

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** โครงการวิจัยการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตร ให้ถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานสากล
กิจกรรม การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อย การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย)** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม organophosphorus ในมะม่วง

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Method Validation of Organophosphorus in Mango.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางรัชราพร ศรีสว่างวงศ์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3
ผู้ร่วมงาน นางสาวปริยานุช สายสุพรรณ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3
นายชัยศักดิ์ แผ้วพลสง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เป็นกระบวนการที่จะพิสูจน์ว่าวิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการมีความเหมาะสม ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ โดยทำการพิสูจน์ตามพารามิเตอร์ต่างๆคือ Range, Linearity, Limit of detection(LOD), Limit of Quantitation(LOQ), Accuracy และ Precision ในปีงบประมาณ 2554 ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus ในมะม่วง สารพิษที่ทำการทดสอบประกอบด้วย chlorpyrifos, ethion, fenitrothion, pirimiphos-methyl, profenofos และ triazophos วิธีที่ห้องปฏิบัติการใช้ในการทดสอบสารพิษตกค้างคือวิธีทดสอบที่ดัดแปลงจากวิธีของ Steinwandter(1985) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สรุปผลได้ดังนี้ range ของวิธีทดสอบอยู่ระหว่าง 0.01-4 mg/kg ค่า Linearity จากค่า Correlation coefficient : R^2 มีค่าระหว่าง 0.9997-0.9999 ค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบมีค่า 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ การวิเคราะห์ Accuracy โดยประเมินจากค่า % Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.4 และ 1 mg/kg อยู่ในช่วง 60-120, 70-120, 70-110 และ 70-110 จากการวิเคราะห์ Precision ประเมินจาก % RSD ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง สูง มีค่าระหว่าง 5.2-13.1, 4.0-7.8 และ 3.2-4.3 ตามลำดับ และเมื่อนำไปประเมิน HORRAT(Horwitz' s ratio)พบว่าอยู่ในเกณฑ์กำหนด(Horwitz' s ratio ≤ 2) ซึ่งจากการประเมินผลการทดสอบโดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ

เหล่านี้พบว่า วิธีทดสอบนี้ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับและสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐาน
สำหรับห้องปฏิบัติการได้

6. คำนำ

ความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือของผลการทดสอบเป็นผลมาจากความชำนาญของบุคลากร และเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับวิธีการทดสอบที่เลือกใช้ เพราะวิธีทดสอบแต่ละวิธี จะมีคุณลักษณะเฉพาะ(Performance)แตกต่างกัน หากห้องปฏิบัติการใช้วิธีที่ยังไม่เป็นวิธีมาตรฐานเช่น วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานหรือวิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาหรือออกแบบขึ้นมาใช้เอง ห้องปฏิบัติการ จะต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นวิธีการในการยืนยันความสามารถของวิธีวิเคราะห์ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ ตามหลักสากล(สถาบันมาตรฐานแห่งชาติ, 2554 และดุษฎี, 2554) โดยทำการพิสูจน์ตามพารามิเตอร์ ต่าง ๆ คือ Range, Linearity, Accuracy, Precision, Limit of detection(LOD) และ Limit of Quantitation(LOQ)

วิธีที่ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 เลือกใช้อยู่ใน ปัจจุบันไม่ใช่วิธีที่เป็นมาตรฐาน แต่เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Steinwandter(1985) ดังนั้น ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวเพื่อพิสูจน์ว่าวิธี วิเคราะห์ที่นำมาใช้ในห้องปฏิบัติการมีความเหมาะสม ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml

7.1.2 Volumetric flask, Class A ขนาด 5, 10, 50 ml

7.1.3 Flat bottom flask ขนาด 250 ml

7.1.4 ขวดใส่ตัวอย่าง (Duran) ขนาด 250 ml

7.1.5 Sodium sulfate (Anhydrous granular)

7.1.6 เครื่องตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Gas Chromatography (GC) หัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector (FPD)

7.1.7 Homogenizer

7.1.8 Rotary evaporator

7.1.9 Micro pipette range 2-20 μ l, 20-200 μ l และ 100-1000 μ l

7.1.10 Dispenser range 1-10 ml และ 20-100 ml

7.1.11 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และทศนิยม 4 ตำแหน่ง

7.1.12 Ethyl acetate (Pesticide grade)

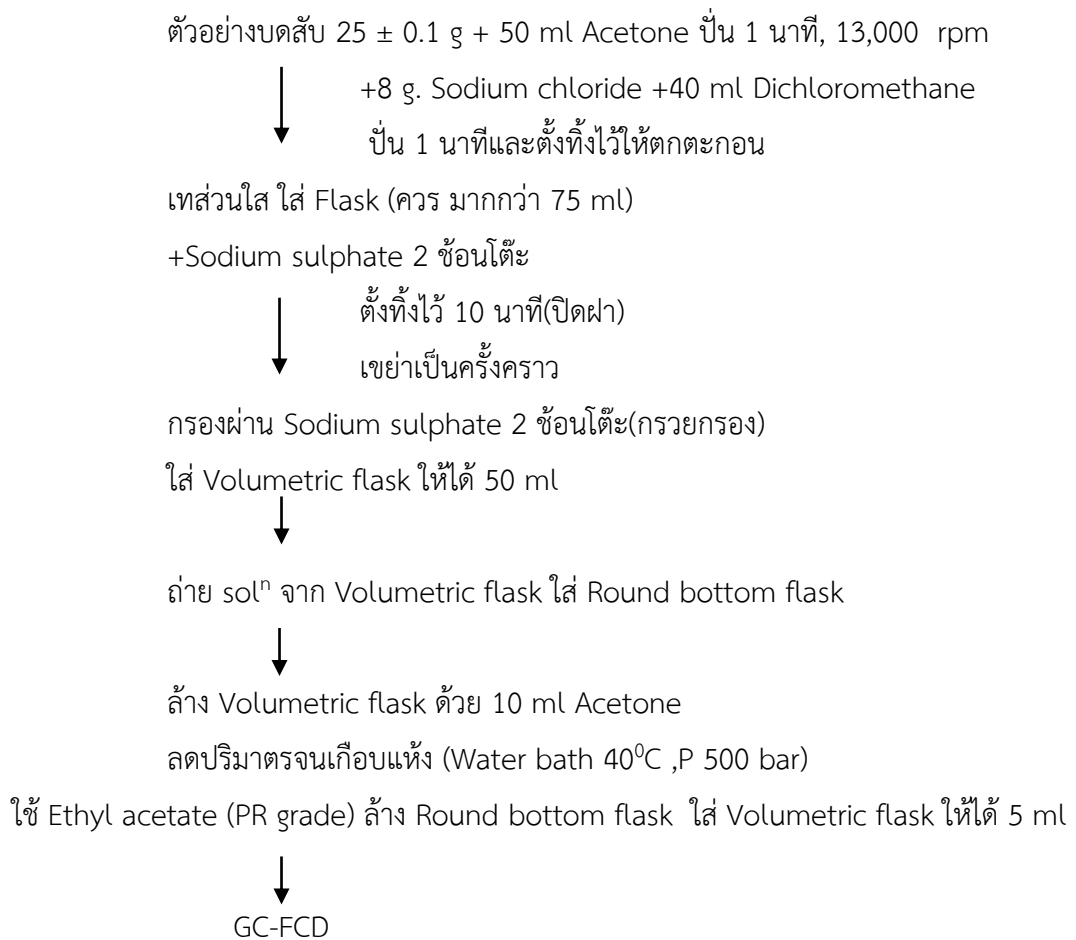
7.1.13 Acetone (Analytical grade: AR)

7.1.14 Dichloromethane (Analytical grade)

7.1.15 สารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) 6 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, ethion, fenitrothion, pirimiphos-methyl, profenofos และ triazophos

7.2 วิธีการ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ การวิเคราะห์สารฆ่าแมลงกลุ่ม organophosphorus ในมะม่วง โดยใช้แก๊สโครมาโตกราฟ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Steinwandter(1985) ดังแสดงใน ภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus

เมื่อดำเนินการสกัดตัวอย่างตามวิธีการครบถ้วนแล้ว จึงทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีการดังกล่าว ดังต่อไปนี้

7.2.1 การหา Range โดยทดสอบ reagent blank, sample blank และ Fortified sample 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample (แกน x) กับ Area Response (แกน Y) แล้วพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

7.2.2 การหา Linearity โดยทดสอบ reagent blank และ Fortified sample ที่ความเข้มข้นภายใน Range ของการทดสอบ 6 ความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample (แกน x) กับ Area Response(แกน Y) คำนวณหา Correlation Coefficient (R^2) เกณฑ์ในการยอมรับค่า $R^2 \geq 0.995$

7.2.3 การหาค่า Limit of detection(LOD) โดยวิเคราะห์ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้นๆละ 10 ซ้ำ คำนวณค่า SD ของผลการทดสอบ แต่ละความเข้มข้น plot graph ระหว่างความเข้มข้น(แกน x) กับ SD(แกน y) หาค่า S_0 โดย extrapolate เส้นกราฟมาตัดแกน Y จะได้ $LOD = 3 S_0$

7.2.4 การหาค่า Limit of Quantitation(LOQ) คำนวณค่า predicted LOQ โดย $LOQ = 10S_0$ เตรียม Fortified sample ที่ความเข้มข้นเท่ากับ predicted LOQ วิเคราะห์ Fortified sample 10 ซ้ำ คำนวณค่า Accuracy และ Precision เกณฑ์การยอมรับต้องผ่านการประเมินที่กำหนด

7.2.5 ตรวจสอบ Accuracy โดยทดสอบ Reagent blank, Sample blank และ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 4 ระดับ ดังนี้ 0.01, 0.05, 0.4 และ 1 mg/kg วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ นำมาประเมิน % Recovery

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(X_2 - X_1)}{C} \times 100$$

C

โดยที่ C = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

X_1 = ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน(Sample blank)

X_2 = ความเข้มข้นเฉลี่ยของสารมาตรฐานที่วัดได้หลังจากเติมสารมาตรฐาน

7.2.6 ตรวจสอบ Precision โดยทดสอบ Reagent blank, Sample blank และ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ (Ranges) 4 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0.01, 0.05, 0.4 และ 1 mg/kg วิเคราะห์ level ละ 10 ซ้ำ บันทึกผลการทดสอบ คำนวณค่าเฉลี่ย \bar{X} และ SD ของผลการทดสอบคำนวณ % RSD

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz' s ratio) หรือจาก % RSD

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

Predicted Horwitz RSD คำนวณได้จาก Horwitz equation

Repeatability: $RSD = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$

เกณฑ์การยอมรับ AOAC : HORRAT (Horwitz' s ratio) ≤ 2 หรือตามเกณฑ์ที่กำหนดทั่วไปของ Precision, % RSD ของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov. 1993

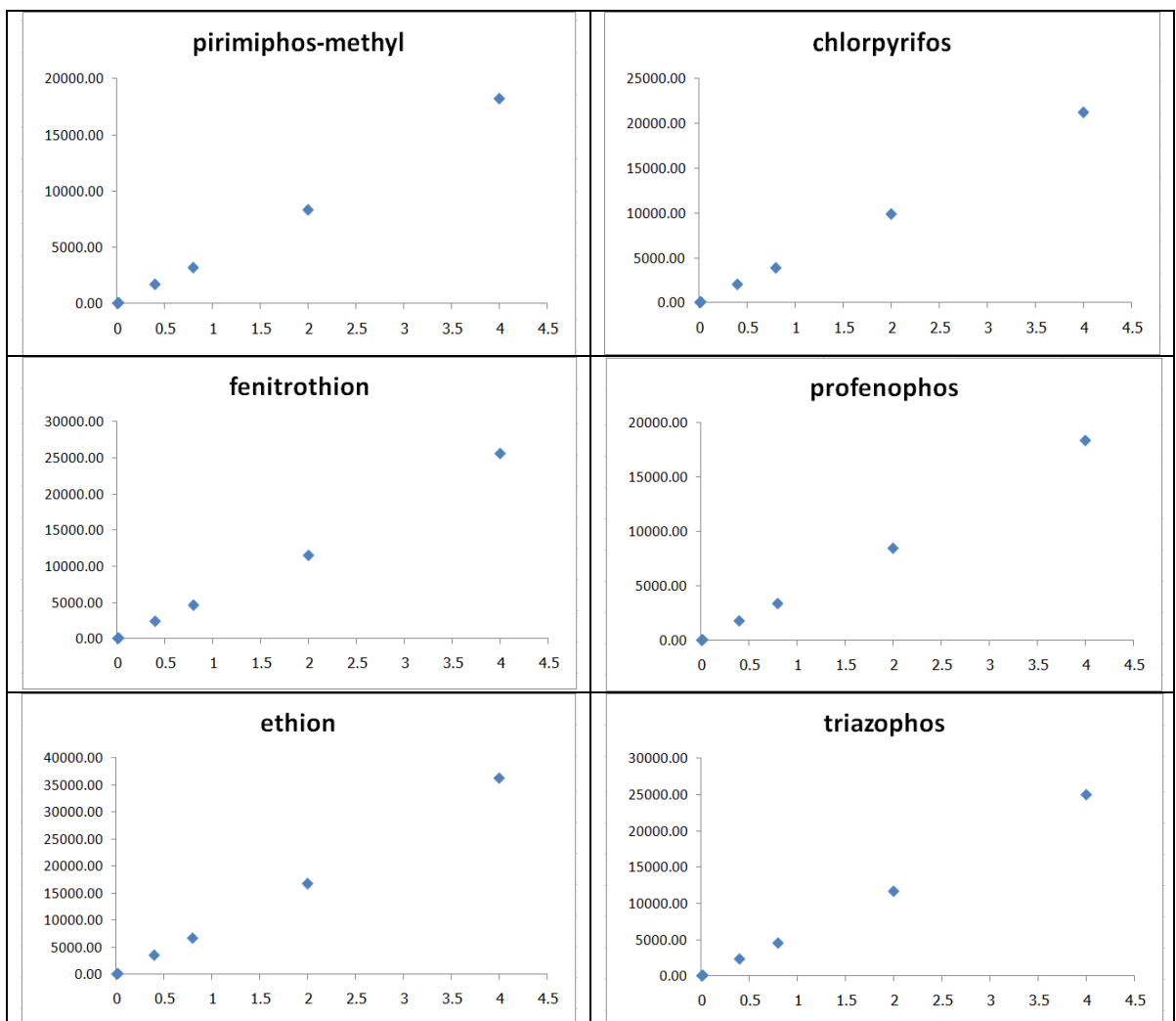
7.3 เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2554

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ช่วงของการวัด (Range)

ทดสอบ reagent blank, sample blank และ Fortified sample 6 ความเข้มข้นๆละ 1 ซ้ำ plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample (แกน x) กับ Area Response (แกน Y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง ประเมินด้วยสายตาตามภาพที่ 2 พบว่าวิธีการทดสอบนี้สามารถตรวจสอบสารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟอรัส ได้ในช่วงตั้งแต่ 0.01 ถึง 4 mg/kg

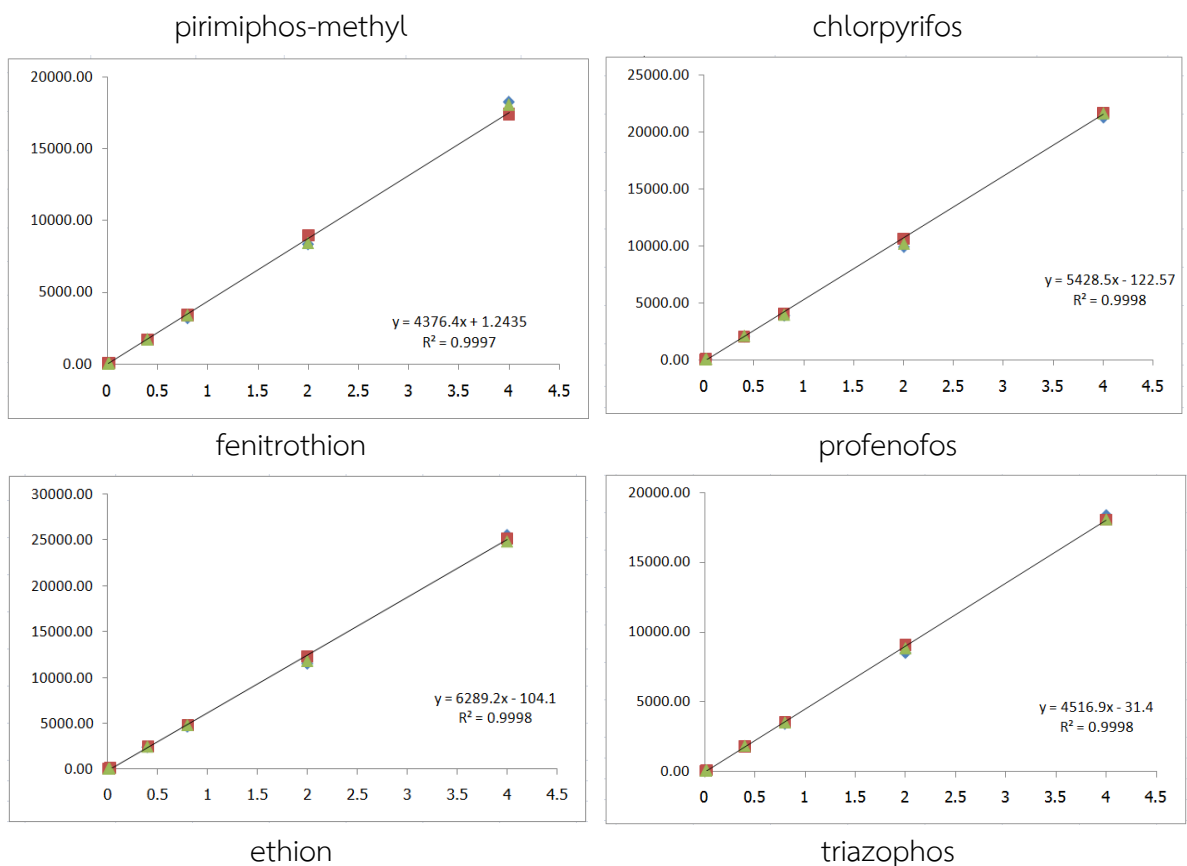


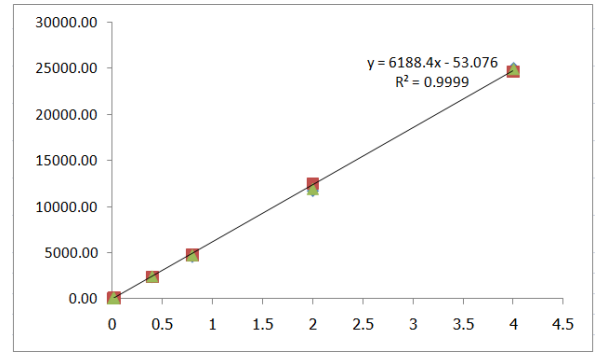
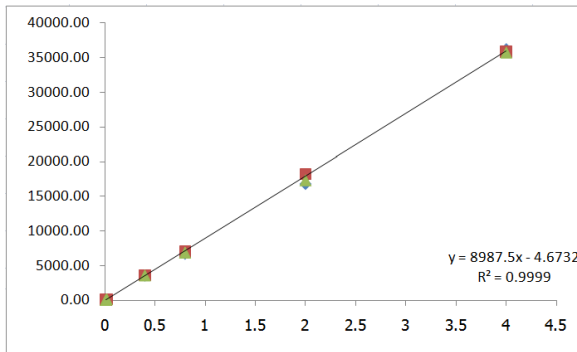
ภาพที่ 2 ช่วงการวัด (Range) ของ pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, fenitrothion, profenofos, ethion และ triazophos ความเข้มข้น 0.01-4 mg/kg

8.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

ทดสอบ reagent blank และ Fortified sample ที่ความเข้มข้นภายใน Range ของการทดสอบ 6 ความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ Fortified sample (แกน x) กับ Area Response(แกน Y) สร้าง Regression line โดยใช้ Method of least square ใช้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(Coefficient of determination : R^2) เกณฑ์ในการยอมรับค่า $R^2 \geq 0.995$ ตามภาพที่

3





ภาพที่ 3 ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของ pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, fenitrothion, profenofos, ethion และ triazophos ค่า Coefficient of determination : $R^2 \geq 0.995$

8.3 Limit of detection(LOD)

วิเคราะห์ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ ค่าความไว อัตราส่วนของ signal/noise ของแต่ละสารต้องมีค่ามากกว่า 3 ($s/n > 3$) ดังนั้นค่า LOD ของวิธีการทดสอบเท่ากับ 0.005 mg/kg

8.4 Limit of Quantitation (LOQ)

วิเคราะห์ Fortified sample ที่ระดับ 0.01 mg/kg 10 ซ้ำ ค่าความถูกต้อง Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ผลการทดลองตามตารางที่ 1 ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

8.5 Accuracy

ทดสอบ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 4 ระดับ ดังนี้ 0.01, 0.05, 0.4 และ 1 mg/kg วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ ประเมิน Accuracy จากค่า % Recovery โดยเกณฑ์การยอมรับ Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของ Pesticide residue และ Veterinary drug(Codex, 1995) ผลการทดสอบแสดงว่า Fortified sample ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 เป็นไปตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้(ดังแสดงในตารางที่ 1) การตรวจสอบ Accuracy ของวิธีทดสอบ อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานและสามารถยอมรับได้

8.6 Precision

ทดสอบ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ (Ranges) 4 ระดับ ความเข้มข้น ดังนี้ 0.01, 0.05, 0.4 และ 1 mg/kg วิเคราะห์ level ละ 10 ซ้ำ บันทึกผลการทดสอบ ค่าความเฉลี่ย \bar{X} และ SD ของผลการทดสอบ คำนวณ %CV= % RSD ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz' s ratio) หรือจาก % RSD ผลการทดสอบ เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT(Horwitz' s ratio) ≤ 2 ตามตารางที่ 1 ผลการทดสอบ Precision ของวิธีทดสอบทุกระดับความเข้มข้น อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน คือสามารถคำนวณค่า % RSD ได้อยู่ระหว่าง 2.36 - 13.08 และ HORRAT ≤ 2

ตารางที่ 1 พิสูจน์ Accuracy และ Precision ที่ความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับในช่วงการใช้งาน(Range)

ชื่อสาร	ความเข้มข้น Spike (mg/kg)	Accuracy		Precision			
		Recovery (%)	เกณฑ์ (%)	$\bar{x} \pm SD$ (mg/kg)	% RSD	เกณฑ์ (%)	HORRAT เกณฑ์ ≤ 2
pirimiphos-methyl	0.01	78.30	60-120	0.0078 \pm 0.001	13.08	21	0.60
	0.05	77.28	70-120	0.0386 \pm 0.0016	4.20	15	0.24
	0.4	80.79	70-110	0.3138 \pm 0.3016	4.28	11	0.34
	1	84.79	70-110	0.8479 \pm 0.0272	3.21	11	0.30
chlorpyrifos	0.01	94.50	60-120	0.0095 \pm 0.001	10.26	21	0.48
	0.05	87.80	70-120	0.0439 \pm 0.0016	3.67	15	0.22
	0.4	90.46	70-110	0.3697 \pm 0.3276	4.02	11	0.33
	1	97.38	70-110	0.9738 \pm 0.0405	4.16	11	0.39
fenitrothion	0.01	98.60	60-120	0.0099 \pm 0.0005	5.22	21	0.25
	0.05	91.94	70-120	0.046 \pm 0.0011	2.36	15	0.14
	0.4	94.00	70-110	0.3929 \pm 0.3154	6.69	11	0.55
	1	99.14	70-110	0.9914 \pm 0.0426	4.30	11	0.41
profenofos	0.01	81.80	60-120	0.0082 \pm 0.001	12.65	21	0.58
	0.05	88.96	70-120	0.0445 \pm 0.0013	2.88	15	0.17
	0.4	94.73	70-110	0.3965 \pm 0.3181	6.73	11	0.55
	1	100.36	70-110	1.0036 \pm 0.0411	4.10	11	0.39
ethion	0.01	92.70	60-120	0.0093 \pm 0.0007	7.78	21	0.36
	0.05	89.20	70-120	0.0446 \pm 0.0017	3.77	15	0.22
	0.4	94.87	70-110	0.3866 \pm 0.3402	4.80	11	0.39
	1	97.01	70-110	0.9701 \pm 0.04	4.12	11	0.39
triazophos	0.01	93.60	60-120	0.0094 \pm 0.0008	8.23	21	0.39
	0.05	97.36	70-120	0.0487 \pm 0.002	4.17	15	0.25
	0.4	100.19	70-110	0.422 \pm 0.323	7.78	11	0.64
	1	105.34	70-110	1.0534 \pm 0.035	3.32	11	0.32

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus ในมะม่วง สามารถสรุปผลได้ดังนี้

- 9.1 ค่า LOD ของสารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus อยู่ที่ระดับ 0.005 mg/kg
- 9.2 ค่า LOQ ของสารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus อยู่ที่ระดับ 0.01 mg/kg
- 9.3 ค่า Range อยู่ในช่วงระหว่าง 0.01 ถึง 1 mg/kg
- 9.4 Linearity มีค่า R^2 มากกว่า 0.995 ในทุกสารที่ทำการทดสอบ
- 9.5 Accuracy ประเมินจากค่า % Recovery ของสารพิษตกค้างที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.4 และ 1 mg/kg อยู่ในช่วง 77.28 - 105.34 % ตามลำดับ
- 9.6 Precision คำนวณค่า % RSD ได้อยู่ระหว่าง 2.36 - 13.08 และ HORRAT ≤ 2

จากผลการทดสอบทั้งหมดที่กล่าวมานี้ พบว่าการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการทดสอบหาสารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus ในมะม่วง โดยสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์นี้สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำและเชื่อถือได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus ในมะม่วง

11. เอกสารอ้างอิง

สถาบันมาตรฐานแห่งชาติ. 2554. Analytical Method Validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม
สถาบันมาตรฐานแห่งชาติ

คุชฎี มั่นความดี. 2554. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์. เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรม
วิทยาศาสตร์บริการ

AOAC Peer-Verified Methods. 1993. Manual on policies and procedures. AOAC
International Arlington, VA, USA.

Codex. 1995. Codex Alimentarius volume 3. Residues of Veterinary Drugs in Food.

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, UK. 305 p.

Steinwandter H. 1985. Universal 5-min on-line method for extracting and isolating
pesticide residues and industrial chemicals. Fresenius Z Anal Chem. 322:752-754.

12. ภาคผนวก

เกณฑ์การยอมรับ Recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดสำหรับ Pesticide residue และ Veterinary
drug(Codex, 1995)

ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง	Range of mean % recovery
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	50 - 120
$> 1 \mu\text{g}/\text{kg} \leq 0.01 \text{ mg}/\text{kg}$	60 - 120
$> 0.01 \text{ mg}/\text{kg} \leq 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$	70 - 120
$> 0.1 \text{ mg}/\text{kg} \leq 1 \text{ mg}/\text{kg}$	70 - 110
$> 1 \text{ mg}/\text{kg}$	70 - 110

เกณฑ์การยอมรับ % RSD ของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov. 1993

ความเข้มข้นของตัวอย่าง	% RSD
100 %	1.3
10 %	2.8
1 %	2.7
0.10 %	3.7
100 ppm	5.3
10 ppm	7.3
1 ppm	11

100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30