

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

- ชื่อชุดโครงการ** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
- ชื่อโครงการ** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
Research and Development on Analytical System of Agricultural
Production Inputs.
กิจกรรมที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
- ชื่อการทดลอง** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสาร
กลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine)
และ ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในพริก ของห้องปฏิบัติการ สวพ.1 (2560-2561)
Method Validation of Pesticide Residues with QuEChERS Method for
Organophosphate, Organochlorine, Pyrethroid and Carbamate Group in
Chilli by Laboratory of DOA1
- คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง นางเนาวรัตน์ ตั้งมันคงวรกุล สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1
ผู้ร่วมงาน นางนงพงา โอลแสน สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

5. บทคัดย่อ

QuEChERS เป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ง่าย ประหยัด มีประสิทธิภาพ ทนทาน และปลอดภัย สามารถใช้กับงานประจำจริงในการวิเคราะห์ ปริมาณสารพิษตกค้างทางการเกษตรกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate) ในพริกร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคโตรเมตรี (GC/MS/MS) และเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคโตรเมตรี (LC/MS/MS) เพื่อให้เกิดความมั่นใจในวิธีที่ใช้จึงทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) มีความเป็นเส้นตรงยกเว้น dicrotophos monocrotophos coumaphos carbosulfan, benfuracarb และ aldicarb-sulfone มีความแม่นยำที่ 0.1 mg/kg สำหรับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์(pyrethroid) รวม 27 ชนิด สำหรับสารทั้ง 4 กลุ่มดังกล่าววิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง มีความคงทน (robustness) ต่อการลดเวลาในการหมุนเหวี่ยงครั้งแรกจาก 5 นาที เป็น 4 นาทีที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 มก/กก.ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (n=3) และมีคุณสมบัติของ reproducibility ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 mg/kg เมื่อเปลี่ยนผู้ทดสอบ

Abstract

QuEChERS method is quick, easy, cheap, effective rugged and safe. The method able to use with routine work for quantitative pesticides residues analysis of organophosphate, organochlorine, pyrethroid and carbamate group in Chili cooperated with GC/MS/MS and LC/MS/MS. For confidence with method, the method must be validated. After validation, the method is found that the method has specificity, linearity except dicofol monocrotophos coumaphos carbosulfan, benfuracarb and aldicarb-sulfone at 0.1 mg/kg for 27 compounds of organophosphate, organochlorine and pyrethroid group. For 4 pesticide groups, the method has selectivity, robustness when reduce the 1st centrifugation time (5 min to 4 min) at 0.01 and 0.1 mg/kg (95% confidence level when n=3) and reproducibility at 0.01 0.1 and 0.5mg/kg when change analyst.

6. คำนำ

พริกเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย และเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการปรุงอาหารไทยเกือบทุกชนิด พริกมักมีโรคและแมลงศัตรูพืชรบกวนมากมาย ทำให้ผลผลิตลดลง ต้นแคระแกรนหรือตาย การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่ถูกต้อง ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชผลผลิตในผลผลิตพริก ทำให้ผู้บริโภคขาดความมั่นใจในความปลอดภัย และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้า การวิเคราะห์สารตกค้างในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ต่างๆ เช่น

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างมีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิคการตรวจหาการเปลี่ยนสีของสาร (colorimetric) เป็นการใส่สารที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์เพื่อให้เกิดสีได้ วิธีนี้สามารถใช้ในภาคสนามได้ในรูปแบบของชุดน้ำยา เช่น ชุดน้ำยาตรวจสอบยาฆ่าแมลง/สารพิษตกค้าง "จีที" (GT-Pesticide residual test kit) ชุดทดสอบสารพิษตกค้าง (pesticides residue test kit, PR) และ ชุดตรวจสอบสารพิษตกค้างในผักผลไม้ TM kit เป็นต้น ส่วนวิธีการทดสอบโดยใช้เครื่องมือโครมาโตกราฟี ได้แก่ ลิกวิดโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) และ ก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง สามารถตรวจวัดในระดับมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือต่ำกว่า นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธีทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical technique) ในการวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

การแบ่งส่วนด้วยของเหลว (liquid-liquid partition) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารที่อยู่ในเมทริกซ์ที่มีความแตกต่างของความมีขี้ ในการสกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชวิธี multi-residues สารละลายที่ใช้กันแพร่หลาย เช่น อะซิโตน และอะซิโตนไนไตรล์ สารทั้งสองสามารถผสมเข้ากันได้ ข้อดีของอะซิโตนไนไตรล์ คือ กำจัดไขมันและแว็กซ์ที่อยู่ในเมทริกซ์ของพืชได้ดี แต่ข้อเสียคือมีความพิษสูงและราคาแพง ส่วนอะซิโตนสามารถละลายสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้หลายชนิด แต่มีจุดเดือดต่ำ (56.5 องศาเซลเซียส) และทำให้เกิดความผิดพลาดเชิงปริมาณ จึงมักใช้ในการสกัดแบบแบ่งส่วน (partition) ร่วมกับไดคลอโรมีเทน (J.Takel and S.Hatrik, 1996)

การสกัดด้วยของแข็ง (solid phase extraction) เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทำให้สารบริสุทธิ์และลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (A.Balinova et al., 2007) ตัวดูดซับที่ใช้กัน เช่น non-polar octadecyl

(C18) primary secondary amine (PSA) และ amminopropyl (NH₂) เป็นต้น การสกัดด้วยของแข็งสำหรับ สกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมักทำใน normal phase mode

การใช้วิธี QuEChERS มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้ในการสกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในวิธีวิเคราะห์ แบบ multi-residues เช่น ในการหาปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 115 ชนิดในส้มด้วย LC-MS/MS ร่วมกับการใช้วิธี QuEChERS มีการใช้ของอะซิโตนไนไตรล์ร่วมกับ primary secondary amine (PSA) ในการสกัด ตัวอย่างส้ม (O.Golge and B.Kabak, 2015) การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 3 สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 128 ชนิดในกล้วยด้วยวิธี QuEChERS ร่วมกับการใช้ UHPLC-MS/MS จากการทดลองพบว่าวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ในช่วงความเข้มข้น 10.0-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) เท่ากับ 5.00 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เท่ากับ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ยกเว้น fenamiphos and mevinphos (R.P.Carneiro, et al., 2007)

ดังนั้น เพื่อให้ได้วิธีการที่เป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) ในพริก สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จึงทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์(pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) ในพริก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการขยาย ขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 นอกจากนี้ยังเป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการให้ได้ตามมาตรฐานสากล มีผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจย้อนกลับได้

7. วิธีดำเนินการ

7.1 สารเคมี

7.1.1 อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) เกรด AR และ PR

7.1.2 แมกนีเซียมซัลเฟต

7.1.3 โซเดียมคลอไรด์

7.1.4 ไตรโซเดียมซิเตรท

7.1.5 ไดโซเดียมซิเตรท

7.1.6 แมกนีเซียมซัลเฟต

7.1.7 Dispersive SPE ชนิด primary second amine (PSA) 25 มิลลิกรัม

7.1.8 แก๊สไนโตรเจน เกรด ultra high purity (UHP)

7.1.9 แก๊สไนโตรเจน เกรด ultra high purity (HP)

7.1.10 แก๊สฮีเลียม เกรด ultra high purity (UHP)

7.1.11 สารมาตรฐาน กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate)

7.1.12 เอธิลอะซิเตต (ethyl acetate)

7.2 อุปกรณ์

7.2.1 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS/MS) แบบ QQQ

7.2.2 เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี (LC/MS/MS) แบบ QQQ

7.2.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

7.2.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง

7.2.5 เครื่องระเหยด้วยไนโตรเจน (nitrogen evaporator)

7.2.6 เครื่องบดตัวอย่าง

7.2.7 ปีเปตต์ ขนาด 1-10 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร

7.2.8 เครื่องกระจายสารละลาย (dispenser) ขนาด 10-50 มิลลิลิตร

7.2.9 หลอดสำหรับใช้กับเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร

7.2.10 ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร

7.2.11 vial filter ชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน และ 0.02 ไมครอน

7.3 การเตรียมสารเคมี

7.3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน ใช้ตัวทำละลายที่เกรด PR หรือ ultra residue สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS/MS) หรือ HPLC grade สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี (LC/MS/MS) สำหรับสารมาตรฐานเสร็จแล้วให้ขีดเส้นระบุปริมาตรของสารละลาย ติดฉลากระบุชื่อสาร batch number ความเข้มข้น วันที่เตรียม ชื่อผู้เตรียม ตัวทำละลายที่ใช้ และวันหมดอายุ เก็บที่อุณหภูมิ -15 ± 5 องศาเซลเซียส

7.3.1.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร

ชั่งสารมาตรฐานที่เป็น primary standard ให้ได้น้ำหนักเนื้อสาร 10 mg โดยประมาณใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธิลอะซิเตต (ethyl acetate) ลงในขวดวัดปริมาตรที่ละน้อยแล้วเขย่าจน primary standard ละลายหมด จากนั้นเติมเอธิลอะซิเตตจนถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายใส่ขวดฝาเกลียวและปิดฝาให้แน่น ส่วนความเข้มข้นของสารมาตรฐานคำนวณตามสูตรการคำนวณหาหน้าหนักของสารมาตรฐานจากชั่งสารมาตรฐาน (ภาคผนวก)

7.3.1.2 Mixed intermediate standard solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร

ใช้ปีเปตต์ stock standard solution ของแต่ละสารในปริมาณที่คำนวณ ตามสูตรการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ในภาคผนวก) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอธิลอะซิเตต เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายใส่ขวดฝาเกลียวและปิดฝาให้แน่น

7.3.1.3 Mixed intermediate standard solution

7.3.1.3.1 ใช้ปีเปตต์ mixed intermediate standard solution ในปริมาณที่คำนวณตามสูตรการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ในภาคผนวก) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10

มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอธิลอะซิเตต เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายใส่ขวดฝาเกลียวและปิดฝาให้แน่น

7.3.1.4 Calibration curve แบบ matrix-matched calibration standard

7.3.1.4.1 เตรียม matrix solution โดยสกัดตัวอย่าง sample blank ที่ปราศจากสารตกค้างตามขั้นตอนการสกัด ข้อ 7.4.2

7.3.1.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 0.005 0.01 0.05 0.5 และ 0.1 ppm ในสารละลายตัวอย่างที่สกัด โดยปิเปต mixed intermediate standard solution ในปริมาณที่คำนวณตามสูตรการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ในภาคผนวก) ใส่ลงในขวด เติม matrix solution จนมีปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน

7.4 วิธีการทดสอบ

7.4.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ นำตัวอย่างแกะเอาถ้ำและใบออก บดให้ละเอียด กรณีไม่สามารถเตรียมตัวอย่างในวันเดียวกับที่รับตัวอย่างให้เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 0 - 10 °C เป็นเวลา ไม่เกิน 3 วัน

7.4.2 การการสกัดตัวอย่าง

7.4.2.1 ชั่งตัวอย่างพริกบดละเอียดหนัก 10.000 ± 0.01 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง ใส่ลงในหลอดสำหรับใช้กับเครื่องมือเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

7.4.2.2 เติม acetonitrile (AR grade) 10 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เขย่าด้วยมือแรงๆ ประมาณ 1 นาที

7.4.2.3 เติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 4 กรัม โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 1 กรัม ไตรโซเดียมซิเตรท 1 กรัม ไดโซเดียมซิเตรท 0.5 กรัม ตามลำดับ ปิดฝาให้แน่น เขย่าด้วยมือแรงๆ ประมาณ 1 นาที หมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องมือเหวี่ยงประมาณ 3,500 RCF เป็นเวลา 5 นาที

7.4.2.4 เติม PSA 25 มิลลิกรัม และ แมกนีเซียมซัลเฟต 150 มิลลิกรัม ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสในข้อ 7.4.2.3 มาใส่ 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex mixer เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที

7.4.2.5 นำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องมือเหวี่ยงประมาณ 3,500 RCF เป็นเวลา 5 นาที

7.4.2.6 ดูดสารละลายส่วนใสในข้อ 7.4.2.5 มาใส่ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยด้วยไนโตรเจน (nitrogen evaporator) เติมเอธิลอะซิเตต (ethyl acetate) 0.5 มิลลิลิตร กรองด้วย vial filter ชนิด PTFE ขนาด 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS/MS)

7.4.2.7 ดูดสารละลายส่วนใสในข้อ 7.4.2.5 มาใส่ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยด้วยไนโตรเจน (nitrogen evaporator) เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร กรองด้วย vial filter ชนิด PTFE ขนาด 0.02 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี

7.4.3 การทดสอบด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟชนิดแมสตีเทคเตอร์ (GC/MS/MS) แบบ QQQ ตั้ง
ค่าสภาวะของเครื่องดังนี้

7.4.3.1 Quench Gas : Helium Flow Rate 2.5ml/min

7.4.3.2 Collision Gas : Nitrogen Flow Rate 1.5 ml/min

7.4.3.3 Temperature Condition : Inlet 280 °C

7.4.3.4 Injection Mode :Splitless

7.4.3.5 Inject Volume 2 µl

7.4.3.6 Column HP – 5MS UI ขนาดยาว 15 m diameter 0.25 mm film thickness 0.25

µm ต่อกัน 2 column

7.4.3.7 Oven Programme Temperature;

Initial Temp :60°C hold1 min

Rate :40°C /min to 170°C hold 0 min

Rate : 10°C /min to 310 °C hold 3 min

7.4.3.8 Column flow 1.011 ml/min

7.4.3.9 Source Temperature 300 °C

Quad.1 Temperature 150 °C

Quad.2 Temperature 150 °C

7.4.3.10 Ionization Mode EI+

7.4.4 การทดสอบด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟชนิดแมสตีเทคเตอร์ (LC/MS/MS) แบบ QQQ ตั้ง
ค่าสภาวะของเครื่องดังนี้

7.4.4.1 สภาวะของ UHPLC : Agilent Technologies 1290 infinity II UHPLC

Column : Agilent Poroshell 120 EC –C18, 3.0 x 150mm. 2.7 ไมครอน, ที่ 30°C

Mobile phase A : 5 mM ammonium formate +0.1% formic acid in water

Mobile phase B : 5 mM ammonium formate +0.1% formic acid in Methanol

Flow rate : 0.500 mL/min

Gradient :	Time	A	B
	0.50 min	95.00 %	5.00 %
	3.50 min	50.00 %	50.00 %
	17.00 min	0.00 %	100.00 %
	20.00 min	0.00 %	100.00 %

Stop time : 20.00 min Post time : 3.00 min

Injection Volume : 2.00 µL

7.4.4.2 สภาวะของ MS : 6495 QQQ

Ionization	: Positive/Negative switching		
Gas Temp (°C)	120	Gas Flow (l/min)	16
Sheath Gas Heater	375	Sheath Gas Flow	11
Nebulizer (psi)	45		
Capillary (V)	3500 (positive)/3000(negative)		
Precursor Ion และ Product Ion	(ภาคผนวก)		

7.4.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์ ทำการทดสอบสารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์(pyrethroid) ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (GC/MS/MS) ส่วนสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) ทำการทดสอบด้วยลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (LC/MS/MS) โดยทดสอบ 9 พารามิเตอร์ คือ ช่วงของการวัด (range), ความเป็นเส้นตรง (linearity), ความแม่นยำ (accuracy), ความเที่ยง (precision), ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD), ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ), ความจำเพาะเจาะจง (specificity), ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness), คุณสมบัตินี้ของ Reproducibility ของการทดสอบภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness) โดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ

เวลาและสถานที่ ดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม 2560–กันยายน 2561 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.1

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์(pyrethroid)

ในการทดลองได้มีการทดสอบ 9 พารามิเตอร์ในพริกด้วยวิธีการ QuEChERS คือ ช่วงของการวัด (range) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness) คุณสมบัตินี้ของ Reproducibility ของการทดสอบภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness) โดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ ส่วนสารมาตรฐานที่ใช้ คือ ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate)

8.1.1 การทดสอบช่วงของการวัด (range)

จากการทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 7 ระดับของสาร คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/kg ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดสารที่ทดสอบ Retention time, Precursor ion, Product ion, R² และ Range

Compound	Retention Time (min)	Precursor ion	Product ion	R ²	Range (mg/kg)
----------	----------------------	---------------	-------------	----------------	----------------

Compound	Retention Time (min)	Precursor ion	Product ion	R ²	Range (mg/kg)
dicrotophos	7.401	127.0	109.0	0.99892226	0.02-0.5
phorate	7.536	121.0	65.0	0.99832465	0.05-0.5
diazinon	8.291	137.1	84.0	0.99877643	0.01-1.0
parathion-methyl	9.126	125.0	47.0	0.99803399	0.02-1.0
chlorpyrifos-methyl	9.127	124.9	47.0	0.99877888	0.02-1.0
pirimiphos-methyl	9.562	290.0	125.0	0.99916339	0.02-1.0
fenitrothion	9.564	125.1	47.0	0.99907327	0.02-1.0
malathion	9.701	126.9	99.0	0.9994558	0.02-1.0
chlorpyrifos	9.924	126.9	169.0	0.99921735	0.02-1.0
parathion	9.943	126.9	109.0	0.99841251	0.1-1.0
pirimiphos-ethyl	10.255	126.9	166.1	0.99939889	0.02-1.0
methidathion	10.952	126.9	85.0	0.99924265	0.02-1.0
prothiofos	11.447	126.9	239.0	0.99889321	0.02-1.0
profenofos	11.494	126.9	63.0	0.99872268	0.02-1.0
ethion	12.363	126.9	96.9	0.99942758	0.02-1.0
triazophos	12.583	126.9	134.2	0.99905566	0.02-1.0
phosmet	13.829	126.9	77.1	0.99797020	0.02-1.0
EPN	13.868	126.9	141.1	0.99761889	0.02-0.2
phosalone	14.508	126.9	111.0	0.99950779	0.02-1.0
azinphos-methyl	14.536	126.9	77.1	0.99764808	0.05-1.0
azinphos-ethyl	15.137	126.9	77.1	0.99567563	0.02-1.0
coumaphos	15.793	126.9	182.0	0.99555332	0.02-1.0

8.1.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เมื่อทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 mg/kg ของสารมาตรฐาน 43 ชนิด ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่าของพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น คำนวณค่า correlation coefficient (r) เพื่อทดสอบ linearity ผลการทดสอบดังตารางที่ 2

จากการทดสอบความเป็นเส้นตรง พบว่า สารที่ทดสอบเกือบทั้งหมดมีความเป็นเส้นตรง ยกเว้น dicrotophos (r= 0.9933) monocrotophos (r= 0.9929) และ coumaphos (r= 0.9917)

ตารางที่ 2 ชนิดสารที่ทดสอบ Retention time, Equation และ R² Range

Compound	Retention			Compound	Retention		
	Time (min)	Equation	R ²		Time (min)	Equation	R ²
dichlorvos	4.6981	y = 3297.6x - 13864	0.9998	endosulfan I (alpha isomer)	11.3612	y = 49.212x - 26.853	0.9998

Compound	Retention			Compound	Retention		
	Time (min)	Equation	R ²		Time (min)	Equation	R ²
methamidophos	4.7339	y = 177.65x - 4611.1	0.9972	ethion	12.4126	y = 710.78x - 6223.8	0.9997
mevinphos	5.6386	y = 649.56x - 6832.3	0.9992	profenofos	11.6133	y = 227.66x - 705.36	0.9999
omethoate	6.8459	y = 376.98x - 8165.9	0.9971	prothiofos	11.5250	y = 402.42x - 1185.2	0.9999
dicrotofos	7.2734	y = 357.11x - 9247.6	0.9933	triazophos	12.7106	y = 269.48x - 3028.2	0.9994
monocrotophos	7.4246	y = 489.65x - 15803	0.9929	endosulfan sulfate	13.1120	y = 370.9x - 547.08	0.9999
phorate	7.5333	y = 308.46x - 3143.8	0.9992	bifenthrin	13.9415	y = 3297.6x - 13864	0.9998
atrazine	7.9629	y = 150.83x - 1078.3	0.9995	EPN	14.0312	y = 711.62x - 19917	0.9956
dimethoate	7.8532	y = 197.12x - 2897.5	0.9984	phosmet	14.0172	y = 1399.4x - 18179	0.9989
diazinon	8.2152	y = 270.39x - 944.78	0.9998	azinphos-methyl	14.7575	y = 512.73x - 9877.5	0.9982
chlorpyrifos-methyl	9.0831	y = 320.35x - 4756.6	0.9980	lambda-cyhalothrin	14.9173	y = 438.38x - 3064.3	0.9994
parathion-methyl	9.2027	y = 287.73x - 6065.7	0.9978	phosalone	14.6523	y = 779.1x - 5521.3	0.9997
fenitrothion	9.6069	y = 396.26x - 6095.5	0.9989	azinphos-ethyl	15.3284	y = 704.25x - 11724	0.9988
malathion	9.7084	y = 522.91x - 3473	0.9996	coumaphos	15.9053	y = 133.27x + 1760.1	0.9917
pirimiphos-methyl	9.5089	y = 436.23x - 2363.8	0.9997	permethrin I	15.8680	y = 326.58x - 2102.1	0.9997
chlorpyrifos	9.8629	y = 444.52x - 2132.4	0.9998	permethrin II (trans)	15.8678	y = 314.14x - 2170.1	0.9996
parathion	10.0112	y = 186.18x - 4982.4	0.9961	cyfluthrin	16.3895	y = 1409.9x - 18375	0.9987
pirimiphos-ethyl	10.1878	y = 242.34x - 2324.4	0.9994	cypermethrin	16.7053	y = 671.09x - 9411.7	0.9984
endosulfan II (beta isomer)	12.4273	y = 30.26x + 6.7575	0.9999	fenvalerate I	17.5077	y = 644.66x - 10554	0.9985
methidathion	11.0383	y = 1192x - 15661	0.9991	fenvalerate II	17.7064	y = 248.39x - 4237.6	0.9983
procymidone	10.8087	y = 475.99x + 104954	0.9996	deltamethrin	18.2627	y = 209.97x - 5007.7	0.9967

8.1.3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

เมื่อใช้ fortified sample ที่มีปริมาณสาร 4 ระดับ คือ ในช่วง 0.005 ถึง 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อประเมิน accuracy จาก % recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method ที่ความเข้มข้น 0.005-0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม %recovery จะเท่ากับ 60-115% และที่ 0.1-0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม % recovery จะเท่ากับ 80-110 % ผลการทดสอบดังตารางที่ 3

จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีทดสอบพบว่า วิธีทดสอบที่ใช้ไม่มีความแม่นยำที่ความเข้มข้น 0.005-0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สำหรับที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า สาร 27 ชนิด ได้แก่ acephate, atrazine, azinphos-methyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, coumaphos, cyhalothrin (lambda), diazinon, dicrotofos, dimethoate, endosulfan I (alpha isomer), endosulfan II (beta isomer), endosulfan sulfate, fenitrothion, malathion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, parathion-methyl, phorate, phosalone, phosmet, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos และ prothiofos มีความแม่นยำของวิธีทดสอบ ส่วนความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า cyhalothrin (lambda) เป็นสารชนิดเดียวที่มีความแม่นยำของวิธีทดสอบ

ตารางที่ 3 แสดงค่า% recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg (10 ชั่วโมง)

Compound	Percentage of Recovery			
	0.005 ppm	0.01 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm
acephate	381	214	88	179
atrazine	174	151	99	151
azinphos-ethyl	261	181	111	176
azinphos-methyl	297	187	100	124
bifenthrin	148	147	116	173
chlorpyrifos	163	151	103	154
chlorpyrifos-methyl	189	160	100	160
coumaphos	246	174	102	142
cyfluthrin IV	628	294	134	189
cyhalothrin (lambda)	359	222	90	105
cypermethrin II	536	265	136	202
deltamethrin	416	282	134	231
diazinon	145	138	100	153
dichlorvos	172	133	51	132
dicrotofos	343	194	108	180
dimethoate	283	181	109	175
endosulfan I (alpha isomer)	192	160	96	116
endosulfan II (beta isomer)	136	146	105	153
endosulfan sulfate	229	193	108	151
EPN	404	255	125	203
ethion	217	167	119	175
fenitrothion	307	211	100	156
fenvalerate I	301	201	119	176
fenvalerate II	196	165	139	251
malathion	246	177	105	149
methamidophos	296	195	90	157
methidathion	238	181	107	165
mevinphos	197	154	92	164
monocrotophos	370	234	99	170
omethoate	340	244	194	368
parathion	419	267	124	186
parathion-methyl	315	216	106	169
permethrin I	154	144	116	169
permethrin II (trans)	195	162	113	169

Compound	Percentage of Recovery			
	0.005 ppm	0.01 ppm	0.1 ppm	0.5 ppm
phorate	213	163	85	153
phosalone	173	156	107	165
phosmet	258	191	106	164
pirimiphos-ethyl	216	175	108	158
pirimiphos-methyl	160	144	101	151
procymidone	5513	2507	376	250
profenofos	161	146	108	160
prothiofos	150	155	109	151
triazophos	233	179	116	182

8.1.4 การทดสอบความเที่ยง (precision)

เมื่อใช้ fortified sample ที่มีปริมาณสาร 4 ระดับในช่วง 0.005 ถึง 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993 (ภาคผนวก) ผลการทดสอบดังตารางที่ 4

จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารที่ทดสอบเกือบทั้งหมดมีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD ยกเว้นสาร fenvalerate II สำหรับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารเกือบทั้งหมดมีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD ยกเว้น bifenthrin , cyfluthrin IV , cypermethrin II, dichlorvos , fenvalerate II, permethrin I และ procymidone ส่วนที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มี cyhalothrin (lambda) เท่านั้นที่มีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่มีสารที่มีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT

ตารางที่ 4 แสดงค่า% RSD และ HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (10 ซ้ำ)

Compound	0.005 ppm		0.01 ppm		0.1 ppm		0.5 ppm	
	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT
acephate	6	0.25	8	0.36	26	1.74	43	3.65
atrazine	12	0.52	17	0.82	20	1.36	40	3.43
azinphos-ethyl	7	0.29	15	0.71	21	1.42	42	3.62
azinphos-methyl	3	0.13	19	0.92	27	1.79	29	2.46
bifenthrin	13	0.54	22	1.02	21	1.42	42	3.60
chlorpyrifos	12	0.51	19	0.91	18	1.19	40	3.37
chlorpyrifos-methyl	10	0.43	18	0.86	17	1.16	41	3.46
coumaphos	8	0.35	12	0.58	17	1.11	41	3.47

Compound	0.005 ppm		0.01 ppm		0.1 ppm		0.5 ppm	
	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT
cyfluthrin IV	17	0.71	25	1.17	23	1.51	42	3.62
cyhalothrin (lambda)	3	0.11	7	0.32	13	0.90	44	3.75
cypermethrin II	15	0.66	25	1.18	22	1.49	43	3.69
deltamethrin	3	0.12	9	0.40	20	1.36	36	3.04
diazinon	12	0.50	20	0.96	18	1.22	40	3.45
dichlorvos	11	0.49	25	1.20	58	3.91	33	2.84
dicrotofos	7	0.32	12	0.55	25	1.67	42	3.62
dimethoate	11	0.47	15	0.72	24	1.59	41	3.51
endosulfan I (alpha isomer)	8	0.35	11	0.54	17	1.16	25	2.11
endosulfan II (beta isomer)	14	0.59	18	0.86	20	1.33	41	3.53
endosulfan sulfate	7	0.28	16	0.76	19	1.30	39	3.33
EPN	4	0.18	10	0.49	24	1.59	47	4.00
ethion	9	0.39	19	0.90	21	1.44	41	3.54
fenitrothion	5	0.21	12	0.56	17	1.15	40	3.44
fenvalerate I	6	0.26	15	0.69	20	1.36	40	3.45
fenvalerate II	39	1.65	24	1.16	23	1.51	50	4.25
malathion	9	0.40	15	0.69	17	1.16	32	2.72
methamidophos	7	0.29	11	0.52	24	1.58	46	3.95
methidathion	8	0.32	15	0.71	21	1.39	38	3.26
mevinphos	11	0.47	18	0.85	19	1.24	40	3.41
monocrotophos	6	0.24	9	0.40	27	1.82	38	3.26
omethoate	12	0.50	17	0.79	29	1.94	40	3.44
parathion	5	0.20	11	0.52	19	1.29	41	3.50
parathion-methyl	6	0.26	13	0.61	20	1.34	40	3.38
permethrin I	12	0.53	22	1.03	21	1.40	39	3.32
permethrin II (trans)	10	0.41	20	0.94	21	1.42	43	3.67
phorate	10	0.41	19	0.92	22	1.46	40	3.41
phosalone	13	0.54	19	0.89	21	1.37	41	3.50
phosmet	6	0.25	15	0.69	23	1.56	42	3.58
pirimiphos-ethyl	8	0.34	16	0.75	19	1.25	41	3.46
pirimiphos-methyl	11	0.47	19	0.91	17	1.15	38	3.28
procymidone	23	1.00	30	1.44	33	2.18	39	3.31
profenofos	10	0.43	19	0.92	22	1.49	40	3.43
prothiofos	9	0.37	20	0.96	21	1.41	35	2.96
triazophos	8	0.36	17	0.79	22	1.47	42	3.60

8.1.5 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และ การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

จากการวิเคราะห์ fortified samples เพื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) พบว่า ค่า LOD ของสารแต่ละชนิดดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์

ในพริก

Compound	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
acephate	0.005	0.005-0.01
atrazine	0.005	0.005-0.01
azinphos-ethyl	0.005	0.005-0.01
azinphos-methyl	0.005	0.005-0.01
bifenthrin	0.005	0.005
chlorpyrifos	0.005	0.005-0.01
chlorpyrifos-methyl	0.005	0.005-0.01
coumaphos	0.005	0.005-0.01
cyfluthrin IV	0.005	0.005
cyhalothrin (lambda)	0.005	0.005-0.01
cypermethrin II	0.005	0.005
deltamethrin	0.005	0.005-0.01
diazinon	0.005	0.005-0.01
dichlorvos	0.005	0.005
dicrotofos	0.005	0.005-0.01
dimethoate	0.005	0.005-0.01
endosulfan I (alpha isomer)	0.005	0.005-0.01
endosulfan II (beta isomer)	0.005	0.005-0.01
endosulfan sulfate	0.005	0.005-0.01
EPN	0.005	0.005-0.01
ethion	0.005	0.005-0.01
fenitrothion	0.005	0.005-0.01
fenvalerate I	0.005	0.005-0.01
fenvalerate II	0.005	>0.5
malathion	0.005	0.005-0.01
methamidophos	0.005	0.005-0.01
methidathion	0.005	0.005-0.01
mevinphos	0.005	0.005-0.01
monocrotophos	0.005	0.005-0.01

Compound	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
omethoate	0.005	0.005-0.01
parathion	0.005	0.005-0.01
parathion-methyl	0.005	0.005-0.01
permethrin I	0.005	0.005
permethrin II (trans)	0.005	0.005-0.01
phorate	0.005	0.005-0.01
phosalone	0.005	0.005-0.01
phosmet	0.005	0.005-0.01
pirimiphos-ethyl	0.005	0.005-0.01
pirimiphos-methyl	0.005	0.005-0.01
procymidone	0.005	0.005
profenofos	0.005	0.005-0.01
prothiofos	0.005	0.005-0.01
triazophos	0.005	0.005-0.01

8.1.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

เมื่อฉีดสารมาตรฐานในเครื่อง GC/MS/MS พบว่า สารแต่ละชนิดให้ precursor ion และ product ion ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสารนั้น เช่น ที่ 4.5818 นาที สาร Methamidophos แตกตัวให้อิออนที่มี m/z เท่ากับ 95 เมื่อนำ m/z เท่ากับ 95 ไปแตกอิออนต่อได้ m/z เท่ากับ 64 และ 79 เป็นต้น ผลการทดลองดังตารางที่ 1 ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

8.1.7 การทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness)

จากการวิเคราะห์ fortified samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.01 และ 0.100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์เดิมกับวิธีวิเคราะห์ที่เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการหมนเหวี่ยงครั้งแรกจาก 5 นาที เป็น 4 นาที และประเมิน T-test ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 4

ในการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.01 และ 0.100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า การเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการหมนเหวี่ยงครั้งแรกจาก 5 นาที เป็น 4 นาที ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของผลการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ % recovery % RSD และ HORRAT ที่ได้จากการเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการหมนเหวี่ยงครั้งแรกจาก 5 นาที เป็น 3 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (3 ซ้ำ)

Compound	0.005 mg/kg			10 mg/kg			100 mg/kg		
	Average	%RSD	HORRAT	Average	%RSD	HORRAT	Average	%RSD	HORRAT
acephate	23	18	0.79	24	45	2.11	89	91	6.12

Compound	0.005 mg/kg			10 mg/kg			100 mg/kg		
	Average	%RSD	HORRAT	Average	%RSD	HORRAT	Average	%RSD	HORRAT
atrazine	15	35	1.49	17	77	3.64	100	101	6.75
azinphos-ethyl	23	29	1.23	27	64	3.05	134	103	6.89
azinphos-methyl	86	84	3.59	61	151	7.17	166	126	8.41
bifenthrin	15	34	1.46	19	84	3.97	114	104	6.94
chlorpyrifos	16	36	1.53	18	79	3.73	101	101	6.76
chlorpyrifos-methyl	17	26	1.12	20	69	3.27	109	100	6.69
coumaphos	16	33	1.41	19	77	3.63	104	107	7.18
cyfluthrin iv	64	47	2.01	54	99	4.67	148	103	6.87
cyhalothrin (lambda)	18	5	0.21	25	35	1.65	87	83	5.56
cypermethrin ii	54	43	1.84	48	99	4.68	151	104	6.95
deltamethrin	18	38	1.61	22	92	4.34	170	108	7.25
diazinon	14	30	1.30	16	78	3.71	100	101	6.77
dichlorvos	14	9	0.39	17	69	3.27	76	97	6.49
dicrotofos									
(dicrotophos)	21	33	1.40	23	70	3.33	103	97	6.48
dimethoate	22	37	1.57	23	80	3.80	117	100	6.72
endosulfan i (alpha isomer)	11	16	0.69	13	62	2.93	66	88	5.89
endosulfan ii (beta isomer)	13	32	1.35	16	84	3.99	97	102	6.86
endosulfan sulfate	18	20	0.87	21	60	2.83	103	96	6.45
EPN	27	26	1.10	31	57	2.69	136	101	6.76
ethion	20	30	1.28	23	70	3.31	118	100	6.71
fenitrothion	25	17	0.73	27	43	2.03	106	92	6.13
fenvalerate I	24	22	0.94	27	57	2.69	127	99	6.60
fenvalerate II	24	35	1.51	29	74	3.48	151	106	7.07
malathion	20	25	1.05	22	63	2.97	91	94	6.26
methamidophos	25	16	0.70	27	43	2.03	82	85	5.67
methidathion	20	27	1.17	22	67	3.15	120	99	6.66
mevinphos	18	23	0.98	21	66	3.11	103	96	6.40
monocrotophos	26	20	0.85	29	50	2.38	93	91	6.10
omethoate	36	38	1.62	39	79	3.75	196	99	6.66
parathion	26	20	0.84	29	51	2.40	127	95	6.33
parathion-methyl	21	24	1.02	24	61	2.89	116	98	6.55

Compound	0.005 mg/kg			10 mg/kg			100 mg/kg		
	Average	%RSD	HORRAT	Average	%RSD	HORRAT	Average	%RSD	HORRAT
permethrin I	11	31	1.31	14	94	4.44	107	105	7.04
permethrin II (trans)	15	34	1.47	19	84	3.98	114	105	7.02
phorate	13	23	0.97	16	73	3.47	94	100	6.68
phosalone	18	41	1.75	21	83	3.92	122	105	7.05
phosmet	27	27	1.15	30	64	3.01	150	106	7.12
pirimiphos-ethyl	17	26	1.10	20	66	3.10	105	99	6.61
pirimiphos-methyl	15	29	1.23	17	73	3.44	99	100	6.66
procymidone	413	80	3.43	262	105	4.99	389	107	7.18
profenofos	15	32	1.35	17	78	3.67	102	102	6.83
prothiofos	15	20	0.83	16	63	2.96	87	92	6.13
triazophos	20	32	1.38	23	72	3.43	125	102	6.81

8.1.9 การทดสอบคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness)

จากการวิเคราะห์ fortified samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.10 และ 0.005 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ และประเมิน T-test ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 5

ในทดสอบคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.10 และ 0.005 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า การเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของผลการวิเคราะห์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ % recovery จากวิเคราะห์ด้วยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.10 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (5 ซ้ำ)

Compound	0.005 mg/kg		0.10 mg/kg		0.5 mg/kg	
	1 st Person	2 nd Person	1 st Person	2 nd Person	1 st Person	2 nd Person
acephate	347	351	244	214	97	215
atrazine	217	238	251	192	124	181
azinphos-ethyl	335	349	335	260	166	311
azinphos-methyl	664	617	703	564	192	292
bifenthrin	214	233	290	212	140	265
chlorpyrifos	231	258	323	229	122	198
chlorpyrifos-methyl	234	256	284	217	127	243
coumaphos	290	297	270	209	128	211
cyfluthrin IV	674	745	701	520	160	281

Compound	0.005 mg/kg		0.10 mg/kg		0.5 mg/kg	
	1 st Person	2 nd Person	1 st Person	2 nd Person	1 st Person	2 nd Person
cyhalothrin (lambda)	382	392	296	233	99	181
cypermethrin II	565	624	623	460	171	306
deltamethrin	187	199	289	213	218	296
diazinon	193	213	260	194	121	236
dichlorvos	177	169	194	115	56	121
dicrotofos	291	301	277	233	122	265
dimethoate	292	321	290	244	127	256
endosulfan I (alpha isomer)	205	225	194	173	111	169
endosulfan II (beta isomer)	196	219	264	198	126	236
endosulfan sulfate	300	315	268	231	127	217
EPN	377	394	369	283	173	376
ethion	251	272	315	235	142	263
fenitrothion	374	390	326	267	125	223
fenvalerate I	338	352	332	262	154	242
fenvalerate II	299	326	407	278	194	370
malathion	282	291	294	240	113	211
methamidophos	471	480	288	246	87	97
methidathion	266	283	284	223	137	239
mevinphos	254	264	273	207	112	237
monocrotophos	342	355	286	252	121	211
omethoate	431	433	390	320	230	440
parathion	388	410	361	288	154	299
parathion-methyl	337	356	300	243	136	266
permethrin I	113	131	222	168	133	268
permethrin II (trans)	260	273	294	213	135	249
phorate	217	241	241	173	113	220
phosalone	225	242	277	210	152	285
phosmet	359	375	339	264	179	337
pirimiphos-ethyl	257	275	290	224	128	241
pirimiphos-methyl	203	224	258	196	122	218
procymidone	7565	8957	6346	4355	193	386
profenofos	220	239	263	199	128	211
prothiofos	210	217	262	211	125	176
triazophos	280	300	321	242	149	294

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่95% โดยการทดสอบ T-test เมื่อ n=5 (tcrit (a=0.05,df=4) = 2.7765)

8.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate)

8.2.1 การทดสอบช่วงของการวัด (range)

จากการทดสอบ fortified sample ในความเข้มข้น 7 ระดับของกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 1 mg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ผลการตรวจสอบ range พบว่า Aldicarb-sulfone, methomyl, isoprocarb, methiocarb, benfuracarb และ carbosulfan มีช่วงของการวัดที่ 0.005 - 0.5 mg/kg ส่วน 3-hydroxy carbofuran, carbofuran-3-keto, pirimicarb, carbofuran, carbaryl, ethiofencarb, fenobucarb, promecarb, iprovalicarb, thiobencarb และ indoxacarb มีช่วงของการวัดที่ 0.005 - 1 mg/kg

8.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เมื่อทดสอบ fortified sample ในความเข้มข้น 7 ระดับ ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 1 mg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่าของพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น คำนวณค่า correlation coefficient (r)

เมื่อทดสอบ linearity ผลการทดสอบดังตารางที่ 7 ค่า r ของสารที่ทดสอบเกือบทั้งหมดมีความเป็นเส้นตรง ยกเว้น carbosulfan, benfuracarb และ aldicarb-sulfone

ตารางที่ 7 แสดงชนิดของสาร range และ ค่า correlation coefficient (r)

Compound	Range (ppm)	Correlation coefficient (r)
aldicarb-sulfone	0.005 - 0.5	0.99382388
methomyl	0.005 - 0.5	0.99991090
3-hydroxy carbofuran	0.005 - 1	0.99949826
carbofuran-3-keto	0.005 - 1	0.99915198
pirimicarb	0.005 - 1	0.99720747
carbofuran	0.005 - 1	0.99794957
carbaryl	0.005 - 1	0.99957992
ethiofencarb	0.005 - 1	0.99917451
isoprocarb	0.005 - 0.5	0.99942067
fenobucarb	0.005 - 1	0.99921609
methiocarb	0.005 - 0.5	0.99712097
promecarb	0.005 - 1	0.99893934
iprovalicarb	0.005 - 1	0.99924756
thiobencarb	0.005 - 1	0.99888812
indoxacarb	0.005 - 1	0.99870454

benfuracarb	0.005 - 0.5	0.99124741
carbosulfan	0.005 - 0.5	0.95639877

8.2.3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

เมื่อใช้ fortified sample ที่มีปริมาณสาร 4 ระดับ คือ ในช่วง 0.005 ถึง 0.5 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อประเมิน accuracy จาก% recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov.1993 (ตารางที่ 3) ผลการทดสอบดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงค่า% recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg (10 ซ้ำ)

Compound	Percentage of Recovery			
	0.005 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg
omethoate	152	76	221	209
aldicarb-sulfone	27	14	114	108
methomyl	0	0	114	107
3-hydroxy carbofuran	187	94	113	107
carbofuran-3-keto	152	76	100	98
pirimicarb	164	82	116	117
carbofuran	130	66	103	99
carbaryl	178	90	109	115
ethiofencarb	184	92	112	124
isoprocarb	209	105	112	128
fenobucarb	303	152	117	126
methiocarb	119	60	111	121
promecarb	147	75	110	120
iprovalicarb	135	68	100	75
thiobencarb	175	88	368	993
indoxacarb	169	85	99	119
benfuracarb	113	57	113	118
carbosulfan	288	144	14	3

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีทดสอบ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg พบว่า สารคาร์บาเมต 16 ชนิด คือ methomyl, aldicarb-sulfone, carbofuran, iprovalicarb, promecarb, omethoate, carbofuran-3-keto, pirimicarb, indoxacarb, thiobencarb, carbaryl, ethiofencarb, 3-hydroxy carbofuran, isoprocarb, carbosulfan และ fenobucarb ไม่ผ่านเกณฑ์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg พบว่า สารคาร์บาเมต 5 ชนิด คือ methomyl, aldicarb-sulfone, benfuracarb, carbosulfan และ fenobucarb ไม่ผ่านเกณฑ์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg พบว่า สารคาร์บาเมต 12 ชนิด คือ

carbosulfan , methiocarb, ethiofencarb , isoprocarb , 3-hydroxy carbofuran , benfuracarb , ldicarb-sulfone, methomyl , pirimicarb , fenobucarb, omethoate และ thiobencarb ไม่ผ่านเกณฑ์ สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/kg พบว่า สารคาร์บาเมต 14 ชนิด คือ carbosulfan, carbaryl, promecarb, methiocarb (mercaptodimethur), isoprocarb, ethiofencarb, 3-hydroxy carbofuran, benfuracarb, aldicarb-sulfone (aldoxycarb), methomyl, pirimicarb, fenobucarb (baycarb), omethoate และ thiobencarb ไม่ผ่านเกณฑ์

8.2.4 การทดสอบความเที่ยง (precision)

เมื่อใช้ fortified sample ที่มีปริมาณสาร 3 ระดับในช่วง 0.005 ถึง 0.5 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993 (ตารางที่ 5)

จากผลการทดสอบ precision ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับในช่วง 0.005 ถึง 0.5 mg/kg ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg พบว่า เมื่อประเมินค่า HORRAT ไม่มีสารคาร์บาเมตใดผ่านเกณฑ์ อาจใช้สถิติในการตัดข้อมูล outlier ออกไป

เมื่อประเมินโดยตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993 พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg สารคาร์บาเมตทุกตัวผ่านเกณฑ์ โดยมี %RSD >30 ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg สารคาร์บาเมตทุกตัวผ่านเกณฑ์ โดยมี %RSD >21 ยกเว้น aldicarb-sulfone มี %RSD =31 และ methomyl ไม่พบสาร สำหรับที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg สารคาร์บาเมตทุกตัวผ่านเกณฑ์ โดยมี %RSD >15 ยกเว้น thiobencarb มี %RSD =23 และ methomyl ไม่พบสาร และที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/kg สารคาร์บาเมตทุกตัวผ่านเกณฑ์ โดยมี %RSD >5.3 ยกเว้น methomyl และ carbosulfan ไม่พบสาร

ตารางที่ 9 แสดงค่า% RSD และ HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg (10 ซ้ำ)

Compound	0.005 mg/kg		0.01 mg/kg		0.1 mg/kg		0.5 mg/kg	
	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT
omethoate	6	9.03	5	7.68	8	14.06	9	15.39
aldicarb-sulfone	29	36.28	31	35.16	7	11.35	12	18.70
methomyl	-	-	-	-	-	-	-	-
3-hydroxy carbofuran	2	3.85	3	4.00	8	12.86	10	14.95
carbofuran-3-keto	3	4.43	3	5.04	6	8.46	19	29.18
pirimicarb	2	3.91	3	4.05	7	10.93	12	18.15
carbofuran	5	7.49	6	9.06	7	10.84	13	19.45
carbaryl	2	4.10	3	4.14	7	10.04	12	19.01
ethiofencarb	4	5.91	4	5.35	5	8.12	12	18.11
isoprocarb	2	4.08	3	4.00	7	10.08	13	21.13
fenobucarb	2	3.97	2	3.42	8	12.01	14	22.35

methiocarb	6	8.68	6	8.52	7	11.09	11	17.93
promecarb	3	4.86	5	6.79	8	12.20	12	18.32
iprovalicarb	5	8.71	6	8.01	6	8.56	16	22.76
thiobencarb	7	11.47	7	9.99	23	41.58	25	52.56
indoxacarb	5	8.98	6	8.79	6	9.31	11	16.39
benfuracarb	4	6.89	6	8.85	8	12.00	11	16.59

8.2.5 การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) และ การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ผลการทดสอบดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่า LOD และ LOQ ของสารกลุ่มคาร์บาเมต

Compound	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
omethoate	0.005	0.005
aldicarb-sulfone	0.005	0.1
methomyl	-	-
3-hydroxy carbofuran	0.005	0.005
carbofuran-3-keto	0.005	0.005
pirimicarb	0.005	0.005
carbofuran	0.005	0.005
Carbaryl	0.005	0.005
ethiofencarb	0.005	0.005
isoprocarb	0.005	0.005
fenobucarb	0.005	0.005
methiocarb	0.005	0.005
promecarb	0.005	0.005
iprovalicarb	0.005	0.005
thiobencarb	0.005	0.005
indoxacarb	0.005	0.005
benfuracarb	0.005	0.005

8.2.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

เมื่อฉีดสารมาตรฐานในเครื่อง LC/MS/MS พบว่า สารแต่ละชนิดให้ precursor ion และ product ion ที่มีความจำเพาะเจาะจง

8.2.7 การทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ (robustness)

ผลการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะโดยลดเวลาในการหมุนเหวี่ยงครั้งแรกเป็น 4 นาที และทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 0.01 และ 0.1 mg/kg ผลการทดสอบดังตารางที่ 11

วิธีนี้มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะโดยลดเวลาในการหมนเหวียงครั้งแรกจาก 5 นาทีเป็น 4 นาทีไม่ทำให้ผลการวิเคราะห์ของสารคาร์บาเมตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (n=3)

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ % recovery % RSD และ HORRAT ที่ได้จากการเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการหมนเหวียงครั้งแรกจาก 5 นาที (1st Method) เป็น 4 นาที (2nd Method) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (3 ซ้ำ)

Compound	0.01 mg/kg		0.1 mg/kg	
	1 st Method	2 nd Method	1 st Method	2 nd Method
3-hydroxy carbofuran	86	86	102	103
aldicarb-sulfone	53	101	110	125
carbaryl	65	125	106	119
carbofuran	150	135	76	112
carbofuran-3-keto	85	127	95	114
carbosulfan	0	65	6129	110
ethiofencarb	148	134	102	112
fenobucarb	140	125	105	112
indoxacarb	65	4764	108	9145
iprovalicarb	162	119	103	101
isoproc carb	130	182	105	117
methiocarb	164	89	104	110
methomyl	45	55	111	116
omethoate	89	109	180	114
pirimicarb	113	126	108	113
promecarb	147	135	108	93
thiobencarb	143	216	103	18

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% โดยการทดสอบ T-test เมื่อ n=3 ($t_{crit} (a=0.05, df=2) = 4.3027$)

8.2.8 การทดสอบคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness)

จากการวิเคราะห์ fortified samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 mg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ โดยเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ ประเมิน t-test ของ % recovery ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 12

การทดสอบคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบสารคาร์บาเมตในตัวอย่างพริก ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 mg/kg ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% เมื่อเปลี่ยนผู้วิเคราะห์

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ % recovery ของสารคาร์บาเมตจากวิเคราะห์ด้วยผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.10 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (5 ซ้ำ)

Compound	0.01 mg/kg		0.1 mg/kg		0.5 mg/kg	
	1 st Person	2 nd Person	1 st Person	2 nd Person	1 st Person	2 nd Person
3-hydroxy carbofuran	54	61	116	99	108	105
aldicarb-sulfone	106	110	117	105	102	103
benfuracarb	216	231	14	40	18	26
carbaryl	134	139	113	93	102	101
carbofuran	124	128	115	94	97	94
carbofuran-3-keto	84	85	98	75	91	73
carbosulfan	4940	6739	7707	9807	12343	13683
ethiofencarb	126	133	120	101	116	114
fenobucarb	183	189	118	102	109	112
indoxacarb	65	70	112	98	99	98
iprovalicarb	134	134	95	81	100	96
isoprocarb	132	136	114	97	102	101
methiocarb	121	128	113	93	102	107
methomyl	100	108	124	103	118	115
pirimicarb	125	130	114	99	104	103
promecarb	87	95	110	96	104	103
thiobencarb	118	118	104	86	95	94

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% โดยการทดสอบ T-test เมื่อ n=5 (tcri (α=0.05,df=4) = 2.7765)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

9.1 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในพริก

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีนี้ พบว่า วิธีนี้มีความเป็นเส้นตรงเกือบทุกสาร ยกเว้น dicrotofos ($r = 0.9933$) monocrotophos ($r = 0.9929$) และ coumaphos ($r = 0.9917$) ไม่มีความแม่นยำที่ความเข้มข้น 0.005-0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สำหรับที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า สาร 27 ชนิด ได้แก่ acephate, atrazine, azinphos-methyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, coumaphos, cyhalothrin (lambda), diazinon, dicrotofos, dimethoate, endosulfan I (alpha isomer), endosulfan II (beta isomer), endosulfan sulfate, fenitrothion, malathion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, parathion-methyl, phorate, phosalone, phosmet, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos และ prothiofos มีความแม่นยำของวิธีทดสอบ ส่วนความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า cyhalothrin (lambda) เป็นสารชนิดเดียวที่มีความแม่นยำของวิธีทดสอบ เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) มีความคงทนต่อการลดเวลาในการหมუნเหยียงครั้งแรกเป็น 4 นาที มีคุณสมบัติของ reproducibility ภายใต้อาการทดสอบปกติ (ruggedness) โดยเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.10 และ 0.005 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% มีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD ยกเว้นสาร

fenvalerate II สำหรับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สารเกือบทั้งหมดมีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD ยกเว้น bifenthrin , cyfluthrin IV , cypermethrin II, dichlorvos , fenvalerate II, permethrin I และ procymidone ส่วนที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มี cyhalothrin (lambda) เท่านั้นที่มีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่มีสารที่มีความเที่ยงเมื่อประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.01 และ 0.100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และมีคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 0.10 และ 0.005 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อใช้วิเคราะห์สารตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในพริก

9.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์สารกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate)

วิธีนี้เมื่อใช้ทดสอบสารกลุ่มคาร์บาเมตในตัวอย่างพริก พบว่า มีช่วงของการวัด ของ aldicarb-sulfone, methomyl, isoprocarb, methiocarb, benfuracarb และ carbosulfan มีช่วงของการวัดที่ 0.005 - 0.5 mg/kg ส่วน 3-hydroxy carbofuran, carbofuran-3-keto, pirimicarb, carbofuran, carbaryl, ethiofencarb, fenobucarb, promecarb, iprovalicarb, thiobencarb และ indoxacarb มีช่วงของการวัดที่ 0.005 - 1 mg/kg มีความเป็นเส้นตรง ยกเว้น carbosulfan, benfuracarb และ aldicarb-sulfone วิธีนี้ไม่มีความแม่นยำของสาร methomyl, aldicarb-sulfone, carbofuran, iprovalicarb, promecarb, omethoate, carbofuran-3-keto, pirimicarb, indoxacarb, thiobencarb, carbaryl, ethiofencarb, 3-hydroxy carbofuran, isoprocarb, carbosulfan และ fenobucarb ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg สาร methomyl , aldicarb-sulfone, benfuracarb , carbosulfan และ fenobucarb ไม่มีความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg สาร carbosulfan , methiocarb, ethiofencarb , isoprocarb , 3-hydroxy carbofuran , benfuracarb , ldicarb-sulfone, methomyl , pirimicarb , fenobucarb, omethoate และ thiobencarb ไม่มีความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg สาร carbosulfan, carbaryl, promecarb, methiocarb (mercaptodimethur), isoprocarb, ethiofencarb, 3-hydroxy carbofuran, benfuracarb, aldicarb-sulfone (aldoxycarb), methomyl, pirimicarb, fenobucarb (baycarb), omethoate และ thiobencarb ไม่มีความแม่นยำที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/kg มีความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg มีความจำเพาะเจาะจงเนื่องจากแต่ละชนิดให้ precursor ion และ product ion ที่เวลาและ m/z แตกต่างกัน มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะโดยลดเวลาในการหมุนเหวี่ยงครั้งแรกจาก 5 นาทีเป็น 4 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 และ 0.10 mg/kg และระดับความเชื่อมั่น 95% (n=3) และมีคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบสารคาร์บาเมตในตัวอย่างพริก ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 mg/kg เมื่อเปลี่ยนผู้ทดสอบ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ห้องปฏิบัติการได้วิธีการที่เป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) ในพริก

10.2 เป็นข้อมูลในการขยายขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

10.3 ห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งเป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการให้ได้ตามมาตรฐานสากล ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจย้อนกลับได้

11. คำขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างและวัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

12. เอกสารอ้างอิง

J. Takel and S. Hatrik, Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. *J.Chromatogr. A*, **733:1-2** (1996) 217-233.

A.Balinova et al., Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography–mass spectrometric and gas chromatography–electron capture detection of pesticide residues in crops. *J.Chromatogr. A*, **1150:1-2** (2007) 136-144.

O.Golge and B.Kabak, Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography–triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. *J. Food Compos. Anal.*, **41** (2015) 86-97.

R.P.Carneiro, Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *J.Food Control*, **33:2** (2013) 413-423.

ภาคผนวก

- สูตรการคำนวณหาน้ำหนักของสารมาตรฐานจากชั่งสารมาตรฐาน

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง} (mg) \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร} (\%) \times 10^3}{\text{ปริมาตรที่เตรียม} (ml) \times 100}$$

- สูตรการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (standard solution)

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของ สารตั้งต้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องนำมา (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (มิลลิลิตร)

- การประเมินค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993 คำนวณโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\%RSD}{\text{PredictedHorwitzRSD}}$$

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

C = concentration ratio

เกณฑ์ประเมิน precision : 1. HORRAT \leq 2 ; [AOAC]

2. % RSD \leq 21 ; [AOAC] ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

- ค่า %RSD ตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov.1993

ความเข้มข้นของ Analyte ในตัวอย่าง	Concentration ratio (C)	RSD %
100%	1	1.3
10%	0.1	2.8
1%	0.01	2.7
0.10%	0.001	3.7
100 ppm	10^{-4}	5.3
10 ppm	10^{-5}	7.3
1 ppm	10^{-6}	11
100 ppb	10^{-7}	15
10 ppb	10^{-8}	21

ความเข้มข้นของ Analyte ในตัวอย่าง	Concentration ratio (C)	RSD %
1 ppb	10 ⁻⁹	30

□ ค่า% recovery ตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov.1993

ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง	Recovery (%)
100%	98 - 102
10%	98 - 102
1%	97 - 103
0.10%	95 - 105
100 ppm	90 - 107
10 ppm	80 - 110
1 ppm	80 - 110
100 ppb	80 - 110
10 ppb	60 - 115
1 ppb	40 - 120

□ สูตรการคำนวณ t-test

$$t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{S_d}$$

โดยที่ \bar{d} = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง

n = จำนวนตัวอย่าง

S_d = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแตกต่าง

□ Precursor Ion และ Product Ion ของเครื่องลิวทิตโครมาโทกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (LC/MS/MS)

แบบ QQQ

สารประกอบ	Scan Segment 1			Scan Segment 2		
	MS1	MS2	Polarity	MS1	MS2	Polarity
	Prec Ion	Prod Ion		Prec Ion	Prod Ion	
Indoxacarb	528.1	203	Positive	528.1	203	Positive
Indoxacarb	528.1	150	Positive	528.1	150	Positive
Benfuracarb	411.2	252.1	Positive	411.2	252.1	Positive
Benfuracarb	411.2	195	Positive	411.2	195	Positive
Benfuracarb	411.2	162.1	Positive	411.2	162.1	Positive
Carbosulfan	381.2	160.2	Positive	381.2	160.2	Positive
Carbosulfan	381.2	118.1	Positive	381.2	118.1	Positive
Carbosulfan	381.2	76.1	Positive	381.2	76.1	Positive

Scan Segment 1				Scan Segment 2		
สารประกอบ	MS1	MS2	Polarity	MS1	MS2	Polarity
	Prec Ion	Prod Ion		Prec Ion	Prod Ion	
Thiodicarb	355.06	108.1	Positive	355.06	108.1	Positive
Thiodicarb	355.06	88.1	Positive	355.06	88.1	Positive
Iprovalicarb	321.2	202.9	Positive	321.2	202.9	Positive
Iprovalicarb	321.2	119	Positive	321.2	119	Positive
Thiobencarb	258.07	125.1	Positive	258.07	125.1	Positive
Pirimicarb	239.15	182.1	Positive	239.15	182.1	Positive
Pirimicarb	239.15	72.1	Positive	239.15	72.1	Positive
3-Hydroxy Carbofuran	238.11	181.09	Positive	238.11	181.09	Positive
3-Hydroxy Carbofuran	238.11	163.08	Positive	238.11	163.08	Positive
Oxamyl	237.1	90	Positive	237.1	90	Positive
Oxamyl	237.1	72	Positive	237.1	72	Positive
Carbofuran-3-keto	236.1	179.1	Positive	236.1	179.1	Positive
Carbofuran-3-keto	236.1	161.1	Positive	236.1	161.1	Positive
Methiocarb	226.1	169	Positive	226.1	169	Positive
(Mercaptodimethur)						
Methiocarb	226.1	121.1	Positive	226.1	121.1	Positive
(Mercaptodimethur)						
Ethiofencarb	226.09	107	Positive	226.09	107	Positive
Ethiofencarb	226.09	77	Positive	226.09	77	Positive
Aldicarb-sulfone	223.1	86.1	Positive	223.1	86.1	Positive
(Aldoxycarb)						
Aldicarb-sulfone	223.1	76	Positive	223.1	76	Positive
(Aldoxycarb)						
Carbofuran	222.1	165.1	Positive	222.1	165.1	Positive
Carbofuran	222.1	123.1	Positive	222.1	123.1	Positive
Omethoate	214	125	Positive	214	125	Positive
Omethoate	214	109	Positive	214	109	Positive
Fenobucarb (Baycarb)	208.1	152.1	Positive	208.1	152.1	Positive
Promecarb	208.1	151	Positive	208.1	151	Positive
Aldicarb	208.1	116.2	Positive	208.1	116.2	Positive
Promecarb	208.1	109.1	Positive	208.1	109.1	Positive
Fenobucarb (Baycarb)	208.1	95	Positive	208.1	95	Positive
Aldicarb	208.1	89.1	Positive	208.1	89.1	Positive
Fenobucarb (Baycarb)	208.1	77.1	Positive	208.1	77.1	Positive
Aldicarb-sulfoxide	207.1	131.9	Positive	207.1	131.9	Positive
Aldicarb-sulfoxide	207.1	89.1	Positive	207.1	89.1	Positive
Carbaryl	202.1	145.1	Positive	202.1	145.1	Positive
Carbaryl	202.1	127.1	Positive	202.1	127.1	Positive
Isoprocab	194.1	137.1	Positive	194.1	137.1	Positive
Isoprocab	194.1	95	Positive	194.1	95	Positive

Scan Segment 1				Scan Segment 2		
สารประกอบ	MS1 Prec Ion	MS2 Prod Ion	Polarity	MS1 Prec Ion	MS2 Prod Ion	Polarity
Isoprocab	194.1	77	Positive	194.1	77	Positive
Methomyl	163.1	106	Positive	163.1	106	Positive
Methomyl	163.1	88	Positive	163.1	88	Positive