

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

-
1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 2. โครงการวิจัย : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรม : 1. การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืชสารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อย : 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมัยการเกษตร
 3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : 1.5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลง Fipronil
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Study on Method Validation of Fipronil in Pesticide Products
 4. คณะผู้ดำเนินงาน
ชื่อหัวหน้าโครงการ นางจิตติมา ยถาภูฐานนท์ สังกัด กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง นางสาวภัทรฤทัย คมนันธุ์ สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมัยการเกษตร
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ภัทรฤทัย คมนันธุ์ สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมัยการเกษตร
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
พิเชษฐ์ ทองละเอียด สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมัยการเกษตร
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

เนื่องด้วยวิธีวิเคราะห์ Fipronil ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นมาเพื่อปรับใช้ตามเครื่องมืออุปกรณ์ที่มีอยู่ และเพื่อสะดวกกับการใช้งานในห้องปฏิบัติการที่จะได้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Fipronil ได้วิธีที่เหมาะสมดังนี้ ใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสถานะดังนี้ ใช้ตัวทำละลายเป็น Acetonitrile โมบายเฟสเป็น Acetonitrile 70 : 30 H₂O คอลัมน์ชนิด คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm, packed with Lichrospher®100,RP-18, 5 μm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร ได้ทำการพิสูจน์ ความใช้ได้ของวิธี ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ โดยมี Range อยู่ในช่วงความเข้มข้น เช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 และ Linearity 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Linearity ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995 Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.806, Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.727 Robustness ได้ค่า HORRAT = 0.891 Ruggedness ได้ค่า

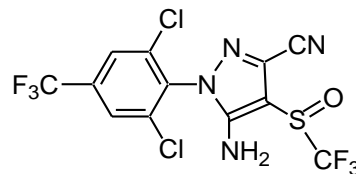
HORRAT = 0.012 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC ,EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการจากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ร้อยละ 99.27 อยู่ในช่วง 98-102 %

ABSTRACT

Fipronil is a broad-spectrum phenylpyrazone insecticide .and The Internation Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) name is (\pm) -5-amino-1(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4- trifluoromethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile. registry number 120068-37-3 with The Chemical Abstract Service (CAS) .Fipronil is used to control ants ,beetles ,cockroaches ,fleas ,ticks ,termites ,molecrickets ,thrips ,rootworms ,weevils ,and other insects. Fipronil is toxic to insects by contact or ingestion. Technical grade fipronil is considered moderatetly toxic by ingestion with an oral LD₅₀ of 97 mg/kg in rats and LD₅₀ of 95 mg/kg in mice. Fipronil is low to moderate in toxicity by contract with a dermal LD₅₀ of > 2,000 mg/kg in rats and 354 mg/kg in rabbits. Fipronil did not have method in CIPAC. So the method used was modified for analysis to Fipronil suitable in my laboratory . Analysis used High Performance Liquid Chromatography UV-Variable Detector .using column is LiChroCART® HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm, packed with Lichrospher®100,RP-18, 5 μ m .The condition of the method used mobile phase Acetonitrile 70 : 30 H₂O . UV-Variable Detector wavelength 230 nm. The result of study on method validation of Fipronil in pesticide Products .First ,the value of range 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 mg/ml ,respectively ,and value correlation coefficient (r) as 0.99996 ,Than the linearity value were 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 mg/ml., respectively ,and value correlation coefficient (r) as 0.99995 .The value of precision used Repeatability gain HORRAT as 0.806 ,Reproducibility gain HORRAT as 0.727,and Robustness gain HORRAT as 0.891 ,respectively. All of the items passed acceptance criteria (from AOAC ,EU & Codex). Finally ,The value of accuracy used %recovery gain as 99.27% ,and the result passed acceptance criteria (benchmark as 98-102, from AOAC ,EU & Codex).

6. คำนำ

ฟีโพรนิล (Fipronil) มีชื่อทางเคมี(±)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ น้ำหนักโมเลกุล 437.2 ประโยชน์ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงเช่น โรคหนอนซอนใบในดาวเรือง โรคเพลี้ยไฟในนาข้าว หนอนม้วนใบข้าว หนอนกอข้าว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว หนอนใยผัก แมลงหวี่ขาว เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง เพลี้ยจักจั่น แมลงวันทอง มดแดง หนอนเจาะ ตั๊กแตน แมลงสิง บั่ว ปลวก เป็นสารกำจัดแมลงและเพลี้ยไฟ ประเภทดูดซึมและถูกตัวตาย มีพิษเฉียบพลันทางปาก (หนู) 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พิษทางผิวหนังต่อหนูมากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทางผิวหนังต่อกระต่าย 345 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่มีพิษต่อปลาในนาข้าว ใช้ในพืชจำพวก ข้าว มะม่วง แตงโม ผัก ส้ม กัญชง ไม้ มะเขือเทศ ลำไย ลองกอง พริกไทย แตงกวา มะพร้าว สารเคมี Fipronil ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดใหม่ มีประสิทธิภาพในการป้องกันปลวกได้ดีที่สุดนานกว่า 3 ปี



7.วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector
2. คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5 μ m
3. เครื่องซั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 25, 200 และ 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. ปิเปตชนิด type A ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. บีกเกอร์ ขนาด 50,100,250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Fipronil 97.3%
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Fipronil 5% SC ความถ่วงจำเพาะ 1.052
3. Acetonitrile ชนิด AR grade

วิธีการ

- 1.การปรับสถานะเครื่อง HPLC (High Performance Liquid chromatography)

การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC (High Performance Liquid chromatography) ชนิด UV-Variable Detector ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Fipronil ดังนี้

อุณหภูมิ oven	:	35 องศาเซลเซียส
คอลัมน์ชนิด	:	คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm, packed with Lichrospher®100,RP-18, 5 µm
Injection volume	:	10.0 ไมโครลิตร
ตัวทำละลาย	:	Acetonitrile
Mobile phase	:	Acetonitrile 70 : 30 H ₂ O

และทดสอบความพร้อมของเครื่องด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2% จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์

2. ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่าง Fipronil 5% w/v SC

ชั่งสารมาตรฐาน สารมาตรฐาน Fipronil 97.3% ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 (±2 มิลลิกรัม) มิลลิกรัม ลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ประมาณ 80 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วย Ultrasonic bath เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนครบ 100 มิลลิลิตร

ชั่งสารตัวอย่างให้มีน้ำหนักประมาณ 200 มิลลิกรัมลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ประมาณ 80 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วย Ultrasonic bath เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนครบ 100 มิลลิลิตร

การฉีดสารเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector ดังนี้โดยฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนค่าของ Peak Area ที่ฉีดแต่ละครั้งมีค่าเท่ากัน หรือแตกต่างกันไม่เกิน 2 % จึงดำเนินการตรวจวิเคราะห์ ฉีดสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

คำนวณค่า response factor (fi) ตามสูตร

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

เมื่อ	f_i	=	ค่า response factor ของสารมาตรฐาน
	H_s	=	พื้นที่ใต้ peak ของ Fipronil ในสารมาตรฐาน
	S	=	น้ำหนักของ Fipronil ในสารละลายมาตรฐาน (mg)
	P	=	ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Fipronil (%)

หาเปอร์เซ็นต์ของสาร Fipronil จากสูตรดังนี้

$$\text{Fipronil content} = \frac{Hw}{f \times w}$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ Fipronil ในสารละลาย ตัวอย่าง Fipronil

f = ค่าเฉลี่ย response factor

w = น้ำหนักของ Fipronil ในสารละลาย ตัวอย่าง Fipronil (mg)

3.ตรวจสอบช่วงของการวัด(Range)

ซึ่งสารมาตรฐานที่ทราบเปอร์เซ็นต์ Fipronil ที่แน่นอน ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ 6 ความเข้มข้นๆ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน เช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต stock สารมาตรฐาน Fipronil เข้มข้น 2.158 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 3, 5, 6, 7, 8, 9 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้ว เติม Acetonitrile 25 มิลลิลิตรเขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector ที่มีสถานะดังนี้ อุณหภูมิ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm, packed with Lichrospher®100, RP-18, 5 µm Injection volume 10.0 ไมโครลิตร

ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็น Acetonitrile 70 : 30 H₂O

แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Fipronil (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

4.ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงจากค่า Rang ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงที่ใช้งานจริง คือความเข้มข้นที่ 0.086, 0.129, 0.173, 0.216, 0.259, 0.302 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต stock สารมาตรฐาน Fipronil เข้มข้น 2.1579 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2, 3, 4, 5, 6, 7 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile 25 มิลลิลิตรเขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสถานะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm, packed with Lichrospher®100, RP-18, 5µm , Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็น Acetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Fipronil (แกนx) กับ response (แกนy) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากช่วงความเข้มข้นที่หาค่า Range โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995

5.ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

5.1 ตรวจสอบความแม่นยำ Repeatability (โดยทำการทดลองภายในวันเดียวกัน)

ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 100, 200 และ 300 มิลลิกรัม (± 25 มิลลิกรัม) เนื่องจากเป็นช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

ทำ Calibration Curve ซึ่งสารมาตรฐานที่ทราบเปอร์เซ็นต์ Fipronil ที่แน่นอน ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นๆ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งานเช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้า เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm, packed with Lichrospher®100, RP-18, 5 μ m , Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็น Acetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization ในเวลาที่ใกล้เคียงกันหรือวันเดียวกัน คำนวณค่าเฉลี่ย (\bar{X}) และ SD ของผลการทดสอบ

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

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

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

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

$$\text{AOAC ยอมรับ } < 2 \text{ และ EU, Codex ยอมรับ } \leq 2 \text{ (ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549)}$$

5.2 ตรวจสอบความแม่นยำ Reproducibility (ทำโดยทำการทดลองต่างวันเวลายกกัน)

ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 100, 200 และ 300 มิลลิกรัม (± 25 มิลลิกรัม) เนื่องจากเป็นช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้า เครื่อง High

Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

ทำ Calibration Curve ซั่งสารมาตรฐานที่ทราบเปอร์เซ็นต์ Fipronil ที่แน่นอน ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นๆ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งานเช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้า เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization ในเวลาที่ต่างวันกันคำนวณค่าเฉลี่ย (X) และ SD ของผลการทดสอบ

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

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

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

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

$$\text{AOAC ยอมรับ } < 2 \text{ และ EU, Codex ยอมรับ } \leq 2$$

5.3 ตรวจสอบความแม่นยำ Robustness/Ruggedness(โดยเปลี่ยนเครื่องในการทดสอบ)

ซั่งผลิตภัณฑ์ที่คลุกเคล้าแล้ว หนัก 100, 200 และ 300 มิลลิกรัม (± 25มิลลิกรัม)เนื่องจากเป็นช่วงใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetonitrileประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้า เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

ทำ Calibration Curve ซั่งสารมาตรฐานที่ทราบเปอร์เซ็นต์ Fipronil ที่แน่นอน ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นๆ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งานเช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้า เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70

: 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization คำนวณค่าเฉลี่ย (\bar{X}) และ SD ของผลการทดสอบ

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

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

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

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

$$\text{AOAC ยอมรับ} < 2 \text{ และ EU, Codex ยอมรับ} \leq 2$$

6.ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Fipronil โดยชั่งสารมาตรฐาน Fipronil ให้ทราบน้ำหนักแน่นอน ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetonitrile ประมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน (Stock std. ประมาณ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสถานะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x 4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

เตรียมสารละลายตัวอย่าง Fipronil ให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(Stock sample) โดยชั่ง Fipronil (sample) น้ำหนักประมาณ 14372.0 มิลลิกรัมใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetonitrile ประมาณ 500 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5-10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrileจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสถานะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

ทำ Calibration Curve โดยชั่งสารมาตรฐานที่ทราบเปอร์เซ็นต์ Fipronil ที่แน่นอน ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ความเข้มข้นๆ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งานเช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x 4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

เตรียมสารละลาย original sample ของ Fipronil ในสารตัวอย่าง โดยดูดสารละลาย Stock sample ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด (ทำ 3 ชุด รวม 30 ขวด) นำมาละลายด้วย Acetonitrile ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x 4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization

เตรียมสารละลาย Spike sample โดยดูดสารละลาย Stock tech ปริมาตร 1,2,4 มิลลิลิตร และดูดสารละลาย Stock sample ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 25 มิลลิลิตรจำนวน 10 ขวด (ทำ 3 ชุด รวม 30 ขวด) นำมาละลายด้วย Acetonitrile ประมาณ 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตรฉีดสารละลายเข้าเครื่อง เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศาเซลเซียส คอลัมน์ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Fipronil โดยวิธี external standardization ประเมินค่า Accuracy จากค่า % recovery ดังนี้

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

A_{spike} = ปริมาณ Fipronil ในสารละลาย Spike

A_{origin} = ปริมาณ Fipronil ในสารละลาย Origin

A_{add} = ปริมาณ Fipronil ที่เติมลงในสารละลาย Spike

7.การหา Specificity / selectivity

ทดลองโดยฉีดสารมาตรฐานของ Fipronil สารละลายตัวอย่าง เข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector พิจารณา Chromatogram ที่ดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอม

มารบกวณสารออกฤทธิ์ Fipronil หรือไม

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1.ผลการหาเปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสาร

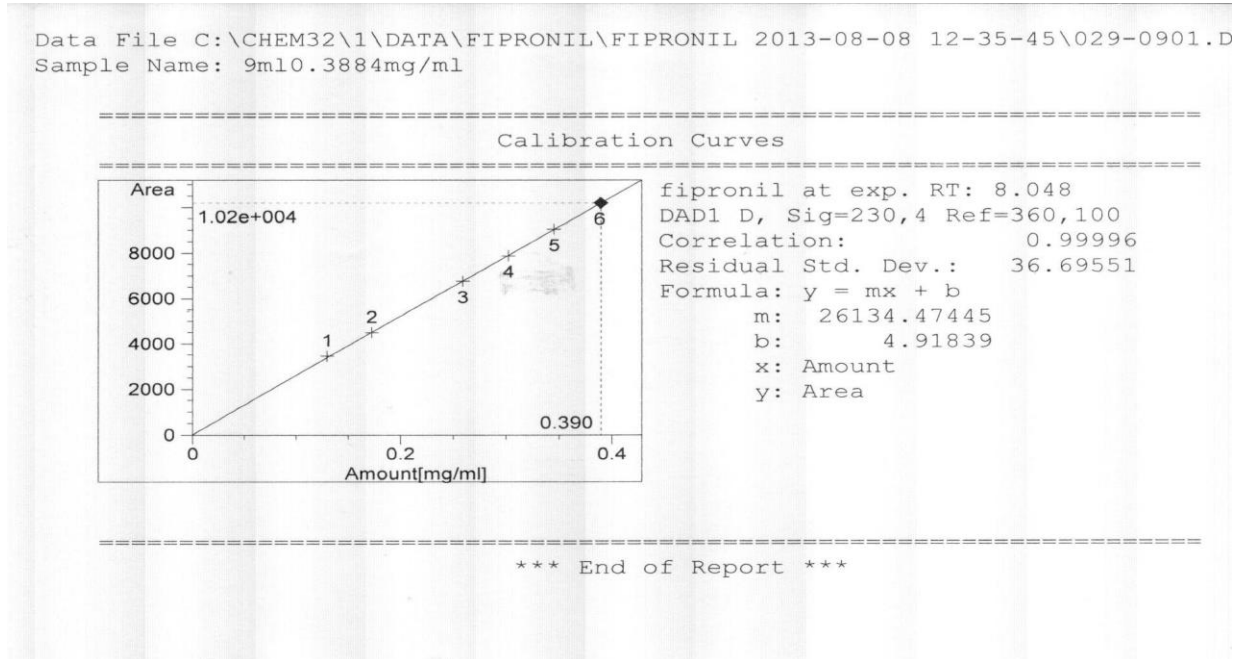
ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของสาร Fipronil 5% w/v SC ความถ่วงจำเพาะ 1.010

นน.ตัวอย่าง มิลลิกรัม	% ที่ตรวจพบ
209.2	4.999
206.6	4.980
202.3	5.146
214.8	5.159
209.0	5.124
202.5	5.131
222.1	5.039
233.5	5.081
208.4	5.074
211.9	5.063
ค่าเฉลี่ย	5.080
SD	0.061
%RSD	1.200

เปอร์เซ็นต์ที่แน่นอนของสารตัวอย่าง Fipronil เทียบกับสารมาตรฐานได้ค่า %RSD คือ 1.200 เกณฑ์ยอมรับ %RSD คือ ≤ 2 ฉะนั้นอยู่ในช่วงยอมรับได้ จึงสามารถนำไปใช้สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Fipronil ในขั้นตอนของตรวจสอบความถูกต้อง(Accuracy) และตรวจสอบความแม่นยำ(Precision)

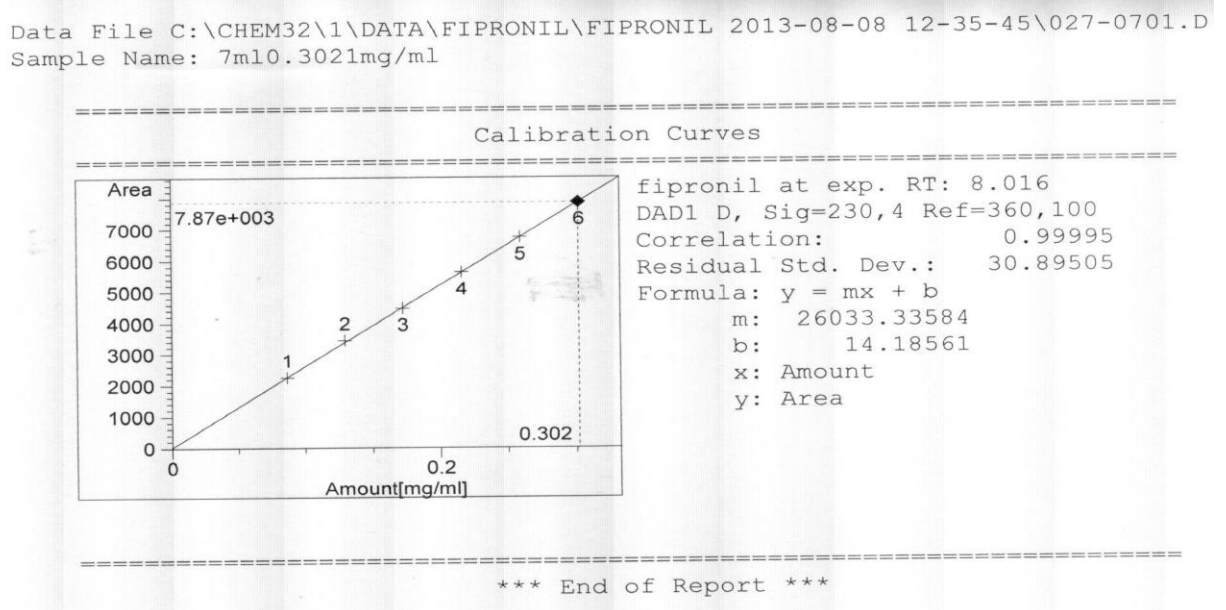
2.ผลการศึกษาช่วงของการวัด(Range)

พิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของ Range ในช่วงความเข้มข้น 0.086, 0.129, 0.259, 0.302, 0.388, 0.432 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ Fipronil ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) \geq 0.995



3.ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง(Linearity)

Linearity ที่ความเข้มข้น 0.086, 0.129, 0.173, 0.216, 0.259, 0.302 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Fipronil Linearity ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r) \geq 0.995



4. ผลการตรวจสอบ Precision

ตารางที่ 2 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น Repeatability (โดยทำการทดลองภายในวันเดียวกัน)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.1 mg/ml		ความเข้มข้น 0.2 mg/ml		ความเข้มข้น 0.3 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ
1	108.3	4.848	209.2	4.999	305.1	5.108
2	106.3	4.862	206.6	4.980	306.9	5.057
3	103.1	4.921	202.3	5.146	303.6	5.093
4	103.6	4.917	214.8	5.159	323.5	5.078
5	103.9	5.011	209.0	5.124	308.5	5.072
6	108.8	4.994	202.5	5.131	312.4	5.026
7	104.8	5.053	222.1	5.039	313.4	5.046
8	110.3	4.915	233.5	5.081	358.4	5.074
9	103.4	4.988	208.4	5.074	315.8	5.077
10	109.2	4.882	211.9	5.063	307.9	4.970
mean		4.939		5.080		5.060
SD		0.068		0.061		0.039

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ โดยทำการทดลองภายในวันเดียวกัน ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 5.026 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.084$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.084 \times 100}{5.026} = 1.671$$

$$\begin{aligned} \text{คำนวณ Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \quad (\text{Mill, J.N. and Mill, J.C., 2005}) \\ &= 2.072 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{เมื่อค่า } C &= \text{Concentration ration} \\ &= 0.05 \end{aligned}$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{1.671}{2.072} = 0.806$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.806

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

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Fipronil ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น (Reproducibility) (ทำโดยทำการทดลองต่างวันเวลา)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.1 mg/ml		ความเข้มข้น 0.2 mg/ml		ความเข้มข้น 0.3 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ
1	120.7	5.158	235.8	5.069	308.3	5.078
2	111.9	5.159	210.0	5.093	329.8	4.962
3	134.5	5.132	204.3	5.104	318.4	5.089
4	109.7	5.235	202.0	5.084	340.5	5.028
5	122.5	5.131	243.4	5.006	321.9	5.100
6	112.1	5.174	203.6	5.110	307.7	5.098
7	116.6	5.165	200.9	5.057	315.4	5.035
8	102.2	5.182	242.7	5.012	309.3	5.106
9	105.6	5.303	221.2	5.110	309.9	5.039
10	113.9	5.292	207.2	5.145	302.4	5.098
mean		5.193		5.079		5.063
SD		0.063		0.044		0.046

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ทำโดยทำการทดลองต่างวันเวลา ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 5.111 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.077$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{\bar{X}}{5.111} = \frac{0.077 \times 100}{5.111} = 1.507$$

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

$$= 3.139$$

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

$$= 0.05$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{1.507}{3.139} \quad \text{ได้ค่า} = 0.480$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.480

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

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Fipronil ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4 การหา Precision ที่ 3 ความเข้มข้น ตรวจสอบการทนซ้ำ (Robustness/ Ruggedness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.1 mg/ml		ความเข้มข้น 0.2 mg/ml		ความเข้มข้น 0.3 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ	นน.ตัวอย่าง mg	% ที่ตรวจพบ
1	106.3	5.066	208.4	5.076	303.6	5.124
2	106.5	4.868	212.1	4.906	306.9	5.033
3	107.6	4.921	209.0	4.930	302.3	5.152
4	103.1	4.929	204.1	4.946	300.1	4.937
5	104.8	4.858	203.8	5.066	302.4	5.104
6	103.9	4.873	210.5	4.937	307.9	4.993
7	103.6	4.858	202.1	4.925	301.2	5.036
8	103.4	4.876	205.1	4.935	307.5	5.101
9	110.3	4.895	209.2	4.935	303.6	4.922
10	110.8	4.847	210.1	4.890	301.4	4.845
mean		4.899		4.955		5.025
SD		0.065		0.064		0.099

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ (Robustness/ Ruggedness) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ โดยเปลี่ยนเครื่องมือในการทดสอบ ซึ่งแสดงผลรวมในรูปของ % RSD จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 4.959 \quad \text{และได้ค่า} \quad SD = 0.092$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

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

$$\% \text{ RSD (experimental)} = \frac{0.092 \times 100}{4.959} = 1.846$$

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

$$= 3.139$$

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

$$= 0.05$$

การประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} = \frac{1.846}{3.139} = 0.588$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness /Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.588

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

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Fipronil ให้ผลการทดสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

5.ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

ตารางที่ 6 ตรวจสอบ % Recovery									
N	Al content (mg / 50 ml)								
	Conc. added 5.4 mg			Conc. added 9.8 mg			Conc. added 13.7 mg		
	Mean Origin	Spike	%Recovery	Mean Origin	Spike	%Recovery	Mean Origin	Spike	%Recovery
1	3.189	8.760	103.167	2.950	12.722	99.714	2.959	16.746	100.635
2	3.189	8.746	102.907	2.950	12.608	98.551	2.959	16.783	100.905
3	3.189	8.637	100.889	2.950	12.716	99.653	2.959	16.746	100.635
4	3.189	8.577	99.778	2.950	12.431	96.745	2.959	16.903	101.781
5	3.189	8.558	99.426	2.950	12.359	96.010	2.959	16.889	101.679
6	3.189	8.585	99.926	2.950	12.740	99.898	2.959	16.913	101.854
7	3.189	8.727	102.556	2.950	12.697	99.459	2.959	16.883	101.635
8	3.189	8.017	89.407	2.950	12.652	99.000	2.959	16.851	101.401
9	3.189	8.235	93.444	2.950	12.377	96.194	2.959	16.765	100.774

10	3.189	8.208	92.944	2.950	12.349	95.908	2.959	16.820	101.175
mean		8.505	98.444		12.565	98.113		16.830	101.247
SD		0.258	4.795		0.166	1.692		0.066	0.484
%RSD		3.045	5.332		1.319	1.893		0.394	0.478

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

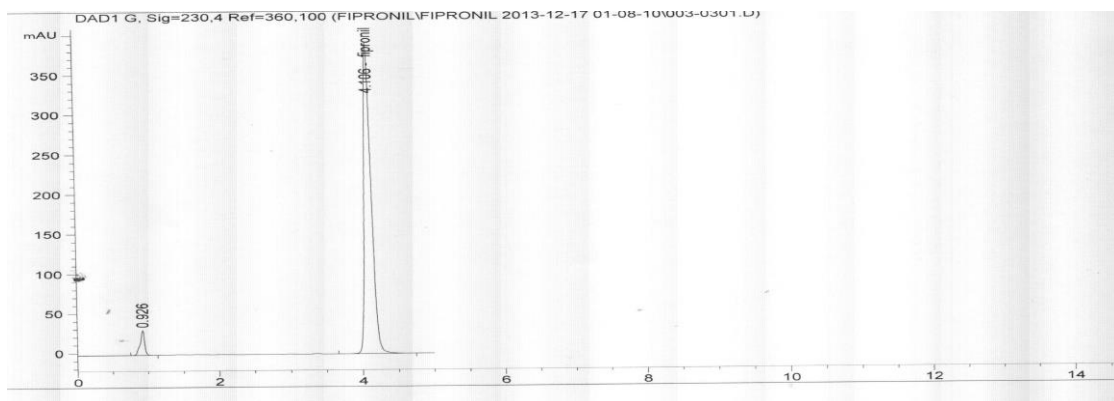
$$\%Recovery\ ที่\ ความ\ เข้ม\ ข้น\ ต่ำ = \frac{98.44 + 98.11 + 101.25 \times 100}{3} = 99.27$$

$$\%Recovery\ เฉลี่ย = 99.27$$

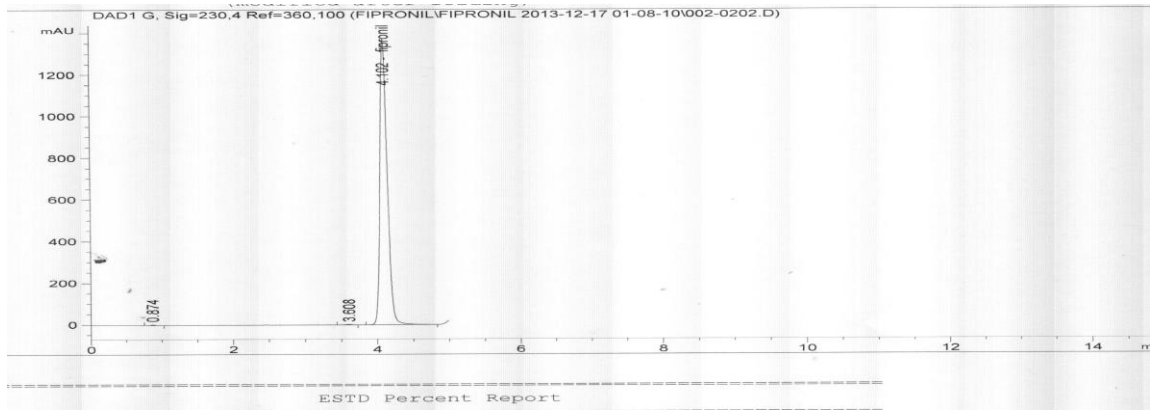
เกณฑ์ยอมรับ 98 – 102

ผลจากการประเมินความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการจากตารางที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ Recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้ร้อยละ 99.27 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณา ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์ เปอร์เซนต์ Fipronil ได้อย่างถูกต้อง

6.ผลการศึกษา Specificity / selectivity



รูปที่ 1 Chromatogram of Standard solution



รูปที่ 2 Chromatogram of Sample solution

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

9. สรุปผลการทดลอง

ผลของการศึกษาครั้งนี้ วิธีการตรวจวิเคราะห์ Fipronil ได้วิธีที่เหมาะสมดังนี้ ใช้เครื่อง เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ชนิด UV-Variable Detector มีสภาวะดังนี้ oven 35 องศา เซลเซียส คอลัมน์ ชนิด LiChroCART®HPLC-Cartridge 250 x4 (i.d.) mm,packed with Lichrospher®100,RP-18, 5µm ,Injection volume 10.0 ไมโครลิตร ตัวทำละลาย Acetonitrile และ Mobile phase เป็นAcetonitrile 70 : 30 H₂O ที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตรได้ทำการพิสูจน์ ความใช้ได้ของวิธี ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ โดยมี Range อยู่ในช่วงความเข้มข้น เช่น 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 และ Linearity 0.129, 0.216, 0.259, 0.302, 0.345, 0.388 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และLinearity ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9999 เกณฑ์ยอมรับค่าcorrelation coefficient (r) ≥ 0.995 Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.806, Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.480 ,Robustness / Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.588 ได้ค่า ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC ,EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ร้อยละ 99.27 อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณา สรุปได้ว่าค่าความคลาดเคลื่อนต่างๆที่ทำการศึกษา สามารถยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล สามารถใช้เป็นวิธีการวิเคราะห์ ในห้องปฏิบัติการที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ เป็นที่ยอมรับได้ในระดับสากล และเผยแพร่แก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐ และเอกชน ได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ ใช้ยื่นขอรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO/IEC 17025 เพื่อแสดงถึงความแม่นยำ และความเที่ยงของผลวิเคราะห์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบตรายทางการเกษตรตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535

2. สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่เผยแพร่แก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ
3. สามารถเป็นหน่วยงานกลางในการทดสอบเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตรได้
4. ใช้ยื่นขอขยายขอบข่ายการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO / IEC 17025 : 2005

11. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ดุขฎิ มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation) เอกสารประกอบการฝึกอบรม.กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

นิรนาม. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย .กองควบคุมพืชและวัสดุ การเกษตร.กรมวิชาการเกษตร.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิรนาม. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรม สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร.สถาบันอาหาร.

Mill, J.N. and Mill, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemical. 5th Ed. Pearson Education Limited. England, 2005 ,p 92

Kidd, H. and D.R. James (Eds). 1993. The Agrochemicals Handbook. 3rd. Ed. Royal Society of Chemistry. England.

Ludwig,H 1998. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Inter pharm Press.USA. p112.

EURACHEM Guide : the Fitness for Purpose of Analytical Method : A laboratory Guide to Method Validation and Related topics, 1998.

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.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว.เอกสารประกอบการฝึกอบรม.กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.กระทรวงสาธารณสุข.

นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี.สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐาน. กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. กรุงเทพฯ. รายงานวิชาการ ฉบับที่ สอพ 1 /2555.

