter TE. Nitrate by cadmium reduction and colorimetric determination of combined nitrite. Standard Operating Procedure AMBL-206-E. Applied Microbiology & Biotechnology Laboratory. 2019:
17. Alahi EE, Mukhopadhyay SC. Detection method of nitrite in water: A review. Sensors and Actuators A 280. 2018: 210-221.
18. Tirumalesh K. Simultaneous determination of bromide and nitrate in contaminated waters by ion chromatography using amperometry and absorbance detectors. Talanta. 2008: 74 (5): 1428-1434.

ภาคผนวก

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ไนเตรทในตัวอย่างน้ำ



$$\text{Area} = 3.16\text{e-}6 \cdot \text{Conc}^2 + 9.96\text{e-}4 \cdot \text{Conc} + 6.69\text{e-}5$$

$$\text{Conc} = -2.75\text{e+}3 \cdot \text{Area}^2 + 1.00\text{e+}3 \cdot \text{Area} - 0.0653$$

Sample (mg/L)	Peak Area (V min)	Nitrate (mg/L)
Standard 0.00	3.67E-05	-0.0285
Standard 0.10	1.14E-04	0.0487
Standard 0.20	2.55E-04	0.19
Standard 0.80	9.25E-04	0.859
Standard 2.00	2.15E-03	2.08
Standard 6.00	6.08E-03	5.93
Standard 10.0	1.04E-02	10.0
QC 0.2	2.56E-04	0.19
QC 2.0	1.87E-03	1.80
Sample 1	2.51E-04	0.185
Sample 2	2.46E-04	0.180
Sample 3	2.09E-04	0.143
Sample 4	8.92E-04	0.826
Sample 5	5.67E-04	0.501
Sample 6	3.50E-04	0.284
Sample 7	8.19E-04	0.753
Sample 8	2.71E-04	0.205
Sample 9	4.98E-04	0.432
Sample 10	3.00E-04	0.229
Sample 10	2.90E-04	0.226
QC 0.2	2.64E-04	0.198
QC 2.0	1.90E-03	1.83

ประกาศกรมอนามัย เรื่อง เกณฑ์คุณภาพน้ำประปาดื่มได้ กรมอนามัย พ.ศ. ๒๕๖๓

รายการทดสอบ	หน่วย	มาตรฐานที่กำหนด	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพ			
1. สีปรากฏ (Apparent Color)	แพลทินัม-โคบอลต์	ไม่เกิน 15	Visual comparison
2. ความขุ่น (Turbidity)	เอ็นทียู	ไม่เกิน 5	Nephelometric
3. ความเป็นกรดและด่าง (pH)	-	ต้องอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 8.5	Electrometric
ทางเคมี			
4. ของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total Dissolved Solids)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 500	TDS Dried at 180°C
5. ความกระด้าง (Hardness as CaCO ₃)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 300	EDTA Titrimetric
6. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Ion Chromatography
7. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Ion Chromatography
8. ไนเตรท (Nitrate as NO ₃ -)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 50	Ion Chromatography
9. ไนไตรท์ (Nitrite as NO ₂ -)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 3	Colorimetric
10. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.7	Ion Chromatography
ทางโลหะหนัก			
11. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.3	ICP
12. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.3	ICP
13. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1	ICP
14. สังกะสี (Zinc)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 3	ICP
ทางโลหะหนักที่เป็นพิษ			
15. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.01	ICP
16. โครเมียมรวม (Total Chromium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
17. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.003	ICP
18. สารหนู (Arsenic)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.01	ICP
19. ปรอท (Mercury)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.001	ICP
ทางแบคทีเรีย			
20. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Total Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique
21. อีโคไล (<i>Escherichia coli</i>)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique

แหล่งที่มา : ประกาศกรมอนามัย

: การตรวจวิเคราะห์ วิธีการเก็บและรักษาตัวอย่างคุณภาพน้ำประปา ตามข้อ 4 จะต้องเป็นไปตามวิธีการตามหนังสือ

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Edition 23rd APHA AWWA WEF.

**เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศ สธ. ฉบับที่ 61 (พ.ศ.2524) และ
135 (พ.ศ.2534)**

รายการทดสอบ	หน่วย	มาตรฐานที่กำหนด	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพ			
1. สี (Colour)	(ฮาเซนยูนิต, แพลทินัมโคบอลต์)	ไม่เกิน 20	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	(ซีลีกา)	ไม่เกิน 5	Nephelometric
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	ต้องอยู่ระหว่าง 6.5 ถึง 8.5	Electrometric
4. กลิ่น (Odour)	-	ไม่มีกลิ่น แต่ไม่รวมถึงกลิ่นคลอรีน	
ทางเคมี			
5. ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solids)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 500	TS Dried at 103-105°C
6. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 100	EDTA Titrimetric
7. สารหนู (Arsenic)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
8. แบเรียม (Barium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0	ICP
9. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.005*	ICP
10. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Ion Chromatography
11. โครเมียม (Chromium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
12. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 1.0	ICP
13. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.3*	ICP
14. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05*	ICP
15. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
16.ปรอท (Mercury)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.002	ICP
17. ไนเตรท (Nitrate) คำนวณเป็นไนโตรเจน	(มก./ล.)	ไม่เกิน 4.0	Auto-Cadmium Reduction
18. ฟีนอล (Phenol)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.001	Distillation & Colorimetric
19. ซีลีเนียม (Selenium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.01	ICP
20. เงิน (Silver)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.05	ICP
21. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 250	Turbidimetric
22. สังกะสี (Zinc)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 5.0	ICP
23. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.7**	Ion Selective Electrode
24. อลูมิเนียม (Aluminium)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.2*	ICP
25. อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต (ABS)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.2*	Extraction & Colorimetric
26. ไซยาไนด์ (Cyanide)	(มก./ล.)	ไม่เกิน 0.1*	Ion Chromatography
ทางจุลชีววิทยา			
27. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	น้อยกว่า 2.2	Multiple-Tube Fermentation Technique
28. อี.โคไล (E.coli)	-	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique
29. สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
30. ซาลโมเนลลา (Salmonella)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
31. คลอสทริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique

แหล่งที่มา : ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 วันที่ 24 กันยายน 2524

* แก้ไขเพิ่มเติม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 2) ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 108 ตอนที่ 61 วันที่ 2 เมษายน 2534

** แก้ไขเพิ่มเติม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 6) ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 67 ง วันที่ 27 พฤษภาคม 2553

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศ สธ. ฉบับที่ 61 (พ.ศ.2524) และ 135 (พ.ศ.2534) (กรณีเลือกตรวจแบบย่อ)

รายการทดสอบ	หน่วย	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพและเคมี		
1. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	Electrometric
2. ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solids)	(มก./ล.)	TS Dried at 103 - 105°C
3. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness)	(มก./ล.)	EDTA Titrimetric
4. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	Argentometric
5. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	ICP
6. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	ICP
7. ไนเตรท (Nitrate as Nitrogen)	(มก./ล.)	Auto-Cadmium Reduction
8. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	Ion Selective Electrode
ทางจุลชีววิทยา		
9. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	Multiple-Tube Fermentation Technique
10. อี.โคไล (E.coli)	-	Multiple-Tube Fermentation Technique
11. สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)	-	Membrane Filter Technique
12. ซาลโมเนลลา (Salmonella)	-	Membrane Filter Technique
13. คลอสทริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	-	Membrane Filter Technique

แหล่งที่มา : ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 98 ตอนที่ 157 วันที่ 24 กันยายน 2524

* แก้ไขเพิ่มเติม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ.2534) เรื่อง น้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 2) ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 108 ตอนที่ 61 วันที่ 2 เมษายน 2534

** แก้ไขเพิ่มเติม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องน้ำบริโภคในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (ฉบับที่ 6) ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 127 ตอนพิเศษ 67 ง วันที่ 27 พฤษภาคม 2553

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ มาตรฐานเลขที่ มอก.257-2521

รายการทดสอบ	หน่วย	เกณฑ์ที่กำหนดสูงสุด	* เกณฑ์ที่อนุโลมให้สูงสุด	วิธีทดสอบ
ทางกายภาพ				
1. สี (Colour)	(แพลทินัม-โคบอลต์)	5	15	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	(ซีลิกา)	5	20	Nephelometric
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	6.5 ถึง 8.5	ไม่เกิน 9.2	Electrometric
4. กลิ่น (Odour)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ	ไม่เป็นที่รังเกียจ	-
5. รส (Taste)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ	ไม่เป็นที่รังเกียจ	-
ทางเคมี				
6. ปริมาณสารทั้งหมด (Total Solids)	(มก./ล.)	500	1,500	TS Dried at 103-105°C
7. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	0.5	1.0	ICP
8. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	0.3	0.5	ICP
9. (เหล็กและแมงกานีส)	(มก./ล.)	(0.5)	(1.0)	
10. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	1.0	1.5	ICP
11. สังกะสี (Zinc)	(มก./ล.)	5.0	15	ICP
12. แคลเซียม (Calcium)	(มก./ล.)	75**	200	Titrimetric
13. แมกนีเซียม (Magnesium)	(มก./ล.)	50	150	Titrimetric
14. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	200	250	Ion Chromatography
15. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	250	600	Ion Chromatography
16. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	0.7	1.0	Ion Chromatography
17. ไนเตรท (Nitrate)	(มก./ล.)	45	45	Ion Chromatography
18. อัลคิลเบนซิลซัลโฟเนต (ABS)	(มก./ล.)	0.5	1.0	Extraction & Colorimetric
19. ฟีนอลิกซัสแตนซ์ (Phenolic substances, as Phenol)	(มก./ล.)	0.001	0.002	Distillation & Colorimetric
สารเป็นพิษ				
20.ปรอท (Mercury)		0.001	-	ICP
21. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	0.05	-	ICP
22. อาร์เซนิก (Arsenic)	(มก./ล.)	0.05	-	ICP
23. เซเลเนียม (Selenium)	(มก./ล.)	0.01	-	ICP
24. โครเมียม (Chromium - hexavalent)	(มก./ล.)	0.05	-	ICP
25. ไซยาไนด์ (Cyanide)	(มก./ล.)	0.2	-	Ion Chromatography
26. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	0.01	-	ICP
27. แบเรียม (Barium)	(มก./ล.)	1.0	-	ICP
ทางจุลชีววิทยา				
28. สแตนด์การ์ดเพลตเคานต์ (Standard Plate Count)	(โคโลนี/ลบ.ชม.)	500	-	Pour Plate
29. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	น้อยกว่า 2.2	-	Multiple-Tube Fermentation Technique
30. อี.โคไล (E.coli)	-	ไม่มี	-	Multiple-Tube Fermentation Technique

แหล่งที่มา : ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 95 ตอนที่ 68 วันที่ 4 กรกฎาคม 2521

* เกณฑ์ที่อนุโลมให้สูงสุด เป็นเกณฑ์ที่อนุญาตให้สำหรับน้ำประปาหรือน้ำบาดาลที่มีความจำเป็นต้องใช้บริโภคเป็นการชั่วคราว และน้ำที่มีคุณลักษณะอยู่ในระหว่างเกณฑ์ที่กำหนดสูงสุด กับเกณฑ์ที่อนุโลมให้สูงสุดเท่านั้น ไม่ใช่น้ำที่ให้เครื่องหมายมาตรฐานได้

** หากแคลเซียมมีปริมาณสูงกว่าที่กำหนด และแมกนีเซียมมีปริมาณต่ำกว่าที่กำหนดในมาตรฐาน ให้พิจารณาแคลเซียมและแมกนีเซียมในเทอมของความกระด้างทั้งหมด ถ้าความกระด้างทั้งหมดเมื่อคำนวณเป็นแคลเซียมคาร์บอเนตมีปริมาณต่ำกว่า 300 มก./ล. ให้ถือว่าน้ำนั้นเป็นไปตามมาตรฐาน

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำ มาตรฐานเลขที่ มอก.257-2549

รายการทดสอบ	หน่วย	เกณฑ์ที่กำหนดสูงสุด	วิธีการทดสอบ
ทางกายภาพ			
1. สี (Colour)	(แพลทินัม - โคบอลต์)	5	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	(เอ็นทียู)	ไม่เกิน 5	Nephelometric
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	6.5 ถึง 8.5	Electrometric
4. กลิ่น (Odour)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ	-
5. รส (Taste)	-	ไม่เป็นที่รังเกียจ	-
ทางเคมี			
6. ปริมาณสารที่ละลายทั้งหมด (Total Dissolved Solids)	(มก./ล.)	500	TDS Dried at 180°C
7. เหล็ก (Iron)	(มก./ล.)	0.3	ICP
8. แมงกานีส (Manganese)	(มก./ล.)	0.05	ICP
9. ทองแดง (Copper)	(มก./ล.)	1.0	ICP
10. สังกะสี (Zinc)	(มก./ล.)	3	ICP
11. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness)		100	EDTA Titrimetric
12. ซัลเฟต (Sulfate)	(มก./ล.)	200	Ion Chromatography
13. คลอไรด์ (Chloride)	(มก./ล.)	250	Ion Chromatography
14. ฟลูออไรด์ (Fluoride)	(มก./ล.)	0.7	Ion Chromatography
15. ไนเตรท (Nitrate as Nitrogen)	(มก./ล.)	4	Ion Chromatography
16. ลิเนียร์อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต (LAS)	(มก./ล.)	0.2	Extraction & Colorimetric
17. ฟีนอลิกซัสแตนซ์ (Phenolic substances, as Phenol)	(มก./ล.)	0.001	Distillation & Colorimetric
สารเป็นพิษ			
18.ปรอท (Mercury)	(มก./ล.)	0.001	ICP
19. ตะกั่ว (Lead)	(มก./ล.)	0.01	ICP
20. สารหนู (Arsenic)	(มก./ล.)	0.01	ICP
21. ซีลีเนียม (Selenium)	(มก./ล.)	0.01	ICP
22. โครเมียม (Chromium)	(มก./ล.)	0.05	ICP
23. ไซยาไนด์ (Cyanide)	(มก./ล.)	0.07	Ion Chromatography
24. แคดเมียม (Cadmium)	(มก./ล.)	0.003	ICP
25. แบเรียม (Barium)	(มก./ล.)	0.7	ICP
ทางจุลวิทยา			
26. โคลิฟอร์มแบคทีเรีย (Coliform bacteria)	(เอ็มพีเอ็น/100 มล.)	น้อยกว่า 1.1	Multiple-Tube Fermentation Technique
27. อี.โคไล (E.coli)	-	ไม่พบ	Multiple-Tube Fermentation Technique
28. สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
29. ซาลโมเนลลา (Salmonella)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique
30. คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (Clostridium perfringens)	-	ไม่พบ	Membrane Filter Technique

แหล่งที่มา : ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 123 ตอนที่ 64ง วันที่ 6 กรกฎาคม 2549

เกณฑ์การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำบาดาลเพื่อการบริโภค

รายการทดสอบ	หน่วย	ค่ามาตรฐาน		วิธีการทดสอบ
		เกณฑ์กำหนดที่เหมาะสม	เกณฑ์อนุโลมสูงสุด	
ทางกายภาพ				
1. สี (Colour)	แพลทินัม-โคบอลต์	5	15	Spectrophotometric-Single-Wavelength
2. ความขุ่น (Turbidity)	หน่วยความขุ่น	5	20	Nephelometric
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH)	-	7.0 - 8.5	6.5 - 9.2	Electrometric
ทางเคมี				
4. เหล็ก (Fe)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 0.5	1.0	ICP
5. แมงกานีส (Mn)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 0.3	0.5	ICP
6. ทองแดง (cu)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 1.0	1.5	ICP
7. สังกะสี (Zn)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 5.0	15.0	ICP
8. ซัลเฟต (SO ₄)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 200	250	Ion Chromatography
9. คลอไรด์ (Cl)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 250	600	Ion Chromatography
10. ฟลูออไรด์ (F)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 0.7	1.0	Ion Chromatography
11. ไนเตรท (NO ₃)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 45	45	Ion Chromatography
12. ความกระด้างทั้งหมด (Total Hardness as CaCO ₃)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 300	500	EDTA Titrimetric
13. ความกระด้างถาวร (Non carbonate hardness as CaCO ₃)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 200	250	
14. ปริมาณสารทั้งหมดที่ละลายได้ (Total dissolved solids)	มก./ล.	ไม่เกินกว่า 600	1,200	TDS Dried at 180°C
สารพิษ				
15. สารหนู (As)	มก./ล.	ต้องไม่มีเลย	0.05	ICP
16. ไซยาไนด์ (CN)	มก./ล.	ต้องไม่มีเลย	0.1	Ion Chromatography
17. ตะกั่ว (Pb)	มก./ล.	ต้องไม่มีเลย	0.05	ICP
18. ปรอท (Hg)	มก./ล.	ต้องไม่มีเลย	0.001	ICP
19. แคดเมียม (Cd)	มก./ล.	ต้องไม่มีเลย	0.01	ICP
20. ซีลีเนียม (Se)	มก./ล.	ต้องไม่มีเลย	0.01	ICP
ทางแบคทีรี				
21. บักเตรียที่ตรวจพบโดยวิธี Standard Plate count	โคโลนี/ลบ.ชม.	ไม่เกินกว่า 500	-	Pour Plate Method
22. บักเตรียที่ตรวจพบโดยวิธี Most Probable Number (MPN)	เอ็ม.พี.เอ็น/100 ลบ.ชม.	น้อยกว่า 2.2	-	
23. อี.โคไล (E.coli)	-	ต้องไม่มีเลย	-	Multiple-Tube Fermentation technique

แหล่งที่มา : ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์และมาตรการในทางวิชาการสำหรับการป้องกันด้านสาธารณสุขและการป้องกันในเรื่องสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ พ.ศ.2551 ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125 ตอนพิเศษ 85 ง ลงวันที่ 21 พฤษภาคม 2552