

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2555

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้อง แม่นยำตามมาตรฐานสากล
- กิจกรรม 1 : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
- กิจกรรมย่อย1.2 : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิด ในทุเรียนโดยวิธี QuEChERS ด้วยเทคนิค Gas Chromatograph
- ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Validation of QuEChERS method for determination of organophosphorus pesticide residues in durian using gas chromatography with FPD
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- หัวหน้าการทดลอง : น.ส.ลักขมี เดชานุรักษ์นุกูล กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปฉ.
- ผู้ร่วมงาน : นายวิทยา บัวศรี กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปฉ.

5. บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์(method validation) วัตถุมีพิษจำนวน 29 ชนิด ในทุเรียน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ QuEChERS ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ด้วยเครื่อง Gas Chromatography/ECD-FPD ตาม parameter ที่ทดสอบ ทำการทดลองในทุเรียนที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุมีพิษ 5 ระดับ คือ 0.01 0.025 0.1 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากผลการทดสอบการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิดในทุเรียน พบว่าวัตถุมีพิษจำนวน 29 ชนิด มีความเหมาะสมในการทดสอบโดยสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง (Accuracy) และมีความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ Range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.997-1.0 พบว่าวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด อยู่ในช่วง 0.01 – 0.5 mg/kg มีค่า % การวิเคราะห์ย้อนกลับ ระหว่าง \leq 49-152 % , 60-108 % , 81- 148% , 89-132% และ 88-116% ตามลำดับ มีค่า LOD ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.025 mg/kg วัตถุมีพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg ได้แก่ etroprophos, phorate, chlorpyrifos-methyl, parathion-methyl, malathion ,chlorpyrifos, parathion-ethyl, methidathion, prothiophos, ethion และ triazophos วัตถุมีพิษ 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 mg/kg dichlovos omethoate dicrotophos dimethoate diazinon pirimiphos-methyl fenitrothion pirimiphos-ethyl EPN phosalone แ ล ะ

coumaphos วัตถุพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 mg/kg ได้แก่ acephate, monocrotophos phosphamidon phenthoate และ profenophos วัตถุพิษจำนวน 2 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 และ 1.0 mg/kg ได้แก่ methamidophos และ azinphos-methyl

6. คำนำ

ในปัจจุบันได้มีการคำนึงถึงเรื่องสุขภาพอนามัยและสิ่งแวดล้อมจากการใช้สาร chlorinated solvents จึงเกิดวิธีการวิเคราะห์ใหม่ๆที่หลีกเลี่ยงการใช้สารดังกล่าวในการสกัด โดยใช้สารอื่นที่เป็น non-halogen-containing และ solvent mixtures เช่น ethyl acetate : acetonitrile และ cyclohexane : ethyl acetate เป็นต้น จากความต้องการวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถใช้กับพืชและวัตถุพิษหลายชนิดในการวิเคราะห์ครั้งเดียว รวมทั้งคุณภาพของผลการตรวจวิเคราะห์สูง ลดขั้นตอนและแรงงานคนในการสกัดตัวอย่าง ใช้สารเคมีและเครื่องแก้วน้อย ในปี 2002 Michelangelo Anastassiades และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ และตั้งชื่อว่า QuEChERS Method (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ในปี 2003 ได้เผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of AOAC International หลังจากนั้นห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง CVUA Stuttgart ประเทศเยอรมัน (The pesticide residue laboratory of the CVUA Stuttgart, Germany) ได้นำวิธีนี้มาใช้สำหรับงานประจำในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ และได้เข้าร่วมทดสอบความชำนาญ (proficiency test) กับ EU-PT 4 ในสัปดาห์ (2002) ซึ่งให้ผลทดสอบที่ดีเยี่ยม ต่อมา Steven J Lehotay และคณะ ได้มีการดัดแปลงและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้โดยการขยายขอบข่ายทั้งชนิดของสารและพืช โดยใช้ buffering salts เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกลับคืนได้ของสารที่วิเคราะห์ (Recoveries) ที่ pH มีผลต่อสาร analytes โดยใช้ acetate buffering ในการปรับค่า pH ประมาณ 6 ในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ และได้ตีพิมพ์และเผยแพร่ใน the European Standard EN 15662 ปี 2008 ในปัจจุบัน วิธี QuEChERS เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการนิยมน้อย่างแพร่หลายในกลุ่มประเทศยุโรป สหรัฐอเมริกา และประเทศต่างๆ นำมาใช้ทดสอบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ และความสามารถของวิธีการในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และใช้ตรวจวิเคราะห์ที่เป็นงานประจำทั้งภาครัฐและเอกชน วิธีนี้จะใช้ Acetonitrile เป็นสารในการสกัด มีข้อดีคือสามารถใช้ได้ทั้ง GC และ HPLC ในขั้นตอนการสกัดจะใช้ Magnesium sulfate anhydrous เพื่อใช้ในการ partition และเพิ่มประสิทธิภาพของ recoveries (การวิเคราะห์ย้อนกลับ) สำหรับในขั้นตอนของการ clean-up (การขจัดสิ่งปนเปื้อน) Magnesium sulfate anhydrous จะทำหน้าที่เป็นสารที่ดูน้ำ Sodium Chloride ช่วยในการลดความเป็น Polar ของ co-extractables และสามารถลด recoveries ของ สารวิเคราะห์ที่เป็น polar (polar analytes) Primary Secondary Amine (PSA) ใช้ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน พวก organic acids, sterols และ กลุ่มของน้ำตาลและไขมันบางชนิด และ C₁₈ ใช้ในการขจัดสิ่งปนเปื้อน พวก hydrophobic interferants เช่น ไขมัน

การดำเนินกิจกรรมต่างๆในยุคปัจจุบันหลายๆกรณี ต้องอาศัยผลการวัดจากห้องปฏิบัติการเบนข้อมูลประกอบการตัดสินใจ เช่น การเฝ้าระวังกระบวนการผลิต การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การยืนยันความแม่นยำไปตามข้อกำหนดคุณลักษณะเฉพาะของสินค้า การเฝ้าระวังความปลอดภัยอันตรายต่อคนและสภาวะแวดล้อม รวมถึงการใช้มาตรการสุขอนามัยทางการค้าในตลาดโลก ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่จะให้ผลถูกต้องและเป็นที่น่าเชื่อถือ นั้น วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่นำมาใช้ต้องมีการทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (method validation) เพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และเหมาะสมตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน (ทิพวรรณ., 2549) การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะที่ต้องศึกษา ได้แก่ ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity range) ช่วงของการใช้งาน (working range) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection, LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจหาปริมาณได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Limit of Quantitation, LOQ) ภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด เนื่องจากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กรมวิชาการเกษตร จำเป็นต้องติดตามและเตรียมความพร้อมที่จะต้องปฏิบัติให้ได้ตามกฎเกณฑ์ต่างๆ ดังนั้นจึงพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ในทุเรียน ด้วยเทคนิค Chromatography GC เพื่อให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐาน สามารถในการตรวจวัดหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่มีอยู่ปริมาณน้อยในตัวอย่างได้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1.1 centrifuge tubes ขนาด 50 มล. (Polypropylene, LP, ITALIA)
- 1.2 centrifuge tubes ขนาด 10-15 มล (Polypropylene,LP, ITALIA)
- 1.3 graduated centrifuge tubes ขนาด 10-15 มล (Pyrex)
- 1.4 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 และ 3 ตำแหน่ง
- 1.5 ตู้อบ และเตาเผา
- 1.6 เครื่องบดสับตัวอย่าง (food processor)
- 1.7 vortex mixer
- 1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) พร้อมด้วย adapter สำหรับ tube ขนาด 50 มล. และ 10-15 มล.
- 1.9 อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย(auto pipette)ขนาด 20-200ไมโครลิตร 0.1-1 มล. 0.5-5 มล. และ 1-10 มล.อุปกรณ์ดูดจ่ายสารเคมีจากขวด (dispenser) ขนาด 25 มล.
- 1.10 เครื่องลดปริมาตรโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน (nitrogen evaporator)
- 1.11 เครื่อง Gas Chromatograph ซึ่งมีหัวตรวจวัดชนิด Flame Photometric Detector : FPD ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6890

2. สารเคมี

- 2.1 acetonitrile, ชนิด pesticide grade J.T. Baker
- 2.2 magnesium sulfate-dried(powder, Fisher) เผาที่ 500 °C นาน 5 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่ตู้ดูดความชื้น
- 2.3 Octadecyl C₁₈ J.T. Baker
- 2.4 acetic acid (HOAc): glacial
- 2.5 anhydrous sodium acetate (NaOAc) (powder-Merck)
- 2.6 primary-secondary-amine (PSA) sorbent: particle size 40 µm (Varian part No.12213024)
- 2.7 toluene ชนิด pesticide grade J.T. Baker
- 2.8 helium gas : purity 99.999% และ N₂ gas

3.สารมาตรฐาน

สารละลายผสมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด ได้แก่ methamidophos dichlorvos acephate omethoate etroprophos dicrotophos monocrotophos phorate dimethoate diazinon phosphamidon chlorpyrifos-methyl parathion-methyl pirimiphos-methyl fenitothion malathion chlorpyrifos parathion-ethyl pirimiphos-ethyl phenthoate methidathion prothiophos profenophos ethion triazophos EPN Phosalone azinphos-methyl และ coumaphos

2 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างทุเรียนประมาณ 10 กิโลกรัม นำเนื้อและเปลือก มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (food processor) คลุกเคล้าให้เข้ากันดีก่อนชั่งตัวอย่างละ 10±0.1กรัม ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มล. เป็น analytical sample เพื่อนำไปสกัดหาสารพิษตกค้าง ในตัวอย่าง (blank) ซึ่งจะนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เก็บตัวอย่างทั้งหมดไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C สำหรับใช้ในครั้งต่อไป

3 การสกัดและการ clean up ตัวอย่าง

3.1 การสกัดตัวอย่าง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ Variation of QuEChERS-Method for Avocado (fatty matrix in presence of water). Community Reference Laboratory for Single Residue Methods. CVUA Stuttgart Germany และ (Anastassiades,M. 2007) ดังนี้

- 3.1.1 ชั่งตัวอย่างทุเรียนตัวอย่างละ 5±0.1กรัมใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 มล.
- 3.1.2 เติมน้ำ 6.5 มล. และสารละลาย acetonitrile จำนวน 10 มล.
- 3.1.3 เติม Disodium hydrogencitrate sesquihydrate จำนวน 0.5 กรัม
- 3.1.4 เติม Trtisodium citrate dehydrate จำนวน 1 กรัม
- 3.1.5 เติม anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄) จำนวน 4 กรัม และ Sodium

Chloride จำนวน 1 กรัม ปิดฝา

3.1.6 เขย่าด้วยมือ และเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที

3.1.7 นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 5 นาที

3.2 การ clean up ทำความสะอาดตัวอย่าง โดย Dispersive-SPE Cleanup

3.2.1 ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง จำนวน 4 มล. ด้วย autopipette ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 มล.

3.2.2 ที่ ใส่ PSA 100 มก. และ ODS C₁₈ 100 มก. ไว้แล้ว ปิดฝาแล้ว เขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุด นาน 1 นาที

3.2.3 นำไป centrifuge ด้วย ที่ระดับความเร็วรอบ >3,500 rpm นาน 5 นาที

3.2.4 ดูดสารละลาย 0.6 มล. ใส่ใน GC-vial ขนาด 2 มล. นำไปฉีดเข้าเครื่อง GC/FPD ปริมาณ 2 µl เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของวัตถุที่มีพิษกลุ่มมอร์ฟีนฟอสเฟต

4 การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC/FPD

4.1 การตั้งสถานะของเครื่อง GC/FPD 6890 โดยใช้

FPD Column : DB-5ms; 30 m. length (i.d.) 0.25 mm 0.25 µm. film thickness ปรับสถานะการทำงานของเครื่องดังนี้

4.1.1 oven : temperature: 100°C initial temp ramped to 175°C (25°C/min), 225°C (5°C/min), 290°C (25°C/min runtime) hold 10 min, runtime = 21.6 min

4.1.2 carrier gas : Helium, flow 1.5 ml/min, Mode: Constant flow

4.1.3 injector : injection temperature 250°C, inlet: EPC Mode: pulsed splitless, injection pulse pressure 56.40 psi until 0.75 min,

4.1.4 injection volume 2 µl

4.2 การทำ Calibration curve

ปรับสภาพเครื่องให้อยู่ในสภาพพร้อมจะใช้งาน นำสารละลาย working standard solution ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม/มล. ฉีดเข้าเครื่อง GC/FPD เพื่อทำ calibration curve เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน โดย plot กราฟระหว่าง พื้นที่ใต้ peak (peak area) ในแกน y และความเข้มข้นของสารในแกน x ซึ่ง calibration curve เป็นกราฟเส้นตรง (linear line) มีค่า correlation ของ linear regression (R²) ไม่น้อยกว่า 0.995

4.3 การตรวจวิเคราะห์ชนิดของสารพิษตกค้าง

ฉีดสารสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบค่า retention time ของ peak ตัวอย่างกับ peak ของสารมาตรฐานเพื่อพิสูจน์ว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน (qualitative data analysis) นำมาคำนวณปริมาณโดยเทียบพื้นที่ใต้ peak ระหว่างสารละลายมาตรฐานกับสารสกัดตัวอย่าง (quantitative data analysis)

5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

5.1 Accuracy

เป็นการวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานของวัตถุพิษลงในตัวอย่างที่ไม่มีวัตถุพิษที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (sample blank) และทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้(% recovery) ทำการทดลองในตัวอย่างทุเรียนที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุพิษ 7 ระดับ คือ 0.01 0.025 0.05 0.10 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์ 7 ซ้ำมาหาค่าเฉลี่ย ประเมิน accuracy จาก % recovery โดยเกณฑ์การยอมรับ Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ Codex, 1995

5.2 Precision

เป็นการวัดความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (repeatability) ในห้องปฏิบัติการเดียวกันโดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ใช้วิธีวิเคราะห์ เครื่องมือและผู้วิเคราะห์ชุดเดียวกัน ซึ่งทำการทดลองอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำผลวิเคราะห์มาหา % RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ค่า precision ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

5.3 Limit of quantitation (LOQ)

LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุพิษในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ต้องมีความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยง (precision) ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

5.4 Limit of detection (LOD)

LOD เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ซึ่งผลการวิเคราะห์ต้องมีค่าอัตราส่วนของ Signal/Noise ของแต่ละสารมากกว่า 3

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)

ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุเรียนที่นำมาใช้ในการทดลอง (blank)

ผลการวิเคราะห์ตรวจไม่พบสารพิษตกค้างของกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต รวม 29 ชนิด ในตัวอย่างทุเรียนที่นำมาใช้ทดสอบ

2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1 Linearity และ Range ผลการวิเคราะห์ พบว่า range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.997-1 พบว่าวิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต 24 ชนิด อยู่ในช่วง 0.01 – 0.5 mg/kg ยกเว้นวัตถุมีพิษ 6 ชนิด ได้แก่ methamidophos acephate omethoate monocrotophos azinphos-methyl อยู่ในช่วง 0.025- 0.5 mg/kg

2.2 Accuracy และ Precision ทำการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์ที่กลับคืน (%recovery) โดยเกณฑ์ยอมรับของ accuracy ที่ความเข้มข้นของวัตถุมีพิษในตัวอย่าง $>0.01\text{mg/kg} \leq 1 \text{ mg/kg}$ มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70 -120 (Codex, 1995) precision มีค่า %RSD ≤ 20 และ HORRAT ≤ 2

ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg ของวัตถุมีพิษกลุ่ม จำนวน 29 ชนิดใน ตัวอย่างทุเรียน (ตารางที่ 1.1 และ 1.2) %recovery ของผลวิเคราะห์ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (%recovery อยู่ในช่วง 70-120) จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ etroprophos phorate chlorpyrifos-methyl parathion-methyl malathion chlorpyrifos parathion-ethyl methidathion prothiophos ethion และ triazophos มี % recovery ในช่วง 77-110% และค่า precision มี %RSD ในช่วง 1.1-7.7 และ HORRAT ในช่วง 0.1-0.4

ผลการวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ระดับ 0.01 mg/kg แต่ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับระดับความเข้มข้น 0.025 mg/kg จำนวน 11 ชนิด (ตารางที่ 1) ได้แก่ dichlovos omethoate dicrotophos dimethoate diazinon pirimiphos-methyl fenitrothion pirimiphos-ethyl EPN phosalone และ coumaphos ค่า accuracy มี %recovery ในช่วง 71 -96% ค่า precision %RSD ในช่วง 9.0-13.7 และ HORRAT ในช่วง 0.5 - 0.8 ยกเว้น methamidophos และ azinphosmethyl ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ

วัตถุมีพิษจำนวน 5 ชนิด ที่ ผ่านเกณฑ์ยอมรับระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg ได้แก่ acephate monocrotophos phosphamidon phenthoate และ profenophos %recovery ให้ผลการทดสอบผ่าน เกณฑ์ยอมรับ ค่า accuracy มี %recovery ในช่วง 98-114% ค่า precision % RSD ในช่วง 5.2 – 8.8 และ HORRAT ในช่วง 0.3 – 0.6

วัตถุมีพิษ methamidophos ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/kg ค่า accuracy มี %recovery เท่ากับ 90% ค่า precision % RSD เท่ากับ 4.0 และ HORRAT เท่ากับ 0.38

วัตถุมีพิษ azinphos-methyl ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mg/kg ค่า accuracy มี %recovery เท่ากับ 113% ค่า precision % RSD เท่ากับ 10.1 และ HORRAT เท่ากับ 0.94

2.3 Limit of Detection (LOD)

จากการวิเคราะห์ fortified samples วัตถุมีพิษจำนวน 24 ชนิดในทุเรียนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg จำนวน 7 ซ้ำ คำนวณอัตราส่วนของ Signal/Noise ของแต่ละสารต้องมีค่ามากกว่า 3 ค่า LOD ของ

วัตถุพิษจำนวน 24 ชนิดที่ใช้วิธีการทดสอบนี้เท่ากับ 0.01 mg/kg ได้แก่ dichlovos etroprophos dicrotophos phorate dimethoate diazinon phosphamidon chlorpyrifos-methyl parathion-methyl pirimiphos-methyl fenitrothion malathion chlorpyrifos parathion-ethyl pirimiphos-ethyl phenthoate methidathion prothiophos profenophos ethion triazophos EPN phosalone และ coumaphos วัตถุพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOD เท่ากับ 0.025 mg/kg ได้แก่ methamidophos acephate omethoate monocrotophos และ azinphos-methyl

2.4 Limit of Quantitation (LOQ)

จากการทำ fortified samples วัตถุพิษจำนวน 29 ชนิด ในตัวอย่างทุเรียนที่ระดับความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.01 0.025 0.05 0.1 0.25 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ มีผลการทดสอบดังนี้ (ตารางที่1)

วัตถุพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ etroprophos phorate chlorpyrifos-methyl parathion-methyl malathion chlorpyrifos parathion-ethyl methidathion prothiophos ethion และ triazophos

วัตถุพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 mg/kg ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ dichlovos omethoate dicrotophos dimethoate diazinon pirimiphos-methyl fenitrothion pirimiphos-ethyl EPN phosalone และ coumaphos

วัตถุพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 mg/kg ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ได้แก่ acephate monocrotophos phosphamidon phenthoate และ profenophos

สำหรับวัตถุพิษ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ methamidophos และ azinphos-methyl มีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 mg/kg ให้ผลการทดสอบ Accuracy และ Precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ทำการทดลองในทุเรียนที่ระดับความเข้มข้นของวัตถุพิษ 5 ระดับ คือ 0.01 0.025 0.1 0.5 และ 1.0 mg/kg ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากผลการทดสอบการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษ กลุ่ม organophosphate จำนวน 29 ชนิด

ผลการทดสอบพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.025 0.05 0.1 0.5 และ 1.0mg/kg ของ วัตถุพิษกลุ่ม จำนวน 29 ชนิดในตัวอย่างทุเรียน Range ของวิธีวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่า correlation coefficient (r) อยู่ระหว่าง 0.997-1.0 มีค่า % การวิเคราะห์ย้อนกลับ ระหว่าง $\leq 49-152\%$, 60-108 % , 81- 148% , 89-132% และ 88-116% ตามลำดับ มีค่า LOD ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.025 mg/kg วัตถุพิษจำนวน 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg ได้แก่ etroprophos phorate chlorpyrifos-

methyl parathion-methyl malathion chlorpyrifos parathion-ethyl methidathion prothiophos ethion และ triazophos

วัตถุมีพิษ 11 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.025 mg/kg ได้แก่ dichlofos omethoate dicrotophos dimethoate diazinon pirimiphos-methyl fenitrothion pirimiphos-ethyl EPN phosalone และ coumaphos

วัตถุมีพิษจำนวน 5 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.05 mg/kg ได้แก่ acephate, monocrotophos phosphamidon phenthoate และ profenophos วัตถุมีพิษจำนวน 2 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.5 และ 1.0 mg/kg ได้แก่ methamidophos และ azinphos-methyl

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับ นักวิทยาศาสตร์ นักวิจัย นิสิต และนักศึกษา ที่จะทำการพัฒนาและปรับปรุงวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีการที่ดีและเหมาะสมและมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น
2. นำไปถ่ายทอดให้แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 เพื่อเป็นการพัฒนาและเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร
3. นำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว
4. จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐ และเอกชน นำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

11. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อติสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย 2547. Method Validation, เอกสารการฝึกอบรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ดุษฎี มั่นความดี และอุมาพร สุขม่วง 2544. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (Chemical Method Validation), เอกสารการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์บริการ

ทิพวรรณ นิ่งน้อย 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 124 หน้า

Anastassiades, M. 2007. prEN 15662: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS (MS) following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS method Brussels, Belgium, European Committee for Standardization.

Community Reference Laboratory for Single Residue Methods. 2010. Variation of QuEChERS-Method for Avocado (fatty matrix in presence of water). CVUA Stuttgart, Schaflandstr. Fellbach, Germany

- Codex. 1995. Codex Alimentarius volume3. Residues of Veterinary Drugs in Food.
- European Commission (EC). 2000. Guidance Document on Residue Analysis Method. SANCO/825/00 rev. 620/06/00. 16p.
- Food Standard Agency. 2004. Food Standard Agency Information Bulletin on Methods of Analysis and Sampling for Foodstuffs. Institute of Food Research,UK. <http://www.food.gov.uk>.
- 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.
- Lehotay, S.J. 2007. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partition with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. J. AOAC Int. 90, 485-520

ตารางที่ 1 สรุปผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด ในทุเรียน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.025 0.05 0.1 0.5 และ 1.0 mg/kg
ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

No.	Pesticide	Linear	Correlation	LOD	LOQ	Accuracy (%Recovery)						Precision (%RSD)						Precision (HORRAT)					
		Range	coefficient (r)	(mg/kg)	(mg/kg)	Concentration (mg/kg)						Concentration (mg/kg)						Concentration (mg/kg)					
		(ng)				0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0
1	methamidophos	0.025-0.5	0.999	0.025	0.5	98	70	81	81	90	88	-	-	-	-	4.5	1.6	-	-	-	-	0.4	0.1
2	diclofos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	87	78	95	96	104	106	22.9	9.0	4.2	4.6	4.3	5.4	1.1	0.5	0.3	0.3	0.4	0.5
3	acephate	0.025-0.5	0.999	0.025	0.05	-	69	98	71	110	94	-	14.6	8.8	2.5	6.3	4.0	-	0.7	0.5	0.2	0.5	0.4
4	omethoate	0.025-0.5	0.997	0.025	0.025	-	78	97	74	112	109	-	11.8	10.4	5.0	5.2	4.0	-	0.6	0.6	0.3	0.5	0.4
5	etroprophos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	77	81	93	113	105	105	9.2	6.9	4.1	3.7	3.8	1.0	0.4	0.4	0.2	0.3	0.3	0.1
6	dicrotophos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	152	81	89	90	111	110	12.0	9.5	5.5	4.2	5.1	2.4	0.6	0.5	0.3	0.3	0.4	0.2
7	monocrotophos	0.025-0.5	1	0.025	0.05	-	66	111	74	118	114	-	-	6.8	6.5	8.3	3.4	-	-	0.4	0.4	0.7	0.3
8	phorate	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	111	77	94	108	105	104	11.5	8.8	6.8	6.0	3.6	1.4	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3	0.1
9	dimethoate	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	112	87	106	97	112	109	23.5	12.6	8.8	6.4	5.8	2.5	1.1	0.7	0.5	0.4	0.5	0.2
10	diazinon	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	93	80	95	113	106	104	22.5	13.7	8.2	5.4	3.9	0.9	1.1	0.7	0.5	0.4	0.3	0.1
11	phosphamidon	0.01-0.5	0.999	0.01	0.05	-	61	114	100	117	116	12.3	10.3	6.1	8.8	6.6	4.9	0.6	0.5	0.4	0.6	0.6	0.5
12	chlorpyrifos-methyl	0.01-0.5	0.998	0.01	0.01	98	97	95	103	107	109	8.0	13.7	5.8	6.8	4.7	3.8	0.4	0.7	0.3	0.5	0.4	0.4
13	parathion-methyl	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	81	76	102	105	111	111	16.8	6.4	7.6	4.3	5.8	9.3	0.8	0.3	0.5	0.3	0.5	0.9
14	pirimifos-methyl	0.01-0.5	0.995	0.01	0.025	137	96	91	114	105	104	133.0	8.8	8.2	5.0	4.3	1.5	6.6	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1
15	fentothion	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	135	95	98	106	109	108	78.0	9.9	7.8	5.6	6.0	6.0	3.9	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6
16	malathion	0.01-0.5	0.998	0.01	0.01	87	97	99	117	110	107	16.0	9.8	8.8	7.7	5.4	1.3	0.7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1
17	chlorpyrifos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	78	93	92	110	103	106	7.4	6.6	10.0	6.2	4.6	2.9	0.3	0.4	0.6	0.4	0.4	0.3
18	parathion-ethyl	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	89	108	97	116	106	105	18.2	12.5	9.2	7.2	4.9	4.5	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4
19	pirimiphos-ethyl	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	120	92	105	115	104	106	12.9	12.7	10.0	3.2	4.1	18.6	0.6	0.7	0.6	0.2	0.4	1.8
20	phenthoate	0.01-0.5	0.998	0.01	0.05	91	87	104	112	110	107	22.9	20.7	9.7	9.2	5.1	1.0	1.1	1.1	0.6	0.6	0.4	0.1
21	methidathion	0.01-0.5	0.998	0.01	0.01	94	100	108	94	114	111	15.8	11.3	5.5	10.2	6.6	1.7	0.7	0.6	0.3	0.7	0.6	0.2
22	prothiophos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	102	85	87	97	97	98	16.3	21.7	5.9	12.2	8.1	0.9	0.8	1.2	0.4	0.8	0.7	0.1
23	profenophos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.05	107	92	100	99	110	109	33.8	20.5	5.2	12.0	6.0	1.7	1.6	1.1	0.3	0.8	0.5	0.2
24	ethion	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	102	88	101	100	107	104	4.5	5.2	9.6	5.4	5.5	0.8	0.2	0.3	0.6	0.4	0.5	0.1

ตารางที่ 1 (ต่อ) สรุปผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 29 ชนิด ในทุเรียน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.025 0.05 0.1 0.5 และ 1.0 mg/kg
ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

No.	Pesticide	Linear	Correlation	LOD	LOQ	Accuracy (%Recovery)						Precision (%RSD)						Precision (HORRAT)					
		Range	coefficient (r)	(mg/kg)	(mg/kg)	Concentration (mg/kg)						Concentration (mg/kg)						Concentration (mg/kg)					
		(ng)				0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0	0.01	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0
25	triazophos	0.01-0.5	0.999	0.01	0.01	107	83	108	99	112	110	10.6	14.0	7.2	11.1	6.0	3.0	0.5	0.7	0.4	0.7	0.5	0.3
26	EPN	0.01-0.5	0.998	0.01	0.025	49	71	95	98	106	108	39.6	8.7	6.2	11.6	7.4	3.4	1.7	0.4	0.4	0.8	0.6	0.3
27	phosalone	0.01-0.5	0.999	0.01	0.025	113	84	111	90	114	113	37.3	11.1	4.7	15.1	6.9	3.1	1.8	0.6	0.3	1.0	0.6	0.3
28	azinphos-methyl	0.025-0.5	0.999	0.025	0.5	-	80	148	67	133	114	-	7.4	9.0	23.0	10.6	6.6	-	0.4	0.6	1.5	0.9	0.6
29	coumaphos	0.01-0.5	0.998	0.01	0.025	-	89	99	89	115	109	41.6	14.0	10.6	7.6	7.9	2.7	2.1	0.7	0.6	0.5	0.7	0.3