

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

๑. **ชุดโครงการวิจัย:** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
๒. **โครงการวิจัย:** การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
กิจกรรม: การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อย: การพัฒนาเทคนิควิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินและน้ำ
๓. **ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย):** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างสารกลุ่ม Organophosphorus, Organochlorine และ Pyrethroids ในน้ำ เพื่อการขอการรับรองห้องปฏิบัติการของ สวพ.๕
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ): Method Validation of Organophosphorus, Organochlorine and Pyrethroids in Water for accreditation of OARD ๕
๔. **คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง: มณฑาทิพย์ อรุณวารกรณ์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๕
ผู้ร่วมงาน: กัญญารัตน์ เต็มปิยพล
จิราภา เมืองคล้าย
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๕
๕. **บทคัดย่อ:**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างสารกลุ่ม organophosphorus organochlorine และ pyrethroids ในน้ำ ที่ใช้ว่ามีความถูกต้องเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ สวพ.๕ โดยใช้วิธีทดสอบที่ดัดแปลงจาก AOAC, ๑๙๙๓ ทำการทดสอบและประเมินผลจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC ๑๗๐๒๕: ๒๐๐๕ ได้แก่ range / linearity, accuracy, precision, LOD และ LOQ สารพิษที่ทำการทดสอบเป็นกลุ่ม organophosphorus จำนวน ๔ ชนิด ได้แก่ azinphos-ethyl EPN phosalone และ triazophos สารพิษกลุ่ม organochlorine จำนวน ๑ ชนิด ได้แก่ sulfate-endosulfan และ pyrethroids จำนวน ๕ ชนิด ได้แก่ bifenthrin cyhalothrin cyfluthrin cypermethrin และ fenvalerate ซึ่งจากการทดสอบค่าต่าง ๆ ตามข้อกำหนดพบว่าสารกลุ่ม organophosphorus ได้ range ของวิธีทดสอบ อยู่ระหว่าง ๐.๐๕ - ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร และผลการทดสอบ linearity จากค่า correlation coefficient; r มีค่าระหว่าง ๐.๙๙๕ - ๐.๙๙๙ ผลการตรวจสอบ accuracy ประเมินผลจากเปอร์เซ็นต์ recovery พบว่าที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ๐.๐๕ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๗๒ - ๗๙ เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระดับกลาง ๐.๕ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๗ - ๗๖ เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นระดับสูง ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๗๐ - ๘๗ เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบ precision ประเมินจากเปอร์เซ็นต์ RSD ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าระหว่าง ๗.๓ - ๑๖.๙ , ๗.๗ - ๙.๐ และ ๒.๕ - ๔.๔ ตามลำดับ และเมื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) พบว่าทั้ง ๓ ระดับความเข้มข้นมีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนด (Horwitz's ratio < ๒) และยอมรับได้ คือระหว่าง ๐.๒๕ - ๐.๙๕ ค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบมีค่า ๐.๐๓ และ ๐.๐๕ ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนสารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids ได้ range ของวิธีทดสอบ อยู่ระหว่าง ๐.๐๒ - ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร และผลการทดสอบ linearity จากค่า correlation coefficient; r มีค่าระหว่าง ๐.๙๙๗ - ๐.๙๙๙ ผลการ

ตรวจสอบ accuracy ประเมินผลจากเปอร์เซ็นต์ recovery พบว่าที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ๐.๐๒ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๖ - ๑๑๕ เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระดับกลาง ๐.๕ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๑ - ๗๘ เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นระดับสูง ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๖ - ๗๓ เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบ precision ประเมินจากเปอร์เซ็นต์ RSD ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มีค่าระหว่าง ๔.๑ - ๑๒.๙ , ๑๒.๖ - ๑๗.๗ และ ๑.๖ - ๑๓.๗ ตามลำดับ และเมื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) พบว่าทั้ง ๓ ระดับความเข้มข้นมีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนด (Horwitz's ratio < ๒) และยอมรับได้ คือระหว่าง ๐.๒๒ - ๑.๔๐ ค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบมีค่า ๐.๐๐๘ และ ๐.๐๒ ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากการประเมินผลการทดสอบโดยวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ เหล่านี้ พบว่าวิธีทดสอบนี้ ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับและนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการได้

Abstract

The inhouse method based on AOAC (๑๙๙๓) for the determination of organophosphorus pesticides (azinphos-ethyl, EPN, phosalone and triazophos) organochlorine (sulfate-endosulfan) and pyrethroids (bifenthrin, cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin and fenvalerate) in water samples was developed and validated . The samples were extracted by organic solvent and analysed by gas chromatography (GC) using a flame photometric detector in phosphorous mode for organophosphorus and micro-ECD for organochlorine and pyrethroids. The method was validated by evaluating the analytical curves, linearity, limits of detection, and quantification, precision (% RSD and HORRAT ratio), and accuracy (%recovery). For organophosphorus pesticides, range of the method were ๐.๐๕ - ๒.๐ µg/L . Correlation coefficient (r) were ๐.๙๙๕ - ๐.๙๙๙ . Recovery and precision tests were performed on ๓ level of concentrations. At low , medium and high concentrations (๐.๐๕, ๐.๕ and ๒.๐ µg/L), recovery were between ๗๒ - ๗๙ % , ๖๗ - ๗๖ % and ๗๐ - ๘๗ % , precision(%RSD) were between ๗.๓ - ๑๖.๙% , ๗.๗ - ๙.๐% and ๒.๕ - ๔.๔% and HORRAT ratio were accepted. Limits of detection were ๐.๐๓ µg/L and limits of quantification were ๐.๐๕ µg/L . Organochlorine and pyrethroids pesticides, Range were ๐.๐๒ - ๒.๐ µg/L . Correlation coefficient (r) were ๐.๙๙๗ - ๐.๙๙๙ . Recovery and Precision tests were performed on ๓ level of concentrations. At low , medium and high concentration (๐.๐๒, ๐.๕ and ๒.๐ µg/L), recovery were between ๖๖ - ๑๑๕ % , ๖๑ - ๗๘ % and ๖๖ - ๗๓ % , precision(%RSD) were between ๔.๑ - ๑๒.๙% , ๑๒.๖ - ๑๗.๗% and ๑.๖ - ๑๓.๗% and HORRAT ratio were accepted. Limits of detection were ๐.๐๐๘ µg/L and limits of quantification were ๐.๐๒ µg/L. Therefore, the proposed method is applicable in the analysis of pesticides in water and the use of the method in routine analysis of pesticide residues is discussed.

๖. คำนำ:

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC ๑๗๐๒๕ : ๒๐๐๕ สำหรับห้องปฏิบัติการทดสอบที่ต้องการขอการรับรองความสามารถสำหรับวิธีทดสอบนั้น ๆ โดยจะต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามข้อกำหนดต่าง ๆ ก่อนนำไปใช้เป็นวิธีทดสอบมาตรฐานของห้องปฏิบัติการต่อไป สำหรับห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.๕ ได้รับการรับรอง

ความสามารถในรายการทดสอบสาร ออร์กาโนฟอสฟอรัสในมะม่วง โดยวิธี Inhouse method base on stienvandter ๑๙๘๕ เมื่อปี ๒๕๕๔ และมีนโยบายในการขยายขอบข่ายของวิธีทดสอบสำหรับขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ เพิ่มทุก ๆ ปี ทั้งนี้เพื่อให้ครอบคลุมรายการทดสอบให้มากที่สุด

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus organochlorine และ pyrethroids ในน้ำ โดยใช้ Gas Chromatography จึงเป็นการพิสูจน์วิธีการทดสอบที่ใช้ว่ามีความถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับได้และเหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบ โดยจัดทำเป็นรายงานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC ๑๗๐๒๕ สำหรับขยายขอบข่ายยื่นขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการต่อไป

๗. วิธีดำเนินการ

-อุปกรณ์

๑. เครื่องแก้ว

๑.๑ เครื่องแก้วที่ใช้ในการสกัดได้แก่ separatory funnel พร้อมฝาจุกแก้ว/Teflon, beaker, cylinder, erlenmeyer flask, round bottom flask, graduated tube, glass vial for Auto sampler, disposable pasture pipette และ glass funnel

๑.๒ เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน และ calibration curve ได้แก่ autopipette, volumetric flask class A

๒. สารเคมี

๒.๑ สารเคมีชนิด analytical grade (AR) สำหรับใช้ในการสกัดตัวอย่าง ได้แก่

๒.๑.๑ ethyl acetate , hexane

๒.๑.๒ anhydrous sodium sulfate (anh, Na_2SO_4) ก่อนใช้นำไปเผาที่อุณหภูมิ ๔๕๐ องศาเซลเซียส นาน ๔ ชั่วโมง นำมาใส่ใน dessicator ทิ้งไว้ไม่น้อยกว่า ๖ ชั่วโมง ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง

๒.๒ สารเคมีชนิด pesticide grade (PR) สำหรับใช้เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานและปรับปริมาตรของตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ได้แก่ ethyl acetate และ hexane

๒.๓ สารพิษมาตรฐานกลุ่ม organophosphorus จำนวน ๔ ชนิด ได้แก่ azinphos-ethyl EPN phosalone และ triazophos สารพิษกลุ่ม organochlorine จำนวน ๑ ชนิด ได้แก่ sulfate-endosulfan และ pyrethroids จำนวน ๕ ชนิด ได้แก่ bifenthrin cyhalothrin cyfluthrin cypermethrin และ fenvalerate pesticide grade ของ Dr. Ehrenstofer

๓. วัสดุและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ได้แก่ aluminum foil, filter paper No.๑ จุกยาง น้ำจากเขื่อนศรีนครินทร์ สำหรับใช้ sample blank เครื่องชั่งละเอียด ๕ ตำแหน่ง เครื่องสกัดวัดอุณหภูมิชนิด separatory funnel shaker เครื่องลดปริมาตรชนิด rotary evaporator เครื่องลดปริมาตรชนิด nitrogen evaporator ตู้อบสารเคมี (digital oven) เตาเผาอุณหภูมิสูง (furnace) เครื่องทำสุญญากาศ (vacuum pump) ตู้ดูดความชื้น (desiccator) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เครื่อง Gas Chromatograph (GC) ของบริษัท Agilent Technology รุ่น HP ๖๘๙๐ พร้อมหัวตรวจวัดชนิด GC หัวตรวจวัดชนิด FPD และ GC หัวตรวจวัดชนิด μECD

-วิธีการ

๑. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน เพื่อทำ calibration curve

๑.๑ เตรียม stock standard solution ของสารพิษกลุ่ม organophosphorus organochlorine และ pyrethroids โดยชั่งสารพิษแต่ละชนิดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน อยู่ในช่วงประมาณ ๑๐ มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric

flask ขนาด ๑๐ มิลลิลิตร เติม ethyl acetate (PR) เพื่อละลายสารพิษกลุ่ม organophosphorus เติมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม hexane (PR) เพื่อละลายสารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids จะได้ stock standard solution ที่มีความเข้มข้นประมาณ ๑,๐๐๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

๑.๒ เตรียม intermediate standard solution ดูด stock standard solution แต่ละชนิด ใส่ใน volumetric flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) เพื่อละลายสารพิษกลุ่ม organophosphorus ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม hexane (PR) เพื่อละลายสารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้ได้ intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้นประมาณ ๕๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

๑.๓ เตรียม working standard solution ใช้ pipette ดูดสารละลาย intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละกลุ่มใส่รวมใน volumetric flask ขนาด ๒๕ มิลลิลิตร ใบเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate (PR) เพื่อละลายสารพิษกลุ่ม organophosphorus ให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม hexane (PR) เพื่อละลายสารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้ได้ mixed working standard solution ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงประมาณ ๐.๐๒ - ๒.๐ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

๒. เตรียม fortified sample, sample blank และ reagent blank โดยตวงน้ำปริมาณ ๙๐๐ มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel ขนาด ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร ใช้ pipette ดูดสารละลายของสารมาตรฐานผสมในช่วง working standard solution ความเข้มข้นขึ้นอยู่กับช่วงที่จะประเมินผลการทดสอบ ใส่ลงไปแล้วหมุนวนให้ สารละลายของสารมาตรฐานผสมกับน้ำเป็นเนื้อเดียวกันตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๓๐ นาที เตรียม sample blank เหมือนกับการเตรียม fortified sample แต่จะไม่เติมสารละลายของสารมาตรฐานลงในตัวอย่างน้ำที่ทดสอบ และเตรียม reagent blank จะใช้สารเคมีที่ใช้สกัดในปริมาณเท่ากับที่ใช้ในการทดสอบเท่านั้น แล้วทำตามขั้นตอนของวิธีการสกัดตัวอย่าง

๓. เตรียมเครื่อง Gas Chromatograph ควบคุมสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

๓.๑ สารกลุ่ม organophosphorus วิเคราะห์ด้วย GC FPD มีสภาวะเครื่องดังนี้

Inlet: ๒๕๐°C, splitless

Column: DB๑๗๐๑P

Oven: ๖๐°C hold ๑min, ๓๐°C/min to ๑๘๐°C, ๔°C/min to ๒๕๐°C hold ๙min

Detector: FPD ๒๕๐°C

๓.๒ สารกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids วิเคราะห์ด้วย GC μ ECD มีสภาวะเครื่องดังนี้

Inlet: ๓๐๐°C, splitless

Column: DB๕

Oven: ๑๙๐ °C, ๑๖ °C/min to ๒๙๐°C, hold ๘ min

Detector: μ ECD ๓๐๐°C

๔. วิธีการสกัดตัวอย่าง

๔.๑ วิธีการสกัดตัวอย่างน้ำเพื่อสารพิษตกค้างสารกลุ่ม organophosphorus

ตวงน้ำ ๙๐๐ มิลลิลิตร ใส่ใน separatory funnel เติม ethyl acetate (AR) ๑๐๐ มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้ separatory funnel shaker นาน ๓ นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไช้ชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำเก็บไว้ใน Erlenmeyer flask ชั้นบนเป็นชั้นของ ethyl acetate กรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 ที่บรรจุใน funnel รองด้วยใยแก้ว ลงใน round bottom flask ขนาด ๒๕๐ มิลลิลิตร เทน้ำจาก Erlenmeyer flask ใส่ใน separatory

funnel ใบเติมเติม ethyl acetate (AR) ๕๐ มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้ separatory funnel shaker นาน ๓ นาที ตั้งไว้ให้แยกชั้นไขชั้นน้ำเก็บไว้ใน Erlenmeyer flask ใบเติม ชั้นบนกรองผ่าน anhydrous Na₂SO₄ เก็บรวมกับครั้งแรกทำการสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย ethyl acetate (AR) ๕๐ มิลลิลิตร และเก็บสารละลายชั้นบนรวมกัน เมื่อกรองเสร็จแล้วล้าง (rinse) separatory funnel ด้วย ethyl acetate (AR) ประมาณ ๑๐ มิลลิลิตร ๒ ครั้ง นำไปลดปริมาตรโดยใช้ rotary evaporator จนเกือบแห้ง ล้าง (rinse) round bottom flask ด้วย ethyl acetate (PR) ครั้งละประมาณ ๒-๓ มิลลิลิตร เขย่าด้วย vortex mixer ให้ทั่ว ใช้ Pasteur pipette ดูด ethyl acetate จากการ rinse แต่ละครั้ง เก็บใน graduated tube ขนาด ๑๒ หรือ ๑๕ มิลลิลิตร ลดปริมาตรด้วย nitrogen evaporator และปรับปริมาตรให้ได้ ๑ มิลลิลิตร นำไป inject ด้วยเครื่อง GC หัวตรวจวัดชนิด FPD

๔.๒ วิธีการสกัดตัวอย่างน้ำเพื่อสารพิษตกค้างสารกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids ทำเหมือนข้อ ๔.๑ แต่เปลี่ยนมาใช้ hexane แทน ethyl acetate นำไป inject ด้วยเครื่อง GC หัวตรวจวัดชนิด micro-ECD

๕. การทดสอบและประเมินจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ

๕.๑ ตรวจสอบช่วงความเข้มข้น/ ปริมาณของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (range) และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง response กับความเข้มข้น/ปริมาณของสารที่ วิเคราะห์ทดสอบ สามารถจะตรวจวิเคราะห์ที่ให้ค่าเป็นสมการเส้นตรงได้ (linearity)

๕.๑.๑ การหา range

ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ๕ ความเข้มข้น ๆ ละ ๑ ซ้ำ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดในข้อ ๔ นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample (แกน X) กับ response (แกน Y) พิจารณายอมรับค่าความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรง

๕.๑.๒ การหา linearity

ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายใน range ของการทดสอบ ๕ ความเข้มข้น ๆ ละ ๓ ซ้ำ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดในข้อ ๔ นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ fortified sample (แกน X) กับ response (แกน Y) คำนวณหา correlation coefficient (r), เกณฑ์การยอมรับ correlation coefficient; $r \geq 0.995$

๕.๒ ประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่ศึกษา กับค่าอ้างอิงจากตัวอย่าง (accuracy) ทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงการทดสอบ ๓ ระดับความเข้มข้น (low, medium, high) ความเข้มข้นละ ๑๐ ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการในข้อ ๔ หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบที่ลบค่า reagent blank ของ sample blank (X_๑) และ fortified sample (X_๒) นำไปประเมิน accuracy จากคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ recovery โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{X_2 - X_1}{C} \times 100$$

โดยที่ C = ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างมีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml)

กำหนดเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์ recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC peer - verified Method Nov.๑๙๙๓ ที่ความเข้มข้นของ analyst ในตัวอย่าง ๑ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าอยู่ในช่วง ๔๐ - ๑๒๐ เปอร์เซ็นต์

๕.๓ ประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (precision) ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ ๓ ระดับความเข้มข้น (low, medium, high) ความเข้มข้นละ ๑๐ ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ (\bar{X}) และ SD ของผลการทดสอบ คำนวณ % RSD จากสูตร

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

กำหนดเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์ RSD โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC peer- Verified Method Nov.๑๙๙๓ มีค่าไม่เกิน ๒๐ เปอร์เซ็นต์ ถ้าเปอร์เซ็นต์ RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดสามารถประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz' s ratio) จากสูตร

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

Predicted Horwitz RSD คำนวณได้จาก Horwitz equation แบบ Repeatability (RSD_r)

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

โดยที่ C = Concentration ratio

กำหนดเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT (Horwitz' s ratio) < ๒

๕.๔ หาค่าความเข้มข้น/ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection, LOD) ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จำนวน ๑๐ ซ้ำ พิจารณาโครมาโตแกรมที่พบว่ามีพีคของสารความสูงแตกต่างจาก Noise (Signal to noise ratio)อย่างน้อย ๓ เท่า

๕.๕ หาค่าความเข้มข้น/ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง โดยมี accuracy และ precision ตามที่กำหนด (Limit of Quantitation, LOQ) ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ จำนวน ๑๐ ซ้ำ ซึ่งผลการทดสอบค่า accuracy และ precision ต้องผ่านการประเมิน accuracy และ precision ถ้าไม่ผ่านเกณฑ์จะต้อง fortified ความเข้มข้นในระดับที่สูงขึ้น และทำซ้ำ ตามขั้นตอนจนผ่านเกณฑ์การประเมินจึงจะยอมรับค่า LOQ

-ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง เดือน ตุลาคม ๒๕๕๖ ถึง เดือนกันยายน ๒๕๕๘
กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๕

๘. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบและประเมินผลจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่ม ๓ กลุ่ม ได้แก่ organophosphorus organochlorine และ pyrethroids ในน้ำโดยใช้ Gas Chromatograph เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ที่กำหนดจากช่วงที่เป็นเส้นตรงจะได้ range สารพิษกลุ่ม organophosphorus จำนวน ๔ ชนิด ได้แก่ azinphos-ethyl EPN phosalone และ triazophos อยู่ในช่วง ๐.๐๕- ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อนำไปตรวจสอบ linearity จะได้ค่า correlation coefficient, r เท่ากับ ๐.๙๙๙, ๐.๙๙๖, ๐.๙๙๘ และ ๐.๙๙๕ ตามลำดับ ส่วนสารพิษกลุ่ม organochlorine จำนวน ๑ ชนิด ได้แก่ sulfate-endosulfan และ pyrethroids จำนวน ๕ ชนิด ได้แก่ bifenthrin cyhalothrin cyfluthrin cypermethrin และ fenvalerate ได้ range อยู่ในช่วง ๐.๐๒ - ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่า correlation coefficient, r เท่ากับ ๐.๙๙๗, ๐.๙๙๗, ๐.๙๙๙, ๐.๙๙๘, ๐.๙๙๗ และ ๐.๙๙๘ ตามลำดับ (ตารางที่ ๑)

ผลการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีที่ศึกษากับค่าอ้างอิงจากตัวอย่าง (accuracy) จากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery พบว่าสารพิษกลุ่ม organophosphorus ที่มีความเข้มข้นระดับต่ำ ๐.๐๕ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๗๒ - ๗๙ เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระดับกลาง ๐.๕ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๗ - ๗๖ เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นระดับสูง ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๗๐ - ๘๗ เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ ๒) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ ๖) และสามารถยอมรับได้ ส่วนสารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ๐.๐๒ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๖ - ๑๑๕ เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระดับกลาง ๐.๕ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๑ - ๗๘ เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นระดับสูง ๒.๐ ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่าระหว่าง ๖๖ - ๗๓ เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ ๓) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ตารางที่ ๖) และสามารถยอมรับได้

ผลการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ (precision) โดยตรวจสอบ precision ประเมินจากค่าเปอร์เซ็นต์ RSD ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง พบว่าสารพิษกลุ่ม organophosphorus มีค่า ๗.๓ - ๑๖.๙ , ๗.๗ - ๙.๐ และ ๒.๕ - ๔.๔ ตามลำดับ ส่วนสารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids มีค่า ๔.๑ - ๑๒.๙ , ๑๒.๖ - ๑๗.๗ และ ๑.๖ - ๑๓.๗ ตามลำดับ (ตารางที่ ๗) และเมื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz' s ratio) พบว่าทั้ง ๓ ระดับความเข้มข้นของสารพิษกลุ่ม organophosphorus มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง ๐.๒๕ - ๐.๙๕ สารพิษกลุ่ม organochlorine และ pyrethroids มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง ๐.๒๒ - ๑.๔๐ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด (Horwitz' s ratio < ๒) และยอมรับได้ (ตารางที่ ๒ และ ๓)

ค่าความเข้มข้น/ปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection, LOD) ของสารพิษแต่ละชนิดเมื่อพิจารณาจากค่า Signal to noise ratio มากกว่าหรือเท่ากับ ๓ พบว่า สารพิษ organophosphorus ทั้ง ๔ ชนิด มีค่า LOD เท่ากับ ๐.๐๓ ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ ๔) สารพิษกลุ่ม organochlorine ๑ ชนิด และ pyrethroids ทั้ง ๕ ชนิด มีค่า LOD เท่ากับ ๐.๐๐๘ ไมโครกรัมต่อลิตร (ตารางที่ ๕) ส่วนค่าความเข้มข้น/ปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง (Limit of Quantitation, LOQ) สารพิษ organophosphorus ทั้ง ๔ ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ ๐.๐๕ ไมโครกรัมต่อลิตร สารพิษกลุ่ม organochlorine ๑ ชนิด และ pyrethroids ทั้ง ๕ ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ ๐.๐๒ ไมโครกรัมต่อลิตร โดยผ่านการประเมิน accuracy และ precision

๙. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus จำนวน ๔ ชนิด ได้แก่ azinphos-ethyl EPN phosalone และ triazophos สารพิษกลุ่ม organochlorine จำนวน ๑ ชนิด ได้แก่ sulfate-endosulfan และ pyrethroids จำนวน ๕ ชนิด ได้แก่ bifenthrin cyhalothrin cyfluthrin cypermethrin และ fenvalerate ในน้ำโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph ผลการประเมินและตรวจสอบค่าต่าง ๆ ได้แก่ range/linearity, accuracy, precision, LOD และ LOQ อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ ซึ่งการประเมินผลการทดสอบจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ เหล่านี้ พบว่าวิธีทดสอบสารพิษวิธีนี้ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด และนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม organophosphorus organochlorine และ pyrethroids ในน้ำสำหรับห้องปฏิบัติการได้

๑๐. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

๑. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus organochlorine และ pyrethroids ในน้ำสำหรับห้องปฏิบัติการ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ. ๕

๒. เป็นข้อมูลสนับสนุนการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบสารพิษกลุ่ม organophosphorus organochlorine และ pyrethroids ในน้ำโดยวิธี Gas Chromatography

๑๑. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ นิ่งน้อย . ๒๕๔๗ . Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สถาบันอาหาร. ๒๕๔๗. การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี, เอกสารประกอบ
อบรมสัมมนาวิชาการด้านอุตสาหกรรมอาหาร.

ISO/IEC ๑๗๐๒๕, ๑๙๙๙, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration
Laboratories.

The Fitness for Purpose of Analytical methods: A Laboratory Guide to Method Validation and
Related Topics, EURACHEM Guide, December ๑๙๙๘.

๑๒. ภาคผนวก

ตารางที่ ๑. ผลการตรวจสอบ range และ linearity ของสารที่ได้จากวิธีทดสอบ

pesticide		Range (µg/L)	Linearity (correlation coefficient, r)
organophosphorus	aziphos-ethyl	๐.๐๕-๒.๐	๐.๙๙๙
	EPN	๐.๐๕-๒.๐	๐.๙๙๖
	phosalone	๐.๐๕-๒.๐	๐.๙๙๘
	triazophos	๐.๐๕-๒.๐	๐.๙๙๕
organochlorine	sulfate-endosulfan	๐.๐๒-๒.๐	๐.๙๙๗
pyrethroids	bifenthrin	๐.๐๒-๒.๐	๐.๙๙๗
	cyhalothrin	๐.๐๒-๒.๐	๐.๙๙๙
	cyfluthrin	๐.๐๒-๒.๐	๐.๙๙๘
	cypermethrin	๐.๐๒-๒.๐	๐.๙๙๗
	fenvalerate	๐.๐๒-๒.๐	๐.๙๙๘

ตารางที่ ๒ แสดงค่า LOD, LOQ, % Recovery, HORRAT ของสาร organophosphorus ที่ได้จากวิธีทดสอบ

Pesticides	LOD (ug/l)	LOQ (ug/l)	% Recovery			% RSD			HORRAT		
			๐.๐๕	๐.๕	๒.๐	๐.๐๕	๐.๕	๒.๐	๐.๐๕	๐.๕	๒.๐
azinphos-ethyl	๐.๐๓	๐.๐๕	๖๓.๖๘	๖๘	๘๖.๖๕	๑๖.๘๖	๙.๐๓	๔.๔๐	๐.๙๕	๐.๗๓	๐.๔๕
EPN	๐.๐๓	๐.๐๕	๗๙.๓๓	๗๑	๗๐.๐๐	๗.๓๖	๗.๗๓	๒.๕๒	๐.๔๓	๐.๖๓	๐.๒๕
phosalone	๐.๐๓	๐.๐๕	๗๑.๗๔	๖๗	๘๐.๙๕	๑๓.๓๕	๘.๓๐	๓.๒๒	๐.๗๗	๐.๖๗	๐.๓๓
triazophos	๐.๐๓	๐.๐๕	๙๕.๐๙	๗๖	๘๑.๘๗	๘.๙๒	๘.๐๒	๓.๒๐	๐.๕๓	๐.๖๖	๐.๓๓

ตารางที่ ๓ แสดงค่า LOD, LOQ, % Recovery, HORRAT ของสาร organochlorine และ pyrethroids ที่ได้จากวิธีทดสอบ

Pesticides	LOD (ug/l)	LOQ (ug/l)	% Recovery			% RSD			HORRAT		
			๐.๐๒	๐.๕	๒.๐	๐.๐๒	๐.๕	๒.๐	๐.๐๒	๐.๕	๒.๐
Sulfate-endosulfan	๐.๐๐๘	๐.๐๒	๖๘.๔	๗๓.๖	๖๖.๑	๑๒.๙	๑๖.๖	๑๑.๕	๐.๖๔	๑.๓๖	๑.๑๔
bifenthrin	๐.๐๐๘	๐.๐๒	๖๖.๕	๗๘.๕	๖๙.๑	๗.๙	๑๓.๘	๑.๖	๐.๓๙	๑.๑๔	๐.๙๖
cyhalothrin	๐.๐๐๘	๐.๐๒	๑๑๔.๘	๖๘.๖	๗๐.๖	๔.๑	๑๒.๖	๑๑.๕	๐.๒๒	๑.๐๑	๑.๑๕
cyfluthrin	๐.๐๐๘	๐.๐๒	๑๑๑.๓	๗๑.๔	๖๙.๘	๕.๘	๑๕.๐	๑๑.๒	๐.๓๑	๑.๒๒	๑.๑๒
cypermethrin	๐.๐๐๘	๐.๐๒	๙๔.๑	๗๐.๗	๗๐.๘	๑๑.๔	๑๕.๖	๑๑.๖	๐.๕๙	๑.๒๖	๑.๑๖
fenvalerate	๐.๐๐๘	๐.๐๒	๙๙.๕	๖๐.๙	๗๓.๒	๕.๙	๑๗.๗	๑๓.๗	๐.๓๑	๑.๔๐	๑.๓๗

ตารางที่ ๔ แสดงค่า Signal to noise ratio ของสาร organophosphorus ที่ความเข้มข้น ๐.๐๓ ไมโครกรัมต่อลิตร

pesticides	Signal to noise ratio										
	ซ้ำที่๑	ซ้ำที่๒	ซ้ำที่๓	ซ้ำที่๔	ซ้ำที่๕	ซ้ำที่๖	ซ้ำที่๗	ซ้ำที่๘	ซ้ำที่๙	ซ้ำที่๑๐	เฉลี่ย
azinphos-ethyl	๓.๐	๓.๔	๓.๒	๓.๓	๓.๓	๓.๒	๓.๑	๓.๔	๓.๔	๓.๕	๓.๓
EPN	๓.๔	๓.๓	๓.๓	๓.๑	๓.๔	๓.๓	๓.๔	๓.๒	๓.๑	๓.๒	๓.๓
phosalone	๓.๒	๓.๒	๓.๔	๓.๑	๓.๔	๓.๓	๓.๕	๓.๒	๓.๒	๓.๓	๓.๓
triazophos	๓.๐	๓.๐	๓.๒	๓.๑	๓.๑	๓.๒	๓.๓	๓.๒	๓.๒	๓.๓	๓.๒

ตารางที่ ๕ แสดงค่า Signal to noise ratio ของสาร organochlorine และ pyrethroids ที่ความเข้มข้น ๐.๐๐๘ ไมโครกรัมต่อลิตร

pesticides	Signal to noise ratio										
	ซ้ำที่๑	ซ้ำที่๒	ซ้ำที่๓	ซ้ำที่๔	ซ้ำที่๕	ซ้ำที่๖	ซ้ำที่๗	ซ้ำที่๘	ซ้ำที่๙	ซ้ำที่๑๐	เฉลี่ย
sulfate-endosulfan	๓.๒	๓.๒	๓.๔	๓.๕	๓.๔	๓.๖	๓.๒	๓.๔	๓.๒	๓.๓	๓.๓
bifenthrin	๓.๖	๓.๘	๓.๖	๓.๐	๓.๗	๓.๖	๓.๖	๓.๔	๓.๘	๓.๕	๓.๖
cyhalothrin	๓.๗	๓.๙	๔.๐	๓.๖	๓.๗	๓.๗	๓.๙	๓.๕	๓.๔	๓.๗	๓.๗
cyfluthrin	๓.๓	๓.๔	๓.๒	๓.๒	๓.๔	๓.๖	๓.๔	๓.๔	๓.๒	๓.๔	๓.๔
cypermethrin	๓.๔	๓.๕	๓.๒	๓.๒	๓.๕	๓.๖	๓.๕	๓.๕	๓.๓	๓.๔	๓.๔
fenvalerate	๓.๒	๓.๒	๓.๓	๓.๒	๓.๑	๓.๑	๓.๓	๓.๒	๓.๒	๓.๒	๓.๒

ตารางที่ ๖ เกณฑ์การยอมรับ recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer - Verified Method,
Nov.๑๙๙๓

ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง	Recovery, %
๑๐๐ %	๙๘ -๑๐๒
๑๐ %	๙๘ -๑๐๒
๑ %	๙๗-๑๐๓
๐.๑๐ %	๙๕-๑๐๕
๑๐๐ ppm	๙๐-๑๐๗
๑๐ ppm	๘๐-๑๑๐
๑ ppm	๘๐-๑๑๐
๑๐๐ ppb	๘๐-๑๑๐
๑๐ ppb	๖๐-๑๑๕
๑ ppb	๔๐-๑๒๐

ตารางที่ ๗ เกณฑ์การยอมรับ % RSD ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer - Verified Method,
Nov.๑๙๙๓

ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง	RSD, %
๑๐๐ %	๑.๓
๑๐ %	๒.๘
๑ %	๒.๗
๐.๑๐ %	๓.๗
๑๐๐ ppm	๕.๓
๑๐ ppm	๗.๓
๑ ppm	๑๑
๑๐๐ ppb	๑๕
๑๐ ppb	๒๑
๑ ppb	๓๐