รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปี2555

1.ชุดโครงการวิจัย :วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2.โครงการวิจัย :การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้อง แม่นยำตามมาตรฐานสากล

3.กิจกรรมที่ 1 :การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

4.กิจกรรมที่ 1.2 :พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพาตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

5.ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย):การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Spinetoram ในมะม่วง

6.ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ): Method Validation of Spinetoram in mango

7.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง :นายปิยะศักดิ์ อรรคบุตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน :นางสาวลมัย ซูเกียรติวัฒนา

:นางสาววิสุทธิ เชวงศรี

:นางสาวชนิตา ทองแซม

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spinetoram ในมะม่วง โดยใช้เทคนิค Liquid Chormatograph-Mass spectrometry/mass spectrometry ทำการสกัดด้วยวิธี QuEChERS AOAC,2007 การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการโดยการใช้เทคนิค fortified sample สาร spinetoram ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สาร spinetoram มีอนุพันธ์ 5 ชนิด ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ XDE-175-

N-demethyl-J, XDE-175-N-demethyl-L, XDE-175-J, XDE-175-L และ XDE-175-N-formyl-J พารามิเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ Linearity, Range, Accuracy, Precision, LOD และ LOQ ผลการวิเคราะห์พบว่า Linearity และ Range มีค่า correlation coefficient > 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย Range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.003- 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหาค่า % recovery อยู่ในช่วง 82-116 เปอร์เซ็นต์ precision ของสารพิษตกค้างให้ค่า HORRAT ไม่เกิน 2 และ %RSD น้อยกว่า 20 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ สำหรับค่า LOD เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และLOQ เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

คำนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ (Laboratory accreditation) ตามมาตรฐานสากล (ISO/IEC17025,2005) รับรองความสามารถสำหรับวิธีทดสอบ โดยต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามข้อกำหนดต่างๆ ที่ใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการ ได้แก่ Linearity/ Range, Accuracy, Precision, LOD และ LOQ (กนกพร และทิพวรรณ, 2547 และสถาบันอาหาร, 2547) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับ ทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล และยังเป็นการแก้ไขปัญหาการกีดกันทางการค้าของสินค้าเกษตรที่จะส่งไปขายยังต่างประเทศที่มี โดยมีแก้และปรับปรุงกฎระเบียบร่วมถึงการกำหนดค่ามาตรฐานทางด้านสารพิษตกค้าง ทำให้ห้องปฏิบัติการต้องมีการพัฒนาและวิจัยเทคนิคและวิธีการใหม่เพื่องรองรับการเปลี่ยนแปลงของสถานะการณ์อยู่ตลอดเวลา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารมาตรฐาน spinetoram และ อนุพันธ์ของสารมาตรฐาน Internal standardและอนุพันธ์

2. สารเคมี ได้แก่ Acetonitrile, Merck, HPLC grade, Methanol, J.T. baker, HPLC grade, Water, J.T. baker, HPLC grade, Ammonium acetate, HPLC grade, Formic acid 96%, magnesium sulfate anhydrous, sodium chloride, sodium citrate anhydrate, graphite carbon bonde

3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง, Food processor, Homogenizer , Rotery evaporator, Nitrogen evaporator, Centrifuge

4. เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ bottle ขนาด 250 mL, tube PTFE ขนาด 250 mL, กระบอกตวง ขนาด 10, 50 mL, volumetric pipette 10 mL, volumetric flask ขนาด 5, 10, 100, 1,000 mL, กรวยแก้ว , centrifuge tube

5. เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ Liquid chromatographic- mass spectrometry/mass spectrometry

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน spinetoram และอนุพันธ์ ที่มีความบริสุทธิ์ 78-99 % ใน Acetonitrile ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock standard solution ทำการ mixed spinetoram และ เมตาบอลิส ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลาย Internal standard และอนุพันธ์ ที่มีความบริสุทธิ์ 93-97 % ใน Acetonitrile ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock standard solution ทำการ mixed Internal standard และ เมตาบอลิส ให้ได้ความเข้มข้น 10ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.1, 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย(mobile phase)

3.1 Water+5mM ammonium acetate+0.01% formic acid

ชั่งAmmonium acetate 0.15 g ใส่บิกเกอร์ขนาด 50 mL ละลายด้วย water เท ใส่ขวดปรับปริมาตร 1,000 mL เติม formic acid 1 mL ปรับปริมาตรให้ถึงขีด นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Nylon 0.2 ไมครอน

4. หาสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS

5. การเตรียมตัวอย่าง

นำมะม่วงมาหั่นเอาเมล็ดออกนำเนื้อมะม่วงไปแช่ในตู้แช่ -20 °C ทิ้งไว้ 1 วัน นำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง stephane

6.วิธีสกัดตัวอย่าง

6.1 QuEChERS ชั่งตัวอย่าง 10 g ใส่ใน PTFE centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม 1% acetic acid ใน acetonitrile 10 mL เขย่าโดยใช้ vortex mixer 1 นาที เติม $MgSO_4$ 6 g, sodium acetate 1.5 g vortex 1 นาที นำไป centrifuge 5 นาที (3,000 rpm) ดูดสารละลายส่วนใส 5 mL ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 mL ที่มี $MgSO_4$ 750 mg และ PSA 250 mg Vortex 1 นาที นำไป centrifuge 5 นาที (3,000 rpm) เทสารละลายส่วนใสใส่ขวด vial นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.1 คอลัมน์ Kinetex YMC pack proC18, 150 x 4.6 mm. , 3 µm (Quantitation)

คอลัมน์ Synergi Polar RP, 75 x 4.6 mm. , 4 µm (confirmation)

7.2 Mobile Phase A : 5mM ammonium acetate+0.01%formic acid in water

B : ACN

inject 15 µL flow 0.5 mL/min

Gradient :

time	%A	%B	Flow (mL/min)
00.01	30	70	0.8
03.00	30	70	0.8
05.00	30	75	0.8
08.00	25	80	1.0
09.00	20	100	1.0
13.00	30	100	1.0
13.10	30	70	0.8
14.00	30	70	0.8

7.3 สภาวะของเครื่อง

Iornization mode	:	ESI
Polarity	:	Positive
Scan type	:	MRM
Resolution	:	Q1,Q3
Gas flow	:	10 l/min
Nebulizer	:	45 psi
Temperature	:	325 ^{o}C
Capillary	:	4000 V

Compounds	Q1	Q3	Dwell	Fragment	Collision
XDE-175-J	748.5	142.1	30	1	32
XDE-175-N-demethyl-J	734.5	128.1	30	1	28
XDE-175-N-formyl-J	762.5	155.9	30	1	14
XDE-175-L	760.5	142.1	30	1	28
XDE-175-N-demethyl-L	746.5	128.1	30	1	24
IS-XDE-175-J	757.6	146.1	30	1	36
IS-XDE-175-N-demethyl-J	739.5	128.2	30	1	28
IS-XDE-175-L	769.6	146.2	30	1	32
IS-XDE-175-N-demethyl-L	751.6	128.2	30	1	24

8. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (validation)

8.1 การหา range ทดสอบ reagent blank และ fortified sample 8 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ทำการสกัดในข้อ 6 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่าง ความเข้มข้นที่ fortified sample (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น

8.2 การหา Linearity ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นใน range 6 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดในข้อ 6 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นที่ fortified sample (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น จากค่า correlation coefficient, $R^2 \geq 0.995$

8.3 การหา Accuracy ทดสอบ reagent blank, sample blank(X_1) และ fortified sample (X_2) ที่ระดับความข้มข้น (Low, medium, high) ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาลบกับ reagent blank และ sample blank นำไปประเมิน Accuracy โดยการคำนวณ ร้อยละการได้กลับคืน จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{X_2 - X_1}{C}$$

โดยที่ C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

เกณฑ์การยอมรับ % recovery (AOAC. 1993) มีค่าอยู่ในช่วง 60 -115

8.4 การหา Precision

8.4.1 นำผลที่ได้จากการหา accuracy มาหา precision โดยการหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ ($\bar{x}$) จากการทดสอบ 7 ซ้ำ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (SD) นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย (%RSD)

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

8.4.2 ทำการประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

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

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

c = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

หลักเกณฑ์การยอมรับของ precision คือมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

8.5 การหา LOD (Limit of detection,LOD) ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ประเมินค่า LOD โดย LOD เท่ากับ 3 × SD นำค่า LOD จากการคำนวณมา spike ในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

8.6 การหา LOQ ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ประเมินค่า LOQ โดย LOQ เท่ากับ 10 × SD ซึ่ง LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุอันตรายในตัวอย่างที่วิธีทอสอบสามารถตรวจพบ โดยให้ค่า accuracy และ precision ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

ระยะเวลา ตุลาคม 2554-กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ Spinetoram และอนุพันธ์ ในมะม่วง พบว่ามี Range และ Linearity อยู่ในช่วง 0.003 – 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความสัมพันธ์เชิงเส้นมีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.995-0.999 (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด R^2 = 0.995

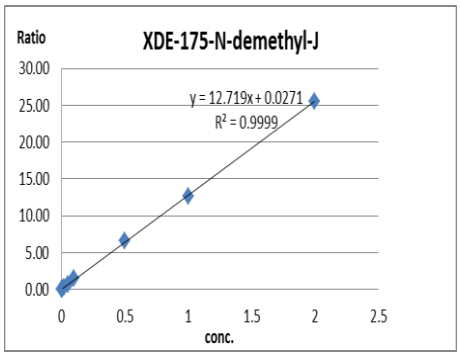
ผลการทดสอบ Accuracy ของวิธีการทดสอบ Spinetoram และอนุพันธ์ ที่ fortified sample 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.003, 0.005, 0.01, 0.05, 0.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบความเข้มข้นละ 7ซ้ำ ผลเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้ (%recovery) ดังนี้ XDE-175-

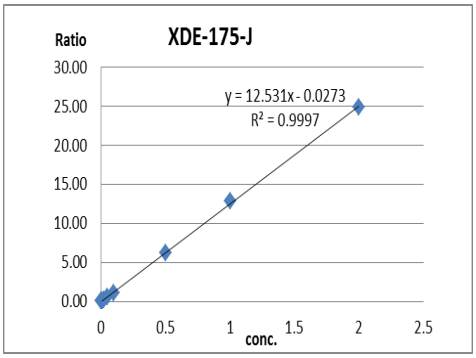
N-demethyl-J, XDE-175-N-demethyl-L, XDE-175-J, XDE-175-L และ XDE-175-N-formyl-J มีค่าระหว่าง 86 -108, 92-107, 90-105, 92-107 และ80-114 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC 1993 ที่กำหนดไว้ 60-120 (ภาคผนวก)

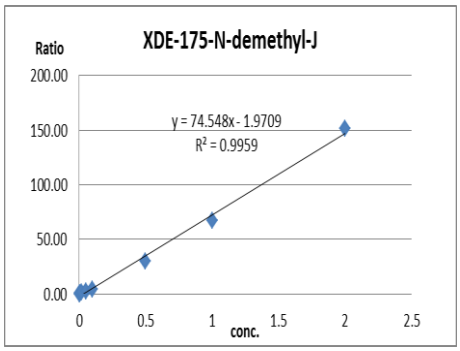
ผลการทดสอบ Precision ได้ค่า %RSD ของ XDE-175-N-demethyl-J, XDE-175-N-demethyl-L, XDE-175-J, XDE-175-L และ XDE-175-N-formyl-J มีค่าระหว่าง 1.27-4.48, 0.53-3.69, 0.53-3.49, 0.52-2.59 และ 1.06-11.95 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับโดยมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และมีค่า HORRAT อยู่ในระหว่าง 0.08-0.16, 0.02-0.15, 0.02-0.14, 0.02-0.13 และ 0.04-0.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ผ่านเกณฑ์ยอมรับคือมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

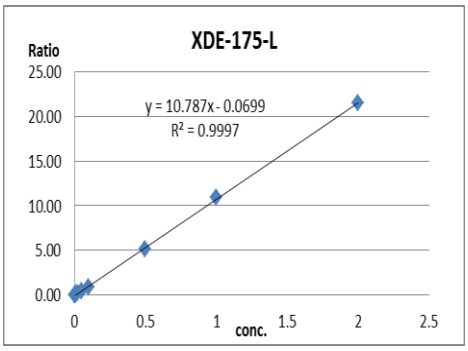
ตารางที่ 1 แสดงRange, Linearity, และcorrelation coefficient (R^2) ของวิธีทดสอบสาร Spinetoram และอนุพันธ์ ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

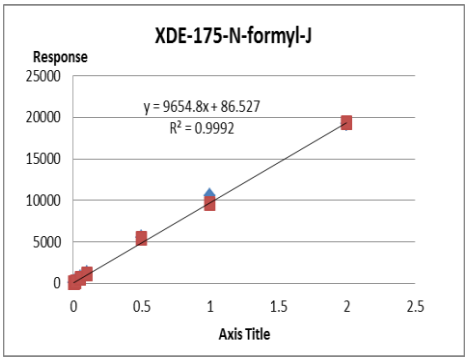
Compounds	สมการเส้นตรง	ความเข้มข้น (mg/kg)	R^2
XDE-175-N-demethyl-J	Y=12.719x + 0.0271	0.003-2	0.9999
XDE-175-N-demethyl-L	Y=74.548x - 1.9709	0.003-2	0.9959
XDE-175-J	Y=12.531x - 0.0273	0.003-2	0.9997
XDE-175-L	Y=10.787x - 0.0699	0.003-2	0.9998
XDE-175-N-formyl-J	Y=9654.8x + 86.527	0.003-2	0.9995











รูปที่ 1 แสดง Range, Linearity และ Correlation coefficient (R^2)ของวิธีทดสอบสาร Spinetoram และอนุพันธ์ ในมะม่วง

ตารางที่ 2 แสดง % recovery %RSD และ HORRAT ของวิธีทดสอบสาร Spinetoram และอนุพันธ์ ในมะม่วง ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

compound name	0.003 mg/kg n=7,average			0.005 mg/kg n=7,average			0.01 mg/kg n=7,average			0.05 mg/kg n=7,average			0.5 mg/kg n=7,average			2.0 mg/kg n=7,average		
	%REC	%RSD	Horrat	%REC	%RSD	Horrat	%REC	%RSD	Horrat	%REC	%RSD	Horrat	%REC	%RSD	Horrat	%REC	%RSD	Horrat
XDE-175-N-demethyl-J	97	3.25	0.13	97	1.95	0.08	102	2.94	0.14	104	1.27	0.08	99	1.48	0.13	98	4.48	0.16
XDE-175-N-demethyl-L	99	3.69	0.15	101	1.79	0.08	96	2.90	0.14	102	1.45	0.09	99	1.10	0.09	102	0.53	0.02
XDE-175-J	96	3.49	0.14	97	2.12	0.09	97	2.38	0.11	101	1.38	0.08	97	0.71	0.06	99	0.53	0.02
XDE-175-L	98	2.59	0.10	99	2.16	0.09	95	2.14	0.10	102	0.52	0.03	97	1.57	0.13	107	0.62	0.02
XDE-175-N-formyl-J	98	10.03	0.48	94	11.95	0.51	99	9.12	0.43	101	7.18	0.44	103	3.01	0.26	83	1.06	0.04

ตารางที่ 3 การประเมิน LOD ของสาร Spinetoram และอนุพันธ์ ในมะม่วง จากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 7 ซ้ำ

compound name	Fortified conc.	Average Analyte conc.	SD	3SD	LOD
	mg/kg				
XDE-175-N-demethyl-J	0.0030	0.0029	0.00010	0.0003	0.001
XDE-175-N-demethyl-L	0.0030	0.0028	0.00012	0.0004	0.001
XDE-175-J	0.0030	0.0029	0.00014	0.0004	0.001
XDE-175-L	0.0030	0.0030	0.00012	0.0004	0.001
XDE-175-N-formyl-J	0.0030	0.0030	0.00049	0.0015	0.001

ตารางที่ 4 การประเมิน LOQ ของสาร Spinetoram และอนุพันธ์ ในมะม่วง จากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 7 ซ้ำ

compound name	Fortified conc.	Average Analyte conc.	SD	LOQ
	mg/kg			
XDE-175-N-demethyl-J	0.0030	0.0029	0.00010	0.0010
XDE-175-N-demethyl-L	0.0030	0.0028	0.00012	0.0012
XDE-175-J	0.0030	0.0029	0.00014	0.0014
XDE-175-L	0.0030	0.0030	0.00012	0.0012
XDE-175-N-formyl-J	0.0030	0.0030	0.00049	0.0049

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างสาร Spinetoram และอนุพันธ์ในมะม่วงซึ่งได้แก่ XDE-175-N-demethyl-J, XDE-175-N-demethyl-L, XDE-175-J, XDE-175-L และ XDE-175-N-formyl-J ให้ผลการทดลองดังนี้ linearity และ range ของวิธีวิเคราะห์ มีค่า correlation coefficient (R2) ≥ 0.995 และมีค่า range อยู่ในช่วง 0.003-2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

accuracy และ precision ที่ 6 ระดับความเข้มข้นผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด คือมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 83-107 เปอร์เซ็นต์ %RSD น้อยกว่า 20 และมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2

สำหรับค่า LOD พบว่า ได้แก่ XDE-175-N-demethyl-J, XDE-175-N-demethyl-L, XDE-175-J, XDE-175-L และ XDE-175-N-formyl-J มีค่า LOD เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม LOQ เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การนำไปใช้ประโยชน์

1.ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในงานบริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างรวมทั้งใช้ในงานวิจัย

2.ใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

3.ถ่ายทอดวิธีการวิเคราะห์ให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8

4.เสนอผลงานวิจัยเพื่อให้ผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ทิพวัน นิ่งน้อย. 2549.แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว

สถาบันอาหาร. 2547. การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี. เอกสารประกอบการอบรม. ณ โรงแรมมิราเคิล กรุงเทพฯ

วิสุทธิ เชวงศรี, รัชนี สุวภาพ และปิยะศักดิ์ อรรคบุตร.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.

ภาคผนวก

เกณฑ์การยอมรับ % Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดทั่วไปของ AOAC peer - verified method 1993

ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง	recovery %
100%	98-102
10%	98-102
1%	97-103
0.10%	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

เกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน 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