

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตร profenofos

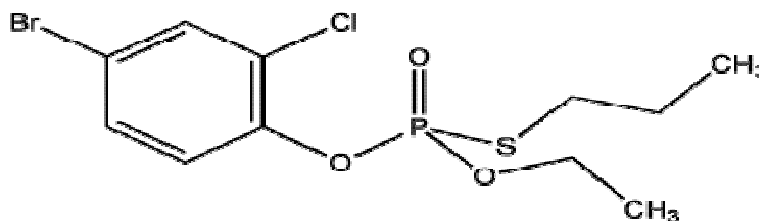
Study on Method Validation of profenofos

นางสาวมนัสนันท์ อรุณ¹ นางสาวนพพร ถนอมวงษ์¹

บทคัดย่อ

ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ โพรฟีโนฟอส (profenofos) ดังนี้ ตรวจสอบ Range หรือช่วงที่เป็นเส้นตรงจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.274– 1.642 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.99986 เกณฑ์ยอมรับ $r > 0.995$ ตรวจสอบ Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.456– 1.459mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.99982 เกณฑ์ยอมรับ $r > 0.995$ ตรวจสอบ Precision ทั้ง 3 ระดับของความเข้มข้น day 1 ได้ค่าHORRAT = 0.988 ตรวจสอบ Precision ทั้ง 3 ระดับของความเข้มข้น day 2 ได้ค่าHORRAT = 0.806 การตรวจสอบ Accuracy จากค่าเปอร์เซ็นต์ Recovery ได้ 127.97 % ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 98 – 102 % การประเมินค่า Precision โดยใช้วิธี HORRAT เกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับค่าHORRAT ≤ 2 ,และ EU ,Codex ยอมรับค่า HORRAT < 2 ผลการทดลองยังไม่มี ความเหมาะสม ในการนำไปตรวจวิเคราะห์การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ใกล้เคียงกัน ประมาณ 1 มก/มล ละลายด้วย acetone ให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันอย่างดี แล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GLC โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2 % จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับ สารละลายมาตรฐานฉีดสารละลายความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

คำนำ



โพรฟีโนฟอส (profenofos) IUPAC: (RS) O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 373.63 จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี ACTIVITY: insecticide (phenyl organothiophosphate insecticides) ประโยชน์ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช ดังนี้คือ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น ไรแดง แมลงหวี่ขาว หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม เป็นต้น การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช ที่ได้ค่าผลวิเคราะห์ที่ ถูกต้อง และแม่นยำนั้น จำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม วิธีวิเคราะห์บางวิธีที่พบ อยู่ในเอกสารเผยแพร่ ถ้าห้องปฏิบัติการมีเครื่องมือวิเคราะห์พร้อมก็สามารถทำตามวิธีมาตรฐานนั้นได้ แต่บางวิธีวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ไม่มีเครื่องมือพร้อมที่จะทำตาม วิธีนั้นได้หรือไม่มีวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาพัฒนา วิธีวิเคราะห์ขึ้นมาใหม่ เพื่อสะดวกกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการ และได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำจำเป็นต้อง มีการศึกษาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สำหรับนำไปใช้ใน ห้องปฏิบัติการต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID
2. capillary column HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane 30 เมตร x 0.32 มิลลิเมตร (id) 0.25 ไมโครเมตร film thickness
3. เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 4 หรือ 5 ตำแหน่ง (± 0.1 mg) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath และ ปิเปตขนาด 2 ,3, 4, 5,10 ml
5. Volumetric flask ขนาด 10 , 25 , 100 ml ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว

สารเคมี

1. Acetone ชนิด GR grade
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (profenofos)
3. สารมาตรฐาน(Standard profenofos)

วิธีการ

1. Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด FID

Conditions : Capillary Column HP-5 5% Phenyl Methyl Siloxane 30 m. x 0.32 mm. (id) 0.25 μ m film thickness

Split injection split ration 100 : 1 Detector H₂ flow 30.0 ml/min

Flow rate 2 ml/min Air flow 300.0 ml/min

Oven Temperature 250°C Makeup flow N₂ 30.0 ml/min

Injector Temperature 250°C Detector Temperature 280°C

2. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของ. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (profenofos)

2.1 ชั่งสารมาตรฐาน (profenofos) 2 ช้ำ (Ca1, Ca2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 ml เติม Acetone 5 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 10 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี

2.2 ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (profenofos) 10 ช้ำ ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 25 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml เติมสารละลาย Acetone 20 ml ลงใน Volumetric flask ปิดจุกแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 25 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี แล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร

2.3 การฉีดสารมาตรฐาน (profenofos)

และสาร Technical grade เข้าเครื่อง GLC โดยตั้ง sequence ในการ ฉีดดังนี้ Ca1, S1, S2, Ca2, S3, S4, Ca1, S5, S6, Ca2...S10 แล้วฉีดสารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร โดยการฉีดความเข้มข้นละ 2 ช้ำ

การฉีดสารเข้าเครื่อง GLC โดยฉีดสารละลายมาตรฐาน ช้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2 % จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

2.4 คำนวณค่า response factor (fi) ตามสูตร

$$f_i = \frac{S \times P}{H_s}$$

เมื่อ	f _i	=	ค่า response factor ของสารมาตรฐาน
	H _s	=	พื้นที่ใต้ peak ของ (profenofos) ในสารมาตรฐาน
	S	=	น้ำหนักของ (profenofos) ในสารละลายมาตรฐาน (mg)
	P	=	ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (profenofos) (%)

2.5 หาค่าเปอร์เซ็นต์ของสารออกฤทธิ์ (profenofos) จากสูตรดังนี้

$$(\text{profenofos})\text{content} = \frac{Hw \times f}{w}$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ (profenofos) ในสารละลายตัวอย่าง (mg)

f = ค่าเฉลี่ย response factor

w = น้ำหนักของ (profenofos) ในสารละลาย ตัวอย่าง (mg)

2.6 นำค่าเปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ (profenofos) ที่ได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ย จะได้เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของ ผลิตภัณฑ์ (profenofos)

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด) : ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุมีพิษ สำนักวิจัยพัฒนา
ปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8 ผลการทดลองและวิจารณ์

เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร (profenofos)

เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร (profenofos)	41.348
SD.	0.481
%RSD	1.165

การทำ precision ที่ 3 ความเข้มข้น day 1

เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร (profenofos)	41.689
SD	0.483
%RSD	1.159
HORRAT	0.988

การทำ precision ที่ 3 ความเข้มข้น day 2

เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร (profenofos)	41.555
SD	0.408
%RSD	0.981
HORRAT	0.806

AOAC ยอมรับ HORRAT \leq 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT $<$ 2

ตารางที่ 5 ตรวจสอบ % Recovery

N	Al content (mg / 25 ml)								
	Conc.added (4.186 mg /25 ml)			Conc. added (8.372 mg /25 ml)			Conc. added (12.558 mg /25 ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	2.77	9.39	4.19	2.80	12.22	8.372	2.86	15.24	12.558
2	2.83	9.44	4.19	2.81	12.23	8.372	2.85	15.21	12.558
3	2.77	9.35	4.19	2.84	12.07	8.372	2.80	15.22	12.558
4	2.74	9.37	4.19	2.80	12.05	8.372	2.85	15.30	12.558
5	2.73	9.51	4.19	2.78	12.20	8.372	2.82	15.28	12.558
6	2.76	9.39	4.19	2.85	12.15	8.372	2.83	15.28	12.558
7	2.78	9.62	4.19	2.82	12.19	8.372	2.79	15.38	12.558
8	2.76	9.56	4.19	2.77	12.25	8.372	2.81	15.11	12.558
9	2.77	9.51	4.19	2.83	12.24	8.372	2.79	15.37	12.558
10	2.77	9.54	4.19	2.75	12.23	8.372	2.81	15.41	12.558
mean	2.768	9.468	4.19	2.805	12.183	8.372	2.821	15.28	12.558
SD	0.0266	0.0924		0.0317	0.0710		0.0256	0.0909	
%RSD	0.9604	0.9754		1.1305	0.5830		0.0091	0.0059	
%Recov			159.90			112.01			99.21

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

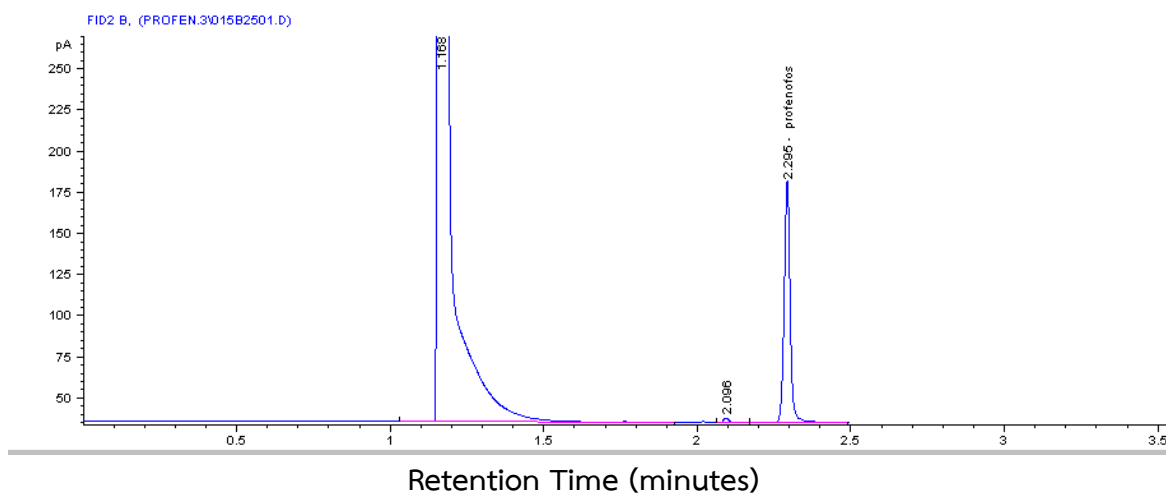
$$\%Recovery\text{ที่ความเข้มข้น ต่ำ} = \frac{9.468 - 2.768 \times 100}{4.19} = 159.90\%$$

$$\%Recovery\text{ที่ความเข้มข้น กลาง} = \frac{12.183 - 2.805 \times 100}{8.372} = 112.01\%$$

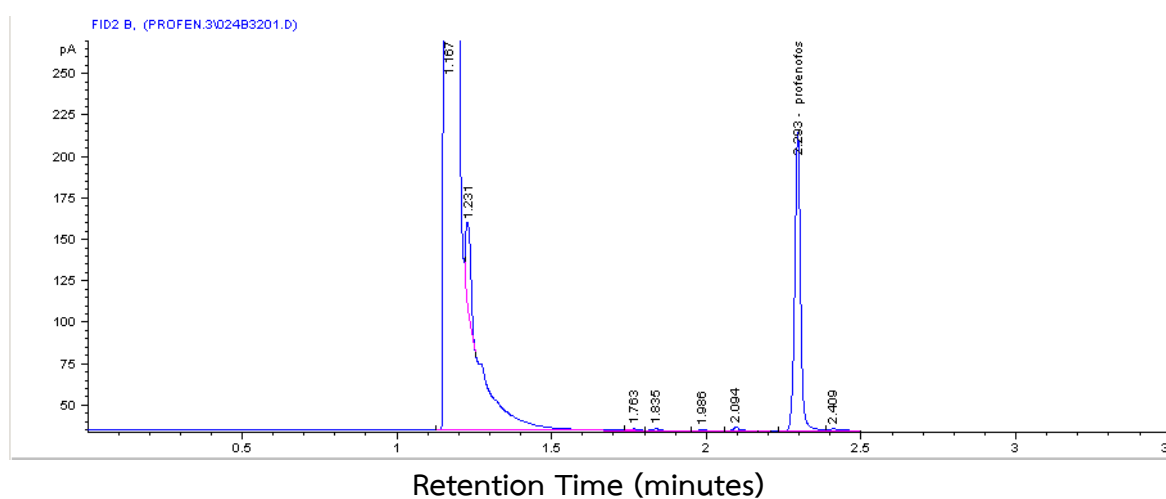
$$\%Recovery\text{ที่ความเข้มข้น สูง} = \frac{15.28 - 2.821 \times 100}{12.558} = 99.21\%$$

%Recovery เฉลี่ย = 127.97

เกณฑ์ยอมรับ 98 – 102



รูปที่ 1 Chromatogram of Standard solution



รูปที่ 2 Chromatogram of Sample solution

1. ตรวจสอบ Range ดังแสดงในรูปที่ 3

1.1 ซั่งสารมาตรฐาน(profenofos) ให้มีความเข้มข้น 6 ความเข้มข้น ให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน เช่น 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วเติมสารละลายacetone 15 ml เขย่าใน

Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร 25 ml เขย่าให้เข้ากัน

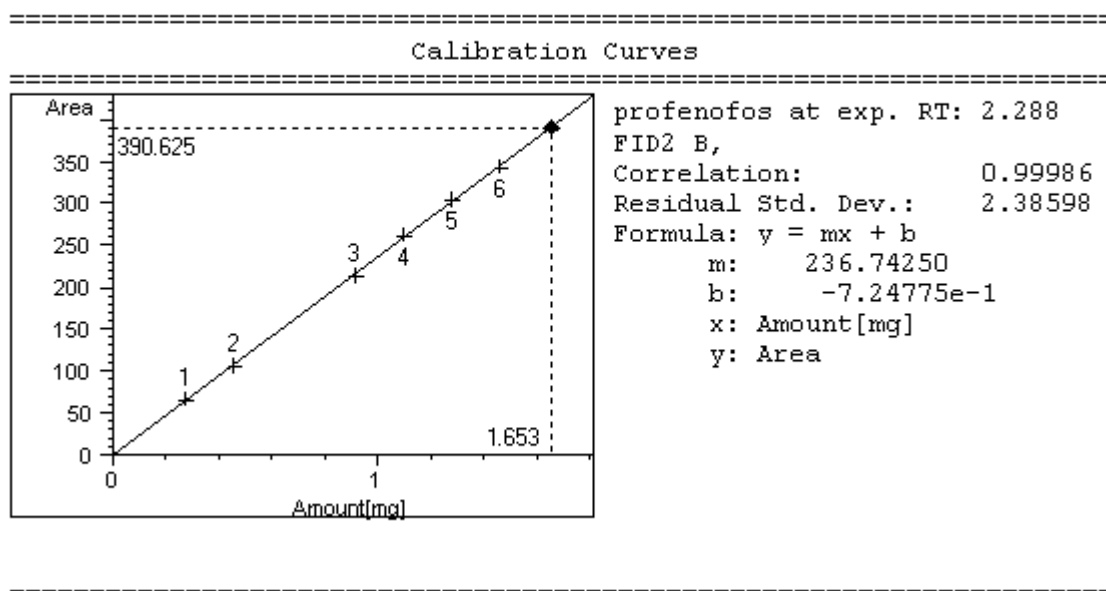
1.2 ฉีดสารละลายในข้อ 1.1 เข้าเครื่อง GLC ชนิด FID

1.3 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของ สารมาตรฐาน(profenofos) (แกน X) กับ response (แกน Y)

1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.274– 1.642 mg/ml ของ (profenofos)	
mg/ml	Area
0.274	65.12772
0.456	104.84681
0.912	212.95801
1.094	260.92899
1.459	342.65393
1.642	390.62463

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\PROFEN.4\009B0901.D

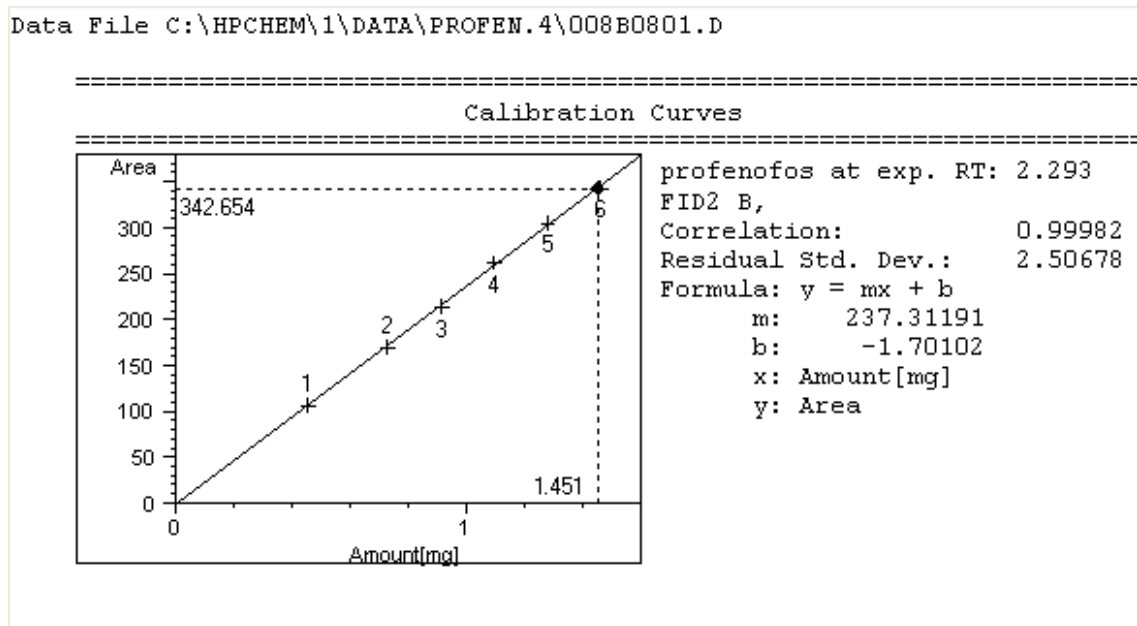


รูปที่ 3 Range ที่ความเข้มข้น 0.274– 1.642 mg/ml ของ(profenofos)

2. ตรวจสอบ Linearity ดังแสดงในรูปที่ 4

- 2.1 เลือกความเข้มข้นจาก range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น
- 2.2 เตรียมสารละลาย สารมาตรฐาน(profenofos) ให้มีความเข้มข้น 6 ความเข้มข้น ให้อยู่ในช่วงที่เลือกไว้
- 2.3 ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GLC ชนิด FID
- 2.4 Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย สารมาตรฐาน(profenofos) (แกน X) กับ response (แกน Y)
- 2.5 คำนวณหาค่า correlation coefficient (r) $r \geq 0.995$

การหา Linearity ที่ความเข้มข้น 0.456– 1.459 mg/ml ของ profenofos	
mg/ml	Area
0.456	104.84681
0.727	168.91214
0.912	212.95801
1.094	260.92899
1.277	303.86609
1.459	342.65393



รูปที่ 4 Linearity ที่ความเข้มข้น 0.456– 1.459mg/ml ของ profenofos

3. ตรวจสอบ Precision

3.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง (profenofos) ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ที่ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงการ ทดสอบ 3 ความเข้มข้น ๆ ละ อย่างน้อย 10 ซ้ำ

3.2 คำนวณค่าเฉลี่ย (\bar{X}) และ SD ของผลการทดสอบ

3.3 คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\begin{aligned} \text{ตัวอย่างการคำนวณ เช่น } \% \text{ RSD} &= \frac{0.483 \times 100}{41.689} \\ &= 1.159 \end{aligned}$$

3.4 ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

3.5 คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ C &= \text{Concentration ratio}(41.68\%) \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.468)} \\ &= 0.66 \times 2^{0.829754} \\ &= 0.66 \times 1.77738 \\ \% \text{ RSD} &= 1.173 \\ \text{HORRAT} &= \frac{1.159}{1.173} \\ &= 0.988 \end{aligned}$$

3.6 เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ HORRAT \leq 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT $<$ 2

4. ตรวจสอบหา % Recovery เพื่อประเมินค่า Accuracy (จากตารางที่ 5)

$$\% \text{ Recovery เฉลี่ย} = \frac{159.90 + 112.54 + 99.21}{3}$$

= 127.97

เกณฑ์ยอมรับ 98 – 102

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (profenofos)ค่าที่ได้ = 41.68 % w/w
2. ตรวจสอบ Range หรือช่วงที่เป็นเส้นตรง จะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.274– 1.642 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.99986 เกณฑ์ยอมรับ $r \geq 0.995$
3. ตรวจสอบ Linearity ที่ความเข้มข้น 0.456– 1.459 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.99982 เกณฑ์ยอมรับ $r \geq 0.995$
4. ตรวจสอบ Precision (day 1)ที่ 3 ความเข้มข้น ได้ค่า = 0.988 เกณฑ์ยอมรับ ≤ 2
ตรวจสอบ Precision (day 2)ที่ 3 ความเข้มข้น ได้ค่า = 0.806เกณฑ์ยอมรับ ≤ 2
5. ตรวจสอบ Accuracy จากค่าเปอร์เซ็นต์ Recovery ได้ 127.97 ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 98 - 102
6. เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ HORRAT ≤ 2

EU, Codex ยอมรับ HORRAT < 2

7. สรุปวิธีที่นำไปใช้วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ (profenofos)ยังไม่มีควมเหมาะสมต้องทำการศึกษาถึงวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ยังไม่สามารถนำวิธีการทดสอบไปใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากตรวจสอบความถูกต้องจากค่า เปอร์เซ็นต์ Recovery ได้ 127.97 ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ 98 - 102

11. เอกสารอ้างอิง

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

ดุขฎิ มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี

(Chemical Method Validation), เอกสารประกอบการฝึกอบรมกรมวิทยาศาสตร์บริการ.

นิรนาม. 2537. “ การขึ้นทะเบียนวัตถุที่มีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย ” กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

สถาบันอาหาร 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี, เอกสารประกอบการอบรม

สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร.

CIPAC H . 1998., Analysis of Technical and Formulated Pesticides, Collaborative
International Pesticides Analytical Council

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

Chemistry, England.

12. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร ตัวอย่าง(profenofos)

สารละลาย (profenofos)	เปอร์เซ็นต์ของสาร (profenofos)
1	41.30
2	41.27
3	40.72
4	41.18
5	40.53
6	40.74
7	40.81

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8	41.21
9	41.57
10	41.18
11	41.92
12	41.77
13	41.79
14	41.57
15	42.08
16	41.93
เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร (profenofos)	41.348
SD.	0.481
%RSD	1.165

ตารางที่ 2 การหา precision ที่ 3 ความเข้มข้น day 1

น้ำหนักตัวอย่าง (profenofos) (mg)	เปอร์เซ็นต์ (profenofos) ที่ตรวจพบ
------------------------------------	-------------------------------------

32.3	41.53
43.9	41.47
42.4	41.46
41.1	41.06
44.5	40.93
49.8	41.56
49.2	41.48
46.2	41.19
54.0	41.03
47.1	41.03
83.0	42.29
84.6	42.07
90.1	41.84
84.2	41.65
92.2	41.08
80.4	41.48
80.0	41.20
80.8	41.83
87.8	41.54
81.4	41.58
104.1	42.90
119.0	42.13
112.3	42.08
110.4	42.44
105.2	41.52
109.3	42.23
107.3	42.19
109.6	41.93
106.9	41.78
119.5	42.18
เฉลี่ย	41.689
SD	0.483
%RSD	1.159
HORRAT	0.988

ตารางที่ 3 การหา precision ที่ 3 ความเข้มข้น day 2

น้ำหนักตัวอย่าง (profenofos) (mg)	เปอร์เซ็นต์ (profenofos) ที่ตรวจพบ
49.0	40.91
57.4	41.43
44.2	41.13
50.0	41.22
42.7	40.96
49.8	40.97
50.9	41.27
45.8	41.22
40.6	41.12
46.3	41.39
80.7	41.76
80.8	41.85
80.6	41.69
92.5	41.53
83.2	41.28
83.8	40.97
75.8	42.21
81.4	41.52
85.9	41.23
81.0	41.53
121.0	41.76
116.2	42.47
117.3	41.94
109.0	41.56
129.7	41.89
113.2	41.97
123.9	41.92
130.0	41.79
114.8	42.25.
115.7	41.72
เฉลี่ย	41.555
SD	0.408
%RSD	0.981

HORRAT	0.806
--------	-------