

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร
- กิจกรรม : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร (ปีเริ่มต้น 2559 – สิ้นสุด 2561)
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลง ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (2559-2561) : บuprofezin ไพริดาเบน เบตา-ไซฟลูทริน อีทิโพรล อิมิดาโคลพริด อะซีตามิพริด ไซเปอร์เมทริน+โพรฟีโนฟอส ฟีนบูคาร์บ เฟนิโตรไทออน และลูเฟนนูรอน+โพรฟีโนฟอส

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Method Validation for Determination of the Active Ingredients of Insecticide in Pesticide Products (2016-2018) : Buprofezin Pyridaben Beta-cyfluthrin Ethiprole Imidacloprid Ac e t a m i p r i d Cypermethrin+Profenofos Fenobucarb Fenitrothion and lufenuron+profenofos

#### 4. คณะผู้ดำเนินงาน

ผู้รวบรวมรายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล

ปี 2559 : บuprofezin (buprofezin), ไพริดาเบน (pyridaben), เบตา-ไซฟลูทริน (beta-cyfluthrin) และอีทิโพรล (ethiprole)

หัวหน้าการทดลอง นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

ผู้ร่วมงาน นางสาวดวงรัตน์ วิลาลินี สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

นายพิเชษฐ์ ทองละเอียด สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

นางสาวทัศนีย์ อัญญพรพงษ์ สังกัด กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

ปี 2560 : อิมิดาโคลพริด (imidacloprid), อะซีตามิพริด (acetamiprid) และไซเปอร์เมทริน+โพรฟีโนฟอส (cypermethrin+profenofos)

หัวหน้าการทดลอง	นายพิเชษฐ์ ทองละเอียด	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
ผู้ร่วมงาน	นางสาวทัศนีย์ อัญญาพรพงษ์	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
	นางสาวดวงรัตน์ วิลาสินี	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
	นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

ปี 2561 : ฟีนอบูคาร์บ (fenobucarb), เฟนิโตรไทออน (fenitrothion) และลูเฟนนูรอน+โพรฟีโนฟอส (lufenuron+profenofos)

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวทัศนีย์ อัญญาพรพงษ์	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
ผู้ร่วมงาน	นายพิเชษฐ์ ทองละเอียด	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
	นางสาวดวงรัตน์ วิลาสินี	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
	นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล	สังกัด	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

## 5. บทคัดย่อ (Abstract)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเทคนิค gas-liquid chromatography (GLC) ชนิด flame ionization detector (FID) สำหรับบูโปรเฟซีน (buprofezin), ไพริดาเบน (pyridaben), เบตา-ไซฟลูทริน (beta-cyfluthrin), ไซเปอร์เมทริน+โพรฟีโนฟอส (cypermethrin+profenofos) และเฟนิโตรไทออน (fenitrothion) และเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ชนิด UV detector สำหรับอีทิโพรล (ethiprole), อิมิดาโคลพริด (imidacloprid), อะเซตามิพริด (acetamiprid), ฟีนอบูคาร์บ (fenobucarb) และลูเฟนนูรอน+โพรฟีโนฟอส (lufenuron+profenofos) ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity)/ช่วงของการวัด (working range) ให้ช่วงความเข้มข้น 0.2-1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin) ช่วงความเข้มข้น 0.02-0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ethiprole) ช่วงความเข้มข้น 0.06-0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin, fenobucarb, lufenuron และ profenofos) และช่วงความเข้มข้น 0.6-1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (profenofos และ fenitrothion) ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r$ )  $r > 0.995$  อยู่ในเกณฑ์ยอมรับค่า  $r \geq 0.995$  ตรวจสอบความเที่ยง (precision) ทั้งแบบ repeatability และ within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.14-0.88 (buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole) ช่วง 0.3288-1.9230 (imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos) ช่วง 0.34-1.84 (fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos) ตรวจสอบ robustness/ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.16-0.60 (buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole) ช่วง 0.3937-1.8352 (imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos) ช่วง 0.36-1.94 (fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos) ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ได้ค่า %recovery ของ buprofezin, pyridaben, profenofos, fenobucarb และ fenitrothion อยู่ในช่วง 98.2 – 102.0 ตามช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98-102%

พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และได้ค่า %recovery ของ beta-cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin และ lufenuron อยู่ในช่วง 98.1 – 102.4 ตามช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 97-103% พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และประมาณค่าความไม่แน่นอนของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin+profenofos, fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron +profenofos เป็น 0.2, 1.2, 0.04, 0.13, 0.34, 0.21, 0.04, 0.40, 0.94, 1.18, 0.09 และ 1.17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ ดังนั้นผลการทดสอบดังกล่าว มีคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ วิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

**คำสำคัญ :** ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สารกำจัดแมลง ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช สารออกฤทธิ์

Method validation of buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin+profenofos, fenobucarb, fenitrothion and lufenuron+profenofos as the active ingredients of insecticide in pesticide products were determined by gas chromatography (GC) with flame ionization detector and high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector. The linearity/working range of buprofezin, pyridaben and beta-cyfluthrin were in the range of 0.2 to 1.8 mg/ml, the range of 0.02 to 0.18 mg/ml for ethiprole, the range of 0.06 to 0.16 mg/ml for imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin fenobucarb, lufenuron and profenofos and the range of 0.6 to 1.6 mg/ml for profenofos and fenitrothion with the coefficient correlation ( $r$ ) > 0.995 which had accepted with limit of the correlation coefficient ( $r$ )  $\geq$  0.995. The precision of HORRAT values for repeatability and within laboratory reproducibility were in the range of 0.14 to 0.88 for (buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin and ethiprole), the range of 0.3288-1.9230 for (imidacloprid, acetamiprid and cypermethrin+profenofos) and the range of 0.34-1.84 for (fenobucarb, fenitrothion and lufenuron+profenofos). The HORRAT values for robustness /ruggedness were in the range of 0.16 to 0.60 for (buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin and ethiprole), the range of 0.3937-1.8352 for (imidacloprid, acetamiprid and cypermethrin+ profenofos) and the range of 0.36-1.94 for (fenobucarb, fenitrothion and lufenuron+profenofos) which were within acceptance criteria of the AOAC, EU and Codex (HORRAT value less than 2). The accuracy of this method was assessed by recovery studied. The percent recovery of buprofezin, pyridaben, profenofos, fenobucarb and fenitrothion were in the range of 98.2 to 102.0 considered an acceptance by the AOAC (98-102%) for analyte concentration more than 10%. The percent recovery of beta-

cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin and lufenuron were in the range of 98.1 to 102.4 considered an acceptance by the AOAC (97-103%) for analyte concentration more than 1%. This specific method did not have interference from other substances. The measurement uncertainty of buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin+profenofos, fenobucarb, fenitrothion and lufenuron +profenofos were 0.2, 1.2, 0.04, 0.13, 0.34, 0.21, 0.04, 0.40, 0.94, 1.18, 0.09 and 1.17 respectively at 95% confidence level. As a result, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. This method could be used to determine in insecticide products with accuracy and precision.

**Keywords :** method validation, insecticide, pesticide products, active ingredient

## 6. คำนำ

ประเทศไทยมีการใช้สารกำจัดแมลง (Insecticide) กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นประเทศเกษตรกรรม สารกำจัดแมลงที่ผลิตขึ้นจึงนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมและการทำลายศัตรูพืช เพื่อลดความเสียหายของ ผลผลิตการเกษตรที่เกษตรกรปลูก ปริมาณข้อมูลการนำเข้าสารกำจัดแมลงในระหว่างปี 2554-2560 พบว่ามี ปริมาณนำเข้ามากกว่าสิบล้านกิโลกรัม และคิดเป็นมูลค่ามากกว่าพันล้านบาทในแต่ละปี (สำนักงานเศรษฐกิจ การเกษตร, 2554-2560) โดยปริมาณและมูลค่าการนำเข้าค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่ามีการใช้สารกำจัดแมลงเป็น จำนวนมาก ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีคุณภาพและเกษตรกรนำไปใช้ได้อย่างมี ประสิทธิภาพ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ก่อนการนำเข้าประเทศจึงเป็นสิ่งสำคัญ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนา ระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง การเกษตรเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรทั้งการ ขึ้นทะเบียน นำเข้า และส่งออก รวมทั้งควบคุมคุณภาพตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 เพื่อให้ผล การวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำและเป็นที่น่าเชื่อถือ นั้น ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความถูกต้อง ของวิธีวิเคราะห์ หรือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ ที่ใช้อยู่ถูกต้องเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานตรงตามวัตถุประสงค์ ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้กำหนดคุณลักษณะเฉพาะของวิธีในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีคือ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)/ตรวจสอบช่วงของ การวัด (Working range) ความเที่ยง (Precision) ความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) ความถูกต้อง (Accuracy) และความจำเพาะเจาะจง (Specificity) (EURACHEM Guide, 1998; APVMA, 2004; CIPAC, 2003) แล้วนำมาประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ งานได้หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัด แมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช : บuprofezin (buprofezin), pyridaben (pyridaben), beta-cyfluthrin (beta-cyfluthrin) ethiprole (ethiprole) imidacloprid (imidacloprid), acetamiprid (acetamiprid)

ไซเปอร์เมทริน+โพรฟีโนฟอส (cypermethrin+profenofos), ฟีนอบูคาร์บ (fenobucarb), เฟนิโตรไทออน (fenitrothion) และลูเฟนนูรอน+โพรฟีโนฟอส (lufenuron+profenofos) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี เพื่อให้วิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องเหมาะสม สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ และนำไปขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 รวมทั้งเพิ่มสมรรถนะของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector
2. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด UV Detector
3. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
4. คอลัมน์ชนิด ZORBAX SB-Phenyl ขนาดอนุภาค 3.5  $\mu\text{m}$  ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร
5. คอลัมน์ชนิด Luna C18 ขนาดอนุภาค 5  $\mu\text{m}$  ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร
6. คอลัมน์ HPLC ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ภายในบรรจุด้วย Octadecyl silain bonded silica gel ขนาด 5 ไมโครเมตร (Hypersil ODS)
7. คอลัมน์ HPLC ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ภายในบรรจุด้วย Octyl silain bonded silica gel ขนาด 5 ไมโครเมตร (Lichrospher100 RP-8)
8. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
9. Ultrasonic bath
10. ขวดวัดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
11. Auto pipette ขนาด 10-100 ไมโครลิตร, 100-1000 ไมโครลิตรและ 1-10 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
12. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
13. กรวยแก้วก้านยาว
14. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
15. Syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร
16. Syringe filters 0.22 ไมโครเมตร

### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Beta-cyfluthrin 99.0 %
2. สารมาตรฐาน Buprofezin 99.0 %
3. สารมาตรฐาน Pyridaben 100.0 %

4. สารมาตรฐาน Ethiprole 99.0 %
5. สารมาตรฐาน Imidacloprid 99.4 %
6. สารมาตรฐาน Acetamiprid 98.1 %
7. สารมาตรฐาน Cypermethrin 96.5 %
8. สารมาตรฐาน Profenofos 99.0 %
9. สารมาตรฐาน Lufenuron 99.4 %
10. สารมาตรฐาน Fenobucarb 98.6 %
11. สารมาตรฐาน Fenitrothion 98.4 %
12. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Buprofezin 25%WP, Pyridaben 20%WP, Beta-cyfluthrin 2.5% EC, Ethiprole 10% SC, Imidacloprid 35% w/v SC, Acetamiprid 20% w/w SP, Cypermethrin+Profenofos 4% + 40% w/v EC, Fenobucarb 50% w/v EC, Fenitrothion 95% w/w Tech และ Lufenuron + Profenofos 5% + 50% w/v EC
13. Acetone ชนิด AR grade ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Buprofezin, Pyridaben, Beta-cyfluthrin, Cypermethrin+Profenofos และ Fenitrothion
14. Acetonitrile ชนิด HPLC grade ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Ethiprole, Imidacloprid, Acetamiprid และ Lufenuron + Profenofos
15. Methanol ชนิด HPLC grade ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Fenobucarb
16. Water ชนิด HPLC grade
17. Acetic acid 99.8%

## วิธีการ

1. การปรับภาวะเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph ชนิด Flame Ionization Detector (GC-FID) สำหรับสารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, cypermethrin+profenofos และ fenitrothion ดังนี้

คอลัมน์ชนิด	: Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ injector	: 260°C (buprofezin), 270°C (pyridaben), 280°C (beta-cyfluthrin) 250°C (cypermethrin+profenofos), 210°C (fenitrothion)
อุณหภูมิ oven	: 240°C (buprofezin), 260°C (pyridaben), 280°C (beta-cyfluthrin) 240°C (cypermethrin+profenofos), 195°C (fenitrothion)
อุณหภูมิ detector	: 260°C (buprofezin), 270°C (pyridaben), 280°C (beta-cyfluthrin)

	250°C (cypermethrin+profenofos), 250°C (fenitrothion)
Split ratio	: 50 : 1
ปริมาตรการฉีด	: 1.0 ไมโครลิตร
ก๊าซตัวพา	: He อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที (buprofezin, pyridaben cypermethrin+profenofos และ fenitrothion) He อัตราการไหล 2.5 มิลลิลิตรต่อนาที (beta-cyfluthrin)
ก๊าซจุดเปลวไฟ	: H <sub>2</sub> อัตราการไหล 40 มิลลิลิตรต่อนาที (cypermethrin+profenofos) H <sub>2</sub> อัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที (buprofezin, pyridaben Beta-cyfluthrin และ fenitrothion) : Air อัตราการไหล 450 มิลลิลิตรต่อนาที
Make up gas	: N <sub>2</sub> อัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที

ทดสอบความพร้อมของเครื่อง GC ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดติดต่อกัน มีความแตกต่างกันไม่เกิน 2%

## 2. การปรับภาวะเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ชนิด UV Detector สำหรับสารออกฤทธิ์ ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, fenobucarb และ lufenuron + profenofos) ดังนี้

คอลัมน์ชนิด	: ZORBAX SB-Phenyl ขนาดอนุภาค 3.5 µm ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร (ethiprole) : 250 x4.0 มิลลิเมตร id packed with 5 ไมโครเมตร octydecylsilane-bonded silica gel (imidacloprid, acetamiprid, fenobucarb และ lufenuron+profenofos)
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่	: acetonitrile – 0.5% acetic acid (55+45 v/v) (ethiprole) : acetonitrile – water (60+40 v/v) (imidacloprid) : acetonitrile – water (25+75 v/v) (acetamiprid) : acetonitrile – water (70+30 v/v) (fenobucarb) : acetonitrile – water (80+20 v/v) (lufenuron+profenofos)
อุณหภูมิคอลัมน์	: 40°C
ความยาวคลื่น	: 280 นาโนเมตร (ethiprole) : 252 นาโนเมตร (imidacloprid)

	: 246 นาโนเมตร (acetamiprid)
	: 245 นาโนเมตร (fenobucarb)
	: 254 นาโนเมตร (lufenuron+profenofos)
ปริมาตรการฉีด	: 10 ไมโครลิตร (ethiprole)
	: 5 ไมโครลิตร (imidacloprid, acetamiprid, fenobucarb และ lufenuron+profenofos)

ทดสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน ปริมาณ 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดติดต่อกัน มีความแตกต่างกันไม่เกิน 2%

### 3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin+profenofos, fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

#### 3.1 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) /ช่วงของการวัด (Working range)

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

##### 3.1.1 ทาค่า linearity/working range

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ ethiprole) สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ response พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง คำนวณค่า correlation coefficient (r);  $r \geq 0.995$

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

##### 3.1.2 ทาค่า linearity

เตรียมสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ cypermethrin+profenofos) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ imidacloprid และ acetamiprid) เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง

##### 3.1.3 ทาค่า working range

เลือกค่าจาก linearity ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น หลังจากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ cypermethrin+profenofos) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ imidacloprid และ acetamiprid) เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995



ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

### 3.1.4 ทาค่า linearity

เตรียมสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenitrothion) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenobucarb และ lufenuron+profenofos) เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง

### 3.1.5 ทาค่า working range

เลือกค่าจาก linearity ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น หลังจากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน 6 ความเข้มข้น ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenitrothion) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenobucarb และ lufenuron+profenofos) เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงกราฟที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ต้องมีค่ามากกว่า 0.995

## 3.2 ตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

### 3.2.1 Repeatability

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เป็นของแข็งต้องคลุกผสมให้เข้ากัน ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลวต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (สำหรับสารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ ethiprole)

คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \%RSD_{\text{exp.}} / \%RSD_{\text{Horwitz}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ repeatability})$$

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ reproducibility})$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

$$\text{AOAC} \quad \text{ยอมรับ} \quad \text{HORRAT} < 2$$

$$\text{EU, Codex} \quad \text{ยอมรับ} \quad \text{HORRAT} \leq 2$$

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

ซึ่งสารมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น อย่างละ 2 ซ้ำ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร (สำหรับสารออกฤทธิ์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin) และลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตร (สำหรับสารออกฤทธิ์ profenofos) เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ HPLC

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เป็นของแข็งต้องคลุกผสมให้เข้ากัน ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลวต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ความเข้มข้น อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย ประมาณ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (สำหรับสารออกฤทธิ์ cypermethrin+profenofos) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ imidacloprid และ acetamiprid)

คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \%RSD_{\text{exp.}} / \%RSD_{\text{Horwitz}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ repeatability})$$

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ reproducibility})$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

ซั่งสารมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น อย่างละ 2 ซ้ำ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron) และลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตร (สำหรับสารออกฤทธิ์ profenofos) เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ HPLC

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เป็นของแข็งต้อง คลุกผสมให้เข้ากัน ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลวต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซั่งตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ความเข้มข้น อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย ประมาณ 25 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenitrothion) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenobucarb และ lufenuron+profenofos)

คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT} = \%RSD_{\text{exp.}} / \%RSD_{\text{Horwitz}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ repeatability})$$

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ reproducibility})$$

$$C = \text{Concentration ratio}$$

### 3.2.2 Within laboratory reproducibility

ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1 แต่จะวิเคราะห์ต่างวัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

### 3.3 ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1 (ปี 2559) โดยทำการตรวจสอบ Robustness (เปลี่ยน อุณหภูมิ/อัตราการใช้) และตรวจสอบ Ruggedness (เปลี่ยนเครื่อง/คอลัมน์) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1 (ปี 2560) โดยทำการตรวจสอบ Robustness (เปลี่ยน อัตราการใช้/อุณหภูมิ) และตรวจสอบ Ruggedness (เปลี่ยนคอลัมน์/อุณหภูมิ) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.1 (ปี 2561) โดยทำการตรวจสอบ Robustness/Ruggedness (เปลี่ยนอุณหภูมิ/อัตราการใช้/Split ratio/คอลัมน์/solvent/เครื่อง) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

### 3.4 ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

3.4.1 เตรียม Stock standard ซึ่งสารละลายมาตรฐาน buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐาน ethiprole 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสาร มาตรฐานลงใน volumetric flask เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร

3.4.2 เตรียม Stock sample ซึ่งสารละลายตัวอย่าง buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐาน ethiprole 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่ง ตัวอย่างลงในบีกเกอร์ ละลายด้วยตัวทำละลาย เทสารผ่านกรวยกรองสู่ volumetric flask เติมตัวทำละลาย ประมาณ ครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้ เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร

3.4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับ ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวด ปิด

จุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ ethiprole) ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

3.4.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin ปีเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 3.4.2 ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่องโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 3.4.3

3.4.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike ปีเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 3.4.2 ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่องโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 3.4.3

3.4.6 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % recovery โดย beta-cyfluthrin และ ethiprole ต้องอยู่ในช่วง 97-103% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC และ buprofezin และ pyridaben อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC จากสูตร

$$\begin{aligned} \% \text{ Recovery} &= (C_{\text{spike}} - C_{\text{origin}}) \times 100 / C_{\text{add}} \\ C_{\text{spike}} &= \text{ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Spike} \\ C_{\text{origin}} &= \text{ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Origin} \\ C_{\text{add}} &= \text{ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย Spike} \end{aligned}$$

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

3.4.7 เตรียมสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ โดยการชั่งสารมาตรฐาน imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin ให้มีความเข้มข้น 0.08, 0.10 และ 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 2 ซ้ำ ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร และชั่งสารมาตรฐาน profenofos ให้มีความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 2 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปลอ่ยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากันแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ cypermethrin+profenofos) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ imidacloprid และ acetamiprid)

3.4.8 การเตรียม stock sample นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เป็นของแข็ง ต้องคลุกผสมให้เข้ากัน ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลวต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งให้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1.2, 1.5 และ 1.8 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 2 ชุด ชุดละ 20 ขวดแบ่งมาชุดละ 10 ขวดเพื่อปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากันแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ cypermethrin+profenofos) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ imidacloprid และ acetamiprid)

3.4.9 การเตรียม stock standard ซึ่งสารมาตรฐาน imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin ให้ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) และซึ่งสารมาตรฐาน profenofos ให้ความเข้มข้น 20.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน

3.4.10 ปิเปตสารมาตรฐานจาก stock standard ในข้อ 3.4.9 ปริมาตร 1.40, 1.75 และ 2.10 มิลลิลิตร เติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ในข้อ 3.4.8 ที่เหลือชุดละ 10 ขวด ทำการปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.4.11 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % recovery โดย cypermethrin ต้องอยู่ในช่วง 97-103% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC และ imidacloprid, acetamiprid และ profenofos อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC จากสูตร

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

A spike = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย spike

A origin = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย origin

A add = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย spike

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

3.4.12 เตรียมสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ โดยการชั่งสารมาตรฐาน fenobucarb และ profenofos ให้ความเข้มข้น 0.08, 0.10 และ 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) และสารมาตรฐาน lufenuron ให้ความเข้มข้น 0.008, 0.01 และ 0.012 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 2 ซ้ำ ลงในปิเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 150 มิลลิลิตร และซึ่งสารมาตรฐาน fenitrothion ให้ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

(+0.1 มิลลิกรัม) อย่างละ 2 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยตัวทำละลาย ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 15 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากันแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenitrothion) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenobucarb และ lufenuron+profenofos)

3.4.13 การเตรียม stock sample นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่เป็นของเหลวต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายตัวอย่างมา 1.2, 1.5 และ 1.8 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 2 ชุด ชุดละ 20 ขวดแบ่งมาชุดละ 10 ขวดเพื่อปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากันแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenitrothion) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ fenobucarb และ lufenuron+profenofos)

3.4.14 การเตรียม stock standard ซึ่งสารมาตรฐาน lufenuron ให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม), ซึ่งสารมาตรฐาน fenobucarb และ profenofos ให้มีความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) และซึ่งสารมาตรฐาน fenitrothion ให้มีความเข้มข้น 20.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (+0.1 มิลลิกรัม) ใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน

3.4.15 ปิเปตสารมาตรฐานจาก stock standard ในข้อ 3.4.14 ปริมาตร 1.40, 1.75 และ 2.10 มิลลิลิตร เติมลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ในข้อ 3.4.13 ที่เหลือชุดละ 10 ขวด ทำการปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.4.16 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % recovery โดย lufenuron ต้องอยู่ในช่วง 97-103% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC และ fenobucarb, fenitrothion และ profenofos อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC จากสูตร

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

A spike = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย spike

A origin = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย origin

A add = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย spike

### 3.5 ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ฉีด Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC (สำหรับสารออกฤทธิ์ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, cypermethrin+profenofos และ fenitrothion) และ HPLC (สำหรับสารออกฤทธิ์ ethiprole imidacloprid, acetamiprid, fenobucarb และ lufenuron+profenofos) พิจารณาโครมาโทแกรมดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอมรบกวนสารออกฤทธิ์หรือไม่

4. ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช : buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin+profenofos, fenobucarb, Fenitrothion และ Lufenuron +profenofos รายงานความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2558 ถึง เดือนกันยายน 2559  
 สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

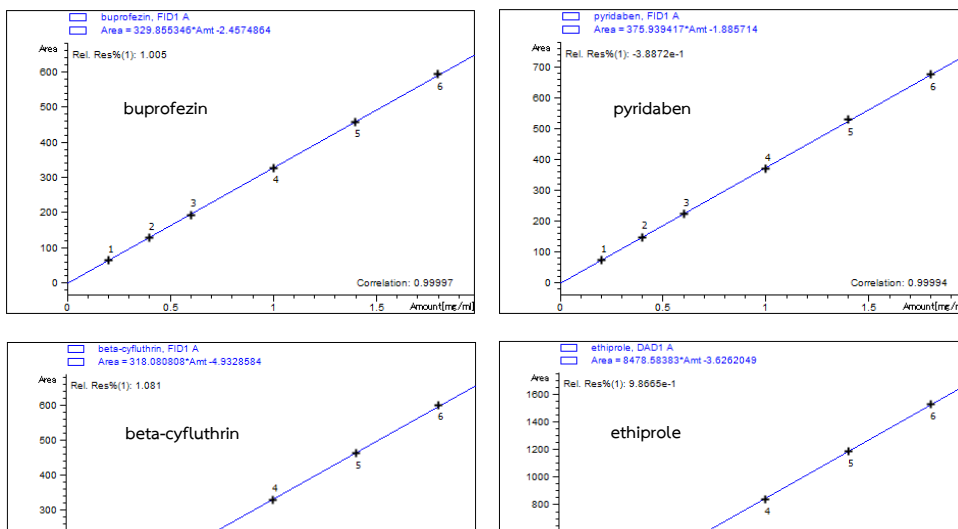
### 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี 2559 : บูโพรเฟซิน (buprofezin), ไพริดาเบน (pyridaben), เบตา-ไซฟลูทริน (beta-cyfluthrin) และอีทิโพรล (ethiprole) ปี 2560 : อิมิดาโคลพริด (imidacloprid), อะซิพริด (acetamiprid) และไซเพอร์เมทริน+โพรฟีโนฟอส (cypermethrin+profenofos) ปี 2561 : ฟีนอบูคาร์บ (fenobucarb), เฟนิโตรไทออน (fenitrothion) และลูเฟนูรอน+โพรฟีโนฟอส (lufenuron+profenofos) โดยหาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ Linearity/Working range, Precision, Robustness/Ruggedness, Accuracy และ Specificity นำมาหาค่าและประเมินการยอมรับดังนี้

#### 1. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) /ช่วงของการวัด (Working range)

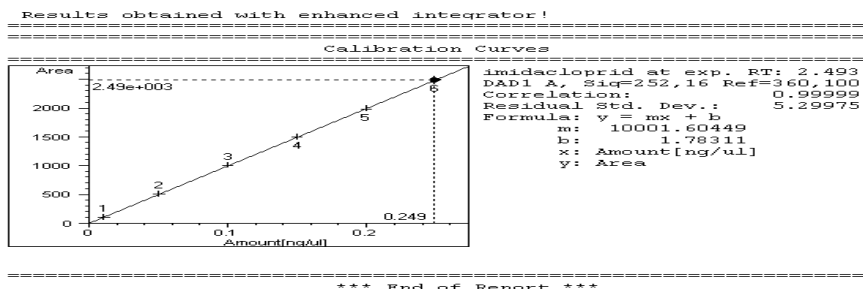
ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

1.1 ผลการศึกษาพบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และช่วงความเข้มข้น 0.02 – 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับ ethiprole ได้ค่า correlation coefficient (r)  $\geq 0.995$  ดังรูปที่ 1 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ  $r \geq 0.995$

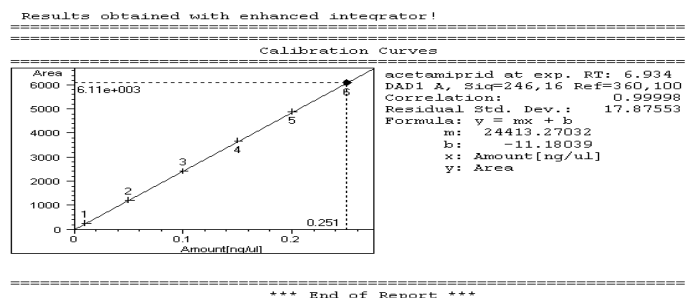




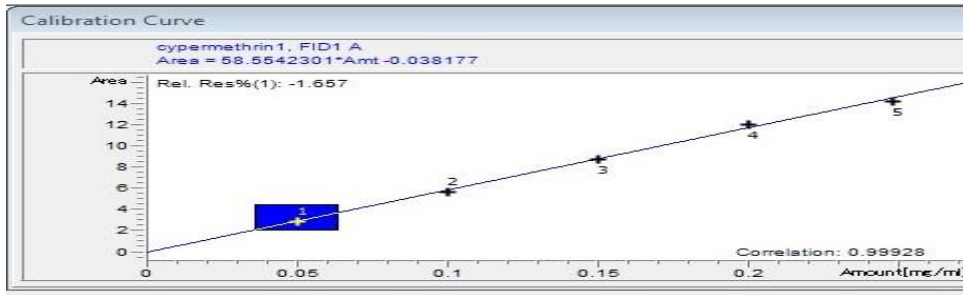
รูปที่ 1 ตรวจสอบ Linearity/Working range ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole  
 ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos  
 1.2 ผลการศึกษาช่วงของการวัด (linearity) ได้ผลการศึกษา ดังนี้



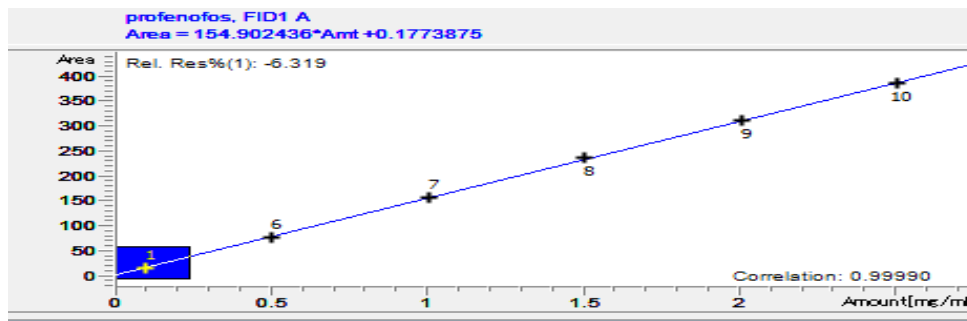
รูปที่ 2 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity imidacloprid  
 อยู่ในช่วง 0.01-0.25 mg/ml



รูปที่ 3 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity acetamiprid  
 อยู่ในช่วง 0.01-0.25 mg/ml



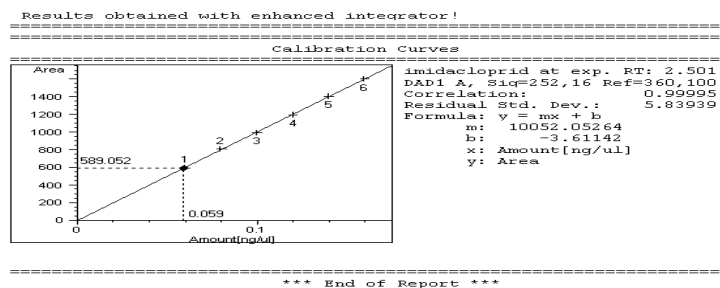
รูปที่ 4 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity cypermethrin อยู่ในช่วง 0.05-0.25 mg/ml



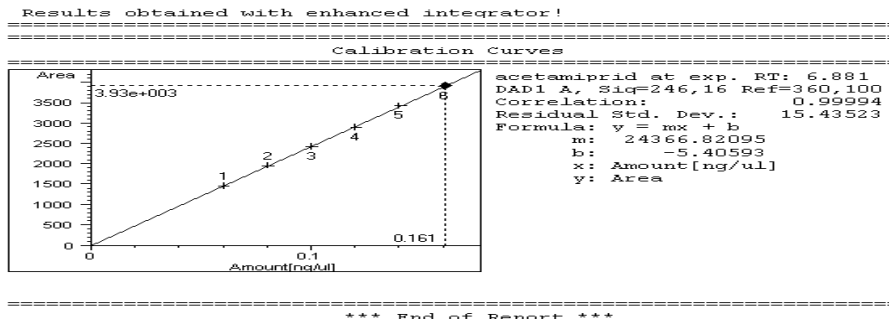
รูปที่ 5 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity profenofos อยู่ในช่วง 0.1-2.5 mg/ml

จากการทดลองหาช่วงของการวัด imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.99999, 0.99998, 0.99928 และ 0.99990 ตามลำดับ

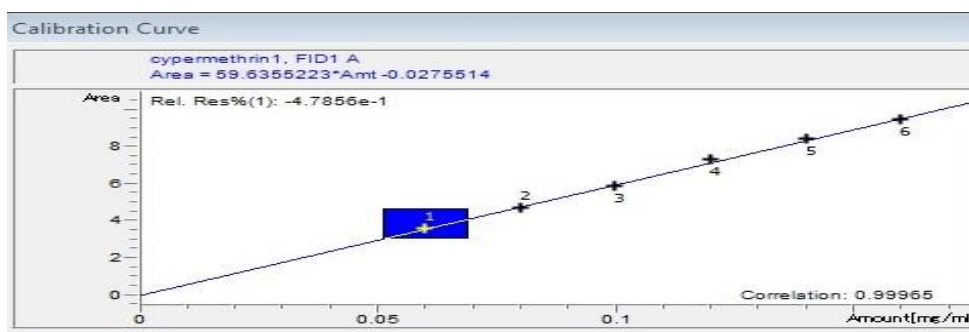
1.3 ผลการศึกษาช่วงของการใช้งาน (working range) ได้ผลการศึกษาดังนี้



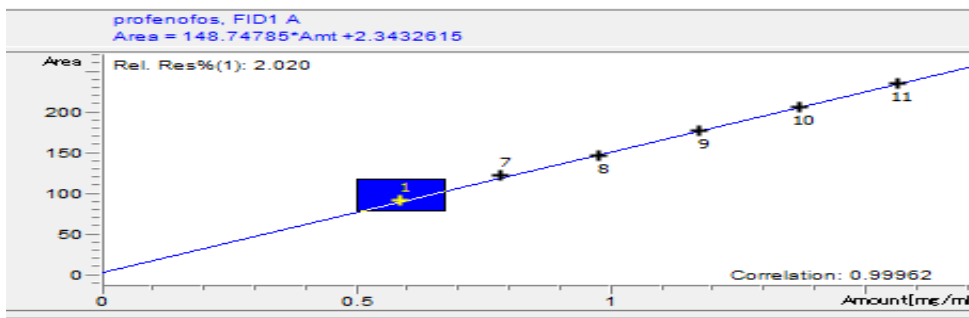
รูปที่ 6 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range imidacloprid อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml



รูปที่ 7 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range acetamidrid อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml



รูปที่ 8 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range cypermethrin อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml

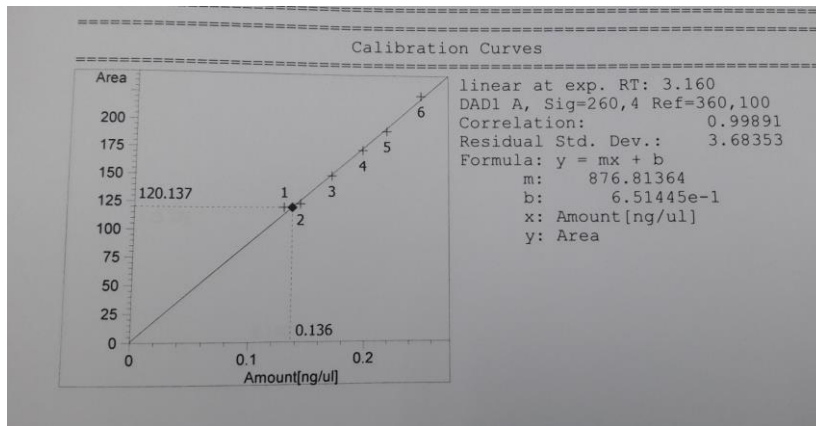


รูปที่ 9 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range profenofos อยู่ในช่วง 0.6-1.6 mg/ml

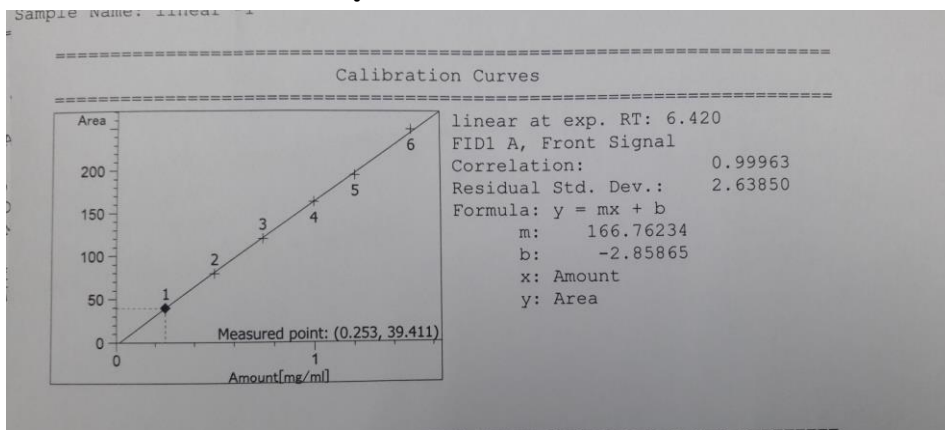
จากการทดลองหาช่วงของการใช้งาน imidacloprid, acetamidrid และ cypermethrin+profenofos ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.99995, 0.99994, 0.99965 และ 0.99962 ตามลำดับ ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq$  0.995 อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ  $r \geq$  0.995

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

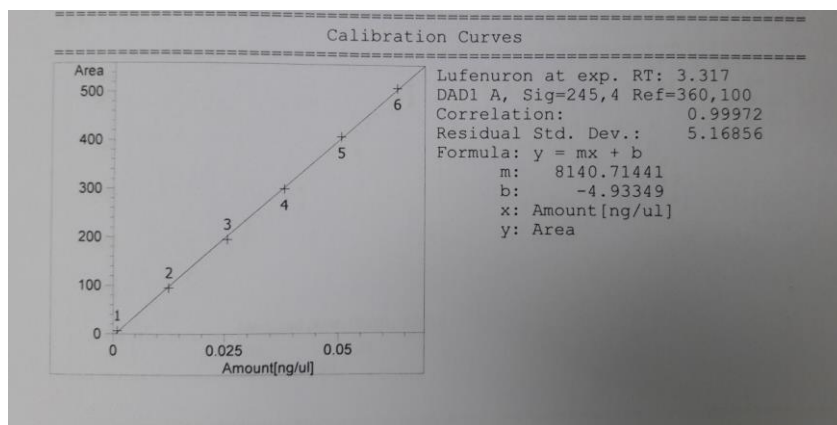
1.4 ผลการศึกษาช่วงของการวัด (linearity) ได้ผลการศึกษาดังนี้



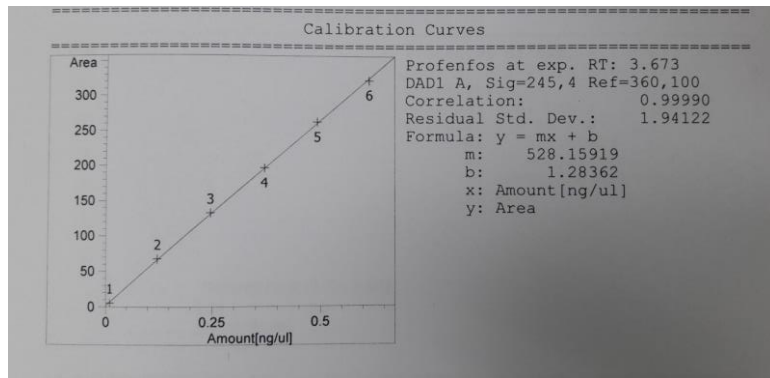
รูปที่ 10 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity fenobucarb อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml



รูปที่ 11 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity fenitrothion อยู่ในช่วง 0.60-1.60 mg/ml



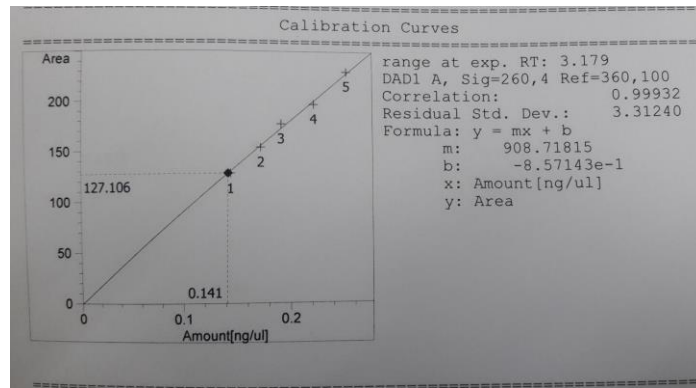
รูปที่ 12 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity lufenuron อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml



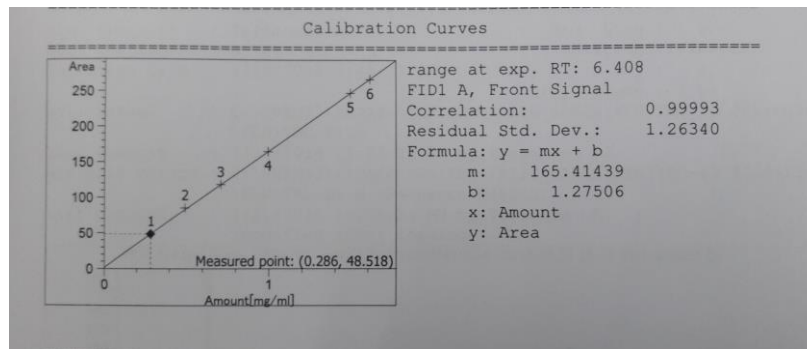
รูปที่ 13 แสดง calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัด linearity profenofos อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml

จากการทดลองหาช่วงของการวัด fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.99891, 0.99963, 0.99972 และ 0.99990 ตามลำดับ

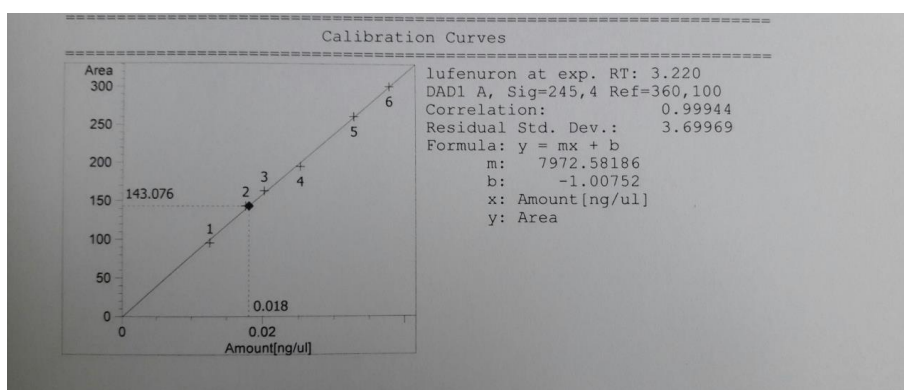
1.5 ผลการศึกษาช่วงของการใช้งาน (working range) ได้ผลการศึกษาดังนี้



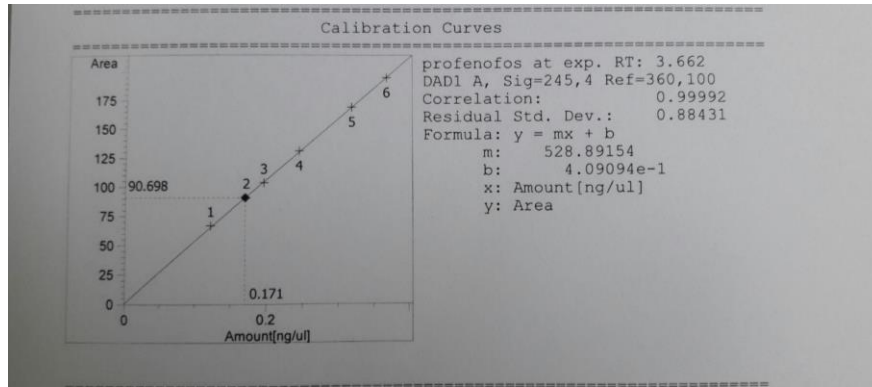
รูปที่ 14 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range fenobucarb อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml



รูปที่ 15 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range fenitrothion อยู่ในช่วง 0.60-1.60 mg/ml



รูปที่ 16 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range lufenuron อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml



รูปที่ 17 แสดง calibration curves ของช่วงของการใช้งาน working range profenofos อยู่ในช่วง 0.06-0.16 mg/ml

จากการทดลองหาช่วงของการใช้งาน fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.99932, 0.99993, 0.99944 และ 0.99992 ตามลำดับ ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$  อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ  $r \geq 0.995$

## 2. ตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

### 2.1 Repeatability

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) สำหรับ Repeatability ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin) และความเข้มข้นที่ระดับ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ ethiprole) ผลการทดสอบพบว่า ได้ค่าเฉลี่ย (mean) ของ buprofezin เท่ากับ 25.38, 25.30, 25.34 %w/w, pyridaben เท่ากับ 20.12, 19.97, 19.98 %w/w, beta-cyfluthrin เท่ากับ 2.50, 2.50, 2.55 %w/v และ ethiprole เท่ากับ 9.97, 9.89, 9.85 %w/v ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) มีค่าน้อยกว่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) ดังนั้นการประเมินด้วย HORRAT ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole มีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (ตารางที่ 1) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับ Within laboratory reproducibility ได้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ Repeatability

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ Precision ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	ความเข้มข้น (mg/ml)	repeatability				within laboratory reproducibility			
		mean	%RSD <sub>exp</sub>	%RSD <sub>Horwitz</sub>	HORRAT	mean	%RSD <sub>exp</sub>	%RSD <sub>Horwitz</sub>	HORRAT
buprofezin	0.5	25.38	1.02	1.63	0.62	25.60	0.66	2.46	0.27
	1.0	25.30	0.84	1.63	0.52	25.37	0.72	2.46	0.29
	1.5	25.34	0.79	1.63	0.49	25.52	0.93	2.46	0.38
pyridaben	0.5	20.12	0.23	1.68	0.14	20.18	0.89	2.55	0.35
	1.0	19.97	0.61	1.68	0.36	20.01	1.92	2.55	0.75
	1.5	19.98	0.90	1.68	0.54	20.29	1.00	2.55	0.39
beta-cyfluthrin	0.5	2.50	0.68	2.30	0.30	2.47	0.56	3.48	0.16
	1.0	2.50	1.80	2.30	0.78	2.51	1.30	3.48	0.37
	1.5	2.55	1.44	2.30	0.63	2.49	0.88	3.48	0.25
ethiprole	0.05	9.97	1.64	1.87	0.88	9.96	0.98	2.83	0.35
	0.10	9.89	0.82	1.87	0.44	9.84	0.46	2.83	0.16
	0.15	9.85	0.65	1.87	0.35	9.82	0.68	2.83	0.24

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

ผลการตรวจสอบ precision ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin + profenofos ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลง สำหรับ Repeatability พบว่า มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยที่ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.10, 0.14 mg/ml ส่วน profenofos ที่ความเข้มข้น 0.6, 1.0, 1.4 เท่ากับ 1.0000, 0.1725, 0.0565 และ 0.9579 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 2.9853, 0.8600, 1.5460, และ 0.8683 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.9230, 0.5137, 0.7215, และ 0.5730 ตามลำดับ ส่วน Within laboratory reproducibility มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.9579, 0.1675, 0.0773 และ 1.0140 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 2.8558, 0.8377, 2.1080 และ 2.5960 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.2190, 0.3288, 0.6493 และ 1.1308 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT มีรายละเอียดดังนี้ AOAC, EU และ Codex ยอมรับค่า HORRAT ต้องไม่เกิน 2 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin +profenofos ให้ผลการทดสอบของค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ Precision ของ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	repeatability			within laboratory reproducibility		
	SD	%RSD	HORRAT	SD	%RSD	HORRAT
imidacloprid (0.06, 0.10, 0.14 mg/mL)	1.0000	2.9853	1.9230	0.9579	2.8558	1.2190
acetamiprid (0.06, 0.10, 0.14 mg/mL)	0.1725	0.8600	0.5137	0.1675	0.8377	0.3288



<b>cypermethrin</b> (0.06, 0.10, 0.14 mg/mL)	0.0565	1.5460	0.7215	0.0773	2.1080	0.6493
<b>profenofos</b> (0.6, 1.0, 1.4 mg/mL)	0.9579	0.8683	0.5730	1.0140	2.5960	1.1308

---

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) สำหรับ Repeatability ความเข้มข้นที่ระดับ 0.125, 0.250 และ 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ fenobucarb, lufenuron และ profenofos) และความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ fenitrothion) จากตารางที่ 3 ผลการทดสอบ พบว่า มีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับ Within laboratory reproducibility ได้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ Repeatability

ตารางที่ 3 การตรวจสอบ Precision ของ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

สารป้องกัน กำจัดศัตรูพืช	ความ เข้มข้น (mg/ml)	Precision	
		Repeatability (HORRAT)	Within laboratory reproducibility (HORRAT)
fenobucarb	0.125	0.77	0.53
	0.250	1.11	0.38
	0.375	0.63	0.45
fenitrothion	0.5	1.84	1.69
	1.0	0.61	0.61
	1.5	0.63	0.66
lufenuron	0.125	0.05	0.73
	0.250	0.70	0.34
	0.375	0.35	0.34
profenofos	0.125	0.75	0.54
	0.250	1.13	0.39
	0.375	0.65	0.47

3. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ buprofezin, pyridaben และ beta-cyfluthrin) และความเข้มข้นที่ระดับ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ ethiprole) ผลการทดสอบพบว่า ได้ค่าเฉลี่ย (mean) ของ buprofezin เท่ากับ 24.83, 24.79, 25.01 %w/w, pyridaben เท่ากับ 20.13, 19.98, 19.84 %w/w, beta-cyfluthrin เท่ากับ 2.54, 2.49, 2.50 %w/v และ ethiprole เท่ากับ 9.98, 9.90, 9.88 %w/v ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD<sub>exp.</sub>) มีค่าน้อยกว่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD<sub>Horwitz</sub>) ดังนั้นการประเมินด้วย HORRAT ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole มีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (ตารางที่ 4) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์

พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole ให้ผลการทดสอบ Robustness อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับ Ruggedness ได้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ Robustness

ตารางที่ 4 การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	ความเข้มข้น (mg/ml)	robustness				ruggedness			
		mean	%RSD <sub>exp</sub>	%RSD <sub>Horwitz</sub>	HORRAT	mean	%RSD <sub>exp</sub>	%RSD <sub>Horwitz</sub>	HORRAT
buprofezin	0.5	24.83	1.20	2.46	0.49	25.31	1.35	2.46	0.55
	1.0	24.79	0.63	2.46	0.26	25.61	0.65	2.46	0.26
	1.5	25.01	0.63	2.46	0.26	25.42	1.03	2.46	0.42
pyridaben	0.5	20.13	0.81	2.55	0.32	20.24	0.42	2.55	0.16
	1.0	19.98	0.67	2.55	0.26	20.00	0.49	2.55	0.19
	1.5	19.84	0.75	2.55	0.29	20.20	0.59	2.55	0.23
beta-cyfluthrin	0.5	2.54	0.82	3.48	0.24	2.50	0.88	3.48	0.25
	1.0	2.49	0.96	3.48	0.27	2.51	1.20	3.48	0.35
	1.5	2.50	1.53	3.48	0.44	2.50	0.99	3.48	0.28
ethiprole	0.05	9.98	1.69	2.83	0.60	10.05	1.68	2.83	0.59
	0.10	9.90	0.90	2.83	0.32	9.98	0.81	2.83	0.29
	0.15	9.88	0.65	2.83	0.23	9.96	0.58	2.83	0.20

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

ผลการตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลง สำหรับ Robustness พบว่า มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยที่ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.10, 0.14 mg/ml ส่วน profenofos ที่ความเข้มข้น 0.6, 1.0, 1.4 เท่ากับ 0.8235, 0.1320, 0.0954 และ 1.0934 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.2436, 0.6621, 2.5919 และ 2.7807 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.5866, 0.3937, 1.2096 และ 1.8352 ตามลำดับ ส่วน Ruggedness มีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 0.8081, 0.1466, 0.0814 และ 0.5303 มีค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 2.4311, 0.7369, 2.1141 และ 1.3097 และคำนวณค่า HORRAT ได้เป็น 1.5657, 0.4382, 0.9866 และ 0.8644 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT มีรายละเอียดดังนี้ AOAC, EU และ Codex ยอมรับค่า HORRAT ต้องไม่เกิน 2 ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos ให้ผลการทดสอบของค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 การตรวจสอบ Precision ของ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	robustness			ruggedness		
	SD	%RSD	HORRAT	SD	%RSD	HORRAT
imidacloprid (0.06, 0.10, 0.14 mg/mL)	0.8235	0.2436	1.5866	0.8081	2.4311	1.5657
acetamiprid	0.1320	0.6621	0.3937	0.1466	0.7369	0.4382

(0.06, 0.10, 0.14 mg/mL)						
cypermethrin	0.0954	2.5919	1.2096	0.0814	2.1141	0.9866
(0.06, 0.10, 0.14 mg/mL)						
profenofos	1.0934	2.7807	1.8352	0.5303	1.3097	0.8644
(0.6, 1.0, 1.4 mg/mL)						

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

ตรวจสอบความเที่ยง Robustness/Ruggedness ความเข้มข้นที่ระดับ 0.125, 0.250 และ 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ fenobucarb, lufenuron และ profenofos) และความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สำหรับ fenitrothion) จากตารางที่ 6 ผลการทดสอบ พบว่า มีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 การตรวจสอบ Precision ของ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

สารป้องกัน กำจัดศัตรูพืช	ความ เข้มข้น (mg/ml)	Robustness/Ruggedness			
		HORRAT	HORRAT	HORRAT	HORRAT
		(1)	(2)	(3)	(4)
fenobucarb	0.125	0.81	1.64	1.91	1.02
	0.250	0.71	1.44	1.43	1.63
	0.375	0.36	1.93	0.85	1.40
fenitrothion	0.5	0.75	1.01	1.40	1.92
	1.0	0.50	0.99	1.85	0.57
	1.5	0.72	1.47	1.48	0.63
lufenuron	0.125	0.75	1.01	1.40	1.15
	0.250	0.50	0.99	1.85	0.98
	0.375	0.89	0.79	1.10	1.32
profenofos	0.125	0.81	1.65	1.90	1.06
	0.250	0.72	1.47	1.48	1.65
	0.375	1.34	1.94	0.86	1.41

4. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า %recovery ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างมี 3 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ จากตารางที่ 7 พบว่า %recovery ของ buprofezin และ pyridaben อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า

10% ของ AOAC และ %recovery ของ beta-cyfluthrin และ ethiprole อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 97-103% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC (AOAC, 1993)

ตารางที่ 7 การตรวจสอบ Accuracy ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole

Pesticide	AI content (mg/25 ml)	%Recovery
buprofezin	10.0	99.5
	15.0	100.9
	20.0	100.8
pyridaben	10.0	100.5
	15.0	99.9
	20.0	100.7
beta- cyfluthrin	10.0	102.4
	15.0	102.2
	20.0	102.4
ethiprole	1.00	100.5
	1.50	100.0
	2.00	100.5

ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

ผลการตรวจสอบ accuracy จากตารางที่ 8 พบว่า %recovery ของการตรวจหาปริมาณสารออกฤทธิ์ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos ในผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงโดยที่ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin ที่ความเข้มข้น 0.08, 0.10, และ 0.12 mg/ml ที่ความเข้มข้น 0.08 mg/ml มีค่า %recovery 101.1, 98.1 และ 100.5 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/ml มีค่า %recovery 100.2, 100.6 และ 100.7 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 0.12 mg/ml มีค่า %recovery 100.3, 100.7 และ 98.5 ตามลำดับ ส่วน profenofos ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0, และ 1.2 mg/ml มีค่า %recovery 99.1, 100.7 และ 98.3 ตามลำดับ cypermethrin ช่วงการ

ยอมรับ 97-103% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC imidacloprid, acetamiprid และ profenofos ช่วงการยอมรับ 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC

**ตารางที่ 8** การตรวจสอบ Accuracy ของ imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos

Pesticide	AI content (mg/50 ml)	%Recovery
imidacloprid	0.08 mg/mL	101.1
	0.10 mg/mL	100.2
	0.12 mg/mL	100.3
acetamiprid	0.08 mg/mL	98.1
	0.10 mg/mL	100.6
	0.12 mg/mL	100.7
cypermethrin	0.08 mg/mL	100.5
	0.10 mg/mL	100.7
	0.12 mg/mL	98.5
profenofos	0.8 mg/mL	99.1
	1.0 mg/mL	100.7
	1.2 mg/mL	98.3

ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า %recovery จากตารางที่ 9 พบว่า %recovery ของ fenobucarb, fenitrothion และ profenofos อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และ %recovery ของ lufenuron อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 97-103% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 1% ของ AOAC

**ตารางที่ 9** การตรวจสอบ Accuracy ของ fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

Pesticide	AI content (mg/50 ml)	%Recovery
fenobucarb	0.08 mg/mL	98.2
	0.10 mg/mL	100.0
	0.12 mg/mL	98.8
fenitrothion	0.8 mg/mL	101.2
	1.0 mg/mL	99.8
	1.2 mg/mL	99.2
lufenuron	0.008 mg/mL	100.0
	0.010 mg/mL	100.0
	0.012 mg/mL	102.4

profenofos	0.08 mg/mL	101.7
	0.10 mg/mL	101.7
	0.12 mg/mL	102.0

---

#### 5. ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

จากการฉีด Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos และ ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos พบว่า โครมาโทแกรมของ Blank สารมาตรฐานและสารตัวอย่าง ไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin, ethiprole, imidacloprid, acetamiprid, cypermethrin+profenofos, fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos

#### 6. ประเมินค่าความไม่แน่นอน

ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ตัวอย่าง ปี 2559 buprofezin, pyridaben, beta-cyfluthrin และ ethiprole ปี 2560 imidacloprid, acetamiprid และ cypermethrin+profenofos และ ปี 2561 fenobucarb, fenitrothion และ lufenuron+profenofos พบว่าประเมินค่าความไม่แน่นอนเป็น 0.2, 1.2, 0.04, 0.13, 0.34, 0.21, 0.04, 0.40, 0.94, 1.18, 0.09 และ 1.17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ



## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (2559-2561) บูโพรเฟซิน (buprofezin), ไพริดาเบน (pyridaben), เบตา-ไซฟลูทริน (beta-cyfluthrin) อีทีโพรล (ethiprole) อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) อะซิแทมิปริด (acetamiprid) ไซเปอร์เมทริน+โพรฟีโนฟอส (cypermethrin+profenofos) ฟีนอบูคาร์บ (fenobucarb) เฟนิโตรไทออน (fenitrothion) และลูเฟนนูรอน+โพรฟีโนฟอส (lufenuron+profenifos) โดยพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)/ช่วงของการวัด (Working range) ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility รวมทั้งตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไปขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ได้

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการในการให้บริการตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และใช้ในการขอรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 รวมถึงเผยแพร่ให้กับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาคต่อไป

## 11. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2554-2560. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าวัตถุ

อันตรายทางการเกษตร. สืบค้นจาก: <http://oldweb.oae.go.th/economicdata/pesticides.html>

[ธันวาคม 2561].

AOAC Peer Verified Methods Program. 1993. Manual on Policies and Procedures. Arlington, Virginia.

APVMA. 2004. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Kingston. Australia.

- Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited. 2003. Guidelines on method /validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. from <http://www.cipac.org/index.php/guidelines>
- EURACHEM Guide. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Method: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM Working Group. United Kingdom.
- AOAC Official Methods of analysis. 2005. Pesticide Formulations: Imidacloprid in Liquid and Solid Formulations. Method 997.12. In AOAC
- AOAC Official Methods of analysis. 2005. Pesticide Formulations: Cypermethrin in Pesticide Formulations. Method 985.03. In AOAC
- Dobrat, W. and A. Martijn, editors. 1998. Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Black Bear Press Ltd. CIPAC Handbook-Vol. H. England. pp. 185-193.
- Dobrat, W. and A. Martijn, editors. 2003. Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Black Bear Press Ltd. CIPAC Handbook-Vol. K. England. pp. 5-15.
- Dobrat, W. and A. Martijn, editors. 2006. Analysis of Technical and Formulated Pesticides Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited. Black Bear Press Ltd. CIPAC Handbook-Vol. L. England. pp. 185-193.