

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตรกลุ่มสารกำจัดแมลง
Chlorpyrifos Method Validation of Chlorpyrifos in Insecticide Formulation

นางสาวทัศนีย์ จงกลาง¹ นายอนุชา ผลไสว¹

บทคัดย่อ

จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Chlorpyrifos โดยวิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ได้
สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

Column : Capillary, HP-5(5% Phenyl methyl siloxane)

30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 μ m, film thickness

Split injection : Split ratio : 50:1

Injection volume : 1 μ l.

Detector : Flame ionization

Temperature

Column oven : 220°C Injection port : 250°C Detector : 250°C

ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์นี้ ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้

- Range หรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วง
0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- Linearity หรือความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิเคราะห์ทดสอบสามารถทำ
ได้ อยู่ในช่วง 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Chlorpyrifos มี Correlation coefficient (r)
= 1.0000
- Precision Repeatability ได้ค่า HORRAT = 1.74
Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.87
Robustness ได้ค่า HORRAT = 1.36
Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 1.27

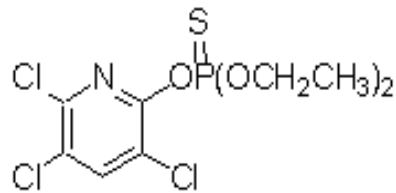
ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

- Accuracy (ตรวจสอบความถูกต้อง) ของวิธีการ ได้ % Recovery = 99.2 %

ซึ่งอยู่ในช่วง 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC

¹ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

คำนำ



Chlorpyrifos มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC ว่า O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothiate มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{11}Cl_3NO_3PS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 350.62 จุดหลอมเหลว 42-43.5 องศาเซลเซียส เป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นกำมะถัน มีค่าครึ่งชีวิต (Half-life) 60-120 วัน เป็นสารกำจัดศัตรูพืช ประเภทไม่ดูดซึม ใช้ควบคุมแมลงในดิน และแมลงศัตรูพืชในใบพืช ผัก ผลไม้หลายชนิด ตลอดจนงูพิษเช่น กำจัดหอนใยผัก, เพลี้ยกระโดด, ไรสนิมส้ม, ตัวงวงข้าว เป็นต้น ชนิดของสูตรผสมเช่น TC (Technical grade), EC (Emulsifiable concentrate) มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (LD_{50} rat, oral, acute) 135-163 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นพิษต่อปลา LD_{50} (96hours)_{rainbow trout} 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นพิษต่อผึ้งค่อนข้างต่ำ (Agrochemicals Handbook, 1993)

การควบคุมคุณภาพของสารกำจัดศัตรูพืช ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 นั้น จะต้องตรวจวิเคราะห์ชนิดและสารออกฤทธิ์ ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุไว้บนฉลากหรือข้อมูลที่แสดงไว้ก่อนการขึ้นทะเบียนหรือไม่ และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช วิธีการตรวจวิเคราะห์ Chlorpyrifos นั้น มีวิธีมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council) แต่วิธีมาตรฐานนั้นบางครั้งไม่สามารถทำตามได้ทั้งหมด และเพื่อเป็นการประหยัดงบประมาณ จึงจำเป็นต้องประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีใช้อยู่จริงในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีตามข้อกำหนด ISO 17025 เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบที่นำมาใช้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Liquid Chromatography (GLC)
2. คอลัมน์ ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) หนา 0.25

ไมโครเมตร

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร หรือเทียบเท่า

3. เครื่องชั่งละเอียด 4 หรือ 5 ตำแหน่ง (± 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร ขนาด 10,25,50,100,250,1000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. ปิเปต ขนาด 2,3,4,5,8,10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Chlorpyrifos 99.5 %
2. สาร Chlorpyrifos ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical grade)
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Chlorpyrifos 40 %
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Chlorpyrifos

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นด้วย HP-5

Capillary column ดังนี้

Column : Capillary, HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane) 30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 μm , film thickness

Injector system : Split injection, Split ratio : 50:1, Split flow.: 100 mL/min, Injection volume : 1 μL ., Detector : Flame ionization

Temperature : Colum oven : 220°C, Injection port : 250°C, Detector : 250°C

Gas flow rate Helium (carrier) : 2.0 mL/min, Hydrogen : about 30 mL/min, Air : about 300 mL/min, Nitrogen : about 30 mL/min

2. การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Chlorpyrifos

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Chlorpyrifos 2 ซ้ำ (C_1 , C_2) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

ชั่งสาร Technical grade 10 ซ้ำ (T_1 - T_{10}) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 50 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic

bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสถานะการใช้งาน และรอนจนกระทั่ง baseline เรียบ จึงทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องซ้ำหลายๆครั้ง จนได้ค่าพื้นที่ใต้ peak หรือความสูง peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % เครื่อง GLC จึงพร้อมใช้งาน แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายของสารความเข้มข้นสูง เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอน ตามลำดับ ดังนี้

C₁,C₁,T₁,T₁,C₂,C₂,T₂,T₂,C₁,C₁,T₃,T₃.....

สารละลายมาตรฐาน ทั้ง 2 ต้องมีค่า % Relative Percent Different (RPD) ไม่เกิน 3 %

$$\% = \frac{(\text{factor max} - \text{factor min})}{\text{factor mean}} \times 100$$

2.4 การคำนวณ Response factor

$$\text{response factor} = \frac{\text{น้ำหนัก} \times \text{Purity}}{\text{Peak area}} \quad \text{หรือ} \quad f = \frac{S \times P}{H_s}$$

S = น้ำหนักของ Chlorpyrifos ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม)

P = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Chlorpyrifos (%)

H_s = พื้นที่ใต้พีคของ Chlorpyrifos ในสารละลายมาตรฐาน

2.5 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ Chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Chlorpyrifos content} = \frac{HW \times f}{W}$$

HW = พื้นที่ใต้พีคของ Chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade

F = ค่าเฉลี่ย response factor

W = น้ำหนักของ Chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade

2.6 นำค่า % ของ Technical grade ที่ได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ % ที่แน่นอนของ Technical grade

3.ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linear) ของวิธีการ

3.1 หาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ Chlorpyrifos ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 25,50,100,150,200 และ 250 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 50 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มี 6 ความเข้มข้น ตามที่เลือกดังนี้ 25,50,75,100,125 และ 150 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

3.2.5 คำนวณหาค่า Correlation coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$

4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการ

4.1 Repeatability (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Repeatability ซึ่งป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน)

4.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการใช้งาน (ภายใน range ที่ทำได้ จากข้อ 3.1) จำนวน 3 ความเข้มข้นๆละ 10 ซ้ำ ได้แก่ 50,100 และ 150 มิลลิกรัม. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 ชั่งสาร Chlorpyrifos ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการใช้งาน (ภายใน range ที่ทำได้ จากข้อ 3.1) จำนวน 3 ความเข้มข้นๆละ 10 ซ้ำ ได้แก่ 50,100 และ 150 มิลลิกรัม. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีด ข้อ 4.1.1,4.1.2 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Chlorpyrifos ในสารละลาย

4.2 Reproducibility (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Reproducibility ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการในระยะเวลาที่แตกต่างกัน) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.1

5. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการ

5.1 Robustness (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Robustness ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการแต่เปลี่ยน Oven temperature จาก 220 – 230°C) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.1

5.2 Ruggedness (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Ruggedness ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการแต่เปลี่ยนเครื่อง) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4.1

6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ (5 mg Al /ml)

ซึ่งสาร Technical grade ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1,275.5 มิลลิกรัม. ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณ 150 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย Stock Sample ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ (1 mg Al /ml)

เตรียมสารละลายเหมือนข้อ 6.1 โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Chlorpyrifos ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2,500 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร

6.3 เตรียมสารละลายเพื่อ Plot กราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) ปริมาตร 2, 5 และ 8 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของ Technical grade ที่มีความเข้มข้นของ Chlorpyrifos เป็น 0.4, 1.0 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงลำดับตามความเข้มข้น

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Chlorpyrifos เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.3)

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

6.5.1 ปิเปตสารละลาย Stock Sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) ปริมาตร 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ที่มี Stock Sample (ข้อ 6.5.1) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากันนำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Chlorpyrifos เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.3)

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Chlorpyrifos ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4-6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC จากสูตร $\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc}_{\text{spiked sample}} - \text{Conc}_{\text{original sample}})}{\text{Conc}_{\text{added}}} \times 100$

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2554 และสิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ตารางที่ 1 การประเมินค่า % Relative Percent Different (RPD) ของสารมาตรฐาน

std.	mg.	Area	%RPD
C1	25.1	124.66092	1.38
C2	25.3	126.39229	
C1	25.1	126.11436	1.33
C2	25.3	127.80464	
C1	25.1	126.20525	1.38
C2	25.3	127.95921	
C1	25.1	126.22549	1.03
C2	25.3	124.92964	
C1	25.1	125.84093	1.07
C2	25.3	124.49397	
C1	25.1	125.98462	1.11
C2	25.3	124.59667	

จากตารางที่ 1 เมื่อหาค่า % Relative Percent Different (RPD) แล้ว พบว่าสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 มีค่าไม่เกิน 3 %

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Technical grade

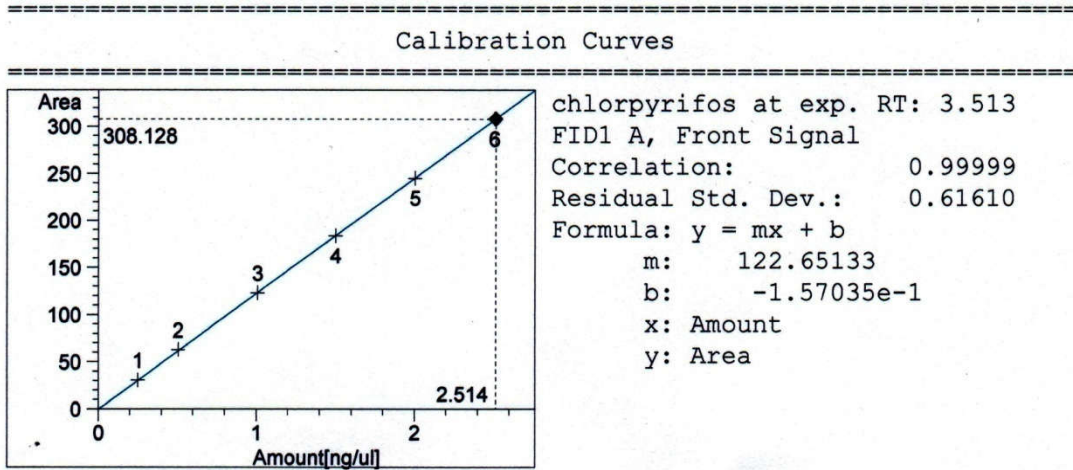
สารละลาย Technical grade	เปอร์เซ็นต์ของสาร Technical grade
--------------------------	-----------------------------------

T 1	97.71
T 2	97.89
T 3	97.80
T 4	98.13
T 5	98.34
T 6	98.34
T 7	98.14
T 8	98.06
T 9	97.88
T 10	98.04
เฉลี่ย	98.03
SD	0.214

จากตารางที่ 2 เมื่อหาค่าเฉลี่ยของ % สาร Technical grade ที่ตรวจได้ทั้ง 10 ค่า จะได้ % ที่แน่นอนของสาร Technical grade เท่ากับ 98.0 %

ตารางที่ 3 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Chlorpyrifos	
mg/ml	Area
0.25	30.62696
0.50	62.55021
1.00	122.87712
1.50	183.61192
2.00	245.31111
2.50	308.12750

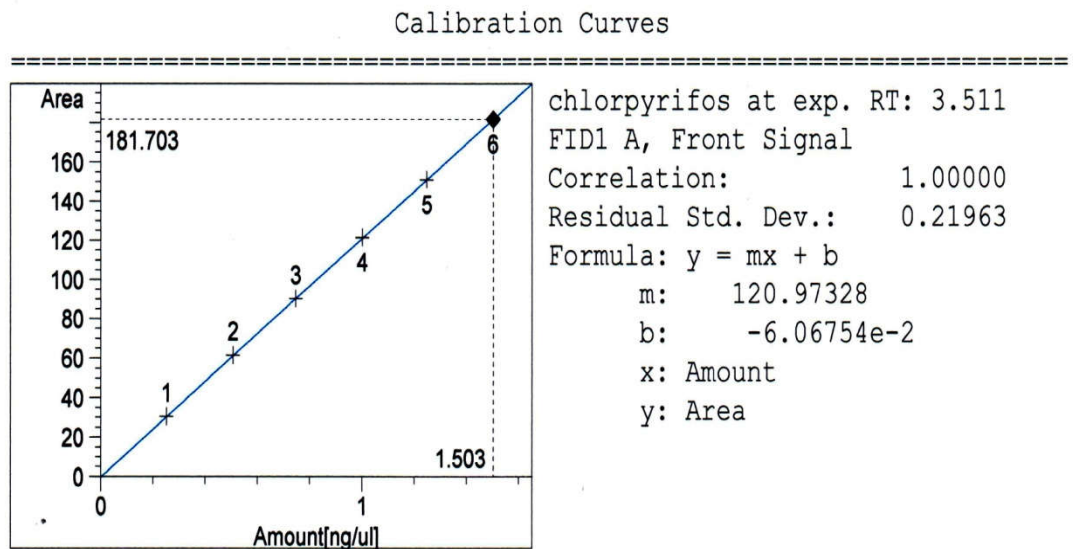


Instrument 1 3/31/2011 6:20:55 PM tassanee

จากการทดลองหาปริมาณ Chlorpyrifos ได้ Range มีค่า 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การหา Linearity ที่ความเข้มข้น 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Chlorpyrifos	
mg/ml	Area
0.25	30.43195
0.50	61.37973
0.75	90.10273
1.00	121.48102
1.25	150.88585
1.50	181.70294



Instrument 1 3/31/2011 4:47:34 PM tassanee

จากการทดลองหา Linearity ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 1.00000

ตารางที่ 5 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	30.7	38.50	61.6	37.93	91.9	38.32
2	31.5	37.99	61.7	40.10	92.1	38.10
3	32.0	38.62	61.8	37.65	92.3	37.91
4	32.1	37.98	62.0	37.66	92.6	37.66
5	32.4	37.64	62.5	37.97	93.0	37.86
6	32.7	38.03	62.8	38.28	93.2	37.99
7	32.8	37.47	63.7	38.31	94.5	37.57
8	33.4	37.43	64.7	40.84	95.2	37.95
9	33.4	39.96	64.8	40.49	95.7	37.54
10	33.8	38.37	65.8	40.83	96.8	37.42
mean		38.20		39.01		37.83
SD		0.742		1.374		0.281

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 38.35 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 1.015$$

$$\text{คำนวณ \% RSD ตามสูตร } \% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100$$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{1.015}{38.35} \times 100 = 2.646$$

$$\text{การประเมิน Precision โดยใช้ (HORRAT) HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

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

$$\text{เมื่อค่า } C = \text{Concentration ration ได้ค่า} = 0.383$$

$$\text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \text{ ได้ค่า} = 1.525$$

$$\text{HORRAT} = \frac{2.646}{1.525} \text{ ได้ค่า} = 1.74$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 1.74

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Chlorpyrifos ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Reproducibility)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	31.4	38.42	60.5	38.48	93.0	38.57
2	31.9	38.15	61.4	37.52	93.0	38.48
3	32.0	38.03	62.0	37.56	93.3	39.0
4	32.1	38.0	62.6	38.43	94.1	38.96
5	32.3	38.17	62.7	38.11	94.2	39.23
6	32.4	37.5	63.2	37.82	94.6	38.72
7	32.5	37.94	63.3	38.18	94.8	38.7
8	33.3	37.84	63.8	37.76	95.4	38.37
9	34.1	38.04	64.3	38.17	96.0	38.79
10	34.4	37.95	65.1	37.54	97.0	39.46
mean		38.00		37.96		38.83
SD		0.238		0.365		0.339

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 38.26 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.510$$

$$\text{คำนวณ \% RSD ตามสูตร \% RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.510}{38.26} \times 100 = 1.333$$

$$\text{การประเมิน Precision โดยใช้ (HORRAT)} \quad \text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

$$\text{คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร} \quad \text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$$

$$\text{เมื่อค่า } C = \text{Concentration ration ได้ค่า} = 0.383$$

$$\text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \quad \text{ได้ค่า} = 1.525$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.333}{1.525} \quad \text{ได้ค่า} = 0.87$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.87

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Chlorpyrifos ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 7 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทนซ้ำ (Robustness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	30.7	36.93	61.6	37.15	91.9	37.63
2	31.5	36.66	61.7	37.45	92.1	37.55
3	32.0	37.72	61.8	37.17	92.3	37.53
4	32.1	36.9	62.0	37.36	92.6	37.32
5	32.4	36.66	62.5	37.63	93.0	37.57
6	32.7	37.11	62.8	37.32	93.2	37.38
7	32.8	36.51	63.7	37.67	94.5	39.45
8	33.4	36.5	64.7	37.62	95.2	37.2

9	33.4	37.31	64.8	37.22	95.7	37.18
10	33.8	37.24	65.8	39.55	96.8	39.62
mean		36.95		37.61		37.84
SD		0.395		0.707		0.906

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 37.47 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.778$$

$$\text{คำนวณ \% RSD ตามสูตร \% RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.778}{37.47} \times 100 = 2.077$$

$$\text{การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT} \quad \text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

$$\text{คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร} \quad \text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)}$$

$$\text{เมื่อค่า } C = \text{Concentration ration ได้ค่า} = 0.375$$

$$\text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \quad \text{ได้ค่า} = 1.530$$

$$\text{HORRAT} = \frac{2.077}{1.530} \quad \text{ได้ค่า} = 1.36$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 0.87

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Chlorpyrifos ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 8 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Ruggedness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg/ml	% ที่ตรวจพบ
1	30.7	36.98	61.6	37.58	91.9	37.97
2	31.5	36.55	61.7	37.76	92.1	40.23
3	32.0	37.76	61.8	37.37	92.3	37.65
4	32.1	36.6	62.0	37.76	92.6	37.87

5	32.4	36.65	62.5	37.9	93.0	38.09
6	32.7	37.34	62.8	37.53	93.2	38.24
7	32.8	36.54	63.7	37.69	94.5	37.74
8	33.4	36.38	64.7	38.04	95.2	38.0
9	33.4	36.8	64.8	37.56	95.7	37.8
10	33.8	37.08	65.8	37.82	96.8	37.59
mean		36.87		37.70		38.12
SD		0.426		0.197		0.769

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 37.56 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.728$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD \times 100}{\bar{X}}$$

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.728 \times 100}{37.56} = 1.938$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

เมื่อค่า C = Concentration ration ได้ค่า = 0.376

$$\text{RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \quad \text{ได้ค่า} = 1.530$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.938}{1.530} \quad \text{ได้ค่า} = 1.27$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 1.27

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ < 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Chlorpyrifos ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 9 ตรวจสอบ % Recovery ของ Chlorpyrifos

N	AI content (mg / 25 ml)		
	Conc.added(10.2128 mg/ml)	Conc.added(15.3192 mg/ml)	Conc.added(20.4256 mg/ml)

	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.73	19.97	10.21	9.70	24.86	15.32	9.68	29.97	20.42
2	9.81	19.90	10.21	9.73	24.73	15.32	9.72	29.95	20.42
3	9.74	19.80	10.21	9.65	24.83	15.32	9.69	29.91	20.42
4	9.77	19.86	10.21	9.79	24.85	15.32	9.75	29.95	20.42
5	9.72	19.87	10.21	9.75	24.83	15.32	9.73	29.95	20.42
6	9.74	19.96	10.21	9.76	24.88	15.32	9.70	29.97	20.42

ตารางที่ 9 ตรวจสอบ % Recovery ของ Chlorpyrifos

N	Al content (mg / 25 ml)								
	Conc.added(10.2128 mg/ml)			Conc.added(15.3192 mg/ml)			Conc.added(20.4256 mg/ml)		
	7	9.76	19.92	10.21	9.73	24.95	15.32	9.71	29.91
8	9.79	19.95	10.21	9.77	24.92	15.32	9.70	29.92	20.42
9	9.71	19.98	10.21	9.72	24.96	15.32	9.72	29.97	20.42
10	9.71	19.96	10.21	9.69	25.04	15.32	9.64	29.99	20.42
mean	9.75	19.92	10.21	9.73	24.89	15.32	9.70	29.95	20.42
SD	0.034	0.059		0.041	0.086		0.030	0.028	
% RSD	0.349	0.296		0.421	0.345		0.309	0.093	
%Recovery			99.6			98.9			99.1

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc Spiked sample} - \text{Conc original sample})}{\text{Conc added}} \times 100$$

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นต่ำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{19.92 - 9.75}{10.21} \times 100 = 99.6$$

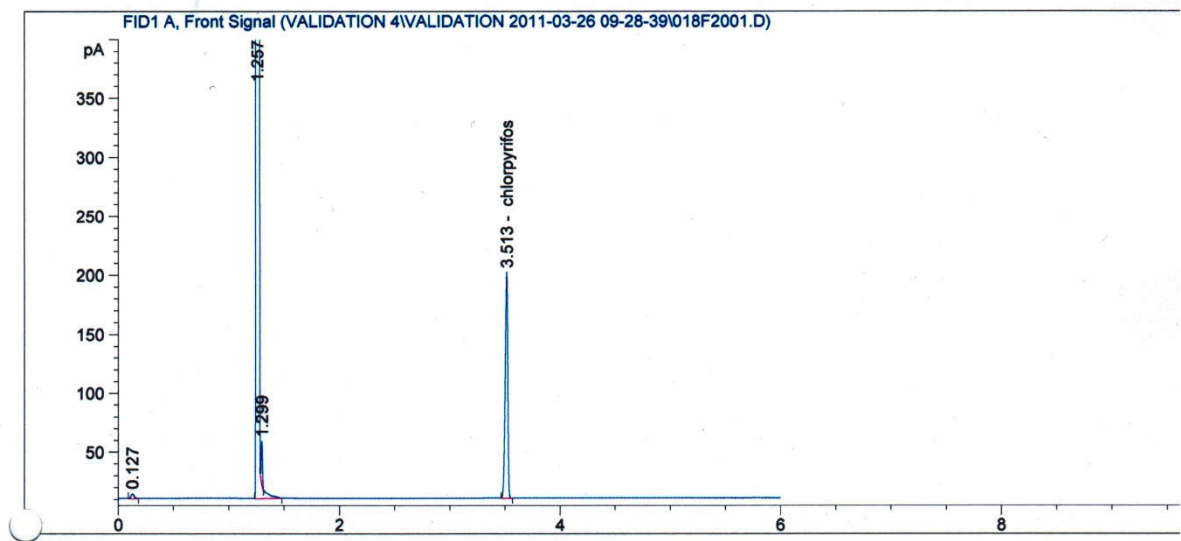
$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นกลาง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{24.88 - 9.73}{15.32} \times 100 = 98.9$$

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นสูง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{29.95 - 9.70}{20.42} \times 100 = 99.1$$

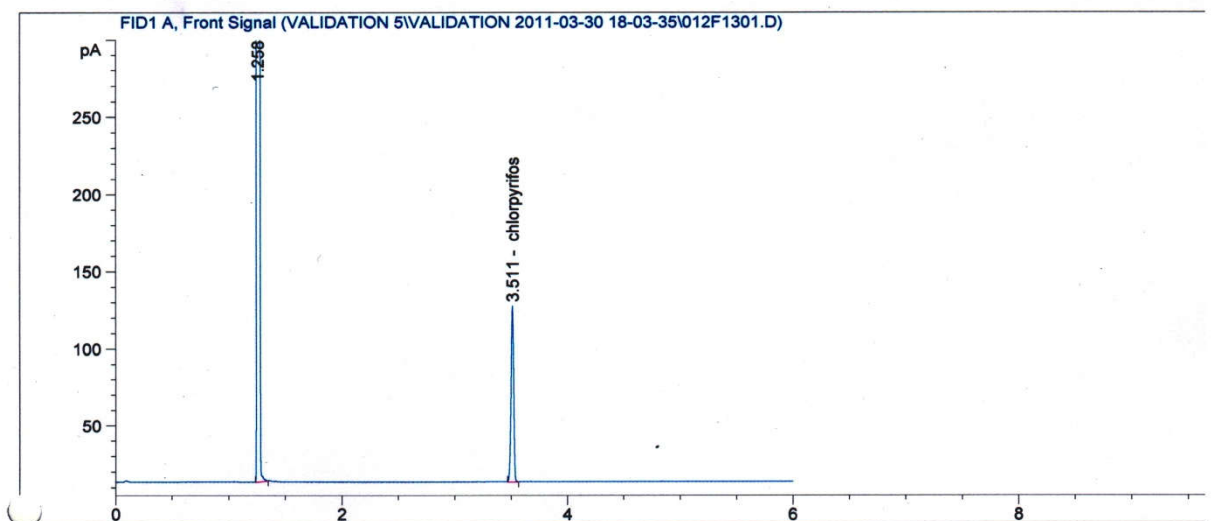
$$\% \text{ Recovery เฉลี่ย} = 99.2$$

ผลการศึกษา Specification/Selectivity

ภาพที่ 1 แสดง Chromatogram ของสารมาตรฐาน Chlorpyrifos



ภาพที่ 2 แสดง Chromatogram ของสารตัวอย่าง Chlorpyrifos



จาก Chromatogram ไม่มี Peak อื่นใดรบกวน Peak ของ Chlorpyrifos แสดงว่า Specification / Selectivity ดี

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Chlorpyrifos โดยวิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ได้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้

Column : Capillary, HP-5(5% Phenyl methyl siloxane)
30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 μ m, film thickness

Split injection : Split ratio : 50:1, Injection volume : 1 μ l.

Detector : Flame ionization

Temperature Colum oven : 220°C, Injection port : 250°C, Detector : 250°C

ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์นี้ ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้

Range หรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วง 0.25 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Linearity หรือความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิธีวิเคราะห์ทดสอบสามารถทำได้

Chlorpyrifos

มี Correlation coefficient (r) = 1.0000

Precision Repeatability ได้ค่า HORRAT = 1.74

Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.87

Robustness ได้ค่า HORRAT = 1.36

Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 1.27

Accuracy (ตรวจสอบความถูกต้อง) ของวิธีการ ได้ % Recovery = 99.2 %

การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ Chlorpyrifos ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อการควบคุมคุณภาพตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535

วิธีวิเคราะห์ที่ได้ศึกษานี้ สามารถถ่ายทอดให้แก่หน่วยงานราชการอื่นๆ และหน่วยงานเอกชนที่จะนำไปใช้ในการตรวจ Chlorpyrifos เพื่อการควบคุมคุณภาพในการผลิตและจำหน่ายต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย (2547). Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร.2537 การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษการเกษตรในประเทศไทย.กรมวิชาการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ขาลีสธุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.

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

J.Henriet,A.Martijn and H.H.Povlsen,1985,CIPAC Handbook,Vol.1C,Analysis of Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical Council. Limited.