

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ไทอะมีโทกแซม
ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
Method Validation for determination of the Active Ingredient of
thiamethoxam in Pesticide Products

สุกัญญา คำคง ทศนี อัฐพรพงษ์
Sukanya Khomkong Tassanee Atthapornpong

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Method validation study of active ingredients in pesticide formulation products, such as thiamethoxam. The objectives of this study were validated of method to appropriate with the instrument in laboratory which was developed and adapted from standard method by High Performance Liquid Chromatography technique within the appropriate condition. The results were found that the working concentration range and linearity range of thiamethoxam were 0.20 – 1.40 mg/ml, respectively with the correlation coefficient (r) > 0.998 which had accepted with limit of the correlation coefficient (r) \geq 0.990 (CIPAC, 2003). The precision of HORRAT values for repeatability and within laboratory repeatability of the analytical substances by the three levels of concentration were in the range of 0.69 – 0.96 and 0.45 – 0.68, respectively. The HORRAT values tested with robustness and ruggedness of thiamethoxam which two factors analysis for change that temperature of column and flow rate by the three levels of concentration were in the range of 0.38 – 0.97 which were followed by the AOAC (2016) that between 0.3 – 1.3. The accuracy of this method was assessed by recovery studied. The percent recoveries of the analytical substances by the three levels of concentration were in the range of 98.4 – 98.8% considered an acceptance by the AOAC (2016) that as 98-102 for analytical concentrations more than 10%. This specificity method did not have interference from other substances. The measured uncertainty of thiamethoxam was $25.4 \pm 0.43\%$, respectively at 95% confidence level. As a result, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. Therefore, the method development could be used to determine the active ingredients in pesticide formulation products with accuracy and precision.

Keywords : method validation, thiamethoxam, linearity and working range, precision, repeatability, within laboratory repeatability, robustness and ruggedness, accuracy, specificity, uncertainty

บทคัดย่อ

จากการศึกษาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ไธอะมีทอกแซม (thiamethoxam) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาวิธีขึ้นมาใหม่หรือดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐานให้เหมาะสมกับเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ เพื่อสร้างมาตรฐานการทดสอบ ให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ ยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงของการวัด (working range) มีช่วงความเข้มข้น 0.20 - 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) มากกว่า 0.998 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥ 0.990 (CIPAC, 2003) ตรวจสอบความแม่นยำ (precision) แบบ repeatability และ within laboratory repeatability ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.69 - 0.96 และ 0.45 - 0.68 ตามลำดับ ตรวจสอบความคงทน (robustness / ruggedness) โดยเปลี่ยนปัจจัยการทดสอบแบบ 2 ปัจจัยคือ อุณหภูมิคอลัมน์กับอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.38 - 0.97 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) คือ 0.3 - 1.3 ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) จาก % recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ อยู่ระหว่าง 98.4 - 98.8 ซึ่งอยู่ในช่วง 98 - 102 ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (2016) วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และการประมาณค่าความไม่แน่นอนของ thiamethoxam เท่ากับ $25.4 \pm 0.43\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากผลการทดสอบดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า คุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

คำสำคัญ : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารออกฤทธิ์ไธอะมีทอกแซม ช่วงความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวัด ความแม่นยำ การทำซ้ำ ความคงทน ความถูกต้อง ความจำเพาะเจาะจง การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

คำนำ

ประเทศไทยมีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นประเทศเกษตรกรรม สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ผลิตขึ้นจึงนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมและการทำลายศัตรูพืช เพื่อลดความเสียหายของผลผลิต การเกษตรที่เกษตรกรปลูก จะเห็นได้ว่าปริมาณข้อมูลการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในระหว่างปี 2554 - 2560 มีปริมาณนำเข้าสารป้องกันกำจัดโรคพืช 84,415 ตัน คิดเป็นมูลค่า 32,610 ล้านบาท ดังแสดงในตารางที่ 1 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561)

ตารางที่ 1 ปริมาณการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี 2554 - 2560

ปี	สารเคมี									
	สารกำจัดวัชพืช (Herbicide)		สารกำจัดแมลง (Insecticide)		สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide)		อื่นๆ		รวม	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
2554	112,177	11,480	34,672	5,938	12,179	3,875	5,511	777	164,538	22,070
2555	106,860	11,294	16,797	3,686	6,972	3,883	3,748	494	134,480	19,378
2556	137,049	14,873	21,485	4,201	10,350	4,828	3,942	514	172,826	24,416
2557	117,645	13,435	13,910	4,013	10,988	4,708	4,832	656	147,375	22,812
2558	119,971	11,016	12,927	3,684	11,088	3,839	5,560	787	149,546	19,326
2559	125,596	9,688	16,056	3,899	12,915	4,503	6,120	2,487	160,824	20,618
2560	148,979	13,686	21,601	6,166	19,923	6,974	7,814	1,096	198,317	27,922

ที่มา : สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2561)

จากตารางแสดงให้เห็นว่า มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 นั้น จะตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ ว่าตรงตามที่ระบุไว้บนฉลากหรือไม่ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีคุณภาพและเกษตรกรนำไปใช้ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนการนำเข้าประเทศจึงเป็นสิ่งสำคัญ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ทั้งการขึ้นทะเบียนนำเข้าและส่งออก รวมทั้งควบคุมคุณภาพตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 โดยใช้วิธีมาตรฐาน CIPAC (Collaborative International Pesticide Analytical Council) แต่วิธีการจากวิธีมาตรฐานไม่สามารถทำตามได้ทั้งหมด เนื่องจากไม่มีเครื่องมือ/อุปกรณ์ หรือสารเคมี จึงต้องใช้วิธีดัดแปลง การดัดแปลงวิธีวิเคราะห์นั้น ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องมีการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หรือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้อยู่ถูกต้องแม่นยำ และเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ได้กำหนดคุณลักษณะเฉพาะวิธีในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี คือ ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) ช่วงของการวัด (working Range) ความแม่นยำ (precision) ความคงทนของวิธี (robustness/ruggedness) ความถูกต้อง (accuracy) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) รวมทั้งความไม่แน่นอนของ การวัด (Measurement Uncertainty) (ทิพวรรณ, 2549) แล้วยนำมาประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่าวิธีวิเคราะห์สามารถนำไปใช้งานได้หรือไม่

สารออกฤทธิ์โทเอมีทอกแซม (thiamethoxam) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ใช้เพื่อป้องกันกำจัด ทำลาย ควบคุมแมลงศัตรูพืช จัดอยู่ในกลุ่ม neonicotinoids มีฤทธิ์ต่อระบบเซลล์ประสาทของแมลง โดยการรบกวนการรับสาร nicotinic acetylcholine ในระบบประสาทส่วนกลางและทำให้กล้ามเนื้อของแมลงกลายเป็นอัมพาต (Kidd and James, 1991) สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์โทเอมีทอกแซม (thiamethoxam) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีวิธีมาตรฐานใน CIPAC Handbook (Volume O) โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC) และเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (Liquid Chromatography: HPLC) (Maria and Jim, 2017)

ตั้งนํ้างานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ไทอะมีโทกแซม (thiamethoxam) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องเหมาะสม สามารถใช้เป็นวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ และนำไปขอการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 รวมทั้งเพิ่มสมรรถนะของห้องปฏิบัติการในการตรวจสอบวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง high performance liquid chromatograph มีตัวตรวจวัดชนิด DAD หรือ UV
2. คอลัมน์ชนิด LiChroCART® 60 (RP-18) ขนาด 5.0 ไมโครเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง (i.d.) 4.0 มิลลิเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ชั่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. Ultrasonic bath
6. ขวดวัดปริมาตรชนิด type A ขนาด 25, 200 และ 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. Auto pipette ขนาด 1 - 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
8. ปีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
10. syringe ขนาด 10 มิลลิลิตร
11. syringe filters 0.22 ไมโครเมตร

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน thiamethoxam 99.65 %
2. สารเมทานอล (HPLC grade)
3. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (HPLC grade)
4. กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4)
5. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช thiamethoxam 25 % W/W WG

วิธีการ

1. การปรับตั้งสภาวะเครื่อง HPLC (DAD/UV) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ thiamethoxam
คอลัมน์ : LiChroCART® 60 (RP-18) ขนาด 4.0 x 250 มิลลิเมตร ภายในบรรจุ bonded silica gel ขนาด 5 ไมโครเมตร
อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เฟสเคลื่อนที่ : อัตราส่วนของกรดฟอสฟอริก (0.1% H_3PO_4) ต่อเมทานอล (Methanol) (60:40)
อุณหภูมิคอลัมน์ : 40 องศาเซลเซียส
ความยาวคลื่น : 225 นาโนเมตร
ปริมาตรการฉีด : 1 ไมโครลิตร
2. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวัด (linearity/working range)
ซึ่งสารมาตรฐาน thiamethoxam 99.65 % ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.20 - 1.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมนเมทานอลประมาณครึ่งขวด นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล แบ่งใส่ในขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานเข้าเครื่อง HPLC สร้างกราฟ

ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง และ คำนวณค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.990 (CIPAC, 2003)

3. ตรวจสอบความแม่นยำ (Precision)

3.1 Repeatability

ตรวจสอบ precision แบบ repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบ คนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาเดียวกัน ดังนี้

3.1.1 การเตรียมสารมาตรฐานแบบ 2 ซ้ำ (duplicate) ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานให้มีสาร thiamethoxam ปริมาณ 20, 25 และ 30 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ใน ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอลปริมาณครึ่งขวด เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที ปลอ่ยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องแล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างสาร thiamethoxam 25 % W/W WG ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยชั่งสารตัวอย่างให้มีสาร thiamethoxam ปริมาณ 80, 100 และ 120 มิลลิกรัม (± 0.1 มิลลิกรัม) ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอลปริมาณครึ่งขวด เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยสารเมทานอล และ กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานของแต่ละ ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 3.1.1 คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดย HORRAT ต้องมีค่า อยู่ในช่วง 0.3 – 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_r = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

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

เกณฑ์ยอมรับค่า precision ยอมรับ HORRAT = 0.3 – 1.3

3.2 Within laboratory repeatability

ตรวจสอบ precision แบบ within laboratory repeatability ซึ่งเป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการ เดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในเวลาต่างวันกัน วิเคราะห์ตัวอย่างเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่จะวิเคราะห์ ต่างวัน โดยเทียบกับกับสารมาตรฐานของแต่ละช่วงความเข้มข้น คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมินด้วย HORRAT โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.3-1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

4. ตรวจสอบความคงทน (Robustness/Ruggedness)

วิเคราะห์ตัวอย่างสาร thiamethoxam 25 % W/W WG เช่นเดียวกับข้อ 3.1 โดยเปลี่ยนปัจจัยการทดสอบ แบบ 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิคอลัมน์กับอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (standard deviation, SD) ความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) และประเมิน ด้วย HORRAT โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.3 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016)

5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

5.1 เตรียม Stock standard

เตรียมสารละลายมาตรฐาน thiamethoxam ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มีความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม) ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำเมทานอลประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง

ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยสารเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร

5.2 เตรียม Stock sample

เตรียมสารละลายตัวอย่าง thiamethoxam ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารเมทานอลประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยสารเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร

5.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน thiamethoxam 99.65 % ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ข้ำ โดยปิเปตสารละลาย stock standard ข้อ 5.1 ปริมาตร 4.7, 5.8 และ 7 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารเมทานอลประมาณครึ่งขวด ปิดจุก เขย่าให้ละลายด้วย ultrasonic bath 15 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องแล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร แบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC

5.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Origin

ปิเปตสารละลาย stock sample ข้อ 5.2 ปริมาตร 6, 7.5 และ 9 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 10 ข้ำ ปรับปริมาตรด้วยสารเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานในแต่ละช่วงที่เตรียมไว้ ข้อ 5.3

5.5 เตรียมสารละลายเพื่อหาค่า Spike

ปิเปตสารละลาย stock sample ข้อ 5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ชุดละ 10 ข้ำ จากนั้นเติมสารละลาย stock standard ปริมาตร 4.7, 5.8 และ 7.0 มิลลิลิตร อย่างละ 10 ข้ำ ปรับปริมาตรด้วยสารเมทานอลจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐานในแต่ละช่วงที่เตรียมไว้ ข้อ 5.3

ประเมินค่า accuracy จากค่า % recovery

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

C_{spike} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Spike

C_{origin} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลาย Origin

C_{add} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลาย Spike

6. ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

โดยฉีดสารมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างของ thiamethoxam เข้าเครื่อง HPLC ที่ทำการกำหนดสภาวะเครื่องตั้งข้อ 1 พิจารณาโครมาโทแกรมดูว่ามีสารอื่นแปลกปลอม มารบกวนสารออกฤทธิ์ thiamethoxam หรือไม่

7. ประมาณค่าความไม่แน่นอน (Uncertainty)

ประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ thiamethoxam ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช thiamethoxam ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ระยะเวลา

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

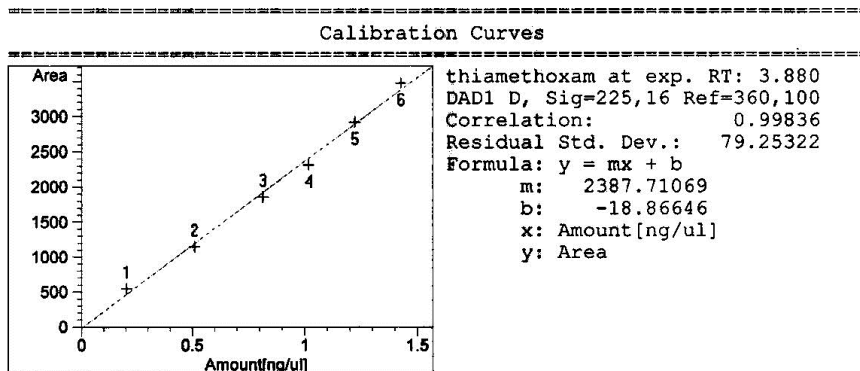
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุที่มีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดโรคพืช ไทอะมีโทกแซม (thiamethoxam) ในผลิตภัณฑ์สารสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ linearity, working range, precision, robustness/ruggedness, accuracy, specificity และ uncertainty ประเมินการยอมรับได้ดังนี้

1. การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working Range)

ตรวจสอบช่วงของการวัด (working range) และ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) พบว่า ช่วงของการวัด และช่วงความเป็นเส้นตรงของ thiamethoxam อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99836 ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.990$ (CIPAC, 2003)



ภาพที่ 1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงของการวัด (working Range) ของสารมาตรฐาน thiamethoxam

2. การตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

ตรวจสอบความเที่ยง (precision) ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ thiamethoxam ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0, 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ประเมินแบบ repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.93, 0.96, 0.69 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ประเมินแบบ within laboratory repeatability ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.45, 0.68, 0.54 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.3

ตารางที่ 2 Precision results of repeatability and within laboratory repeatability of thiamethoxam

Conc.(mg/ml)	repeatability (n=10)			within laboratory repeatability		
	0.8	1.0	1.2	0.8	1.0	1.2
mean (%W/W)	25.00	25.39	24.95	24.61	24.53	24.90
SD	0.57	0.60	0.42	0.27	0.41	0.33
%RSD	2.29	2.37	1.71	1.11	1.68	1.34
HORRAT	0.93	0.96	0.69	0.45	0.68	0.54

3. การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ (Robustness/Ruggedness)

การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ thiamethoxam โดยเปลี่ยนปัจจัยการทดสอบแบบ 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิคอลัมน์กับอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0, 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า การเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์ของวิธีวิเคราะห์ thiamethoxam ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.97, 0.62, 0.68 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) การเปลี่ยนอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ของวิธีวิเคราะห์ thiamethoxam ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.84, 0.80, 0.76 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และการเปลี่ยนอุณหภูมิคอลัมน์กับอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ของวิธีวิเคราะห์ thiamethoxam ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 0.46, 0.75, 0.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.3

ตารางที่ 3 Results of robustness/ruggedness (change temperature) of thiamethoxam

thiamethoxam			
Conc.	0.8 mg/ml	1.0 mg/ml	1.2 mg/ml
mean (%W/W)	25.31	24.93	25.04
SD	0.60	0.37	0.41
%RSD	2.39	1.52	1.66
HORRAT	0.97	0.62	0.68

ตารางที่ 4 Results of robustness/ruggedness (change flow rate) of thiamethoxam

thiamethoxam			
Robustness/Ruggedness	0.8 mg/ml	1.0 mg/ml	1.2 mg/ml
mean (%W/W)	25.18	25.73	25.76
SD	0.52	0.50	0.48
%RSD	2.08	1.97	1.87
HORRAT	0.84	0.80	0.76

ตารางที่ 5 Results of robustness/ruggedness (change temperature and flow rate) of thiamethoxam

thiamethoxam			
Robustness/Ruggedness	0.8 mg/ml	1.0 mg/ml	1.2 mg/ml
mean (%W/W)	24.96	24.80	24.61
SD	0.28	0.46	0.23
%RSD	1.14	1.86	0.95
HORRAT	0.46	0.75	0.38

4. การตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

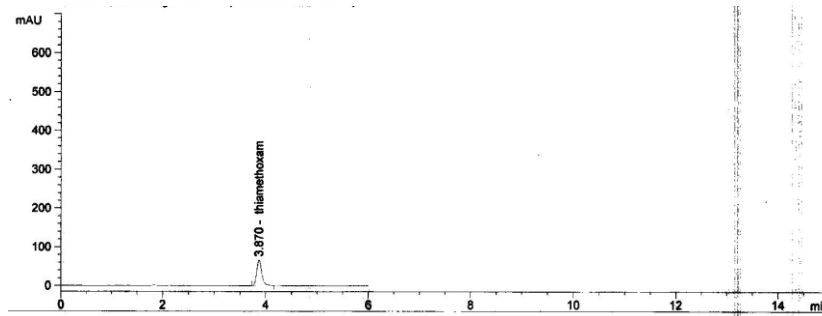
ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) โดยหาค่า %recovery ของ thiamethoxam ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ จำนวน 10 ซ้ำ คือ 0.8, 1.0, 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่า ได้ %recovery เท่ากับ 98.8%, 98.4%, 98.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับที่ 98-102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10% ของ AOAC (2016)

ตารางที่ 6 % Recovery of thiamethoxam

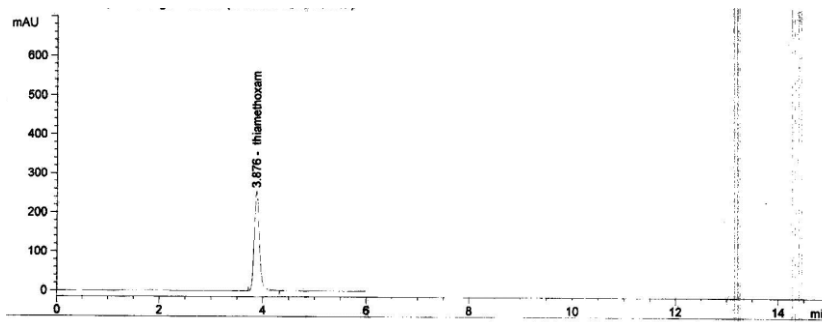
No.	thiamethoxam a.i. content (mg/ml)								
	0.8 mg/ml			1.0 mg/ml			1.2 mg/ml		
	origin	add	result	origin	add	result	origin	add	result
1	0.24	0.56	0.77	0.29	0.70	0.99	0.35	0.84	1.18
2	0.23	0.56	0.78	0.28	0.70	1.00	0.36	0.84	1.15
3	0.23	0.56	0.78	0.27	0.70	0.95	0.36	0.84	1.22
4	0.23	0.56	0.78	0.28	0.70	0.97	0.36	0.84	1.18
5	0.23	0.56	0.78	0.28	0.70	0.95	0.36	0.84	1.21
6	0.23	0.56	0.79	0.29	0.70	0.95	0.36	0.84	1.15
7	0.23	0.56	0.77	0.28	0.70	0.97	0.37	0.84	1.16
8	0.23	0.56	0.77	0.27	0.70	0.96	0.35	0.84	1.19
9	0.23	0.56	0.83	0.29	0.70	0.97	0.35	0.84	1.20
10	0.23	0.56	0.79	0.28	0.70	0.98	0.36	0.84	1.20
mean	0.231	0.560	0.784	0.280	0.700	0.969	0.358	0.840	1.185
SD	0.003	-	0.016	0.005	-	0.016	0.006	-	0.024
%RSD	1.361	-	2.002	1.725	-	1.670	1.705	-	2.047
%Recovery	-	-	98.75	-	-	98.42	-	-	98.45

5. การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง (Specificity)

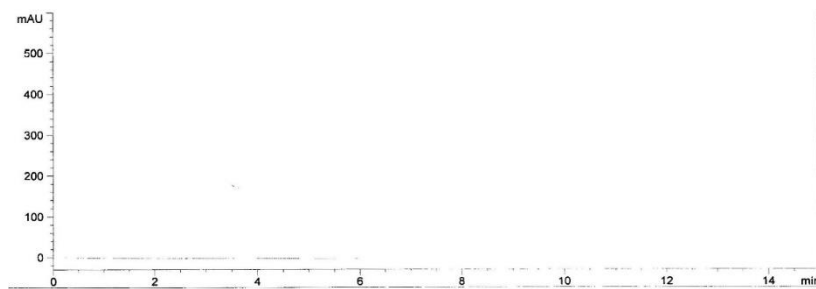
การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ thiamethoxam พบว่าโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน สารละลายตัวอย่าง และสารละลายแบลงค์ (blank) ไม่มีพีคอื่นใดมารบกวน (ภาพที่ 2 – 4) แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ thiamethoxam ไม่ตอบสนองต่อสารอื่น แต่จะตอบสนองเฉพาะเจาะจงต่อสารตัวอย่าง



ภาพที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน thiamethoxam ที่ไม่มีสารอื่นรบกวนการวิเคราะห์



ภาพที่ 3 แสดงโครมาโตแกรมของสารละลายตัวอย่าง thiamethoxam ที่ไม่มีสารอื่นรบกวนการวิเคราะห์



ภาพที่ 4 แสดงโครมาโตแกรมของตัวทำละลายเมทานอล (Methanol) ที่ไม่มีพีค (peak) ขึ้นตรงกับสารละลายมาตรฐาน

6. การประมาณค่าความไม่แน่นอน (Uncertainty)

ประมาณค่าความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของการหาปริมาณสารออกฤทธิ์ thiamethoxam พบว่า แหล่งของความไม่แน่นอนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร thiamethoxam 25% WP

6.1 การชั่งน้ำหนัก

$$6.1.1 \text{ การสอบเทียบเครื่องชั่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95\% } u_x = \frac{a}{d}$$

ค่าความไม่แน่นอนขยายจากการสอบเทียบเครื่องชั่งมีค่า = ± 0.000035 กรัม, $k = 2.07$ (ชั่งน้ำหนักที่ 0.010 กรัม)

$$u_x \text{ จากการสอบเทียบ} = \frac{0.000035}{2.07} = 1.69082 \times 10^{-5} \text{ กรัม}$$

$$u_x \text{ จากการชั่งน้ำหนัก (tare and gross)} = \sqrt{2 \times (1.69082 \times 10^{-5})^2} = 2.3912 \times 10^{-5} \text{ กรัม}$$

ค่าความไม่แน่นอนขยายจากการสอบเทียบเครื่องชั่งมีค่า = ± 0.000035 กรัม, $k = 2.07$ (ชั่งน้ำหนักที่ 0.10 กรัม)

$$u_x \text{ จากการสอบเทียบ} = \frac{0.000035}{2.07} = 1.69082 \times 10^{-5} \text{ กรัม}$$

$$u_x \text{ จากการชั่งน้ำหนัก (tare and gross)} = \sqrt{2 \times (1.69082 \times 10^{-5})^2} = 2.3912 \times 10^{-5} \text{ กรัม}$$

6.2 การปรับปริมาตรเครื่องแก้ว

6.2.1 เครื่องแก้วสำหรับสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง

ค่าความไม่แน่นอนจากค่าผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้ของ Volumetric flask 25 มิลลิลิตร

เท่ากับ ± 0.0074 มิลลิลิตร, $k = 2.00$

$$u_x \text{ จากการสอบเทียบเครื่องแก้ว} = \frac{0.0074}{2.00} = 3.70 \times 10^{-3} \text{ มิลลิลิตร}$$

ขณะใช้งานมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 5 °C ปริมาตรที่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิของ organic solvent เท่ากับ 1×10^{-3}

$$u_x \text{ จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ} = (1 \times 10^{-3}) \times 25 \times \frac{5}{\sqrt{3}} = 0.07217 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$u_x \text{ จากการปรับปริมาตรของสารตัวอย่าง} = \sqrt{(3.70 \times 10^{-3})^2 + (7.217 \times 10^{-2})^2} \\ = 7.2264 \times 10^{-2} \text{ มิลลิลิตร}$$

6.3 การทดสอบซ้ำ (repeatability)

ค่าความไม่แน่นอนจาก method validation

$$u_x = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

SD = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารมาตรฐานของ intermediate precision ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml อย่างน้อย 10 ซ้ำ จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

n = จำนวนซ้ำของตัวอย่าง 10 ซ้ำ

$$u_x = \frac{0.600}{\sqrt{10}} = 1.8973 \times 10^{-1} \text{ กรัม}$$

6.4 ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน

ความไม่แน่นอนที่เกิดจากการหาความบริสุทธิ์ของสาร จากใบรับรองผลการทดสอบสารมาตรฐาน (Certificate)

สารมาตรฐานมีความบริสุทธิ์ = $99.65 \pm 0.30\%$

หรือ = 0.9965 ± 0.003 กรัม

$$\text{ดังนั้น } u_x = \frac{0.003}{2.00}$$

$$= 1.5000 \times 10^{-3} \text{ กรัม}$$

6.5 การหาความไม่แน่นอนรวม (u_c)

กรณีหน่วยวัดต่างกันจะต้องเปลี่ยนค่า u_x จากแต่ละแหล่งให้เป็นความเบี่ยงเบนความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard uncertainty, Ru)

โดย
$$Ru = \frac{u_x}{x} \quad \text{เมื่อ } x = \text{ค่าของ parameter นั้น}$$

สมการ
$$U_c = C\sqrt{Ru_1^2 + Ru_2^2 + \dots + Ru_n^2} \quad \text{เมื่อ } C = \text{ผลที่ได้จากการวิเคราะห์}$$

ตารางที่ 7 Possible sources of uncertainty in analysis of thiamethoxam

แหล่งข้อมูล	Unit	Value (x)	u_x	Ru (u_x/x)	Ru^2
u_m	g	0.100	2.3912×10^{-5}	2.3912×10^{-4}	5.718×10^{-8}
u_s	g	0.010	2.3912×10^{-5}	2.3912×10^{-3}	5.718×10^{-6}
$u_{vol.std.samp}$	ml	25	7.2264×10^{-2}	2.8905×10^{-3}	8.355×10^{-6}
u_{std}	-	0.9965	1.5000×10^{-3}	1.5053×10^{-3}	2.296×10^{-6}
u_{Repeat}	g	25.39	1.8973×10^{-1}	7.4729×10^{-2}	5.584×10^{-5}

U_c

$$= 25.39 \sqrt{(5.718 \times 10^{-8}) + (5.718 \times 10^{-6}) + (8.355 \times 10^{-6}) + (2.296 \times 10^{-6}) + (5.584 \times 10^{-5})}$$

$$\begin{aligned} u_c &= 25.39 \sqrt{7.227 \times 10^{-5}} \\ &= 25.39 \times (8.501 \times 10^{-3}) \\ &= 2.158 \times 10^{-1} \end{aligned}$$

6.6 การหาค่าความไม่แน่นอนขยาย (U)

$$\begin{aligned} U &= 2 \times u_c \\ &= 2 \times 0.2158 \\ &= 0.43 \% \end{aligned}$$

6.7 รายงานผลการทดสอบตัวอย่าง

$$\begin{aligned} \text{การรายงานผลการทดสอบ} &= C \pm U \text{ หน่วย} \\ \text{โดยที่ } C &= \text{ผลวิเคราะห์} \\ &= 25.39 \% \end{aligned}$$

ดังนั้น การทดสอบสารออกฤทธิ์ thiamethoxam = $25.4 \pm 0.43 \%W/W$

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์โทเอมีทอกแซม (thiamethoxam) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ของสารออกฤทธิ์ thiamethoxam ให้ค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงของการวัด (working Range) อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.8 – 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า r มากกว่า 0.998 ซึ่งเกณฑ์การยอมรับ ค่า $r \geq 0.990$ (CIPAC, 2003) ตรวจสอบความแม่นยำ (precision) ทั้งแบบ repeatability และ within laboratory repeatability ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.69 – 0.96 และ 0.45 – 0.68 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความคงทน (robustness/ ruggedness) โดยการเปลี่ยนแปลงตัวแปรหรือปัจจัยบางอย่างในวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ อุณหภูมิคอลัมน์ และอัตราการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ พบว่า ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.38 – 0.97 ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.3 ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC (2016) การตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) จากค่า %recovery ที่ 3 ระดับความเข้มข้น อยู่ระหว่าง 98.4 – 98.8% ซึ่งอยู่ในช่วง 98 – 102 ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่าร้อยละ 10 ของ AOAC (2016) นอกจากนี้การศึกษาความสามารถในการแยก และความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ thiamethoxam พบว่า ให้พีคของสารทดสอบชัดเจน ไม่มีพีคอื่นมารบกวนพีคของสาร แสดงว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกและมีความเฉพาะเจาะจงที่ดีต่อสารที่ทำการทดสอบ การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (uncertainty) พบว่า ประมาณค่าความไม่แน่นอนสารออกฤทธิ์ thiamethoxam เท่ากับ 25.4 ± 0.43 %W/W ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้ จึงมีความเหมาะสม ที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดแมลงในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สร้างความน่าเชื่อถือแก่ผลการทดสอบ อีกทั้งเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และสามารถนำไปขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025: 2017 ได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรในห้องปฏิบัติการ เพื่อการขึ้นทะเบียนนำเข้าและส่งออก รวมทั้งควบคุมคุณภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตร ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 และรวบรวมเป็นวิธีมาตรฐาน สามารถตีพิมพ์เผยแพร่ให้แก่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาค ส่วนภาครัฐหรือภาคเอกชน และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้อย่างเป็นที่น่าเชื่อถือ
2. ใช้ยื่นขอขยายขอบข่ายการรับรองคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ตามระบบ ISO/IEC 17025: 2017 เพื่อเพิ่มศักยภาพให้กับหน่วยงานและองค์กร

เอกสารอ้างอิง

- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. (2549). แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรุงเทพฯ. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2561). ปริมาณการนำเข้าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปี 2554 - 2560. สืบค้น 1 เม.ย 2565 จาก <http://www.oae.go.th/view/1/ปัจจัยการผลิต/TH-TH>
- Anonymous. (2003). Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. CIPAC 3807. Retrived April 1, 2022, from <https://www.cipac.org/images/pdf/validat.pdf>.
- AOAC. (2016). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Retrived April 1, 2022, from <http://www.eoma.aoac.org>
- Kidd H. and James D.R. (1991). *The Agrochemicals Handbook*. 3rd Ed. England. Royal Society of Chemistry. Cambridge.



Maria Celeste Cardeal de Oliveira and Jim Garvel. (2017). CIPAC Handbook volume O Analysis of Technical and Formulated Pesticides. England. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited.

