

## รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

-----

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร  
**กิจกรรม** : 1. การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร  
**กิจกรรมย่อย** : 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุดิบพืชทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง** : 1.5.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพิษ การเกษตร กลุ่มสารกำจัดแมลง Isoprocab  
: Method validation of Isoprocab in Insecticide Formulation
4. **คณะผู้ดำเนินงาน:** ทศนี จงกลาง                      กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร                      สปผ.  
   : อนุชา ผลไสว                                      กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร                                      สปผ.

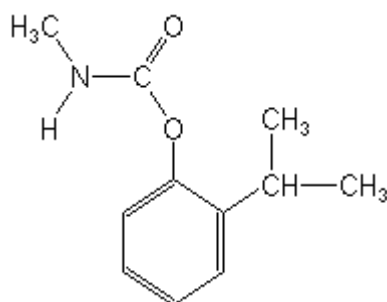
### 5. บทคัดย่อ

ด้วยวิธีวิเคราะห์ Isoprocab ที่มีใน CIPAC D ใช้การวิเคราะห์ โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) ใช้ n-hexane และ tetrahydrofuran เป็นตัวทำละลายและเป็นเฟสเคลื่อนที่ ใช้คอลัมน์ LiChrosorb Si 60, 250 x4.6 (i.d) mm, 7 ไมโครเมตร เป็นวิธีการที่ไม่สะดวกในการใช้งานจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นมาใหม่เพื่อให้สะดวกกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการและได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ

จากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Isoprocab ในผลิตภัณฑ์วัตถุพิษการเกษตร ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้ คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร film thickness 0.25 ไมโครเมตร อัตราของการ Split injection เท่ากับ 50 ต่อ 1 ปริมาตรของการฉีดตัวอย่างต่อครั้งเท่ากับ 1 ไมโครลิตร. อัตราการไหลของก๊าซตัวพา(Helium)เท่ากับ 1.9 มิลลิลิตรต่อนาที ชนิดของดีเทคเตอร์ที่ใช้คือ Flame ionization detector(FID) อุณหภูมิของสภาวะในการวิเคราะห์มีรายละเอียดดังนี้ อุณหภูมิของ Oven เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Injection เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ใช้ในการทำการศึกษาตรวจสอบความใช้ได้ของ

วิธีการวิเคราะห์ Isoprocarb โดยได้ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้ ค่า Range หรือปริมาณของสาร Isoprocarb ที่ได้จากการใช้สภาวะดังกล่าวในการวิเคราะห์ สามารถวิเคราะห์ได้ อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99990 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995 และให้ค่า Linearity หรือค่าความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสาร Isoprocarb ที่วิธีวิเคราะห์สามารถทำได้ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99993 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995, ผลการตรวจสอบค่า Precision หรือค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ Isoprocarb ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงสูตร WP ให้ค่า HORRAT ดังนี้ค่า Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.549, Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.225, Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.109 และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.758 ซึ่งทั้งหมดไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex และการตรวจสอบค่า Accuracy ของวิธีการวิเคราะห์ได้ผลของ % Recovery เท่ากับ 99.6 % ซึ่งอยู่ในช่วง 98 ถึง 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC

## 6. คำนำ



Isoprocarb มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC ว่า *o*-cumenyl methylcarbamate หรือ 2-isopropylphenyl methylcarbamate มีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น 2-(1-methylethyl)phenyl methylcarbamate จัดอยู่ในกลุ่ม Carbamate มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{11}H_{15}NO_2$  มีน้ำหนักโมเลกุล 193.2 จุดหลอมเหลว 88 ถึง 93 องศาเซลเซียส เป็นผลึกไม่มีสี เป็นสารกำจัดศัตรูพืช ประเภทออกฤทธิ์ในทางสัมผัสและกินตาย ใช้ควบคุมเพลี้ยจักจั่น เพลี้ยกระโดด เพลี้ยต่างๆ และแมลงต่างๆ ไป เป็นต้น ชนิดของสูตรผสมเช่น WP (wetable powder), DP (dustable powder), EC (Emulsifiable concentrate), GR(granules)มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ( $LD_{50}$  male rat, oral, acute) 485 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ( $LD_{50}$  mice, oral, acute) 487-512 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ( $LD_{50}$  rabbits ca., oral, acute) 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางผิวหนัง( $LD_{50}$  male rat) >500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีความเป็นพิษต่อปลา  $LD_{50}$  (48hours)<sub>carp</sub> 4.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเป็นพิษต่อผึ้ง (Agrochemicals Handbook, 1993)

การควบคุมคุณภาพของสารกำจัดศัตรูพืช ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 นั้น จะต้องตรวจวิเคราะห์ชนิดและสารออกฤทธิ์ ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุไว้บนฉลากหรือข้อมูลที่แสดงไว้ก่อนการขึ้นทะเบียนหรือไม่ และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช วิธีการตรวจวิเคราะห์ Isoprocarb นั้น มีวิธีมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council limited) แต่วิธีมาตรฐานนั้น

บางครั้งไม่สามารถทำตามได้ทั้งหมด และเพื่อเป็นการประหยัดงบประมาณ จึงจำเป็นต้องประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีใช้อยู่จริงในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีตามข้อกำหนด ISO 17025 เพื่อยืนยันว่าวิธีทดสอบที่นำมาใช้มีความถูกต้อง แม่นยำ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์

## 7. 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 ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร type A ขนาด 10, 250, 1,000 มิลลิเมตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. ปิเปต type A ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. vial ขนาด 2 มิลลิเมตร

### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Isoprocarb 99.0%
2. สาร Isoprocarb ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical grade)
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Isoprocarb 50% WG
4. Acetone AR grade

### วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Isoprocarb

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ดังนี้

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

Injector system : Injector Split injection

Split ratio : 50:1

Split flow : 100 ml/min

Injection volume : 1  $\mu$ l.

Detector : Flame ionization detector(FID)

Temperature : Oven temperature 200 °C

Injection temperature 250 °C

Detector temperature 250 °C  
 Gas flow rate : Helium (carrier) 1.9 ml/min  
 Hydrogen 30 ml/min  
 Air 400 ml/min  
 Nitrogen 30 ml/min

## 2. การหาปริมาณที่แน่นอนสารออกฤทธิ์ Isoprocarb (Technical grade)

### 2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Isoprocarb 2 ขั้ว ( C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> ) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### 2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

ชั่งสาร Technical grade 10 ขั้ว ( T<sub>1</sub>-T<sub>10</sub> ) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

### 2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

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

C<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>3</sub>,.....

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

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

### 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 Isoprocarb ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

P = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Isoprocarb (%)

$H_s$  = พื้นที่ใต้พีคของ Isoprocarb ในสารละลายมาตรฐาน

2.5 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ Isoprocarb ในสารละลาย Technical grade ดังสมการต่อไปนี้

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

$HW$  = พื้นที่ใต้พีคของ Isoprocarb ในสารละลาย Technical grade

$F$  = ค่าเฉลี่ย response factor

$W$  = น้ำหนักของ Isoprocarb ในสารละลาย Technical grade

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

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linear) ของวิธีการ

3.1 ตรวจสอบช่วงของการวัด(Range)

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ช้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ Isoprocarb ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด 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 พิจารณช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

3.2.1 เลือกค่าจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มี 6 ความเข้มข้น ตามที่เลือกดังนี้ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 และ 15.0 มิลลิกรัม Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด 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 ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน)

4.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการใช้งาน (ภายใน range ที่ทำได้ จากข้อ 3) จำนวน 3 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ ได้แก่ 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 ชั่งสาร Isoprocarb ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการใช้งาน (ภายใน range ที่ทำได้ จากข้อ 3) จำนวน 3 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ ได้แก่ 5.0, 10.0 และ 15.0 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดยาละลายในข้อ 4.1.1, 4.1.2 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Isoprocarb ในสารละลายของผลิตภัณฑ์

4.2 Reproducibility (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Reproducibility ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการในระยะเวลาที่แตกต่างกัน) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4

## 5. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีการ

5.1 Robustness (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Robustness ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการแต่เปลี่ยน Oven) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4

5.2 Ruggedness (เป็นการทำการทดลองหา Precision ในรูปของ Ruggedness ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการแต่เปลี่ยนเครื่อง) ทำการทดลองเหมือนข้อ 4

## 6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ 5 มิลลิกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสาร Technical grade ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1,258.8 มิลลิกรัม ใส่ในขวด Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย Stock Sample ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ 1 มิลลิกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อมิลลิลิตร การเตรียมสารละลายทำเหมือนข้อ 6.1 ด้วยการชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Isoprocarb ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1996.8 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

### 6.3 เตรียมสารละลายเพื่อ Plot กราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) ปริมาตร 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของ Technical grade ที่มีความ

เข้มข้นของ Isoprocarb เป็น 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC โดยเรียงลำดับตามความเข้มข้น

#### 6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Isoprocarb เทียบกับกราฟ(ข้อ 6.3)

#### 6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

6.5.1 ปิเปตสารละลาย Stock Sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) ปริมาตร 1, 2 และ 3 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ที่มี Stock Sample (ข้อ 6.5.1) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Isoprocarb เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.3)

#### 6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

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

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

#### 7. การหา Specificity / selectivity

ทดลองโดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่างของ Isoprocarb และ blank เข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization(FID) พิจารณา Chromatogram ว่ามีสารอื่นแปลกปลอมมารบกวนสารออกฤทธิ์ของ Isoprocarb หรือไม่

**ระยะเวลา** เริ่มเดือนตุลาคม 2554 และสิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

#### **สถานที่ทำการทดลอง**

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

### **8. ผลการทดลองและวิจารณ์**

#### 1. ผลการหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade

ผลการประเมินค่า เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Technical grade และค่า % Relative Percent Different (RPD) ของสารมาตรฐานได้ผลดังนี้

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Technical grade และค่า % Relative Percent Different (RPD) ของสารมาตรฐาน

สารละลาย Technical grade	%ของสาร Technical grade	std. sol.	mg	Area of STD.	%RPD
T 1	99.75	C1	10.1	274.1274	0.726
		C2	10.2	278.8584	
T 2	99.43	C1	10.1	271.5646	1.690
		C2	10.2	269.6579	
T 3	98.90	C1	10.1	273.1817	1.536
		C2	10.2	280.1566	
T 4	99.72	C1	10.1	272.1902	0.283
		C2	10.2	275.6629	
T 5	99.78	C1	10.1	272.2920	1.942
		C2	10.2	280.3806	
T 6	98.58	C1	10.1	268.4791	1.977
		C2	10.2	276.6518	
T 7	99.20	C1	10.1	276.0327	0.302
		C2	10.2	277.9259	
T 8	99.66	C1	10.1	276.0327	0.166
		C2	10.2	278.3026	
T 9	99.96	C1	10.1	276.0327	0.644
		C2	10.2	276.9750	
T 10	99.74	C1	10.1	276.0327	0.920
		C2	10.2	281.3416	
เฉลี่ย	99.5%				

จากตารางที่ 1 เมื่อกำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณของสาร Technical grade ที่ตรวจได้ทั้ง 10 ค่า จะได้เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade เท่ากับ 99.5% ได้ค่า SD เท่ากับ 0.445 ค่า %RSD เท่ากับ 0.447 และเมื่อหาค่า Relative Percent Different (RPD) แล้ว สารละลายมาตรฐานทั้ง 2 มีค่าไม่เกิน 3%

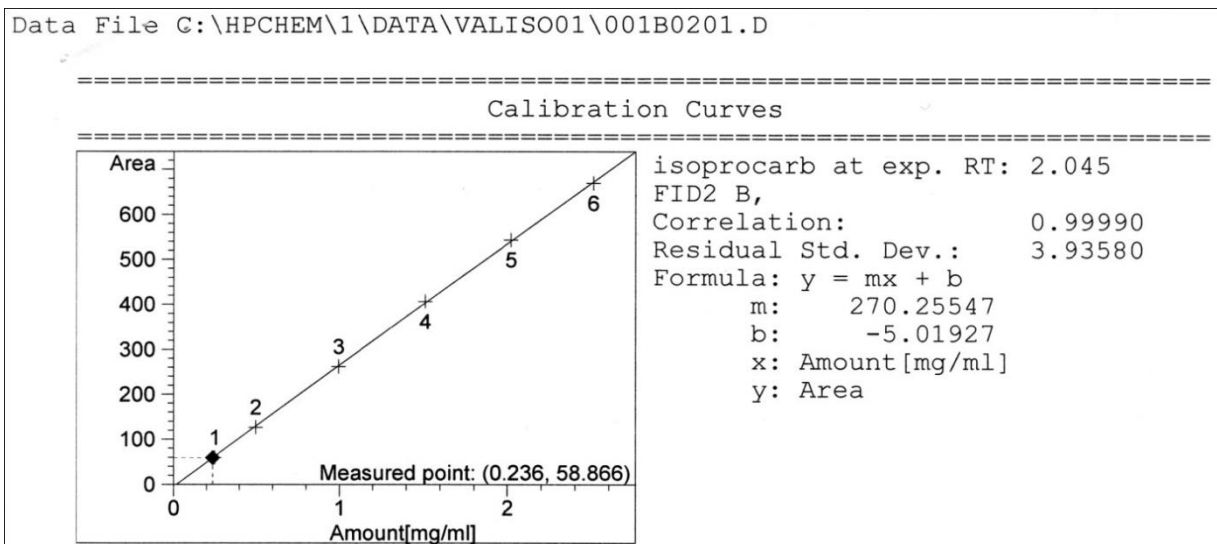


2. ผลการศึกษาช่วงของการวัด (Range) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของ Isoprocarb

การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.25 - 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Isoprocarb	
mg/ml	Area
0.25	58.8656
0.50	126.5092
1.00	261.2967
1.50	406.9307
2.00	543.8604
2.50	670.0576

รูปภาพที่ 1 แสดง Calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของ Isoprocarb



จากการทดลองหาช่วงของการวัด Isoprocarb ได้ Range มีค่า 0.25 - 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.99990

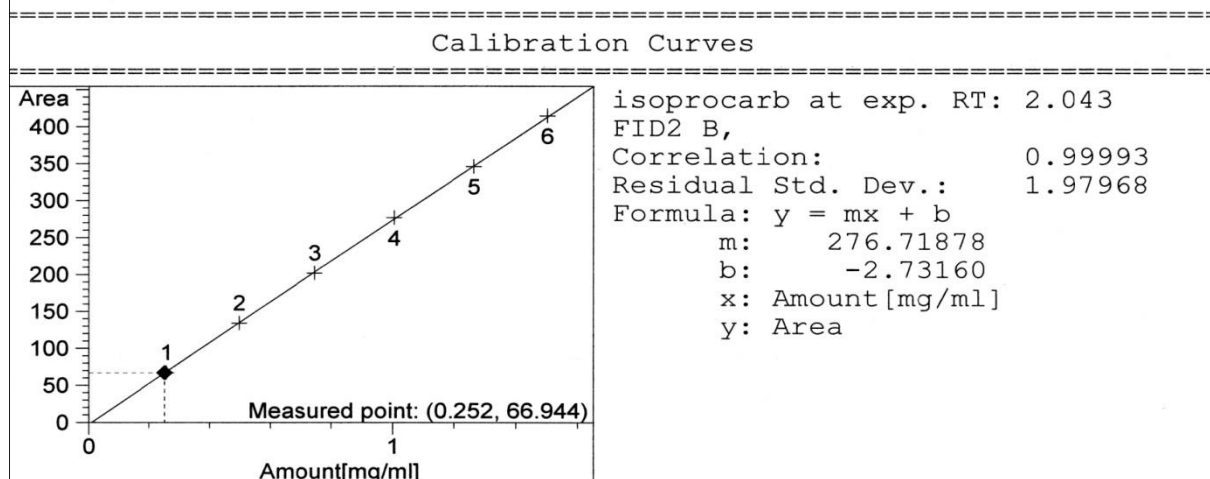
3. ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของ Isoprocarb

การหา Linearity ที่ความเข้มข้น 0.25 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Isoprocarb	
mg/ml	Area
0.25	66.9435
0.50	134.1345
0.75	201.8804
1.00	276.7800
1.25	346.2293
1.50	414.1735

รูปภาพที่ 2 แสดง Calibration curves ของการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของ Isoprocarb

File G:\HPCHEM\1\DATA\VALISO01\021B2302.D



จากการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของ Isoprocarb ได้ Linearity มีค่า 0.25 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ค่า Correlation coefficient ( $r$ ) = 0.99993

ตารางที่ 4 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	9.9	51.16	19.9	50.00	29.9	49.21
2	9.9	51.57	19.9	50.17	29.9	51.62
3	9.9	49.73	20.0	51.10	29.9	49.92
4	10.0	48.51	20.0	50.74	30.0	51.29
5	10.0	48.48	20.0	52.18	30.0	50.74
6	10.1	50.25	20.0	51.24	30.0	51.55
7	10.1	50.62	20.0	52.21	30.0	51.86
8	10.1	51.03	20.1	52.34	30.0	52.28
9	10.1	50.80	20.1	52.55	30.1	51.95
10	10.1	49.33	20.2	52.40	30.1	52.22
mean		50.15		51.49		51.26
SD		1.095		0.966		1.507

จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 50.97 \quad SD = 1.157$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

ตัวอย่างการคำนวณเช่น  $\% RSD = \frac{1.157 \times 100}{50.97} = 2.270$

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

C = Concentration ration

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

$$= 0.66 \times 2.219931 = 1.465$$

$$HORRAT = \frac{2.270}{1.465} = 1.549$$

จากการตรวจสอบหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 1.549  
เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT มีดังนี้

AOAC ยอมรับค่า HORRAT ต้องไม่เกิน 2

EU, Codex ยอมรับค่า HORRAT ต้องไม่เกิน 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Isoprocarb ให้ผลการทดสอบค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

**ตารางที่ 5** 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	9.9	50.37	19.91	49.28	29.82	49.51
2	9.9	50.55	19.9	50.61	29.8	51.19
3	10.0	50.47	20.0	49.71	29.9	49.04
4	10.0	49.16	20.0	49.13	29.9	49.38
5	10.0	49.16	20.0	50.0	30.0	51.78
6	10.1	49.44	20.2	49.43	30.0	50.44
7	10.0	49.72	20.0	49.68	30.0	50.87
8	10.1	49.10	20.0	48.05	30.0	51.85
9	10.1	49.26	20.11	50.49	30.1	51.44
10	10.14	49.81	20.2	49.65	30.1	51.74
mean		49.70		49.60		50.72
SD		0.523		0.728		1.006

จากการตรวจสอบหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 1.225

**ตารางที่ 6** การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทวนซ้ำ (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	9.9	48.92	19.9	50.72	29.8	50.47
2	10.0	50.67	19.9	50.21	29.9	51.32
3	10.0	50.18	19.9	50.04	29.95	51.20
4	10.1	48.82	20.0	50.93	30.0	52.07
5	10.0	50.37	20.0	51.06	30.0	51.81
6	10.1	51.43	20.0	51.53	30.0	50.32
7	10.1	50.91	20.0	51.52	30.0	51.13
8	10.1	51.58	20.0	51.74	30.0	52.43
9	10.1	50.43	20.1	51.55	30.1	52.91
10	10.14	51.53	20.1	51.50	30.1	51.60
mean		50.58		37.61		51.52
SD		0.837		0.707		0.602

จากการตรวจสอบหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 1.109

**ตารางที่ 7** 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	9.9	48.79	19.9	50.07	29.9	50.62
2	9.9	49.46	20.0	49.36	30.0	50.36
3	10.0	50.36	20.0	49.68	30.0	49.60
4	10.0	49.51	20.0	49.25	30.0	50.09
5	10.1	49.13	20.0	49.48	30.0	49.66
6	10.1	49.45	20.1	49.88	30.0	50.23
7	10.1	48.93	20.1	49.00	30.0	50.09
8	10.1	49.01	20.1	49.70	30.1	50.17
9	10.1	49.01	20.1	49.68	30.1	50.63
10	10.1	49.04	20.2	50.43	30.1	50.48
mean		49.27		49.65		50.19
SD		0.454		0.413		0.356

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 0.758

ตารางที่ 8 ตรวจสอบ % Recovery ของ Isoprocab

ครั้งที่	AI content (mg / 10 ml)								
	Conc. Added (5.010024 mg/10ml)			Conc. Added (10.020048mg/10ml)			Conc. Added (15.030072mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	4.0364	9.1876	5.010024	4.18	14.5621	10.020048	4.18	19.3184	15.03007
2	4.0753	8.8776	5.010024	4.06	14.0454	10.020048	4.17	19.3185	15.03007
3	4.0477	9.0425	5.010024	4.04	14.3629	10.020048	4.08	19.4415	15.03007
4	3.9926	9.1083	5.010024	4.03	13.9561	10.020048	4.14	19.3186	15.03007
5	4.0117	9.1066	5.010024	4.06	14.0570	10.020048	4.19	19.3411	15.03007
6	3.9482	9.2480	5.010024	4.16	14.5870	10.020048	4.15	19.0227	15.03007
7	4.0920	8.9722	5.010024	4.08	14.0611	10.020048	4.10	19.3452	15.03007
8	4.0697	8.9228	5.010024	4.01	14.2502	10.020048	4.07	19.257	15.03007
9	4.0237	9.2682	5.010024	4.15	14.3621	10.020048	4.05	19.4421	15.03007
10	4.0515	9.1722	5.010024	4.02	14.2501	10.020048	4.07	19.1711	15.03007

mean	4.03	9.09	5.01	4.08	14.25	10.02	4.12	19.30	15.03
SD	0.043	0.134		0.061	0.220		0.052	0.125	
% RSD	1.061	1.479		1.501	1.547		1.271	0.647	
%Recovery			100.9			101.5			101.0

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

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นต่ำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{9.09 - 4.03}{5.01} \times 100 = 100.9$$

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นกลาง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{14.25 - 4.08}{10.02} \times 100 = 101.5$$

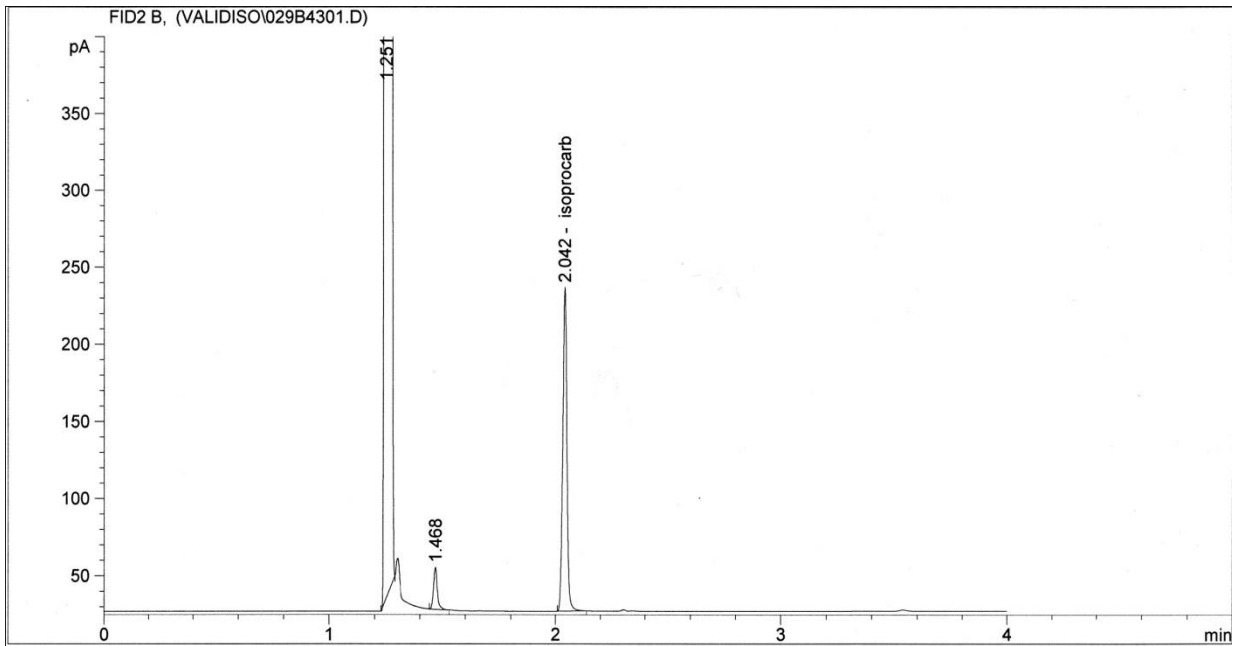
$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นสูง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{19.30 - 4.12}{15.03} \times 100 = 101.0$$

$$\% \text{ Recovery เฉลี่ย} = 101.1$$

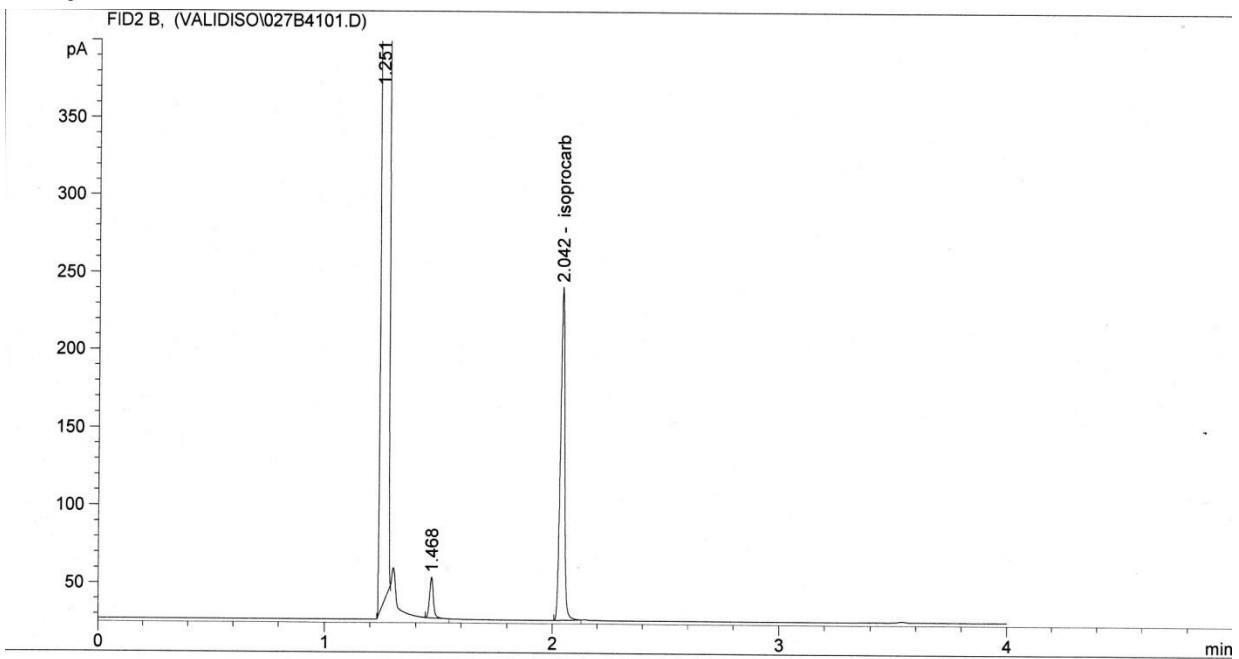
ผลจากการประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการจากตารางที่ 7 พบว่า เปอร์เซ็นต์ Recovery ของ Isoprocarb ที่ปริมาณ spike sample 0.9 mg/ml มีความถูกต้องมากที่สุดและเปอร์เซ็นต์ Recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้ร้อยละ 101.1 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC

#### 6.ผลการศึกษา Specificity / selectivity

**รูปภาพที่ 3** แสดง Chromatogram ของสารมาตรฐาน



รูปภาพที่ 4 แสดง Chromatogram ของสารตัวอย่าง



จากรูปภาพที่ 3 และ 4 Chromatogram ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง Isoprocarb จะเห็นว่าไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ Isoprocarb แสดงว่า วิธีนี้มี Specificity และ selectivity ดี

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ



จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Isoprocarb โดยวิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ได้สถานะที่เหมาะสม ดังนี้

Column	:	Capillary, HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane)
		30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 um, film thickness
Split injection	:	Split ratio : 50:1      Injection volume : 1 ul.
Detector	:	Flame ionization detector (FID)
Temperature	:	Colum oven : 200 °C
		Injection port : 250 °C
		Detector : 250 °C

จากการนำสถานะดังกล่าวมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ Isoprocarb ให้ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ดังนี้

ค่า Rang หรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99990 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

ค่า Linearity หรือความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิเคราะห์ทดสอบ สามารถทำได้ อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) = 0.99993 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

การตรวจสอบค่า Precision ได้ผลดังนี้ Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.549, Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.225, Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.109, Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.758 ซึ่งทั้งหมดไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

การตรวจสอบค่า Accuracy ของวิธีการได้ % Recovery เท่ากับ 101.1% ซึ่งอยู่ในช่วง 98 ถึง 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ Isoprocarb ได้อย่างถูกต้อง

## 10. การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองที่ได้นำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ Isoprocarb ในผลิตภัณฑ์วัตถุดิบพืชการเกษตร เพื่อการควบคุมคุณภาพตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535

วิธีวิเคราะห์ที่ได้ศึกษานี้ สามารถถ่ายทอดให้แก่หน่วยงานราชการอื่นๆ และหน่วยงานเอกชนที่จะนำไปใช้ในการตรวจ Isoprocarb เพื่อการควบคุมคุณภาพในการผลิตและจำหน่ายต่อไป

## 11. เอกสารอ้างอิง

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

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

ดุขฎฐี มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี  
(Chemical Method Validation) เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

นรินาม. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย.กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร.  
กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นรินาม. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี.เอกสารประกอบการอบรม  
สัมมนาวิชาการ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร.สถาบันอาหาร.

Kidd,H.and D.R.James (Eds).1993.The Agrochemicals Handbook.3<sup>rd</sup>.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.