

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำ ตามมาตรฐานสากล
 - กิจกรรมที่ 1. : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
 - กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง** : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในพืชสมุนไพรโดยใช้ Gas Chromatograph
4. **คณะผู้ดำเนินการ**

หัวหน้าโครงการ	:	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง	:	นางสาวศศิมา มั่งนิมิตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	:	นางสาวลักขมี เดชานุรักษ์นุกูล	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	:	นายวิทยา บัวศรี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในพืชสมุนไพรโดยใช้ Gas Chromatograph ทำการทดสอบการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในพืชสมุนไพร 2 ชนิดคือใบสะระแหน่และใบโหระพา ใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS ใช้ acetonitrile , magnesium sulfate และ sodium chloride เป็นสารสกัดและกำจัดขจัดสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ magnesium sulfate Primary secondary amine (PSA) และ Graphitized Carbon Black (GCB) ทำการทดสอบโดยเติม pesticide จำนวน 20 ชนิด เป็นกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส จำนวน 13 ชนิด กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 3ชนิด และ กลุ่มไพรีทรอยด์ จำนวน 7 ชนิด ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC การทดสอบพบว่าการตรวจสอบความใช้ได้ ใบสะระแหน่ มีวัตถุพิษจำนวน 13 ชนิดคือ dimethoate, diazinon, parathion-methyl, pirimiphos-methyl, malathion, chlorpyrifos, parathion-ethyl, pirimiphos-ethyl, methidathion, profenophos, ethion, triazophos และ EPN ที่มีช่วงเปอร์เซ็นต์การคืนกลับได้ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 70-120 มีความถูกต้องของการทำซ้ำ RSD น้อยกว่า 20 % มี Limit of quantitation (LOQ) อยู่ในช่วง 0.02-0.06 mg/kg. ส่วนการทดสอบในใบโหระพา พบว่า มีวัตถุพิษจำนวน 11 ชนิดคือ ชนิดคือ diazinon, parathion-methyl, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, parathion-ethyl, pirimiphos-ethyl, a-endosulfan, beta-endosulfan, L-cyhalothrin, cyfluthrin และ fenvalerate ในเกณฑ์ทดสอบ accuracy มีค่า mean recovery อยู่ในช่วง 70-120 % มีความถูกต้องของการทำซ้ำ % RSD น้อยกว่า 20 มี Limit of quantitation (LOQ) อยู่ในช่วง 0.02-0.1 mg/kg.

Abstract

An analytical method using Gas Chromatograph was validated for the determination of pesticides residue in herbs (sweet basil and herb). The pesticide were extract from herbs with QuEChERS method. The results showed that the recoveries at different concentration levels were within 70-120%. The Relative Standard Deviation (RSD) lower than 20% for most of the compound.

6. คำนำ

- พืชสมุนไพรและเครื่องเทศมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางมาแต่ครั้งโบราณ โดยวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กัน เช่น ด้านการแพทย์ ด้านอาหาร โดยช่วยปรุงแต่งอาหารให้มีรสชาติที่ดีขึ้น เนื่องจากมีวิตามิน แร่ธาตุและน้ำมันหอมระเหยที่มีประโยชน์ แม้สมุนไพรจะเป็นพืชที่มีประโยชน์ด้านสุขภาพกับมนุษย์ แต่ก็อาจมีการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่พืชขึ้นเจริญเติบโต หรือจากการปนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในพืชหลัก หรือปนสารในแปลงปลูกพืชสมุนไพรนั้นโดยตรง การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชสมุนไพรทำได้ยาก เนื่องจากพืชสมุนไพรมีความหลากหลายทั้งในด้านองค์ประกอบทางชีวเคมีและน้ำมันหอมระเหย ซึ่งอาจรบกวนผลการตรวจวิเคราะห์ วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวม (Multiresidues method) ในพืชอาหาร ส่วนใหญ่จะเป็นวิธีการสิ้นเปลืองเวลาและแรงงานในการตรวจวิเคราะห์ เพราะความซับซ้อนของโครงสร้างสารของวัตถุพิษและองค์ประกอบของสารที่มีในตัวอย่างทำให้การตรวจวิเคราะห์มีความยุ่งยาก จำเป็นต้องใช้สารเคมีหลายชนิด ทั้งในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างและการกำจัดสิ่งปนเปื้อน เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของผลของการคืนกลับได้ของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ค่าสูงสุด ในปีค.ศ.2003 ได้มีนักวิทยาศาสตร์เสนอวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวมแบบใหม่ชื่อ QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ซึ่งได้พัฒนาวิธีการนี้ขึ้นเพื่อใช้แทนวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวมแบบเดิม ซึ่งสิ้นเปลืองเวลาและใช้สารเคมีจำนวนมาก โดยใช้วิธีการสกัดด้วย acetonitrile แยกส่วนสารสกัด ด้วย magnesium sulfate และ sodium chloride กำจัดสิ่งปนเปื้อน (clean-up) ด้วย magnesium sulfate และ primary secondary amine (PSA) ตรวจวัดด้วยเครื่อง Gas chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) (Anastassiades et al.,2003) ซึ่งใช้ปริมาณตัวอย่างและสารสกัดที่น้อยกว่าวิธีสกัดแบบเดิม ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องแก้วหลายชนิด ใช้เพียงการเขย่าด้วยมือหรือเครื่องเขย่า และการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ซึ่งลดค่าใช้จ่ายและปริมาณของเสียที่เกิดจากการสกัดตัวอย่างได้เป็นจำนวนมาก

เครื่องแกสโครมาโตกราฟี เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างอย่างกว้างขวาง เพราะสามารถตรวจวัดวัตถุพิษทั้งที่ระเหยเป็นไอและทนความร้อน และมีหัวตรวจวัดชนิดของสารที่หลากหลาย เช่น Electron Capture Detector (ECD), Flame Photometric Detector (FPD) เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจสอบสารได้ครอบคลุมมากขึ้นเช่นเครื่อง Mass spectrometer มาแทนที่เครื่องแกสโครมาโตกราฟีที่มีหัวตรวจวัดเฉพาะดังกล่าว แต่ในแง่ของการปฏิบัติจริงเมื่อคำนึงถึงต้นทุนค่าใช้จ่ายและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่สามารถดำเนินการได้ การตรวจวิเคราะห์สารโดยรวมโดยการใช้เครื่องมือแบบหัวตรวจวัดหลากหลายดังกล่าว ยังคงเป็นมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง

ตามการแบ่งกลุ่มพืชสำหรับการทดลอง MRLของCodex สมุนไพรคือพืชที่ใช้ใบ ต้น หรือ ราก จากพืชในสายพันธ์ herbaceous ที่ใช้ในปริมาณเล็กน้อยเพื่อเพิ่มกลิ่นอาหารซึ่งบริโภคได้ทั้งสดและแห้ง (codex 2010) ตัวอย่างของพืชสมุนไพรเช่น โหระพา และสะระแหน่เป็นพืชที่มีปริมาณคลอโรฟิลสูงและมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ ทั้งในส่วนของสกัดตัวอย่าง การกำจัดสิ่งปนเปื้อนจะรบกวนการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) คือการยืนยันโดยการตรวจสอบ และ จัดทำหลักฐานที่เป็นวิทยาศาสตร์ที่พิสูจน์ได้ว่า วิธีที่วางแผนจะทดสอบนั้นเป็นไปตามข้อกำหนดที่วางไว้ ผลวิเคราะห์ต้องให้ข้อมูลที่แสดงว่าวิธีที่ใช้ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำ ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชนิดของพืชหรือสิ่งที่ทดสอบ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อหาวิธีทดสอบสมุนไพรที่มีปริมาณคลอโรฟิลสูง และมีน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีวิเคราะห์โดยรวมโดยเครื่องแกสโครมาโตกราฟ

7.วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

7.1 สารมาตรฐาน วัตถุเมพิซ กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 13 ชนิด ประกอบด้วย dimethoate, diazinon, parathion-methyl, pirimiphos-methyl, malathion, chlorpyrifos, parathion-ethyl, pirimiphos-ethyl, methidathion, profenophos, ethion, triazophos และ EPN กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 3 ชนิด คือ α -endosulfan, β -endosulfan และ endosulfan-sulfate และกลุ่มไพรีทรอยด์ จำนวน 7 ชนิด คือ bifenthrin, L-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate และ deltamethrin ความบริสุทธิ์ 93.5-98.9% ผลิตภัณฑ์ของ Dr.Ehrenstorfer

7.2 สารเคมี ได้แก่ acetonitrile, ethyl acetate, hexane, magnesium sulfate, sodium chloride, sodium sulfate, SPE sorbent ชนิด primary-secondary-amine (PSA)

7.3 เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ volumetric flask, volumetric pipette, beaker, cylinder, funnel, round bottom flask, centrifuge tubes ขนาด 1.5 และ 50 ml, vials for GC ขนาด 1.5 ml, auto-pipette ขนาด 0.1- 1 ml และ 1-10 ml

7.4 เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่งและ 2 ตำแหน่ง, Food processor, Vortex mixer, เครื่อง centrifuge

7.5 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ สารพิษตกค้างของวัตถุเมพิซ เครื่อง Gas Chromatography รุ่น 6890N Agilent Technologies) ที่มีหัวตรวจวัด 2 ชนิด คือ Flame Photometric Detector (FPD) ใช้ analytical column: DB-1701P ความยาว 30 m. 0.25 mm id. 0.25 μ m film thickness และชนิด Micro-cell Electron Capture Detector (μ ECD) และใช้ analytical column: HP-Ultra 1 ความยาว 25 m. 0.32 mm id. 0.17 μ m film thickness carrier gas: He 1.2 ml/min กำหนดสภาวะของเครื่องมือดังนี้ Inlet: Splitless at 250 $^{\circ}$ C Oven: Initial temp. 100 $^{\circ}$ C hold 1 min, ramp 15 $^{\circ}$ C /

min to 180 hold 3 min , ramp 25 ° C / min to 250 hold 35 min, ramp 30 ° C / min to 260 hold 2min

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารและวางแผนการทดลอง
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสให้มีความเข้มข้นระหว่าง 0.02-2.0 mg/kg ประกอบด้วย dimethoate, diazinon, parathion-methyl, pirimiphos-methyl, malathion, chlorpyrifos, parathion-ethyl, pirimiphos-ethyl, methidathion, profenophos, ethion, triazophos และ EPN กลุ่มออร์กาโนคลอรีน 3 ชนิด คือ α -endosulfan, β -endosulfan และ endosulfan-sulfate ที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.01 – 1.0 mg/kg สารกลุ่มไพริทรอยด์ ที่ระดับ 0.02 – 2.0 mg/kg
3. เลือกตัวอย่างพืชที่เป็นตัวแทนของพืชกลุ่มสมุนไพรที่มีปริมาณคลอโรฟิลสูงและมีน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ใบโหระพาและใบสะระแหน่ การสกัดโดยวิธี QuEChERS (Anastassiades, 2003)

ชั่งตัวอย่าง 10 g ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 ml สกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile จำนวน 10 ml แล้วเขย่าด้วย vortex mixer ที่ความเร็วรอบสูงสุด 1 นาที เติม NaCl 1.0 g และ MgSO₄ 4 g เขย่าด้วย vortex mixer นาน 1 นาทีนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm. นาน 5 นาที ใช้ autopipette ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง 1 ml ใส่ micro centrifuge tube 1.5 ml ที่ใส่ PSA 0.05 g MgSO₄ 0.15 g และ GCB 0.02 g เขย่าด้วย vortex 30 วินาที นำไป centrifuge อีกครั้ง จากนั้นใช้ auto pipette ดูดสารละลายส่วนบน ปริมาตร 0.5 ml จำนวน 2 หลอด นำไปลดปริมาตรด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้ง แล้วปรับปริมาตรเป็น 0.5 ml ด้วย ethyl acetate และ hexane ใส่ GC-vial นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย GC ที่มีหัวตรวจวัด ชนิด FPD และ μ ECD

4. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

4.1 การทดสอบและประเมินค่า Performance Characteristics ต่างๆ

ทดสอบค่าที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ได้แก่ Range, Linearity, Accuracy, Precision, Limit of Quantification (LOQ) และ Limit of Detection (LOD)

4.1.1 Range / Linearity

ทดสอบ sample blank และ fortified sample blank รวม 5 ระดับให้ครอบคลุมช่วงการวิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 1 μ g นำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่า response ไปเขียนกราฟและคำนวณค่า correlation coefficient (R^2) จากความสัมพันธ์เชิงเส้น ใช้เกณฑ์การยอมรับ ค่า $R^2 \geq 0.995$

4.1.2 Accuracy

การตรวจสอบ Accuracy ใช้เกณฑ์กำหนด คือ mean recovery อยู่ระหว่าง 70 – 120% ทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง ลงในตัวอย่างใบสะระแหน่และใบโหระพาความเข้มข้นระดับละ 6 μ g

4.1.3. Precision

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ที่ใช้การทวนซ้ำ(repeatability)แสดงผลในรูปแบบของ%RSD_r (Relative Standard Deviation) ทำการทดสอบ fortified sample ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงในตัวอย่างใบสะระแหน่และใบหระพาความเข้มข้นระดับละ 6 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ตัวอย่างแล้วนำมา คำนวณหาค่า % RSD_r ตามวิธี ISO-5725-2 ประเมินการยอมรับโดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้คำนวณจากสมการ Horwitz (Horwitz's equation) ซึ่งเกณฑ์กำหนด คือ % RSD_r ค่านี้ต้องน้อยกว่าค่า% RSD_{Horwitz} ซึ่งได้จากการคำนวณจากสมการ Horwitz

$$\text{สมการ Horwitz สำหรับ repeatability } \% \text{RSD}_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

นอกจากนี้ยังใช้เกณฑ์พิจารณาค่าความเที่ยงจากค่าที่ได้จากการคำนวณค่าHRRATหรือ Horwitz ratio น้อยกว่า 2 (AOAC, 2002) เป็นเกณฑ์ยอมรับด้วย

4.1.4 Limit of Quantitation (LOQ)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.008mg/kg สำหรับกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ระดับความเข้มข้น0.025 mg/kg สำหรับกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและระดับความเข้มข้น0.05 mg/kg สำหรับกลุ่มไพรีทรอยด์ ในตัวอย่างใบสะระแหน่และใบโหระพาจำนวน 6 ซ้ำ

4.1.5 Limit of Detection (LOD)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ การทดสอบ LOD สามารถทำได้หลายวิธีโดยเลือกใช้จากความเหมาะสมและเป็นไปได้ เนื่องจากการทดสอบทางเคมีการทำซ้ำหลายๆ จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างปริมาณมาก เสียค่าใช้จ่ายและเสียเวลาโดยไม่จำเป็น การแจกแจงของข้อมูลถือว่าเป็นแบบ t-distribution ดังนั้น LOD จึงเท่ากับ $t_{(one\ tail\ 0.01, n-1)} \times SD$ เพื่อให้ค่า t มีค่าเท่ากับ 3 โดยประมาณจึงต้องมีการทดสอบ 7-10 ซ้ำ (ทิพวรรณ, 2549) ค่า LOD ของแต่ละสารได้จากการคำนวณค่า standard deviation (SD) ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ทดสอบ ซึ่งต้องมีผลทดสอบผ่านเกณฑ์ที่กำหนดคือมีผลทดสอบค่าเฉลี่ยของ recovery อยู่ในช่วง 70-120 % [SANCO, doc 12498] ค่าaccuracyและ precisionและอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ %RSD น้อยกว่า 20% [repeatability, 96/46EC] และ HRRATไม่เกิน2 (AOAC, 2002) จึงคำนวณค่า LOD จากสูตร $LOD = 3 \times SD$

– เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

กลุ่มวิจัยวัฏภูมิพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8.ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษชนิดต่างๆในพืชสมุนไพรโดยวิธีQuEChERS ด้วยGas Chromatograph การทดสอบและประเมินค่า Performance Characteristics ต่างๆ ได้แก่ Range, Linearity, Accuracy, Precision, LOQ และ LOD มีผลการทดสอบดังนี้

1. Range และ linearity ผลการประเมิน ค่า Correlation coefficient (R^2) จากความสัมพันธ์เชิงเส้น ใช้เกณฑ์ ยอมรับ ค่า $R^2 \geq 0.995$ พบว่าการวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์มี ค่า $R^2 \geq 0.995$ และมี range อยู่ในช่วงต่างๆตามแต่ชนิดของสาร ดังนี้ โดยกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส มีค่าอยู่ในช่วง 0.02-2.0 mg/kg กลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีค่าอยู่ในช่วง 0.005-1.0 mg/kg กลุ่มไพรีทรอยด์ อยู่ในช่วง 0.02-5.0 mg/kg

2. Accuracy การตรวจสอบ accuracy ใช้เกณฑ์ยอมรับคือ ค่าเฉลี่ยของ recovery อยู่ระหว่าง 70 – 120% จากการวิเคราะห์ใบสะระแหน่ ที่เติมสารมาตรฐาน พบว่ามีความแม่นยำจาก%recovery ในช่วง 85-116 % ส่วนใบโหระพา มี%recovery ในช่วง 82-120 %

3. การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ ใช้การทวนซ้ำ(repeatability)แสดงผลในรูปของ%RSD_r(Relative Standard Deviation) ทำการทดสอบ fortified sample ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ลงในตัวอย่างสัมความเข้มข้นระดับละ 6 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ตัวอย่างแล้วนำมา คำนวณหาค่า % RSD_r ตามวิธี ISO-5725-2ประเมินการยอมรับโดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้คำนวณจากสมการHorwitz (Horwitz's equation)ซึ่งเกณฑ์กำหนด คือ % RSD_r ค่านี้ต้องน้อยกว่าค่า% RSD_{Horwitz} ซึ่งได้จากการคำนวณจากสมการ Horwitz

$$\text{สมการ Horwitz สำหรับ repeatability } \% RSD_r = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

4. Limit of Quantitation (LOQ) จากการทดสอบพบว่า fortified sample blank ด้วย ความเข้มข้นระดับ 0.01-0.05 mg/kg ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดที่ใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์นี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ทดสอบมีค่า%RSD_r $\leq \%RSD_{Horwitz}$ และ มีค่า HORRAT ≤ 2 โดยใบสะระแหน่มีค่า LOQ ของวัตถุมีพิษ ตามตารางที่ 1 และใบโหระพา มีค่า LOQ ตามตารางที่2

5. Limit of Determination (LOD) ผลของการทดสอบกลุ่มสารต่างๆที่ผ่านเกณฑ์ทดสอบ accuracy และ precision ตามเกณฑ์ที่กำหนดดังกล่าว พบว่าใบสะระแหน่มีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.002-0.02mg/kg (ตารางที่ 1) ใบโหระพามีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.002-0.02mg/kg (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างสระระแหนโดยวิธี QUECHERS

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery (n=6)	% RSD	Predicted %RSD	LOD	LOQ
dimethoate	0.025	107	7.7	18.4	0.02	0.02
	0.1	102	1.3	14.9		
	0.2	101	1.6	13.5		
diazinon	0.025	102	8.8	18.4	0.02	0.02
	0.1	98	4.7	14.9		
	0.2	102	0.9	13.5		
parathion-methyl	0.025	100	6.9	18.4	0.02	0.02
	0.1	94	3.6	14.9		
	0.2	99	7.0	13.5		
pirimiphos-methyl	0.025	99	6.8	18.4	0.02	0.02
	0.1	95	4.5	14.9		
	0.2	100	1.7	13.5		
malathion	0.025	109	12.3	18.4	0.02	0.03
	0.1	97	3.0	14.9		
	0.2	100	2.3	13.5		
chlorpyrifos	0.025	97	12.9	18.4	0.02	0.03
	0.1	85	6.0	14.9		
	0.2	89	3.0	13.5		
parathion-ethyl	0.025	111	20.1	18.4	0.02	0.06
	0.1	96	2.6	14.9		
	0.2	101	1.8	13.5		
pirimiphos-ethyl	0.025	103	15.1	18.4	0.02	0.04
	0.1	95	7.3	14.9		
	0.2	101	2.4	13.5		
methidathion	0.025	105	17.8	18.4	0.02	0.05
	0.1	95	4.8	14.9		
	0.2	98	2.6	13.5		
profenophos	0.025	104	11.9	18.4	0.02	0.03
	0.1	90	2.6	14.9		
	0.2	92	4.4	13.5		
ethion	0.025	108	6.7	18.4	0.02	0.02
	0.1	96	3.8	14.9		
	0.2	93	1.1	13.5		
triazophos	0.025	116	9.4	18.4	0.02	0.03
	0.1	100	3.6	14.9		
	0.2	103	2.7	13.5		

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery (n=6)	% RSD	Predicted %RSD	LOD	LOQ
EPN	0.025	100	11.6	18.4	0.02	0.03
	0.1	95	5.3	14.9		
	0.2	94	2.0	13.5		

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างโหระพาโดยวิธี QuEChERS

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery (n=6)	% RSD	Predicted %RSD	LOD	LOQ
diazinon	0.025	112	7.2	18.4	0.01	0.02
	0.1	101	2.1	14.9		
	0.5	117	1.8	13.5		
parathion-methyl	0.025	117	7.5	18.4	0.01	0.02
	0.1	104	2.1	14.9		
	0.5	120	1.5	13.5		
pirimiphos-methyl	0.025	109	14.1	18.4	0.01	0.04
	0.1	101	2.9	14.9		
	0.5	118	2.2	13.5		
chlorpyrifos	0.025	118	9.7	18.4	0.01	0.03
	0.1	103	2.9	14.9		
	0.5	111	2.6	13.5		
parathion-ethyl	0.025	118	16.7	18.4	0.01	0.05
	0.1	108	3.9	14.9		
	0.5	120	2.2	13.5		
pirimiphos-ethyl	0.025	111	10.1	18.4	0.01	0.03
	0.1	102	2.1	14.9		
	0.5	117	2.4	13.5		
alpha endosulfan	0.008	88	19.5	21.8	0.004	0.01
	0.04	90	9.6	17.1		
	0.08	84	5.7	15.3		
beta-endosulfan	0.008	98	18.6	21.8	0.004	0.01
	0.04	94	4.6	17.1		
	0.08	99	4.1	15.3		
L-cyhalothrin	0.03	82	9.5	17.8	0.01	0.03
	0.2	113	2.7	14.0		
	0.3	109	5.9	12.5		

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery (n=6)	% RSD	Predicted %RSD	LOD	LOQ
cyfluthrin	0.05	110	13.6	16.8	0.02	0.1
	0.2	112	5.7	13.2		
	0.5	105	4.9	11.8		
fenvalerate	0.05	110	12.4	16.7	0.02	0.1
	0.2	111	6.4	13.1		
	0.5	112	14.5	11.8		

9. สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวัตถุมีพิษจำนวน 20 ชนิดในพืชสมุนไพรจำนวน 2 ชนิดคือ ใบสะระแหน่และใบโหระพาโดยวิธี QuEChERS โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟชนิดหัวตรวจวัด μ ECD และ FPD ที่นำมาทดสอบ 20 ชนิดผ่านเกณฑ์ทดสอบได้จำนวน 13 ชนิดในใบสะระแหน่ และจำนวน 11 ชนิดในใบโหระพา ตามพารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนดคือ range/linearity มีค่า $R^2 \geq 0.995$ การทดสอบค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ mean recovery อยู่ในช่วง 70-120% ค่า HORRAT ไม่เกิน 2 ค่า % RSD ของ repeatability น้อยกว่า 20% โดยมีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.02-0.1 mg/kg

10. การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิเคราะห์สารพิษชนิดต่างๆ ในสมุนไพรโดยวิธี QuEChERS ด้วย Gas Chromatograph ตามค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่กำหนดสำหรับวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ เพื่อนำไปขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชผักสมุนไพรเพื่อการรับรองสำหรับการส่งออก และเผยแพร่ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร และผู้สนใจต่อไป

11. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 124 หน้า

Ambrus. A., 2000. Worked Example for Validation of a Multi-residue Method. in Principle and Practices of Method Validation. The Royal Society of Chemistry, London, U.K. 157-175

Anastassiades. M., Lehotay. S.J., Stajbaber. D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidues employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive solid-Phase Extraction” for determination of Pesticide Residues in Produce. J.AOAC. Int.86, 412-431

Anonymous. 1994. ISO 5725-2-1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and result- part 2. First edition.

AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/slv_guidelines.pdf 2002

Codex Alimentarius. 2003. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis CAC/GL 40- 1993, REV.1-2003 P.1 of 36

DG-SANGO 2013. Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis. Document No.SANCO/12498/2011

Fajgelli. A.and Ambrus. A. 2000. Principle and Practice of Method Validation. The Royal Society of Chemistry, London, UK