

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- กิจกรรม** : 1. การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชสารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
- กิจกรรมย่อย** : 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมัยทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย)** : 1.5.11 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมัยทางการเกษตร

Hexaconazole

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Study on Method Validation of Hexaconazole in Pesticide Products

4. คณะผู้ดำเนินงาน

ชื่อหัวหน้าโครงการ	นางจิตติมา ยถาฐานนท์	สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง	นางสาวดวงรัตน์ วิลาสินี	สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมัยทางการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล	สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมัยทางการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

จากการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์เฮกซะโคนาโซล(Hexaconazole) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดโรคพืช เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas-Liquid Chromatography, GLC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ก๊าซตัวพา (He) อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิการฉีด 200 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตรวจวัด 250 องศาเซลเซียส Split injection split ratio 50 : 1 และปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร จากผลการทดสอบพบว่าช่วงของการวัด (Working range) และค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99998 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995 ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.20 - 0.50 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.05 - 0.30 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จาก

ค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 99-102 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หัวตุ่มพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

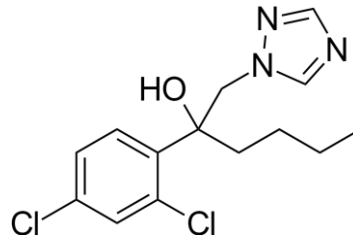
Abstract

Method validation study of Hexaconazole, the active ingredients in fungicide products for aqueous suspension concentrates formulations were developed by gas chromatography with flame ionization detector (FID). Column capillary coated with 5% phenyl methyl siloxane had a diameter of 0.32 mm and a length of 30 m with 0.25 μm film thickness. The carrier gas (He) with flow rate of 2.0 ml/min, an injector temperature of 200 $^{\circ}\text{C}$, an oven temperature of 230 $^{\circ}\text{C}$, a detector temperature of 250 $^{\circ}\text{C}$, a split ratio of 50:1 and a volume injection of 1 μl were used. The results were found that the working concentration range and linearity range of Hexaconazole were 0.2 - 2.0 mg/ml with the coefficient correlation (r) of 0.99998 which had accepted with limit of the correlation coefficient (r) \geq 0.995. The precision of HORRAT values for repeatability and within laboratory reproducibility were in the range of 0.20 – 0.50. The HORRAT values tested with robustness and ruggedness were in the range of 0.05 – 0.30 which were followed by the AOAC, EU and Codex due to their less than 2. The accuracy of this method was assessed by recovery studied. The percent recoveries were in the range of 99 – 101 considered an acceptance by the AOAC (98-102%) for analyte concentrations more than 10%. This specific method did not have interference from other substances. As a result, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. The developed method, therefore, could be used to determine in pesticide products with accuracy and precision.

คำนำ

เฮกซะโคนาโซล (Hexaconazole) มีชื่อทางเคมี (RS)-2-(2,4-dichlorophenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexan-2-ol 2-(2,4-Dichlorophenyl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)hexane-2-ol มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ น้ำหนักโมเลกุล 314.2 g mol^{-1} ประโยชน์ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา ประเภทตุ่มขึ้น มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันและกำจัด โรคกาบใบแห้งของข้าว โรคเมล็ดสีม่วงในถั่ว

เห็ดเชื้อรา โรคช่อดอกแห้งและโรคราแป้งในเงาะ โรคแอนแทรคโนสขององุ่นและมะม่วง โรคใบจุดสีม่วงของหอมหัวใหญ่ โรคราสนิมขาวในเบญจมาศ โรคใบจุดสีดำในกุหลาบ



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้าง hexaconazole

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดวัดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด type A ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร Auto pipette ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Hexaconazole 98.0 %
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Hexaconazole 5% w/v SC
3. Acetone ชนิด AR grade

วิธีการ

1. การปรับภาวะเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph ชนิด Flame Ionization Detector (GC-FID) ดังนี้

คอลัมน์ชนิด : Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร

		ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร		
อุณหภูมิ injector	:	200	องศาเซลเซียส	
อุณหภูมิ oven	:	230	องศาเซลเซียส	
อุณหภูมิ detector	:	250	องศาเซลเซียส	
Split ratio	:	50 : 1		
Injection volume	:	1.0	ไมโครลิตร	
ก๊าซตัวพา	:	He	อัตราการไหล 2	มิลลิลิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H ₂	อัตราการไหล 40	มิลลิลิตรต่อนาที
	:	Air	อัตราการไหล 450	มิลลิลิตรต่อนาที
Make up gas	:	N ₂	อัตราการไหล 30	มิลลิลิตรต่อนาที

ทดสอบความพร้อมของเครื่อง GC ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดติดต่อกัน มีความแตกต่างกันไม่เกิน 2%

2. ตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Hexaconazole 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.2, 0.5, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตรแล้ว เติม Acetone ปริมาณ ครึ่งขวด เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลาย เข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการ กำหนดสถานะตั้งข้อ 1 แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Hexaconazole (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Hexaconazole 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.2, 0.5, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตรแล้ว เติม Acetone ปริมาณ ครึ่งขวด เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีด สารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการ กำหนดสถานะตั้งข้อ 1 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Hexaconazole (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

4. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่าง Hexaconazole 5% w/v SC

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Hexaconazole 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.2, 0.5, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่าง Hexaconazole

ชั่งสารตัวอย่างให้มีน้ำหนักประมาณ 200 มิลลิกรัมลงในขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ปริมาณครึ่งขวด นำไปเขย่าด้วย Ultrasonic bath เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วย Acetone จนครบ 10 มิลลิลิตร

ฉีดสารเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1 ดังนี้โดยฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำกันหลายๆครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2 % จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

5.1 ตรวจสอบความแม่นยำ Repeatability

ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

ชั่งผลิตภัณฑ์ที่เขย่าให้เข้ากันแล้วหนัก 250, 500 และ 750 มิลลิกรัม (± 40 มิลลิกรัม) เนื่องจากเป็นช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ปริมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Hexaconazole โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

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

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

$$\text{คำนวณ Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{Mill, J.N. and Mill, J.C., 2005})$$

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ ≤ 2 (ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549)

5.2 ตรวจสอบความแม่นยำ Reproducibility

ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน

ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่เขย่าให้เข้ากันแล้ว หนัก 250, 500 และ 750 มิลลิกรัม (± 40 มิลลิกรัม) เนื่องจากเป็นช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะตั้งข้อ 1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Hexaconazole โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

$$\text{คำนวณ Predicted Horwitz RSD} = 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ (Mill, J.N. and Mill, J.C., 2005)}$$

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ ≤ 2 (ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549)

5.3 ตรวจสอบความแม่นยำ Robustness/Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่าง Hexaconazole เช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยทำการเปลี่ยนอุณหภูมิในการทดสอบ (ตรวจสอบ Robustness) และเปลี่ยนเครื่อง GC-FID (ตรวจสอบ Ruggedness) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT เช่นเดียวกับข้อ 5.2

6. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

6.1 เตรียม Stock standard

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Hexaconazole 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มีความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม) ลงใน volumetric flask 500 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

6.2 เตรียม Stock sample

เตรียมสารละลายตัวอย่าง Hexaconazole 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 20 กรัม (มีความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม) ลงใน volumetric flask 1000 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

6.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 6.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 6.3 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 6.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard ปริมาตร 2.5, 5.0 และ 7.5 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 6.3

6.6 ประเมินค่า Accuracy จากค่า % recovery ดังนี้

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

C_{spike} = ปริมาณ Hexaconazole ในสารละลาย Spike

C_{origin} = ปริมาณ Hexaconazole ในสารละลาย Origin

C_{add} = ปริมาณ Hexaconazole ที่เติมลงในสารละลาย Spike

7.การหา Specificity / selectivity

ทดลองโดยฉีดสารมาตรฐานของ Hexaconazole สารละลายตัวอย่าง เข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1 เพื่อดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอม มารบกวนสารออกฤทธิ์ Hexaconazole หรือไม่

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาช่วงของการวัด (Working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจสอบช่วงของการวัด (Working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าช่วงของการวัดและช่วงความเป็นเส้นตรง ของ Hexaconazole อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9998 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) \geq 0.995

2. ผลการหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Hexaconazole 5% w/v SC ความถ่วงจำเพาะ 1.006

นน.ตัวอย่าง มิลลิกรัม	% ที่ตรวจพบ
202.6	4.872
205.2	4.882
209.3	4.929
204.8	4.936
189.9	4.931
204.5	4.854
205.0	4.990
204.0	4.955
201.8	4.974
203.0	4.945
ค่าเฉลี่ย	4.927
SD	0.044
%RSD	0.902

เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่าง Hexaconazole เทียบกับสารมาตรฐานได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.927 %w/w (4.957 %w/w), %RSD คือ 0.902 เกณฑ์ยอมรับ %RSD คือ ≤ 2 ฉะนั้นอยู่ในช่วงยอมรับได้ จึงสามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Hexaconazole ในขั้นตอนของการตรวจสอบความแม่นยำ(Precision) และ การตรวจสอบความถูกต้อง(Accuracy)

3.ผลการตรวจสอบ Precision

ตารางที่ 2 ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	249.5	4.955	497.8	4.927	747.9	4.953
2	259.8	5.025	495.8	4.906	740.8	4.990
3	246.4	4.972	502.3	4.910	748.9	4.936
4	251.0	4.946	513.8	4.915	748.6	4.967
5	244.2	4.952	492.8	4.925	751.2	5.009
6	250.2	4.945	496.2	4.979	743.8	5.033
7	266.3	4.928	504.5	4.992	743.9	4.950
8	255.0	4.953	498.1	4.959	742.0	4.994
9	241.8	4.960	497.0	4.924	744.9	5.026
10	274.3	4.960	505.8	4.923	748.0	5.080
mean		4.960		4.936		4.994
SD		0.026		0.030		0.045

ตารางที่ 3 ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	286.9	4.915	500.8	4.870	786.6	4.892
2	271.5	4.786	511.6	4.846	740.8	4.802
3	263.1	4.751	504.1	4.951	745.2	4.881
4	254.2	4.725	527.9	4.806	771.8	4.807
5	249.6	4.719	481.6	4.864	775.4	4.847

6	242.2	4.878	510.1	4.846	754.5	4.896
7	245.1	4.746	521.4	4.921	754.8	4.835
8	256.3	4.733	505.3	4.859	750.3	4.922
9	249.4	4.718	504.6	4.900	760.9	4.854
10	256.5	4.832	519.1	4.789	745.7	4.876
mean		4.780		4.865		4.861
SD		0.071		0.049		0.039

ตารางที่ 4 ตรวจสอบ Robustness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	259.8	4.864	497.8	4.947	747.9	4.987
2	243.9	4.839	502.3	4.895	740.8	4.947
3	249.3	4.853	513.8	4.948	748.6	4.989
4	246.4	4.897	496.2	4.898	743.8	4.961
5	251.0	4.890	504.5	4.925	743.9	4.941
6	244.2	4.879	497.0	4.874	742.0	4.916
7	250.2	4.873	505.8	4.890	744.9	4.997
8	266.3	4.860	526.8	4.936	748.0	4.942
9	255.0	4.875	500.2	4.941	741.8	4.920
10	247.3	4.954	495.6	4.951	743.7	4.958
mean		4.878		4.920		4.956
SD		0.032		0.029		0.028

ตารางที่ 5 ตรวจสอบ Ruggedness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	249.5	4.904	497.8	5.013	747.9	5.107
2	259.8	4.897	495.8	5.024	740.8	5.112

3	248.9	4.932	496.2	4.996	748.6	5.070
4	249.3	4.900	498.1	5.046	751.2	5.084
5	246.4	4.906	497.0	5.001	743.8	5.105
6	251.0	4.881	505.8	5.012	743.9	5.117
7	250.2	4.913	510.9	5.026	742.0	5.122
8	255.0	4.901	526.8	5.019	744.9	5.123
9	241.8	4.914	500.2	5.060	748.0	5.082
10	247.3	4.892	495.6	5.050	745.0	5.103
mean		4.904		5.025		5.102
SD		0.014		0.021		0.018

ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) สำหรับ Repeatability ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 4.960, 4.936, 4.994 % w/w ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.026, 0.030, 0.045 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.519, 0.609, 0.895 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.250, 0.292, 0.432 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

สำหรับ Within laboratory reproducibility ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 4.780, 4.865, 4.861% w/w ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.071, 0.049, 0.39 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 1.486, 1.014, 0.810 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.473, 0.323, 0.258 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ Hexaconazole ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตรวจสอบ Robustness มีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ oven ในการทดสอบ พบว่าสำหรับ Robustness ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 4.878, 4.920, 4.956 % w/w ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.030, 0.029, 0.028 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.646, 0.580, 0.569 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.206, 0.185, 0.181 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

สำหรับ Ruggedness มีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนเครื่อง GC-FID ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 4.904, 5.025, 5.102 %w/w ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.014, 0.021, 0.018 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.280, 0.424, 0.354 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.089, 0.135, 0.113 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ Hexaconazole ให้ผลการทดสอบ Robustness และ Ruggedness อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

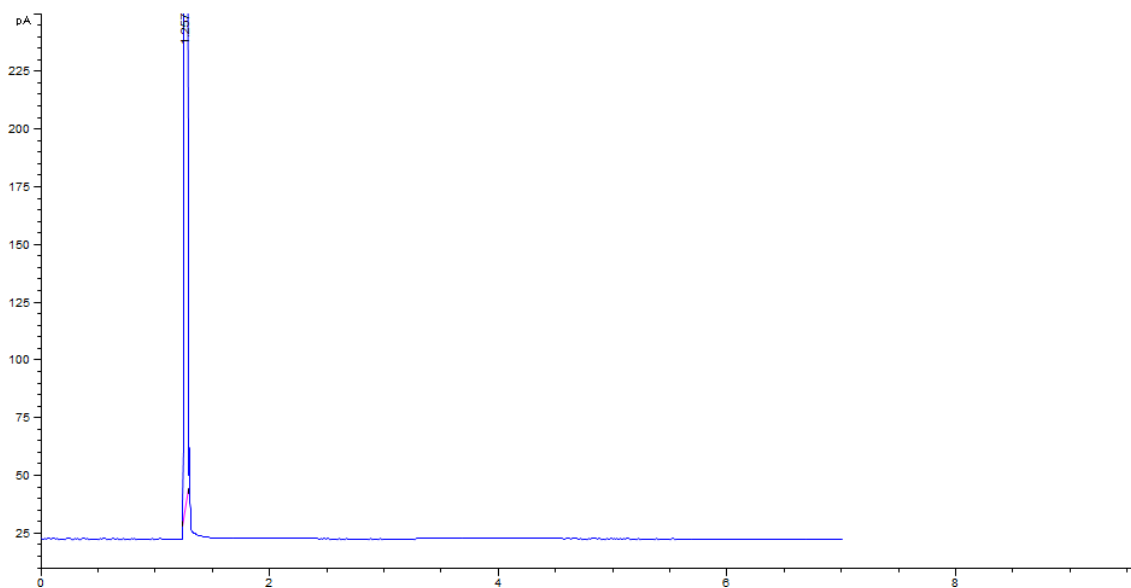
4.ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า % Recovery พบว่า ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างมี 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซ้ำ ค่า %Recovery ได้เท่ากับ 99.01, 101.32 และ 101.55 ตามลำดับ % Recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ความเข้มข้นเท่ากับ 100.63 (ตารางที่ 6) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ เพอร์เซนต์ Hexaconazole ได้อย่างถูกต้อง

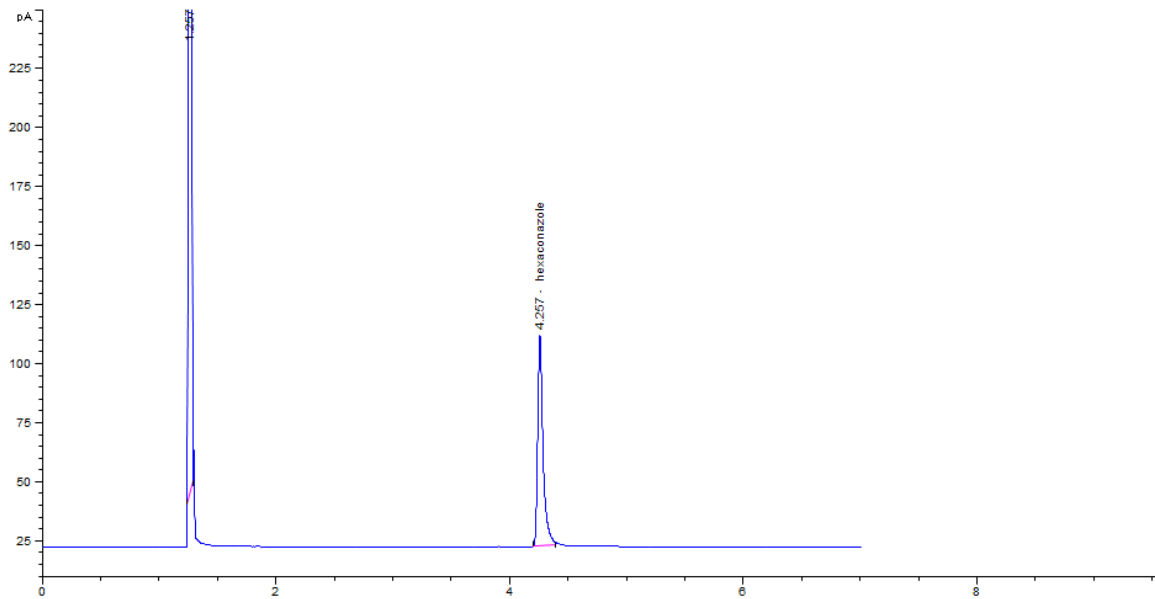
ตารางที่ 6 ตรวจสอบ % Recovery

ลำดับ	Al content (mg / 25 ml)								
	Conc.added (0.5 mg)			Conc. added (1.0 mg)			Conc. added (1.5 mg)		
	Mean Origin	Spike	Recovery (%)	Mean Origin	Spike	Recovery (%)	Mean Origin	Spike	Recovery (%)
1	0.198	0.693	98.973	0.203	1.219	101.598	0.201	1.728	101.804
2	0.198	0.690	98.447	0.203	1.217	101.432	0.201	1.729	101.909
3	0.198	0.691	98.660	0.203	1.211	100.761	0.201	1.727	101.731
4	0.198	0.690	98.458	0.203	1.210	100.743	0.201	1.719	101.220
5	0.198	0.694	99.104	0.203	1.217	101.351	0.201	1.719	101.223
6	0.198	0.692	98.864	0.203	1.219	101.590	0.201	1.719	101.238
7	0.198	0.693	99.069	0.203	1.220	101.721	0.201	1.730	101.934
8	0.198	0.698	100.016	0.203	1.213	100.983	0.201	1.729	101.861
9	0.198	0.693	98.946	0.203	1.217	101.443	0.201	1.721	101.356
10	0.198	0.696	99.604	0.203	1.218	101.545	0.201	1.719	101.217
mean		0.693	99.014		1.216	101.317		1.724	101.549
SD		0.002	0.489		0.004	0.357		0.005	0.322
%RSD		0.353	0.494		0.294	0.353		0.280	0.317

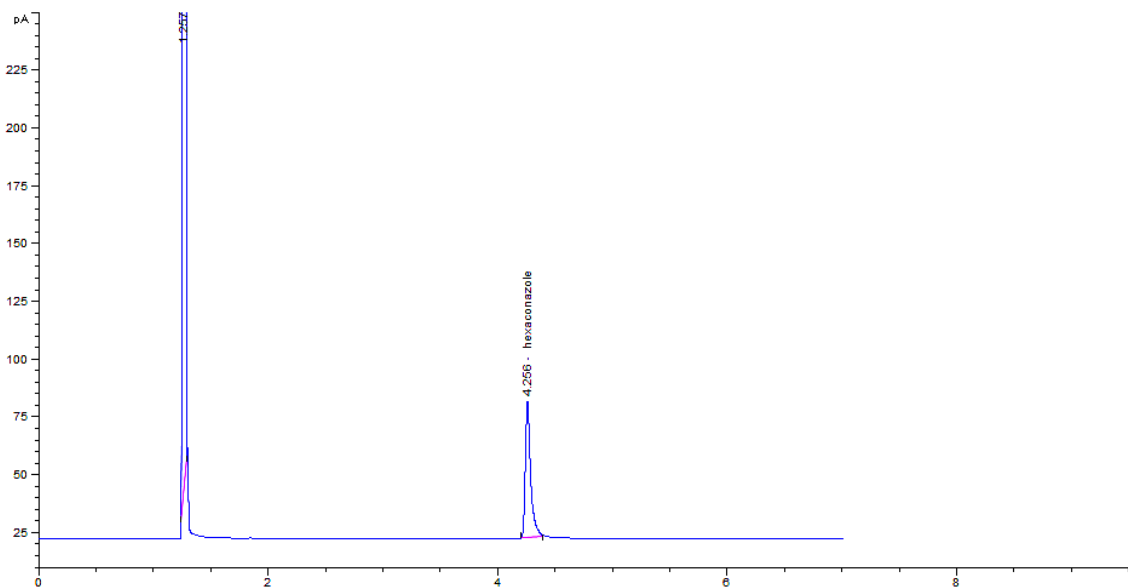
5.ผลการศึกษา Specificity / selectivity



รูปที่ 2 Chromatogram of Blank



รูปที่ 3 Chromatogram of Heaconazole standard solution



รูปที่ 4 Chromatogram of Heaconazole sample solution

จากการฉีด Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง Heaconazole เข้าเครื่อง GC-FID พบว่า โครมาโทแกรมของ Blank สารมาตรฐานและสารตัวอย่าง Heaconazole ไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ Heaconazole ตามรูปที่ 2 - 4 ตาม แสดงว่า วิธีนี้มี Specificity และ selectivity ดี

สรุปผลการทดลอง

ผลของการศึกษาการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร Hexaconazole โดยใช้เครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะต่างๆ เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ ช่วงของการวัด (Working range) และค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า r เท่ากับ 0.99998 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า $r \geq 0.995$ ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.20 - 0.50 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.05 - 0.30 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 99-102 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุที่มีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไป ขอกการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมคุณภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรตาม พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535
2. สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่เผยแพร่แก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ
3. ใช้ยื่นขอขยายขอบข่ายการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO / IEC 17025 : 2005

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2550. *นักวิเคราะห์มืออาชีพสาขาเคมี*. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรุงเทพฯ. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว*. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. *แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี. สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐาน*. กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. กรุงเทพฯ. รายงานวิชาการ ฉบับที่ สอพ 1 /2555.
- APVMA. 2004. *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products*. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Kingston. Australia.

- Anonymous. *Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations*. This document is an improved version of document. CIPAC 3807.
- BCPC : *The e-Pesticide Manual* . [CD-ROM]. (Thirteenth Edition) Version 3.0 BCPC. (British Crop Protection Council), 2006.
- EURACHEM Guide. 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical Method: A Laboratory*. Guide to Method Validation and Related Topics. United Kingdom.
- Kidd, H. and James, D.R. 1991. *The Agrochemicals Handbook*. 3rd Ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge. England.
- Ludwig, H. 1998. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Interpharm Press. USA.
- Mill, J.N. and Mill, J.C. *Statistics and chemometrics for analytical chemical*. 5th Ed. Pearson Education Limited. England, 2005 ,p 92

