

## รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

-----

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร  
**กิจกรรม** : 1. การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร  
**กิจกรรมย่อย** : 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุดิบพืชการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง** : 1.5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืช การเกษตรสารกำจัดโรคพืช  
**Prochloraz**  
**ชื่อการทดลอง** : Method Validation of Prochloraz in Pesticide Products
4. **คณะผู้ดำเนินงาน** : ดวงรัตน์ วิชาสินี กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร สปผ.  
: มนัสนันท์ อรชุน กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร สปผ.

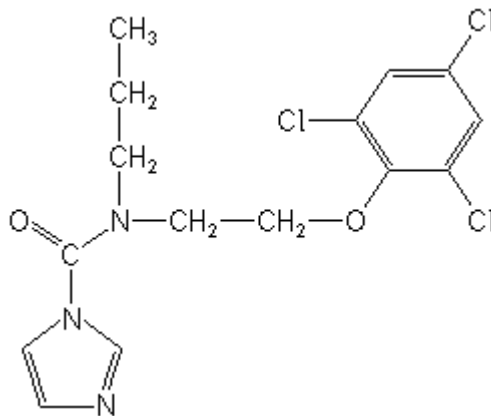
### 5. บทคัดย่อ

เนื่องด้วยวิธีวิเคราะห์ Prochloraz ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นมาเพื่อปรับใช้ตามเครื่องมืออุปกรณ์ที่มีอยู่ และเพื่อสอดคล้องกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการที่จะได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Prochloraz ได้วิธีที่เหมาะสมดังนี้ ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GLC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) มีสถานะดังนี้ ใช้คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร film thickness 0.25 ไมโครเมตร, Split injection split ratio 50 : 1, ก๊าซตัวพา (He) อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที, อุณหภูมิห้อง 180 องศาเซลเซียสและคงไว้เป็นเวลา 2 นาที จึงค่อยเพิ่มอุณหภูมิ ขึ้น 10 องศาเซลเซียสต่อ 1 นาที จนอุณหภูมิสูงถึง 280 องศาเซลเซียสให้คงไว้อีก 5 นาที, Injector อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียสและ Detector อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส ได้ทำการพิสูจน์ ความใช้ได้ของวิธี ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ โดยมี Range อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.685, 1.688, 1.946, 2.512, 2.751, 2.969 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9998 และ Linearity 1.182, 1.688, 1.768, 1.946, 2.264, 2.512 mg/ml และ Linearity ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r)  $\geq$  0.995 Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.652526, Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT =

1.973 Robustness ได้ค่า HORRAT = 1.870899 Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 2.000 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC ,EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ร้อยละ 99.39 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1 % แต่น้อยกว่า 100 % ของ AOAC

## 6. คำนำ

โปรคลอราซ (Prochloraz) มีชื่อทางเคมีว่า *N*-propyl-*N*-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazole-1-carboxamide (IUPAC) มีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$  ประโยชน์ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชเช่น โรคใบจุดสีดำในกุหลาบ โรคใบจุดสีม่วง และโรคแอนแทรคโนส



## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane ( HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 25, 200 และ 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. ปิเปตชนิด type A ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร

### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Prochloraz 99.3 %

2. สาร Prochloraz ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical grade) ใช้แทนสารมาตรฐาน
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Prochloraz 45% EC
4. Acetone ชนิด AR grade

## วิธีการ

### 1.การปรับสภาวะเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization

การเตรียมสภาวะของเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Prochloraz ดังนี้

อุณหภูมิ oven	:	180 องศาเซลเซียส คงไว้ 2 นาทีแล้วเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที จนถึง 280 องศาเซลเซียส คงไว้ 5 นาที
คอลัมน์ชนิด	:	Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ injector	:	280 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ detector	:	280 องศาเซลเซียส
Split ratio	:	50 : 1
Injection volume	:	1.0 ไมโครลิตร
ก๊าซตัวพา	:	He อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H <sub>2</sub> อัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที
	:	Air อัตราการไหล 450 มิลลิลิตรต่อนาที
Make up gas	:	N <sub>2</sub> อัตราการไหล 45.0 มิลลิลิตรต่อนาที

และทดสอบความพร้อมของเครื่องด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GLC ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2% จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์

### 2.ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จำเป็นต้องดำเนินการหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เพื่อนำมาใช้ทดแทน สารมาตรฐานซึ่งมีราคาแพงมาก โดยชั่งสารมาตรฐาน Prochloraz 2 ซ้ำ (Ca1, Ca2) ให้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone 5 มิลลิลิตร ลงใน Volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เป็นอย่างดี

ชั่งสาร Technical grade 10 ซ้ำ (TC1-TC10) ให้น้ำหนักของ สารออกฤทธิ์ประมาณ 100 มิลลิกรัมใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Acetone 50 มิลลิลิตร ลงใน

Volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5-10 นาทีจากนั้น นำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรที่ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การฉีดสารมาตรฐาน Prochloraz และสาร Technical grade เข้าเครื่อง GLC โดยตั้ง sequence ในการ ฉีดดังนี้ Ca1, TC1, TC2, Ca2, TC3, TC4, Ca1, TC5, TC6, Ca2...TC10 แล้วฉีด สารเข้าเครื่อง 1 ไมโครลิตร โดยการฉีดความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

การฉีดสารเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) โดยฉีด สารละลายมาตรฐานซ้ำกันหลายๆครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 1 % จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

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 Prochloraz ในสารมาตรฐาน  
 $S$  = น้ำหนักของ Prochloraz ในสารละลายมาตรฐาน (mg)  
 $P$  = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Prochloraz (%)

หาเปอร์เซ็นต์ของสาร Technical grade จากสูตรดังนี้

$$\text{Prochloraz content} = \frac{H_w}{f \times w}$$

- $H_w$  = พื้นที่ใต้ peak ของ Prochloraz ในสารละลาย Technical grade  
 $f$  = ค่าเฉลี่ย response factor  
 $w$  = น้ำหนักของ Prochloraz ในสารละลาย Technical grade (mg)

### 3.ตรวจสอบช่วงของการวัด( Range )

ซึ่งสารมาตรฐานที่ทราบเปอร์เซ็นต์ Prochloraz ที่แน่นอน (99.3 %) ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ 6 ความเข้มข้นๆครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน เช่น 0.685, 1.688, 1.946, 2.512, 2.750, 2.969 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยซึ่งสารมาตรฐาน Prochloraz ปริมาณ 6.9, 17.0, 19.6, 25.3, 27.7, 29.9 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตรแล้ว เติม acetone 20 มิลลิลิตรเขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม acetone จนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade กับ response พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

#### 4.ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง ( Linearity )

เลือกความเข้มข้นจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้นให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงที่ใช้งานจริงคือความเข้มข้นที่ 0.685, 1.688, 1.946, มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมช่วงความเข้มข้นให้ละเอียดขึ้นเป็น 6 ความเข้มข้น โดยชั่งสาร มาตรฐาน Prochloraz ปริมาณ 11.9, 17.0, 17.8, 19.6, 22.8, 25.3 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetone 20 มิลลิลิตร เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade กับ response พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

#### 5.ตรวจสอบความแม่นยำ ( Precision )

ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 50, 80 และ 120 มิลลิกรัม ( $\pm 20.1$  มิลลิกรัม) เนื่องจากเป็นช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization

ทำ Calibration Curve โดยชั่งสารมาตรฐาน Prochloraz น้ำหนัก 11.9, 17.8, 25.3 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณ สารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization

คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และ HORRAT โดยต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

$$C = \text{Concentration ratio}$$

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC	ยอมรับ	HORRAT	≤ 2
EU, Codex	ยอมรับ	HORRAT	< 2

## 6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Prochloraz โดยชั่งสาร Prochloraz ชนิด technical grade (99.3%) ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย acetone ประมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน (Stock tech ประมาณ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization

เตรียมสารละลายตัวอย่าง Prochloraz ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Stock sample) โดยชั่ง Prochloraz (sample) น้ำหนักประมาณ 9780.8 มิลลิกรัมใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย acetone ประมาณ 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5-10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization

ทำ Calibration Curve โดยชั่งสารมาตรฐาน Prochloraz (Stock tech) ปริมาตร 11.9, 17.0, 25.3 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย acetone ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย สารละลาย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization

เตรียมสารละลาย original sample ของ Prochloraz ในสารตัวอย่าง โดยดูดสารละลาย Stock sample ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ (ทำ 3 ชุด รวม 30 ชุด) นำมาละลายด้วย acetone ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization

เตรียมสารละลาย Spike sample โดยดูดสารละลาย Stock tech ปริมาตร 1,2,4 มิลลิลิตร และดูดสารละลาย Stock sample ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตรจำนวน 10 ซ้ำ (ทำ 3 ชุด รวม 30 ชุด) นำมาละลายด้วย acetone ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้า

กัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz โดยวิธี external standardization ประเมินค่า Accuracy จากค่า % recovery ดังนี้

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

$A_{\text{spike}}$  = ปริมาณ Prochloraz ในสารละลาย Spike

$A_{\text{origin}}$  = ปริมาณ Prochloraz ในสารละลาย Origin

$A_{\text{add}}$  = ปริมาณ Prochloraz ที่เติมลงในสารละลาย Spike

### 7. การหา Specificity / selectivity

ทดลองโดยฉีดสารมาตรฐานของ Prochloraz สารละลายตัวอย่างและ blank เข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) พิจารณา Chromatogram ที่ดูว่ามีสารอื่น แปรปลอมมารบกวนสารออกฤทธิ์ Prochloraz หรือไม่

### 8. การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness

โดยวิเคราะห์หาปริมาณ Prochloraz ด้วยเครื่อง Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame ionization (FID) โดยใช้คอลัมน์ ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 0.25 ไมโครเมตร นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Prochloraz มาคำนวณ ค่าเฉลี่ย ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ HORRAT

ระยะเวลา ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

## 8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. ผลการหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade

เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร Technical grade Prochloraz เทียบกับสารมาตรฐานได้ค่า 99.3 % ค่า %RSD คือ 0.512 เกณฑ์ยอมรับ %RSD คือ  $\leq 2$  ฉะนั้นอยู่ในช่วงยอมรับได้จึงสามารถนำไปใช้แทนสารมาตรฐาน สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Prochloraz ได้

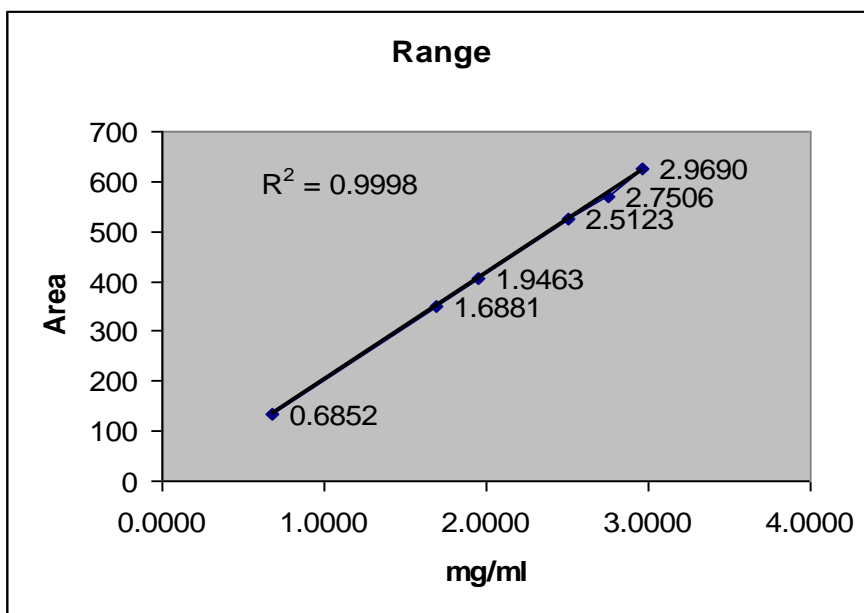
**ตารางที่ 1** เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Technical grade

สารละลาย Technical grade	เปอร์เซ็นต์ของสาร Technical grade
TC1	96.86
TC2	95.74
TC3	95.45
TC4	96.09
TC5	96.93
TC6	96.60
TC7	95.93
TC8	97.15
TC9	97.19
TC10	96.95
<b>เฉลี่ย</b>	96.489
<b>SD.</b>	0.632235
<b>%RSD</b>	0.655241



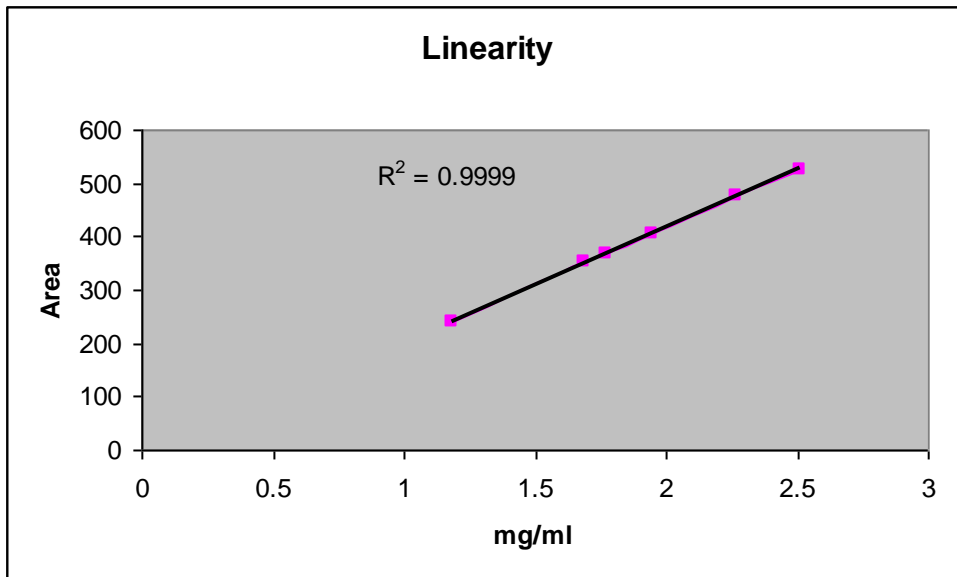
## 2. ผลการศึกษาช่วงของการวัด ( Range )

พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของ Range ในช่วงความเข้มข้น 0.685, 1.688, 1.946, 2.512, 2.751, 2.969 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient ( r ) = 0.9998 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient ( r )  $\geq$  0.995



## 3. ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

Linearity ที่ความเข้มข้นที่ 1.182, 1.688, 1.768, 1.946, 2.264, 2.512 mg/ml ของ Prochloraz Linearity ได้ค่า correlation coefficient ( r ) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient ( r )  $\geq$  0.995



ตารางที่ 2 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	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ
1	67.4	43.60	75.4	42.65	136.8	42.87
2	52.5	43.00	90.8	43.54	132.9	43.05
3	54.7	43.02	84.7	42.91	133.6	43.08
4	54.4	43.36	84.3	43.55	119.4	43.85
5	65.6	43.02	86.7	43.47	127.4	43.36
6	53.7	43.17	83.7	43.79	133.2	42.86
7	54.6	43.49	87.0	44.09	128.1	42.71
8	56.0	44.36	90.6	43.52	131.9	43.62
9	53.2	43.54	82.7	44.16	126.2	43.55
10	53.0	43.55	91.2	43.25	119.8	43.23
mean		43.41		43.49		43.22
SD		0.40995		0.47154		0.37107

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 43.37 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.42132$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{\bar{X}}{43.37} \times 100 = 0.971334$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD}_{\text{Predic}} &= 0.66 \times 2^{1-0.5 \log C} \\ \text{sample 45\%} &= \log 0.45 \\ \log 0.45 &= -0.34678 \\ &= 0.66 \times 2^{1-(-0.173393743)} \\ &= 0.66 \times 2^{1.173393743} \\ \% \text{RSD}_{\text{Predic}} &= 1.488575 \end{aligned}$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = 0.652526$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.652526

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

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Prochloraz ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3 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	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ
1	61.0	49.01	77.0	44.49	116.8	44.22
2	68.2	44.98	77.7	44.69	119.6	43.72
3	64.5	45.22	99.5	44.16	119.3	43.43
4	60.0	45.76	84.4	44.27	121.4	43.57
5	64.1	45.00	92.9	45.25	128.1	43.32
6	61.1	45.58	96.8	43.90	128.0	43.83
7	67.0	44.84	96.0	44.31	125.4	42.71
8	74.0	45.03	99.9	43.41	125.8	43.10
9	74.2	44.41	98.6	43.28	125.5	43.11
10	74.5	45.09	79.8	43.67	116.8	42.48
mean		45.49		44.14		43.35
SD		1.29132		0.60221		0.52319

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 42.49 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 1.248677$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{1.248 \times 100}{42.49} = 2.939003$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD}_{\text{Predic}} &= 0.66 \times 2^{1-0.5 \log C} \\ \text{sample } 45\% &= \log 0.45 \\ \log 0.45 &= -0.34678 \\ &= 0.66 \times 2^{1-(-0.173393743)} \\ &= 0.66 \times 2^{1.173393743} \\ \% \text{RSD}_{\text{Predic}} &= 1.488575 \end{aligned}$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

$$\text{HORRAT} = \frac{2.939}{1.488} \quad \text{ได้ค่า} = 1.973$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 1.973

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

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Prochloraz ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4 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	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ

1	67.4	44.00	75.4	42.45	136.8	42.32
2	52.5	44.42	90.8	41.82	132.9	42.44
3	54.7	43.60	84.7	41.93	133.6	42.35
4	54.4	43.10	84.3	41.54	119.4	41.75
5	65.6	43.23	86.7	42.34	127.4	41.14
6	53.7	43.36	83.7	44.83	133.2	41.37
7	54.6	43.16	87.0	42.35	128.1	40.94
8	56.0	44.27	90.6	43.27	131.9	41.04
9	53.2	42.84	82.7	43.88	126.2	41.18
10	53.0	43.53	91.2	42.32	119.8	40.26
mean		43.55		42.67		41.48
SD		0.52592		1.02159		0.71770

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 44.33 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 1.23487$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{1.23487 \times 100}{44.33} = 2.785769$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD}_{\text{Predic}} &= 0.66 * 2^{1-0.5 \log C} \\ \text{sample } 45\% &= \log 0.45 \\ \log 0.45 &= -0.34678 \\ &= 0.66 * 2^{1-(-0.173393743)} \\ &= 0.66 * 2^{1.173393743} \end{aligned}$$

$$\% \text{RSD}_{\text{Predic}} = 1.488575$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = 1.870899$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 1.870899

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

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Prochloraz ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 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	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ
1	61.0	45.91	77.0	44.80	116.8	43.34
2	68.2	46.51	77.7	45.03	119.6	42.63
3	64.5	46.29	99.5	43.91	119.3	42.65
4	60.0	45.99	84.4	44.02	121.4	43.12
5	64.1	46.31	92.9	45.29	128.1	42.66
6	61.1	45.78	96.8	44.00	128.0	43.15
7	67.0	46.44	96.0	44.10	125.4	43.17
8	74.0	46.16	99.9	44.11	125.8	43.05
9	74.2	45.48	98.6	43.69	125.5	43.05
10	74.5	46.13	79.8	44.42	131.5	43.94
mean		46.10		44.34		43.08
SD		0.31601		0.528947		0.392218

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 44.50 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 1.325565$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% RSD (\text{experimental}) = \frac{1.325 \times 100}{44.50} = 2.978478$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_{\text{Predic}} = 0.66 \cdot 2^{1-0.5 \log C}$$

$$\text{sample } 45\% = \log 0.45$$

$$\log 0.45 = -0.34678$$

$$= 0.66 * 2^{1 - (-0.173393743)}$$

$$= 0.66 * 2^{1.173393743}$$

$$\%RSD_{\text{Predic}} = 1.488575$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = 2.000$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 2.000

### 5.ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

ตารางที่ 6 ตรวจสอบ % Recovery									
N	Al content ( mg / 25 ml )								
	Conc. added 3.0 mg			Conc. added 6.0 mg			Conc. added 12.0 mg		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	18.86	22.02	3.00	19.22	24.99	6.00	18.81	30.53	12.00
2	18.88	22.01	3.00	19.05	24.83	6.00	19.05	31.27	12.00
3	19.07	22.21	3.00	19.12	25.28	6.00	19.20	30.96	12.00
4	19.37	22.32	3.00	18.94	24.81	6.00	18.93	30.59	12.00
5	19.31	22.18	3.00	18.93	24.76	6.00	19.12	30.56	12.00
6	19.06	22.05	3.00	19.11	25.02	6.00	18.91	30.43	12.00
7	18.89	22.06	3.00	19.02	24.93	6.00	18.89	30.54	12.00
8	19.46	22.48	3.00	19.03	24.96	6.00	18.98	30.75	12.00
9	19.15	22.21	3.00	19.18	24.97	6.00	18.96	30.89	12.00
10	19.11	22.22	3.00	19.00	24.88	6.00	18.97	30.99	12.00
mean	19.12	22.18	3.00	19.06	24.94	6.00	18.98	30.75	12.00
SD	0.211	0.148		0.123	0.171		0.114	0.297	
%RSD	1.104	0.667		0.645	0.686		0.601	0.966	
%Recovery			102.0			98.05			98.07

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

$$\%Recovery \text{ ที่ความเข้มข้น ต่ำ} = \frac{22.18 - 19.12}{3.00} \times 100 = 102.0$$

$$\% \text{Recovery ที่ความเข้มข้น กลาง} = \frac{24.94 - 19.06}{6.0} \times 100 = 98.05$$

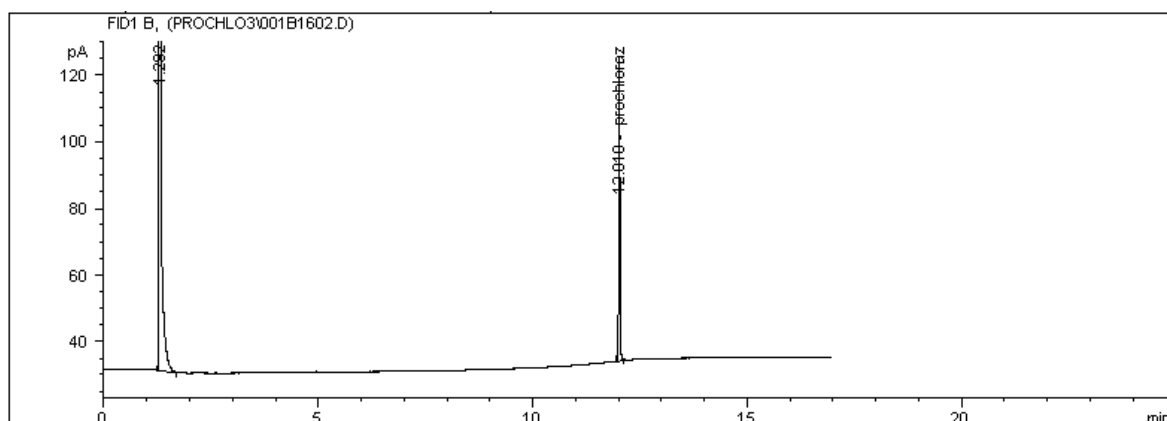
$$\% \text{Recovery ที่ความเข้มข้น สูง} = \frac{30.75 - 18.98}{12.0} \times 100 = 98.07$$

$$\% \text{Recovery เฉลี่ย} = 99.62$$

เกณฑ์ยอมรับ 98 – 102

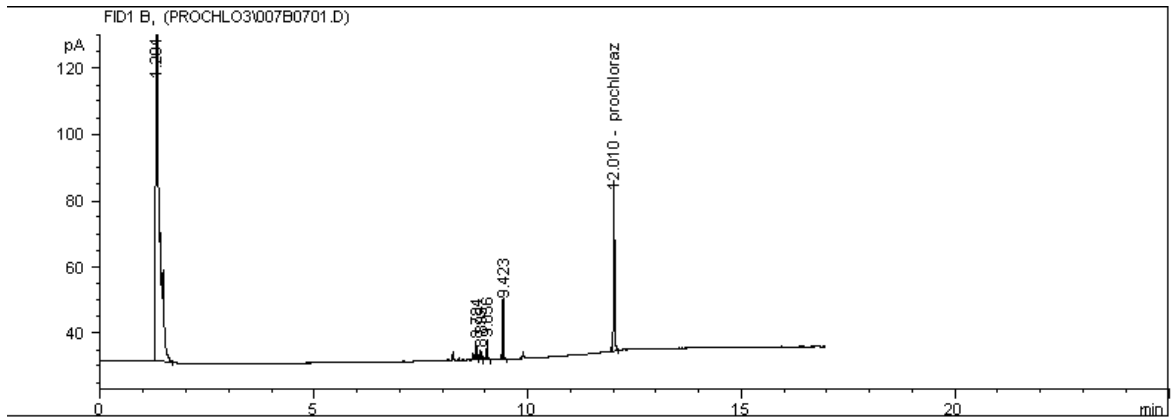
ผลจากการประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการจากตารางที่ 4 พบว่า เปอร์เซ็นต์ Recovery ของ Prochloraz ที่ปริมาณ spike sample 6.0 mg มีความถูกต้องมากที่สุดและเปอร์เซ็นต์ Recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้ร้อยละ 99.39 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1 % แต่ต่ำกว่า 100 % ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ เปอร์เซ็นต์ Prochloraz ได้อย่างถูกต้อง

#### 6.ผลการศึกษา Specificity / selectivity



รูปที่ 1 Chromatogram of Standard solution





รูปที่ 2 Chromatogram of Sample solution

จาก Chromatogram ของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง Prochloraz จะเห็นว่าไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ Prochloraz แสดงว่า วิธีนี้มี Specificity และ selectivity ดี

## 9. สรุปผลการทดลอง

ผลของการศึกษาครั้งนี้ Range ในช่วง 0.685, 1.688, 1.946, 2.512, 2.751, 2.969 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.9998 และ Linearity ที่ 1.182, 1.688, 1.768, 1.946, 2.264, 2.512 mg/ml ของ Prochloraz Linearity ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq$  0.995 Precision โดยใช้ HORRAT ได้ค่า = 0.652526 เกณฑ์ยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ HORRAT  $\leq$  2 EU และ Codex ยอมรับ HORRAT  $<$  2 ประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ จากค่า เปอร์เซนต์ recovery เฉลี่ย ได้ร้อยละ 99.39 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1 % แต่ไม่น้อยกว่า 100 % ของ AOAC สรุปได้ว่าค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆ ที่ทำการศึกษา สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ ในห้องปฏิบัติการที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ เป็นที่ยอมรับได้ในระดับสากล และเผยแพร่แก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐ และเอกชน ได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ ใช้ยื่นขอรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO/IEC 17025 เพื่อแสดงถึงความแม่นยำ และความเที่ยงของผลวิเคราะห์

## 10. เอกสารอ้างอิง

- กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- ดุษฎี มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation) เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- นิรนาม. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิรนาม. 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.