

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ เพนดิเมทาลิน
(pendimethalin) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
Method Validation for Determination of the Active Ingredients of
pendimethalin in Pesticide Products

อิสริยะ สืบพันธุ์ดี พนิดา มงคลวุฒิกุล
Issariya Sueppandee Panida Mongkhonwuttikun

กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิชการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Method validation of pendimethalin as the active ingredients in pesticide products was determined by Gas Chromatography (GC) and condition was capillary column : HP-5 (30 m x 0.32 mm (i.d.), 0.25 μ m), carrier gas : Helium, flow rate 2 ml/minute, split injection : split ratio 50 : 1, injection volume : 1 μ l, injector temperature : 270 °C, oven temperature : 230 °C hold 6 minute, detector : flame ionization detector (FID), detector temperature : 270 °C, run time : 6 minute. The results were found that the concentration linearity and range of pendimethalin were 0.10 - 1.50 mg/ml with the coefficient correlation (r) = 0.99992 which had accepted with limit of the correlation coefficient (r) \geq 0.990 (CIPAC, 2003). The precision were in 3 concentration level 0.8 1.0 and 1.2 mg/ml. The precision of HORRAT values for repeatability (n = 10) and Within laboratory repeatability (n = 10) were in the range of 0.31 – 0.36. The HORRAT values for robustness/ruggedness were in the range of 0.31 – 0.76 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 recovery of pendimethalin was in the range of 99.1 % - 100.0 % considered an acceptance by the AOAC (2016) that as 98-102 % for analytical concentrations more than 10 %. This specific method did not have interference from other substances. The measurement uncertainty of pendimethalin was 33 ± 0.71 % W/V at 95 % confidence level. As a result, it was the performance characteristics of this method according to the criteria. This method could be used to determine in pesticide products with accuracy and precision.

Keywords : method validation, active ingredient, pendimethalin

บทคัดย่อ

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทดสอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคือ คอลัมน์ (Column) ชนิด Capillary (HP-5) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร ใช้แก๊สฮีเลียม (He₂) เป็นแก๊สตัวพา อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการ Split injection เท่ากับ 50 : 1 ปริมาณของการฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร อุณหภูมิของการฉีดสาร 270 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Oven 230 องศาเซลเซียส ชนิดของตัวตรวจวัดที่ใช้คือ Flame Ionization Detector (FID) เวลาการทดสอบต่อตัวอย่างเท่ากับ 6 นาที พบว่าค่า Linearity และ Working range ให้ความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น

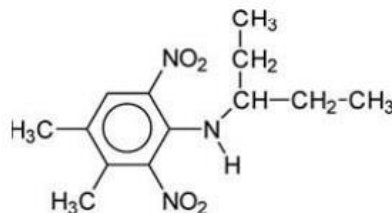
0.10 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥ 0.990 (CIPAC, 2003) ตรวจสอบความเที่ยง Repeatability (n = 10) และ Within laboratory repeatability (n = 10) วิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.31 – 0.36 ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.31 – 0.76 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) คือ 0.3 – 1.3. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ได้ค่า % recovery ของ pendimethalin อยู่ในช่วง 99.1 – 100.0 ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (2016) วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ pendimethalin เท่ากับ 33 ± 0.71 % W/V ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ

คำหลัก : ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สารออกฤทธิ์ เพนดิเมทาลิน

คำนำ

จากสถิติปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช เพนดิเมทาลิน ระหว่างปี 2560 – 2563 พบว่าปริมาณการนำเข้ามีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี โดยปี 2563 มีการนำเข้าเพนดิเมทาลินสูงเป็นอันดับที่ 8 ของสารกำจัดวัชพืช มีการนำเข้าสูงถึง 1,791,336.41 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 199,529,247.36 บาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2563)

pendimethalin เป็นสารกำจัดวัชพืชแบบเลือกทำลาย ในกลุ่ม dinitroanilines เป็นสารดูดซึมเข้าทางรากและใบวัชพืช ทำให้วัชพืชตายอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มออกขณะไผ่พื้นผิวดิน กลไกออกฤทธิ์ต่อส่วนปลายรากของวัชพืช ยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว ส่งผลยับยั้งการแบ่งเซลล์และการยึดตัวของเซลล์ส่วนระบบราก ทำให้ต้นอ่อนวัชพืชชะงักการเจริญและตายก่อนไผ่พื้นผิวดิน ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ pendimethalin (Mohamed, 2019)

กรมวิชาการเกษตรเป็นหน่วยงานหลักในการกำกับดูแล การขึ้นทะเบียน การออกไปสำคัญ การต่ออายุใบสำคัญ การขึ้นทะเบียนวัตถุอันตราย และการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรมี มีหน้าที่ศึกษา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนาและวิธีการตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษทางการเกษตร ตรวจสอบ ทดสอบ พิสูจน์วัตถุอันตราย เพื่อการควบคุมวัตถุอันตรายตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตรายรวมทั้งศึกษาการเสื่อมคุณภาพของวัตถุมีพิษ ตลอดจนให้บริการวิเคราะห์ ตรวจสอบคุณภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรทั้งก่อนและภายหลังการขึ้นทะเบียนต้องมีคุณภาพตรงตามที่แจ้งไว้บนฉลากข้างขวด เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ pendimethalin จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำเพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีการทดสอบ pendimethalin มีความน่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับได้ในระดับสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (Gas Chromatograph, GC) ตัวตรวจวัดที่ใช้คือ Flame Ionization Detector (FID)
2. คอลัมน์ (Column) ชนิด Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl - methylpolysiloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. เครื่อง Ultrasonic bath
5. ขวดวัดปริมาตรชนิด Type A ขนาด 10 25 50 100 200 500 และ 1,000 มิลลิลิตรที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
6. Auto-pipette ขนาด 1 – 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
7. ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
8. ขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร
9. กรวยกรอง

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน pendimethalin 97.34 % W/W
2. ผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช pendimethalin 33 % W/V EC
3. อะซิโตน (Acetone) ชนิด AR grade

วิธีการ

1. การปรับภาวะเครื่อง Gas Chromatograph (GC) ชนิด Flame Ionization Detector (FID) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ pendimethalin ดังนี้

คอลัมน์ชนิด	:	Capillary ภายในเคลือบด้วย 5% phenyl-methylpolysiloxane (HP-5) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร ความหนาของฟิล์ม (film thickness) 0.25 ไมโครเมตร
อุณหภูมิ Injector	:	270 °C
อุณหภูมิ Oven	:	230 °C hold for 6 min
อุณหภูมิ Detector	:	270 °C
Split ratio	:	Split 50 : 1
แก๊สตัวพา	:	แก๊สฮีเลียม (He ₂) อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรการฉีดสาร	:	1 ไมโครลิตร
แก๊สจุดเปลวไฟ	:	แก๊สไฮโดรเจน (H ₂) อัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที
	:	Air อัตราการไหล 450 มิลลิลิตรต่อนาที
Make up gas	:	แก๊สไนโตรเจน (N ₂) อัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที

ทดสอบความพร้อมของเครื่อง GC ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ โดยทำการฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง GC ซ้ำกันหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งพื้นที่ใต้ peak ของสารละลายมาตรฐานที่ฉีดติดต่อกันมีความแตกต่างกันไม่เกิน 2% (% RPD)

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ pendimethalin

2.1 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ซังสารมาตรฐาน pendimethalin 97.34 % W/W ให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ครอบคลุมช่วงการใช้งาน 6 ความเข้มข้น คือ 0.10 – 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนประมาณครึ่งขวด ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแบ่งสารละลายตัวอย่าง pendimethalin ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และคำนวณค่า Correlation Coefficient (r) ซึ่งค่า r ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.990

2.2 ตรวจสอบช่วงของการวัด (Working range)

เลือกความเข้มข้นของสารมาตรฐาน pendimethalin 97.34 % W/W ในช่วงที่เป็นเส้นตรง 6 ความเข้มข้น จากข้อ 2.1 ที่อยู่ใกล้เคียงการใช้งานจริง จากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานเช่นเดียวกับข้อ 2.1 เพื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่า response (แกน Y) พิจารณาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และคำนวณค่า Correlation Coefficient (r) ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥ 0.990 (CIPAC, 2003)

2.3 ตรวจสอบความเที่ยง (Precision)

2.3.1 ซังสารมาตรฐาน pendimethalin 97.34 % W/W ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 2 ซ้ำ ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

นำตัวอย่าง pendimethalin 33 % W/W EC เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซังตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอน ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซ้ำ ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแบ่งสารละลายตัวอย่าง pendimethalin ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp.}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT (ทีพวรรณ, 2549 ; AOAC, 2016) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex (ทีพวรรณ, 2549 ; AOAC, 2016)

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ repeatability})$$

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ reproducibility})$$

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC (ทีพวรรณ, 2549; AOAC, 2016)	ยอมรับ	HORRAT	< 2
EU, Codex (ทีพวรรณ, 2549)	ยอมรับ	HORRAT	≤ 2

2.3.2 Within laboratory repeatability เป็นการทดสอบจากห้องปฏิบัติการเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ในวันและเวลาต่างกัน โดยซังสารมาตรฐาน pendimethalin 97.34 % W/W ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 2 ซัง ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายประมาณครึ่งขวด ปิดจุก นำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาตั้งทิ้งให้เย็น ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมตัวทำละลายจนถึงขีดปริมาตร แบ่งสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร

นำตัวอย่าง pendimethalin 33 % W/V EC เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ซังตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอน ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 10 ซัง ครอบคลุมช่วงที่ใช้งาน ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม acetone ประมาณครึ่งขวด ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแบ่งสารละลายตัวอย่าง pendimethalin ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (%RSD_{exp.}) กับที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) และประเมินด้วย HORRAT (ทีพวรรณ, 2549 ; AOAC, 2016) โดย HORRAT ต้องมีค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC, EU และ Codex (ทีพวรรณ, 2549 ; AOAC, 2016)

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ตามสูตร

$$\%RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ repeatability})$$

$$\%RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad (\text{สำหรับ reproducibility})$$

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

เกณฑ์ยอมรับค่า Precision

AOAC (ทีพวรรณ, 2549 ; AOAC, 2016)	ยอมรับ	HORRAT	< 2
EU, Codex (ทีพวรรณ, 2549)	ยอมรับ	HORRAT	≤ 2

2.4 ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness

วิเคราะห์ตัวอย่าง pendimethalin 33 % W/V เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 โดยทำการเปลี่ยนเครื่อง GC (ตรวจสอบ Robustness) เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ในการทดสอบจาก 230 °C เป็น 240 °C เปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่จาก 2.0 ml/min เป็น 2.2 ml/min และเปลี่ยนทั้งอุณหภูมิของคอลัมน์ในการทดสอบและเปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (ตรวจสอบ Ruggedness) คำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) และประเมินด้วย HORRAT

2.5 ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy)

2.5.1 เตรียม Stock standard

เตรียมสารละลาย pendimethalin 97.34 % W/W ที่ความเข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐาน pendimethalin 97.34 % W/W ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 1027.33 มิลลิกรัม ลงในปิ๊กเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสุญญากาศปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone หลายๆ ครั้ง ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วย acetone

3.5.2 เตรียม Stock sample

เตรียมสารละลาย pendimethalin 33 % W/V EC ที่ความเข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งตัวอย่าง pendimethalin 33 % W/V ให้ได้น้ำหนักของสารออกฤทธิ์ประมาณ 1,515.15 มิลลิกรัม ลงในปิ๊กเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วย acetone ผ่านกรวยกรองสุญญากาศปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร กลั้วด้วย acetone หลายๆ ครั้ง ปิดฝา นำไปเขย่าด้วยเครื่องด้วยเครื่อง Ultrasonic bath ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วย acetone

3.5.3 เตรียม Original sample

เปิด Stock sample จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 6 7.5 และ 9 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแบ่งสารละลายตัวอย่าง pendimethalin 33 % W/V ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC ได้ค่า F โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 2.3.1

3.5.4 เตรียม Fortified sample

เปิด Stock sample จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 6 7.5 และ 9 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชุด ๆ ละ 10 ซ้ำ จากนั้นเปิดสารละลาย Stock standard จากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 2.8 3.5 และ 4.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ อย่างละ 10 ซ้ำ ปรับปริมาตรด้วย acetone เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันแบ่งสารละลายตัวอย่าง pendimethalin ใส่ลงในขวด Vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท ฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง GC ได้ค่า F โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานข้อ 2.3.1 และคำนวณค่า % Recovery โดยต้องอยู่ในช่วง 98 - 102 % ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณ 10 % ขึ้นไปของ AOAC (2016)

สูตรการคำนวณหา % Recovery

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

A_{spike} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลายตัวอย่างรวมกับสารมาตรฐานที่เติม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

A_{origin} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

A_{add} = ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เติมลงในสารละลายตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.6 ตรวจสอบ Selectivity และ Specificity

ฉีด Blank solution สารละลายมาตรฐาน และ Sample ของ pendimethalin เข้าเครื่อง GC พิจารณาโครมาโทแกรมดูว่ามีพีคของสารอื่นมารบกวนสารออกฤทธิ์ที่วิเคราะห์หรือไม่

3.7 ตรวจสอบการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการหาปริมาณสาร pendimethalin และรายงานความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.7.1 ขั้นตอนการหาค่าความไม่แน่นอน

1. หาแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน

- เครื่องมือ เช่น ความละเอียดของเครื่องมือ ความเที่ยงของเครื่องมือ
- สารเคมี เช่น ความบริสุทธิ์ของสารเคมี grade ของสารเคมี
- วิธีวิเคราะห์

2. หลักการคิดความไม่แน่นอน

- ความไม่แน่นอนมาตรฐาน (U_x) = $\frac{a}{d}$

a = ความเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือความไม่แน่นอนจากใบรับรองการสอบเทียบ

d = ตัวหารขึ้นอยู่กับลักษณะการกระจายของข้อมูล

3. การหาความไม่แน่นอนรวม (U_c)

- กรณีหน่วยวัดเดียวกัน $U_c = \sqrt{U_{x1}^2 + U_{x2}^2 + \dots + U_{xn}^2}$
- กรณีหน่วยวัดต่างกันต้องเปลี่ยนค่า U_x จากแต่ละแหล่งให้เป็นความเบี่ยงเบนความไม่แน่นอนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard uncertainty, Ru)

$$RU = \frac{U_x}{X}$$

เมื่อ X = ค่าของ parameter นั้น

$$U_c = C \sqrt{R_{u1}^2 + R_{u2}^2 + \dots + R_{un}^2}$$

เมื่อ C = ผลที่ได้จากการวิเคราะห์

4. การหาความไม่แน่นอนขยาย

$$U = 2U_c$$

5. รายงานผลการทดสอบตัวอย่าง

ผลการทดสอบ = C ± U หน่วย

C = ผลวิเคราะห์

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

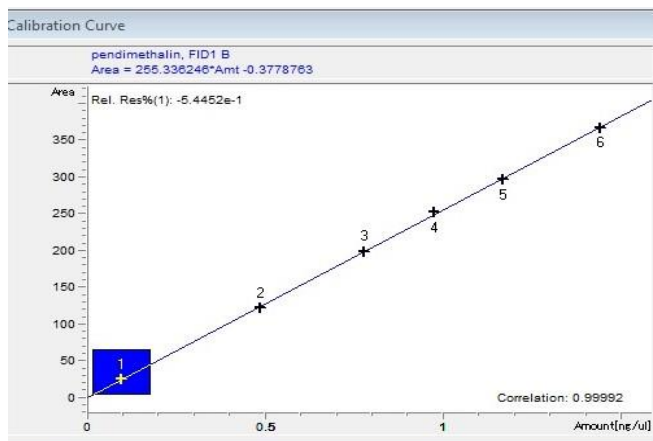
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืชการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช โดยหาค่าคุณลักษณะเฉพาะต่างๆ ได้แก่ Linearity Working Range Precision Robustness Ruggedness Accuracy Selectivity Specificity และค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ แล้วนำมาหาค่าและประเมินการยอมรับดังนี้

1. ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity)

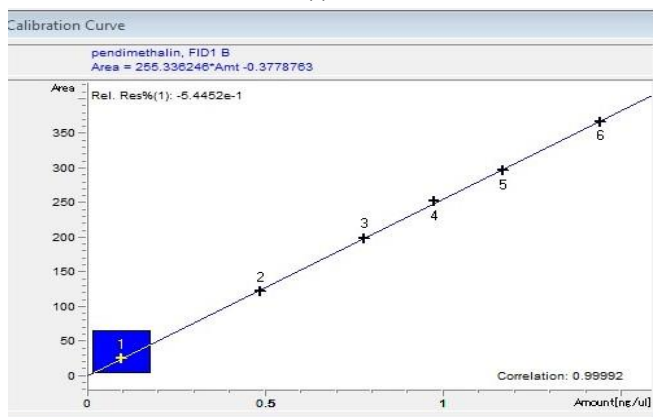
พบว่า pendimethalin ให้ความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.10 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation Coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของ pendimethalin

2. ตรวจสอบช่วงของการใช้งาน (Working Range)

พบว่า Working Range ของ pendimethalin ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.10 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation Coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงช่วงของการใช้งาน (Working Range) ของ pendimethalin

3. ตรวจสอบความเที่ยง (Precision) สำหรับ Repeatability (n = 10) และ Within laboratory repeatability (n = 10) พบว่า pendimethalin ค่า Precision วิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.8 1.0 และ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ยของ pendimethalin อยู่ในช่วง 32.58 – 33.36 % W/V ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation, %RSD) ที่คำนวณได้จากการทดลอง (%RSD_{exp}) มีค่าน้อยกว่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) ดังนั้นการประเมินด้วย HORRAT ของ pendimethalin มีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (ตารางที่ 1)

อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC และ EU, Codex วิธีวิเคราะห์ pendimethalin ให้ผลการทดสอบ Precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 1 การตรวจสอบ Precision Repeatability (n = 10) และ Within laboratory repeatability (n = 10) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	ความเข้มข้น (mg/ml)	Repeatability n = 10				Within laboratory repeatability n = 10			
		mean	%RSD _{exp}	%RSD _{horwitz}	HORRAT	mean	%RSD _{exp}	%RSD _{horwitz}	HORRAT
pendi	0.8	32.99	0.83	2.27	0.36	32.58	0.81	2.27	0.36
methalin	1.0	33.06	0.70	2.27	0.31	33.05	0.72	2.27	0.32
	1.2	33.36	0.70	2.27	0.31	33.15	0.80	2.27	0.35

4. ตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness พบว่า pendimethalin วิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่าเฉลี่ยของ pendimethalin อยู่ในช่วง 32.58 – 33.59 % W/V ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation,%RSD) ที่คำนวณได้จากการทดลอง (%RSD_{exp}) มีค่าน้อยกว่าที่คำนวณได้จาก Horwitz's equation (%RSD_{Horwitz}) ดังนั้นการประเมินด้วย HORRAT ของ pendimethalin มีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (ตารางที่ 2) อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามเกณฑ์พิจารณาของ AOAC EU และ Codex วิธีวิเคราะห์ pendimethalin ให้ผลการทดสอบ Robustness และ Ruggedness อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 2 การตรวจสอบ Robustness และ Ruggedness ที่ 3 ระดับความเข้มข้นของเพนดิเมทาลิน

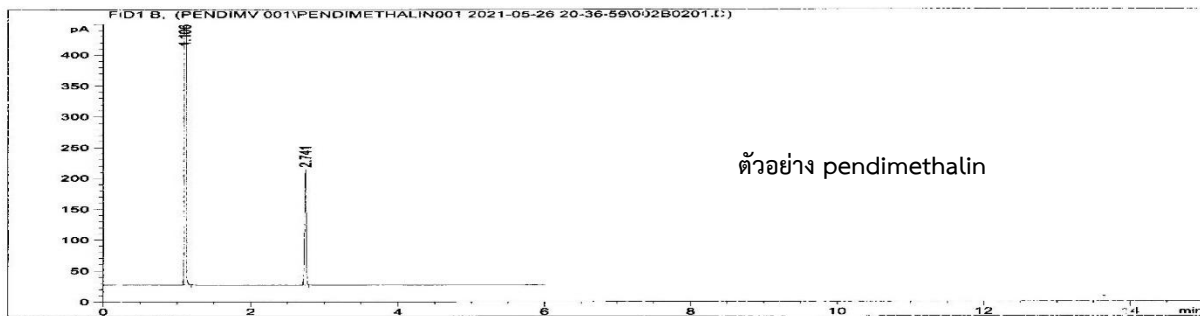
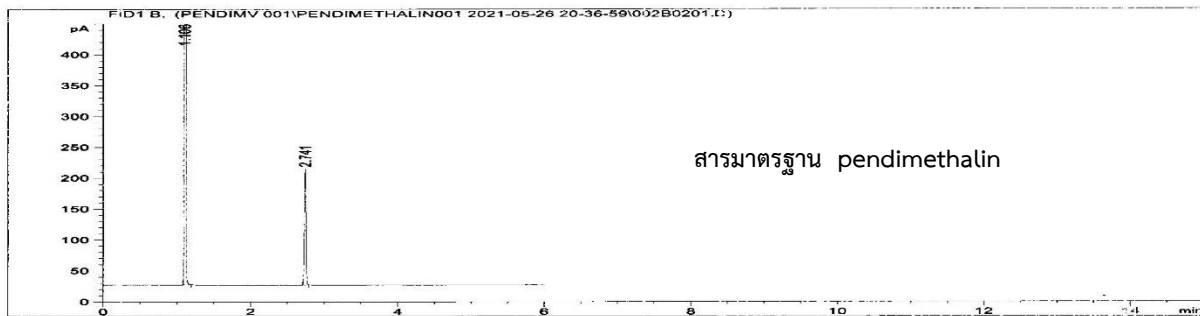
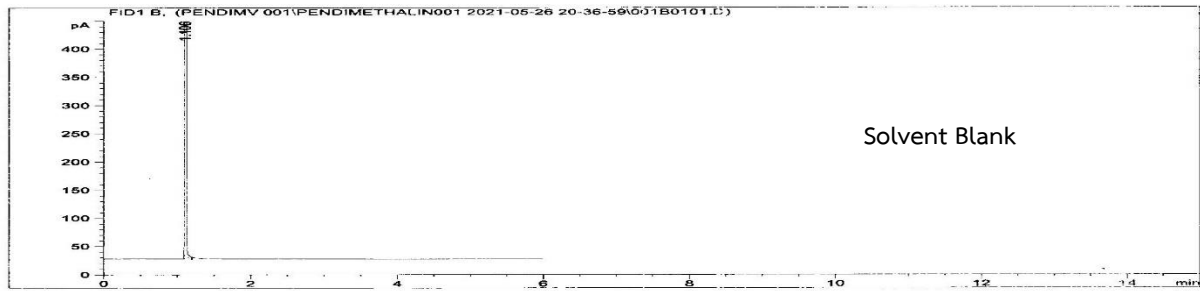
สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช	สถานะของเครื่อง	ความเข้มข้น (mg/ml)	Robustness / Ruggedness			
			mean	%RSD _{exp}	%RSD _{horwitz}	HORRAT
pendimethalin	เปลี่ยนเครื่อง GC	0.8	32.58	0.81	2.27	0.36
		1.0	33.05	0.72	2.27	0.31
		1.2	33.15	0.80	2.27	0.35
	เปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์	0.8	32.67	1.71	2.27	0.76
		1.0	33.29	0.76	2.27	0.34
		1.2	33.06	1.01	2.27	0.45
	เปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	0.8	33.10	0.90	2.27	0.40
		1.0	33.11	1.00	2.27	0.44
		1.2	33.59	0.80	2.27	0.35
	เปลี่ยนทั้งอุณหภูมิของคอลัมน์และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่	0.8	33.20	0.93	2.27	0.41
		1.0	33.20	0.93	2.27	0.41
		1.2	33.30	0.87	2.27	0.38

5. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) โดยหาค่า % Recovery ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป ในสารละลายตัวอย่างมี 3 ระดับความเข้มข้น ระดับละ 10 ซ้ำ พบว่า pendimethalin ค่า Accuracy วิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ % Recovery เท่ากับ 99.5 99.1 และ 100.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (%Recovery สำหรับสารที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10 % คือ 98 – 102)

ตารางที่ 3 การตรวจสอบ Accuracy ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ในตัวอย่าง

ลำดับ	Active ingredient ของ pendimethalin content (mg/ml)								
	Conc. 0.56 mg/ml			Conc. 0.70 mg/ml			Conc. 0.84 mg/ml		
	add	origin	spiked	add	origin	spiked	add	origin	spiked
1	14.0	5.938	19.82	17.5	7.262	24.73	21.0	8.693	29.56
2	14.0	5.670	19.65	17.5	7.103	24.53	21.0	8.675	29.65
3	14.0	5.625	19.59	17.5	7.067	24.33	21.0	8.681	29.91
4	14.0	5.754	19.68	17.5	7.374	24.54	21.0	8.608	29.50
5	14.0	5.423	19.15	17.5	7.282	24.56	21.0	8.865	30.14
6	14.0	5.631	19.39	17.5	6.397	24.03	21.0	8.551	29.22
7	14.0	5.865	19.93	17.5	6.938	24.13	21.0	8.576	29.76
8	14.0	5.606	19.42	17.5	6.958	24.36	21.0	8.567	29.37
9	14.0	5.881	19.92	17.5	7.282	24.60	21.0	8.517	29.48
10	14.0	5.774	19.86	17.5	7.143	24.47	21.0	8.920	30.14
Mean	14.0	5.717	19.64	17.5	7.080	24.43	21.0	8.66	29.67
SD	-	-	0.259	-	-	0.218	-	-	0.313
%Recovery		99.5			99.1			100.0	
%Recovery เฉลี่ย		99.5							

6. ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงโดยฉีด Solvent Blank สารมาตรฐาน pendimethalin และตัวอย่าง pendimethalin พบว่าเป็นวิธีที่สามารถตรวจ pendimethalin ได้ (Selectivity) และมีความจำเพาะเจาะจง (Specificity) เนื่องจาก Chromatogram ของ สารมาตรฐาน มีพีคที่แยกออกจากกันชัดเจน และไม่มีพีคของสารอื่นมารบกวนการวิเคราะห์ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Solvent Blank สารมาตรฐาน pendimethalin และ ตัวอย่าง pendimethalin

7. ประเมินค่าความไม่แน่นอนของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืช พบว่าประมาณค่าของความไม่แน่นอนของการทดสอบเป็น $33.0 \pm 0.71 \% W/W$ ที่ความเชื่อมั่น 95 % ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงวิธีการคำนวณค่าความไม่แน่นอนของ pendimethalin

แหล่ง	unit	value(X)	ux	Ru(ux/X)	(ux/X)^2
um, balance sample	g	0.076	1.02479E-05	1.348E-04	1.818E-08
us, balance standard	g	0.010	1.02479E-05	1.0248E-03	1.050E-06
u Vol std.	ml	10	2.9073E-02	2.9073E-03	8.452E-06
u Vol sample	ml	25	7.2264E-02	2.8905E-03	8.355E-06
u std.	-	0.9734	0.005	5.1366E-03	2.639E-05
repeat	g	33	0.276551	8.3803E-03	7.023E-05
				sum	1.145E-04
				sqrt	1.070E-03
			uc	38.40*sqrt	3.531E-01
			U	uc*2	0.71 %

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) ในผลิตภัณฑ์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งทดสอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) ให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง จากการตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) พบว่าค่า Linearity และ Working range ให้ความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.10 – 1.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99992 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ≥ 0.990 (CIPAC, 2003) ตรวจสอบความเที่ยง Repeatability (n = 10) และ Within laboratory repeatability (n = 10) วิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.8 1.0 และ 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.31 – 0.36 ตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.31 – 0.76 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์พิจารณาของ AOAC (2016) คือ 0.3 – 1.3. ตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) ได้ค่า % recovery ของ pendimethalin อยู่ในช่วง 99.1 – 100.0 ตามเกณฑ์พิจารณาสำหรับสารที่มีปริมาณมากกว่า 10 % ของ AOAC (2016) วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ไม่มีการรบกวนของสารอื่น และประมาณค่าความไม่แน่นอนของการทดสอบ pendimethalin เท่ากับ 33 ± 0.71 % W/V ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากผลการทดสอบดังกล่าว พบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์วัตถุมีพิษการเกษตรได้อย่างถูกต้องและอยู่ในเกณฑ์กำหนด

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการทดสอบที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อใช้ในการยื่นขอการรับรองห้องปฏิบัติการหรือขอขยายขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2017 สำหรับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตร ทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาค
2. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้กับ บริษัท ห้างร้าน ที่ขออนุญาตการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการเกษตรกับกรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ฯ ทั้งก่อนและภายหลังจากได้รับการอนุญาตให้จำหน่ายในท้องตลาด และให้เกษตรกรได้ใช้ผลิตภัณฑ์ฯ ที่มีคุณภาพสามารถนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- AOAC official methods of analysis. 2016. Guidelines for standard method performance requirements Appendix F, p. 9-14
- CIPAC. (2003). Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. CIPAC. (2003).
- Mohamed, A.A., 2019. Evaluation of the Effectiveness of Some Herbicides in the Growth and Yield of Maize (*Zea mays* L.) and Associated Weed. Ph.D. Mosul University.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2563. “10 อันดับ การนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี 2563 โดยปริมาณ สารกำจัดวัชพืช”. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา <https://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2021/01/10-อันดับ-การนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร-pdf>