

รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

1. **ชุดโครงการวิจัย** แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์และปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 - กิจกรรม 1. การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต สารสกัด และวัตถุดิบทรายทางการเกษตร
 - กิจกรรมย่อย 1.5 วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุดิบพืชการเกษตร
- ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) 1.5.5 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุดิบพืชการเกษตร dichlorvos
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** Method Validation of dichlorvos in Pesticide Formulations
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

จิตตานันท์ สรวายเอี่ยม	กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร	สปผ.
สุกัญญา คำคง	กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร	สปผ.

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ dichlorvos ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง สูตรผสม 50% W/V EC ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GC) โดยมีตัวตรวจจับชนิด Flame ionization detector (FID) ด้วยแคปิลลารีคอลัมน์ HP-5 (30 m x 0.25 mm (id.) 0.25 μ m film thickness) ใช้ He เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นที่ 120 °C นาน 2 นาที อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 160 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิการฉีด 250 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 250 °C โหมดการฉีด split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 ไมโครลิตร วิธีทดสอบนี้ ให้ผลการทดสอบปริมาณสาร dichlorvos ที่มีช่วงการวัด (range) ในช่วงความเข้มข้น 0.201 – 3.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ที่ครอบคลุมการใช้งาน 0.200 – 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99993 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$

การตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy) ของปริมาณสาร dichlorvos เมื่อพิจารณาจาก % recovery เท่ากับ 101.2, 101.7 และ 101.8 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC % recovery เท่ากับ 98 - 102 %

การตรวจสอบความเที่ยง (precision) ประเมิน repeatability ของ dichlorvos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.457, 0.908 และ 0.464 และประเมินแบบ intra-laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.560, 0.567 และ 0.676 สำหรับค่าความแข็งแกร่งของวิธี (robustness/ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร dichlorvos ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.482, 0.663 และ 0.885 เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ได้ที่ให้ผลวิเคราะห์ ถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ในระดับสากล

Abstract

A Gas Chromatographic (GC) method using flame ionization detector (FID) was developed and validated for quantitative determination of dichlorvos content in pesticide formulations. The analysis was carried out on column HP-5 (30 m × 0.25 mm id. 0.25 μm film thickness). The condition using helium was flow-rate 2 ml/min, oven temperature 120°C (2 min)-10 °C /min to 160 °C (2 min), detector temperature 250°C, injector temperature 250°C, split ratio 50 : 1 and injection volume 1 μl. The validation presented the concentration range 0.201 – 3.01 mg/ml, the concentration of linearity was 0.200 – 1.40 mg/ml (correlation coefficient = 0.99993), accuracy was defined by % recovery was 101.2, 101.7, 101.8 (AOAC accepted the % recovery as 98 - 102 %), precision was estimated by repeatability with the HORRAT as 0.457, 0.908, 0.464 and intra-laboratory reproducibility with the HORRAT as 0.560, 0.567, 0.676 and robustness/ruggedness with the HORRAT as 0.482, 0.663, 0.885 (AOAC accepted the HORRAT ≤ 2). Results obtained in this parameter was acceptable. This method can be used as a standard method to determine the accuracy and precision of the analytical results is international level.

คำนำ

สารกำจัดแมลง dichlorvos เป็นสารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ออกฤทธิ์ในทางสัมผัส และกินตาย มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โคลิเนสเอสเทอเรสแบบถาวร มีชื่อทางเคมีตาม IUPAC เป็น 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (Anonymous. 1993) การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos มีวิธีมาตรฐานตาม CIPAC Handbook Vol. H โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC ใช้ตัวตรวจจับชนิด FID ใช้คอลัมน์ OV-225 (1.5 m X 4 mm i.d) มีอุณหภูมิคอลัมน์ 140 °C อุณหภูมิการฉีดสาร 160 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 250 °C วิธีมาตรฐานใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร dichlorvos ด้วยคอลัมน์แก้วที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ ทำให้ประสิทธิภาพการแยกสารไม่ดีเท่าแคปิลลารีคอลัมน์ อีกทั้งเครื่องมือปัจจุบันที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นรุ่นใหม่ที่ไม่สามารถเข้ากับคอลัมน์แก้วได้

ดังนั้นงานวิจัย จึงมุ่งที่จะตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ที่มีความแตกต่างกับวิธีมาตรฐาน เพื่อสามารถวิเคราะห์สารได้ และให้ผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือ ถูกต้อง ยอมรับได้ในระดับสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5 % phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์ม 0.25 และ 0.32 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4-5 ตำแหน่ง ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. ขวดปริมาตร ขนาด 10, 50, 250, 1000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ

5. ปีเปตชนิด ขนาด 2, 4, 8, 10,12 และ 14 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. Ultrasonic bath
7. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน dichlorvos ความบริสุทธิ์ 98.0 %
2. สารเข้มข้น (Technical material หรือ TC) ของ dichlorvos 95 % min.Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ dichlorvos 50% W/V EC
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ dichlorvos 95 % min.Tech.

เพื่อใช้สารเข้มข้นนี้แทนสารมาตรฐานที่มีราคาแพง และมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ ที่ต้องใช้สารปริมาณอย่างน้อย 5 กรัม ในกระบวนการตรวจสอบ โดยวิธีวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

1.1 การปรับตั้งสถานะเครื่อง GC-FID

Capillary column	: HP-5 (30 m × 0.25 mm (i.d.), 0.25 μm)
Oven temperature	: 120 °C, 2 °C/min- 160 °C (1 min)
Injector temperature	: 250 °C
Detector temperature	: 250 °C
Split injection	: Split ratio 50 : 1
Carrier gas	: Helium 2.0 mL/min
Injection volume	: 1 μl
Run time	: 7 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน dichlorvos

ชั่งสารมาตรฐาน dichlorvos ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างละ 10 มิลลิกรัม (± 2.0 มิลลิกรัม)

จำนวนอย่างละ 2 ซ้ำ (C₁,C₂) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น 98% min.Tech.

ชั่งสารเข้มข้น dichlorvos ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างละ 10 มิลลิกรัม (±2.0 มิลลิกรัม) จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ (TC₁-TC₁₀) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.4 การฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC-FID

เมื่อปรับตั้งสภาวะของเครื่อง GC-FID เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_1 และ C_2 สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้น dichlorvos ตามลำดับ ดังนี้

$$C_1, TC_1, TC_2, C_2, TC_3, TC_4, C_1, \dots$$

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos ในสูตรสารเข้มข้น

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

$$f = \frac{S \times P}{H_S}$$

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

H_S = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน

จากนั้น คำนวณค่า % RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ของแต่ละสาร ซึ่งต้องได้ค่า % RPD แตกต่างกันไม่เกิน 1 % จากสูตร

$$\% RPD = \frac{(f \text{ of maximum} - f \text{ of minimum}) \times 100}{f \text{ of average}}$$

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารออกฤทธิ์ (\% W/W)} = \frac{f_{avr.} \times H_W}{W}$$

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น หน่วยเป็นมิลลิกรัม

$f_{avr.}$ = ค่าเฉลี่ย response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ

H_W = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้น

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ตรวจสอบค่า Range

2.1.1.1 ซั่งสารเข้มข้น dichlorvos ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.201, 0.401, 1.00, 2.01, 2.41 และ 3.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ที่เตรียมสภาวะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.1.4 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย dichlorvos (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 3 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง แบ่งเป็น 6 ช่วง ดังนี้ 0.201, 0.40, 0.801, 1.00, 1.20 และ 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

2.1.2.2 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย dichlorvos (แกน X) กับค่า response (แกน Y) ต้องได้ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.2.1 การเตรียม Stock สารละลายของสารเข้มข้น dichlorvos ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น dichlorvos ที่ความเข้มข้น 9.896 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งปริมาณ 2,569.1 มิลลิกรัม ใส่ลงในปิកเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสุ้ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone หลายๆครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 2, 5, 8 และ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ของ dichlorvos ความเข้มข้น 0.3958, 0.9896, 1.5834 และ 1.9792 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample

ชั่งผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50%W/V EC ปริมาณ 1,114.8 มิลลิกรัม ใส่ลงในปิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสุ้ขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า 0

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample สำหรับ dichlorvos ที่ความเข้มข้น 0.594, 0.990 และ 1.583 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละ

ละขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น dichlorvos จากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 3, 5 และ 8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขวด ฉีดเข้าเครื่อง GC-FID ได้ค่า F

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก % Recovery

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

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

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

C คือ ปริมาณ added sample (มก.)

ค่าความแม่นยำ ต้องได้ % Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

ประเมินความเที่ยงแบบ Repeatability (การทำซ้ำ) และ Intra-laboratory reproducibility (การทำซ้ำ ต่างวันเวลา) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น dichlorvos ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น dichlorvos ที่ความเข้มข้น 5.0192 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยชั่งปริมาณ 1,303.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone หลายๆ ครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วย เครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 2.3.1.1 ปริมาตร 2, 4, 8,10,12 และ 14 มิลลิลิตร ลง ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน จะได้ standard calibration curve ของ dichlorvos ความเข้มข้น 0.201, 0.402, 0.803,1.004, 1.205 และ 1.405 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50% W/V EC

ชั่งผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50% W/V EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม จำนวนความเข้มข้นละ 10 ขวด ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

2.3.4 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\% \text{ RSD ที่ได้จาการวิเคราะห์}}{\text{}}$$

Predicted Horwitz RSD จากทฤษฎี

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

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความแข็งแกร่ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนสภาวะเงื่อนไขเดิมจาก flow-rate 2 ml/min เป็น flow-rate 1.5 ml/min และใช้คอลัมน์ชนิดเดิม แต่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.32 mm

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น dichlorvos เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50% W/V EC ดำเนินการตามข้อ 2.3.2

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ และการคำนวณค่า HORRAT ดำเนินการตามข้อ 2.3.3-2.3.4

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2556 ถึงเดือน กันยายน 2557

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง โดยตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนของสารเข้มข้น 98 % min. Tech. เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ 96.3

พิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ dichlorvos พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้น 0.201 – 3.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์ dichlorvos ในช่วงความเข้มข้น 0.200 – 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99993 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

การตรวจสอบค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos 50% W/V EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.594, 0.990 และ 1.583 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ คำนวณ

ค่า % Recovery เท่ากับ 101.2, 101.7 และ 101.8 (ตารางที่ 1) ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง % Recovery เท่ากับ 98 – 102 %

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos 50% W/V EC ประเมินแบบ Repeatability ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ได้ค่า HORRAT 0.457, 0.908 และ 0.464 (ตารางที่ 2) ประเมินแบบ Intra-laboratory reproducibility ได้ค่าHORRAT เท่ากับ 0.560, 0.567, 0.676 (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT \leq 2

การตรวจสอบความแข็ง (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos 50% W/V EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 1.0 2.0 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.482, 0.663 และ 0.885 (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT \leq 2

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ % Recovery ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50% W/V EC

Number	Active ingredient content (mg/50 ml)								
	Concn.(0.594 mg/ml)			Concn.(0.990 mg/ml)			Concn.(1.583 mg/ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.37	39.34	29.69	9.37	59.86	49.48	9.37	89.69	79.17
2	9.37	38.81	29.69	9.37	59.72	49.48	9.37	90.03	79.17
3	9.37	39.62	29.69	9.37	59.99	49.48	9.37	90.67	79.17
4	9.37	39.26	29.69	9.37	59.65	49.48	9.37	90.14	79.17
5	9.37	38.82	29.69	9.37	59.92	49.48	9.37	89.45	79.17
6	9.37	39.11	29.69	9.37	59.54	49.48	9.37	89.82	79.17
7	9.37	39.07	29.69	9.37	59.56	49.48	9.37	90.32	79.17
8	9.37	39.48	29.69	9.37	58.47	49.48	9.37	89.80	79.17
9	9.37	39.32	29.69	9.37	60.64	49.48	9.37	89.84	79.17
10	9.37	39.17	29.69	9.37	59.53	49.48	9.37	89.64	79.17
% Recovery	101.2			101.7			101.8		

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Repeatability ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์
dichlorvos 50% W/V EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)	Wt. of Sample (mg)	Al.Content % (W/W)
1	51.1	45.88	103.0	46.12	150.8	47.01
2	52.6	46.14	104.2	45.65	151.2	46.28
3	53.3	46.08	104.4	45.82	152.0	46.48
4	53.4	46.01	106.8	46.58	152.8	46.90
5	53.4	46.48	107.6	46.79	153.0	46.44
6	53.8	45.79	110.3	46.81	153.2	46.45
7	54.1	46.09	112.5	46.41	153.3	47.03
8	54.6	46.51	109.2	47.36	153.3	46.07
9	54.6	46.62	108.1	47.34	156.4	46.70
10	54.8	46.64	104.4	45.82	155.8	46.45
Mean	-	46.22	-	46.47	-	46.58
SD		0.311		0.616		0.319
%RSD _{exp.}		0.670		1.330		0.680
Horwitz		1.465		1.465		1.465
HORRAT		0.457		0.908		0.464

ตารางที่ 3 การตรวจสอบ Precision ประเมินแบบ Intra-laboratory Reproducibility ของปริมาณสารออกฤทธิ์
 ในผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50% W/V EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)
1	50.1	45.48	100.2	45.50	150.0	45.70
2	50.4	45.99	100.5	44.98	150.3	46.31
3	51.9	45.63	101.5	45.52	150.5	45.97
4	52.4	45.93	101.6	45.16	150.6	46.49
5	52.9	45.32	102.6	45.27	150.6	46.12
6	54.0	45.53	102.8	45.31	151.8	46.51
7	55.2	45.65	103.3	45.16	152.0	45.27
8	55.5	46.33	103.8	45.04	152.1	45.68
9	58.0	45.02	104.0	44.97	152.5	45.40
10	58.7	45.42	102.4	44.19	153.2	45.45
Mean	-	45.68	-	45.15	-	45.89
SD		0.373		0.376		0.456
%RSD _{exp.}		0.820		0.830		0.990
Horwitz		1.465		1.465		1.465
HORRAT		0.560		0.567		0.676

ตารางที่ 4 การตรวจสอบ Robustness/ Ruggedness ของปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ dichlorvos 50% W/V EC

Number	Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(2.0 mg/ml)		Concn.(3.0 mg/ml)	
	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)	Wt. of Sample (mg)	Al. Content % (W/W)	Wt. of Sample (mg)	Al.Content % (W/W)
1	52.4	44.38	101.5	44.71	150.3	43.72
2	53.5	44.34	102.0	44.07	151.3	43.87
3	54.6	44.74	102.1	44.84	151.0	44.38
4	54.7	44.96	103.6	45.29	151.2	44.04
5	55.0	44.46	103.7	44.00	151.3	43.87
6	55.1	44.82	104.0	44.62	153.5	44.19
7	55.9	43.83	104.2	44.11	154.4	43.59
8	56.6	44.59	104.2	44.16	154.9	43.64
9	56.8	44.36	104.2	44.26	156.7	42.68
10	57.1	44.46	104.1	44.08	156.4	42.72
Mean	-	44.49	-	44.14	-	43.67
SD		0.314		0.429		0.566
%RSD _{exp.}		0.706		0.972		1.296
Horwitz		1.465		1.465		1.465
HORRAT		0.482		0.663		0.885

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos 50% W/V EC ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดแมลง โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) มีตัวตรวจจับ (Detector) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ด้วย Capillary column ชนิด HP-5 (30 m x 0.25 mm (i.d.), 0.25 μ m) มีสภาวะเครื่องการใช้งานที่ Oven 120 $^{\circ}$ C (2 นาที) 10 $^{\circ}$ C/min- 160 $^{\circ}$ C (1 min), Injector 250 $^{\circ}$ C, Detector 250 $^{\circ}$ C, Split ratio 50 : 1, Helium 2.0 mL/min, Injection volume 1 μ L, Run time 7 min

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ของการวิเคราะห์ปริมาณ dichlorvos ในช่วงความเข้มข้น 0.201 – 3.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.201 – 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99993 เกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

3. การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos พบว่า ได้ค่า % recovery เท่ากับ 101.2, 101.7 และ 101.8 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98–102%

4. การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos 50% W/V EC ประเมินแบบ Repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.457, 0.908 และ 0.464 ประเมินแบบ Intra-laboratory reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.560, 0.567, 0.676 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

5. การตรวจสอบความแข็งแกร่ง (Robustness/Ruggedness) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ dichlorvos 50% W/V EC ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.482, 0.663 และ 0.885 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐาน ในห้องปฏิบัติการตามการขอรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2005
2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธีตามมาตรฐาน
3. สามารถใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสูตรผสม dichlorvos 50% W/V EC เพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ที่มีจำหน่ายในร้านค้าจำหน่ายทั่วประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว*. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

Anonymous. 1993. *The Agrochemicals Handbook 3rd. ed.* The Royal Society of Chemistry

Cambridge, England.

EURACHEM. 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. First English Edition. แหล่งที่มา :

[http://www.gnbsgy.org/PDF/Eurachem%20Guide%20Validation\[1\].pdf](http://www.gnbsgy.org/PDF/Eurachem%20Guide%20Validation[1].pdf), 21 มิถุนายน 2555.

Huber L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories Interpharm/CRC*.

แหล่งที่มา : http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx#03_standard, 1 กรกฎาคม 2557.

Dobrat W. and A Martijn. 1998. *CIPAC Handbook Vol. H : Analysis of Technical*

and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, the Black Bear Press Ltd, England.