

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนามาตรฐานระบบตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรม : 1. พัฒนาการตรวจวิเคราะห์พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อย : 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุพืชมทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง** : 1.5.1 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุพืชมทางการเกษตร Alachlor
ชื่อการทดลอง : Method Validation of Alachlor in Pesticide Formulations
4. **หัวหน้าการทดลอง** : จิราพรรณ ทองหยอด สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน : ฉลองรัตน์ หมื่นขวา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์อะลาคลอร์ (Alachlor) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) ที่นิยมใช้แพร่หลายในปัจจุบัน ดังนั้น กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุพืชมทางการเกษตร จึงทำการวิจัยวิธีตรวจสอบสารออกฤทธิ์ Alachlor ให้มีความถูกต้องและแม่นยำ เพื่อให้เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ในระดับสากล ด้วยเทคนิค Gas Chromatography (GLC) ตัวตรวจจับ Flame ionization detector (FID) คอลัมน์ Capillary ชนิด HP-5 (30 m x 0.32 mm (id.) 0.25 µm film thickness) ใช้ ฮีเลียม (He) เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 230 °C เวลา 3.5 นาที อุณหภูมิการฉีด 250 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 250 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µl ทำการทดสอบในหัวข้อต่างๆ ได้แก่ ช่วงของการวัด (Range) ช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และการตรวจความเที่ยง (Precision)

จากการทดลองพบว่า ค่า Rang ได้ช่วงความเข้มข้น 0.10 - 4.00 mg/ml ค่าLinearity ได้ช่วงความเข้มข้น 0.25 - 2.00 mg/ml มีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 1.00000 โดยเกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า $r \geq 0.995$ ค่า Accuracy หาได้จาก % Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 mg/ml มีค่าเท่ากับ 101.73, 99.14 และ 98.69 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC % Recovery เท่ากับ 98 - 102 การ

วิเคราะห์ซ้ำ (Precision) ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.184, 0.182 และ 0.204 และตรวจสอบความแข็งของวิธี โดยใช้ Robustness/ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.455, 0.204, 0.196 และ 0.381, 0.170, 0.314 ตามลำดับ เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT ≤ 2 จากการประเมินผลการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ทั้งสิ้น ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง แม่นยำ และยอมรับได้ในระดับสากล

6. คำนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) เป็นวิธีการปฏิบัติอย่างหนึ่งของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ ที่ทำให้ผลการทดสอบเกิดความน่าเชื่อถือและยอมรับความสารถของห้องปฏิบัติการนั้นๆ ดังนั้น การวิจัยวิธีตรวจสอบสารออกฤทธิ์ Alachlor ให้มีความถูกต้องและแม่นยำ จะทำให้ผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการได้รับการยอมรับและน่าเชื่อถือ

Alachlor เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Chloroacetamide มีชื่อทางเคมี (IUPAC) คือ 2-Chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl)acetamide มีวิธีวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน CIPAC Handbook Vol.D โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID ใช้ column glass packed (10% SP-250) ขนาด 1.8 m x 2 mm i.d. อุณหภูมิคอลัมน์ 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิการฉีดสาร 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิตัวตรวจจับ 260 องศาเซลเซียส ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาอัตราการไหล 35 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาในการวิเคราะห์ 15 นาที ใช้ di-(2-ethylhexyl)phthalate เป็นสารมาตรฐานภายใน(internal standard) ซึ่งเดิมใช้ column glass packed (10% SP-250) ในการตรวจวิเคราะห์ปัจจุบันไม่มีจำหน่ายแล้ว

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สูตร EC โดยเทคนิค GC-FID ใช้ Capillary column แทน column packing ที่สามารถแยกสารให้ผลการวิเคราะห์น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว เป็นที่ยอมรับได้ในระดับนานาชาติ โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ซึ่งเป็นข้อกำหนด ข้อที่ 5.4.2 ตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (ISO/IEC:17025)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Gas Chromatograph มีตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector
2. คอลัมน์ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5 % phenyl methyl siloxane (HP-5) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath

5. ขวดปริมาตร ขนาด 25, 50, 500 ,1000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปตชนิด ขนาด 2, 3, 4, 5 และ 10 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
7. บีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน alachlor ความบริสุทธิ์ 99.5 %
2. สารเข้มข้นสูง (Technical material) ของ alachlor สูตร 90 % min. Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของ alachlor สูตร EC (48%w/v)
4. Acetone AR grade

วิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ alachlor

เพื่อใช้สารเข้มข้นสูง (Technical material) แทนสารมาตรฐานที่มีราคาแพง มีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอในกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ซึ่งกระบวนการตรวจสอบต้องเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง ใช้สารในปริมาณมากและเพื่อทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอนของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ โดยวิธีวิเคราะห์ ดำเนินการดังนี้

1.1 การปรับตั้งสถานะเครื่อง GC-FID

Capillary column	: HP-5 (30 m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 μm)
Oven temperature	: 230 °C
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	: 3.5 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน alachlor

ชั่งสารมาตรฐาน alachlor ที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 25 มิลลิกรัม จำนวน 2 ซ้ำ (C_A, C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3 การเตรียมสารละลายสาร alachlor

1.3.1 ซั่งสารเข้มข้นalachlor ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 25 มิลลิกรัม จำนวน 10 ซ้ำ (TC₁-TC₁₀) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

1.3.2 ซั่งสารผลิตภัณฑ์alachlor ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 100 มิลลิกรัม จำนวน 10 ซ้ำ (tC₁-tC₁₀) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 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_A และ C_B สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1 % จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้นalachlor ตามลำดับ ดังนี้

สารเข้มข้นสูง C_A C_A, TC₁TC₁ C_A C_A, TC₁TC₁, C_A,.....

สารผลิตภัณฑ์ C_A C_A, tC₁tC₁ C_A C_A, tC₁tC₁, C_A,.....

1.5 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์alachlor

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

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

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานalachlor หน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานalachlor

จากนั้นคำนวณค่า % RPD (relative percent difference) ของ response factor ของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ซ้ำ ซึ่งต้องได้ค่า % RPD แตกต่างกันไม่เกิน 3 % จากสูตร

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

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

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

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้นalachlor หน่วยเป็นมิลลิกรัม

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

H_W = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้นalachlor

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์alachlor สูตร EC

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Range

2.1.1.1 เตรียมสารเข้มข้น alachlor ที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว ให้มีสารออกฤทธิ์ alachlor ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 9 ความเข้มข้น คือ 0.10 0.25 0.50 0.80 1.00 1.20 1.60 2.00 และ 4.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone

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

2.1.1.3 วาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย alachlor (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง

2.1.2 ค่า Linearity

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 7 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือ ความเข้มข้น 0.25 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย acetone โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก เข้าเครื่อง GC-FID

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

2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูง alachlor ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.2.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น alachlor ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารเข้มข้น alachlor ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 2,184.3 มิลลิกรัม ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร ก่อด้วย acetone จนหลายๆครั้ง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน

2.2.1.2 เตรียมสารละลายจากข้อ 2.2.1.1 ความเข้มข้น 0.25 0.50 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID จะได้ calibration curve ของ standards

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ซึ่งผลิตภัณฑ์ alachlor สูตร EC ปริมาณ 5,216.7 มิลลิกรัม ใส่ลงในปิ๊กเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง 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 ขวด ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID (ได้ค่า O)

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ข้ว จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้น alachlor จากข้อ 2.2.1.1 ปริมาตร 5, 15 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ข้ว ฉีดเข้าเครื่อง GLC-FID (ได้ค่า F)

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก % Recovery

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

เมื่อ F คือ ปริมาณสาร alachlor ในสารละลาย fortified sample, มก./50มล.

O คือ ปริมาณสาร alachlor ในสารละลาย original sample, มก./50มล.

C คือ ปริมาณ added sample, มก.

ค่าความแม่นยำ ต้องได้ % Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102% ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้น alachlor ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve

2.3.1.1 เตรียม stock ของสารเข้มข้น alachlor ที่ความเข้มข้น 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารเข้มข้น alachlor ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 2,184.3 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.1.2 เตรียมสารละลายจากข้อ 2.3.1.1 ความเข้มข้น 0.25 0.50 และ 1.50 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย acetone นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง GC-FID จะได้ calibration curve ของ standards

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ alachlor สูตร EC

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยซึ่ง ผลิตภัณฑ์ alachlor EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม จำนวนความเข้มข้นละ 10 ข้ว ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1.2

2.3.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

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

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

2.4 การตรวจสอบความแข็งแกร่ง Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่งโดยใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน และภายใต้สภาวะเงื่อนไขอย่างเดียวกัน

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นalachlor ที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์alachlor สูตร EC

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์alachlor สูตร EC ที่เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณ 50, 100 และ 150 มิลลิกรัม จำนวนความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วย acetone เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย acetone

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์alachlor

โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง GC-FID เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

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

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลา เดือน ตุลาคม 2554 ถึงเดือน กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชโดยตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารความเข้มข้นสูงสุด 90 % min Tech ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 90.35 % w/w และสารผลิตภัณฑ์สูตร 48%w/v EC เทียบกับสารละลายมาตรฐาน ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละ และ 41.49 %w/w

เมื่อพิจารณาการตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) ของวิธีวิเคราะห์ พบว่า มีช่วงความเป็นเส้นตรงครอบคลุมความเข้มข้น 0.10 - 4.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตรวจสอบค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 2.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ครอบคลุมช่วงการใช้งานอีกครั้ง พบว่า มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 1.00000 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$

การตรวจสอบค่าความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor สูตร EC ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ คำนวณค่า % Recovery เท่ากับ 101.73, 99.14 และ 98.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง % Recovery เท่ากับ 98-102 พิจารณาตามเกณฑ์ที่มีปริมาณสารในตัวอย่าง ค่าความถูกต้องทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถครอบคลุมช่วงที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หมายความว่า ถ้าผู้วิเคราะห์เตรียมสารละลายตัวอย่างสูงกว่าหรือต่ำกว่าความเข้มข้นที่ใช้งานจริงสามารถให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องเช่นกัน

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ % Recovery ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Active ingredient content (mg/50 ml)								
	Concn.(0.5 mg/ml)			Concn.(1.0 mg/ml)			Concn.(1.5 mg/ml)		
	Origin	Spilke	Added	Origin	Spilke	Added	Origin	Spilke	Added
1	11.283	22.195	10.825	11.283	43.946	32.473	11.283	65.270	54.123
2	11.283	22.241	10.825	11.283	43.928	32.473	11.283	65.272	54.123
3	11.283	22.293	10.825	11.283	43.733	32.473	11.283	64.441	54.123
4	11.283	22.439	10.825	11.283	43.500	32.473	11.283	64.321	54.123
5	11.283	22.294	10.825	11.283	43.384	32.473	11.283	64.665	54.123
6	11.283	22.319	10.825	11.283	43.199	32.473	11.283	64.604	54.123
7	11.283	22.378	10.825	11.283	43.235	32.473	11.283	64.783	54.123
8	11.283	22.121	10.825	11.283	43.195	32.473	11.283	64.739	54.123
9	11.283	22.289	10.825	11.283	43.297	32.473	11.283	64.323	54.123
10	11.283	22.383	10.825	11.283	43.368	32.473	11.283	64.569	54.123

% Recovery	101.73	99.14	98.69
------------	--------	-------	-------

ค่าความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 41.48, 41.49 และ 41.51 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความเคลื่อนสัมพัทธ์ (% RSD_{exp.}) เท่ากับ 0.243, 0.240 และ 0.270 ตามลำดับ ค่าความเคลื่อน สัมพัทธ์จากทฤษฎี (% RSD_{Horwitz.}) เท่ากับ 1.320 และค่า HORRAT เท่ากับ 0.184, 0.182 และ 0.204 (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ Precision ในผลิตภัณฑ์สูตร 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	52.7	41.49	100.3	41.55	155.1	41.49
2	52.7	41.34	100.7	41.59	158.5	41.66
3	55.5	41.52	110.9	41.39	158.7	41.36
4	50.0	41.56	102.5	41.55	151.4	41.37
5	50.7	41.35	108.8	41.41	150.3	41.55
6	52.8	41.43	103.9	41.40	152.1	41.63
7	52.1	41.44	108.1	41.65	150.7	41.54
8	53.3	41.66	106.7	41.39	160.1	41.63
9	49.7	41.47	106.1	41.42	156.8	41.40
10	52.3	41.57	107.3	41.58	154.0	41.48
Mean	-	41.48	-	41.49	-	41.51
SD		0.101		0.099		0.122
%RSD _{exp.}		0.243		0.240		0.270
Horwitz		1.320		1.320		1.320
HORRAT		0.184		0.182		0.204

สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness และ Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.5 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 42.32, 41.18 41.65 และ 41.83, 41.63, 41.50 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ สำหรับ Robustness มีค่า HORRAT

เท่ากับ 0.455, 0.204 และ 0.196 พบค่าเฉลี่ยที่ความเข้มข้น 0.5mg/ml มีค่าเฉลี่ยร้อยละของสารสูงกว่าระดับอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามจากการคำนวณค่า HORRAT ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ Ruggedness คำนวณค่า HORRAT เท่ากับ 0.381, 0.170 และ 0.314 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับ โดยพิจารณาตาม AOAC ต้องได้ค่า HORRAT ≤ 2 แสดง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์สูตร EC

Number	Concn.(0.5 mg/ml)		Concn.(1.0 mg/ml)		Concn.(1.5 mg/ml)	
	Al. Content % (w/w)		Al. Content % (w/w)		Al. Content % (w/w)	
	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness	Robustness	Ruggedness
1	42.17	41.98	41.16	41.51	41.75	41.55
2	42.09	41.48	41.01	41.79	41.66	41.57
3	42.85	42.01	41.05	41.57	41.69	41.36
4	42.17	41.88	41.14	41.58	41.59	41.32
5	42.44	41.58	41.32	41.62	41.48	41.33
6	42.11	41.98	41.36	41.60	41.83	41.50
7	42.13	42.17	41.24	41.64	41.57	41.90
8	42.49	41.74	41.18	41.68	41.51	41.42
9	42.56	41.78	41.11	41.77	41.69	41.61
10	42.18	41.74	41.23	41.54	41.70	41.46
Mean	42.32	41.83	41.18	41.63	41.65	41.50
SD	0.253	0.209	0.110	0.093	0.107	0.172
% RSD _{exp.}	0.597	0.501	0.268	0.224	0.258	0.415
Horwitz	1.312	1.317	1.317	1.319	1.318	1.320
HORRAT	0.455	0.381	0.204	0.170	0.196	0.314

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชโดยใช้เทคนิค Gas Liquid Chromatography ใช้ตัวตรวจจับชนิด Flame Ionization Detector ด้วย Capillary column ชนิด HP-5 (30

m × 0.32 mm (i.d.), 0.25 µm) มีสภาวะเครื่องการใช่งาน ดังนี้ ใช้แก๊ส He เป็นตัวพา อัตราการไหล 2 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 230 °C เวลา 3.5 นาที อุณหภูมิการฉีด 250 °C อุณหภูมิตัวตรวจจับ 250 °C โหมดการฉีด Split ratio 50 : 1 ปริมาณการฉีด 1 µl การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1 - 4.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.25 - 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 1.00000 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชพบว่า ได้ค่า % recovery เท่ากับ 101.7, 99.14 และ 98.69 อยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC 98 - 102 % สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10%

สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์alachlorในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.184, 0.182 และ 0.204 การตรวจสอบค่าความแข็งแกร่ง Robustness ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ alachlor ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชโดยการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน เวลา (reproducibility) ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.245 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ย HORRAT เท่ากับ 0.288 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC (ค่า HORRAT ≤ 2)

10. การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาคเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์alachlor
2. เป็นการทดสอบศักยภาพของห้องปฏิบัติการ ในด้านบุคลากร เครื่องมือและอุปกรณ์ เปรียบเทียบกับวิธีตามมาตรฐาน

11. เอกสารอ้างอิง

- จิราพรรณ ทองหยอด กาญจนา นนอสิงหา และ ณัญญา ลือตระกูล. 2549. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ วัตุภูมิพิษการเกษตรกลุ่มคาร์บาเมท Carbosulfan. รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุดในปีงบประมาณ 2549 โครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. (อัดสำเนา)
- จิรดา สรวยเอี่ยม และ ณัญญา ลือตระกูล. 2549. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตุภูมิพิษการเกษตร กลุ่มไพรีทรอยด์ Deltamethrin. รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุดในปีงบประมาณ 2549 โครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. (อัดสำเนา)
- กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (อัดสำเนา)

สถาบันอาหาร. 2547. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี เอกสารประกอบการอบรมสัมมนา
วิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร. (อัสสำเนา)

Anonymous. 1993. The Agrochemicals Handbook 3rd. ed. The Royal Society of Chemistry
Cambridge, England.

Dobrat W. and A Martijn H. 1988. CIPAC Handbook Vol. D : Analysis of Technical and Formulated
Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, The Black
Bear Press, England.