รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปี2555

1.ชุดโครงการวิจัย :วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2.โครงการวิจัย :การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้อง แม่นยำตามมาตรฐานสากล

3.กิจกรรมที่ 1 :การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

4.กิจกรรมที่ 1.2 :พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพาตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

5.ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย):การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphorus, pyrethroid และ endosulfan ในพืชน้ำมัน

6.ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ): Method Validation of organophosphorus, pyrethroid และ endosulfan in vegetable oil.

7.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง :นายปิยะศักดิ์ อรรคบุตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน :นางสาวลมัย ชูเกียรติวัฒนา กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

:นางสาวชนิตา ทองแซม กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

:นางสาววาเลนไทน์ เจือสกุล กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

:นางสาววิชุตา ควรหัตร์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

Abstract

The validation of analytical methods for pesticides residue. organophosphorus, pyrethroid and endosulfan (18 compounds) in vegetable oil using Gas chromatograph. Were extracted by the Luke method to prove the use of the technique using fortified sample material organophosphorus, pyrethroid and endosulfan at different concentrations. Parameters tested include Linearity, Range, Accuracy, Precision, LOD and LOQ Linearity and Range The analysis showed that the correlation coefficient more than 0.995, which is considered acceptable by Range of testing in the range 0.003-2.00 mg. kg proven accuracy of the values in the range of 82-116% recovery percent precision of the residue to the HORRAT up to two and less than 20% RSD, which is the accepted standard for LOD score of 0.001 milligrams per kilogram. and LOQ was 0.005 milligrams per kilogram.

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง organophosphorus, pyrethroid และ endosulfan (18 ชนิด) ในพืชน้ำมันโดยใช้เทคนิค Gas chromatograph ทำการสกัดด้วยวิธีเนเธอร์แลนด์ การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการโดยการใช้เทคนิค fortified sample สาร organophosphorus, pyrethroid และ endosulfan ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พารามิเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ Linearity, Range, Accuracy, Precision, LOD และ LOQ ผลการวิเคราะห์พบว่า Linearity และ Range มีค่า correlation coefficient มากกว่า 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

ถั่วเหลืองเป็นหนึ่งในพืชผลทางการเกษตรที่สำคัญที่สุดในแง่ของการผลิตการใช้งานและคุณค่าทางโภชนาการสำหรับทั้งมนุษย์และสัตว์ พืชตระกูลถั่วนี้ยังเสริมสร้างดินที่มีไนโตรเจนผ่านกระบวนการทางชีวภาพโลก ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการเพิ่มขึ้นในการผลิตถั่วเหลืองทั่วโลกเช่นเดียวกับในการนำเข้าและ ส่งออก โรคถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อราแบคทีเรียและไวรัสไส้เดือนฝอยเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักในการจำกัด การได้รับผลตอบแทนที่สูงขึ้น ซึ่งการแก้ปัญหาคือการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่หลายขั้นตอนของกระบวนการเพาะปลูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับการปฏิบัติทางการเกษตรแบบเดิมที่ใช้สำหรับการปลูกถั่วเหลือง สารกำจัดศัตรูพืชส่วนหนึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีความหลากหลายมากคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมหรือการป้องกันวัชพืชหรือโรคพืชแม้เมื่อนำมาใช้ให้สอดคล้องกับการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) ในปัจจุบันต้องมีการตรวจสุขอนามัยพืชและสารตกค้างในพืชอย่างเข้มงวด ก่อนส่งออกไปขายยังประเทศปลายทาง ดังนั้นหน่วยงานภาครัฐและบริษัทเอกชน จึงต้องปรับปรุงประสิทธิภาพการวิเคราะห์ในการวิเคราะห์สารตกค้างยาฆ่าแมลงทำให้เพิ่มประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการวิเคราะห์

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 ทำให้ห้องปฏิบัติการต้องมีการพัฒนาและวิจัยเทคนิคและวิธีการใหม่เพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลงของสถานการณ์ทางด้านความปลอดภัยของผู้บริโภคอยู่ตลอดเวลา

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารมาตรฐาน organophosphorus, pyrethroid และ endosulfan

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 Gas chromatographic -μECD, FPD

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน organophosphorus, pyrethroid และ endosulfan ที่มีความบริสุทธิ์ 78-99 % ใน Ethyl acetate ให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock standard solution ทำการ mixed standard ให้ได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้น 10, 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน pyrethroid และ endosulfan ที่มีความบริสุทธิ์ 78-99 % ใน Hexane ให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock standard solution ทำการ mixed standard ให้ได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้น 10, 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมCalibration curve ทำการเจือจางจาก mixed standard 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.วิธีสกัดตัวอย่าง

4.1ชั่งตัวอย่าง 5 กรัมใส่ขวดตัวอย่างขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 มิลลิลิตรทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม 80 มิลลิลิตร Hexane ที่อิ่มตัวด้วย acetonitrile ปั่นด้วย Homogenizer 1 นาที (12000 rpm) เติม NaCl 1 กรัม ปั่นด้วย Homogenizer 1 นาที แช่ตู้เย็น -20 ^{o}C 1 คืน

4.2 เทสารละลายผ่าน Na_2SO_4 ใส่ใน separation funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการ partition ด้วย acetonitrile ที่อิ่มตัวด้วย Hexane 50 มิลลิลิตร เก็บชั้นล่าง ส่วนชั้นบนนำไป partition อีกครั้ง เก็บชั้นล่างรวมกันนำไปลดปริมาตรด้วย Rotary evaporator ปรับปริมาตรด้วย Ethyl acetate PR grade 5 มิลลิลิตร ดูดมา 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์สารกลุ่ม ออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง GC-FPD

4.3 แบ่งสารจากข้อ 4.2 มา 2 มิลลิลิตร ลดปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย hexane : Dichloromethane (4:1) 2 มิลลิลิตร เทลงในคอลัมน์ที่ pack ด้วย silica deactivated water 10 % 1 กรัม ที่ชะด้วย ด้วย hexane : Dichloromethane (4:1) 5 มิลลิลิตร

4.4 เติมตัวชะ ด้วย hexane : Dichloromethane (4:1) 3 มิลลิลิตร และจากนั้น hexane : Dichloromethane (1:1) 10 มิลลิลิตร นำไปลดปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วย hexane 2 มิลลิลิตร นำไปไปวิเคราะห์สารกลุ่ม เอ็นโดซัลแฟน และไพรีทรอยด์ ด้วยเครื่อง GC-μECD

5. การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatographic -μECD, FPD

5.1 คอลัมน์ DB-5.625

คอลัมน์ Ultra-1

5.2 สภาวะของเครื่อง

Inlet temperature 250 °C

temperature program

80 °C hold 1 min $\xrightarrow{15\ ^\circ C/min}$ 150 °C hold 5 min $\xrightarrow{15\ ^\circ C/min}$ 200 °C hold 5 min

$\xrightarrow{15\ ^\circ C/min}$ 250 °C hold 1 min $\xrightarrow{15\ ^\circ C/min}$ 280 °C hold 12 min

Detector temperature

- FPD 250 °C
- μECD 300 °C

Run time 36 min

6. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (validation)

6.1 การหา range ทดสอบ reagent blank และ fortified sample 7 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ทำการสกัดในข้อ 5 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่าง ความเข้มข้นที่ fortified sample (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น

6.2 การหา Linearity ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นใน range 6 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดในข้อ 5 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่าง ความเข้มข้นที่ fortified sample (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น จากค่า correlation coefficient, $R^2 \geq 0.995$

6.3 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

$$\%\ \text{recovery} = \frac{X2 - X1}{C}$$

โดยที่ C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

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

6.4 การหา Precision

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

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

6.4.2 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)

6.5 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

6.6 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 2557-กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอย และสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัส ในถั่วเหลืองพบว่ามี Range และ Linearity อยู่ในช่วง 0.005 – 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความสัมพันธ์เชิงเส้นมีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.998-0.999 (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด R^2 = 0.995

ผลการทดสอบ Accuracy ของวิธีการสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอย และสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสที่ fortified sample 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบความเข้มข้นละ 7ซ้ำ ผลเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้(% recovery) มีค่าระหว่าง 78-98 (ตารางที่ 3) และผลการทดสอบ Accuracy ของวิธีการสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัส ผลเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้ มีค่าระหว่าง 69-105 (ตารางที่ 4) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับของ AOAC 1993 ที่กำหนดไว้ 60-120 (ภาคผนวก)

ผลการทดสอบ Precision ได้ค่า %RSD ของสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอย มีค่า %RSD ระหว่าง 7.89-15.45 และมีค่า HORRAT ระหว่าง 0.92-1.64 (ตารางที่ 3) และผลการทดสอบ Precision ได้ค่า %RSD ของสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัส มีค่า %RSD ระหว่าง 2.59-11.90 และมีค่า HORRAT ระหว่าง 0.41-1.87 (ตารางที่ 4) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับโดยมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และเกณฑ์ยอมรับคือมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงRange, Linearity, และcorrelation coefficient (R^2) ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอยในถั่วเหลืองที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ชื่อสาร	สมการเส้นตรง	ความเข้มข้น mg/kg	R^2
Alpha endosulfan	y=171165.91782x-4588.02866	0.005-1.0	0.99839
Beta endosulfan	y=146811.39907x-3638.08464	0.005-1.0	0.99902
Endosulfan sulphate	y=184675.99293x-4338.73068	0.005-1.0	0.99914
lamda cyhalothrin	y=142373.27482x-5217.54554	0.005-1.0	0.99836
Permethrin	y=105886.90765x-3475.34526	0.005-1.0	0.99766
Cypermerthrin	y=7906.89633x-10206.36216	0.005-1.0	0.99871

ตารางที่ 2 แสดงRange, Linearity, และcorrelation coefficient (R2) ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลืองที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ชื่อสาร	สมการเส้นตรง	ความเข้มข้น mg/kg	R^2
dimethoate	y=2621.71874x-3.64032	0.01-1.00	0.99990
diazinon	y=2157.97867x+16.39912	0.01-1.00	0.99960
parathion-methyl	y=2311.96226x+9.48320	0.01-1.00	0.99998
pirimiphos-methyl	y=2011.45241x+13.39587	0.01-1.00	0.99730
chlorpyrifos	y=1572.00050x+27.35939	0.01-1.00	0.99976
parathion-ethyl	y=1960.01656x+8.02502	0.01-1.00	0.99994
pirimiphos-ethyl	y=1937.72582x+10.92178	0.01-1.00	0.99967
profenofos	y=1449.65586x+23.21361	0.01-1.00	0.99994
ethion	y=3118.01467x-1.02641	0.01-1.00	0.99989
triazophos	y=3395.33768x+33.45266	0.01-1.00	0.99882
phosalone	y=1562.10642x+7.90292	0.01-1.00	0.99957
azinphos-ethyl	y=1489.71874x-3.48526	0.01-1.00	0.99875

ตารางที่ 3 แสดง % recovery %RSD และ HORRAT ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอยในถั่วเหลือง ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

compound	ความเข้มข้น (mg/kg) n=7														
	0.01			0.05			0.1			0.5			1		
	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT
Alpha endosulfan	79	12.65	1.45	80	10.89	1.57	94	8.97	1.05	87	9.91	1.08	90	8.67	1.02
Beta endosulfan	72	14.27	1.52	85	12.06	1.35	98	10.87	1.09	84	9.54	0.97	92	8.24	1.08
Endosulfan	75	11.69	1.62	88	13.71	1.64	96	9.12	1.01	89	9.34	0.94	89	7.68	1.04

sulphate															
lamda cyhalothrin	80	15.45	1.51	82	11.24	1.54	85	7.95	1.05	84	8.17	0.92	84	10.25	1.05
permethrin	85	13.9	1.59	81	13.17	1.59	86	8.70	1.07	83	10.25	0.96	86	9.31	1.01
cypermerthrin	80	14.81	1.48	89	12.97	1.57	92	8.94	1.04	81	7.89	1.07	84	11.70	0.98

<u>ตารางที่ 4</u> แสดง % recovery %RSD และ HORRAT ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลืองที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

compound	ความเข้มข้น (mg/kg) n=7														
	0.02			0.05			0.10			0.50			1.00		
	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT	%Rec	%RSD	HORRAT
dimethoate	81	9.78	1.56	101	5.47	1.06	97	3.25	0.71	98	4.25	0.74	105	4.09	0.89
diazinon	78	7.88	1.28	78	4.96	1.08	92	3.69	0.69	89	5.05	0.68	80	5.21	0.75
parathion-methyl	83	11.90	1.43	93	7.41	1.01	87	3.49	0.89	85	6.01	0.66	99	4.91	0.84
pirimiphos-methyl	73	8.99	1.44	83	6.05	1.10	78	2.59	0.72	82	4.36	0.69	97	4.56	0.94
chlorpyrifos	85	9.17	1.23	99	8.47	1.16	85	3.56	0.85	96	3.27	0.72	100	5.08	0.41
parathion-ethyl	79	7.34	1.41	79	6.33	0.99	86	4.87	0.82	84	4.68	0.81	87	5.11	0.86
pirimiphos-ethyl	69	10.03	1.87	87	8.95	0.98	87	6.59	0.87	80	4.68	0.79	86	4.89	0.84
profenofos	77	6.89	1.56	77	7.47	0.91	76	5.47	0.74	86	3.89	0.68	101	4.71	0.79
ethion	71	8.42	1.54	81	5.89	1.07	74	4.96	0.64	94	4.57	0.65	93	5.55	0.92
triazophos	74	9.14	1.51	94	7.29	1.03	90	3.25	0.84	87	3.28	0.69	90	5.87	0.89
phosalone	75	9.88	1.56	85	7.91	1.08	76	4.19	0.98	85	4.17	0.74	89	5.09	0.81
azinphos-ethyl	74	7.89	1.53	85	4.58	1.05	85	4.70	0.88	84	4.05	0.84	93	4.67	0.86

ผลการทดสอบ LOD โดยการ spike ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOD เท่ากับ 3 × SD ได้ค่า LOD จากการคำนวณสารกลุ่มออกาโนคลอรีนไพรีทรอยในถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 0.003-0.006 และปรับค่า LOD จากการคำนวณ เป็น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 5) ส่วนสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลืองปรับค่าเป็น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOD เท่ากับ 3 × SD ได้ค่า LOD มีค่าเท่ากับ 0.004-0.012 และปรับค่า LOD จากการคำนวณ เป็น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 6)

ผลการทดสอบ LOQ โดยการ spike ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ คือที่ระดับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอยในถั่วเหลือง ทำการทดสอบความเข้มข้นที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมละ 10 ซ้ำหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOQ เท่ากับ 10 × SD ได้ค่า LOQ จากการคำนวณที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของ (ตารางที่ 7)

ส่วนสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลือง ทำการทดสอบความเข้มข้นที่ระดับ 0.01มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ละ 10 ซ้ำหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) LOQ เท่ากับ 10 × SD ได้ค่า LOQ จากการคำนวณที่ระดับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 5 การประเมิน LOD ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอยในถั่วเหลืองจากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 7 ซ้ำ

ชื่อสาร	ความเข้มข้น		SD	3SD	LOD
	fortified	Average Analyte			
	mg/kg				
Alpha endosulfan	0.005	0.0043	0.0016	0.005	0.005
Beta endosulfan	0.005	0.0045	0.0010	0.003	0.005
Endosulfan sulphate	0.005	0.0042	0.0011	0.003	0.005
lamda cyhalothrin	0.005	0.0041	0.0010	0.003	0.005
permethrin	0.005	0.0043	0.0019	0.006	0.005
cypermerthrin	0.005	0.0039	0.0019	0.006	0.005

ตารางที่ 6 การประเมิน LOD ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลืองจากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 7 ซ้ำ

ชื่อสาร	ความเข้มข้น		SD	3SD	LOD
	fortified	Average Analyte			
	mg/kg				
dimethoate	0.01	0.0086	0.0013	0.004	0.005
diazinon	0.01	0.0087	0.0014	0.004	0.005
parathion-methyl	0.01	0.0085	0.0020	0.006	0.01
pirimiphos-methyl	0.01	0.0090	0.0015	0.005	0.01
chlorpyrifos	0.01	0.0097	0.0029	0.009	0.01
parathion-ethyl	0.01	0.0084	0.0028	0.008	0.01
pirimiphos-ethyl	0.01	0.0089	0.0029	0.009	0.01
profenofos	0.01	0.0078	0.0030	0.009	0.01
ethion	0.01	0.0082	0.0030	0.009	0.01
triazophos	0.01	0.0084	0.0020	0.006	0.01
phosalone	0.01	0.0079	0.0015	0.005	0.01
azinphos-ethyl	0.01	0.0080	0.0041	0.012	0.01

ตารางที่ 7 การประเมิน LOQ ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนคลอรีนและไพรีทรอยในถั่วเหลืองจากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 10 ซ้ำ

ชื่อสาร	ความเข้มข้น		SD	10SD	LOQ
	fortified	Average Analyte			
	mg/kg				
Alpha endosulfan	0.005	0.0043	0.0011	0.011	0.01
Beta endosulfan	0.005	0.0045	0.0010	0.010	0.01
Endosulfan sulphate	0.005	0.0042	0.0011	0.011	0.01
lamda cyhalothrin	0.005	0.0041	0.0010	0.010	0.01
permethrin	0.005	0.0043	0.0014	0.014	0.01
cypermerthrin	0.005	0.0039	0.0013	0.013	0.01

<u>ตารางที่ 8</u> การประเมิน LOQ ของวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลือง จากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 7 ซ้ำ

ชื่อสาร	ความเข้มข้น		SD	10SD	LOQ
	fortified	Average Analyte			
	mg/kg				
dimethoate	0.01	0.0086	0.0013	0.013	0.02
diazinon	0.01	0.0087	0.0014	0.014	0.02
parathion-methyl	0.01	0.0085	0.0020	0.020	0.02
pirimiphos-methyl	0.01	0.0090	0.0015	0.015	0.02
chlorpyrifos	0.01	0.0097	0.0029	0.029	0.02
parathion-ethyl	0.01	0.0084	0.0028	0.028	0.02
pirimiphos-ethyl	0.01	0.0089	0.0029	0.029	0.02
profenofos	0.01	0.0078	0.0030	0.030	0.02
ethion	0.01	0.0082	0.0030	0.030	0.02
triazophos	0.01	0.0084	0.0020	0.020	0.02
phosalone	0.01	0.0079	0.0015	0.015	0.02
azinphos-ethyl	0.01	0.0080	0.0041	0.041	0.02

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างวิธีทดสอบสารกลุ่มออกาโนคลอรีน ไพรีทรอย และสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลือง ให้ผลการทดลองดังนี้ linearity และ range ของวิธีวิเคราะห์ มีค่า correlation coefficient (R^2) ≥ 0.995 และมีค่า range อยู่ในช่วง 0.005-1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

accuracy และ precision สารกลุ่มออกาโนคลอรีน ไพรีทรอย และสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลืองที่ 5 ระดับความเข้มข้นผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด คือมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 78-98, 69-105 ตามลำดับ %RSD น้อยกว่า 20และมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2

สำหรับค่า LOD ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างวิธีทดสอบสารกลุ่มออกา

โนคลอรีน ไพรีทรอย และสารกลุ่มออกาโนฟอสฟอรัสในถั่วเหลือง มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนค่า LOQเท่ากับ 0.01และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ

การนำไปใช้ประโยชน์

1.ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในงานบริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างรวมทั้งใช้ในงานวิจัย

2.ใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

3.ถ่ายทอดวิธีการวิเคราะห์ให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8

4.เสนอผลงานวิจัยเพื่อให้ผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียวสถาบันอาหาร. 2547. การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบ

ทิพวัน นิ่งน้อย. 2549.แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เคมี. เอกสารประกอบการอบรม. ณ โรงแรมมิราเคิล กรุงเทพฯ

วิสุทธิ เชวงศรี, รัชนี สุวภาพ และปิยะศักดิ์ อรรคบุตร.2551. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม Triazole ในมะม่วง ผลการปฏิบัติงานประจำปีงบประมาณ 2551. สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

Anastassides, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., and Schenck, F.J. 2003. Fast and Easy Mulitiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/partitioning “Dispersive Solid-phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 86, 412-131.

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

The Luke et al. method for determining multipesticide residues in fruits and vegetables: collaborative study. J Assoc Off Anal Chem. 1985 Jan-Feb; 68(1): 64-71

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