การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ไกลโฟเซตและอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก แอซิด (AMPA) ในน้ำและดินด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี

Development and validation of a method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in water and soil samples by liquid chromatography

อำนาจ กะฐินเทศ[a*], จันทิมา ผลกอง[a], นพดล มะโนเย็น[a], สิริพร เหลืองสุชนกุล[a], ทิตยา บุญทองโท[b]

Amnaj Katintet[a*], Jantima Phonkong[a], Noppadon Manoyen[a], Siriporn Luengsuchonkul[a], Tittaya Boontongto[b]

[a]กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[a]Agricultural Production Science Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

[b]ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 6 ชลบุรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ชลบุรี 20000

[b]Regional Medical Sciences Center 6 Chonburi, Department of Medical Sciences, Chonburi 20000

*Corresponding author. E-mail address: katintet.a@gmail.com

บทคัดย่อ

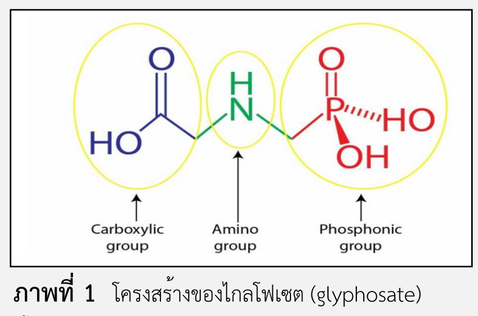
การใช้สารกำจัดวัชพืชในปริมาณสูงและต่อเนื่องทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม เพื่อให้ทราบข้อมูลการตกค้างในสิ่งแวดล้อมและสามารถนำไปประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม จึงได้ทำการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไกลโฟเซตและอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก แอซิด (Aminomethylphosphonic acid, AMPA) ในตัวอย่างน้ำและดินด้วยปฏิกิริยาการทำอนุพันธ์กับ Fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี ผลได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของช่วงการใช้งานไกลโฟเซต และ AMPA ในตัวอย่างน้ำ 1.0-40.0 µg/L และในตัวอย่างดิน 0.1-4.0 mg/kg ค่า LOD และ LOQ ในตัวอย่างน้ำเท่ากับ 0.15 1.00 µg/L และตัวอย่างดินเท่ากับ 0.03 0.10 mg/kg ตามลำดับ ค่า %recovery ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินอยู่ในช่วง 80.1-111.8% และ 80.0-107.4% ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำและดิน สุ่มเก็บในแปลงยางพารา ส้ม ลำไย มันสำปะหลัง อ้อยปลูกใหม่ จำนวนรวม 10 ตัวอย่าง พบการตกค้างในน้ำปริมาณ 1.74-3.99 µg/L และดิน ปริมาณ 1.80-3.89 mg/kg

คำสำคัญ: น้ำ, ดิน, ไกลโฟเซต, อะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก แอซิด, ลิควิดโครมาโทกราฟี

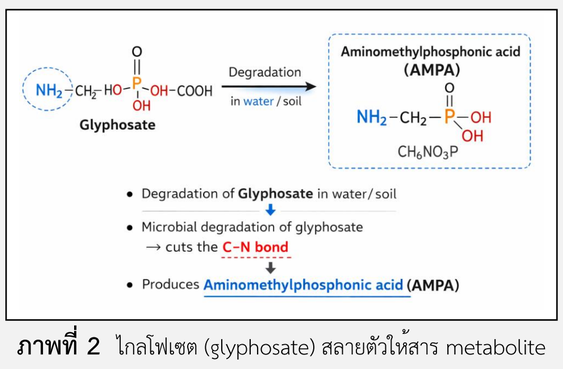
คำนำ

ไกลโฟเซต (glyphosate) มีชื่อ IUPAC คือ N-(phosphonomethyl) glycine มีสูตรโมเลกุล $C_3H_8NO_5P$ และมวลโมเลกุล 169.1 g/mol ความสามารถในการละลายในน้ำ (solubility in water) ปริมาณ 10.5 g/L (pH 1.9, 20°C) ไกลโฟเซตเป็นสารป้องกันกำจัดวัชพืช (herbicide) อยู่ในกลุ่มฟอสโฟโนไกลซีน (phosphonoglycine) ใช้กำจัดวัชพืชหลังงอกประมาณ 2-4 สัปดาห์ในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วเหลือง สับปะรด ปาล์มน้ำมัน และสวนยางพารา (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2554) ความเป็นพิษเฉียบพลันทางการกิน (Acute Oral Toxicity (LD_{50})) ในหนู >5,000 mg/kg·bw และความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสัมผัสผ่านทางผิวหนัง (Acute Dermal Toxicity (LD_{50})) ในกระต่าย >5000 mg/kg·bw (Turner, 2018) การสลายตัวในสิ่งแวดล้อม ค่า degradation time (DT_{50}) ในน้ำ 1-91 วัน และในดิน 1-130 วัน โดยจุลินทรีย์ชนิด *Pseudomonas sp., Arthrobacter atrocyaneus* และ *Flavobacterium sp*. ที่อาศัยอยู่ในดินและน้ำจะย่อยสลายไกลโฟเซตให้สาร metabolite ชนิด Aminomethylphosphonic acid (AMPA)

วิธีวิเคราะห์ไกลโฟเซตและ AMPA เดิมจะเป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำ โดยทำอนุพันธ์ (derivatization) กับ o-phthalaldehyde มีค่า LOQ 3.2 และ 1.2 µg/L ตามลำดับ มีข้อจำกัดคือการใช้ post-column จะมีการอุดตันบ่อย สารเคมีที่ใช้มีราคาแพง ต่อมามีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไกลโฟเซตและ AMPA ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดิน โดยสกัดดินด้วย KOH ทำอนุพันธ์กับ FMOC-Cl วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-MS/MS ได้ค่า LOQ ในน้ำ 50 ng/L และดิน 0.05 mg/kg เป็นวิธีที่ง่ายและลด matrix effect ได้ แต่เครื่องมือวิเคราะห์มีราคาสูงมาก จากข้อจำกัดดังกล่าวทั้งหมด นักวิจัยจึงได้ทำการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์ไกลโฟเซตและอนุพันธ์ AMPA ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดิน เพื่อลดระยะเวลา ลดความยุ่งยากและความซับซ้อน รวมทั้ง interferences ในการวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์ไกลโฟเซตและ AMPA ในน้ำและดินในระดับปริมาณต่ำๆ รวมทั้งผ่านเกณฑ์ยอมรับการทดสอบของ Codex Alimentarius Commission /Good Laboratory (CAC/GL) Assocoation of Official Analytical Chemists (AOAC) และ European Commission Directorate – General for Health and Food Safety (SANTE)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไกลโฟเซต (glyphosate)
(อ้างอิง https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-glyphosate-molecule-and-its-functional-groups_fig4_260375117)



ภาพที่ 2 ไกลโฟเซต (glyphosate) สลายตัวให้สาร metabolite ชนิด Aminomethylphosphonic acid
(อ้างอิง https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-glyphosate-molecule-and-its-functional-groups_fig4_260375117)

อุปกรณ์และวิธีการ

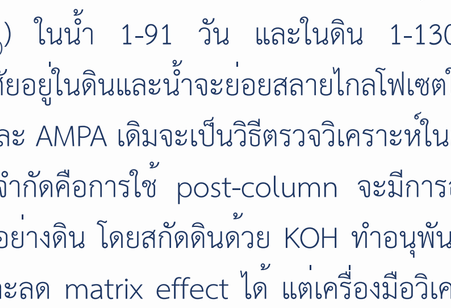
1. อุปกรณ์

เครื่อง Shaker เครื่อง Ultrasonic bath และเครื่อง Ultra-High Performance Liquid Chromatograph (UHPLC)

2. วิธีการ

2.1 การหาสภาวะเวลาที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์

1 mL Std. Glyphosate
1 mL 0.02M FMOC-Cl
2 mL 0.05M Borate buffer (pH 9) ผสมและเขย่า 180 rpm (5,15,30,60 นาที)



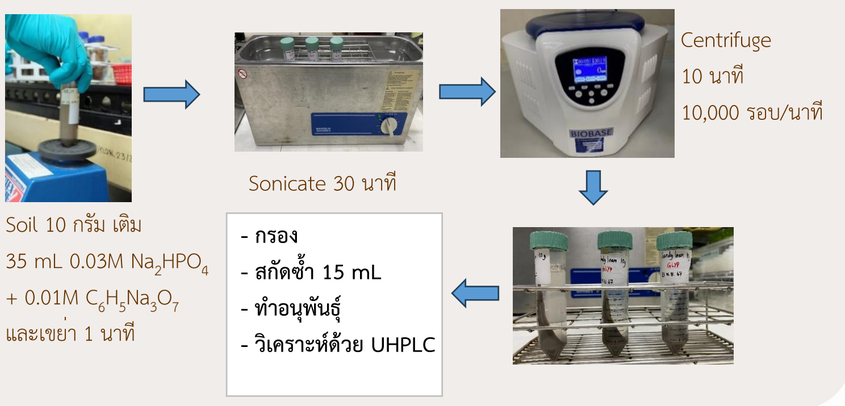
2.2 พัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างน้ำผิวดิน (Surface Water)

Condition: 6 mL Water
Load Sample: 100 mL
Wash: 6 mL Water
Elute: 0.1M HCl (8 mL)

เปรียบเทียบ 2 step
1. AFFINIMIP®SPE และ HR-XA SPE
2. 0.1M HCl ที่ 3, 5, 8 mL

1 mL Water sample ไปทำอนุพันธ์ และวิเคราะห์ด้วย UHPLC

2.3 พัฒนาวิธีสกัดตัวอย่างดินร่วนปนทราย (Sandy loam)



Soil 10 กรัม เติม 35 mL 0.03M Na_2HPO_4 + 0.01M $C_6H_5Na_3O_7$ และเขย่า 1 นาที

Sonicate 30 นาที

Centrifuge 10 นาที 10,000 รอบ/นาที

- กรอง
- สกัดซ้ำ 15 mL
- ทำอนุพันธุ์
- วิเคราะห์ด้วย UHPLC

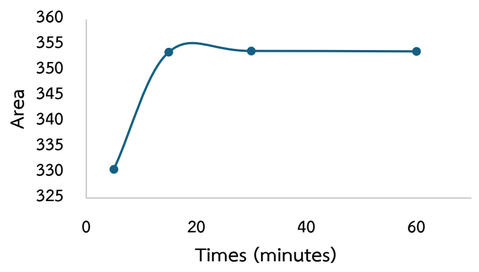
2.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ดังนี้

1. ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Selectivity)
2. ทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)
3. ทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)
4. ทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของช่วงการใช้งาน (Linearity of working range)
5. ทดสอบความถูกต้อง (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ผลการทดลอง

1. ผลสภาวะเวลาที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์

พบว่าเวลา 15 นาที สาร Glyphosate และ AMPA มีค่า Area ที่สูง (0.25 µg/mL) (n=5)

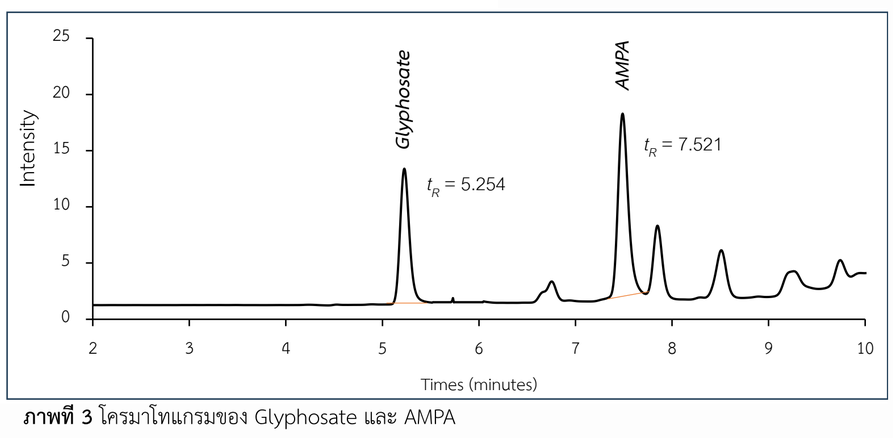


2. ผลการพัฒนาวิธีสกัดไกลโฟเซตและ AMPA ใน น้ำผิวดิน (Surface Water)

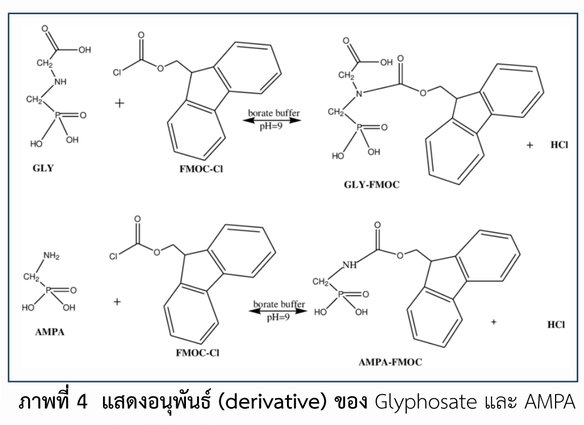
โดยเปรียบเทียบ SPE 2 ชนิด คือ AFFINIMIP และ HR-XA SPE (Elute 8 mL 0.1M HCl) ; 10 µg/L ผลพบว่าค่า Mean Recovery สาร Glyphosate และ AMPA ใน AFFINIMIP®SPE มีค่า 97.5%, 91.3% สำหรับ HR-XA มีค่า 10.0%, 30.9% (n=3) และพบว่า 0.1M HCl (Eluent) ที่ปริมาตร 3, 5, 8 mL (10 µg/L) ให้ค่า Mean Recovery สาร Glyphosate และ AMPA ที่ 5 mL มีค่า 94.3%, 89.6% ที่ 8 mL มีค่า 97.5%, 91.3% ที่ 3 mL มีค่า 68.1%, 73.6% (n=3)

3. ผลการพัฒนาวิธีสกัดไกลโฟเซตและ AMPA ในดินร่วนปนทราย (Sandy loam)

พบว่าการสกัด 0.03M Na_2HPO_4+0.01M $C_6H_5Na_3O_7$ (1.0 mg/kg) สาร Glyphosate และ AMPA ผลค่า Mean Recovery มีค่า 88.2%, 87.8% (n=3) สำหรับ 0.03M Na_3PO_4+0.01M $Na_3C_6H_5O_7$ มีค่า 85%, NT



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ Glyphosate และ AMPA



ภาพที่ 4 แสดงอนุพันธ์ (derivative) ของ Glyphosate และ AMPA ทำปฏิกิริยากับ FMOC-Cl

4. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ Glyphosate (GLYP) และ AMPA ในน้ำผิวดินและดินร่วนปนทราย

Parameters	Samples				Acceptance criteria*
	Water (µg/L)		Soil (mg/kg)		
	glyphosate	AMPA	glyphosate	AMPA	
LOD	0.15	0.15	0.03	0.03	S/N≥3
LOQ	1.00	1.00	0.10	0.10	S/N≥10
Linearity of Working range	0.9957	0.9926	0.9979	0.9995	R^2≥0.98
Accuracy	79.2-111.8% (1.00 µg/L)	75.6-108.8% (1.00 µg/L)	97.7-107.1% (0.10 mg/kg)	80.9-107.4% (0.10 mg/kg)	40-120% (1 ppb)
	91.2-110.3% (10.00 µg/L)	68.2-88.7% (10.00 µg/L)	86.3-95.3% (1.00 mg/kg)	80.0-86.3% (1.00 mg/kg)	60-115% (10 ppb)
	90.6-109.3% (40.12 µg/L)	80.1-84.6% (39.96 µg/L)	82.5-91.7% (4.01 mg/kg)	80.4-88.9% (4.00 mg/kg)	80-110% (0.1-10 ppm)
Precision	7-12%	6-11%	3-4%	2-9%	%RSD≤20%

* CAC/GL 40-1993 (2010), AOAC (2023), SANTE (2024)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้วิธีวิเคราะห์ไกลโฟเซตและ AMPA ในน้ำและดิน โดยการทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย FMOC-Cl วิเคราะห์ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี สามารถตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในตัวอย่างน้ำและตัวอย่างดินได้อย่างถูกต้อง มีความเที่ยง และประหยัดสารเคมี ได้ค่า LOQ อยู่ในระดับต่ำ ผลการทดสอบค่า % recovery และ %RSD ผ่านเกณฑ์การทดสอบทุกช่วงความเข้มข้น วิธีนี้มีความเหมาะสม สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์ไกลโฟเซตและ AMPA ในตัวอย่างน้ำและดิน

อ้างอิง

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2554. **การควบคุมวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช ปี 2554.** กรุงเทพมหานคร : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

Association of Official Analysis Chemists. 2023. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC Official Methods of Analysis./ https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf/ April 17, 2025.

Claude, B., C. Berho, S. Bayoudh, L. Amalric, E. Coisy, R. Nehmé and P. Morin. 2017. Preliminary recovery study of a commercial molecularly imprinted polymer for the extraction of glyphosate and AMPA in different environmental waters using MS. **Environ Sci Pollut Res**: 1-8.

Codex Alimentarius Commission/Good Laboratory 40-1993. 2010. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis. https://www.fao.org/input/download/standards/378 /cxg_040e.pdf./ November 20, 2025.

Eurachem 2025, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Third edition/ https:// www.eurachem.org/ images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd _ed_V1_EN.pdf. / March 24, 2024.

EUROPEAN COMMISSION. 2024. ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED Document No SANTE 11312/2021 v2. Implemented by 01/01/2024. /https://food.ec.europa.eu/system/files/ 2023-11/ pesticides_mrl _guidelines_wrkdoc_2021 -11312.pdf. March 24, 2024

Garba, J., A.W. Samsuri, R. Othman and M.S.A. Hamdani. 2018. Simplified method for derivatization of extractable glyphosate and aminomethylphosphonic acid and their determination by high performance liquid chromatography. **Environmental Research & Technology** 1(2): 19-30.

Sun, L., D. Kong, W. Gu, X. Guo, W. Tao, Z. Shan, Y. Wang and N. Wang. 2017. Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1502: 8-13.

Turner, J A. 2018. **The Pesticide Manual 18th ed.** British Crop Production Council, United Kingdom.