

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัดและวัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อย 1.5 : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุดิบพืชทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษทางการเกษตร
fipronil
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Method Validation on Analysis of fipronil
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นางนงพงา โอลเสน สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
ผู้ร่วมงาน : นางเนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกุล สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
นายสาคร นิยมสัจย์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

5. บทคัดย่อ

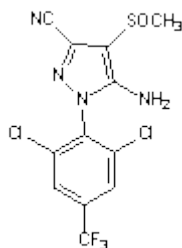
การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบของการวิเคราะห์สาร fipronil ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงศัตรูพืช สูตรผสมชนิด Suspension concentrate : SC ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography โดยมีตัวตรวจจับชนิด Diode Array Detector (DAD) ด้วย column Hypersil BDS C18 วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.5 – 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient : r เท่ากับ 0.99995 ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.5 – 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.99996 มีเกณฑ์การยอมรับของ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ การตรวจสอบความเที่ยง (precision) จากการทำ repeatability และ reproducibility มีค่า HORRAT ที่ความเข้มข้น 0.5 - 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ระหว่าง 0.5231- 0.6350 การตรวจสอบความคงทนของวิธีการ robustness โดยการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างชนิดของคอลัมน์ Hypersil BDS C18 กับ Hypersil ODS C18 และ ruggedness โดยการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างผู้ทดสอบที่ 1 และผู้ทดสอบที่ 2 ได้ค่า HORRAT มีค่า 0.6140 - 0.7937 ซึ่งเกณฑ์การยอมรับของ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 การตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy) พิจารณาจากค่า % recovery ได้ค่า 99.99 - 102.8 เกณฑ์การยอมรับของ AOAC % recovery อยู่ในช่วง 97-

103 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีการนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ได้ทำให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับในระดับสากล

Method Validation of fipronil by High Performance Liquid Chromatography technique is conducted in the laboratory to confirm the acceptable and reliable result. From the experiment to prove the parameters comply with international standard , range of concentration 0.50-1.50 mg/kg with correlation coefficient = 0.99995, linearity of concentration 0.5 -1.2 mg/kg with correlation coefficient = 0.99996, precision by repeatability with HORRAT 0.5306 - 0.8294 and reproducibility with HORRAT 0.5231 - 0.5542, ruggedness/robustness with HORRAT between 0.6140 to 0.7937, accuracy by %recovery of 100.0-102.8 , selectivity and specificity are acceptable. All parameters meet standard index.

6. คำนำ

fipronil เป็นสารป้องกันกำจัดแมลงในกลุ่มฟีนิลไพราโซล (phenylpyrazole) ออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยรบกวนการทำงานของระบบประสาท โดยผ่านทาง GABA-gated chloride channel ขัดขวางการไหลผ่านของคลอไรด์ไอออนในเซลล์ประสาท ทำให้การทำงานของระบบประสาทผิดปกติ มีผลให้แมลงตายในที่สุด ข้อดีของ fipronil คือเป็นพิษต่อระบบประสาทเฉพาะของแมลง เนื่องจาก fipronil จับได้ไม่ดีกับ GABA receptor ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง fipronil จัดเป็นสารฆ่าแมลงที่มีอันตรายระดับกลาง (กลุ่ม WHO class II moderately hazardous pesticide) มีค่า LD₅₀ (ขนาดยาที่ทำให้หนูทดลองตายจำนวนร้อยละ 50) เท่ากับ 97 มก./กก. มีพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมน้อยกว่าในนก ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง fipronil มีชื่อตาม International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) คือ (RS)-5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)pyrazole-3-carbonitrile มีสูตรโมเลกุล C₁₂H₄Cl₂F₆N₄O S มีสูตรโครงสร้างคือ



คุณภาพของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายปี 2535 นั้นจะตรวจหาชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ ตรงตามข้อมูลที่ระบุไว้ในฉลากหรือข้อมูลที่แจ้งไว้ก่อนขึ้นทะเบียนหรือไม่ ทั้งนี้เพื่อควบคุมให้ผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษทางการเกษตรที่จำหน่ายในท้องตลาดมีคุณภาพดีและมีความสำคัญมากต่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ถ้าคุณภาพไม่ดีหรือไม่ได้มาตรฐาน ทำให้การป้องกันกำจัดไม่มีประสิทธิภาพและอาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมรวมทั้งทำให้เกิดการตกค้างในพืชและสิ่งแวดล้อมได้

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีการอ้างอิงใน Analytical of Technical and Formulated Pesticides, CIPAC handbook Vol. N เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่สามารถปฏิบัติตามกระบวนการตามวิธีมาตรฐานได้ทั้งหมด ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการจึงดัดแปลงวิธีทดสอบจากวิธีมาตรฐาน เพื่อให้วิธีที่ทางห้องปฏิบัติการดัดแปลงเพื่อความเหมาะสมต่อการใช้งานจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามหลักเกณฑ์ของมาตรฐานสากล สามารถยืนยันความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ (ดุขุณีและอุมาพร, 2544) โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 จะต้องมีการทดสอบ range, linearity, precision, accuracy, robustness, ruggedness, specificity และselectivity (กนกพรและทิพวรรณ,2547) เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์ fipronil ให้มีความเหมาะสมต่อห้องปฏิบัติการและมีความถูกต้อง (accuracy) มีความแม่นยำ(precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์สากล

7.วิธีดำเนินการ

7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

7.1.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ประกอบด้วย

- 1) หัวตรวจวัดชนิด DAD
- 2) เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ
- 3) เครื่องประมวลผล data processing unit

7.1.2 เครื่องชั่ง range 0.00001 – 220 g ความละเอียด 4-5 ตำแหน่ง

7.1.3 freezer range 0 ถึง - 20 °C

7.1.4 ultrasonic bath

7.1.5 เครื่องวัดความหนาแน่นของสาร

7.1.6 volumetric flask, class A ขนาด 10 และ 25 ml (calibrated)

7.1.7 pasture pipette

7.1.8 beaker ขนาด 50 และ 100 ml

7.1.9 vial ขนาด 2 ml

7.2 สารเคมีในการทดสอบ ให้ใช้เฉพาะสารเคมีที่มีคุณภาพตามที่ระบุหรือเทียบเท่า เท่านั้น

7.2.1 สารมาตรฐาน fipronil purity ไม่ต่ำกว่า 90%

7.2.2 control sample fipronil

7.2.3 acetonitrile (analytical grade, AR)

7.3 วิธีกร

การเตรียมเครื่องมือ

การปรับสภาวะสำหรับเครื่อง HPLC ดังนี้

Column : column Hypersil BDS C18 ขนาด 150×4.6mm 5μ

Mobile : acetonitrile : Water (90 : 10)

Temperature : 30 °C

UV-detector : 254 nm

Flow rate : 1.0 ml/min

Inject volume : 10 μl

การตรวจสอบความพร้อมของเครื่องมือ

โดยการเตรียมสารมาตรฐาน standard solution 1 mg/ml เตรียมสารมาตรฐาน fipronil ความเข้มข้นประมาณ 1mg/ml โดยชั่งสารมาตรฐานที่เป็น primary standard ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 mg (C_A, C_B) โดยประมาณใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml เติม acetonitrile ประมาณ 5 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ Vial ขนาด 2 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตรวจสอบโดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน (C_A และ C_B) เข้าเครื่องหลายๆซ้ำ จนกระทั่ง peak area หรือ peak high มีค่า %RSD แตกต่างไม่เกิน 1% และ %RPD ของสารละลายมาตรฐาน (C_A และ C_B) แตกต่างไม่เกิน 3%

7.3.1 การหา range

- 1) เตรียมสารละลาย fipronil ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ โดยชั่งให้มีสารออกฤทธิ์ fipronil ในช่วงการใช้งาน ได้แก่ 0.50, 0.80, 0.90, 1.00, 1.20 และ 1.50 mg/ml
- 2) วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ fipronil ด้วยเครื่อง HPLC-DAD
- 3) plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fipronil (แกน X) กับ Response (แกน Y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

7.3.2 การหา linearity

- 1) จากกราฟของ range เลือกช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงมา 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำเตรียมสารละลาย fipronil ในช่วงที่เลือกที่ความเข้มข้น 0.50, 0.60, 0.70, 0.90, 1.00 และ 1.20 mg/ml
- 2) วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ fipronil ด้วยเครื่อง HPLC-DAD
- 3) plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fipronil (แกน X) กับ response (แกน Y)
- 4) จากกราฟ หาค่า correlation coefficient (r), เกณฑ์การยอมรับ $r \geq 0.995$

7.3.3 ตรวจสอบ precision ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

7.3.3.1 ตรวจสอบ precision ในรูปของ repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ จากเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในระยะเวลาใกล้เคียงกันแล้ว ประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

- 1) เตรียมสารละลาย fipronil ภายในช่วงที่หาได้จากข้อ 7.3.2 จำนวน 3 ความเข้มข้น 0.5, 1.00 และ 1.50 mg/ml ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

- 2) วิเคราะห์ปริมาณ fipronil ด้วยเครื่อง HPLC-DAD
- 3) บันทึกผลการทดสอบคำนวณค่าเฉลี่ย \bar{x} และ SD ของผลการทดสอบ

$$4) \text{ คำนวณ \% RSD, } \% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

5) บันทึกค่าทดสอบและผลการคำนวณ \bar{x} , SD, % RSD และ HORRAT ลงในตาราง
 ตรวจสอบ precision ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz' s ratio)

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

Predicted Horwitz RSD คำนวณได้จาก Horwitz equation

เกณฑ์การยอมรับ HORRAT < 2 : AOAC

7.3.3.2 ตรวจสอบ precision ในรูป reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกันในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองและคำนวณผลเช่นเดียวกันกับข้อ 7.3.3.1

7.3.4 ตรวจสอบ robustness

ทดสอบจากการเปลี่ยนชนิดของ column ที่ใช้ในการวิเคราะห์จาก 150×4.6mm 5µ Hypersil BDS C18 เป็น 125×4.0mm 5µ Hypersil ODS C18 ทำการทดลองและคำนวณผลเช่นเดียวกันกับข้อ 7.3.3.1

7.3.5 ตรวจสอบ ruggedness โดยการเปรียบเทียบผลระหว่างผู้ทดสอบ ทำการทดลองและคำนวณผลเช่นเดียวกันกับข้อ 7.3.3.1

7.3.6 ตรวจสอบ accuracy ในรูปของ % recovery

1) เตรียมสารละลาย fipronil จากสารมาตรฐาน (stock fipronil) โดยการชั่งสารให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ fipronil 4 mg/ml ใน volumetric flask ขนาด 250 ml เติม acetonitrile ประมาณ 150 ml เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วย acetonitrile

2) เตรียมสารละลายตัวอย่าง fipronil (stock sample) โดยการชั่งสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ fipronil 1mg/ml ใน volumetric flask ขนาด 1,000 ml เติม acetonitrile ประมาณ 500 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วย acetonitrile

3) เตรียม calibration curve โดยดูสารละลาย (stock fipronil) ปริมาตร 1.5, 2.5 และ 4 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 10 ml เติม acetonitrile 5 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ถึงขีด

4) หาปริมาณ fipronil ในตัวอย่าง (origin) ดูดสารละลาย stock sample ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25ml เติม acetonitrile 5 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ถึงขีด ทำ 3 ชุดๆละ 10 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

5) หาปริมาณ fipronil ในตัวอย่างที่มีการเติม stock fipronil (spike sample)

a) ดูดสารละลาย stock sample ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ทำ 3 ชุดๆละ 10 ซ้ำ

b) ดูดสารละลาย stock fipronil ปริมาตร 2, 4 และ 6 ml ลงใน volumetric flask ของ a) ปริมาตรละ 10 ซ้ำ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ถึงขีด

c) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

6) ประเมิน accuracy จากค่า %recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{X_2 - X_1}{C} \times 100$$

โดยที่ C = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

X_2 = conc. spike sample

X_1 = conc. original sample

การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ fipronil ในสูตรสารเข้มข้น

สูตรการคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ในตัวอย่าง

$$\%w/v \text{ สารออกฤทธิ์} = \frac{Hw \times f \times Dw \times SG}{W \times Ds}$$

$$\text{เมื่อ } f = \frac{S \times P}{Hs}$$

S = น้ำหนัก 1st standard (mg)

P = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 1st standard

Hs = พื้นที่ใต้ peak หรือความสูง peak ของ standard

W = น้ำหนักตัวอย่าง (mg)

Hw = พื้นที่ใต้ peak หรือความสูง peak ของตัวอย่าง

Dw = ความเจือจางของตัวอย่าง

Ds = ความเจือจางของ standard

SG = ค่าความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.)

จากนั้นคำนวณค่า %RPD (relative percent difference)

$$\text{สูตร } \% \text{ RPD} = \frac{\text{ผลการทดสอบครั้งที่ 1} - \text{ผลการทดสอบครั้งที่ 2} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองครั้ง}}$$

7.3.7 การหา specificity หมายถึง การที่วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจวัดเท่านั้น สารชนิดอื่นๆ ไม่มีผลรบกวนการตรวจวัด ทำการตรวจสอบด้วยการนำacetonitrileเข้าเครื่องวิเคราะห์แล้วดูการแยกของวิธีทดสอบว่ามีความจำเพาะกับสารนั้นหรือไม่

7.3.8 การหา selectivity หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่สามารถแยกสิ่งที่ต้องการออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้ทำการตรวจสอบโดยการนำสารตัวอย่างที่ผ่านการสกัดแล้วนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ แล้วดูการแยกของวิธีทดสอบว่าสามารถแยกตัวอย่างออกจากสิ่งเจือปนได้หรือไม่

7.4 ระยะเวลา ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 เชียงใหม่

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ผลการทดสอบพบว่า

1. range ช่วงที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การตรวจสอบช่วงของการวัด Range ความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.5	7722.3000	1
0.8	12398.0000	2
0.9	14128.2310	3
1.0	15467.2430	4
1.2	21118.4310	5
1.5	25079.4000	6

correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99995

2. linearity หรือความสัมพันธ์ ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิธีทดสอบสามารถทำได้ ค่าความเข้มข้น 0.50 – 1.20 mg/ml correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99996 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง Linearity ความเข้มข้น 0.50 – 1.20 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.1	7542.2482	1
0.7	8343.3246	2
0.9	11456.6548	3
1.0	13128.2310	4
1.5	15667.2534	5
2.0	20164.1120	6

correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99995

3. precision จากการทำ

3.1 repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ แสดงผลในรูปของ %RSD ได้ค่า HORRAT ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจวิเคราะห์ 3 ความเข้มข้นจากการทวนซ้ำ (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	232.20	5.10	464.60	5.20	697.20	5.20
2	232.20	5.13	464.60	5.27	697.10	5.19
3	232.40	5.22	464.50	5.11	697.10	5.15
4	232.30	5.10	464.80	5.28	697.20	5.22
5	232.20	5.11	464.70	5.05	697.20	5.10
6	232.50	5.12	464.50	5.10	697.20	5.23
7	232.30	5.12	464.60	5.12	697.10	5.06
8	232.10	5.25	464.70	5.22	697.00	5.13
9	232.20	5.18	464.50	5.09	697.20	5.10
10	232.40	5.14	464.60	5.23	697.10	5.24
	Mean	5.147	Mean	5.167	Mean	5.162
	SD	0.0496	SD	0.0780	SD	0.0596
	%RSD	0.9638	%RSD	1.5092	%RSD	1.1552
	Predicted Horwitz RSD	1.8164	Predicted Horwitz RSD	1.8197	Predicted Horwitz RSD	1.8192
	HORRAT	0.5306	HORRAT	0.8294	HORRAT	0.6350

3.2 reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD ของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิมแต่ช่วงเวลาต่างกัน ได้ค่า HORRAT ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจวิเคราะห์ 3 ความเข้มข้นจากการทวนซ้ำ (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	232.30	5.11	464.70	5.130	697.00	5.09
2	232.40	5.15	464.70	5.200	697.00	5.08
3	232.30	5.20	464.60	5.100	697.00	5.1
4	232.50	5.13	464.70	5.080	697.10	5.21
5	232.30	5.08	464.90	5.110	697.10	5.12
6	232.30	5.14	464.80	5.090	697.00	5.22
7	232.20	5.05	464.70	5.170	697.00	5.07
8	232.30	5.21	464.50	5.170	697.00	5.11
9	232.30	5.16	464.70	5.070	697.10	5.09
10	232.30	5.11	464.70	5.200	697.00	5.13
Mean		5.134	Mean	5.132	Mean	5.122
SD		0.0472	SD	0.0469	SD	0.0496
%RSD		0.9186	%RSD	0.9131	%RSD	0.9676
Predicted Horwitz RSD		1.7456	Predicted Horwitz RSD	1.7456	Predicted Horwitz RSD	1.7459
HORRAT		0.5262	HORRAT	0.5231	HORRAT	0.5542

4. robustness ผลการตรวจสอบความคงทนของวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเปลี่ยน column ในการวิเคราะห์จาก column Hypersil BDS C18 เป็น Hypersil ODS C18

ตารางที่ 5 robustness จากการเปรียบเทียบชนิดของ column

n	ความเข้มข้น 1.00 mg/ml			
	BDS C18		ODS C18	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	464.40	5.20	464.60	5.22
2	464.40	5.12	464.60	5.18
3	464.50	5.10	464.50	5.10
4	464.40	5.23	464.50	5.27
5	464.50	5.24	464.40	5.15
6	464.50	5.12	464.70	5.09
7	464.60	5.06	464.50	5.25
8	464.50	5.30	464.60	5.30
9	464.40	5.09	464.60	5.18
10	464.40	5.20	464.50	5.26

Mean	5.1660	Mean	5.1660
SD	0.0745	SD	0.0692
%RSD	1.4413	%RSD	1.3390
Predicted Horwitz RSD	1.8160	Predicted Horwitz RSD	1.8160
HORRAT	0.7937	HORRAT	0.7374

5. ruggedness ความคงทนของวิธีการวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์จากการเปลี่ยนผู้ทดสอบ

ตารางที่ 6 ruggedness โดยการเปรียบเทียบผู้ทดสอบ

n	ความเข้มข้น 1.00 mg/ml			
	ผู้ทดสอบที่ 1		ผู้ทดสอบที่ 2	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	464.60	5.19	464.40	5.20
2	464.60	5.29	464.50	5.14
3	464.60	5.14	464.50	5.13
4	464.50	5.25	464.60	5.18
5	464.60	5.09	464.60	5.30
6	464.50	5.23	464.60	5.23
7	464.50	5.18	464.60	5.16
8	464.60	5.25	464.50	5.26
9	464.60	5.11	464.50	5.12
10	464.50	5.19	464.50	5.25
Mean		5.192	Mean	5.197
SD		0.0614	SD	0.0581
%RSD		1.1835	%RSD	1.1188
Predicted Horwitz RSD		1.8230	Predicted Horwitz RSD	1.8221
HORRAT		0.6492	HORRAT	0.6140

6. accuracy ความถูกต้องของวิธีทดสอบหาในรูปของ %recovery ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การตรวจสอบ % recovery ในผลิตภัณฑ์ fipronil สูตร SC

n	AI content(mg/25ml)								
	Cone.(0.5 mg/ml)			Cone.(1.0 mg/ml)			Cone.(1.5 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	10.87	25.30	14.59	10.66	37.64	26.70	10.79	60.99	48.76

2	10.89	25.54	14.59	10.84	37.94	26.70	10.60	60.99	48.76
3	10.68	25.30	14.59	10.76	37.94	26.70	10.83	60.64	48.76
4	10.76	25.45	14.59	10.89	37.60	26.70	10.72	60.97	48.76
5	10.90	25.58	14.59	10.97	37.64	26.70	10.90	60.81	48.76
6	10.85	25.29	14.59	10.77	36.70	26.70	10.80	60.80	48.76
7	10.80	25.47	14.59	10.69	37.13	26.70	10.78	60.79	48.76
8	10.79	25.29	14.59	10.78	37.21	26.70	10.84	60.69	48.76
9	10.89	25.39	14.59	10.89	37.94	26.70	10.65	60.99	48.76
10	10.78	25.46	14.59	10.76	37.94	26.70	10.69	60.98	48.76
Mean	10.82	25.4070	14.5860	10.80	37.4994	26.6984	10.76	60.8650	50.1050
SD	0.0676	0.1033		0.0910	0.4053		0.0883	0.1285	
%RSD	0.6247	0.4068		0.8429	1.0808		0.8208	0.2112	
%recovery			100.00	%recovery		100.3	%recovery		102.8

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เป็นสารป้องกันกำจัดแมลง โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่มีหัวตรวจวัด (detector) ชนิด Diode Array ด้วย column Hypersil BDS C18 ขนาด 150×4.6mm 5μ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.5- 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 และค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99996

สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยการทำการทำ repeatability ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.5306, 0.8294 และ 0.6350 ตามลำดับ การตรวจวิเคราะห์ซ้ำคือต่างวันและเวลา reproducibility ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.5262, 0.5231 และ 0.5542 ตามลำดับ การทดสอบความคงทนของวิธี robustness โดยเปรียบเทียบผลจาก column Hypersil BDS C18 และ ODS C18 มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.7937 และ 0.7374 ตามลำดับ และการทดสอบความคงทนของวิธี ruggedness โดยเปรียบเทียบผลจากผู้ทดสอบ 2 คน ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.6492 และ 0.6140 เกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 การตรวจสอบความแม่นยำ accuracy โดยการคำนวณจาก % recovery ที่ความเข้มข้น 0.5 , 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 100.0 , 100.2 และ 102.8 % ตามลำดับ การทดสอบ selectivity และ specificity มีความเฉพาะเจาะจงและสามารถแยกจากสารชนิดอื่นอย่างชัดเจน

ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยวิธีนี้มีความถูกต้อง แม่นยำและมีความน่าเชื่อถือตามเกณฑ์สากล

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี นำมาใช้เพื่อเป็นมาตรฐานของห้องปฏิบัติการสำหรับนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง fipronil ได้
2. เป็นการทดสอบความสามารถของปฏิบัติการ ทั้งทางด้านบุคลากร อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ว่าสามารถใช้งานเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานสากลได้หรือไม่
3. นำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2005 ในขอบข่ายสารออกฤทธิ์ fipronil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย (2547). Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ดุษฎี มั่นความดี และ อุมภาพร สุขม่วง (2544). การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation), เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ Instruction manual ของ Agilent Technologies, คู่มือการใช้งาน HPLC รุ่น 1100 (Version B.02.01:November 2006).

W DOBRAT and A MARTIJN., 2012 Analysis of Technical and Formulated Pesticides CIPAC Handbook Volume N Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Great Britain,p. 56-61.

ภาคผนวก

นิยาม

๑. Range หมายถึง ช่วงปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบ ซึ่งวิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้
๒. Linearity หมายถึง ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ กับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ (Response) มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง
๓. Accuracy หมายถึง ความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์จากการใช้วิธีที่ใช้ทดสอบนั้น กับค่าอ้างอิงจากตัวอย่างเดียวกัน แสดงผลในรูปของ %Recovery
๔. Precision หมายถึง ความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ แสดงผลในรูปของ %RSD และ ค่า HORRAT จะอธิบายในรูปของการทำ Repeatability และ Reproducibility
๕. Repeatability หมายถึง ผลที่ได้จากการทำซ้ำจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดลองเดียวกัน เครื่องมือเดียวกันภายในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน
๖. Reproducibility หมายถึง ผลการทดสอบที่ได้จากการทำซ้ำโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน หรือ ผู้ทดสอบ หรือเครื่องมือ หรือระยะเวลาแตกต่างกัน

๗. Robustness หมายถึง คุณสมบัติที่แสดงว่ามีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ pH เวลาที่ใช้ เป็นต้น

๘. Ruggedness หมายถึง คุณสมบัติ ของ Reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนวันทดสอบ เป็นต้น แต่ผลการทดสอบยังคงเดิม

๙. Specificity หมายถึง การที่วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจวัดเท่านั้น สารชนิดอื่นๆ ไม่มีผลรบกวนการตรวจวัด

๑๐. Selectivity หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบ ที่สามารถแยกสิ่งที่ต้องการออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้