

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

.....

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรม : กิจกรรมที่ 1 พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อย : กิจกรรมย่อยที่ 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง** : การทดลองที่ 1.5.2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมทางการเกษตร amitraz
ชื่อการทดลอง : Method validation of amitraz in pesticide products
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง : อนุชา ผลไสว กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมทางการเกษตร สปผ.
ผู้ร่วมงาน : ทศนี จงกลาง กลุ่มวิจัยวัตถุพืชมทางการเกษตร สปผ.
5. **บทคัดย่อ**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Amitraz ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) คอลัมน์ชนิด Capillary HP-5 (5% Phenyl Methyl Siloxane ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร film thickness 0.25 ไมโครเมตร) สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ อัตราของการ Split injection เท่ากับ 50 ต่อ 1 ปริมาตรของการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 1 ไมโครลิตร อัตราการไหลของก๊าซตัวพา (Helium) เท่ากับ 2.0 มิลลิตรต่อนาที ใช้ดีเทคเตอร์ชนิด Flame ionization detector (FID) อุณหภูมิของสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิของ Oven เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Injector เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของ Detector เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส ผลการตรวจสอบพบว่า ช่วงของการวัด (Range) ของสาร Amitraz อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99999 และช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) หรือค่าความสัมพันธ์ระหว่าง response กับความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99997 เกณฑ์การยอมรับค่าของ Range และ Linearity ต้องมากกว่า 0.995 ผลการตรวจสอบค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ Amitraz ในผลิตภัณฑ์สูตร EC ได้ผลดังนี้ Repeatability และ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.424 และ 0.262 ตามลำดับ ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness หรือทดสอบความทนของวิธีการได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.412, และ 0.760 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดผ่านเกณฑ์การยอมรับของ EU, Codex และ AOAC และการตรวจสอบค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ได้เปอร์เซ็นต์ Recovery เท่ากับ 100.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วง 98 ถึง 102 เปอร์เซ็นต์ ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของ AOAC ดังนั้นการตรวจสอบ

ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Amitraz มีความเที่ยง ความทนและความแม่นยำของวิธีผ่านเกณฑ์มาตรฐานของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

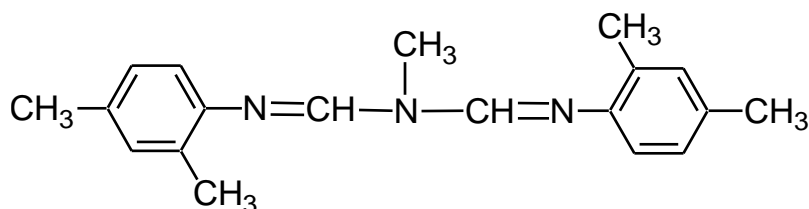
Abstract

The validation of the amitraz in pesticide products was analyze using Gas liquid chromatography (GLC) technique, the capillary column was HP-5 (5% phenyl methyl siloxane) with 30 m long, 0.32 mm internal diameter and 0.25 μ m film thickness. The condition for analysis was rate of split injection value 50 : 1, injection sample 1 μ l and flow rate of the carrier gas (Helium) at 2.0 ml/min. The detector was the Flame ionization detector (FID). The temperature conditions for analysis were oven temperature at 250 $^{\circ}$ C, injector temperature at 280 $^{\circ}$ C and detector temperature at 280 $^{\circ}$ C. The results shown that the range for analyzed the Amitraz were 0.25 mg/ml to 1.75 mg/ml with the correlation coefficient (r) was 0.99999. The linearity or the relationship between the responses to the concentration of the analyte was 0.25 mg/ml to 1.50 mg/ml and the correlation coefficient (r) was 0.99997. Acceptable criteria of the range and linearity must be greater than 0.995. The results was verified reliability (Precision) the method of Amitraz with the formula EC. The HORRAT values of the repeatability and reproducibility were 0.424 and 0.262 respectively. The HORRAT values of the Robustness / Ruggedness or resistance tests were 0.412 and 0.760 respectively. All these results pass the criteria of the EU, Codex and AOAC. The accuracy of the method was 100.9% recovery which met the criteria for substances more than 10% of AOAC (98%-102%). Therefore, the Amitraz method has all results pass the standard method.

6. คำนำ

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ Amitraz มีวิธีวิเคราะห์มาตรฐานคือ CIPAC Handbook volume G ด้วยเทคนิค Gas Liquid Chromatography (GLC) โดยใช้ Flame ionization detector เป็นอุปกรณ์ตรวจวัดและใช้คอลัมน์เป็นชนิด Packed column (Column glass, 1.5 to 2 m x 3 mm(i.d.) packed with 3% OV-101) ค่า retention time อยู่ในช่วง 14 ถึง 18 นาที (Dobrat and Martin,1995) ด้วย Column glass เป็นอุปกรณ์ที่ไม่มีการใช้งานแล้วและมีคอลัมน์ที่ใช้ในปัจจุบันเป็นชนิด Capillary column, HP-5 ภายในเคลือบด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร film thickness 0.25

ไมโครเมตร ซึ่งมีความจำเพาะกับเครื่องมือวิเคราะห์ Gas Liquid Chromatograph ที่ใช้ในปัจจุบันและให้ค่า retention time อยู่ในช่วง 4 ถึง 6 นาทีซึ่งเป็นเวลาที่น้อยกว่าเดิมจึงเป็นการลดเวลา และสามารถลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ได้ตามมา เพื่อให้มีความเหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์การวิเคราะห์ดังกล่าวซึ่งมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปในรายละเอียดค่อนข้างมาก จึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความเที่ยง ความทนของวิธีและความแม่นยำผ่านเกณฑ์มาตรฐานในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Amitraz



ภาพประกอบที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Amitraz

(The e-pesticide manual(thirteenth Edition) version 3.0)

Amitraz มีชื่อทางเคมีว่า N-Methyl-bis(2,4-xylyliminomethyl) amine มีชื่อตาม Chemical Abstract เป็น N'-(2,4-dimethylphenyl)-N-[[[(2,4-dimethylphenyl)-imino]methyl]-N-methylmethanimidamide มีสูตรโมเลกุลเป็น C₁₉H₂₃N₃ ลักษณะทางกายภาพ มีน้ำหนักโมเลกุล 293.4 จุดหลอมเหลว 86 ถึง 87 องศาเซลเซียส เป็นผลึกไม่มีสีหรือสีขาวออกเหลืองอ่อน ละลายในน้ำได้น้อยกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ ละลายในอะซีโตน โทลูอีน ไซลีน ได้มากกว่า 300 กรัมต่อลิตร แสงยูวีมีผลเล็กน้อยต่อการคงสภาพ (Dobrat and Martin,1995) มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบที่ 1 (Anonymous,1993) ตามIRACจัดอยู่ในกลุ่ม Amidine ความเป็นพิษมีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (LD₅₀ rat, oral, acute) 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (LD₅₀ mice, oral, acute) >1,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (LD₅₀ rabbits, percutaneous, acute) >200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (LD₅₀ rat, percutaneous, acute) >1,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Agrochemicals Handbook, 1993) สูตรที่มีขึ้นทะเบียนคือ Emulsifiable concentrates(EC) และWettable powders(WP)

การออกฤทธิ์เป็นประเภทเป็นแบบสัมผัสและระบบหายใจ ไม่เป็นประเภทดูดซึม ออกฤทธิ์มีผลต่อระบบประสาท การใช้งาน Amitraz ใช้เพื่อควบคุมในทุกระยะของไร และแมลงอาทิเพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว ไข่และตัวอ่อนระยะแรกของผีเสื้อผลไม้ ผ้ายและผัก และใช้กับผึ้งด้วย และใช้เพื่อควบคุมเห็บ ไร แมลงปรสิตเล็กๆ ตามที่อยู่อาศัยและฟาร์มปศุสัตว์(Terry R. Roboberts and David H. Hutson,1999) ใช้กำจัดไรชาวพริกในพืชปลูกพริก ถั่วเขียวและส้มโอ ไรแมงมุมในละหุ่ง ไรแดงแอฟริกันในทุเรียนและส้มโอ ไรก้ามะหยี่ลิ้นจี่ในลิ้นจี่ ไรแดงแอฟริกัน และไรสนิมส้มในส้มเขียวหวาน ไรแดงมะม่วงในองุ่น ไรกระเทียมในหอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม ไรลูกโปรงและไรติดในโรงเรือน 15 วันก่อนการเพาะเห็ดยานางิ เห็ดแครง เห็ดหูหนูเห็ดนางรม,เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเป่าฮื้อและเห็ดเข็มเงิน ไรทอโรปีลีแลปส์(*Tropilaelaps clareae*) ไรวารริ้ว(*Varroa jacobsoni*, *V. destructor*)เป็นการใช้สารฆ่าไรศัตรูผึ้ง (กลุ่มกัญและสัตว์วิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร,2553)

การควบคุมคุณภาพของสารกำจัดศัตรูพืช ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 นั้น จะต้องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุไว้บนฉลากหรือข้อมูลที่แสดงไว้ตามการขึ้นทะเบียน วิธีการตรวจวิเคราะห์ Amitraz นั้น มีวิธีมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council limited) แต่วิธีมาตรฐานนั้นไม่สามารถทำตามได้ทั้งหมดในรายละเอียด และเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ จำเป็นต้องพัฒนาให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีใช้อยู่จริงในห้องปฏิบัติการปัจจุบัน ทั้งนี้การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตามข้อกำหนด ISO 17025 เพื่อยืนยันวิธีทดสอบที่นำมาใช้มีความเที่ยง ความแม่นยำ และความถูกต้องเหมาะสมตามวัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์การทดลอง

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Amitraz ในผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษทางการเกษตร เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้องผ่านเกณฑ์มาตรฐานของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Liquid Chromatograph (GLC) มีตัวตรวจจับชนิด Flam Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary Column, HP-5 (5% phenyl methyl siloxane) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร หรือเทียบเท่า
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (± 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath
5. ขวดปริมาตร type A ขนาด 10, 25, 250, และ 1,000 มิลลิเมตร ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปต type A ขนาด 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการสอบเทียบ
7. vial ขนาด 2 มิลลิเมตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Amitraz 97.0 %
2. สาร Amitraz ที่มีความเข้มข้นสูง (Technical material หรือ TC)
3. ผลิตภัณฑ์ Amitraz 20 %W/V EC
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. พัฒนารูปแบบวิธีการวิเคราะห์ Amitraz

1.1 โดยปรับตั้งสภาวะการใช้งานเครื่อง GLC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ดังนี้

Column : Capillary Column HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane) 30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 um, film thickness

Injector system : Injector Split injection

Split ratio : 50:1
 Split flow : 100 ml/min
 Injection volume : 1 µl.
 Detector : Flame ionization detector (FID)
 Temperature : Oven temperature 250 °C
 Injection temperature 280 °C
 Detector temperature 280 °C
 Gas flow rate : Helium flow (carrier) 2.0 ml/min
 Hydrogen flow 40 ml/min
 Air flow 450 ml/min
 Make up flow 45 ml/min

2. การหาปริมาณที่แน่นอนสารออกฤทธิ์ Amitraz (Technical material)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน Amitraz 2 ช้ำ (C₁, C₂) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (Technical material)

ชั่งสาร Technical material 10 ช้ำ (T₁-T₁₀) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

2.3 ตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical material

ตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GLC ที่ปรับตั้งสภาวะการใช้งานตามวิธีทดสอบ และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ จึงทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องซ้ำหลายๆครั้ง จนได้ค่าพื้นที่ใต้ peak หรือความสูง peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % เครื่อง GLC จึงพร้อมใช้งาน แล้วฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายของสารความบริสุทธิ์สูง เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอน ตามลำดับ ดังนี้

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

สารละลายมาตรฐาน ทั้ง 2 ต้องมีค่า Relative Percent Different (%RPD) ไม่เกิน 3 %

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

2.4 การคำนวณ Response factor

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

S = น้ำหนักของ Amitraz ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน Amitraz (g/Kg)

H_s = พื้นที่ใต้พีคของ Amitraz ในสารละลายมาตรฐาน

2.5 การคำนวณหาปริมาณสารออกฤทธิ์ Amitraz ในสารละลาย Technical material ดังสมการต่อไปนี้

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

HW = พื้นที่ใต้พีคของ Amitraz ของสารละลาย Technical material

F = ค่าเฉลี่ย response factor

W = น้ำหนักของ Amitraz ของสารละลาย Technical material

2.6 นำผลวิเคราะห์ที่ได้ของ Technical material ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ปริมาณที่แน่นอนในรูปเปอร์เซ็นต์(%)สารออกฤทธิ์ของ Technical material

3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity) ของวิธีการ

3.1 ตรวจสอบช่วงของการวัด(Range)

3.1.1 ชั่งสาร Technical material ที่ทราบปริมาณแน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ Amitraz ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.25, 0.50, 1.00, 1.25, 1.50 และ 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาณเพื่อใช้ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด แล้วทำให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากันแบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.1.2 ฉีดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์โดยเรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก

3.1.3 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical material (แกน x) กับ response (แกน y)

3.1.4 คำนวณหาค่า Correlation coefficient (r) เกณฑ์ยอมรับที่ $r \geq 0.995$ พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงเพื่อใช้ในการทดสอบค่า Linearity ต่อไป

3.2 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

3.2.1 เลือกช่วงของการตรวจสอบจากผลของ Range ในช่วงที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร Technical material ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน กำหนดช่วงให้มี 6 ความเข้มข้น จากการตรวจสอบช่วงของการวัดดังนี้ 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาณเพื่อใช้ Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด แล้วทำให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.2.3 ฉีดสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์โดยเรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก

3.2.4 Plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร Technical material (แกน x) กับ response (แกน y)

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

4. ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์

4.1 Repeatability (ความทวนซ้ำได้ เป็นการทดสอบความเที่ยง ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน โดยวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน นักวิเคราะห์คนเดียวกันและเครื่องมือเดียวกัน ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน)

4.1.1 ชั่งสาร Technical material ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน (ภายใน Linearity ที่ได้จากข้อ 3.2) จำนวน 3 ความเข้มข้นได้แก่ 0.50, 1.00 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาณเพื่อใช้ Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด แล้วทำให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

4.1.2 ชั่งผลิตภัณฑ์ Amitraz ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอนที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน (ภายใน Linearity ที่ได้จากข้อ 3.2) จำนวน 3 ความเข้มข้นละ 10 ชั่ง ได้แก่ 0.50, 1.00 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณปริมาณเพื่อใช้ Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด แล้วทำให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายในข้อ 4.1.1, 4.1.2 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Amitraz ในสารละลายของผลิตภัณฑ์

4.2 Reproducibility ความทำซ้ำได้เป็นการทดสอบความเที่ยงเมื่อทำการทดลองซ้ำๆกัน โดยการทดลองด้วยวิธีเดียวกันภายใต้สถานการณ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ เครื่องมือต่างกัน ห้องปฏิบัติการต่างกัน และผู้วิเคราะห์คนละคนกัน (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549) การทดลองปฏิบัติตามขั้นตอนเหมือนข้อ 4.1 ตามเงื่อนไขของ Reproducibility โดยใช้ผู้วิเคราะห์คนละคนกัน

5. ตรวจสอบความทน Robustness/Ruggedness ของวิธีการ

5.1 Robustness ความคงทนเป็นตัวชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ว่ายังคงใช้ได้เป็นที่น่าเชื่อถือ แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในการวิเคราะห์ (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549) ทำการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของ oven จาก 250 องศาเซลเซียสเป็น 260 องศาเซลเซียส เพื่อแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในการวิเคราะห์ การทดลองขั้นตอนอื่นๆ ปฏิบัติตามข้อ 4.1

5.2 Ruggedness ความทนเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ยังให้ผลการวิเคราะห์เหมือนเดิมแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยของสภาวะแวดล้อมที่เกิดขึ้น (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549) ซึ่งเป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน แต่เปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์ เพื่อแสดงถึงความแตกต่างของสภาวะแวดล้อมในการวิเคราะห์) การทดลองปฏิบัติตามขั้นตอนเหมือนข้อ 4.1 ตามเงื่อนไขของ Ruggedness

6. ตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธี

6.1 เตรียมสารละลาย Stock Tech ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ 5 มิลลิกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อ มิลลิลิตร โดยการชั่งสาร Technical material ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1,292.7 มิลลิกรัม ใส่ในขวด Volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด แล้วทำให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone แล้วเขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย Stock Sample ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอนประมาณ 1 มิลลิกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อ มิลลิลิตร โดยการชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Amitraz ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 4,566.2 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติม Acetone ประมาณครึ่งขวด แล้วทำให้ละลายด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย Acetone แล้วเขย่าให้เข้ากัน

6.3 เตรียมสารละลายเพื่อ Plot กราฟ

ปิเปตสารละลาย Stock Tech จากข้อ 6.1 ปริมาตร 2, 5 และ 8 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone แล้วเขย่าให้เข้ากัน ได้สารละลายของ Technical material ที่มีความเข้มข้นของ Amitraz เป็น 0.40, 1.00 และ 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปฉีดเข้า เครื่อง GLC โดยเรียงลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock Sample จากข้อ 6.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Amitraz โดยเทียบกับกราฟข้อ 6.3

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

6.5.1 ปิเปตสารละลาย Stock Sample จากข้อ 6.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 ปิเปตสารละลาย Stock Tech จากข้อ 6.1 ปริมาตร 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ที่มี Stock Sample ในข้อ 6.5.1 ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย Acetone เขย่าให้เข้ากัน นำไปฉีดเข้าเครื่อง GLC หาปริมาณ Amitraz โดยเทียบกับกราฟ จากข้อ 6.3

6.6 การประเมินค่าความแม่นยำ (Accuracy) จากค่าของ Recovery

นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Amitraz ที่เป็นค่า Origin และ Spike (ข้อ 6.4-6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า %Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (AOAC official methods of analysis, 2012) จากสูตรคำนวณ ดังนี้

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

7.การหา Specificity / selectivity

ความจำเพาะเจาะจงเป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง และสามารถแยกแยะเฉพาะเจาะจงสำหรับสารที่สนใจออกจากสารประกอบอื่นในตัวอย่าง ภายใต้สภาวะการทดลองที่ระบุไว้ (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549) ทดลองโดยการฉีดสารละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลาย(blank) สารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Amitraz เข้าเครื่อง Gas Liquid Chromatograph (GLC) ชนิด Flame ionization(FID) เพื่อพิจารณา Chromatogram สารออกฤทธิ์ Amitraz ตามเงื่อนไขการหา Specificity และselectivity

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2556 และสิ้นสุดเดือนกันยายน 2557

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร กลุ่มวิจัย วัตถุดิบพืชการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการทดลองหาปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ใน Technical material แสดงเป็นร้อยละ(%)ของสาร Amitraz และค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐานได้ผลดังนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณเฉลี่ยของ Amitraz ใน Technical material และค่า Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน

ลำดับที่	ปริมาณ Technical material (%)	std. No.	mg/10ml	Area of STD.	%RPD
T 1	95.42	C1	10.4	411.05637	0.355
		C2	10.8	428.38455	
T 2	97.12	C1	10.4	411.79180	0.176
		C2	10.8	428.38455	
T 3	96.31	C1	10.4	411.79000	0.109
		C2	10.8	427.16300	
T 4	95.93	C1	10.4	411.79000	0.108
		C2	10.8	427.16600	
T 5	97.29	C1	10.4	411.79080	0.177
		C2	10.8	428.38455	
T 6	96.51	C1	10.4	411.79300	0.110
		C2	10.8	427.16300	
T 7	97.45	C1	10.4	411.79000	0.108
		C2	10.8	427.16500	
T 8	97.11	C1	10.4	411.79180	0.177

		C2	10.8	428.38555	
T 9	95.80	C1	10.4	402.84600	0.278
		C2	10.8	419.50354	
T 10	97.62	C1	10.4	411.79180	0.176
		C2	10.8	428.38455	
ปริมาณ เฉลี่ย	96.7%				

จากตารางที่ 1 เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณของสาร Technical material 96.7% ค่า SD ของข้อมูลรวมเท่ากับ 0.867 และคำนวณ %RSD ของข้อมูลรวมได้เท่ากับ 0.897 เมื่อพิจารณาค่า %RPD ทุกคู่ของสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Amitraz ใน Technical material แล้วมีค่าไม่เกิน 3%

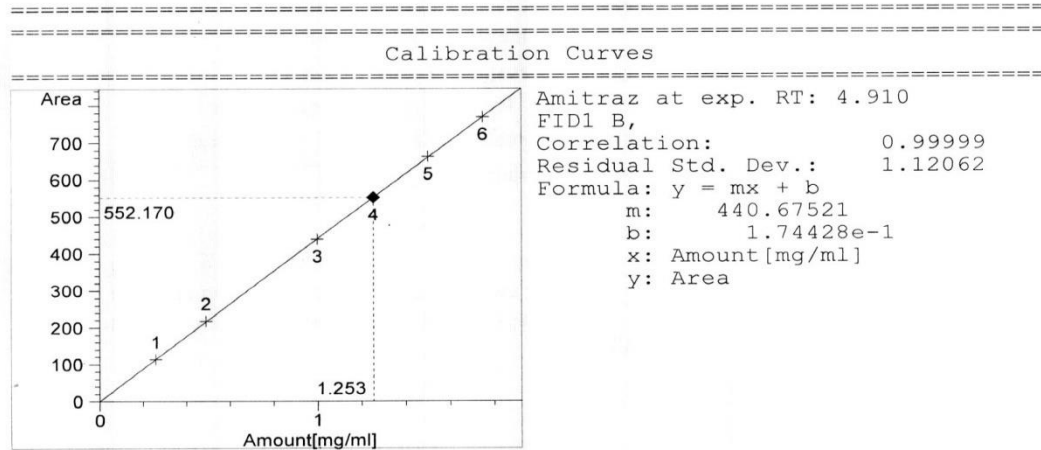
2. ผลการศึกษาช่วงของการวัด (Range) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบช่วงของการวัดของ Amitraz

การหา Range ที่ความเข้มข้น 0.25 – 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Amitraz	
mg/ml	Area
0.259	114.02352
0.491	217.72366
0.997	438.81897
1.253	552.16968
1.500	663.30786
1.748	769.54718

ภาพประกอบที่ 2 แสดง Calibration curves ของการตรวจสอบช่วงของการวัดของ Amitraz

Results obtained with enhanced integrator!



จากการทดลองหาช่วงของการวัด Amitraz มีค่าอยู่ในช่วง 0.25 - 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.99999

3.ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ได้ผลการศึกษาดังนี้

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของ Amitraz

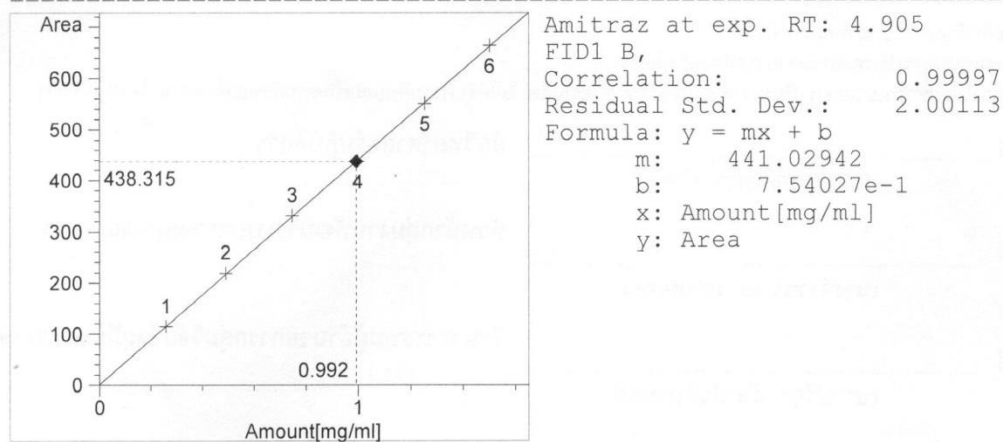
การหา Linearity ที่ความเข้มข้น 0.25 - 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Amitraz

mg/ml	Area
0.259	144.74532
0.491	219.39957
0.746	331.61093
0.997	438.31467
1.253	551.60559
1.500	664.50378

ภาพประกอบที่ 3 แสดง Calibration curves ของการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของ Amitraz

Results obtained with enhanced integrator!

Calibration Curves



จากการตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของ Amitraz มีค่า 0.25 - 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ค่า Correlation coefficient (r) = 0.99997

ตารางที่ 4 การหา Precision ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ตรวจสอบความทวนซ้ำได้ (Repeatability)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25 ml)	% Amitraz
1	58.4	21.50	112.3	21.77	164.2	21.66
2	58.7	21.75	114.6	21.67	166.9	21.78
3	58.9	21.50	115.4	21.72	165.7	22.09
4	59.3	21.48	115.6	21.61	170.2	21.89
5	59.6	21.68	116.2	21.63	170.7	21.84
6	60.5	21.66	116.3	21.74	171.4	21.76
7	60.7	21.58	116.4	21.87	171.7	21.68
8	61.4	21.74	117.3	21.69	172.9	21.83
9	62.2	21.73	117.7	21.72	177.8	21.54
10	64.5	21.64	117.8	21.56	191.4	21.77
mean		21.63		21.70		21.78
SD		0.124		0.126		0.173

จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 21.70, \quad SD = 0.155$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD} \times 100}{\bar{X}} = \frac{0.155 \times 100}{21.70} = 0.713$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\text{RSD}_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} = 0.66 \times 2^{-0.1505}$$

C = Concentration ratio

$$\begin{aligned} \text{RSD}_r &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log c)} \\ &= 0.66 \times 2.548211 = 1.682 \end{aligned}$$

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

$$\text{HORRAT} = \frac{0.714}{1.682} = 0.424$$

จากการตรวจสอบหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.424
เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT ดังนี้

AOAC ยอมรับค่า HORRAT น้อยกว่า 2

EU, Codex ยอมรับค่า HORRAT ไม่เกิน 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Amitraz ให้ผลการทดสอบค่า Repeatability, HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 5 การหา Precision ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ตรวจสอบความซ้ำได้ (Reproducibility)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz
1	57.1	21.25	115.4	21.56	164.2	21.59
2	57.5	21.23	115.6	21.46	165.7	21.64
3	58.4	21.46	116.2	21.36	166.9	21.47
4	59.0	21.54	116.2	21.67	169.7	21.44
5	59.3	21.47	116.3	21.38	170.2	21.60
6	59.6	21.42	116.4	21.32	170.7	21.65
7	60.5	21.31	117.3	21.45	171.4	21.67
8	60.7	21.50	117.8	21.39	171.7	21.61
9	62.2	21.28	117.8	21.41	177.8	21.55

10	64.5	21.55	118.4	21.48	191.4	21.50
mean		21.40		21.45		21.57
SD		0.151		0.112		0.109

จากการทดลองได้ค่า ดังนี้

$$\bar{X} = 21.47, \quad \overline{SD} = 0.144$$

คำนวณ % RSD ตามสูตร

$$\% RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{X}} = \frac{0.144 \times 100}{21.47} = 0.669$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD_R ตามสูตร

$$RSD_R = 2^{(1-0.5 \log c)} = 2C^{-0.1505}$$

C = Concentration ratio

$$RSD_R = 2.548211$$

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

$$\text{HORRAT} = \frac{0.669}{2.548} = 0.262$$

จากการตรวจสอบหา Precision ที่อยู่ในรูปของ Reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.262

เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT ดังนี้

AOAC ยอมรับค่า HORRAT น้อยกว่า 2

EU, Codex ยอมรับค่า HORRAT ไม่เกิน 2

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ Amitraz ให้ผลการทดสอบค่า Reproducibility, HORRAT อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 6 การหา Precision ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ตรวจสอบความคงทน (Robustness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz
1	57.1	21.39	112.3	21.46	166.9	21.52
2	57.5	21.68	115.4	21.53	169.7	21.56
3	58.4	21.59	116.2	21.67	170.7	21.66
4	58.4	21.63	116.3	21.71	171.0	21.74
5	59.0	21.40	116.4	21.53	171.4	21.57
6	59.2	21.65	117.7	21.65	172.8	21.71

7	59.3	21.41	117.8	21.57	172.9	21.52
8	61.4	21.71	117.8	21.57	177.8	21.68
9	62.2	21.71	118.4	21.71	182.0	21.81
10	64.5	21.73	118.4	21.52	191.4	21.91
mean		21.58		21.59		21.67
SD		0.134		0.142		0.130

จากการตรวจสอบตามเงื่อนไขของ Robustness ได้ค่า HORRAT = 0.412

ตารางที่ 7 การหา Precision ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ตรวจสอบความทน (Ruggedness)

ครั้งที่	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz	นน.ตัวอย่าง (mg/25ml)	% Amitraz
1	57.1	20.95	112.3	21.33	164.2	21.41
2	57.5	20.89	114.6	21.45	165.7	21.29
3	58.4	20.99	115.6	21.43	166.9	21.75
4	58.7	21.02	116.2	21.38	169.7	21.70
5	59.0	21.14	116.2	21.64	170.2	21.58
6	59.2	20.97	116.3	21.41	170.7	21.72
7	59.3	21.08	117.3	21.46	171.4	21.73
8	59.6	21.19	117.8	21.39	172.8	21.63
9	60.5	21.15	118.4	21.64	172.9	21.78
10	64.5	21.22	118.4	21.41	177.8	21.50
mean		21.06		21.45		21.62
SD		0.125		0.114		0.167

จากการตรวจสอบตามเงื่อนไขของ Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.760

ตารางที่ 8 ตรวจสอบ % Recovery ของ Amitraz

ครั้งที่	Conc. Added (10.0011 mg/25ml)		Conc. Added (15.0016mg/25ml)		Conc. Added (20.0022mg/25ml)	
	Origin	Spike	Origin	Spike	Origin	Spike
1	9.9189	20.0524	9.9074	24.7985	10.0450	30.5009
2	9.8580	19.9322	9.9109	25.0325	9.9731	30.6517

3	9.8315	19.9318	9.9877	24.7369	9.9860	30.2123
4	9.9263	19.9638	9.8507	24.7189	10.0913	30.5780
5	9.8442	20.0643	9.8701	25.1232	10.0352	30.4620
6	9.9686	20.0816	9.8703	24.7707	9.9356	30.5625
7	9.8869	19.8295	9.8033	24.5401	10.0241	30.2882
8	9.8611	20.0111	9.8440	24.7105	9.9934	30.4631
9	10.0068	20.0263	9.8648	25.1345	9.9464	30.4050
10	9.8430	19.9838	9.9617	25.1134	10.0214	29.8326
mean	9.8945	19.9877	9.8871	24.8679	10.0052	30.3956
SD	0.071	0.128	0.073	0.251	0.075	0.273
% RSD	0.714	0.642	0.742	1.009	0.745	0.899
%Recovery		100.9		99.9		101.9

% Recovery = $(\frac{\text{Conc Spiked sample} - \text{Conc original sample}}{\text{Conc added}}) \times 100$

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นต่ำ (มิลลิกรัมต่อ 25 มิลลิลิตร)} = \frac{19.9877 - 9.8945}{10.0011} \times 100 = 100.9$$

$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นกลาง (มิลลิกรัมต่อ 25 มิลลิลิตร)} = \frac{24.8679 - 9.8871}{15.0016} \times 100 = 99.9$$

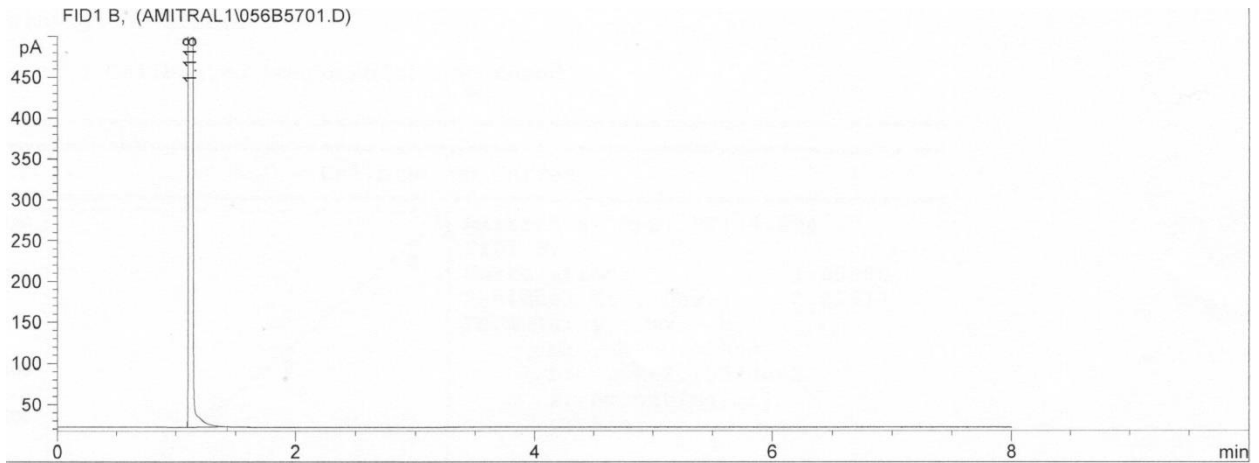
$$\% \text{ Recovery ที่มีความเข้มข้นสูง (มิลลิกรัมต่อ 25 มิลลิลิตร)} = \frac{30.3956 - 10.0052}{20.0022} \times 100 = 101.9$$

% Recovery เฉลี่ย = 100.9

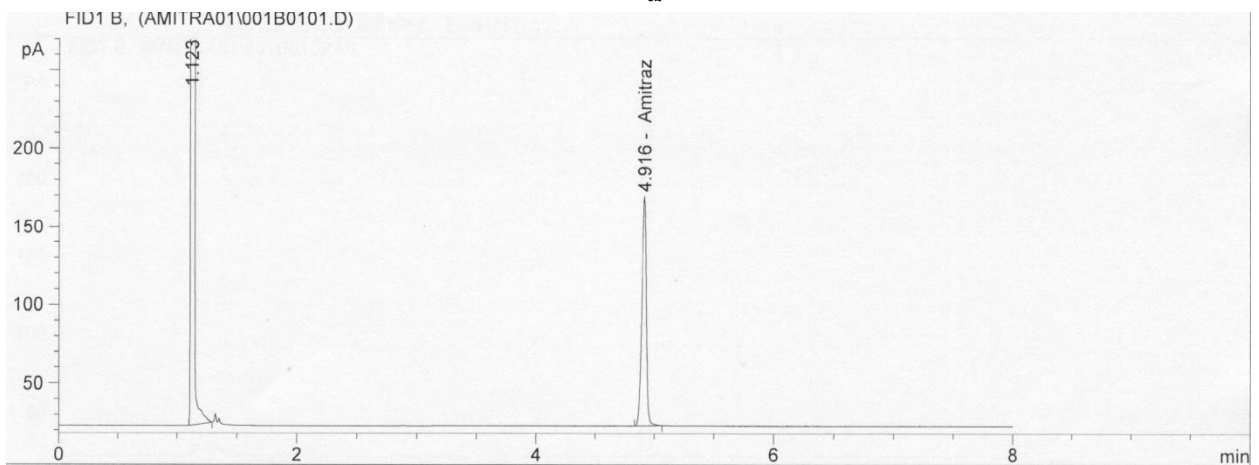
ผลจากการวิเคราะห์เพื่อประเมินความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการจากตารางที่ 8 พบว่า ความเข้มข้นของ Amitraz รวมกับค่า Spike แล้วนั้น ได้ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ 0.80, 1.00 และ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยถือว่าเป็นระดับความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ในการประเมินความถูกต้อง ตามลำดับ ได้ค่า Recovery รวมทั้ง 3 ความเข้มข้นคิดเป็นร้อยละ 100.9 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (AOAC official methods of analysis, 2012)

6. ผลการศึกษา Specificity / selectivity

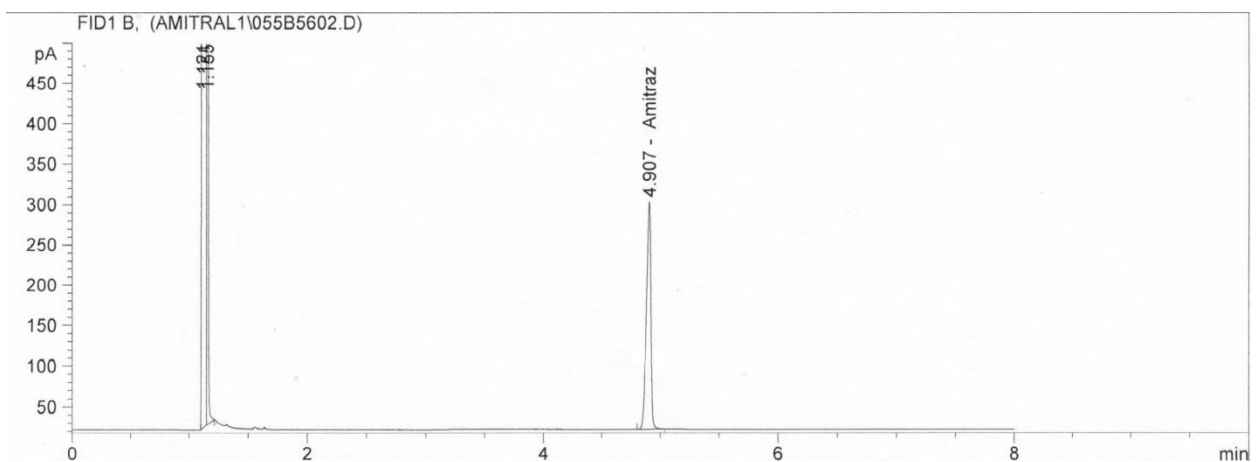
ภาพประกอบที่ 4 แสดง Chromatogram ของตัวทำละลาย



ภาพประกอบที่ 5 แสดง Chromatogram ของสารมาตรฐาน



ภาพประกอบที่ 6 แสดง Chromatogram ของสารตัวอย่าง



จากรูปภาพ Chromatogram ของตัวทำละลาย สารมาตรฐานและสารตัวอย่างในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Amitraz พบว่าไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ Amitraz แสดงว่า วิธีนี้มี Specificity และ selectivity ที่ดีต่อสารมาตรฐานและสารตัวอย่างของ Amitraz ที่ใช้ในการทดสอบ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

จากการศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Amitraz โดยวิธี Gas Liquid Chromatography (GLC) ได้สภาวะที่เหมาะสม ในการวิเคราะห์ดังนี้

Column	:	Capillary, HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane)
		30 m. x 0.32 mm. (id.), 0.25 um, film thickness
Split injection	:	Split ratio : 50:1 Injection volume : 1 ul.
Detector	:	Flame ionization detector (FID)
Temperature	:	Colum oven : 250 °C
		Injection port : 280 °C
		Detector : 280 °C

จากการนำสภาวะดังกล่าวมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ Amitraz ให้ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ดังนี้

ค่า Range พิสัยหรือช่วงของการวัดปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 1.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99999 เกณฑ์ยอมรับค่าต้องมากกว่า 0.995

ค่า Linearity หรือช่วงความเป็นเส้นตรง ความสัมพันธ์ระหว่าง response กับปริมาณของสารที่วิเคราะห์ทดสอบ สามารถทำได้ อยู่ในช่วง 0.25 ถึง 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient (r) = 0.99997 เกณฑ์ยอมรับค่าต้องมากกว่า 0.995

การตรวจสอบค่า Precision ได้ผลดังนี้ Repeatability และ Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.424 และ 0.262 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ EU, Codex และน้อยกว่า 2 ตามเกณฑ์พิจารณา AOAC

ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness หรือความทนของวิธีการได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.412, และ 0.760 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ EU, Codex และน้อยกว่า 2 ตามเกณฑ์พิจารณา AOAC

การตรวจสอบค่า Accuracy ของวิธีการได้ % Recovery เท่ากับ 100.9 % ซึ่งอยู่ในช่วง 98 ถึง 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ Amitraz ดังกล่าวมีความเที่ยง ความทนและความแม่นยำของวิธีผ่านเกณฑ์มาตรฐานของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์

10. การนำไปใช้ประโยชน์

ผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ของ Amitraz ในผลิตภัณฑ์วัตถุที่มีพิษการเกษตร เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุที่มีพิษการเกษตรตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535

วิธีวิเคราะห์ที่ได้ศึกษานี้ สามารถถ่ายทอดให้แก่หน่วยงานราชการอื่นๆ และหน่วยงานเอกชนที่จะนำไปใช้เพื่อ การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ Amitraz ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อให้ มีผลิตภัณฑ์ของ Amitraz ใช้ในภาคการเกษตรของประเทศต่อไป

12. เอกสารอ้างอิง

- กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2553. การป้องกันกำจัดแมลงและ **ศัตรูพืช ปี 2553**. เอกสารวิชาการเกษตรกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 303 หน้า.
- กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2537 **การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษการเกษตรในประเทศไทย**.กรมวิชาการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชาลีสรุรกิจและโฆษณา, กรุงเทพฯ.
- ดุขฎิ มั่นความดี และ อุทุมพร สุขม่วง. 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation) เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
- นรินนาม. 2537. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย.กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- นรินนาม. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี.เอกสารประกอบการอบรม สัมมนาวิชาการ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันอาหาร.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- AOAC official methods of analysis. 2012. Guidelines for standard method performance requirements Appendix F, p. 9.
- Anonymous.1993. Amitraz,The Agrochemicals Handbook Third edition update 4. Royal Society of chemistry/Information Services, England.
- Dobrat, W. and Martin, A. 1995.CIPAC Handbook Volume G, Analysis of Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical Council. Limited. pp. 5-10.
- Kidd,H. and D.R.James (Eds). 1993.The Agrochemicals Handbook.3rd.ed.Royal Society of chemistry, England
- Roberts, R. and Hutson, H. 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2:Insecticides and Fungicides. Amitraz. Society of chemistry/Information Services, England pp. 729-733