

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2561

1.ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2.โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำ ตามมาตรฐานสากล

กิจกรรมที่1. การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง 1.1.6 : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างของ oxyfluorfen, pyridaben, difenoconazole, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, beta- cyfluthrin, fenpropathrin, ในกลุ่มพืชที่มี ปริมาณน้ำสูง (High water content) และกลุ่ม พืช ที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง (High acid content and high water content)

Development and method validation for determination of 8 pesticides in representative plant commodities with high acid content and high water content.

4.คณะผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลอง นางสาวศศิมา มั่งนิมิตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน นายวิทยา บัวศรี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวมัลลิกา ทองเขียว กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในพืช ในกลุ่มพืชที่มี ปริมาณน้ำสูง และกลุ่มพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง เลือกตัวแทนกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง (High water content) 2 ชนิดคือ มะเขือเทศและผักกาดหอม ตัวแทนพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง 2 ชนิด (High acid content and high water content) คือ องุ่น และ กีวี ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ oxyfluorfen, pyridaben, difenoconazole, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, beta-cyfluthrin, fenpropathrin โดยวิธี ethyl acetate extraction สกัดตัวอย่างด้วย ethyl acetate NaHCO₃ และ Na₂HO₄ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง แกสโครมาโตกราฟ-แมสสเปกโตรมิเตอร์- แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS/MS) พารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, Limit of Quatitation (LOQ) และ Limit of Detction (LOD) และ การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการ

Abstack

Determination of 8 pesticides in representative commodities with high water content and high acidity and water content.The pesticides were extracted using Ethyl Acetate method. The final extracts were analyzed with gas chromatographic-tandem quadrupole mass

spectrometric (GC-MS/MS) acquisition method. The linearity of the calibration curve in matrix matched standards yielded the coefficients of determination $R^2 \geq 0.99$ for almost all pesticides. The Average recoveries of the pesticide spiked at 0.01 mgkg^{-1} into tomato lettuce grape and kiwi were in the range 70-120% with associated RSD values $\leq 20 \%$. At the higher spiking levels of 0.02, 0.05 and 0.1 mgkg^{-1} average recoveries and RSDs readily met the validation criteria for nearly all the studied pesticides. Inter laboratory comparison between two laboratories were conducted in order to evaluate the precision of the reproducibility of the method.

6. คำนำ

- วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยรวม (Multiresidues method) ในพืชอาหาร ส่วนใหญ่จะเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลาและแรงงานในการตรวจวิเคราะห์เพราะความซับซ้อนของโครงสร้างสารของวัตถุที่มีพิษและองค์ประกอบของสารที่มีในตัวอย่าง กลุ่มพืชและพืชตัวแทนที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง สามารถจัดได้เป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ 1.กลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง ได้แก่ ผักชนิดต่างๆ ผลไม้ตระกูลแอปเปิ้ล ผลไม้ที่มีเมล็ดแข็ง 2. กลุ่มที่มีปริมาณกรดและน้ำสูง ได้แก่ พืชตระกูลส้ม พืชที่มีขนาดเล็ก พืชตระกูลเบอร์รี่ 3.กลุ่มน้ำตาลสูงและน้ำน้อย ได้แก่ ผลไม้แห้ง น้ำผึ้ง 4.กลุ่มปริมาณน้ำมันสูงและปริมาณน้ำน้อยได้แก่พืชน้ำมัน และพืชตระกูลถั่ว ร่วมกับกลุ่มย่อยปริมาณน้ำมันสูงและปริมาณน้ำปานกลาง ได้แก่ พืชที่มีน้ำมันสูง 5.กลุ่มปริมาณแป้งหรือโปรตีนสูง มีปริมาณน้ำน้อยและมีไขมันได้แก่ ถั่วแห้ง และธัญพืช 6.กลุ่มที่มีความยากและมีเอกลักษณ์เฉพาะในพืชนั้นๆ ได้แก่ ชา และพืชสมุนไพร (European Commission SANTE /11813/2017) จึงได้เลือกตัวแทนกลุ่มพืช 2 กลุ่ม ที่เป็นตัวแทนผักผลไม้จากการจำแนกดังกล่าวมาทดสอบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง คือกลุ่มพืชกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง (High water content) และกลุ่ม พืช ที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง (High acid content and high water content) และเลือกวิธี Swedish Ethyl Acetate method (SweET) ของหน่วยงาน National Food Administration (NFA) ประเทศสวีเดน ซึ่งได้พัฒนาวิธีการสกัดสารพิษตกค้างในตัวอย่างผักและผลไม้โดยใช้ ethyl acetate และซึ่งง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยสกัดตัวอย่างด้วย ethyl acetate NaHCO_3 และ Na_2HPO_4 ร่วมกับการใช้ เครื่อง ultrasonic bath และ เครื่องcentrifuge กรองตัวอย่างที่สกัดได้ด้วย ตัวกรองชนิด PTFE ขนาด $0.2 \mu\text{m}$ นำไปตรวจวัดได้ทั้งเครื่อง GC-MS/MS และ LC-MS/MS และวิธีนี้ยังได้รับเลือกให้เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งของของ EURL (European Union Reference Laboratory) EURL-FV(2010-M4) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) คือการยืนยันโดยการตรวจสอบ และ จัดทำหลักฐานที่เป็นวิทยาศาสตร์ที่พิสูจน์ได้ว่า วิธีที่วางแผนจะทดสอบนั้นเป็นไปตามข้อกำหนดที่วางไว้ ผลวิเคราะห์ต้องให้ข้อมูลที่แสดงว่าวิธีที่ใช้ทดสอบนั้นมีความเหมาะสม ถูกต้อง แม่นยำ ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับชนิดของพืชหรือสิ่ง

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

7.1 สารมาตรฐาน วัตถุที่มีพิษ 8 ชนิด ประกอบด้วย oxyfluorfen, pyridaben, difenoconazole, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, beta-cyfluthrin และ fenpropathrin ความบริสุทธิ์ 93.5-98.9% ผลิตภัณฑ์ของ Dr.Ehrenstorfer

7.2 สารเคมีได้แก่ ethyl acetate, NaHCO₃, Na₂SO₄,

7.3 เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์ 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 เครื่อง เครื่อง ultrasonic bath

7.5 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุที่มีพิษ เครื่อง GC-MS/MS รุ่น 7890A เครื่อง Mass Spectrometry รุ่น 7000 (Agilent Technologies) ชนิด Triple Quadrupole และคอลัมน์ชนิด HP-5MS ความยาว 15 m 0.25 mm id. 0.25 μm film thickness carrier gas: He 1.2 ml/min MSD Transfer line 280 °C อุณหภูมิ Inlet 280 °C ฉีดสารปริมาตร 2 μl อุณหภูมิของ Oven ที่ใช้เป็นดังนี้ 60° C (1min) 80 ° C / min 170 ° C (0min) 10 ° C/min 310 ° C (3 min) และกำหนดสภาวะในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของวัตถุอันตรายที่ทดสอบโดยใช้ Multiple Reaction Monitoring (MRM) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

No.	Pesticide	RT(min)	Quant	CE				
				(v)	Qual			
1	beta-cyfluthrin	16.54	226.9 →	76.9	25	198.9 →	170	25
						162.9 →	127.0	5
						162.9 →	90.9	15
2	chlorfenapyr	12.03	327.8 →	246.8	15	246.9 →	227.0	15
						136.9 →	102.0	15
						136.9 →	75.0	30
3	chlorpyrifos	9.95	313.8 →	285.8	5	313.8 →	258	15
						198.9 →	171.0	15
						196.9 →	169.0	15
4	difenoconazole	18.05	324.8 →	266.8	15	322.8 →	265	15
						264.9 →	202.0	20
						264.9 →	139.0	45
5	fenpropathrin	14.25	264.9 →	210	10	207.9 →	181.0	5
						181.1 →	152.1	25

ซั่งตัวอย่าง มะเขือเทศ ผักกาดหอม องุ่น และ กิวี น้ำหนัก 10 g ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 ml เติมสารมาตรฐานตามความเข้มข้นที่กำหนด สกัดตัวอย่างด้วย ethyl acetate จำนวน 20 ml เติม NaHCO₃ 3 g และ Na₂HO₄ 10 g แล้วเขย่าด้วย เครื่อง ultrasonic bath นาน 3 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm. นาน 3 นาที กรองส่วนที่สกัดได้ด้วย ตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.2 µm แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย เครื่อง GC-MS/MS

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษใน ตัวแทนกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง 2 ชนิดคือ มะเขือเทศ และ ผักกาดหอม ตัวแทนพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง 2 ชนิด คือ องุ่น และ กิวี

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 7 ความเข้มข้นคือ 0.002, 0.005, 0.010, 0.02, 0.05 และ 0.1 และ 0.2 mg/kg ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่า response ไปเขียนกราฟและคำนวณค่า correlation coefficient (R²) จากความสัมพันธ์เชิงเส้น ใช้เกณฑ์การยอมรับ ค่า R² ≥ 0.99

4.1.2 Accuracy

การตรวจสอบ Accuracy ใช้เกณฑ์กำหนด คือ mean recovery อยู่ระหว่าง 70 – 120% ทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.005, 0.01, 0.02 0.05 และ 0.1 mg/kg ลงในตัวอย่างมะเขือเทศ ผักกาดหอม องุ่น และ กิวี ความเข้มข้นระดับละ 5 ซ้ำ

4.1.3. Precision

การทดสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ใช้การทวนซ้ำ (repeatability) แสดงผลในรูปของ %RSD_r (Relative Standard Deviation) ทำการทดสอบ fortified sample ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.005, 0.01, 0.02 0.05 และ 0.1 mg/kg ลงในตัวอย่างมะเขือเทศ ผักกาดหอม องุ่น และ กิวี ความเข้มข้นระดับละ 5 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์ตัวอย่างแล้วนำมา คำนวณหาค่า % RSD_r ตามวิธี ISO-5725-2 ประเมินการยอมรับ โดยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้คำนวณจากสมการ Horwitz (Horwitz's equation) ซึ่งเกณฑ์กำหนด คือ % RSD_r ค่านี้ต้องน้อยกว่าค่า % RSD_{Horwitz} ซึ่งได้จากการคำนวณจากสมการ Horwitz

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

4.1.4 Limit of Quantitation (LOQ)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สนใจในตัวอย่างที่วิธีทดสอบสามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นระดับนี้ สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg ในตัวอย่าง มะเขือเทศ ผักกาดหอม องุ่น และ กิวี จำนวน 5 ซ้ำ

5. การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่าง มะเขือเทศเพื่อใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการทดสอบ โดย ปั่นตัวอย่างมะเขือเทศกับน้ำแข็งแห้ง แบ่งตัวอย่างเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งใช้เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ ส่วนที่สองเติมสาร oxyfluorfen ,pyridaben, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr , beta-cyfluthrin difenoconazole และ fenprothrin เพื่อใช้เป็นตัวอย่างทดสอบให้มีความเข้มข้นที่ระดับ 0.05 mg/kg ผสมให้เข้ากัน แบ่งตัวอย่างใส่ขวด เก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -18°C ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง โดยสุมตัวอย่างมะเขือเทศจากที่ทำการ fortified sample จำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบแบบ duplicate ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยด้วยวิธี ethyl acetate ด้วยเครื่อง GC-MS/MS และประเมินผลเพื่อตรวจสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง วิเคราะห์ผลด้วยการเปรียบเทียบค่าความแปรปรวนภายในตัวอย่าง (within sample variation) โดย Cochran's maximum variance test ($p < 0.05$) และ เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ของของแต่ละตัวอย่าง (between sample variation) การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการ ใช้การประเมินด้วยสถิติ t-Test

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ chlorpyrifos, oxyfluorfen L-cyhalothrin, chlorfenapyr fen prothrin และ pyridaben ในตัวแทนพืชที่มีน้ำสูง คือมะเขือเทศและผักกาดหอม ตัวแทนพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูงคือ องุ่น และ กีวี โดยวิธี ethyl acetate extraction ด้วย Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS/MS) การทดสอบ และ ประเมิน ค่า 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 $R^2 \geq 0.99$ พบว่ากลุ่มสารที่ทดสอบ มี range อยู่ในช่วง 0.002-0.2 mg/kg และ $R^2 \geq 0.99$ เกือบทุกชนิด

2. Accuracy การตรวจสอบ accuracy ใช้เกณฑ์ยอมรับคือ ค่าเฉลี่ยของ recovery อยู่ระหว่าง 70 – 120% จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน พบว่ามีความแม่นยำจาก %recovery ในช่วง 70-120 %

3. Precision การตรวจสอบ precision ใช้เกณฑ์ยอมรับจากค่า Repeatability RSD_r (% RSD_r) น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 20 % พบว่าวัตถุมีพิษที่ทดสอบที่มีผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับดังกล่าว ตามตารางที่ 2 และ 3

4. Limit of Quantitation (LOQ) จากการทดสอบพบว่า fortified sample ความเข้มข้นระดับ 0.005 mg/kg ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดที่ใช้ทดสอบนี้สามารถรายงานเป็นปริมาณที่มีความแม่นยำและความเที่ยงในระดับที่ยอมรับได้ทดสอบมีค่า % $RSD_r \leq \%RSD_{Horwitz}$ โดยสาร chlorpyrifos, oxyfluorfen L-cyhalothrin, chlorfenapyr fenprothrin และ pyridaben ผ่านเกณฑ์การยอมรับทั้งในตัวอย่างมะเขือเทศและผักกาดหอม ส่วนในตัวอย่างองุ่น และ กีวี พบว่าการทดสอบในตัวอย่างองุ่น ได้ค่า LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg ในวัตถุมีพิษ 5 ชนิด คือ chlorpyrifos, oxyfluorfen L-cyhalothrin, chlorfenapyr fenprothrin และ pyridaben ส่วน

beta-cyfluthrin และ มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg และ difenoconazole มีค่า LOQ เท่ากับ 0.02 mg/kg ในตัวอย่าง กิวี ได้ ค่า LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg ในวัตถุมีพิษ 3 ชนิด คือ chlorpyrifos, oxyfluorfen และ difenoconazole ส่วนวัตถุมีพิษ chlorfenapyr fenpropathrin L-cyhalothrin pyridaben และ beta-cyfluthrin มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg

ตารางที่ 2 ผลของ accuracy precision และ LOQ ของวัตถุมีพิษ 6ชนิดที่ทดสอบในมะเขือเทศ

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery(n=5) mean	% RSDr	Horwitz%	LOQ
chlorpyrifos	0.005	90	4	36	0.005
	0.01	93	2	32	
	0.02	73	2	29	
	0.05	85	2	25	
	0.1	93	1	23	
oxyfluorfen	0.005	90	14	36	0.005
	0.01	90	5	32	
	0.02	70	2	29	
	0.05	83	4	25	
	0.1	95	3	23	
chlorfenapyr	0.005	104	8	36	0.005
	0.01	102	3	32	
	0.02	76	1	29	
	0.05	86	3	25	
	0.1	96	2	23	
fenpropathin	0.005	112	2	36	0.005
	0.01	101	3	32	
	0.02	75	1	29	
	0.05	92	9	25	
	0.1	94	1	23	
Lambda-cyhalothrin	0.005	102	11	36	0.005
	0.01	97	3	32	
	0.02	75	3	29	
	0.05	94	3	25	
		%			
Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery(n=5) mean	% RSDr	Horwitz%	LOQ
pyridaben	0.005	101	5	36	0.005
	0.01	98	7	32	
	0.02	76	7	29	
	0.05	86	3	25	

ตารางที่ 3 ผลของ accuracy, precision และ LOQ ของวัตถุที่มีพิษ 6 ชนิดที่ทดสอบในผักกาดหอม

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery(n=5) mean	% RSDr	Horwitz%	LOQ
chlorpyrifos	0.005	93	5	36	0.005
	0.01	87	5	32	
	0.02	84	3	29	
	0.05	85	1	25	
	0.1	84	6	23	
oxyfluorfen	0.005	98	5	36	0.005
	0.01	86	6	32	
	0.02	71	6	29	
	0.05	70	3	25	
	0.1	74	7	23	
chlorfenapyr	0.005	98	5	36	0.005
	0.01	92	2	32	
	0.02	84	2	29	
	0.05	88	4	25	
	0.1	85	5	23	
fenpropathin	0.005	105	7	36	0.005
	0.01	100	6	32	
	0.02	87	3	29	
	0.05	85	1	25	
	0.1	87	4	23	
Lambda-cyhalothrin	0.005	105	6	36	0.005
	0.01	92	4	32	
	0.02	82	4	29	
	0.05	80	5	25	
	0.1	83	4	23	
pyridaben	0.005	100	2	36	0.005
	0.01	91	6	32	
	0.02	82	5	29	
	0.05	84	1	25	
	0.1	84	6	23	

ตารางที่ 4 ผลของ accuracy, precision และ LOQ ของวัตถุที่มีพิษ 8 ชนิดที่ทดสอบในองุ่น

Pesticides	Spike level (mg/kg)	% Recovery(n=5) mean	% RSDr	Horwitz%	LOQ
Chlorpyrifos	0.005	97	17	36	0.005

	0.01	83	13	32	
	0.02	87	5	29	
	0.05	88	11	25	
	0.1	99	3	23	
Oxyfluorfen	0.005	104	3	36	0.005
	0.01	99	2	32	
	0.02	95	9	29	
	0.05	97	9	25	
	0.1	106	5	23	
Chlorfennapyr	0.005	113	5	36	0.005
	0.01	95	3	32	
	0.02	92	4	29	
	0.05	94	8	25	
	0.1	105	4	23	
Fenpropathrin	0.005	104	4	36	0.005
	0.01	91	2	32	
	0.02	87	4	29	
	0.05	91	8	25	
	0.1	101	4	23	
L-Cyhalothrin	0.005	108	3	36	0.005
	0.01	97	2	32	
	0.02	91	6	29	
	0.05	95	9	25	
	0.1	106	5	23	
Pyridaben	0.005	109	2	36	0.005
	0.01	100	2	32	
	0.02	90	9	29	
	0.05	96	7	25	
	0.1	107	7	23	
Beta-cyfluthrin	0.005	147	8	36	0.01
	0.01	116	6	32	
	0.02	93	11	29	
		%			
Pesticides	Spike level	Recovery(n=5)	% RSDr	Horwitz%	LOQ
	(mg/kg)	mean			
	0.05	87	8	25	
	0.1	97	6	23	

Difenoconazole	0.005	112	10	36	0.02
	0.01	122	6	32	
	0.02	81	19	29	
	0.05	80	14	25	
	0.1	104	12	23	

ตารางที่ 5 ผลของ accuracy, precision และ LOQ ของวัตถุที่มีพิษ 8 ชนิดที่ทดสอบในกีวี

Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery	% RSDr	Horwitz%	LOQ
Chlorpyrifos	0.005	107	5	36	0.005
	0.01	100	5	32	
	0.02	102	1	29	
	0.05	93	4	25	
	0.1	99	2	23	
Oxyfluorfen	0.005	109	6	36	0.005
	0.01	99	4	32	
	0.02	103	4	29	
	0.05	95	2	25	
	0.1	110	4	23	
Chlorfennapyr	0.005	118	5	36	0.01
	0.01	102	2	32	
	0.02	106	4	29	
	0.05	98	5	25	
	0.1	104	2	23	
Fenpropathrin	0.005	122	3	36	0.01
	0.01	104	2	32	
	0.02	101	3	29	
	0.05	92	6	25	
	0.1	100	2	23	
L-Cyhalothrin	0.005	121	4	36	0.01
	0.01	106	4	32	
	0.02	102	3	29	
Pesticide	Spike level (mg/kg)	% Recovery	% RSDr	Horwitz%	LOQ
	0.05	94	7	25	
	0.1	100	5	23	

Pyridaben	0.005	127	2	36	0.01
	0.01	110	6	32	
	0.02	105	6	29	
	0.05	94	9	25	
	0.1	101	9	23	
Beta-cyfluthrin	0.005	120	2	36	0.01
	0.01	110	7	32	
	0.02	108	5	29	
	0.05	97	8	25	
	0.1	100	9	23	
Difenoconazole	0.005	96	7	36	0.005
	0.01	98	9	32	
	0.02	104	7	29	
	0.05	88	9	25	
	0.1	95	14	23	

5. การทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการ การทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง วิเคราะห์ผลด้วยการเปรียบเทียบค่าความแปรปรวนภายในตัวอย่าง (within sample variation) โดย Cochran's maximum variance test ($p < 0.05$) พบว่าไม่มีค่า outliers ของตัวอย่างที่เตรียม เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ของแต่ละตัวอย่างโดยวิเคราะห์ F-test two sample for variance เปรียบเทียบค่า F ที่คำนวณได้กับ ค่า F critical โดยกำหนด Alpha = 0.025 และ ทดสอบ t-test กำหนด Alpha = 0.05 จากการวิเคราะห์สารทั้ง 8 ชนิดคือ oxyfluorfen, pyridaben, difenoconazole, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, beta-cyfluthrin, fenpropathrin ในตัวอย่างมะเขือเทศที่ใช้ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg ระหว่างห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 พบว่ามีเพียง 3 สารที่ $t_{stat} < t_{critical}$ และมี ค่า HORRAT ≤ 2 คือสาร fenpropathrin มีค่า t_{stat} เท่ากับ 1.72 น้อยกว่าค่า $t_{critical}$ 2.10 L-cyhalothrin มีค่า t_{stat} เท่ากับ 1.24 น้อยกว่าค่า $t_{critical}$ 2.10 และ pyridaben ที่มีค่า มีค่า t_{stat} เท่ากับ 0.96 น้อยกว่าค่า $t_{critical}$ 2.10 และมี ค่า HORRAT ≤ 2 ที่แสดงว่าผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แต่สาร อีก 4 ชนิดคือ oxyfluorfen, difenoconazole, chlorpyrifos, , chlorfenapyr และ beta-cyfluthrin มีค่า $t_{stat} \geq t_{critical}$ ส่วน สาร difenoconazole ไม่สามารถใช้ประเมินการทดสอบได้เนื่องจากให้ค่า % recovery ที่ต่ำมากในผลทดสอบของทั้ง 2 ห้องปฏิบัติการ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์สาร 8 ชนิดระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการ

	pesticide	LAB.	mean	SD	%RSD	Horwitz	Predicted	T-stat	T-crit	% rec	T-stat<T-crit	
						%RSDr	Horwitz RSD					HORRAT
1	B-cyfluthrin	LAB-1	0.046	0.005	10.68	12.71	17.14	0.62	3.50	2.10	92	No
		LAB-2	0.028	0.002	6.96	13.67	17.14	0.41			57	
2	chlorfenapyr	LAB-1	0.037	0.003	8.71	13.11	17.14	0.51	-	2.23	75	No
		LAB-2	0.016	0.001	5.85	14.86	17.14	0.34			33	
3	chlorpyrifos	LAB-1	0.039	0.004	9.52	13.05	17.14	0.56	-	2.20	77	No
		LAB-2	0.019	0.001	6.82	14.48	17.14	0.40			39	
4	difenoconazole	LAB-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	No
		LAB-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	fenpropathrin	LAB-1	0.040	0.003	7.60	12.98	17.14	0.44	1.72	2.10	80	Yes
		LAB-2	0.029	0.002	5.28	13.66	17.14	0.31			57	
6	L-cyhalothrin	LAB-1	0.042	0.003	7.63	12.89	17.14	0.45	1.24	2.10	84	Yes
		LAB-2	0.032	0.002	6.08	13.45	17.14	0.35			63	
7	oxyfluorfen	LAB-1	0.042	0.003	7.60	12.89	17.14	0.44	2.43	2.10	84	No
		LAB-2	0.039	0.002	5.05	13.02	17.14	0.29			79	
8	pyridaben	LAB-1	0.039	0.004	9.12	13.02	17.14	0.53	0.96	2.10	78	Yes
		LAB-2	0.030	0.002	6.12	13.56	17.14	0.36			60	

9.สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในตัวแทนกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง(มะเขือเทศ และ ผักกาดหอม) และกลุ่มพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง (องุ่นและกีวี) วิธีวิเคราะห์วัตถุอันตราย 8 ชนิดคือ oxyfluorfen, pyridaben, difenoconazole, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, beta-cyfluthrin, fenpropathrin โดยวิธี ethyl acetate extraction และนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS พารามิเตอร์ต่างๆที่ใช้ในการตรวจสอบได้แก่ range, linearity, accuracy, precision, Limit of Quantitation และ (LOQ) และ ผ่านเกณฑ์ทดสอบ ได้จำนวน 6 ชนิดในมะเขือเทศและ ผักกาดหอม และจำนวน 8 ชนิดในองุ่นและกีวี ส่วนการทดสอบเปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการผลวิเคราะห์ของสารที่ข้อมูลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ผ่านการประเมินเพียง 3 ชนิดคือ fenpropathrin L-cyhalothrin และ pyridaben

10.การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษชนิดต่างๆในตัวแทนกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง (มะเขือเทศ และ ผักกาดหอม) และกลุ่มพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง (องุ่น และกีวี) โดยวิธี ethyl acetate extraction ด้วย GC-MS/MS ตามค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่กำหนดสำหรับวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ตรวจวิเคราะห์โดยรวม ที่ตรวจวิเคราะห์ได้สะดวก รวดเร็ว ประหยัด ที่สามารถเผยแพร่ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับ การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร และผู้สนใจ

11.เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 124 หน้า

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

EURL-FV(2010-m4) Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate
extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric
detection 0.1

SANTE 2017. Guidnce document on analytical quality control and mthod validation prcedure
for pesticide residue and analysis in food and feed. No.SANTE/11813/2017