

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2555

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
  - กิจกรรม 1 : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
  - กิจกรรมย่อย 1.2 : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง** : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม phenylurea ในผลไม้  
**ชื่อการทดลอง** : Development and method validation of phenylurea herbicides in fruit
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

<b>หัวหน้าการทดลอง</b>	: วิทยา บัวศรี	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.
<b>ผู้ร่วมงาน</b>	: ศศิมา มั่งนิมิตร	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.
	: ลักษณ์ี เดชานุรักษ์นุกูล	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

### 5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่มฟีนิลยูเรีย (phenylurea) ในผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERs, SweEt Method และ Steinwandter (1985) โดยเลือกวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี การสกัดสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERs (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งสกัดตัวอย่างสับปะรดด้วย acetonitrile, magnesium sulfate และ Sodium chloride นำส่วนที่สกัดได้ไปทำการขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up) ด้วย primary secondary amine (PSA) และ magnesium sulfate แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV detector ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยการใช้เทคนิค fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กลุ่ม phenylurea ที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ diuron และ isoproturon พาราเมเตอร์ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, limit of quantitation (LOQ) และ limit of detection (LOD)

ผลการตรวจสอบพบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99974 – 0.99998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01–2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา % recovery อยู่ในช่วง 81.6-106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง

2.07-3.81 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.14-0.32 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Key word : phenylurea, QuEChERs Method, SweEt Method, Steinwandter Method

## 6. คำนำ

ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร โดยห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษ การเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร มีภารกิจสำคัญในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างใน ผักผลไม้ ผลผลิต ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ซึ่งเป็นเครื่องมือในการคุ้มครองผู้บริโภคทั้งภายในประเทศ การส่งออก ไปจำหน่ายต่างประเทศ และเพื่อปกป้องสิ่งแวดล้อม อีกทั้งการดำเนินการค้าระหว่างประเทศโดยเฉพาะสินค้า เกษตรในปัจจุบันจำเป็นต้องดำเนินการตามมาตรการและข้อจำกัดต่างๆ ที่กำหนดขึ้นโดยหน่วยงานหรือองค์กร นานาชาติ การวิเคราะห์และทดสอบจะเป็นตัวการสำคัญในการที่จะดำเนินการตามมาตรการนั้นๆ ให้ได้ผลดี และ นำไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพตรงตามวัตถุประสงค์ เพื่อให้ห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร เป็นผู้นำด้าน คุณภาพการทดสอบตัวอย่างทางการเกษตร จึงได้เริ่มจัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐานสากล ISO/IEC 17025:2005 “ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ” มาตั้งแต่ปี 2546 และนำข้อกำหนดทุกข้อมาใช้ปฏิบัติงานในทุกงานทดสอบ โดยได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการ แล้วนั้น ซึ่งต้องดำเนินการรักษาสภาพขอข่ายการทดสอบที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐานดังกล่าวแล้ว ยังต้อง เพิ่มขอข่ายการทดสอบให้ได้รับการรับรองฯ ต่อไป การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัด วัชพืชกลุ่ม phenylurea ในผลไม้ เป็นการดำเนินกิจกรรมเพื่อแสดงถึงความมั่นใจได้ว่า ผลการทดสอบที่ได้รับจาก ห้องปฏิบัติการนั้น ถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ โดยวิธีการวิเคราะห์ จำเป็นต้องมีการเลือกใช้วิธีทดสอบที่เหมาะสม และผ่านการตรวจสอบความใช้ได้มาแล้ว

ห้องปฏิบัติการจะต้องใช้วิธีมาตรฐาน (standard method) เท่านั้น หากมีการปรับวิธีการหรือคิดค้นขึ้น เอง จำเป็นต้องนำมาทดสอบเพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ตาม parameter ที่ กำหนด ได้แก่ linearity / working range, accuracy, precision, limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) โดยทำการทดสอบในจำนวน/ระดับความเข้มข้น และจำนวนซ้ำที่กำหนด เมื่อผ่าน เกณฑ์ยอมรับตาม parameter ที่กำหนดแล้วจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาใช้ได้ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์สารพิษ ตกค้างทั้งสามวิธี คือ QuEChERs method, SweEt method และ Steinwandter method (1985) เป็นวิธี มาตรฐานสำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ที่ได้รับการนิยมน้อยกว่าแพร่หลายในกลุ่ม ประเทศยุโรปและสหรัฐอเมริกาในขณะนี้ โดยนำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ และทดสอบ ความสามารถของวิธีการในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง (collaborative study)

QuEChERs method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) โดย Anastassiades และคณะ ได้พัฒนาวิธี QuEChERs ซึ่งเป็นวิธีการสกัดตัวอย่างที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถใช้กับ พืชและวัตถุมีพิษหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว รวมทั้งให้คุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์สูง ลดขั้นตอน

และแรงงานคนในการสกัดตัวอย่าง ใช้สารเคมีและเครื่องแก้วน้อย (Anastassiades, *et al.*, 2003) วิธีการ SweEt method เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาโดย Dr. Tuija Pihlström และคณะ ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศสวีเดน โดยเน้นที่การลดการใช้สารเคมีให้ใช้น้อยที่สุดและเลือกสารที่มีผลกระทบต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม (Tuija Pihlström, *et al.*, 2007) วิธีที่ปรับจาก Steinwandter method โดยเป็นวิธีการที่กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ทำการปรับขึ้นและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการกลุ่ม organophosphorus, pyrethroid, endosulfan, carbamate ในตัวอย่างมะม่วง และ abamectin ในตัวอย่างพริก และใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของกลุ่มงานฯ (Steinwandter, H. 1985)

## 7. วิธีดำเนินการ

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Teflon centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. Micro centrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. Auto sampler vials for HPLC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. Auto pipette ขนาด 0.1-1 มิลลิลิตร
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
6. เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor) และ Vortex mixer
7. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder
8. เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษ HPLC UV detector

### สารเคมี

1. สารมาตรฐานกลุ่มกำจัดวัชพืช กลุ่ม phenylurea ได้แก่ diuron, isoproturon
2. Acetonitrile, Hexane, Methanol, Ultrapure water, และ Toluene ชนิด Pesticide grade (J.T baker)
3. Anhydrous Magnesium sulfate (ACS powder-Fisher) เเผาที่ 500°C นาน 5 ชั่วโมง
4. Sodium chloride (NaCl) ชนิด Analytical grade (Merck)
5. SPE sorbent ชนิด Primary-Secondary-Amine (PSA varian)
6. Graphite Carbon Black (GCB)

### วิธีการ

1. วางแผนการดำเนินการ

ศึกษาข้อมูลและวิธีการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบทดสอบค่าที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ ได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

## 2. เตรียมสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ

### 2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

#### 2.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution กลุ่มกำจัดวัชพืช

2.1.1.1 เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานกลุ่มกำจัดวัชพืช โดยชั่งสารมาตรฐานให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำค่า % purity มาคำนวณกลับเป็นน้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ toluene PR grade เป็นตัวทำละลาย

2.1.1.2 เตรียม intermediate solution ของสารละลายมาตรฐานกลุ่มกำจัดวัชพืชแต่ละชนิด จากข้อ 2.1.1.1 ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลาย

2.1.1.3 เตรียม mix herbicide spike solution จาก intermediate solution ให้ได้ความเข้มข้นของ mix herbicide spike solution เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

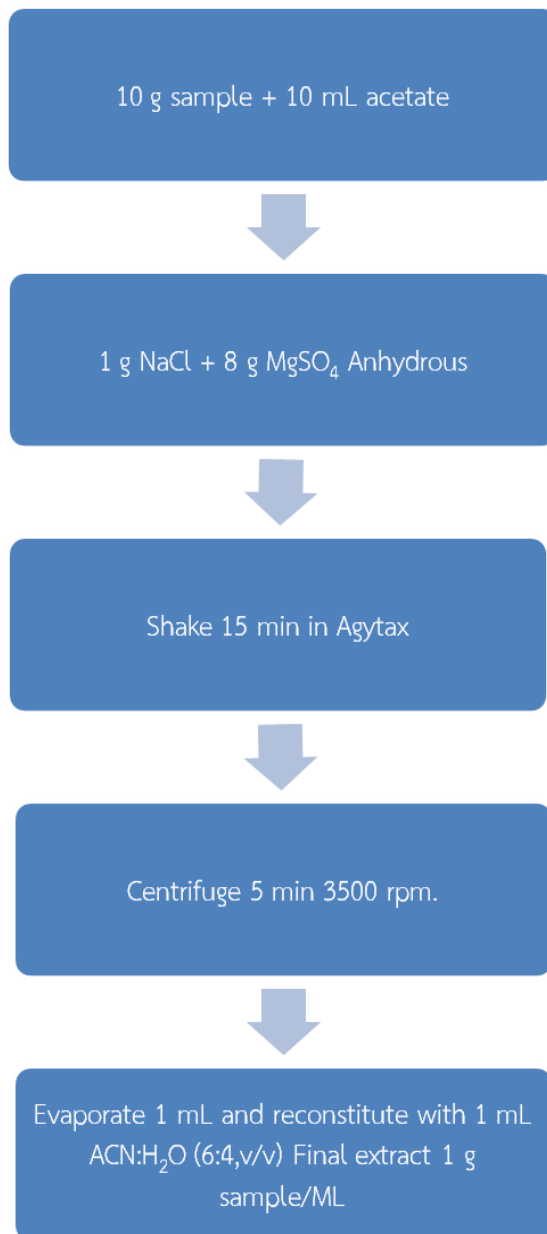
2.1.1.4 เตรียม mix calibration standard solution เตรียมจากเจือจาง mix herbicide spike solution ด้วยสารสกัดสับปรดใน acetonitrile ให้มีความเข้มข้นระดับ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

## 3. การสกัดตัวอย่าง

### 3.1 วิธี SweEt method ใช้ขั้นตอนวิธีการการสกัดตัวอย่าง ตามแผนภาพที่ 1

New advances in Ethyl Acetate Method

Tuija Pihlström, Gun Blomkvist, Paula Friman, Ulla Pagard and Bengt-Göran Österdahl, Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, Volume 389, Number 6, Pages 1773-1789

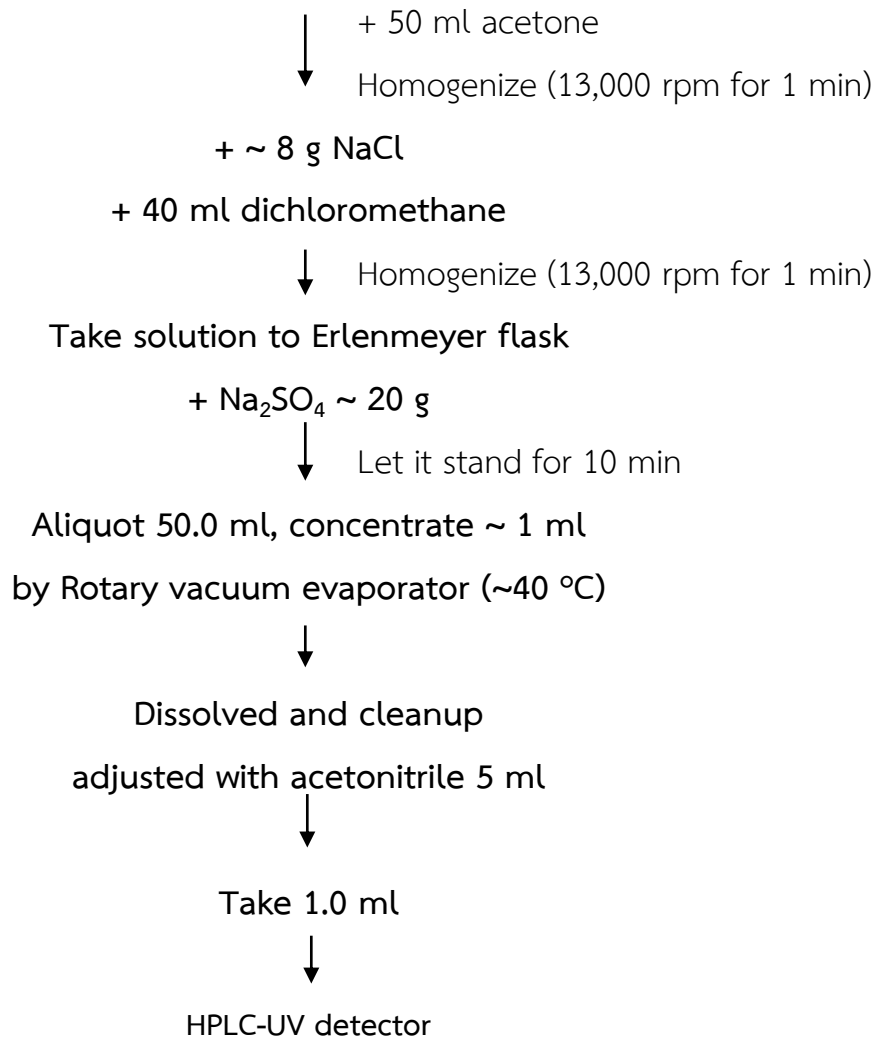


แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนวิธี SweEt method

3.3 วิธีการที่ปรับจาก Steinwandter method (1985) โดยกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัย วัตถุประสงค์การเกษตร ใช้ขั้นตอนวิธีการการสกัดตัวอย่าง ตามแผนภาพที่ 2 ซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของกลุ่มงานฯ โดยได้รับการรับรองการตรวจวิเคราะห์สารพิษ ตกค้าง กลุ่ม organophosphorus, pyrethroid, endosulfan, carbamate ในตัวอย่างมะม่วง และ abamectin ในตัวอย่างพริก

Steinwandter, H. 1985. Universal 5 Min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem (1985) 322 : 752-754.

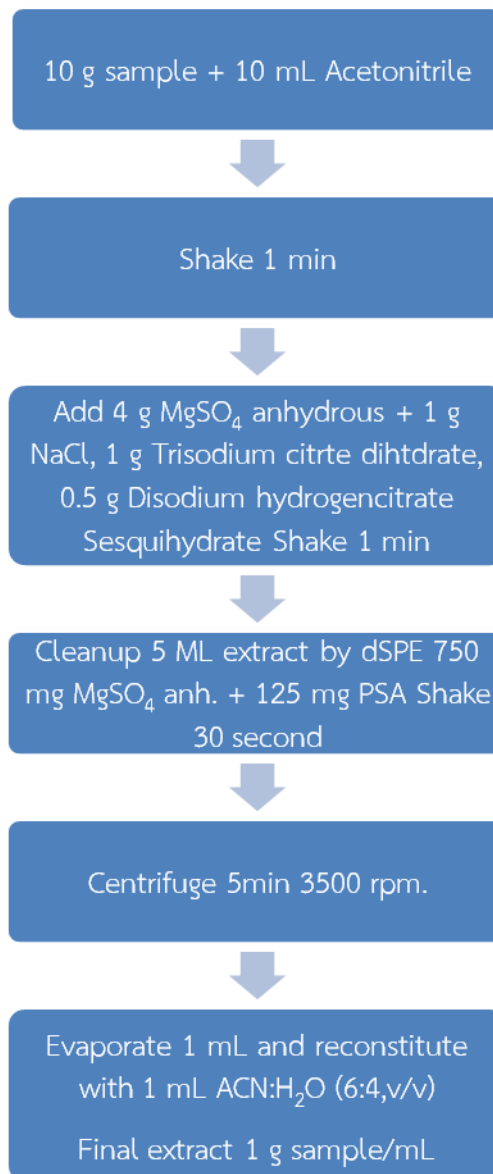
**25 ± 0.1 g sample**



แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนวิธีการที่ปรับจาก Steinwandter method

### 3.3 วิธี QuEChERS method ใช้ขั้นตอนวิธีการสกัดตัวอย่าง ตามแผนภาพที่ 3

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaber. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive solid-Phase Extraction” for determination” of Pesticide Residue in Produce. AOAC. Int.86, 412-431



แผนภาพที่ 3 ขั้นตอนวิธี QuEChERS method

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากทั้งสามวิธีการที่บรรจุอยู่ในขวด HPLC-vial นำไปด้วยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC UV-detector

*Instrument condition:*

#### HPLC-UV parameter for phenylurea

Instrument: HPLC binary pump with a UV variable wavelength detector

Detector : UV at 254 nm

Column : RP Select B (5  $\mu$ m)

Mobile phase : Isocratic 65% ACN, 35% H<sub>2</sub>O

Flow rate : 1 mL per min

Injection volume : 20 µL

Column temperature : 40 °C

Stop time : 12 min

#### 4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

กำหนดการตรวจสอบ parameter ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) (ISO/IEC17025:2005) ได้แก่

##### 4.1 linearity/working range

linearity เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารมา plot เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ส่วน range เป็นค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่อยู่ใน linearity ซึ่งมี ค่า accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการทดสอบ linearity/working range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างอย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ

##### 4.2 accuracy/precision

การทดสอบ accuracy โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) ของวัตถุที่มีพิษที่เติมลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับคือ สูง กลาง และต่ำ ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยนำผลการวิเคราะห์ accuracy มาหา %RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบ %RSD ที่ได้จากการทดลองกับ Predicted Horwitz RSD ของ repeatability ซึ่ง Predicted Horwitz RSD มีสูตรคำนวณ (Food Standard Agency, 2004) (Horwitz, W., 2000) ดังนี้

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

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของวัตถุที่มีพิษในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์ (เช่น 0.5 mg/kg,  $C = 0.5 \times 10^{-6}$ )

**4.3 Limit of Detection (LOD)** เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องพิสูจน์ accuracy และ precision โดยค่า  $\text{LOD} = 3\text{SD}$  และ ค่าสัญญาณการวัดต้องมีค่า signal to noise ratio  $\geq 3$  ทำการประมาณค่า LOD จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ

**4.4 Limit of Quantitation (LOQ)** เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยมีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยค่า  $\text{LOQ} = 10 \text{SD}$  (SD ; standard deviation ของความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำการทดสอบ) ทำการประมาณค่า LOQ จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ

ระยะเวลา ตุลาคม 2554 - กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร



## 8.. ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรดซึ่งเป็นตัวแทนของผลไม้ เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS, SweEt Method และ Steinwandter (1985) โดยเลือกวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ และตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง HPLC UV detector โดยตรวจสอบ parameter ต่างๆ ได้แก่ linearity, working range, LOD, LOQ, precision และ accuracy โดยมีเกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Codex, 1995)

parameter	criteria	
linearity	$R^2 \geq 0.995$	
working range	$R^2 \geq 0.995$ % recovery = 50-120 ( $\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) = 60-120 ( $> 1 \mu\text{g}/\text{kg} \leq 0.01 \text{ mg}/\text{kg}$ )	
LOD	LOD= 3SD และ $S/N \geq 3$	
LOQ	LOQ = 10 SD	
precision	HORRAT $\leq 2$	
accuracy	conc. (mg/kg)	% recovery
	$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	50-120
	$> 1 \mu\text{g}/\text{kg} \leq 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$	60-120
	$> 0.01 \text{ mg}/\text{kg} \leq 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$	70-110
	$> 1 \text{ mg}/\text{kg}$	70-110

### 5.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี SweEt Method (Ethly Acetate)

ตัวอย่างตัวอย่าง ซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea

ผลการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea 2 ชนิด ได้แก่ diuron และ isoproturon แบ่งตาม parameter ต่างๆ (ตารางที่ 2 และ 3) และเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) สรุปได้ดังนี้

5.1.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 7-8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99985-0.99997 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า  $R^2 \geq 0.995$  (FDA, 2005) และ% recovery 70.3-105.4 (ตารางที่ 2) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery ในช่วง 70-110 (Codex, 1995)

5.1.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า % recovery ในช่วง 72.0-106.8 มี %RSD ในช่วง 1.89-3.78 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.11-0.29 (ตารางที่ 3) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ % recovery ในช่วง 70-110 และมีค่า HORRAT  $\leq 2$  (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ linearity/working range ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 7-8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Name	range (mg/kg)	$R^2$	no. of level	%recovery	
				min	max
1 diuron	0.01-2.0	0.99997	7	70.3	105.4
2 isoproturon	0.01-2.0	0.99985	7	71.8	100.2

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Name	conc. (mg/kg)											
	0.025				0.05				0.2			
	%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT
1 diuron	75.5	102.9	2.32	0.13	73.4	99.9	2.49	0.15	72.0	93.7	3.51	0.27
2 isoproturon	75.8	106.8	2.96	0.16	74.1	98.7	1.89	0.11	72.8	93.4	3.78	0.29

## 5.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธีที่ปรับจากวิธีการของ Steinwandter method (1985)

ตัวอย่างตัวอย่าง ซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea

ผลการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea 2 ชนิด ได้แก่ diuron และ isoproturon แบ่งตาม parameter ต่างๆ (ตารางที่ 4 และ 5) และเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) สรุปได้ดังนี้

5.2.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 7-8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99981-0.99995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า  $R^2 \geq 0.995$  (FDA, 2005) และ% recovery 72.3-101.2 (ตารางที่ 4) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery ในช่วง 70-110 (Codex, 1995)

5.2.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า % recovery ในช่วง 71.0-107.6 มี %RSD ในช่วง 0.89-3.88 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.05-0.30 (ตารางที่ 5) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ % recovery ในช่วง 70-110 และมีค่า HORRAT  $\leq 2$  (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ linearity/working range ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 7-8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Name	range (mg/kg)	$R^2$	no. of level	%recovery	
				min	max
1 diuron	0.01-2.0	0.99981	7	72.3	110.4
2 isoproturon	0.01-2.0	0.99995	7	74.8	101.2

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Name	conc. (mg/kg)											
	0.025				0.05				0.2			
	%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT

1	diuron	74.5	106.2	2.86	0.16	74.5	96.9	0.89	0.05	71.0	94.5	3.05	0.23
2	isoproturon	73.2	107.6	2.97	0.16	74.1	97.8	3.18	0.19	78.2	97.3	3.88	0.30

### 5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี QuEChERS method

ตัวอย่างตัวอย่าง ซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea

ผลการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea 2 ชนิด ได้แก่ diuron และ isoproturon แบ่งตาม parameter ต่างๆ (ตารางที่ 6 - 8) และเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 1) สรุปได้ดังนี้

5.3.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 7-8 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99974 – 0.99998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือ มีค่า  $R^2 \geq 0.995$  (FDA, 2005) และ % recovery 81.6-109.1 (ตารางที่ 6) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery ในช่วง 70-110 (Codex, 1995)

5.3.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง รวม 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า มีค่า % recovery ในช่วง 81.6-106.8 มี %RSD ในช่วง 2.07-3.81 มีค่า HORRAT ในช่วง 0.14-0.32 (ตารางที่ 7) ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ % recovery ในช่วง 70-110 และมีค่า HORRAT  $\leq 2$  (Horwitz, 2000)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ linearity/working range ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 7-8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

	Name	range (mg/kg)	$R^2$	no. of level	%recovery	
					min	max
1	diuron	0.01-2.0	0.99974	7	81.6	109.1
2	isoproturon	0.01-2.0	0.99998	7	85.9	101.2

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

Name		conc. (mg/kg)											
		0.025				0.05				0.2			
		%recovery		precision		%recovery		precision		%recovery		precision	
		min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT	min	max	%RSD	HORRAT
1	diuron	94.2	106.8	3.81	0.23	94.1	100.5	2.07	0.14	81.6	94.1	3.81	0.32
2	isoproturon	96.3	105.2	2.64	0.16	93.3	100.3	2.26	0.15	81.8	93.4	3.60	0.31

5.3.3 LOD และ LOQ ค่า LOD จากการคำนวณตามข้อ 4.3 และมีการปรับระดับความเข้มข้นในตัวอย่างและทำการทดสอบ พบว่า LOD มีระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า signal to noise ratio (S/N) อยู่ในช่วง 5.8-6.8 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.4 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับคือมีค่า signal to noise ratio  $\geq 3$  ค่า LOQ จากการคำนวณตามข้อ 4.4 และมีการปรับระดับความเข้มข้นในตัวอย่างและทำการทดสอบ พบว่าค่า LOQ มีค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มี % recovery ในช่วง 84.7 – 101.2 มี %RSD ในช่วง 5.04-6.31 และค่า HORRAT ในช่วง 0.24-0.30 ซึ่งที่ระดับ LOQ มีค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และได้ทำการหาค่า signal to noise ratio (S/N) อยู่ในช่วง 8.5-13.5 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.4 และ 12.2 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ LOD และ LOQ ในตัวอย่างสับปะรดจากการทดสอบ 10 ซ้ำ

Name		LOD conc. (mg/kg)	signal/noise			LOQ conc. (mg/kg)	%recovery		precision		signal/noise		
			min	max	average		min	max	%RSD	HORRAT	min	max	average
1	diuron	0.005	5.8	6.8	6.4	0.01	84.9	98.3	5.04	0.24	8.5	10.2	9.4
2	isoproturon	0.005	6.6	7.5	7.1	0.01	84.7	101.2	6.31	0.30	10.7	13.5	12.2

## 8. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี SweEt Method (Ethly Acetate) พบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99985-0.99997 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01–2.00 มิลลิกรัม

ต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา % recovery อยู่ในช่วง 72.0-106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 1.89-3.78 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.11-0.29 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธีที่ปรับจากวิธีการของ Steinwandter method (1985) พบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99981-0.99995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01–2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา % recovery อยู่ในช่วง 81.6-106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 0.89-3.88 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.05-0.30 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ด้วยวิธี QuEChERs method พบว่า range/linearity ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่า correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.99974 – 0.99998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01–2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหา % recovery อยู่ในช่วง 81.6-106.8 เปอร์เซ็นต์ มี %RSD ในช่วง 2.07-3.81 precision ของสารพิษตกค้าง มีค่า HORRAT ในช่วง 0.14-0.32 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ในสับปะรด ทั้งสามวิธีการสกัด จะเห็นได้ว่าการสกัดสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERs method ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยได้เลือกวิธีการนี้มาเพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถสรุปข้อมูลผลการพิสูจน์ความใช้ได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปความสามารถของวิธีในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม phenylurea ที่ผ่านพิสูจน์ความได้ในตัวอย่างสับปะรด

name		Papaya		
		conc. (mg/kg)		
		LOD	LOQ	range
1	diuron	0.005	0.01	0.01-2
2	isoproturon	0.005	0.01	0.01-2

### 9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง phenylurea ในผลไม้
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง
4. จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐและเอกชนนำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

### 10. เอกสารอ้างอิง

- Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaber. D. and Schenck F.J. 2 0 0 3 . *Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive solid-Phase Extraction” for determination” of Pesticide Residue in Produce.* AOAC. Int.86, 412-431
- Steinwandter, H. 1985. *Universal 5 Min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals.* Fresenius Z. Anal. Chem (1985) 322 : 752-754.
- Tuija Pihlström, Gun Blomkvist, Paula Friman, Ulla Pagard and Bengt-Göran Österdahl, *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection,* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, Volume 389, Number 6, Pages 1773-1789