

# การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ฟลูซิลลาโซล (flusilazole) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

## Method Validation for Determination the Active Ingredients Flusilazole in Pesticide Products

ดวงรัตน์ วิลาสินี  
Duangrat Wilasinee

พินิตนันต์ สรวายเอี่ยม  
Pinitnun Sruay-iam

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### ABSTRACT

Method validation study of flusilazole, the active ingredients in pesticide products for emulsifiable concentrate formulations, was developed by gas chromatography with flame ionization detector (FID). This method used the capillary column coated with 5% phenyl methyl siloxane had a diameter of 0.32 mm and a length of 30 m with 0.25  $\mu$ m film thickness and He gas was used for carrier gas. The results were found that the working concentration range and linearity range of flusilazole were 0.3 – 1.8 mg/ml with the correlation coefficient ( $r$ ) > 0.990 which had accepted with limit of the correlation coefficient ( $r$ )  $\geq$  0.990. The precision of HORRAT values for repeatability were in the range of 0.38 – 0.69. The HORRAT values tested with robustness and ruggedness of flusilazole was in the range of 0.41 – 1.25 which were followed by the AOAC due to their 0.3-1.3. The accuracy of this method was assessed by recovery studied. The percent recoveries of flusilazole was in the range of 99.88 – 100.92 considered an acceptance by the AOAC (98-102) for analytical concentrations more than 10%. This specific method did not have interference from other substances. The measured uncertainty of flusilazole was  $40.32 \pm 0.45$  %W/V EC at 95% confidence level. 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.

**Keywords :** flusilazole, method validation, pesticide

### บทคัดย่อ

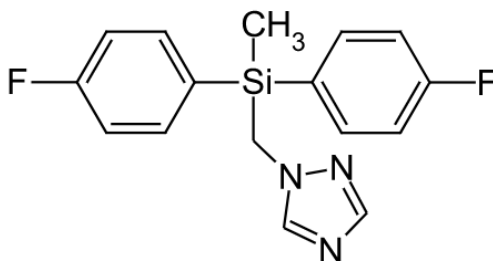
จากการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ ฟลูซิลลาโซล (flusilazole) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas-Chromatography, GC) ชนิด Flame Ionization detector (FID) ใช้คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5%Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยมีก๊าซ He เป็นตัวพา จากผลการทดสอบพบว่าช่วงของการวัด (Working range) และค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.3 – 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r$ ) มากกว่า 0.990 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $r$ )  $\geq$  0.990 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) แบบ Repeatability ค่า HORRAT ของ flusilazole อยู่ในช่วง 0.38 – 0.69 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.41 – 1.25 ซึ่งไม่เกิน 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 99.88 – 100.92 ซึ่งอยู่ในช่วง 98-102

ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และประมาณค่าความไม่แน่นอนของ flusilazole เท่ากับ  $40.32 \pm 0.45$  %W/V EC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หัวตุ่มมีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

**คำหลัก :** ฟลูซิลลาโซล การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

## คำนำ

ฟลูซิลลาโซล (flusilazole) มีชื่อ IUPAC คือ bis(4-fluorophenyl)(methyl)(1H-1,2,4-triazole-1-ylmethyl)silane; 1-[[bis(4-fluorophenyl)(methyl)silyl]methyl]-1H-1,2,4-triazole สูตรโมเลกุลคือ  $C_{16}H_{15}F_2N_3Si$  น้ำหนักโมเลกุล  $315.4 \text{ g mol}^{-1}$  เป็นยาฆ่าเชื้อรา ประโยชน์ใช้ในการควบคุมการติดเชื้อราในพืชผักและผลไม้หลากหลายชนิด ป้องกันและรักษาโรคราแป้ง โรคกุ้งแห้ง โรคแอนแทรคโนส โรคผลแตก โรคใบจุด ใบจุดดำ โรคราเขม่าดำ โรคใบจุดสีม่วง โรคกาบใบแห้ง โรคเมล็ดด่าง ใช้ได้กับพืชที่ปลูก เช่น หอม กระเทียม หองหัวใหญ่ ข้าว พริก องุ่น ถั่วฝักยาว ผักกาดขาวปลี ลำไยมะม่วง พืชผักต่างๆ และพืชตระกูลถั่ว กุหลาบ เบญจมาศ ไม้ดอกและไม้ประดับทั่วไป (BCPC, 2006)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้าง ฟลูซิลลาโซล (flusilazole)

ในการพัฒนาวิธีการทดสอบ Flusilazole จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารดังกล่าว โดยศึกษาคุณลักษณะต่างๆ ได้แก่ ช่วงของการวัด (Working range) ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ความแม่นยำ (Precision) ความถูกต้อง (Accuracy) และความจำเพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) (Eurachem, 2014; SANCO/3030/99 rev. 4, 2000) รวมถึงการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของวิธีการทดสอบ (Eurachem, 2012) เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าวิธีวิเคราะห์ที่กำหนดขึ้นมานั้นให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph (GC) 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 (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
5. ขวดวัดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10 25 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด type A ขนาด 1 2 3 4 5 และ 10 มิลลิลิตร Auto pipette ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. บีกเกอร์ ขนาด 50 100 250 มิลลิลิตร

## สารเคมี

1. สารมาตรฐาน ฟลูซิลาโซล (flusilazole) 97.0 %
2. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ฟลูซิลาโซล (flusilazole) 40 %W/V EC
3. Acetone ชนิด AR grade

## วิธีการ

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

#### 1.1 ภาวะสำหรับวิเคราะห์สารฟลูซิลาโซล (flusilazole)

คอลัมน์ชนิด	:	Capillary คอลัมน์ภายในบรรจุด้วย 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ injector	:	260 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ oven	:	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิ detector	:	260 องศาเซลเซียส
Split ratio	:	50 : 1
Injection volume	:	1.0 ไมโครลิตร
ก๊าซตัวพา	:	He อัตราการไหล 2 มิลลิิตรต่อนาที
ก๊าซจุดเปลวไฟ	:	H <sub>2</sub> อัตราการไหล 40 มิลลิิตรต่อนาที
	:	Air อัตราการไหล 450 มิลลิิตรต่อนาที
Make up gas	:	N <sub>2</sub> อัตราการไหล 40 มิลลิิตรต่อนาที

ทดสอบความพร้อมของเครื่อง GC ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดติดต่อกัน %RSD มีความแตกต่างกันไม่เกิน 2%

### 2. ตรวจสอบช่วงของการวัด ( Working range )

เตรียมสารละลายมาตรฐาน flusilazole 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.3 0.8 1.0 1.2 1.5 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตรแล้ว เติม acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม acetone จนถึงขีดปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1 แล้วนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน flusilazole (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.990$  (CIPAC No.3807, 2003)

### 3. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง ( Linearity )

เตรียมสารละลายมาตรฐาน flusilazole 6 ความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ได้แก่ 0.3 0.8 1.0 1.2 1.5 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric Flask ขนาด 10 มิลลิลิตรแล้ว เติม acetone ประมาณครึ่งขวด เขย่าใน Ultrasonic bath 5-10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตรเพื่อฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas-Chromatograph (GC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน flusilazole (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง โดยคำนวณค่า correlation coefficient (r)  $\geq 0.990$  (CIPAC No.3807, 2003)

#### 4. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

##### 4.1 ตรวจสอบความแม่นยำ Repeatability

ตรวจสอบ Precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน

ซึ่งผลิตภัณฑ์ flusilazole 40 %W/V EC ที่เขย่าให้เข้ากันแล้ว 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.5 1.0 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ใช้งานจริง อย่างละ 10 ซ้ำ ใส่ขวดปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม acetone ปริมาณครึ่งขวด เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 -10 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสถานะตั้งข้อ 1 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ flusilazole เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานแบบ 2 ซ้ำ (duplicate) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้งานจริง คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

คำนวณ % RSD ตามสูตร 
$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (ทิพวรรณ, 2549)

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

##### 4.2 ตรวจสอบความแม่นยำ Robustness/Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่าง flusilazole เช่นเดียวกับข้อ 4.1 โดยทำการเปลี่ยนสถานะในการวิเคราะห์ ดังนี้

4.2.1 ทำการเปลี่ยน flow rate จาก 2.0 mL/min เป็น 1.8 mL/min

4.2.2 ทำการเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์จาก 250 °C เป็น 240 °C

4.2.3 ทำการเปลี่ยน flow rate และอุณหภูมิคอลัมน์

4.2.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ และการคำนวณค่า HORRAT ประเมินค่า HORRAT โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3-1.3 (AOAC, 2016)

#### 5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

##### 5.1 เตรียม Stock standard

เตรียมสารละลายมาตรฐาน flusilazole 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 500 มิลลิลิตร เติม acetone ปริมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

##### 5.2 เตรียม Stock sample

เตรียมสารละลายตัวอย่าง flusilazole 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน volumetric flask 1,000 มิลลิลิตร เติม acetone ปริมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร

### 5.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานให้ครอบคลุมช่วงใช้งาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานแบบ 2 ซ้ำ (duplicate) ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้งานจริง ลงใน volumetric flask 10 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม acetone จนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง GC

### 5.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 5.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 5.3 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

### 5.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย Stock sample ข้อ 5.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย Stock standard ปริมาตร 4.0, 5.0 และ 6.0 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งสารละลายใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 5.3

### 5.6 ประเมินค่า Accuracy จากค่า % recovery ดังนี้

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

$C_{\text{spike}}$  = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Spike

$C_{\text{origin}}$  = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Origin

$C_{\text{add}}$  = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย Spike

## 6. การหา Specificity / selectivity

ทดลองโดยฉีดสารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างของ flusilazole เข้าเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะดังข้อ 1 เพื่อดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอม มารบกวนสารออกฤทธิ์ flusilazole หรือไม่

## 7. การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช flusilazole

ประเมินที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ทิพวรรณ, 2549)

**ระยะเวลา** ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

### สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การศึกษาช่วงของการวัด (Working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ตรวจสอบช่วงของการวัด (Working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าช่วงของการวัดและช่วงความเป็นเส้นตรง ของ flusilazole อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.3 – 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient ( $r$ ) = 0.9991 และ 0.9992 ตามลำดับ ซึ่งเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq$  0.990

### 2. การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) สำหรับ Repeatability ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า flusilazole ได้ค่าเฉลี่ย (mean) 40.56 40.32 40.59 %W/W ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.938 0.573 0.862 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.62 0.38 0.57 ตามลำดับ และทดสอบ Repeatability ชุดที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 40.29 40.36 40.72 %W/W ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.606 0.642 1.04 ตามลำดับ และประเมินด้วย HORRAT ได้ค่าเป็น 0.40 0.42 0.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดย HORRAT ต้องมีค่า 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC วิธีวิเคราะห์ flusilazole ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเที่ยงแบบ repeatability ของวิธีวิเคราะห์ flusilazole 40 %W/V EC ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

Repeatability (n=10)	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	1.5 mg/ml
mean (%W/W)	40.56	40.32	40.59
%RSD	0.938	0.573	0.862
HORRAT	0.62	0.38	0.57
Repeatability ชุดที่ 2 (n=10)			
mean (%W/W)	40.29	40.36	40.72
%RSD	0.606	0.642	1.04
HORRAT	0.40	0.42	0.69

การตรวจสอบความคงทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) ของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ flusilazole โดยการเปลี่ยนแปลงสภาวะเครื่อง 3 ปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 ทดสอบโดยการปรับภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยน flow rate จาก 2.0 ml/min เป็น 1.8 ml/min ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 39.88 39.65 40.72 %W/W ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.619 0.355 1.858 ตามลำดับ และ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.41 0.59 และ 1.23 ปัจจัยที่ 2 ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์จากอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็น อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 39.58 39.82 39.71 %W/W ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.801 1.276 1.899 ตามลำดับ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.53 0.84 และ 1.25 และปัจจัยที่ 3 ทดสอบโดยการปรับภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยน flow rate จาก 2.0 ml/min เป็น 1.8 ml/min และปรับสภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์จากอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็น อุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 39.95 39.82 40.05 %W/W ตามลำดับ ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD) 0.424 1.241 0.855 ตามลำดับ ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.70 0.82 และ 0.56 (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณา

ตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.3 – 1.3 วิธีวิเคราะห์ flusilazole ให้ผลการทดสอบ Robust/Ruggedness อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

**ตารางที่ 2** การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ในผลิตภัณฑ์ สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช flusilazole 40 %WV EC

<b>ปัจจัยที่ 1</b> ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยน flow rate ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น (n=10)			
	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml	1.5 mg/ml
mean (%W/W)	39.88	39.65	40.72
%RSD	0.619	0.355	1.858
HORRAT	0.41	0.59	1.23
<b>ปัจจัยที่ 2</b> ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น (n=10)			
mean (%W/W)	39.58	39.82	39.71
%RSD	0.801	1.276	1.899
HORRAT	0.53	0.84	1.25
<b>ปัจจัยที่ 3</b> ทดสอบโดยการปรับสภาวะของเครื่อง GC-FID โดยเปลี่ยน flow rate และ อุณหภูมิ คอลัมน์ ทำการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น (n=10)			
mean (%W/W)	39.95	39.82	40.05
%RSD	0.424	1.241	0.855
HORRAT	0.70	0.82	0.56

### 3. ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า %Recovery พบว่า ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างมี 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซ้ำ ค่า %Recovery ของ flusilazole เท่ากับ 100.92 100.92 และ 99.88 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์ได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นสารละลาย Origin

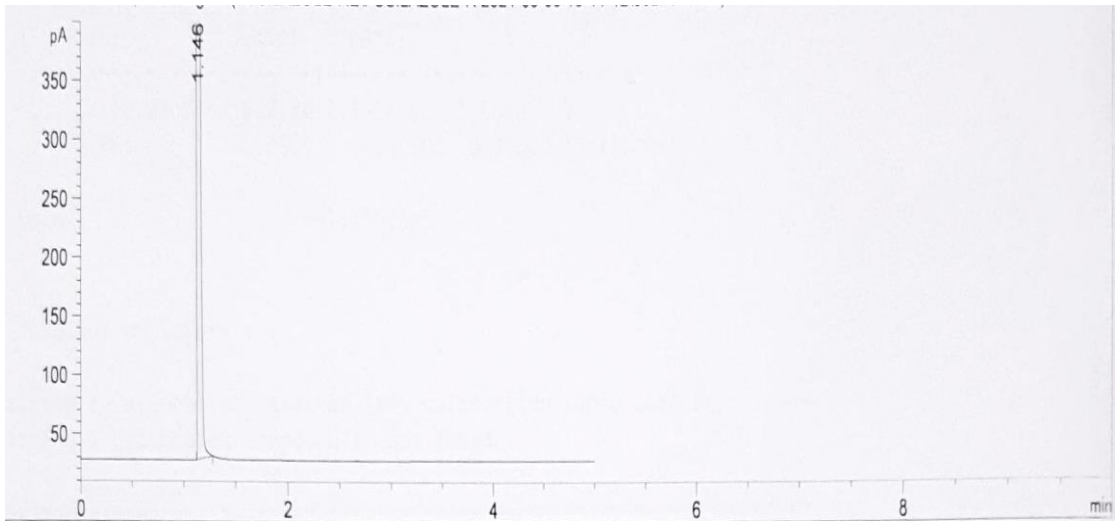
ลำดับ	flusilazole a.i. content (mg/ml)		
	Origin for Conc.	Origin for Conc.	Origin for Conc.
	0.8 mg/ml	1.0 mg/ml	1.2 mg/ml
1	0.2036	0.2211	0.2054
2	0.2039	0.2200	0.2044
3	0.2022	0.2217	0.2009
4	0.2020	0.2195	0.2010
5	0.1998	0.2156	0.1993
6	0.2027	0.2157	0.1979
7	0.2008	0.2146	0.2042
8	0.2034	0.2139	0.1997
9	0.2034	0.2228	0.2039
10	0.2043	0.2209	0.1998
Mean	0.2026	0.2186	0.2016
SD	0.0014	0.0033	0.0026
%RSD	0.7070	1.5024	1.2909

ตารางที่ 4 ตรวจสอบ % Recovery ของ flusilazole

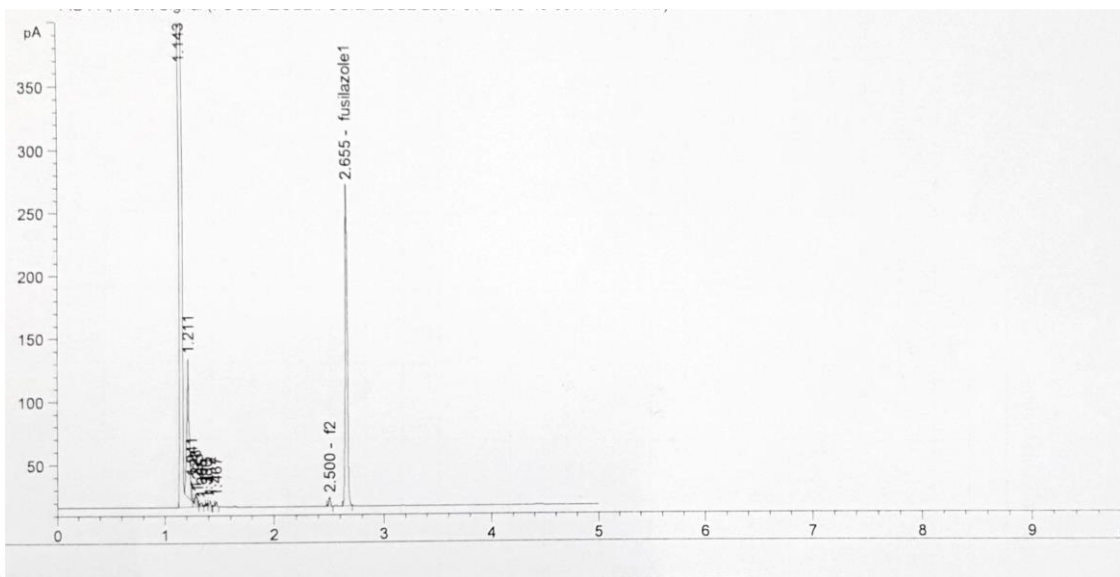
ลำดับ	flusilazole a.i. content (mg/ml)					
	Conc. 0.8		Conc. 1.0		Conc. 1.2	
	Origin=0.2026	Add=1.000	Origin=0.2186	Add=1.200	Origin=0.2016	Add=1.400
	result	%Recovery	result	%Recovery	result	%Recovery
1	1.0124	101.23	1.2285	100.99	1.4145	101.08
2	1.0114	101.10	1.2351	101.65	1.4169	101.28
3	1.0157	101.64	1.2278	100.92	1.4029	100.11
4	0.9953	99.09	1.2157	99.71	1.4100	100.70
5	1.0122	101.20	1.2252	100.66	1.3977	99.68
6	1.0124	101.23	1.2179	99.93	1.3891	98.96
7	1.0082	100.70	1.2250	100.64	1.3784	98.07
8	1.0111	101.06	1.2371	101.85	1.4038	100.189
9	1.0142	101.45	1.2278	100.92	1.3945	99.41
10	1.0064	100.48	1.2376	101.90	1.3935	99.33
Mean	1.0099	100.92	1.2278	100.92	1.4001	99.88
SD	0.0058	0.7240	0.0074	0.7419	0.0119	0.9945
%RSD	0.5735	0.7174	0.6042	0.7351	0.8523	0.9957



#### 4. ผลการศึกษา Specificity / selectivity



ภาพที่ 2 Chromatogram ของ Solvent Blank



ภาพที่ 3 Chromatogram ของฟลูซิลาโซล (flusilazole)

จากการฉีด solvent blank และสารละลายตัวอย่าง flusilazole เข้าเครื่อง GC-FID พบว่า โครมาโทแกรมของ solvent blank และสารตัวอย่าง flusilazole ไม่มี peak อื่นใดมารบกวน peak ของ flusilazole ตามภาพที่ 2 และภาพที่ 3 ตามลำดับ แสดงว่าวิธีนี้มี Specificity และ selectivity ที่ดี

#### 5. การประมาณค่าความไม่แน่นอน

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดวัชพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช flusilazole พบว่าประมาณค่าความไม่แน่นอนเป็น  $40.32 \pm 0.45$  %W/W EC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Mill, J.N. and Mill, J.C., 2005; Eurachem, 2012)

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดจากแหล่งข้อมูลทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความไม่แน่นอนรวม ( $u_c$ )

แหล่งข้อมูล	Unit	Value (x)	$u_x$	$Ru (u_x/x)$	$Ru^2$
$u_{m,balance\ sample}$	g	0.010	$7.7782 \times 10^{-6}$	$7.7782 \times 10^{-4}$	$6.0500 \times 10^{-7}$
$u_{s,balance\ std.}$	g	0.050	$7.7782 \times 10^{-6}$	$1.5556 \times 10^{-4}$	$2.4200 \times 10^{-8}$
$u_{vol.std}$	ml	10	$2.9073 \times 10^{-2}$	$2.9073 \times 10^{-3}$	$8.4524 \times 10^{-6}$
$u_{vol.samp}$	ml	25	$7.2264 \times 10^{-2}$	$2.8905 \times 10^{-3}$	$8.3552 \times 10^{-6}$
$u_{std}$	g	0.970	$1.5000 \times 10^{-3}$	$1.5464 \times 10^{-3}$	$2.3913 \times 10^{-6}$
$u_{Repeat}$	g	40.32	$1.3337 \times 10^{-1}$	$3.3077 \times 10^{-3}$	$1.0941 \times 10^{-5}$
$u_{density}$	-	1.000	$5.8000 \times 10^{-5}$	$5.7942 \times 10^{-5}$	$3.3573 \times 10^{-9}$

$$u_c = 40.32 \sqrt{(6.0500 \times 10^{-7}) + (2.4200 \times 10^{-8}) + (8.4524 \times 10^{-6}) + (8.3552 \times 10^{-6}) + (2.3913 \times 10^{-6}) + (1.0941 \times 10^{-5}) + (3.3573 \times 10^{-9})}$$

$$u_c = 0.2237\%$$

#### 6.5 การหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (U)

$$\begin{aligned} U &= 2 \times u_c \\ &= 2 \times 0.2237\% \\ &= 0.45\% \end{aligned}$$

### สรุปผลการทดลอง

ผลของการศึกษาการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ตัวต่อนตรายทางการเกษตรฟลูซิลาโซล (flusilazole) โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Flame Ionization Detector ที่ทำการกำหนดสภาวะต่างๆ เพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาค่าคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ ช่วงของการวัด (Working range) และค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.3 – 1.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า r เท่ากับ 0.9991 และ 0.9992 ตามลำดับ ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่า  $r \geq 0.990$  ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) แบบ Repeatability ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 flusilazole ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.38 – 0.69 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.41 – 1.25 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery เฉลี่ยของ flusilazole แต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 99.88 – 100.92 ซึ่งอยู่ในช่วง 98 - 102 ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และวิธีการทดสอบ flusilazole นี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น การประมาณค่าความไม่แน่นอนเท่ากับ  $40.32 \pm 0.45\%$  W/V EC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ตัวต่อนตรายทางการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไปขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ได้

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อการควบคุมคุณภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535
2. สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่เผยแพร่แก่ห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชนได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ
3. ใช้ยื่นขอขยายขอบข่ายการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO / IEC 17025

## เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว*. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

AOAC. 2016, Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC INTERNATIONAL 2016. Available Source: <http://www.eoma.aoc.org>. April 1, 2017.

BCPC: The e-Pesticide Manual. [CD-ROM]. (Thirteenth Edition) Version 3.0 BCPC. (British Crop Protection Council), 2006.

Eurachem/ CITAC Guide CG 4. 2012. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3<sup>rd</sup> ed. Available Source: <https://www.eurachem.org>. April 1, 2017.

Eurachem Guide. 2014. The Fitness for Purpose of analytical Method A Laboratory Guide to method Validation and Related Topics. 2<sup>nd</sup> ed. Eurachem. Available Source: <https://www.eurachem.org>. April 1, 2017.

Guidelines on method validation to be performed in support of analytical method for agrochemical formulations. 2003. This document is a transcript - with errata corrected of the printed. CIPAC No. 3807. Available Source: <https://www.cipac.org/images/pdf/validat.pdf>. April 1, 2017.

Mill, J.N. and Mill, J.C. Statistics and chemometrics for analytical chemical. 5<sup>th</sup> Ed. Pearson Education Limited. England, 2005.

SANCO/3030/99 rev. 4 (2000). European Commission Directorate General for Health and Consumer Affairs. Technical Material and Preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414. Working document, 11th July 2000. Available Source: <https://www.ec.europa.eu>. July 9, 2015