

## รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชื่อชุดโครงการ      วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. ชื่อโครงการ          วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง

การทดลองที่ 1.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชของห้องปฏิบัติการพื้นที่ภาคเหนือตอนบน (2559-2561) กลุ่มสารกำจัดแมลง แลมป์ดา ไซฮาโลทริน (lambda cyhalothrin) และกลุ่มสารกำจัดวัชพืช พาราควอท ไดคลอไรด์ (paraquat dichloride)

Method validation on Active Ingredient of lambda cyhalothrin and paraquat dichloride by OARD1's Laboratory (2016-2018)

### 4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางนงพงา โอลเสน	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1
ผู้ร่วมงาน	นางเนาวรัตน์ ตั้งมันคงวรกุล	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1
	นายสาคร นิยมสัจย์	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

### 5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin และ paraquat dichloride ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช สูตรผสมชนิด Emulsifiable concentrate (EC) โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Chromatography วิธีนี้ให้ผลการทดสอบช่วงของการวัด (Range) ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.50 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) พิจารณาจากค่า % Recovery ความเที่ยง (Precision) โดยการตรวจสอบจากค่า Repeatability และ Intermediate precision การตรวจสอบความคงทน (Robustness และ Ruggedness) ระหว่างคอลัมน์ 2 ชนิด และผู้ทดสอบ 2 คน เกณฑ์การยอมรับของ AOAC ค่า HORRAT  $\leq 2$  จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีการนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ที่ได้ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับในระดับสากล

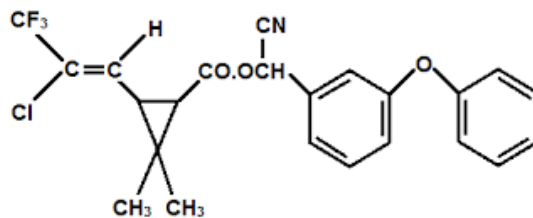
### Abstract

Method validation of lambda cyhalothrin and paraquat dichloride in agricultural toxic substances with emulsifiable concentration EC by chromatography technique. Range was

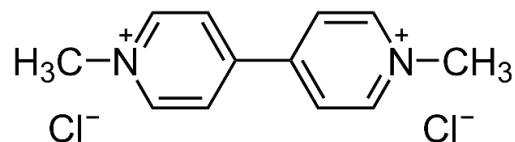
between 0.05 and 2.00 mg./ml. Linearity was from 0.5 to 1.50 mg./ml. including other parameters such as accuracy which determine by % recovery, precision with both repeatability and intermediate precision, robustness and ruggedness. All parameters were proved to be accepted with AOAC which HORRAT  $\leq 2$ . This method can apply to substances: lambda cyhalothrin and paraquat dichloride for the accurate, precise and consistence result.

## 6. คำนำ

lambda cyhalothrin เป็นสารเคมีที่ใช้กำจัดแมลงต่างๆ เป็นสารกลุ่ม ไพรีทรอยด์ (pyrethroids) มีพิษต่อระบบประสาท มีการใช้อย่างแพร่หลาย มีชื่อตาม International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) คือ 3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2,2-dimethyl-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl cyclopropanecarboxylate มีสูตรโมเลกุล  $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$  มีสูตรโครงสร้างคือ



Paraquat dichloride เป็นสารเคมีที่ใช้ป้องกันและกำจัดวัชพืช มีพิษต่อระบบประสาท มีการใช้อย่างแพร่หลาย มีชื่อตาม International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) คือ 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride มีสูตรโมเลกุล  $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$  มีสูตรโครงสร้างคือ



คุณภาพของสารกำจัดศัตรูพืชตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายปี 2535 นั้นจะตรวจหาชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ ตรงตามข้อมูลที่ระบุไว้ในฉลากหรือข้อมูลที่แจ้งไว้ก่อนขึ้นทะเบียนหรือไม่ ทั้งนี้เพื่อควบคุมให้ผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษทางการเกษตรที่จำหน่ายในท้องตลาดมีคุณภาพดีและมีความสำคัญมากต่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ถ้าคุณภาพไม่ดีหรือไม่ได้มาตรฐาน ทำให้การป้องกันกำจัดไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้มีการใช้เกินกว่าคำแนะนำและอาจมีผลกระทบต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมรวมทั้งทำให้เกิดการตกค้างในพืชและสิ่งแวดล้อมได้

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin และ paraquat dichloride ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร มีการอ้างอิงใน Analytical of Technical and Formulated Pesticides, CIPAC handbook Vol. G, E และ N ตามลำดับ เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่สามารถปฏิบัติตามกระบวนการตามวิธีมาตรฐานได้ทั้งหมด ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการจึงตัดแปลงวิธีทดสอบจากวิธีมาตรฐาน เพื่อให้วิธีที่ทางห้องปฏิบัติการตัดแปลงความเหมาะสมต่อการใช้งาน จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตาม

หลักเกณฑ์ของมาตรฐานสากล สามารถยืนยันความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ (ดุขฎฐฎและอุมฎพร, 2544) โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2017 จะต้องมีการทดสอบ Range, Linearity, Precision, Accuracy, Robustness, Ruggedness, Specificity และ Selectivity (กนกพรและทฎพวรวรณ, 2547) เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถวิเคราะห์ lambda cyhalothrin และ paraquat dichloride ให้มีความเหมาะสมต่อห้องปฏิบัติการและมีความถูกต้อง (Accuracy) มีความแม่นยำ (Precision) เป็นที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์สากล

## 7. วิธีดำเนินการ

### 7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ประกอบด้วย
  - 1.1 หัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
  - 1.2 เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ
  - 1.3 เครื่องประมวลผล Data Processing Unit
2. เครื่องลึควิดโครมาโตกราฟ ประกอบด้วย
  - 1.4 หัวตรวจวัดชนิด Diode Array (DAD)
  - 1.5 เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ
  - 1.6 เครื่องประมวลผล Data Processing Unit
3. เครื่องชั่ง Range 0.00001 – 220 g ความละเอียด 4-5 ตำแหน่ง
4. Freezer Range 0 ถึง - 20 °C
5. Ultrasonic Bath
6. เครื่องวัดความหนาแน่นของสาร
7. Volumetric Flask, Class A ขนาด 10 และ 25 ml (Calibrated)
8. Pasture Pipette
9. Beaker ขนาด 50 และ 100 ml
10. Vial ขนาด 2 ml

### 7.2 สารเคมี

1. สารมาตรฐาน lambda cyhalothrin 99.1%
2. สารมาตรฐาน paraquat dichloride 82.5 %
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ lambda cyhalothrin สูตร emulsifiable concentrates (EC) 2.5% AI
4. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ paraquat dichloride สูตร emulsifiable concentrates (EC) 27.6% AI
5. acetone AR grade
6. acetonitrile HPLC grade

### 7.3 วิธีการ

#### ก. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ lambda cyhalothrin

##### 1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin

###### 1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน lambda cyhalothrin

ชั่งสารมาตรฐาน lambda cyhalothrin ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม ( $\pm 1.0$  มิลลิกรัม) จำนวน 10 ซ้ำ ( $C_1 - C_{10}$ ) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย Ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับด้วย acetone

###### 1.2 การปรับตั้งสถานะเครื่อง GC-FID ตามคู่มือการใช้งาน GC เครื่อง GC 6890

Column : Capillary column HP-Ultra 1, 25 m  $\times$  320  $\mu$ m  $\times$  0.17  $\mu$ m

Injection System

Injection:	Split Injection
Split Ratio:	50 : 1
Split Flow:	100 mL/min
Injection Volume:	1 $\mu$ l

Detector: Flame Ionization

Temperature

Oven Temperature Program

Initial Temp	180 °C	hold	0 min
20 °C/ min	250 °C	hold	3 min
10 °C/ min	280 °C	hold	3 min
Injection	: 260 °C		
Detector	: 260 °C		

Gas Flow Rate

Helium	: 2 mL/min
Hydrogen	: 30 mL/min
Air	: 400 mL/min
Nitrogen	: 40 mL/min

###### 1.3 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID

เมื่อปรับสถานะของเครื่อง GC-FID เรียบร้อยแล้วให้สังเกตหรือรอจน Baseline เรียบ ทดสอบการฉีดด้วยสารละลายมาตรฐาน  $C_A$  และ  $C_B$  สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า Response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น lambda cyhalothrin ตามลำดับการคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin ในสูตรสารเข้มข้น

สูตรการคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ในตัวอย่าง

$$\%w/v \text{ สารออกฤทธิ์} = \frac{Hw \times f \times Dw \times SG}{W \times Ds}$$

เมื่อ  $f = \frac{S \times P}{Hs}$

S = น้ำหนัก 1st Standard (mg)

P = เปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของ 1st Standard

Hs = พื้นที่ใต้ Peak หรือความสูง Peak ของ Standard

W = น้ำหนักตัวอย่าง (mg)

Hw = พื้นที่ใต้ Peak หรือความสูง Peak ของตัวอย่าง

Dw = ความเจือจางของตัวอย่าง

Ds = ความเจือจางของ Standard

SG = ค่าความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.)

จากนั้นคำนวณค่า %RPD (Relative Percent Difference)

สูตร  $\% RPD = \frac{\text{ผลการทดสอบครั้งที่ 1} - \text{ผลการทดสอบครั้งที่ 2} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองครั้ง}}$

## 2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin 2.5% (w/v) EC

### 2.1 การตรวจสอบช่วงการวัด Range

2.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน lambda cyhalothrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้นคือ 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

2.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ที่เตรียมสภาวะเครื่องแล้ว โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

2.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย lambda cyhalothrin (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

### 2.2 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง Linearity

2.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ 0.50, 0.70, 0.90, 1.00, 1.20 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย lambda cyhalothrin (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

## 2.3 การตรวจความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการ

### 2.3.1 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Repeatability)

2.3.1.1 ซ้ำผลิตภัณฑ์ lambda cyhalothrin สูตร EC ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับด้วย acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath 5 นาที ปรับด้วย acetone ตามปริมาตรที่กำหนดไว้ แบ่งใส่ขวด vial 2 มิลลิลิตร

2.3.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ ที่เตรียมจากข้อ 2.3.1.1 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย lambda cyhalothrin (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) และประเมินค่า HORRAT  $\leq 2$  ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

สูตรการคำนวณ

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

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

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

### 2.3.2 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Intermediate precision)

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์ lambda cyhalothrin สูตร EC ทำตามข้อ 2.3.1.1 (ต่างวันและเวลา รวม 10 ซ้ำ) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย lambda cyhalothrin (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) และประเมินค่า HORRAT  $\leq 2$  ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU

## 2.4 ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ

2.4.1 วิเคราะห์หาปริมาณ lambda cyhalothrin ที่สภาวะการใช้งาน ใช้คอลัมน์ชนิด Ultra 1 กับ HP-5 และ เปรียบเทียบผู้ทดสอบที่ 1 และ ผู้ทดสอบที่ 2

2.4.2 เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน เพื่อทำ Standard calibration curve

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ lambda cyhalothrin 2.5% w/v EC เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยซ้ำผลิตภัณฑ์ lambda cyhalothrin 2.5% w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 500, 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin โดยการฉีดสารละลายข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC-FID แล้วเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ Standard calibration curve คำนวณตามนี้

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \% \text{RSD}_{\text{exp}} / \% \text{RSD}_{\text{Horwitz}} \\ \% \text{RSD}_{\text{Horwitz}} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ C &= \text{Concentration ratio} \end{aligned}$$

## 2.5 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน lambda cyhalothrin ที่ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำ Standard calibration curve

2.5.2 เตรียม Stock ของสารมาตรฐาน lambda cyhalothrin ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสาร lambda cyhalothrin ปริมาณ 252.27 มิลลิกรัม ใส่ลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ใส่ลงขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับด้วย acetone

### 2.5.3 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ดูดสารละลาย Stock ข้อ 2.5.2 ปริมาตร 2.5, 5 และ 7.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันได้สารละลายของสาร ที่มีความเข้มข้น ของ lambda cyhalothrin เป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

### 2.5.4 เตรียมสารละลาย Stock sample (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่งผลิตภัณฑ์ lambda cyhalothrin สูตร EC หนัก 41,841 มิลลิกรัม ใส่ลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ใส่ลงขวดวัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับด้วย acetone

### 2.5.5 เตรียมสารละลายเพื่อหา Original sample

ดูดสารละลาย stock sample จากข้อ 2.5.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันและแบ่งใส่ขวด Vial 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า O

### 2.5.6 เตรียมสารละลาย Fortified sample

โดยทำ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลาย stock sample จากข้อ 2.5.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด จากนั้นดูด สารละลาย Stock. 2.5, 5 และ 7.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขวด ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า F

### 2.5.7 การประเมินค่า Accuracy จาก %Recovery

$$\% \text{Recovery} = \frac{F - O}{C} \times 100$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร lambda cyhalothrin ในสารละลาย fortified sample (มก./25 มล)

O คือ ปริมาณสาร lambda cyhalothrin ในสารละลาย original sample (มก./25 มล)

C คือ ปริมาณ added sample (มก)

ค่า %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 98-103% ตามเกณฑ์ AOAC

### ข. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ paraquat dichloride

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride

1.1 การเตรียมตัวทำละลายA ประกอบด้วย acetonitrile และ water อัตราส่วน 1:3

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน paraquat dichloride

ซึ่งสารมาตรฐาน paraquat dichloride ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม ( $\pm 1.0$  มิลลิกรัม) จำนวน 10 ซ้ำ ( $C_1 - C_{10}$ ) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลายA เขย่าให้เข้ากันด้วย Ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับด้วยตัวทำละลายA

1.3 การปรับตั้งสถานะเครื่อง HPLC ตามคู่มือการใช้งาน HPLC เครื่อง HPLC 1290

Column : 30 × 4.6 mm ,1.8 $\mu$  Hypersil BDS C18

Mobile phase : Acetonitrile : 0.1M Heptane sulfonic acid sodium salt in Water 90 : 10

Flow rate : 0.40 ml/min

Detector : DAD

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC

เมื่อปรับสถานะของเครื่อง HPLC เรียบร้อยแล้วให้สังเกตหรือรอจน Baseline เรียบ ทดสอบด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐาน  $C_A$  และ  $C_B$  สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า Response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1%

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride ในสูตรสารเข้มข้น

สูตรการคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ในตัวอย่าง

$$\%w/v \text{ สารออกฤทธิ์} = \frac{H_w \times f \times D_w \times SG}{W \times D_s}$$

$$\text{เมื่อ } f = \frac{S \times P}{H_s}$$

S = น้ำหนัก 1st Standard (mg)

P = เปอร์เซนต์ความบริสุทธิ์ของ 1st Standard

H<sub>s</sub> = พื้นที่ใต้ Peak หรือความสูง Peak ของ Standard

W = น้ำหนักตัวอย่าง (mg)

H<sub>w</sub> = พื้นที่ใต้ Peak หรือความสูง Peak ของตัวอย่าง

D<sub>w</sub> = ความเจือจางของตัวอย่าง

D<sub>s</sub> = ความเจือจางของ Standard

SG = ค่าความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.)



จากนั้นคำนวณค่า %RPD (Relative Percent Difference)

$$\text{สูตร } \% \text{ RPD} = \frac{\text{ผลการทดสอบครั้งที่ 1} - \text{ผลการทดสอบครั้งที่ 2} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบทั้งสองครั้ง}}$$

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride 27.6% (w/v) EC

### 2.1 การตรวจสอบช่วงการวัด Range

2.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน paraquat dichloride ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน เติมตัวทำละลาย A และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้นคือ 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC ที่เตรียมสถานะเครื่องแล้ว โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

2.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย paraquat dichloride (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณช่วงความเป็นเส้นตรง

### 2.2 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง Linearity

2.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ 0.50, 0.70, 0.90, 1.00, 1.20 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย paraquat dichloride (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณช่วงความเป็นเส้นตรง

### 2.3 การตรวจความแม่นยำ (Precision) ของวิธีการ

#### 2.3.1 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Repeatability)

2.3.1.1 ชั่งผลิตภัณฑ์ paraquat dichloride สูตร EC ( $\pm 0.1$  มิลลิกรัม) ให้มีความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับด้วย ตัวทำละลาย A ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath 5 นาที ปรับด้วยตัวทำละลาย A ตามปริมาตรที่กำหนดไว้ แบ่งใส่ขวด vial 2 มิลลิลิตร

2.3.1.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride ในสารละลายของผลิตภัณฑ์ ที่เตรียมจากข้อ 2.3.1.1 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย paraquat dichloride (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณช่วงความเป็นเส้นตรง คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) และประเมินค่า  $\text{HORRAT} \leq 2$  ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex

สูตรการคำนวณ

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \% \text{RSD}_{\text{exp}} / \% \text{RSD}_{\text{Horwitz}} \\ \% \text{RSD}_{\text{Horwitz}} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ C &= \text{Concentration ratio} \end{aligned}$$

### 2.3.2 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Intermediate precision))

เตรียมสารละลายผลิตภัณฑ์ paraquat dichloride สูตร EC ทำตามข้อ 2.3.1.1 (ต่างวันและเวลา) แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย paraquat dichloride (แกน X) กับค่า Response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง คำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Relative standard deviation, RSD) และประเมินค่า HORRAT  $\leq 2$  ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU

### 2.4 ตรวจสอบ Robustness / Ruggedness ของวิธีการ

2.4.1 วิเคราะห์หาปริมาณ paraquat dichloride ที่สภาวะการใช้งาน ใช้คอลัมน์ชนิด Hypersil ODS กับ BDS และ เปรียบเทียบผู้ทดสอบที่ 1 กับผู้ทดสอบที่ 2

2.4.2 เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน เพื่อทำ Standard calibration curve

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ paraquat dichloride 27.6% w/v EC เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ paraquat dichloride 27.6% w/v EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 500, 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย A เขย่าให้เข้ากันด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย A

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride โดยการฉีดสารละลายข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC-FID แล้วเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ Standard calibration curve คำนวณตามนี้

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

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

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

### 2.5 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน paraquat dichloride ที่ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำ Standard calibration curve

2.5.2 เตรียม Stock ของสารมาตรฐาน paraquat dichloride ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสาร paraquat dichloride ปริมาณ 252.27 มิลลิกรัม ใส่ลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย A ใส่ลงขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับด้วยตัวทำละลาย A acetone

2.5.3 เตรียมสารละลาย เพื่อวาดกราฟ

ดูดสารละลาย Stock ข้อ 2.5.2 ปริมาตร 2.5, 5 และ 7.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย A เขย่าให้เข้ากันได้สารละลายของสาร ที่มีความเข้มข้น ของ

paraquat dichloride เป็น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

#### 2.5.4 เตรียมสารละลาย Stock sample (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ซึ่งผลิตภัณฑ์ paraquat dichloride สูตร EC หน้า 41,841 มิลลิกรัม ใส่ลงบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย A ใส่ลงขวดวัดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เข้ากันด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 5 นาที ปรับด้วยตัวทำละลาย A acetone

#### 2.5.5 เตรียมสารละลายเพื่อหา Original sample

ดูดสารละลาย Stock sample จากข้อ 2.5.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย A เขย่าให้เข้ากันและแบ่งใส่ขวด vial 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ค่า O

#### 2.5.6 เตรียมสารละลาย Fortified sample

โดยทำ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลาย Stock sample จากข้อ 2.5.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด จากนั้นดูดสารละลาย Stock 2.5, 5 และ 7.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขวด ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า F

#### 2.5.7 การประเมินค่า Accuracy จาก %Recovery

$$\%Recovery = \frac{F - O}{C} \times 100$$

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร paraquat dichloride ในสารละลาย fortified sample (มก./25 มล)

O คือ ปริมาณสาร paraquat dichloride ในสารละลาย original sample (มก./25 มล)

C คือ ปริมาณ added sample (มก)

ค่า %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 98-103% ตามเกณฑ์ AOAC

7.4 ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 เชียงใหม่

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ lambda cyhalothrin ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ผลการทดสอบพบว่า

1. Range ช่วงที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 2.00 mg/ml correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99990 (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** การตรวจสอบช่วงของการวัด Range ความเข้มข้น 0.05 – 2.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.05	25.05045	1
0.10	53.68559	2
0.50	307.66888	3
1.00	632.89850	4
1.50	941.55615	5
2.00	1239.01147	6

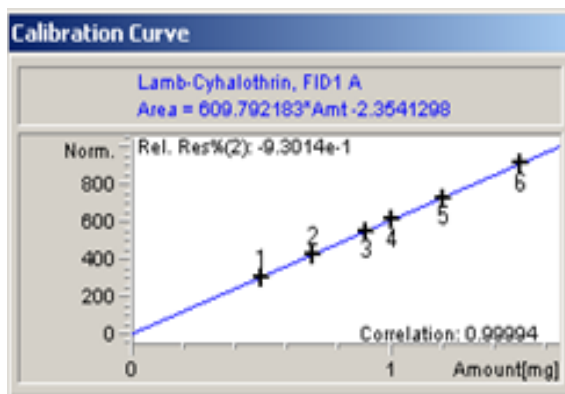
การตรวจสอบช่วงการวัด Range มีค่า 0.05 – 2.00 mg/ml ค่าของ Correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99990

2. Linearity หรือความสัมพันธ์เส้นตรง ระหว่าง Response กับปริมาณของสารที่วิธีทดสอบสามารถทำได้ความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง Linearity ความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.50	298.50378	1
0.70	420.55197	2
0.90	549.55000	3
1.00	610.00000	4
1.20	730.33000	5
1.50	910.88000	6

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง Linearity ที่ความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml ได้ค่า Correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99994



รูปภาพที่ 1 Linearity

### 3. Precision จากการทำ

3.1 Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ แสดงผลในรูปของ %RSD ได้ค่า HORRAT

**ตารางที่ 3** เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบที่ 3 ความเข้มข้น จากการทำซ้ำ (Repeatability)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml			
	น้ำหนัก(mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ		
1	500.10	2.50	1000.00	2.53	1500.00	2.43		
2	500.10	2.45	1000.00	2.47	1500.10	2.49		
3	500.10	2.47	1000.00	2.44	1500.20	2.50		
4	500.20	2.44	1000.00	2.48	1500.00	2.51		
5	500.20	2.50	1000.00	2.53	1500.10	2.53		
6	500.30	2.48	1000.00	2.49	1500.10	2.46		
7	500.10	2.46	1000.00	2.47	1500.00	2.44		
8	500.20	2.52	1000.00	2.44	1500.10	2.50		
9	500.10	2.47	1000.00	2.46	1500.20	2.51		
10	500.10	2.51	1000.00	2.51	1500.20	2.45		
<b>Mean</b>		2.48	<b>Mean</b>		2.482	<b>Mean</b>		2.482
<b>SD</b>		0.0253	<b>SD</b>		0.0312	<b>SD</b>		0.0325
<b>%RSD</b>		1.0201	<b>%RSD</b>		1.2587	<b>%RSD</b>		1.3093
<b>Predicted Horwitz RSD</b>		1.317149359	<b>Predicted Horwitz RSD</b>		1.287025367	<b>Predicted Horwitz RSD</b>		1.28138004
<b>HORRAT</b>		0.7745	<b>HORRAT</b>		0.9780	<b>HORRAT</b>		1.0218

3.2 Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD ของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิมแต่ช่วงเวลาต่างกัน (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบที่ 3 ความเข้มข้น จากการทวนซ้ำ (Reproducibility)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	500.10	2.45	1000.00	2.48	1500.10	2.50
2	500.20	2.38	1000.00	2.50	1500.00	2.45
3	500.00	2.48	1000.00	2.42	1500.10	2.44
4	500.10	2.43	1000.00	2.45	1500.00	2.43
5	500.10	2.41	1000.00	2.42	1500.20	2.45
6	500.20	2.42	1000.00	2.43	1500.10	2.42
7	500.00	2.49	1000.00	2.41	1500.00	2.43
8	500.10	2.38	1000.00	2.48	1500.10	2.50
9	500.00	2.40	1000.00	2.41	1500.00	2.40
10	500.20	2.44	1000.00	2.39	1500.10	2.43

Mean	2.428	Mean	2.439	Mean	2.445
SD	0.0360	SD	0.0348	SD	0.0307
%RSD	1.4827	%RSD	1.4256	%RSD	1.2573
Predicted Horwitz RSD	1.26355224	Predicted Horwitz RSD	1.269179554	Predicted Horwitz RSD	1.287185777
HORRAT	1.1734	HORRAT	1.1233	HORRAT	0.9768

4. Robustness ผลการตรวจสอบ Robustness จากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยน Column ในการวิเคราะห์จาก Capillary Column Ultra-1 เป็น HP-5 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบ Robustness

n	ความเข้มข้น 1.00 mg/ml			
	Column Ultra-1		Column HP-5	
	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	1000.00	2.45	1000.00	2.47
2	1000.00	2.42	1000.00	2.50
3	1000.00	2.48	1000.00	2.48
4	1000.00	2.43	1000.00	2.45
5	1000.00	2.45	1000.00	2.48
6	1000.00	2.46	1000.00	2.50
7	1000.00	2.47	1000.00	2.48
8	1000.00	2.45	1000.00	2.45
9	1000.00	2.5	1000.00	2.45
10	1000.00	2.45	1000.00	2.46
Mean		2.456	Mean	2.456
SD		0.0220	SD	0.0190
%RSD		0.8958	%RSD	0.7718
Predicted Horwitz RSD		1.335775875	Predicted Horwitz RSD	1.357130358
HORRAT		0.6706	HORRAT	0.5687

5. Ruggedness ผลการตรวจสอบจากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบ Ruggedness

n	ความเข้มข้น 1.00 mg/ml			
	ผู้ทดสอบที่ 1		ผู้ทดสอบที่ 2	
	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	1000.00	2.45	1000.00	2.49
2	1000.00	2.50	1000.00	2.50
3	1000.00	2.50	1000.00	2.45

4	1000.00	2.45	1000.00	2.47
5	1000.00	2.48	1000.00	2.49
6	1000.00	2.45	1000.00	2.45
7	1000.00	2.49	1000.00	2.50
8	1000.00	2.50	1000.00	2.46
9	1000.00	2.48	1000.00	2.45
10	1000.00	2.47	1000.00	2.50
Mean		2.477	Mean	2.476
SD		0.0200	SD	0.0211
%RSD		0.8084	%RSD	0.8510
Predicted Horwitz				
RSD		1.350476761	Predicted Horwitz RSD	1.343119521
HORRAT		0.5986	HORRAT	0.6336

6. Accuracy ความถูกต้องของวิธีทดสอบหาในรูปของ %Recovery ได้ %Recovery 98.59-100.57 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์ในสูตร EC

n	Spiked level 0.5013 mg/ml				Spiked level 1.0025 mg/ml				Spiked level 1.5038 mg/ml			
	(A)	(B)	(C)	%Recovery	(A)	(B)	(C)	%Recovery	(A)	(B)	(C)	%Recovery
	ปริมาณสารตั้งต้น (mg/ml)	ปริมาณสารที่พบทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณสารที่ได้ (mg/ml)		ปริมาณสารตั้งต้น (mg/ml)	ปริมาณสารที่พบทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณสารที่ได้ (mg/ml)		ปริมาณสารตั้งต้น (mg/ml)	ปริมาณสารที่พบทั้งหมด (mg/ml)	ปริมาณสารที่ได้ (mg/ml)	
1	0.4032	0.8832	0.4800	98.52	0.4032	1.3832	0.9800	100.57	0.4032	1.8632	1.4600	99.89
2	0.4032	0.8836	0.4804	98.60	0.4032	1.3836	0.9804	100.62	0.4032	1.8640	1.4608	99.95
3	0.4032	0.8832	0.4800	98.52	0.4032	1.3832	0.9800	100.57	0.4032	1.8652	1.4620	100.03
4	0.4032	0.8832	0.4800	98.52	0.4032	1.3832	0.9800	100.57	0.4032	1.8648	1.4616	100.00
5	0.4032	0.8836	0.4804	98.60	0.4032	1.3836	0.9804	100.62	0.4032	1.8648	1.4616	100.00
6	0.4032	0.8836	0.4804	98.60	0.4032	1.3824	0.9792	100.49	0.4032	1.8640	1.4608	99.95
7	0.4032	0.8840	0.4808	98.69	0.4032	1.3832	0.9800	100.57	0.4032	1.8652	1.4620	100.03
8	0.4032	0.8840	0.4808	98.69	0.4032	1.3828	0.9796	100.53	0.4032	1.8632	1.4600	99.89
9	0.4032	0.8836	0.4804	98.60	0.4032	1.3832	0.9800	100.57	0.4032	1.8656	1.4624	100.05
10	0.4032	0.8832	0.4800	98.52	0.4032	1.3832	0.9800	100.57	0.4032	1.8652	1.4620	100.03
Mean			0.4803	98.59			0.9800	100.57			1.4613	99.98
SD			0.00032	0.0648			0.00035	0.0359			0.00087	0.0592
RSD <sub>r</sub>				0.0657				0.0357				0.0592
Predicted RSD <sub>r</sub>				4.1692				3.7449				3.5263
HORRAT				0.02				0.01				0.02

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ paraquat dichloride ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ผลการทดสอบพบว่า

1. Range ช่วงที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.05 – 2.00 mg/ml correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99990 (ตารางที่ 8)

**ตารางที่ 8** การตรวจสอบช่วงของการวัด Range ความเข้มข้น 0.05 – 2.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.05	617.34000	1
0.10	1183.40000	2
0.50	4514.40000	3
1.00	8979.00000	4
1.50	13573.00000	5
2.00	17638.00000	6

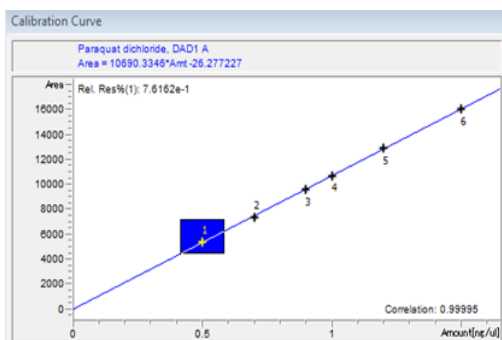
การตรวจสอบช่วงการวัด Range มีค่า 0.05 – 2.00 mg/ml ค่าของ Correlation Coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99990

2. Linearity หรือความสัมพันธ์ ระหว่าง Response กับปริมาณของสารที่วิธีทดสอบสามารถทำได้ ค่าความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 (ตารางที่ 9)

**ตารางที่ 9** การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง Linearity ความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.50	5359.40000	1
0.70	7356.30029	2
0.90	9556.30000	3
1.00	10683.00000	4
1.20	12850.00000	5
1.50	16015.00000	6

การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง Linearity ที่ความเข้มข้น 0.50 – 1.50 mg/ml ได้ค่า correlation coefficient (r) มีค่าเท่ากับ 0.99994



รูปภาพที่2 Linearity



### 3. Precision จากการทำ

3.1 Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ แสดงผลในรูปของ %RSD ได้ค่า HORRAT

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบที่ 3 ความเข้มข้น จากการทำซ้ำ (Repeatability)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	45.30	27.05	90.60	27.15	135.90	27.11
2	45.30	27.13	90.50	27.60	135.90	27.45
3	45.30	27.40	90.40	27.45	135.80	27.36
4	45.40	27.45	90.40	27.38	135.80	27.64
5	45.40	27.60	90.60	27.33	135.90	27.20
6	45.40	27.52	90.50	27.56	135.80	27.10
7	45.30	27.38	90.60	27.62	135.70	27.40
8	45.40	27.52	90.40	27.54	135.90	27.28
9	45.30	27.34	90.30	27.10	135.90	27.53
10	45.40	27.61	90.30	27.22	135.90	27.22
	Mean	27.4	Mean	27.395	Mean	27.329
	SD	0.1774	SD	0.1806	SD	0.1700
	%RSD	0.6475	%RSD	0.6591	%RSD	0.6221
	Predicted Horwitz RSD	1.382281956	Predicted Horwitz RSD	1.379739637	Predicted Horwitz RSD	1.388015378
	HORRAT	0.4685	HORRAT	0.4777	HORRAT	0.4482

3.2 Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD ของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิมแต่ช่วงเวลาต่างกัน ได้ค่า HORRAT (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบที่ 3 ความเข้มข้น จากการทวนซ้ำ (Reproducibility)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	45.40	27.10	90.50	27.45	135.80	27.49
2	45.40	27.22	90.40	27.12	135.80	27.39
3	45.30	27.56	90.90	27.11	135.80	27.60
4	45.30	27.39	90.60	27.6	135.80	27.21
5	45.40	27.45	90.60	27.62	135.40	27.15
6	45.40	27.60	90.60	27.45	135.40	27.34
7	45.40	27.19	90.60	27.56	135.50	27.58
8	45.40	27.11	90.60	27.49	135.40	27.59
9	45.40	27.22	90.50	27.23	135.40	27.60

10	90.50	27.20	90.50	27.1	135.40	27.10
	Mean	27.304	Mean	27.373	Mean	27.405
	SD	0.1729	SD	0.2003	SD	0.1867
	%RSD	0.6333	%RSD	0.7318	%RSD	0.6813
	Predicted Horwitz RSD	1.385459339	Predicted Horwitz RSD	1.364760053	Predicted Horwitz RSD	1.374989541
	HORRAT	0.4571	HORRAT	0.5362	HORRAT	0.4955

4. Robustness ผลการตรวจสอบ Robustness จากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยน Column ในการวิเคราะห์จาก Column Hypersil BDS C18 เป็น Column Hypersil ODS C18

ตารางที่ 12 Robustness

ความเข้มข้น 1.00 mg/ml				
n	Hypersil BDS C18		Hypersil ODS C18	
	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	90.30	27.45	90.40	27.60
2	90.30	27.45	90.40	27.50
3	90.40	27.55	90.50	27.60
4	90.40	27.60	90.50	27.50
5	90.50	27.50	90.50	27.55
6	90.50	27.58	90.50	27.58
7	90.50	27.60	90.50	27.56
8	90.60	27.50	90.60	27.60
9	90.60	27.60	90.60	27.45
10	90.60	27.58	90.60	27.54
	Mean	27.541	Mean	27.541
	SD	0.0579	SD	0.0486
	%RSD	0.2101	%RSD	0.1764
	Predicted Horwitz RSD	1.543582303	Predicted Horwitz RSD	1.568649022
	HORRAT	0.1361	HORRAT	0.1125

5. Ruggedness ผลการตรวจสอบจากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ

ตารางที่ 13 Ruggedness

ความเข้มข้น 1.00 mg/ml				
n	ผู้ทดสอบที่ 1		ผู้ทดสอบที่ 2	
	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	90.30	27.55	90.30	27.60
2	90.30	27.48	90.30	27.50

3	90.30	27.57	90.40	27.60
4	90.50	27.60	90.40	27.58
5	90.50	27.60	90.50	27.45
6	90.50	27.59	90.50	27.60
7	90.60	27.54	90.50	27.58
8	90.60	27.55	90.60	27.45
9	90.60	27.60	90.70	27.50
10	90.70	27.50	90.70	27.60
Mean		27.558	Mean	27.546
SD		0.0404	SD	0.0605
%RSD		0.1468	%RSD	0.2197
Predicted Horwitz RSD		1.595007495	Predicted Horwitz RSD	1.537166668
HORRAT		0.0920	HORRAT	0.1430

6. Accuracy ความถูกต้องของวิธีทดสอบหาในรูปของ %Recovery

ตารางที่ 14 Accuracyการตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์ในสูตร EC

n	Spiked level 0.4950 mg/ml				Spiked level 0.9901 mg/ml				Spiked level 1.5049 mg/ml			
	ปริมาณสารตั้งต้น	ปริมาณสารที่พบทั้งหมด	ปริมาณสารที่ได้	% Recovery	ปริมาณสารตั้งต้น	ปริมาณสารที่พบทั้งหมด	ปริมาณสารที่ได้	% Recovery	ปริมาณสารตั้งต้น	ปริมาณสารที่พบทั้งหมด	ปริมาณสารที่ได้	% Recovery
1	0.4380	0.9260	0.4880	100.16	0.4380	1.4116	0.9736	99.92	0.4380	1.9000	1.4620	100.03
2	0.4380	0.9248	0.4868	99.92	0.4380	1.4120	0.9740	99.96	0.4380	1.8996	1.4616	100.00
3	0.4380	0.9228	0.4848	99.51	0.4380	1.4120	0.9740	99.96	0.4380	1.8992	1.4612	99.97
4	0.4380	0.9240	0.4860	99.75	0.4380	1.4120	0.9740	99.96	0.4380	1.9000	1.4620	100.03
5	0.4380	0.9256	0.4876	100.08	0.4380	1.4124	0.9744	100.00	0.4380	1.8988	1.4608	99.95
6	0.4380	0.9252	0.4872	100.00	0.4380	1.4124	0.9744	100.00	0.4380	1.9000	1.4620	100.03
7	0.4380	0.9252	0.4872	100.00	0.4380	1.4128	0.9748	100.04	0.4380	1.8996	1.4616	100.00
8	0.4380	0.9256	0.4876	100.08	0.4380	1.4120	0.9740	99.96	0.4380	1.8992	1.4612	99.97
9	0.4380	0.9260	0.4880	100.16	0.4380	1.4120	0.9740	99.96	0.4380	1.8996	1.4616	100.00
10	0.4380	0.9240	0.4860	99.75	0.4380	1.4116	0.9736	99.92	0.4380	1.9000	1.4620	100.03
Mean			0.4869	99.94			0.9741	99.97			1.4616	100.00
SD			0.00103	0.2122			0.00037	0.0377			0.00042	0.0288
RSD <sub>r</sub>			0.2123				0.0377				0.0288	
Predicted RSD <sub>r</sub>			4.1607				3.7483				3.5262	
HORRAT			0.05				0.01				0.01	

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography ที่มีหัวตรวจวัด Detector ชนิด Flame Ionization Detector ด้วย Ultra 1 capillary column (25 m × 320 µm × 0.17 µm)ซึ่งมีสภาวะการใช้งาน Oven Temperature, Injection Temperature, Detector Temperature เท่ากับ 250, 260 และ 260 °C ตามลำดับ Split ratio 50 : 1 Helium 2.0 ml/min, Injection volume 1µl

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า Range ที่ในช่วงความเข้มข้น 0.05-2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99990 และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99994 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าได้ค่า % Recovery อยู่ระหว่าง 98.59 – 100.57 อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC 98-103% สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.7745, 0.9780 และ 1.00218 การตรวจวิเคราะห์ซ้ำ (Intermediate precision) คือต่างวันที่และเวลา ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.1734, 1.1233 และ 0.9768 ตามลำดับ การตรวจค่า Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.6706 และ 0.5687 ค่า Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.5986 และ 0.6336 เกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ค่า HORRAT ≤ 2

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ paraquat dichloride ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography ที่มีหัวตรวจวัดชนิด Diode Array ด้วย column Hypersil BDS C18 ซึ่งมีสภาวะการใช้งานโดยมี Mobile phase เป็น Acetonitrile : 0.1M Heptane sulfonic acid sodium salt in Water Flow rate 0.40 ml/min

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า Range ที่ในช่วงความเข้มข้น 0.05-2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99981 และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.50 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99995 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าได้ค่า % Recovery อยู่ระหว่าง 99.94 – 100.00 อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC 98-103% สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.4685, 0.4777 และ 0.4482 การตรวจวิเคราะห์ซ้ำ (Intermediate precision) คือต่างวันที่และเวลา ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.4571, 0.5362 และ 0.4955 ตามลำดับ การตรวจค่า Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.1361 และ 0.1125 ค่า Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.0920 และ 0.1430 เกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ค่า HORRAT ≤ 2

ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ lambda cyhalothrin และ paraquat dichloride ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยวิธีนี้มีความถูกต้อง แม่นยำและมีความน่าเชื่อถือตามเกณฑ์สากล

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีที่ได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี นำมาใช้เพื่อเป็นมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ สำหรับนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช lambda cyhalothrin และ paraquat dichloride ได้
2. ใช้ทดสอบความสามารถของปฏิบัติการ ทั้งทางด้านบุคลากร อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ว่าสามารถใช้งานเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานสากลได้หรือไม่
3. ใช้เป็นข้อมูลในการขยายขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025
4. เพื่อให้บริการหน่วยงานราชการ เอกชน มหาวิทยาลัย ในด้านการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในวัตถุอันตรายทางการเกษตร

**11. คำขอขอบคุณ** เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างและวัตถุอันตราย กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

## 12. เอกสารอ้างอิง

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

ดุขฎิ มั่นความดี และ อุมาพร สุข่ม่วง (2544). การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation), เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ Instruction manual ของ Agilent Technologies, คู่มือการใช้งาน GC รุ่น GC 6890 (Version B.02.01:November 2006).

A MARTIJN and W DOBRAT., 1993 Analysis of Technical and Formulated Pesticides CIPAC Handbook Volume E Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Great Britain,p. 167-168

W DOBRAT and A MARTIJN., 1995 Analysis of Technical and Formulated Pesticides CIPAC Handbook Volume G Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Great Britain,p. 83-86

W DOBRAT and A MARTIJN., 2012 Analysis of Technical and Formulated Pesticides CIPAC Handbook Volume N Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, Great Britain,p. 83-86

## ภาคผนวก

### นิยาม

๑. Range หมายถึง ช่วงปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบ ซึ่งวิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้
๒. Linearity หมายถึง ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ กับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ (Response) มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง
๓. Accuracy หมายถึง ความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์จากการใช้วิธีที่ใช้ทดสอบนั้น กับค่าอ้างอิงจากตัวอย่างเดียวกัน แสดงผลในรูปของ %Recovery
๔. Precision หมายถึง ความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ แสดงผลในรูปของ %RSD และ ค่า HORRAT จะอธิบายในรูปของการทำ Repeatability และ Reproducibility
๕. Repeatability หมายถึง ผลที่ได้จากการทำซ้ำจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดลองเดียวกัน เครื่องมือเดียวกันภายในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน
๖. Reproducibility หมายถึง ผลการทดสอบที่ได้จากการทำซ้ำโดยห้องปฏิบัติการ หรือผู้ทดสอบ หรือเครื่องมือ หรือระยะเวลาแตกต่างกัน
๗. Robustness หมายถึง คุณสมบัติที่แสดงว่ามีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ เช่น อุณหภูมิ pH เวลาที่ใช้ เป็นต้น
๘. Ruggedness หมายถึง คุณสมบัติ ของ Reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนวันทดสอบ เป็นต้น แต่ผลการทดสอบยังคงเดิม
๙. Specificity หมายถึง การที่วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะกับสารที่ต้องการตรวจวัดเท่านั้น สารชนิดอื่นๆ ไม่มีผลรบกวนการตรวจวัด
๑๐. Selectivity หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบ ที่สามารถแยกสิ่งที่ต้องการออกจากสิ่งเจือปนอื่นได้