รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

   กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ
3. **การทดลองที่ 1.1** : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอต(paraquat)ในดินและน้ำ

   : Development and validation of method for residue analysis of paraquat in soil and water
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวจันทิมา ผลกอง	สังกัด กปผ.
ผู้ร่วมงาน	: นางมลิสา เวชยานนท์	สังกัด กปผ.
	นายอำนาจ กะฐินเทศ	สังกัด กปผ.

5. **บทคัดย่อ**

พาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชแบบสัมผัสตายและไม่เลือกทำลาย มีการใช้อย่างกว้างขวางทั้งในพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในดินและน้ำ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถทำได้รวดเร็ว และมีความถูกต้อง โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) สกัดตัวอย่างดินโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้นและน้ำกลั่นปริมาตร 25 และ 75 มิลลิลิตร ตามลำดับ ต้มระเหยควบแน่นเพื่อสกัดตัวอย่างนาน 2 ชั่วโมง ดูดจับอนุภาคด้วย cation exchange resin และกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย solid phase extraction (SPE) cartridge กรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC ตัวตรวจวัดชนิด Diode Array Detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร แยกสารด้วยคอลัมน์ชนิด reverse phase Ffpใช้ 250 มิลลิโมลาร์ ammonium formate (pH 3.7) และ acetonitrile อัตราส่วน 80:20 เป็นสารตัวพา ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 0.02-2.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9999 เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างดินต่างชนิดกัน (ดินทรายปนร่วน ดินร่วนปนทราย และดินร่วนเหนียวปนทราย) ค่าร้อยละการได้คืนกลับ (%recovery) ระหว่าง 71-115% ทดสอบตัวอย่างน้ำ

โดยกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย Si-OH SPE cartridge กรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE และทำการตรวจวัดด้วย HPLC-DAD เมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างน้ำต่างชนิดกัน (น้ำกลั่น น้ำผิวดิน และน้ำประปา) ได้ค่า %recovery ระหว่าง 97-109% ซึ่งค่า %recovery ที่ได้ทั้งในตัวอย่างดินและน้ำพบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และมีค่า Relative standard deviation (%RSD) น้อยกว่า 20% ผลการทดสอบช่วงของความเข้มข้นที่ทดสอบ (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ในการทดสอบตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 0.1-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient) มากกว่า 0.998 ส่วนในการทดสอบตัวอย่างน้ำพบว่า range และ linearity อยู่ในช่วง 0.25-20 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่า Correlation Coefficient มากกว่า 0.996 ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of Detection; LOD) และค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantitation; LOQ) ของการทดสอบตัวอย่างดิน เท่ากับ 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนการทดสอบตัวอย่างน้ำ มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความแม่น (accuracy) ของการทดสอบตัวอย่างดินโดยทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า %recovery ระหว่าง 89-91% ส่วนการทดสอบน้ำ ทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่า %recovery ระหว่าง 77-85% ความเที่ยง (precision) พิจารณาจากค่า HORRAT ที่ได้จากการทดสอบ fortified sample ทั้งในตัวอย่างดินและน้ำ พบว่ามีค่าน้อยกว่า 2 ซึ่งผลการทดสอบที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับรวมทั้งมี accuracy และ precision

ABSTRACT

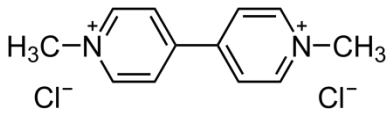
Paraquat is classified as non-selective contact herbicide. It is widely used herbicide in agricultural areas and other areas; therefore it leads to contamination in the environment, especially in soil and water. This study describes to develop and validate a more rapid and accurate analytical methods of the residue of paraquat in soil and water using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique. The appropriate parameter was boiled under reflux for 2 hours, conc. sulfuric acid and distilled water (25 and 75 ml, respectively) as extraction solvent. Cation exchange resin was used to absorb ion, solid phase extraction (SPE) cartridge and polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter were used to remove the interferences. The analysis is performed by HPLC with Diode Array Detector (DAD) operating at a wavelength of 258 nm. Reverse phase column was used as stationary phase, 250 mM ammonium formate (pH 3.7) and acetonitrile with ratio 80:20 were also used as mobile phase. The linearity of this method was 0.02 to 2.70 µg/ml with the correlation coefficient of the calibration curve was 0.9999. The recoveries of the spiked paraquat from the different soil

(loamy sandy, sandy loam and sandy clay loam) were in the range from 71 to 115%. SPE cartridge (on silica cartridge) and PTFE syringe filter were used to remove the interferences and enrichment in the analysis of paraquat in water samples by HPLC-DAD. The recoveries of the spiked paraquat from the different water (distilled, surface and tap water) were in the range from 97 to 109%. These recoveries of the spiked paraquat from soil and water samples were in the acceptable range at 70 to 120% with a relative standard deviation (%RSD) less than 20%. To evaluate the range and linearity of the method, at level range between 0.1 to 20 mg/kg (in soil samples), a correlation coefficient of determination greater than 0.998 and at level range between 0.25 to 20 µg/L (in water samples), a correlation coefficient of determination is greater than 0.996. Quantitation and detection limits were 0.05 and 0.1 mg/kg for soil samples, 0.25 and 0.5 µg/L for water samples, respectively. Absolute recoveries of paraquat for the accuracy, spiked at levels 0.1, 1 and 20 mg/kg were in range from 89 to 91% (in soil samples) and spiked at levels 1, 10 and 20 µg/L were in range from 77 to 85% (in water samples). Precision at spiked concentration was evaluated by the HORRAT value which is demonstrate less than 2 for soil and water samples. The result of all parameters were in the acceptable range with the accuracy and precision.

6. คำนำ

พาราควอตโดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของเกลือไดคลอไรด์ (dichloride salt) คือพาราควอตไดคลอไรด์ (*1,1'*-dimethyl-*4,4'*-bipyridinium dichloride) สูตรโมเลกุล $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ มวลโลเลกุล 257.2 กรัมต่อโมล จัดอยู่ในกลุ่มไบไพริดิเลียม เป็นสารกำจัดวัชพืชแบบสัมผัสตายและไม่เลือกทำลาย (non-selective contact herbicide) ถูกดูดซึมทางใบ ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และไซโทพลาซึม (cytoplasm) ใช้กำจัดวัชพืชพวกหญ้าในพื้นที่ปลูกมะพร้าว ปาล์ม ยางพารา สับปะรด และอ้อย (MacBean, 2012) จากสถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2556-2557 พบว่ามีปริมาณการนำเข้าเป็นอันดับสองของวัตถุอันตรายทางการเกษตรและสารกำจัดวัชพืช ปริมาณสารสำคัญ (active ingredient; a.i.) ประมาณ 10 ล้านกิโลกรัม มูลค่ามากกว่า 2,500 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2557) ด้วยคุณสมบัติของพาราควอตที่สามารถกำจัดวัชพืชได้กว้างและไม่เลือกทำลาย ทำให้มีการใช้อย่างกว้างขวางทั้งในพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร เป็นผลทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะดินและแหล่งน้ำที่ใช้ในการเกษตร จากการศึกษาการสะสมและการแพร่กระจายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมพื้นที่สูงภาคเหนือในแหล่งปลูกส้ม เขตอำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ และบริเวณแหล่งน้ำ

ใกล้เคียง ตรวจพบพาราควอตในตัวอย่างน้ำทั้งหมด จำนวน 31 ตัวอย่าง ปริมาณ 0.73-144.60 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภิญญาและคณะ, 2554) พฤติกรรมของพาราควอตเมื่ออยู่ในดินจะถูกจับยึดกับอนุภาคของดินที่มีประจุลบอย่างแข็งแรง ซึ่งขึ้นอยู่กับอินทรียวัตถุและองค์ประกอบของดิน พาราควอตมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในดินอยู่ในช่วง 1.4 ถึง 7.2 ปี โดยขึ้นอยู่กับชนิดของดิน (Roede and Miller, 2014) นอกจากนี้ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความแรงของไอออน (ionic strength) ของอนุภาคในดินเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับพาราควอต โดยการดูดจับพาราควอตจะลดลงเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนย้ายของพาราควอตมีโอกาสเพิ่มสูงขึ้นและถูกสะสมไว้ในสารละลายดิน (soil solution) (Gondar et al., 2012) โดยค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับในดิน (K_{oc}) อยู่ระหว่าง 8,000-40,000,000 มิลลิลิตรต่อกรัม มีโอกาสเพียงเล็กน้อยที่พาราคอตจะถูกชะไปสู่น้ำใต้ดิน (MacBean, 2012) พาราควอตมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี เนื่องจากเป็นสารที่มีขั้วสูง โดยที่อุณหภูมิ 20°C สามารถละลายน้ำได้ 700 กรัมต่อลิตร และไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (Lock and Wilks, 2010) ตาม World Health Organization จัดอยู่ในกลุ่มสารที่มีพิษเป็นกลาง (MacBean, 2012) ในสัตว์ พาราควอตจัดอยู่ในกลุ่มมีพิษระดับกลาง ค่า LD_{50} (ค่า 50% Lethal Dose) ทางปาก อยู่ในช่วง 22 ถึง 262 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Roede and Miller, 2014) พาราควอตเป็นพิษกับปลา ตะไคร่น้ำ และสิ่งมีชีวิตในน้ำ เช่น กั้ง แมลง เป็นต้น มนุษย์ได้รับพาราควอตเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย จากการตกค้างในอาหารหรืออากาศ และการชะไปสู่แหล่งน้ำ (run off) ระหว่างการพ่นสาร (Taguchi et al., 1998) การปนเปื้อนพาราควอตในน้ำดื่มเสี่ยงต่อการเกิดโรคตับ หัวใจ ปอด และไต (Jing et al., 2016)



รูปที่ 1. สูตรโครงสร้างของ 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride

(ที่มา: https://th.wikipedia.org/Paraquat)

เนื่องจากโครงสร้างของพาราควอตมีประจุบวก (รูปที่ 1) ทำให้ยึดเกาะติดแน่นกับอนุภาคของดินที่มีประจุลบได้ดี จึงทำให้การตรวจวิเคราะห์ต้องใช้สารสกัดที่มีคุณสมบัติในการทำลายโครงสร้างที่ยึดแน่นนี้ ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่ถูกอ้างถึงส่วนใหญ่คือวิธีของ ICI Plant Protection Division Method ทำการสกัดตัวอย่างดินโดยใช้กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ต้มระเหยควบแน่น (boil under reflux) นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นกรองและนำสารละลายที่ได้ผ่านคอลัมน์ cation exchange resin ล้างด้วยสารละลายกรด hydrochloric เจือจาง สารละลาย ammonium chloride ร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำ ชะตัวอย่างด้วยสารละลาย ammonium chloride อิ่มตัว เติมสารละลาย sodium dithionite เกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนจาก cation เป็น ion radical ทำการตรวจวัดด้วย spectrophotometer ได้ค่า %recovery ระหว่าง 80-95% และค่า LOD เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Kennedy, 1986) จากนั้นมีการพัฒนาวิธีต่อจากวิธีของ ICI Plant Protection

Division Method โดยใช้ C_{18} SPE cartridge และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC ได้ค่า %recovery ระหว่าง 70-110% (Anderson and Boseley, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับวิธีของ N J Robinson สกัดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ต้มระเหยควบแน่น นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย ENVI-Carb SPE cartridge และทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ได้ค่า %recovery ระหว่าง 75-116% (Robinson, 2006) นอกจากนี้มีการพัฒนาวิธีสกัดโดยใช้เทคนิค microwave-assisted extraction (MAE) ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography และ mass spectrometry (Pateiro-Moure et al., 2008) มีการพัฒนาวิธีสกัดโดยใช้ methanol เป็นสารสกัด นำไปเขย่าด้วย shaker นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอน กรองและนำไปลดปริมาตร ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค liquid chromatography ตรวจวัดด้วย photodiode array (Wong et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับวิธีของ Wahyu Wibawa ที่ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค liquid chromatography ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร แยกสารด้วยคอลัมน์ชนิด C_{18} reverse phase ได้ค่า %recovery ระหว่าง 78-92% (Wahyu, 2013)

พาราควอตมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี เทคนิคที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตในน้ำ จึงมีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิค Spectrophotometry Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Liquid scintillation counting (LCS) และ HPLC ซึ่ง HPLC เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์พาราควอต โดยวิธีที่ถูกอ้างถึงส่วนใหญ่คือ วิธีของ U.S.EPA Method 549.2 ซึ่งใช้ SPE สำหรับกำจัดสิ่งปนเปื้อน ตัวอย่างน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตร กรองผ่าน SPE ชนิด C_8 แบบ cartridge หรือ disk ซึ่งใช้เป็น reverse-phase และแยกสารแบบ ion-pair ชะสารด้วย acidic aqueous solvent 4.5 มิลลิลิตร เติม ion-pair reagent ลงในสารละลายที่ได้ และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร ตรวจวัดด้วย HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 257 นาโนเมตร ได้ค่า Method Detection Limits (MDL) เท่ากับ 0.68 ไมโครกรัมต่อลิตร (Munch and Bashe, 1997) มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์พาราควอตในน้ำ โดยใช้ ENVI-8 DSK SPE disk และตรวจวัดด้วย Liquid Chromatography-(electrospray ionization)-Mass Spectrometer [LC-(ESI)-MS] ได้ค่า LOD เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร (Taguchi et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับวิธีของ Raquel Rial-Otero วิเคราะห์พาราควอตในน้ำดื่มโดยใช้ SPE ชนิด silica cartridge และตรวจวัดด้วย HPLC-DAD ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร ได้ค่า %recovery ระหว่าง 91-103% ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.06 และ 0.09 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Rial-Otero et al., 2006) S L Hargreaves พัฒนาวิธีวิเคราะห์พาราควอตในน้ำด้วยวิธีที่ง่ายขึ้น โดยนำตัวอย่างน้ำปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ammonium formate (pH 3.7) เข้มข้น 1 โมลาร์ และ acetonitrile จากนั้นตรวจวัดโดยใช้ Liquid Chromatography-tandem triple

quadrupole Mass Spectrometer (LC-MS/MS) ได้ค่า LOQ เท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อลิตร (Hargreaves, 2006) Waters Corporation ได้นำวิธี U.S.EPA method 549.2 มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาพาราควอตในน้ำดื่ม แยกสารโดยใช้ SPE cartridge ตรวจวิเคราะห์ด้วย Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC/MS(MS) โซ้สารละลาย ammonium formate (pH 3.7) และ acetonitrile เป็นสารตัวพา (mobile phase) (Kim et al., 2008) จากข้อมูลในงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์พาราควอตในดินและน้ำบางวิธีมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก รวมทั้งมีการใช้สารเคมีบางชนิดและเครื่องมือที่ไม่สามารถจัดหาได้ ทำให้ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการปฏิบัติงาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตในดินและน้ำพร้อมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ได้วิธีที่สามารถปฏิบัติงานได้ง่าย เหมาะสมกับเครื่องมือวัสดุอุปกรณ์ที่มีอยู่ และมีความถูกต้อง

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ ได้แก่ beaker, cylinder, test tube, cuvette, pipette, round bottom flask, filter paper No.42, graduated plastic tube, polytetrafluoroethylene (PTFE) filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร, plastic vial สำหรับ auto sampler, auto micro-pipette, Buchner funnel, plastic volumetric flask, desiccator, เม็ดแก้ว, ขวดพลาสติกชนิด High Density Polyethylene (HDPE) และคอลัมน์ Primesep AB ชนิด zwitterionic reversed-phase ความยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร สารเคลือบหนา 5 ไมโครเมตร รูพรุนของอนุภาคขนาด 100 อังสตรอม

2. เคมีภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ

2.1 สารเคมีชนิด analytical grade ได้แก่ แอมโมเนียม คลอไรด์ (ammonium chloride; NH_4Cl), แอมโมเนียม ฟอร์เมท (ammonium formate; NH_4HCO_2), เรซิน ประจุบวก ขนาด 50-100 mesh (cation exchange resin), สารช่วยกรองชนิดซีไลท์ ขนาด 0.02-1 มิลลิเมตร (celite), กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (concentrated sulfuric acid; conc. H_2SO_4), น้ำกลั่น (distilled water; distilled H_2O), กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid; HCl), ออกทานอล (octan-2-ol; $C_8H_{18}O$), กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid; H_3PO_4), โซเดียม คลอไรด์ (sodium chloride; NaCl), กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid (TFA); CF_3CO_2H), กรดฟอร์มิก (formic acid; CH_2O_2), โซเดียม ไดไธโอไนท์ (sodium dithionite; $Na_2S_2O_4$), โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH), วัสดุสำหรับสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอม (C_{18} SPE cartridge), ซิลิกา (Si-OH SPE cartridge) และ เอนไว-คาร์บ (ENVI-Carb™ SPE cartridge) ขนาด 250 มิลลิกรัม 3 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมีชนิด HPLC grade ได้แก่ อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile; CH_3CN), เมทานอล (methanol; CH_3OH) และน้ำ (water; H_2O)

2.3 สารมาตรฐาน pesticide grade ชนิด พาราควอต ไดคลอไรด์ (paraquat dichloride; $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$)

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องให้ความร้อนแบบเตาหลุมพร้อมชุด condenser เครื่องกรองแบบสุญญากาศ เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi รุ่น UH5300 และเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1290

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย ดังนี้

1.1 สารมาตรฐาน paraquat dichloride อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง เตรียม stock standard solution ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำในขวดวัดปริมาตรที่ทำด้วยพลาสติก ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียม working standard solution ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.02-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 สารละลาย ammonium formate เข้มข้น 200, 250 และ 300 มิลลิโมลาร์

1.3 สารละลาย ammonium formate เข้มข้น 100, 200, 250 และ 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.7 (ปรับ pH ด้วย formic acid)

1.4 สารละลาย trifluoroacetic acid เข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.3 และ 0.4 โดยปริมาตร

1.5 สารละลายผสม sodium chloride, pH 3.0: acetonitrile ในอัตราส่วน 6:4 (ปรับ pH ด้วย hydrochloric acid)

1.6 สารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 2 นอร์มอล

1.7 สารละลาย ammonium chloride เข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตร

1.8 สารละลายอิ่มตัว ammonium chloride

1.9 สารละลายอิ่มตัว sodium chloride

1.10 elution solution (acetonitrile: 250 มิลลิโมลาร์ ammonium formate: phosphoric acid อัตราส่วน 30:70:1.25)

1.11 สารละลาย sodium dithionite เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร (เตรียมในสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 1 นอร์มอล)

2. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใช้สภาวะการทดสอบแบบสัดส่วนของสารตัวพาคงที่ (isocratic elution) ปริมาตรในการฉีด 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของ mobile phase 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย Diode Array Detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร โดยทดสอบปรับสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ 3 สภาวะ

สภาวะที่ 1 ใช้ mobile phase 2 ชนิด คือสารละลาย 250 มิลลิโมลาร์ ammonium formate (pH 3.7) และ acetonitrile ในอัตราส่วน 30:70, 50:50, 70:30, 80:20, 90:10 และ 95:5 ทดสอบปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย ammonium formate เป็น 100, 200, 250 และ 300 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทุกๆ ความเข้มข้นปรับ pH 3.7 และอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส

สภาวะที่ 2 ใช้ mobile phase 2 ชนิด คือสารละลาย TFA ร้อยละ 0.3 โดยปริมาตรและ acetonitrile ในอัตราส่วน 60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10 ทดสอบปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลาย TFA เป็นร้อยละ 0.2, 0.3 และ 0.4 โดยปริมาตร อุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง

สภาวะที่ 3 ใช้ mobile phase 2 ชนิด คือสารละลาย sodium chloride (pH 3.0): acetonitrile ในอัตราส่วน 60:40 ทดสอบอุณหภูมิคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของสารละลายมาตรฐาน

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากข้อ 2 ใช้ในการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานพาราควอต โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ด้วยสารละลาย working standard solution ที่ 6 ระดับความเข้มข้น กำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient; $r \geq 0.995$

4. การทดสอบตัวอย่างดิน

4.1 การสกัดตัวอย่าง ดัดแปลงมาจากวิธี ICI Plant Protection Division Method (Kennedy, 1986) และวิธี Syngenta Method (Robinson, 2006) โดยชั่งตัวอย่างดิน 25 กรัม ใส่ round bottom flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่าง (fortified sample) เติมน้ำกลั่น 65 มิลลิลิตร conc. sulfuric acid 35 มิลลิลิตร ใส่เม็ดแก้ว (anti-bumping granules) และ octan-2-ol 1 มิลลิลิตร สกัดโดยการต้มระเหยควบแน่น (boil under reflux) นาน 5 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองผ่านกระดาษกรอง No.42 จำนวน 2 แผ่น ที่บรรจุ celite 10 กรัม ปรับปริมาตรสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่กรองได้ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ cation exchange resin 5 กรัม ซึ่งจะต้องเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมสำหรับการดูดจับอนุภาคของสารพาราควอตในสารสกัดตัวอย่าง โดยล้างด้วยน้ำกลั่นและสารละลายอิ่มตัว sodium chloride ปริมาตรอย่างละ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารสกัดตัวอย่าง ปรับอัตราการไหลประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น สารละลาย 2 นอร์มอล hydrochloric acid น้ำกลั่น สารละลาย ammonium chloride เข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 25, 100, 25, 50 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับอัตราการไหลของสารละลายที่ใช้ล้าง 3-4 มิลลิลิตรต่อนาที ชะสารสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายอิ่มตัว ammonium chloride 50 มิลลิลิตร ปรับอัตราการไหลให้ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ชะได้ในขวดพลาสติกทึบแสง 50 มิลลิลิตร นำไปกำจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย SPE cartridge และกรองผ่าน syringe filter membrane ชนิด PTFE ใส่ขวดพลาสติก 2 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-DAD

ปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่มีความเหมาะสมที่สุด โดยมี %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 70-120% (SANTE/11813, 2017) ดังนี้

4.1.1 เปรียบเทียบอัตราส่วนของปริมาตร conc. sulfuric acid และน้ำกลั่น ที่เหมาะสมต่อการสกัดที่ 10:90, 15:85, 25:75, 35:65 และ 45:55 มิลลิลิตร

4.1.2 ทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มระเหยควบแน่น ที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง

4.1.3 ทดสอบประสิทธิภาพของ SPE cartridge 3 ชนิด ได้แก่ C_{18}, Si-OH และ ENVI-Carb™ SPE cartridge (เตรียม SPE cartridge ก่อนใช้โดยผ่าน methanol และน้ำ เกรด HPLC 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้จากการชะสารพิษ 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 ชะด้วย elution solution (acetonitrile: 250 มิลลิโมลาร์ammonium formate: phosphoric acid (30:70:1.25))

วิธีที่ 2 ชะด้วยสารละลายตัวอย่าง

4.1.4 เปรียบเทียบปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ผ่าน SPE cartridge ที่ 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร

4.1.5 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลาย ammonium formate ใน elution solution ที่ความเข้มข้น 200, 250 และ 300 มิลลิโมลาร์

4.2 ทดสอบค่าวิเคราะห์ดิน โดยวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน ประกอบด้วย %อนุภาคดิน ค่า pH ปริมาณอินทรียวัตถุ (organic matter) และความจุในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchange Capacity; CEC) ในดินแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ดินทรายปนร่วน (loamy sand) ดินร่วนปนทราย (sandy loam) และดินร่วนเหนียวปนทราย (sandy clay loam)

4.3. เลือกวิธีการทดสอบที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.1 ทดสอบกับดินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ดินทรายปนร่วน ดินร่วนปนทราย และดินร่วนเหนียวปนทราย ประเมินค่า accuracy และ precision จากค่า %recovery และ %RSD ตามลำดับ โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับ %recovery อยู่ในช่วง 70-120% (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20% (AOAC, 1993)

4.4 เปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีทดสอบเดิม (วิธีของ ICI Plant Protection Division Method) สกัดตัวอย่างดิน โดยชั่งตัวอย่างดิน 25 กรัม ใส่ round bottom flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานในตัวอย่าง เติมน้ำกลั่น 65 มิลลิลิตร conc. sulfuric acid 35 มิลลิลิตร ใส่เม็ดแก้ว (anti-bumping granules) และ octan-2-ol 1 มิลลิลิตร สกัดโดยการต้มระเหยควบแน่นนาน 5 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองผ่านกระดาษกรอง No.42 จำนวน 2 แผ่น ที่บรรจุ celite 10 กรัม ปรับปริมาตรสารสกัดตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่กรองได้ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ cation exchange resin 5 กรัม ซึ่งจะต้องเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมสำหรับการดูดจับอนุภาคของสารพาราควอตในสารสกัดตัวอย่าง โดยล้างด้วยน้ำกลั่นและสารละลายอิ่มตัว sodium chloride ปริมาตรอย่างละ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารสกัดตัวอย่าง ปรับอัตราการไหลประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น สารละลาย 2 นอร์มอล hydrochloric acid น้ำกลั่น สารละลาย ammonium chloride เข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 25, 100, 25, 50 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับอัตราการไหลของสารละลายที่ใช้ล้าง 3-4 มิลลิลิตรต่อนาที ชะสารสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายอิ่มตัว ammonium chloride 50 มิลลิลิตร ปรับอัตราการไหลให้ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ชะได้ในขวดพลาสติกทึบแสง 50 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ชะได้ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย sodium dithionite เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร (เตรียมในสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 1 นอร์มอล) 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 396 นาโนเมตร (Kennedy, 1986) เปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีที่พัฒนา พิจารณาค่า %recovery และ %RSD

5. การทดสอบตัวอย่างน้ำ

5.1 การสกัดตัวอย่าง ดัดแปลงมาจากวิธีที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างดินข้างต้น โดยตวงตัวอย่างน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดพลาสติกชนิด HDPE ทดสอบ fortified sample กำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ SPE cartridge ชะด้วย elution solution (acetonitrile : 250 มิลลิโมลาร์ ammonium formate : phosphoric acid อัตรา 30:70:1.25) กรองผ่าน syringe filter membrane ชนิด PTFE ใส่ขวดพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-DAD

ปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบ เพื่อให้ได้ผลการทดสอบที่มีความเหมาะสมที่สุด โดยมี %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ 70-120% (SANTE/11813, 2017) ดังนี้

5.1.1 ทดสอบประสิทธิภาพของ SPE cartridge 2 ชนิด ได้แก่ Si-OH และ ENVI-Carb™ cartrdge (เตรียม SPE cartridge ก่อนใช้โดยผ่าน methanol และน้ำ เกรด HPLC 5 มิลลิลิตร)

5.1.2 ทดสอบเปรียบเทียบปริมาตรของตัวอย่างที่ผ่าน SPE cartridge ที่ 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

5.1.3 ทดสอบเปรียบเทียบปริมาตรของ elution solution ที่ชะผ่าน SPE cartridge ที่ 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร

5.2 เลือกวิธีการทดสอบที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 5.1 นำวิธีที่เหมาะสมมาทดสอบตัวอย่างน้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น (distilled water) น้ำผิวดิน (surface water) และน้ำประปา (tap water)

5.3 เปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีทดสอบเดิม โดยตวงตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกชนิด HDPE กรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ cation exchange resin 5 กรัม ซึ่งจะต้องเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมสำหรับการดูดจับอนุภาคของสารพาราควอต โดยล้างด้วยน้ำกลั่นและสารละลายอิ่มตัว sodium chloride ปริมาตรอย่างละ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารสกัดตัวอย่าง ปรับอัตราการไหลประมาณ 5-10 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น สารละลาย 2 นอร์มอล hydrochloric acid น้ำกลั่น สารละลาย ammonium chloride เข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 50, 100, 50, 50 และ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ ปรับอัตราการไหลของสารละลายที่ใช้ล้าง 3-4 มิลลิลิตรต่อนาที ชะสารสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายอิ่มตัว ammonium chloride 50 มิลลิลิตร ปรับอัตราการไหลให้ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ชะได้ในขวดพลาสติกทึบแสง 50 มิลลิลิตร ดูดสารละลายที่ชะได้ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย sodium dithionite เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร (เตรียมในสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 1 นอร์มอล) 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 396 นาโนเมตร (Kennedy, 1986) เปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธีที่พัฒนา พิจารณาค่า %recovery และ %RSD

6. ทดสอบคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีทดสอบ ได้แก่ range, linearity, LOQ, LOD, accuracy และ precision (คณะกรรมการด้านวิชาการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2554)(นันทนาและนุชนาท, 2555)(Magnusson and Örenemark, 2014)

6.1 ทดสอบ range ตัวอย่างดิน ทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานพาราควอตความเข้มข้น 0.75, 2.5, 7.5, 12.5, 17.5, 25, 50, 125, 250, และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างน้ำ ทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.8, 1, 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.125, 0.25, 0.4, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างน้ำ ตามลำดับ เขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง (แกน x) มีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้น โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient ≥0.995

6.2 ทดสอบ linearity ทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับการทดสอบ range แล้ว ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบ linearity จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง (แกน x) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า correlation coefficient ≥0.995

6.3 ทดสอบ LOQ ทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับ Predicted LOQ (ประมาณค่า Predicted LOQ จากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของผลการทดสอบ sample blank ที่มีการตรวจพบพาราควอต) หรือสิบเท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบที่มีการเติมสารมาตรฐานพาราควอตปริมาณน้อยๆ ลงใน sample blank จำนวน 10 ซ้ำ โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับค่า %recovery 70-120% (SANTE/11813, 2017) และ %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (AOAC, 1993)

6.4 ทดสอบ LOD ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นน้อยๆ จำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อประมาณค่า LOD ซึ่ง LOD มีค่าเท่ากับสามเท่าของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ยืนยันค่า LOD โดยทดสอบ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับ LOD จำนวน 10 ซ้ำ เกณฑ์การยอมรับพิจารณาจากการตรวจพบพาราควอตทั้ง 10 ซ้ำ

6.5 ทดสอบ accuracy และ precision ทำการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินผล accuracy จาก %recovery และประเมินผล precision ตาม Horwitz equation (ดูจากค่า HORRAT) โดยเกณฑ์การยอมรับ %recovery ที่ได้ต้องอยู่ในช่วง 70-120% (SANTE/11813, 2017) และค่า HORRAT ที่ได้ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 (AOAC, 2002)

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมในการสกัดและวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตในดิน โดยใช้เทคนิค HPLC ได้ผลการทดสอบ ดังนี้

1. ผลการปรับสภาวะเพื่อทดสอบเครื่อง HPLC

สภาวะที่ 1 ผลการทดสอบ retention time, area และ sensitivity พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase สารละลาย 250 มิลลิโมลาร์ ammonium formate (pH 3.7):acetonitrile คือ 80:20 ให้ค่า sensitivity สูง และมี retention time น้อยที่สุด

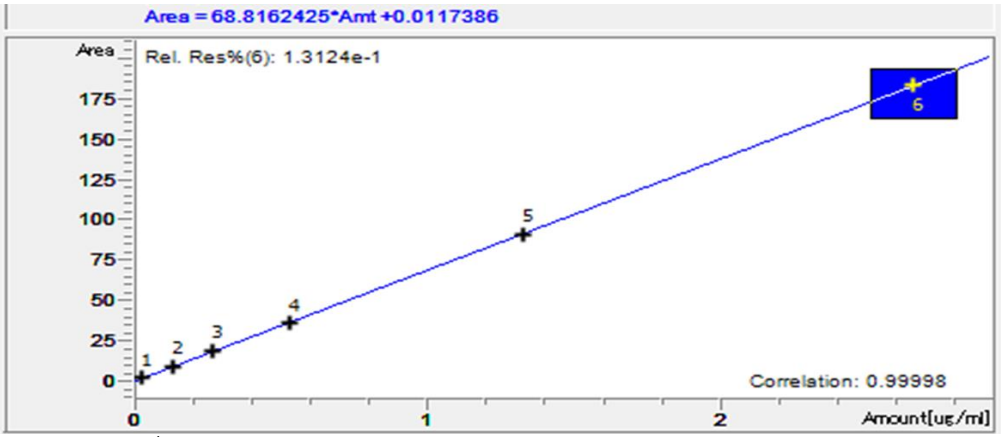
สภาวะที่ 2 ผลการทดสอบ retention time, area และ sensitivity พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของ mobile phase สารละลาย TFA ร้อยละ 0.3 โดยปริมาตร:acetonitrile คือ 70:30

สภาวะที่ 3 ผลการทดสอบ retention time, area และ sensitivity พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของคอลัมน์ที่ใช้ในการตรวจวัดคือ 40 องศาเซลเซียส

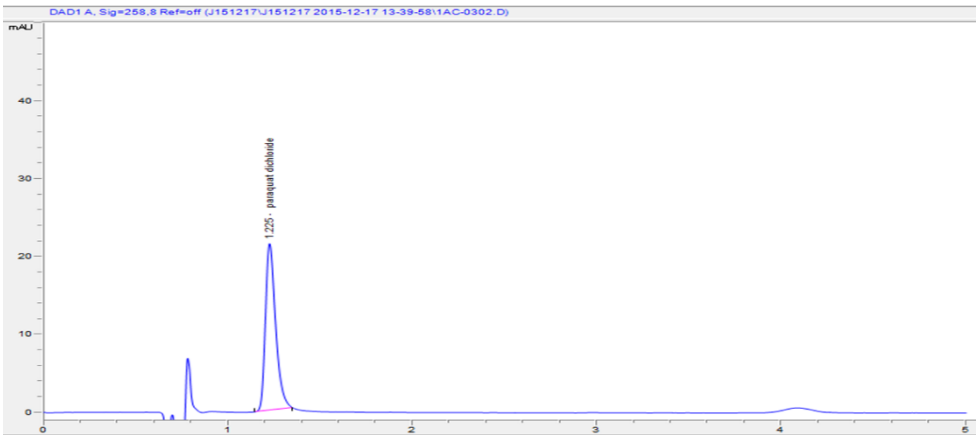
จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมทั้ง 3 สภาวะ พบว่าสภาวะที่ 1 และ 2 ให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกัน และมีลักษณะ peak ที่สมมาตร แต่เนื่องจาก TFA มีความเป็นอันตรายมากกว่า ammonium formate (Merck, 2018) จึงเลือกใช้วิธีที่ 1 ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษพาราควอต โดยใช้สารละลาย ammonium formate 250 มิลลิโมลาร์ (pH 3.7) และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20 เป็น mobile phase อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส รวมเวลาที่ใช้ตรวจวัด 5 นาที

2. ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของสารละลายมาตรฐาน

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ working standard solution ที่ 6 ระดับความเข้มข้นคือ 0.0266, 0.1328, 0.2656, 0.5311, 1.3278 และ 2.6556 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่า correlation coefficient; r เท่ากับ 0.99998 (รูปที่ 2) จากนั้นทดสอบคุณลักษณะของการวิเคราะห์ (Analytical Performance) โดยใช้ความเข้มข้นระดับกลางคือ 0.2656 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ค่า S/N (Signal to Noise) และ resolution เท่ากับ 104.2 และ 3.42 ตามลำดับ ค่า %RSD ของการทดสอบ area และ retention time วิเคราะห์ 3 ซ้ำ เท่ากับ 1.68 และ 0.12% ตามลำดับ ลักษณะโครมาโทแกรมใน รูปที่ 3



รูปที่ 2. กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานพาราควอตไดคลอไรด์



รูปที่ 3. โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานพาราควอตไดคลอไรด์ ตรวจวัดด้วย HPLC-DAD

3. ผลการทดสอบและปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบของการสกัดตัวอย่างดิน

3.1 ผลการทดสอบอัตราส่วนปริมาตรของ conc. sulfuric acid และน้ำกลั่น ที่เหมาะสมต่อการสกัดตัวอย่าง พบว่าอัตราส่วนปริมาตรที่เหมาะสมคือ 25:75 มิลลิลิตร โดยให้ผลการทดสอบ %recovery เท่ากับ 76.6±4.74% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีของ ICI Plant Protection Division Method (Kennedy, 1986) ที่ใช้อัตราส่วน conc. sulfuric acid และน้ำกลั่น เท่ากับ 35:65 มิลลิลิตร จะเห็นว่าสัดส่วนปริมาตรของ conc. sulfuric acid สูงกว่า 10 มิลลิลิตร มีโอกาสที่จะเกิดอันตรายสูง เนื่องจาก conc. sulfuric acid เป็นกรดกัดกร่อนที่มีความเป็นอันตรายต่อระบบหายใจและผิวหนัง (Merck, 2018) และเป็นการสิ้นเปลืองสารเคมี รวมทั้งก่อให้เกิด waste มากขึ้น ดังนั้นอัตราส่วนที่ใช้นี้จึงมีความเหมาะสมกว่า ช่วยประหยัดสารเคมีและลดความเป็นอันตรายต่อสุขภาพในระหว่างการปฏิบัติงาน

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบแต่ละอัตราส่วนของ conc. sulfuric acid และน้ำกลั่น

	ปริมาตรของ conc. sulfuric acid : น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)				
	10:90	**15:85**	**25:75**	**35:65**	**45:55**
Recovery (%)	ND	26.4±2.33	76.6±4.74	59.6±0.00	27.4±0.42

± : standard of deviation (n=3)

ND: Not detected (ตรวจไม่พบ)

3.2 ผลการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มระเหยควบแน่น พบว่าระยะเวลาที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ให้ผลการทดสอบ %recovery เท่ากับ 80.8±0.71%, 81.4±0.14%, 90.6±4.95%, 94.1±5.23% และ 95.9±4.74% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด โดยระยะเวลาที่น้อยที่สุดและให้ผลการทดสอบ %recovery อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ที่ 2 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเดิมของ ICI Plant Protection Division Method (Kennedy, 1986) และ Syngenta Method (Robinson, 2006) ที่ใช้เวลาในการต้มระเหยควบแน่นนาน 5 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลามากกว่า 3 ชั่วโมง ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความเหมาะสมในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดตัวอย่างน้อยกว่า ทำให้ระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์สามารถทำได้เร็วขึ้น

ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบระยะเวลาในการต้มระเหยควบแน่น

	ระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มระเหยควบแน่น (ชั่วโมง)

	1	2	3	4	5	6
Recovery (%)	67.1±0	80.8±0.71	81.4±0.14	90.6±4.95	94.1±5.23	95.9±4.74

± : standard of deviation (n=3)

3.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ SPE cartridge 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้จากการชะสาร 2 วิธี พบว่าวิธีการชะสารสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับ SPE cartridge ชนิด C_{18} คือการชะด้วยสารละลายตัวอย่าง (sample solution) ในขณะที่ Si-OH และ ENVI-Carb™ ชะด้วย elution solution และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบค่า %recovery พบว่าการ clean up ด้วย ENVI-Carb™ SPE cartridge ซึ่งทำการชะด้วย elution solution ให้ค่า %recovery สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยเปรียบเทียบกับวิธีของ ICI Plant Protection Division Method (Kennedy, 1986) จะไม่มีขั้นตอนการ clean up เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนในสารสกัด ทำให้มีโอกาสที่สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ยังคงมีสิ่งปนเปื้อนอยู่ เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสี จะทำให้เกิดสีที่ไม่ใช่พาราควอตในตัวอย่าง แต่เครื่อง spectrophotometer ตรวจวัดได้เนื่องจากมีช่วงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน ทำให้การรายงานผลคลาดเคลื่อน และไม่ถูกต้อง ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จึงเพิ่มความมั่นใจในผลการวิเคราะห์มากขึ้น และมีความถูกต้อง

ตารางที่ 3. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ SPE cartridge แต่ละชนิด

วิธีการชะสาร	**ชนิด SPE cartridge**		
	C_{18}	Si-OH	ENVI-Carb™
วิธีที่ 1 ชะด้วย elution solution	42.3±4.31	85.8±17.61	99.35±3.18
วิธีที่ 2 ชะด้วยสารละลายตัวอย่าง	84.4±2.12	34.9±1.06	ND

± : standard of deviation (n=3)

ND: Not detected (ตรวจไม่พบ)

elution solution คืออัตราส่วนของ acetonitrile : 250 mM ammonium formate : phosphoric acid (30:70:1.25)

3.4 ผลการทดสอบปริมาตรของสารสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมในการนำไป clean up ผ่าน SPE cartridge พบว่าปริมาตรที่ 5 มิลลิลิตร ให้ค่า %recovery เท่ากับ 83.5±5.44% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบปริมาตรของสารสกัดตัวอย่าง

	ปริมาตรของสารสกัดตัวอย่าง (มิลลิลิตร)		
	2	5	10
Recovery (%)	53.8±1.63	83.5±5.44	128.7±13.93

± : standard of deviation (n=3)

3.5 ผลการทดสอบความเข้มข้นของสารละลาย ammonium formate ใน elution solution พบว่าที่ความเข้มข้น 250 และ 300 มิลลิโมลาร์ ให้ %recovery เท่ากับ 76.3±5.44% และ 77.1±7.35% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 5 อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการลดความเข้มข้นสารเคมีที่จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ เนื่องจาก ammonium formate เป็นเกลือแอมโมเนียม ถ้า

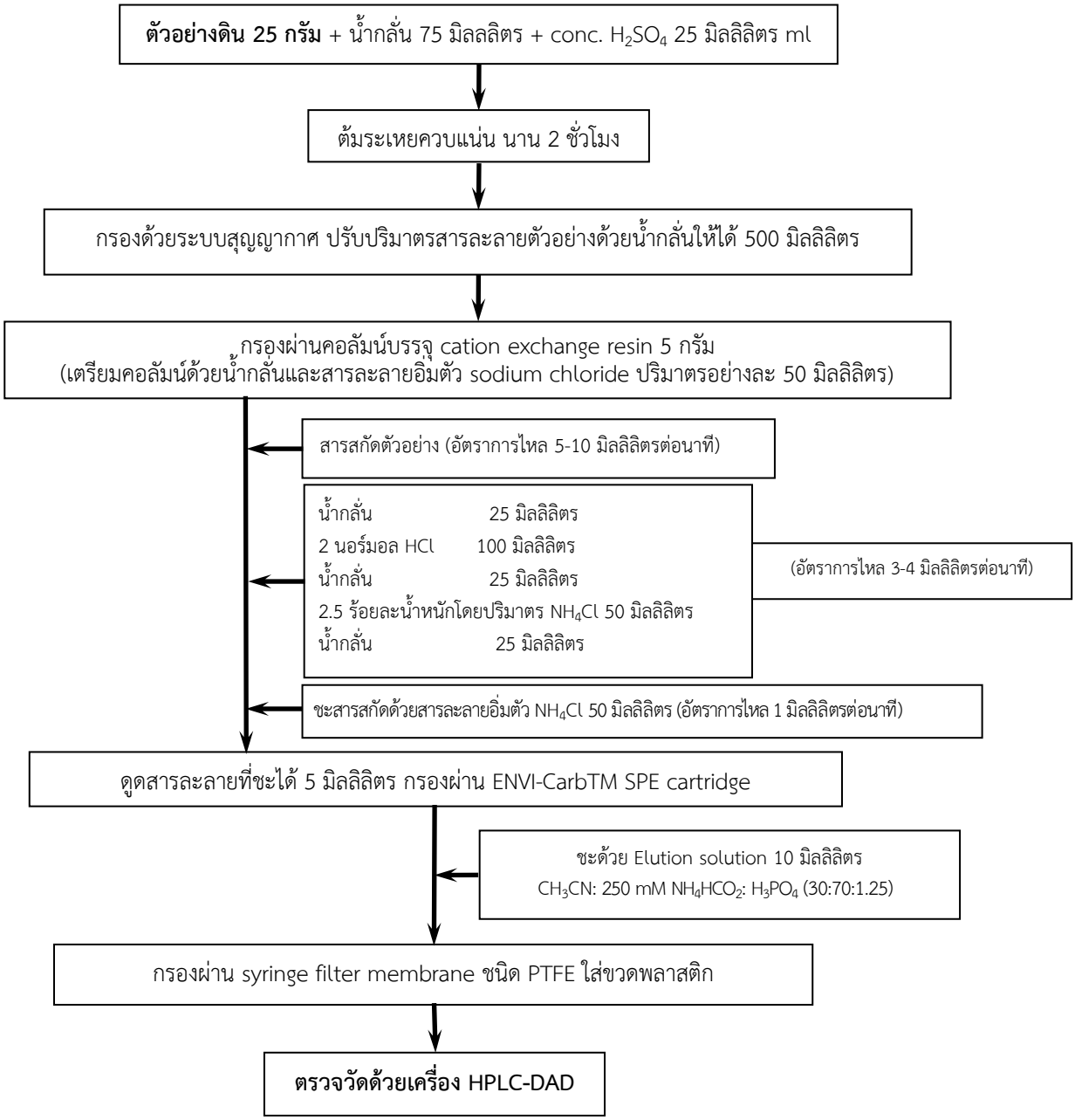
ความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการอุดตันในระบบได้ รวมทั้งเป็นการประหยัดสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ สำหรับเป็นสารทดสอบต่อไป

ตารางที่ 5. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลาย ammonium formate ใน elution solution

	ความเข้มข้นของ ammonium formate (มิลลิโมลาร์)		
	200	**250**	**300**
Recovery (%)	65.62±2.59	76.3±5.44	77.1±7.35

± : standard of deviation (n=3)

จากผลการทดสอบได้วิธีการสกัดตัวอย่างดินที่มีความเหมาะสมคือ ตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร และ conc. sulfuric acid 25 มิลลิลิตร นำไปต้มระเหยควบแน่น นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ล้าง condenser ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยระบบสุญญากาศ (vacuum pump) ผ่านกระดาษกรอง No.42 จำนวน 2 แผ่น ที่บรรจุ celite 10 กรัม ปรับปริมาตรสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่กรองได้ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ cation exchange resin เพื่อจับอนุภาคของพาราควอต เตรียมคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นและสารละลายอิ่มตัว sodium chloride ปริมาตรอย่างละ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ เติมสารสกัดตัวอย่าง (อัตราการไหล 5-10 มิลลิลิตรต่อนาที) จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่น สารละลาย 2 นอร์มอล hydrochloric acid น้ำกลั่น สารละลาย ammonium chloride เข้มข้นร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 25, 100, 25, 50 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ (อัตราการไหล 3-4 มิลลิลิตรต่อนาที) ชะสารสกัดด้วยสารละลายอิ่มตัว ammonium chloride 50 มิลลิลิตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ชะได้ในขวดพลาสติกทึบแสง ดูดสารละลายที่ชะได้ 5 มิลลิลิตร กรองผ่าน ENVI-Carb^{TM} SPE cartridge เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ล้างด้วยน้ำและชะด้วย elution solution ปริมาตร 2 และ 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที กรองผ่าน syringe filter membrane ชนิด PTFE ใส่ขวดพลาสติก ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-DAD (รูปที่ 4)



รูปที่ 4. ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์พาราควอตในดิน

4. ผลการทดสอบค่าวิเคราะห์ดิน จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินทรายปนร่วน ดินร่วนปนทราย และดินร่วนเหนียวปนทรายที่นำมาใช้ในการทดสอบ พบว่าค่า CEC ในดินร่วนปนทรายมีค่าน้อยที่สุด (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินแต่ละชนิด

เนื้อดิน	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Soil pH (H_2O)	Organic matter (g/kg)	CEC ($cmol_c$/kg)
Loamy sand	78.3	13.4	8.3	3.63	0.53	1.48
Sandy loam	74.4	7.9	17.7	3.69	0.52	1.09
Sandy clay loam	69.0	21.5	9.5	3.84	0.64	1.74

5. ผลการทดสอบในตัวอย่างดินชนิดต่าง ๆ จากผลการทดสอบในตัวอย่างดินชนิดต่าง ๆ พบว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้สามารถนำไปตรวจวิเคราะห์พาราควอตในตัวอย่างดินทรายปนร่วน ดินร่วนปนทราย และดินร่วนเหนียวปนทรายได้ มีค่า %recovery ระหว่าง 71-115% (ตารางที่ 7) โดย %recovery ในตัวอย่างดินร่วนปนทรายมีค่าน้อยที่สุด เนื่องจากดินทรายปนร่วนและดินร่วนเหนียวปนทราย มีค่า organic matter และ CEC สูงกว่า จึงทำให้พาราควอตถูกดูดซับในดินทั้งสองชนิดนี้มากกว่าในดินร่วนปนทราย ถึงแม้ค่า pH ของดินร่วนเหนียวปนทรายจะสูงกว่า แต่ปัจจัยที่มีผลต่อการดูดซับของดินยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีกด้วย เช่น ค่า organic matter เนื้อดิน (soil texture) ชนิดของแร่ดินเหนียว (clay mineral) เป็นต้น (Crampon et al., 2014)

ตารางที่ 7. ค่าเฉลี่ย %recovery ของผลการทดสอบ fortified sample ในดินแต่ละชนิด

		ชนิดของดิน								
		Loamy sand			Sandy loam			Sandy clay loam		
		Analyte (mg/kg)	Recovery (%)	%RSD	Analyte (mg/kg)	Recovery (%)	%RSD	Analyte (mg/kg)	Recovery (%)	%RSD
Fortified sample (mg/kg)	**0.5311**	0.4938±0.04	92.97±8.03	8.64	0.4446±0.01	83.71±2.75	3.29	0.5478±0.05	103.15±9.38	9.10
	1.0067	0.8788±0.12	87.30±11.49	13.16	0.8762±0.03	87.04±3.38	3.89	0.9550±0.05	94.87±4.90	5.17
	3.0349	3.4935±0.26	115.11±8.73	7.58	2.1590±0.04	71.14±1.32	1.86	3.0540±0.19	96.25±6.42	6.67

± : standard of deviation (n=7)

6. เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีที่พัฒนากับผลการทดสอบตามวิธีทดสอบเดิม (Kennedy, 1986) ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าได้ค่า %recovery และ %RSD เท่ากับ 74.55±9.52% และ 12.78% ตามลำดับ ส่วนวิธีที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่า %recovery และ %RSD เท่ากับ 96.25±6.42% และ 6.67% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่า %recovery สูงกว่าและค่า %RSD ต่ำกว่า แสดงว่ามีค่า accuracy และ precision ที่ดีกว่า ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีทดสอบเดิม

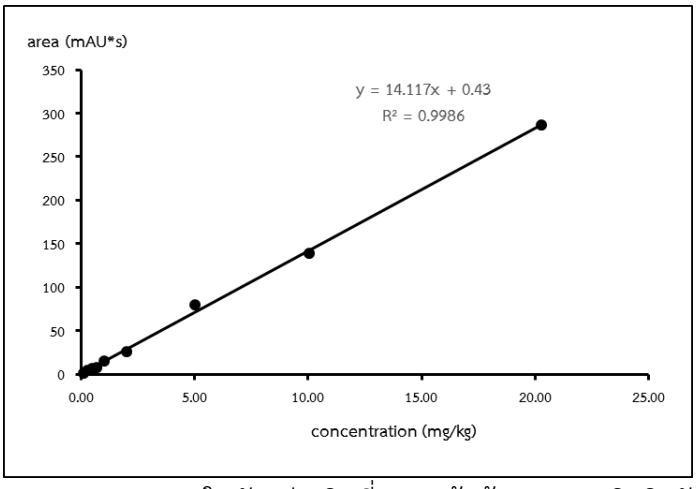
ตารางที่ 8. ค่าเฉลี่ย %recovery ของผลการทดสอบ fortified sample ในแต่ละวิธีทดสอบ

วิธีทดสอบ	Recovery (%)	%RSD
วิเคราะห์ด้วย spectrophotometer (Kennedy, 1986)	74.55±9.52	12.78
วิเคราะห์ด้วย HPLC (new method)	96.25±6.42	6.67

± : standard of deviation (n=7)

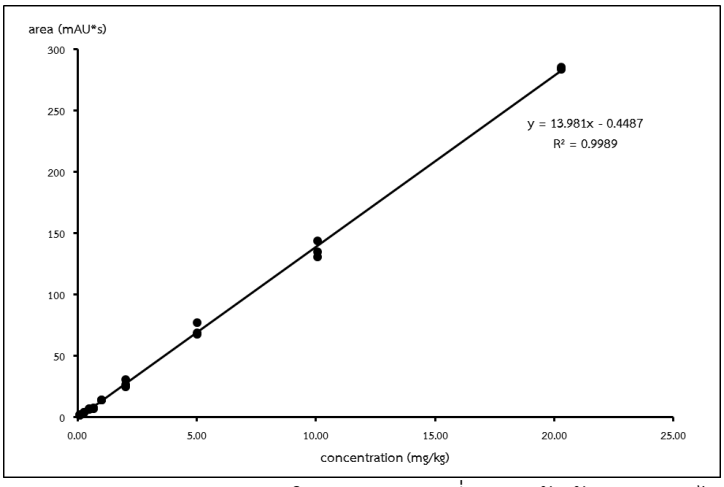
7. ผลการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์พาราควอตในดิน ได้แก่ range, linearity, LOQ, LOD, accuracy และ precision

7.1 ผลการทดสอบ range จากการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.75, 2.5, 7.5, 12.5, 17.5, 25, 50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม ตามลำดับ ผลการทดสอบ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.03 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตรวจไม่พบพาราควอต เมื่อสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง (แกน x) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9986 แสดงว่า พื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง มีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้น นั่นคือ range มีค่าอยู่ในช่วง 0.1-20 ไมโครกรัมต่อกรัม ผลการทดสอบดังรูปที่ 5



รูปที่ 5. range ของพาราควอตในตัวอย่างดินที่ความเข้มข้น 0.1-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

7.2 ผลการทดสอบ linearity โดยทำการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 2.5, 7.5, 12.5, 17.5, 25, 50, 125, 250, และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม ตามลำดับ นำผลการทดสอบที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง (แกน x) ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อกรัม ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9989 แสดงว่า พื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง มีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้นตรง นั่นคือ linearity มีค่าอยู่ในช่วง 0.1-20 ไมโครกรัมต่อกรัม ผลการทดสอบดังรูปที่ 6



รูปที่ 6. linearity ของพาราควอตในตัวอย่างดินที่ความเข้มข้น 0.1-20 ไมโครกรัมต่อกรัม

7.3 ผลการทดสอบ LOQ ที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับ Predicted LOQ เนื่องจากผลการทดสอบไม่พบพาราควอตใน sample blank ดังนั้น Predicted LOQ จึงเท่ากับสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบที่มีการเติมสารมาตรฐานพาราควอตปริมาณน้อยๆ ลงใน sample blank ทำการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 7 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม ผลการทดสอบดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9. ค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบ fortified sample

Fortified sample (mg/kg)	ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (mg/kg)	Recovery (%)	%RSD	Predicted Horwitz %RSD	HORRAT
0.05	0.0238±0.005	47.21±10.69	22.64	18.54	1.22

± : standard of deviation (n=7)

ผลการทดสอบที่ได้พบว่า Predicted LOQ มีค่าเท่ากับ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม ผลการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม ดังตารางที่ 9 ซึ่งใกล้เคียงกับ Predicted LOQ พบว่าผลการทดสอบมี precision เนื่องจากมีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 แต่ไม่มี accuracy เนื่องจากค่า %recovery ที่ได้ไม่อยู่ในช่วงเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นจึงทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ทำการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.07 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1.75 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม ตามลำดับ ผลการทดสอบดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10. ค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบ fortified sample แต่ละความเข้มข้น

		ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (mg/kg)	Recovery (%)	%RSD	Predicted Horwitz %RSD	HORRAT
Fortified sample (mg/kg)	0.07	0.0351±0.005	48.17±7.00	14.53	17.48	0.83
	0.1	0.0827±0.007	82.19±6.51	7.93	15.37	0.52

± : standard of deviation (n=7)

จากผลการทดสอบที่ได้พบว่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เนื่องจากผลการทดสอบที่ได้มี accuracy และ precision ส่วนผลการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มี precision แต่ไม่มี accuracy เนื่องจากค่า %recovery ที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด

7.4 ผลการทดสอบ LOD เนื่องจากผลการทดสอบไม่พบพาราควอตใน sample blank ดังนั้น LOD จึงเท่ากับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบที่มีการเติมสารมาตรฐานพาราควอตปริมาณน้อยๆ ลงใน sample blank ซึ่งพบว่า Predicted LOD มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยืนยันค่า LOD ทดสอบความเข้มข้นต่างๆที่ใกล้เคียงค่า LOD โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 0.01, 0.04 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบดังตารางที่ 11 พบว่าค่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เนื่องจากตรวจพบสารพาราควอตทั้ง 10 ซ้ำ

ตารางที่ 11. ผลการทดสอบการยืนยันค่า LOD

ความเข้มข้น (mg/kg)	จำนวนครั้งที่ทดสอบ	จำนวนครั้งที่ตรวจพบ/ไม่พบ
0.01	10	0/10
0.04	10	2/10
0.05	10	10/0

7.5 ผลการทดสอบ accuracy และ precision จากการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 2.5, 25 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างดิน น้ำหนัก 25 กรัม ตามลำดับ ได้ค่า %recovery ระหว่าง 89-91% และค่า HORRAT ระหว่าง 0.06-0.9 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12. ค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบ fortified sample แต่ละความเข้มข้น

		ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (mg/kg)	Recovery (%)	%RSD	Predicted Horwitz %RSD	HORRAT
Fortified sample (mg/kg)	0.1	0.0905±0.01	89.92±12.28	13.66	15.16	0.90
	1	0.9173±0.06	90.48±5.76	6.37	10.70	0.60
	20	18.5099±0.08	91.29±0.37	0.40	6.81	0.06

± : standard of deviation (n=7)

8. ผลการทดสอบและปรับเปลี่ยนวิธีการทดสอบของการสกัดตัวอย่างน้ำ

8.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ SPE cartridge 2 ชนิด ได้แก่ Si-OH และ ENVI-Carb™ SPE cartridge เมื่อเปรียบเทียบค่า %recovery พบว่า SPE cartridge ทั้งสองชนิด ให้ผลการทดสอบที่มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ Si-OH SPE cartridge เนื่องจากมีราคาถูกกว่าแต่ให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ SPE cartridge แต่ละชนิด

	ชนิดของ SPE cartridge	
	Si-OH	**ENVI-Carb™**
Recovery (%)	64.84±4.95	67.35±4.48

± : standard of deviation (n=3)

8.2 ผลการทดสอบปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบผ่าน SPE cartridge ที่ 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร อัตราการไหล 2-3 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า ปริมาตรของตัวอย่างที่เหมาะสม คือ 500 มิลลิลิตร ได้ %recovery เท่ากับ 60.15±5.33% ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14. ค่าเฉลี่ย %recovery เปรียบเทียบปริมาตรของตัวอย่างน้ำ

	ปริมาตรของตัวอย่างน้ำ (มิลลิลิตร)		
	100	**250**	**500**
Recovery (%)	ND	ND	60.15±5.33

± : standard of deviation (n=3)

ND: Not Detected หมายถึงตรวจไม่พบ

8.3 ผลการทดสอบปริมาตรของ elution solution ที่ชะผ่าน SPE cartridge ที่ 1, 2, 5 และ 10 มิลลิลิตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าปริมาตรของ elution solution ที่เหมาะสม คือ 5 มิลลิลิตร ได้ค่า %recovery เท่ากับ 106.73±3.96% เนื่องจากมีค่าอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15. ผลการทดสอบค่า %recovery เปรียบเทียบปริมาตรของ elution solution

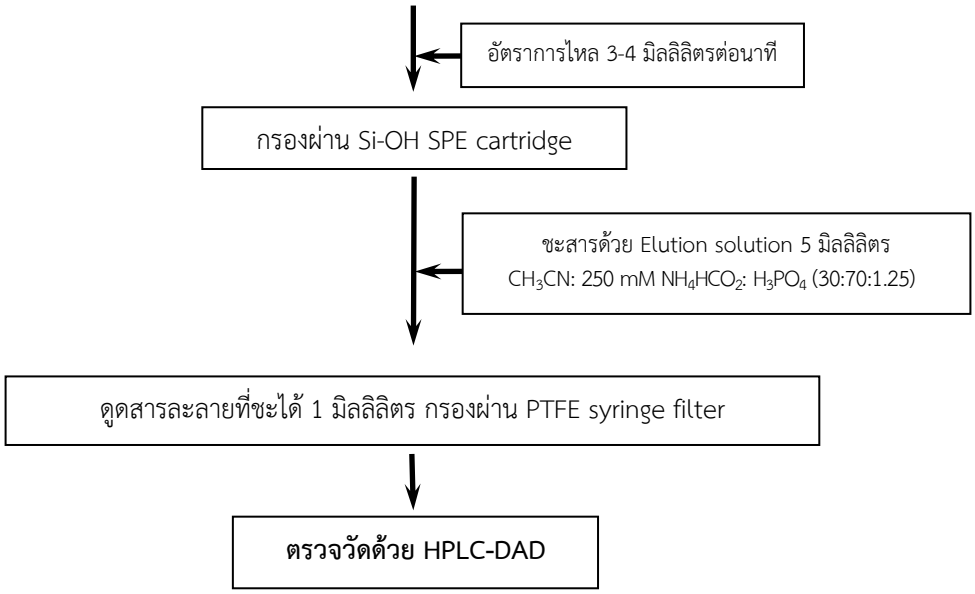
	ปริมาตรของ elution solution (มิลลิลิตร)			
	1	**2**	**5**	**10**
Recovery (%)	ND	1.00±0.88	106.73±3.96	66.71±5.11

± : standard of deviation (n=3)

ND: Not Detected หมายถึงตรวจไม่พบ

จากผลการทดสอบที่ได้วิธีการสกัดตัวอย่างน้ำที่เหมาะสม คือ ตวงตัวอย่างน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดพลาสติกชนิด HDPE กำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยกรองผ่าน Si-OH SPE cartridge อัตราการไหล 2-3 มิลลิลิตรต่อนาที ชะสารด้วย elution solution (Acetonitrile : 250 มิลลิโมลาร์ Ammonium formate : Phosphoric acid อัตรา 30:70:1.25) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที กรองผ่าน syringe filter membrane ชนิด PTFE ใส่ขวดพลาสติก ขนาด 2 มิลลิลิตร และตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-DAD (รูปที่ 7)

ตวงตัวอย่างน้ำ 500 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกชนิด HDPE



รูปที่ 7. ขั้นการตรวจวิเคราะห์พาราควอตในน้ำ

9. ผลการทดสอบในตัวอย่างน้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น (distilled water) น้ำผิวดิน (surface water) และน้ำประปา (tap water) ได้ค่า %recovery ระหว่าง 97-109% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16. ผลการทดสอบค่า %recovery ในน้ำแต่ละชนิด

	ชนิดของน้ำ		
	น้ำกลั่น	**น้ำผิวดิน**	**น้ำประปา**
Analyte (μg/L)	20.46±0.76	18.68±1.35	21.00±0.50
Recovery (%)	106.74±3.95	97.46±7.05	109.57±2.70
%RSD	3.70	7.23	2.47

± : standard of deviation (n=3)

10. เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธีที่พัฒนากับวิธีทดสอบเดิม (Kennedy, 1986) ที่ตรวจวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ดังแสดงในตารางที่ 17 พบว่าได้ค่า %recovery และ %RSD เท่ากับ 86.14±14.09% และ 16.36% ตามลำดับ ส่วนวิธีที่พัฒนาขึ้นตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC ได้ค่า %recovery และ %RSD เท่ากับ 92.67±7.74% และ 8.35% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่า %recovery สูงกว่า และค่า %RSD ต่ำกว่า แสดงว่ามีค่า accuracy และ precision ที่ดีกว่า ดังนั้นวิธีที่พัฒนานี้จึงมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีทดสอบเดิม ซึ่งวิธีทดสอบเดิม ในขั้นตอนการ clean up ด้วย cation exchange resin ใช้สารเคมีหลายชนิดและมีการล้างคอลัมน์หลายขั้นตอน จึงทำให้เกิดการสิ้นเปลืองสารเคมีและก่อให้เกิด waste เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งใช้เวลาวิเคราะห์นานกว่าเมื่อเทียบกับวิธีที่พัฒนา

ตารางที่ 17. ค่าเฉลี่ย %recovery ของผลการทดสอบ fortified sample ในแต่ละวิธีทดสอบ

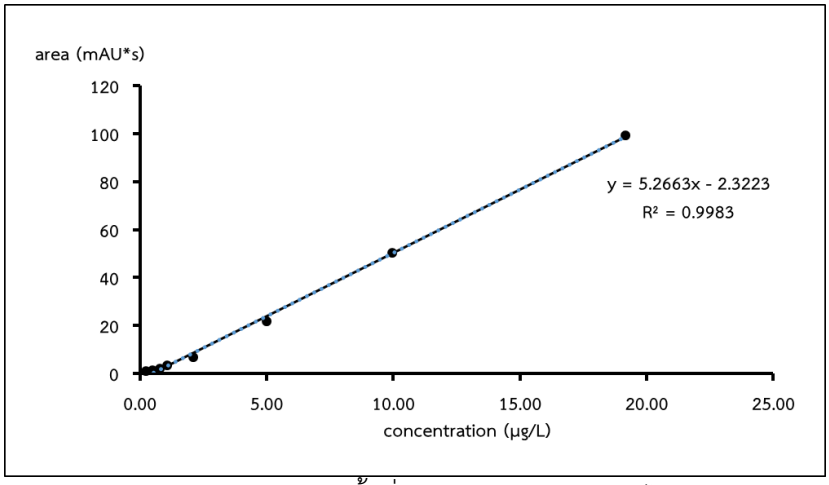
วิธีทดสอบ	**Recovery (%)**	**%RSD**

วิเคราะห์ด้วย spectrophotometer (Kennedy, 1986)	86.14±14.09	16.36
วิเคราะห์ด้วย HPLC (new method)	92.67±7.74	8.35

± : standard of deviation (n=7)

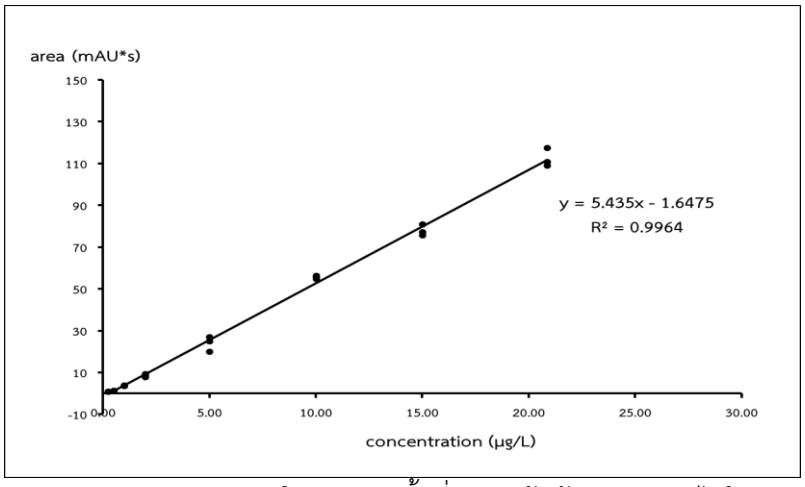
11.ผลการทดสอบคุณลักษณะเฉพาะที่แสดงคุณสมบัติของวิธี ได้แก่ range, linearity, LOQ, LOD, accuracy และ precision

11.1 ผลการทดสอบ range จากการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.8, 1, 2, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบที่ได้ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อลิตร ตรวจไม่พบพาราตวอต เมื่อสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง (แกน x) ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9983 แสดงว่า พื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง มีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้น นั่นคือ range มีค่าอยู่ในช่วง 0.25-20 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบดังรูปที่ 8



รูปที่ 8. range ของพาราควอตในตัวอย่างน้ำที่ความเข้มข้น 0.25-20 ไมโครกรัมต่อลิตร

11.2 ผลการทดสอบ linearity จากการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลการทดสอบที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) กับความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง (แกน x) ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ได้ค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9964 แสดงว่า พื้นที่ใต้กราฟกับค่าความเข้มข้นของพาราควอตในตัวอย่าง มีความสัมพันธ์เป็นสมการเชิงเส้นตรง นั่นคือ linearity มีค่าอยู่ในช่วง 0.25-20 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบดังรูปที่ 9



รูปที่ 9. linearity ของพาราควอตในตัวอย่างน้ำที่ความเข้มข้น 0.25-20 ไมโครกรัมต่อลิตร

11.3 ผลการทดสอบ LOQ ที่ระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกับ Predicted LOQ เนื่องจากผลการทดสอบไม่พบพาราควอตใน sample blank ดังนั้น Predicted LOQ จึงเท่ากับสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบที่มีการเติมสารมาตรฐานพาราควอตปริมาณน้อยๆ ลงใน sample blank จึงทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร 10 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผลการทดสอบดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18. ค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบ fortified sample

		ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (µg/L)	Recovery (%)	%RSD	Predicted Horwitz %RSD	HORRAT
Fortified sample (µg/L)	0.25	0.3936±0.03	157.19±10.79	6.80	34.32	0.20

± : standard of deviation (n=10)

จากตารางที่ 18 พบว่า ผลการทดสอบมี precision เนื่องจากมีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนด แต่ไม่มี accuracy เนื่องจากค่า %recovery ที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด ดังนั้นจึงทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยเติมสารละลายมาตรฐานพาราควอตเข้มข้น 0.2 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19. ค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบ fortified sample แต่ละความเข้มข้น

		ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (µg/L)	Recovery (%)	%RSD	Predicted Horwitz %RSD	HORRAT
Fortified sample (µg/L)	0.4	0.6211±0.14	148.86±32.55	21.86	32.09	0.68
	0.5	0.4422±0.04	88.34±8.02	9.08	33.77	0.27

± : standard of deviation (n=10)

จากผลการทดสอบที่ได้พบว่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยผลการทดสอบที่ได้มี accuracy และ precision เนื่องจากค่า %recovery และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนด ส่วนที่ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่มี accuracy เนื่องจากค่า %recovery ที่ได้ไม่อยู่ในเกณฑ์กำหนด

11.4 ผลการทดสอบ LOD เนื่องจากผลการทดสอบไม่พบพาราควอตใน sample blank ดังนั้น LOD จึงเท่ากับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดสอบที่มีการเติมสารมาตรฐานปริมาณน้อยๆ ลงใน sample blank ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.08 ไมโครกรัมต่อลิตร ยืนยันค่า LOD ทดสอบความเข้มข้นต่างๆที่ใกล้เคียงค่า LOD โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 0.08, 0.2 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร 10 ซ้ำ ผลการทดสอบดังตารางที่ 20 พบว่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจากตรวจพบสารพาราควอตทั้ง 10 ซ้ำ

ตารางที่ 20. ผลการทดสอบการยืนยันค่า LOD

ความเข้มข้น (µg/L)	จำนวนครั้งที่ทดสอบ	จำนวนครั้งที่ตรวจพบ/ไม่พบ
0.08	10	0/10
0.2	10	4/10
0.25	10	10/0

11.5 ผลการทดสอบ accuracy และ precision จากการประเมินผลการทดสอบค่า %recovery และค่า HORRAT ตามลำดับ ของการทดสอบ sample blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ได้ค่า %recovery ระหว่าง 77-85% และค่า HORRAT ระหว่าง 0.2-0.5 ดังตารางที่ 21 จากผลการทดสอบที่ได้จะเห็นได้ว่าวิธีทดสอบนี้มี accuracy และ precision เนื่องจากมีค่า %recovery และค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนด

ตารางที่ 21. ค่าเฉลี่ย %recovery ของการทดสอบ fortified sample แต่ละความเข้มข้น

		ความเข้มข้นที่ทดสอบได้ (µg/L)	Recovery (%)	%RSD	Predicted Horwitz %RSD	HORRAT
Fortified sample (µg/L)	1	0.8087±0.08	80.75±7.92	9.80	30.84	0.32
	10	7.7538±0.37	77.43±3.66	4.73	21.94	0.22
	20	17.9071±1.96	85.84±9.37	10.92	19.35	0.56

± : standard of deviation (n=10)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตในดิน โดยใช้เทคนิค high performance liquid chromatography พบว่าสกัดตัวอย่างดินด้วยการต้มระเหยควบแน่นนาน 2 ชั่วโมง โดยใช้สารสกัดเป็นน้ำกลั่น และ conc. sulfuric acid ปริมาตร 75 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ ดูดจับอนุภาคสารพาราควอตในสารสกัดตัวอย่างด้วย cation exchange resin และกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย ENVI-

CarbTM SPE cartridge ตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-DAD ให้ผลการทดสอบค่า %recovery ระหว่าง 71-115% และค่า %RSD น้อยกว่า 20% วิธีทดสอบในตัวอย่างดินนี้มี accuracy และ precision ในช่วงความเข้มข้น 0.1-20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างน้ำ กำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย Si-OH SPE cartridge ทำการตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC-DAD ให้ผลการทดสอบค่า %recovery ระหว่าง 97-109% วิธีทดสอบในตัวอย่างน้ำนี้มี accuracy และ precision ในช่วงความเข้มข้น 0.5-20 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ วิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีทดสอบเดิม เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่มี accuracy และ precision ดีกว่าวิธีทดสอบเดิม รวมทั้งวิธีทดสอบในตัวอย่างดินนี้ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตในตะกอนได้ สามารถนำไปพัฒนาต่อโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคขั้นสูงที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตปริมาณน้อยๆ ในดินและน้ำได้อย่างถูกต้อง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เป็นวิธีที่ได้พัฒนาและผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี นำไปใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอตในดิน ตะกอน และน้ำของห้องปฏิบัติการ สามารถนำไปขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน และเผยแพร่ให้กับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ได้

2. ใช้เป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาต่อโดยใช้ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคขั้นสูง ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารพาราควอตตกค้างในดินและน้ำที่มีปริมาณน้อยๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

11. เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการด้านวิชาการของกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 2553. แนวทางการจัดทำความสมเหตุสมผลของการวัด Guidelines on Validity of Measurement. โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ: กรุงเทพมหานคร. 131 หน้า.

นันทนา กันยาณุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. 2555. แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี รายงานวิชาการ ฉบับที่ 1/2555. สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐาน กรมอุตสาหกรรมพื้นฐานและเหมืองแร่: กรุงเทพมหานคร. 131 หน้า.

ภิญญา จุลินทร วิภา ตั้งนิพนธ์ ประกิจ จันทร์ติ๊บ และเอกราช สิทธิมงคล. 2554. การสะสมและแพร่กระจายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมแหล่งปลูกส้มพื้นที่สูงภาคเหนือ. รายงานผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2554 เล่ม 2. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพมหานคร. หน้า 137-153.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2557. รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตรายปี 2556-2557 (10 อันดับ). สืบค้นจาก: http://www.doa.go.th/ard, [4 เมษายน 2559].

AOAC. 1993. Peer-Verified Method. Retrieved January 20, 2017, from http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.196.7223&rep=rep1&type=pdf

AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Retrieved November 20, 2017, from https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf

Anderson, L. and A.D. Boseley. 1997. The determination of residues of paraquat and diquat in crops and soil a high performance liquid chromatographic method. ZENECA Agrochemical, Jealott's Hill Research Station: UK. 41p.

Crampon, M., Y. Copard, G. Favreau, J. Raux, N. Merlet-Machour, M.L. Coz, M. Ibrahim, V. Peulon-Agasse and F. Portet-Koltalo. 2014. Occurrence of 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium (Paraquat) in irrigated soil of the Lake Chad Basin, Niger. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 10601-10613.

Gondar, D., R. López, J. Antelo, S. Fiol and F. Arce. 2012. Adsorption of paraquat on soil organic matter: Effect of exchangeable cations and dissolved organic carbon. *Journal of Hazadous Materials*: 218-223.

Hargreaves S. L. 2006. Paraquat: Residue Method for the Determination of Paraquat Dichloride as Paraquat Cation in water (GRM012.01A). Syngenta. Jealott's Hill International Research Centre: UK. 69p.

Jing, C., X. Qun and J. Rohrer. 2016. Sensitive and Rapid Determination of Paraquat and Diquat in Tap and Environment Waters. Application note 1051. Retrieved January 17, 2017, Available from https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-1051-LC-Paraquat-Diquat-Tap-Environmental-Waters-AN70386-EN.pdf

Kennedy, S.H. 1986. The determination of residues of paraquat in soil a spectrophotometric method. ICI Plant Protection Division, Jealott's Hill Research Station: UK. 10p.

Kim V. T., J. C. Shia and M. S. Young. 2008. Fast and Sensitive UPLC/MS(MS) Determination of Diquat and Paraquat in Drinking Water. Retieved January 17, 2017, from http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004220en.pdf

Lock E. A. and M. F. Wilks. 2010. Chapter 83 : Paraquat. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. 1772-1827.

MacBean, C. 2012. *A World Compendium. The Pesticide Manual*. 16th edition. BCPC: UK. 1439p.

Magnusson B. and U. Örenemark. 2014. Eurachem Guide : The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd edition. Retrieved November 20, 2017, from www.eurachem.org.

Merck. 2018. Trifluoroacetic acid MSDS. Available: http://www.merckmillipore.com/TH/en/

product/Trifluoroacetic-acid,MDA_CHEM-108178?ReferrerURL= https%3A%2F %2 Fwww.google.co.th%2, Accessed Nov 2, 2017.

Munch, J.W. and W.J. Bashe. 1997. Determination of diquat and paraquat in drinking water by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (Method 549.2). U.S. Environmental Protection Agency. National exposure research laboratory: Ohio. 21p.

Pateiro-Moure, M., E. Martínez-Carballo, M. Arias-Estévez and J. Simal-Gándara. 2008. Determination of quaternary ammonium herbicide in soils Comparision of digestion, shaking and microwave-assisted extractions. *Journal of Chromatography A:* 110-116.

Rial-Otero, R. B. Cancho-Grande, C. Perez-Lamela, J. Simal-Gándara and M. Arias-Estévez. 2006. Simultaneous Determination of the Herbicides Diquat and Paraquat in Water. *Journal of Chromatographic Science* 44: 539-542.

Robinson, N.J. 2006. Paraquat: Residue Method for the Determination of Paraquat Dichloride as Paraquat Cation in Soil (GRM012.04A). Syngenta, Jealott's Hill International Research Centre: UK. 49p.

Roede, J.R. and G.W. Miller. 2014. Paraquat. *Encyclopedia of Toxicology* 3: 756-758.

SANTE/11813. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. 21-22 November 2017 rev. 0. Retrieved January 20, 2017, from https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf

Taguchi, V. Y., S. W.D. Jenkins, P. W. Crozier and D. T. Wang. 1998. Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography-(Electrospray Ionization) Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9: 830-839.

Wahyu, W. 2013. Development of method for residue analysis of three herbicides in the soil by high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Environmental chemistry and Ecotoxicology* 5(8): 220-226.

Wong, Y.C., N. Norsyamimi and W.A. Wan-Nurdiyana. 2013. Determination of Paraquat (herbicide) Residue Level in Sandy Clay Loam Soil Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Basic & Applied Sciences* 9: 566-577.