

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2555

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้อง
แม่นยำตามมาตรฐานสากล
- กิจกรรม 1 : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
- กิจกรรมย่อย1.2 : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม
Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด
- ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Method Validation of Organophosphorous ,Pyrethroid and
Endosulfan Residues in Mangosteen
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- หัวหน้าการทดลอง : วิสุทธิ เสงขศรี กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร สปผ.
- ผู้ร่วมงาน : ปิยะศักดิ์ อรรถบุตร กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร สปผ.
: ชนิตา ทองแซม กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร สปผ.

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous, Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด โดยวิธีทดสอบจากการประยุกต์ของ วิธีการของ Steinwandter (1985) โดยการสกัดด้วย acetone, dichloromethane และ sodium chloride ทำการ clean up โดยใช้ส่วนผสมของ sorbent ชนิด PSA และ SAX (1:1) ชะด้วย hexane:dichloromethane 4:1 และ 1:1 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์โดยใช้ เครื่อง Gas chromatograph ทำการพิสูจน์ความใช้ได้ ของวิธีการโดยการใช้เทคนิค fortified sample ที่ระดับ ความเข้มข้นต่างๆ กลุ่ม Organophosphorous ที่ทำการทดสอบมี 18 ชนิด Pyrethroid 7 ชนิด และ Endosulfan 3 ชนิด พารามิเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ linearity/range, accuracy, precision, LOD และ LOQ ผล การวิเคราะห์พบว่า linearity/range ของสารทั้ง 3 กลุ่ม มีค่า correlation coefficient > 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ ที่ยอมรับได้ การทดสอบกลุ่ม Organophosphorous, Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด พบว่ามีค่า Range อยู่ในช่วง 0.01- 2.00, 0.005-0.5 และ 0.005-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การพิสูจน์ accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 70-110 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 สำหรับค่า LOD อยู่ระหว่าง 0.005-0.02, 0.002-0.02 และ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ อยู่ระหว่าง 0.01-0.05, 0.005-0.1 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

6. คำนำ

จากการจัดตั้งองค์การการค้าโลก (WTO) ในปี พ.ศ.2538 มีความตกลงที่เกี่ยวข้องกับสุขอนามัยและคุณภาพของอาหาร 2 ฉบับ คือ ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary & Phytosanitary Measure) และความตกลงว่าด้วยอุปสรรคทางเทคนิคต่อการค้า (Agreement on Technical Barrier to Trade, TBT) ที่ให้ประเทศสมาชิกกำหนด หรือใช้บังคับมาตรการเท่าที่จำเป็นในการปกป้องชีวิตหรือสุขภาพของมนุษย์ สัตว์ และพืชซึ่งประเทศสมาชิกได้มีการนำปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิต ผลิตภัณฑ์การเกษตรและสิ่งแวดล้อม มาใช้เป็นมาตรการกีดกันทางการค้าสำหรับประเทศที่ส่งสินค้าเกษตรเป็นสินค้าออก ดังนั้นประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตร รวมทั้งประเทศไทยจำเป็นต้องปรับปรุงกฎระเบียบ และข้อกำหนดต่างๆที่เกี่ยวข้องกับสุขอนามัย และมาตรการว่าด้วยอุปสรรคทางเทคนิคต่อการค้า ให้มีความสอดคล้องกับมาตรฐานขององค์การระหว่างประเทศ เช่น codex, ISO เพื่อแสดงความเท่าเทียมกัน ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องพัฒนาระบบห้องปฏิบัติการที่มีเป้าหมายใหญ่ คือ การวิจัยและพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ (Method development) ให้เป็นมาตรฐาน ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation) และทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ (Proficiency testing) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับได้ และเพื่อขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ (Laboratory accreditation) ตามมาตรฐานสากล (ISO/IEC17025,2005) สำหรับงานวิจัยนี้ จะเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของสารพิษตกค้างกลุ่ม triazophos ในมะม่วง โดย parameter ที่ใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการ ได้แก่ linearity/ rang, accuracy, precision, LOD และ LOQ (กนกพร และทิพวรรณ, 2547) และสถาบันอาหาร, 2547) ทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล และสามารถใช้ในการขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ส่งออกต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องสกัดชนิดปั่นความเร็วสูง (Homogenizer) เครื่องระเหยสารละลายชนิด Flash evaporator, Nitrogen evaporator ตู้อบอุณหภูมิสูง เครื่องชั่งชนิด 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง และเครื่องบดตัวอย่าง (Food processor)
2. เครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipet, auto pipet, erlenmeyer flask, lab bottle, flat bottle flask และ glass syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร
3. สารเคมีชนิด Analytical grade ได้แก่ acetone, dichloromethane, acetonitrile, sodium chloride และ sodium sulfate anhydrous เหนือที่ 450 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator
4. สารเคมีชนิด pesticide grade ได้แก่ toluene, sorbent ชนิด PSA และ SAX
5. สารมาตรฐาน กลุ่ม Organophosphorous 18 ชนิด ได้แก่ DDVP, Mevinphos, Dimethoate, Diazinon, Parathion-methyl, Pirimiphos- methyl, Fenitrothion, Malathion, Chlorpyrifos, Parathion-

ethyl, Pirimiphos- ethyl, Methidathion, Prothiophos, Profenophos, Ethion, Triazophos, EPN, Phosalone กลุ่ม Pyrethroid 7 ชนิด ได้แก่ Bifenthrin, Lambda-cyhalothin, Permethrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvalerate, และ Deltamethrin ส่วน Endosulfan 3 ชนิด ประกอบด้วย Alpha-Endosulfan, Beta-Endosulfan และ Endosulfan sulfate

6. เครื่องตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Gas chromatograph (GC) ชนิด Electron capture detector (ECD) และ Flam Photometric detector (FPD)

วิธีการ

1. การเตรียมสารมาตรฐาน

1.1 เตรียม stock standard solution 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 เตรียม Mixed Standard Solution 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 เตรียม Intermediate Mixed Standard Solution 1 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4 เตรียม working standard solution เพื่อทำ Calibration curve

โดยเตรียมจากสารละลายมาตรฐาน Mixed Standard Solution ที่มีความเข้มข้น 1 5 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นในสารละลายเท่ากับความเข้มข้นของวัตถุอันตรายในตัวอย่างคือ 0.01 0.02 0.05 0.1 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2. การเตรียมตัวอย่าง

หั่นผลมังคุดรวมทั้งเปลือกให้มีขนาดเล็กกลง โดยเอาหัวและจุกทิ้งไปแล้วนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง food processor

3. การสกัดตัวอย่าง

การสกัด ใช้วิธีประยุกต์ของ Steinwandter 1985 ดังนี้

3.1 ชั่งตัวอย่างมังคุด 25 ± 0.1 กรัม ใน lab bottle ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2 เติม acetone 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วย homogenizer ความเร็วประมาณ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

3.3 เติม sodium chloride 8 กรัม และ dichloromethane 40 มิลลิลิตร ปั่นอีก 1 นาที

3.4 เทสารละลายส่วนใสใน lab bottle ที่มี Na_2SO_4 anhydrous ประมาณ 30 กรัม ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที

3.5 แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรจนเกือบแห้ง ปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย ethyl acetate (PR) แบ่งสารละลายตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous ด้วยเครื่อง GC ชนิด FPD

4. การขจัดสิ่งปนเปื้อน (clean up)

4.1 การเตรียม column โดยใช้ syringe column ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่อุดปลาย column ด้วยสำลี ปิดทับด้วย sodium sulfate ประมาณ 1 เซนติเมตร เติมส่วนผสมของ sorbent ชนิด PSA และ SAX (1:1) ปริมาณ 1 กรัม และปิดทับด้วย sodium sulfate ประมาณ 1 เซนติเมตร

4.2 ล้าง column ด้วย hexane 5 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย ตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร นำมาลดปริมาตรให้แห้ง และละลายด้วย hexane: dichloromethane 4:1 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร เทใส่ column รองรับไว้

4.4 เชะต่อด้วย hexane: dichloromethane 4:1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และชะต่อด้วย hexane: dichloromethane 1:1 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร รองรับรวมกัน

4.5 นำส่วนที่รองรับได้ไปลดปริมาตร และปรับปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย hexane นำไปตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างกลุ่ม Pyrethroid และ Endosulfan ด้วยเครื่อง GC ชนิด ECD

5. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC)

5.1 สภาพะการใช้งานเครื่อง GC มีดังนี้

5.1.1 เครื่อง GC ชนิด FPD ยี่ห้อ Agilent Technology รุ่น 6890N

Column : DB 5.625 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร

สารเคลือบหนา 0.50 ไมโครเมตร

Inlet : mode:splitless, temperature 250° C ,pressure 15.96 Psi

Purge flow 40 ml/min, purge time 0.75 min, total flow 46.1 ml/min

Saver gas 20.0 ml/min ,Saver time 2.0 min

Gas type : He

Detector : temperature 250° C

Hydrogen flow 150 ml/min, air flow 110 ml/min

Mode : constant column+make up flow,combine flow 60 ml/min

Make up gas : N₂

Oven program : 70 ° C (1 min) $\xrightarrow{15\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 180 ° C (4 min) $\xrightarrow{15\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 250 ° C (5 min)
 $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 270 ° C (12 min) run time 38 min

Carrier gas : He flow 3.5 ml/min

5.1.2 เครื่อง GC ชนิด ECD ยี่ห้อ Agilent Technology รุ่น 6890N

Column : Ultra-1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 25 เมตร

สารเคลือบหนา 0.17 ไมโครเมตร

Inlet : mode:splitless, temperature 250° C ,pressure 9.63 Psi

Purge flow 40 ml/min, purge time 0.75 min, total flow 45.3 ml/min

Saver gas 20.0 ml/min ,Saver time 2.0 min

Gas type : He

Detector : temperature 300 ° C

Mode : constant column+make up flow,combine flow 60 ml/min

Make up gas : N₂

Oven program : 70 ° C (1 min) $\xrightarrow{15\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 180 ° C (4 min) $\xrightarrow{15\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 250 ° C (5 min) $\xrightarrow{5\text{ }^{\circ}\text{C/min}}$ 270 ° C (12 min) run time 38 min

Carrier gas : He flow 2.2 ml/min

6. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

6.1 การหา linearity และ range

6.1.1 spike สารละลายมาตรฐาน ลงในตัวอย่างมั่งคุด ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ คือ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 1 ซ้ำ

6.1.2 สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ peak (แกน y) และความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง (แกน x)

6.1.3 พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง ซึ่งมีค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995 จะได้ linearity และ range

6.1.4 พิสูจน์ linearity และ range โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 6.1.1-6.1.3 แต่ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ คำนวณหาค่า correlation coefficient (r) จะต้องอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้คือ ≥ 0.995

6.2 การหา accuracy และ precision

6.2.1 การหา accuracy

1) ทำการ spike สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างมั่งคุดให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ กลาง สูง ซึ่งมีความเข้มข้น 0.02, 0.1 และ 0.5 แต่ละระดับความเข้มข้นทำการทดสอบ 7 ซ้ำ คำนวณหาค่า เปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืน (% recovery)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)} \times 100\%}{\text{ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมลงไป (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)}}$$

หลักเกณฑ์การยอมรับของ accuracy คือมีค่า %recovery ในช่วง 70-120 เปอร์เซ็นต์ (FAO/WHO, 1997; Dogheim *et al*, 1999; Kuet และ Sent, 2004)

6.2.2 การหา precision

นำผลที่ได้จากการหา accuracy มาหา precision โดยหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย %RSD (relative standard deviation) และหาค่า HORRAT

$$\% \text{RSD} = \frac{S D \times 100}{X}$$

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

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

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

หลักเกณฑ์การยอมรับของ precision คือมีค่า %RSD ตามตารางที่4 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

6.3 การหา Limit of detection (LOD) และ Limit of quantitation (LOQ)

6.3.1 การหา LOD

ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ประมาณค่า LOD โดย LOD เท่ากับ $3 \times \text{SD}$ (SD=Standard deviation) ปรับค่า LOD จากการคำนวณมา spike ในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาคำนวณ signal/noise ของแต่ละสารซึ่งจะต้องมีค่า ≥ 3

6.3.2 การหา LOQ

ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่ของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ ประมาณ ค่า LOQ โดย LOQ เท่ากับ $10 \times \text{SD}$ ปรับค่า LOQ จากการคำนวณมา spike ในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาตรวจสอบ accuracy และ precision ซึ่งต้องผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

ระยะเวลา ตุลาคม 2554-กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1.Linearity และ range

ผลการวิเคราะห์จากวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous 18 ชนิด ที่ 7 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01 0.02 0.05 0.1 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า linearity ของวิธีวิเคราะห์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.9982-1.0000 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือมีค่า $r \geq 0.995$ และมี range ในช่วง 0.01-2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับกลุ่ม Pyrethroid 7 ชนิด และ Endosulfan 3 ชนิด ทดสอบที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.005 0.01 0.02 0.05 0.1 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า Pyrethroid 6 ชนิด มีค่า r อยู่ระหว่าง 0.9960-0.9985 และมีค่า range ในช่วง 0.005-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น bifenthrin และ Endosulfan มีค่า r ระหว่าง 0.9984-0.9993 และ range ในช่วง 0.005-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 1)

2. Accuracy และ Precision

การทดสอบ accuracy และ precision ที่ 3 ระดับ ความเข้มข้น คือ 0.02, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ได้ผลการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมาตรฐานตามตารางที่ 3 และ 4 ซึ่งให้ผลดังนี้

2.1 กลุ่ม Organophosphorous มีค่า%recovery เฉลี่ยในช่วง 78-105, %RSD 2.27-11.98 และ HORRAT 0.15-0.87 (ตารางที่ 2)

2.2 กลุ่ม Pyrethroid มีค่า%recovery เฉลี่ยในช่วง 77-108 %RSD 4.33-17.07 และ HORRAT 0.37-1.09 (ตารางที่ 2)

2.3 Endosulfan ซึ่งประกอบด้วย alph-endosulfan, beta-endosulfan, และ endosulfan sulfate , มีค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 74-91 %RSD 5.00-11.19 และ HORRAT 0.43-0.73 (ตารางที่ 2)

3. LOD และ LOQ

จากการ spike ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบซ้ำ ประมาณค่า LOD เท่ากับ $3 \times SD$ และ LOQ เท่ากับ $10 \times SD$ ปรับค่า LOD และ LOQ จากผลการคำนวณ ทำการทดสอบซ้ำ ได้ผลการทดสอบที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมาตรฐาน คือ LOD มีค่า signal/noise ratio ≥ 3 และ LOQ ผ่านการพิสูจน์ Accuracy และ Precision ซึ่งให้ผลดังนี้

3.1 กลุ่ม Organophosphorous มีค่า LOD 0.005-0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม signal/noise ratio อยู่ในช่วง 3-12 มีค่า LOQ มีค่าระหว่าง 0.01-0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยได้ค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 71-107 %RSD 3.08-14.13 และมีค่า HORRAT 0.15-0.67 (ตารางที่ 5)

3.2 กลุ่ม Pyrethroid มีค่า LOD 0.002-0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม signal/noise ratio อยู่ในช่วง 3-6 มีค่า LOQ มีค่าระหว่าง 0.005-0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยได้ค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 78-99 %RSD 10.15-25.6 และมีค่า HORRAT 0.53-1.09 (ตารางที่ 5)

3.3 Endosulfan มีค่า LOD 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม signal/noise ratio อยู่ในช่วง 10-20 มีค่า LOQ เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยได้ค่า %recovery เฉลี่ยในช่วง 77-82 %RSD 19.74-22.5 และมีค่า HORRAT 0.84-0.96 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 Linearity และ range ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous

Pyrethroid และEndosulfan ในมังคุด

Pesticide	Correlation(r)	Rang (mg/kg)
DDVP	0.9995	0.01-2
Mevinphos	0.9998	0.01-2
Dimethoate	0.9996	0.01-2
Diazinon	0.9998	0.01-2
Parathion-methyl	0.9998	0.01-2
Pirimiphos- methyl	0.9999	0.01-2
Fenitrothion	0.9999	0.01-2
Malathion	1.0000	0.01-2
Chlorpyrifos	0.9986	0.01-2
Parathion-ethyl	0.9999	0.01-2
Pirimiphos- ethyl	1.0000	0.01-2
Methidathion	0.9995	0.01-2
Prothiophos	0.9999	0.01-2
Profenophos	0.9996	0.01-2
Ethion	0.9997	0.01-2
Triazophos	0.9992	0.01-2
EPN	0.9992	0.01-2
Phosalone	0.9982	0.01-2
bifenthrin	0.9984	0.005-0.5
Lamda-Cyhalothin	0.9975	0.01-0.5
Permethrin	0.9985	0.01-0.5
Cyfluthrin	0.9985	0.01-0.5
Cypermethrin	0.9960	0.01-0.5
Fenvalerate	0.9985	0.01-0.5
Deltamethtrin	0.9983	0.01-0.5
alpha-Endosulfan	0.9991	0.005-0.5
Beta-Endosulfan	0.9988	0.005-0.5
Endosulfan sulfate	0.9993	0.005-0.5

ตารางที่ 2 Accuracy และ Precision จากค่าเฉลี่ยของ %recovery %RSD และ HORRAT (H) ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด

Pesticide	0.02 mg/kg			0.1 mg/kg			0.5 mg/kg		
	Accuracy	Precision		Accuracy	Precision		Accuracy	Precision	
	% recovery	% RSD	H	% recovery	% RSD	H	% recovery	% RSD	H
DDVP	104	3.67	0.19	89	3.16	0.21	96	3.22	0.27
Mevinphos	105	5.56	0.29	81	5.33	0.36	103	10.25	0.87
Dimethoate	97	5.79	0.30	83	4.18	0.28	89	3.10	0.26
Diazinon	98	5.58	0.29	97	2.54	0.17	96	2.65	0.23
Parathion-methyl	103	4.15	0.21	93	3.02	0.20	101	2.80	0.24
Pirimiphos- methyl	99	4.48	0.24	94	2.29	0.15	100	2.48	0.21
Fenitrothion	101	4.68	0.24	94	2.83	0.19	101	2.80	0.24
Malathion	105	8.55	0.45	94	2.91	0.20	100	2.46	0.21
Chlorpyrifos	105	4.17	0.22	101	2.38	0.16	101	2.64	0.22
Parathion-ethyl	104	5.80	0.30	95	2.44	0.16	100	2.73	0.23
Pirimiphos- ethyl	102	6.55	0.34	97	2.56	0.17	100	2.54	0.22
Methodathion	95	6.58	0.35	91	3.09	0.21	96	2.80	0.24
Prothiophos	98	6.99	0.37	94	2.47	0.16	100	2.41	0.21
Profenophos	96	6.64	0.35	92	2.77	0.18	89	2.46	0.21
Ethion	101	5.90	0.31	98	2.65	0.18	99	2.42	0.21
Triazophos	95	5.47	0.29	94	2.88	0.19	85	2.30	0.19
EPN	102	10.07	0.53	99	2.41	0.16	84	2.27	0.19
Phosalone	89	11.98	0.63	95	4.68	0.31	78	2.56	0.21
Bifenthrin	96	10.78	0.57	84	8.71	0.58	94	5.44	0.46
Lamda-Cyhalothin	89	10.75	0.57	86	10.47	0.70	87	5.44	0.46
Permethrin	106	9.28	0.78	91	15.91	1.06	88	4.33	0.37
Cyfluthrin	99	10.15	0.53	90	6.54	0.44	92	11.25	0.96
Cypermethrin	97	13.06	0.69	79	14.69	0.98	108	4.34	0.37
Fenvalerate	89	17.07	0.90	89	7.18	0.48	97	8.04	0.69
Deltamethrin	82	11.88	0.62	91	16.31	1.09	77	6.18	0.53

alpha-Endosulfan	91	12.04	0.63	83	8.99	0.60	89	5.11	0.44
Beta-Endosulfan	86	10.87	0.57	74	10.33	0.69	84	5.19	0.44
Endosulfan sulfate	89	11.19	0.59	79	10.89	0.73	87	5.00	0.43

ตารางที่ 3 แสดงเกณฑ์ยอมรับมาตรฐานการพิสูจน์ accuracy ของวิธีทดสอบสำหรับ pesticide residue และ veterinary drug (Codex 1995)

Concentration	%Recovery
<1 µg/kg	50-120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	60-120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	70-120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	70-110
> 1 mg/kg	70-110

ตารางที่ 4 แสดงเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน การพิสูจน์ precision ของวิธีทดสอบโดยประเมินจาก %RSD และ HORRAT (EC, 2000)

Concentration	%RSD
10 ppm	7.58
1 ppm	10.72
0.1 ppm	15.16
0.01 ppm	21.44
0.001 ppm	30.32

เกณฑ์ประเมิน Precision

HORRAT < 2

ตารางที่ 5 LOD และLOQ ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด

pesticide	LOD (mg/kg)	S/N	LOQ (mg/kg)	%recovery	%RSD	HORRAT
DDVP	0.01	10	0.02	104	3.67	0.19
Mevinphos	0.01	7	0.02	105	5.56	0.29
Dimethoate	0.01	8	0.02	97	5.79	0.30
Diazinon	0.01	9	0.02	98	5.58	0.29
Parathion-methyl	0.01	12	0.02	103	4.15	0.21
Pirimphos-methyl	0.005	5	0.01	101	4.85	0.23
Fenitrothion	0.005	3	0.01	98	14.3	0.67
Malathion	0.005	3	0.01	96	3.08	0.15
Chlorpyrifos	0.005	9	0.01	107	6.17	0.29
Parathion-ethyl	0.005	3	0.01	94	4.24	0.20
Pirimphos- ethyl	0.005	4	0.01	105	8.44	0.40
Methidathion	0.01	7	0.02	95	6.58	0.35
Prothiophos	0.005	5	0.01	84	6.75	0.32
Profenofos	0.01	4	0.02	96	6.64	0.35
Ethion	0.005	4	0.01	86	3.61	0.17
Triazophos	0.01	4	0.02	95	5.47	0.29
EPN	0.02	4	0.05	79	5.63	0.33
Phosalone	0.02	3	0.05	71	8.04	0.48
Bifenthrin	0.002	6	0.005	81	25.6	1.09

Lambda-cyhalothrin	0.002	3	0.005	78	12.86	0.55
Permethrin	0.02	4	0.1	91	15.91	1.06
Cyfluthrin	0.01	4	0.02	99	10.15	0.53
Cypermethrin	0.01	4	0.02	97	13.06	0.69
Fenvalerate	0.01	5	0.02	89	17.07	0.90
Deltamethrin	0.01	3	0.02	82	11.88	0.62
Alpha-endosulfan	0.002	20	0.005	82	19.74	0.84
Beta-endosulfan	0.002	11	0.005	77	22.5	0.96
Endosulfan-sulfate	0.002	10	0.005	79	21.92	0.94

9. สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Organophosphorous 18 ชนิด, Pyrethroid 7 ชนิด และ Endosulfan 3 ชนิด ในมังคุด โดยวิธีทดสอบจากการประยุกต์ของ วิธีการของ Steinwandter (1985) โดยการสกัดด้วย acetone, dichloromethane และ sodium chloride ทำการ clean up โดยใช้ส่วนผสมของ sorbent ชนิด PSA และ SAX (1:1) ชะด้วย hexane:dichloromethane 4:1 และ 1:1 ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Gas chromatograph ผลการวิเคราะห์พบว่า linearity/range ของสารทั้ง 3 กลุ่ม มีค่า correlation coefficient > 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การทดสอบกลุ่ม Organophosphorous, Pyrethroid และ Endosulfan ในมังคุด พบว่ามีค่า Range อยู่ในช่วง 0.01- 2.00, 0.005-0.5 และ 0.005-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การพิสูจน์ accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 70-110 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 สำหรับค่า LOD อยู่ระหว่าง 0.005-0.02, 0.002-0.02 และ 0.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และค่า LOQ อยู่ระหว่าง 0.01-0.05, 0.005-0.1 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งวิธีการนี้สามารถใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

10. การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในงานบริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างรวมทั้งใช้ในงานวิจัย
2. ใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025
3. ถ่ายทอดวิธีการวิเคราะห์ให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8
4. เสนอผลงานวิจัยเพื่อให้ผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

- กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
สถาบันอาหาร. 2547. การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรม. ณ โรงแรมมิรา
เคิล กรุงเทพฯ
- วิสุทธิ เขวงศรี, รัชณี สุวภาพ และปิยะศักดิ์ อรรถบุตร. 2551. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Triazole
ในมะม่วง ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2551. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
- Codex. 1995. Codex Alimentarius volumn 3. Residues of Veterinary Drugs in Food.
- Dogheim, S.M., S.A.G. Alla, A.M.E. Marsafy and S.M. Fahmy. 1999. Monitoring pesticide residues in
Egyptain. fruit and vegetable in 1995 J. AOAC Int. 82 : 948-955
- European Commission (EC). 2000. Guidance Document on Residue Analytical Methods.
SANCO/825/00 rev6 20/06/00.16p
- FAO/WHO. 1997 . FAO manual on the submission and evaluation of pesticide residues data for
the estimation of maximum residue level in food and feed. Food and Agricultural
Organization of the United Nation. Rome.
- Food and Drug Administration (FDA). 2005. Validation and Verification Guidance for Human Drug
Analytical Method. ORA Laboratory Procedure. USA.
- Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to Validate Pesticide Residue Method
Performance. In Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus
(eds), the Royal Society of Chemistry 2000, U.K. 305p
- ISO/IEC 17025. 2005. General Requirement for the Competener of Testing and
Calibration Laboratories. 280.
- Kuet A.C.L. and L. Seng. 2004. Solid phase Extraction Clean up Method for the Determination of
Organophosphorus Pesticides in vegetables. Malaysian Journal of chemistry 6:029-038
- Keith, L., H. W. Crummett, J. Deegan, R. A. Libby, J. K. Taylor and G. Wentler. 1983. Principle of
Environmental Analysis. J Anal. Chem.. 55: 2210-2218
- Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min. On-line Method for Extracting and
Isolating Pesticide Residue and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal Chem. 314-129-
130.

