

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร  
กิจกรรม 1. การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตสารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร  
กิจกรรมย่อย 1.5 วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชรากทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) 1.5.5 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชรากทางการเกษตร  
Alpha-cypermethrin  
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Method Validation of Alpha-cypermethrin in Pesticide Formulations
4. คณะผู้ดำเนินงาน  
หัวหน้าการทดลอง จิตตานันท์ สรวัยเอี่ยม กลุ่มวิจัยวัตถุพืชรากทางการเกษตร สปพ.  
ผู้ร่วมงาน ยุพดี จิตรไพศาล กลุ่มวิจัยวัตถุพืชรากทางการเกษตร สปพ.

### 5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Alpha-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 อุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C เวลา 13 นาที อุณหภูมิการฉีด 270 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 270 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µL วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.21 - 3.12 mg/ml ให้ค่าช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.42 - 1.67 mg/ml ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า  $r \geq 0.995$  การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) พิจารณาจาก % Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 mg/ml ได้ค่าเท่ากับ 98.96 100.36 และ 100.48 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC % Recovery เท่ากับ 95 - 105 ความเที่ยง (Precision) ได้ค่าเท่ากับ 1.876 1.941 และ 1.780 ตรวจสอบค่า Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.599 1.805 0.366 ตรวจสอบค่า Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.043 0.655 0.656 เกณฑ์

ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT  $\leq 2$  จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ได้ที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

## 6. คำนำ

สารป้องกันและกำจัดแมลง alpha-cypermethrin เป็นสารกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (pyrethroids) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตาย ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น (S)- $\alpha$ -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol.H โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID ใช้ Capillary column ชนิด DB-1 ขนาด 30 m x 0.25 mm i.d. ความหนา 0.25  $\mu$ m อุณหภูมิคอลัมน์ 235 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการฉีดสาร 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจจับ 300 องศาเซลเซียส ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาอัตรา 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ di-(2-ethylhexyl)phthalate เป็นสารมาตรฐานภายใน และใช้ tetrahydrofuran เป็นตัวทำละลาย มีค่า LD50 (rat) เท่ากับ 1,650 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่มีความเป็นพิษสูงกว่า acetone มีค่า LD50 (rat) เท่ากับ 5,800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ซึ่งใช้ตัวทำละลายในวิธีที่พัฒนาขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin 10 % w/v EC โดยใช้เทคนิค GC-FID ที่ใช้ Capillary column ที่ทันสมัยในการแยกสาร สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ(Method Validation) ซึ่งเป็นข้อกำหนด ข้อที่ 5.4.2 ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจจับชนิด 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 (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร ขนาด 25, 50, 500 ,1000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด ขนาด 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 alpha-cypermethrin ความบริสุทธิ์ 99.0 %
2. สารเข้มข้น (Technical material) ของ alpha-cypermethrin สูตร 95 % min. Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ alpha-cypermethrin สูตร 10 % (w/v) EC
4. Acetone AR grade

#### วิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin สูตร 95 %min Tech.

เพื่อใช้สารเข้มข้นนี้แทนสารมาตรฐานที่มีราคาแพง และมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ ซึ่งกระบวนการตรวจสอบต้องเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง จึงใช้สารปริมาณมาก โดยวิธีวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

##### 1.1 การปรับตั้งสถานะเครื่อง GC-FID

Capillary column	: HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 μm)
Oven temperature	: 250 °C
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	: 13 min

##### 1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน alpha-cypermethrin

ชั่งสารมาตรฐาน alpha-cypermethrin ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม (± 1.0 มิลลิกรัม) จำนวน 2 ซ้ำ (C<sub>A</sub>, C<sub>B</sub>) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน ด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

##### 1.3 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin

ซังสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ( $\pm$  1.0 มิลลิกรัม) จำนวน 10 ซ้ำ (TC<sub>1</sub>-TC<sub>10</sub>) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

#### 1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID

เมื่อปรับตั้งสภาวะของเครื่อง GC-FID เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C<sub>A</sub> และ C<sub>B</sub> สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ตามลำดับดังนี้

C<sub>A</sub>, TC<sub>1</sub>, TC<sub>2</sub>, C<sub>B</sub>, TC<sub>3</sub>, TC<sub>4</sub>, C<sub>A</sub>,.....

#### 1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสูตรสารเข้มข้นสูง

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

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

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน alpha-cypermethrin หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H<sub>s</sub> = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน alpha-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

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

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin หน่วยเป็นมิลลิกรัม

f<sub>avr.</sub> = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H<sub>w</sub> = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin

## 2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin 10 % (W/V) EC

### 2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

#### 2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 ซังสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.21 0.42 1.04 2.08 2.50 และ 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

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

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย alpha-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 alpha-cypermethrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$

#### 2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง alpha-cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่ขายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 2,523.1 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร กั้วด้วย 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 0.399 0.999 และ 1.599 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งผลิตภัณฑ์ alpha-cypermethrin 10 %w/v EC ปริมาณ 10,000.4 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร 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 ข้ว 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 ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตร

ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin จาก ข้อ 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 alpha-cypermethrin ในสารละลาย fortified sample, มก./25มล.

O คือ ปริมาณสาร alpha-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 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 1,261.6 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ที่ความเข้มข้น 0.399 0.999 และ 1.599 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID

#### 2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ alpha-cypermethrin 10 %w/v EC

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยซึ่งผลิตภัณฑ์ alpha-cypermethrin 10 %w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 125, 250 และ 375 มิลลิกรัม ( $\pm 5.0$  มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

#### 2.3.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

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

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

## 2.4 การตรวจสอบความแข็งแกร่ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่ง ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกันอีกอันหนึ่ง และ ภายใต้สภาวะเงื่อนไข

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alpha-cypermethrin ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ alpha-cypermethrin 10 %w/v EC

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง ผลิตภัณฑ์ alpha-cypermethrin 10 %w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 250, 500 และ 750 มิลลิกรัม ( $\pm 5.0$  มิลลิกรัม) จำนวนความเข้มข้นละ 10 ข้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin

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

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

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

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2554 ถึงเดือน กันยายน 2555

### สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร  
สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

## 8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูงสุด 95 % min Tech เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 99.1

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้น 0.21 - 3.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.42 - 1.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า  $r \geq 0.995$

การตรวจสอบค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin 10 % w/v EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ คำนวณค่า % Recovery เท่ากับ 98.96 100.36 และ 100.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง % Recovery เท่ากับ 95-105 พิจารณาตามเกณฑ์ที่มีปริมาณสารในตัวอย่างไม่เกิน 10 % ค่าความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถครอบคลุมช่วงที่ใช้งานการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-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	11.034	21.481	9.9913	11.034	37.076	24.978	11.034	47.449	34.969
2	11.034	21.331	9.9913	11.034	37.099	24.978	11.034	47.355	34.969
3	11.034	21.275	9.9913	11.034	37.158	24.978	11.034	47.085	34.969
4	11.034	21.271	9.9913	11.034	37.024	24.978	11.034	47.267	34.969
5	11.034	20.889	9.9913	11.034	36.582	24.978	11.034	46.822	34.969
6	11.034	20.884	9.9913	11.034	36.117	24.978	11.034	45.839	34.969
7	11.034	20.511	9.9913	11.034	36.571	24.978	11.034	46.033	34.969
8	11.034	20.814	9.9913	11.034	36.028	24.978	11.034	45.612	34.969
9	11.034	20.422	9.9913	11.034	35.694	24.978	11.034	45.891	34.969



10	11.034	23.113	9.9913	11.034	35.726	24.978	11.034	45.714	34.969
% Recovery	98.96			100.36			100.48		

ค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.66 10.62 และ 10.60 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% RSD<sub>exp.</sub>) เท่ากับ 3.499 2.062 และ 3.321 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อน สัมพัทธ์จากทฤษฎี (% RSD<sub>Horwitz</sub>) เท่ากับ 1.866 และคำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 1.876 1.105 และ 1.780 (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)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI. Content % (w/w)	Wt. of Sample (mg)	AI.Content % (w/w)
1	133.0	10.96	269.1	10.60	328.9	10.09
2	117.4	10.02	246.7	10.55	406.6	10.80
3	125.4	10.51	241.7	10.22	408.6	10.80
4	125.5	10.22	246.8	10.41	340.8	10.36
5	139.1	10.33	263.9	10.93	443.8	10.41
6	132.9	10.76	399.1	10.85	486.5	10.01
7	117.5	10.84	241.8	10.51	329.0	10.79
8	125.6	10.87	375.4	10.79	406.7	10.95
9	114.1	10.86	314.0	10.78	408.7	10.86
10	139.2	11.21	239.0	10.53	340.9	10.93

Mean	-	10.66	-	10.62	-	10.60
SD		0.373		0.219		0.352
%RSD <sub>exp.</sub>		3.499		2.062		3.321
Horwitz		1.866		1.866		1.866
HORRAT		1.876		1.105		1.780

สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness/Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 10.27 และ 10.02 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) สำหรับ Robustness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.599 1.805 0.366 Ruggedness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 1.043 0.655 0.656 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT  $\leq$  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	10.86	10.02	10.88	10.08	10.12	9.96
2	10.85	10.63	10.33	9.91	9.96	10.08
3	10.80	9.95	10.35	9.95	9.99	10.02
4	10.61	10.16	9.88	10.05	10.06	10.01
5	10.70	9.94	9.95	9.84	9.92	9.96
6	10.86	10.18	9.86	9.82	9.93	10.06
7	10.67	10.08	10.30	9.86	9.97	10.37
8	10.71	10.04	9.92	9.76	9.92	10.01
9	10.70	10.14	9.80	9.69	9.92	10.02
10	10.49	10.05	9.93	9.91	9.94	9.94

Mean	10.73	10.12	10.12	9.89	9.97	10.04
SD	0.120	0.197	0.341	0.121	0.068	0.123
% RSD <sub>exp.</sub>	1.118	1.947	3.369	1.223	0.682	1.225
Horwitz	1.866	1.866	1.866	1.866	1.866	1.866
HORRAT	0.599	1.043	1.805	0.655	0.366	0.656

## 9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-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) มีสถานะเครื่องการใช้งาน ดังนี้

Oven temperature	: 250 °C
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	: 13 min

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.4 - 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง พบว่า ได้ค่า % recovery เท่ากับ 98.96 100.36 และ 100.48 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 95 - 105 % สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10%

สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.876 1.941 และ 1.780 การตรวจสอบค่าความแข็ง Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alpha-cypermethrin ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดแมลง โดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน เวลา

(reproducibility) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.685 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.818 เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT  $\leq$  2

## 10. การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ cypermethrin ตามแหล่งจำหน่าย
2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธีตามมาตรฐาน

## 11. เอกสารอ้างอิง

- กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (อัดสำเนา)
- สถาบันอาหาร. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี เอกสารประกอบการอบรม สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. (อัดสำเนา)
- Anonymous. 1993. The Agrochemicals Handbook 3<sup>rd</sup>. ed. The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.
- Dobrat W. and A Martijn H. 1988. CIPAC Handbook Vol. H : Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, The Black Bear Press, England.