

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร

กลุ่มสารกำจัดแมลง Chlorpyrifos

Method Validation of Chlorpyrifos in Insecticide Formulation

จารุพงศ์ ประสพสุข

วัชรพร ศรีสว่างวงศ์

ปริยานุช สายสุพรรณ

กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3

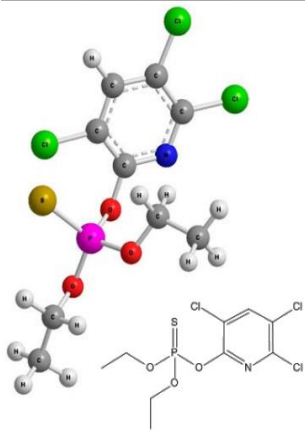
บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 มีภารกิจด้านการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร ในส่วนภูมิภาค โดยรับผิดชอบพื้นที่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน 11 จังหวัด ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร ชนิดสาร chlorpyrifos ด้วยเทคนิค gas liquid chromatography เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าให้ค่า range ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25-1.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.99995 มีความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) เป็น 0.53 และ 0.46 ตามลำดับ ตรวจสอบ robustness และ ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 0.54 และ 0.83 ตามลำดับ ซึ่งค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์ของ AOAC และการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการจากค่า % recovery ได้ 99.8 % อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์สารที่มีปริมาณมากกว่า 10 %ของ AOAC ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร chlorpyrifos สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้องและแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

คำนำ

chlorpyrifos เป็นสารกำจัดแมลงประเภทไม่ดูดซึม (Non-systemic insecticide) จัดอยู่ในกลุ่ม organophosphate (OP) ที่ออกฤทธิ์แบบ broad spectrum ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำพวกแมลงปากดูดเช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยอ่อน ตัวงวงมันเทศ ตัวงวงข้าว หนอนเจาะลำต้น เเจาะฝักนุ่น หนอนหน้าแมว หนอนร่านโพניתา แมลงดำหนาม ใช้ในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง มันเทศ ข้าวเปลือก (เฉพาะที่ใช้ทำพันธุ์) นุ่น ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว เป็นต้น (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2552)

Molecular Structure - Chlorpyrifos



IUPAC : *O,O*-Diethyl *O*-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate

chlorpyrifos ชื่อตามระบบ IUPAC คือ *O,O*-Diethyl *O*-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ มีน้ำหนักโมเลกุล 350.6 g/mol มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นกำมะถัน มีค่าครึ่งชีวิตในดินและน้ำใต้ดิน (Half-life) 60-120 วัน มีความเป็นพิษจับปล้นทางปาก LD50 (rat) 135-163 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นพิษต่อปลาสูง ค่า LD50 (96 hours, rainbow trout) 0.003 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kidd, H. and James, D.R. 1991) นอกจากนี้ chlorpyrifos เป็นมีพิษมากต่อไก่ และมีพิษสูงมากต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยในน้ำ (aquatic invertebrate) ปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ทางทะเล (NPIC, 2009) chlorpyrifos อยู่ในกลุ่มระดับความเป็นพิษปานกลาง หรือ Class II (WHO, 2009)

อันตรายต่อมนุษย์เมื่อกินหรือหายใจเข้าไป อาจระคายเคืองผิวหนัง ถ้าได้รับสารเป็นระยะเวลานาน อาจมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำลายตับหรือไต ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อตา น้ำตาไหล ตาบวม แดง และมองภาพไม่ชัดเจน อันตรายขั้นร้ายแรงทำให้หมดสติ ชัก หายใจลำบาก (เกิดอาการภายใน 24 ชั่วโมง) อาจตายได้เนื่องจากระบบหายใจและหัวใจล้มเหลว (ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์, 2554; หน่วยข้อเสนอเทคโนโลยีวัตถุอันตรายและความปลอดภัย, 2554)

เนื่องจาก chlorpyrifos เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการใช้อย่างแพร่หลายและพบการตกค้างมากในผลผลิตทางการเกษตรในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3, 2553; วัชรารพร และคณะ, 2554; นาดยา และคณะ, 2553) ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช chlorpyrifos ที่วางจำหน่ายมีหลากหลายยี่ห้อ เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพตาม พ.ร.บ.วัตถุอันตราย 2535 จำเป็นต้องมีการตรวจสอบชนิดและสารออกฤทธิ์ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุในฉลากหรือไม่ ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos มีวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน CIPAC Handbook 1C (CIPAC : Collaborative International Pesticide Analytical Council) (Henriet et al., 1985) ซึ่งจะต้องประยุกต์ให้ทันสมัยมากขึ้นเหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ ขณะที่ผลการวิเคราะห์จะต้องให้ความถูกต้อง แม่นยำตามเกณฑ์ยอมรับสากล ดังนั้นห้องปฏิบัติการวัตถุพิษวิทยาเกษตร สวพ.3 จึงต้องทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) หัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
2. capillary column ชนิด 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร (30m x 0.32mm ID, 0.25 µm film thickness)
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
4. ultrasonic bath
5. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50, 250 และ1000 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 2,3,4,5,8 และ10 มิลลิลิตร
7. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน chlorpyrifos 99.5%
2. สาร chlorpyrifos ที่มีความเข้มข้นสูง (technical grade)
3. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช chlorpyrifos 40%
4. acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ chlorpyrifos

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ดังนี้

Column: capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 µm film thickness)

Gas flow rate: Helium (carrier gas) 2 ml/min, Hydrogen 40 ml/min, Air 400 ml/min

Split injection: Split ratio 50:1, Split flow 100 ml/min, Injection volume: 1 µl,

Temperature: Oven 240 °C, Inlet 260 °C, Detector 260 °C

Detector: Flame Ionization Detector

2. การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน chlorpyrifos 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (technical grade)

ชั่งสาร technical grade chlorpyrifos 10 ซ้ำ ($T_1- T_{10}$) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC

เปิดเครื่อง GC ตามที่กำหนดโปรแกรมควบคุมสถานะการใช้งานไว้ เมื่อ baseline คงที่ ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้ peak หรือความสูงของ peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

2.4 การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

เมื่อเครื่อง GC พร้อมใช้งานแล้ว ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลาย technical grade เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอนตามลำดับ ดังนี้

$C_1, C_1, T_1, T_1, C_2, C_2, T_2, T_2, C_1, C_1, T_3, T_3$

สารละลายมาตรฐาน C_1, C_2 ต้องมีค่า % Relative Percent Different (%RPD) ไม่เกิน 3%

$$\%RPD = [(factor\ max - factor\ min) / factor\ mean] \times 100$$

2.5 การคำนวณหา Response factor

$$Response\ factor = (weigh\ x\ purity) / peak\ area\ หรือ\ f = (S \times P) / H_s$$

S = น้ำหนักของ chlorpyrifos ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม)

$P = \% \text{ ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน chlorpyrifos}$

$H_s = \text{พื้นที่ใต้ peak ของ chlorpyrifos ในสารละลายมาตรฐาน}$

2.6 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade

$\text{chlorpyrifos content} = (H_w \times f)/w$

$H_w = \text{พื้นที่ใต้ peak ของ chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade}$

$f = \text{ค่าเฉลี่ย Response factor}$

$w = \text{น้ำหนักของ chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade (มิลลิกรัม)}$

2.7 นำค่า % ของ technical grade ที่คำนวณได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ % ที่แน่นอนของ technical grade

3. การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

3.1 ทดสอบช่วงการวัด range

3.1.1 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้นความเข้มข้นละ 1 ชั่ว โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ chlorpyrifos ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน (0.25-2.5 mg/ml) ได้แก่ 12.5, 25, 50, 75, 100 และ 125 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า linearity

3.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 และ 75 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

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)

4.1 repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน แสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง

4.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน chlorpyrifos 2 ซ้ำ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิตร เติม acetone ประมาณ 15 มิลลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 มิลลิตร

4.1.2 ชั่งสารตัวอย่าง chlorpyrifos ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ (0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำโดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิตร เติม acetone ประมาณ 15 มิลลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 มิลลิตร

4.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (4.1.1 และ 4.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ในสารละลายตัวอย่าง

4.2 reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 หาค่า HORRAT ของ repeatability และ reproducibility โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการที่ 1

$$\text{HORRAT} = \% \text{RSD experimental} / \text{Predicted Horwitz RSD} \quad \text{สมการที่ 1}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

5. ตรวจสอบ robustness/ruggedness

5.1 robustness ทดสอบจากการเปลี่ยนสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยน oven temperature จาก 240 เป็น 230 °C ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.2 ruggedness ทดสอบจากการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์โดยเปลี่ยน capillary column จาก HP-5 (30 m. x 0.32mm.(ID.),0.25 μ m, film thickness) เป็น DB-5ms (30 m. x 0.25 mm.(ID.),0.25 μ m, film thickness) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.3 ทหาค่า HORRAT ของ robustness และ ruggedness โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการที่ 1

6. การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy)

6.1 เตรียมสารละลาย stock tech ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (4 mg Al/ml) โดยชั่งสาร technical grade ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย stock sample ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่าง chlorpyrifos ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetone ประมาณ 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.3 สร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลาย 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดย pipette stock tech (4 mg/ml) 2.5, 6.25 และ 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า origin โดย pipette สารละลาย stock sample ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ chlorpyrifos

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

6.5.1 pipette สารละลาย stock sample ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 pipette สารละลาย stock tech (4 mg/ml) ปริมาณ 4, 6 และ 10 มิลลิลิตร ลงใน sample origin 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ chlorpyrifos

6.6 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ที่เป็นค่า origin และ spike (6.4 และ 6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่

ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC การ
คำนวณตามสมการที่ 2

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[\text{Conc. spike sample} - \text{Conc. Original sample}]}{\text{Conc. added}} \times 100$$

สมการที่ 2

ระยะเวลา ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการวัฏภูมิพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ chlorpyrifos

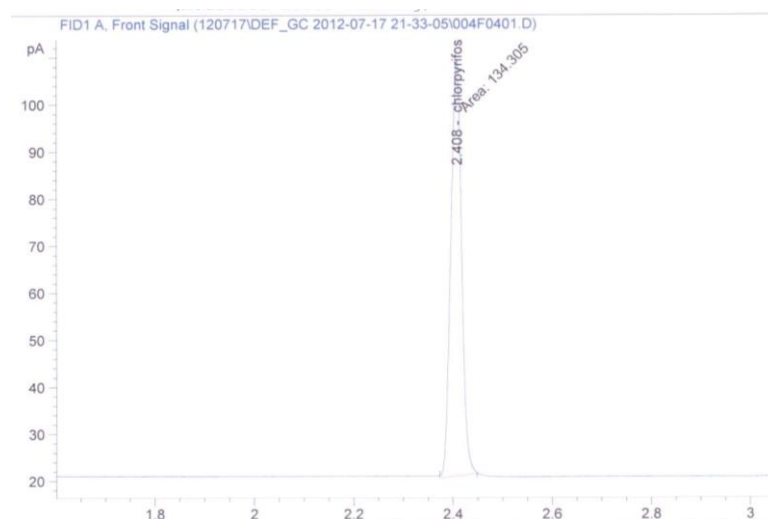
สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC –FID ในห้องปฏิบัติการวัฏภูมิพิษการเกษตร สวพ.3 คือ
Column: capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 µm film thickness)

Gas flow rate: Helium (carrier gas) 2 ml/min, Hydrogen 40 ml/min, Air 400 ml/min

Split injection: Split ratio 50:1, Split flow 100 ml/min, Injection volume: 1 µl,

Temperature: Oven 240 °C, Inlet 260 °C, Detector 260 °C

ผลการทดลองพบว่า Chromatogram ของ chlorpyrifos ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี
specification/ selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos

2. ผลการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos

2.1 ค่า %RPD ของ peak area สารละลายสารมาตรฐาน C1, C2 มีค่าไม่เกิน 3 % ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2 ค่า % สารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.16 % ดังแสดงในตารางที่ 2

3. ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

3.1 การตรวจสอบช่วงของการวัด (range) มีค่า 0.25-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99999 ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 2

3.2 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ความเข้มข้น 0.25 – 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 3

ตารางที่ 1 การประเมินค่า % Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน

std.	mg.	peak area	average	%RPD
C1	28.8	136.096	136.919	1.202
C2	28.8	137.742		
C1	28.8	137.255	136.372	1.295
C2	28.8	135.489		
C1	28.8	138.302	137.9955	0.444
C2	28.8	137.689		
C1	28.8	138.890	138.624	0.384
C2	28.8	138.358		
C1	28.8	139.140	139.515	0.538
C2	28.8	139.890		
C1	28.8	139.394	139.181	0.306
C2	28.8	138.968		

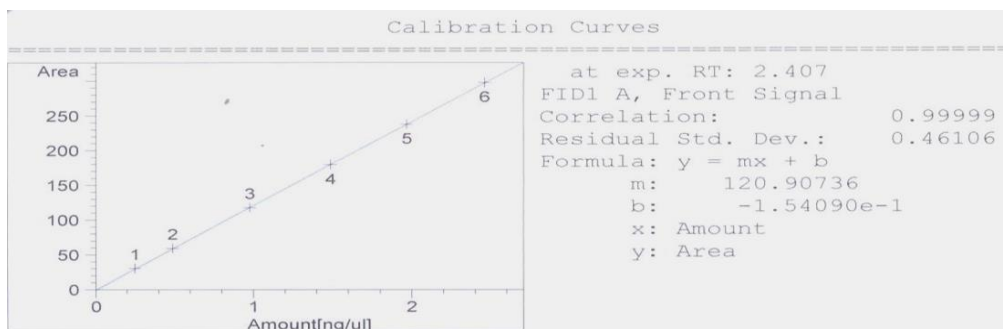
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย % สารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ในสารละลาย Technical grade

สารละลาย Technical grade	% Technical grade
T1	97.54
T2	97.80
T3	97.80
T4	97.84
T5	97.88
T6	98.22

T7	98.33
T8	98.33
T9	98.77
T10	99.05
ค่าเฉลี่ย	98.16
SD	0.477

ตารางที่ 3 ช่วงของการวัด (range) ความเข้มข้น 0.25-2.5 mg/ml

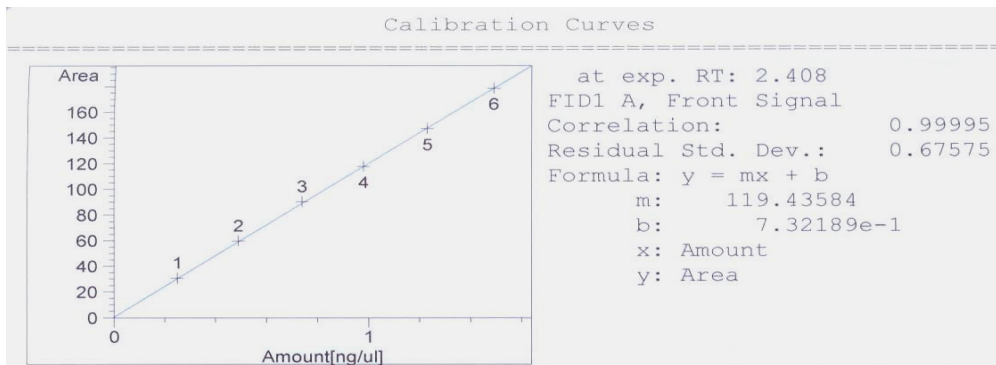
ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.25	30.32891	1
0.5	59.33950	2
1.0	117.69587	3
1.5	179.54581	4
2.0	237.92921	5
2.5	297.81433	6



ภาพที่ 2 แสดง Calibration curves สารละลาย chlorpyrifos 6 level (0.25-2.5 mg/ml)

ตารางที่ 4 ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความเข้มข้น 0.25-1.5 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.25	30.66213	1
0.50	59.57400	2
0.75	90.26456	3
1.00	117.69587	4
1.25	147.11852	5
1.50	178.48790	6



ภาพที่ 3 แสดง Calibration curves สารละลาย chlorpyrifos 6 level (0.25-1.5 mg/ml)

4. ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (precision)

4.1 ผลการหา precision ที่ 3 ความเข้มข้น โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (repeatability) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทวนซ้ำ (repeatability)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	32.8	38.86	65.8	38.96	99.2	38.11
2	32.8	38.30	65.9	38.46	99.3	37.92
3	32.9	39.26	66.1	38.87	99.4	38.59
4	33.0	39.00	66.1	38.13	99.5	38.60
5	33.0	38.85	66.2	38.65	98.6	38.69
6	33.1	38.77	66.2	38.45	98.6	38.63
7	33.1	39.11	66.3	38.79	98.7	38.44
8	33.3	39.49	66.6	38.64	98.8	38.26
9	40.4	38.68	66.9	38.35	98.8	38.98
10	40.6	38.47	70.1	38.65	99.0	38.09
	Mean	38.9	Mean	38.6	Mean	38.4
	SD	0.356	SD	0.252	SD	0.329

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 38.64, \quad \text{SD} = 0.312 \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 0.808$$

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; $\text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Mean}}$

Predicted Horwitz RSD

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.393 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.393)} = 1.519 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{0.808}{1.519} = 0.53$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.53

4.2 ผลการหา precision ที่ 3 ความเข้มข้น โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (reproducibility) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทำซ้ำ (reproducibility)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	32.6	39.39	65.4	39.57	98.7	39.84
2	32.7	39.21	65.6	39.41	98.9	38.94
3	32.8	38.93	65.7	39.11	99.0	39.17
4	32.8	38.87	65.8	39.72	99.1	39.34
5	32.9	39.19	65.8	39.35	101.9	39.46
6	33.0	39.54	65.9	39.79	102.0	39.55
7	33.1	38.90	67.3	39.31	107.5	39.13
8	33.3	39.33	67.5	39.72	107.6	39.76
9	33.7	39.11	72.7	39.81	125.8	39.84

10	33.8	39.42	72.9	40.05	125.9	39.53
	Mean	39.2	Mean	39.6	Mean	39.5
	SD	0.235	SD	0.285	SD	0.311

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิม หลังจากการทดลองครั้งแรก 10 วัน ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 39.41, \quad \text{SD} = 0.277 \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 0.703$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad \text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.393 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.393)} = 1.519 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{0.703}{1.519} = 0.46$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.46

5. ผลการตรวจสอบ robustness/ruggedness

5.1 ผลตรวจสอบ robustness จากการปรับสภาวะของเครื่อง โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ oven จาก 240 °c เป็น 230 °c ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้นจากการตรวจสอบ robustness

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	32.8	39.57	65.8	39.20	99.2	39.11
2	32.8	39.63	65.9	39.07	99.3	39.27

3	32.9	39.75	66.1	39.02	99.4	39.50
4	33.0	39.94	66.1	39.17	99.5	39.09
5	33.0	39.51	66.2	39.42	98.6	38.66
6	33.1	39.02	66.2	39.73	98.6	38.45
7	33.1	38.96	66.3	39.20	98.7	39.76
8	33.3	39.33	66.6	38.96	98.8	39.57
9	40.4	39.37	66.9	39.43	98.8	38.92
10	40.6	39.70	70.1	38.98	99.0	38.96
	Mean	39.48	Mean	39.22	Mean	39.13
	SD	0.313	SD	0.244	SD	0.410

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง โดยการเปลี่ยน อุณหภูมิ Oven จาก 240 องศาเซลเซียส เป็น 230 องศาเซลเซียส ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 39.270, \quad \text{SD} = 0.322, \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 0.820$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.393 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.393)} = 1.519 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{0.820}{1.519} = 0.54$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ robustness ได้ค่า HORRAT = 0.54

5.2 ผลการตรวจสอบ ruggedness จากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก capillary column HP-5 เป็น DB-5ms (I.D จาก 0.32 mm เป็น 0.25 mm) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้นจากการตรวจสอบ ruggedness

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ

1	32.6	39.26	65.4	39.12	98.7	39.34
2	32.7	39.19	65.6	39.22	98.9	39.29
3	32.8	37.57	65.7	38.96	99.0	39.24
4	32.8	37.69	65.8	39.12	99.1	39.22
5	32.9	40.11	65.8	39.31	101.9	39.50
6	33.0	40.12	65.9	39.59	102.0	39.98
7	33.1	40.16	67.3	39.50	107.5	38.82
8	33.3	39.91	67.5	39.30	107.6	38.70
9	33.7	39.51	72.7	39.15	125.8	39.29
10	33.8	39.35	72.9	39.28	125.9	39.36
	Mean	39.29	Mean	39.26	Mean	39.27
	SD	0.948	SD	0.187	SD	0.350

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองโดยการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก capillary column HP-5 เป็น DB-5ms ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 39.272, \quad \text{SD} = 0.495, \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.260$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.393 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.393)} = 1.519 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.260}{1.519} = 0.83$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.83

6. ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) การประเมินค่า accuracy จาก % recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ chlorpyrifos ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ Chlorpyrifos

n	AI content (..mg/25ml)								
	Conc.added (8.25 mg/25ml)			Conc.added (16.50 mg/25ml)			Conc.added (24.60 mg/25ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.04	17.26	8.25	9.14	24.67	16.50	9.30	33.54	24.60
2	9.09	17.42	8.25	9.22	24.69	16.50	9.27	33.78	24.60
3	9.11	17.56	8.25	9.13	24.95	16.50	9.31	33.91	24.60
4	9.12	17.52	8.25	9.16	25.38	16.50	9.26	34.00	24.60
5	9.15	17.74	8.25	9.16	25.44	16.50	9.16	34.14	24.60
6	9.17	17.26	8.25	9.17	25.32	16.50	9.17	34.18	24.60
7	9.18	17.51	8.25	9.18	25.33	16.50	9.14	33.97	24.60
8	9.20	17.50	8.25	9.26	25.41	16.50	9.19	34.18	24.60
9	9.27	17.28	8.25	9.31	25.48	16.50	9.17	33.86	24.60
10	9.34	17.25	8.25	9.40	25.48	16.50	9.15	34.14	24.60
Mean	9.16	17.46	8.25	9.17	25.36	16.50	9.18	33.99	24.60
SD	0.08638	0.1644		0.0867	0.320		0.0658	0.207	
%RSD	0.94278	0.942		0.9446	1.2608		0.717	0.609	
%Recovery			100.5			98.1			100.8

สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ chlorpyrifos โดยเครื่อง GC-FID ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

Column: capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 µm film thickness)

Gas flow rate: Helium (carrier gas) 2 ml/min, Hydrogen 40 ml/min, Air 400 ml/min

Split injection: Split ratio 50:1, Split flow 100 ml/min, Injection volume: 1 µl,

Temperature: Oven 240 °C, Inlet 260 °C, Detector 260 °C

สภาวะที่ได้พบว่า chromatogram ของ chlorpyrifos ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี specification/ selectivity ที่ดี

2. ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้

2.1 range หรือ ปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0.25-2.5 mg/ml

2.2 linearity หรือ ความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิธีวิเคราะห์ทดสอบ สามารถทำได้ chlorpyrifos มี correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$

2.3 การตรวจสอบ precision ในรูปของ repeatability และ reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.53 และ 0.46 ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

2.4 การตรวจสอบ precision ในรูปของ robustness และ ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.54 และ 0.83 ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

2.5 การตรวจสอบ accuracy ของวิธีการจากค่า % recovery เท่ากับ 99.8 % สำหรับสารที่มี ปริมาณมากกว่า 10% เกณฑ์ AOAC อยู่ในช่วง 98-102% ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos ให้ผลการ ทดสอบ accuracy อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

3. ผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบ ค่า % สารออกฤทธิ์ ผลผลิตกัญชาสารกำจัดศัตรูพืช chlorpyrifos ของห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการ ตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

เอกสารอ้างอิง

นาคยา จันทร์ส่อง, อธิพิล บังพรม, สุภาพร บังพรม, จำลอง กรัมย์ และ สุนทรี มีเพ็ชร. 2553. ชนิดและ ปริมาณสารพิษตกค้างในพืชผักและผลไม้ในพื้นที่ สวพ. 4 หลังการรับรองระบบ GAP. การประชุม วิชาการประจำปี 2553, สวพ. 3-4-5. กรมวิชาการเกษตร. 3-5 มีนาคม 2553. ศูนย์ศิลปวัฒนธรรม กาญจนภิเษก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

วัชรพร พากัดดี, ปริญญา สายสุพรรณ, จารุงค์ ประสพสุข และ ชัยศักดิ์ แผ้วพลสง. 2554. การศึกษาชนิด และปริมาณของสารพิษตกค้างในพืชผักผลไม้ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน หลังการรับรอง ระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP). ประกอบการประชุมวิชาการระบบเกษตรแห่งชาติครั้งที่ 7. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และ กรมวิชาการเกษตร. 8-10 สิงหาคม 2554. โรงแรมตักศิลา. มหาสารคาม.

ศูนย์ข้อมูลวัตถุอันตรายและเคมีภัณฑ์. 2554. เอกสารข้อมูลความปลอดภัยเคมีภัณฑ์ (MSDS).

(วันที่สืบค้น 8 พฤษภาคม 2554) จาก: URL: <http://msds.pcd.go.th/>.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2554. ข้อมูลสถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร.

(วันที่สืบค้น 8 พฤษภาคม 2554) จาก: URL: <http://www.m.doa.go.th/ard/stat2.php?cat=2>.

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3. 2553. รายงานการตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักและ ผลไม้แปลง GAP ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน. กรมวิชาการเกษตร. ขอนแก่น.

- หน่วยข้อเสนอเพื่อลดอันตรายและความปลอดภัย. 2554. ฐานความรู้เรื่องความปลอดภัยด้านสารเคมี. (วันที่
สืบค้น 8 พฤษภาคม 2554) จาก: URL:<http://www.chemtrack.org/>
- NPIC. 2009. Chlorpyrifos technical fact sheets. (cited 5 July 2010) Available from: URL:
<http://www.npic.orst.edu/factsheets/chlorptech.pdf>.
- Kidd, H. and James, D.R. 1991. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of
Chemistry Information Services, Cambridge, United Kingdom.
- Henriet, J., Martijn, A. and Povlsen, H.H. 1985, CIPAC Handbook, Vol.1C, Analysis of
Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical
Council, Limited.
- WHO. 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticide by Hazard and Guidelines to
Classification 2009. (cited 7 July 2012) Available from:
URL: http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf.