

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองสิ้นสุด

1. ชื่อชุดโครงการ : วิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้อง แม่นยำตามหลักสากล
กิจกรรมที่ 1. การพัฒนาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ในผัก
ชื่อการทดลอง : Development and method validation for the analysis of pymetrozine pesticide residues in vegetable

4. คณะผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กปผ.
หัวหน้าการทดลอง	นายวิทยา บัวศรี	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ	กปผ.
ผู้ร่วมงาน	นางสาวลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กปผ.
	นางสาวศศิมา มั่งนิมิตร	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ	กปผ.
	นางสาวมัลลิกา ทองเขียว	นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ	กปผ.

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างไพเมโทโรซีน (pymetrozine) ในผัก เป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS (Lehotay S.J., et al. 2005) และ Ethyl Acetate method (Tuija Pihlström, NFA, 2010) ทำการตรวจสอบความใช้ได้โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ ใช้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนกลุ่มผัก ตาม (ร่าง) มาตรฐานสินค้าเกษตร “การจัดกลุ่มสินค้าเกษตรด้านพืช” ดังนี้ ต้นหอม (spring onion) ผักกาดขาวปลี (chinese cabbages) แตงกวา (cucumber) มะเขือเทศ (tomato) ผักกาดหอม (lettuce) ถั่วฝักยาว (yard long bean) แครอท (carrots) หน่อไม้ฝรั่ง (asparagus) และเห็ดเข็ม (enoke mushroom) ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วยวิธี QuEChERS method พบว่ามีค่า Linearity อยู่ในช่วง 0.005 - 1.0 mg/kg working range อยู่ในช่วง 0.01 - 1.0 mg/kg โดยที่ค่า R² อยู่ในช่วง 0.9974 - 0.9996 ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ที่ความเข้มข้น 0.005 - 1.0 mg/kg อยู่ในช่วง 70 - 118% พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ (Standard deviation for reproduceibility; SD_R) อยู่ในช่วง 0.0004 - 0.0016 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard deviation for reproduceibility; RSD_R) เท่ากับ 4.0 - 17.6 ค่าจำนวนค่า HORRAT จากสมการ Horwitz มีค่าอยู่

ในช่วง 0.13 – 0.54 และประเมินค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ ส่วนวิธี Ethyl Acetate method ทำการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเฉพาะในผักกาดหอม พบว่า ค่า Linearity อยู่ในช่วง 0.005 - 1.0 mg/kg working range อยู่ในช่วง 0.01 - 1.0 mg/kg โดยที่ค่า R² เท่ากับ 0.9955 %recovery ที่ความเข้มข้น 0.005 – 0.1 mg/kg อยู่ในช่วง 71 - 118% ค่า SD_R เท่ากับ 0.0008 ค่า RSD_R เท่ากับ 9.91 คำนวณค่า HORRAT จากสมการ Horwitz มีค่าเท่ากับ 0.30 และประเมินค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สามารถนำไปขอขยายขอบข่ายการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัย วัตถุประสงค์พิเศษการเกษตร โดยเฉพาะวิธีมาตรฐาน QuEChERS method ซึ่งมีข้อมูลตัวแทนพืชในกลุ่มผักครกถั่ว และเพื่อให้เป็นไปตามความต้องการของผู้มารับบริการตรวจวิเคราะห์ ตามข้อกำหนด 5.4.2 ห้องปฏิบัติการต้องเพิ่มขอบข่ายกลุ่มผักสำหรับวิธีมาตรฐาน Ethyl Acetate method อีกทางหนึ่งด้วย

Abstract

A liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) residue method for the simultaneous target analysis of a wide range of pesticide in vegetables has been developed. Gradient elution has been used in conjunction with positive mode electrospray ionization tandem mass spectrometry to detect to pymetrozine pesticide residue in different crop matrices. Pesticide residue was extracted/partitioned from the samples with modified QuEChERS (Lehotay S.J., et al. 2005) and Ethyl Acetate Method (Tuija Pihlström, NFA, 2010). The analytical performance was demonstrated by the analysis of extracts from spring onion, chinese cabbages, cucumber, tomato, lettuce, yard long bean, carrots, asparagus and enoke mushroom, spiked at three concentration levels ranging from 0.01 to 0.1 mg/kg for each matrices. In general, recoveries ranging from 70 to 118%, with relative standard deviations below 20%, were obtained. The recovery and repeatability data are in good accordance with EU guidelines for pesticide residue analysis. The limit of quantification (LOQ) and limit of determination (LOD) for test was 0.01 and 0.005 mg/kg.

Key-words : pymetrozine, QuEChERS and Ethyl Acetate method

6. คำนำ

การวิเคราะห์สาร pymetrozine ด้วยวิธี QuEChERS multi-residue method (Lehotay S.J., et al. 2005) โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS (EURL-FV, 2012) ให้ความถูกต้องแม่นยำจึงเลือกวิธีการนี้มาพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ อีกทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างและการตรวจสอบความใช้ได้ ได้ดำเนินการตามเอกสาร Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed (Document No SANCO/12571/2013) โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนกลุ่มผัก ตาม (ร่าง) มาตรฐานสินค้าเกษตร “การจัดกลุ่มสินค้า

เกษตรด้านพืช” และเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อไปได้เพิ่มการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วยวิธี Ethyl Acetate method เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นมาโดย Dr. Tuija Pihlström ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐานของประเทศสวีเดน โดยเน้นที่การลดการใช้สารเคมีให้ใช้น้อยที่สุดและเลือกสารที่มีผลกระทบต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม (Tuija Pihlström, NFA, 2010) โดยเลือกตัวอย่างผักกาดหอม มาทำการตรวจสอบความใช้ได้

การแบ่งกลุ่มของสารป้องกันกำจัดแมลงไว้ตามกลไกการออกฤทธิ์หรือตำแหน่งของการออกฤทธิ์ (Mode of Action หรือ Site of Action) มี 28 กลไกการออกฤทธิ์ โดยที่สาร pymetrozine (C₁₀H₁₁N₅O) จัดอยู่ในกลุ่มที่ 9B ยับยั้งการกินของแมลงในอันดับ Homoptera (Antifeedant) กลไกการออกฤทธิ์จะไปทำให้กล้ามเนื้อส่วนปากของแมลงอ่อนแรง แล่งไม่สามารถกินอาหารได้ ทำให้อุดอาหาร และตายในที่สุด ซึ่งสาร pymetrozine มีการทดสอบประสิทธิภาพกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลพบว่าในช่วงการระบาดในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – กุมภาพันธ์ 2553 ซึ่งมีการระบาดรุนแรงระดับมากกว่า 100 ตัว/กอ พบว่าสาร pymetrozine เพียงชนิดเดียวที่สามารถใช้พ่นแบบเดี่ยวแล้วมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ส่วนสารชนิดอื่นจำเป็นต้องใช้ผสมกับสารที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกันแบบ tank mixs จึงจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (สุเทพ สหยา, 2556) โดยที่สาร pymetrozine ได้ขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ภายใต้ พ.ร.บ. วัตถุอันตราย ฉบับปรับปรุง พ.ศ. 2551 ใช้ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย กรมวิชาการเกษตร, 2559)

การระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นปัญหากับเกษตรกร ซึ่งการระบาดจะเกิดเป็นรอบประมาณ 10 ปี 1 ครั้ง นับตั้งแต่การระบาดครั้งที่ 1 เมื่อปี 2521 ครั้งที่ 2 ในปี 2532-2533 ครั้งที่สาม ในปี 2541-2542 และการระบาดครั้งล่าสุด ในปี 2552-2554 ครอบคลุมพื้นที่ทำการเกษตรมากขึ้นเรื่อยๆ ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้สารเคมีที่ผิดหรือ misuse จะเป็นการเร่งให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแพร่ระบาดมากขึ้น ซึ่งสารที่เกษตรกรใช้ส่วนใหญ่เกือบ 100% เป็นอะบาเม็คติน (abamectin) และไซเปอร์เมทริน (cypermethrin) (คู่มือเกษตรกร สร้อยทอง, 2554) หน่วยงานภาครัฐ และภาคเอกชน ร่วมกันรณรงค์ให้เกษตรกรตระหนักถึงผลกระทบ รวมถึงบริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์สารกำจัดศัตรูพืช ได้พัฒนาและมีการนำเข้าสู่สารใหม่มาเพื่อลดการพัฒนาตนเองของศัตรูพืชให้ด้านทานต่อสารเคมีที่ใช้

ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศหลักที่เพาะปลูกพืชผัก ผลไม้ เป็นแหล่งผลิตสินค้าเกษตรที่ใหญ่และสำคัญแห่งหนึ่งของโลก โดยเฉพาะผักไทยมีความหลากหลายและรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะในการปรุงอาหารไทยหากได้ใช้ผักที่มีผลผลิตจากประเทศไทยก็ยิ่งทำให้อาหารมีรสชาติดีได้รับความนิยมทั้งในประเทศและในต่างประเทศ ตลาดส่งออกผักไทยที่สำคัญ คือ สหภาพยุโรป ที่มีประเทศสมาชิกทั้งหมด 27 ประเทศ ญี่ปุ่น นับว่าเป็นการสร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยจำนวนมหาศาลในตลอดระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมาแต่ก็ต้องพบกับอุปสรรคที่สำคัญ คือ การตรวจพบสารพิษตกค้างที่เกิดจากยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช และเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับการแจ้งเตือนจากทางการสหภาพยุโรปด้วยระบบเตือนภัยเร่งด่วนอาหารมนุษย์และสัตว์ (Rapid Alert

System for Food and feed: RASFF) เป็นสาเหตุให้เมื่อต้นปี 2554 ประเทศไทยต้องระงับการส่งออก (หนึ่งฤทัย บุญธรรม, 2554)

ทั้งยังปรากฏว่าการส่งออกผักที่ผ่านกระบวนการตรวจสอบทั้งหน่วยงานและกฎระเบียบที่เกี่ยวข้องยังพบว่าผักของไทยไม่ได้มาตรฐานในหลายชนิด กล่าวคือ ปริมาณสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนอันเกิดจากการใช้สารปราบศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง เชื้อจุลินทรีย์ เกินปริมาณที่กำหนด อีกทั้งยังมีเพิ่มมาตรการโดยคณะกรรมการยุโรปได้ออกคำสั่ง ที่ 2007/7/EC ลงวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2550 ซึ่งลงพิมพ์ใน Official Journal เล่มที่ L 43 ประกาศแก้ไขคำสั่งคณะมนตรียุโรปที่ 86/362/EEC และ 90/642/EEC ว่าด้วยการกำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุดจากยาฆ่าแมลงในสินค้าอาหารที่ผลิตจากผักและผลไม้ สรุปได้ดังนี้ ได้ปรับปริมาณสารตกค้างสูงสุดจากยาฆ่าแมลง 9 รายการ คือ atrazine, lambda-cyhalothrin, phenmedipham, methomyl, linuron, penconazole, pymetrozine, bifenthrin และ abamectin ในสินค้าผักและผลไม้ตาม Annex II ของคำสั่ง ซึ่งครอบคลุมสินค้าส่งออกสำคัญของไทยไปยังสหภาพยุโรป คือ ลิ้นจี่ มะม่วง มะละกอ สับปะรด ข้าวโพดหวาน และหน่อไม้ฝรั่ง และกระทรวงสาธารณสุข แรงงาน และสวัสดิการญี่ปุ่น (MHLW) ได้พิจารณาปรับปรุงแก้ไขมาตรฐานสารเคมีตกค้างตามพระราชบัญญัติสุขอนามัยอาหารญี่ปุ่น ครั้งที่ 150 (The 150th Conference for Promotion of Food Import Facilitation) ในวันที่ 8 กรกฎาคม 2554 สรุปสาระสำคัญ ดังนี้ พิจารณาปรับปรุงมาตรฐานสารเคมีทางการเกษตรและยาที่ใช้กับสัตว์ ที่ใช้บังคับมาตั้งแต่การประกาศใช้ระบบ Positive List ในปี ค.ศ. 2006 รวมจำนวน 5 ชนิด ดังนี้ ethychozate, oxyflurfen, pymetrozine, clavulanic acid และ prifinium โดยเฉพาะ pymetrozine มีความเข้มงวดต่อกระเจียบเขียว กว๊าย และมะม่วง จะเห็นได้ว่าวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญในการพัฒนาขึ้นมาใช้ทดแทนสารเดิม หากพิจารณาถึงความสำคัญของมาตรฐานห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC17025:2005 ที่ได้รับการรับรองมาแล้วนั้น หากลูกค้าร้องขอให้วิเคราะห์สารพิษตกค้างดังกล่าว เพื่อการส่งออกสินค้าเกษตรให้ได้มาตรฐานความปลอดภัยของประเทศปลายทางห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีวิธีการที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้และมีสารมาตรฐานไว้รองรับให้เพียงพอต่อความต้องการลูกค้า ห้องปฏิบัติการจึงได้กำหนดให้ต้องดำเนินการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้อง แม่นยำ ตามหลักสากล และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ในผักนี้ขึ้น

7. วิธีดำเนินการ

7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

7.1.1 Teflon centrifuge tubes ขนาด 50 มิลลิลิตร

7.1.2 Micro centrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.1.3 Auto sampler vials for LC ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7.1.4 Auto pipette ขนาด 20-200, 100-1,000, 500-5,000 ไมโครลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร

7.1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง

7.1.6 เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor) และ Vortex mixer

7.1.7 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder

7.1.8 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษ LC-MS/MS

7.1.9 membrane filter ขนาด 0.20 μm

7.1.10 เครื่องเขย่า ultrasonic bath

7.2 สารเคมี

7.2.1. สารมาตรฐาน pymetrozine 99%

7.2.2 Acetonitrile, Ethyl acetate และ Methanol ชนิด pesticide grade (PR) และ formic acid, acetic acid ชนิด analytical grade

7.2.3 Methanol, Acetonitrile และ water ชนิด LC-MS grade

7.2.4 Anhydrous Magnesium sulfate (Mg_2SO_4) เผาที่ 500°C นาน 5 ชั่วโมง

7.2.5 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) ชนิด analytical grade

7.2.6 Ammonium formate (CH_5NO_2) ชนิด analytical grade

7.2.7 Anhydrous Sodium sulfate (Na_2SO_4) เผาที่ 600°C นาน 5 ชั่วโมง

7.2.8 Sodium acetate (CH_3COONa) ชนิด analytical grade

7.2.9 SPE sorbent ชนิด Primary-Secondary-Amine (PSA)

7.3 วิธีการ

7.3.1 วางแผนการดำเนินการ

7.3.1.1 ศึกษาข้อมูลและวิธีการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบทดสอบค่าที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ ได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantification (LOQ)

ตารางที่ 1 Overview of performance characteristics commonly evaluated during method validation

Performance characteristics
Selectivity
Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)
Working range
Analytical sensitivity
Trueness <ul style="list-style-type: none"> ● bias, recovery
Precision <ul style="list-style-type: none"> ● repeatability, intermediate precision and reproducibility
Ruggedness (robustness)

ที่มา Eurachem, 2014.

7.3.1.2 วางแผนการทดลอง คำนวณจากเอกสารรายงานผลการทดลองที่ผ่านมา และเอกสารวิธีทดสอบ ได้แก่ วิเคราะห์ QuEChERS และ Ethyl Acetate method ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.1.3 หาข้อมูลสารพิษ pymetrozine

7.3.1.4 เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดสอบ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder

7.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution

7.3.2.1 เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐาน pymetrozine โดยชั่งสารมาตรฐานให้ได้ น้ำหนักที่แน่นอนใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำค่า %purity มาคำนวณกลับเป็น น้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 1,024.65 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ใช้ methanol PR grade เป็นตัวทำละลาย

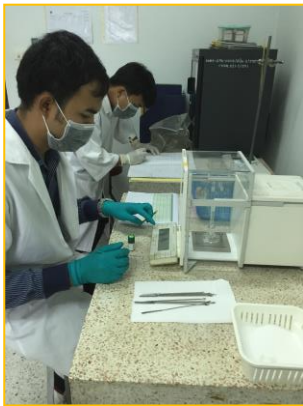
ตารางที่ 2 ข้อมูลของสารมาตรฐาน pymetrozine

NO	STD	Mol. Weight	Lot No.	Purity	Uncertainty	Expiry date	ผู้ผลิต
1	Pymetrozine	217.2	21017	99.0%	± 0.5%	10 oct 2016	Dr.Ehrenstorfer

ปริมาตร(ml)	ชนิด Solvent	%Purity	น้ำหนักที่ชั่งได้	Conc. (ppm)
10.00 ml	Methanol	99.00%	10.35 mg	1024.65

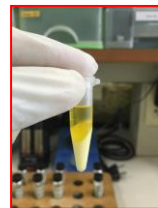
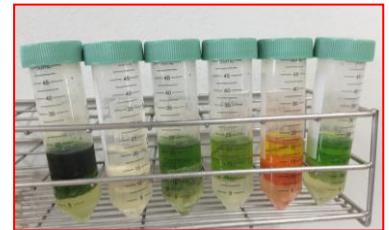
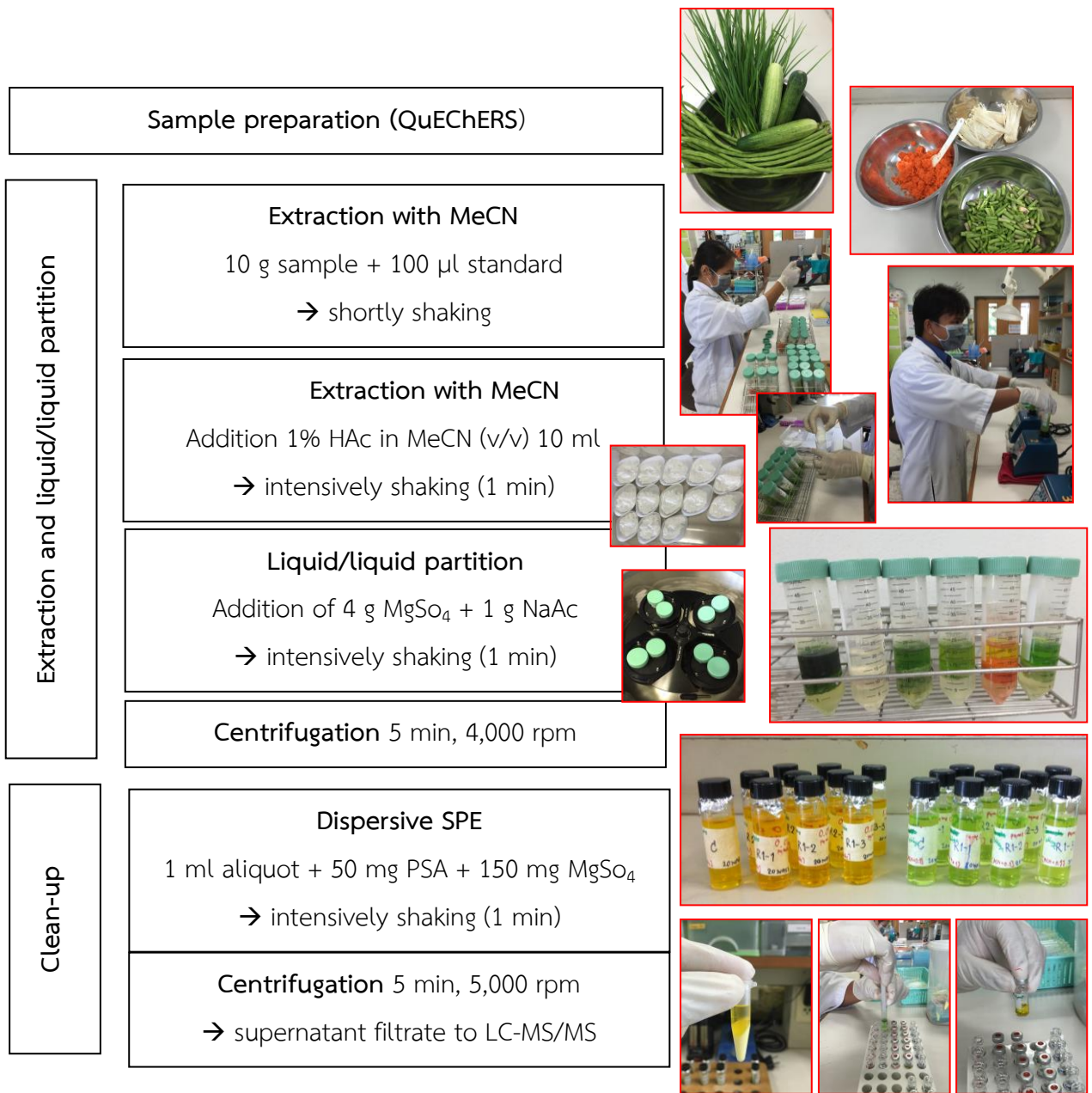
7.3.2.2 เตรียม standard pymetrozine in matrix solution โดยวิธี QuEChERS และวิธี Ethyl Acetate method

- 1) ใช้ standard pymetrozine stock standard solution 1,024.65 mg/kg
- 2) สกัดตัวอย่าง control sample ผักกาดหอม (lettuce) ด้วยวิธี QuEChERS และวิธี Ethyl Acetate method เพื่อให้ได้สารละลายสำหรับการเตรียม Intermediate และ working standard solution
- 3) เตรียม Intermediate standard solution in matrix จาก stock standard solution 1,024.65 mg/kg ให้ได้ Intermediate standard solution ที่มีความเข้มข้น 50 mg/kg ปริมาตร 10 ml
- 4) เตรียม working standard solution in matrix จาก Intermediate standard solution ให้มีความเข้มข้น 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01, 0.005 และ 0.002 mg/kg มีปริมาตรความเข้มข้นละ 5 ml
- 5) ทำการฉีด working standard solution in matrix มีค่า $R^2 = 0.99930379$ สำหรับวิธี QuEChERS และ $R^2 = 0.99957625$ สำหรับวิธี Ethyl Acetate method



7.3.3 การสกัดตัวอย่าง

ดำเนินการเตรียมและสกัดตัวอย่างตามวิธีการ QuEChERS method ดังนี้



แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนวิธี QuEChERS multi-residue method

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดตัวอย่างผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.20 µm บรรจุลงในขวด LC-vial นำไปด้วยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS



ดำเนินการเตรียมและสกัดตัวอย่างตามวิธีการ Ethyl Acetate method ดังนี้

แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนวิธี Ethyl Acetate method

Sample preparation (Ethyl Acetate method)

Extraction

10 g sample + 100 μ l standard
+ 20 ml ethyl acetate + 3 g NaHCO_3 and 10 g Na_2SO_4
→ ultrasonic bath 3 minutes

Centrifugation

In 5 min, 4,000 rpm

Aliquot 1.0 ml to micro centrifuge tubes 1.5 ml

Evaporated by Nitrogen

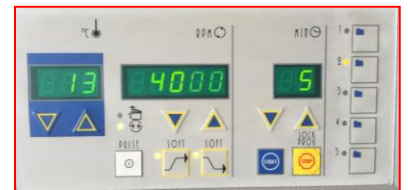
Reconstituted in 1.0 ml ACN

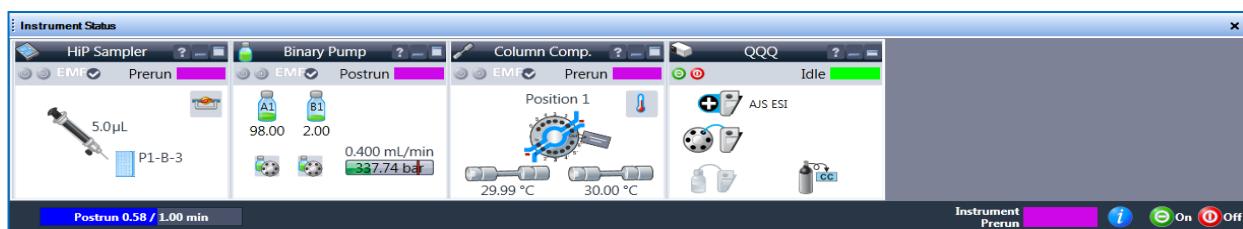
Filtration

Filtrate the crude extract
0.20 μ m PTFE filter

Inject to LC-MS/MS

Sample conc. 0.5 g/ml





นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดตัวอย่างผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.20 µm บรรจุลงในขวด LC-vial นำไปด้วยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS



7.3.3.1 LC-MS/MS determination for *pymetrozine*

- 1) Equipment: LC-MS/MS Agilent
- 2) Column: Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 x 75 mm, 1.8 µm
- 3) Mobile phase: A: 0.1% FA in water, B: 0.1% FA in MeOH

Time table: time (min)	A (%)	B (%)
0.00	98	2
1.00	98	2
4.00	50	50
6.00	10	90
7.00	10	90
7.20	98	2
8.00	98	2

- 4) Flow: 0.4 mL/min, Temp. 30°C, Injection volume: 5 µL
- 5) Post run: 1 min, Total cycle time: 9 min
- 6) MS conditions: Positive mode, Gas temp.: 300 °C, Gas flow: 10 L/min, Nebulizer: 40 psi, Capillary: 3,500 V

7.3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ก

The screenshot shows the 'Binary Pump' configuration window. The flow rate is set to 0.400 mL/min. Solvent A is 98.00% Aqueous (100.0% Water V.03) and 0.1% formic acid. Solvent B is 2.00% 100.0% Acetonitrile V.02 and 100.0% Acetonitrile V.03. The timetable shows a gradient from 98% A to 10% A over 8 minutes.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]	Max. Pressure Limit [bar]
0.00	98.00	2.00	0.400	1000.00
1.00	98.00	2.00	0.400	1000.00
4.00	50.00	50.00	0.400	1000.00
6.00	10.00	90.00	0.400	1000.00
7.00	10.00	90.00	0.400	1000.00
7.20	98.00	2.00	0.400	1000.00
8.00	98.00	2.00	0.400	1000.00

The screenshot shows the 'Source' parameters configuration window. Key parameters include Gas Temp (300 °C), Gas Flow (10 l/min), Nebulizer (40 psi), Sheath Gas Temp (300 °C), and Sheath Gas Flow (11 l/min). The Capillary voltage is set to 3500 V (Positive) and 3500 V (Negative), and the Chamber Current is 0.51 µA.

Parameter	Value	Unit
Gas Temp	300	°C
Gas Flow	10	l/min
Nebulizer	40	psi
Sheath Gas Temp	300	°C
Sheath Gas Flow	11	l/min
Capillary (Positive)	3500	V
Capillary (Negative)	3500	V
Chamber Current	0.51	µA

ใช้ได้ คือ การยืนยันโดยการตรวจสอบและจัดทำหลักฐานที่เป็นรูปธรรมเพื่อยืนยันว่าวิธีการนั้นเหมาะสมกับการใช้ตามวัตถุประสงค์ โดยทำการวิเคราะห์และทดสอบ Range, Linearity, Accuracy, Precision, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantification (LOQ) ที่กำหนดการตรวจสอบ parameter ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) (ISO/IEC17025:2005) ได้แก่

7.3.4.1 linearity/working range

linearity เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารมา plot เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 8 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ส่วน range เป็นค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่อยู่ใน linearity ซึ่งมี ค่า accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการทดสอบ linearity/working range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างอย่างน้อย 7 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ

7.3.4.2 accuracy/precision

การทดสอบ accuracy โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) ของวัตถุดิบที่เติมลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับคือ สูง กลาง และต่ำ ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยนำผลการวิเคราะห์ accuracy มาหา %RSD (relative standard deviation) และค่า HORRAT ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบ %RSD ที่ได้จากการทดลองกับ Predicted Horwitz RSD ของ repeatability ซึ่ง Predicted Horwitz RSD มีสูตรคำนวณ (Horwitz, W. and Albert R., 1995) ดังนี้

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

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของวัตถุดิบที่เติมในการตรวจวิเคราะห์ (เช่น 0.5 mg/kg, C = 0.5 × 10⁻⁶)

7.3.4.3 Limit of Detection (LOD) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องพิสูจน์ accuracy และ precision โดยค่า LOD = 3SD และ ค่าสัญญาณการวัดต้องมีค่า signal to noise ratio ≥ 3 ทำการประมาณค่า LOD จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ

7.3.4.4 Limit of Quantitation (LOQ) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยมีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยค่า LOQ = 10 SD (SD ; standard deviation ของความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำการทดสอบ) ทำการประมาณค่า LOQ จากการคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างที่ประมาณได้ รวม 10 ซ้ำ

7.4 ระยะเวลา ตุลาคม 2557 - กันยายน 2558

7.5 สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ในผัก เป็นการพัฒนา และปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS method และ Ethyl Acetate method เพื่อเลือกเป็นวิธีการ ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ สำหรับห้องปฏิบัติการ ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยตรวจสอบ parameter ต่างๆ ได้แก่ linearity, working range, LOD, LOQ, precision และ accuracy โดยมีเกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เกณฑ์มาตรฐานของ parameter ต่างๆ ของการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

parameter	What/how	criteria
Linearity, Working range	Measure blank plus calibration standards, 2-3 time at 6-10 concentrations evenly spaced across the linear range ¹	$R^2 \geq 0.995$
LOD	Replicate measurements of test sample with low concentrations of analyte ¹	Calculate the standard deviation, S_0 of the result ¹
LOQ	Minimum concentration or mass of analyte in given matrix that can be reported as a quantitative result ²	Calculate the mean average and standard deviation of the result ³
Precision (RSD_R)	Within-laboratory reproducibility, derived from on-going method validation ⁴	$\%RSD_R < \%RSD_{Horwitz}$ $HORRAT \leq 2$
Trueness (bias) accuracy	Average recovery for spike levels tested	70 – 120% ⁴

¹ (Eurachem, 2014), ² (AOAC, 2012), ³ (Codex, 2015), ⁴ (SANCO, 2013)

8.1 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วยวิธี QuEChERS method

ทำการฉีด working standard solution in matrix lettuces มีค่า $R^2 = 0.99930379$ และเปรียบเทียบผลของ matrix effect ใน calibration curves ด้วย working standard solution in methanol และ matrix ของ lettuces, cucumber และ asparagus ได้ข้อมูล response ดังตารางที่ 4

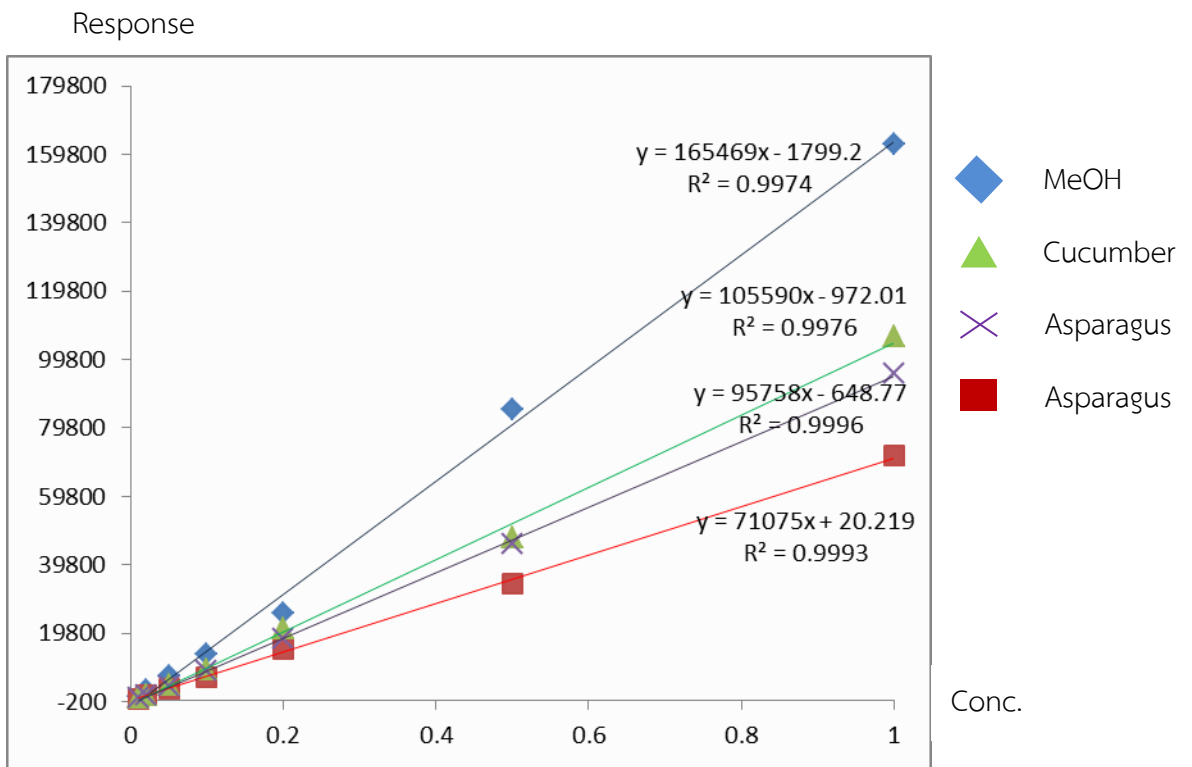
ตารางที่ 4 ข้อมูล response ของ working standard solution

conc. (mg/kg)	MeOH response	Lettuces response	Cucumber response	Asparagus response
0.01	1,277	697	894	853

0.02	3,063	1,527	1,790	1,691
0.05	7,131	3,405	4,599	4,286
0.1	13,695	7,041	8,992	8,722
0.2	25,452	15,276	21,152	18,151
0.5	85,072	34,270	47,852	45,973
1.0	162,797	71,547	106,426	95,807
(R ²) =	0.9974	0.9993	0.9976	0.9996

นำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 4 เขียนกราฟเส้น เพื่อเปรียบเทียบค่า slope และ y-intercept โดยใช้สมการเชิงเส้นสองตัวแปร (Linear Equation with two variables) ดังนี้ $y = mx + c$ เมื่อ m , c เป็นค่าคงตัว โดยที่ m เป็นความชันของกราฟ, c เป็นระยะตัดแกน y (y-intercept)

แผนภาพที่ 3 ผลการเปรียบเทียบค่า slope และ y-intercept ของ working standard solution in matrix



ตัวอย่างซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้าง pymetrozine ดำเนินการทำการวิเคราะห์และทดสอบสารพิษมาตรฐาน pymetrozine ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยทำการ optimize สาร เพื่อกำหนดค่า MRM Precursor/Product Ion Transitions and Instrument Condition ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 MRM Precursor/Product Ion Transitions and Instrument Condition

Analyte	Molecular formula	t _R ^a (min)	Ion transition (primary)	Dwell time	Frag (V)	CE (V)	Ion transition (secondary)	Dwell time	Frag (V)	CE (V)
pymetrozine	C ₁₀ H ₁₁ N ₅ O	2.336 ^b (MeOH) 0.663 ^b (Matrix)	218.1 > 105.0	100	100	20	218.1 > 78.0	100	100	50

หมายเหตุ

^a t_R = Retention time

^b First of 2 peak (Lehotay S.J., et al., 2005)

การประเมินผลการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ในผัก โดยเลือกตัวอย่างผักใบจำนวน 2 ชนิด คือ ผักกาดหอม กะหล่ำปลี และตัวอย่างผักที่เป็นผล จำนวน 1 ชนิด คือ มะเขือเทศ ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ทำการทดสอบ Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 ppm ได้ผลดังนี้

1. Recovery ผักกาดหอม ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 71.8 – 92.8%
2. Recovery ผักกาดหอม ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 84.6 – 90.0%
3. Recovery ผักกาดหอม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 84.0 – 94.5%
4. Recovery กะหล่ำปลี ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 91.2 – 95.1%
5. Recovery กะหล่ำปลี ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 80.1 – 86.9%
6. Recovery กะหล่ำปลี ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 84.7 – 92.3%
7. Recovery มะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 101.8 – 117.7%

Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
pyridine	pymetrozine	<input type="checkbox"/>	218.1	Unit	105.1	Unit	100	100	20	4	Positive
pyridine	pymetrozine	<input type="checkbox"/>	218.1	Unit	78.1	Unit	100	100	50	4	Positive

8. Recovery มะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 96.6 – 103.2%
9. Recovery มะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 107.2 – 109.4%

เลือกใช้ตัวแทนกลุ่มผัก ตาม (ร่าง) มาตรฐานสินค้าเกษตร “การจัดกลุ่มสินค้าเกษตรด้านพืช” ดังนี้

1. กลุ่มพืชหัวแบบหอม ใช้ ต้นหอม (spring onion)
2. กลุ่มผักตระกูลกะหล่ำ ยกเว้นผักใบของตระกูลกะหล่ำ ใช้ ผักกาดขาวปลี (chiness cabbages)
3. กลุ่มผักบริเวณผลตระกูลแตง ใช้ แตงกวา (cucumber)

4. กลุ่มผักบรีโกลผล นอกเหนือจากตระกูลแตง ใช้ มะเขือเทศ (tomato)
5. กลุ่มผักใบ ใช้ ผักกาดหอม (lettuce)
6. กลุ่มถั่วฝักสด ใช้ ถั่วฝักยาว (yard long bean)
7. กลุ่มผักรากและหัว ใช้ แครอท (carrots)
8. กลุ่มผักที่บรีโกลลำต้นและราก ใช้ หน่อไม้ฝรั่ง (asparagus)
9. กลุ่มราที่บรีโกลได้ ใช้ เห็ดเข็ม (enoke mushroom)

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วย LC-MS/MS

No.	Matrix Sample	linearity (mg/kg)	Range (mg/kg)	Spike Level (mg/kg)	Replicate (n)	%Recovery				%RSD _R ^b	HORRAT	LOD	LOQ
						min	max	mean	± SD _R ^a				
1	Lettuces	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	28	70	93	82.5	0.0007	8.88	0.27	0.005	0.01
2	Tomato	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	30	74	118	90.3	0.0013	14.3	0.44	0.005	0.01
3	Chiness Cabbage	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	15	73	98	90.4	0.0016	17.6	0.54	0.005	0.01
4	Enoke Mushroom	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	20	74	96	83.1	0.0006	7.66	0.23	0.005	0.01
5	Carrots	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	6	103	116	112.2	0.0005	4.49	0.14	0.005	0.01
6	Asparagus	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	20	87	118	102.1	0.0010	9.60	0.30	0.005	0.01
7	Cucumber	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	10	101	114	107.4	0.0004	4.00	0.13	0.005	0.01
8	Yard Long Bean	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	20	77	100	87.4	0.0008	8.61	0.26	0.005	0.01
9	Spring Onion	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	20	79	99	88.2	0.0006	6.81	0.21	0.005	0.01

หมายเหตุ ^a SD_R = Standard deviation for reproducibility

^b RSD_R = Relative Standard deviation for reproducibility

8.1 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วยวิธี Ethyl Acetate method

ตัวอย่างซึ่งนำมาใช้ในการทดสอบ ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างตามวิธีการที่กำหนด ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้าง pymetrozine ดำเนินการทำการวิเคราะห์และทดสอบสารพิษมาตรฐาน pymetrozine ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยทำการประเมินผลการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ในผัก โดยเลือกตัวอย่างผักใบจำนวน 2 ชนิด คือ ผักกาดหอม กะหล่ำปลี และตัวอย่างผักที่เป็นผล จำนวน 1 ชนิด คือ มะเขือเทศ ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ทำการทดสอบ Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 ppm ได้ผลดังนี้

1. Recovery ผักกาดหอม ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 89.1 – 95.2%
2. Recovery ผักกาดหอม ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 86.4 – 102.0%
3. Recovery ผักกาดหอม ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 71.1 – 89.1%
4. Recovery กะหล่ำปลี ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 88.1 – 96.7%
5. Recovery กะหล่ำปลี ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 85.6 – 98.2%

6. Recovery กะหล่ำปลี ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 79.7 – 87.1%
7. Recovery มะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 89.9 – 114.6%
8. Recovery มะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 102.0 – 107.8%
9. Recovery มะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm มีค่าอยู่ในช่วง 78.2 – 95.6%

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วย LC-MS/MS

No.	Matrix Sample	linearity (mg/kg)	Range (mg/kg)	Spike Level (mg/kg)	Replicate (n)	%Recovery				%RSD _R ^b	HORRAT	LOD	LOQ
						min	max	mean	± SD _R ^a				
1	Lettuces	0.005 - 1.0	0.01 - 1.0	0.010	21	71	99	82.5	0.0008	9.91	0.30	0.005	0.01

หมายเหตุ ^a SD_R = Standard deviation for reproducibility

^b RSD_R = Relative Standard deviation for reproducibility

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างไพเมโทโรซีน (pymetrozine) ในผักเป็นการพัฒนาและปรับวิธีการจากวิธีมาตรฐาน คือ QuEChERS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์แบบ multi-residue method โดยเน้นความรวดเร็วในการวิเคราะห์และมีความเที่ยงตรงสูง และ Ethyl Acetate method ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน โดยเน้นที่การลดการใช้สารเคมีให้ใช้น้อยที่สุดและเลือกสารที่มีผลกระทบต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม ทำการตรวจสอบความใช้ได้โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีการที่ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ยอมรับมาใช้เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับห้องปฏิบัติการ และเลือกใช้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนกลุ่มผัก ตาม (ร่าง) มาตรฐานสินค้าเกษตร “การจัดกลุ่มสินค้าเกษตรด้านพืช” ดังนี้ ต้นหอม (spring onion) ผักกาดชาวปลี (chiness cabbages) แตงกวา (cucumber) มะเขือเทศ (tomato) ผักกาดหอม (lettuce) ถั้วฝักยาว (yard long bean) แครอท (carrots) หน่อไม้ฝรั่ง (asparagus) และเห็ดเข็ม (enoke mushroom) ทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ด้วยวิธี QuEChERS method พบว่ามีค่า Linearity อยู่ในช่วง 0.005 - 1.0 mg/kg working range อยู่ในช่วง 0.01 - 1.0 mg/kg โดยที่ค่า R² อยู่ในช่วง 0.9974 – 0.9996 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ R² ≥ 0.995 ร้อยละของการกลับคืน (%recovery) ที่ความเข้มข้น 0.005 – 1.0 mg/kg อยู่ในช่วง 70 - 118% อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ 70 – 120% พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ (Standard deviation for reproducibility; SD_R) อยู่ในช่วง 0.0004 – 0.0016 ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard deviation for reproducibility; RSD_R) เท่ากับ 4.0 – 17.6 คำนวนค่า HORRAT จากสมการ Horwitz มีค่าอยู่ในช่วง 0.13 – 0.54 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ HORRAT ≤ 2 และประเมินค่า LOD และ LOQ ซึ่งต้องพิจารณาด้วยว่าค่า %RSD_R < %RSD_{Horwitz} จึงจะสามารถนำค่า SD มาคำนวณได้ พบว่าค่า %RSD_R < %RSD_{Horwitz} ตามทฤษฎี มีค่าและ LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ ส่วนวิธี Ethyl Acetate method ทำการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเฉพาะในผักกาดหอม พบว่าค่า Linearity อยู่ในช่วง 0.005 - 1.0 mg/kg working range อยู่ในช่วง 0.01 - 1.0 mg/kg โดยที่ค่า R² เท่ากับ 0.9955 %recovery ที่ความเข้มข้น 0.005 – 0.1 mg/kg อยู่ในช่วง 71 - 118% ค่า SD_R เท่ากับ 0.0008 ค่า

RSD_R เท่ากับ 9.91 ค่าความคลาด HORRAT จากสมการ Horwitz มีค่าเท่ากับ 0.30 และประเมินค่า LOD และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ

จากข้อมูลที่ได้จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไพเมโทซีน (pymetrozine) ในผัก ตามข้อกำหนด 5.4.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation of method) สามารถนำไปขอขยายขอบข่าย การรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร โดยเฉพาะวิธีมาตรฐาน QuEChERS method ซึ่งมีข้อมูลตัวแทนพืชในกลุ่มผักครบถ้วน และเพื่อให้เป็นไปตาม ความต้องการของผู้มารับบริการตรวจวิเคราะห์ ตามข้อกำหนด 5.4.2 การเลือกวิธี (Selection of method) ห้องปฏิบัติการต้องเพิ่มขอบข่ายกลุ่มผักสำหรับวิธีมาตรฐาน Ethyl Acetate method อีกทางหนึ่งด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 10.1 ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง pymetrozine ในผัก
- 10.2 สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
- 10.3 ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการกลุ่ม งานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
- 10.4 จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่เพื่อให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐและเอกชน นำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

- AOAC. *Guideline for Standard Method Performance Requirements Official Methods of Analysis*, 19th ed., Appendix F, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 2012.
- Codex Alimentarius. *Codex Alimentarius Commission Procedure Manual*, 23rd ed., 2015.
- Eurachem. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed., 2014.
- EURL-FV. *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1*, 2012.
- European Commission. *Guidance document on analytical quality and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Document No SANCO/12571/2013, Implemented 2014.
- Horwitz, W. and Albert R., *Precision in analytical measurements: Expected values and consequences in geochemical analysis*. Fresenius J Anal Chem, 1995. 351:507 513
- ISO/IEC17025:2005. *General Requirements for the Competence of Testing and calibration Laboratory*.

Lehotay S.J., et al., *Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables*. Journal of AOAC International Vol. 88, No. 2, 2005.

Tuija Pihlström, *New Advances in Ethyl Acetate Method*. National Food Administration (NFA), Sweden, 2010.

ผู้เกียรติ สร้อยทอง. สถานการณ์การใช้สารเคมีกำจัดแมลงและการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าวเขตภาคกลางและภาคเหนือตอนล่าง. การประชุมวิชาการเพื่อการเฟ้าระวังสารเคมีทางการเกษตรครั้งที่ 1. วันที่ 16-17 มิถุนายน 2554.

กระทรวงสาธารณสุข แรงงาน และสวัสดิการญี่ปุ่น (MHLW). *มาตรฐานสารเคมีตกค้างตามพระราชบัญญัติสุขอนามัยอาหารญี่ปุ่น ครั้งที่ 150 (The 150th Conference for Promotion of Food Import Facilitation)*, ในวันที่ 8 กรกฎาคม 2554

กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย กรมวิชาการเกษตร. *วัตถุอันตรายที่ได้รับการขึ้นทะเบียน*. Available <http://www.doa.go.th/ard/FileUpload/HazardousPass.pdf>, 2558.

คณะกรรมการยุโรป. *การกำหนดปริมาณสารตกค้างสูงสุดจากยาฆ่าแมลงในสินค้าอาหารที่ผลิตจากผักและผลไม้*, คำสั่ง ที่ 2007/7/EC ลงวันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2550 ลงพิมพ์ใน Official Journal เล่มที่ L 43

สุเทพ สหายา. *สารป้องกันกำจัดแมลงและไรศัตรูพืช (Insecticides and Acaricides)*. กรมวิชาการเกษตร, 2556.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, (ร่าง) *มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. xxxx-255x การจัดกลุ่มสินค้าเกษตรด้านพืช*. เอกสารเสนอในการสัมมนาระดมความคิดเห็นฯ วันที่ 22 มิถุนายน 2558.

หนึ่งฤทัย บุญธรรม. *มาตรการทางกฎหมายควบคุมมาตรฐานผักส่งออกของไทยให้ทัดเทียมความปลอดภัยอาหารสหภาพยุโรป*. มหาวิทยาลัยเกริก, 2554.

13. ภาคผนวก

-