

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : การพัฒนาระบบการวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรม : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อยที่ 1.5 : การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การทดสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์วัตถุพืชมการเกษตร cypermethrin
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : น.ส.ปริยานุช สายสุพรรณ นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ สังกัด สวพ.3
ผู้ร่วมงาน : นางวัชรพร ศรีสว่างวงศ์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ สังกัด สวพ.3
: นายจรรพงค์ ประสพสุข นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ สังกัด สวพ.3
5. บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการวัตถุพืชมการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 มีภารกิจด้านการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมการเกษตร ในส่วนภูมิภาค โดยรับผิดชอบพื้นที่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน 11 จังหวัด ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมการเกษตร ชนิดสาร cypermethrin ด้วยเทคนิค gas liquid chromatography เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือ ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าให้ค่า range ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25-1.50 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) 0.9994 เกณฑ์ยอมรับที่ค่า r มากกว่า 0.995 มีความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) เป็น 0.96 และ 0.93 ตามลำดับ ตรวจสอบ robustness และ ruggedness ของวิธีการ มีค่า HORRAT เป็น 0.80 และ 0.57 ตามลำดับ ซึ่งค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์ของ AOAC และการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการจากค่า % recovery ได้ 99.20 % อยู่ในช่วง 98-102% ตามเกณฑ์สารที่มีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 10

%ของ AOAC ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตร cypermethrin สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง และแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากลและสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้

6. คำนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติและเงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ ก่อนที่จะนำวิธีการวิเคราะห์ที่ใดมาใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง จำเป็นจะต้องทำ method validation เพื่อใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ผู้วิเคราะห์ พัฒนาขึ้น หรือดัดแปลงมาจาก reference method เพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการของห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำ validation เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ วิธีการทดสอบที่ใช้สำหรับ method validation จะครอบคลุมถึงสมบัติของวิธีการวิเคราะห์ ได้แก่

1) ความถูกต้อง (accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด การหา accuracy ทำได้โดยวิเคราะห์ CRM (Certified Reference Material) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาระดับความถูกต้องในรูปของความผิดพลาดสัมพัทธ์ (relative error) หรือ ความถูกต้องสัมพัทธ์ (relative accuracy) และการหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) ในกรณีที่ไม่สามารถหา CRM ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้โดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ซึ่งจะมีข้อจำกัดว่า accuracy ที่ได้นั้นครอบคลุมเฉพาะขั้นตอนที่วิเคราะห์ spiked sample เท่านั้น การทำ recovery จะทำ 3 ระดับความเข้มข้น และอย่างน้อยความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

2) การตรวจสอบความแม่นยำ (precision) หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำๆ กัน หลายๆ ครั้ง ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ซึ่ง precision ของวิธีการวิเคราะห์มี 2 ลักษณะคือ repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ ในสถานะเดียวกันโดยวิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกันและผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และ reproducibility หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน เครื่องมือคนละเครื่องกัน และทำในห้องปฏิบัติการคนละแห่งกันมักจะวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้ช่วงเวลายาวพอสมควร ระดับของความแม่นยำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่วิเคราะห์

3) linearity และ range linearity หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่จะทำให้วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด ส่วน range หมายถึง ช่วงความเข้มข้นของสารที่จะวัดตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดถึงความเข้มข้นสูงสุดที่วัดแล้วมี accuracy precision และ linearity อยู่ในระดับที่มีความถูกต้องยอมรับได้ตามข้อกำหนด

4) การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

LOD หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ และ LOQ หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี accuracy และ precision ที่ยอมรับได้ (สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วิเคราะห์วัตถุที่มีพิษการเกษตรไม่ได้ทำการหาค่า LOD และ LOQ)

5) สภาพไว (sensitivity) หมายถึง ความสามารถในการวัดความเข้มข้นที่แตกต่างกันน้อยที่สุด วิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวสูงจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมากหรือเป็นวิธีที่สามารถแยกความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกันน้อยมากได้ถูกต้อง

6) ความจำเพาะ (selectivity หรือ specificity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะวิเคราะห์เฉพาะสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ โดยที่สารนั้นเป็นเพียงส่วนประกอบหนึ่งในสารละลายนั้น ๆ หรือวิธีการวิเคราะห์ที่มีความสามารถในการเลือกวัดเฉพาะสารที่ต้องการจะวัด

7) ruggedness/robustness คือ การทดสอบความคงทนของวิธีการทดสอบ จากการเปลี่ยนสภาวะและสิ่งแวดล้อมของวิธีที่เกิดขึ้นในการทำงานปกติ การทดสอบหา ruggedness ของวิธีการวิเคราะห์ทำโดยการเปลี่ยนแปลงวิธีการวิเคราะห์ให้ต่างไปจากเดิมเล็กน้อยและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

เนื่องจากห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สวพ.3 เป็นห้องปฏิบัติการใหม่ ที่ต้องวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงตอนบน และจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำเป็นที่น่าเชื่อถือ จำเป็นต้องมีการตรวจสอบชนิด และเปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ว่าตรงตามข้อมูลที่ระบุในฉลากหรือไม่ เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและเป็นไปตามการควบคุมใน พ.ร.บ. วัตถุอันตราย 2535 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์ cypermethrin มีวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน CIPAC Handbook 1C (CIPAC : Collaborative International Pesticide Analytical Council) (Henriet et al., 1985) ซึ่งต้องประยุกต์ให้ทันสมัยเหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงต้องทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลง cypermethrin เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ โดยมีพารามิเตอร์ที่นำมาทดสอบวิธีวิเคราะห์ได้แก่ การหาค่าช่วงการวัด range, การหาค่า linearity, การตรวจสอบความแม่นยำ (precision) จากค่า HORRAT ของ repeatability และ reproducibility, robustness และ ruggedness, การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ซึ่งประเมินจาก HORRAT ของ % recovery โดยเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานสากล

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- 1) เครื่อง Gas Chromatograph (GC) หัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector (FID)
- 2) capillary column ชนิด 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร หนา 0.25 ไมโครเมตร (30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film thickness)
- 3) เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
- 4) ultrasonic bath
- 5) ขวดวัดปริมาตร ขนาด 10, 25, 50, 250 และ 1000 มิลลิลิตร (ml)

6) ปิเปต ขนาด 2,3,4,5,8 และ 10 ml

7) vial ขนาด 2 ml

- สารเคมี

1) สารมาตรฐาน cypermethrin 97.0%

2) สาร cypermethrin ที่มีความเข้มข้นสูง (technical grade)

3) ผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช cypermethrin 10%

4) acetone AR grade

- วิธีการ

1. พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ cypermethrin

ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC ในการหาปริมาณที่แน่นอนของสารเข้มข้น ดังนี้

Column: capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 μ m film thickness)

Gas flow rate: Helium (carrier gas) 2 ml/min, Hydrogen 40 ml/min, Air 400 ml/min

Split injection: Split ratio 50:1, Split flow 100 ml/min, Injection volume: 1 μ l,

Temperature: Oven 240 $^{\circ}$ C, Inlet 260 $^{\circ}$ C, Detector 260 $^{\circ}$ C

Detector: Flame Ionization Detector

2. การหาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน cypermethrin 2 ชั่ง (C_1 , C_2) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 มิลลิกรัม (mg) ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติม acetone ประมาณ 15 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

2.2 การเตรียมสารละลายของสารความเข้มข้นสูง (technical grade)

ชั่งสาร technical grade cypermethrin 10 ชั่ง (T_1 - T_{10}) ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติม acetone ประมาณ 15 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

2.3 การตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง GC

เปิดเครื่อง GC ตามที่กำหนดโปรแกรมควบคุมสภาวะการใช้งานไว้ เมื่อ baseline คงที่ ทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่องประมาณ 4 ซ้ำ เมื่อค่าพื้นที่ใต้ peak หรือความสูงของ peak แตกต่างจากค่าเฉลี่ยของการฉีดติดต่อกัน 3 ครั้งไม่เกิน 1 % จึงถือว่าเครื่องพร้อมใช้งาน

2.4 การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสาร technical grade

เมื่อเครื่อง GC พร้อมใช้งานแล้ว ฉีดสารละลายมาตรฐาน และสารละลาย technical grade เพื่อตรวจสอบหาปริมาณที่แน่นอนตามลำดับ ดังนี้

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

สารละลายมาตรฐาน C₁, C₂ ต้องมีค่า % Relative Percent Different (%RPD) ไม่เกิน 3%

$$\%RPD = [(factor\ max - factor\ min) / factor\ mean] \times 100$$

2.5 การคำนวณหา Response factor

$$Response\ factor = (weigh \times purity) / peak\ area \quad \text{หรือ} \quad f = (S \times P) / H_s$$

S = น้ำหนักของ cypermethrin ในสารละลายมาตรฐาน (mg)

P = % ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน cypermethrin

H_s = พื้นที่ใต้ peak ของ cypermethrin ในสารละลายมาตรฐาน

2.6 การคำนวณหา % สารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสารละลาย Technical grade

$$cypermethrin\ content = (H_w \times f) / w$$

H_w = พื้นที่ใต้ peak ของ cypermethrin ในสารละลาย Technical grade

f = ค่าเฉลี่ย Response factor

w = น้ำหนักของ cypermethrin ในสารละลาย Technical grade (mg)

2.7 นำค่า % ของ technical grade ที่คำนวณได้ทั้ง 10 ค่า หาค่าเฉลี่ยจะได้ % ที่แน่นอนของ technical grade

3. การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

3.1 ทดสอบช่วงการวัด range

3.1.1 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณ cypermethrin ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน (0.25-2.50 mg/ml) ได้แก่ 12.5, 25, 50, 75, 100 และ 125 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml เติม acetone ประมาณ 25 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

3.1.2 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.1.3 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

3.1.4 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3.2 หาค่า linearity

3.2.1 เลือกค่าความเข้มข้นจาก range ที่เป็นเส้นตรง 3 ความเข้มข้น

3.2.2 ชั่งสาร technical grade ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5 และ 75 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml เติม acetone ประมาณ 25 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

3.2.3 ฉีดสารละลายที่เตรียมไว้เรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

3.2.4 Plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสาร technical grade (แกน x) กับ response (แกน y)

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

(AOAC Peer- Verified methods, 1993)

4. ตรวจสอบความแม่นยำ (precision)

4.1 repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในระยะเวลาเดียวกัน แสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง

4.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน cypermethrin 2 ซ้ำ ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 25 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml เติม acetone ประมาณ 15 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

4.1.2 ชั่งสารตัวอย่าง cypermethrin ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน ให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงการใช้งาน 3 ระดับ (0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำโดยใช้ volumetric flask ขนาด 25 ml เติม acetone ประมาณ 15 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน นำใส่ vial ขนาด 2 ml

4.1.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง (4.1.1 และ 4.1.2) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสารละลายตัวอย่าง

4.2 reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำ ในเครื่องมือห้องปฏิบัติการ ผู้ทดลองเดียวกัน ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

4.3 หาค่า HORRAT ของ repeatability และ reproducibility โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC (1993) ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการที่ 1

HORRAT = % RSD experimental / Predicted Horwitz RSD (สมการที่ 1)

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

5. ตรวจสอบ robustness/ruggedness

5.1 robustness ทดสอบจากการเปลี่ยนสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ โดยเปลี่ยน oven temperature จาก 240 เป็น 250 °C ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.2 ruggedness ทดสอบจากการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์โดยเปลี่ยน capillary column จาก HP-5 (30 m. x 0.32mm. ID, 0.25 µm film thickness) เป็น DB-5ms (30 m. x 0.25 mm. ID, 0.25 µm film thickness) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

5.3 หาค่า HORRAT ของ robustness และ ruggedness โดยเกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC (1993) ยอมรับที่ < 2 คำนวณโดยใช้สมการที่ 1

6. การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy)

6.1 เตรียมสารละลาย stock tech ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (4 mg/ml) โดยชั่งสาร technical grade ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน volumetric flask ขนาด 250 ml เติม acetone ประมาณ 15 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.2 เตรียมสารละลาย stock sample ให้มีความเข้มข้นที่แน่นอน (1 mg/ml) โดยชั่งตัวอย่าง cypermethrin ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1000 ml เติม acetone ประมาณ 500 ml เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

6.3 สร้างกราฟมาตรฐาน เตรียมสารละลาย 3 ระดับที่ความเข้มข้น 0.4, 1.0 และ 1.64 mg/ml ครอบคลุมช่วงการใช้งาน โดย ปิเปต stock tech (4 mg/ml) 2.5, 6.25 และ 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย acetone

6.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า origin โดย ปิเปต สารละลาย stock sample ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ cypermethrin

6.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า recovery

6.5.1 ปิเปต สารละลาย stock sample ปริมาตร 10 ml ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml จำนวน 30 ซ้ำ

6.5.2 ปิเปต สารละลาย stock tech (4 mg/ml) ปริมาณ 2, 4 และ 6 ml ลงใน sample origin 10 ml ที่เตรียมไว้ใน volumetric flask ขนาด 25 ml อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ cypermethrin

6.6 การประเมินค่า accuracy จาก % recovery โดยนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ที่เป็นค่า origin และ spike (6.4 และ 6.5) มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์การพิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (1993) การคำนวณตามสมการที่ 2

$$\% \text{ Recovery} = [(\text{Conc. spike sample} - \text{Conc. Original sample}) / \text{Conc. added}] \times 100 \quad (\text{สมการที่ 2})$$

ระยะเวลา ตุลาคม 2556 – กันยายน 2557

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

1. ผลการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ cypermethrin

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC –FID ในห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สวพ.3 คือ

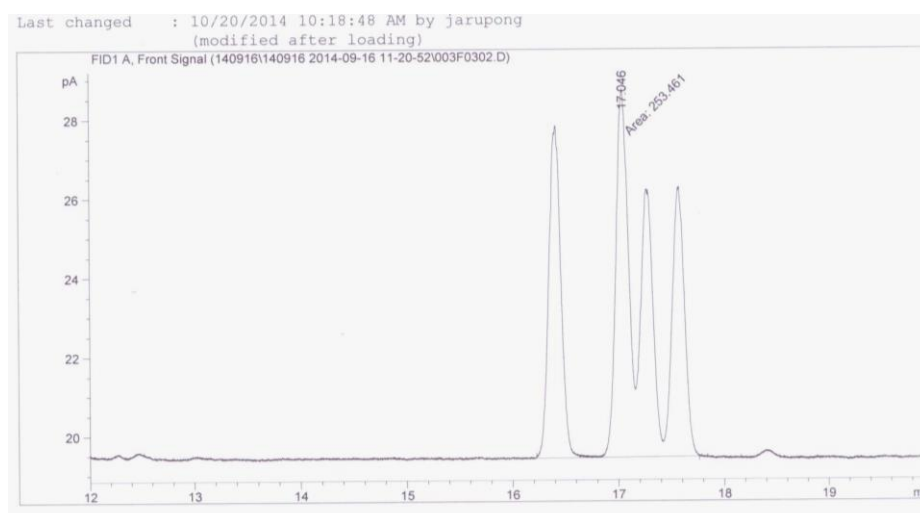
Column: capillary, HP-5 (30m x 0.32mm ID, 0.25 µm film thickness)

Gas flow rate: Helium (carrier gas) 2 ml/min, Hydrogen 40 ml/min, Air 400 ml/min

Split injection: Split ratio 50:1, Split flow 100 ml/min, Injection volume: 1 µl,

Temperature: Oven 240 °C, Inlet 270 °C, Detector 270 °C

ผลการทดลองพบว่า Chromatogram ของ cypermethrin ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี specification/ selectivity ที่ดี ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดง Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน cypermethrin

2. ผลการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin

2.1 ค่า %RPD ของ peak area สารละลายมาตรฐาน C1, C2 มีค่าไม่เกิน 3 % ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2 ค่า % สารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสารละลาย Technical grade มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 92.02 % ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การประเมินค่า % Relative Percent Different (%RPD) ของสารมาตรฐาน

std.	mg.	Area	Average	%RPD
C1	10.8	128.699	128.772	0.113
C2	10.9	128.845		
C1	10.8	131.219	131.6805	0.701
C2	10.9	132.142		
C1	10.8	132.197	132.1285	0.104
C2	10.9	132.060		
C1	10.8	131.432	132.143	1.076
C2	10.9	132.854		
C1	10.8	129.500	129.9475	0.689
C2	10.9	130.395		
C1	10.8	129.621	129.5355	0.132
C2	10.9	129.450		

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย % สารออกฤทธิ์ cypermethrin ในสารละลาย Technical grade

สารละลาย Technical grade	% Technical grade
T1	92.57
T2	92.45
T3	92.21
T4	91.91
T5	92.02
T6	92.02
T7	91.46
T8	91.98
T9	91.87
T10	91.74
ค่าเฉลี่ย	92.02
SD	0.325

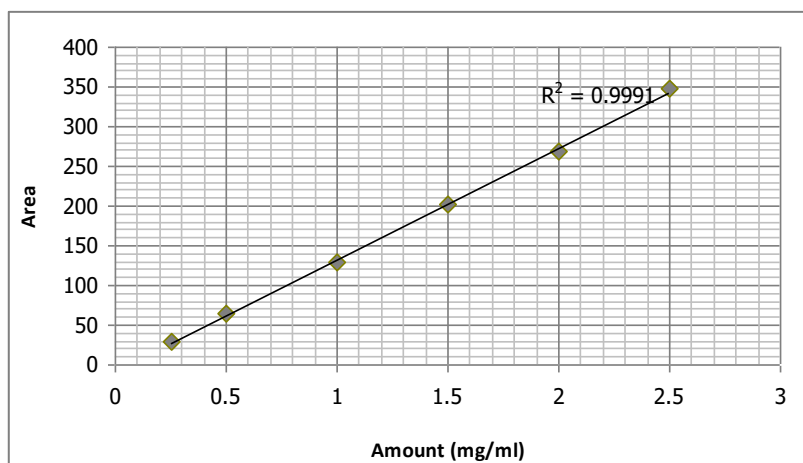
3. ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

3.1 การตรวจสอบช่วงของการวัด (range) มีค่า 0.25-2.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9991 ดังแสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 2

3.2 การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ความเข้มข้น 0.25 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ ค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9994 ดังแสดงในตารางที่ 4 และภาพที่ 3 เกณฑ์ยอมรับที่ $r > 0.995$

ตารางที่ 3 การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ช่วงความเข้มข้น 0.25-2.50 mg/ml

mg/ml	Area	Level
0.25	28.49415	1
0.5	65.58052	2
1.0	129.14324	3
1.5	201.11449	4
2.0	268.22508	5
2.5	347.37265	6

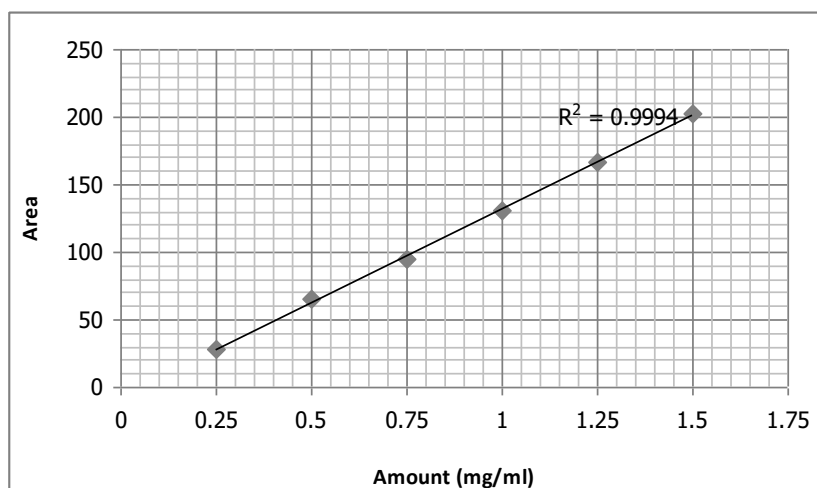


ภาพที่ 2 แสดง Calibration curves สารละลาย cypermethrin 6 level (0.25-2.50 mg/ml)

ตารางที่ 4 ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความเข้มข้น 0.25-1.50 mg/ml

mg/ml	Area	Level
0.25	28.61717	1
0.50	65.11357	2
0.75	95.21779	3
1.00	130.61305	4

1.25	166.86177	5
1.50	202.07297	6



ภาพที่ 3 แสดง Calibration curves สารละลาย cypermethrin 6 level (0.25-1.50 mg/ml)

4. ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (precision)

4.1 ผลการหา precision ที่ 3 ความเข้มข้น โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (repeatability) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์ที่ตรงพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทวนซ้ำ (repeatability)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรงพบ	น้ำหนัก (mg)	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรงพบ	น้ำหนัก (mg)
1	116.4	11.10	233.5	11.58	350.8	11.87
2	116.4	10.79	233.5	11.47	350.8	11.48
3	117.5	11.17	234.6	11.83	350.3	11.84
4	117.5	11.65	234.6	11.46	350.3	11.56
5	116.9	11.88	233.5	11.71	350.4	11.50
6	116.9	11.48	233.5	11.73	350.4	11.68
7	117.3	11.35	234.4	11.31	350.6	11.72
8	117.3	11.05	234.4	11.39	350.6	11.64
9	117.1	11.34	233.9	11.51	350.4	11.65
10	117.1	11.46	233.9	11.49	350.4	11.62
	Mean	11.33	Mean	11.55	Mean	11.66
	SD	0.315	SD	0.163	SD	0.129

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 11.51, \quad \text{SD} = 0.203 \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.760$$

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; HORRAT = $\frac{\text{Mean}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \times \% \text{ RSD experimental}$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.115 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.115)} = 1.828 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.760}{1.828} = 0.96$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ repeatability ได้ค่า HORRAT = 0.96

เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2

4.2 ผลการหา precision ที่ 3 ความเข้มข้น โดยตรวจสอบการทำซ้ำ (reproducibility)

ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้น จากการทำซ้ำ (reproducibility)

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)
1	116.6	11.03	233.30	10.87	350.4	11.69
2	116.6	11.12	233.30	11.18	350.4	11.64
3	117.5	11.34	233.30	11.50	350.8	11.45
4	117.5	11.05	233.30	11.74	350.8	11.32
5	117.7	11.54	233.30	11.10	350.4	11.45
6	117.7	11.54	233.30	11.25	350.4	11.27
7	117.6	11.30	233.70	11.30	350.5	11.41
8	117.6	11.33	233.70	11.15	350.5	11.31
9	117.9	11.32	233.10	11.03	350.6	11.45
10	117.9	11.29	233.10	11.03	350.6	11.63
	Mean	11.29	Mean	11.22	Mean	11.46
	SD	0.178	SD	0.252	SD	0.147

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองซ้ำด้วยวิธีการเดิม หลังจากการทดลองครั้งแรก 10 วัน ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 11.32, \quad \text{SD} = 0.192 \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{Mean}} = 1.699$$

Mean

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; HORRAT = $\frac{\text{Mean}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \times \% \text{ RSD experimental}$

Predicted Horwitz RSD

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.113 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.113)} = 1.833 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.699}{1.833} = 0.93$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ reproducibility ได้ค่า HORRAT = 0.93

เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2

5. ผลการตรวจสอบ robustness/ruggedness

5.1 ผลตรวจสอบ robustness จากการปรับสภาวะของเครื่อง โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ oven จาก 240 °c เป็น 250 °c ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้นจากการตรวจสอบ robustness

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ
1	117	11.19	234.1	11.13	351.8	11.09
2	117	11.11	234.1	11.29	351.8	11.29
3	116	11.24	233.6	11.42	350.8	11.56
4	116	11.18	233.6	11.21	350.8	11.63
5	116.9	11.2	234.1	10.93	350.7	11.12
6	116.9	11.26	234.1	10.94	350.7	11.2
7	116.6	11.48	233.9	11.45	350.5	11.45
8	116.6	11.27	233.9	11.37	350.5	11.37
9	116.6	11.13	233.8	11.01	351.5	11.05
10	116.6	11.2	233.8	11.09	351.5	11.21
	Mean	11.23	Mean	11.18	Mean	11.30
	SD	0.103	SD	0.194	SD	0.200

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ robustness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลอง โดยการเปลี่ยน อุณหภูมิ Oven จาก 240 องศาเซลเซียส เป็น 250 องศาเซลเซียส ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 11.236, \quad \text{SD} = 0.166, \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.475$$

การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; $\text{HORRAT} = \frac{\% \text{RSD experimental}}{\text{Mean}}$

Predicted Horwitz RSD

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \text{ เมื่อ } C \text{ (Concentration ration) ได้ค่า} = 0.112 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.112)} = 1.834 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.475}{1.834} = 0.80$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ robustness ได้ค่า HORRAT = 0.80

เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2

5.2 ผลการตรวจสอบ ruggedness จากการทดลองด้วยวิธีการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก capillary column HP-5 เป็น DB-5ms (I.D จาก 0.32 mm เป็น 0.25 mm) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ ที่ 3 ความเข้มข้นจากการตรวจสอบ ruggedness

n	ความเข้มข้น 0.5 mg/ml		ความเข้มข้น 1.0 mg/ml		ความเข้มข้น 1.5 mg/ml	
	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)	น้ำหนัก (mg)	%ที่ตรวจพบ	น้ำหนัก (mg)
1	117	11.7	234.1	11.69	351.8	11.59
2	117	11.8	234.1	11.74	351.8	11.9
3	116	11.47	233.6	11.97	350.8	11.62
4	116	11.57	233.6	11.78	350.8	11.72
5	116.9	11.78	234.1	11.84	350.7	11.59
6	116.9	11.74	234.1	11.77	350.7	11.59
7	116.6	11.93	233.9	11.60	350.5	11.53
8	116.6	11.76	233.9	11.64	350.5	11.70
9	116.6	11.86	233.8	11.79	351.5	11.62
10	116.6	11.93	233.8	11.76	351.5	11.82
	Mean	11.75	Mean	11.76	Mean	11.67
	SD	0.147	SD	0.104	SD	0.117

การตรวจสอบ precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness คือ การตรวจสอบความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่วิเคราะห์ซ้ำซึ่งแสดงผลในรูปของ % RSD จากข้อมูลทั้งหมดของการทดลองโดยการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก

ตารางที่ 9 ร้อยละการตรวจพบ (% Recovery) ของ cypermethrin

capillary column HP-5 เป็น DB-5ms ได้ค่าดังนี้

$$\text{Mean} = 11.727, \quad \text{SD} = 0.122, \quad \% \text{RSD (experimental)} = \frac{(\text{SD} \times 100)}{\text{Mean}} = 1.044$$

$$\text{การประเมินค่า precision โดยใช้ HORRAT; } \quad \text{HORRAT} = \frac{\% \text{ RSD experimental}}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\begin{aligned} \text{Predicted Horwitz RSD} &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad \text{เมื่อ } C \text{ (Concentration ratio) ได้ค่า} = 0.117 \\ &= 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log 0.117)} = 1.823 \end{aligned}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{1.044}{1.823} = 0.57$$

จากการทดลองหา precision ที่อยู่ในรูปของ ruggedness ได้ค่า HORRAT = 0.57

เกณฑ์การยอมรับค่า Precision ของ AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2

6. ผลการตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) การประเมินค่า accuracy จาก % recovery โดยการนำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ cypermethrin ที่เป็นค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ยและคำนวณค่า % recovery โดยค่าต้องอยู่ในเกณฑ์ AOAC อยู่ในช่วง 98-102% (สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 10%) ดังแสดงในตารางที่ 9

n	Al content (..mg/25ml)								
	conc.added (15.92 mg/25ml)			conc.added (23.88 mg/25ml)			conc.added (39.75 mg/25ml)		
	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added	Origin	Spike	Added
1	9.50	25.75	15.92	9.75	32.00	23.88	10.00	48.75	39.75
2	9.50	26.00	15.92	9.75	32.25	23.88	9.50	48.25	39.75
3	9.75	25.75	15.92	9.50	34.25	23.88	9.50	48.25	39.75
4	9.50	25.75	15.92	9.50	34.50	23.88	9.50	48.00	39.75
5	9.50	24.75	15.92	9.50	33.75	23.88	9.50	48.00	39.75
6	9.50	25.00	15.92	9.75	34.25	23.88	9.50	49.50	39.75
7	9.50	25.50	15.92	9.75	34.25	23.88	9.25	48.50	39.75
8	9.50	25.75	15.92	9.50	32.75	23.88	9.50	48.00	39.75
9	9.75	25.25	15.92	9.75	32.75	23.88	9.75	49.00	39.75
10	9.50	25.00	15.92	9.50	33.25	23.88	9.50	49.50	39.75
Mean	9.55	25.45	15.92	9.625	33.4	23.88	9.55	48.575	39.75
SD	0.11	0.42		0.13	0.92		0.20	0.59	
%RSD	1.10	1.66		1.37	2.76		2.06	1.21	
%recovery	99.87			99.56			98.18		

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ cypermethrin ได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง GC -FID ในห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สวพ.3 จากการทดลองพบว่า Chromatogram ของ cypermethrin ไม่มีสัญญาณ peak รบกวน แสดงว่ามี specification/ selectivity ที่ดี ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (range/linearity) ได้ ค่า Correlation coefficient (r) ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ $r > 0.995$ การตรวจสอบความแม่นยำ (precision) โดยตรวจสอบการทวนซ้ำ (repeatability) และการทำซ้ำ (reproducibility) ได้ค่า HORRAT ผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า Precision (AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) สำหรับการตรวจสอบความแม่นยำโดยวิธี robustness/ruggedness ผลตรวจสอบ robustness จากการปรับสภาวะของเครื่อง โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ oven จาก 240°C เป็น 250°C และการตรวจสอบ ruggedness ด้วยวิธีการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์จาก capillary column HP-5 เป็น DB-5ms (I.D จาก 0.32 mm เป็น 0.25 mm) ได้ค่า HORRAT ผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า Precision (AOAC ยอมรับ < 2 และ EU, Codex ยอมรับที่ < 2) การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยการประเมินค่า accuracy จาก % recovery ได้ค่า% recovery ผ่านเกณฑ์ของ AOAC คืออยู่ในช่วง 98-102% (สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับ 10%)

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำวิธีการตรวจสอบไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 เพื่อให้บริการวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษการเกษตรในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

- AOAC. 1993. Peer- Verified methods Program, Manual on policies and procedures, AOAC International Arlington, Virginia, USA.
- AOAC. 1998. Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. 2004. Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data, HorRat for SLV.doc, 2004-01-18, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- CIPAC. 1999. Guidelines on Method Validation to be performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations. Collaborative International Pesticides Analytical Council, Document No. 3807, Black Bear Press, Cambridge, UK.
- Henriet, J., Martijn, A. and Povlsen, H.H. 1985, CIPAC Handbook, Vol.1C, Analysis of Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical Council, Limited.
- Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to validate Pesticide Residue Method Performance. In: Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus(eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

13. ภาคผนวก

Table 1: เกณฑ์การยอมรับ recovery

% Active/impurity content A	acceptable mean recovery
≥10	98 –102%
≥1	90 –110%
0.1 – 1	80 – 120%
< 0.1	75 – 125%

AOAC Peer- Verified methods Program (1993)

Table 2: Expected precision (repeatability) as a function of analyte concentration

Analyte, %	Analyte ratio	Unit	RSD, %
100	1	100%	1.3
10	10 ⁻¹	10%	1.9
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.01	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.001	10 ⁻⁴	100 ppm (mg/kg)	5.3

AOAC Peer-Verified Methods Program (1998)

Table 3: Predicted relative standard deviation of reproducibility (PRSD_R)

Concentration (C)	Mass fraction (C)	PRSD _R , %
100%	1.0	2
1%	0.01	4
0.01%	0.0001	8
1 ppm	0.000001	16

Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data,

HorRat for SLV.doc, 2004-01-18

Reproducibility relative standard deviation calculated from the Horwitz formula