

## รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

ชุดโครงการวิจัย	วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร	
โครงการวิจัย	การพัฒนาระบบตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร	
กิจกรรม 1	พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืช พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร	
กิจกรรมย่อย 1.5	การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมะพร้าวทางการเกษตร	
ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)	1.5.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมะพร้าวทางการเกษตร Bromacil	
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)	1.5.3 Method Validation of Bromacil in Pesticide Products	
คณะผู้ดำเนินงาน		
หัวหน้าการทดลอง	นางสาวพินดา มงคลวุฒิกุล	สังกัดกลุ่มวิจัยวัตถุพืชมะพร้าวทางการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวดวงรัตน์ วิลาสินี	สังกัดกลุ่มวิจัยวัตถุพืชมะพร้าวทางการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### บทคัดย่อ

ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์โบรมาซิล (Bromacil) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดวัชพืช สูตรผสมแบบผงเปียกน้ำ (Wettable Powder, WP) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas-Liquid Chromatography, GLC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ก๊าซตัวพา (He) อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิการฉีด 290 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตรวจวัด 270 องศาเซลเซียส Split injection split ratio 50 : 1 และปริมาตรการฉีด 1 ไมโครลิตร จากผลการทดสอบพบว่า ช่วงของการวัด (Range) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เท่ากับ 0.99990 และให้ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99991 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient (r)  $\geq 0.995$  ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3891 และ 0.3911 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.3844 และ 0.3589 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ร้อยละ 101.12 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง

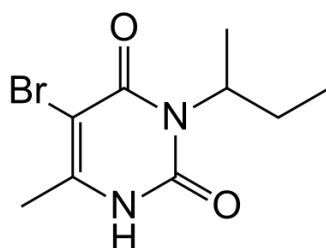
(specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หัวตุ่มมีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

### Abstract

Method validation study of bromacil, the active ingredients in herbicide products for wettable powder formulations were developed by gas chromatography with flame ionization detector (FID). Column capillary coated with 5% phenyl methyl siloxane had a diameter of 0.32 mm and a length of 30 m with 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness. The carrier gas (He) with flow rate of 2.0 ml/min, an injector temperature of 290  $^{\circ}\text{C}$ , an oven temperature of 240  $^{\circ}\text{C}$ , a detector temperature of 270  $^{\circ}\text{C}$ , a split ratio of 50:1 and a volume injection of 1  $\mu\text{l}$  were used. The results were found that the concentration range of bromacil was 0.2 - 2.4 mg/ml with the coefficient correlation (r) of 0.99990. However, the linearity of concentration range was from 0.2 to 1.6 mg/ml with the correlation coefficient of 0.99991 which had accepted with limit of the correlation coefficient (r)  $\geq$  0.995. The precision of HORRAT values for repeatability and within laboratory reproducibility was 0.3891 and 0.3911, respectively. The HORRAT values tested with robustness and ruggedness were 0.3844 and 0.3589, respectively which were followed by the AOAC, EU and Codex due to their less than 2. The accuracy of this method was assessed by recovery studied. The percent recovery was 101.12 considered an acceptance by the AOAC (98-102%) for analyte concentration more than 10%. This specific method did not have interference from other substances. As a result, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. The developed method, therefore, could be used to determine in pesticide products with accuracy and precision.

### คำนำ

โบรมาซิล (Bromacil) เป็นกลุ่มกำจัดวัชพืชในกลุ่ม uracil ประเภทเจาะจงในการกำจัดวัชพืชพวกหญ้า ส้มลูกและวัชพืชยืนต้นอื่นๆ โดยใช้ได้ทั้งก่อนวัชพืชงอกและภายหลังวัชพืชงอก มีชื่อทางเคมีว่า 5-bromo-3-sec-butyl-6-methyluracil มีสูตรโมเลกุลเป็น  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_2$  มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1



## รูปที่ 1 สูตรโครงสร้าง Bromacil

สารป้องกันและกำจัดวัชพืช Bromacil ถูกดูดซึมเข้ารากได้อย่างรวดเร็ว แต่จะดูดซึมทางใบได้เพียงเล็กน้อย ประโยชน์ใช้ในการป้องกันกำจัดวัชพืช เช่น หญ้าแพรก หญ้าข้าวนก กก หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าปากควาย หญ้ารังนก หญ้าหางหมา หญ้าพง หญ้าชันอากาศ หญ้าขน สาบเสือ ผักโขม ผักเบี้ยใหญ่ หัวหมู รวมทั้งวัชพืชใบแคบอื่น ๆ และวัชพืชใบกว้างทั้งชนิดล้มลุกและยืนต้น ถูกใช้กำจัดวัชพืชในสวนส้มเขียวหวาน มะนาว ไร่สับปะรด และพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร

ปัจจุบัน Bromacil จัดเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีการขึ้นทะเบียน นำเข้า และส่งออก รวมทั้งควบคุมคุณภาพตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 เพื่อได้ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่มีคุณภาพและเกษตรกรรมนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุพิษ การเกษตรที่ให้บริการในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายต้องมีความเชี่ยวชาญในการทดสอบ ให้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ และให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025 จึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Bromacil ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรด้วยเทคนิค GC-FID เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องของวิธี ก่อนนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการต่อไป

### วิธีดำเนินการ

#### อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่อง Gas-Liquid Chromatograph (GLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดวัดปริมาตรชนิด type A ขนาด 25, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. ปิเปตชนิด type A ขนาด 1, 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร

#### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Bromacil 98.0 %
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Bromacil 80% WP
3. Acetone ชนิด AR grade

## วิธีการ

### 1. การปรับภาวะเครื่อง Gas-Liquid Chromatograph ชนิด Flame Ionization Detector (GC-FID) ดังนี้

คอลัมน์ชนิด	:	Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ injector	:	290 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ oven	:	240 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ detector	:	270 องศาเซลเซียส
Split ratio	:	50 : 1
Injection volume	:	1.0 ไมโครลิตร
ก๊าซตัวพา	:	He อัตราการไหล 2 มิลลิิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H <sub>2</sub> อัตราการไหล 45 มิลลิิตรต่อนาที
	:	Air อัตราการไหล 450 มิลลิิตรต่อนาที
Make up gas	:	N <sub>2</sub> อัตราการไหล 45.0 มิลลิิตรต่อนาที

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

### 2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

#### 2.1 ตรวจสอบช่วงของการวัด (Range)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bromacil 6 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 1 ซีซี ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.2, 0.6, 1.0, 1.6, 2.0 และ 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมา ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ response พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

#### 2.2 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เลือกความเข้มข้นสารมาตรฐานในช่วงที่เป็นเส้นตรงจาก Range 3 ระดับความเข้มข้น เตรียมช่วงความเข้มข้นให้เป็น 6 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 1 ซ้ำ ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 3.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ response คำนวณค่า correlation coefficient (r);  $r \geq 0.995$

## 2.3 ตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

### 2.3.1 Repeatability

ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

นำตัวอย่าง Bromacil คลุกผสมให้เข้ากัน ซั่งตัวอย่าง Bromacil ที่ทราบปริมาณแน่นอน 3 ระดับ ความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetone ปริมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

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

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

### 2.3.2 Within laboratory reproducibility

ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน

วิเคราะห์ตัวอย่าง Bromacil เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 แต่จะวิเคราะห์ต่างวัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex

## 2.4 ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่าง Bromacil เช่นเดียวกันกับข้อ 2.3.1 โดยทำการเปลี่ยนอุณหภูมิในการทดสอบ (ตรวจสอบ Robustness) และเปลี่ยนเครื่อง GC-FID (ตรวจสอบ Ruggedness) คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT

## 2.5 ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

### 2.5.1 เตรียม Stock standard

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bromacil 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารมาตรฐานให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 1,275 มิลลิกรัม (มีความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม) ลงใน volumetric flask 250 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

### 2.5.2 เตรียม Stock sample

เตรียมสารละลายตัวอย่าง Bromacil 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 625 มิลลิกรัม (มีความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม) ลงใน volumetric flask 500 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

### 2.5.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงใช้งาน ลงใน volumetric flask 25 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก

### 2.5.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 2.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 2.5.3

### 2.5.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 2.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard ปริมาตร 2, 3 และ 4 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 2.5.3

### 2.5.6 ประเมินค่า Accuracy จากค่า % recovery

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

$C_{\text{spike}}$	=	ความเข้มข้นของ Bromacil ในสารละลาย Spike
$C_{\text{origin}}$	=	ความเข้มข้นของ Bromacil ในสารละลาย Origin
$C_{\text{add}}$	=	ความเข้มข้นของ Bromacil ที่เติมลงในสารละลาย Spike

## 2.6 ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ฉีด Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง Bromacil เข้าเครื่อง GC-FID พิจารณาโครมาโทแกรมดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอมรบกวนสารออกฤทธิ์ Bromacil หรือไม่

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2556 – กันยายน 2557

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบวัตถุที่มีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

### ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตร Bromacil ด้วยเครื่อง GC-FID โดยหาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ Range, Linearity, Precision, Robustness/Ruggedness, Accuracy และ Specificity/Selectivity นำมาหาค่าและประเมินการยอมรับดังนี้

1. ตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.9990

2. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 – 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.9991 เกณฑ์ยอมรับค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq$  0.995

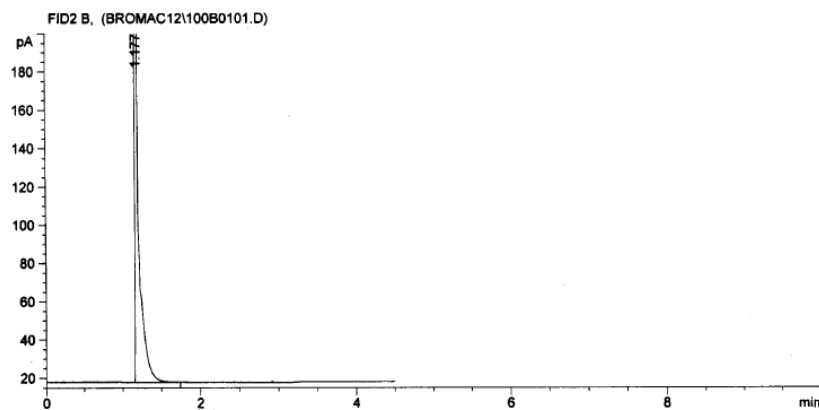
3. ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) สำหรับ Repeatability ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 79.29% w/w ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.69 ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.5493 และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.3891 (ตารางที่ 1) สำหรับ Within laboratory reproducibility ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 79.21% w/w ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.70 ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.5521 และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.3911 (ตารางที่ 2) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ Bromacil ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

4. ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness มีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรบางอย่างในวิธีวิเคราะห์โดยการเปลี่ยนเครื่อง GC-FID พบว่าสำหรับ Robustness ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 78.44% w/w ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.69 ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.5427 และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.3844 (ตารางที่ 3) สำหรับ Ruggedness ความเข้มข้นที่ระดับ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 78.77% w/w ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.64 ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.5079

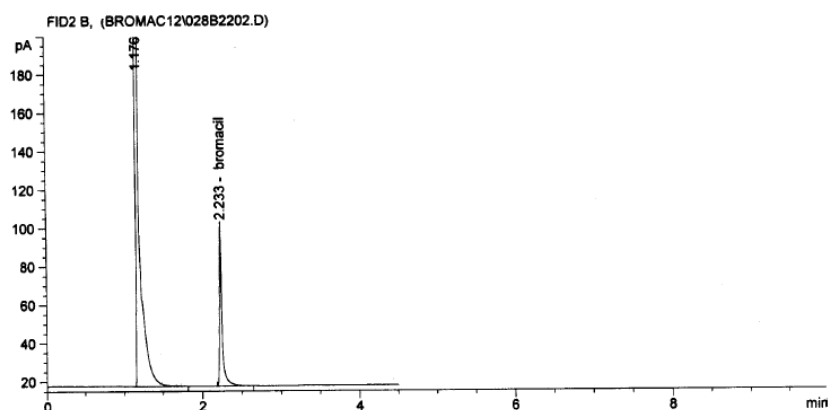
และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.3589 (ตารางที่ 4) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ Bromacil ให้ผลการทดสอบ Robustness และ Ruggedness อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า % Recovery พบว่า ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างมี 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซ้ำค่า % Recovery ได้เท่ากับ 100.05, 101.36 และ 101.96 ตามลำดับ % Recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ความเข้มข้นเท่ากับ 101.12 (ตารางที่ 5) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC

6. ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) จากการฉีด Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง Bromacil เข้าเครื่อง GC-FID พบว่า โครมาโทแกรมของ Blank สารมาตรฐานและสารตัวอย่าง Bromacil ไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ Bromacil ตามรูปที่ 2 - 4 ตามลำดับ

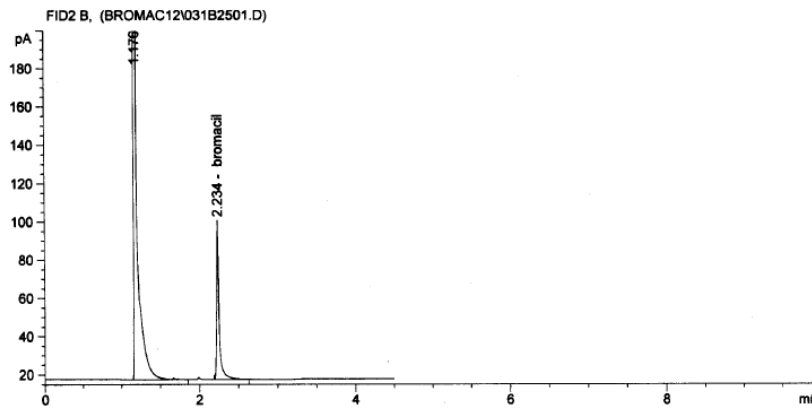


รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของ Blank





### รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน



### รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของสารตัวอย่าง

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สัตว์ตัดอ้วนทรายทางการเกษตร Bromacil โดยพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ ช่วงของการวัด (Range) ในช่วงความเข้มข้น 0.2 - 2.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.99990 และให้ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า  $r$  เท่ากับ 0.99991 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า  $r \geq 0.995$  ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ทั้งแบบ Repeatability และ Within laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3891 และ 0.3911 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3844 และ 0.3589 ซึ่งไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ได้ร้อยละ 101.12 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สัตว์ที่มีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไปขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ได้

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

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

### เอกสารอ้างอิง

- ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์. 2537. *สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย*. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว*. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- กรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2550. *นักวิเคราะห์มีอาชีพสาขาเคมี*. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรุงเทพฯ.
- EURACHEM Guide. 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical Method: A Laboratory*. Guide to Method Validation and Related Topics. United Kingdom.
- APVMA. 2004. *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products*. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Kingston. Australia.
- Kidd, H. and James, D.R. 1991. *The Agrochemicals Handbook*. 3<sup>rd</sup> Ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge. England.
- Ludwig, H. 1998. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Interpharm Press. USA.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	15.4	78.08	30.6	79.95	46.3	78.69
2	15.5	78.99	30.7	78.93	46.3	79.59
3	15.7	78.48	30.7	79.68	46.8	78.28
4	15.8	79.98	31.0	79.15	47.2	78.77
5	15.9	78.57	31.4	79.32	47.3	79.32
6	16.0	79.80	31.5	80.74	47.3	79.06
7	16.1	79.12	31.7	80.18	47.4	79.60
8	16.3	78.95	31.8	80.59	47.4	79.79
9	16.4	78.58	31.9	79.99	47.6	79.23
10	16.5	78.32	32.0	80.17	47.6	78.93
mean		78.89		79.87		79.13
SD		0.62		0.60		0.47

ตารางที่ 2 ตรวจสอบ Precision แบบ Within laboratory reproducibility ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	15.3	79.19	30.6	78.43	46.3	79.04
2	15.4	79.29	30.7	78.54	46.4	79.58
3	15.5	78.65	31.1	78.94	46.5	78.66
4	15.6	79.01	31.3	79.19	46.5	79.54
5	15.7	78.60	31.3	79.81	46.5	79.01

6	15.8	79.00	31.4	78.40	46.9	79.30
7	16.0	78.35	31.5	78.09	47.0	80.19
8	16.2	80.75	31.6	78.48	47.6	79.41
9	16.3	80.87	31.6	78.90	47.6	79.20
10	16.3	79.89	31.9	79.83	47.6	80.18
mean		79.36		78.86		79.41
SD		0.87		0.60		0.49

ตารางที่ 3 ตรวจสอบ Robustness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	15.4	77.58	30.6	79.25	46.6	78.85
2	15.4	77.65	30.9	78.14	46.6	79.23
3	15.4	78.95	31.2	78.03	46.7	78.64
4	15.4	79.11	31.5	77.83	46.7	78.85
5	15.5	77.52	31.5	78.86	46.8	78.81
6	15.5	77.55	31.5	77.65	47.1	77.97
7	15.7	79.75	31.6	79.25	47.2	78.15
8	15.8	77.59	31.8	78.20	47.5	79.02
9	16.0	77.67	31.8	79.86	47.5	78.59
10	16.1	78.77	31.8	77.93	47.6	78.05
mean		78.21		78.50		78.62
SD		0.84		0.75		0.43

ตารางที่ 4 ตรวจสอบ Ruggedness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ลำดับ	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)	นน.ตัวอย่าง (mg)	% ที่ตรวจพบ (w/w)
1	15.4	78.05	30.6	78.91	46.3	78.82
2	15.5	78.33	30.7	79.46	46.3	78.18
3	15.7	79.01	30.7	78.17	46.8	78.83
4	15.8	78.06	31.0	79.28	47.2	78.10
5	15.9	78.13	31.4	78.48	47.3	79.29

6	16.0	78.71	31.5	78.07	47.3	78.70
7	16.1	80.83	31.7	78.40	47.4	79.21
8	16.3	79.32	31.8	79.54	47.4	79.54
9	16.4	79.37	31.9	78.52	47.6	78.50
10	16.5	77.79	32.0	78.95	47.6	78.54
mean		78.76		78.78		78.77
SD		0.92		0.53		0.47

ตารางที่ 5 ตรวจสอบ % Recovery

ลำดับ	Al content ( mg / 25 ml )								
	Conc.added (10.0 mg )			Conc. added (15.0 mg )			Conc. added (20.0 mg)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.86	19.77	10.00	9.86	24.60	15.00	9.81	30.24	20.00
2	9.89	19.71	10.00	9.84	25.05	15.00	9.80	30.07	20.00
3	9.98	20.02	10.00	9.90	24.99	15.00	9.71	30.28	20.00
4	9.90	19.88	10.00	9.74	24.84	15.00	9.90	30.12	20.00
5	9.86	19.90	10.00	9.77	25.09	15.00	9.98	30.19	20.00
6	9.84	19.97	10.00	9.74	24.97	15.00	9.73	30.04	20.00
7	10.01	19.88	10.00	9.88	25.05	15.00	9.79	30.16	20.00
8	9.92	19.95	10.00	9.81	25.30	15.00	9.78	30.25	20.00
9	9.85	19.98	10.00	9.79	25.01	15.00	9.75	30.25	20.00
10	9.92	19.99	10.00	9.83	25.29	15.00	9.83	30.34	20.00
mean	9.90	19.91	10.00	9.82	25.02	15.00	9.81	30.19	20.00
SD	0.06	0.10		0.06	0.20		0.08	0.10	
%RSD	0.57	0.50		0.57	0.81		0.82	0.32	
%Recovery			100.05			101.36			101.96

