

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืช
ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช : ไตรไซคลาโซล

Method Validation for determination of the Active Ingredient of
Fungicide Group in Pesticide Products : Tricyclazole

ทัศนีย์ อัฐพรพงษ์

Tassanee Atthapornpong

สุกัญญา คำคง

Sukanya Khomkhong

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

The study on method validation of fungicide group; Tricyclazole are determined by high performance liquid chromatography (HPLC) the methods are appropriated because there are accuracy and precision. Moreover, the results were accepted from universal standard. The results was described as follows, Working range of tricyclazole using 0.06-0.16mg/ml that were found correlation coefficient (r) 0.99995, respectively (accept of correlation coefficient ≥ 0.995). Next, precision considered HORRAT found 0.61 value and study from repeatability and within laboratory repeatability that was found 1.29 respectively. Then robustness/ruggedness of method was found HORRAT value as 0.48 which were followed by the AOAC (2016) that between 0.3–1.3 Lastly, Accuracy of method considers from % Recovery that was found 100.0

Keyword : method validation, Tricyclazole

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารกำจัดโรคพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) มีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้องและแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล เนื่องจากวิธีการนี้ ให้ค่า การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวัดให้ช่วงความเข้มข้น 0.06-0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) > 0.99995 เกณฑ์ยอมรับ correlation coefficient (r) ต้องมากกว่า 0.995 และตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ที่ให้ค่า HORRAT ของการทวนซ้ำ (repeatability) เท่ากับ 0.61 และการทำซ้ำ within laboratory repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.29 และตรวจสอบ robustness / ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.48 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ได้ค่า %recovery เท่ากับ 100.0

คำหลัก : ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ไตรไซคลาโซล

คำนำ

ประเทศไทยมีการใช้ป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide) กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นประเทศเกษตรกรรม สารป้องกันและกำจัดโรคพืชที่ผลิตขึ้นจึงนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมและการทำลายศัตรูพืช เพื่อลดความเสียหายของ ผลผลิตการเกษตรที่เกษตรกรปลูก ปริมาณข้อมูลการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในรายงานสรุปการนำเข้าวัตถุดิบอันตรายทาง การเกษตร ปี พ.ศ. 2561 ประเภทการใช้ (สำนักควบคุมพืชวัตถุทางการเกษตร, 2561) โดยมีปริมาณและมูลค่าการนำเข้า ค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่ามีการใช้สามารถป้องกันและกำจัดโรคพืชเป็นจำนวนมากดังนั้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อันตรายทาง การเกษตรที่มีคุณภาพและเกษตรกรนำไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพการตรวจสอบผลผลิตก่อนการนำเข้าไปประเทศจึง เป็นสิ่งสำคัญของปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุที่มีพิษทางการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษทางการเกษตร กองวิจัยพัฒนาการผลิตทางการเกษตรเป็นหน่วยงานรับผิดชอบในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทาง การเกษตรทั้งการขึ้นทะเบียนเข้า นำเข้าและส่งออก รวมทั้งควบคุมคุณภาพตามพระบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำและเป็นที่น่าเชื่อถือ นั้น ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความถูกต้อง ของวิธีวิเคราะห์ หรือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้อยู่ ถูกต้องเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานตรงตามวัตถุประสงค์ ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้กำหนดคุณลักษณะเฉพาะวิธีในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีคือตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ช่วงของ การวัด(Working Range) ความเที่ยง (Precision) ความทนของวิธี (Robustness/Ruggedness) ความถูกต้อง (Accuracy) และความจำเพาะเจาะจง (Specificity) (EURACHEM Guide, 1998; APVMA, 2004; CIPAC, 2003) แล้ว นำมาประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์สามารถนำไปใช้งานได้หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจสอบ ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารป้องกันและกำจัดโรคพืชในผลิตภัณฑ์ : ไตรไซคลาโซล (Tricyclazole) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเพื่อให้วิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องเหมาะสมสามารถใช้เป็นวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ และ นำไปขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 รวมทั้งเพิ่มสมรรถนะของห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบวิเคราะห์ ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง high performance liquid chromatograph ที่ติดตั้งหัววัด UV detector
2. คอลัมน์ HPLC ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ภายในบรรจุด้วย Octylsilain bonded silica gel ขนาด 5 ไมโครเมตร (Lichrospher100 RP-8)
3. คอลัมน์ HPLC ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ภายในบรรจุด้วย Octylsilain bonded silica gel ขนาด 5 ไมโครเมตร (Hypersil ODS)
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
5. Ultrasonic bath
6. ขวดปริมาตรชนิด type A ขนาด 10, 25, 50 และ 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. Auto pipette ขนาด 10-100 ไมโครลิตร, 100-1000 ไมโครลิตรและ 1-10 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. ปีกเกอร์ ขนาด 50,100 มิลลิลิตร
9. vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
10. syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร
11. syringe filters 0.22 ไมโครเมตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Tricyclazole 99.4 %
2. Acetonitrile HPLC grade
3. Methanol HPLC grade
4. Water HPLC grade
5. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ Tricyclazole 75%w/w WP

วิธีการ

1. การปรับภาวะเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ดังนี้
คอลัมน์ชนิด : คอลัมน์ HPLC ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ภายในบรรจุด้วย Octylsilain bonded silica gel ขนาด 5 ไมโครเมตร (Lichrospher100 RP-8)
อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตร/นาที
เฟสเคลื่อนที่ : water : ACN (80:20)
อุณหภูมิคอลัมน์ : 30 °C ความยาวคลื่น : 252 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด : 10 ไมโครลิตร
2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ Tricyclazole
 - 2.1 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity / working range)
เตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้น ที่ 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร ใส่ใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวดปิดจุกเขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วย methanol เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นละ 3 ซ้ำเข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับ response พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง คำนวณค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995 (Eugene et al, 2012)
 - 2.2 ตรวจสอบความเที่ยง (precision)
 - 2.2.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (repeatability)
ตรวจ precision แบบ Repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกันเครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน ซึ่งตัวอย่าง Tricyclazole 75% w/w WP ให้มีความเข้มข้น 0.08,0.10,0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซ้ำ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ใส่ใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวดปิดจุกเขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วย methanol เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน
คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation,SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation,%RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT (ทิพวรรณ,2549) โดย HORRAT ต้องอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

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

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

เกณฑ์ยอมรับค่า precision

AOAC (2016) ยอมรับ HORRAT = 0.3 – 1.3

2.2.2 ตรวจสอบความซ้ำ within laboratory repeatability

ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลา
ต่างวันกัน

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 แต่จะวิเคราะห์ต่างวัน คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT ซึ่งต้องอยู่ในช่วง 0.3 - 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

2.3 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness

2.3.1 การตรวจสอบ Robustness

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 โดยทำการตรวจสอบ Robustness วิเคราะห์หาปริมาณ Tricyclazole ที่สภาวะการใช้งานปกติ ใช้คอลัมน์ชนิด Lichrospher100 RP-8 อัตราการไหลของ Mobile phase จาก 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ Mobile phase เป็น 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที และคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT ซึ่งต้องอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

2.3.2 การตรวจสอบ Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 โดยทำการตรวจสอบ Ruggedness วิเคราะห์หาปริมาณ Tricyclazole ที่สภาวะการใช้งานปกติ และทำการเปลี่ยนคอลัมน์จาก Lichrospher100 RP-8 เป็น Hypersil ODS และคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT ซึ่งต้องอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

2.4 ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

2.4.1 เตรียม stock standard

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารมาตรฐาน ใส่ในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ ครึ่งขวด ปิดจุก เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องแล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร

2.4.2 เตรียม stock sample

เตรียมสารละลายตัวอย่าง Tricyclazole 75% w/w WP ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งตัวอย่างลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย เทสารผ่านกรวยกรอง ลงใน

ขวดวัดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณ ครึ่งขวด ปิดจุก เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 15 นาที
ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องแล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร

2.4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 3 ระดับความเข้มข้น ที่ 0.08, 0.10 และ 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรเติมตัวทำละลายประมาณ ครึ่งขวด ปิดจุก เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath
15 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องแล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตรแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2
มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไป
มาก

2.4.4 เตรียมสารละลายเพื่อหา origin

ปิเปตสารละลาย stock sample ข้อ 2.4.2 ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ
ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้า
เครื่องโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ข้อ 2.4.3

2.4.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า spike

ปิเปตสารละลาย stock sample ข้อ 2.4.2 ลงใน ขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด
ชุดละ 10 ซ้ำ จากนั้นเติมสารละลาย stock standard 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย
ตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ฉีดสารละลายเข้าเครื่องโดยเทียบกับ
กราฟมาตรฐาน ข้อ 2.4.3

2.4.6 ประเมินค่า Accuracy จากค่า %recovery

การประเมินค่า accuracy จาก % recovery นำค่าปริมาณสารออกฤทธิ์ Tricyclazole ที่เป็น
ค่า origin และ spike มาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณค่า % recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณา
สำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC จากสูตร

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

A_{spike} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย spike

A_{origin} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย origin

A_{add} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย spike

2.5 ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ฉีด Solvent Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่องตัว HPLC พิจารณาโครมาโทแกรม
ดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอมรบกวนสารออกฤทธิ์หรือไม่

3. ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืชในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช
Tricyclazole รายงานความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 - สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนา
ปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กลุ่มสารกำจัดโรคพืชในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช Tricyclazole โดยหาค่าคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ และนำมาหาค่าและประเมินการยอมรับได้ดังนี้

1. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working Range) ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14 และ 0.16 พบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.06 - 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995

2. ตรวจสอบความเที่ยง Precision

2.1 ตรวจสอบความทวนซ้ำ (repeatability) ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน โดยทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ระดับ 0.08, 0.10, 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

2.2 ตรวจสอบความทำซ้ำ within laboratory repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน โดยทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ระดับ 0.08, 0.10, 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

และนำผลที่ได้จากการทดสอบมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT (ทิพวรรณ, 2549) โดย HORRAT ต้องอยู่ในช่วง 0.3 - 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 1 ผลการตรวจ Precision ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

สารป้องกัน	ความเข้มข้น	Repeatability (n=10)				within laboratory repeatability (n=10)			
		mean	%RSD _{exp}	%RSD _{Horwitz}	HORRAT	mean	%RSD _{exp}	%RSD _{Horwitz}	HORRAT
กำจัดศัตรูพืช	0.08	75.76	1.02	2.08	0.49	74.79	1.98	2.08	0.95
	0.10	75.35	0.80	2.08	0.38	75.42	1.69	2.08	0.81
	0.12	76.14	1.41	2.08	0.68	75.75	1.33	2.08	0.64

3. การตรวจสอบ Robustness ได้ทำการเปลี่ยนอัตราการใช้ของ Mobile phase จาก 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที เปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ของ Mobile phase เป็น 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ระดับ 0.08, 0.10, 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และนำผลที่ได้จากการทดสอบมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT (ทิพวรรณ, 2549) โดย HORRAT ต้องอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบ Robustness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (n=10)

สารป้องกัน	ความเข้มข้น	เปลี่ยน flow ของ Mobile phase จาก 1.0 ml/min เป็น 1.2 ml/min				เปลี่ยน Temperature จาก 30 °C เป็น 40 °C			
		mean	%RSD _{exp}	%RSD _{Horwitz}	HORRAT	mean	%RSD _{exp}	%RSD _{Horwitz}	HORRAT
กำจัดศัตรูพืช	0.08	76.40	0.86	2.08	0.41	76.05	0.84	2.08	0.40
	0.10	75.65	0.80	2.08	0.38	76.01	0.69	2.08	0.33
	0.12	75.83	1.12	2.08	0.54	75.59	1.09	2.08	0.53

4. การตรวจสอบ Ruggedness ได้ทำการเปลี่ยนคอลัมน์จาก Lichrospher100 RP-8 เป็น Hypersil OD โดยทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่ระดับ 0.08, 0.10, 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และผลการทดลองพบว่าได้ค่าเฉลี่ย (mean) ของ Tricyclazole ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp}) มีค่าน้อยกว่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) ดังนั้นการประเมินด้วย HORRAT ของ Tricyclazole มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) วิธีวิเคราะห์ Tricyclazole ให้ผลการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบ Ruggedness ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (n=10)

สารป้องกัน	ความเข้มข้น	เปลี่ยน Column Lichrospher เป็น Hypersil ODS				เปลี่ยนเครื่อง			
		mean	%RSD _{exp}	%RSD _{Horwitz}	HORRAT	mean	%RSD _{exp}	%RSD _{Horwitz}	HORRAT
กำจัดศัตรูพืช	0.08	75.73	0.884	2.08	0.42	76.15	0.669	2.08	0.321
	0.10	75.89	0.957	2.08	0.459	76.12	0.631	2.08	0.303
	0.12	75.27	0.696	2.08	0.334	75.21	0.705	2.08	0.338

5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า %recovery ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.10, 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่า %recovery ของ Tricyclazole อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98 - 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC

ตารางที่ 4 ผลตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

Al Tricyclazole mg/ml										
No.	Conc.0.08mg/ml			Conc.0.1mg/ml			Conc.0.12 mg/ml			
	origin	add	Spike	origin	add	Spike	origin	add	Spike	
1	0.026	0.056	0.081	0.028	0.07	0.101	0.040	0.084	0.125	
2	0.023	0.056	0.080	0.028	0.07	0.101	0.039	0.084	0.120	
3	0.022	0.056	0.080	0.028	0.07	0.101	0.039	0.084	0.122	
4	0.022	0.056	0.079	0.028	0.07	0.102	0.039	0.084	0.124	
5	0.022	0.056	0.080	0.028	0.07	0.101	0.040	0.084	0.121	
6	0.024	0.056	0.080	0.028	0.07	0.101	0.039	0.084	0.121	
7	0.022	0.056	0.081	0.029	0.07	0.100	0.040	0.084	0.123	
8	0.025	0.056	0.079	0.028	0.07	0.100	0.039	0.084	0.123	
9	0.023	0.056	0.079	0.028	0.07	0.101	0.040	0.084	0.120	
10	0.022	0.056	0.079	0.029	0.07	0.101	0.040	0.084	0.124	
mean	0.023	0.056	0.080	0.028	0.07	0.101	0.039	0.084	0.122	
% Recovery	98.2		100			98.8				

6. ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity) จากการฉีด Blank สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง Tricyclazole พบว่า โครมาโทแกรม ของ Blank สารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ไม่มี Peak อื่นใดมารบกวน

7. ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช Tricyclazole $75 \pm 1.18\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์กลุ่มสารป้องกันกำจัดโรคพืชในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช Tricyclazole โดยพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีด้วยการหาค่าคุณลักษณะเฉพาะต่างๆได้แก่ ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working range) ให้ช่วงความเข้มข้น 0.06-0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า $r > 0.995$ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับค่า $r \geq 0.995$ ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) รวมทั้งตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ประเมินด้วย HORRAT ของ Tricyclazole มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.3 - 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ได้ค่า %recovery ของ Tricyclazole อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98 - 102% ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC และวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และประเมินค่าความไม่แน่นอน ของ Tricyclazole $75 \pm 1.18\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุที่มีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไปขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ได้

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

วิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบของห้องปฏิบัติการในการให้บริการตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลิตภัณฑ์วัตถุมีพิษ การเกษตรตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย และใช้ในการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานรวมถึงเผยแพร่ให้กับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. *แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว*.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข.

สำนักงานควบคุมและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2561. "รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร-ปี-พ.ศ-๒๕๖๑-ประเภทการใช้." [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2020/01/HASTAT61_05รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตราย_ทางการเกษตร-ปี-พ.ศ-๒๕๖๑-ประเภทการใช้.pdf (16 พฤศจิกายน 2561)

APVMA. 2004. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultura and Vterinary Chemical Products. Autralian Pesticides Veterinary Medicines Authority. Kingston. Australia.

Eugene, W.R, B.B Rodger, D.E. Andrew and S.C. Lenore. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. Washington, DC.USA.

EURACHEM Guide. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Method: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM Working Group. United Kingdom.

George W. and Jr., Latimer. 2016. Official method analysis of AOAC in international. Appendix F;; Guidelines for standard method performance requirements. 20th ed. AOAC international, 2016.p1-18