รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

----

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนามาตรฐานระบบตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
   กิจกรรม : **1.**พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชสารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
   กิจกรรมย่อย : **1.5** การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร

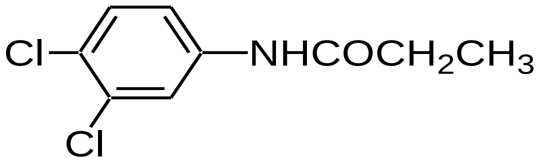
3. **ชื่อการทดลอง** : **1.5.4** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร Propanil
   ชื่อการทดลอง : Method Validation of Propanil in Formulation

4. **หัวหน้าการทดลอง** : พิเชษฐ์ ทองละเอียด สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
   ผู้ร่วมงาน : ฉลองรัตน์ หมื่นขวา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดวัชพืช Propanil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายการเกษตรด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เนื่องจาก วิธีการนี้ให้ค่า Range ในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 มีความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) เท่ากับ 0.568 และการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.4 mg/ml เท่ากับ 0.681, 0.798 และ 0.590 ตามลำดับตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 1.058 และ 1.324 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex และตรวจสอบความถูก (Accuracy) ของวิธีการ จากค่า เปอร์เซ็นต์การกลับคืน(% recovery) ที่ 0.4, 1.0, และ 1.4 mg/ml มีค่าเป็นร้อยละ 99.1, 100.2, 100.5 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC วิธีวีเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายการเกษตร Propanil ที่เป็นงานประจำและต้องการผลวิเคราะห์ที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

6. คำนำ



Propanil เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้กำจัดวัชพืชพวกใบแคบ เช่น หญ้าข้าวนก หญ้านกสีชมพู หญ้าดอกขาว มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC 3',4'-dichloropropionanilideมีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น N-(3,4-dichlorophenyl) propanamide มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_9H_9Cl_2NO$ มีน้ำหนักโมเลกุล 218.1 มีจุดหลอมเหลว 91.5 องศาเซลเซียส มีจุดเดือด351องศาเซลเซียส เป็นครีสตัลไม่มีกลิ่น ละลายน้ำได้ 130 กรัมต่อลิตร ทีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ละลาย isopropanol, dichloromethane ได้มากกว่า 200 กรัมต่อลิตร จะเกิดขบวนการ hydrolysis ในสภาวะที่เป็นกดหรือด่างสูงและจะสลายตัวในน้ำอย่างรวดเร็วด้วยแสง คงสภาพได้ดีในช่วง pH ปกติ คือ pH 4,7,9

ในด้านวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีอ้างอิงใน Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators Vol.13 ซึ่งระบุใช้ pack column ซึ่งในปัจจุบันได้มีการผลิต Capillary column ขึ้นมาใช้แทนประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ก็ดีกว่า และมีความสะดวก เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่น (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล จึงจำเป็นต้องศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นพร้อมตรวจสอบความ ใช้ได้ ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร Propanil จากวิธีมาตรฐานที่กำหนด Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators เพื่อให้สะดวกและมีความเหมาะสมต่อการใช้งาน
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร Propanil ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้ผลวิเคราะห์มีความถูกต้อง และแม่นยำยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือแก่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบวัตถุมีพิษการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

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 Propanil 99.5 %
2. สารเข้มข้น Propanil (Technical grade, TC) 95.8 %AI
4. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สูตร Emulsifiable concentrates (EC) 36 %AI
5. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Propanil

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ด้วย HP-5 capillary column ดังนี้

อุณหภูมิ	Oven	:	220	องศาเซลเซียส		
	Injector	:	250	องศาเซลเซียส		
	Detector	:	250	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 propanil 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_{1-1}, T_{1-2}, C_B, T_{2-1}, T_{2-2}, C_A, ...

2.4 การคำนวณ

2.4.1 ค่า response factor

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

W = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็น มิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของ Propanil ในสารมาตรฐาน หน่วยเป็น เปอร์เซนต์

A = peak area ของ Propanil ในสารละลายมาตรฐาน

2.4.2 ปริมาณ Propanil ในสาร Technical grade

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

As = peak area ของ Propanil ในสารละลาย Technical grade

Ws = น้ำหนักสาร Technical grade หน่วยเป็น มิลลิกรัม

M = ปริมาณ Propanil ในสาร Technical grade หน่วยเป็น เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range / Linear) ของวิธีการ

3.1 หาค่า Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน และคลุกเคล้าแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ Propanil ครอบคลุมช่วงการใช้งาน รวม 6 ความเข้มข้น หนัก 10.4, 52.0, 104.0, 156.0, 208.0, และ 260 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 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 Propanil (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 Propanil 6 ความเข้มข้น หนัก 20.8, 52.0, 83.2, 104.0, 124.8 และ 156.0 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 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 Propanil (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 27, 69 และ 97 มิลลิกรัม ($\pm$ 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลาย

ด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil 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

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

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

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

4.2 ตรวจสอบความทำซ้ำ (Intermediat reproducibility)

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

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

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

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

5. ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ

5.1 ตรวจสอบ Robustness

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

5.1.1.1 เตรียมสารละลายของสาร Technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน หนัก 20.8, 52.0, 83.2, 104.0, 124.8 และ 156.0 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใน Acetone 100 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องเพื่อสร้างกราฟ

5.1.1.2 ชั่งสารละลายผลิตภัณฑ์สูตร EC คลุกเคล้าแล้ว หนัก 27, 69 และ 97 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 10 ซ้ำ (EC_S, EC_M, EC_L) ใน Acetone 25 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Propanil ที่สภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

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

5.1.2.1 ปรับเปลี่ยนสภาวะคอลัมน์ DB-1 (100% dimethylpolysiloxane)

5.1.2.2 ฉีดสารละลายของสาร Technical grade (ข้อ 5.1.1.1) เพื่อสร้างกราฟ

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

5.1.3 การประเมินค่า HORRAT

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil 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 Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 3.2.4)

5.2.2 นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil 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 1,305 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 10 มิลลิลิตรใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของสาร Technical grade ที่มีความเข้มข้นของ Propanil เป็น 0.4, 1.0 และ 2.0 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 Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.5 เตรียมสารละลาย เพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock Tech (ข้อ 6.1) 3, 5 และ 7 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 Propanil เทียบกับกราฟ (ข้อ 6.2)

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil 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 Propanil ในสารละลาย Spike

A_{origin} = ปริมาณ Propanil ในสารละลาย Origin

A_{add} = ปริมาณ Propanil ที่เติมลงในสารละลาย Spike.

8. ผลการทดลอง และวิจารณ์

ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช เมื่อตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GLC แล้ว ดำเนินการตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง ได้ผลการคำนวณค่า

response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ย ไม่เกินร้อยละ 1 (ตารางที่ 1) และตรวจหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เทียบกับสารละลายมาตรฐาน (รูปที่ 1) ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 95.8 (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาค่า Range ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.1 – 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2) จึงตรวจสอบค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) 0.9998 (ตารางที่ 4 และ รูปที่ 3)

ในด้านความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC พบว่า การทวนซ้ำ (Repeatability) มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.4 mg/ml เท่ากับ 0.305 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.875 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.568 (ตารางที่ 5) ส่วนการทำซ้ำ (Intermediat reproducibility)ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.4 mg/ml มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.37, 0.43, 0.32 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 1.05, 1.23, 0.910 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.681, 0.798, 0.590 ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า Robustness มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.59 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 1.63 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.058 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และพบว่า Ruggedness มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.74 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 2.04 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.324 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

กรณีความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืช EC ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, และ 1.4 mg/ml มีค่าเป็นร้อยละ99.1, 100.2, 100.5 (ตารางที่ 9)

วิจารณ์

วิธีวิเคราะห์มาตรฐานที่ใช้หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ตามที่ระบุใน Analytical Methods For Pesticides And Plant Growth Regulators เป็นการใช้ Pack column ในการแยกสาร และ การศึกษาทดลองนี้ได้พัฒนาใช้ Capillary column ซึ่งมีประสิทธิภาพการแยกสารสูงกว่าแทน และปรับเปลี่ยนปริมาณการใช้สารมาตรฐาน เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องดำเนินการโดยหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้นสูงก่อน เพื่อนำมาใช้ทดแทนสารมาตรฐานซึ่งมีราคาแพงมาก ในขั้นตอนต่างๆ โดยเฉพาะการตรวจสอบความถูกของวิธีการ ที่ต้องมีการใช้สารมาตรฐานเติมลงในสารละลายตัวอย่างอย่างน้อย 30 ซ้ำ และผลของการศึกษาครั้งนี้ สามารถตรวจสอบได้ว่า ค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆ สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล วิธีการนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ Propanil ของห้องปฏิบัติการต่อไป

9. สรุปผลการทดลอง

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

อุณหภูมิ Oven	:	220	องศาเซลเซียส		
Injector	:	250	องศาเซลเซียส		
Detector	:	250	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 Propanil 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 Propanil 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 0.2-1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9998

4. ความแม่น (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC เมื่อทดสอบค่าการทวนซ้ำ (Repeatability) ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 0.875 และ 0.568ตามลำดับ การทำซ้ำ (Intermediat reproducibility) สัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, 1.4 mg/ml ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) ได้เป็น 1.05, 12.3, 0.91 ตามลำดับ ค่า

HORRAT เท่ากับ0.681, 0.798, 0.590 ซึ่งยอมรับได้ เนื่องจากไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

5. การตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ พบว่า ยอมรับได้ เนื่องจากเมื่อนำค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) มาคำนวณค่า HORRAT ของ Robustness และ Ruggedness ได้เป็น 1.058 และ 1.324 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU,Codex

6. ความถูก (Accuracy) ของวิธีการ พบว่า % recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Propanil ในผลิตภัณฑ์กำจัดวัชพืชสูตร EC ที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0, และ 1.4 mg/ml มีค่าเป็นร้อยละ99.1, 100.2, 100.5 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC

10. เอกสารอ้างอิง

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

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.13

ทิพวรรณ นิ่งน้อย.2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว,กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

11. ภาคผนวก

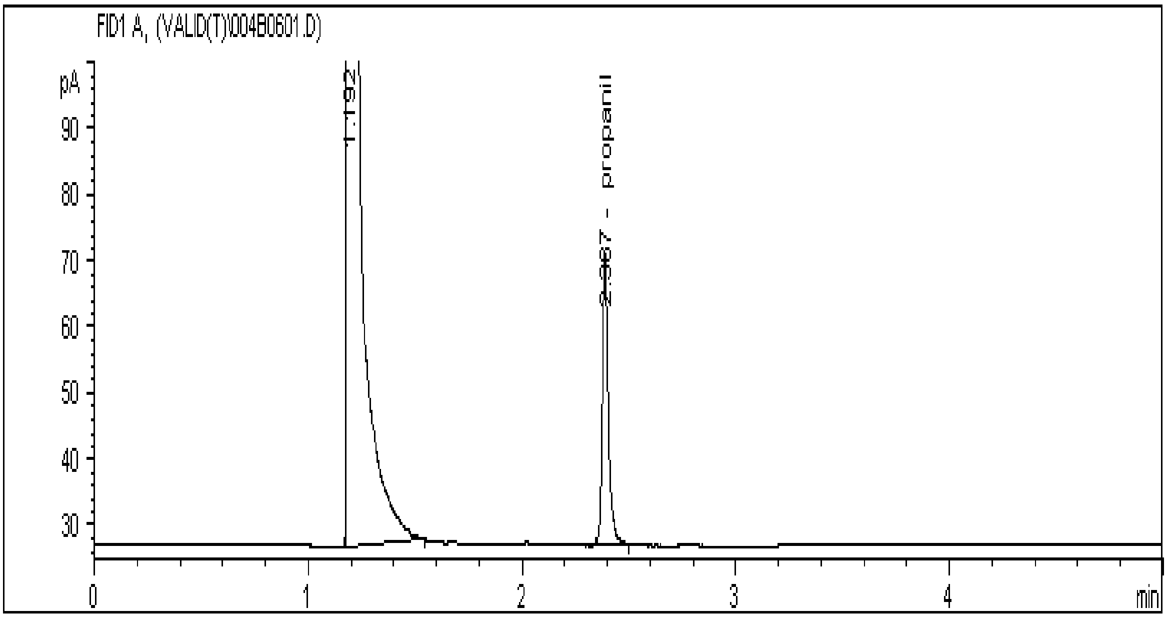
<u>ตารางที่ 1</u> การปรับตั้งเครื่องก่อนการวิเคราะห์ (Std. Purity 99.5 %, in 10 ml.)

Std. Soln.	Mg	Area	f = Ws * P / Vs * As	% diff.
C_A	10.4	239.00948	0.4308	1.5410
C_B	12.5	283.49893	0.4365	0.2310
C_A	10.4	236.10400	0.4361	0.3294
C_B	12.5	282.62393	0.4379	-0.0779
C_A	10.4	231.86038	0.4441	-1.4949
C_B	12.5	281.35718	0.4398	-0.5285

	Mean	0.4375

หมายเหตุ : f = Response factor

% diff. = ร้อยละของการเบี่ยงเบนจากค่าเฉลี่ย



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน propanil

<u>ตารางที่ 2</u> การหาปริมาณ Propanil ในผลิตภัณฑ์สูตร Tech.

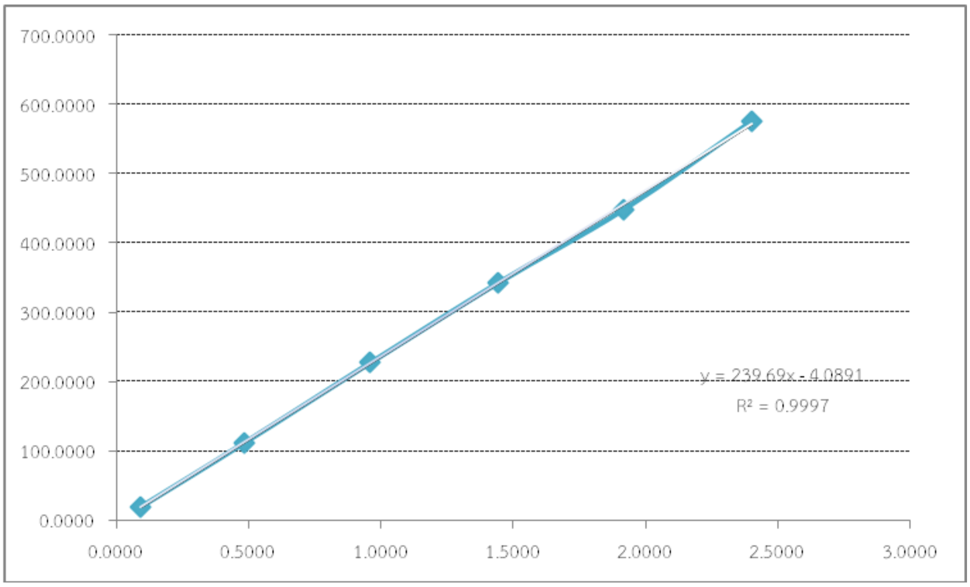
mg. Tech	%w/w
27.5	94.7
26.5	95.3
26.5	96.8
27.6	95.4
26.5	95.1

27.8	96.8
27.5	96.5
27.1	96.6
26.4	96.0
27.7	94.5
27.5	95.6
26.9	95.9
28.0	96.4
27.8	95.4
27.2	95.8
mean	**95.8**

<u>ตารางที่ 3</u> การหาช่วงของการวัด (Range)

mg AI, Tech / ml	Area
0.0939	19.2396
0.4838	111.3786
0.9609	227.3481
1.4437	342.7628

1.9189	448.9636
2.4027	576.4564



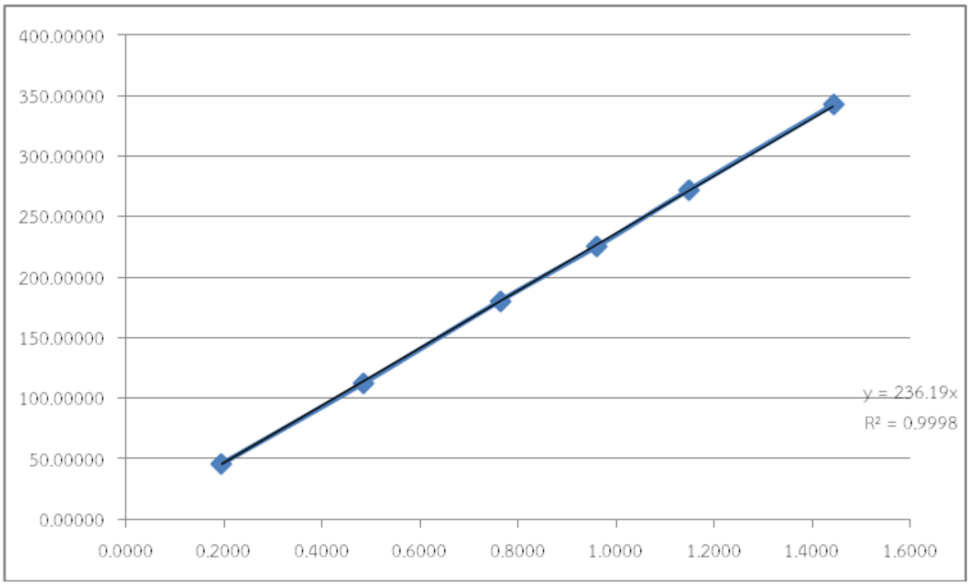
รูปที่ 2 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

<u>ตารางที่ 4</u> การหาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวัด (Linearlity)

mg AI, Tech / ml	Area
0.1954	45.72450
0.4838	112.1729

0.7638	180.3414
0.9609	225.3167
1.1496	272.2258

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



รูปที่ 3 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตารางที่ 5 **ตรวจสอบ Repeatability ของสูตร EC**

mg. Sample	%w/v
26.8	34.99

mg. Sample	%w/v
70.5	34.65

26.8	34.34
26.9	34.39
27.0	35.12
27.1	34.38
27.6	35.33
27.6	35.16
27.9	35.15
28.1	35.13
28.2	34.49
68.9	34.97
69.3	34.90
69.5	35.00
69.8	34.99
70.2	34.87
70.4	34.73
70.4	34.94

70.5	35.02
70.6	34.37
95.8	34.83
95.8	35.12
96.0	35.34
96.2	34.99
96.3	34.52
96.3	35.09
96.3	35.00
96.4	34.83
96.5	35.37
96.6	35.34
Mean	**34.91**
SD	**0.305**
%RSD	**0.875**

$\%RSD_{HOR} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.36)}$

$= 0.66 \times 2^{1.222}$

$= 1.540$

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

$= 0.875 / 1.54$

$= 0.568$

ตารางที่ 6 ตรวจสอบ Intermediat reproducibility ของสูตร EC

ความเข้มข้นที่ 0.4 mg/ml

mg. Sample	%w/v
26.8	34.99
26.8	34.34
26.9	34.38
27.0	35.12
27.1	34.37
27.6	35.32
27.6	35.15
27.9	35.15
28.1	35.12
28.2	34.48

mg. Sample	%w/v
26.5	35.17
26.8	34.71
27.0	35.00
27.3	35.37
27.1	35.14
26.8	34.99
26.7	34.71
26.6	35.15
27.5	34.32
27.4	34.32
Mean	**34.81**
SD	**0.37**
%RSD	**1.05**

$\%RSD_{HOR} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.36)}$

$= 0.66 \times 2^{1.222}$

$= 1.540$

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

$= 1.05 / 1.54$

$= 0.681$

ความเข้มข้นที่ 1.0 mg/ml

mg. Sample	%w/v
68.9	34.97
69.3	34.90
69.5	35.00
69.8	34.99
70.2	34.87
70.4	34.73
70.4	34.94
70.5	34.65
70.5	35.02
70.6	34.37

mg. Sample	%w/v
69.1	35.39
69.0	35.68
69.8	35.18
69.7	35.35
68.8	35.67
68.9	35.73
69.1	33.40
69.5	35.50
70.0	35.84
70.6	**34.27**
Mean	**35.13**
SD	**0.43**
%RSD	**1.23**

$\%RSD_{HOR} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.36)}$

$= 0.66 \times 2^{1.222}$

$= 1.540$

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

$= 1.23 / 1.54$

$= 0.798$

ความเข้มข้นที่ 1.4 mg/ml

mg. Sample	%w/v
95.8	34.83
95.8	35.12
96.0	35.34
96.2	34.99
96.3	34.52
96.3	35.09
96.3	35.00
96.4	34.83
96.5	35.37
96.6	35.34

mg. Sample	%w/v
97.2	34.97
97.5	35.25
96.2	35.50
96.8	35.61
97.0	35.21
96.1	35.76
96.4	35.07
97.3	35.69
96.6	35.59
96.6	**35.38**
Mean	**35.23**
SD	**0.32**
%RSD	**0.91**

$\%RSD_{HOR} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.36)}$

$= 0.66 \times 2^{1.222}$

$= 1.540$

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

$= 0.91 / 1.54$

$= 0.590$

__ตารางที่ 7__ **ตรวจสอบ Robustness ของสูตร EC**

mg. Sample	%w/w
26.6	35.44
27.0	35.21
27.7	35.39
27.9	35.50
28.2	35.30
28.3	35.58
28.5	35.37
28.8	35.39
28.9	35.88
29.7	35.91
67.8	36.72
68.1	35.81
68.4	36.78
69.7	37.01
70.0	37.08
70.1	35.90
70.3	36.34
70.7	36.18
71.1	36.79
71.6	36.78
96.2	36.58
98.2	36.21
98.5	36.46
98.8	36.84
99.3	37.00
99.5	36.24
101.2	36.68
101.6	36.43
102.3	36.59
102.7	36.35
Mean	**36.19**
SD	**0.59**
%RSD	**1.63**

$$\%RSD_{HOR} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$$
$$= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.36)}$$
$$= 0.66 \times 2^{1.222}$$
$$= 1.540$$

$$Horrat = \%RSD / \%RSD_{Hor}$$
$$= 1.63 / 1.54$$
$$= 1.058$$

<u>ตารางที่ 8</u> ตรวจสอบ Ruggdness ของสูตร EC

mg. Sample	%w/w	mg. Sample	%w/w
26.6	35.48	70.7	35.81
27.0	33.62	71.1	36.79
27.7	35.39	71.6	37.01
27.9	35.50	96.2	36.51
28.2	35.10	98.2	36.18
28.3	35.59	98.5	36.46
28.5	35.37	98.8	36.35
28.8	35.50	99.3	36.24
28.9	36.13	99.5	36.24
29.7	35.76	101.2	36.63
67.8	36.13	101.6	36.43
68.1	35.72	102.3	36.60
68.4	37.56	102.7	35.35
69.7	35.44	**Mean**	**36.03**

70.0	37.08
70.1	35.90
70.3	35.91

SD	**0.74**
%RSD	**2.04**

$\%RSD_{HOR} = 0.66 \times 2^{(1-0.5\log C)}$

$= 0.66 \times 2^{(1-0.5\log 0.36)}$

$= 0.66 \times 2^{1.222}$

$= 1.540$

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

$= 2.04 / 1.54$

$= 1.324$

<u>ตารางที่ 9</u> ตรวจสอบ % Recovery ของสูตร EC

N	AI content (mg / 25 ml)								
	Concn. (0.4 mg / ml)			Concn. (1.0 mg / ml)			Concn. (1.4 mg / ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	8.48	18.68	10.00	8.20	33.20	25.00	8.43	43.21	35.00
2	8.12	18.01	10.00	8.38	33.48	25.00	8.48	43.12	35.00
3	8.17	18.24	10.00	8.22	32.87	25.00	8.42	43.56	35.00
4	8.52	18.37	10.00	8.23	34.00	25.00	8.54	42.95	35.00
5	8.31	18.34	10.00	8.11	33.10	25.00	8.41	44.15	35.00
6	8.44	18.16	10.00	8.12	33.01	25.00	8.58	43.50	35.00

7	8.26	17.75	10.00	8.21	32.97	25.00	8.38	44.02	35.00
8	8.13	17.81	10.00	8.24	32.79	25.00	8.46	44.12	35.00
9	8.23	18.33	10.00	8.12	33.21	25.00	8.30	43.56	35.00
10	8.26	18.42	10.00	8.20	34.10	25.00	8.29	43.85	35.00
mean	8.29	18.21	10.00	8.20	33.27	25.00	8.43	43.60	35.00
SD	0.14	0.29		0.08	0.45		0.09	0.43	
%RSD	1.73	1.57		0.96	1.36		1.10	0.98	
%Recov			99.19			100.28			100.50