

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองสิ้นสุด ปี 2558

1. **ชุดโครงการวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนามาตรฐานระบบตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กิจกรรม : 1. พัฒนาการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สารควบคุมการเจริญเติบโต สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร
กิจกรรมย่อย : 1.5 การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบรับรองผลิตภัณฑ์วัตถุที่มีพิษทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** 1.5.9 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษทางการเกษตร Hexazinone
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Method Validation of Hexazinone in Pesticide Formulations
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**
 หัวหน้าการทดลอง จิราพรรณ ทองหยอด กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
 ผู้ร่วมงาน ฉลองรัตน์ หมั่นขวา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
5. **บทคัดย่อ**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์เฮกซาซีนอน (Hexazinone) ทดสอบด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้ตัวตรวจจับชนิด Diode Array (DAD) วิเคราะห์โดยใช้ column C-18 (Poroshell 120, EC-C18 2.7 μ m) สารตัวอย่างละลายด้วย acetonitrile เขย่าสารด้วยเครื่อง ultrasonic ได้สถานะที่เหมาะสม คือ อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วน Mobile phase น้ำต่ออะซิโตนไตรล์ (50:50) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 1.0 ไมโครลิตร เวลาในการฉีด 4.0 นาที ผลการทดลอง ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นสาร (Technical grade) เท่ากับ 95.44% ค่า Working Rang ได้ช่วงความเข้มข้น 0.05–0.150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Correlation coefficient เท่ากับ 0.99998 ค่า Linearity ได้ช่วงความเข้มข้น 0.001–0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99997 ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (AOAC ค่า $r \leq 0.995$) ค่า Accuracy หาจาก %Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.06 0.10 และ 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 100.2 ผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (เกณฑ์ยอมรับอยู่ระหว่าง 98 - 102) การวิเคราะห์ซ้ำ (Precision) ใช้ Repeatability และ Within Laboratory Reproducibility ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.51 และ 1.56 ตามลำดับ และตรวจสอบความแข็งของวิธีโดยใช้ Robustness/ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.68 และ 1.35 ตามลำดับ ผลการทดสอบทุกพารามิเตอร์ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งหมด (เกณฑ์ยอมรับ AOAC ค่า HORRAT < 2, Codex,EU ≤ 2)

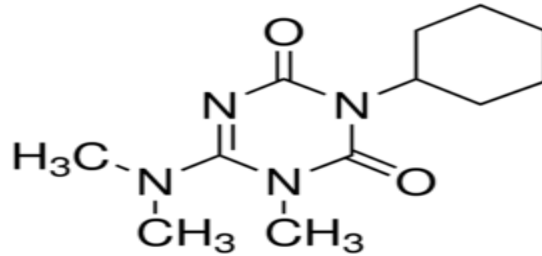
Abstract

The validation of analytical methods was performed to determine active ingredient, hexazinone, is experimentation by using High Performance liquid chromatography with diode array detector (DAD). The analysis was separated with column C-18 (Poroshell 120, EC - C18 2.7 μm), and samples were prepared with acetonitrile and ultrasonic extraction. The result of optimization methods got a flow rate 2 ml/min, mobile phase water : acetonitrile (50 : 50), wave length 254 nm, column temperature 40°C, injection volume 1.0 μL , stop time 4.0 min. The experimental results were conducted under parameters. The technical grade was 99.44%, The working range was concentrations from 0.050 to 0.150 mg/ml with a correlation coefficient (r) was 0.99998. The linearity using concentration is from 0.001 to 0.250 mg/ml with a correlation coefficient (r) was 0.99997 (Accepted by the AOAC $r \geq 0.995$). Accuracy considers from %recovery, this is an examination using concentration 3 levels are 0.06, 0.100 and 0.140 mg/ml, found the mean average was 100.2 (Accepted by AOAC, %Recovery of 98 – 102). Precision uses repeatability and within Laboratory reproducibility that HORRAT value was 1.51 and 1.56, respectively. Determine the hardness of the method using robustness/ruggedness, it was found that HORRAT value was 1.68 and 1.35, respectively. From the test results, validation method parameters are acceptable. (Accepted by the AOAC HORRAT < 2 , Codex, EU ≤ 2)

6. คำนำ

เฮ็กซาซีนอนเป็นสารกำจัดวัชพืช triazine ประเภทไม่เฉพาะเจาะจงพืช กำจัดวัชพืชแบบ ก่อนงอกและ ภายหลังงอก ซึมผ่านเข้าลำต้นได้ทั้งทางใบและทางราก มีพิษเฉียบพลันทางปาก (หนู) 1,690 มก./กก. ทางผิวหนัง มากกว่า 5,278 มก./กก. ทำให้ดวงตาระคายเคือง ใช้ทั้งวัชพืชใบแคบและใบกว้าง เช่น หญ้าข้าวนก หญ้าตีนนก หญ้าพง ผักโขม ผักเบี้ยและวัชพืชอื่นๆ (ปรีชา, 2537) เฮ็กซาซีนอน มีชื่อทางเคมี คือ 3-cyclohexyl-6-dimethylamino-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4-(1H,3H)-dione. (ตามระบบ IUPAC) มีสูตรทางเคมี คือ $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ น้ำหนักโมเลกุล 252.31 มีสูตรโครงสร้างตามภาพประกอบ 1 สารบริสุทธิ์มีลักษณะไม่มีสี คงสภาพได้

ดีที่ pH ระหว่าง 5-9 มีหลอมเหลว 115 - 117 องศาเซลเซียส คงสภาพได้ดีในกรด ต่าง และแสง (Anonymous,1993)



ภาพประกอบ 1. สูตรโครงสร้างของเฮกซาไซโนน (Anonymous, 1993)

การตรวจสอบคุณภาพปริมาณเฮกซาไซโนนมีวิธีวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน CIPAC Handbook Vol.L สภาวะของเครื่องตามวิธีมาตรฐาน คือใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ใช้ตัวตรวจจับชนิด Diode array (DAD) คอลัมน์ 250 x 4.6 mm (i.d.) Zorbax RX-C8 สภาวะของวิธีวิเคราะห์ อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วน Mobile phase น้ำ pH7.0 (with Phosphoric acid) ต่ออาซีโตไนไตรล์ (50:50) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 5 ไมโครลิตร เวลาในการวิเคราะห์ 4 นาที (Dobrat W. and A Martijn H. 2000) เพื่อให้การวิเคราะห์ เป็นไปได้ด้วยความรวดเร็วและลดระยะเวลา ซึ่งการทำตามวิธีมาตรฐานไม่สามารถทำได้ การปรับปรุงหรือปรับเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์จึงมีความสำคัญกับผู้วิเคราะห์ และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบ สำหรับประเมินคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นที่ยอมรับ ทั้งระหว่างห้องปฏิบัติการเองและผู้รับบริการ

งานวิจัยนี้ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์เฮกซาไซโนนในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางเภสัช สูตร SL โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD) ใช้ Column C-18 (Poroshell 120, EC-C18 2.7 μ m) แทน Column Zorbax RX-C8 เปลี่ยนสภาวะของเครื่อง โดยปรับอัตราการไหล เป็น 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้สอดคล้องกับเครื่อง HPLC รุ่นใหม่ (Ultra High Performance Liquid Chromatography) และขนาด column ที่เล็กลง ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามข้อกำหนดต่างๆ ของ Method Validation ได้แก่ ทดสอบช่วงของการวัด (Working Range) ช่วงที่เป็นเส้นตรง (Linearity) การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) และการตรวจความเที่ยง (Precision) และความแข็งแกร่งของวิธี (Robustness/Ruggedness) (Huber, 1998)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Ultra High Performance Liquid Chromatograph มีตัวตรวจจับชนิด DAD Detector

2. คอลัมน์ชนิด Poroshell 120, EC-C18 2.7 μm (C-18)
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ซึ่งได้ระดับ 0.1 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการสอบเทียบ
4. Ultrasonic bath
5. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร (class A) ที่ผ่านการสอบเทียบ
6. ปิเปต 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. สารมาตรฐานเฮ็กซาซีนอนความบริสุทธิ์ 98.0 %
2. สารเข้มข้นสูง (Technical material) ของเฮ็กซาซีนอน สุทธ 96.0% min.Tech.
3. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของเฮ็กซาซีนอน สุทธ SL (25% w/v)
4. สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile HPLC grade)
5. กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid 85%)

วิธีการ

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ Technical grade Hexazinone

1.1 การปรับตั้งสภาวะเครื่อง HPLC-DAD

Column	: Poroshell 120, EC-C18 2.7 μm
Mobile phase	: Water: Acetonitrile (50:50)
Flow rate	: 0.2 ml/min
Column temperature	: 40 °C
Wavelength	: 254 nm
Injection volume	: 1 μl
Run time	: 4.0 min

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฮ็กซาซีนอน

ซึ่งสารมาตรฐานเฮ็กซาซีนอนปริมาณสารออกฤทธิ์ประมาณ 10 มิลลิกรัม จำนวน 2 ซ้ำ (C_A, C_B) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยอะซิโตไนไตรล์ เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์

1.3 การเตรียมสารละลายสารเฮ็กซาซีนอน

ซึ่งสารเข้มข้นเฮ็กซาซีนอนคลุกสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 10 มิลลิกรัม จำนวน 10 ซ้ำ (TC_1-TC_{10}) ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยอะซิโตไนไตรล์เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตไนไตรล์

เมื่อปรับตั้งสถานะของเครื่อง HPLC-DAD เรียบร้อยแล้ว และรอจนกระทั่ง baseline เรียบ ทดลองฉีดสารละลายมาตรฐาน C_A และ C_B สลับกันหลายๆครั้ง จนได้ค่า response factor ที่คำนวณได้จากการ ฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกิน 1% จากนั้นฉีดสารละลายของสารเข้มข้นสูงเฮ็กซาซิโนน ตามลำดับดังนี้

สารเข้มข้นสูง $C_A C_A, TC_1 TC_1, T_2 C_2, TC_3 TC_3, C_B C_B, \dots$

1.4 การคำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ เฮ็กซาซิโนน

โดยเริ่มจากการคำนวณค่า response factor (f) จากสูตร

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

โดยที่ S = น้ำหนักสารมาตรฐาน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

P = ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานเฮ็กซาซิโนน หน่วยเป็นกรัม/กิโลกรัม

H_S = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน เฮ็กซาซิโนน

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

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

นำค่า response factor เฉลี่ยที่ได้คำนวณปริมาณสารออกฤทธิ์ จากสูตร

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

โดยที่ W = น้ำหนักสารละลายของสารเข้มข้น เฮ็กซาซิโนน หน่วยเป็นมิลลิกรัม

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

H_W = พื้นที่ใต้พีคของสารละลายของสารเข้มข้นสูงเฮ็กซาซิโนน

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์เฮ็กซาซิโนนสูตร SL

2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Working Range/Linearity)

2.1.1 ค่า Linearity

2.1.1.1 เตรียมสารเข้มข้นเฮ็กซาซิโนนที่ทราบเปอร์เซ็นต์แน่นอน และคลุกให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วชั่งสารให้มีสารออกฤทธิ์เฮ็กซาซิโนนครอบคลุมความเข้มข้นช่วงการใช้งาน 5 ความเข้มข้น นั่นคือ 0.010 - 0.250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย อาซีโตไนไตรล์

2.1.1.2 นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC-DAD ที่เตรียมสถานะเครื่องตามข้อ 1.1 โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมาก

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

2.1.2 ค่า Working Range

2.1.2.1 เลือกความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง 5 ช่วงความเข้มข้นจากข้อ 2.1.1 ให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงการใช้งานจริง นั่นคือความเข้มข้น 0.050 - 0.150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วยอะซิโตนไตรล โดยฉีดสารละลายเรียงจากความเข้มข้นน้อยไปมากเข้าเครื่อง HPLC-DAD

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

2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

2.2.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นสูงเอ็กซาซิโนน 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วยอะซิโตนไตรล เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไตรลเขย่าให้เข้ากัน

2.2.2 การเตรียมสารละลาย stock sample ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ซึ่งผลิตภัณฑ์ เอ็กซาซิโนน สูตร SL ประมาณ 4,000 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย อะซิโตนไตรล เทผ่านกรวยกรองสู่ขวดวัดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนไตรล

2.2.3 การเตรียมสารละลาย original sample

ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด ปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด ปรับปริมาตรด้วย อะซิโตนไตรล เขย่าให้เข้ากัน และแบ่งใส่ขวด vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC-DAD (ได้ค่า O)

2.2.4 การเตรียมสารละลาย fortified sample

โดยทำ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.060 0.100 และ 0.140 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย stock sample จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ขวด จากนั้น ปิเปตสารละลาย stock ของสารเข้มข้นสูงเอ็กซาซิโนน จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 6, 10 และ 14 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 10 ขวด ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-DAD (ได้ค่า F)

2.2.5 การประเมินค่า accuracy จาก %Recovery

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

เมื่อ F คือ ปริมาณสารเอ็กซาซิโนนในสารละลาย fortified sample, มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

O คือ ปริมาณสารเอ็กซาซิโนนในสารละลาย original sample, มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร

C คือ ปริมาณ added sample, มิลลิกรัม

ค่าความแม่นยำ ต้องได้ %Recovery อยู่ในช่วง 98 – 102 ตามเกณฑ์ AOAC

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision and Within Laboratory Reproducibility)

2.3.1 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นเฮ็กซาซิโนนที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอน เพื่อทำ standard calibration curve โดยเตรียมสารเข้มข้นเฮ็กซาซิโนน ที่ความเข้มข้น 0.05 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายด้วย อาซิโตไนโตรล์ เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่ อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยอาซิโตไนโตรล์ เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายฉีดเข้าเครื่อง HPLC-DAD จะได้ calibration curve ของ standards

2.3.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ เฮ็กซาซิโนน สูตร SL

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างประมาณ 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ เฮ็กซาซิโนนสูตร SL ที่คนให้เป็นเนื้อเดียวกันประมาณ 40 มิลลิกรัม 10 ซ้ำ จำนวน 2 ชุด (Repeatability) ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วยอาซิโตไนโตรล์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาที ปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยอาซิโตไนโตรล์และฉีดเข้าเครื่อง HPLC-DAD และเตรียมอีกชุดหนึ่ง โดยเปลี่ยนวันที่วิเคราะห์ เครื่องมือและผู้วิเคราะห์ (Within Laboratory Reproducibility)

2.3.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ เฮ็กซาซิโนน เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.3.1

2.3.4 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 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness

2.4.1 ทำการเปลี่ยนเครื่องมือวิเคราะห์อีกเครื่องหนึ่งโดย ใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน ภายใต้สภาวะเงื่อนไขอย่างเดียวกัน (Robustness) และทำการปรับเปลี่ยนสภาวะของเครื่องเล็กน้อย (Ruggedness) คือเปลี่ยนอัตราส่วน Mobile phase น้ำ pH3.0 (ปรับด้วย Phosphoric acid) ต่ออาซิโตไนโตรล์ (50:50)

2.4.2 การเตรียมสารละลายของสารเข้มข้นเฮ็กซาซิโนนที่ทราบความบริสุทธิ์แน่นอนเพื่อทำ standard calibration curve ดำเนินการตามข้อ 2.3.1

2.4.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของผลิตภัณฑ์เฮ็กซาซิโนน สูตรSL

เตรียมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างประมาณ 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งผลิตภัณฑ์ เฮ็กซาซิโนนสูตร SL ที่คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ประมาณ 40 มิลลิกรัม 10 ซ้ำจำนวน 2 ชุด (สำหรับ Robustness 1

ชุด และ Ruggedness 1 ชุด) ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ใส่อาซีโตไนโตรล์ 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย ultrasonic bath 5 นาทีปล่อยให้สารละลายปรับตัวเข้าสู่อุณหภูมิห้องปรับปริมาตรด้วยอาซีโตไนโตรล์

2.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ เฮ็กซาซีนอน

โดยฉีดสารละลายตัวอย่างข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง HPLC-DAD เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard calibration curve ข้อ 2.4.2

2.4.5 การคำนวณค่าความเที่ยง ด้วยการประเมินค่า HORRAT ตามสูตร ดังนี้

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

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

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

C คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของ analyte

ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบพืช การเกษตร กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์เฮ็กซาซีนอนในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชโดยใช้เทคนิค HPLC-DAD ทำการเตรียมภาวะของเครื่อง HPLC จากนั้นดำเนินการตรวจสอบตรวจสอบความพร้อมของเครื่อง โดยคำนวณ ค่า response factor (f) ของการฉีดแต่ละครั้งต่างจากค่าเฉลี่ยไม่เกินร้อยละ 1 และดำเนินการตรวจวิเคราะห์ตามขั้นตอน ได้ผลการทดลองดังนี้

1. การตรวจสอบปริมาณที่แน่นอนของสารออกฤทธิ์ Technical grade Hexazinone

เนื่องจากสารมาตรฐานมีปริมาณน้อย ราคาแพง และไม่เพียงพอต่อกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีผู้ทดลองจึงได้นำสารความเข้มข้นสูงมาใช้แทน และก่อนที่จะทำกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีจำเป็นต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารเฮ็กซาซีนอนความเข้มข้นสูง เพื่อให้ทราบปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอน โดยใช้สารละลายมาตรฐานเฮ็กซาซีนอนความบริสุทธิ์ 98.0 %W/W มาเป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของสาร Technical grade ซึ่งตามฉลากระบุเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 96.0% W/W จากการทดลองได้ผลดัง ตาราง 1 และมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ 95.44%

ตาราง 1 เปอร์เซ็นต์ของสาร Technical grade Hexazinone

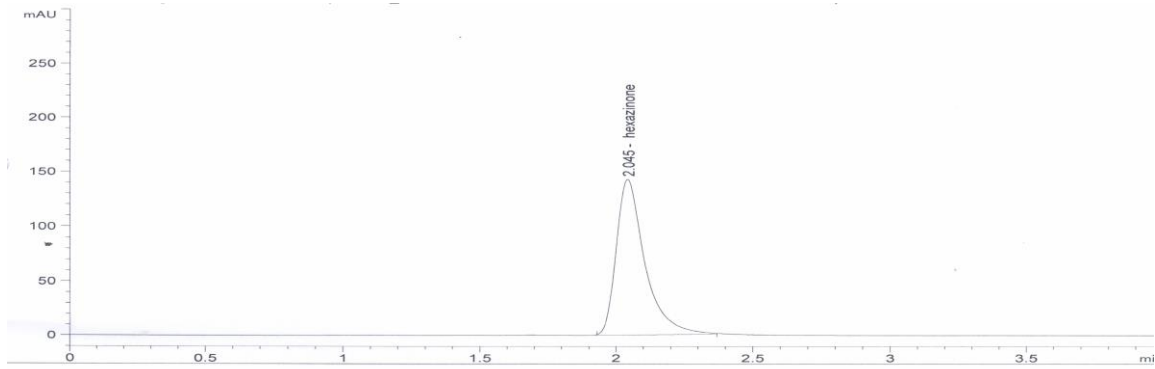
สารละลาย Technical grade Hexazinone	เปอร์เซ็นต์สารออกฤทธิ์
TC1	96.23
TC2	96.22
TC3	96.21
TC4	95.27
TC5	95.18
TC6	94.83
TC7	95.41
TC8	95.64
TC9	94.80
TC10	94.63
เฉลี่ย	95.44
SD	0.61

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของปริมาณสารออกฤทธิ์ เฮกซาซิโนน สูตร SL

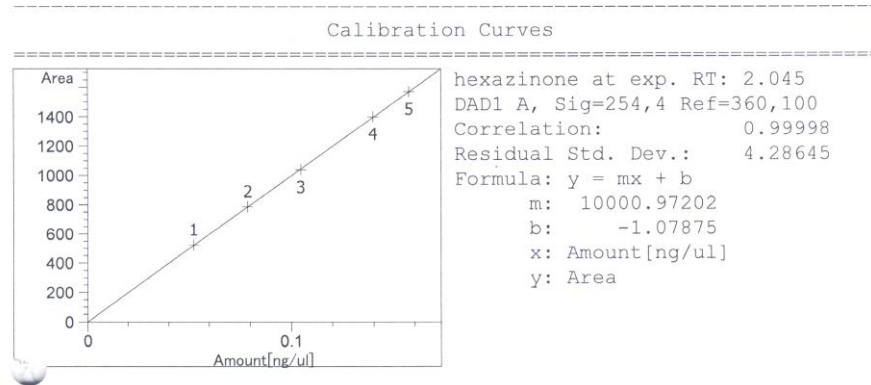
2.1 การตรวจสอบช่วงความเป็นเส้นตรง (Working Range/Linearity)

2.1.1 การตรวจสอบ Working Range

Working Range เป็นการหาช่วงความเข้มข้นหรือปริมาณสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (จิราพรรณ, 2549) การตรวจสอบช่วงของการวัด (Range) โดยชั่งสารให้มีเนื้อสาร 0.050 0.075 0.100 0.125 และ 0.150 ได้โครมาโตแกรม ดังภาพประกอบ 2 และเมื่อพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงจากการวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน X) กับ response (แกน Y) (ภาพประกอบ 3) ได้ช่วงที่เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.050 - 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีความเป็นเส้นตรงมากที่สุด และมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998



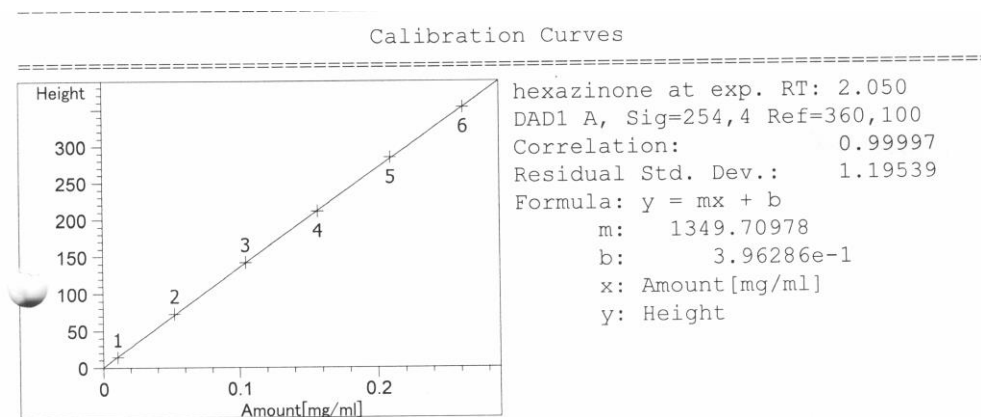
ภาพประกอบ 2 โครมาโตแกรมของ เฮ็กซาซิโนน



ภาพประกอบ 3 กราฟมาตรฐานค่า Working Range ของของเฮ็กซาซิโนน

2.1.2 การตรวจสอบ Linearity

Linearity หาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นหรือปริมาณสารที่ทดสอบกับสัญญาณที่ตรวจวัดได้ ซึ่งเป็นช่วงที่เป็นเส้นตรง ซึ่งจะอยู่ในช่วง 0.001 - 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขยายความเข้มข้น ดังนี้ 0.001 0.050 0.100 0.150 0.200 และ 0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำมาวาดกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน X) กับ response (แกน Y) (ภาพประกอบ 4) มีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99997 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน AOAC ต้องมีค่า $r \geq 0.995$



ภาพประกอบ 4 กราฟมาตรฐานค่า linearity ของของเฮ็กซาซิโนน

2.2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์หรือการตรวจสอบความแม่นยำจะสามารถหาได้จากการทำ Accuracy โดยการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ที่ได้กับวัสดุอ้างอิงจากตัวอย่างเดียวกัน โดยพิจารณาจาก %Recovery ตามสูตรในข้อ 2.2.4 ดำเนินการโดยใช้สารตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เฮ็กซาซิโนน 25% W/V สูตร SL ให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.06 0.10 และ 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 10 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-DAD ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เฮ็กซาซิโนน

ลำดับ	Active ingredient content (mg/100 ml)								
	Concn.(0.06 mg/ml)			Concn.(0.10 mg/ml)			Concn.(0.14mg/ml)		
	add	Origin	Spilke	add	Origin	Spilke	add	Origin	Spilke
1	0.627	1.218	1.840	0.996	1.203	2.206	1.445	1.210	2.614
2	0.627	1.226	1.861	0.996	1.221	2.221	1.445	1.223	2.634
3	0.627	1.216	1.867	0.996	1.225	2.214	1.445	1.221	2.659
4	0.627	1.215	1.880	0.996	1.217	2.250	1.445	1.216	2.683
5	0.627	1.238	1.864	0.996	1.224	2.222	1.445	1.231	2.699
6	0.627	1.227	1.826	0.996	1.228	2.232	1.445	1.228	2.696
7	0.627	1.222	1.840	0.996	1.223	2.227	1.445	1.222	2.662
8	0.627	1.239	1.836	0.996	1.227	2.269	1.445	1.234	2.659
9	0.627	1.239	1.875	0.996	1.215	2.241	1.445	1.222	2.700
10	0.627	1.234	1.843	0.996	1.226	2.252	1.445	1.230	2.700
Mean	0.627	1.227	1.853	0.996	1.221	2.233	1.445	1.224	2.670
SD	-	0.010	0.018	-	0.008	0.019	-	0.007	0.030
%Recovery	99.80			101.01			99.87		
%Recovery	เฉลี่ย			100.2					

จากการทดลองใช้ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.06 0.10 และ 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรได้ค่า%Recovery เท่ากับ 99.80 100.2 และ 99.87 ตามลำดับ และได้ค่า %Recovery เฉลี่ย เท่ากับ 100.2 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ ตามมาตรฐาน AOAC ในช่วง (%Recovery เท่ากับ 98 – 102) ทั้ง 3 ความเข้มข้นและใกล้เคียงกับค่าจริง

2.3 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision/Repeatability and Within Laboratory Reproducibility)

เป็นการตรวจสอบค่าความใกล้เคียงกันระหว่างการวิเคราะห์ข้อมูลซ้ำ โดย Precision/ Repeatability และ Within Laboratory Reproducibility โดยที่ Repeatability ใช้แลปเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คน เดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน และทำ การทดสอบในวันเดียวกันหรือเป็นการทดลองซ้ำในช่วงเวลาสั้นๆ และการ ทดสอบ Within Laboratory Reproducibility ทำการทดสอบเปรียบเทียบโดยเปลี่ยนวันทดสอบ เปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือหรือห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบตัวอย่างที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน (นิรนาม, 2554) ซึ่งจะ แสดงออกในรูป %RSD ของการทดลอง ประเมินโดยใช้ HORRAT equation สามารถคำนวณได้จาก ข้อ 2.3.4 จากการทดลอง ได้ค่า Precision และ Reproducibility ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตรวจสอบ Precision/Repeatability และ Within laboratory reproducibility ในผลิตภัณฑ์ สูตร SL

Number	Concn.(0.10 mg/ml)					
	Repeatability			Within Laboratory Reproducibility		
	%AI1	%AI2	%AI เฉลี่ย	%AI1	%AI2	%AI เฉลี่ย
1	25.09	24.93	25.01	24.14	24.63	24.38
2	25.08	25.25	25.16	24.65	24.65	24.65
3	25.33	25.34	25.33	25.68	25.78	25.73
4	25.01	24.97	24.99	24.15	24.30	24.23
5	24.14	24.35	24.24	24.60	23.95	24.27
6	24.98	25.04	25.01	24.70	24.44	24.57
7	24.41	24.61	24.51	23.70	24.64	24.17
8	25.77	25.77	25.77	25.15	25.17	25.16
9	26.42	26.55	26.48	24.44	24.46	24.45
10	24.97	24.97	24.97	25.41	25.95	25.68

Mean	25.12	25.18	25.15	24.66	24.67	24.73
SD	0.64	0.62	0.63	0.61	0.64	0.59
HORRAT	1.51		1.56			

จากการวิเคราะห์ค่า Repeatability ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 25.12 และ 25.18 (น้ำหนักต่อ น้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่าความคลื่อนสัมพัทธ์ (%RSD_{exp.}) เท่ากับ 0.64 และ 0.62 ตามลำดับ ได้ค่า HORRAT เฉลี่ย 1.51 และการวิเคราะห์ค่า Within Laboratory Reproducibility ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 24.66 และ 24.67 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ได้ค่าHORRATเฉลี่ย 1.56 ซึ่งผลการทดสอบผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้ง 2 แบบ (เกณฑ์ยอมรับของ AOAC ยอมรับ HORRAT < 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT ≤ 2)

2.4 การตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ Robustness/Ruggedness

Robustness เป็นคุณสมบัติที่แสดงว่าวิธีทดสอบมีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการ ทดสอบ เช่น อุณหภูมิ pH เวลาที่ใช้ และ Ruggedness เป็นคุณสมบัติ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้ภาวะการทดสอบปกติ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนวันที่ทดสอบ สำหรับการตรวจสอบค่า Robustness และ Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยใช้ความเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 10 ซ้ำ โดยการทำให้ Robustness ได้ทำการเปลี่ยนอัตราส่วน Mobile phase จากน้ำต่ออะซิโตนไตรล์ (50 :50) เป็นน้ำ pH 3.0 (ปรับด้วย Phosphoric acid) ต่ออะซิโตนไตรล์ (50:50) และ Robustness ทดลองโดยการเปลี่ยนผู้ทดสอบเป็น นักวิเคราะห์อีกคน ผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การตรวจสอบ Robustness/Ruggedness ในผลิตภัณฑ์สูตร SL

Number	Concn.(0.10 mg/ml)					
	Robustness			Ruggedness		
	%AI1	%AI2	%AI เฉลี่ย	%AI1	%AI2	%AI เฉลี่ย

1	23.88	23.86	23.87	24.43	24.54	24.48
2	24.40	24.43	24.42	25.27	24.58	24.93
3	24.20	24.37	24.29	24.77	24.53	24.65
4	23.89	24.41	24.15	24.35	24.62	24.48
5	24.00	23.88	23.95	23.70	23.58	23.68
6	25.17	24.10	24.64	24.34	24.63	24.49
7	23.84	23.74	23.79	23.79	24.15	23.97
8	24.53	25.66	25.09	24.85	25.52	25.19
9	25.16	25.20	25.18	24.83	24.36	24.59
10	25.59	25.45	25.52	25.20	25.16	25.18
Mean	24.47	24.51	24.49	24.55	24.57	24.56
SD	0.63	0.69	0.61	0.53	0.52	0.49
HORRAT		1.68			1.35	

จากตารางที่ 4 พบว่า Robustness ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 24.47 และ และ 24.51 (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่า HORRAT เฉลี่ย เท่ากับ 1.68 และ Ruggedness ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 24.57 และ และ 24.56 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ มีค่า HORRAT เฉลี่ย เท่ากับ 1.35 เมื่อพิจารณาจากค่า HORRAT จะพบว่า ทั้ง Robustness/Ruggedness ผ่านเกณฑ์ที่ยอมรับได้ทั้งหมด ซึ่งเกณฑ์ยอมรับของ AOAC HORRAT < 2 และของ EU, Codex ยอมรับ HORRAT ≤ 2

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เฮ็กซาซิโนนในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชพีซ โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography ใช้ตัวตรวจจับชนิด Diode Array (DAD) วิเคราะห์โดยใช้ column C-18 (Poroshell 120, EC-C18 2.7 μm) ได้สภาวะที่เหมาะสม คือ อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตร/นาที อัตราส่วน Mobile phase น้ำต่ออะซิโตนไตรล์ (50:50) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีด 1.0 ไมโครลิตร เวลาในการฉีด 4.0 นาที การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า Working Range ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.050 -0.150 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99998 และค่า Linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.99997 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ เฮ็กซาซิโนน ในผลิตภัณฑ์ได้ค่า %recovery เท่ากับ 99.80 101.1 และ 99.87 และได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 100.2 ซึ่งอยู่ในช่วงการเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC (98-102% สำหรับปริมาณสารในตัวอย่างมากกว่า 10%) สำหรับการตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารออก

ฤทธิ์เฮ็กซาซิโนน ค่าความแข็งของวิธี (Robustness/ Ruggedness ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.68 และ 1.35 สำหรับการวิเคราะห์ซ้ำ และการวิเคราะห์ต่างวัน ต่างเวลา (reproducibility/ Within laboratory reproducibility) ได้ค่า HORRAT เท่ากับ 1.51 และ 1.56 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งหมด (AOAC ค่า HORRAT < 2) ดังนั้น วิธีที่ใช้ตรวจสอบ เฮ็กซาซิโนน ในการทดสอบนี้ที่ดัดแปลงมาจากวิธีมาตรฐาน CIPAC HANDBOOK Vol.J เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ต่างๆ ตาม Method Validation ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทั้งสิ้น ดังนั้น วิธีนี้จึงสามารถนำมาเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาร้อยละสารออกฤทธิ์เฮ็กซาซิโนน ในผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชของกรมวิชาการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาค

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี กำหนดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรทั้งในส่วนกลางและส่วนภูมิภาคเพื่อควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชเฮ็กซาซิโนน
2. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดได้

เอกสารอ้างอิง

- จิราพรรณ ทองหยอด และ ณัญจนา ลือตระกูล. 2549. ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบคาร์โบฟูแรนในผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช. ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2549 สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 453 น.
- นิรนาม. 2554. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวัดทางเคมี เอกสารการฝึกอบรมปฏิบัติการ. ณ สถาบันมาตรฐานวิทยาแห่งชาติ. จังหวัดปทุมธานี. 28 – 29 กรกฎาคม 2554.
- ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์. 2537. สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย. ฝ่ายสารสารวัตรเกษตร. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 371 น.
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. 124 น.
- Anonymous. 1993. The Agrochemicals Handbook 3rd. ed. The Royal Society of Chemistry Cambridge, England.
- Dobrat W. and H A Martijn. 2000. CIPAC Handbook Vol.J : Analysis of Technical and Formulated Pesticides. Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited, The Black Bear Press, England.
- Huber. Ludwig. 1998. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. Interpharm Press, Inc. Buffalo Grove, Illinois. 318p.