

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

- | | | | |
|---------------------------|---|--------|-------------------------------------|
| 1. ชุดโครงการวิจัย | วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิต | | |
| 2. โครงการวิจัย | การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร | | |
| กิจกรรมที่ 1 | พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร | | |
| กิจกรรมย่อยที่ 1.5 | การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษทางการเกษตร | | |
| 3. ชื่อการทดลองที่ 1.5.17 | การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร
กลุ่มสารกำจัดแมลง Cabaryl
Method Validation of Carbaryl in Insecticide Formulation | | |
| 4. คณะผู้ดำเนินงาน | | | |
| หัวหน้าการทดลอง | นางสาวปริยานุช สายสุพรรณ | สังกัด | สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 |
| ผู้ร่วมงาน | นางวิษราพร ศรีสว่างวงศ์ | สังกัด | สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 |
| ผู้ร่วมงาน | นายจารุพงศ์ ประสพสุข | สังกัด | สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 |

5. บทคัดย่อ

ภารกิจด้านการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุดิบพืชการเกษตร ในส่วนภูมิภาค ในเขตพื้นที่รับผิดชอบ 11 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ถือเป็นการกิจหลักของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุดิบพืชการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เป็นหนึ่งในกระบวนการตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุดิบพืชการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุดิบพืชการเกษตร ชนิดสาร carbaryl ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด DAD (Diode Array Detector) เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ ผลการตรวจสอบความได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าให้ค่า range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995) มีความ

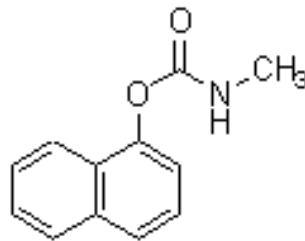
แม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) เท่ากับ 0.770 และ 0.632 ตามลำดับ การตรวจสอบค่า robustness และ ruggedness มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.811 และ 0.663 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ ไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์ของ AOAC (เกณฑ์เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)) และการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการ จากค่า % recovery เท่ากับ 99.48 % อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 98 - 102% สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ตามเกณฑ์ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร carbaryl ที่ได้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้พิสูจน์แล้วว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบ ปริมาณสารออกฤทธิ์ ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช carbaryl ของห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

Analyze the toxic substances in toxic agricultural product at Northeast of Thailand area is main job of formulation laboratory of Office of Agricultural Research and Development Region 3 . 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 Carbaryl in Insecticide Formulation. Analysis with technical High Performance Liquid Chromatography(HPLC) and detected by Diode Array Detector(DAD) 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 – 2.50 mg/ml. The Linearity test showed in the concentration from 0.25-2.00 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 0.770 and 0.632 respectively. Robustness and Ruggedness of the analysis method that provides the HORRAT is 0.811 and 0.663 respectively. This result is not over than 2 criteria (HORRAT ≤ 2 (AOAC)). Accuracy of the analysis method showed with % Recovery was 99.48 %. The results of this method validation for analysis Carbaryl in Insecticide Formulation is accurate , precise, reliable and acceptance criteria of international laboratory. This Method can be use for a standard method for analysis Carbaryl in Insecticide Formulation in formulation laboratory of Office of Agricultural Research and Development Region 3 .

6. คำนำ

คาร์บาริล (Carbaryl) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทยาฆ่าแมลง จัดอยู่ในสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) ซึ่งคาร์บาเมตเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ และมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเนื่องจากสามารถใช้กำจัดแมลงได้เทียบเท่ากับสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่มีความเป็นพิษสูง (กระทรวงสาธารณสุข, 2558) คาร์บาเมตมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำและสลายตัวได้เร็ว จึงตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) และกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตทำให้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

Carbaryl มีชื่อทางเคมีว่า 1-naphthyl methylcarbamate มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{12}H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 201.23 g/mol (Wikipedia, 2015) สารบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีจุดหลอมเหลว $142\text{ }^{\circ}\text{C}$ ประสิทธิภาพในการละลายน้ำต่ำแต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ มีค่าครึ่งชีวิตในดิน (Half-life) 4-72 วัน มีค่าครึ่งชีวิตในพืช (Half-life) 3.2 วัน มีความเป็นพิษฉับพลันทางปาก LD_{50} (rabbit, oral) 710 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม LD_{50} (rat, oral) 850 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเป็นพิษต่อปลาและผึ้งสูง (NPIC, 2015) เป็นที่รู้จักโดยทั่วไปภายใต้ชื่อทางการค้า เซฟวิน และ เอส-85 สูตรผสมที่นิยมใช้คือ 85% WP



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ carbaryl

ที่มา : <http://oldweb.pharm.su.ad.th/chemistry-in-life/d026.html>

การใช้ประโยชน์ ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น หนอนเจาะผล หนอนคืบกะหล่ำ หนอนไยผัก หนอนกระทุ้ผักข้าวโพด หนอนหงอนมันฝรั่ง หนอนกระทุ้ หนอนห่อใบงา หนอนเจาะผักข้าวโพด หนอนแมลงวันกินดอกมะม่วง หนอนซอนใบ หนอนม้วนใบ หนอนเจาะข้าวผล หนอนม้วนใบส้ม เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไก่อ๊แจ้ มวนลำไย มวนเขียว ตัวง้ำมัน ตัวง้ำหมัดผัก เต่าแดง เต่าแตง ใช้ในพืชหลายชนิด เช่น องุ่น ข้าวโพด แตงกวา แตงโม มะเขือเทศ มันฝรั่ง ส้ม งามา พริก กลัวย มะม่วง มังคุด ลิ้นจี่ เงาะทุเรียน ถั่วลิสง ถั่วเหลือง พืชตระกูลกะหล่ำ ข้าวฟ่าง มะเขือยาว ถั่วต่างๆ ผักต่างๆ เป็นต้น (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2537) และใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในเมล็ดพืชที่เป็นอาหารนอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์ปีก ปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยง เพื่อกำจัดแมลงรบกวน กลไกการเกิดพิษของ carbaryl คือ ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของแอสีทิลโคลีนเอสเตอเรส ทำให้สารสื่อประสาทแอสีทิลโคลีนถูกทำลายลดลง จึงเกิดอาการพิษเนื่องจากการทำงานของระบบสื่อประสาทโคลิเนอร์จิก (cholinergic neurotransmission) ทำงานมากเกินไป (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และคณะ, 2558)

Carbaryl อยู่ในกลุ่มระดับความเป็นพิษปานกลาง หรือ Class II (กระทรวงสาธารณสุข, 2558) สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ โดยเฉพาะรอยแผลหรือรอยข่วน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความระคายเคืองต่อตาอย่างมาก ซึ่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจมีผลต่ออวัยวะส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น ระบบ

ประสาท กล้ามเนื้อ การหายใจและสมองเป็นต้น ซึ่งถ้ารุนแรงจะทำให้เสียชีวิตได้ (ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา, 2558) ในระยะยาวถ้าได้รับสารบาริลทางการรับประทานจัดเป็นสารก่อมะเร็งได้

การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดตาม พ.ร.บ.วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 จำเป็นต้องมีการตรวจสอบชนิดและสารออกฤทธิ์ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุในฉลากหรือไม่ การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ของสารกำจัดศัตรูพืช จะใช้วิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council) ซึ่งการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช ที่ได้ค่าผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง และแม่นยำจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม ซึ่งจะต้องประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ ขณะที่ผลการวิเคราะห์จะต้องให้ความถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่ยอมรับตามเกณฑ์ยอมรับสากล ดังนั้นห้องปฏิบัติการวัดภูมิพิษการเกษตร สวพ.3 จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ carbaryl เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายชนิดใช้แรงดันสูง (High Performance Liquid Chromatograph : HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด DAD (Diode Array Detector)
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) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
5. ชุดกรองสารละลายพร้อมเยื่อ membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
6. บั๊มสุญญากาศ
7. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) type A ขนาด 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 carbaryl 98.9 %
14. สารความเข้มข้นสูง (Technical grade) carbaryl
15. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbaryl 85% WP

16. Methanol ชนิด HPLC grade

17. Water ชนิด HPLC grade

- วิธีการ

1. ปรับตั้งสถานะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade) และเป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษ การเกษตร carbaryl โดยควบคุมสถานะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

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

Mobile phase : Methanol 55% : water 45%

อัตราการไหล (Flow rate) : 1.00 มิลลิลิตร/นาที

Stop time : 10 นาที

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

ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume) : 1 ไมโครลิตร

ความยาวคลื่น (Wavelength) : 254 นาโนเมตร

Retention time (RT) : 8.158 นาที

ตัวตรวจวัด (Detector) : DAD (Diode Array Detector)

2. ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade) carbaryl

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

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน carbaryl 2 ขั้ว (C_1 , C_2) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำ Methanol (HPLC grade) ประมาณ 15 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 carbaryl 10 กรัม (T₁- T₁₀) ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ ประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Methanol (HPLC grade) ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน

2.3 กรองสารละลายมาตรฐาน และสารละลาย technical grade carbaryl ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC

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

2.5 การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade เมื่อเครื่อง HPLC พร้อมใช้งานแล้ว ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลาย technical grade เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอนตามลำดับ ดังนี้

C₁, C₁, T₁, T₁, C₂, C₂, T₂, T₂, C₁, C₁, T₃, T₃ , C₂, C₂, T₁₀, T₁₀

สารละลายมาตรฐาน C₁, C₂ 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 carbaryl ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม)

P = % ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน carbaryl

Hs = พื้นที่ใต้ peak ของ carbaryl ในสารละลายมาตรฐาน

2.7 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ carbaryl ในสารละลาย Technical grade

คำนวณค่า % สารออกฤทธิ์ carbaryl (carbaryl content) ตามสูตร

$$\text{carbaryl content} = \frac{(Hw \times f)}{w}$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ carbaryl ในสารละลาย Technical grade

f = ค่าเฉลี่ย Response factor

w = น้ำหนักของ carbaryl ในสารละลาย Technical grade (มิลลิกรัม)

2.8 นำค่า % สารออกฤทธิ์ ของสารละลาย technical grade ที่คำนวณได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ % 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 ข้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ carbaryl ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน (0.25-2.50 mg/ml) ได้แก่ 12.5, 25, 50, 75, 100 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

3.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

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

3.1.4 พิจารณช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

3.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับความเข้มข้น 12.5, 25, 40, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน 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 carbaryl 2 ช้ำ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน 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 ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbaryl 85% WP ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ (0.25, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นละ 10 ช้ำโดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน Methanol (HPLC grade) ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง 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

4.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 4.1.1 และ 4.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbaryl ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

(Mean ; $\bar{X}$) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ; % RSD) โดยใช้สูตรดังนี้

การคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% 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 carbaryl ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$) , ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ; % RSD)

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

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

4.3.1 การคำนวณ 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 carbaryl ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$) , ส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐาน (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 carbaryl ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; $\bar{X}$), ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation ; % RSD)

5.3 คำนวณค่า HORRAT ของ robustness และ ruggedness โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC, EU และ Codex ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้ สมการที่ 1

6. การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการ

6.1 เตรียมสารละลาย stock tech

เตรียมสารละลายของ stock ของสาร technical grade carbaryl ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (5 mg Al/ml) โดยชั่งสาร technical grade ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน หนัก 1,292.52 มิลลิกรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 100 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Methanol (HPLC grade) ถ่ายสารละลายสู่ volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10-15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock tech

6.2 เตรียมสารละลาย stock sample

เตรียมสารละลาย stock ของสารผลิตภัณฑ์ carbaryl 85% WP ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbaryl หนัก 1,176.47 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 0.25, 0.1 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดย ปิเปตสารละลาย stock tech (ข้อ 6.1) 1.25, 5 และ 7.5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียม

ได้ผ่าน 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 ข้ว ปรับปริมาตรด้วย Methanol (HPLC grade) เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ carbaryl 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 ข้ว

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 stock sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ข้ว (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 carbaryl โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 6.3)

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

$$\% \text{ Recovery} = [(\text{Conc.spike sample} - \text{Conc.Original sample}) / \text{Conc. added}] \times 100 \quad \text{สมการที่ 2}$$

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558 รวม 1 ปี

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร
กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตร carbaryl

ได้สภาวะที่เหมาะสมในการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัดชนิด DAD ในการหาตรวจวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษ carbaryl โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

Column	: Zorbax Eclipse XDB-C18 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร
Mobile phase	: Methanol 55% : water 45%
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1.00 มิลลิลิตร/นาที
Stop time	: 10 นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature)	: 40 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume)	: 1 ไมโครลิตร
ความยาวคลื่น (Wavelength)	: 254 นาโนเมตร
RT (Retention Time)	: 8.158 นาที
ตัวตรวจวัด (Detector)	: DAD (Diode Array Detector)

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



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน carbaryl

3. ผลการตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade) Carbaryl

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 Carbaryl

std.	mg.	peak area	average	%RPD
C1	29.0	205.1963	204.6983	0.487
C2	26.5	204.2000		
C1	29.0	136.7023	136.8759	0.257
C2	26.5	137.0495		
C1	29.0	194.1761	194.2056	0.030
C2	26.5	194.2352		
C1	29.0	170.6837	171.5384	0.996
C2	26.5	172.3931		
C1	29.0	177.4500	179.0990	1.841
C2	26.5	180.7479		
C1	29.0	181.0821	181.3102	0.252
C2	26.5	181.5383		

3.2 ค่า % สารออกฤทธิ์ carbaryl ในสารละลาย technical grade มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 96.71 % ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย % สารออกฤทธิ์ carbaryl ในสารละลาย Technical grade

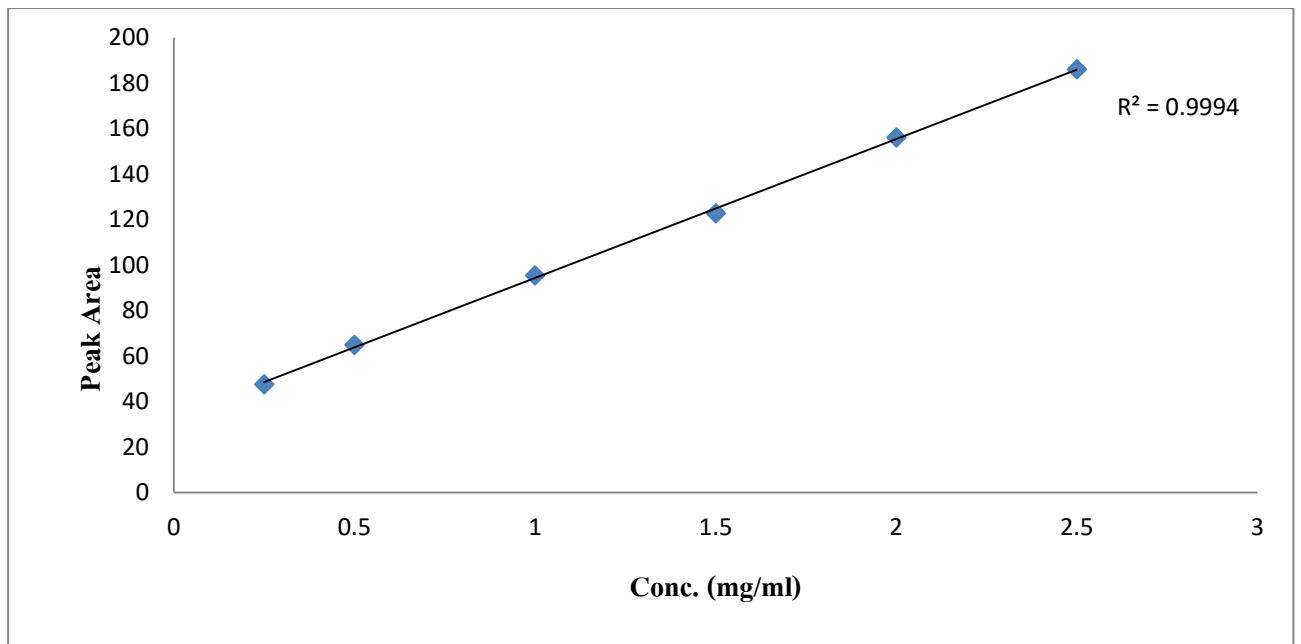
สารละลาย Technical grade	% Technical grade
T1	94.99
T2	97.27
T3	95.97
T4	97.78
T5	98.16
T6	93.86
T7	97.47
T8	95.09
T9	99.80
T10	96.71
ค่าเฉลี่ย	96.71
SD	1.762

4. ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

4.1 ผลการทดสอบช่วงของการวัด (range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.25-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ช่วงของการวัด (range) ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.25	47.58766	1
0.50	64.88194	2
1.00	95.36502	3
1.50	122.7387	4
2.00	156.1773	5
2.50	186.1181	6



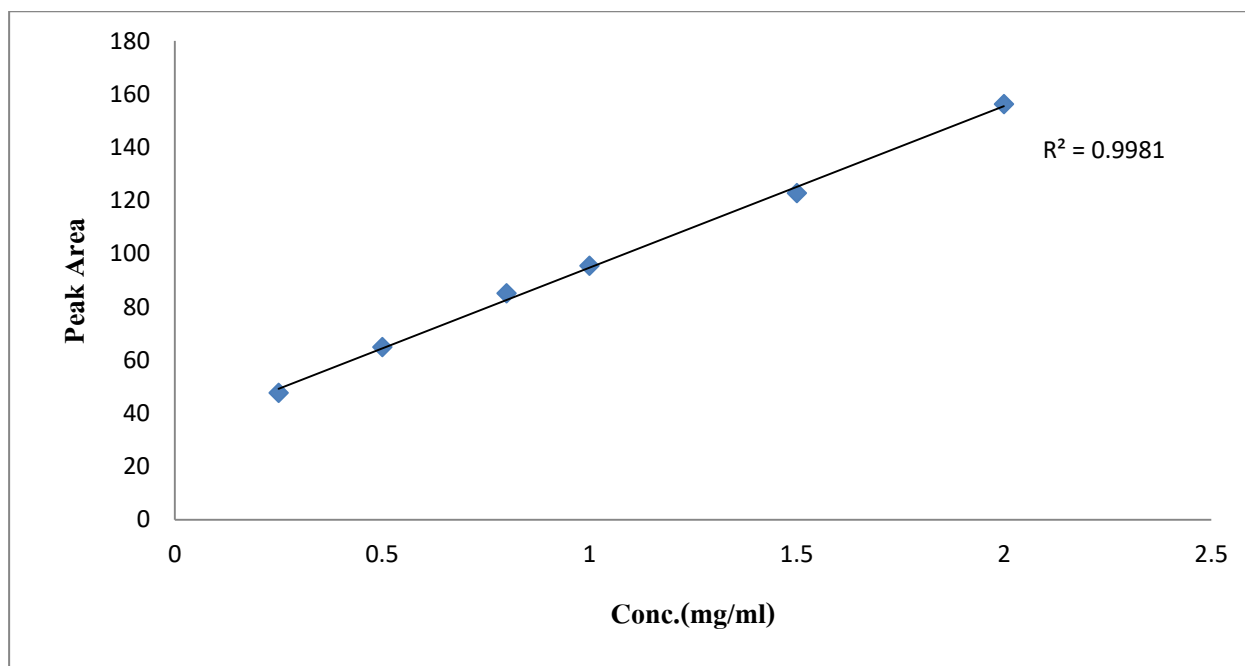
ภาพที่ 3 การตรวจสอบช่วงของการวัด (range) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย carbaryl ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml

4.2 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995 (AOAC)) ดังแสดงตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเป็นเส้นตรง (linearity) ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.25	47.58766	1
0.50	64.88194	2
0.80	84.99805	3
1.00	95.36502	4

1.50	122.7387	5
2.00	156.1773	6



ภาพที่ 4 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) แสดงกราฟมาตรฐานของสารละลาย carbaryl ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.00 mg/ml โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999

5. ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (precision)

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

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

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	7.6	85.67	29.7	87.17	59.0	85.60
2	7.8	85.37	29.8	85.37	58.9	85.73
3	7.9	86.05	29.8	85.41	59.5	85.67
4	7.7	86.97	29.9	85.46	59.3	86.44
5	7.9	86.09	29.7	86.94	59.3	87.51
6	7.7	87.29	29.4	87.41	59.5	85.45
7	7.4	87.21	29.9	85.54	59.3	85.58
8	7.7	85.46	29.6	85.44	59.2	85.07
9	7.5	85.29	29.8	85.08	59.4	87.31
10	7.4	85.12	29.8	87.36	59.7	87.29
	Mean	86.05	Mean	86.12	Mean	86.17
	SD	0.826	SD	0.963	SD	0.899

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่าดังนี้

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.896 \times 100)}{86.11} \\ &= 1.040 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 86.11, SD = 0.735

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

$$\text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ration)} = 0.861$$

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

$$= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.861)}$$

$$= 1.350$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

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

$$= \frac{1.040}{1.350}$$

$$= 0.770$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability ได้ค่า HORRAT = $0.770 \leq 2$
เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)

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

ตารางที่ 6 เพอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbaryl ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทำซ้ำ (reproducibility)

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	7.6	86.33	29.7	86.57	59.0	86.93
2	7.8	85.31	29.8	85.73	58.9	86.99
3	7.9	86.16	29.8	84.45	59.5	87.19
4	7.7	86.49	29.9	87.21	59.3	85.17
5	7.9	85.12	29.7	86.33	59.3	85.32
6	7.7	85.38	29.4	85.31	59.5	86.71
7	7.4	85.91	29.9	86.04	59.3	86.51
8	7.7	86.07	29.6	87.17	59.2	85.90
9	7.5	86.93	29.8	86.05	59.4	86.24
10	7.4	87.10	29.8	86.65	59.7	86.26
	Mean	86.08	Mean	86.10	Mean	86.32
	SD	0.669	SD	0.846	SD	0.690

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่าง

ข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองซ้ำ ด้วยวิธีการเดิม หลังจากการทดลองครั้งแรก 10 วัน ได้ค่าดังนี้

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.735 \times 100)}{86.18} \\ &= 0.853 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 86.18, SD = 0.735

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ration)} &= 0.862 \\ \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.862)} \\ &= 1.350 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{0.853}{1.305} \\ &= 0.632 \end{aligned}$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.632 ≤ 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 carbaryl ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการตรวจสอบ robustness

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	7.6	84.20	29.7	85.33	59.0	86.46
2	7.8	83.16	29.8	84.00	58.9	84.32
3	7.9	84.91	29.8	86.37	59.5	84.47
4	7.7	85.23	29.9	85.18	59.3	84.44
5	7.9	83.87	29.7	84.99	59.3	86.48
6	7.7	83.83	29.4	84.58	59.5	84.14
7	7.4	84.83	29.9	83.61	59.3	84.13
8	7.7	85.80	29.6	84.02	59.2	84.59
9	7.5	83.11	29.8	83.41	59.4	84.24
10	7.4	85.51	29.8	84.93	59.7	84.05
	Mean	84.45	Mean	84.64	Mean	84.73
	SD	0.951	SD	0.904	SD	0.932

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง โดยการเปลี่ยน เปลี่ยนอุณหภูมิของ 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

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.929 \times 100)}{84.61} \\ &= 1.098 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 84.61, SD = 0.929

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C (\text{Concentration ration}) &= 0.846 \\ \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.846)} \\ &= 1.354 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{1.098}{1.354} \\ &= 0.811 \end{aligned}$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ robustness ได้ค่า HORRAT = 0.811 ≤ 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 เพอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้นจากการตรวจสอบ ruggedness

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)
1	7.6	85.84	29.7	84.42	59.0	85.38

2	7.8	85.89	29.8	87.44	58.9	85.38
3	7.9	83.90	29.8	85.04	59.5	83.96
4	7.7	84.78	29.9	83.92	59.3	84.51
5	7.9	85.51	29.7	84.93	59.3	85.51
6	7.7	86.00	29.4	84.12	59.5	84.93
7	7.4	84.64	29.9	85.33	59.3	85.13
8	7.7	84.16	29.6	84.71	59.2	85.25
9	7.5	86.04	29.8	84.94	59.4	85.33
10	7.4	84.31	29.8	85.06	59.7	84.75
	Mean	85.11	Mean	84.99	Mean	85.01
	SD	0.835	SD	0.968	SD	0.485

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

$$\begin{aligned} \% \text{RSD (experimental)} &= \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} \\ &= \frac{(0.763 \times 100)}{85.04} \\ &= 0.897 \end{aligned}$$

เมื่อ Mean = 85.04, SD = 0.763

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C (\text{Concentration ration}) &= 0.850 \\ \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \end{aligned}$$

$$= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.850)}$$

$$= 1.353$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

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

$$= \frac{0.897}{1.353}$$

$$= 0.663$$

จากการทดสอบหาค่า precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness ได้ค่า HORRAT = $0.663 \leq 2$
 เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)

7 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy)

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

ตารางที่ 9 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ carbaryl

n	AI 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	12.79	20.17	7.50	12.58	25.15	12.50	12.25	32.80	20.00
2	12.68	20.28	7.50	12.61	24.98	12.50	12.38	32.86	20.00
3	12.64	20.02	7.50	12.51	24.91	12.50	12.34	32.58	20.00
4	12.68	20.09	7.50	12.51	24.73	12.50	12.34	32.36	20.00
5	12.66	20.06	7.50	12.52	24.76	12.50	12.39	32.36	20.00
6	12.64	20.22	7.50	12.58	24.97	12.50	12.29	32.36	20.00
7	12.64	20.08	7.50	12.64	25.05	12.50	12.29	32.36	20.00
8	12.68	20.07	7.50	12.61	25.04	12.50	12.38	32.42	20.00
9	12.73	20.08	7.50	12.64	24.45	12.50	12.37	32.29	20.00
10	12.72	20.08	7.50	12.62	24.71	12.50	12.37	33.02	20.00
Mean	12.69	20.12	7.50	12.58	24.88	12.50	12.34	32.54	20.00
SD	0.049	0.081		0.049	0.212		0.049	0.261	
%RSD	0.385	0.401		0.390	0.851		0.395	0.804	
%Recovery			99.07			98.40			101.00

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ} = \frac{20.12 - 12.69 \times 100}{7.50} = 99.07$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง} = \frac{24.88 - 12.58 \times 100}{12.50} = 98.40$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นสูง} = \frac{32.54 - 12.34 \times 100}{20.00} = 101.00$$

$$\% \text{ Recovery เฉลี่ย} = 99.49$$

จากการทดสอบหาค่า accuracy ของวิธีการ จาก % recovery ได้ค่า % recovery เท่ากับ 99.49 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร carbaryl โดยใช้เทคนิควิธี HPLC ตัวตรวจวัดชนิด DAD มีสถานะการทำงานของเครื่อง HPLC ดังนี้

Column	: Zorbax Eclipse XDB-C18 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมครอน
Mobile phase	: Methanol 55 % : water 45 %
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1.00 มิลลิลิตร/นาที
Stop time	: 10 นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature)	: 40 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume)	: 1 ไมโครลิตร
ความยาวคลื่น (Wavelength)	: 254 นาโนเมตร
RT (Retention Time)	: 8.158 นาที
ตัวตรวจวัด (Detector)	: DAD (Diode Array Detector)

มีค่า Range (ช่วงของการวัด) เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml ให้ค่า linearity (ความเป็นเส้นตรง) ในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 2.00 mg/ml โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient (r) $\geq$ 0.995 (AOAC)) การตรวจสอบ precision (ความแม่นยำ) ของการวิเคราะห์ carbaryl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มคาร์บาเมท สูตร WP มีค่า HORRAT ในรูปของ repeatability (การทวนซ้ำ) และ reproducibility (การทำซ้ำ) ได้ค่า เท่ากับ 0.770 และ 0.632 ตามลำดับ (เกณฑ์ยอมรับ HORRAT $\leq$ 2 (AOAC)) การตรวจสอบค่า robustness/ruggedness ในรูปของ precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.811 และ 0.663 ตามลำดับ (เกณฑ์เกณฑ์ยอมรับ HORRAT $\leq$ 2 (AOAC)) การตรวจสอบ accuracy (ความถูกต้อง) ของวิธีการจากค่า % recovery พบว่า % Recovery เท่ากับ 99.49 % ซึ่งเกณฑ์ยอมรับสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% อยู่ในช่วง 98-102 % (AOAC) จากผลการวิเคราะห์และตรวจสอบค่าต่างๆ ได้แก่ rang, linearity, precision, robustness/ruggedness และ accuracy อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ปริมาณ carbaryl ที่ได้เป็นวิธีที่พิสูจน์แล้วว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบ ค่า % สารออกฤทธิ์สำหรับผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช carbaryl ของห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ได้วิธีวิเคราะห์ carbaryl ที่พิสูจน์แล้วว่ามีคุณภาพถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานสากล และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

10.2 สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ในตรวจสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbaryl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชที่จำหน่ายในท้องตลาด และเพื่อการขอขึ้นทะเบียน

10.3 เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน

10.4 เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษทางการเกษตร 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>

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว (A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข : นนทบุรี

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนพานนท์. 2558. carbaryl. (วันที่สืบค้น 22 สิงหาคม 2558) จาก : URL: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2171/carbaryl>

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2558. สารเคมีในชีวิตประจำวัน/ยาฆ่าแมลง. (วันที่สืบค้น 25 สิงหาคม 2558) จาก: URL: <http://oldweb.pharm.su.ad.th/chemistry-in-life/d026.html>

ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา. 2558. รู้จักคาร์บาเมท. (วันที่สืบค้น 21 สิงหาคม 2558) จาก : URL: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_2_001c.asp?info_id=297

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษการเกษตรในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร

National Pesticide information Center : NPIC. 2015. Carbaryl (General fact sheet). Available August 24, 2015. From : <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/carbaryl.pdf>

Wikipedia. 2015. Carbaryl. Available August 24, 2015 from : <https://en.wikipedia.org/wiki/Carbaryl>

10. ภาคผนวก

เกณฑ์การยอมรับ Recovery

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

ตารางที่ 10 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