

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล (Research and Development on Analytical System of Agricultural Inputs Following the International Standards)
2. **โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร (Research and Development on Analytical System of Agricultural Hazardous Substance Products)
- กิจกรรมที่ 1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** 1.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลง : ไตรอะโซฟอส (triazophos), คาร์โบซัลแฟน (carbosulfan), ไดเมโทเอต (dimethoate), โพรฟีโนฟอส (profenofos) กลุ่มสารกำจัดวัชพืช : ไกลโฟเซต (glyphosate) และกลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืช : คาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชของห้องปฏิบัติการพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน (พ.ศ. 2559-2561)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Method Validation of triazophos carbosulfan dimethoate profenofos glyphosate and carbendazim in Pesticide Formulation

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวปริยานุช สายสุพรรณ	สังกัด	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3
ผู้ร่วมงาน	นางวัชรพร ศรีสว่างวงศ์	สังกัด	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3
ผู้ร่วมงาน	นายจรรพงค์ ประสพสุข	สังกัด	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3

5. บทคัดย่อ

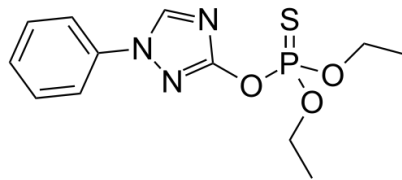
ภารกิจด้านการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรในส่วนภูมิภาค ในเขตพื้นที่รับผิดชอบ 11 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ถือเป็นภารกิจหลักของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เป็นหนึ่งในกระบวนการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากลหรือไม่ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลง : ไตรอะโซฟอส (triazophos), คาร์โบซัลแฟน (carbosulfan), ไดเมโทเอต (dimethoate), โพรฟีโนฟอส (profenofos) กลุ่มสารกำจัดวัชพืช : ไกลโฟเซต (glyphosate) และกลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืช : คาร์เบนดาซิม

(carbendazim) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินผล ด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos, glyphosate และ carbendazim พบว่าให้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.025-4.00 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.050–2.50 mg/ml โดยค่า Correlation of determination (R^2) มีค่าระหว่าง 0.99936-0.99991 (เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$) มีความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ประเมินด้วยค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) อยู่ระหว่าง 0.17-0.66 และการทำซ้ำ (Reproducibility) อยู่ระหว่าง 0.15-0.64 การตรวจสอบค่า Robustness มีค่า HORRAT อยู่ระหว่าง 0.14-0.63 และการตรวจสอบค่า Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ระหว่าง 0.07-0.85 ซึ่งค่าที่ได้ไม่เกิน 2 (เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)) การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการจาก % Recovery ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง สูง มีค่าระหว่าง 98.01-101.53 % อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับ 98-102 % สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ตามเกณฑ์ของ AOAC และมีค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์ เท่ากับ ± 0.60 , ± 0.36 , ± 0.48 , ± 0.54 , ± 0.71 และ ± 0.72 ตามลำดับ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos, glyphosate และ carbendazim ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ได้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้พิสูจน์แล้วว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

6. คำนำ

ไตรอะโซฟอส (Triazophos) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทสารกำจัดแมลงและไร กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (Organophosphorus) ออกฤทธิ์ในทางสัมผัสและกินตาย (cholinesterase inhibitor) สารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงต่อแมลงประเภทกัดกินใบ ดอก ผล แมลงปากดูด เช่นเพลี้ย และหนอนเจาะกิ่ง ลำต้น ผล เป็นต้น อีกทั้งสารในกลุ่มนี้มีราคาไม่สูงมาก นิยมใช้เพื่อกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ หนอนกินใบ หนอนม้วนใบ เพลี้ยหอย เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว และไส้เดือนฝอย ในพืชผักต่างๆ พืชไร่ ข้าว ธัญพืชและผลไม้ เช่น มะเขือเทศ ข้าว ถั่วเหลือง ส้ม สตรอเบอร์รี่ เป็นต้น (กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2537) สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสทั้งหมดเป็นเอสเทอร์ของกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) เป็นสารกำจัดแมลงที่มีคุณสมบัติสำคัญ 2 ประการคือ มีพิษเฉียบพลันต่อมนุษย์และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง สารนี้สามารถสลายตัวได้เร็วหรือตกค้างสั้น จึงถูกนำมาใช้ทดแทนสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) สาร triazophos มีชื่อทางเคมี (IUPAC) ว่า *O,O*-Diethyl *O*-(1-phenyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl) phosphorothioate มีสูตรโมเลกุล (Molecular formular) เป็น $C_{12}H_{16}N_3O_3PS$ มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) เท่ากับ $313,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ สามารถสลายตัวได้เร็วหลังจากใช้ประมาณ 7-14 วัน ลักษณะสูตร เป็นสูตร EC (Emulsifiable Concentrat : สูตรชนิดน้ำมันเข้มข้น) มีลักษณะเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปใช้ต้องทำการเจือจางด้วยน้ำ สารที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำจะได้สารอิมัลชันมีลักษณะขุ่นขาว (กึ่งขุ่น,

2561) สาร triazophos เป็นอันตรายเมื่อถูกผิวหนังทำให้ผิวหนังระคายเคือง มีผลทำให้เกิดการระคายเคืองตา เกิดผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจ เกิดการระคายเคืองจมูกและคอ อาการของพิษ หากได้รับสารในระดับต่ำจะแสดงอาการเซื่องซึม สับสน เป็นตะคริว อูจจาระร่วง ปวด และหายใจลำบาก หากได้รับในปริมาณสูงจะแสดงอาการชักกระตุกอย่างรุนแรง สั่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง หมดสติและตายในที่สุด โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสาร triazophos จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase inhibitors Nerve action) โดเนอีนไซม์จะถูกจับด้วยโมเลกุลของสารกำจัดแมลง ผลจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ทำให้เกิดการสะสมหรือครั่งของสารอะเซทิลโคลีน บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ประสาท (Neuro/Neuron junction) ส่งผลให้กล้ามเนื้อ และชักกระตุกอย่างรุนแรง ทำให้แมลงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด สำหรับในมนุษย์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในพลาสมาทำหน้าที่ทำลายเอนไซม์อะเซทิลโคลีนในเนื้อเยื่อประสาท ผลจากการยับยั้งการทำงานดังกล่าว ทำให้ระบบประสาททำงานผิดปกติ

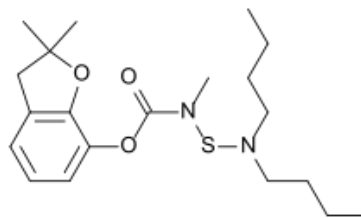


ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ triazophos

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Triazofos>

คาร์โบซัลแฟน (Carbosulfan) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทสารกำจัดแมลง (Insecticides) ในกลุ่มคาร์บาเมท (Carbamate) เป็นสารกำจัดแมลงประเภทดูดซึม มีฤทธิ์ทางการสัมผัส ถูกตัวตายและทางการกิน (ฝ่ายข้อมูลเกษตร, 2561) สาร carbosulfan สามารถกำจัดแมลงได้หลายชนิด ทั้งปากดูดและปากกัด โดยเฉพาะด้วงและแมลงปีกแข็ง ศัตรูพืชที่สามารถกำจัดได้ เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยหอย แมลงหวี่ขาว หนอนกอแถบลาย หนอนเจาะยอดและเจาะผล หนอนกัดราก ข้าวโพด มวนและไส้เดือน เป็นต้น สามารถใช้กับแมลงศัตรูในโรงเก็บพืช และมักใช้ในผลิตผลทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ พืชไร่ และเมล็ดพืชที่เป็นพืชอาหาร นอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์ปีก ปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยง เพื่อกำจัดแมลงรบกวน ยังสามารถใช้กำจัดหอยทากและหนอนตัวกลม (Nematodes) บางชนิดได้ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2561) สาร carbosulfan มีชื่อทางเคมี (IUPAC) ว่า 2,2-Dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl [(dibutylamino)sulfonyl]methylcarbamate มีสูตรโมเลกุล เป็น $C_{20}H_{32}N_2O_3S$ มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ $380.55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (INCHEM, 2018) มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้น้อยคือ ประมาณ 0.3 มิลลิกรัม/ลิตร ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ สารบริสุทธิ์เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล (พนิดา และคณะ, 2553) ค่าความเป็นพิษของ carbosulfan มีดังนี้ ในหนู มีปริมาณที่ทำให้ประชากร 50% ตาย หรือที่เรียกว่า แอลดี 50 (LD_{50}) เท่ากับ 4.5 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการกิน และ 0.64

มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง มีพิษสูงต่อปลา ผึ้งและนก โดยความเป็นพิษต่อนกมีค่า LD₅₀ จากการกิน เท่ากับ 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พิษต่อผึ้งจากการกินมีค่า LD₅₀ (24 Hours) เท่ากับ 1.0460 ไมโครกรัม/ผึ้ง เป็นต้น สาร carbosulfan มีลักษณะสูตร ที่เป็นทั้งสูตร GR (Granules – สูตรชนิดเม็ด) ซึ่งเป็นสูตรชนิดใช้ได้ทันที เป็นเม็ดขนาดเล็ก พร้อมใช้ได้ทันที สารออกฤทธิ์จะเคลือบบนวัสดุดูดซับ เช่นเม็ดทราย และสูตร EC (Emulsifiable Concentrat : สูตรชนิดน้ำมันเข้มข้น) มีลักษณะเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปใช้ต้องทำการเจือจางด้วยน้ำ สารที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำจะได้สารอิมัลชันมีลักษณะขุ่นขาว กลไกการออกฤทธิ์ของสารกำจัดแมลงในกลุ่มคาร์บาเมทมีผลต่อระบบประสาทโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase หรือ AChE) ทำให้สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนถูกทำลายและลดลง ทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนที่ซินแนปส์ของเส้นประสาท เนื่องจากเอนไซม์ไม่สามารถไปไฮโดรไลสอะซิติลโคลีนให้เป็นโคลีนและกรดอะซิติคได้ จึงทำให้เกิดการกระตุ้นปลายประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมาก เกิดอาการพิษเนื่องจากการทำงานของระบบสื่อประสาทโคลิเนอร์จิก (Cholinergic neurotransmission) ทำงานมากเกินไป ก่อให้เกิดอาการชักเกร็งอย่างรุนแรง สั่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง ทำให้แมลงเป็นอัมพาตและตายในที่สุด สำหรับในมนุษย์ลักษณะอาการจะขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของสารที่ได้รับ หากได้รับในปริมาณสูง จะแสดงอาการชักเกร็งอย่างรุนแรง สั่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง หดสติและตายในที่สุด สารกำจัดแมลงกลุ่มนี้สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ โดยเฉพาะรอยแผลหรือรอยข่วน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรง และสารกำจัดแมลงในกลุ่มนี้ยังทำให้เกิดความระคายเคืองต่อตาอย่างมากได้ ซึ่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจมีผลต่ออวัยวะส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น ระบบ ประสาท กล้ามเนื้อ การหายใจและสมอง เป็นต้น ซึ่งถ้ารุนแรงอาจทำให้เสียชีวิตได้ (ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา. 2561)

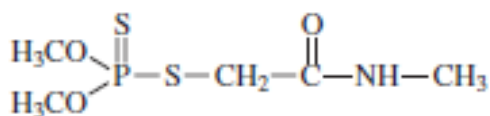


ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ carbosulfan

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Carbosulfan>

ไดเมโทเอต (Dimethoate) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทสารกำจัดแมลง ในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เป็นสารกำจัดแมลงชนิดถูกตัวตายและดูดซึมโดยมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ใช้ในการป้องกันกำจัด เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ ไรแดง หนอนกระทู้ผัก ข้าวโพด หนอนใยผัก หนอนคืบกะหล่ำ แมลงหวี่ขาว ในพืชต่างๆ เช่น ฝ้าย ข้างพ่าง กล้าย มะม่วง พืชผักผลไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น (ลักษมี และคณะ, 2553) สาร dimethoate มีชื่อทางเคมี (IUPAC) ว่า O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate มีสูตรโมเลกุล เป็น C₅H₁₂NO₃PS₂

มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ $229.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลือง ไม่มีกลิ่น มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีมาก และละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น chloroform, benzene, toluene, methylene chloride มีค่าครึ่งชีวิตในอากาศที่ 0.469-4.690 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตในน้ำผิวดินที่ 11-56 วัน ค่าครึ่งชีวิตในน้ำใต้ดินที่ 22-112 วัน และค่าครึ่งชีวิตในดินที่ 11-37 วัน (ตารางภาคผนวกที่ 2) ค่าความเป็นพิษของ dimethoate มีพิษเฉียบพลันโดยการให้ทางปากและการป้ายบนผิวหนัง โดยมีค่า LD_{50} โดยการให้ทางปากในหนู เท่ากับ 215-700 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และ 610 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวโดยการป้ายบนผิวหนัง สาร dimethoate มีพิษเฉียบพลันร้ายแรงในสัตว์ปีกทุกสปีชีส์ โดยมีค่า LD_{50} ในนก European starling โดยการกิน เท่ากับ 32 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และมีค่า LD_{50} ในเป็ด mallard โดยการกิน อยู่ระหว่าง 41.7-63.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (นงลักษณ์ และคณะ, 2551) สาร dimethoate มีลักษณะสูตร เป็นสูตร EC (Emulsifiable Concentrat : สูตรชนิดน้ำมันเข้มข้น) มีลักษณะเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปใช้ต้องทำการเจือจางด้วยน้ำ สารที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำจะได้สารอิมัลชันมีลักษณะขุ่นขาว อาการเกิดพิษของ dimethoate ผู้ที่ได้รับพิษ จะมีอาการ เชื่องซึม ตาพร่า ปวดเกร็งในช่องท้อง แน่นหน้าอก ปวดศีรษะ หายใจขัด ชักกระตุกอย่างรุนแรง สั่นกล้ามเนื้ออ่อนแรง หหมดสติ ถ้ารุนแรงจะทำให้เสียชีวิตได้

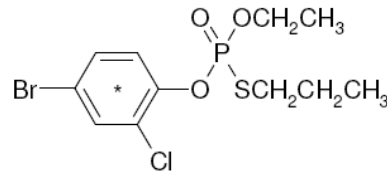


ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของ dimethoate

ที่มา : เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของเคมีเฉพาะเรื่อง ไดมेटโทเอท Dimethoate

โปรฟีโนฟอส (Profenofos) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส เป็นสารกำจัดแมลงประเภทไม่ดูดซึม ออกฤทธิ์ในทางสัมผัสและกินตาย เป็นสารที่สามารถกำจัดศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น หนอนใยผัก หนอนกระทู้ยาสูบ หนอนกระทู้ควายพระอินทร์ ตัวงวงเจาะสมอ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ ไรฝ้ายใช้ได้กับฝ้าย มันฝรั่ง ยาสูบ หอม พริก ผักตระกูลกะหล่ำ ข้าวโพด เป็นต้น สาร profenofos มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก โดยมีค่า LD_{50} โดยการให้ทางปากในหนู เท่ากับ 358 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า LD_{50} โดยการให้ทางผิวหนังในกระต่าย เท่ากับ 472 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยอาการเกิดพิษ จะมีอาการ มึนงง ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ม่านตาหรี่ ตาพร่า คลื่นไส้ อาเจียน เหนื่อยและน้ำลายไหลมาก ปวดท้องเกร็งท้องเสีย กล้ามเนื้อกระตุก พุดไม่ชัด หายใจขัด หัวใจเต้นช้า ชักเกร็งและอาจหมดสติ (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2560) สาร profenofos นอกจากมีฤทธิ์กำจัดแมลง ยังเป็นพิษทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ งานวิจัยในอดีตพบว่า profenofos มีผลกระทบต่อการทำงานของระบบการเมตาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิต โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่งผลให้เกิดปัญหาต่อระบบประสาทได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ หากได้รับสาร profenofos ในปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ในที่สุด (สุนณา และคณะ, 2558) สาร profenofos มีชื่อทางเคมี (IUPAC) ว่า O-(4-bromo-2-chlorophenyl) O-

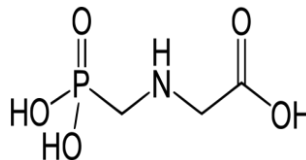
ethyl S-propyl phosphorothioate ลักษณะสูตร เป็นสูตร EC (Emulsifiable Concentrat : สูตรชนิดน้ำมันเข้มข้น) ที่มีลักษณะเป็นของเหลวที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปใช้ต้องทำการเจือจางด้วยน้ำ สารที่ได้จากการเจือจางด้วยน้ำจะได้สารอิมัลชันมีลักษณะขุ่นขาว



ภาพที่ 4 สูตรโครงสร้างของ profenofos

ที่มา : วารสารวิชาการวิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ. ปีที่ 8 ฉบับที่ 1

ไกลโฟเซต (Glyphosate) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทสารกำจัดวัชพืช (herbicide) ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้โดยวิธีฉีดพ่นและพืชสามารถดูดซึมได้ทางใบ วิธีฉีดเข้าลำต้นหรือหยอดที่ยอด เป็นสารกำจัดวัชพืช ที่มีปริมาณการใช้งานมากที่สุดในสหรัฐอเมริกา ทั้งในภาคการเกษตร และการตกแต่งสวนหย่อม บริษัทมอนซานโต้เป็นผู้ถือสิทธิบัตรและผลิตจำหน่ายในสหรัฐอเมริกามาตั้งแต่ทศวรรษที่ 1970 ในชื่อการค้า ราวด์อัฟ (Roundup) สาร glyphosate มีชื่อทางเคมี (IUPAC) ว่า N-(phosphonomethyl)glycine เป็นสารในกลุ่ม phosphinic acid มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_3H_8NO_5P$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 169.1 g/mol^{-1} มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.704 g/cm^3 (20 °C) ลักษณะทางกายภาพเป็นผงผลึกสีขาว (Wikipedia, 2018)

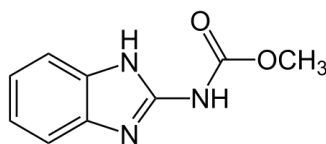


ภาพที่ 5 สูตรโครงสร้างของ Glyphosate

ที่มา : <https://th.wikipedia.org/wiki/Glyphosate>

คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่อยู่ในกลุ่มสารป้องกันและกำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช (Fungicide) เป็นสารกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึม (systemic fungicide) โดยพืชสามารถดูดซึมผ่านทางราก ทางใบ และเนื้อเยื่อ ไปส่วนต่างๆ ได้ (สุนีย์, 2533) สาร carbendazim ออกฤทธิ์กว้าง ซึ่งออกฤทธิ์ทั้งแบบป้องกันและกำจัดโรคพืช นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อราที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ โรคใบไหม้ โรคราแป้ง โรคใบจุด โรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดดำ โรคสแค๊ป โรคราสีเทา โรคหน่อเน่า ในพืชผักต่างๆ พืชไร่ ข้าวและธัญพืช ผลไม้และไม้ดอกไม้ประดับทั่วไป เช่น องุ่น ต้นหอม ถั่วเหลือง มะม่วง ข้าว กุยช่าย หอมแดง หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น (ชนิดสรา และคณะ, 2559) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสาร carbendazim จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เชื้อรา โดยขัดขวางหรือทำลายการแบ่งตัวของเซลล์ระหว่างการสืบพันธุ์ มีชื่อทางการค้ามากมาย ได้แก่ คอลโตแซน คาร์เบนดาซิม50 เดลซีน50 และเบนด้า50 เป็นต้น



ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของ Carbendazim

ที่มา : <https://en.wikipedia.org/wiki/Carbendazim>

การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดตาม พ.ร.บ.วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 จำเป็นต้องมีการตรวจสอบชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุในฉลากหรือไม่ การตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ของสารกำจัดศัตรูพืช จะใช้วิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council) ซึ่งการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชที่ได้ค่าผลวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม ซึ่งจะต้องประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ ขณะที่ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะต้องความถูกต้อง แม่นยำ เป็นที่ยอมรับตามเกณฑ์การยอมรับสากล ดังนั้นห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สวพ.3 จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร triazopho, carbosulfan, dimethoate, profenofos, glyphosate และ carbendazim เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายชนิดใช้แรงดันสูง (High Performance Liquid Chromatograph : HPLC) ตัวตรวจวัดชนิด DAD (Diode Array Detector)
2. Agilent Column Zorbax Eclipse XDB-C18 (USNH037758) Analytical, ความยาว 250 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, partical size 5 ไมโครเมตร
3. Agilent Column Zorbax Eclipse XDB-C18 (USNH037800) Analytical, ความยาว 250 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, partical size 5 ไมโครเมตร
4. Waters Column WATWAT02770 IC-Pak Anion HC Column ความยาว 150 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร
5. SUPELCO LC-SAX 58996 Column Number 181675AA, ความยาว 250 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.4 มิลลิเมตร, partical size 5 ไมโครเมตร

6. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A ตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
7. Capillary Column ชนิด 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร, หนา (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร (μm)
8. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (± 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
9. เครื่องวัด pH (pH Meter)
10. เครื่องกวนสารพร้อมให้ความร้อน (Hot plate Magnetic stirrer)
11. เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic bath)
12. เครื่องวัดความหนาแน่น (Density meter)
13. ชุดกรองสารละลายพร้อมเยื่อ membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
14. ปัมสุญญากาศ
15. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) type A ขนาด 10, 25, 250, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
16. ปิเปตแบบปริมาตร (Volumetric pipette) type A ขนาด 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
17. เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto pipettes) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
18. ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 500 และ 2,000 มิลลิลิตร
19. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
20. กระบอกฉีดยาแก้ว (Glass syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตร
21. Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
22. ขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
23. ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
24. สารมาตรฐาน triazophos (purity 98.00%), สารมาตรฐาน carbosulfan (purity 98.00%), สารมาตรฐาน dimethoate (purity 99.37%), สารมาตรฐาน profenofos (purity 99.00%), สารมาตรฐาน glyphosate (purity 99.00%), สารมาตรฐาน carbendazim purity 99.00%
25. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC, ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC, ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% w/v EC, ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% w/v EC, ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL, ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC
26. Methanol (CH_3OH) ชนิด HPLC grade
27. Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) ชนิด HPLC grade
28. Acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) ชนิด AR grade

29. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized Water : DI Water)

30. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

31. Phosphoric Acid (H_3PO_4) 85%

- วิธีการ

1. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos

1.1 สอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.2 เตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ให้พร้อมสำหรับการทดลอง

1.3 ปรับตั้งสถานะการใช้งานของเครื่อง GC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos

1.4 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC

1.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน triazophos ซึ่งสารมาตรฐาน triazophos (purity 98.00%) 2 ซ้ำ (C_1 , C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารมาตรฐาน triazophos ปริมาตร 10.20 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) ชนิด AR grade ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

1.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos ปริมาตร 62.50 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

1.4.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ เทตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC ประมาณ 60-70 มิลลิลิตร ลงในปิเกตอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างและฉีดเข้าเครื่อง Density meter อ่านค่าความถ่วงจำเพาะของสารที่ได้จากเครื่อง

1.4.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC เปิดเครื่อง GC ตามสถานะการทำงานของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak high) แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1% จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

1.4.5 คำนวณค่า % Relative Percent Different (%RPD) สารละลายมาตรฐาน C_1 , C_2 ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% คำนวณค่า %RPD ตามสมการภาคผนวกที่ 1

1.4.6 คำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

1.4.7 คำนวณหา % สารออกฤทธิ์ triazophos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos ตามสมการภาคผนวกที่ 3

1.4.8 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ triazophos

เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ triazophos = %w/w ของ triazophos x ความถ่วงจำเพาะ

1.5 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของวิธีการ

1.5.1 ทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range)

ช่วงการใช้งาน (Working range) เป็นช่วงของความเข้มข้น/ปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (มลิสา และคณะ, 2554)

1.5.1.1 ซังสารมาตรฐาน triazophos ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยซังน้ำหนักรวมให้มีปริมาณ triazophos ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml โดยซังสารมาตรฐาน triazophos ให้มีปริมาณดังนี้ 2.55, 5.10, 10.20, 15.30, 20.45 และ 25.55 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

1.5.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง GC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

1.5.1.3 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

1.5.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

1.5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรง (Linearity) เป็นคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือตรวจวัด (Response) และความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งาน (ทิพวรรณ, 2549)

1.5.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก Working range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น ซังสารมาตรฐาน triazophos ให้ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ ความเข้มข้น (0.25–2.00 mg/ml) หนัก 2.55, 5.10, 8.20, 10.20, 15.35 และ 20.45 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

1.5.2.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง GC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

1.5.2.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ response (แกน y)

1.5.2.4 คำนวณหาค่า Correlation of determination (R^2) เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC)

1.6 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

ความเที่ยง (Precision) เป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงถึงความใกล้เคียงกันของชุดข้อมูลที่ทดสอบตัวอย่างเดียวกันหลายครั้งภายใต้สภาวะที่กำหนด (อูมาพร และคณะ, 2550)

1.6.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability)

Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่าง ข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

1.6.1.1 ซั่งสารมาตรฐาน triazophos 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ซั่งสารมาตรฐาน triazophos ปริมาตร 10.20 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

1.6.1.2 ซั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ได้แก่ 0.25, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้น นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

1.6.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 1.6.1.1 และ 1.6.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean ; \bar{X}) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation ; SD) และร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (Relative standard deviation ; %RSD) โดยใช้สูตรการคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (%RSD) ตามสมการภาคผนวกที่ 4

1.6.1.4 คำนวณหาค่า HORRAT ของ Repeatability โดยเกณฑ์การประเมินค่า Precision ยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 , EU และ Codex ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการภาคผนวกที่ 5

1.6.1.5 คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสมการภาคผนวกที่ 6

1.6.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility)

Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

1.7 การตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

ความทน (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์ เป็นคุณลักษณะที่บ่งว่าวิธีวิเคราะห์นั้น จะยังให้ผลการวิเคราะห์ที่ยอมรับได้เมื่อตัวแปรหรือเงื่อนไขบางอย่างที่กำหนดไว้ในวิธีวิเคราะห์มีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย (ทิพวรรณ, 2549)

1.7.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสถานะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Oven Temperature) จาก 240 °C เป็น 250 °C และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

1.7.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A เป็น เครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

1.8 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

ความถูกต้อง (Accuracy) เป็นคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความใกล้เคียงของผลการทดสอบต่อค่าจริงหรือค่าอ้างอิง (ทิพวรรณ, 2549)

1.8.1 เตรียมสารละลาย stock standard ของสารมาตรฐาน triazophos ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (4 mg Al/ml) โดยชั่งสารมาตรฐาน triazophos หนัก 1,022 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ ขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock standard เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.8.2 เตรียมสารละลาย stock sample ของสารผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos หนัก 2,603.50 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย เติม Acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.8.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายที่ 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 1.8.1) ปริมาตร 1.25, 2.50 และ 3.75 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยเรียงลำดับความเข้มข้นน้อยไปมาก

1.8.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า sample origin โดยปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 1.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC หาปริมาณ triazophos โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 1.8.3)

1.8.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

1.8.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 1.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

1.8.5.2 ปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 1.8.1) ปริมาณ 625 ไมโครลิตร 3.75 และ 6.87 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย stock sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ซ้ำ (ข้อ 1.8.5.1) ปรับปริมาตรด้วย Acetone (AR grade) เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC หาปริมาณ triazophos โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 1.8.3)

1.8.6 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 1.8.4 และ 1.8.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% การคำนวณตามสมการภาคผนวกที่ 7

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbosulfan

2.1 สอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.2 เตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ให้พร้อมสำหรับการทดลอง

2.3 ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbosulfan

2.4 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC

2.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน carbosulfan ซึ่งสารมาตรฐาน carbosulfan (purity 98.0%) 2 ซ้ำ (C₁, C₂) ให้มีสารออกฤทธิ์ 0.1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารมาตรฐาน carbosulfan ประมาณ 10.20 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร เติมน Methanol (CH₃OH) ชนิด HPLC grade ประมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2.4.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC ให้มีสารออกฤทธิ์ 0.1 มิลลิกรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan ประมาณ 50.00 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร เติมน Methanol ประมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

2.4.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ เทตตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC ประมาณ 60-70 มิลลิลิตร ลงในปิเกตอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างและฉีดเข้าเครื่อง Density meter อ่านค่าความถ่วงจำเพาะของสารที่ได้จากเครื่อง

2.4.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC เปิดเครื่อง HPLC ตามสภาวะการทำงาน ของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่า พื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak high) แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

2.4.5 คำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) สารละลายมาตรฐาน C₁, C₂ ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% คำนวณค่า %RPD ตามสมการภาคผนวกที่ 1

2.4.6 คำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

2.4.7 คำนวณหา % สารออกฤทธิ์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan ตามสมการภาคผนวกที่ 3

2.4.8 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbosulfan

เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ของ carbosulfan = %w/w ของ carbosulfan x ความถ่วงจำเพาะ

2.5 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของวิธีการ

2.5.1 ทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range)

2.5.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน carbosulfan ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณสารมาตรฐาน carbosulfan ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน 0.025–0.250 mg/ml โดยชั่งสารมาตรฐาน carbosulfan ให้มีปริมาตรดังนี้ 2.55, 5.10, 10.20, 15.35, 20.45 และ 25.55 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Methanol ประมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter Membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.5.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง HPLC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

2.5.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

2.5.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

2.5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

2.5.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก Working range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น ชั่งสารมาตรฐาน carbosulfan ให้ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับความเข้มข้น (0.050–0.200 mg/ml) หน้า 5.10, 7.65, 10.20, 12.75, 15.30 และ 20.45 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Methanol ประมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้

ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

2.5.2.2 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

2.5.2.3 คำนวณหาค่า Correlation of determination (R^2) เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC)

2.6 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

2.6.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

2.6.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน carbosulfan 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 0.1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Methanol ประมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.6.1.2 ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ได้แก่ 0.075, 0.100 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติม Methanol ประมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.6.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 2.6.1.1 และ 2.6.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

2.6.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

2.7 การตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

2.7.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยน อุณหภูมิของคอลัมน์ จาก 40 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 เพื่อ

วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มา คำนวณหา HORRAT

2.7.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยน Column Agilent Column Zorbax Eclipse XDB-C18 USNH037758 Analytical, ความยาว 250 มิลลิเมตร, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร partical size 5 ไมโครเมตร เป็น Column Agilent Column Zorbax Eclipse XDB-C18 USNH037800 Analytical, ความยาว 250 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร partical size 5 ไมโครเมตร ทำการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในสารละลายตัวอย่าง และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

2.8 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

2.8.1 เตรียมสารละลาย stock standard ของสารมาตรฐาน carbosulfan ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งสารมาตรฐาน carbosulfan น้ก 102.04 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Methanol ถ่ายสารละลายสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock standard เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.8.2 เตรียมสารละลาย stock sample ของสารผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (0.1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan น้ก 475.89 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Methanol ถ่ายสารละลายสู่ ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.8.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายที่ 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.075, 0.100 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 2.8.1) ปริมาตร 750, 1,000 และ 1,250 ไมโครลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเรียงลำดับความเข้มข้น

2.8.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า sample origin โดยปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 2.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ carbosulfan โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 2.8.3)

2.8.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

2.8.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 2.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด

2.8.5.2 ปิเปต สารละลาย stock standard (ข้อ 2.8.1) ปริมาณ 0.875, 1.5 และ 2.125 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย stock sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ขวด (ข้อ 2.8.5.1) ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ glyphosate โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 2.8.3)

2.8.6 การประเมินค่า accuracy จาก %recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 2.8.4 และ 2.8.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% การคำนวณตามสมการภาคผนวกที่ 7

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ dimethoate

3.1 สอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2 เตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ให้พร้อมสำหรับการทดลอง

3.3 ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ dimethoate

3.4 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC

3.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน dimethoate ซึ่งสารมาตรฐาน dimethoate (purity 99.37 %) 2 ขวด (C₁, C₂) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารมาตรฐาน dimethoate ปริมาตร 10.06 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

3.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate ปริมาตร 62.50 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

3.4.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ เทตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC ประมาณ 60-70 มิลลิลิตร ลงในปิเกตอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างและฉีดเข้าเครื่อง Density meter อ่านค่าความถ่วงจำเพาะของสารที่ได้จากเครื่อง

3.4.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC เปิดเครื่อง GC ตามสภาวะการทำงานของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ขวด เมื่อค่าพื้นที่ได้

พีก (peak area) หรือความสูงของพีก (peak high) แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1% จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

3.4.5 คำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) สารละลายมาตรฐาน C_1, C_2 ต้องมีค่า % RPD ไม่เกิน 3% คำนวณค่า %RPD ตามสมการภาคผนวกที่ 1

3.4.6 คำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

3.4.7 คำนวณหา % สารออกฤทธิ์ dimethoate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate ตามสมการภาคผนวกที่ 3

3.4.8 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ dimethoate

เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ dimethoate = %w/w ของ dimethoate x ความถ่วงจำเพาะ

3.5 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของวิธีการ

3.5.1 ทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range)

3.5.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน dimethoate ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ dimethoate ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml โดยชั่งสารมาตรฐาน dimethoate ให้มีปริมาตรดังนี้ 2.55, 5.05, 10.10, 15.10, 20.15 และ 25.20 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

3.5.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง GC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.5.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

3.5.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

3.5.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก Working range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น ชั่งสารมาตรฐาน dimethoate ให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ ความเข้มข้น (0.50–2.50 mg/ml) หนัก 5.05, 7.55, 10.10, 12.60, 15.10, 17.65 และ 25.20 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

3.5.2.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง GC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.5.2.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

3.5.2.4 คำนวณหาค่า Correlation of determination (R^2) เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC)

3.6 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

3.6.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

3.6.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน dimethoate 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ชั่งสารมาตรฐาน dimethoate ปริมาตร 10.06 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

3.6.1.2 ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ได้แก่ 0.25, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

3.6.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 3.6.1.1 และ 3.6.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

3.6.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

3.7 การตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

3.7.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสถานะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Oven Temperature) จาก 260 °C เป็น 250 °C และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

3.7.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A เป็น เครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

3.8 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

3.8.1 เตรียมสารละลาย stock standard ของสารมาตรฐาน dimethoate ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (5 mg Al/ml) โดยชั่งสารมาตรฐาน dimethoate หนัก 504.40 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100

มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock standard เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.2 เตรียมสารละลาย stock sample ของสารผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg AI/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate หนัก 2,452 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายที่ 4 ระดับที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 3.8.1) ปริมาตร 0.50, 1.00, 2.00 และ 4.00 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยเรียงลำดับความเข้มข้น

3.8.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า sample origin โดยปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 3.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC หาปริมาณ dimethoate โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 3.8.3)

3.8.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

3.8.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 3.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

3.8.5.2 ปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 3.8.1) ปริมาณ 0.50, 3.00 และ 5.50 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย stock sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ซ้ำ (ข้อ 3.8.5.1) ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC หาปริมาณ dimethoate โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 3.8.3)

3.8.6 การประเมินค่า accuracy จาก %recovery

โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 3.8.4 และ 3.8.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% การคำนวณตามสมการภาคผนวกที่ 7

4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ profenofos

4.1 สอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

4.2 เตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ให้พร้อมสำหรับการทดลอง

4.3 ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ profenofos

4.4 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC

4.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน profenofos ซั่งสารมาตรฐาน profenofos (purity 99.00%) 2 ซ้ำ (C₁, C₂) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ซั่งสารมาตรฐาน profenofos ปริมาตร 10.10 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตร ด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

4.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC ซั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัมในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ซั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos ปริมาตร 50.00 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

4.4.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ เทตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC ประมาณ 60-70 มิลลิลิตร ลงในปิเกตอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างและฉีดเข้าเครื่อง Density meter อ่านค่าความถ่วงจำเพาะของสารที่ได้จากเครื่อง

4.4.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC เปิดเครื่อง GC ตามสภาวะการทำงาน ของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak high) แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1% จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

4.4.5 คำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) สารละลายมาตรฐาน C₁, C₂ ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% คำนวณค่า %RPD ตามสมการภาคผนวกที่ 1

4.4.6 คำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

4.4.7 คำนวณหา % สารออกฤทธิ์ profenofos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos ตามสมการภาคผนวกที่ 3

4.4.8 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ profenofos

เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ profenofos = %w/w ของ profenofos x ความถ่วงจำเพาะ

4.5 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของวิธีการ

4.5.1 ทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range)

4.5.1.1 ซั่งสารมาตรฐาน profenofos (purity 99.00%) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยซั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ profenofos ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml โดยซั่งสารมาตรฐาน profenofos ให้มีปริมาตรดังนี้ 2.53, 5.05, 10.10, 15.15, 20.20 และ 25.25 มิลลิกรัม ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone

ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

4.5.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง GC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

4.5.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

4.5.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

4.5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

4.5.2.1 เลือกระดับความเข้มข้นจาก Working range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น ซึ่งสารมาตรฐาน profenofos ให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ ความเข้มข้น (0.25–2.50 mg/ml) หนัก 2.53, 5.05, 10.10, 12.63, 17.68, 20.20 และ 25.25 มิลลิกรัม ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

4.5.2.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง GC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

4.5.2.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

4.5.2.4 คำนวณหาค่า Correlation of determination (R^2) เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC)

4.6 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

4.6.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

4.6.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน profenofos 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ชั่งสารมาตรฐาน profenofos ปริมาตร 10.10 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรละลายด้วย Acetone ประมาณ 5 นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

4.6.1.2 ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ได้แก่ 0.25, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย Acetone ประมาณ 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้น นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

4.6.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 4.6.1.1 และ 4.6.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

4.6.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลทีวิเคราะห์ซ้ำในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

4.7 การตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

4.7.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสถานะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Oven Temperature) จาก 260 °C เป็น 250 °C และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในสารละลายตัวอย่าง นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

4.7.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A เป็นเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

4.8 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

4.8.1 เตรียมสารละลาย stock standard ของสารมาตรฐาน profenofos ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (4 mg Al/ml) โดยชั่งสารมาตรฐาน profenofos หนัก 1,010.10 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock standard เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.8.2 เตรียมสารละลาย stock sample ของสารผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos หนัก 2,062.84 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Acetone ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Acetone ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย เติม Acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.8.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายที่ 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.50, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 4.8.1) ปริมาตร 1.25, 2.50 และ 5.00 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร

ด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC โดยเรียงลำดับความเข้มข้น

4.8.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า sample origin โดยปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 4.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจำนวน 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC หาปริมาณ profenofos โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 4.8.3)

4.8.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

4.8.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 4.8.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด

4.8.5.2 ปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 4.8.1) ปริมาณ 2.188 , 3.750 และ 6.875 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย stock sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ขวด (ข้อ 4.8.5.1) ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC หาปริมาณ profenofos โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 4.8.3)

4.8.6 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery

โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 4.8.4 และ 4.8.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% การคำนวณตามสมการภาคผนวกที่ 7

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ glyphosate

5.1 สอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

5.2 เตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ให้พร้อมสำหรับการทดลอง

5.3 การเตรียม Mobile phase

5.3.1 ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) น้ำหนัก 0.8437 กรัม ลงในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI Water) ประมาณ 20-30 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ปริมาตร 960 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile (CH_3CN) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5.3.2 จากนั้นเทจากขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรด Phosphoric Acid (H_3PO_4) 85% ให้ได้ค่า pH ประมาณ 1.9 (ในขณะที่ปรับ pH ให้ทำการกวนสารอยู่ตลอดเวลา)

5.3.3 เทสารละลายที่ได้ลงในขวด Duran ที่มีฝาปิด เขย่าให้เท่ากัน เก็บไว้สำหรับทำ Mobile phase ต่อไป ก่อนนำไปใช้งานต้องกรองด้วยชุดกรอง HPLC ผ่าน Filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

5.4 ปรับตั้งสถานะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ glyphosate

5.5 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL

5.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน glyphosate ซึ่งสารมาตรฐาน glyphosate (purity 99.00%) 2 ซ้ำ (C₁, C₂) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารมาตรฐาน glyphosate ประมาณ 10.10 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร เติม Mobile phase (KH₂PO₄) ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

5.5.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate ประมาณ 31.25 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร เติม Mobile phase ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

5.5.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ เทตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL W/V EC ประมาณ 60-70 มิลลิลิตร ลงในปิเกตอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ syring ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่าง และฉีดเข้าเครื่อง Density meter อ่านค่าความถ่วงจำเพาะของสารที่ได้จากเครื่อง

5.5.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC เปิดเครื่อง HPLC ตามสภาวะการทำงานของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) หรือความสูงของพีค (peak high) แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้ง ไม่เกิน 1% จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

5.5.5 คำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) สารละลายมาตรฐาน C₁, C₂ ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% คำนวณค่า %RPD ตาม สมการภาคผนวกที่ 1

5.5.6 การคำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

5.5.7 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ glyphosate ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL ตามสมการภาคผนวกที่ 3

5.5.8 การเปลี่ยน glyphosate acid เป็น glyphosate IPA
(isopropylammonium/isopropylamine salt)

glyphosate IPA (isopropylammonium) มี Molar mass : 228.2 g mol⁻¹

ค่า factor เท่ากับ $\frac{228.2 \text{ (glyphosate IPA)}}{169.1 \text{ (glyphosate acid)}}$ = 1.349

5.5.9 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ glyphosate

ปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate IPA = AI ของ glyphosate acid x 1.349 (% w/w)

เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ glyphosate = %w/w ของ glyphosate IPA x ความถ่วงจำเพาะ

5.6 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/linearity) ของวิธีการ

5.6.1 ทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range)

5.6.1.1 ซั่งสารมาตรฐาน glyphosate ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยซั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ glyphosate ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน 0.75-4.00 mg/ml โดยซั่งสารมาตรฐาน glyphosate ให้มีปริมาตรดังนี้ 7.60, 10.10, 15.15, 20.20, 30.30 และ 40.40 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Mobile phase ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter Membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.6.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง HPLC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

5.6.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

5.6.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

5.6.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

5.6.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก Working range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

5.6.2.2 ซั่งสารมาตรฐาน glyphosate ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับความเข้มข้น (0.75–2.00 mg/ml) หนัก 7.60, 10.80, 12.70, 15.15, 17.70 และ 20.20 มิลลิกรัม ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Mobile phase (KH_2PO_4) ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.6.2.3 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง HPLC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

5.6.2.4 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

5.6.2.5 คำนวณหาค่า Correlation of determination (R^2) เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC)

5.7 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

5.7.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

5.7.1.1 ซั่งสารมาตรฐาน glyphosate 2 ซ้ำ (C_1 , C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Mobile phase ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile

phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.7.1.2 ซั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ได้แก่ 0.75, 1.00 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Mobile phase ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

5.7.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 5.7.1.1 และ 5.7.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

5.7.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.7.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

5.8 การตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

5.8.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสถานะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยน ความยาวคลื่นจาก 195 นาโนเมตร เป็น 198 นาโนเมตร และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.7.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

5.8.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยน Column จาก Column Waters Column WATWAT02770 IC-Pak Anion HC Column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร เป็น Column SUPELCO LC-SAX 58996 Column Number 181675 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.4 มิลลิเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร particle size 5 ไมโครเมตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5.7.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

5.9 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

5.9.1 เตรียมสารละลาย stock standard ของสารมาตรฐาน glyphosate ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (4 mg Al/ml) โดยซั่งสารมาตรฐาน glyphosate หนัก 1,010.10 มิลลิกรัม ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 50 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Mobile phase ถ่ายสารละลายสู่ ขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock standard เข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.9.2 เตรียมสารละลาย stock sample ของสารผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL ของ 30.73 W/W glyphosate acid ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate หนัก 2,085.33 มิลลิกรัม ใส่ในปิเกตอร์ ขนาด 100 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Mobile phase ถ่ายสารละลายสู่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.9.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายที่ 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.75, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 5.9.1) ปริมาตร 1.875, 2.50 และ 3.75 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเรียงลำดับความเข้มข้น

5.9.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า sample origin โดยปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 5.9.2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ glyphosate โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 5.9.3)

5.9.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

5.9.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 5.9.2) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

5.9.5.2 ปิเปต สารละลาย stock standard (ข้อ 5.9.1) ปริมาณ 0.875, 1.5 และ 2.75 มิลลิลิตร ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย stock sample origin อยู่ 4 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ซ้ำ (ข้อ 5.16.4) ปรับปริมาตรด้วย Mobile phase เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ glyphosate โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 15.9.3)

5.9.6 การประเมินค่า accuracy จาก %recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 5.9.4 และ 5.9.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% การคำนวณตามสมการภาคผนวกที่ 5

6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbendazim

6.1 สอบเทียบเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

6.2 เตรียมสารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ให้พร้อมสำหรับการทดลอง

6.3 ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbendazim

6.4 การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC

6.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน carbendazim ซึ่งสารมาตรฐาน carbendazim (purity 99.00%) 2 ซ้ำ (C_1 , C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 0.1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งสารมาตรฐาน carbendazim ปริมาตร 10.00 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Ethanol (C_2H_6O) ชนิด HPLC grad ประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาเติม Methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC ให้มีสารออกฤทธิ์ 0.1 มิลลิกรัมในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim ปริมาตร 20.00 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย Ethanol ประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาเติม Methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6.4.3 การวัดความถ่วงจำเพาะ เทตตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC ประมาณ 60-70 มิลลิลิตร ลงในปิเกตอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างและฉีดเข้าเครื่อง Density meter อ่านค่าความถ่วงจำเพาะของสารที่ได้จากเครื่อง

6.4.4 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง HPLC เปิดเครื่อง HPLC ตามสภาวะการทำงาน ของเครื่องที่กำหนดไว้ เมื่อ baseline คงที่ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน เข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้ peak area หรือความสูงของ peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1% จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

6.4.5 คำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) สารละลายมาตรฐาน C_1 , C_2 ต้องมีค่า %RPD ไม่เกิน 3% คำนวณค่า %RPD ตามสมการภาคผนวกที่ 1

6.4.6 คำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

6.4.7 คำนวณหา % สารออกฤทธิ์ carbendazim ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim ตามสมการภาคผนวกที่ 3

6.4.8 การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbendazim

เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbendazim = %w/w ของ carbendazim x ความ
ถ่วงจำเพาะ

6.5 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/linearity) ของวิธีการ

6.5.1 ทดสอบช่วงการใช้งาน (Working range)

6.5.1.1 ซังสารมาตรฐาน carbendazim ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 6 ระดับ ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ carbendazim ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml โดยซังสารมาตรฐาน carbendazim ให้มีปริมาตรดังนี้ 2.60, 5.05, 10.10, 15.15, 20.20 และ 25.30 มิลลิกรัม ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย Ethanol ประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาเติม Methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ที่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6.5.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง HPLC เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

6.5.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

6.5.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

6.5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

6.5.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก Working range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น ซังสารมาตรฐาน carbendazim ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ ความเข้มข้น (0.050–0.20 mg/ml) หนัก 5.40, 7.60, 10.60, 12.70, 15.30 และ 20.20 มิลลิกรัม ลงใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย Ethanol ประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาเติม Methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6.5.2.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

6.5.2.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ Response (แกน y)

6.5.2.4 คำนวณหาค่า Correlation of determination (R^2) เกณฑ์ยอมรับที่ $R^2 \geq 0.995$ (AOAC)

6.6 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการ

6.6.1 ตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน หรือใกล้เคียงกัน

6.6.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน carbendazim 2 ซ้ำ (C_1, C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ 0.1 มิลลิกรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ชั่งสารมาตรฐาน carbendazim ปริมาตร 10.08 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ละลายด้วย Ethanol ประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาเติม Methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6.6.1.2 ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ ได้แก่ 0.075, 0.100 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยใช้ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย Ethanol ประมาณ 40 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาเติม Methanol ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ผ่าน Syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

6.6.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (ข้อ 6.7.1.1 และ 6.7.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา ค่า HORRAT

6.6.2 ตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำในเครื่องมือเดียวกัน ห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.7.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

6.7 การตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

6.7.1 ตรวจสอบค่า Robustness

ทดสอบโดยการเปลี่ยนสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ วิธีการโดยเปลี่ยน ความยาวคลื่น จาก 254 นาโนเมตร เป็น 257 นาโนเมตร และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.7.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหา HORRAT

6.7.2 ตรวจสอบค่า Ruggedness

ทดสอบโดยการเปลี่ยน Column จาก Agilent Column ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมโครเมตร เป็น Agilent Column ZORBAX Eclipse plus C18 Rapid Resolution HT ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร

ความยาว 75 มิลลิเมตร partical size 1.8 ไมโครเมตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 6.7.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในสารละลายตัวอย่างและนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาค่า HORRAT

6.8 การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีการ

6.8.1 เตรียมสารละลาย stock standard ของสารมาตรฐาน carbendazim ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (0.25 mg Al/ml) โดยชั่งสารมาตรฐาน carbendazim หนัก 63.10 มิลลิกรัม ใส่ในปิ๊กเกอร์ ขนาด 100 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย Ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม Ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นเติม Methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock standard เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.8.2 เตรียมสารละลาย stock sample ของสารผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (0.1 mg Al/ml) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim หนัก 197 มิลลิกรัม ใส่ในปิ๊กเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร นำมาละลายด้วย Ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายสารละลายสู่ขวดวัดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วเติม Ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 30 นาที จากนั้นเติม Methanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายด้วย เครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Methanol จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย stock sample ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.8.3 เตรียมสารละลายเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลายที่ 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.075, 0.10 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดยปิเปตสารละลาย stock standard (ข้อ 6.9.1) ปริมาตร 7.5, 10 และ 12.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเรียงลำดับความเข้มข้น

6.8.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Sample origin โดยปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 6.9.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จะได้สารที่มีความเข้มข้น 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ carbendazim โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 6.9.3)

6.8.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

6.8.5.1 ปิเปตสารละลาย stock sample (ข้อ 6.9.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

6.8.5.2 ปิเปต สารละลาย stock standard (ข้อ 6.9.1) ปริมาณ 3.5, 6 และ 8.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย stock sample origin อยู่ 10 มิลลิลิตร ที่

เตรียมไว้แล้ว อย่างละ 10 ซ้ำ (ข้อ 6.8.5.1) ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายที่เตรียมได้ผ่าน Syring filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณ carbendazim โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ข้อ 6.9.3)

6.8.6 การประเมินค่า accuracy จาก %recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ที่เป็นค่า origin และ spike (ข้อ 6.9.4 และ 6.9.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาของ AOAC สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % การคำนวณตามสมการภาคผนวกที่ 7

7 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ความไม่แน่นอนในการวัด (Uncertainty) เป็นการประมาณค่าจากปัจจัยที่คาดว่าจะทำให้ผลการวัดคลาดเคลื่อน โดยใช้วิธีทางสถิติ ได้แก่ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการวัดตัวอย่างซ้ำ ความคลาดเคลื่อนจากวิธีทดสอบ เครื่องมืออุปกรณ์ สารเคมี สภาพแวดล้อมในการวัด เป็นต้น (อนุสิทธิ สุขม่วงและคณะ. 2550)

7.1 นิยาม

7.1.1 ค่าจริง (True value, μ) เป็นค่าที่ถูกตรวจสอบและรับรองว่าถูกต้อง

7.1.2 ค่าเฉลี่ย (Mean value, \bar{x}) เป็นค่าที่ได้จากการปฏิบัติงานซ้ำหลายครั้ง (n)

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} \quad \text{สมการที่ 1}$$

7.1.3 ความคลาดเคลื่อน (Error) เป็นค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยและค่าจริง

$$\text{Error} = \bar{x} - \mu \quad \text{สมการที่ 2}$$

7.1.4 ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) เป็นขอบเขตการเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad \text{สมการที่ 5}$$

7.1.5 ความไม่แน่นอน (uncertainty, U_x) เป็นความเบี่ยงเบนของผลการทดสอบอันเนื่องจากสภาพแวดล้อมของการปฏิบัติงาน

7.1.6 ชนิดของความไม่แน่นอน

7.1.6.1 แบ่งตามวิธีที่ใช้ประเมินความไม่แน่นอน

1) ค่าความไม่แน่นอนแบบ Type A เป็นความไม่แน่นอนที่เกิดจากการทำซ้ำประเมินผลด้วยวิธีทางสถิติ คือ หาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) ค่าความไม่แน่นอนแบบ Type B เป็นความไม่แน่นอนที่เกิดนอกเหนือจาก Type A เป็นค่าความไม่แน่นอนของระบบที่ไม่อาจประเมินได้ด้วยวิธีทางสถิติ เช่น Specification ของเครื่องมือ การสอบเทียบเครื่องมือ ความบริสุทธิ์ของสารเคมี วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน เป็นต้น

7.1.6.2 แบ่งตามผลของความไม่แน่นอน

1) ความไม่แน่นอนแบบสุ่ม (Random) เป็นความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นแบบไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้ง เช่น การเติมน้ำถึงขีดบอกปริมาตร

2) ความไม่แน่นอนระบบ (Systemic) เป็นความไม่แน่นอนที่เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอในทุกครั้งของการวัด เช่น ความไม่แน่นอนจากใบรับรองสอบเทียบ

7.1.7 ความไม่แน่นอนรวม (Combined Uncertainty, U_C) เป็นผลรวมของความไม่แน่นอนทั้งหมด (ได้จากการคำนวณ)

7.1.8 ความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty, U_E) เป็นความไม่แน่นอนรวม (U_C) ที่ถูกขยายออกไป (ได้จากการคำนวณ)

7.2 ขั้นตอนการหาค่าความไม่แน่นอน

7.2.1 เขียนขั้นตอนการวิเคราะห์

7.2.2 เขียนสูตร / สมการที่ให้ผลลัพธ์

7.2.3 หาแหล่งของความไม่แน่นอน ผังก้างปลา (Identify Sources of Uncertainty)

7.2.4 หาความไม่แน่นอนมาตรฐาน (U_x)

7.2.5 รวมความไม่แน่นอนมาตรฐานที่มาจากแหล่งเดียวกัน (หน่วยเดียวกัน)

7.2.6 เปลี่ยนความไม่แน่นอนของแต่ละแหล่งให้อยู่ในรูป Relative Standard Uncertainty

7.2.7 หาค่าความไม่แน่นอนรวม (U_C) (Calculating the Combined Uncertainty)

7.2.8 หาค่าความไม่แน่นอนขยาย (U_E) (Calculating the Expanded Uncertainty)

7.2.9 จัดทำฮิสโตแกรม (Histogram)

7.2.10 รายงานผลการทดสอบ

7.3 แหล่งที่มาของความไม่แน่นอน

7.3.1 ความไม่แน่นอนจากการชั่งสารมาตรฐาน ($U_{\text{mass.std}}$)

7.3.2 ความไม่แน่นอนจากการชั่งสารตัวอย่าง ($U_{\text{mass.samp}}$)

7.3.3 ความไม่แน่นอนจากขวดวัดปริมาตรสำหรับสารมาตรฐาน ($U_{\text{vol.std}}$)

7.3.4 ขวดวัดปริมาตรสำหรับสารตัวอย่าง ($U_{\text{vol.samp}}$)

7.3.5 ความไม่แน่นอนจากสารมาตรฐาน (U_{std})

7.3.6 ความไม่แน่นอนจากการทำ Method validation ($U_{\text{prec.}}$)

7.3.7 ความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ ($U_{\text{repeat.}}$)

7.4 หลักการคิดความไม่แน่นอน

7.4.1 หาแหล่งความไม่แน่นอนในการวัด

7.4.2 ความไม่แน่นอนมาตรฐาน (U_x)

$$U_x = \frac{U}{d}$$

สมการที่ 4

เมื่อ U = ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน / ความไม่แน่นอนจากใบรับรองการสอบเทียบ

d = divisor (ค่าความเชื่อมั่นของการวัด) ขึ้นอยู่กับลักษณะการกระจาย

1) ค่าความไม่แน่นอนที่มีการกระจายแบบสี่เหลี่ยม (Rectangular)

$$\text{ค่า } d = \sqrt{3} \text{ (ทั่วไป)}$$

2) ค่าความไม่แน่นอนที่มีการกระจายแบบสามเหลี่ยม (Triangle)

$$\text{ค่า } d = \sqrt{6} \text{ (เครื่องแก้ว)}$$

3) ค่าความไม่แน่นอนที่มีการกระจายแบบปกติ (Normal)

$$\text{ค่า } d = 2 \text{ (ระบุระดับความเชื่อมั่นที่ 95\%)}$$

7.4.2.1 การชั่งน้ำหนัก ความไม่แน่นอนประกอบด้วย

1) Repeatability จากผู้ผลิต หรือการทำ Daily Check

$$U_x = SD \quad \text{สมการที่ 5}$$

- ถ้าระบุความเชื่อถือว่า 95%

$$U_x = \frac{a}{2} \quad \text{สมการที่ 6}$$

- ถ้าไม่ระบุความเชื่อมั่น

$$U_x = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad \text{สมการที่ 7}$$

2) การชั่งที่ใช้ Tare จะคิด U_x 2 ครั้ง

7.4.2.2 เครื่องแก้วที่เกี่ยวข้องกับการตวงปริมาตร ประกอบด้วยค่าความไม่แน่นอนจาก

1) การสอบเทียบเครื่องแก้ว

- ถ้าระบุความเชื่อมั่นที่ 95%

$$U_x = \frac{a}{2} \quad \text{สมการที่ 8}$$

- ถ้าไม่ระบุความเชื่อมั่นที่ 95%

$$U_x = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad \text{สมการที่ 9}$$

- การทำ Repeatability จากการปรับปริมาตร

$$U_x = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{สมการที่ 10}$$

เมื่อ n = จำนวนครั้งของการทดสอบ

2) การเปลี่ยนปริมาตรตามอุณหภูมิ

- การขยายตัวตามปริมาตรของน้ำ = $2 \times 10^{-4} \text{ mL/}^\circ\text{C}$

- การขยายตัวตามปริมาตรของ Organic Solvent = $1 \times 10^{-3} \text{ mL/}^\circ\text{C}$

- การทดสอบซ้ำ (Reproducibility / Repeatability) เช่น การทำ

Method Precision

$$U_x = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SD = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทำ Recovery อย่างน้อย 10 ซ้ำ

- เครื่องมือวิเคราะห์ถ้าไม่ได้ทำการสอบเทียบให้ใช้ค่า SD จากการทำ

Reproducibility

7.4.2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ความไม่แน่นอนประกอบด้วย

- 1) ความไม่แน่นอนจากการชั่ง
- 2) ความไม่แน่นอนจากความบริสุทธิ์ของสาร
- 3) ความไม่แน่นอนจากการตวงปริมาตรสารละลาย

7.4.3 การหาค่าความไม่แน่นอนรวม (U_C)

7.4.3.1 กรณีหน่วยเดียวกัน

$$U_C = \sqrt{Ux_1^2 + Ux_2^2 + \dots + Ux_n^2} \quad \text{สมการที่ 11}$$

7.4.3.2 กรณีหน่วยวัดต่างกัน จะต้องเปลี่ยนค่า Ux จากแต่ละแหล่งให้เป็นความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, RSD) โดย

$$RSD = \frac{U_x}{X} \quad \text{สมการที่ 12}$$

เมื่อ X เป็นค่าเฉลี่ย หรือค่าของ Parameter นั้น

$$U_C = C \sqrt{RSD_1^2 + RSD_2^2 + \dots + RSD_n^2} \quad \text{สมการที่ 13}$$

เมื่อ C = ผลที่ได้จากการวิเคราะห์

7.4.4 การหาค่าความไม่แน่นอนขยาย U_E

$$U_E = 2 U_C \quad \text{สมการที่ 14}$$

7.5 รายงานผลการทดสอบ (รายงานค่าความไม่แน่นอนเป็นเลขนัยสำคัญ 2 ตำแหน่ง)

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายมีปริมาณสารออกฤทธิ์ = $C \pm U_E$ % ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (ค่า $k=2$) เมื่อ C = ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ ค่าความไม่แน่นอนในการวัดที่รายงานเป็นค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน คูณกับ แฟคเตอร์ $k=2$ ซึ่งมีระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 รวม 3 ปี

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos

- 1.1 ได้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ผ่านการสอบเทียบและผลการสอบเทียบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน
- 1.2 ได้สารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พร้อมสำหรับการทดลอง

1.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ triazophos โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง GC-FID ดังนี้

Column : Capillary Column HP-5 ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl-Methyl siloxane , 30 m. X 0.32 mm. (ยาว 30 เมตร, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร), หนา (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร (μm)

Injection Volume : 1 μl

Run time : 8 min

Oven Temperature : 220 °C (1 min) $\xrightarrow{2 \text{ min } (20 \text{ }^\circ\text{C/min})}$ 240 °C (5 min)

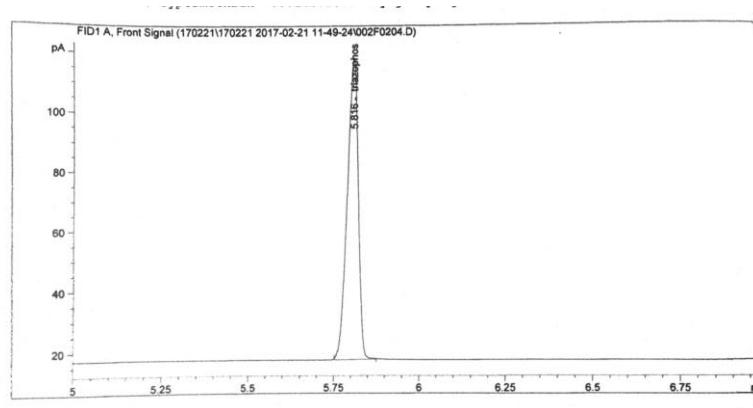
Injector Temperature : 270 °C

Detector Temperature : 270 °C

แก๊สตัวพา : Helium อัตราการไหล (Flow rate) 2.0 มิลลิตรต่อนาที

ตัวตรวจวัด (Detector) : FID (Flame Ionization Detector)

1.4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specification/Selectivity) พบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน triazophos ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี Specification/Selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน triazophos

1.5 ผลการหาค่า %Relative Percent Different (%RPD) ในสารมาตรฐาน triazophos ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ประเมินค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน triazophos

ลำดับที่	สารมาตรฐาน (std.)	น้ำหนัก (mg.)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	ค่าเฉลี่ย (Average)	%RPD
1	C1	10.4	180.5243	180.1007	0.4704
	C2	10.4	179.6771		
2	C1	10.4	180.6348	181.4652	0.9152
	C2	10.4	182.2956		
3	C1	10.7	184.9434	185.2544	0.3358
	C2	10.7	185.5654		
4	C1	10.3	181.5027	181.7608	0.2840
	C2	10.3	182.0189		
5	C1	10.4	180.4338	179.9046	0.5883
	C2	10.4	179.3754		
6	C1	10.7	185.0797	185.7417	0.7128
	C2	10.3	186.4037		
7	C1	10.4	194.9641	195.2043	0.2460
	C2	10.3	195.4444		
8	C1	10.4	188.4572	187.5785	0.9369
	C2	10.4	186.6998		
9	C1	10.4	194.5814	194.7728	0.1965
	C2	10.4	194.9641		
10	C1	10.4	194.5814	194.7728	0.1965
	C2	10.4	194.9641		
ค่าเฉลี่ย				186.6556	
SD				6.2178	

1.6 ผลการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos = % W/W ของ triazophos x ความถ่วงจำเพาะ

เมื่อ % W/W ของ triazophos = 38.3677

ความถ่วงจำเพาะ = 1.0529

แทนค่าเพื่อหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ของ triazophos = 38.3677 x 1.0529

= 40.3974 %

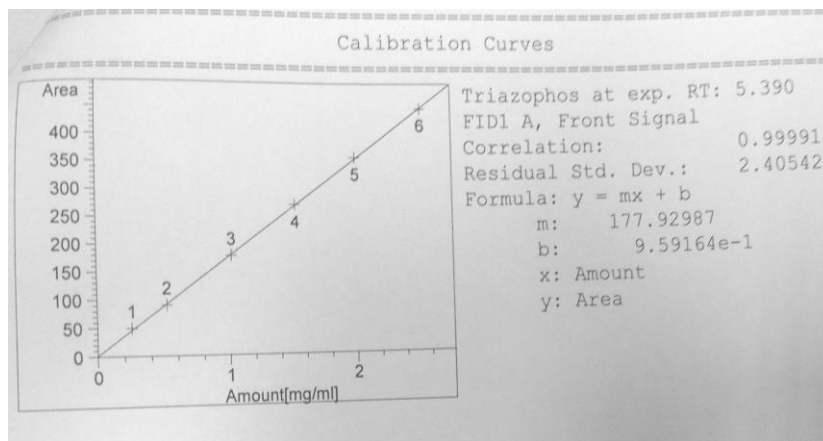
เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ของ triazophos ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC เท่ากับ 40.3974% เกณฑ์กำหนดของ triazophos IPA 40% W/V EC คือ $\pm 5\%$ (FAO, 1995) เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 38.0-42.0%

1.7 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity)

1.7.1 ผลการตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Working range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.25–2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Working range ของ triazophos ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.25	49.58500	1
0.50	91.29930	2
1.00	180.16036	3
1.50	272.34539	4
2.00	358.87330	5
2.50	449.27864	6

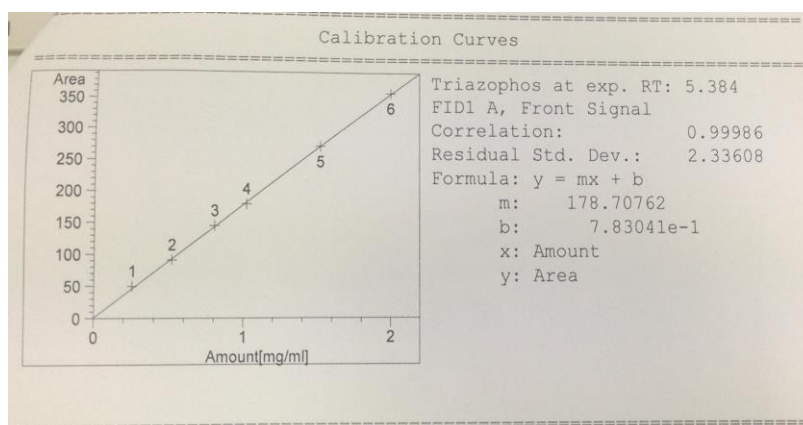


ภาพที่ 8 แสดงกราฟ Working range ของ triazophos ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml

1.7.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ให้ค่า Linearity ของ triazophos ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99986 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) ≥ 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 9

ตารางที่ 3 Linearity ของ triazophos ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	Level
0.25	49.58500	1
0.50	91.29930	2
0.80	145.97927	3
1.00	180.16036	4
1.50	272.34539	5
2.00	358.87330	6



ภาพที่ 9 แสดงค่า Linearity ของ triazophos ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.00 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99986

ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของสาร triazophos ได้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.00 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99986 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

1.8 ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

1.8.1 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ triazophos จากการตรวจสอบ Repeatability ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	16.9	38.0766	65.6	38.0671	128.2	38.4080
2	17.3	38.0888	66.3	38.0650	128.3	38.3274
3	17.2	38.0237	65.9	38.1184	128.6	38.2611
4	17.9	38.1847	65.7	38.1369	128.9	38.3324
5	18.0	38.1353	65.4	38.0383	128.5	38.2940
6	18.1	38.0220	65.5	38.2414	128.7	38.3131
7	16.6	38.1781	66.1	38.2664	128.7	38.2005
8	16.2	38.0070	64.6	38.2538	128.3	38.2612
9	17.2	37.9154	64.7	38.5033	128.1	38.2598
10	17.3	38.1827	65.8	38.1444	128.1	38.3705
	Mean	38.0814	Mean	38.1835	Mean	38.3028
	SD	0.0902	SD	0.1391	SD	0.0606

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่าดังนี้

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ %RSD (experimental) ตามสูตร

$$\text{เมื่อ } \text{SD} = 0.0966$$

$$\text{Mean} = 38.1892$$

$$\% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}}$$

$$= \frac{(0.0966 \times 100)}{38.1892}$$

$$= 0.253$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \\ \text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ration)} &= 0.3819 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.3819)} \\ &= 1.526 \end{aligned}$$

คำนวณ HORRAT ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{HORRAT} &= \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \\ &= \frac{0.253}{1.526} \\ \text{HORRAT} &= 0.17 \end{aligned}$$

จากการทดลองหาค่า Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.17 เกณฑ์การยอมรับค่า HOAART ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2

1.8.2 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ triazophos จากการตรวจสอบ Reproducibility ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	16.9	38.0766	65.6	38.5843	128.2	38.1547
2	17.3	38.0888	66.3	38.2762	128.3	38.2702
3	17.2	38.0237	65.9	38.1722	128.6	38.3591
4	17.9	38.1847	65.7	38.4630	128.9	38.4661
5	18.0	38.1353	65.4	38.0098	128.5	38.6912
6	18.1	38.0220	65.5	38.1383	128.7	38.5416
7	16.6	38.1662	66.1	38.1930	128.7	38.5671
8	16.2	38.0070	64.6	38.4476	128.3	38.8981

9	17.2	38.3177	64.7	38.2176	128.1	38.6823
10	17.3	38.1781	65.8	38.1170	128.1	38.8093
	Mean	38.1200	Mean	38.2619	Mean	38.5440
	SD	0.0963	SD	0.1806	SD	0.2366

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิม หลังจากการทดลองครั้งแรก 10 วัน ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.29 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos 40% W/V EC มีค่า HORRAT ในรูปของ Repeatability (การทวนซ้ำ) เท่ากับ 0.17 และมีค่า HORRAT ในรูปของ Reproducibility (การทำซ้ำ) ได้ค่า เท่า 0.29 ตามลำดับ (เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

1.9 ผลการตรวจความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

1.9.1 ผลการตรวจสอบ Robustness ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Oven Temperature) จาก 240 °C เป็น 250 °C ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้นให้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ triazophos จากการตรวจสอบ Robustness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	16.9	38.3518	65.6	39.8143	128.2	39.2669
2	17.3	39.0093	66.3	39.3793	128.3	39.2952
3	17.2	38.7708	65.9	39.5065	128.6	39.6283

4	17.9	39.2571	65.7	39.5828	128.9	39.5059
5	18.0	39.7971	65.4	39.3989	128.5	39.9994
6	18.1	38.0325	65.5	39.5649	128.7	38.8120
7	16.6	39.5333	66.1	39.1971	128.7	38.7842
8	16.2	38.8069	64.6	39.7565	128.3	38.7938
9	17.2	38.7872	64.7	39.7069	128.1	38.9352
10	17.3	38.6879	65.8	39.5585	128.1	38.8495
	Mean	38.9034	Mean	39.5466	Mean	39.1870
	SD	0.5251	SD	0.1876	SD	0.4229

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และคำนวณค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง ทำการทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.63 (เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

1.9.2 ผลการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์จากเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A เป็น เครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ triazophos จากการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	16.9	38.3932	65.6	38.2987	128.2	38.0311
2	17.3	38.1573	66.3	38.2331	128.3	38.0313
3	17.2	38.7130	65.9	38.2230	128.6	38.3695
4	17.9	38.2012	65.7	38.2982	128.9	38.1382
5	18.0	38.0382	65.4	38.0219	128.5	38.0643
6	18.1	38.5766	65.5	38.1837	128.7	38.1428
7	16.6	38.0301	66.1	38.0274	128.7	38.2471
8	16.2	38.0907	64.6	38.1526	128.3	38.2134
9	17.2	38.5485	64.7	38.1350	128.1	38.2129
10	17.3	38.5767	65.8	38.3252	128.1	38.0812

Mean	38.3326	Mean	38.1899	Mean	38.1532
SD	0.2579	SD	0.1074	SD	0.1085

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD และค่านวนค่า HORRAT จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองทำการทดสอบโดยเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.27 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความทน (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในรูปของ Precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.63 และ 0.27 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

1.10 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

การประเมินค่า Accuracy ของวิธีการ จาก %Recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและค่านวนค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ให้ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ triazophos

N	AI content								
	Conc.add 0.1 mg/ml			Conc.added 0.6 mg/ml			Conc.added 1.1 mg/ml		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.3776	0.4760	0.1000	0.3666	0.9595	0.6000	0.356990	1.4345	1.1000
2	0.3775	0.4733	0.1000	0.3666	0.9904	0.6000	0.357391	1.4349	1.1000
3	0.3878	0.4860	0.1000	0.3663	0.9557	0.6000	0.357380	1.4375	1.1000
4	0.3882	0.4864	0.1000	0.3644	0.9814	0.6000	0.356763	1.4326	1.1000
5	0.3891	0.4739	0.1000	0.3654	0.9772	0.6000	0.356871	1.4334	1.1000
6	0.3778	0.4759	0.1000	0.3685	0.9799	0.6000	0.356400	1.4356	1.1000
7	0.3876	0.4833	0.1000	0.3659	0.9614	0.6000	0.356640	1.4356	1.1000
8	0.3762	0.4839	0.1000	0.3685	0.9566	0.6000	0.356597	1.4345	1.1000
9	0.3782	0.4760	0.1000	0.3675	0.9582	0.3685	0.356694	1.4375	1.1000
10	0.3791	0.4859	0.1000	0.3653	0.9577	0.6000	0.357024	1.4349	1.1000
Mean	0.3786	0.4797	0.1000	0.3664	0.9604	0.6000	0.3568	1.4349	1.1000
SD	0.0055	0.0055		0.0014	0.0129		0.0003	0.0016	
% RSD	1.4397	1.1390		0.3711	1.3462		0.0915	0.1084	
% Recovery			101.10			99.00			98.01

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

% Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ = $\frac{(0.4797 - 0.3786) \times 100}{0.1000} = 101.10$

% Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง = $\frac{(0.9604 - 0.3664) \times 100}{0.0600} = 99.00$

% Recovery ที่ความเข้มข้นสูง = $\frac{(1.4349 - 0.3568) \times 100}{1.100} = 98.01$

% Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.37

จากการทดสอบหาค่า Accuracy ของวิธีการ จาก % Recovery ได้ค่า % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 101.10 % Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 99.00 % Recovery ที่ความเข้มข้นสูงเท่ากับ 98.01 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

2. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbosulfan

- 2.1 ได้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ผ่านการสอบเทียบ ผลการสอบเทียบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน
- 2.2 ได้สารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พร้อมสำหรับการทดลอง
- 2.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbosulfan ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbosulfan โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC-DAD ดังนี้

Column : Zorbax® C8, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร particle size 5 ไมครอน

Mobile phase : Methanol 88% : Water 12%

อัตราการไหล (Flow rate) : 2.00 มิลลิลิตร/นาที

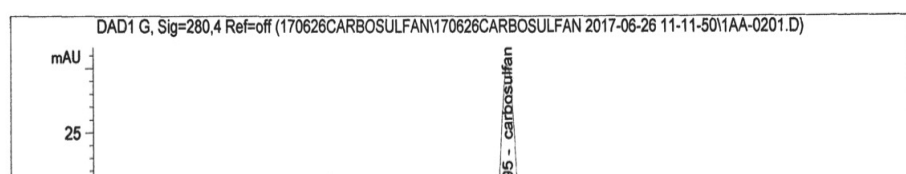
Stop time : 10 นาที

อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature) : 45 องศาเซลเซียส (°C)

ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume) : 2 ไมโครลิตร (µl)

ความยาวคลื่น (Wavelength) : 280 นาโนเมตร (nm)

ตัวตรวจวัด (Detector) : DAD (Diode Array Detector)



2.4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specification/Selectivity) พบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน carbosulfan ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี Specification/Selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 10

ภาพที่ 10 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน carbosulfan

2.5 ผลการหาค่า %Relative Percent Different (%RPD) ในสารมาตรฐาน carbosulfan ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การประเมินค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน carbosulfan

ลำดับที่	สารมาตรฐาน (std.)	น้ำหนัก (mg.)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	ค่าเฉลี่ย (Average)	%RPD
1	C1	10.7	528.9796	528.9466	0.0125
	C2	10.7	528.9136		
2	C1	10.7	530.8687	530.9534	0.0319
	C2	10.7	531.0382		
3	C1	10.7	531.1519	531.3857	0.0880
	C2	10.7	531.6196		
4	C1	10.7	529.0018	529.3669	0.1379
	C2	10.7	529.7319		
5	C1	10.6	539.3373	539.2390	0.0365
	C2	10.6	539.1406		
6	C1	10.6	538.6918	539.1417	0.1669
	C2	10.6	539.5916		

7	C1	11.0	548.3707	548.6257	0.0929
	C2	11.0	548.8806		
8	C1	11.0	550.8765	550.1713	0.2564
	C2	11.0	549.4661		
9	C1	10.4	519.6777	519.7379	0.0232
	C2	10.4	519.7982		
10	C1	10.4	518.3901	519.0339	0.2481
	C2	10.4	519.6777		
ค่าเฉลี่ย			533.6602		
SD			10.6388		

2.6 ผลการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ออกฤทธิ์ carbosulfan ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan = % W/W ของ carbosulfan × ความถ่วงจำเพาะ

เมื่อ % W/W ของ carbosulfan = 22.7834

ความถ่วงจำเพาะ = 0.9223

แทนค่าเพื่อหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbosulfan = 22.7834×0.9223
= 21.0131%

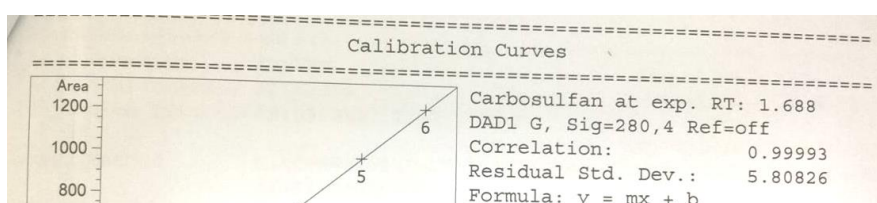
เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbosulfan ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC เท่ากับ 21.1013% เกณฑ์กำหนดของ carbosulfan IPA 20% W/V EC คือ $\pm 5\%$ (FAO, 1995) เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 19.0-21.0%

2.7 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity)

2.7.1 ผลการตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Working range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.025–0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 11

ตารางที่ 10 Working range ของ carbosulfan ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	Level
0.025	117.66327	1
0.050	246.72609	2
0.100	488.65503	3
0.150	718.52618	4
0.200	974.85657	5
0.250	1219.59973	6

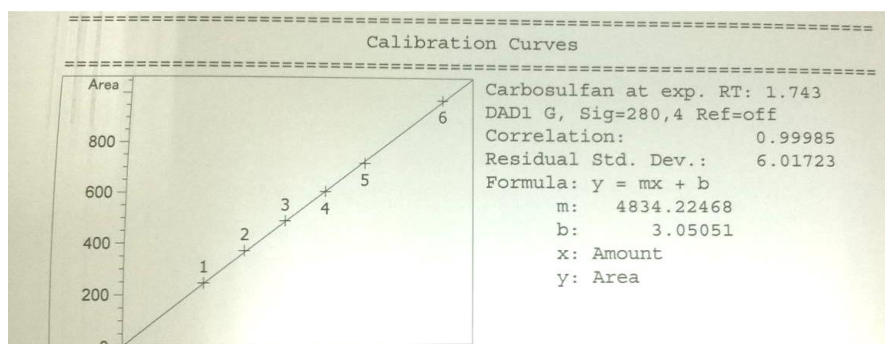


ภาพที่ 11 แสดงกราฟ Working range ของ carbosulfan ในช่วงความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml

2.7.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.05–0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99985 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 12

ตารางที่ 11 Linearity ของ carbosulfan ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.05–0.20 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	Level
0.050	246.72609	1
0.075	371.81876	2
0.100	488.65503	3
0.125	604.72821	4
0.150	718.52618	5
0.200	974.85657	6



ภาพที่ 12 แสดงค่า Linearity ของ carbosulfan ในช่วงความเข้มข้น 0.050–0.200 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99985

ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของสาร carbosulfan ได้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.05–0.20 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99985 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC)) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

2.8 ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

2.8.1 ผลการทดสอบค่า Precision โดยการตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ทำการทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbosulfan จากการตรวจสอบ Repeatability ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.100 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	37.1	20.7542	47.5	20.5701	59.9	20.0018
2	37.1	20.7202	47.5	20.5519	59.9	20.0040
3	36.5	20.4181	47.7	20.8792	60.0	20.1709
4	36.5	20.4289	47.7	20.9481	60.0	20.2227
5	38.6	20.5731	48.0	20.8540	59.2	20.2116

6	38.6	20.5520	48.0	20.8995	59.2	21.3150
7	37.4	20.5978	48.2	20.7543	62.4	20.3290
8	37.4	20.6244	48.2	20.9734	62.4	20.2370
9	39.0	20.8630	49.6	20.8651	61.7	20.5282
10	39.0	20.8530	49.6	20.9036	61.7	20.4958
	Mean	20.6385	Mean	20.8199	Mean	20.3516
	SD	0.1573	SD	0.1485	SD	0.3809

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.66 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

2.8.2 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbosulfan จากการตรวจสอบ Reproducibility ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.100 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	37.1	20.8056	47.5	20.6877	59.9	20.0465
2	37.1	20.8437	47.5	20.6747	59.9	20.1079
3	36.5	20.5380	47.7	20.9991	60.0	20.1189
4	36.5	20.5215	47.7	21.2115	60.0	20.3000
5	38.6	20.5866	48.0	21.0231	59.2	20.2904
6	38.6	20.6510	48.0	21.0286	59.2	20.2804
7	37.4	20.5338	48.2	20.8688	62.4	20.2894
8	37.4	20.5634	48.2	20.8867	62.4	20.4241
9	39.0	20.7728	49.6	20.9058	61.7	20.5417
10	39.0	20.9547	49.6	20.9069	61.7	20.5890
	Mean	20.6771	Mean	20.9193	Mean	20.2988
	SD	0.1551	SD	0.1605	SD	0.1801

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.48 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbosulfan 20% W/V EC มีค่า HORRAT ในรูปของ Repeatability (การทวนซ้ำ)

เท่ากับ 0.66 และมีค่า HORRAT ในรูปของ Reproducibility (การทำซ้ำ) ได้ค่า เท่า 0.48 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หารปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

2.9 ผลการตรวจความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

2.9.1 ผลตรวจสอบ Robustness ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่องมือ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ (Column Temperature) จาก 40 °C เป็น 25 °C (อุณหภูมิห้อง) ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbosulfan จากการตรวจสอบ Robustness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.100 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	37.1	20.7065	47.5	20.5621	59.9	20.1345
2	37.1	20.7306	47.5	20.6550	59.9	20.0173
3	36.5	20.3090	47.7	20.8077	60.0	20.1054
4	36.5	20.3067	47.7	20.9089	60.0	20.2724
5	38.6	20.5094	48.0	20.8522	59.2	20.1944
6	38.6	20.5713	48.0	20.9459	59.2	20.2493
7	37.4	20.5139	48.2	20.6913	62.4	20.2682
8	37.4	20.5612	48.2	20.7541	62.4	20.2046
9	39.0	20.7847	49.6	20.7500	61.7	20.4263
10	39.0	20.8154	49.6	20.8414	61.7	20.4951
	Mean	20.5809	Mean	20.7769	Mean	20.2368
	SD	0.1807	SD	0.1185	SD	0.1429

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.43 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

2.9.2 ผลการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จาก column Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 USNH037758 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 mm ความยาว 250 mm parical size 5 micron เป็น Column Zorbax Eclipse XDB-C18 USNH037800 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 mm ความยาว 250 mm parical size 5 micron ทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 15

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.100 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	37.1	20.9491	47.5	20.6850	59.9	20.0826
2	37.1	20.9239	47.5	20.6270	59.9	20.1522
3	36.5	20.4823	47.7	20.9852	60.0	20.2192
4	36.5	20.5508	47.7	21.0205	60.0	20.1415
5	38.6	20.6136	48.0	21.0086	59.2	20.1047
6	38.6	20.6970	48.0	20.9259	59.2	20.3855
7	37.4	20.6457	48.2	20.7941	62.4	20.3796
8	37.4	20.6801	48.2	20.8546	62.4	20.2518
9	39.0	20.7981	49.6	20.8506	61.7	22.0000
10	39.0	20.9421	49.6	20.9641	61.7	20.6581
	Mean	20.7283	Mean	20.8715	Mean	20.4375
	SD	0.1676	SD	0.1361	SD	0.5758

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbosulfan จากการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.85 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ในรูปของ Precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.43 และ 0.85 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

2.10 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

การประเมินค่า Accuracy ของวิธีการ จาก %recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ carbosulfan

n	Al content								
	Conc.add 0.035 mg/ml			Conc.added 0.060 mg/ml			Conc.added 0.085 mg/ml		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.0449	0.0789	0.0350	0.0449	0.1062	0.0600	0.0440	0.1322	0.0850
2	0.0449	0.0789	0.0350	0.0451	0.1062	0.0600	0.0440	0.1294	0.0850
3	0.0450	0.0785	0.0350	0.0451	0.1041	0.0600	0.0442	0.1318	0.0850
4	0.0439	0.0787	0.0350	0.0451	0.1045	0.0600	0.0440	0.1313	0.0850
5	0.0439	0.0786	0.0350	0.0450	0.1046	0.0600	0.0441	0.1292	0.0850
6	0.0449	0.0785	0.0350	0.0451	0.1044	0.0600	0.0440	0.1284	0.0850
7	0.0439	0.0783	0.0350	0.0450	0.1044	0.0600	0.0440	0.1283	0.0850
8	0.0440	0.0785	0.0350	0.0450	0.1049	0.0600	0.0440	0.1292	0.0850
9	0.0439	0.0788	0.0350	0.0449	0.1048	0.0600	0.0441	0.1313	0.0850
10	0.0439	0.0789	0.0350	0.0448	0.1053	0.0600	0.0440	0.1324	0.0850
Mean	0.0440	0.0787	0.0350	0.0450	0.1047	0.0600	0.0440	0.1303	0.0850
SD	0.0005	0.0002		0.0001	0.0008		0.0001	0.0016	
% RSD	1.1954	0.2763		0.2237	0.7173		0.1637	1.2253	
% Recovery			99.14			99.50			101.53

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ} = \frac{(0.0787 - 0.0440) \times 100}{0.0350} = 99.14$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง} = \frac{(0.1047 - 0.0450) \times 100}{0.0600} = 99.50$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นสูง} = \frac{(0.1303 - 0.0440) \times 100}{0.0850} = 101.53$$

0.0850

% Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 100.06

ผลการทดสอบหาค่า Accuracy ของวิธีการจาก %Recovery ได้ค่า %Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 99.14 %Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 99.05 %Recovery ที่ความเข้มข้นสูง เท่ากับ 101.53 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ dimethoate

3.1 ได้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ผ่านการสอบเทียบ ผลการสอบเทียบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน

3.2 ได้สารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พร้อมสำหรับการทดลอง

3.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ dimethoate ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ dimethoate โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง GC-FID ดังนี้

Column : Capillary Column HP-5 ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl-Methyl siloxane, 30 m. X 0.32 mm. (ยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร) หนา (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร (μm)

Injection Volume : 1 μl

Oven Temperature : 210 $^{\circ}\text{C}$

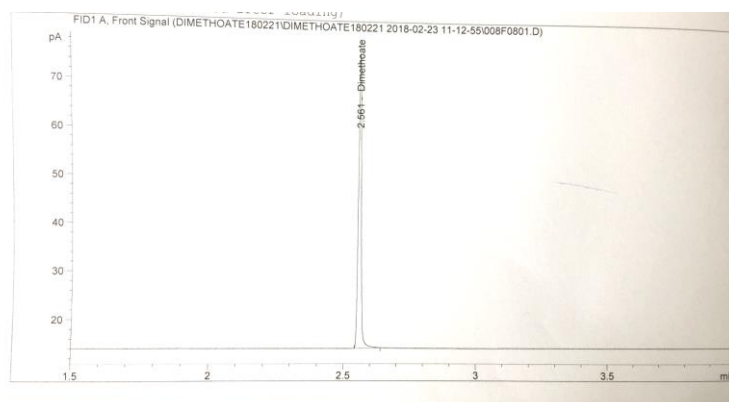
Injector Temperature : 280 $^{\circ}\text{C}$

Detector Temperature : 280 $^{\circ}\text{C}$

แก๊สตัวพา : Helium อัตราการไหล (Flow rate) 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ตัวตรวจวัด (Detector) : FID (Flame Ionization Detector)

3.4 ผลการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specification/Selectivity) พบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน dimethoate ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี Specification/Selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน dimethoate

3.5 ผลการคำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) ในสารมาตรฐาน dimethoate ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การประเมินค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน dimethoate

ลำดับที่	สารมาตรฐาน (std.)	น้ำหนัก (mg.)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	ค่าเฉลี่ย (Average)	%RPD
1	C1	10.4	50.014680	49.9637	0.2041
	C2	10.4	49.91270		
2	C1	10.4	49.976250	49.8158	0.6441
	C2	10.4	49.65539		
3	C1	10.7	47.245750	47.2298	0.0675
	C2	10.7	47.213860		
4	C1	10.3	47.270900	47.2316	0.1666
	C2	10.3	47.192210		
5	C1	10.4	48.35507	48.2783	0.3180
	C2	10.4	48.201530		
6	C1	10.7	47.53624	47.3029	0.9864
	C2	10.3	47.06965		
7	C1	10.4	47.707490	47.6955	0.0502
	C2	10.3	47.68354		
8	C1	10.4	46.976270	46.9620	0.0608
	C2	10.4	46.94770		
9	C1	10.4	52.73164	52.6270	0.3977
	C2	10.4	52.522360		

10	C1	10.4	50.146120	50.1461	1.1702
	C2	10.4	49.559320		
ค่าเฉลี่ย				48.7253	
SD				1.8507	

3.6 ผลการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ dimethoate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

ปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate = % W/W ของ dimethoate x ความถ่วงจำเพาะ
 เมื่อ % W/W ของ dimethoate = 39.5480
 ความถ่วงจำเพาะ = 1.0320
 แทนค่าเพื่อหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ของ dimethoate = 39.5480×1.0320
 = 40.8135%

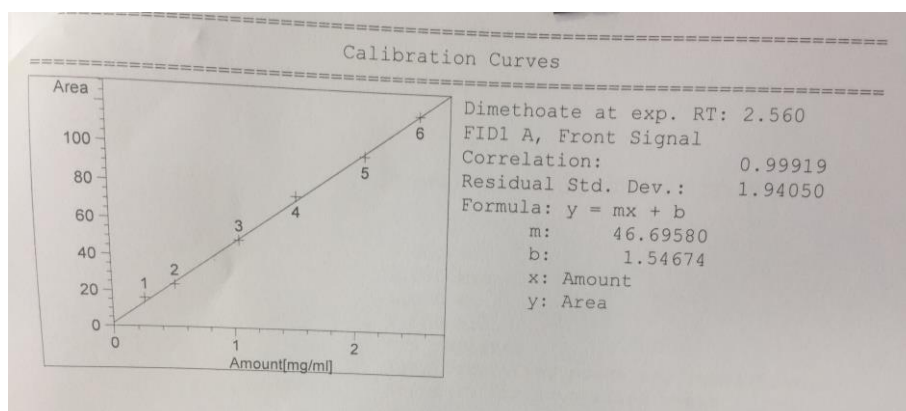
เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ dimethoate ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC เท่ากับ 40.8135 % เกณฑ์กำหนดของ dimethoate IPA 40% W/V EC คือ $\pm 5\%$ (FAO, 1995) เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 38.0-42.0%

3.7 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity)

3.7.1 ผลการตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Working range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.25–2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 14

ตารางที่ 18 Working range ของ dimethoate ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	Level
0.25	16.09696	1
0.50	23.86631	2
1.00	49.17029	3
1.50	73.99178	4
2.00	96.53149	5
2.50	118.83488	6

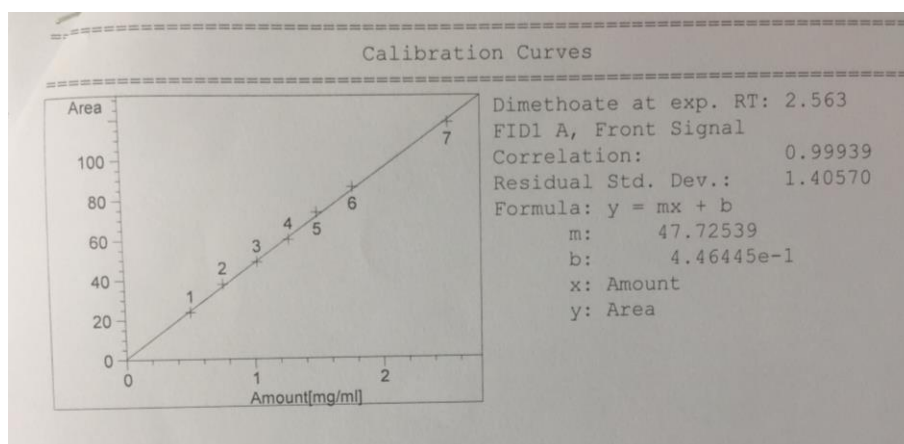


ภาพที่ 14 แสดงกราฟ Working range ของ dimethoate ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml

3.7.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.50–2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99939 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 15

ตารางที่ 19 Linearity ของ dimethoate ในช่วงความเข้มข้น 0.50–2.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	Level
0.50	23.86631	1
0.75	38.03380	2
1.00	49.17029	3
1.25	60.38599	4
1.50	73.99178	5
1.75	86.62002	6
2.50	118.83488	7



ภาพที่ 15 แสดงค่า Linearity ของ dimethoate ในช่วงความเข้มข้น 0.50–2.50 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99939

ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของสาร dimethoate ได้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.50–2.50 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99939 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) ≥ 0.995 (AOAC)) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

3.8 ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

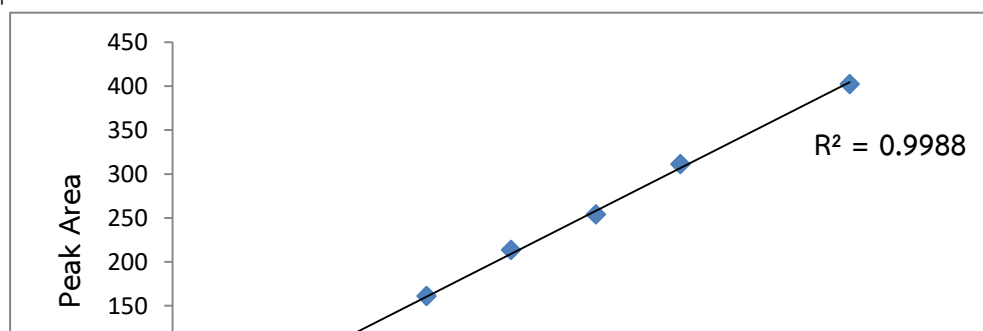
3.8.1 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ dimethoate จากการตรวจสอบ Repeatability ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.00 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	14.7	40.9247	67.9	40.7622	126.6	40.5007
2	16.8	39.7592	67.5	40.6445	127.1	40.6049
3	17.0	40.7123	66.4	40.7045	127.2	40.4395
4	14.8	39.8838	63.8	40.7126	126.2	40.3886
5	16.9	40.9596	62.8	40.5957	127.5	40.1898
6	15.5	40.9949	66.5	40.5438	127.6	40.2208
7	15.1	40.9831	63.5	40.7308	124.2	40.3595
8	15.6	40.0187	69.4	40.2546	125.8	40.2962
9	16.2	40.7485	64.7	40.6615	126.5	40.2255
10	16.3	40.7495	66.8	40.7520	128	40.2844
	Mean	40.5734	Mean	40.6362	Mean	40.3510
	SD	0.4882	SD	0.1510	SD	0.1343

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.42 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

3.8.2 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 21



ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ dimethoate จากการตรวจสอบ Reproducibility ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.00 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	14.7	40.3770	67.9	40.8519	126.6	40.4726
2	16.8	40.4545	67.5	40.4511	127.1	40.3511
3	17.0	39.0372	66.4	40.6636	127.2	40.1569
4	14.8	40.4649	63.8	40.6885	126.2	40.5001
5	16.9	41.6375	62.8	40.4459	127.5	40.2726
6	15.5	40.9727	66.5	40.8112	127.6	40.6278
7	15.1	41.0648	63.5	41.1920	124.2	40.6997
8	15.6	40.0678	69.4	40.6314	125.8	40.5431
9	16.2	40.8994	64.7	41.2984	126.5	40.2056
10	16.3	40.9132	66.8	40.7965	128	40.2328
	Mean	40.5889	Mean	40.7830	Mean	40.4062
	SD	0.7018	SD	0.2806	SD	0.1887

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.64 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ dimethoate 40% W/V EC มีค่า HORRAT ในรูปของ Repeatability (การทวนซ้ำ) เท่ากับ 0.42 และมีค่า HORRAT ในรูปของ Reproducibility (การทำซ้ำ) เท่ากับ 0.64 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

3.9 ผลการตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

3.9.1 ผลตรวจสอบ Robustness ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Oven Temperature) จาก 240 °C เป็น 250 °C ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ dimethoate จากการตรวจสอบ Robustness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.00 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	14.7	40.8303	67.9	40.2830	126.6	40.0073
2	16.8	40.5522	67.5	39.8555	127.1	40.3476
3	17.0	40.1951	66.4	40.2194	127.2	40.3063
4	14.8	40.7716	63.8	40.3187	126.2	40.1980
5	16.9	40.7943	62.8	40.5791	127.5	39.9123
6	15.5	39.8820	66.5	40.3263	127.6	39.8933
7	15.1	41.0157	63.5	40.3492	124.2	40.2395
8	15.6	41.1977	69.4	39.6466	125.8	40.0448
9	16.2	40.8273	64.7	40.4181	126.5	39.7771
10	16.3	40.0530	66.8	40.3136	128	40.1568
	Mean	40.6119	Mean	40.2310	Mean	40.0883
	SD	0.4323	SD	0.2747	SD	0.1911

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.49 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

3.9.2 ผลการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A เป็น เครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ dimethoate จากการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.00 mg/ml		ความเข้มข้น 2.00 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	14.7	40.8303	67.9	40.3104	126.6	39.7412
2	16.8	40.5522	67.5	39.9747	127.1	39.8067
3	17.0	40.1951	66.4	40.4469	127.2	40.2134
4	14.8	40.7716	63.8	40.3279	126.2	39.6094
5	16.9	40.7943	62.8	39.9523	127.5	39.5750
6	15.5	39.8820	66.5	39.9476	127.6	39.7349
7	15.1	41.0157	63.5	40.3179	124.2	40.0798
8	15.6	41.1977	69.4	39.7779	125.8	39.5569
9	16.2	40.8273	64.7	40.7399	126.5	39.6705
10	16.3	40.0530	66.8	40.2684	128	40.0943
	Mean	40.6119	Mean	40.2064	Mean	39.8082

SD	0.4323	SD	0.2893	SD	0.2370
----	--------	----	--------	----	--------

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.47 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความทน (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ในรูปของ Precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.49 และ 0.47 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

3.10 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

การประเมินค่า Accuracy ของวิธีการ จาก %Recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %Recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ให้ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ dimethoate

n	AI content								
	Conc.add 0.1 mg/ml			Conc.added 0.6 mg/ml			Conc.added 1.1 mg/ml		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.3995	0.4952	0.1000	0.3998	1.0127	0.6000	0.3999	1.5211	1.1000
2	0.3997	0.5162	0.1000	0.4000	1.0110	0.6000	0.4266	1.5152	1.1000
3	0.4016	0.4961	0.1000	0.4015	1.0027	0.6000	0.4094	1.5127	1.1000
4	0.4030	0.5116	0.1000	0.4037	1.0103	0.6000	0.4111	1.5107	1.1000
5	0.4063	0.5186	0.1000	0.4064	1.0031	0.6000	0.3995	1.5091	1.1000
6	0.4099	0.4961	0.1000	0.4028	1.0002	0.6000	0.4029	1.5055	1.1000
7	0.4072	0.5116	0.1000	0.4078	0.9950	0.6000	0.4068	1.5012	1.1000
8	0.4025	0.5000	0.1000	0.4086	0.9931	0.6000	0.4269	1.5006	1.1000
9	0.4004	0.4997	0.1000	0.4075	0.9974	0.6000	0.4151	1.5098	1.1000
10	0.4007	0.5072	0.1000	0.4063	0.9921	0.6000	0.4183	1.4921	1.1000
Mean	0.4021	0.5036	0.1000	0.4050	1.0014	0.6000	0.4103	1.5095	1.1000
SD	0.0036	0.0089		0.0033	0.0076		0.0100	0.0083	
% RSD	0.8840	1.7633		0.8152	0.7571		2.4439	0.5477	
% Recovery			101.50			99.40			99.93

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

		Conc. Added
% Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ =	$\frac{(0.5036 - 0.4021) \times 100}{0.1000} =$	101.50
% Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง =	$\frac{(1.0014 - 0.4050) \times 100}{0.6000} =$	99.40
% Recovery ที่ความเข้มข้นสูง =	$\frac{(1.5095 - 0.4103) \times 100}{1.1000} =$	99.93
% Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 100.28		

จากการทดสอบหาค่า accuracy ของวิธีการจาก %recovery ได้ค่า %Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 101.50 %Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 99.40 และ %Recovery ที่ความเข้มข้นสูง เท่ากับ 99.93 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ profenofos

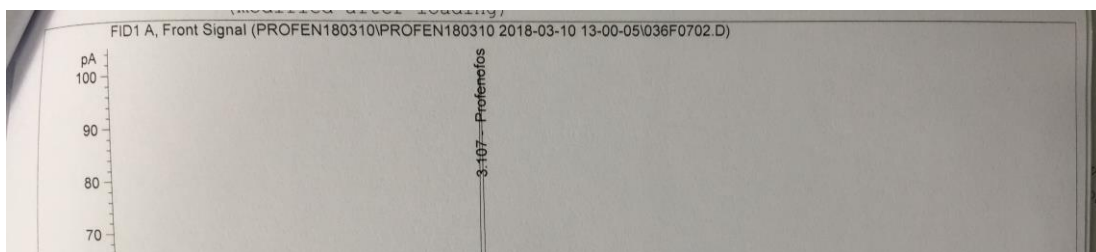
4.1 ได้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ผ่านการสอบเทียบ ผลการสอบเทียบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน

4.2 ได้สารเคมี มาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พร้อมสำหรับการทดลอง

4.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ profenofos ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง GC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ profenofos โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง GC-FID ดังนี้

- Column : Capillary Column HP-5 ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl-Methyl siloxane, 30 m. X 0.32 mm. (ยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร), หนา (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร (µm)
- Injection Volume : 1 µl
- Oven Temperature : 250 °C
- Injector Temperature : 250 °C
- Detector Temperature : 280 °C
- แก๊สตัวพา : Helium อัตราการไหล (Flow rate) 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ตัวตรวจวัด (Detector) : FID (Flame Ionization Detector)

4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specification/Selectivity) พบว่าโครมาโตแกรมของ มาตรฐาน profenofos ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี Specification/Selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน profenofos

4.5 ผลการหาค่า %Relative Percent Different (%RPD) ในสารมาตรฐาน profenofos ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 การประเมินค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน profenofos

ลำดับที่	สารมาตรฐาน (std.)	น้ำหนัก (mg.)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	ค่าเฉลี่ย (Average)	%RPD
1	C1	11.1	76.69939	76.5243	0.4575
	C2	11.1	76.349300		
2	C1	11.4	77.29814	77.2081	0.2331
	C2	11.4	77.118130		
3	C1	11.4	77.040620	77.0054	0.0916
	C2	11.4	76.970120		
4	C1	11.1	76.349300	76.2580	0.2395
	C2	11.1	76.16663		
5	C1	11.7	81.551280	81.5451	0.0152
	C2	11.7	81.538870		
6	C1	11.1	81.60729	81.3354	0.6685
	C2	11.1	81.06355		
7	C1	11.3	76.69939	76.4330	0.6970
	C2	11.3	76.16663		
8	C1	11.1	76.970120	76.5093	1.2046

	C2	11.1	76.048510		
9	C1	11.4	81.11749	81.0558	0.1523
	C2	11.4	80.99401		
10	C1	11.4	77.29814	77.2981	0.3332
	C2	11.4	77.040620		
ค่าเฉลี่ย			78.1173		
SD			2.2334		

4.6 ผลการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ profenofos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos} &= \% \text{ W/W ของ profenofos} \times \text{ความถ่วงจำเพาะ} \\ \text{เมื่อ \% W/W ของ profenofos} &= 42.5646 \\ \text{ความถ่วงจำเพาะ} &= 1.1389 \\ \text{แทนค่าเพื่อหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ของ profenofos} &= 42.5646 \times 1.1389 \\ &= 48.4768\% \end{aligned}$$

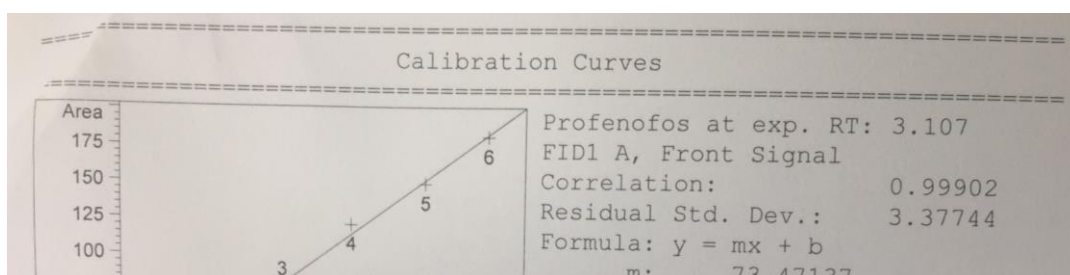
เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ profenofos ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC เท่ากับ 48.4768% เกณฑ์กำหนดของ profenofos IPA 50% W/V EC คือ $\pm 5\%$ (FAO, 1995) เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 47.5-52.5%

4.7 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity)

4.7.1 ผลการตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Working range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.25–2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 Working range ของ profenofos ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	Level
0.25	19.25180	1
0.50	38.38095	2
1.00	79.09565	3
1.50	122.41860	4
2.00	150.48556	5
2.50	182.61834	6

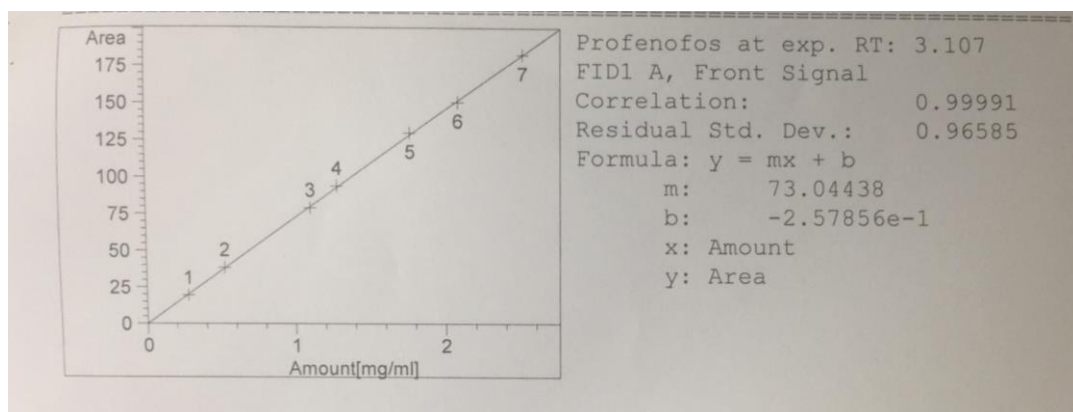


ภาพที่ 17 แสดงกราฟ Working range ของ profenofos ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml

4.7.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99991 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 18

ตารางที่ 27 Linearity ของ profenofos ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	Level
0.25	19.2518	1
0.50	38.38095	2
1.00	79.09565	3
1.25	93.92436	4
1.75	129.84784	5
2.00	150.48556	6
2.50	182.61834	7



ภาพที่ 18 แสดงค่า Linearity ของ profenofos ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99991

ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของสาร profenofos ได้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25–2.50 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99991 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC)) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

4.8 ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

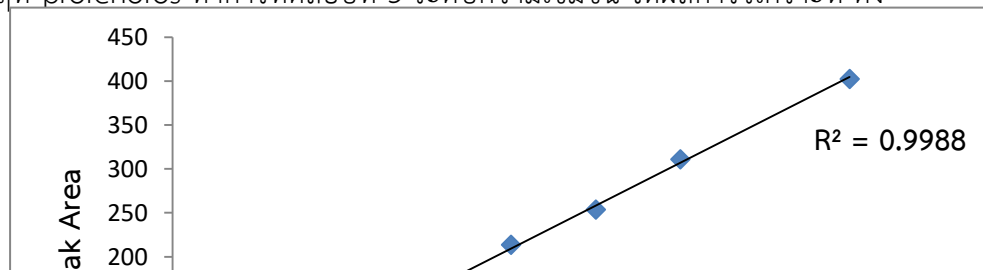
4.8.1 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ profenofos จากการตรวจสอบ Repeatability ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	% ที่ตรวจพบ
1	13.1	47.9942	55.1	49.3697	108.7	49.8861
2	13.3	48.1094	55.0	49.4179	108.6	49.7087
3	12.7	48.1603	55.0	49.0921	103.5	49.7846
4	12.8	48.1603	54.8	49.4083	103.2	49.7452
5	12.0	48.3621	54.9	49.2836	107.9	49.8025
6	13.1	48.2931	55.7	49.1736	106.3	49.4408
7	12.6	48.7395	54.4	49.3625	107.8	49.0991
8	12.9	48.8813	56.6	49.3493	108.5	49.2000
9	13.1	48.6939	54.0	49.3995	105.5	49.2602
10	12.8	48.0501	54.7	49.6750	103.0	49.8111
	Mean	48.3444	Mean	49.3531	Mean	49.5738
	SD	0.3165	SD	0.1558	SD	0.2943

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.35 เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2

4.8.2 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 29



ตารางที่ 29 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ profenofos จากการตรวจสอบ Reproducibility ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	13.1	49.8260	55.1	49.0601	108.7	49.4508
2	13.3	48.5557	55.0	49.0414	108.6	49.9108
3	12.7	49.0020	55.0	48.9380	103.5	49.7718
4	12.8	49.3182	54.8	49.3576	103.2	49.6763
5	12.0	49.8079	54.9	48.8466	107.9	49.6282
6	13.1	49.9285	55.7	49.1806	106.3	49.8297
7	12.6	49.6419	54.4	48.7070	107.8	49.6664
8	12.9	49.0624	56.6	49.2981	108.5	49.1906
9	13.1	50.0809	54.0	48.5727	105.5	49.9559
10	12.8	50.0957	54.7	48.6490	103.0	49.8539
	Mean	49.5319	Mean	48.9651	Mean	49.6934
	SD	0.5219	SD	0.2711	SD	0.2318

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.47 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ profenofos 50% W/V EC มีค่า HORRAT ในรูปของ Repeatability (การทวนซ้ำ) เท่ากับ 0.35 และมีค่า HORRAT ในรูปของ Reproducibility (การทำซ้ำ) เท่ากับ 0.47 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

4.9 ผลการตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

4.9.1 ผลตรวจสอบ Robustness ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของ Oven (Oven Temperature) จาก 260 °C เป็น 250 °C ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 30

ตารางที่ 30 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ profenofos จากกาตรตรวจสอบ Robustness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย.(mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย.(mg)	% ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย.(mg)	% ที่ตรวจพบ
1	13.1	47.7990	55.1	48.2170	108.7	48.4177
2	13.3	47.5303	55.0	49.1814	108.6	48.5188
3	12.7	47.5587	55.0	49.2003	103.5	48.5604
4	12.8	47.7144	54.8	49.1028	103.2	48.6821
5	12.0	48.2170	54.9	49.1688	107.9	48.7242
6	13.1	48.7304	55.7	49.2202	106.3	48.9250
7	12.6	48.5781	54.4	49.0316	107.8	49.2450
8	12.9	48.1304	56.6	49.0512	108.5	48.4388
9	13.1	48.2667	54.0	49.1124	105.5	49.0142
10	12.8	48.7115	54.7	49.1066	103.0	48.4298
	Mean	48.1236	Mean	49.0392	Mean	48.6956
	SD	0.4587	SD	0.2955	SD	0.2829

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.48 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

4.9.2 ผลการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบโดยการเปลี่ยนเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากเครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890A เป็น เครื่อง GC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7890B ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 31

ตารางที่ 31 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ profenofos จากการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.57 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความทน (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ในรูปของ precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.49 และ 0.57 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

4.10 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

การประเมินค่า Accuracy ของวิธีการ จาก % Recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ให้ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 32

ตารางที่ 32 ร้อยละการตรวจพบ (%Recovery) ของ profenofos

n	ความเข้มข้น 0.25 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ตย. (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	13.1	48.1811	55.1	48.5855	108.7	49.4209
2	13.3	48.3466	55.0	48.8492	108.6	49.3995
3	12.7	47.8631	55.0	48.5050	103.5	49.5673
4	12.8	48.2974	54.8	48.5153	103.2	49.4432
5	12.0	48.7205	54.9	48.2082	107.9	49.4702
6	13.1	50.1879	55.7	48.1354	106.3	49.3946
7	12.6	48.6255	54.4	48.7053	107.8	49.4624
8	12.9	48.1969	56.6	48.8037	108.5	48.9633
9	13.1	48.6983	54.0	48.7774	105.5	49.0421
10	12.8	48.1730	54.7	49.5445	103.0	49.2662
	Mean	48.5290	Mean	48.6630	Mean	49.3430
	SD	0.6425	SD	0.3922	SD	0.1953

AI content

n	Conc.add 0.35 mg/ml			Conc.added 0.60 mg/ml			Conc.added 1.10mg/ml		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.3516	0.6939	0.3500	0.3455	0.9499	0.6000	0.3588	1.4318	1.1000
2	0.3496	0.7035	0.3500	0.3462	0.8884	0.6000	0.3415	1.4421	1.1000
3	0.3510	0.7041	0.3500	0.3472	0.8916	0.6000	0.3405	1.4053	1.1000
4	0.3520	0.6994	0.3500	0.3467	0.9494	0.6000	0.3441	1.4506	1.1000
5	0.3516	0.6856	0.3500	0.3468	0.9422	0.6000	0.3447	1.4454	1.1000
6	0.3590	0.7093	0.3500	0.3473	0.9446	0.6000	0.3467	1.4534	1.1000
7	0.3518	0.7025	0.3500	0.3468	0.9461	0.6000	0.3438	1.4578	1.1000
8	0.3496	0.7084	0.3500	0.3457	0.9461	0.6000	0.3492	1.4354	1.1000
9	0.3511	0.7088	0.3500	0.3469	0.9487	0.6000	0.3441	1.3923	1.1000
10	0.3543	0.7033	0.3500	0.3555	0.9491	0.6000	0.3457	1.4231	1.1000
Mean	0.3516	0.7034	0.3500	0.3468	0.9461	0.6000	0.3444	1.4388	1.1000
SD	0.0027	0.0074		0.0029	0.0242		0.0051	0.0213	
% RSD	0.7797	1.0475		0.8285	2.5559		1.4940	1.4824	
%Recovery			100.51			99.88			99.49

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ} = \frac{(0.7034 - 0.3516) \times 100}{0.3500} = 100.51$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง} = \frac{(0.9461 - 0.3468) \times 100}{0.6000} = 99.88$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นสูง} = \frac{(1.4388 - 0.3444) \times 100}{1.1000} = 99.49$$

% Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.96

ผลการทดสอบหาค่า Accuracy ของวิธีการ จาก %Recovery ได้ค่า %Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 100.51 %Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 99.88 และ %Recovery ที่ความเข้มข้นสูง เท่ากับ 99.49 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ glyphosate

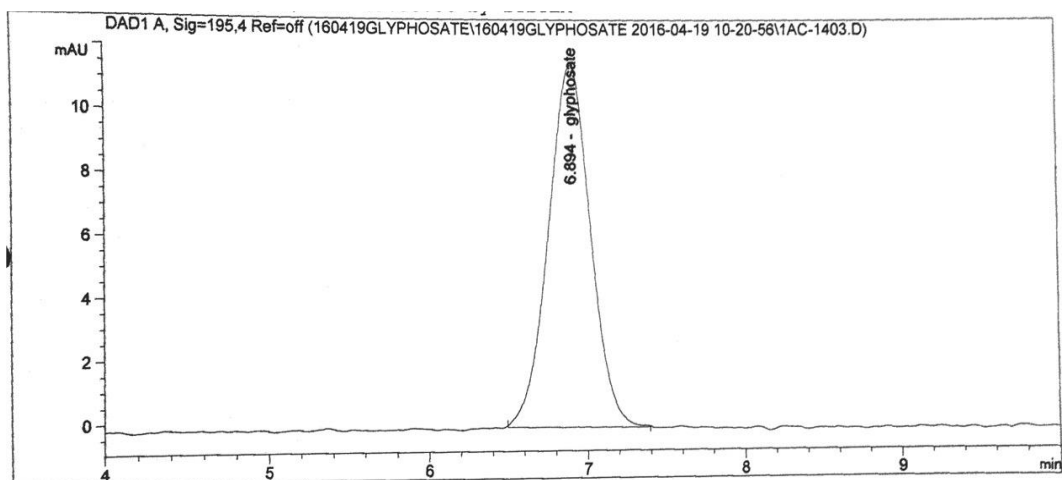
5.1 ได้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ผ่านการสอบเทียบ ผลการสอบเทียบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน

5.2 ได้สารเคมี มาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พร้อมสำหรับการทดลอง

5.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ glyphosate ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ glyphosate โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC-DAD ดังนี้

Column : Waters Column WATWAT02770 IC-Pak Anion HC Column
ความยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร
Mobile phase (ตามข้อ 1): Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 100%
อัตราการไหล (Flow rate) : 1.00 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature) : 40 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$)
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume) : 5 ไมโครลิตร
ความยาวคลื่น (Wavelength) : 195 นาโนเมตร
ตัวตรวจวัด (Detector) : DAD (Diode Array Detector)

5.4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specification/Selectivity) พบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน glyphosate ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี Specification/Selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน glyphosate

5.5 ผลการหาค่า %Relative Percent Different (%RPD) ในสารมาตรฐาน glyphosate ดังแสดงในตารางที่ 33

ตารางที่ 33 ประเมินค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน glyphosate

ลำดับที่	สารมาตรฐาน (std.)	น้ำหนัก (mg.)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	ค่าเฉลี่ย (Average)	%RPD
1	C1	10.3	215.6566	217.7576	1.9297
	C2	10.4	219.8587		
2	C1	10.3	215.1738	216.8270	1.5250
	C2	10.4	218.4803		
3	C1	10.3	215.6441	218.1909	2.3345
	C2	10.4	220.7377		
4	C1	10.3	218.0394	218.5801	0.4948
	C2	10.4	219.1209		
5	C1	10.3	215.2558	216.8189	1.4418
	C2	10.4	218.3820		
6	C1	10.3	215.6223	217.2059	1.4581
	C2	10.4	218.7895		
7	C1	10.3	214.8480	216.9772	1.9626
	C2	10.4	219.1065		
8	C1	10.3	215.0167	216.9002	1.7368
	C2	10.4	218.7838		
9	C1	10.3	215.8980	217.5883	1.5537
	C2	10.4	219.2787		
10	C1	10.3	214.6395	216.8835	2.0693
	C2	10.4	219.1274		
ค่าเฉลี่ย				217.3730	
SD				0.6301	

5.6 ผลการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ glyphosate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate IPA} &= \text{AI ของ glyphosate acid} \times 1.349 (\% \text{ w/w}) \\ &= \% \text{ W/W ของ glyphosate IPA} \times \text{ความถ่วงจำเพาะ} \end{aligned}$$

$$\text{เมื่อ AI ของ glyphosate acid} = 30.7299$$

$$\text{ความถ่วงจำเพาะ} = 1.1954$$

$$\begin{aligned} \text{แทนค่าเพื่อหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ glyphosate} &= 30.7299 \times 1.349 \\ &= 41.4488 \times 1.1954 \end{aligned}$$

= 49.5479%

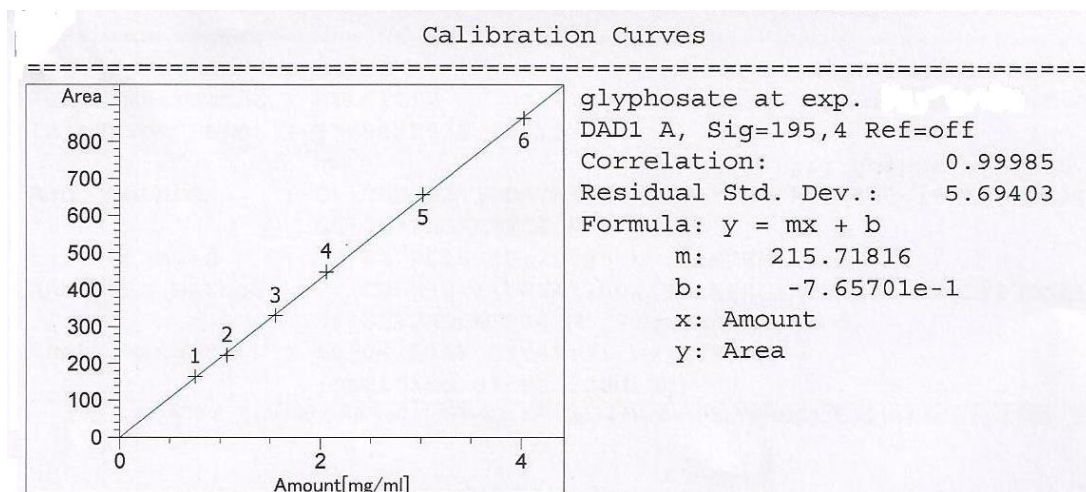
เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ glyphosate ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL เท่ากับ 49.5479% (เกณฑ์กำหนดของ glyphosate IPA 48% W/V SL คือ $\pm 5\%$ (FAO 2001) เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 45.6-50.4%)

5.7 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity)

5.7.1 ผลการตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Working range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.75–4.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 34

ตารางที่ 34 Working range ของ glyphosate ความเข้มข้น 0.75–4.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.75	164.93533	1
1.00	222.67474	2
1.50	330.63452	3
2.00	448.66638	4
3.00	656.73126	5
4.00	863.89392	6

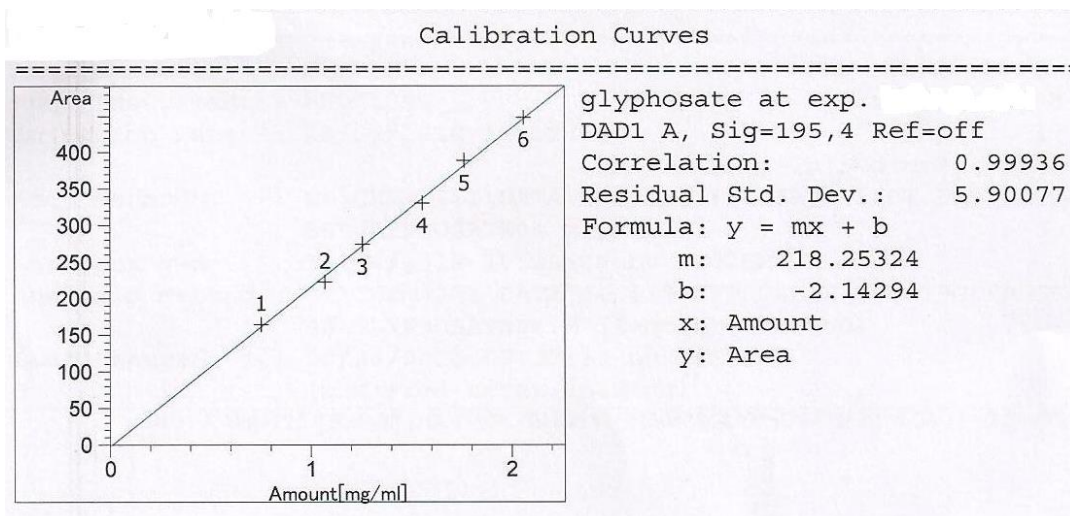


ภาพที่ 20 แสดงกราฟ Working range ของ glyphosate ในช่วงความเข้มข้น 0.75–4.00 mg/ml

5.7.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.75–2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99936 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) ≥ 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 21

ตารางที่ 35 Linearity ของ glyphosate ในช่วงความเข้มข้น 0.75–2.00 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.75	164.93533	1
1.00	222.67474	2
1.25	274.12491	3
1.50	330.63452	4
1.75	388.94550	5
2.00	448.66638	6



ภาพที่ 21 แสดงค่า Linearity ของ glyphosate ในช่วงความเข้มข้น 0.75–2.00 mg/ml โดยมีค่า Correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.99936

ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของสาร glyphosate ได้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.75–4.00 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.75–2.00 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99936 (เกณฑ์ยอมรับที่

Correlation of determination ($R^2 \geq 0.995$ (AOAC)) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

5.8 ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

5.8.1 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ทำการทดสอบที่ 3 ความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 36

ตารางที่ 36 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ glyphosate จากการตรวจสอบ Repeatability ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.75 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	27.2	49.06	35.5	49.53	51.3	49.22
2	26.8	48.79	35.5	49.17	51.3	49.34
3	25.3	48.99	35.6	49.64	51.3	49.12
4	25.3	48.64	35.5	49.67	51.8	48.96
5	25.0	48.58	35.5	49.43	49.9	49.73
6	25.3	48.57	36.4	49.60	50.8	49.39
7	25.3	49.07	37.3	49.83	51.7	48.85
8	25.5	49.58	37.3	49.52	50.9	48.65
9	25.6	48.71	34.9	49.89	51.6	48.89
10	25.5	49.22	34.9	50.01	50.1	49.07
	Mean	48.92	Mean	49.63	Mean	49.12
	SD	0.325	SD	0.242	SD	0.314

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.41 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

5.8.2 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 37

ตารางที่ 37 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ glyphosate จากการตรวจสอบ Reproducibility ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.75 (mg/ml)		ความเข้มข้น 1.0 (mg/ml)		ความเข้มข้น 1.5 (mg/ml)	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	27.2	49.58	35.5	48.89	49.7	49.71
2	25.3	50.37	35.5	49.99	50.0	50.00
3	25.7	50.39	35.6	49.89	51.3	49.24
4	25.5	49.22	37.2	49.77	51.8	49.29
5	25.6	49.39	35.5	49.57	49.9	50.05
6	25.6	49.66	36.4	49.70	50.8	50.08
7	25.6	49.81	35.2	49.55	51.7	50.13
8	25.5	49.80	37.3	50.23	50.9	49.01
9	25.5	49.90	34.9	50.02	51.6	48.89
10	25.5	50.08	35.0	49.51	50.1	49.07
	Mean	49.82	Mean	49.71	Mean	49.55
	SD	0.385	SD	0.372	SD	0.496

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.57 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ glyphosate 48% W/V SL มีค่า HORRAT ในรูปของ Repeatability (การทวนซ้ำ) เท่ากับ 0.41 และ มีค่า HORRAT ในรูปของ Reproducibility (การทำซ้ำ) ได้ค่า เท่า 0.57 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

5.9 ผลการตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

5.9.1 ผลการตรวจสอบค่า Robustness ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ทดสอบ โดยการเปลี่ยนความยาวคลื่นจาก 195 นาโนเมตร เป็น 198 นาโนเมตร ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 38

ตารางที่ 38 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ glyphosate จากการตรวจสอบ Robustness ที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.75 (mg/ml)		ความเข้มข้น 1.0 (mg/ml)		ความเข้มข้น 1.5 (mg/ml)	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ

1	27.2	49.78	35.5	49.66	49.7	49.99
2	27.2	49.52	35.5	49.78	50.0	49.81
3	26.8	49.98	35.5	49.86	51.3	48.98
4	25.3	49.42	35.5	49.25	51.8	49.37
5	25.0	49.58	36.4	49.77	49.9	49.96
6	25.3	48.87	36.4	49.89	50.8	49.93
7	25.7	49.70	35.2	49.84	51.7	48.94
8	25.5	49.88	37.3	49.29	50.9	48.83
9	25.6	49.22	34.9	49.73	51.6	48.81
10	25.5	49.11	34.9	49.99	50.1	49.16
	Mean	49.51	Mean	49.70	Mean	49.38
	SD	0.354	SD	0.248	SD	0.498

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ Robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.50 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

5.9.2 ผลการตรวจสอบ Ruggedness ทดสอบโดยการเปลี่ยน Column จาก Column Waters Column WATWAT02770 IC-Pak Anion HC Column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร เป็น Column SUPELCO LC-SAX 58996 Column Number 181675 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.4 มิลลิเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร particle size 5 ไมโครเมตร ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 39

ตารางที่ 39 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ glyphosate จากการตรวจสอบ Ruggedness ที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.75 (mg/ml)		ความเข้มข้น 1.0 (mg/ml)		ความเข้มข้น 1.5 (mg/ml)	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	27.2	48.67	35.5	49.86	49.7	49.02
2	27.5	48.84	35.6	49.39	50	49.12
3	26.8	49.16	37.2	48.59	51.3	49.18
4	25.3	49.69	35.5	48.82	51.8	49.40
5	25.3	50.27	36.4	49.14	49.9	51.22
6	25.7	49.67	35.2	49.48	50.8	49.12
7	25.7	49.52	37.3	48.67	51.7	48.69

8	25.5	49.50	34.9	49.81	50.9	48.51
9	25.6	50.40	33.6	49.90	51.6	49.59
10	25.5	48.71	35.0	48.87	50.1	49.13
	Mean	49.44	Mean	49.19	Mean	49.30
	SD	0.604	SD	0.466	SD	0.743

การตรวจสอบ Precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.83 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความทน (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ในรูปของ Precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.50 และ 0.83 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

5.10 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

การประเมินค่า Accuracy ของวิธีการ จาก %Recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %Recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 40

ตารางที่ 40 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ glyphosate

n	AI content								
	Conc.add 0.35 mg/ml)			Conc.added 0.6 mg/ml)			Conc.added 1.1 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.2790	0.6193	0.3500	0.2673	0.8708	0.6000	0.2692	1.3944	1.1000

2	0.2778	0.6409	0.3500	0.2786	0.8682	0.6000	0.2711	1.3931	1.1000
3	0.2747	0.6218	0.3500	0.2599	0.8799	0.6000	0.2672	1.3741	1.1000
4	0.2641	0.6328	0.3500	0.2629	0.8500	0.6000	0.2650	1.3954	1.1000
5	0.2822	0.6326	0.3500	0.2720	0.8550	0.6000	0.2953	1.3915	1.1000
6	0.2739	0.6233	0.3500	0.2760	0.9062	0.6000	0.2831	1.3841	1.1000
7	0.2761	0.6277	0.3500	0.2712	0.8561	0.6000	0.2738	1.3843	1.1000
8	0.2898	0.6248	0.3500	0.2737	0.8883	0.6000	0.2701	1.3007	1.1000
9	0.2772	0.6233	0.3500	0.2815	0.8510	0.6000	0.2697	1.3889	1.1000
10	0.2750	0.6270	0.3500	0.2619	0.8623	0.6000	0.2773	1.3729	1.1000
Mean	0.2767	0.6259	0.3500	0.2716	0.8652	0.6000	0.2706	1.3866	1.1000
SD	0.0065	0.0065		0.0073	0.0182		0.0091	0.0283	
%RSD	2.3557	1.0334		2.6971	2.0997		3.3485	2.0395	
%Recovery			99.77			98.93			101.45

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ} = \frac{(0.6259 - 0.2767) \times 100}{0.3500} = 99.77$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง} = \frac{(0.8652 - 0.2716) \times 100}{0.6000} = 98.93$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นสูง} = \frac{(1.3866 - 0.2706) \times 100}{1.1000} = 101.45$$

% Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 100.05

จากการทดสอบหาค่า Accuracy ของวิธีการจาก % Recovery ได้ค่า % Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 99.77, % Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 98.93 และ % Recovery ที่ความเข้มข้นสูง เท่ากับ 101.45 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

6. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbendazim

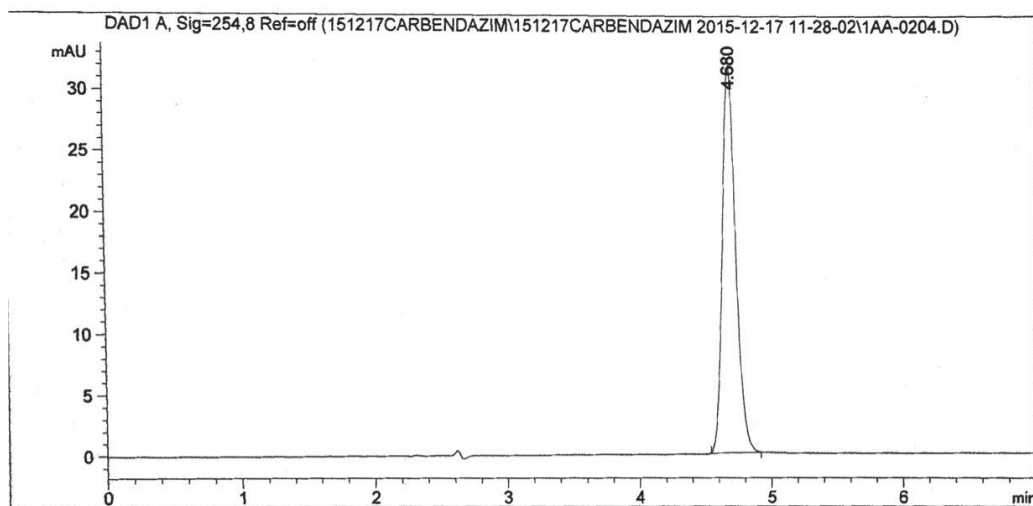
6.1 ได้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ผ่านการสอบเทียบ ผลการสอบเทียบผ่านตามเกณฑ์มาตรฐาน

6.2 ได้สารเคมี สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่พร้อมสำหรับการทดลอง

6.3 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ในการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbendazim ปรับตั้งสภาวะการใช้งานของเครื่อง HPLC ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด DAD ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ carbendazim โดยควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC-DAD ดังนี้

Column	: Agilent Column ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical ความยาว 250 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร partical size 5 ไมโครเมตร
Mobile phase	: Methanol 55% : water 45%
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1.00 มิลลิลิตร/นาที
อุณหภูมิคอลัมน์ (Column Temperature)	: 40 องศาเซลเซียส (°C)
ปริมาตรที่ฉีด (Injection Volume)	: 1 ไมโครลิตร
ความยาวคลื่น (Wavelength)	: 254 นาโนเมตร
ตัวตรวจวัด (Detector)	: DAD (Diode Array Detector)

6.4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specification/Selectivity) พบว่าโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน carbendazim ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี specification/selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 22



ภาพที่ 22 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน carbendazim

6.6 ผลการหาค่า %Relative Percent Different (%RPD) ในสารมาตรฐาน carbendazim ดังแสดงในตารางที่ 41

ตารางที่ 41 ประเมินค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน carbendazim

ลำดับที่	สารมาตรฐาน (std.)	น้ำหนัก (mg.)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)	ค่าเฉลี่ย (Average)	%RPD
1	C1	14.0	225.0885	222.7483	2.1012
	C2	13.9	220.4081		
2	C1	14.0	225.1368	222.8291	2.0713
	C2	13.9	220.5214		
3	C1	14.0	225.6461	223.2251	2.1691
	C2	13.9	220.8041		
4	C1	14.0	224.9100	222.7898	1.9033
	C2	13.9	220.6696		
5	C1	14.0	225.5785	223.2534	2.0829
	C2	13.9	220.9284		
6	C1	14.0	225.6686	223.3770	2.0518
	C2	13.9	221.0854		
7	C1	14.0	225.9317	223.4873	2.1875
	C2	13.9	221.0429		
8	C1	14.0	225.4520	223.1515	2.0618
	C2	13.9	220.8511		
9	C1	14.0	225.7855	223.6641	1.8970
	C2	13.9	221.5427		
10	C1	14.0	225.7458	223.6505	1.8738
	C2	13.9	221.5551		
ค่าเฉลี่ย				223.4661	
SD				0.2125	

6.7 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbendazim

ปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim = % W/W ของ carbendazim × ความถ่วงจำเพาะ

เมื่อ % W/W ของ carbendazim = 43.73
 ความถ่วงจำเพาะ = 1.1608
 แทนค่าเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbendazim = 43.73×1.1608
 = 50.7618%

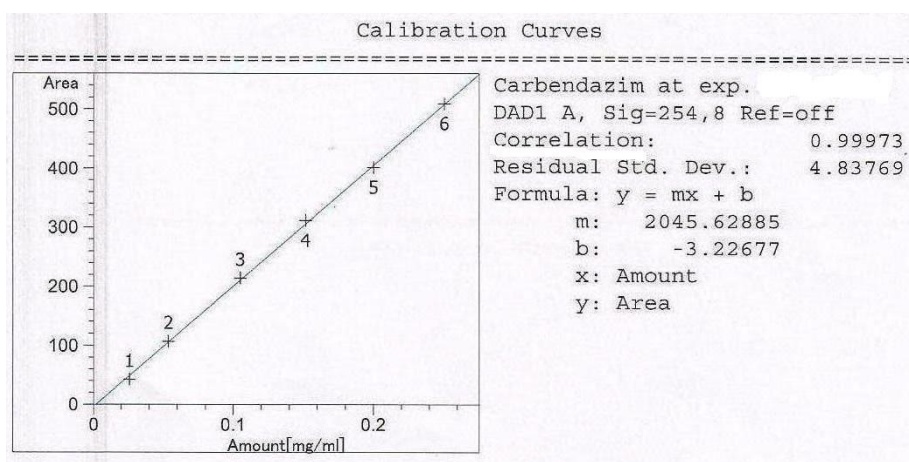
เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ ของ carbendazim ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC เท่ากับ 50.7618% เกณฑ์กำหนดของ carbendazim 50% W/V SC คือ ± 2.5 % เกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 47.5 - 52.5%

6.8 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity)

6.8.1 ผลการตรวจสอบช่วงการใช้งาน (Working range) มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมค่าความเข้มข้น 0.025–0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 42

ตารางที่ 42 Working range ของ carbendazim ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.025	42.21716	1
0.050	106.78599	2
0.100	214.36127	3
0.150	311.57951	4
0.200	401.26384	5
0.250	509.19182	6

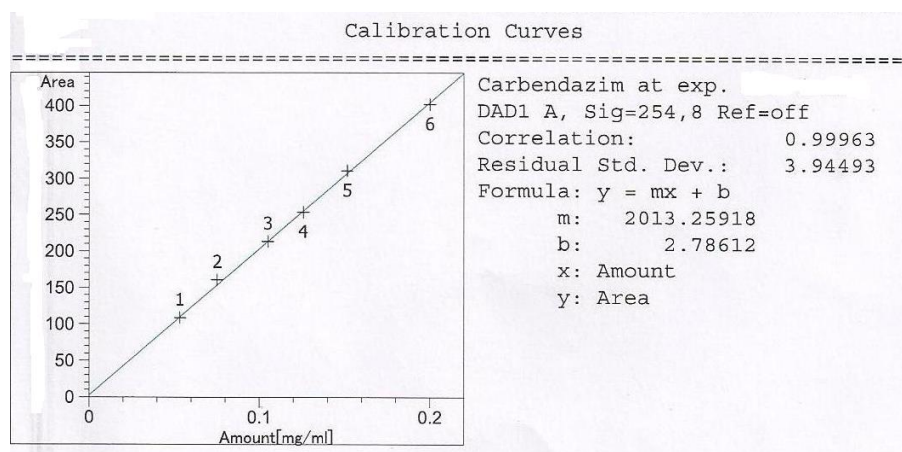


ภาพที่ 23 แสดงกราฟ Working range ของ carbendazim ในช่วงความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml

6.8.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.05–2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99963 (เกณฑ์ยอมรับที่ Correlation of determination (R^2) \geq 0.995 (AOAC)) ดังแสดงในภาพที่ 24

ตารางที่ 43 Linearity ของ carbendazim ให้ค่าในช่วงความเข้มข้น 0.05–2.00mg/ml

ความเข้มข้น (mg/ml)	Peak area	level
0.050	108.92508	1
0.075	160.83682	2
0.100	213.53798	3
0.125	253.81264	4
0.150	311.04944	5
0.200	402.40475	6



ภาพที่ 24 แสดงค่า Linearity ของ carbendazim ในช่วงความเข้มข้น 0.05–2.00mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99963

ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Working range/Linearity) ของสาร carbendazim ได้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.025–0.250 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.05–0.20 mg/ml โดยมีค่า Correlation of determination (R^2) เท่ากับ 0.99963 (เกณฑ์ยอมรับที่

Correlation of determination (R^2) ≥ 0.995 (AOAC) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

6.9 ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

6.9.1 ผลการทดสอบหาค่า Precision โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 44

ตารางที่ 44 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbendazim จากการตรวจสอบ Repeatability ที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.100 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	%สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	15.0	50.01	20.2	49.61	25.1	50.69
2	15.0	50.01	20.2	49.30	25.1	50.91
3	15.0	50.07	19.8	50.20	25.1	50.89
4	15.0	50.19	19.8	50.36	25.1	50.83
5	15.0	50.22	19.8	50.55	25.1	50.81
6	15.0	50.42	19.8	50.44	25.1	50.88
7	15.0	50.51	19.8	50.53	25.1	50.75
8	15.0	50.53	20.1	51.82	25.1	50.88
9	15.0	50.64	20.1	51.99	25.1	50.83
10	15.0	50.70	19.8	49.05	25.1	50.86
	Mean	50.33	Mean	50.39	Mean	50.83
	SD	0.262	SD	0.960	SD	0.068

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.58 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

6.9.2 ผลการทดสอบค่า Precision โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (Reproducibility) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 45

ตารางที่ 45 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbendazim จากการตรวจสอบ Reproducibility ที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.1 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	14.9	50.00	20.3	49.88	25.1	50.75

2	14.9	49.98	20.3	49.94	25.1	50.75
3	14.9	50.32	20.3	49.79	25.1	50.04
4	14.9	50.21	20.3	49.86	25.1	50.04
5	14.9	50.22	20.3	49.92	25.1	50.81
6	14.9	50.26	20.3	49.91	25.1	50.82
7	14.9	50.24	20.3	49.92	25.1	50.72
8	14.9	50.28	20.3	50.00	25.1	50.86
9	14.9	50.34	20.3	49.93	25.1	50.60
10	14.9	50.19	20.3	50.04	25.1	50.66
	Mean	50.19	Mean	43.00	Mean	50.80
	SD	0.118	SD	0.072	SD	0.147

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.15 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ carbendazim 50% W/V SC มีค่า HORRAT ในรูปของ Repeatability (การทวนซ้ำ) เท่ากับ 0.58 และ มีค่า HORRAT ในรูปของ Reproducibility (การทำซ้ำ) ได้ค่า เท่า 0.15 ตามลำดับ (เกณฑ์ยอมรับค่า HORRA ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Repeatability และ Reproducibility อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

6.10 ผลการตรวจสอบความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness)

6.10.1 ผลการตรวจสอบ Robustness ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยการเปลี่ยนความยาวคลื่นจาก 254 นาโนเมตร เป็น 257 นาโนเมตร ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 46

ตารางที่ 46 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbendazim จากการตรวจสอบ Robustness ที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.1 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	14.8	50.39	19.9	50.79	25.1	50.75

2	14.8	50.41	19.9	50.78	25.1	50.72
3	14.8	50.47	19.9	50.77	25.1	50.83
4	14.8	50.39	19.9	50.84	25.1	50.68
5	14.8	50.44	19.9	50.85	25.1	50.69
6	14.8	50.39	19.9	50.80	25.1	50.58
7	14.8	50.48	20.1	50.98	25.2	50.89
8	14.8	50.35	20.1	51.13	25.2	50.54
9	14.8	50.49	20.1	50.99	25.2	50.45
10	14.8	50.47	20.1	50.89	25.2	50.52
	Mean	50.43	Mean	50.88	Mean	50.66
	SD	0.040	SD	0.100	SD	0.121

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ robustness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.14 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

6.10.2 ผลการตรวจสอบ ruggedness ทดสอบโดยการเปลี่ยน Column จาก Agilent Column ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร particle size 5 ไมโครเมตร เป็น Agilent Column ZORBAX Eclipse plus C18 Rapid Resolution HT ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.4 มิลลิเมตร ความยาว 77 มิลลิเมตร particle size 1.8 ไมโครเมตร ให้ผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 47

ตารางที่ 47 เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ carbendazim จากการตรวจสอบ Ruggedness ที่ 3 ความเข้มข้น

n	ความเข้มข้น 0.075 mg/ml		ความเข้มข้น 0.10 mg/ml		ความเข้มข้น 0.125 mg/ml	
	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ ที่ตรวจพบ
1	14.8	50.05	19.9	50.62	25.1	50.43
2	14.8	49.99	19.9	50.73	25.1	50.49
3	14.8	50.07	19.9	50.81	25.1	50.59
4	14.8	49.95	19.9	50.81	25.1	50.51
5	14.8	49.91	19.9	50.82	25.1	50.61
6	14.8	49.93	20.1	50.78	25.2	50.35
7	14.8	49.97	20.1	50.94	25.2	50.40
8	14.8	50.01	20.1	50.89	25.2	50.38
9	14.8	49.98	20.1	50.89	25.2	50.42
10	14.8	49.96	20.1	50.04	25.2	50.39
	Mean	49.98	Mean	50.83	Mean	50.46
	SD	0.049	SD	0.115	SD	0.089

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.07 (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2)

ผลการตรวจสอบความทน (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ในรูปของ precision ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.14 และ 0.07 ตามลำดับ (เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ของ AOAC ยอมรับที่ ≤ 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) ดังนั้น วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ให้ผลการทดสอบ Precision ในรูปของ Robustness/Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

6.11 ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy)

การประเมินค่า accuracy ของวิธีการ จาก %recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ให้ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 48

ตารางที่ 48 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ carbendazim

n	AI content								
	Conc.add 0.035 mg/ml)			Conc.added 0.06 mg/ml)			Conc.added 0.085 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	0.0359	0.0710	0.0350	0.0359	0.0965	0.0600	0.0353	0.1197	0.0850
2	0.0358	0.0709	0.0350	0.0358	0.0950	0.0600	0.0352	0.1193	0.0850
3	0.0356	0.0709	0.0350	0.0356	0.0941	0.0600	0.0351	0.1195	0.0850
4	0.0359	0.0669	0.0350	0.0359	0.0944	0.0600	0.0355	0.1197	0.0850
5	0.0358	0.0703	0.0350	0.0359	0.0953	0.0600	0.0353	0.1158	0.0850
6	0.0357	0.0723	0.0350	0.0357	0.0946	0.0600	0.0353	0.1185	0.0850
7	0.0362	0.0721	0.0350	0.0362	0.0954	0.0600	0.0350	0.1193	0.0850
8	0.0355	0.0721	0.0350	0.0356	0.0954	0.0600	0.0357	0.1197	0.0850
9	0.0352	0.0729	0.0350	0.0362	0.0946	0.0600	0.0354	0.1203	0.0850
10	0.0357	0.0712	0.0350	0.0357	0.0964	0.0600	0.0355	0.1193	0.0850
Mean	0.0358	0.0711	0.0350	0.0359	0.0951	0.0600	0.0353	0.1194	0.0850
SD	0.0003	0.0017		0.0002	0.0008		0.0002	0.0012	
%RSD	0.7465	2.3462		0.6332	0.8611		0.5877	1.0464	
%Recovery			100.86			98.67			98.94

การคำนวณค่า % Recovery คำนวณตามสูตร ดังนี้

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

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ} = \frac{(0.0711 - 0.0358) \times 100}{0.0350} = 100.86$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง} = \frac{(0.0951 - 0.0359) \times 100}{0.0600} = 98.67$$

$$\% \text{ Recovery ที่ความเข้มข้นสูง} = \frac{(0.1194 - 0.0353) \times 100}{0.0850} = 98.94$$

% Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 99.49

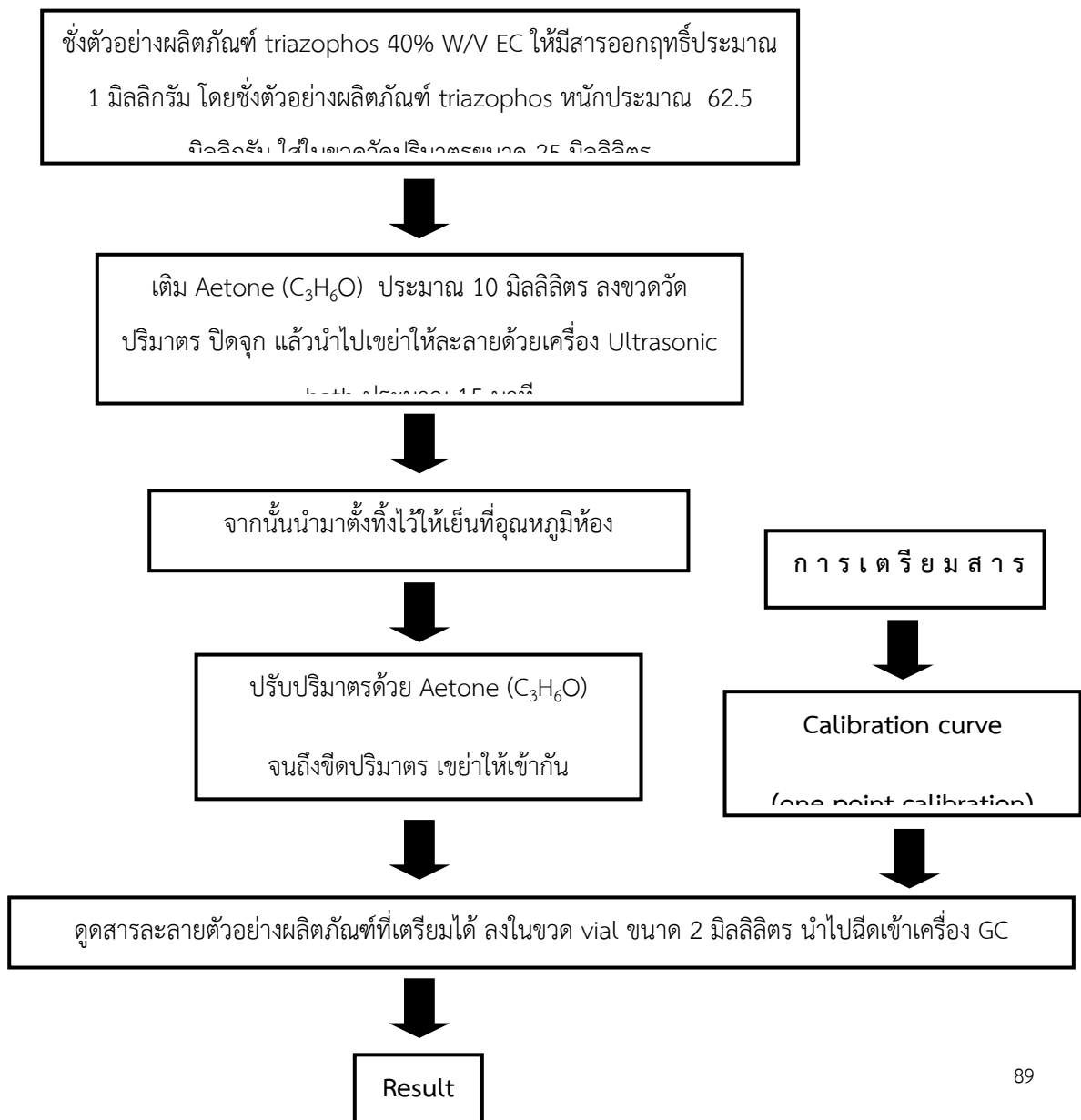
จากการทดสอบหาค่า accuracy ของวิธีการจาก %Recovery ได้ค่า %Recovery ที่ความเข้มข้นต่ำ เท่ากับ 100.86 %Recovery ที่ความเข้มข้นกลาง เท่ากับ 98.67 และ %Recovery ที่ความเข้มข้นสูง เท่ากับ 98.94 โดยค่าที่ได้อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

7. ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์

6.9 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos

7.1.1. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์

Flow diagram



7.1.2 ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน triazophos

ชั่งสารมาตรฐาน triazophos (Purity 98.0%) จำนวน 2 ซ้ำ (C_1 , C_2) ให้มีสารออกฤทธิ์ประมาณ 1 มิลลิกรัม โดยชั่งสารมาตรฐาน triazophos (purity 98.0%) หนักประมาณ 10.2 มิลลิกรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

เติม Aetone (C_3H_6O) ประมาณ 50 มิลลิลิตร ลงขวดวัดปริมาตร ปิดจุก แล้วนำไปเขย่าให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที

จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ปรับปริมาตรด้วย Aetone (C_3H_6O)
จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

ดูดสารละลายสารมาตรฐานที่เตรียมได้ ลงในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC

7.1.3 สูตรการคำนวณ

1) การคำนวณหา Response factor (f)

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

H_s

f = ค่า response factor ของสารมาตรฐาน

S = น้ำหนักของ triazophos ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัม)

P = % ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน triazophos

H_s = พื้นที่ใต้พีค ของ triazophos ในสารละลายมาตรฐาน

2) การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ triazophos ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos

$$\text{Triazophos content} = \frac{(H_w \times f)}{w}$$

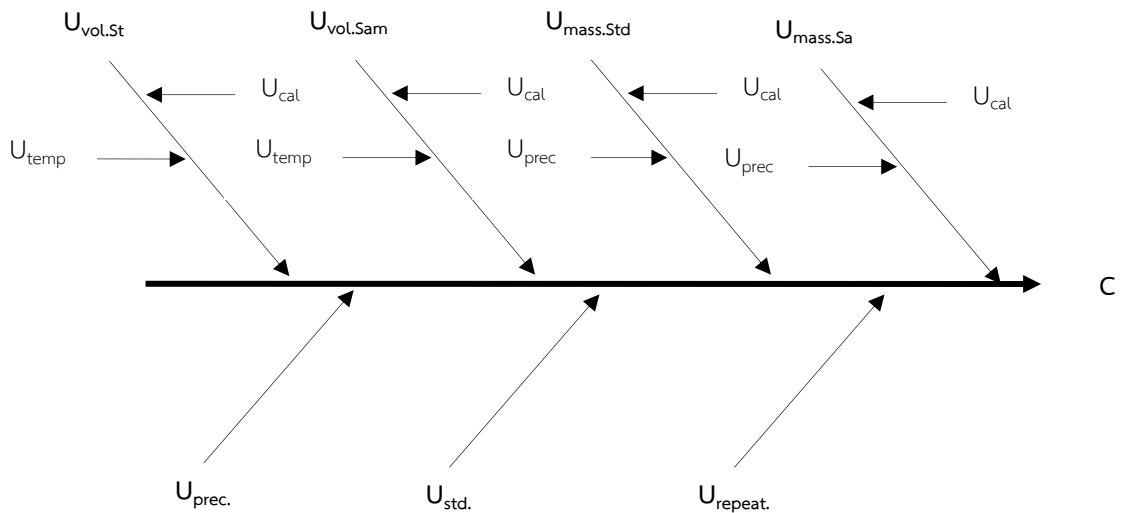
w

H_w = พื้นที่ใต้พีคของ triazophos ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos

f = ค่าเฉลี่ย Response factor

w = น้ำหนัก (มิลลิกรัม) ของ triazophos ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์

7.1.4 แผนผังก้างปลาแสดงแหล่งของความไม่แน่นอน



7.1.5 การหาแหล่งของความไม่แน่นอน

1) ความไม่แน่นอนจากการชั่งสารมาตรฐาน ($U_{mass.std}$)

1.1) การทำ Daily check (U_{prec})

1.2) การสอบเทียบเครื่องชั่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (U_{cal})

- 2) ความไม่แน่นอนจากการชั่งสารมาตรฐาน ($U_{\text{mass.samp}}$)
 - 2.1) การทำ Daily check (U_{prec})
 - 2.2) การสอบเทียบเครื่องชั่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (U_{cal})
- 3) ความไม่แน่นอนจากขวดวัดปริมาตรสำหรับสารมาตรฐาน ($U_{\text{vol.std}}$)
 - 3.1) การเปลี่ยนแปลงปริมาตรตามอุณหภูมิ (U_{temp})
 - 3.2) การสอบเทียบเครื่องแก้ว ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (U_{cal})
- 4) ขวดวัดปริมาตรสำหรับสารตัวอย่าง ($U_{\text{vol.samp}}$)
 - 4.1) การเปลี่ยนแปลงปริมาตรตามอุณหภูมิ (U_{temp})
 - 4.2) การสอบเทียบเครื่องแก้ว ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (U_{cal})
- 5) ความไม่แน่นอนจากสารมาตรฐาน (U_{std})
 - 5.1) ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน
- 6) ความไม่แน่นอนจากการทำ Method validation ($U_{\text{prec.}}$)
- 7) ความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ ($U_{\text{repeat.}}$)
 - 7.1) ค่า SD จากทดสอบเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ของสาร จำนวนอย่างน้อย 10 ซ้ำ

7.1.6 การหาค่าความไม่แน่นอนมาตรฐาน (U_x)

7.1.6.1 ความไม่แน่นอนจากการชั่งสารมาตรฐาน ($U_{\text{mass. std}}$)

- 1) การหาค่า U_{prec} จากการทำ Daily Check ของการชั่งสารมาตรฐาน

ตารางที่ 49 ค่า U_{prec} จากการทำ Daily Check ของการชั่งสารมาตรฐาน triazophos

จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก (กรัม)
1	0.1000
2	0.0998
3	0.1000
4	0.0999
5	0.0999
6	0.0998
7	0.0999
8	0.0998
9	0.1000
10	0.0999
Mean	0.0999

SD	8.16×10^{-5}
----	-----------------------

$$\text{ดังนั้น } U_{\text{prec}} = 8.16 \times 10^{-5}$$

2) ความไม่แน่นอนจากการสอบเทียบเครื่องชั่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (U_{cal})

ค่า uncertainty จากการสอบเทียบเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เท่ากับ ± 0.0001901

$$\text{ดังนั้น } U_{\text{cal}} = \frac{0.0001901}{2}$$

2

$$U_{\text{cal}} = 9.51 \times 10^{-5}$$

การคำนวณค่า $U_{\text{mass std}}$

$$U_{\text{mass std}} = \sqrt{U^2_{\text{Cal. groos}} + U^2_{\text{Prec. groos}} + U^2_{\text{Cal. tare}} + U^2_{\text{Prec. tare}}}$$

$$= \sqrt{(9.51 \times 10^{-5})^2 + (8.16 \times 10^{-5})^2 + (9.51 \times 10^{-5})^2 + (8.16 \times 10^{-5})^2}$$

$$= 0.000177 \text{ หรือ } 1.77 \times 10^{-4} \text{ g}$$

$$U_{\text{mass std}} = 1.77 \times 10^{-4} \text{ g}$$

7.1.6.2 ความไม่แน่นอนจากการชั่งสารตัวอย่าง ($U_{\text{mass. samp}}$)

1) การหาค่า U_{prec} จากการทำ Daily Check ของการชั่งสารตัวอย่าง

ตารางที่ 50 ค่า U_{prec} จากการทำ Daily Check ของการชั่งสารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ triazophos

จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก (กรัม)
1	0.1001
2	0.0999
3	0.1001
4	0.1000
5	0.1000
6	0.0999
7	0.1002
8	0.0999
9	0.1005
10	0.1001
Mean	0.1001
SD	1.83×10^{-4}
ดังนั้น U_{prec}	$= 1.83 \times 10^{-4}$

2) ความไม่แน่นอนจากการสอบเทียบเครื่องชั่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (U_{cal})
 ค่า uncertainty จากการสอบเทียบเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95
 เท่ากับ ± 0.0001908

$$\text{ดังนั้น } U_{\text{cal}} = \frac{0.0001908}{2}$$

$$U_{\text{cal}} = 9.50 \times 10^{-5}$$

การคำนวณค่า $U_{\text{mass samp}}$

$$\begin{aligned} U_{\text{mass samp}} &= \sqrt{U^2_{\text{Cal. groos}} + U^2_{\text{Prec. groos}} + U^2_{\text{Cal. tare}} + U^2_{\text{Prec. tare}}} \\ &= \sqrt{(9.50 \times 10^{-5})^2 + (1.83 \times 10^{-4})^2 + (9.50 \times 10^{-5})^2 + (1.83 \times 10^{-4})^2} \\ &= 0.000291 \text{ หรือ } 2.91 \times 10^{-4} \text{ g} \\ U_{\text{mass std}} &= 2.91 \times 10^{-4} \text{ g} \end{aligned}$$

7.1.6.3 ความไม่แน่นอนจากขดวัดปริมาตร สำหรับสารมาตรฐาน ($U_{vol. Std}$)

$$U_{vol.Std} = \sqrt{U^2_{temp} + U^2_{cal}}$$

1) การเปลี่ยนแปลงปริมาตรตามอุณหภูมิ (มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 2 °C)

การขยายตัวตามปริมาตรของ Organic Solvent = $1 \times 10^{-3} \text{ ml/ } ^\circ\text{C}$

$$U_{temp} = \frac{F \times V \times T}{\sqrt{3}}$$

เมื่อ $F = 1 \times 10^{-3} \text{ ml/ } ^\circ\text{C}$

$V = 10 \text{ ml}$ (ปริมาตรของขดวัดปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสา

มาตรฐาน)

$T = 23 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$

$$U_{temp} = \frac{(1 \times 10^{-3}) \times 10 \times 2}{\sqrt{3}}$$

$$= 0.0115 \text{ หรือ } 1.15 \times 10^{-2}$$

$$U_{temp} = 1.15 \times 10^{-2}$$

2) ความไม่แน่นอนจากการสอบเทียบขดวัดปริมาตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (U_{cal})

ค่า uncertainty จากการสอบเทียบเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95

เท่ากับ ± 0.0069

$$U_{cal} = \frac{0.0069}{2}$$

$$= 0.00345 \text{ หรือ } 3.45 \times 10^{-3}$$

$$U_{cal} = 3.45 \times 10^{-3}$$

แทนค่าเพื่อหาค่า $U_{vol.Std}$

$$U_{vol.Std} = \sqrt{U^2_{temp} + U^2_{cal}}$$

$$= \sqrt{(1.15 \times 10^{-2})^2 + (3.45 \times 10^{-3})^2}$$

$$= 0.0121 \text{ หรือ } 1.21 \times 10^{-2} \text{ ml}$$

$$U_{vol.Std} = 1.21 \times 10^{-2} \text{ ml}$$

7.1.6.4 ความไม่แน่นอนจากขดวัดปริมาตร สำหรับสารตัวอย่าง ($U_{vol. samp}$)

$$U_{vol.Std} = \sqrt{U^2_{temp} + U^2_{cal}}$$

1) การเปลี่ยนแปลงปริมาตรตามอุณหภูมิ (มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 2 °C)

การขยายตัวตามปริมาตรของ Organic Solvent = $1 \times 10^{-3} \text{ ml/ } ^\circ\text{C}$

$$U_{temp} = \frac{F \times V \times T}{\sqrt{3}}$$

เมื่อ $F = 1 \times 10^{-3} \text{ ml/ } ^\circ\text{C}$

V = 25 ml (ปริมาตรของขวดวัดปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารมาตรฐาน)

$$T = 23 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$U_{temp} = \frac{(1 \times 10^{-3}) \times 25 \times 2}{\sqrt{3}}$$

$$= 0.0289 \text{ หรือ } 2.89 \times 10^{-2}$$

$$U_{temp} = 2.89 \times 10^{-2}$$

2) ความไม่แน่นอนจากการสอบเทียบขวดวัดปริมาตร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (U_{cal}) ค่า uncertainty จากการสอบเทียบขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 ml ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เท่ากับ ± 0.074

$$U_{cal} = \frac{0.074}{2}$$

$$= 0.00370 \text{ หรือ } 3.70 \times 10^{-3}$$

$$U_{cal} = 3.70 \times 10^{-3}$$

แทนค่าเพื่อหาค่า $U_{Vol.Std}$

$$U_{Vol.Std} = \sqrt{U^2_{temp} + U^2_{cal}}$$

$$= \sqrt{(2.89 \times 10^{-2})^2 + (3.70 \times 10^{-3})^2}$$

$$= 0.0291 \text{ หรือ } 2.91 \times 10^{-2} \text{ ml}$$

$$U_{Vol.Std} = 2.91 \times 10^{-2} \text{ ml}$$

7.1.6.5 ความไม่แน่นอนจากสารมาตรฐาน (U_{Std})

ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน triazophos คือ 98 % \pm 1.0 % หรือ 0.98 ± 0.01

$$U_{cal} = \frac{0.01}{\sqrt{3}}$$

$$= 0.00577 \text{ หรือ } 5.77 \times 10^{-3}$$

$$U_{cal} = 5.77 \times 10^{-3}$$

7.1.6.6 ความไม่แน่นอนจากค่าความเที่ยง (precision) ในการทำ method validation (U_{prec})

ตารางที่ 51 การหาค่า U_{prec} จากค่าความเที่ยง (Precision) ของการทำ method validation

จำนวนซ้ำ	Conc. ต่ำ	Conc. กลาง	Conc. สูง
1	38.08	38.07	38.41
2	38.09	38.06	38.33
3	38.02	38.12	38.26
4	38.18	38.14	38.33

5	38.14	38.04	38.29
6	38.02	38.14	38.31
7	38.18	38.16	38.20
8	38.01	38.15	38.26
9	37.92	38.40	38.26
10	38.18	38.14	38.37
mean	38.08	38.14	38.30
SD	0.090	0.099	0.061
RSD	0.002	0.003	0.002
U _{prec.}	0.029	0.031	0.019

Mean = 38.18

$$U_x = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$U_{prec.} = \sqrt{(UConc. \text{ ต่ำ})^2 + (UConc. \text{ กลาง})^2 + (UConc. \text{ สูง})^2}$$

$$U_{prec.} = \sqrt{(0.029)^2 + (0.031)^2 + (0.019)^2}$$

$$U_{prec.} = 0.03032$$

7.1.6.7 ความไม่แน่นอนจากการทำซ้ำ U_{repeat} ที่ความเข้มข้น 2.0 mg/ml

ตารางที่ 52 การหาค่า U_{repeat} จากการทำซ้ำที่ความเข้มข้น 2.0 mg/ml

ความเข้มข้น 2.0 mg/ml	
น้ำหนัก ต.ย. (mg)	% สารออกฤทธิ์ที่ตรวจพบ
128.2	40.32
128.3	39.30
128.6	39.63
128.9	39.51

128.5	40.00
128.7	39.86
128.7	40.88
128.3	39.84
128.1	39.98
128.1	40.95
<hr/>	
Mean	40.03
SD	0.547
<hr/>	

$$\begin{aligned}
 U_{\text{repeat}} &= \frac{\text{SD}}{\sqrt{n}} \\
 &= \frac{0.547}{\sqrt{10}} \\
 &= 0.173 \text{ หรือ } 1.73 \times 10^{-1} \\
 U_{\text{prec.}} &= 1.73 \times 10^{-1}
 \end{aligned}$$

7.1.7 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

ตารางที่ 53 การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด

แหล่งข้อมูล	value (X)	(U _x)	RSU (U _x /x)	RSU ²
U _{mass.std}	10.20 mg	0.000177	1.74 × 10 ⁻⁵	3.02 × 10 ⁻¹⁰
U _{mass.samp}	62.50 mg	0.000291	4.66 × 10 ⁻⁶	2.71 × 10 ⁻¹¹
U _{vol.Std}	10 ml	0.0121	1.21 × 10 ⁻³	1.45 × 10 ⁻⁶
U _{vol.Samp}	25 ml	0.0291	1.16 × 10 ⁻³	1.36 × 10 ⁻⁶
U _{std}	0.98	0.00577	5.89 × 10 ⁻³	3.47 × 10 ⁻⁵
U _{prec}	38.18	0.03032	7.94 × 10 ⁻⁴	6.30 × 10 ⁻⁷
U _{repeat}	40.02	0.173	4.33 × 10 ⁻³	1.87 × 10 ⁻⁵

7.1.8 การหาค่าความไม่แน่นอนรวม (U_C)

$$U_C = 40.02 \sqrt{(RSU_{U_{mass.std}})^2 + (RSU_{U_{mass.samp}})^2 + (RSU_{U_{vol.std}})^2 + (RSU_{U_{vol.samp}})^2 + (RSU_{U_{std}})^2 + (RSU_{U_{prec}})^2 + (RSU_{U_{repeat}})^2}$$

$$U_C = 40.02$$

$$\sqrt{(1.74 \times 10^{-5})^2 + (4.66 \times 10^{-6})^2 + (1.21 \times 10^{-3})^2 + (1.16 \times 10^{-3})^2 + (5.89 \times 10^{-3})^2 + (7.94 \times 10^{-4})^2 + (4.33 \times 10^{-3})^2}$$

$$U_C = 0.3018$$

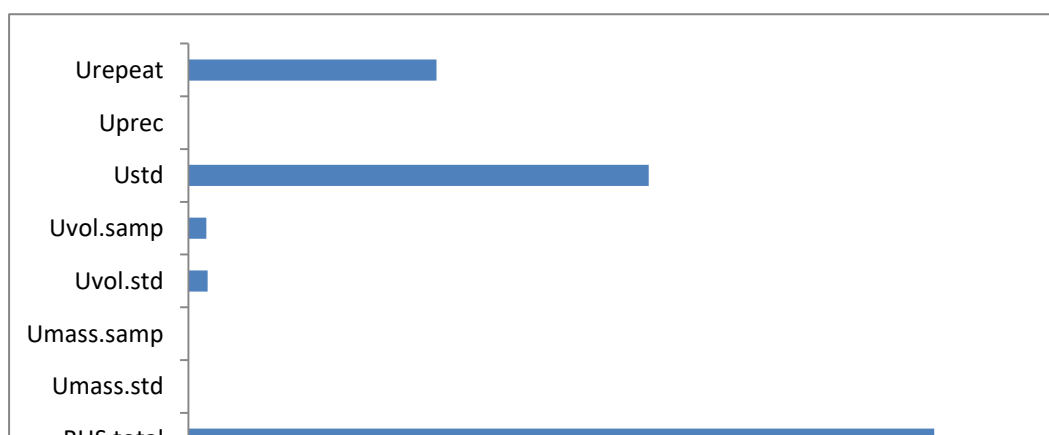
7.1.9 การหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (U_E)

$$\begin{aligned} U_E &= 2 \times U_C \\ &= 2 \times 0.3018 \\ &= \mathbf{0.60} \end{aligned}$$

7.1.10 การรายงานค่าความไม่แน่นอนในการวัด

การรายงานผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos = 40.02 ± 0.60% W/V EC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

7.1.11 จัดทำฮิสโตแกรม (Histogram)



7.2 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan ได้ Uncertainty ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbosulfan เท่ากับ ± 0.36

7.3 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate ได้ Uncertainty ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dimethoate เท่ากับ ± 0.48

7.4 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos ได้ Uncertainty ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ profenofos เท่ากับ ± 0.54

7.5 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate ได้ Uncertainty ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ glyphosate เท่ากับ ± 0.71

7.6 ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim ได้ Uncertainty ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ carbendazim เท่ากับ ± 0.72

8. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดแมลง : ไตรอะโซฟอส (triazophos), คาร์โบซัลแฟน (carbosulfan), ไดเมโทเอต (dimethoate), โพรฟีโนฟอส (profenofos) กลุ่มสารกำจัดวัชพืช : ไกลโฟเซต (glyphosate) และกลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืช : คาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชของห้องปฏิบัติการ สวพ.3 ตาม Parameter ต่างๆ ประกอบด้วย Specification/Selectivity, Working rang, Linearity, Accuracy, Precision, Ruggedness, Robustness และได้ทำการทดสอบค่า Uncertainty ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 54

ตารางที่ 54 แสดงผลการทดสอบค่าทางสถิติต่างๆ ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos glyphosate และ carbendazim

Pesticide	Working Rang (mg/ml)	Linearity (mg/ml)	R ²	Precision (HORRAT)		Robust	Rugged	% Recovery	Ucertainty
				ในรูป Repea tability	ในรูป Repro ducibility	ness (HORRAT)	ness (HORRAT)		

triazophos	0.25–2.50	0.25–2.00	0.99986	0.17	0.29	0.63	0.27	99.37	± 0.60
carbosulfan	0.025–0.25	0.05–0.20	0.99985	0.66	0.48	0.43	0.85	100.06	± 0.36
dimethoate	0.25-2.50	0.50-2.50	0.99939	0.42	0.64	0.49	0.47	100.28	± 0.48
profenofos	0.25-2.50	0.25-2.50	0.99991	0.35	0.47	0.48	0.57	99.96	± 0.54
glyphosate	0.75– 4.00	0.75–2.00	0.99936	0.41	0.57	0.50	0.83	100.05	± 0.71
carbendazim	0.025–0.25	0.05–0.20	0.99963	0.58	0.15	0.14	0.07	99.49	± 0.72

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos glyphosate และ carbendazim ผลการวิเคราะห์จากตรวจสอบค่าตาม Parameter ต่างๆ พบว่าให้ค่า Working range เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.025-4.000 mg/ml ให้ค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.050–2.500 mg/ml โดยค่า Correlation of determination (R^2) มีค่าระหว่าง 0.99936-0.99991 (เกณฑ์ยอมรับ $R^2 \geq 0.995$) มี Precision ของวิธีวิเคราะห์ที่ประเมินด้วยค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (Repeatability) อยู่ระหว่าง 0.17-0.66 และการทำซ้ำ (Reproducibility) อยู่ระหว่าง 0.15-0.64 การตรวจสอบค่า Robustness มีค่า HORRAT อยู่ระหว่าง 0.14-0.63 และการตรวจสอบค่า Ruggedness มีค่า HORRAT อยู่ระหว่าง 0.07-0.85 (เกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (AOAC)) การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จาก %Recovery ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง สูง มีค่าระหว่าง 98.01-101.53% (เกณฑ์ยอมรับ 98-102% สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% (AOAC)) และมีค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Uncertainty) ของวิธีวิเคราะห์ เท่ากับ ± 0.60 , ± 0.36 , ± 0.48 , ± 0.54 , ± 0.71 และ ± 0.72 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ที่ได้อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos glyphosate และ carbendazim ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ได้เป็นวิธีที่พิสูจน์แล้วว่ามี ความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ทดสอบของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

9.1) ได้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos glyphosate และ carbendazim ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ที่พิสูจน์แล้วว่ามี ความถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐาน และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล

9.2) สามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ในตรวจสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ triazophos, carbosulfan, dimethoate, profenofos glyphosate และ carbendazim ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชที่จำหน่ายในท้องตลาด และเพื่อการขอขึ้นทะเบียน

9.3) เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลงที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน

9.4) เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 สู่การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025

10. เอกสารอ้างอิง

- กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร
- กิจชัย ศิริวัฒน์. 2561. สารเคมีกำจัดแมลง : รูปแบบของสารเคมีกำจัดแมลง. ฝ่ายพิษวิทยาและชีวเคมี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (วันที่สืบค้น 22 กันยายน 2561). จาก : URL: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=396
- ชนิตสรุา งามศักดิ์ประเสริฐ และคณะ. 2559. การลดสารคาร์เบนดาซิมในใบกุยช่ายและการดูดสารกลับจากการล้างด้วยวิธีของกรมวิชาการเกษตร (Reduction of Carbendazim in Chinese Chives and Re-absorption from Washing Solution Using Methods of Department of Agriculture) : วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24(4) : หน้า 628-640
- ตติยะ สีหน่าย. 2547. ความไม่แน่นอนของการทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรม-สัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันอาหาร : กรุงเทพฯ
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว (A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข : นนทบุรี
- ฝ่ายข้อมูลเกษตร. 2561. ข้อควรระวังกับสารกำจัดศัตรูพืช(ยาฆ่าแมลง) : คาร์โบซัลแฟน (carbosulfan). (วันที่สืบค้น 26 กันยายน 2561) จาก : <http://www.phkaset.com/articledetail.asp?id=12614>
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2561. Carbosulfan (คาร์โบซัลแฟน). (วันที่สืบค้น 28 กันยายน 2561) จาก : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2175/carbosulfan>
- พนิดา ไชยยันต์บุรณ์ จินตนา ภูมังกฤษชัย บุญทวีศักดิ์ และสุพัตริ์ หนูสังข์. 2553. วิจัยปริมาณสารมีพิษตกค้างของคาร์โบซัลแฟน (carbosulfan) ในมะเขือยาวเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (MRLs) ครั้งที่ 1 และ 2 (Residue Trial of Carbosulfan in Egg Plant to Establish Maximum Residue Limit (MRLs) (Trial 1 and 2). ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ
- นงลักษณ์ เรืองวิเศษ และคณะ, 2551. ไดมัทธอเอท Dimethoate. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของเคมีเฉพาะเรื่อง พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม : กรุงเทพฯ
- มลิสา เวชยานนท์ และ สิริพร เหลืองสุขนกุล. 2554. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่มไพรีทรอยด์ในน้ำ (Method validate of Pyrethroids in water by Gas Chromatography). ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2553 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร : กรุงเทพฯ

ลักษณะ เดชานุกฤษณ์กุล และคณะ, 2553. วิจัยปริมาณสารพิษตกค้างไดเมโทเอต (dimethoate) ใน ถั่วฝักยาวเพื่อกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง ครั้งที่ 1 และ 2 (Residue Trial of Dimethoate in Yardlong Bean to Establish Maximum Residue Limit (MRL). ผลการปฏิบัติงานประจำปี 2553 เล่มที่ 1. หน้า 109-114. กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร : กรุงเทพฯ

ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา. 2561. รู้จักคาร์บาเมท. (วันที่สืบค้น 21 พฤษภาคม 2561)

จาก : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_2_001c.asp?info_id=297

สุนา ราชฤทธิ์ภักดี และคณะ, 2558. ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชไพรอโนฟอสที่ตกค้างในพริกจากตำบลหัวเรือ จังหวัดอุบลราชธานี และความเสี่ยงจากการบริโภค (Profenofos Pesticide esidue in Chill from Huaruea District, Ubonratchathani and Consumption Risk), บทความวิจัยวารสารวิชาการวิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ. 8(1) : หน้า 115-122.

สุนีย์ ธีญญโนทัย, 2533. แนะนำสารป้องกัน กำจัดโรคพืชคาร์เบนดาซิม, วารสาร. เคหะการเกษตร 14(6) : หน้า 105-108.

อนุสิทธิ์ สุขม่วง และอุมาพร สุขม่วง. 2550. การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี (Estimation of the measurement uncertainty in Chemical Testing). เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตร การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดทางเคมี. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : กรุงเทพฯ

อุมาพร สุขม่วง และดุซงฎิ มั่นความดี. 2550. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรม “การดำเนินการเตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการให้ได้รับการรับรอง” ของกรมวิชาการเกษตร ปี 2550. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : กรุงเทพฯ

INCHEM (Internationnal Programme on Chemical Safety). 2018. CARBOSULFAN. Pesticide residues in food–1984. Avalible October 3, 2018.

From : <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v84pr47.htm>

Wikipedia. 2018. Carbosulfan. Avalible October 3, 2018.

From : <https://en.wikipedia.org/wiki/Carbosulfan>

Wikipedia. 2018. Glyphosate. Avalible December 9, 2018.

From : <https://th.wikipedia.org/wiki/Glyphosate>.

11. ภาคผนวก

11.1 การคำนวณค่า %Relative Percent Different (%RPD) ตามสมการภาคผนวกที่ 1

$$\%RPD = [(factor\ max - factor\ min) / factor\ mean] \times 100 \text{ สมการภาคผนวกที่ 1}$$

11.2 การคำนวณหา Response factor (f) ตามสมการภาคผนวกที่ 2

$$f = \frac{(S \times P)}{H_s} \quad \text{สมการภาคผนวกที่ 2}$$

- f = ค่า response factor ของสารมาตรฐาน
 S = น้ำหนักของสารมาตรฐาน (มิลลิกรัม)
 P = % ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน
 H_s = พื้นที่ใต้พีค หรือ ความสูงของพีคของสารละลายมาตรฐาน

11.3 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ของวัตถุอันตรายทางการเกษตรในตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ตามสมการภาคผนวกที่ 3

$$\% \text{ W/W สารออกฤทธิ์} = \frac{(H_w \times f)}{w} \quad \text{สมการภาคผนวกที่ 3}$$

- H_w = พื้นที่ใต้พีค หรือ ความสูงของพีค ของสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์
 f = ค่าเฉลี่ย Response factor
 w = น้ำหนักของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ (มิลลิกรัม)

11.4 การคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ตามสมการภาคผนวกที่ 4

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{สมการภาคผนวกที่ 4}$$

11.5 การคำนวณค่า HORRAT คำนวณโดยใช้สมการภาคผนวกที่ 5

$$\text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \quad \text{สมการภาคผนวกที่ 5}$$

11.6 การคำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสมการภาคผนวกที่ 6

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad \text{สมการภาคผนวกที่ 6}$$

เมื่อค่า C = concentration ration

11.7 การคำนวณ % recovery ตามสมการภาคผนวกที่ 7

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(\text{Conc. spike sample} - \text{Conc. original sample})}{\text{Conc. added}} \times 100 \quad \text{สมการภาคผนวกที่ 7}$$

11.8 เกณฑ์การยอมรับ Recovery

The AOAC Manual for the Peer Verified Methods Program (1993) ได้กำหนดแนวทางสำหรับพิจารณาการยอมรับ %recovery โดยทั่วไป ตามตารางที่ภาคผนวก 1 (ทิพวรรณ, 2549)

ตารางภาคผนวก 1 Analyte recovery ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตาม AOAC)

ความเข้มข้นของ analyte	% Recovery
------------------------	------------

100 %	98-102
> 10 %	98-102
> 1 %	97-103
> 0.1 %	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

11.9 ค่าครึ่งชีวิตของ dimethoate ในสิ่งแวดล้อม

ตารางภาคผนวก 2 ค่าครึ่งชีวิตของ dimethoate ในสิ่งแวดล้อม

สิ่งแวดล้อม	ค่าครึ่งชีวิต	คำอธิบาย
อากาศ	0.269-4.69 ชั่วโมง	ค่าครึ่งชีวิตของ dimethoate ในอากาศคำนวณจากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยแสง (photooxidation)
น้ำผิวดิน	11-56 วัน	ค่าครึ่งชีวิตของ dimethoate ในน้ำผิวดินคำนวณจากปฏิกิริยาย่อยสลายโดยชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน (aerobic biodegradation)
น้ำใต้ดิน	22-112 วัน	ค่าครึ่งชีวิตของ dimethoate ในน้ำใต้ดินคำนวณจากปฏิกิริยาย่อยสลายโดยชีวภาพแบบใช้ออกซิเจน (aerobic biodegradation)
ดิน	11-37 วัน	ค่าครึ่งชีวิตของ dimethoate ในดินคำนวณจากการศึกษาในตัวอย่างดิน