การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มสารกำจัดแมลง Dimethoate

Method Validation of Dimethoate in Insecticide Formulation

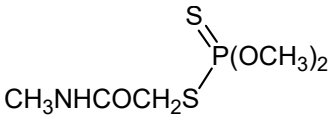
นางจิตติมา ยถาภูธานนท์[1] นายพิเชษฐ์ ทองละเอียด[1] นายฉลองรัตน์ หมื่นขวา[1]

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดแมลง Dimethoate ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายการเกษตรด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เนื่องจาก วิธีการนี้ให้ค่า Range ในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.6-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 มีความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงสูตร EC ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) และการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) เป็น 0.249 และ 0.268 ตามลำดับ ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 0.589 และ 0.268 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex และตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการ จากค่า เปอร์เซ็นต์การกลับคืน(% recovery) ได้ร้อยละ 99.6 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC วิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายการเกษตร Dimethoate ที่เป็นงานประจำและต้องการผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

[1] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

คำนำ



Dimethoaate มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC *O,O*-dimethyl *S*-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate; 2-dimethoxyphosphinothioylthio-*N*-methylacetamideมีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น *O,O*-dimethyl*S*-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] phosphorodithioate จัดอยู่ในกลุ่ม acylalinine มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_{12}NO_3PS_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 229.3 มีจุดหลอมเหลว 50.0-51.5 องศาเซลเซียส เป็นผลึกสีขาว ที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ 25 กรัมต่อลิตร ละลาย Methanol ได้มากกว่า 300 กรัมต่อลิตร ละลาย Dichlorometane ได้มากกว่า 300 กรัมต่อลิตร ละลาย Carbon tetrachloride ได้มากกว่า 50 กรัมต่อลิตร มีความคงทน (stable) คงต่อสภาวะที่เป็นกรด (pH 2-7) จะเกิดขบวนการ hydrolysis ในสภาวะที่เป็นด่าง pH 9 มีค่าครึ่งชีวิต 12 วัน ในด้านสิ่งแวดล้อม โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) พบว่า Dimethoate มีการตกค้างในสิ่งแว้ดล้อมน้อยถ้ามีการใช้อย่างถูกวิธี โดยในอากาศมีครึ่งชีวิตอยู่ที่ 2-4.1 วัน บนผิวดินอยู่ที่ 7-16 วัน และมีการลงสู่น้ำใต้ดินได้น้อยเนื่องจากมีการย่อยสลายได้รวดเร็วในดิน

ในด้านวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีอ้างอิงใน CIPAC Handbook H (Dobrat and Martijn, 1998) ซึ่งระบุใช้สารมาตรฐานในปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อการเตรียมสารละลายมาตรฐาน 1 ซ้ำ ดังนั้น เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่น (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล จึงจำเป็นต้องศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้น พร้อมตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร Dimethoate จากวิธีมาตรฐานที่กำหนด CIPAC Handbook เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และเหมาะต่อการใช้งาน

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Dimethoate ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง และแม่นยำยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือแก่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบวัตถุมีพิษการเกษตร

อุปกรณ์ และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง GLC ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame ionization detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl methyl siloxane (HP-5) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
3. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 100% dimethylpolysiloxane (DB-1) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
5. Ultrasonic bath
6. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. ปิเปตชนิด type A ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. กรวยแก้วก้านยาว
10. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Dimethoate 98.5 %
2. สารเข้มข้น Dimethoate (Technical grade, TC) 90 %AI
4. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สูตร Emulsifiable concentrates (EC) 40 %AI
5. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Dimethoate

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ด้วย HP-5 capillary column ดังนี้

อุณหภูมิ	Oven	:	210	องศาเซลเซียส
	Injector	:	280	องศาเซลเซียส
	Detector	:	280	องศาเซลเซียส
สภาวะ	Injector	:	split ratio 50 :1	

ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H_2	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
		Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N_2	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Dimethoate หนัก 10 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) 2 ซ้ำ (C_A, C_B) ใส่ขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสาร Technical grade

ชั่งสาร Technical grade ที่คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วหนัก 25 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) 15 ซ้ำ (T_1 - T_{15}) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสภาวะการใช้งาน และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆ ครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % แล้วฉีดสารละลายเพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ดังนี้

C_A, $T_{1\text{-}1}$, $T_{1\text{-}2}$, C_B, $T_{2\text{-}1}$, $T_{2\text{-}2}$, C_A, ...

2.4 การคำนวณ

2.4.1 ค่า response factor

$$f = W \times P / A$$

W = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็น มิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของ Dimethoate ในสารมาตรฐาน หน่วยเป็น เปอร์เซนต์

A = peak area ของ Dimethoate ในสารละลายมาตรฐาน

2.4.2 ปริมาณ Dimethoate ในสาร Technical grade

$$M = As \times f / Ws$$

As = peak area ของ Dimethoate ในสารละลาย Technical grade

Ws = น้ำหนักสาร Technical grade หน่วยเป็น มิลลิกรัม

M = ปริมาณ Dimethoate ในสาร Technical grade หน่วยเป็น เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range / Linear) ของวิธีการ

3.1 หาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Dimethoate ครอบคลุมช่วงการใช้งาน รวม 6 ความเข้มข้น หนัก 5.5, 27.5, 55.5, 82.5, 110.0 และ 137.5 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของ Dimethoate (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 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Dimethoat 5 ความเข้มข้น หนัก 33, 44, 55, 66, และ 77 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 50 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 Dimethoate (แกน X) กับค่า response (แกน Y)

3.2.5 พิสูจน์ความเป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

4. ตรวจสอบความแม่น (Precision) ของวิธีการ

4.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (Repeatability)

4.1.1 ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 52, 65 และ 78 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ ที่เตรียม (ข้อ 4.1.1) 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

4.1.3 การคำนวณ

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

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

C = Concentration ratio

4.2 ตรวจสอบความทำซ้ำ (Intermediat reproducibility)

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ขึ้นใหม่ตามข้อ 4.1.1 (ต่างวันกัน) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4) คำนวณค่าเฉลี่ย
ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และประเมินค่า HORRAT ของปริมาณ Dimethoate จากข้อ 4.1.2 และ 4.2 ดังนี้

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

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

C = Concentration ratio

5. ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ

5.1 ตรวจสอบ Robustness

5.1.1 วิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะการใช้งาน ใช้คอลัมน์ชนิด HP-5 (5% phenyl methyl siloxane)

5.1.1.1 เตรียมสารละลายของสาร Techniical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน หนัก 33, 44, 55, 66, และ 77 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร
ฉีดเข้าเครื่องเพื่อสร้างกราฟ

5.1.1.2 ชั่งสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC คลุกเคล้าแล้ว หนัก 52, 65 และ 78 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.1 ปรับเปลี่ยนสภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.2 ฉีดสารละลายของสาร Techniical grade (ข้อ 5.1.1.1) เพื่อสร้างกราฟ

5.1.2.3 ฉีดสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC (ข้อ 5.1.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Dimethoate ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.3 การประเมินค่า HORRAT

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 5.1.1.2 และ 5.1.2.3 มาคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HORRAT ตามข้อ 4.2

5.2 ตรวจสอบ Ruggedness

5.2.1 เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC ตามข้อ 4.1.1 และเตรียม Technical grade (ข้อ 3.2.2) เพื่อสร้างกราฟ โดยมีการวิเคราะห์ต่างวันกันแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4)

5.2.2 นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ของผลิตภัณฑ์สูตร EC จากข้อ 5.2.1 นำมาร่วมคำนวณค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ และ HORRAT ตามข้อ 4.2

6. ตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech (5 mg AI / ml)

ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว หนัก 1,395 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 2, 5 และ 8 มิลลิลิตรใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของสาร Technical grade ที่มีความเข้มข้นของ Dimethoate เป็น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงตามลำดับความเข้มข้น

6.3 เตรียมสารละลาย Stock Sample (1 mg AI / ml)

ชั่งผลิตภัณฑ์สูตร EC ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 2,777 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ตามลำดับใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ถ่ายผ่านกรวยแก้วก้านยาวสู่ขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.4 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) มา 10 มิลลิลิตร 10 ซ้ำใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร รวม 10 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.5 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Stock Sample EC (ข้อ 6.3) อยู่ 10 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ รวม 30 ใบ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Dimethoate เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

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

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

A_{spike} = ปริมาณ Dimethoate ในสารละลาย Spike

A_{origin} = ปริมาณ Dimethoate ในสารละลาย Origin

A_{add} = ปริมาณ Dimethoate ที่เติมลงในสารละลาย Spike

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

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุมีพิษ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลอง และวิจารณ์

ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง เมื่อตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้ผลการคำนวณค่า response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ย ไม่เกินร้อยละ 1 (ตารางที่ 1) และตรวจหา

ปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เทียบกับสารละลายมาตรฐาน (รูปที่ 1) ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 89.5 (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.1 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2) จึงตรวจสอบค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.6 - 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 3)

ในด้านความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC พบว่า การทวนซ้ำ (Repeatability) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.137 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.406 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.249 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วนการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.224 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.661 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.286 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า Robustness มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.489 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 1.453 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.589 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และพบว่า Ruggedness มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.224 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.661 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.268 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

กรณีความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณ สารออกฤทธิ์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC มีค่าเป็นร้อยละ 99.6 (ตารางที่ 9)

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Dimethoate ตามที่ระบุใน CIPAC Handbook H (Dobrat and Martijn, 1998) เป็นการใช้ Pack column ในการแยกสาร และ การศึกษาทดลองนี้ได้พัฒนาใช้ Capillary column ซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสารสูงกว่าแทน และปรับเปลี่ยนปริมาณการใช้สารมาตรฐาน เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการ โดยหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นสูงก่อน เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารมาตรฐานซึ่งมีราคาแพงมาก ในขั้นตอนต่างๆ โดยเฉพาะการตรวจสอบความถูกของวิธีการ ที่ต้องมีการใช้สารมาตรฐานเติมลงในสารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 30 ซ้ำ และผลของการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆ สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล วิธีการนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ Dimethoate ของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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

อุณหภูมิ Oven	:	210	องศาเซลเซียส		
Injector	:	280	องศาเซลเซียส		
Detector	:	280	องศาเซลเซียส		
สภาวะ Injector	:	split ratio 50 :1			
ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล	2.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H_2	อัตราการไหล	40.0	มิลลิลิตรต่อนาที
		Air	อัตราการไหล	450.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซ make up	:	N_2	อัตราการไหล	45.0	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1	ไมโครลิตร		

2. การเตรียมสารละลายเพื่อการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Dimethoate ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานให้มีสารออกฤทธิ์ หนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง จึงปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

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

3. วิธีการนี้มีค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.6-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998

4. ความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์กำจัดโรคพืชสูตร EC เมื่อทดสอบค่าการทวนซ้ำ (Repeatability) และการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) นำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.661 และ 0.27 ตามลำดับ ซึ่งยอมรับได้ เนื่องจากไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

5. การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า ยอมรับได้ เนื่องจากเมื่อนำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ของ Robustness และ Ruggedness ได้เป็น 0.589 และ 0.268 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

6. ความถูก (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณ

สารออกฤทธิ์ Dimethoete ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงสูตร EC มีค่าร้อยละ 99.6 อยู่ในช่วง 95-105 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 0.1 % ของ AOAC

เอกสารอ้างอิง

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. **การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย**. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชาลีธุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.

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

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

Gunter Zweig. and Joseph Sherma. 1972. **Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators. Vol.6**

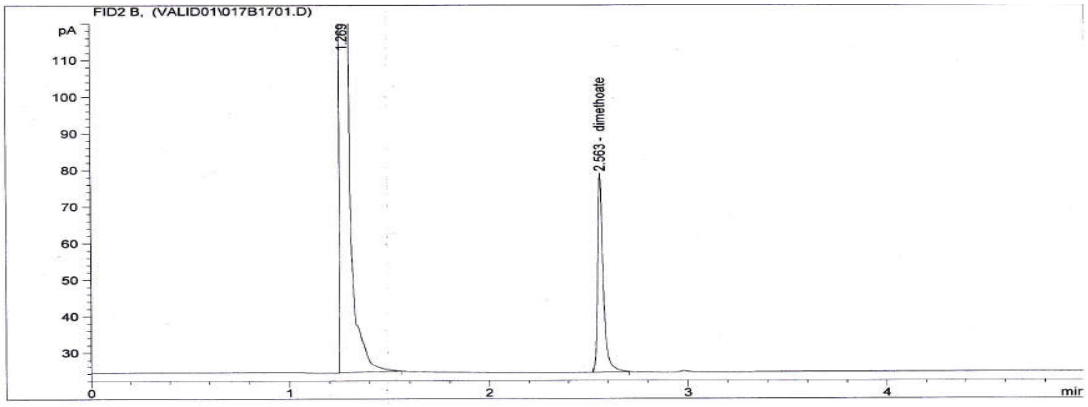
ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การปรับตั้งเครื่องก่อนการวิเคราะห์ (Std. Purity 98.5 %, in 10 ml.)

Std. Soln.	Mg	Area	f = Ws * P / Vs * As	% diff.
C_A	10.3	107.70036	0.9420	0.3190
C_B	11.1	114.90313	0.9515	-0.6893
C_A	10.3	108.23396	0.9374	0.8104
C_B	11.1	115.49756	0.9466	-0.1711
C_A	10.3	107.56045	0.9432	0.1894
C_B	11.1	115.167245	0.9494	-0.4584
		Mean	**0.9450**	

หมายเหตุ : f = Response factor

% diff. = ร้อยละของการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Dimethoate

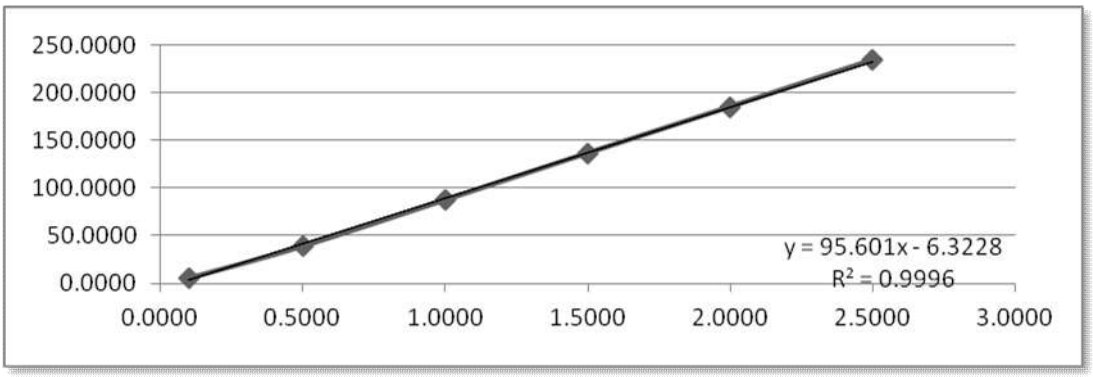
ตารางที่ 2 การหาปริมาณ Dimethoate ในผลิตภัณฑ์สูตร Tech.

mg. Tech	**%w/w**
24.4	89.37
27.8	90.54
27.4	91.37
24.0	90.56
27.9	90.14
25.5	88.70
25.4	88.67
25.1	89.44

22.6	88.03
26.8	89.98
25.6	88.61
27.4	90.37
23.5	88.99
24.5	89.85
23.0	89.14
Mean	**89.58**

ตารางที่ 3 การหาช่วงของการวัด (Range)

mg AI, Tech / ml	Area
0.1000	5.9428
0.4999	39.5514
0.9997	87.7548
1.4996	136.5815
1.9994	184.9095
2.4993	233.6935

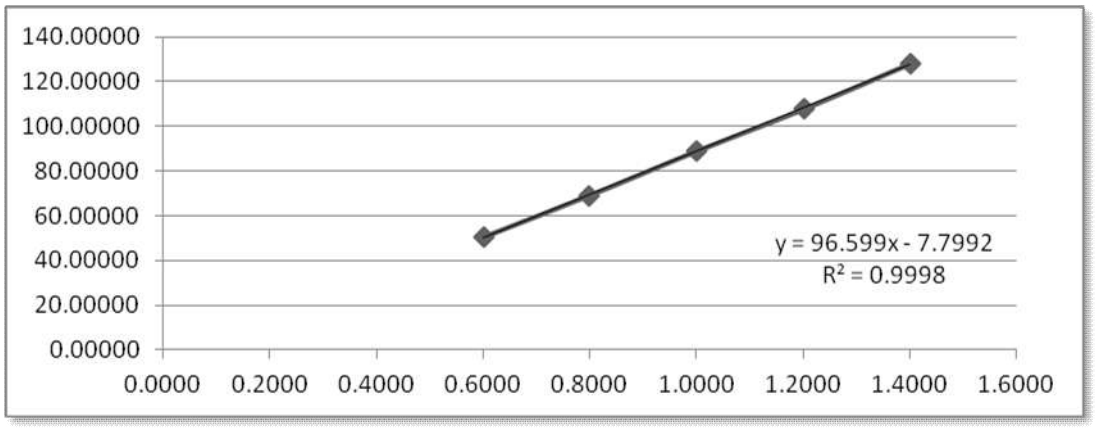


รูปที่ 2 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

ตารางที่ 4 การหาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวัด (Linearlity)

mg AI, Tech / ml	Area
0.6005	50.50050
0.7983	69.0509
1.0008	88.9681
1.2011	107.6753
1.4012	127.989

corr.coef. (r) **0.9998**



รูปที่ 3 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตารางที่ 5 ตรวจสอบ Repeatability ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w	mg. Sample	%w/w
51.8	33.72	64.0	33.90
51.5	34.10	63.0	33.96
51.1	33.86	63.8	33.89
50.8	33.90	78.5	33.86
50.7	33.81	78.9	33.56
49.8	33.98	77.2	33.78
51.3	33.79	76.7	34.05

51.6	33.94
50.2	33.98
49.5	33.67
64.7	33.78
63.9	33.69
64.6	33.81
63.4	33.74
64.3	34.03
62.9	33.83
64.7	33.98

78.8	33.84
77.6	33.98
78.4	33.98
76.3	33.76
76.9	33.56
78.1	34.00
Mean	**33.858**
SD	**0.137**
%RSD	**0.406**

$\%RSD_{HOR} = 0.66x2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66x2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 0.66x2^{1.301}$

$= 1.626$

$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 0.406 / 1.626$

$= 0.249$

ตารางที่ 6 ตรวจสอบ Intermediat reproducibility ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w
51.8	33.72
51.5	34.10
51.1	33.86

mg. Sample	%w/w
55.1	33.26
55.0	33.05
55.2	33.22

$\%RSD_{HOR} = 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{1.301}$

$= 2.464$

$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 0.661 / 2.464$

$= 0.268$

50.8	33.90
50.7	33.81
49.8	33.98
51.3	33.79
51.6	33.94
50.2	33.98
49.5	33.67
64.7	33.78
63.9	33.69
64.6	33.81
63.4	33.74
64.3	34.03
62.9	33.83
64.7	33.98
64.0	33.90
63.0	33.96
63.8	33.89
78.5	33.86
78.9	33.56
77.2	33.78
76.7	34.05
78.8	33.84
77.6	33.98
78.4	33.98
76.3	33.76
76.9	33.56
78.1	34.00

55.0	33.57
55.1	33.78
55.5	33.89
55.3	33.80
55.6	34.15
55.0	34.08
55.9	34.23
66.2	33.50
66.1	33.79
66.0	33.82
66.3	34.04
66.1	34.05
66.2	33.96
66.1	33.93
66.2	34.10
66.2	34.19
66.2	34.06
77.2	33.96
77.3	33.84
77.1	34.12
77.2	34.04
77.2	34.05
77.1	33.87
77.1	33.74
77.1	33.88
77.2	33.98
77.2	33.98
Mean	**33.861**
SD	**0.224**
%RSD	**0.661**

ตารางที่ 7 ตรวจสอบ Robustness ของสูตร EC

mg.	%w/w
51.8	33.06
	34.24
51.5	32.36
	32.6
51.1	33.23
	32.76
50.8	34.06
	34.82
50.7	33.69
	33.54
49.8	33.67
	33.73
51.3	33.18
	33.32
51.6	32.8
	33.82
50.2	33.77
	34
49.5	34.01
	34.3
64.7	33.85
	34.18
64.6	33.83
	33.83
64.3	34.25
	33.56
63.4	34.19
	33.77
62.9	33.84
	35.27

mg.	%w/w
64.7	34.22
	33.52
66.3	33.89
	33.61
65.5	33.65
	32.68
63.8	33.79
	32.99
66.1	33.35
	33.16
78.5	33.41
	33.41
78.9	33.83
	33.82
77.2	33.64
	33.61
76.7	33.81
	33.73
78.8	33.83
	33.83
77.6	33.54
	33.54
76.3	33.93
	33.83
78.4	33.61
	33.6
76.9	33.93
	33.88
78.1	33.8
	33.81
mean	33.679
SD	0.4896
%RSD	**1.453**

$\%RSD_{HOR} = 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{1.301}$

$= 2.464$

$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$

$= 1.453 / 2.464$

$= 0.589$

ตารางที่ 8 ตรวจสอบ Ruggdness ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w	mg. Sample	%w/w
51.8	33.72	55.1	33.26
51.5	34.10	55.0	33.05
51.1	33.86	55.2	33.22
50.8	33.90	55.0	33.57
50.7	33.81	55.1	33.78
49.8	33.98	55.5	33.89
51.3	33.79	55.3	33.80
51.6	33.94	55.6	34.15
50.2	33.98	55.0	34.08
49.5	33.67	55.9	34.23
64.7	33.78	66.2	33.50
63.9	33.69	66.1	33.79
64.6	33.81	66.0	33.82
63.4	33.74	66.3	34.04
64.3	34.03	66.1	34.05
62.9	33.83	66.2	33.96
64.7	33.98	66.1	33.93
64.0	33.90	66.2	34.10
63.0	33.96	66.2	34.19
63.8	33.89	66.2	34.06
78.5	33.86	77.2	33.96
78.9	33.56	77.3	33.84
77.2	33.78	77.1	34.12
76.7	34.05	77.2	34.04
78.8	33.84	77.2	34.05
77.6	33.98	77.1	33.87

78.4	33.98
76.3	33.76
76.9	33.56
78.1	34.00

77.1	33.74
77.1	33.88
77.2	33.98
77.2	33.98
Mean	**33.861**
SD	**0.224**
%RSD	**0.661**

$\%RSD_{HOR} = 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 2^{(1-0.5\log 0.25)}$

$= 2^{1.301}$

$= 2.464$

Horrat = $\%RSD / \%RSD_{Hor}$

= 0.661 / 2.464

= 0.268

ตารางที่ 8 ตรวจสอบ % Recovery สูตร EC

N	AI content (mg / 25 ml)								
	Concn. (0.4 mg / ml)			Concn. (0.6 mg / ml)			Concn. (0.8 mg / ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	8.23	18.10	10.00	8.04	23.18	15.00	8.23	28.56	20.00
2	8.25	18.03	10.00	8.16	23.04	15.00	8.29	28.52	20.00
3	8.39	18.17	10.00	8.09	23.21	15.00	8.24	28.70	20.00
4	8.22	17.88	10.00	8.19	23.11	15.00	8.12	28.84	20.00
5	8.38	17.96	10.00	8.26	23.01	15.00	8.15	28.91	20.00
6	8.37	17.85	10.00	8.14	23.07	15.00	8.18	28.65	20.00
7	8.44	18.33	10.00	8.16	23.02	15.00	8.32	28.79	20.00
8	8.39	18.18	10.00	8.18	23.21	15.00	8.28	28.79	20.00
9	8.37	18.14	10.00	8.20	23.20	15.00	8.30	28.24	20.00
10	8.21	18.09	10.00	8.28	23.13	15.00	8.29	28.24	20.00

mean	8.33	18.07	10.00	8.17	23.12	15.00	8.24	28.62	20.00
SD	0.09	0.15		0.07	0.08		0.07	0.24	
%RSD	1.04	0.81		0.88	0.35		0.84	0.82	
%Recov			97.48			99.65			101.92

%Recovery = 99.683