

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัดปริมาณพิษการเกษตร cypermethrin Method Validation of Cypermethrin in Pesticide Formulations

นางจิตติมา ยถาภูรานนท์ นางจิตตานันท์ สรวายเอี่ยม
นางสาวยุพดี จิตรไพศาล นางจิราพรรณ ทองหยอด

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง สูตรผสมชนิด EC ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยมีตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) ด้วยแคพิลลารีคอลัมน์ HP-5 (30 m × 0.32 mm (id.) 0.25 μm film thickness) ใช้ He เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 220 °C นาน 3 นาที อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 20 °C/min จนถึง 240 °C นาน 14 นาที อุณหภูมิการฉีด 270 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 μl วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 3.0 mg/ml ให้ค่าช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.4 - 2.0 mg/ml ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) พิจารณาจาก % Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 mg/ml ได้ค่าเฉลี่ย % Recovery เท่ากับ 98.6 เกณฑ์ยอมรับ AOAC % Recovery เท่ากับ 98 - 102 ความเที่ยง (Precision) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.755 ตรวจสอบค่า Robustness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.685 ตรวจสอบค่า Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.818 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≥ 2 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

คำนำ

สารป้องกันและกำจัดแมลง Cypermethrin เป็นสารกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (pyrethroids) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตาย ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น (RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS; 1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol.1C โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในสภาวะ Normal Phase ด้วยคอลัมน์ Spherisorb S 5W สารละลายตัวพา 0.05 % (v/v) ของเอทิลอะซิเตต ในไอโซออกเทน ตัวตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร ใช้เมทิลเบนโซเอท เป็นสารมาตรฐานภายใน และเทคนิค GC-FID เป็นเทคนิคที่ดีและรวดเร็ว โดยตาม CIPAC ใช้ Packed column ชนิด Chromosorb W-HP silicone เคลือบบน OV-101 คอลัมน์แก้วขนาด 1m x 4 mm i.d. อุณหภูมิคอลัมน์ 235 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการฉีดสาร 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจวัด 250 องศาเซลเซียส ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาอัตรา 0.05 ลิตรต่อนาที ใช้ di-(2-ethylhexyl)phthalate เป็นสารมาตรฐานภายใน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ โดยเทคนิค HPLC ในสภาวะ Normal Phase ได้ค่า repeatability (r) เท่ากับ 1.1 ในผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์ระหว่าง 20 – 40 เปอร์เซ็นต์ และเทคนิค GLC-FID ด้วย packed column ได้ค่า repeatability (r) เท่ากับ 0.5 ในผลิตภัณฑ์ที่มีสารออกฤทธิ์ระหว่าง 20 – 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเทคนิค GC-FID ให้ค่าการวิเคราะห์ซ้ำของข้อมูลภายในห้องปฏิบัติการ น้อยกว่าเทคนิค HPLC แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค GC-FID ที่ใช้คอลัมน์ประเภท Capillary column ที่มีขนาดเล็กลง แต่ให้ประสิทธิภาพการแยกสารดียิ่งขึ้นกว่า Packed column

ตั้งนั้งานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin สูตร 35 % (w/v) EC (Emulsifiable concntrate) โดยใช้เทคนิค GC-FID ที่ใช้ Capillary column ที่ทันสมัยในการแยกสาร สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ(Method Validation) ซึ่งเป็นข้อกำหนด ข้อที่ 5.4.2 ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5 % phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50, 100, 500 ,1000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
7. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Cypermethrin ความบริสุทธิ์ 99.0 %
2. สารเข้มข้นสูง (Technical material) ของ Cypermethrin สูตร 92 % min. Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ Cypermethrin สูตร 35 % (w/v) EC
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ cypermethrin สูตร 92 %min Tech.

เพื่อใช้สารเข้มข้นสูงนี้แทนสารมาตรฐานที่มีราคาแพง และมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งกระบวนการตรวจสอบต้องเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง จึงใช้สารปริมาณมาก โดยวิธีวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง GC-FID

Capillary column	: HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 μm)
Oven temperature	: 220 °C (3 min), 20 °C/min – 240 °C (14 min)
Injector temperature	: 270 °C
Detector temperature	: 270 °C
Split injection	: Split ratio 50 : 1
Carrier gas	: Helium 2.0 ml/min
Injection volume	: 1 μl
Run time	: 17 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน cypermethrin

ชั่งสารมาตรฐาน cypermethrin ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม (\pm 0.1 มิลลิกรัม) จำนวน 2 ซ้ำ (C_A, C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin

ซังสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 100 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) จำนวน 10 ซ้ำ (TC₁-TC₁₀) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID

เมื่อปรับตั้งสถานะของเครื่อง GC-FID เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น cypermethrin ตามลำดับ ดังนี้

C_A, TC₁, TC₂, C_B, TC₃, TC₄, C_A,.....

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสูตรสารเข้มข้นสูง

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

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

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน cypermethrin หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน cypermethrin

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

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

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin หน่วยเป็นมิลลิกรัม

f_{avr.} = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin 35 % (W/V) EC

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 ซังสารเข้มข้น cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ cypermethrin ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 2.4 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ที่เตรียมสถานะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 3 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ ความเข้มข้น 0.4 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 1359.9 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ลงในปิเปตอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone จนหลายครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 8 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.3943 0.9856 และ 1.5770 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC ปริมาณ 1457.2 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ลงในปิเปตอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID ได้ค่า 0

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้นสูง cypermethrin จากข้อ

2.2.1.1 ปริมาตร 3, 5 และ 8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID ได้ค่า F

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{F - O}{C} \times 100$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร cypermethrin ในสารละลาย fortified sample, มก./25มล.

O คือ ปริมาณสาร cypermethrin ในสารละลาย original sample, มก./25มล.

C คือ ปริมาณ added sample, มก.

ค่าความแม่นยำ ต้องได้ % Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ซ้ำสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 598.0 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 7 มิลลิลิตร ลงในขวดวัด ปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ ความเข้มข้น 0.4334, 1.0836 และ 1.5170 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยซ้ ผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 30, 60 และ 100 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับ ปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

2.3.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\% \text{ RSD ที่ได้จาการวิเคราะห์}}{\text{Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี}}$$

$$\text{เมื่อ } \% \text{ RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความแข็งแกร่ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่ง ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันอีกอันหนึ่ง และภายใต้สภาวะเงื่อนไขอีกสภาวะหนึ่ง ดังนี้

Capillary column : HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.32 μm)

Oven temperature : 240 °C, post run 250 °C (1 min)

Injector temperature : 270 °C

Detector temperature : 270 °C

Split injection : Split ratio 50 : 1

Carrier gas : Helium 2.0 ml/min

Injection volume : 1 μl

Run time : 10 min

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ cypermethrin 35 %w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 30, 60 และ 100 มิลลิกรัม (±0.1 มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin

โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC-FID เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\% \text{ RSD ที่ได้จากกรวิเคราะห์}}{\text{Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี}}$$

$$\text{เมื่อ \% RSD (relative standard deviation)} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2553 ถึงเดือน กันยายน 2554

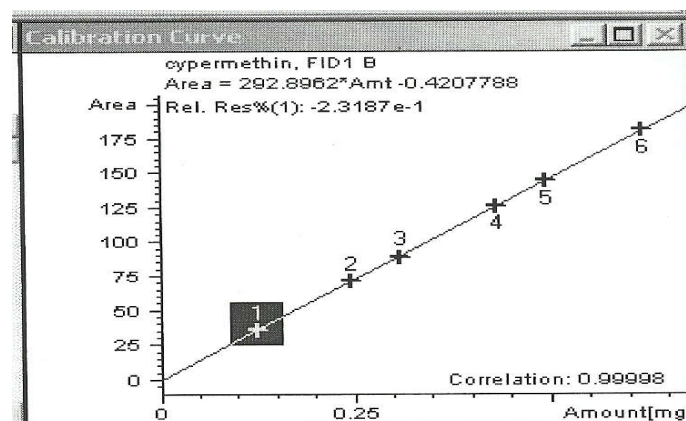
สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร

กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูงสุด 92 %w/w TC เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 90.6

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้น 0.2 - 3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.4 - 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 (ภาพที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$



ภาพที่ 1 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

การตรวจสอบค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin 35 % w/v EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ คำนวณค่า % Recovery เท่ากับ 97.3 98.0 และ 100.43 ตามลำดับ ได้ค่าเฉลี่ย 98.6 (ตารางที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง % Recovery เท่ากับ 98-102 พิจารณาตามเกณฑ์ที่มีปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10 % ค่าความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถครอบคลุมช่วงที่ใช้งานการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นหมายความว่า ถ้าผู้วิเคราะห์เตรียมสารละลายตัวอย่างสูงกว่าหรือต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้งานจริง สามารถให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องเช่นกัน

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Active ingredient content (mg/25 ml)								
	Concn.(0.5 mg/ml)			Concn.(1.0 mg/ml)			Concn.(1.5 mg/ml)		
	Origin	Spilke	Added	Origin	Spilke	Added	Origin	Spilke	Added
1	10.061	24.482	14.785	10.061	34.320	24.641	10.061	48.281	39.426
2	10.061	24.436	14.785	10.061	34.351	24.641	10.061	49.925	39.426
3	10.061	24.447	14.785	10.061	34.141	24.641	10.061	49.817	39.426
4	10.061	24.408	14.785	10.061	34.084	24.641	10.061	48.545	39.426
5	10.061	24.497	14.785	10.061	34.386	24.641	10.061	50.357	39.426
6	10.061	24.513	14.785	10.061	34.298	24.641	10.061	50.085	39.426
7	10.061	24.368	14.785	10.061	34.161	24.641	10.061	48.849	39.426
8	10.061	24.504	14.785	10.061	34.448	24.641	10.061	50.021	39.426
9	10.061	24.464	14.785	10.061	34.276	24.641	10.061	49.969	39.426
10	10.061	24.396	14.785	10.061	33.704	24.641	10.061	50.465	39.426
% Recovery	97.33			98.03			100.43		

ค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 35.6 35.4 และ 35.4 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% RSD_{exp.}) เท่ากับ 1.382 0.645 และ 1.476 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์จาก ทฤษฎี (% RSD_{Horwitz.}) เท่ากับ 1.546 และคำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.894, 0.417 และ 0.955 ได้ค่าเฉลี่ย 0.755 (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ Precision ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

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	36.4	35.695	67.8	35.895	119.3	35.493
2	31.5	36.246	67.4	35.357	111.5	35.084
3	31.3	36.605	60.2	35.164	103.0	36.581
4	38.4	35.109	64.7	35.335	102.8	35.103
5	28.1	35.229	64.5	35.307	104.8	36.158
6	39.2	35.846	69.4	35.160	101.8	35.264
7	32.6	35.255	69.8	35.710	105.8	35.188
8	32.8	35.277	67.4	35.400	104.7	35.289
9	35.7	35.417	74.9	35.368	102.2	35.120
10	34.8	35.393	73.7	35.440	104.2	35.015
Mean	-	35.61	-	35.41	-	35.43
SD		0.492		0.229		0.523
% RSD _{exp.}		1.382		0.645		1.476
Horwitz		1.546		1.546		1.546
HORRAT		0.894		0.417		0.955

สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness/Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 35.725 และ 35.23 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) สำหรับ Robustness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.851 0.849 0.354 ได้ค่าเฉลี่ย 0.685 Ruggedness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.426 1.034 0.993 ได้ค่าเฉลี่ย 0.818 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2 แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Al. Content % (w/w)		Al. Content % (w/w)		Al. Content % (w/w)	
	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness
1	36.689	35.786	35.139	35.369	35.391	35.046
2	35.468	35.429	36.266	35.849	35.369	34.499
3	36.113	35.742	36.475	35.189	35.211	34.296
4	35.336	35.243	36.217	35.411	35.685	34.941
5	35.656	35.453	35.756	35.167	35.604	34.475
6	36.176	35.536	35.922	35.824	35.538	35.561
7	35.442	35.563	35.584	34.308	35.316	35.096
8	35.858	35.657	35.387	34.838	35.542	35.626
9	36.438	35.127	35.280	34.472	35.851	35.916
10	35.442	35.856	36.260	34.412	35.343	35.296
Mean	35.86	35.54	35.83	35.08	35.48	35.08
SD	0.472	0.2343	0.470	0.5605	0.194	0.5389
% RSD _{exp.}	1.316	0.659	1.312	1.598	0.547	1.536
Horwitz	1.546	1.546	1.546	1.546	1.546	1.546
HORRAT	0.851	0.426	0.849	1.034	0.354	0.993

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง

โดยใช้เทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) มีตัวตรวจจับ (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย Capillary column ชนิด HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 μm) มีสภาวะเครื่องการ ใช้งาน ดังนี้

Oven temperature	: 220 °C (3 min), 20 °C/min – 240 °C (14 min)
Injector temperature	: 270 °C
Detector temperature	: 270 °C
Split injection	: Split ratio 50 : 1
Carrier gas	: Helium 2.0 ml/min
Injection volume	: 1 μl
Run time	: 17 min

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.4 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ สารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง พบว่า ได้ค่าเฉลี่ย % recovery เท่ากับ 98.6 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98 – 102 % สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10%

สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.755 การตรวจสอบค่าความแข็งแกร่ง Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน เวลา (reproducibility) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.685 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.818 เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT ≤ 2

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานใน ห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ cypermethrin ตามแหล่งจำหน่าย
2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธี ตามมาตรฐาน

เอกสารอ้างอิง

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

สถาบันอาหาร. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี เอกสารประกอบการอบรม
สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. (อัดสำเนา)

Anonymous. 1993. **The Agrochemicals Handbook 3rd. ed.** The Royal Society of Chemistry
Cambridge, England.

Henriet J., A Martijn and H Povlsen. 1985. **CIPAC Handbook Vol. 1C : Analysis of Technical
and Formulated Pesticides.** Collaborative International Pesticides Analytical Council
Limited, Heffers Printers Ltd, Cambridge, England.