รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการ วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล

กิจกรรมที่ 1 : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง 1.2.32 : การศึกษาความคงตัว (Stability) ในการเก็บรักษา สารมาตรฐานกลุ่ม fungicide ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

: Fungicide reference standard storage stability .

4. คณะผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บูรณ์	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บูรณ์	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวจินตนา ภู่มงกุฎชัย	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การศึกษาการคงสภาพของ สารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 24 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, benalaxyl, cymoxanil, cyproconazole, difenoconazole, dimethomorph, epoxiconazole, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, metalaxyl, oxycarboxin, penconazole, prochloraz, propamocarb, pyrazophos, pyrimethanil, tebuconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, triadimenol, tricyclazole และ trifloxystrobin โดยตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ศึกษา working standard solution ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 60 วัน ตู้เย็น 90 วัน และตู้แช่ 12 เดือน พบว่าที่อุณหภูมิห้อง สารมีความคงทนถึง 60 วัน ยกเว้น cymoxanil มีความคงทนถึง 7 วัน สาร oxycarboxin มีความคงทน ถึง 20 วัน ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น สารมีความคงทน ที่ 90 วัน และ ตู้แช่ สารมีความคงทน ที่ 12 เดือน การศึกษามาตรฐาน intermediate standard solution เมื่อเก็บรักษาในตู้แช่ 12 เดือน พบว่ามีความคงทนจนถึง 12 เดือน นอกจากนี้ยังทำการศึกษาสารมาตรฐาน (pure reference standard) ที่หมดอายุแล้ว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ที่ยังไม่หมดอายุ พบว่า azoxystrobin สามารถใช้ได้หลังหมดอายุแล้ว 6 ปี ส่วน tebuconazole ไม่สามารถนำมาใช้งานได้หลังหมดอายุแล้ว 1 ปี

Abstract

Study on the Storage stability of 24 fungicide standards : azoxystrobin, benalaxyl, cymoxanil, cyproconazole, difenoconazole, dimethomorph, epoxiconazole, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, metalaxyl, oxycarboxin, penconazole, prochloraz, propamocarb, pyrazophos, pyrimethanil, tebuconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, triadimenol, tricyclazole and trifloxystrobin had been conducted. The analysis technique of this study were conducted by using LC-MS / MS instruments. Working standard solutions were stored until 60 days at ambient temperature, 90 days in refrigerated and 12 months in freezer conditions. The results of storage stability of working standard solutions showed that, at ambient temperature : standard solutions were stable until 60 days except cymoxanil (was stable until 7 days) and oxycarboxin (was stable until 7 days), in refrigerated : all compounds were stable until 60 days and freezer : all compounds were stable until 12 months. The storage stability of intermediate standard solutions in the freezer showed that, all compounds were stable up until 12 months. The study of the expired pure reference standard compared with unexpired standard showed that azoxystrobin was stable for six years expired and tebuconazole was unusable after expiration date.

6. คำนำ

การศึกษาความคงทนของสารมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการมีความสำคัญ อย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นส่วนหนึ่งของการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ รวมทั้งเมื่อมีการกำหนดอายุสารมาตรฐานซึ่งเป็น working standard solution และ intermediate standard solution จะต้องมีการพิสูจน์ว่า ที่ระยะเวลาที่กำหนดสารมาตรฐานยังมีความคงทน ไม่มีการสลายตัวจนส่งผลกระทบต่อผลการทดสอบ ซึ่งในการศึกษาความคงทนของสารมาตรฐาน จะมีการกำหนดเกณฑ์ การยอมรับ เช่นเมื่อให้สารมาตรฐานที่เตรียมใหม่มีความเข้มข้น 100 % สารต้องมีความเข้มข้นไม่เกิน ±10 % ถือว่าไม่มีความแตกต่างสามารถใช้สารมาตรฐานนั้นได้ (SANCO/12571/2013) อย่างไรก็ตามจะต้องมีการควบคุมปัจจัยที่ทำให้เกิดการสลายตัวอื่นๆ เช่น ใช้ขวดสีชา เพื่อลดการสลายตัวด้วยแสง การชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานเพื่อตรวจสอบการระเหยของตัวทำละลายที่ทำให้ สารมีความเข้มข้นสูงขึ้น การตรวจวัดอุณหภูมิการเก็บรักษา เพื่อให้แน่ใจว่ามีอุณหภูมิไม่ออกจากเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งผลการศึกษาจะนำไปใช้ในการกำหนดอายุสารมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ และนำไปประกอบการตัดสินใจ และเพื่อความมั่นใจในการใช้สารมาตรฐาน (pure reference standard) ที่หมดอายุแล้ว ตามที่ระบุใน ฉลาก เพื่อลดการซื้อสารมาตรฐานซึ่งมีราคาสูง

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

7. 1. อุปกรณ์

7.1.1 สารมาตรฐาน 24 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, benalaxyl, cymoxanil, cyproconazole, difenoconazole, dimethomorph, epoxiconazole, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, metalaxyl, oxycarboxin, penconazole, prochloraz, propamocarb, pyrazophos, pyrimethanil, tebuconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, triadimenol, tricyclazole และ trifloxystrobin

7.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง

7.1.3 สารเคมี ได้แก่ actonitrile, water

7.1.4 เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ volumetric flask และ ขวดแก้วขนาด 15 ml

7.1.5 Auto pipette ขนาด 10-100μL, 200-1000μL and 1-10 mL

7.1.6 ขวดสีชา

7.1.7 ตู้เย็น freezer

7.1.8 เทอร์โมมิเตอร์ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว

7.1.9 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง Liquid Chromatograph / Mass Spectrometer/ Mass Spectrometer (LC/MS/MS) : Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole

7.2 วิธีดำเนินการ

7.2.1 สำรวจสารมาตรฐาน (pure reference standard) กลุ่ม fungicide ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ เพื่อกำหนดวิธีการศึกษา พบว่ามีสารในกลุ่ม fungicide 40 ชนิดที่มีวันหมดอายุ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003-2017 และ มีความบริสุทธิ์ของสารในช่วง 94.5-99.9 % และมีสารที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS จำนวน 33 ชนิด และ GC-MS จำนวน 7 ชนิด จึงทำการศึกษา สารมาตรฐาน 24 ชนิด ที่สามารถ mixed และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยใช้ คอลัมน์ และ mobile phase ชนิดเดียวกันได้

7.2.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

7.2.1.1 Stock standard solution 1,000 µg/ml

ชั่งน้ำหนัก สารมาตรฐาน ประมาณ 10 mg ด้วย เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย actonitrile (HPLC grade)

7.2.1.2 Intermediate standard solution 10 µg/ml

pipette สารมาตรฐาน stock standard solution 1,000 µg/ml แต่ละชนิด ปริมาตร 250 **µl** ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย actonitrile (HPLC grade)

7.2.1.3 Intermediate standard solution 1.0 µg/ml

pipette สารมาตรฐาน Intermediate standard solution 10 µg/ml ปริมาตร 2.5 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย actonitrile (HPLC grade) เตรียมสารมาตรฐาน 25 ml จำนวน 3 ขวด

7.2.1.4 Working standard solution 0.1 µg/ml

pipette สารมาตรฐาน Intermediate standard solution 10 µg/ml

ปริมาตร 250 **µl** ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย actonitrile (HPLC grade) โดยเตรียมสารมาตรฐาน 25 ml จำนวน 3 ขวด

7.2.3 การศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐาน intermediate standard solution 1.0 µg/ml และ working standard solution 0.1 µg/ml ที่เตรียมจากสารมาตรฐาน (pure reference standard) ที่ยังไม่หมดอายุ โดยเก็บรักษาสารละลายมาตรฐาน ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง ตู้เย็น และตู้แช่ ตรวจสอบการระเหยของตัวทำละลายโดยการชั่งน้ำหนัก ต้องไม่แตกต่างกันเกิน ±1 % (EURL,2014) นำสารลายมาตรฐานไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ที่เตรียมใหม่ จำนวน 2 ซ้ำ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ intermediate standard solution 1.0 µg/ml ต้องนำมา dilute เป็น 0.1 µg/ml ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

7.2.3.1 **อุณหภูมิห้อง** เก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml (ข้อ 7.2.1.4) จากการเตรียม 3 ซ้ำ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25±5 ^{O}C) ที่ระยะเวลา 3, 7, 10, 15, 20, 30, 45 และ 60 วัน

7.2.3.2 **ตู้เย็น** เก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml (ข้อ 7.2.1.4) จากการเตรียม 3 ซ้ำ เก็บรักษาในตู้เย็น (5±5 ^{O}C) ที่ระยะเวลา 3, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60 และ 90 วัน

7.2.3.3 **ตู้แช่** เก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml (ข้อ 7.2.1.3) และ 1.0 µg/ml (ข้อ 7.2.1.4) จากการเตรียม 3 ซ้ำ เก็บรักษาใน freezer (น้อยกว่า -18 ^{O}C) ความเข้มข้น 0.1 µg/ml ศึกษาที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 และ 12 เดือน และ ความเข้มข้น 1.0 µg/ml ศึกษาที่ระยะเวลา 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 และ 12 เดือน

7.2.4 ศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานที่หมดอายุแล้ว

โดยเตรียมสาร working standard solution 0.1 µg/ml จากสารมาตรฐาน (pure reference standard) ที่หมดอายุแล้ว และ จากสารมาตรฐาน ที่ยังไม่หมดอายุ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำมาหาความเข้มข้นของสาร เทียบกับสารที่ยังไม่หมดอายุ ต้องอยู่ในช่วง ± 10 %

7.2.5 การตรวจวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษเครื่อง Liquid Chromatograph / Mass Spectrometer/ Mass Spectrometer (LC/MS/MS) : Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole มีการตั้งสภาวะดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การตั้งสภาวะของเครื่องตรวจวิเคราะห์ LC/MS/MS

Instrument parameters	Conditions		
LC conditions			
Column/temperature	Agilent ZORBAX, 3.0x100 mm, 3.5 µm /30 ºC Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18,		
Eluent A	Ammomium formate+ 0.1% formic acid		
Eluent B	acetonitrile		
Gradient	%A	%B	Time (min)
	94	6	0.0
	94	6	0.5
	2	98	15.0
	2	98	16.0
	94	6	17.2
Flow rate	0.5 mL/min		
Injection volume	10 µl		
MS source parameter			
Ionization mode	ESI +		
Gas temperature:	300 °C		
Gas flow	12 L/min		
Nebulizer	60 psi		
Capillary	4,000 V		

Acquired mass transitions			
Compound	Mass Transitions (m/z)		
	Precursor ion	Product ion 1	Product ion 2
azoxystrobin	404	372	344
benalaxy	326	294	148
cymoxanil	199	128	111
cyproconazole	292	125	70
difenoconazole	406	337	251
dimethomorph	388	301	165
epoxiconazole	330	141	121
fenamedone	312	236	92
flusilazole	316	247	165
imazalil	297	201	159
kresoxim-methy	314	267	206
metalaxy	280	220	192
oxycarboxin	268	175	147
penconazole	284	159	70
prochloraz	376	308	266
propamocarb	189	102	74
pyrazophos	374	222	194
Pyrimethanil	200	183	107
tebuconazole	308	151	70
tolclofos-methy	301	269	125
triadimefon	294	197	69
triadimenol	298, 296.1	70	70
tricyclazole	190	163	136
trifloxystrobin	409	206	186

8. ระยะเวลา : ตุลาคม 2556 - กันยายน 2558

9. สถานที่ดำเนินการ :

ห้องปฏิบัติการ : กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

สำรวจสารมาตรฐาน (pure reference standard) กลุ่ม fungicide ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเพื่อกำหนดวิธีการศึกษา พบว่ามีสารในกลุ่ม fungicide 40 ชนิดที่มีวันหมดอายุ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003-2017 และมีความบริสุทธิ์ของสารในช่วง 94.5-99.9 % ศึกษาสารมาตรฐาน 24 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, benalaxyl, cymoxanil, cyproconazole, difenoconazole, dimethomorph, epoxiconazole, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, metalaxyl, oxycarboxin, penconazole, prochloraz, propamocarb, pyrazophos, pyrimethanil, tebuconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, triadimenol, tricyclazole และ trifloxystrobin เนื่องจากสามารถนำมา mixed และตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ในการ run เพียงครั้งเดียว ซึ่งมี % Purity และวันหมดอายุดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 % Purity และวันหมดอายุ ของสารมาตรฐานกลุ่ม fungicide 24 ชนิด

No.	name	**Purity (%)**	**expired date**
1	azoxystrobin	99	01/2014
2	benalaxy	99.5	11/2003
3	cymoxanil	98.5	11/2011
4	cyproconazole	99	05/2010
5	difenoconazole	99	01/2011
6	dimethomorph	99	11/2012
7	epoxiconazole	99	10/2008
8	fenamedone	98.6	02/2014
9	flusilazole	99.5	03/2009
10	imazalil	99	11/2015
11	kresoxim-methy	99	01/2008
12	metalaxy	99.5	08/2010
13	oxycarboxin	99	03/2013
14	penconazole	98.5	03/2013
15	prochloraz	98.5	04/2011
16	propamocarb	99	07/2015
17	pyrazophos	97	02/2011
18	Pyrimethanil	96	09/2012
19	tebuconazole	98.8	04/2012
20	tolclofos-methy	99	04/2010
21	triadimefon	99.5	07/2012
22	triadimenol	98	12/2012
23	tricyclazole	98	02/2012

24	trifloxystrobin	99	09/2011

7.2.6 การศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ

7.2.3.4 **อุณหภูมิห้อง** เก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml ที่อุณหภูมิห้อง (25±5 ^{O}C) ที่ระยะเวลา 3, 7, 10, 15, 20, 30, 45 และ 60 วัน พบว่าสารมาตรฐานมีความคงทนที่ระยะเวลา 3 ถึง 60 วัน โดยมีความเข้มข้นไม่เกิน ± 10 % (SANCO, 2013) เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่เตรียมใหม่ โดยให้ความเข้มข้นของสารที่เตรียมใหม่ เป็น 100% ยกเว้น cymoxanil มีความคงทนถึง 7 วัน เนื่องจาก สารมาตรฐานมีความเข้มข้นลดลงเป็น 0.07 µg/ml (-30 %) ที่ 10 วัน และ 0.010 µg/ml (-90 %) ที่ 60 วัน และ oxycarboxin มีความคงทน ถึง 20 วัน เนื่องจากสารมาตรฐานมีความเข้มข้นลดลง 0.08 µg/ml (-20 %) ที่ 30 วัน และ 0.052 µg/ml (-52 %) ที่ 60 วัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.1 µg/ml ที่ระยะเวลา 3 ถึง 60 วัน จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25±5 ^{O}C)

No.	name	Concentration (µg/ml)							
		D3	D7	D10	D15	D20	D30	D45	D60
1	azoxystrobin	0.100	0.102	0.101	0.091	0.100	0.098	0.099	0.095
2	benalaxy	0.104	0.098	0.098	0.104	0.104	0.100	0.104	0.098
3	cymoxanil	0.101	0.097	0.066	0.070	0.067	0.048	0.047	0.010
4	cyproconazole	0.103	0.093	0.099	0.098	0.110	0.101	0.107	0.102
5	difenoconazole	0.109	0.096	0.097	0.101	0.104	0.104	0.106	0.095
6	dimethomorph	0.108	0.102	0.096	0.108	0.093	0.108	0.093	0.102
7	epoxiconazole	0.101	0.098	0.098	0.096	0.100	0.099	0.096	0.099
8	fenamedone	0.101	0.098	0.100	0.103	0.104	0.097	0.097	0.094
9	flusilazole	0.102	0.102	0.098	0.105	0.104	0.098	0.102	0.098
10	imazalil	0.099	0.104	0.101	0.099	0.104	0.100	0.095	0.105
11	kresoxim-methy	0.099	0.095	0.103	0.101	0.100	0.101	0.098	0.108
12	metalaxy	0.105	0.095	0.098	0.102	0.099	0.099	0.098	0.098
13	oxycarboxin	0.100	0.095	0.100	0.091	0.096	0.080	0.063	0.052
14	penconazole	0.103	0.099	0.100	0.095	0.097	0.098	0.107	0.104
15	prochloraz	0.102	0.097	0.096	0.101	0.101	0.102	0.106	0.097
16	propamocarb	0.097	0.091	0.103	0.098	0.101	0.103	0.101	0.099
17	pyrazophos	0.098	0.098	0.095	0.097	0.094	0.101	0.101	0.094
18	pyrimethanil	0.102	0.096	0.102	0.098	0.098	0.101	0.100	0.098

19	tebuconazole	0.096	0.101	0.096	0.098	0.098	0.101	0.096	0.101
20	tolclofos-methy	0.099	0.105	0.097	0.105	0.101	0.105	0.087	0.100
21	triadimefon	0.094	0.101	0.104	0.101	0.098	0.099	0.101	0.102
22	triadimenol	0.105	0.101	0.099	0.102	0.100	0.100	0.095	0.099
23	tricyclazole	0.094	0.097	0.104	0.098	0.101	0.103	0.103	0.096
24	trifloxystrobin	0.106	0.104	0.097	0.098	0.103	0.101	0.100	0.099

7.2.3.1 **ตู้เย็น** เก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml (ข้อ 7.2.1.4) ที่อุณหภูมิตู้เย็น (5±5 ^{O}C) ที่ระยะเวลา 3, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60 และ 90 วัน พบว่าสารมาตรฐานมีความคงทนที่ระยะเวลา 3 ถึง 90 วัน โดยมีความเข้มข้นไม่เกิน ± 10 % เมื่อเทียบกับสารที่เตรียมใหม่ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.1 µg/ml ที่ระยะเวลา 3 ถึง 90 วัน จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (5±5 ^{O}C)

No.	Name	Concentration (µg/ml)								
		D3	D7	D10	D15	D20	D30	D45	D60	D90
1	azoxystrobin	0.095	0.102	0.107	0.096	0.093	0.098	0.097	0.098	0.100
2	benalaxy	0.105	0.100	0.102	0.099	0.102	0.100	0.101	0.100	0.108
3	cymoxanil	0.100	0.101	0.090	0.105	0.097	0.093	0.099	0.093	0.099
4	cyproconazole	0.098	0.095	0.104	0.099	0.100	0.101	0.105	0.097	0.109
5	difenoconazole	0.109	0.099	0.100	0.093	0.097	0.106	0.099	0.109	0.107
6	dimethomorph	0.095	0.103	0.092	0.093	0.098	0.104	0.103	0.094	0.105
7	epoxiconazole	0.103	0.101	0.101	0.096	0.098	0.098	0.103	0.093	0.100
8	fenamedone	0.104	0.100	0.100	0.101	0.098	0.099	0.098	0.099	0.107
9	flusilazole	0.101	0.100	0.100	0.095	0.099	0.095	0.099	0.108	0.108
10	imazalil	0.104	0.103	0.102	0.094	0.099	0.098	0.100	0.099	0.104
11	kresoxim-methy	0.098	0.099	0.102	0.099	0.099	0.099	0.102	0.106	0.100
12	metalaxy	0.099	0.099	0.106	0.103	0.102	0.099	0.103	0.098	0.103
13	oxycarboxin	0.097	0.100	0.098	0.095	0.100	0.097	0.089	0.095	0.100
14	penconazole	0.099	0.101	0.101	0.102	0.095	0.100	0.104	0.099	0.105
15	prochloraz	0.101	0.098	0.100	0.101	0.095	0.100	0.098	0.095	0.103
16	propamocarb	0.094	0.103	0.109	0.101	0.101	0.105	0.106	0.101	0.109
17	pyrazophos	0.097	0.104	0.101	0.096	0.102	0.099	0.102	0.094	0.107
18	pyrimethanil	0.100	0.097	0.105	0.098	0.098	0.099	0.098	0.105	0.109
19	tebuconazole	0.094	0.099	0.098	0.095	0.098	0.099	0.103	0.099	0.104
20	tolclofos-methy	0.104	0.099	0.096	0.099	0.097	0.102	0.101	0.108	0.099
21	triadimefon	0.094	0.099	0.103	0.097	0.097	0.099	0.100	0.103	0.110

22	triadimenol	0.098	0.101	0.104	0.098	0.100	0.100	0.103	0.094	0.106
23	tricyclazole	0.092	0.099	0.107	0.095	0.096	0.104	0.104	0.099	0.110
24	trifloxystrobin	0.101	0.100	0.102	0.102	0.101	0.099	0.104	0.098	0.101

7.2.3.2 **ตู้แช่** เก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml (ข้อ 7.2.1.4) จากการเตรียม 3 ซ้ำ ใน freezer (น้อยกว่า -18 ^{O}C) ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 และ 12 เดือน และ สารมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 µg/ml (ข้อ 7.2.1.3) ที่ระยะเวลา 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 และ 12 เดือน พบว่าสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml มีความคงทนที่ระยะเวลา 1 ถึง 12 เดือนและ 1.0 µg/ml มีความคงทนที่ระยะเวลา 3 ถึง 12 เดือน โดยมีความเข้มข้นไม่เกิน ± 10 % เมื่อเทียบกับสารที่เตรียมใหม่ (ตารางที่ 5 และ 6)

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.1 µg/ml ที่ระยะเวลา 1 ถึง 12 เดือน จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ freezer (น้อยกว่า -18 ^{O}C)

No.	name	Concentration (µg/ml)									
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M10	M12
1	azoxystrobin	0.100	1.013	0.952	0.106	0.104	0.101	0.097	0.102	0.109	0.111
2	benalaxy	0.103	0.101	0.109	0.106	0.108	0.102	0.095	0.108	0.097	0.099
3	cymoxanil	0.103	0.095	0.100	0.104	0.101	0.097	0.101	0.104	0.107	0.100
4	cyproconazole	0.103	0.096	0.109	0.108	0.101	0.103	0.093	0.104	0.099	0.102
5	difenoconazole	0.105	0.101	0.110	0.103	0.107	0.106	0.095	0.103	0.097	0.104
6	dimethomorph	0.104	0.096	0.104	0.107	0.098	0.102	0.094	0.099	0.096	0.100
7	epoxiconazole	0.103	0.100	0.099	0.102	0.103	0.099	0.096	0.096	0.101	0.109
8	fenamedone	0.100	0.096	0.106	0.110	0.103	0.103	0.091	0.108	0.097	0.101
9	flusilazole	0.099	0.100	0.107	0.108	0.107	0.102	0.095	0.100	0.100	0.102
10	imazalil	0.103	0.107	0.105	0.109	0.109	0.100	0.109	0.102	0.099	0.104
11	kresoxim-methy	0.102	0.096	0.100	0.101	0.101	0.107	0.098	0.105	0.099	0.106
12	metalaxy	0.099	0.098	0.102	0.106	0.103	0.103	0.104	0.101	0.104	0.106
13	oxycarboxin	0.097	0.092	0.099	0.105	0.099	0.092	0.101	0.099	0.096	0.903
14	penconazole	0.102	0.095	0.103	0.105	0.105	0.102	0.094	0.105	0.099	0.105
15	prochloraz	0.101	0.108	0.106	0.110	0.102	0.095	0.100	0.102	0.102	0.099
16	Propamocarb	0.103	0.097	0.104	0.105	0.091	0.109	0.102	0.104	0.106	0.095
17	pyrazophos	0.097	0.103	0.106	0.106	0.104	0.108	0.092	0.109	0.108	0.110
18	pyrimethanil	0.100	0.104	0.109	0.107	0.102	0.098	0.100	0.100	0.099	0.102
19	tebuconazole	0.099	0.092	0.103	0.102	0.093	0.099	0.093	0.099	0.100	0.102

20	tolclofos-methy	0.099	0.929	0.103	0.097	0.098	0.104	0.095	0.100	0.108	0.104
21	triadimefon	0.101	0.093	0.106	0.107	0.101	0.100	0.099	0.104	0.102	0.101
22	triadimenol	0.099	0.101	0.107	0.105	0.107	0.102	0.097	0.107	0.102	0.111
23	tricyclazole	0.099	0.102	0.112	0.107	0.097	0.103	0.105	0.099	0.099	0.092
24	trifloxystrobin	0.101	0.096	0.103	0.106	0.104	0.100	0.101	0.108	0.098	0.106

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 1.0 µg/ml ที่ระยะเวลา 3 ถึง 12 เดือน จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ freezer (น้อยกว่า -18 ^{O}C)

No.	name	Concentration (µg/ml)							
		M3	M4	M5	M6	M7	M8	M10	M12
1	azoxystrobin	0.972	0.975	0.943	1.038	0.963	0.956	0.998	1.014
2	benalaxy	1.059	0.989	0.993	0.996	0.981	1.038	1.001	1.001
3	cymoxanil	1.038	0.981	0.938	0.998	1.016	1.114	1.070	0.923
4	cyproconazole	1.029	1.013	1.008	1.026	0.965	1.058	0.980	0.945
5	difenoconazole	1.028	0.944	1.020	1.040	1.035	0.943	0.977	1.027
6	dimethomorph	0.961	1.024	1.025	1.014	0.945	0.983	0.991	0.983
7	epoxiconazole	1.086	0.996	0.931	1.019	0.955	0.957	0.963	1.017
8	fenamedone	1.023	1.024	0.957	0.984	0.913	1.089	0.943	1.024
9	flusilazole	0.997	0.996	1.004	1.057	0.958	1.063	0.952	0.957
10	imazalil	1.024	0.953	0.956	0.997	1.047	0.985	0.953	0.934
11	kresoxim-methy	0.951	0.940	0.910	1.046	0.942	1.004	1.028	1.039
12	metalaxy	0.953	0.952	0.966	1.016	0.933	1.033	0.966	0.906
13	oxycarboxin	1.108	0.970	0.901	1.025	0.972	1.024	0.983	0.096
14	penconazole	1.010	1.060	1.008	1.011	0.913	1.052	1.016	0.933
15	prochloraz	1.034	0.990	0.979	0.984	0.923	1.002	1.001	0.902
16	Propamocarb	0.982	1.028	1.040	1.020	0.950	1.086	1.060	0.108
17	pyrazophos	1.024	0.921	1.012	1.030	0.920	0.975	0.991	0.996
18	Pyrimethanil	1.030	0.997	1.026	1.021	1.087	1.087	0.972	0.994
19	tebuconazole	0.929	0.989	0.969	0.101	0.919	1.024	0.983	1.095
20	tolclofos-methy	1.012	1.007	0.998	1.040	0.985	1.034	0.987	1.047
21	triadimefon	1.029	0.988	0.959	0.994	1.021	1.048	1.013	0.826
22	triadimenol	1.040	0.967	0.970	0.994	0.953	1.065	0.990	0.997
23	tricyclazole	1.051	0.992	0.984	0.999	1.088	1.003	0.995	0.972
24	trifloxystrobin	1.003	0.980	0.967	0.977	0.933	1.038	0.993	0.905

7.2.7 ศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานที่หมดอายุแล้ว

เตรียมสาร working standard solution 0.1 µg/ml จากสารมาตรฐาน (pure reference standard) ที่หมดอายุแล้ว และ จากสารมาตรฐาน ที่ยังไม่หมดอายุ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เนื่องจากสารมาตรฐานที่ตรวจวิเคราะห์ 24 ชนิด มีสาร 2 ชนิดที่มีวันหมดอายุแตกต่างกัน ได้แก่ azoxystrobin มีวันหมดอายุ ปี 2008, 2011 และ 2014 จึงนำสารที่หมดอายุปี 2008, 2011 มาหาความเข้มข้นเปรียบเทียบกับ สารที่หมดอายุปี 2014 พบว่ามีความเข้มข้นไม่เกิน ± 10 % และ tebuconazole มีวัน

หมดอายุ ปี 2011 และ 2012 พบว่ามีความเข้มข้นแตกต่างกันเกิน ± 10 % สรุปได้ว่าสารมาตรฐาน azoxystrobin สามารถใช้ได้หลังหมดอายุแล้ว 6 ปี ส่วน tebuconazole ไม่สามารถนำมาใช้งานได้หลังหมดอายุแล้ว 1 ปี (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.1 µg/ml ที่มีปีที่หมดอายุแตกต่างกัน

name	**expired year**	conc. ((µg/ml)
azoxystrobin	2014	0.010
	2011	0.106
	2008	0.112
tebuconazole	2012	0.010
	2011	0.086

11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการคงสภาพของ สารมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 24 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, benalaxyl, cymoxanil, cyproconazole, difenoconazole, dimethomorph, epoxiconazole, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, metalaxyl, oxycarboxin, penconazole, prochloraz, propamocarb, pyrazophos, pyrimethanil, tebuconazole, tolclofos-methyl, triadimefon, triadimenol, tricyclazole และ trifloxystrobin ศึกษาที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.1 µg/ml (working standard solution) ที่อุณหภูมิการเก็บรักษาต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง ตู้เย็น และตู้แช่ ที่ระยะเวลา 3-60 วัน, 3-90 วัน และ 1-12 เดือน ตามลำดับ และสารมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 µg/ml (intermediate standard solution) ศึกษาอุณหภูมิตู้แช่ ที่ระยะเวลา 3-12 เดือน ตรวจสอบการระเหยของตัวทำละลายโดยการชั่งน้ำหนัก นำสารลายมาตรฐานไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ที่เตรียมใหม่ ผลการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 µg/ml ที่อุณหภูมิห้อง สารมีความคงทนที่ระยะเวลา 3 ถึง 60 วัน โดยมีความเข้มข้นไม่เกิน ± 10 % เมื่อคิดความเข้มข้น 0.1 µg/ml เป็น 100% ยกเว้น cymoxanil มีความคงทนถึง 7 วัน และ สาร oxycarboxin มีความคงทน ถึง 20 วัน ส่วนการศึกษาที่อุณหภูมิตู้เย็น และตู้แช่สาร พบว่าสารมาตรฐานมีความคงทน ที่ 90 วัน และ 12 เดือน ตามลำดับตามระยะเวลาที่ศึกษา และสารมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 µg/ml มีความคงทนจนถึง 12 เดือน ส่วนการศึกษาสารมาตรฐาน (pure reference standard) ที่หมดอายุแล้ว และ เทียบกับสารมาตรฐาน ที่ยังไม่หมดอายุ พบว่า azoxystrobin สามารถใช้ได้หลังหมดอายุแล้ว 6 ปี ส่วน tebuconazole ไม่สามารถนำมาใช้งานได้หลังหมดอายุแล้ว 1 ปี

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐานในกลุ่ม fungicide ส่วนใหญ่มีความคงทนดี สามารถนำผลการศึกษาไปกำหนดอายุสารมาตรฐานในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ โดยสารมาตรฐานที่เก็บในอุณหภูมิตู้แช่นั้น working standard solution มีอายุการใช้งาน 3 เดือน และ intermediate standard solution มีอายุการใช้งาน 1 ปี และ stock standard solution มีอายุการใช้งานมากกว่า 1 ปี ซึ่งมีการศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 140 ชนิด ซึ่งมีสารมาตรฐานชนิดกลุ่ม fungicide ด้วย ศึกษาในตัวอย่าง strawberry, wheat flour และ leek โดยใช้วิธี QuEChERS และ เครื่องตรวจวิเคราะห์ GC-MS/MS มีการเตรียมสารมาตรฐาน standard stock solutions ความเข้มข้นประมาณ 1,000 µg/ml ในตัวทำละลายที่

เหมาะสมตามชนิดสารเช่น acetone, toluene หรือ acetonitrile ใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้แช่ -20 °C มีการกำหนดอายุของสารมาตรฐาน 6 เดือน และ intermediate standard stock solutions ความเข้มข้นประมาณ 5.00 µg/ml เก็บไว้ในตู้แช่ -20 °C และ Working standards เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °C กำหนดอายุของสารมาตรฐานมีอายุ 3 เดือน (Hollosi, L และคณะ, 2016) แสดงให้เห็นว่า การกำหนดอายุสารมาตรฐานขึ้นกับการประเมินของผู้ปฏิบัติงานโดยสามารถกำหนดอายุในสั้นกว่าที่ทำการศึกษาความคงทนได้เพื่อลดความเสี่ยงที่จะใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นลดลงจากการสลายตัวซึ่งจะมีผลกระทบต่อผลการทดสอบ อย่างไรก็ตามต้องมีข้อมูลประกอบในการตัดสินใจ เพื่อให้กำหนดอายุสารมาตรฐานได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

12.1 ผลการทดลองทำให้ทราบข้อมูลการคงสภาพของสารมาตรฐานไปใช้ใน การกำหนดอายุสารมาตรฐาน pure standard, intermediate standard solution และ working standard solution ในการปฏิบัติงานตรวจวิเคราะห์ และการรับรองมาตรฐานของปฏิบัติงาน

12.2 ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง สามารถเพิ่มความมั่นใจ ในการใช้สารมาตรฐานบริสุทธิ์ ที่หมดอายุแล้วว่ายังคงใช้งานได้ ลดการสั่งซื้อสารที่มีราคาสูง

13. เอกสารอ้างอิง

EURL. 2014. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides EURL for Residues of Pesticides Requiring Single Residue Methods Stability of Pesticide Stock Solutions Hubert Zipper 11.09.2014. www.eurl-pesticides.eu

Laszlo Hollosi, Katerina Bousova, Michal Godula. 2016. Validation of the Method for Determination of Pesticide Residues by Gas Chromatography –Triple-Stage Quadrupole Mass Spectrometry. Thermo Fisher Scientific, Food Safety Response Center, Dreieich, Germany. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TG63899_E_1113M_FINAL.pdf

SANCO/12571/2013 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.