

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 - กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัดและวัตถุอันตรายทางการเกษตร
 - กิจกรรมย่อย 1.5 : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพิษทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพิษทางการเกษตรของสารกำจัดแมลง Cypermethrin
Method Validation of Cypermethrin in Insecticide Formulation
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นิกร โคตรสมบัติ	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7
ผู้ร่วมงาน	: อรพิน หนูทอง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

5. บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการวัตถุพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 มีภารกิจด้านการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุพิษการเกษตร ในส่วนภูมิภาค โดยรับผิดชอบพื้นที่ 7 จังหวัด ภาคใต้ตอนบน ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพิษการเกษตร สารกำจัดแมลง Cypermethrin ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้ ค่า Range หรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.5 mg/ml ค่า Linearity หรือค่าความสัมพันธ์ระหว่าง Response กับปริมาณของสารที่วิธีวิเคราะห์ทดสอบสามารถทำได้ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25-1.5 mg/ml โดยมีค่า Correlation Coefficient (r^2) 0.9995 มีความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml เท่ากับ 0.28, 0.85 และ 0.43 และการทำซ้ำ (Reproducibility) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml เท่ากับ 0.72, 0.81 และ 0.55 ตามลำดับ ตรวจสอบสถานะของ

เครื่องมือ โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Robustness) แล้วตรวจสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml มีค่า HORRAT เท่ากับ 0.82, 1.85 และ 1.08 ตามลำดับ และ การเปลี่ยน Column (Ruggedness) แล้วตรวจสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml มีค่า HORRAT เท่ากับ 1.53, 0.69 และ 0.76 ตามลำดับ ซึ่งตามเกณฑ์มาตรฐานของ AOAC ต้องมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 และการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการจากค่า % Recovery ได้ 100.75%, 99.38% และ 99.38% ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์สารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์หัตถภูมิพิษการเกษตร สารกำจัดแมลง Cypermethrin ถือว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานสากล และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการหัตถภูมิพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

^{1/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7

Abstract

The method validation is verified the accuracy and precision in analytical method to ensure that reliable results. Insecticide formulation analysis laboratory had validated of analytical methods for the determination of cypermethrin in insecticide formulation by gas liquid chromatography technique . It was evaluated from Range ,linearity , Accuracy and Precision. The range of this method was 0.25 -2.5. mg/ml and linearity which assessment from the correlation coefficient (r^2) was 0.9995 . Assessment of the precision by using the equation Horwitz's Ratio is the HORRAT of repeatability at 0.5 ,1.0 and 1.5 mg/ml equal to 0.28, 0.85 and 0.43, respectively, the HORRAT of reproducibility at 0.5 ,1.0 and 1.5 mg/ml equal to 0.72, 0.81 and 0.55, respectively .The optimized condition of gas liquid chromatography by changing oven temperature(robustness) and changing column (ruggedness) , the HORRAT was less than 2 . Assessment of the accuracy by % recovery at more than 10% concentrations of cypermethrin equal to 100.75%, 99.38% and 99.38 % which in 98-102 % , through acceptance of international standards.

คำนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึง คุณสมบัติและเงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ ก่อนที่จะนำวิธีการวิเคราะห์ใดมาใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง จำเป็นจะต้องทำ Method Validation เพื่อใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ผู้วิเคราะห์ พัฒนาขึ้น หรือดัดแปลงมาจาก Reference Method เพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการของห้องปฏิบัติการ ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำ Validation เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ วิธีการทดสอบที่ใช้สำหรับ Method Validation จะครอบคลุมถึงคุณสมบัติของวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่

1) ความจำเพาะ (Selectivity หรือ Specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์ เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยที่สารนั้นเป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งในสารละลายนั้น ๆ หรือวิธีการวิเคราะห์ ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด

2) สภาพไว (Sensitivity) หมายถึง ความสามารถในการวัดความเข้มข้นที่แตกต่างกันน้อยที่สุด วิธีการ วิเคราะห์ที่มีความไวสูงจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมากหรือเป็นวิธีที่สามารถแยกความเข้มข้น ของสารที่แตกต่างกันน้อยมากได้ถูกต้อง

3) Range และ Linearity โดย Range หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวัดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุด ถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วัดแล้วมี Accuracy Precision และ Linearity อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องยอมรับได้ตาม ข้อกำหนด ส่วน Linearity หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่จะทำให้วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

4) การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำๆ กัน หลายๆ ครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ซึ่ง Precision ของวิธีการวิเคราะห์มี 2 ลักษณะคือ repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในสถานะเดียวกันโดยใช้วิธีเดียวกันใน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกันและผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และ Reproducibility หมายถึง ความ แม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือคนละเครื่องกัน และทำใน

ห้องปฏิบัติการคนละแห่งกันมักจะวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้ช่วงเวลายาวพอสมควร ระดับของความแม่นยำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

5) Robustness / Ruggedness คือ การทดสอบความคงทนของวิธีการทดสอบ จากการเปลี่ยนสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธีที่เกิดขึ้นในการทำงานปกติ การทดสอบหา Robustness / Ruggedness ของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงวิธีการวิเคราะห์ให้ต่างไปจากเดิมเล็กน้อยและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างเช่น เปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven หรือแม้กระทั่งการเปลี่ยนชนิดของ คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

6) ความถูกต้อง (Accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด การหา Accuracy ทำได้โดยวิเคราะห์ CRM (Certified Reference Material) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาระดับความถูกต้องในรูปของความผิดพลาดสัมพัทธ์ (Relative error) หรือ ความถูกต้องสัมพัทธ์ (Relative Accuracy) และการหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery) ในกรณีที่ไม่สามารถหา CRM ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้ ให้ใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spiked Sample) ซึ่งจะมีข้อจำกัดว่า Accuracy ที่ได้นั้นครอบคลุมเฉพาะขั้นตอนที่วิเคราะห์ Spiked Sample เท่านั้น การทำ Recovery จะทำ 3 ระดับความเข้มข้น และอย่างน้อยความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

7) การหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) โดย LOD หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ และ LOQ หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี Accuracy และ Precision ที่ยอมรับได้ (สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตรไม่ได้ทำการหาค่า LOD และ LOQ)

การตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร เป็นอีกภารกิจหนึ่งที่กรมวิชาการเกษตรมอบนโยบายให้ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรทั้ง 8 เขต ต้องดำเนินการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้เป็นไปตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำเป็นที่น่าเชื่อถือ เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและเป็นไปตามการควบคุมใน พ.ร.บ.วัตถุอันตราย 2535 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ Cypermethrin มีวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน CIPAC Handbook 1C (CIPAC : Collaborative International Pesticide Analytical Council) (Henriet et al., 1985) ซึ่งต้องประยุกต์ให้ทันสมัยเหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลง Cypermethrin เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ โดยมีพารามิเตอร์ที่นำมาทดสอบวิธีวิเคราะห์ได้แก่ การหาค่าช่วงการวัด Range, การหาค่า Linearity, การตรวจสอบความแม่นยำ (Precision) จากค่า HORRAT ของ Repeatability, Reproducibility, Robustness และ Ruggedness, การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ซึ่งประเมินจากการหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%Recovery) โดยเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานสากล

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) หัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)

2. Capillary column ชนิด 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร (30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film thickness)
3. Capillary column ชนิด 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5MS) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร (30m x 0.25mm ID, 0.25 μ m film thickness)
4. เครื่องชั่งละเอียด 5 ตำแหน่ง
5. Ultrasonic bath
6. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10, 25, 250 และ1000 (ml)
7. ปิเปต ขนาด 2,3,4,5 และ10 ml
8. Vial ขนาด 2 ml

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Cypermethrin 99.5%
2. สาร Cypermethrin ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical grade)
3. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช Cypermethrin 35%
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Cypermethrin

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ดังนี้

Column : capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film thickness)

Gas flow rate : Helium (carrier gas) 2 ml/min

Hydrogen 30 ml/min

Airzero 350 ml/min

Nitrogen 30 ml/min

Split injection : Split ratio 50:1, Split flow 100 ml/min

Injection volume : 1 μ l,

Temperature : Oven 220 °C Hold time 3 min

240 °C Hold time 14 min

: Inlet 270 °C

: Detector 270 °C

Detector : Flame Ionization Detector (FID)

2. การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Cypermethrin 2 ซ้ำ (C₁, C₂) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 ml เติม Acetone ประมาณ 5 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ Vial ขนาด 2 ml

2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (Technical grade)

ชั่งสาร Technical grade Cypermethrin 10 ซ้ำ (T₁- T₁₀) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml เติม Acetone ประมาณ 15 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ Vial ขนาด 2 ml

2.3 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC

เปิดเครื่อง GC ตามที่กำหนดโปรแกรมควบคุมสถานะการใช้งานไว้ เมื่อ Baseline คงที่ ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้ Peak หรือความสูงของ Peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

2.4 การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade

เมื่อเครื่อง GC พร้อมใช้งานแล้ว ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลาย Technical grade เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอนตามลำดับ ดังนี้

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

สารละลายมาตรฐาน C₁, C₂ ต้องมีค่า % Relative Percent Different (%RPD) ไม่เกิน 3%

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

2.5 การคำนวณหา Response factor

Response factor = (weigh x purity)/peak area หรือ $f = (S \times P) / H_s$

S = น้ำหนักของ Cypermethrin ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

P = % ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Cypermethrin

H_s = พื้นที่ใต้ peak ของ Cypermethrin ในสารละลายมาตรฐาน

2.6 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในสารละลาย Technical grade

$$\text{Cypermethrin content} = (Hw \times f)/w$$

Hw = พื้นที่ใต้ peak ของ Cypermethrin ในสารละลาย Technical grade

F = ค่าเฉลี่ย Response factor

w = น้ำหนักของ Cypermethrin ในสารละลาย Technical grade (mg)

2.7 นำค่า % ของ Technical grade ที่คำนวณได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ % ที่แน่นอนของ Technical grade

3. การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

3.1 ทดสอบช่วงการวัด Range

3.1.1 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ Cypermethrin ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน (0.25-2.5 mg/ml) ได้แก่ 6.47, 12.95, 25.91, 38.86, 51.82 และ 64.77 mg ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml เติม Acetone ประมาณ 10 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ Vial ขนาด 2 ml

3.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน x) กับ Response (แกน y)

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า Linearity

3.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก Range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 6.47, 12.95, 19.43, 25.91, 32.38 และ 38.86 mg ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml เติม Acetone ประมาณ 10 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ Vial ขนาด 2 ml

3.2.3 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical grade (แกน x) กับ Response (แกน y)

3.2.5 คำนวณหาค่า Correlation Coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$

(AOAC Peer- Verified methods, 1993)

4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

4.1 Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน แสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง

4.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน Cypermethrin 2 ซ้ำ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 mg ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 ml เติม Acetone ประมาณ 5 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ Vial ขนาด 2 ml

4.1.2 ชั่งสารตัวอย่าง Cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ (0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำโดยใช้ Volumetric flask ขนาด 25 ml เติม Acetone ประมาณ 10 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

4.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (4.1.1 และ 4.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในสารละลายตัวอย่าง

4.2 Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 หาค่า HORRAT ของ Repeatability และ Reproducibility โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC (1993) ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการที่ 1

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

5. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness

5.1 Robustness ทดสอบจากการเปลี่ยนสถานะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยน Oven Temperature จาก 240 เป็น 250 °C ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.2 Ruggedness ทดสอบจากการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์โดยเปลี่ยน capillary column จาก HP-5 (30 m. x 0.32mm.(ID.),0.25 µm, film thickness) เป็น HP-5MS (30 m. x 0.25 mm.(ID.),0.25 µm, film thickness) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.3 หาค่า HORRAT ของ Robustness และ Ruggedness โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC (1993) ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการที่ 1

6. การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech Cypermethrin ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (5 mg/ml) โดยชั่งสาร Technical grade Cypermethrin ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 250 ml เติม Acetone ประมาณ 150 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย Stock Sample Cypermethrin ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg/ml) โดยชั่งตัวอย่าง Cypermethrin ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1000 ml เติม Acetone ประมาณ 500 ml เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.3 สร้างกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลาย 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดย ปิเปต Stock Tech Cypermethrin (5 mg/ml) 2.5, 5 และ 7.5 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย Acetone

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin โดย ปิเปต สารละลาย Stock Sample Cypermethrin ปริมาตร 10 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Cypermethrin

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Recovery

6.5.1 ปิเปต สารละลาย Stock Sample Cypermethrin ปริมาตร 10 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 ปิเปต สารละลาย Stock Tech Cypermethrin (5 mg/ml) ปริมาณ 2, 3 และ 4 ml ลงใน Sample Origin 10 ml ที่เตรียมไว้ใน Volumetric flask ขนาด 25 ml อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ Cypermethrin

6.6 การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin ที่เป็นค่า Origin และ Spike (6.4 และ 6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % Recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (1993) การคำนวณตามสมการที่ 2

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

ระยะเวลา ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 กรมวิชาการเกษตร สุราษฎร์ธานี

ผลการดำเนินงาน

1. ผลการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ Cypermethrin

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC –FID ในห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบ
พืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 กรมวิชาการเกษตร สุราษฎร์ธานี คือ

Column : capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film thickness)

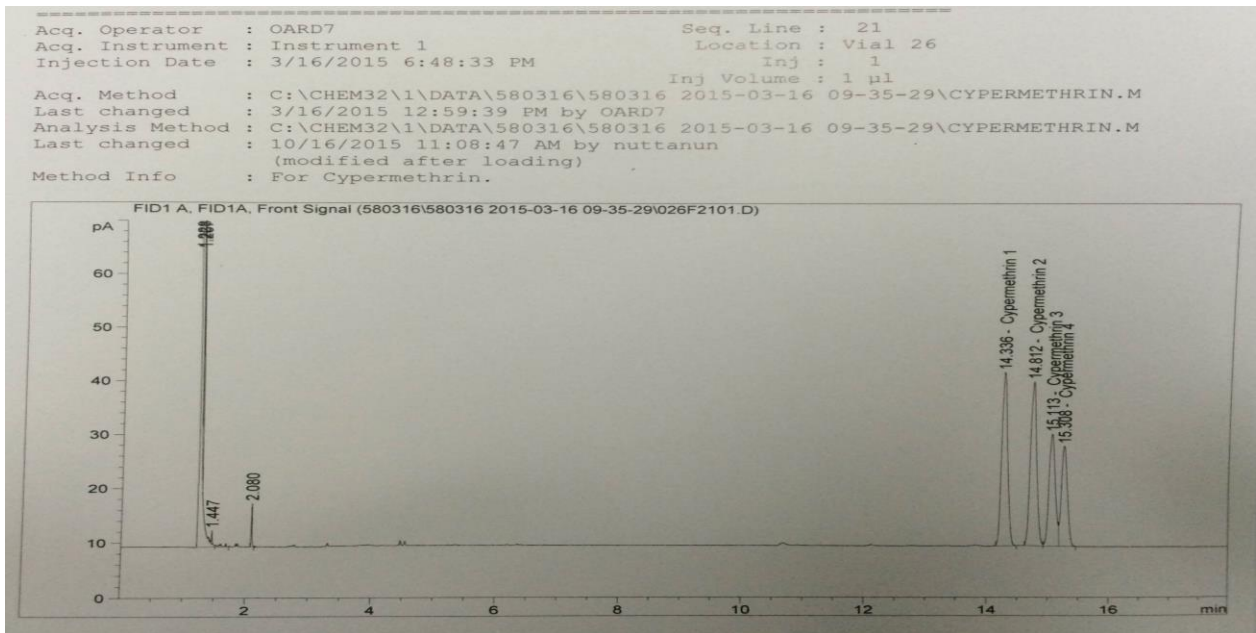
Gas flow rate : Helium (carrier gas) 2 mL/min
Hydrogen 30 mL/min
Airzero 350 mL/min

Split injection : Split ratio 50:1
Split flow 100 mL/min

Injection volume : 1 μ l,

Temperature : Oven 220 °C Hold time 3 min
240 °C Hold time 14 min
Inlet 270 °C
Detector 270 °C

ผลการทดลองพบว่า Chromatogram ของ Cypermethrin ไม่มีสัญญาณ Peak รบกวน แสดงว่ามี
Specification/ Selectivity ที่ดี (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน Cypermethrin

2. ผลการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin

2.1 ค่า %RPD ของ Peak area สารละลายมาตรฐาน C1, C2 มีค่าไม่เกิน 3 % (ตารางที่ 1)

2.2 ค่า % สารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในสารละลาย Technical grade มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 96.47 % (ตารางที่ 2)

3. ผลการตรวจสอบช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

3.1 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) มีค่า 0.25-2.5 mg/ml ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 (เกณฑ์มาตรฐาน > 0.995) ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2-5

3.2 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ความเข้มข้น 0.25 – 1.5 mg/ml ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 (เกณฑ์มาตรฐาน > 0.995) ดังตารางที่ 4 และภาพที่ 6-9

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

std.	mg.	peak area	average	%RPD
C1	10.19	265.77	268.35	1.928
C2	10.20	270.94		
C1	10.19	264.94	268.88	2.933
C2	10.20	272.83		
C1	10.19	270.47	273.14	1.957
C2	10.20	275.82		
C1	10.19	270.66	272.89	1.640

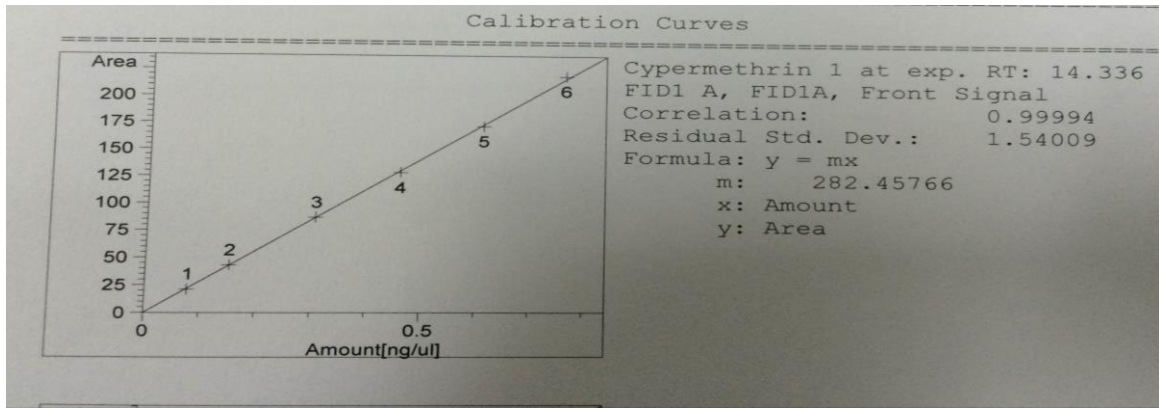
C2	10.20	275.13		
C1	10.19	272.85		
			274.49	1.195
C2	10.20	276.13		

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย % สารออกฤทธิ์ Cypermethrin ในสารละลาย Technical grade

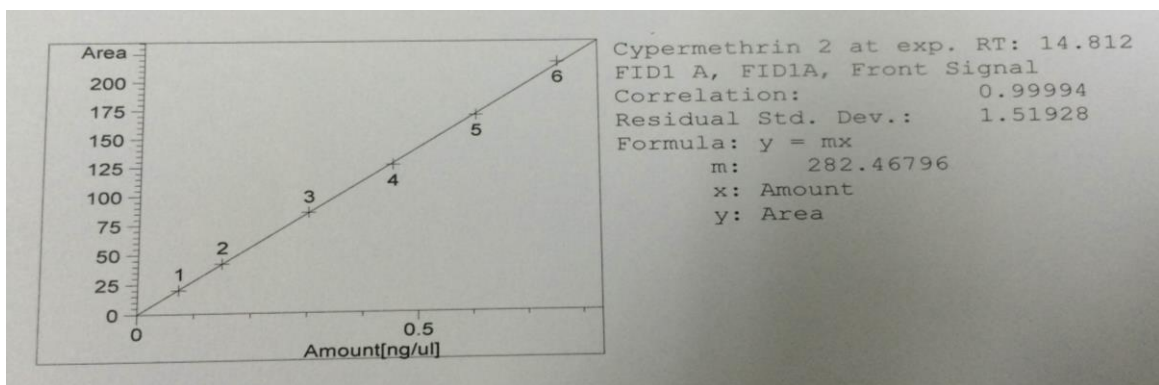
สารละลาย Technical grade	% Technical grade
T1	94.77
T2	96.21
T3	96.62
T4	97.26
T5	96.38
T6	96.28
T7	97.04
T8	96.85
T9	96.48
T10	96.80
Mean	96.47
SD	0.65

ตารางที่ 3 ช่วงของการวัด (Range) ความเข้มข้น 0.25-2.5 mg/ml

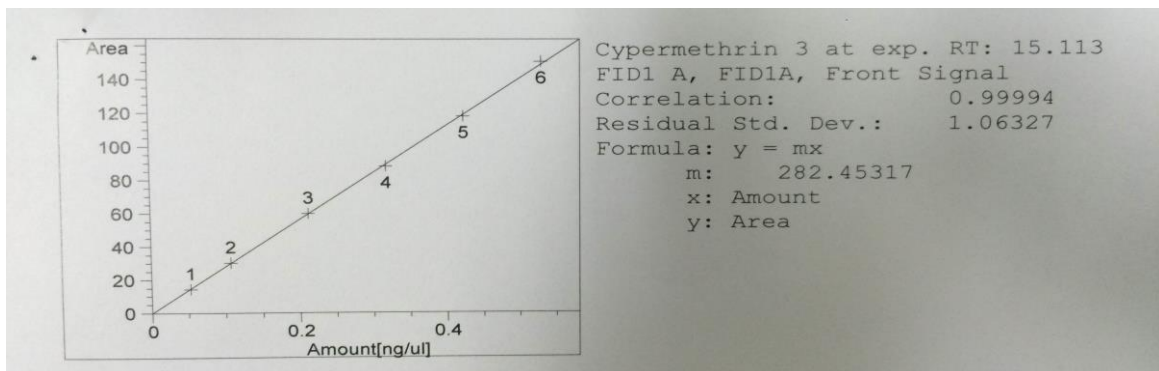
ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.25	66.18	1
0.5	140.75	2
1.0	282.39	3
1.5	417.80	4
2.0	559.32	5
2.5	713.52	6



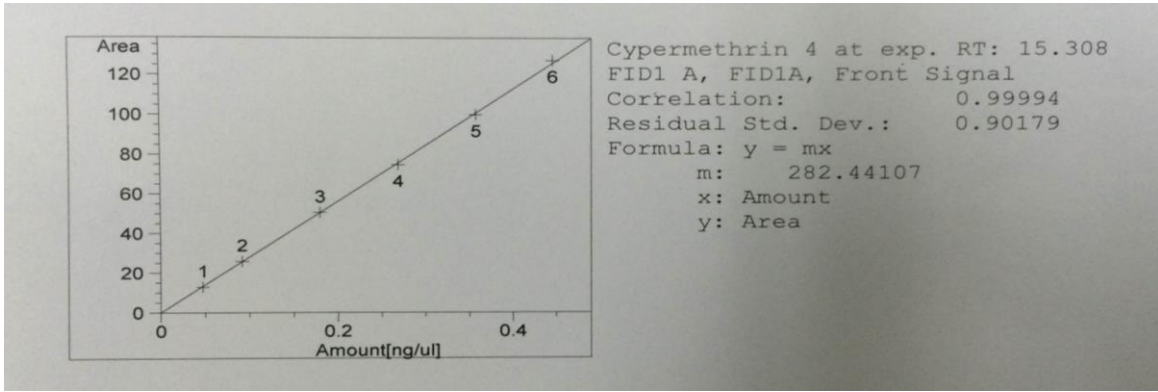
ภาพที่ 2 แสดง Calibration curves (Range) สารละลาย Cypermethrin Peak ที่ 1 6 level (0.25-2.5 mg/ml)



ภาพที่ 3 แสดง Calibration curves (Range) สารละลาย Cypermethrin Peak ที่ 2 6 level (0.25-2.5 mg/ml)



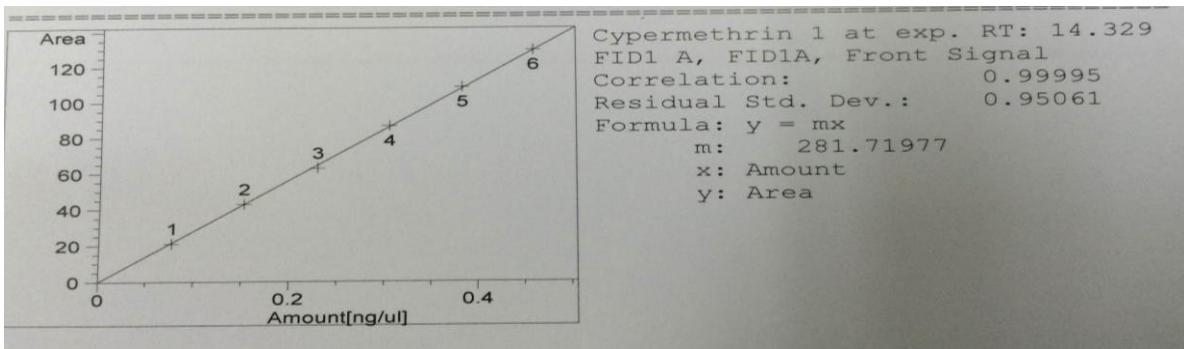
ภาพที่ 4 แสดง Calibration curves (Range) สารละลาย Cypermethrin Peak ที่ 3 6 level (0.25-2.5 mg/ml)



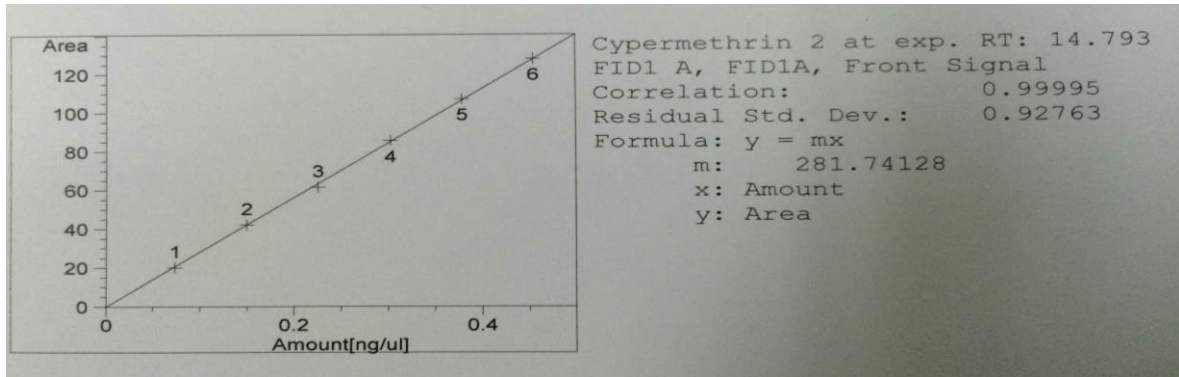
ภาพที่ 5 แสดง Calibration curves (Range) สารละลาย Cypermethrin Peak ที่ 4 6 level (0.25-2.5 mg/ml)

ตารางที่ 4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ความเข้มข้น 0.25-1.5 mg/ml

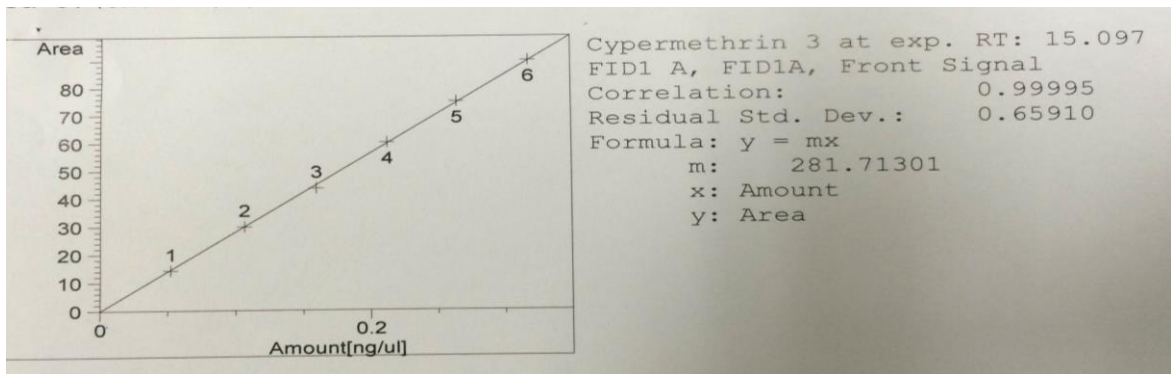
ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.25	35.22	1
0.50	68.58	2
0.75	103.94	3
1.00	135.73	4
1.25	170.51	5
1.50	204.70	6



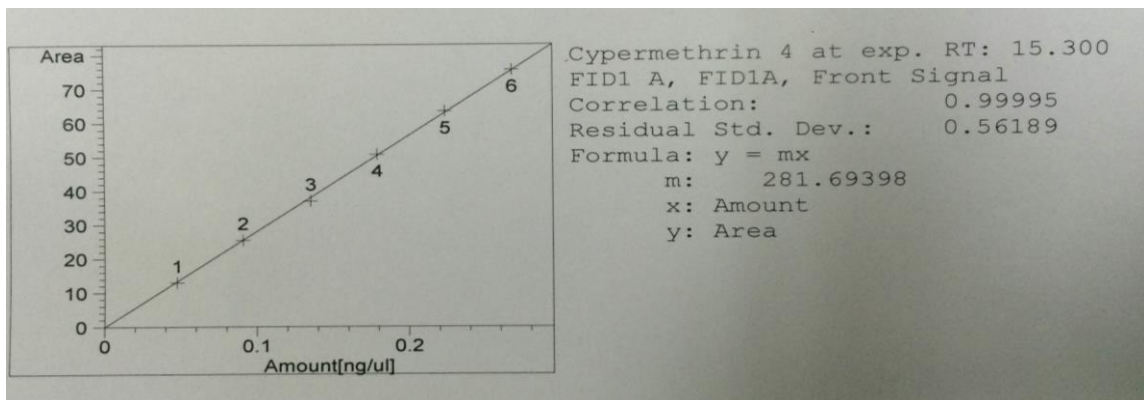
ภาพที่ 6 แสดง Calibration curves (Linearity) ของสาร Cypermethrin Peak ที่ 1 6 level (0.25-1.5 mg/ml)



ภาพที่ 7 แสดง Calibration curves (Linearity) ของสาร Cypermethrin Peak ที่ 2 6 level (0.25-1.5 mg/ml)



ภาพที่ 8 แสดง Calibration curves (Linearity) ของสาร Cypermethrin Peak ที่ 3 6 level (0.25-1.5 mg/ml)



ภาพที่ 9 แสดง Calibration curves (Linearity) ของสาร Cypermethrin Peak ที่ 4 6 level (0.25-1.5 mg/ml)

4. ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (precision)

4.1 ผลการหา Precision โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ที่ 3 ความเข้มข้น (ตารางที่ 5)
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบจากการทวนซ้ำ (Repeatability) ที่ 3 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น 0.5 mg/ml

ความเข้มข้น 1.0 mg/ml

ความเข้มข้น 1.5 mg/ml

n	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	35.88	35.07	71.43	36.91	107.14	35.71
2	35.90	34.97	71.49	35.50	107.17	35.51
3	35.90	34.77	71.54	35.28	107.29	35.81
4	35.97	35.27	71.54	35.50	107.30	36.12
5	36.00	35.15	71.59	35.26	107.36	35.37
6	36.03	35.14	71.60	35.84	107.42	35.71
7	36.10	35.09	71.68	35.84	107.55	35.71
8	36.10	34.81	71.68	35.51	107.58	35.40
9	36.22	35.06	71.78	35.43	107.58	36.02
10	36.33	34.92	72.03	35.29	107.64	35.50
	Mean	35.03	Mean	35.63	Mean	35.69
	SD	0.15	SD	0.47	SD	0.24

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 35.45, \text{SD} = 0.29 \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 0.81$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ratio) ได้ค่า} = 0.35 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.35)} = 1.546 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{0.81}{1.546} = 0.52$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.52

4.2 ผลการหา Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ที่ 3 ความเข้มข้น (ตารางที่ 6)
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการซ้ำ (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	35.77	34.84	71.90	35.65	107.30	36.25
2	35.78	35.37	71.92	36.29	107.33	36.23

3	35.89	35.04	71.95	36.06	107.37	36.47
4	35.97	35.26	72.13	35.36	107.38	35.91
5	36.01	34.73	72.23	36.06	107.39	36.15
6	36.33	34.71	72.28	36.60	107.44	36.12
7	36.36	35.48	72.35	35.38	107.45	36.25
8	36.46	35.76	72.55	35.08	107.46	35.74
9	36.49	35.76	72.57	35.09	107.64	35.38
10	36.71	35.67	72.74	35.53	107.67	35.77
	Mean	35.26	Mean	35.78	Mean	36.03
	SD	0.39	SD	0.45	SD	0.31

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิม หลังจากการทดลองครั้งแรก 10 วัน ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 35.69, \text{SD} = 0.38 \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.06$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ratio) ได้ค่า} = 0.35 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.35)} = 1.546 \\ \text{HORRAT} &= \frac{1.06}{1.546} = 0.69 \end{aligned}$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.69

5. ผลการตรวจสอบ Robustness/Ruggedness

5.1 ผลตรวจสอบ Robustness จากการปรับสภาวะของเครื่อง โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ Oven จาก 240 °C เป็น 250 °C (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์ที่ตรวจพบจากการตรวจสอบ Robustness ที่ 3 ความเข้มข้น

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	35.88	35.18	71.43	36.89	107.14	35.44

2	35.90	34.45	71.49	35.64	107.17	36.64
3	35.90	35.03	71.54	35.39	107.29	35.45
4	35.97	35.73	71.54	35.30	107.30	36.88
5	36.00	35.36	71.59	35.04	107.36	35.72
6	36.03	34.93	71.60	35.59	107.42	36.08
7	36.10	34.83	71.68	35.59	107.55	35.38
8	36.10	36.07	71.68	35.07	107.58	35.27
9	36.22	34.88	71.78	38.58	107.50	36.82
10	36.33	35.03	72.03	35.64	107.64	35.05
	Mean	35.15	Mean	35.87	Mean	35.77
	SD	0.45	SD	1.03	SD	0.60

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง โดยการเปลี่ยน อุณหภูมิ Oven จาก 240 °C เป็น 250 °C ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 35.60, \text{SD} = 0.69, \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.94$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ratio) ได้ค่า} = 0.35 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.35)} = 1.546 \\ \text{HORRAT} &= \frac{1.94}{1.546} = 1.25 \end{aligned}$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 1.25

5.2 ผลการตรวจสอบ Ruggedness จากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก capillary column HP-5 เป็น HP-5MS (I.D จาก 0.32 mm เป็น 0.25 mm) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบจากการตรวจสอบ Ruggedness ที่ 3 ความเข้มข้น

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	35.87	33.68	71.46	34.57	107.23	34.98

2	35.88	34.30	71.50	34.41	107.28	34.96
3	35.97	33.32	71.52	35.06	107.32	33.97
4	35.98	35.02	71.67	34.60	107.35	34.30
5	36.05	34.20	71.75	34.55	107.43	34.05
6	36.08	34.03	72.05	33.91	107.57	33.76
7	36.24	36.21	72.14	34.15	107.61	34.00
8	36.26	33.33	72.16	34.17	107.74	34.38
9	36.47	34.04	72.47	33.75	107.76	34.76
10	36.49	34.09	72.66	34.14	107.86	34.33
	Mean	34.22	Mean	34.33	Mean	34.35
	SD	0.81	SD	0.36	SD	0.41

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองโดยการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก capillary column HP-5 เป็น HP-5ms ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 34.30, \quad \text{SD} = 0.53, \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.54$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \quad \text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.35 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.35)} = 1.546 \\ \text{HORRAT} &= \frac{1.54}{1.546} = 0.99 \end{aligned}$$

จากการทดลองหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.99

6. ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) การประเมินค่า Accuracy จาก % Recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Cypermethrin ที่เป็นค่า Origin และ Spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % Recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98 -102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (1993) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ chlorpyrifos

n	Al content (..mg/25ml)								
	conc.added (10.36 mg/25ml)			conc.added (15.55 mg/25ml)			conc.added (20.73 mg/25ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	11.03	21.57	10.36	11.12	26.44	15.55	11.20	31.59	20.73
2	10.97	21.38	10.36	11.06	26.49	15.55	11.22	31.81	20.73
3	10.98	21.47	10.36	10.96	26.66	15.55	11.28	32.07	20.73
4	10.91	21.09	10.36	10.99	26.25	15.55	11.11	31.43	20.73
5	11.00	21.50	10.36	11.10	26.62	15.55	11.11	31.61	20.73
6	10.96	21.38	10.36	11.16	26.64	15.55	11.13	31.75	20.73
7	11.02	21.54	10.36	11.10	26.62	15.55	11.11	31.75	20.73
8	11.01	21.51	10.36	11.06	26.40	15.55	11.14	31.78	20.73
9	10.95	21.26	10.36	11.09	26.55	15.55	11.09	32.06	20.73
10	10.98	21.49	10.36	11.17	26.67	15.55	11.06	31.65	20.73
Mean		21.42	10.36	11.08	26.53	15.55	11.15	31.75	20.73
SD		0.007	-	0.006	0.005	-	0.006	0.006	-
%RSD		0.03	-	0.05	0.02	-	0.05	0.02	-
%Recovery									

สรุปผลการดำเนินงาน

1. จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Cypermethrin โดยเครื่อง GC-FID ได้สภาวะที่เหมาะสมดังนี้

Column	:	capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 µm film thickness)
Gas flow rate	:	Helium (carrier gas) 2 mL/min
	:	Hydrogen 30 mL/min
	:	Airzero 350 mL/min
	:	Nitrogen 30 mL/min
Split injection	:	Split ratio 50:1
	:	Split flow 100 mL/min
Injection volume	:	1 µl

Temperature : Oven 240 °C Hold time 3 min
 240 °C Hold time 14 min
 Inlet 270 °C
 Detector 270 °C

สภาวะที่ได้พบว่า Chromatogram ของ Cypermethrin ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี specification/ selectivity ที่ดี

2. ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนี้

2.1 Range หรือ ปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 0.25-2.5 mg/ml

2.2 Linearity หรือ ความสัมพันธ์ระหว่าง Response กับปริมาณของสารที่วิธีวิเคราะห์ทดสอบสามารถทำได้มี Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$ (AOAC, 1993)

2.3 การตรวจสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.52 และ 0.69 ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC (1993) ยอมรับ < 2 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ Cypermethrin ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

2.4 การตรวจสอบ Precision ในรูปของ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.69 และ 0.99 ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC (1993) ยอมรับ < 2 ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ Cypermethrin ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

2.5 การตรวจสอบ Accuracy ของวิธีการจากค่า % Recovery เท่ากับ 99.84 % สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% เกณฑ์ AOAC (1993) อยู่ในช่วง 98 -102% ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ Cypermethrin ให้ผลการทดสอบ Accuracy อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

3. จากการทดสอบ 7 พารามิเตอร์พบว่าผ่านเกณฑ์กำหนดทุกพารามิเตอร์ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบ ค่า % สารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง Cypermethrin ห้องปฏิบัติการวัดภูมิพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 ได้

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 1993. Peer- Verified methods Program, Manual on policies and procedures, AOAC International Arlington, Virginia, USA.

- AOAC. 1998. Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. 2004. Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data, HorRat for SLV.doc, 2004-01-18, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- CIPAC. 1999. Guidelines on Method Validation to be performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations. Collaborative International Pesticides Analytical Council, Document No. 3807, Black Bear Press, Cambridge, UK.
- Henriet, J., Martijn, A. and Povlsen, H.H. 1985, CIPAC Handbook, Vol.1C, Analysis of Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical Council, Limited.
- Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to validate Pesticide Residue Method Performance. In: Principle and Practice of Method Validation. A. Fa Ambrus(eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

ภาคผนวก

Table 1: เกณฑ์การยอมรับ recovery

% Active/impurity content A	acceptable mean recovery
≥10	98 –102%
≥1	90 –110%
0.1 – 1	80 – 120%
< 0.1	75 – 125%

AOAC Peer- Verified methods Program (1993)

Table 2: Expected precision (repeatability) as a function of analyte concentration

Analyte, %	Analyte ratio	Unit	RSD, %
100	1	100%	1.3

10	10^{-1}	10%	1.9
1	10^{-2}	1%	2.7
0.01	10^{-3}	0.1%	3.7
0.001	10^{-4}	1 0 0 ppm	5.3

(mg/kg)

AOAC Peer-Verified Methods Program (1998)

Table 3: Predicted relative standard deviation of reproducibility (PRSD_R)

Concentration (C)	Mass fraction (C)	PRSD _R , %
100%	1.0	2
1%	0.01	4
0.01%	0.0001	8
1 ppm	0.000001	16

Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data,

HorRat for SLV.doc, 2004-01-18

Reproducibility relative standard deviation calculated from the Horwitz

formula

