

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรม : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร (ปีเริ่มต้น 2559-สิ้นสุด 2561)

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืช ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ;
ไดยูรอน และ ไซฮาโลฟอป-บิวทิว (2559)
ออกซาไดอะซอน และ เมทริบูซิน (2560)
บิสไพริแบก-โซเดียม และ พาราควอตไดคลอไรด์ (2561)
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Method Validation for Determination the Active Ingredients in Herbicide Products ;
diuron and cyhalofop-butyl (2016)
oxadiazon and metribuzin (2017)
bispiribac-sodium and paraquat dichloride (2018)

4. คณะผู้ดำเนินงาน
ผู้รวบรวมการทดลองสิ้นสุดงานวิจัย (2559-2561) : นางสาวสุกัญญา คำคง
หัวหน้าการทดลอง ปี2559 : นางสาวสุกัญญา คำคง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
ผู้ร่วมงาน : นางพินิตนันต์ สรวายเอี่ยม กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
นางสาวดวงรัตน์ วัลลาสินี กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
นางจิราพรรณ ทองหยอด กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

		นายฉลองรัตน์ หมื่นขวา	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
หัวหน้าการทดลอง ปี2560	:	นางสาวดวงรัตน์ วิลาสินี	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
ผู้ร่วมงาน	:	นางพินิตนันต์ สรวยเอี่ยม	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นางจิราพรรณ ทองหยอด	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นายอิสริยะ สืบพันธุ์ดี	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นายอนุชา ผลไสว	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
หัวหน้าการทดลอง ปี2561	:	นายอนุชา ผลไสว	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
ผู้ร่วมงาน	:	นางพินิตนันต์ สรวยเอี่ยม	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นางสาวพนิดา มงคลวุฒิกุล	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นางสาวดวงรัตน์ วิลาสินี	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นายฉลองรัตน์ หมื่นขวา	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.
		นางสาวสุกัญญา คำคง	กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กปผ.

5. บทคัดย่อ

จากการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ ไดยูรอน (diuron), ไซฮาโลฟอป-บิวทิว (cyhalofop-butyl) ออกซาไดอะซอน (oxadiazon), เมทริบูซิน (metribuzin), บิสไพริแบค-โซเดียม (bispiribac-sodium) และ พาราควอตไดคลอไรด์ (paraquat dichloride) มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ที่พัฒนาวิธีขึ้นมาใหม่หรือดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน ให้เหมาะสมกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเทคนิค Gas-Liquid Chromatography (GLC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า ช่วงของการวัด (Working range) และ ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) มากกว่า 0.995 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥ 0.995 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.110 - 1.227 และ 0.230 - 1.341 ตามลำดับ ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ของสารออกฤทธิ์ทั้ง 6 ชนิด ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.07 - 0.969 ค่า ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 98.53% – 101.26% ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และประมาณค่าความไม่แน่นอนของ diuron, cyhalofop-butyl, oxadiazon, metribuzin, bispyribac-sodium และ paraquat dichloride เท่ากับ $\pm 0.806\%$, $\pm 0.961\%$, $\pm 0.54\%$, $\pm 0.70\%$, $\pm 0.14\%$ และ $\pm 0.78\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดวัชพืชได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

Method validation study of active ingredients in herbicide of pesticide formulation products such as, diuron, cyhalofop-butyl, oxadiazon, metribuzin, bispyribac-sodium and paraquat dichloride. The objectives of this study were validated of method to appropriate with the instrument in laboratory which was developed and adapted from standard method by High Performance Liquid Chromatography technique and Gas-Liquid Chromatography technique with flame ionization detector within the appropriate condition. The results were found that the working concentration range and linearity range were 0.01 - 2.0 mg/ml with the correlation coefficient (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 of the analytical substances were in the range of 0.110 – 1.227 and 0.230 – 1.341, respectively. The HORRAT values tested with robustness and ruggedness of the 6 active ingredients were in the range of 0.07 – 0.969 which were followed by the AOAC, EU and Codex due to their less than 2. The accuracy of this method was assessed by recovery studied. The percent recoveries of the analytical substances were in the range of 98.53% – 101.26% considered an acceptance by the AOAC (98-102%) for analytical concentrations more than 10%. This specific method did not have interference from other substances. The measured uncertainty of diuron, cyhalofop-butyl, oxadiazon, metribuzin, bispyribac-sodium and paraquat dichloride were $\pm 0.806\%$, $\pm 0.961\%$, $\pm 0.54\%$, $\pm 0.70\%$, $\pm 0.14\%$ and $\pm 0.78\%$ respectively at 95% confidence level. As a result, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. Therefore, the method development could be used to determine the active ingredients in herbicide of pesticide formulation products with accuracy and precision.

6. คำนำ

สารกำจัดวัชพืช เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ต้องควบคุมตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และมีปริมาณการนำเข้ามากที่สุด จากรายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี พ.ศ. 2558 พบว่า สารกำจัดวัชพืช มีปริมาณการนำเข้า 119,971,878.64 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 11,016,713,009.25 บาท และมีสถิติการนำเข้าเพิ่มขึ้นทุกปี (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2558) กรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานหลักในด้านการกำกับดูแลการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยกลุ่มวิจัย วัตถุพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ทำหน้าที่ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรเพื่อการขึ้นทะเบียนและภายหลังการขึ้นทะเบียนตามกฎหมาย ให้มีคุณภาพตรงตามที่ กำหนดไว้บนฉลาก เพื่อได้ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีคุณภาพ และเกษตรกรนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น งานวิจัยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืช ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ ไดยูรอน (diuron), ไซฮาโลฟอป-บิวทิว (cyhalofop-butyl) ออกซาไดอะซอน (oxadiazon), เมทริบูซิน (metribuzin), บิสไพริแบค-โซเดียม (bispiribac-sodium) และ พาราควอตไดคลอไรด์ (paraquat dichloride) มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ที่พัฒนา วิธีขึ้นมาใหม่หรือดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานให้เหมาะสมกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ โดยดำเนินการทดสอบ หาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) ได้แก่ ทดสอบช่วงของการวัด (Working Range) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) การตรวจ ความเที่ยง (Precision) ความคงทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) และความจำเพาะเจาะจง (Specificity) (Ludwig, 1998) รวมถึงการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Measurement Uncertainty) เป็นการ พัฒนาวิธีการ และเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ ให้เหมาะสมกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ สามารถทำให้ผลการ ทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) มีตัวตรวจวัดชนิด DAD หรือ UV
2. เครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) มีตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
3. คอลัมน์ชนิด LiChrospher 100 (RP-18) ขนาด 5 μm ความยาว 250 mm เส้นผ่านศูนย์กลาง (i.d.) 4.6 mm
4. คอลัมน์ชนิด reverse phase ใช้ C8 ขนาด 5 μm ความยาว 150 mm เส้นผ่านศูนย์กลาง (i.d.) 4.6 mm

5. คอลัมน์ชนิด reverse phase ใช้ C8 ขนาด 2.7 μm ความยาว 30 mm เส้นผ่านศูนย์กลาง (i.d.)

4.6 mm

6. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (DB-5) ความยาว 30 m
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 mm ความหนาของฟิล์ม 0.25 μm

7. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 mg) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว

8. เครื่องอัลตราโซนิค (Ultrasonic bath)

9. ชุดกรองสารแบบปั๊มสุญญากาศ (vacuum suction pump)

10. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

11. ขวดวัดปริมาตร ชนิด Class A ขนาด 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500 และ 1000 ml

ที่ผ่านการสอบเทียบ

12. ปิเปตชนิด Class A ขนาด 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10 และ 15 ml ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว

13. Auto pipette type A ขนาด 0.0-100.0, 100-1,000 ไมโครลิตร และ 1.00-10.00 ml

ที่ผ่านการสอบเทียบ

14. ปีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 ml

15. กระดาษกรอง ขนาด 0.22 μm (Filter membrane)

16. ขวด Vial ขนาด 2 ml

17. กรวยกรอง

- สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Bispyribac-sodium 96.33 %, uncertainty = $\pm 0.71\%$

2. สารมาตรฐาน Paraquat dichloride 98.5 %, uncertainty = $\pm 2\%$

3. สารมาตรฐาน diuron 98.0%

4. สารมาตรฐาน cyhalofop-butyl 99.0%

5. สารมาตรฐาน oxadiazon 98.0 %

6. สารมาตรฐาน metribuzin 99.5 %

7. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ metribuzin 70 %WP

8. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ oxadiazon 25% W/V EC

9. ผลิตภัณฑ์ Bispyribac-sodium 10 %W/V SC

10. ผลิตภัณฑ์ Paraquat dichloride 27 %W/V SL

11. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช diuron 80 % WP

12. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช cyhalofop-butyl 10 % W/V EC

13. 1-Octane sulfonic acid sodium salt, HPLC grade

14. 1-Heptane sulfonic acid sodium salt monohydrate, HPLC grade
15. 4,4'-Bipyridyl 99.0%
16. Triethylamine
17. Phosphoric acid 85%, AR grade
18. Acetonitrile, HPLC grade
19. Methanol, HPLC grade
20. Acetone, AR grade
21. Deionized water

- วิธีการ

1. ศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ diuron และ cyhalofop-butyl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (2559)

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง HPLC (DAD/UV) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ diuron

Column : LiChrospher 100 (RP-18) ขนาด 5 μ m ยาว 250 X 4.6 mm (id)

Mobile phase : Water : Methanol (65:35)

Flow rate : 1.2 ml/min

Column temperature : 40 °C

Injection volume : 10 μ l

Run time : 8.0 min

1.2 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง GC-FID สำหรับการตรวจวิเคราะห์ cyhalofop-butyl

Column : DB-5 (30 m x 0.32 mm (id), 0.25 μ m)

Oven temperature : 270 °C

Injector temperature : 280 °C

Detector temperature : 280 °C

Split ratio : 50:1

Injection volume : 1.0 μ l

Carrier gas : Helium 2.0 ml/min

Run time : 4.0 min

1.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ diuron และ cyhalofop-butyl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช

1.3.1 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Working Range)

1.3.1.1 ซั่งสารมาตรฐาน diuron 98.0% ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.03 – 0.15 mg/ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml เติมเมทานอลประมาณครึ่งขวด นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แบ่งใส่ใน vial ขนาด 2 ml นำสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง และคำนวณค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.995

1.3.1.2 ซั่งสารมาตรฐาน cyhalofop-butyl 99.0% ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.10 – 1.00 mg/ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 ml เติมอะซิโตนประมาณครึ่งขวด นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยอะซิโตน แบ่งใส่ใน vial ขนาด 2 ml นำสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง และคำนวณค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.995

1.3.2 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

1.3.2.1 เลือกความเข้มข้นสารมาตรฐาน diuron 98.0% ในช่วงที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้นจากข้อ 1.3.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง จากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.1 เพื่อสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง และคำนวณค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.995

1.3.2.2 เลือกความเข้มข้นสารมาตรฐาน cyhalofop-butyl 99.0% ในช่วงที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้นจากข้อ 1.3.1.2 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง จากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2 เพื่อสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง และคำนวณค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.995

1.3.3 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

1.3.3.1 การเตรียม Stock ของสารละลายมาตรฐาน (Stock Standard) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน diuron 98.0% ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/ml และสารละลายมาตรฐาน cyhalofop-butyl 99.0% ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/ml

(1) ซั่งสารมาตรฐาน diuron 98.0% ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 510 mg ลงในปิ๊กเกอร์ ขนาด 100 ml นำไปละลายด้วยเมทานอล เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 500 ml กลั้วด้วยสารเมทานอลหลายๆ ครั้ง นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

(2) ซั่งสารมาตรฐาน cyhalofop-butyl 99.0% ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 505 mg ลงในปิ๊กเกอร์ ขนาด 100 ml นำไปละลายด้วยอะซิโตน เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 ml กลั้วด้วยอะซิโตนหลายๆ ครั้ง นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตน

1.3.4 การเตรียม Stock ของผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (Stock Sample) โดยเตรียมสารละลายตัวอย่าง diuron 80% WP ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/ml และสารละลายตัวอย่าง cyhalofop-butyl 10% W/V EC ที่ความเข้มข้น 1.00 mg/ml

1.3.4.1 ชั่งสาร diuron ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 1,250 mg ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 ml จากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียม Stock Standard เช่นเดียวกับข้อ 1.3.3.1(1) โดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 ml

1.3.4.2 ชั่งสาร cyhalofop-butyl ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 5,000 mg ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียม Stock Standard เช่นเดียวกับข้อ 1.3.3.1(2) โดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 500 ml

1.3.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard calibration curve)

1.3.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน diuron 98.0% ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml เติมเมทานอลประมาณครึ่งขวด นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แบ่งใส่ใน vial ขนาด 2 ml นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC เรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

1.3.5.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน cyhalofop-butyl 99.0% ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml เติมอะซิโตนประมาณครึ่งขวด นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตน แบ่งใส่ใน vial ขนาด 2 ml นำสารละลายเข้าเครื่อง GC เรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

1.3.6 การเตรียมสารละลาย Original sample

1.3.6.1 ปีเปตสารละลาย Stock sample จากข้อ 1.3.4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC (ได้ค่า O) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 1.3.5.1

1.3.6.2 ปีเปตสารละลาย Stock sample จากข้อ 1.3.4.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตน เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายเข้าเครื่อง GC (ได้ค่า O) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ข้อ 1.3.5.2

1.3.7 การเตรียมสารละลาย Fortified sample

1.3.7.1 ปีเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 1.3.4.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 ml จำนวน 3 ชุดๆ ละ 10 ซ้ำ จากนั้นปีเปตสารละลาย stock standard จากข้อ 1.3.3.1(1) ปริมาตร 5, 10 และ 15 ml ตามลำดับ อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm แบ่งใส่ vial ขนาด 2 ml นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC (ได้ค่า F) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ข้อ 1.3.5.1

1.3.7.2 ปีเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 1.3.4.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 ml จำนวน 3 ชุดๆ ละ 10 ซ้ำ จากนั้นปีเปตสารละลาย stock standard จากข้อ 1.3.3.1(2) ปริมาตร

1, 2.5 และ 4 ml ตามลำดับ อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาณด้วยอะซิโตน เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ vial ขนาด 2 ml นำสารละลายเข้าเครื่อง GC (ได้ค่า F) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ข้อ 1.3.5.2

1.3.8 การประเมินค่า Accuracy จาก %Recovery

$$\%Recovery = (F - O) \times 100 / C$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสารในสารละลาย fortified sample, mg/ml

O คือ ปริมาณสารในสารละลาย original sample, mg/ml

C คือ ปริมาณ add sample, mg

1.3.9 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

การตรวจสอบความเที่ยง แบบ Repeatability เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในวันเวลาเดียวกัน และแบบ Within laboratory reproducibility เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในวันเวลาต่างกัน โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.3.9.1 ซังสาร diuron 80% WP ที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ครอบคลุมช่วงการใช้งาน ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml เติมสารเมทานอลปริมาณครึ่งขวด เขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาณด้วยสารเมทานอล และกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 μ m นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation,SD) และประเมินด้วย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC

1.3.9.2 ซังสาร cyhalofop-butyl 10% W/V EC ที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ครอบคลุมช่วงการใช้งาน ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 ml เติมอะซิโตนปริมาณครึ่งขวด เขย่าด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาณด้วยอะซิโตน นำสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation,SD) และประเมินด้วย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC

1.3.9.3 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

HORRAT (Horwitz's ratio) = %RSD ที่ได้จากการวิเคราะห์/Predicted Horwitz RSD
จากทฤษฎี

$$\text{เมื่อ } \%RSD \text{ (relative standard deviation)} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของสารตัวอย่าง

1.3.10 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness

1.3.10.1 วิเคราะห์ตัวอย่าง diuron 80% WP เช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.1 โดยทำการเปลี่ยนเครื่อง HPLC (ตรวจสอบ Robustness) และเปลี่ยนอัตราการไหล (Flow rate) ในการทดสอบ (ตรวจสอบ Ruggedness) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และประเมินด้วย HORRAT

1.3.10.2 วิเคราะห์ตัวอย่าง cyhalofop-butyl 10% W/V EC เช่นเดียวกันกับข้อ 2.4.2 โดยทำการเปลี่ยนเครื่อง GC (ตรวจสอบ Robustness) และเปลี่ยนอัตราการไหล (Flow rate) ในการทดสอบ

(ตรวจสอบ Ruggedness) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และประเมินด้วย HORRAT

1.3.11 การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง (Specificity)

นำสารละลาย blank (เมทานอลและอะซิโตน) สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC สำหรับ diuron และ GC สำหรับ cyhalofop-butyl พิจารณาโครมาโทแกรมว่ามีการรบกวนจากสารอื่นหรือไม่

1.3.12. การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ diuron และ cyhalofop-butyl ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (Measurement Uncertainty) หาค่าความไม่แน่นอนขององค์ประกอบที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนสุ่ม Type A และความไม่แน่นอนระบบ Type B

2. ศึกษาวิธีการและสถานะที่เหมาะสมในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ oxadiazon และ metribuzin ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (2560)

2.1 การปรับภาวะเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph ชนิด Flame Ionization Detector (GC-FID) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ oxadiazon

คอลัมน์ชนิด : Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

อุณหภูมิ injector : 260 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ oven : 230 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ detector : 260 องศาเซลเซียส

Split ratio : 50 : 1

Injection volume : 1.0 ไมโครลิตร

ก๊าซตัวพา : He อัตราการไหล 2 มิลลิิตรต่อนาที

ก๊าซจุดเปลวไฟ : H₂ อัตราการไหล 40 มิลลิิตรต่อนาที

: Air อัตราการไหล 450 มิลลิิตรต่อนาที

Make up gas : N₂ อัตราการไหล 40 มิลลิิตรต่อนาที

2.2 สถานะสำหรับวิเคราะห์สาร metribuzin

คอลัมน์ชนิด : Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร

อุณหภูมิ injector : 250 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ oven	:	230 องศาเซลเซียส		
อุณหภูมิ detector	:	250 องศาเซลเซียส		
Split ratio	:	50 : 1		
Injection volume	:	1.0 ไมโครลิตร		
ก๊าซตัวพา	:	He อัตราการไหล 2	มิลลิลิตรต่อนาที	
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H ₂ อัตราการไหล 40	มิลลิลิตรต่อนาที	
	:	Air อัตราการไหล 450	มิลลิลิตรต่อนาที	
Make up gas	:	N ₂ อัตราการไหล 40	มิลลิลิตรต่อนาที	

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

2.3 ตรวจสอบช่วงของการวัด(Working range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน oxadiazon และ metribuzin 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้ งาน ได้แก่ 0.2, 0.5, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาณครึ่งขวด เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง เติม Acetone จนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะตั้งข้อ 1 แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร มาตรฐาน oxadiazon และ metribuzin (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณ ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2.4 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน oxadiazon และ metribuzin 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้ งาน ได้แก่ 0.2, 0.5, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตรแล้ว เติม Acetone ปริมาณครึ่งขวด เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่ อุณหภูมิห้อง เติม Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะตั้งข้อ 1 สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน oxadiazon และ metribuzin (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2.5 ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

2.5.1 ตรวจสอบความแม่นยำ Repeatability

ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

2.5.1.1 ซังผลิตภัณฑ์ oxadiazon ที่เขย่าให้เข้ากันแล้ว 3 ระดับความเข้มข้นครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะดังข้อ 1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ oxadiazon โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

2.5.1.2 ซังผลิตภัณฑ์ metribuzin ที่เขย่าให้เข้ากันแล้ว 3 ระดับความเข้มข้นครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะดังข้อ 1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ metribuzin โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

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

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

$$\text{คำนวณ Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{Mill, J.N. and Mill, J.C.,2005})$$

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ ≤ 2 (ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549)

2.6 ตรวจสอบความแม่นยำ Within laboratory reproducibility

ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน

2.6.1 ซังผลิตภัณฑ์ oxadiazon ที่เขย่าให้เข้ากันแล้ว ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้ งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะดังข้อ

2.1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

2.6.2 ซังผลิตภัณฑ์ metribuzin ที่เขย่าให้เข้ากันแล้ว ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้ งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะดังข้อ

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{คำนวณ \% RSD ตามสูตร } \% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100$$

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD = $2^{(1-0.5 \log C)}$ (Mill, J.N. and Mill, J.C.,2005)

เมื่อค่า C = Concentration ratio

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับ ≤ 2 (ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549)

2.7 ตรวจสอบความแม่นยำ Robustness/Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่าง oxadiazon และ metribuzin เช่นเดียวกันกับข้อ 4.1 โดยทำการเปลี่ยนอุณหภูมิในการทดสอบ (ตรวจสอบ Robustness) และเปลี่ยนเครื่อง GC-FID (ตรวจสอบ Ruggedness) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT

2.8 ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

2.8.1 เตรียม Stock standard

เตรียมสารละลายมาตรฐาน oxadiazon และ metribuzin 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มีความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม) ลงใน volumetric flask 500 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

2.8.2 เตรียม Stock sample

เตรียมสารละลายตัวอย่าง oxadiazon และ metribuzin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 1000 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

2.8.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

2.8.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 5.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ข้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 2.8.3 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

2.8.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 5.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard ปริมาตร 2.5, 5.0 และ 7.5 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 2.8.3

2.8.6 ประเมินค่า Accuracy จากค่า % recovery ดังนี้

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

C_{spike} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Spike

C_{origin} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Origin

C_{add} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย Spike

2.9 การหา Specificity / selectivity

ทดลองโดยฉีดสารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างของ oxadiazon และ metribuzin เข้าเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะดังข้อ 2.1 และ 2.2 เพื่อดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอม มารบกวนสารออกฤทธิ์ oxadiazon และ metribuzin หรือไม่

2.10 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช oxadiazon และ metribuzin ประเมินที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ทิพวรรณ, 2549)

3. ศึกษาวิธีการและสถานะที่เหมาะสมในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ bispyribac-sodium และ paraquat dichloride ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (2561)

3.1 ศึกษาและปรับตั้งภาวะในการวิเคราะห์ bispyribac-sodium แล้วได้ภาวะที่เหมาะสม รายละเอียดดังนี้ ใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์คือ HPLC คอลัมน์ชนิด reverse phase ใช้ C8 ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ใช้กรดฟอสฟอริก 0.1% ผสม Acetonitrile ในอัตราส่วน 50 : 50 ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาในการวิเคราะห์ 6 นาที ความเข้มข้นของสารละลายที่ทำการวิเคราะห์เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวทำละลายใช้ Methanol ปริมาตรของการฉีดสารตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรต่อครั้ง อุปกรณ์ตรวจวัดชนิด DAD ที่ความยาวคลื่นแสง 246 นาโนเมตร

3.2 ศึกษาและปรับตั้งภาวะในการวิเคราะห์ paraquat dichloride แล้วได้ภาวะที่เหมาะสม รายละเอียดดังนี้ ใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์คือ HPLC คอลัมน์ชนิด reverse phase ใช้ C8 ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศา

เซลเซียส เฟสเคลื่อนที่ใช้สารละลายผสมระหว่าง สารละลายผสมระหว่างสารละลาย 1-Octane sulfonic acid sodium salt 0.01 M เติม Triethylamine 0.035 M แล้วปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริกให้ได้เท่ากับ 3 ผสม Acetonitrile ในอัตราส่วน 70:30 ใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาในการวิเคราะห์ 4 นาที ความเข้มข้นของสารละลายที่ทำการวิเคราะห์เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวทำละลายใช้น้ำและ Acetonitrile ผสมในอัตราส่วน 75:25 ปริมาตรของการฉีดสารตัวอย่าง 2 ไมโครลิตรต่อครั้ง อุปกรณ์ตรวจวัดใช้ชนิด DAD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

3.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium และ paraquat dichloride ตามขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) และความสามารถของการแยกสาร (Selectivity) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.1.1 ปรับตั้งภาวะในการวิเคราะห์ตามข้อ 3.1 (Bispyribac-sodium) และข้อ 3.2 (Paraquat dichloride)

3.3.1.2 ทดสอบความพร้อมภาวะในการวิเคราะห์โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานของสารที่จะทำการวิเคราะห์จำนวน 5 ซ้ำ ตรวจสอบค่า %RPD ของค่า area ไม่เกิน 1%

3.3.1.3 ทำการฉีดสารตัวอย่างคือ สารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง

3.3.1.4 พิจารณา Chromatogram ทั้งหมดตามเงื่อนไขของการหาความจำเพาะเจาะจงและความสามารถในการแยกสาร

3.3.2 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.2.1 เตรียมสารละลาย intermediate โดยชั่งสารมาตรฐาน bispyribac-sodium หรือ paraquat dichloride ให้ได้ความเข้มข้นแน่นอนประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.3.2.2 เตรียมสารละลายของสาร bispyribac-sodium ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ด้วยการปิเปตสารละลาย intermediate ของ bispyribac-sodium เพื่อนำมาเตรียมความเข้มข้นของสารละลายให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.01, 0.025, 0.10, 0.25, 0.50 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาตรของการปิเปตเพื่อเตรียมในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.2.3 เตรียมสารละลายของสาร paraquat dichloride ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ด้วยการปิเปตสารละลาย intermediate ของ paraquat dichloride เพื่อนำมาเตรียมความเข้มข้นของสารละลายให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาตรของการปิเปตเพื่อเตรียมในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายสารผสมระหว่างน้ำและ Acetonitrile ผสมในอัตราส่วน 75:25 เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.2.4 ตรวจสอบความพร้อมของภาวะในการวิเคราะห์โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำหลายๆ ครั้งจนค่าพื้นที่ใต้ peak หรือความสูงของ peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1% จากนั้นจึงทำการฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เพื่อนำไปตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของสารที่วิเคราะห์ โดยเรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก ฉีดความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ

3.3.2.5 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) กับค่า response (แกน y)

3.3.2.6 คำนวณค่า Correlation coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$ พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงเพื่อใช้ในการทดสอบค่า Working range ต่อไป

3.3.3 ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงช่วงใช้งาน (Working range) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.3.1 ตรวจสอบช่วงใช้งานจากผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง ด้วยการเลือกช่วงที่เป็นเส้นตรงโดยพิจารณาให้ค่า $r \geq 0.995$ และให้ครอบคลุมช่วงที่ต้องการใช้งาน

3.3.3.2 เตรียมสารละลาย intermediate โดยชั่งสารมาตรฐาน bispyribac-sodium หรือ paraquat dichloride ให้ได้ความเข้มข้นแน่นอนประมาณ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน

3.3.3.3 เตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงใช้งานของสาร bispyribac-sodium ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ด้วยการปิเปตสารละลาย intermediate ของ Bispyribac-sodium เพื่อนำมาเตรียมความเข้มข้นของสารละลายให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาตรของการปิเปตเพื่อเตรียมในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย Methanol เขย่าให้เข้ากันกรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.3.4 เตรียมสารละลายเพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงใช้งานของสาร paraquat dichloride ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ด้วยการปิเปตสารละลาย

intermediate ของ Paraquat dichloride เพื่อนำมาเตรียมความเข้มข้นของสารละลายให้ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.025, 0.05, 0.10, 0.25, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาตรของการปิเปตเพื่อเตรียมในขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายสารผสมระหว่างน้ำและ Acetonitrile ผสมอัตราส่วน 75:25 เขย่าให้เข้ากันกรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.3.5 ตรวจสอบความพร้อมของภาวะในการวิเคราะห์เหมือนข้อ 3.3.2.4 จากนั้นจึงทำการฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เพื่อทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงใช้งาน โดยเรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก ฉีดความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ

3.3.3.6 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) กับค่า response (แกน y)

3.3.3.7 คำนวณค่า Correlation coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$

3.3.4 ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.4.1 ตรวจสอบความพร้อมของภาวะในการวิเคราะห์เหมือนข้อ 3.3.2.4 จากนั้นทำการวิเคราะห์ โดยจัดลำดับการฉีดสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างตามลำดับ ดังนี้

$C_1, C_2, S_1, S_2, S_3, C_1, C_2, S_4, S_5, S_6, C_1, C_2, \dots$

สารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ต้องมีค่า Relative Percent Different (%RPD) ไม่เกิน 3%

$$RPD = \frac{(\text{factor max} - \text{factor min})}{\text{factor mean}} \times 100$$

factor mean

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

H_s

S = น้ำหนักของสารมาตรฐานในสารละลาย (mg)

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (g/Kg)

H_s = พื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีคของสารมาตรฐาน

คำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์ ดังสมการ

$$\text{Active ingredient content (\%W/W)} = \frac{HW \times f}{W}$$

W

HW = พื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีคของสารละลายตัวอย่าง

f = ค่าเฉลี่ย response factor

W = น้ำหนักของตัวอย่าง

	5µm	5µm	5µm	5µm	2.7µm	2.7µm	2.7µm	2.7µm
อุณหภูมิของคอลัมน์	40 °C	40 °C	35 °C	35 °C	40 °C	40 °C	35 °C	35 °C
ความเข้มข้นของ H ₃ PO ₄	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%	0.2%

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนการทดสอบตามแบบของ factorial design เพื่อการตรวจสอบความคงทนแบบ Robustness ของวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride

ชนิดของปัจจัย	จำนวนการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
pH ของเฟส เคลื่อนที่	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.5	3.5	3.5
อุณหภูมิของ คอลัมน์	40 °C	40 °C	35 °C	35 °C	40 °C	40 °C	35 °C	35 °C
ชนิดของเฟส เคลื่อนที่	1- Octan e	1- Heptan e	1- Octan e	1- Heptan e	1- Octan e	1- Heptan e	1- Octan e	1- Heptan e

3.3.5.2 ตรวจสอบความคงทนตามแบบ Ruggedness การวิเคราะห์ปฏิบัติตาม ขั้นตอนเหมือนข้อ 3.3.4.3 ตามเงื่อนไขของ Ruggedness ใช้วิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium และ paraquat dichloride ทำการทดสอบด้วยการเปลี่ยนเครื่อง/รุ่นของ HPLC จากเดิม Agilent 1290 เป็น Agilent 1100 และเปลี่ยนผู้ทำการวิเคราะห์

3.3.6 ตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

3.3.6.1 ตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium

(1) เตรียมสารละลาย stock standard ของ bispyribac-sodium ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารมาตรฐาน bispyribac-sodium ให้ได้น้ำหนักประมาณ 420.4 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 100 มิลลิลิตร

เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน

(2) เตรียมสารละลาย stock sample ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ bispyribac-sodium ให้ได้น้ำหนักประมาณ 2,118.2 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน

(3) เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า origin ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.6.1.2 ปริมาตร 0.938, 1.88 และ 2.81 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากันกรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

(4) เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า fortified

- ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.6.1.2 ปริมาตร 0.938, 1.88 และ 2.81 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ขวด

- ปิเปตสารละลาย stock standard จากข้อ 2.6.1.1 ปริมาตร 1.09, 2.19 และ 3.28 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่มี stock sample ในข้อ 1) ความเข้มข้นละ 10 ขวด ตามลำดับปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากันกรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.6.2 ตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride

(1) เตรียมสารละลาย stock standard ของ paraquat dichloride ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารมาตรฐาน paraquat dichloride ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 609.6 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 125 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน

(2) เตรียมสารละลาย stock sample ให้มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ paraquat dichloride ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 944.7 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ 125 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน

(3) เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า origin ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.6.2.2 ปริมาตร 0.938, 1.88 และ 2.81 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายแล้วเขย่าให้เข้ากันกรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

(4) เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า fortified

- ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.6.2.2 ปริมาตร 1.90, 3.74 และ 5.64 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ขวด

- ปิเปตสารละลาย stock standard จากข้อ 2.6.2.1 ปริมาตร 2.19, 4.35 และ 6.54 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรที่มี stock sample ในข้อ 1) ความเข้มข้นละ 10 ขวด ตามลำดับปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายแล้วเขย่าให้เข้ากัน กรองด้วย syringe filter แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

3.3.6.3 การประเมินค่าความแม่นยำจากค่าของ Recovery

นำปริมาณสารออกฤทธิ์ที่วิเคราะห์ได้คือ ค่า origin และ fortified มาคำนวณจากสูตรดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc. spiked sample} - \text{Conc. original sample}) \times 100}{\text{Conc. fortified}}$$

- เวลาและสถานที่ : ตุลาคม 2558 – กันยายน 2561 สถานที่ดำเนินการ
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพ
วัตถุดิบพืชการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทาง
การเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาช่วงของการวัด (Working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจสอบช่วงของการวัด (Working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าช่วงของการวัดและช่วงความเป็นเส้นตรง ของ diuron อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.03 – 0.15 mg/l และ cyhalofop-butyl อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 ml/l ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99999 และ 0.99951 ตามลำดับ สำหรับ oxadiazon และ metribuzin อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9998 และ 0.9999 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของ Bispyribac-sodium ทำการศึกษาในช่วง 0.010 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า

Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99982 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของ Paraquat dichloride ทำทดสอบในช่วง 0.010 – 0.500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99997 รวมถึงการตรวจสอบหาช่วงของการวัด Bispyribac-sodium ทำทดสอบในช่วง 0.025 – 0.750 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99983 และ Paraquat dichloride ทำทดสอบในช่วง 0.025 – 0.500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99996 ซึ่งจากผลการทดสอบดังกล่าว ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

2. การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ diuron ที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ประเมินแบบ Repeatability พบว่า ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.452, 1.578 และ 0.651 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ประเมินแบบ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.487, 1.530 และ 1.006 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับสารออกฤทธิ์ cyhalofop-butyl ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.30, 0.50 และ 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ พบว่า ประเมินแบบ Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.353, 0.250 และ 0.210 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ประเมินแบบ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.419, 0.353 และ 0.261 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Repeatability ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ diuron 80% WP และ cyhalofop-butyl 10% W/V EC

No.	diuron			cyhalofop-butyl		
	0.05 mg/ml	0.10mg/ml	0.15 mg/ml	0.30 mg/ml	0.50mg/ml	0.90 mg/ml
	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Conten	%Al.Conten	%Al.Conten
			t	t	t	
1	79.04	81.90	81.60	9.81	9.75	9.86
2	79.09	79.60	80.80	9.79	9.77	9.74
3	79.47	79.70	80.50	9.84	9.78	9.80
4	79.54	79.00	80.70	9.90	9.81	9.82
5	80.30	80.30	81.50	9.88	9.78	9.81
6	81.13	81.60	80.80	9.85	9.84	9.78
7	80.90	80.60	81.20	9.75	9.86	9.74
8	80.90	79.00	80.20	9.96	9.77	9.74
9	81.50	81.80	81.20	9.77	9.83	9.78
10	81.70	80.40	80.60	9.85	9.89	9.78
Mean	80.36	80.39	80.91	9.84	9.81	9.79

SD	1.005	1.092	0.450	0.065	0.046	0.039
HORRAT	1.452	1.578	0.651	0.353	0.250	0.210

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Within laboratory reproducibility ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ diuron 80% WP และ cyhalofop-butyl 10% W/V EC

No.	diuron			cyhalofop-butyl		
	0.05 mg/ml	0.10 mg/ml	0.15 mg/ml	0.30 mg/ml	0.50mg/ml	0.90 mg/ml
	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content
1	79.40	79.10	81.80	9.92	9.86	9.79
2	79.80	80.50	80.30	9.97	9.88	9.84
3	81.40	81.90	81.80	9.91	9.80	9.80
4	81.60	81.70	80.80	9.85	9.78	9.81
5	79.70	80.00	80.00	10.06	9.97	9.77
6	78.90	81.80	80.90	9.83	9.79	9.71
7	81.40	79.80	80.60	9.98	9.76	9.70
8	79.10	81.70	80.30	9.86	9.77	9.71
9	80.60	83.10	81.30	9.88	9.81	9.74
10	79.4	79.60	81.90	9.81	9.80	9.74
Mean	80.13	80.74	80.97	9.91	9.82	9.76
SD	1.029	1.059	0.696	0.078	0.065	0.048
HORRAT	1.487	1.530	1.006	0.419	0.353	0.261

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ประเมินแบบ Repeatability ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ oxadiazon ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า oxadiazon ได้ค่าเฉลี่ย (mean) 24.54, 24.51, 24.57 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.15, 0.10, 0.09 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.59, 0.41, 0.36 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.36, 0.25, 0.22 ตามลำดับ และ metribuzin ได้ค่า 69.90, 70.23, 69.61 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.53, 0.57, 0.52 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.76, 0.81, 0.75 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.55, 0.58, 0.54 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สำหรับ Within

laboratory reproducibility ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า oxadiazon ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 24.04, 24.28, 24.72 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.06, 0.09, 0.16 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.27, 0.39, 0.65 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.11, 0.16, 0.27 ตามลำดับ และ metribuzin ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 69.32, 68.84, 68.28 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.64, 0.42, 1.02 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.92, 0.61, 1.50 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.44, 0.29, 0.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ metribuzin และ oxadiazon ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 3 ตรวจสอบ Precision ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

	oxadiazon			metribuzin		
Repeatability	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	1.5 mg/ml	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	1.5 mg/ml
mean (%W/W)	24.54	24.51	24.57	69.90	70.23	69.61
SD	0.15	0.10	0.09	0.53	0.57	0.52
%RSD	0.59	0.41	0.36	0.76	0.81	0.75
HORRAT	0.36	0.25	0.22	0.55	0.58	0.54
within laboratory reproducibility						
mean (%W/W)	24.04	24.28	24.72	69.32	68.84	68.28
SD	0.06	0.09	0.16	0.64	0.42	1.02
%RSD	0.27	0.39	0.65	0.92	0.61	1.50
HORRAT	0.11	0.16	0.27	0.44	0.29	0.71

การตรวจสอบความเที่ยงแบบ repeatability ของวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ทำการทดสอบในเวลาใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (ตารางที่ 4) และการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability ตามวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ทำการ

ทดสอบในเวลาใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (ตารางที่ 5) พบว่า ผลการตรวจสอบความเที่ยงของวิธีตามแบบ repeatability ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ bispyribac-sodium และ Paraquat dichloride ประเมินผลการทดสอบโดยใช้ค่า HORRAT ทุกระดับความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.236-0.334 และ 0.237-0.659 ตามลำดับ ผลการทดสอบทั้งหมดผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามเกณฑ์ของ AOAC สำหรับการทดสอบความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility ตามวิธีวิเคราะห์ Bispyribac-sodium เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ทำการทดสอบในเวลาต่างกัน ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (ตารางที่ 6) และการทดสอบความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility ของวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ทำการทดสอบในเวลาต่างกัน ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (ตารางที่ 7)พบว่า ผลการทดสอบความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility ตามวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ประเมินผลการทดสอบโดยใช้ค่า HORRAT ในช่วง 0.259-0.654 ซึ่งผลการทดลองผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC น้อยกว่า 2 และ ผลการทดสอบความเที่ยงแบบ Within laboratory reproducibility ของวิธีวิเคราะห์ Paraquat dichloride ผลการทดสอบโดยได้ค่า HORRAT ในช่วง 0.293-0.796 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามเกณฑ์ AOAC น้อยกว่า

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability ของวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.250 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	bispyribac-sodium (%)	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	bispyribac-sodium (%)	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	bispyribac-sodium (%)
1	30.2	10.244	66.5	9.932	82.3	9.740
2	32.2	10.030	66.7	9.951	83.8	9.806
3	32.3	10.181	67.5	9.884	85.1	9.785
4	32.9	10.117	67.7	9.916	90.8	9.719
5	32.9	10.171	68.1	9.822	93.5	9.752
6	33.0	10.192	68.5	9.867	97.2	9.826

7	33.0	10.161	70.3	9.885	98.8	9.703
8	33.9	10.075	70.3	9.923	100.5	9.791
9	34.2	10.156	70.7	9.765	101.6	9.826
10	34.4	10.179	71.0	9.791	102.1	9.744
mean		10.151		9.874		9.769
%RSD		0.608		0.632		0.448
HORRAT		0.321		0.334		0.236

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride ตรวจสอบค่า repeatability ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.250 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	paraquat dichloride (%)	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	paraquat dichloride (%)	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	paraquat dichloride (%)
1	20.6	26.768	43.2	26.944	65.0	26.385
2	21.9	26.619	44.9	26.897	65.7	26.524
3	22.1	26.389	45.2	26.774	66.2	26.296
4	22.4	26.892	45.4	26.411	66.5	26.514
5	22.6	26.205	45.5	26.566	67.0	26.461

6	22.7	26.147	45.4	26.438	67.2	26.627
7	22.8	26.160	45.7	26.560	67.7	26.54
8	22.8	26.178	46.0	26.308	68.4	26.418
9	23.1	26.469	46.1	26.590	68.5	26.323
10	23.6	26.119	46.3	26.332	68.7	26.480
mean		26.394		26.582		26.456
%RSD		1.071		0.846		0.386
HORRAT		0.659		0.520		0.237

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Within laboratory reproducibility ตามวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.250 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)
1	30.2	10.2181	66.5	9.8903	82.3	9.8599
2	32.2	9.8271	66.7	9.8226	83.8	9.8599

3	32.3	9.9932	67.5	9.8566	85.1	9.7424
4	32.9	10.0254	67.7	9.8972	90.8	9.7485
5	32.9	10.1555	68.1	9.8255	93.5	9.7595
6	33.0	10.1762	68.5	9.7998	97.2	9.7812
7	33.0	10.1818	70.3	9.9281	98.8	9.7680
8	33.9	10.1218	70.3	10.0067	100.5	9.8088
9	34.2	9.9375	70.7	9.8395	101.6	9.7150
10	34.2	10.0633	71.0	9.8320	102.1	9.7740
mean		10.0700		9.8698		9.7817
%RSD		1.239		0.631		0.491
HORRAT		0.654		0.333		0.259

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Within laboratory reproducibility ตามวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.250 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน. ตัวอย่าง	paraquat dichloride(นน. ตัวอย่าง	paraquat dichloride(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/50ml)	paraquat dichloride(%)

	(mg/50ml)	(%)	(mg/50ml)		(%)	(mg/50ml)
1	22.4	27.046	45.4	26.215	66.5	26.512
2	22.6	26.208	45.5	26.374	67.0	26.364
3	22.7	26.310	45.4	26.862	67.2	26.452
4	22.8	26.619	45.7	26.708	67.7	26.395
5	22.8	26.533	46.0	26.331	68.4	26.185
6	20.6	26.982	46.1	26.484	65.0	26.364
7	21.9	26.857	46.2	26.337	65.7	26.410
8	22.1	26.508	43.2	26.54	66.2	26.145
9	23.1	26.620	44.9	26.375	68.5	26.189
10	23.6	25.955	45.2	26.284	68.7	26.254
mean		26.564		26.451		26.327
%RSD		1.295		0.763		0.477
HORRAT		0.796		0.469		0.293

3. การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness/Ruggedness)

การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ diuron 80% WP ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ พบว่า ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.344, 1.367 และ 1.588 ตามลำดับ สำหรับสารออกฤทธิ์ cyhalofop-butyl 10% W/V EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.30, 0.50 และ 0.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ พบว่า ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.708, 0.585 และ 0.391 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า HORRAT ≤ 2 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของปริมาณสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ diuron

80% WP และ cyhalofop-butyl 10% W/V EC

No.	diuron			cyhalofop-butyl		
	0.05 mg/ml	0.10 mg/ml	0.15 mg/ml	0.30 mg/ml	0.50mg/ml	0.90 mg/ml
	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content	%Al.Content
1	79.80	79.60	80.90	9.79	9.86	9.70
2	80.30	79.50	80.80	9.71	9.71	9.82
3	78.90	81.90	81.50	9.76	9.74	9.79
4	80.70	81.20	81.50	9.77	9.90	9.71
5	78.50	81.30	80.70	9.77	9.87	9.76
6	79.70	80.50	78.00	10.14	9.63	9.87
7	81.40	80.80	80.80	9.76	9.96	9.92
8	81.70	81.70	81.80	9.69	9.67	9.87
9	79.70	80.30	80.10	9.74	9.74	9.77
10	79.00	79.30	79.80	9.70	9.85	9.79
Mean	79.97	80.61	80.59	9.78	9.79	9.80
SD	1.059	0.930	1.099	0.129	0.107	0.072
HORRAT	1.344	1.367	1.588	0.708	0.585	0.391

ในการตรวจสอบ Robustness มีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนอุณหภูมิ oven ในการทดสอบ พบว่า oxadiazon ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 24.40, 24.53, 24.58 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.14, 0.09, 0.04 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.59, 0.37, 0.18 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.24, 0.15, 0.07 ตามลำดับ และ metribuzin ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 69.72, 69.79, 69.06 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.42, 0.55, 0.56 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.60, 0.79, 0.81 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.29, 0.37, 0.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ในการตรวจ Ruggedness มีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนเครื่อง GC-FID ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า oxadiazon ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 24.71, 24.43, 24.69 %W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.14, 0.09, 0.07 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.58, 0.39, 0.27 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.24, 0.16, 0.11 ตามลำดับ และ metribuzin ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 70.17, 71.23, 70.44

%W/W ตามลำดับ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.43, 0.44, 0.50 ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.60, 0.62, 0.71 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.28, 0.30, 0.34 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ metribuzin และ oxadiazon ให้ผลการทดสอบ Robustness และ Ruggedness อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 9 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

Robustness	oxadiazon			metribuzin		
	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	1.5 mg/ml	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	1.5 mg/ml
mean (%W/W)	24.40	24.53	24.58	69.72	69.79	69.06
SD	0.14	0.09	0.04	0.42	0.55	0.56
%RSD	0.59	0.37	0.18	0.60	0.79	0.81
HORRAT	0.24	0.15	0.07	0.29	0.37	0.38
Ruggedness						
mean (%W/W)	24.71	24.43	24.69	71.07	71.23	70.44
SD	0.14	0.09	0.07	0.43	0.44	0.50
%RSD	0.58	0.39	0.27	0.60	0.62	0.71
HORRAT	0.24	0.16	0.11	0.28	0.30	0.34

สำหรับการตรวจสอบความคงทนของวิธีแบบ Robustness ในการวิเคราะห์ bispyribac-sodium ตามวิธีวิเคราะห์โดยเปลี่ยนปัจจัยในการวิเคราะห์ 3 ปัจจัยคือ เปลี่ยนความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่เป็นกรด ฟอสฟอริก 0.2% ผสม Acetonitrile ในอัตราส่วน 50 : 50 เวลาในการวิเคราะห์รวม 3 นาที เปลี่ยนรุ่นของ คอลัมน์เป็น C8 ขนาด 30 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 2.7 ไมโครเมตร และเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 35 องศาเซลเซียส ปัจจัยอื่นคงเดิมคือ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวทำละลายใช้ Methanol ปริมาณการ ฉีดสารตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรต่อครั้ง ตรวจวัดความยาวคลื่นแสงที่ 246 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 10 พบว่า ผลการทดสอบค่า Robustness ตามวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ผลการ

ทดสอบได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.179-0.364 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์ AOAC ที่น้อยกว่า 2 และการทดสอบ Robustness ตามวิธีการวิเคราะห์ paraquat dichloride โดยเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ 1-heptane sulfonic acid sodium salt 0.01 M เติม Triethylamine 0.035 M ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 3.5 ผสมกับ Acetonitrile ในอัตราส่วน 70 : 30 และเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 35 องศาเซลเซียส ปัจจัยอื่นเหมือนเดิมคือ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาวิเคราะห์รวม 4 นาที และตัวทำละลายใช้ น้ำผสม Acetonitrile ในอัตราส่วน 75 : 25 ปริมาตรในการฉีดสารตัวอย่าง 2 ไมโครลิตรต่อครั้ง ใช้คอลัมน์ C8 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ตรวจวัดความยาวคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 11 พบว่าผลการทดสอบค่า Robustness ตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ Paraquat dichloride ผลการทดสอบได้ค่า HORRAT อยู่ในระหว่าง 0.318-0.932 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์ AOAC ที่น้อยกว่า 2 นอกจากนี้ ผลการทดสอบความทนของวิธีแบบ Ruggedness ตามวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ทำการทดสอบโดยเปลี่ยนเครื่อง/รุ่นของ HPLC จากเดิม Agilent 1290 เป็น Agilent 1100 และเปลี่ยนผู้ทำการทดสอบ ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 12 พบว่าผลการทดสอบค่า Ruggedness ตามวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ผลการทดสอบได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.596-0.819 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามเกณฑ์ของ AOAC ที่น้อยกว่า 2 ในการทดสอบ Ruggedness ของการวิเคราะห์ paraquat dichloride โดยตรวจสอบตามวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride ทำการทดสอบโดยเปลี่ยนเครื่อง/รุ่นของ HPLC จากเดิม Agilent 1290 เป็น Agilent 1100 และเปลี่ยนผู้ทำการทดสอบ ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 13 พบว่า ผลการทดสอบค่า Ruggedness ตามวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride ผลการทดสอบได้ค่า HORRAT อยู่ระหว่าง 0.874-0.969 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ตามเกณฑ์ AOAC ที่น้อยกว่า 2

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบ Robustness ตามวิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.250 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)
1	32.9	10.1555	70.3	9.9281	90.8	9.7485
2	33.0	10.1762	70.3	10.0067	93.5	9.7595
3	34.2	9.9375	70.7	9.8395	97.2	9.7812
4	34.2	10.0633	71.0	9.8320	98.8	9.7680
5	33.9	10.1218	66.5	9.8903	82.3	9.8599
6	30.2	10.2181	66.7	9.8226	83.8	9.8599
7	32.2	9.8271	67.5	9.8566	85.1	9.7424
8	30.2	10.2181	67.7	9.8972	100.5	9.8088
9	32.2	9.8271	68.1	9.8255	101.6	9.7150
10	33.0	10.1818	68.5	9.7998	102.1	9.7740
mean		10.090		9.899		9.795

%RSD	0.691	0.632	0.339
HORRAT	0.364	0.333	0.179

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบ Robustness วิเคราะห์ paraquat dichloride ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน. ตัวอย่าง (mg/50ml)	paraquat dichloride (%)	นน. ตัวอย่าง (mg/50ml)	paraquat dichloride((%)	นน. ตัวอย่าง (mg/50ml)	paraquat dichloride (%)
	1	20.6	27.193	43.2	27.070	26.628
2	21.9	26.953	44.9	27.103	26.865	26.865
3	22.1	26.451	45.2	26.898	26.616	26.616
4	22.4	27.182	45.4	26.65	26.781	26.781
5	22.6	26.306	45.5	26.795	26.635	26.635
6	22.7	26.127	45.4	26.651	26.702	26.702
7	22.8	26.440	45.7	26.739	26.634	26.634
8	22.8	26.389	46.0	26.642	26.478	26.478

9	23.1	26.417	46.2	26.823	26.438	26.438
10	23.6	26.125	46.3	26.738	26.464	26.464
mean		26.558		26.811		26.624
%RSD		1.516		0.623		0.517
HORRAT		0.932		0.383		0.318

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบ Ruggedness วิธีวิเคราะห์ bispyribac-sodium ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.250 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)	นน. ตัวอย่าง (mg/25ml)	bispyribac- sodium(%)
1	32.9	9.8834	70.3	10.0335	93.5	9.7771
2	32.9	10.0135	70.7	9.8794	97.2	9.8438
3	33.0	10.1551	71.0	10.1117	82.3	9.8189
4	33.0	10.0299	66.5	9.8339	83.8	9.6172
5	30.2	9.9282	66.7	10.0001	85.1	9.8342

6	32.2	9.9587	67.5	10.0489	90.8	9.5770
7	32.3	10.0070	67.7	10.1891	101.6	9.8280
8	33.9	10.1546	68.1	9.7135	102.1	9.5905
9	34.2	10.2679	68.5	9.8913	98.8	9.7829
10	34.2	9.8329	70.3	10.1727	100.5	9.8376
mean		10.0231		9.9874		9.7507
%RSD		1.346		1.551		1.130
HORRAT		0.710		0.819		0.596

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ Ruggedness ตามวิธีวิเคราะห์ paraquat dichloride ความเข้มข้น 3 ระดับ

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml		ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 0.375 mg/ml	
	นน.	paraquat	นน.	paraquat	นน.	paraquat
	ตัวอย่าง (mg/50ml)	dichloride(%)	ตัวอย่าง (mg/50ml)	dichloride(%)	ตัวอย่าง (mg/50ml)	dichloride(%)
1	22.6	26.084	45.7	26.979	67.2	26.230
2	22.7	26.252	46.0	26.715	67.7	26.825

3	22.8	26.393	46.1	26.928	68.4	27.112
4	22.8	27.219	46.2	27.164	68.5	27.414
5	23.1	26.651	43.2	27.970	68.7	26.992
6	23.6	26.603	44.9	27.334	65.0	26.839
7	20.6	27.079	45.2	26.793	65.7	26.559
8	21.9	26.818	45.4	26.661	66.2	26.150
9	22.1	26.475	45.5	27.086	66.5	26.602
10	22.4	27.076	45.4	26.819	67.0	26.208
mean		26.67		27.04		26.69
%RSD		1.421		1.429		1.577
HORRAT		0.874		0.878		0.969

4. การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ diuron 80% WP ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.05, 0.10 และ 0.15 mg/ml จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ค่าร้อยละ %Recovery เท่ากับ 101.05, 100.19 และ 99.98 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) สำหรับสารออกฤทธิ์ cyhalofop-butyl 10% W/V EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.20, 0.50 และ 0.80 mg/ml จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ค่าร้อยละ %Recovery เท่ากับ 99.18, 99.36 และ 99.88 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ค่า %Recovery ของ oxadiazon เท่ากับ 99.778, 99.058 และ 99.534 ตามลำดับ (ตารางที่ 16) % Recovery ของ metribuzin เท่ากับ 99.829, 101.260 และ 98.528 ตามลำดับ (ตารางที่ 17) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้สามารถนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ได้อย่างถูกต้อง

No.	Conc ⁿ (0.05 mg/ml)			Conc ⁿ (0.10 mg/ml)			Conc ⁿ (0.15 mg/ml)		
	add	Origin	Spike	add	Origin	Spike	add	Origin	Spike
1	5.00	10.02	15.04	10.01	10.02	19.97	15.02	10.02	24.89
2	5.00	10.01	15.00	10.01	10.01	20.05	15.02	10.01	24.92
3	5.00	9.92	14.99	10.01	9.92	20.07	15.02	9.92	25.08
4	5.00	10.00	15.08	10.01	10.00	20.06	15.02	10.00	25.03
5	5.00	9.93	15.07	10.01	9.93	19.99	15.02	9.93	25.03
6	5.00	9.96	15.07	10.01	9.96	20.05	15.02	9.96	25.04
7	5.00	10.04	15.12	10.01	10.04	20.02	15.02	10.04	25.01
8	5.00	10.00	14.97	10.01	10.00	20.04	15.02	10.00	25.12
9	5.00	10.02	15.11	10.01	10.02	20.03	15.02	10.02	25.04
10	5.00	9.98	15.04	10.01	9.98	19.97	15.02	9.98	24.93
Mean	5.00	9.99	15.05	10.01	9.99	20.02	15.02	9.99	25.01
%Recovery		101.05			100.19			99.98	
%Recovery เฉลี่ย		100.41							

ตารางที่ 14 การตรวจสอบ Accuracy ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ diuron 80% WP

ตารางที่ 15 การตรวจสอบ Accuracy ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ cyhalofop-butyl 10% W/V EC

No.	Active ingredient content (mg/100 ml)								
	Conc ⁿ (0.20 mg/ml)			Conc ⁿ (0.50 mg/ml)			Conc ⁿ (0.80 mg/ml)		
	add	Origin	Spike	add	Origin	Spike	add	Origin	Spike
1	2.07	4.67	6.76	5.06	4.67	9.72	8.10	4.67	12.93
2	2.07	4.66	6.68	5.06	4.66	9.74	8.10	4.66	12.70
3	2.07	4.67	6.68	5.06	4.67	9.71	8.10	4.67	12.70
4	2.07	4.72	6.73	5.06	4.72	9.70	8.10	4.72	12.81
5	2.07	4.73	6.71	5.06	4.73	9.76	8.10	4.73	12.87
6	2.07	4.71	6.67	5.06	4.71	9.69	8.10	4.71	12.81
7	2.07	4.73	6.72	5.06	4.73	9.77	8.10	4.73	12.76
8	2.07	4.72	6.66	5.06	4.72	9.75	8.10	4.72	12.87
9	2.07	4.77	6.68	5.06	4.77	9.79	8.10	4.77	12.84
10	2.07	4.72	6.70	5.06	4.72	9.82	8.10	4.72	12.80
Mean	2.07	4.71	6.70	5.06	4.71	9.75	8.10	4.72	12.81
%Recovery		98.18			99.36			99.88	
%Recovery เฉลี่ย		99.14							

ตารางที่ 16 ตรวจสอบ % Recovery ของ oxadiazon

ลำดับ	oxadiazon a.i. content (mg/ml)								
	Conc. added (0.5 mg)			Conc. added (1.0 mg)			Conc. added (1.5 mg)		
	Mean	Spike	Recovery (%)	Mean	Spike	Recovery (%)	Mean	Spike	Recovery (%)
	Origin			Origin			Origin		
1	0.207	0.707	99.959	0.201	1.197	99.591	0.195	1.696	100.069
2	0.207	0.703	99.243	0.201	1.190	98.914	0.195	1.696	100.088
3	0.207	0.704	99.337	0.201	1.190	98.919	0.195	1.701	100.375
4	0.207	0.703	99.115	0.201	1.195	99.378	0.195	1.682	99.123
5	0.207	0.703	99.154	0.201	1.188	98.699	0.195	1.695	100.024
6	0.207	0.706	99.889	0.201	1.196	99.463	0.195	1.693	99.867
7	0.207	0.717	102.018	0.201	1.191	99.036	0.195	1.682	99.141
8	0.207	0.711	100.858	0.201	1.189	98.779	0.195	1.683	99.184
9	0.207	0.702	98.919	0.201	1.188	98.714	0.195	1.674	98.612
10	0.207	0.703	99.284	0.201	1.192	99.091	0.195	1.678	98.859
mean		0.706	99.778		1.192	99.058		1.688	99.534
SD		0.005	0.973		0.003	0.319		0.009	0.615
%RSD		0.689	0.975		0.268	0.322		0.546	0.618

ตารางที่ 17 ตรวจสอบ % Recovery ของ metribuzin

ลำดับ	metribuzin a.i. content (mg/ml)								
	Conc.added (0.5 mg)			Conc. added (1.0 mg)			Conc. added (1.5 mg)		
	Mean	Spike	Recovery (%)	Mean	Spike	Recovery (%)	Mean	Spike	Recovery (%)
	Origin			Origin			Origin		
1	0.199	0.697	99.532	0.191	1.206	101.513	0.195	1.674	98.592
2	0.199	0.705	101.222	0.191	1.206	101.529	0.195	1.668	98.225
3	0.199	0.695	99.117	0.191	1.201	100.980	0.195	1.673	98.514
4	0.199	0.691	98.361	0.191	1.195	100.360	0.195	1.678	98.836
5	0.199	0.703	100.718	0.191	1.196	100.470	0.195	1.667	98.106
6	0.199	0.697	99.664	0.191	1.204	101.317	0.195	1.666	98.076
7	0.199	0.693	98.836	0.191	1.207	101.600	0.195	1.686	99.430
8	0.199	0.704	100.989	0.191	1.210	101.866	0.195	1.674	98.577
9	0.199	0.698	99.813	0.191	1.208	101.734	0.195	1.679	98.915
10	0.199	0.699	100.034	0.191	1.203	101.230	0.195	1.665	98.012
mean		0.698	99.829		1.204	101.260		1.673	98.528
SD		0.005	0.936		0.005	0.512		0.007	0.448
%RSD		0.670	0.937		0.426	0.506		0.402	0.455

สำหรับการตรวจสอบ % Recovery ของการวิเคราะห์ Bispyribac-sodium ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบและครอบคลุมช่วงใช้งานในคือ 0.125 0.250 และ 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ในช่วง 100.3-101.4% ค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (RSD) อยู่ในช่วง 0.492-1.403% ซึ่ง% Recovery อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (AOAC official methods of analysis, 2012) และได้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Bispyribac-sodium ตามปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ทำการทดสอบมีค่าเท่ากับ $10.59 \pm 0.14\%$ ดังตารางที่ 18 และ % Recovery ของการวิเคราะห์ Paraquat dichloride ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์และครอบคลุมช่วงใช้งานในคือ 0.125, 0.250 และ 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 101.7 100.5 และ 100.3 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง 100.3-101.7% ค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์ (RSD) อยู่ในช่วง 0.181-0.405% ซึ่ง% Recovery อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และได้ค่าความไม่แน่นอนของการวัดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Paraquat dichloride ตามปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ทำการทดสอบมีค่าเท่ากับ $28.7 \pm 0.78\%$ ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 18 แสดงผล % Recovery ของวิธีวิเคราะห์ Bispyribac-sodium

ปริมาณสารออกฤทธิ์ของ Bispyribac-sodium (mg/25 ml)									
ลำดับ	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml (added 2.1780 mg/25ml)			ความเข้มข้น 0.250 mg/ml (added 4.3759 mg/25ml)			ความเข้มข้น 0.375 mg/ml (added 6.5539 mg/25ml)		
	Origin	Fortified	Spike	Origin	Fortified	Spike	Origin	Fortified	Spike
1	0.9306	2.1780	3.1036	1.6040	4.3759	6.0302	2.5241	6.5539	9.0623
2	0.8753	2.1780	3.0695	1.5876	4.3759	6.0577	2.5262	6.5539	9.0311
3	0.8681	2.1780	3.0900	1.6049	4.3759	6.0521	2.5290	6.5539	9.1375
4	0.8700	2.1780	3.1098	1.5898	4.3759	5.9890	2.5271	6.5539	9.1450
5	0.8712	2.1780	3.0875	1.5975	4.3759	6.0390	2.5191	6.5539	9.1587
6	0.8697	2.1780	3.1091	1.5947	4.3759	5.9384	2.5106	6.5539	9.1110
7	0.8589	2.1780	3.0509	1.6070	4.3759	6.0899	2.5043	6.5539	9.0731
8	0.8171	2.1780	3.1252	1.6014	4.3759	6.0576	2.5204	6.5539	9.1004

9	0.8809	2.1780	2.9744	1.6130	4.3759	6.0513	2.5190	6.5539	9.0342
10	0.8573	2.1780	3.0658	1.5895	4.3759	6.0249	2.5135	6.5539	9.1002
mean	0.8699	2.1780	3.0786	1.5989	4.3759	6.0330	2.5193	6.5539	9.0954
% RSD	3.185		1.403	0.532		0.702	0.313		0.492
%Recovery			101.4			101.3			100.3

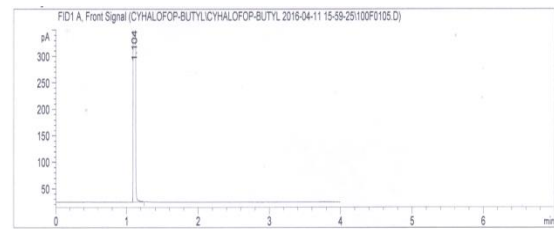
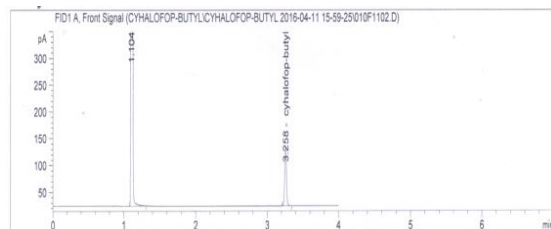
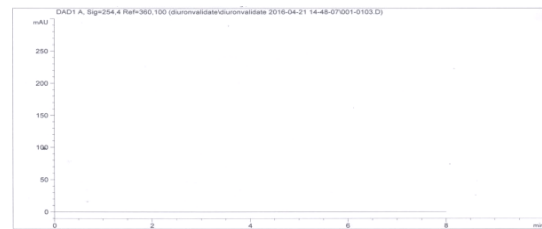
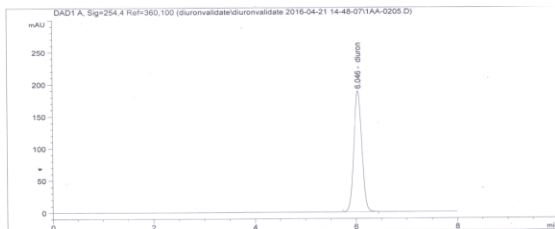
ตารางที่ 19 แสดงผล % Recovery ของวิธีวิเคราะห์ Paraquat dichloride

ปริมาณสารออกฤทธิ์ของ Paraquat dichloride (mg/50 ml)									
ลำดับ	ความเข้มข้น 0.125 mg/ml (added 4.4000 mg/50ml)			ความเข้มข้น 0.250 mg/ml (added 8.7500 mg/50ml)			ความเข้มข้น 0.375 mg/ml (added 13.1500 mg/50ml)		
	Origin	Fortified	Spike	Origin	Fortified	Spike	Origin	Fortified	Spike
1	1.9276	4.4000	6.3890	3.7982	8.7500	12.5503	5.6076	13.1500	18.7759
2	1.9231	4.4000	6.3870	3.7564	8.7500	12.5477	5.6019	13.1500	18.8344
3	1.9060	4.4000	6.3620	3.7505	8.7500	12.5720	5.6256	13.1500	18.7635
4	1.9205	4.4000	6.3715	3.7541	8.7500	12.5614	5.6006	13.1500	18.7019
5	1.9196	4.4000	6.4011	3.7612	8.7500	12.4985	5.6269	13.1500	18.7449
6	1.9194	4.4000	6.4212	3.7672	8.7500	12.5517	5.5995	13.1500	18.7960
7	1.8993	4.4000	6.4330	3.7847	8.7500	12.5560	5.5806	13.1500	18.8138
8	1.9267	4.4000	6.3500	3.7164	8.7500	12.5850	5.6254	13.1500	18.8024

9	1.9133	4.4000	6.4071	3.7407	8.7500	12.5498	5.5969	13.1500	18.7986
10	1.9166	4.4000	6.4007	3.7580	8.7500	12.5668	5.5890	13.1500	18.8550
mean	1.9172	4.4000	6.3923	3.7587	8.7500	12.5539	5.6054	13.1500	18.7886
% RSD	0.465		0.405	0.596		0.181	0.285		0.236
%Recovery			101.7			100.5			100.3

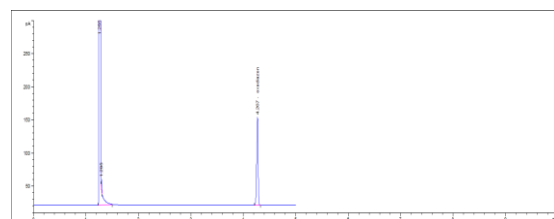
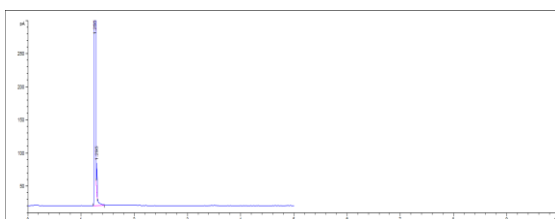
5. การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง (Specificity)

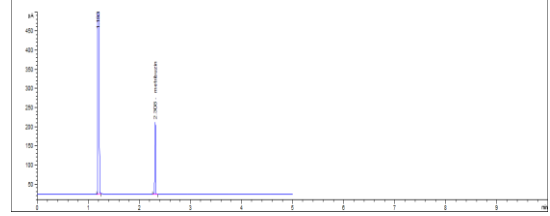
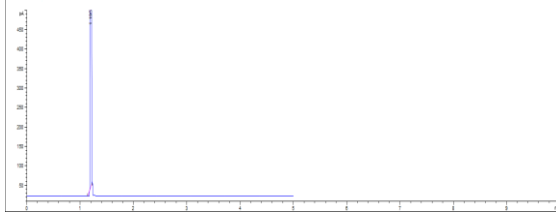
การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช พบว่า โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน สารตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด และสารละลาย blank ไม่มีพีคอื่นใดมารบกวน ดังแสดงในภาพที่ 1 - 3 แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ทั้ง 6 วิธี ไม่ตอบสนองต่อสารอื่น แต่จะตอบสนองเฉพาะเจาะจงต่อสารตัวอย่างทั้ง 6 ชนิด



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารออกฤทธิ์ diuron และสารละลาย blank เรียงจากซ้ายไปขวา (บน)

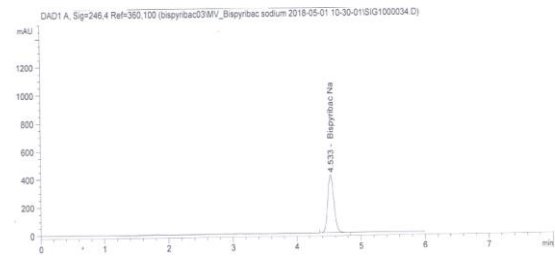
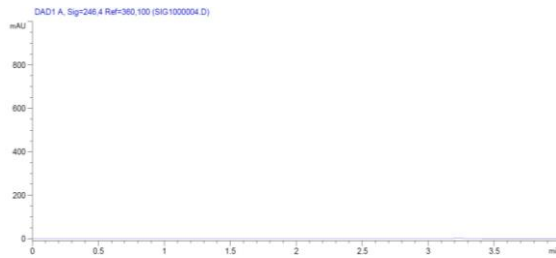
โครมาโทแกรมของสารออกฤทธิ์ cyhalofop-butyl และสารละลาย blank เรียงจากซ้ายไปขวา (ล่าง)

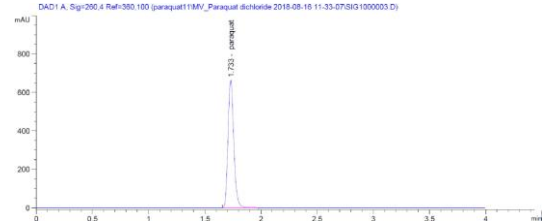
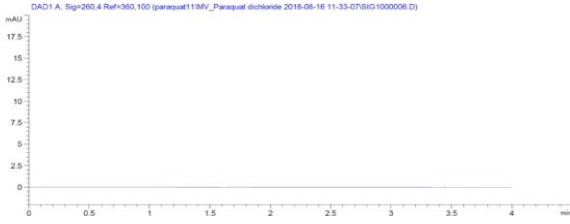




ภาพที่ 2 Chromatogram ของ Blank และ oxadiazon เรียงจากซ้ายไปขวา (บน)

Chromatogram ของ Blank และ metribuzin เรียงจากซ้ายไปขวา (ล่าง)





ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของ Blank และสารมาตรฐาน Bispyribac-sodium เรียงจากซ้ายไปขวา (บน)

โครมาโตแกรมของ Blank และสารมาตรฐาน Paraquat dichloride เรียงจากซ้ายไปขวา (ล่าง)

6. การประมาณค่าความไม่แน่นอน

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช diuron, cyhalofop-butyl, oxadiazon, metribuzin, bispyribac-sodium และ paraquat dichloride พบว่า ประมาณค่าความไม่แน่นอนเป็น ± 0.806 , ± 0.961 , ± 0.54 , ± 0.70 , ± 0.14 และ ± 0.78 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ ไดยูรอน (diuron), ไซฮาโลฟอป-บิวทิว (cyhalofop-butyl) ออกซาไดอะซอน (oxadiazon), เมทริบูซิน (metribuzin), บิสไพริแบค-โซเดียม (bispyribac-sodium) และพาราควอตไดคลอไรด์ (paraquat dichloride) โดยพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี โดยเทคนิค Gas-Liquid Chromatograph (GLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยการทดสอบหาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ของสารออกฤทธิ์ทั้ง 6 ชนิด พบว่า ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working Range) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า r ระหว่าง 0.99951 - 0.99999 ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ ค่า $r \geq 0.995$ ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.110 - 1.227 และ 0.230 - 1.341 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness โดยการเปลี่ยนแปลงตัวแปรหรือปัจจัยบางอย่างในวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ อุณหภูมิ เครื่องมือ อัตราส่วน mobile phase เป็นต้น พบว่า ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.07 - 0.969 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากค่า %Recovery เฉลี่ยแต่ละความเข้มข้น อยู่ระหว่าง 98.53% - 101.26% ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 10 ของ AOAC นอกจากนี้การศึกษาความสามารถในการแยกและความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ต่อสารที่วิเคราะห์ทั้ง 6 ชนิด พบว่า ให้ผลการทดสอบเหมือนกันคือให้พีคของสารทดสอบชัดเจน ไม่มีพีคอื่นมารบกวน

พีคของสาร แสดงว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกและมีความจำเพาะเจาะจงที่ดีต่อสารที่ทำการทดสอบ และมีการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty) ตามวิธีวิเคราะห์ของสารออกฤทธิ์ diuron, cyhalofop-butyl, oxadiazon, metribuzin, bispyribac-sodium และ paraquat dichloride ได้เท่ากับ ± 0.806 , ± 0.961 , ± 0.54 , ± 0.70 , ± 0.14 และ ± 0.78 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ ดังนั้น การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืช ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไปขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรในห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมคุณภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตร ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535
2. สามารถใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาและดัดแปลงขึ้น เผยแพร่และถ่ายทอดให้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาค ส่วนภาครัฐหรือภาคเอกชน และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ
3. ใช้ยื่นขอขยายขอบข่ายการรับรองคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO/IEC 17025

11. เอกสารอ้างอิง

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

กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2550. นักวิเคราะห์มืออาชีพสาขาเคมี. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรุงเทพฯ. กลุ่มวิจัยพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2554. สารกำจัดวัชพืช. คำแนะนำการควบคุมวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช ปี 2554. กลุ่มวิจัยพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537 การขึ้นทะเบียนวัตถุพิษการเกษตรในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ซาลิธีธุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.

ดุขฎี มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation) เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

นิรนาม. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร.
กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิรนาม. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี.เอกสารประกอบการอบรม
สัมมนาวิชาการ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันอาหาร.

นันทนา กัญยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี.สำนัก
อุตสาหกรรมพื้นฐาน. กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและการเหมืองแร่. กรุงเทพฯ. รายงานวิชาการ ฉบับที่ สอพ
1 /2555.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2558. “รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทาง
การเกษตร พ.ศ. 2558.” [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา
http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content&view=article&id=2_2_:stat535&catid=29:stat&Itemid=104 (27 พฤษภาคม 2560)

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

Anonymous. *Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations*. This document is an improved version of document. CIPAC 3807.

AOAC official methods of analysis. 2012. Guidelines for standard method performance requirements Appendix F, p. 9.

BCPC : *The e-Pesticide Manual* . [CD-ROM]. (Thirteenth Edition) Version 3.0 BCPC. (British Crop Protection Council), 2006.

EURACHEM Guide. 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical Method: A Laboratory. Guide to Method Validation and Related Topics*. United Kingdom.

Harwood, J.L. 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 39: 101-138

Kidd, H. and James, D.R. 1991. *The Agrochemicals Handbook*. 3rd Ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge. England.

Ludwig, H. 1998. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Interpharm Press. USA.

Mill, J.N. and Mill, J.C. *Statistics and chemometrics for analytical chemical*. 5th Ed. Pearson Education Limited. England, 2005 ,p 92

