

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

- | | | |
|---------------------------|---|--|
| 1. ชุดโครงการวิจัย | วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิต | |
| 2. โครงการวิจัย | การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร | |
| กิจกรรมที่ 1 | พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร | |
| กิจกรรมย่อยที่ 1.5 | การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมทางเกษตร | |
| 3. ชื่อการทดลองที่ 1.5.16 | การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมทางเกษตร
กลุ่มสารกำจัดแมลง Methomyl
Method Validation of Methomyl in Insecticide Formulation | |
| 4. คณะผู้ดำเนินงาน | | |
| หัวหน้าการทดลอง | นางสาวปริยานุช สายสุพรรณ | สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 |
| ผู้ร่วมงาน | นางวัชรพร ศรีสว่างวงศ์ | สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 |
| ผู้ร่วมงาน | นายจารพงศ์ ประสพสุข | สังกัด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 |

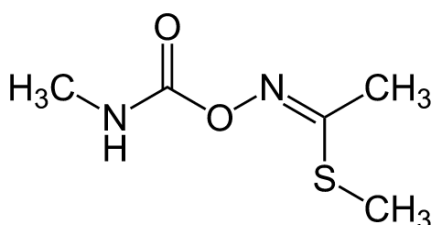
5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เป็นหนึ่งในกระบวนการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการว่า ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ methomyl ในผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช สูตร 40 % SP ด้วยเทคนิควิธี High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector (DAD) ด้วยคอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าให้ค่า Range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 3.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.30-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995 (AOAC)) มีความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) เท่ากับ 1.297 และ 1.883 ตามลำดับ การตรวจสอบ

ค่า robustness และ ruggedness มีค่า HORRAT เท่ากับ 1.220 และ 1.219 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ ไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์ของ AOAC (เกณฑ์เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)) และการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการ จากค่า % recovery เท่ากับ 99.90 % อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 98 – 102 % สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ตามเกณฑ์ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์หัวตุ่มมีพิษการเกษตร methomyl ที่ได้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้พิสูจน์แล้วว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบ ปริมาณสารออกฤทธิ์ ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช methomyl ของห้องปฏิบัติการหัวตุ่มมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

Method Validation is Process for confirm method using in Laboratory. The results analysis of the method validation have to accurate and reliable. This Research study about Method validation of Methomyl in Insecticide Formulation. Analysis with technical High Performance Liquid Chromatography(HPLC) and detected by Diode Array Detector(DAD). The separation was achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (Partical size 5 μm , 4.6 X 250 mm) for confirm method and evaluate the result method by statistical method. The results of validation analytical method showed peak and concentration levels in the Range of 0.25 – 3.00 mg/ml. The Linearity test showed in the concentration from 0.30-2.50 mg/ml with Correlation coefficient (r) 0.999. The Correlation coefficient (r) larger than 0.995 (Correlation coefficient (r) ≥ 0.995). Precision of the analysis method that provides the HORRAT of Repeatability and Reproducibility is 1.297 and 1.883 respectively. Robustness and Ruggedness of the analysis method that provides the HORRAT is 1.220 and 1.219 respectively. This result is not over than 2 criteria (HORRAT ≤ 2 (AOAC)). Accuracy of the analysis method showed with % Recovery was 99.90%. The results of this method validation for analysis Methomyl in Insecticide Formulation is accurate , precise, reliable and acceptance criteria of international laboratory. This Method can be use for a standard method for analysis Methomyl in Insecticide Formulation in formulation laboratory of Office of Agricultural Research and Development Region 3 .

6. คำนำ



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ methomyl

ที่มา : https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a8/Methomyl_Structural_Formulae_.V.1.svg

เมโทมิล (Methomyl) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทสารกำจัดแมลง จัดอยู่ในสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) ซึ่งคาร์บาเมตเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ และมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเนื่องจากสามารถใช้กำจัดแมลงได้เทียบเท่ากับสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่มีความเป็นพิษสูง (กระทรวงสาธารณสุข, 2558) คาร์บาเมตมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำและสลายตัวได้เร็ว จึงตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ทำให้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

มีชื่อทางเคมีตาม Chemical Abstract คือ Methyl *N*-[[[(methylamino)carbonyl]oxy]ethanimidothioate (Charles R. Worthing and S. Barrie Walker, 1987) ชื่อทางเคมีตาม IUPAC คือ (*E,Z*)-methyl *N*-[[[(methylamino)carbonyl]oxy]ethanimidothioate มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_5H_{10}N_2O_2S$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 162.2 g/mol จุดหลอมเหลว 78 - 79 °C (Wikipedia, 2015) สารบริสุทธิ์มีลักษณะ เป็นผลึกไม่มีสี มีกลิ่นคล้ายซัลเฟอร์ ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น acetone, methanol, ethanol และ isopropanol คงสภาพได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นต่าง จะแตกตัวได้เป็น *S*-methyl *N*-hydroxythioacetimidate ester มีความคงตัวที่สภาวะเป็นกรด หรือ pH 5 - 7 (มาลี ธีรานุสนธิ, 2556) มีค่าครึ่งชีวิตในดิน (Half-life) 33 วัน มีโอกาสซึมลงสู่ดินได้ มีค่าครึ่งชีวิตในพืช (Half-life) 3 - 7 วัน โดยพืชจะดูดซึม methomyl ผ่านทางรากและเคลื่อนย้าย (translocation) ไปยังส่วนต่างๆ ของพืชได้ (EXTOXNET, 2015) มีความเป็นพิษฉับพลันทางปาก LD₅₀ (rat, oral) 17-24 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ค่าความเป็นพิษในสัตว์ปีก เช่น ไก่อยู่ที่ 28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นกกระทา 24.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และนกเป็ดน้ำ 15.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มาลี ธีรานุสนธิ, 2556) เป็นที่รู้จักโดยทั่วไปภายใต้ชื่อทางการค้า แลนเนท สูตรผสมที่นิยมใช้คือ 40% SP

Methomyl เป็นสารกำจัดแมลงที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดแมลงแบบสัมผัสตัวตาย และดูดซึมเข้าสู่ลำต้นของพืช มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่างๆ เช่น หนอนไผ่ฝัก หนอนคืบ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนเจาะกระทุ้หอม หนอนกินดอกยาสูบ หนอนใยข้าวฟ่าง หนอนกระทุ้ควายพระอินทร์ หนอนเจาะฝักถั่ว หนอนม้วนใบ หนอนคืบละหุ่ง หนอนห่อใบงา หนอนกัดกินใบส้ม หนอนเจาะลูกมะเขือ หนอนกระทุ้เพี้ยอ่อน เพี้ยไฟ เพี้ยไฟมะเขือ เพี้ยไฟแตงโม ดั่งน้ำมัน ใช้ในพืชหลายชนิด เช่น กะหล่ำปลี ผักกาดหอม หอม มะเขือเปราะ หน่อไม้ฝรั่ง ยาสูบ ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ละหุ่ง งา ส้ม มะเขือยาว พริก แตงโม มะเขือเทศ

ถั่วลิสง ถั่วเหลือง เป็นต้น (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2537) และใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในเมล็ดพืชที่เป็นอาหารนอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์ปีก ปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยง เพื่อกำจัดแมลงรบกวน กลไกการเกิดพิษของ methomyl คือ ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) แบบชั่วคราว ผลของการยับยั้งทำให้เกิดการคลั่งของ acetylcholine (ACh) ตามตำแหน่งต่างๆ ของระบบประสาทอัตโนมัติ แต่เนื่องจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบไม่ถาวรจึงออกฤทธิ์ระยะสั้นและสลายตัวได้เร็ว ทำให้ความเป็นพิษลดลง (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และคณะ, 2558)

Methomyl อยู่ในกลุ่มระดับความเป็นพิษร้ายแรง Class Ib (กระทรวงสาธารณสุข, 2558) สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ โดยเฉพาะรอยแผลหรือรอยข่วน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรง เมื่อได้รับทางปาก ผิวหนัง และสูดดม จะมีอาการมึนงง ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย กระวนกระวาย ม่านตาหรี่ คลื่นไส้ อาเจียน น้ำตาและน้ำลายไหล เหงื่อออกมาก ปวดท้องเกร็ง ชีพจรเต้นช้า กล้ามเนื้อเกร็ง อ่อนล้า เกิดอัมพาตของกล้ามเนื้อหายใจจนกระทั่งหยุดหายใจ มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดการหายใจล้มเหลว และเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตในที่สุด (กัมพล อำนวนพัฒนาพล และคณะ, 2549)

การควบคุมคุณภาพของสารกำจัดศัตรูพืช ตาม พรบ.วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 นั้น จะต้องทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดและสารออกฤทธิ์ ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุบนฉลากหรือหรือข้อมูลที่แสดงไว้ก่อนการขึ้นทะเบียนหรือไม่ และป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารกำจัดศัตรูพืช วิธีการวิเคราะห์ methomyl นั้นมีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council) อยู่แล้ว วิธีวิเคราะห์ methomyl ตามวิธีมาตรฐาน คือ CIPAC Handbook Vol. H แต่วิธีมาตรฐานที่มีอาจจะไม่เหมาะสมกับเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีอยู่จริงในห้องปฏิบัติการ จึงจำเป็นต้องประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีอยู่จริงในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อยืนยันว่าวิธีที่เรานำมาใช้ในห้องปฏิบัติการว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐานสากล (ทัศนีย์ จงกล และคณะ 2554) ดังนั้นห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร สวพ.3 จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ methomyl เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายชนิดใช้แรงดันสูง (High Performance Liquid Chromatograph : HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด (Diode Array Detector : DAD)
2. Column Zorbax Eclipse XDB-C18, ความยาว 250 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร
3. Column Zorbax Eclipse XDB-C8, ความยาว 150 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร
4. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (± 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการ

สอบเทียบแล้ว

5. ชุดกรองสารละลายพร้อมเยื่อ membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
6. ป้อนสุญญากาศ
7. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) type A ขนาด 10, 25, 50, 250, 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. ปิเปต (Volumetric pipette) type A ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
9. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 มิลลิลิตร
10. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50 และ 1000 มิลลิลิตร
11. Glass syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร
12. Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
13. สารมาตรฐาน methomyl 99.5 %
14. สารความเข้มข้นสูง (Technical grade) methomyl
15. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ methomyl 40% SP
16. Methanol ชนิด HPLC grade
17. Water ชนิด HPLC grade

- วิธีการ

1. ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัดชนิด DAD ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade) และเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตร methomyl โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

Column : Zorbax Eclipse XDB-C18, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร,
ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร

Mobile phase : Methanol 80% : water 20%

อัตราการไหล (Flow rate) : 1.00 มิลลิลิตร/นาที

Stop time : 4 นาที

อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature) : 40 องศาเซลเซียส (°C)

ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume) : 1 ไมโครลิตร (μl)

ความยาวคลื่น (Wavelength) : 254 นาโนเมตร (nm)

Retention time (RT) : 2.440 นาที

ตัวตรวจวัด (Detector)

: DAD (Diode Array Detector)

2. ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade) methomyl

เนื่องจากสารมาตรฐาน methomyl มีปริมาณน้อยและราคาแพง ไม่เพียงพอที่จะนำมาทำ Method Validation จึงจำเป็นต้องใช้สารความเข้มข้นสูง (Technical grade) แทนการใช้สารมาตรฐาน โดยใช้สารมาตรฐาน methomyl เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง methomyl มีวิธีการทำดังนี้

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน methomyl 2 ช้ำ (C_1 , C_2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 - 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (technical grade)

ชั่งสาร technical grade methomyl 10 ช้ำ (T_1 - T_{10}) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 - 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน

2.3 กรองสารมาตรฐาน และสาร technical grade methomyl ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC

เปิดเครื่อง HPLC ตามสภาวะการทำงานของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ช้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้ peak area หรือความสูงของ peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

2.5 การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เมื่อเครื่อง HPLC 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 , C_2 , C_2 , T_{10} , T_{10}

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

คำนวณค่า % Relative Percent Different (%RPD) ตามสูตร

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

2.6 การคำนวณหา Response factor

คำนวณค่า Response factor (f) ตามสูตร

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

f	=	ค่า response factor ของสารมาตรฐาน
S	=	น้ำหนักของ methomyl ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม)
P	=	% ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน methomyl
H _s	=	พื้นที่ใต้ peak ของ methomyl ในสารละลายมาตรฐาน

2.7 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ methomyl ในสารละลาย Technical grade

คำนวณค่า % สารออกฤทธิ์ methomyl (methomyl content) ตามสูตร

$$\text{methomyl content} = \frac{(H_w \times f)}{w}$$

H _w	=	พื้นที่ใต้ peak ของ methomyl ในสารละลาย Technical grade
f	=	ค่าเฉลี่ย Response factor
w	=	น้ำหนักของ methomyl ในสารละลาย Technical grade (มิลลิกรัม)

2.8 นำค่า % สารออกฤทธิ์ ของสารละลาย technical grade ที่คำนวณได้ทั้ง 10 ค่า หา
ค่าเฉลี่ยจะได้ % ที่แน่นอนของสาร technical grade

3 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity) ของวิธีการ

3.1 ทดสอบช่วงของ การวัด (Range)

3.1.1 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6
ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ชั่ง โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ methomyl ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน

(0.25-3.00 mg/ml) ได้แก่ 12.5, 25, 50, 90, 125 และ 150 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 25 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 - 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

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

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

3.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับความเข้มข้น หนัก 15, 25, 50, 75, 90 และ 125 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 25 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10-15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

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

3.2.5 คำนวณหาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$ (AOAC)

4 การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการ

4.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability)

repeatability) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่าง ข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

4.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน methomyl 2 ช้ำ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงใน

volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 - 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ methomyl 40% SP ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ (0.3, 1.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นละ 10 ข้ำโดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 4.1.1 และ 4.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ methomy ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standrd deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standara deviation ; % RSD) โดยใช้สูตรดังนี้

การคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (% RSD)

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

4.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility)

reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ methomy ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standrd deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standara deviation ; % RSD)

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

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

4.3.1 คำนวณ Predicted Horwitz RSD

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

เมื่อค่า C = concentration ration

5 การตรวจสอบค่า Robustness/Ruggedness ของวิธี

5.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ วิธีการโดยเปลี่ยน อุณหภูมิของ Column จาก 40 °C เป็น 25 °C (อุณหภูมิห้อง) และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ methomy ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ; % RSD)

5.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยน Column จาก Column Zorbax Eclipse XDB-C18 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร เป็น Column Zorbax Eclipse XDB-C8, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 150 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ methomy ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ; % RSD)

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

6 การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย stock teach

เตรียมสารละลายของ stock ของสาร technical grade methomy ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (5 mg Al/ml) โดยชั่งสาร technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอนหนัก 1,299.51 มิลลิกรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 100 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Methanol (HPLC grade) ถ่ายสารละลายสู่ volumetric flask ขนาด 250 มิลลิกรัม เติมน้ำให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10–15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เติมน้ำให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock teach

6.2 เตรียมสารละลาย stock sample

เตรียมสารละลาย stock ของสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ methomy 40% SP ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ methomyหนัก 2,500.00 มิลลิกรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 100 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Methanol (HPLC grade) ถ่ายสารละลายสู่ volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 - 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample

6.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายที่ 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.3, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดย ปิเปตสารละลาย stock tech (ข้อ 6.1) 1.5, 5 และ 7.5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเรียงลำดับความเข้มข้น

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า origin

โดยปิเปต สารละลาย stock sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ข้าง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ methomy โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 6.3)

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

6.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 6.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ข้าง

6.5.2 ปิเปต สารละลาย stock tech (ข้อ 6.1) ปริมาณ 1.5, 2.5 และ 4 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ข้าง (ข้อ 6.5.1) ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ methomy โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 6.3)

6.6 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ methomy ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 6.4 และ 6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % การคำนวณตามสมการที่ 2

% Recovery = [(Conc.spike sample – Conc.Original sample)/Conc. added] x100

สมการที่ 2

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558 รวม 1 ปี

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร
กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษ methomyl ได้สภาวะที่เหมาะสมในการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัดชนิด DAD ในการหาตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษ methomyl โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

Column : Zorbax Eclipse XDB-C18, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมครอน

Mobile phase : Methanol 80% : water 20%

อัตราการไหล (Flow rate) : 1.00 มิลลิลิตร/นาที

Stop time (นาที) : 4 นาที

อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature) : 40 องศาเซลเซียส (°C)

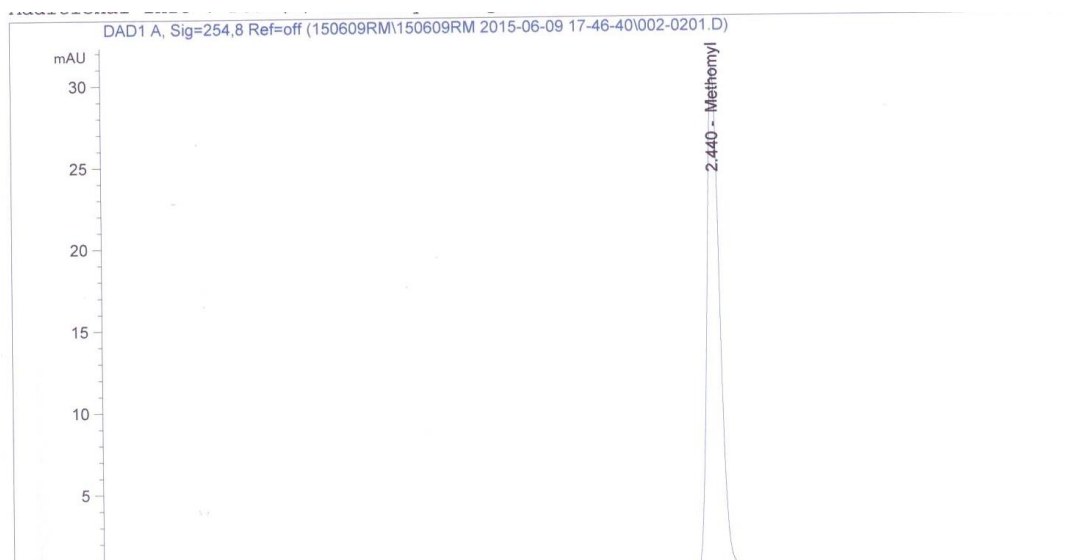
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume) : 1 ไมโครลิตร (μl)

ความยาวคลื่น (Wavelength) : 254 นาโนเมตร (nm)

Retention time (RT) : 2.440 นาที

ตัวตรวจวัด (Detector) : DAD (Diode Array Detector)

2. ผลการทดลองพบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน methomyl ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี specification/selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน methomyl

3. ผลการตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade) methomyl

3.1 ค่า % Relative Percent Different (%RPD) ของ peak area สารมาตรฐาน C1, C2 มีค่าไม่เกิน 3 % ดังแสดงในตารางที่ 1

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

std.	mg.	peak area	average	%RPD
C1	10.6	128.5027	128.9418	0.681
C2	10.3	129.8309		
C1	10.6	138.3304	138.1310	0.289
C2	10.3	137.9317		
C1	10.6	164.7683	164.6159	0.185
C2	10.3	164.4634		
C1	10.6	150.3883	150.7863	0.528
C2	10.3	151.18434		
C1	10.6	115.3278	114.758	0.994
C2	10.3	114.18723		
C1	10.2	108.97295	108.803	0.312
C2	10.3	108.63357		

3.2 ค่า % สารออกฤทธิ์ methomyl ในสารละลาย technical grade มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 96.19 % ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย % สารออกฤทธิ์ methomyl ในสารละลาย Technical grade

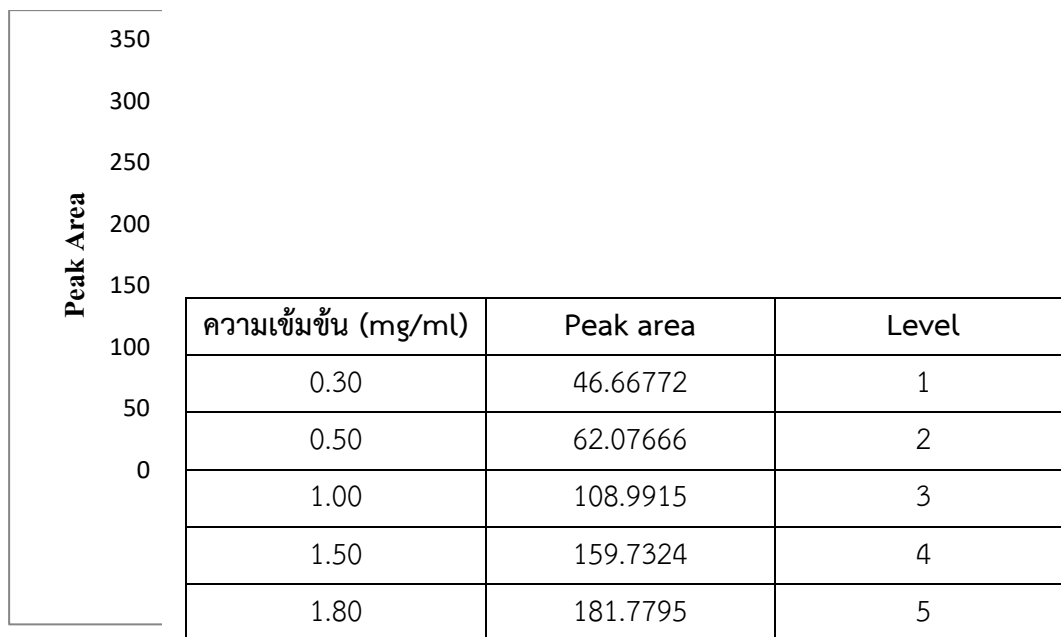
สารละลาย Technical grade	% Technical grade
T1	94.74
T2	97.72
T3	97.06
T4	96.49
T5	98.93
T6	93.81
T7	92.54
T8	97.45
T9	97.21
T10	95.99
ค่าเฉลี่ย	96.19
SD	1.957

4. ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

4.1 ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.25-3.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ช่วงของการวัด (range) ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25-3.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.25	41.17867	1
0.50	62.07666	2
1.00	108.9915	3
1.80	181.7795	4
2.50	246.3872	5
3.00	288.2405	6

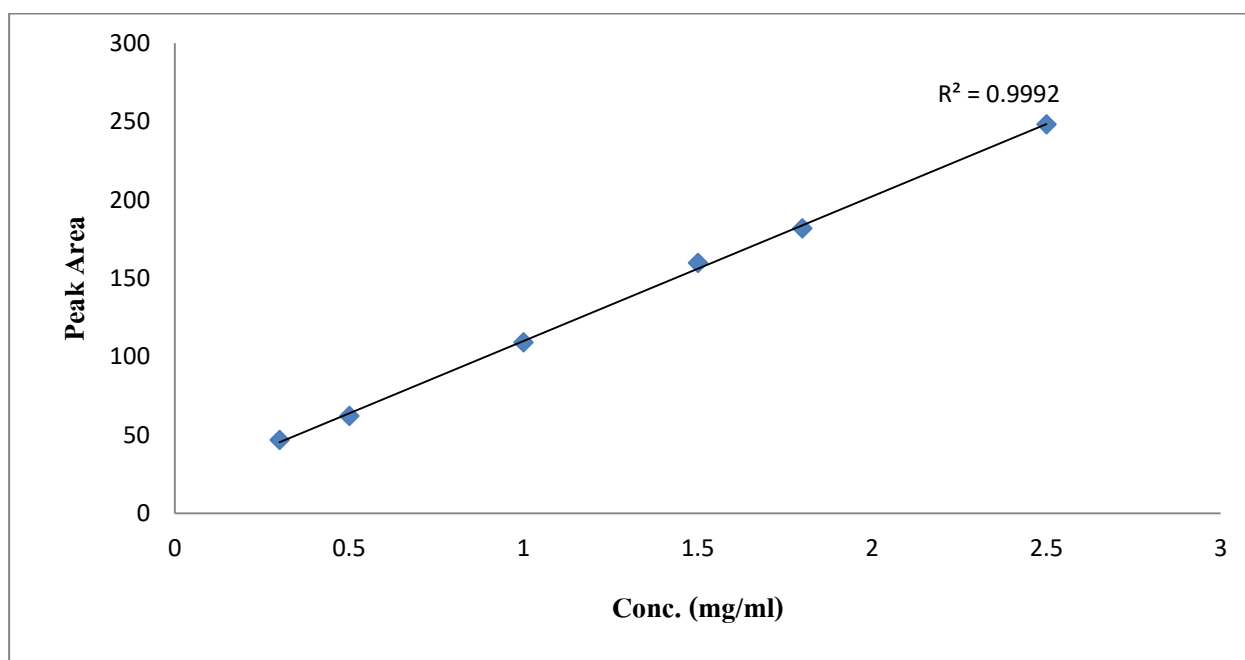


ภาพที่ 3 การตรวจสอบช่วงของการวัด (range) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย methomyl ในช่วงความเข้มข้น 0.25-3.00 mg/ml

4.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.30 – 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 4 ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความเข้มข้น 0.30-2.50 mg/ml

2.50	248.1742	6
------	----------	---



ภาพที่ 4 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย methomyl ในช่วงความเข้มข้น 0.30-2.50 mg/ml โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999

5. ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (precision)

5.1 ผลการทดสอบหาค่า precision ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ methomyl ที่ 3 ความเข้มข้น โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (repeatability) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ methomyl ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทวนซ้ำ (repeatability)

n	ความเข้มข้น 0.30 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	18.9	39.82	62.8	38.38	156.4	38.12
2	19.0	39.25	62.7	39.71	156.3	39.94
3	18.8	39.32	62.5	39.45	156.4	40.34
4	18.8	38.95	62.7	40.23	156.3	40.02
5	18.8	39.25	62.6	40.72	156.3	39.03
6	19.3	40.62	62.6	39.88	156.4	39.21
7	19.8	38.03	62.6	38.45	156.3	38.78
8	18.7	39.95	62.7	39.21	156.4	38.99
9	18.8	39.89	62.6	40.26	156.6	40.80
10	18.8	38.79	62.7	38.78	156.3	39.23
	Mean	39.39	Mean	39.51	Mean	39.45
	SD	0.724	SD	0.799	SD	0.809

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่าง ข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ ค่าดังนี้

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.777 \times 100)}{39.45} \end{aligned}$$

$$= 1.969$$

เมื่อ Mean = 39.45, SD = 0.777

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

$$\text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ration)} = 0.395$$

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.395)} \\ &= 1.518 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{1.969}{1.518} \\ &= 1.297 \end{aligned}$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability ได้ค่า HORRAT = $1.297 \leq 2$
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)

5.2 ผลการทดสอบหาค่า precision ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ methomyl ที่ 3 ความเข้มข้น โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (reproducibility) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ methomyl ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทำซ้ำ (reproducibility)

n	ความเข้มข้น 0.30 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.50 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	18.9	39.33	62.8	40.20	156.4	41.17
2	19.0	40.85	62.7	38.45	156.3	39.95
3	18.8	41.13	62.5	39.04	156.4	41.10
4	18.8	38.32	62.7	38.76	156.3	37.99
5	18.8	39.15	62.6	38.26	156.3	38.19
6	19.3	38.70	62.6	40.18	156.4	38.26
7	19.8	38.55	62.6	41.08	156.3	38.17
8	18.7	39.03	62.7	39.45	156.4	38.17

9	18.8	39.85	62.6	40.41	156.6	38.26
10	18.8	38.37	62.7	40.51	156.3	41.09
	Mean	39.33	Mean	39.63	Mean	39.23
	SD	0.993	SD	0.974	SD	1.414

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

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(1.127 \times 100)}{39.40} \\ &= 2.860 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 39.40, SD = 1.127

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C (\text{Concentration ration}) &= 0.394 \\ \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.394)} \\ &= 1.519 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{2.860}{1.519} \\ &= 1.883 \end{aligned}$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility ได้ค่า HORRAT = $1.883 \leq 2$
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)

6. ผลการตรวจสอบค่า robustness/ruggedness

6.1 ผลตรวจสอบ robustness จากการปรับสภาวะโดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Column จาก 40 °C เป็น 25 °C (อุณหภูมิห้อง) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ methomyl ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการตรวจสอบ robustness

n	ความเข้มข้น 0.30 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.50 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	18.9	39.96	62.8	39.04	156.4	40.11
2	19.0	39.06	62.7	39.05	156.3	38.89
3	18.8	39.38	62.5	40.50	156.4	39.06
4	18.8	39.60	62.7	38.94	156.3	38.56
5	18.8	39.00	62.6	40.15	156.3	40.18
6	19.3	40.66	62.6	40.11	156.4	38.79
7	19.8	38.96	62.6	40.12	156.3	40.03
8	18.7	40.60	62.7	38.84	156.4	40.27
9	18.8	41.03	62.6	39.30	156.6	40.21
10	18.8	40.84	62.7	39.93	156.3	38.45
	Mean	39.91	Mean	39.60	Mean	39.46

	SD	0.817	SD	0.620	SD	0.763
--	----	-------	----	-------	----	-------

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของ Column จาก 40 °C เป็น 25 °C (อุณหภูมิห้อง) ได้ค่าดังนี้

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.734 \times 100)}{39.65} \\ &= 1.851 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 39.65, SD = 0.734

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C (\text{Concentration ration}) &= 0.397 \\ \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.397)} \\ &= 1.517 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{1.851}{1.517} \\ &= 1.220 \end{aligned}$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ robustness ได้ค่า HORRAT = 1.220 ≤ 2
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)

6.2 ผลการตรวจสอบ ruggedness จากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์ จาก

Column Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 X 250 mm เป็น Zorbax Eclipse XDB-C8 4.6 X 150 mm ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้นจากการตรวจสอบ ruggedness

n	ความเข้มข้น 0.30 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.50 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)
1	18.9	40.61	62.8	38.40	156.4	40.40
2	19.0	39.28	62.7	39.41	156.3	38.96
3	18.8	40.42	62.5	39.98	156.4	39.31
4	18.8	40.69	62.7	39.62	156.3	38.96
5	18.8	40.83	62.6	40.86	156.3	41.22
6	19.3	40.57	62.6	39.05	156.4	40.49
7	19.8	38.91	62.6	39.93	156.3	40.72
8	18.7	39.23	62.7	40.33	156.4	39.91
9	18.8	40.22	62.6	40.51	156.6	40.07
10	18.8	40.42	62.7	40.61	156.3	40.09
	Mean	40.12	Mean	39.87	Mean	40.01
	SD	0.702	SD	0.765	SD	0.750

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูล ที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองโดยการ เปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก Column Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 X 250 mm เป็น Zorbax Eclipse XDB-C8 4.6 X 150 mm ได้ค่าดังนี้

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.739 \times 100)}{\text{Mean}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & 40.00 \\ & = 1.841 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 40.00 , SD = 0.739

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ration)} &= 0.401 \\ \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.401)} \\ &= 1.515 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{1.845}{1.515} \\ &= 1.219 \end{aligned}$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness ได้ค่า HORRAT = 1.219 $\leq$ 2
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT $\leq$ 2 (AOAC)

7 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy)

การประเมินค่า accuracy ของวิธีการ จาก % recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ methomyl ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ methomyl

n	Al content (..mg/25ml)								
	Conc.added (7.5 mg/25ml)			Conc.added (12.50 mg/25ml)			Conc.added (20.00 mg/25ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	12.02	19.84	7.50	12.88	25.07	12.50	12.30	32.36	20.00
2	12.10	19.73	7.50	12.44	25.09	12.50	12.34	32.37	20.00
3	12.05	19.75	7.50	12.43	25.11	12.50	12.32	32.12	20.00
4	12.19	19.75	7.50	12.47	25.01	12.50	12.30	32.43	20.00
5	12.41	19.67	7.50	12.83	25.08	12.50	12.33	32.28	20.00
6	12.36	19.67	7.50	12.43	25.10	12.50	12.32	32.18	20.00
7	12.33	19.86	7.50	12.97	25.01	12.50	12.32	32.37	20.00
8	12.24	19.81	7.50	12.42	25.08	12.50	12.32	32.26	20.00
9	12.34	19.86	7.50	12.51	25.06	12.50	12.33	32.66	20.00
10	12.29	19.23	7.50	12.50	25.07	12.50	12.35	32.14	20.00
Mean	12.23	19.72	7.50	12.59	25.07	12.50	12.32	32.32	20.00
SD	0.136	0.184		0.215	0.033		0.016	0.160	
%RSD	1.108	0.931		1.712	0.131		0.128	0.494	
%Recovery			99.87			99.84			100

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc.spike sample} - \text{Conc.Original sample}) \times 100}{\text{Conc. Added}}$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ} = \frac{19.72 - 12.23 \times 100}{7.50} = 99.87$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง} = \frac{25.07 - 12.59 \times 100}{12.50} = 99.84$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นสูง} = \frac{12.50 - 12.32}{20.00} \times 100 = 99.90$$

% Recovery เฉลี่ย = 99.90

จากการทดสอบหาค่า accuracy ของวิธีการ จาก % recovery ได้ค่า % recovery เท่ากับ 99.90 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หัตถุมีพิษการเกษตร methomyl โดยใช้เทคนิควิธี HPLC ตัวตรวจวัดชนิด DAD มีสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

Column	: Zorbax Eclipse XDB-C18, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมครอน
Mobile phase	: Methanol 80% : water 20%
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1.00 มิลลิลิตร/นาที
Stop time	: 4 นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature)	: 40 องศาเซลเซียส (°C)
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume)	: 1 ไมโครลิตร (μl)
ความยาวคลื่น (Wavelength)	: 254 นาโนเมตร (nm)
Retention time (RT)	: 2.440 นาที
ตัวตรวจวัด (Detector)	: DAD (Diode Array Detector)

มีค่า Range (ช่วงของการวัด) เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25-3.00 mg/ml ให้ค่า linearity (ความเป็นเส้นตรง) ในช่วงความเข้มข้น 0.30-2.50 mg/ml โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient (r) ≥ 0.995 (AOAC)) การตรวจสอบ precision (ความแม่นยำ) ของการวิเคราะห์ methomyl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมต สูตร SP มีค่า HORRAT ในรูปของ repeatability (การทวนซ้ำ) และ reproducibility (การทำซ้ำ) ได้ค่า เท่ากับ 1.297 และ 1.883 ตามลำดับ (เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)) การตรวจสอบค่า robustness/ruggedness (ความแตกต่างของวิธี) ในรูปของ precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.220 และ 1.219 ตามลำดับ (เกณฑ์เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2

(AOAC)) การตรวจสอบ accuracy (ความถูกต้อง) ของวิธีการจากค่า % recovery พบว่า % Recovery เท่ากับ 99.90 % ซึ่งเกณฑ์ยอมรับสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% อยู่ในช่วง 98 – 102 % (AOAC) จากผลการวิเคราะห์และตรวจสอบค่าต่างๆ ได้แก่ rang, linearity, precision, robustness/ruggedness และ accuracy ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ปริมาณ methomyl ที่ได้เป็นวิธีที่พิสูจน์แล้วว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบค่า % สารออกฤทธิ์ ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช methomyl ของห้องปฏิบัติการวัดภูมิพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้วิธีวิเคราะห์ methomyl ที่พิสูจน์แล้วว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานสากล และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล
2. สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ในตรวจสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ methomyl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชที่จำหน่ายในท้องตลาด และเพื่อการขอขึ้นทะเบียน
3. เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน
4. เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 สู่การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025

11. เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. 2558. ความปลอดภัยด้านอาหาร (Food safety)/สารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate Insecticides). (วันที่สืบค้น 24 สิงหาคม 2558) จาก : URL: <http://www.fda.moph.go.th/project/foodsafety/tox3.htm>
- กัมพล อำนาจพัฒนาพล และ วินัย วนานุกูล 2549. Toxcase Conference. จุลสารพิษวิทยา. 14(2)
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว (A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข : นนทบุรี
- ทัศนีย์ จงกล, อนุชา ผลไสว, 2554. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพิษการเกษตร กลุ่มสารกำจัดแมลง (Chlorpyrifos Method validation of Chlorpyrifos in Insecticide Formulation).

ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2554, สำนักวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์. 2558. methomyl. (วันที่สืบค้น 22 สิงหาคม 2558)
จาก : URL: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2186/methomyl>

มาลี ธีรานุสนธิ์. 2556. **คุณรู้หรือไม่ Methomyl คืออะไร???**. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 12(6)
สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษการเกษตรในประเทศไทย.
กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร

Charles R. Worthing and S. Barrie Walker. 1987. **The Pesticide Manual**. The British Crop Protection Council.

Extension Toxicology Network ; EXTTOXNET. 2015. **Methomyl (Pesticide Information Profile)**. Available August 27, 2015. From
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/haloxfop-methylparathion/methomyl-ext.html>

Wikipedia, 2015 . **Methomyl**. Available August 26, 2015. From
<https://en.wikipedia.org/wiki/Methomyl>

10. ภาคผนวก

เกณฑ์การยอมรับ Recovery

The AOAC Manual for the Peer Verified Methods Program (1993) ได้กำหนดแนวทางสำหรับพิจารณาการยอมรับ % recovery โดยทั่วไป ตามตารางที่ 1 (ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549)

ตารางภาคผนวกที่ 1 Analyte recovery ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ตาม AOAC)

ความเข้มข้นของ analyte	% Recovery
100 %	98-102
> 10 %	98-102
> 1 %	97-103
> 0.1 %	95-105
100 ppm	90-107

10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120
