

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัดปริมาณสารกำจัดวัชพืช ametryn  
Method Validation of ametryn in Pesticide Formulations

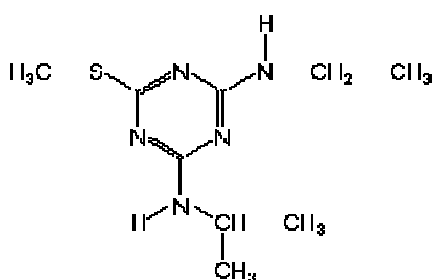
นางจิตติมา ยถาภูพานนท์ นางจิราพรรณ ทองหยอด นายวิสุทย์ สุขเพิ่ม

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดวัชพืชสูตร 80 %WP ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) โดยมีตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) ด้วยคอลัมน์ HP-5 (30 m × 0.32 mm(id.), 0.25 μm film) ใช้ He เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 210°C เวลา 6 นาที อุณหภูมิการฉีด 250°C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 250°C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 μl วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 2.5 mg/ml ให้ค่าช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.25 - 1.5 mg/ml ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9997 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า  $r \geq 0.995$  การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) พิจารณาจาก % Recovery ที่ความเข้มข้น 0.5 1 และ 1.5 mg/ml ได้ค่าเฉลี่ยของ % Recovery เท่ากับ 99.537, 98.728 และ 98.128 เกณฑ์ยอมรับ AOAC 98 - 102 ตรวจสอบ Precision 3 ระดับของความเข้มข้น ประเมินค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) และ การทำซ้ำ (Reproducibility) ได้ 0.41 และ 0.31 ตรวจสอบค่า Robustness/ Ruggedness ประเมินตามความเที่ยง ให้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.12 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ ที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

## คำนำ

Ametryn มีชื่อทางเคมีว่า *N*<sup>2</sup>-ethyl-*N*<sup>4</sup>-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine (IUPAC) จัดอยู่ในกลุ่ม Triazine มีสูตรโมเลกุลเป็น C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>S มีน้ำหนักโมเลกุล 227.33 จุดหลอมเหลว 84 – 85 องศาเซลเซียสและมีสูตรโครงสร้างดังนี้



ค่าครึ่งชีวิต (Half-life) เมื่ออยู่ในดิน 70 – 120 วัน ประโยชน์ใช้ก่อนวัชพืชงอก (pre-emergence) และใช้หลังวัชพืชงอกแล้วในระยะเริ่มต้น (early post – emergence) ในไร่อ้อย ส้ม สับปะรด กล้วย ชา กาแฟ มันฝรั่ง ใช้ได้ทั้งวัชพืชใบกว้างและใบแคบเช่น หญ้าตีนกา หญ้าขน หญ้าตีนนก หญ้ากุศลา หญ้าชันอากาศ หญ้าหางหมา ผักโขม ผักโขมหนาม เป็นต้น มีชนิดของสูตรผสมต่างๆ เช่น Wettable Powder (WP), Suspension Concentrate (SC), Water dispersible granules (WG) มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พิษเฉียบพลันทางปาก Acute oral LD<sub>50</sub> for rats 1110 mg/Kg ความเป็นพิษต่อนก LD<sub>50</sub> for bob white quail 30,000mg/kg, mallard ducks 23,000 mg/Kg ความเป็นพิษต่อปลา LD<sub>50</sub> (96 hours) rain bow trout 8.8 mg/L ความเป็นพิษต่อผึ้ง ค่อนข้างต่ำ

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol.H ซึ่งใช้ Pack column ในการแยกสาร ที่มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่า Capillary column ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn สูตร 80 % WP (Wettable Powder) โดยใช้เทคนิค GLC-FID ที่ใช้ Capillary column ที่ทันสมัยในการแยกสาร สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID
2. capillary column HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane) ขนาด 30 m x 0.32 mm (id), 0.25 µm film

thickness หรือเทียบเท่า

3. capillary column DB-17 30 m x 0.25 mm (id) 0.25  $\mu$ m film thickness หรือเทียบเท่า
4. เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 4 หรือ 5 ตำแหน่ง ( $\pm 0.1$  mg) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
5. Volumetric flask ขนาด 10, 25, 100 ml ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. Ultrasonic bath

### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน (Standard Ametryn )
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Ametryn จำนวน 2 ตัวอย่าง
3. Acetone ชนิด AR grade

### วิธีการ

1. การปรับตั้งสถานะเครื่อง GLC-FID

Capillary Column : HP-5 (30 m x 0.32 mm (i.d.), 0.25  $\mu$ m)

Oven Temperature : 210°C

Injector : 250°C

Detector : 250°C

Split injection : split ratio 50 : 1

Flow rate ; 2 ml/min

2. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์ Ametryn 80 %WP เนื่องจากสารมาตรฐาน Ametryn มีปริมาณน้อยและราคาแพง ไม่เพียงพอที่จะนำมาทำ Method Validation ซึ่งโดยปกติจะใช้สาร Technical grade แทน สารมาตรฐาน Ametryn เป็นตัวเปรียบเทียบ และหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade แต่เนื่องจากไม่สามารถหาสาร Technical grade ของ Ametryn ได้จึงจำเป็นต้องใช้ผลิตภัณฑ์ 80% WP แทน โดยทำการวิเคราะห์ ดังนี้

2.1 ชั่งสารมาตรฐาน Ametryn 2 ชั่ว (C1, C2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 ml เติม Acetone 50 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุกแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 100 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี

2.2 ชั่งผลิตภัณฑ์ 80% WP 10 ชั่ว (T1-T10) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 100 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 ml เติมสารละลาย Acetone 50 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุกแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 100 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี

2.3 ฉีดสารละลายมาตรฐาน (C1, C2) เข้าเครื่อง GLC สลับกันหลายๆครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าแตกต่างกันไม่เกิน 2 %

2.4 ฉีดสารละลายของสารมาตรฐาน Ametryn และของผลิตภัณฑ์ 80% WP เข้าเครื่อง GLC ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำโดยตั้งลำดับการฉีด ดังนี้ C1, T1-1, T1-2, T2-1, T2-1, C2, .....

### 2.5 การคำนวณ

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

$$f = \frac{S \times P}{H_S}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Ametryn หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

H<sub>S</sub> = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน Ametryn

จากนั้นคำนวณค่า % RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า % RPD แตกต่างกันไม่เกิน 3 % จากสูตร

$$\% \text{ RPD} = \frac{(f \text{ of maximum} - f \text{ of minimum}) \times 100}{f \text{ of average}}$$

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn (\% w/w)} = \frac{f_{avr.} \times H_W}{W}$$

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้นสูง Ametryn หน่วยเป็นมิลลิกรัม

f<sub>avr.</sub> = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H<sub>W</sub> = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้นสูง Ametryn

## 3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range / Linearity) ของวิธีการ

### 3.1 หาค่า Range

3.1.1 ซ้ำผลิตภัณฑ์ 80% WP ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Ametryn ครอบคลุมช่วงการใช้งาน รวม 6 ความเข้มข้น หนัก 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ปริมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Ametryn (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.1.4 พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง

### 3.2 หาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งผลิตภัณฑ์ 80% WP ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Ametryn 6 ความเข้มข้น หน้า 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Ametryn (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.2.5 พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient ( r ) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

#### 4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการ

##### 4.1 เตรียมสารละลาย Stock ผลิตภัณฑ์ 80% WP (5 mg AI / ml)

ชั่งผลิตภัณฑ์ 80% WP ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว หน้า 1,540 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ใส่ปิกรขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวด ปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่ อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

##### 4.2 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock ผลิตภัณฑ์ 80% WP (ข้อ 6.1) 2, 5 และ 8 มิลลิลิตรใส่ขวดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของผลิตภัณฑ์ 80% WP ที่มี ความเข้มข้นของ Ametryn เป็น 0.4, 1.0 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดย เรียงตามลำดับความเข้มข้น

##### 4.3 เตรียมสารละลาย Stock Sample (1 mg AI / ml)

ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร WP ที่คลุกเคล้าแล้ว หน้า 1,250 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ตามลำดับใส่ ปิกรขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับ ปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

##### 4.4 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Origin Sample

ปิเปตสารละลาย Stock Sample WP (ข้อ 4.3) มา 10 มิลลิลิตร 10 ซ้ำใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร รวม 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Ametryn เทียบกับกราฟ (ข้อ 4.2)

#### 4.5 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock ผลิตภัณฑ์ 80% WP (ข้อ 6.1) 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร เติมลงในขวด ปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Stock Sample WP (ข้อ 6.3) อยู่ 10 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ รวม 30 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Ametryn เทียบกับ กราฟ (ข้อ 6.2)

#### 4.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4-6.5) มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = (A_{\text{spike}} - A_{\text{origin}}) \times 100 / A_{\text{add}}$$

$$A_{\text{spike}} = \text{ปริมาณ ametryn ในสารละลาย Spike}$$

$$A_{\text{origin}} = \text{ปริมาณ ametryn ในสารละลาย Origin}$$

$$A_{\text{add}} = \text{ปริมาณ ametryn ที่เติมลงในสารละลาย Spike}$$

### 5. ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

#### 5.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (Repeatability)

5.1.1 ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร WP อีกตัวอย่างหนึ่ง ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ ( $WP_S, WP_M, WP_L$ ) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่ อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ ที่เตรียม (ข้อ 5.1.1) เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และ ประเมินค่า HORRAT โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

#### 5.1.3 การคำนวณ

$$\text{HORRAT} = \% \text{RSD}_{\text{exp.}} / \% \text{RSD}_{\text{Horwitz}}$$

$$\% \text{RSD}_{\text{Horwitz}} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{intra-lab.}$$

C = Concentration ratio

## 5.2 ตรวจสอบความซ้ำ (Intermediat reproducibility)

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร WP ขึ้นใหม่ตามข้อ 4.1.1 (ต่างวันกัน) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และประเมินค่า HORRAT ของปริมาณ Ametryn ดังนี้

$$\text{HORRAT} = \%RSD_{\text{exp.}} / \%RSD_{\text{Horwitz}}$$

$$\%RSD_{\text{Horwitz}} = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad : \text{inter-lab}$$

## 6. ตรวจสอบต่างคอลัมน์เพื่อหาค่าความคงทน (Robustness / Ruggedness) ของวิธีการ

### 6.1 ปรับตั้งสภาวะใช้งานเครื่อง GLC ดังนี้

Conditions : DB-17 (30 m × 0.20 mm (i.d.), 0.25 μm)

Split injection : split ratio 50 : 1

Flow rate : 2 ml/min

Oven Temperature : 250°C

Injector : 270°C

Detector : 270°C

### 6.2 เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์ 80% WP ตามข้อ 5.1.1 ฉีดเข้าเครื่องเพื่อสร้างกราฟ

6.3 นำสารละลายผลิตภัณฑ์ข้อ 6.2 มาวิเคราะห์หาปริมาณ Ametryn เทียบกับกราฟตาม ข้อ 3.2.4 และประเมินค่า HORRAT ตามข้อ 5.1.3

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2553 ถึงเดือน กันยายน 2554

### สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

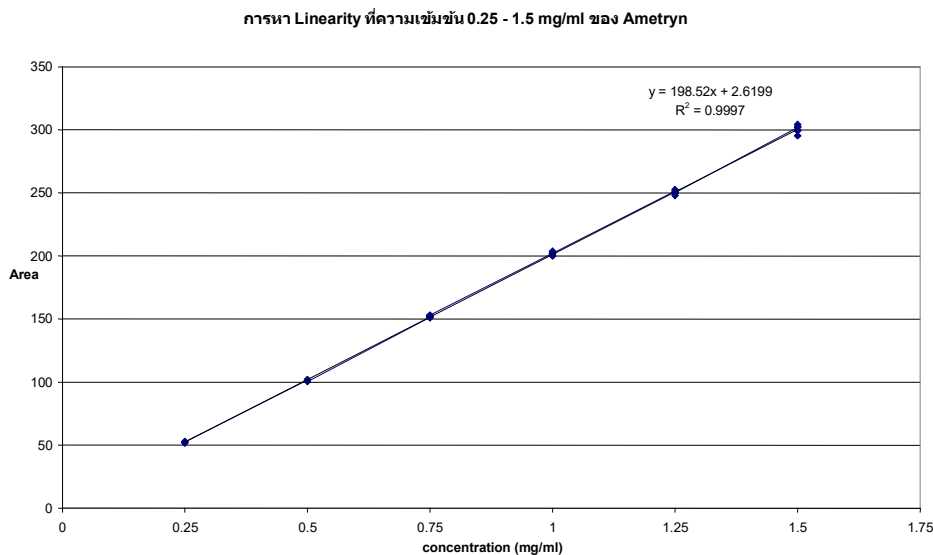
## ผลการทดลอง และวิจารณ์

วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ตามที่ระบุใน CIPAC Handbook-H (Dobrat and Martijn, 1998) เป็นการใช้ Pack column ในการแยกสาร และระบุใช้สารมาตรฐาน 250

มิลลิกรัมในการเตรียมสารละลายมาตรฐานแต่ละครั้ง การศึกษาทดลองนี้ได้พัฒนาโดยใช้ Capillary column ซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสารสูงกว่าแทน และปรับเปลี่ยนปริมาณการใช้สารมาตรฐาน เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยได้ผลการทดสอบดังนี้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช เมื่อตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้ผลการคำนวณค่า response factor ( f ) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ย ไม่เกินร้อยละ 2 และตรวจหาปริมาณที่แน่นอนของผลิตภัณฑ์ 80% WP เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 81.3

เมื่อพิจารณาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.25 - 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงตรวจสอบค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient ( r ) 0.9997 แสดงตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร WP มีค่าเป็นร้อยละ 98.8 แสดงตามตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง ametryn

Number	Active ingredient content (mg/25 ml)								
	Concn.(0.5 mg/ml)			Concn.(1.0 mg/ml)			Concn.(1.5 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	12.46	24.76	12.31	12.36	30.98	18.47	12.54	36.78	24.63
2	12.40	24.57	12.31	12.43	30.91	18.47	12.64	36.54	24.63
3	12.51	24.75	12.31	12.88	30.98	18.47	12.38	36.73	24.63
4	12.62	24.60	12.31	12.61	30.78	18.47	12.37	36.76	24.63
5	12.50	24.68	12.31	12.76	30.58	18.47	12.42	36.48	24.63
6	12.27	24.77	12.31	12.84	30.84	18.47	12.88	36.98	24.63
7	12.54	24.80	12.31	12.54	30.77	18.47	12.63	36.72	24.63
8	12.63	24.98	12.31	12.56	30.94	18.47	12.68	36.90	24.63
9	12.46	24.80	12.31	12.53	30.76	18.47	12.52	36.62	24.63
10	12.50	24.71	12.31	12.52	30.84	18.47	12.42	36.66	24.63
<b>% Recovery</b>	<b>99.537</b>			<b>98.728</b>			<b>98.128</b>		

ในด้านความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร WP พบว่า การทวนซ้ำ (Repeatability) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.45 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.55 และประเมินค่า HORRAT ได้เป็น 0.41 ตามลำดับ ส่วนการทำซ้ำ (Intermediate reproducibility) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.53 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.65 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.31 ตามลำดับ แสดงตามตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2 การหา Repeatability ที่ 3 ความเข้มข้น

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)
1	61.20	81.0	123.10	80.2	185.00	81.4
2	62.10	80.6	123.20	81.5	185.50	81.3
3	62.10	81.0	123.30	81.8	185.90	80.8
4	62.30	81.0	124.30	81.7	185.90	81.4
5	62.30	81.1	124.50	81.3	186.20	81.5
6	62.50	81.0	124.70	81.8	186.40	81.4
7	62.50	81.8	125.40	81.3	186.40	81.7
8	62.80	81.6	125.60	81.6	186.60	81.2
9	62.80	80.4	126.00	81.3	187.10	80.9

10	62.80	80.2	126.20	81.5	187.50	80.9
Mean	-	80.97	-	81.40	-	81.25
SD		0.490		0.464		0.295
% RSDexp.		0.605		0.570		0.363
Horwitz		1.365		1.365		1.365
HORRAT		0.443		0.418		0.266

ตารางที่ 3 ตรวจสอบ Intermediate reproducibility ของสูตร WP

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)
1	60.2	81.5	122.0	81.5	184.8	82.4
2	61.2	80.3	122.7	81.6	185.0	82.6
3	61.7	81.2	123.3	81.9	185.2	82.0
4	61.8	80.5	123.7	81.6	185.5	82.0
5	62.0	81.8	124.2	82.0	185.6	82.5
6	62.6	81.1	125.0	81.3	185.6	81.8
7	62.6	81.1	125.1	81.4	186.3	81.9
8	63.1	81.3	125.7	81.4	187.0	82.5
9	63.5	81.8	125.8	81.3	187.5	82.1
10	63.6	81.3	126.2	81.8	188.2	82.1
Mean	-	81.2	-	81.6	-	82.2
SD		0.489		0.248		0.285
% RSDexp.		0.602		0.304		0.347
Horwitz		1.365		1.365		1.365
HORRAT		0.441		0.223		0.254

การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบ มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 1.89 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 2.31 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.12 แสดงตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตรวจสอบ robustness/ruggedness ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดวัชพืช ametryn

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (w/w)
1	61.20	81.0	123.10	80.2	185.00	81.4
2	62.10	80.6	123.20	81.5	185.50	81.3
3	62.10	81.0	123.30	81.8	185.90	80.8
4	62.30	81.0	124.30	81.7	185.90	81.4
5	62.30	81.1	124.50	81.3	186.20	81.5
6	62.50	81.0	124.70	81.8	186.40	81.4
7	62.50	81.8	125.40	81.3	186.40	81.7
8	62.80	81.6	125.60	81.6	186.60	81.2
9	62.80	81.4	126.00	81.3	187.10	80.9
10	62.80	80.2	126.20	81.5	187.50	80.9

Mean	-	81.07		81.40		81.25
SD		0.4620		0.4643		0.2953
% RSDexp.		0.570		0.570		0.3634
Horwitz		1.365		1.365		1.365
HORRAT		0.418		0.418		0.266

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. วิธีการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดโรคพืช โดยใช้เทคนิควิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ที่มีตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย HP-5 capillary column ซึ่งมีสถานะการใช้งาน ดังนี้

Split injection	:	split ratio 50 : 1
Flow rate	:	2 ml/min
Temperature, Oven	:	210°C
Injector	:	250°C
Detector	:	250°C
Inject volume	:	1 µl

2. การเตรียมสารละลายเพื่อการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Ametryn ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ Ametryn 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่างให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

3. วิธีการนี้มีค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0.25-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25-1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9997

4. ความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร WP มีค่าร้อยละ 98.8 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC

5. ความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Ametryn ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร WP เมื่อทดสอบค่า การทวนซ้ำ (Repeatability) และการทำซ้ำ (Intermediate reproducibility) นำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.41 และ 0.31 ตามลำดับ ซึ่งยอมรับได้ เนื่องจากไม่เกิน 2 ตาม เกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

6. การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า ยอมรับได้ เนื่องจากเมื่อนำค่าความ คลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.12 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

### การนำไปใช้ประโยชน์

ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สาร Ametryn ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร และ สามารถใช้ในการขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025 : 2005

### เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ดุษฎี มั่นความดี และอุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation). เอกสารประกอบการฝึกอบรมกรมวิทยาศาสตร์บริการ.

สถาบันอาหาร. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรมสัมมนา วิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร.

Dobrat, W. and A. Martijn. 1998. **CIPAC Handbook-Vol. H. :Analysis of Technical and Formulated Pesticides**. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Black Bear Press Ltd., England.

Kidd, H. and D.R. James (Eds). 1993. **The Agrochemicals Handbook**. 3rd. ed. Royal Society of Chemistry, England.