

**รายงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด**  
**ปีงบประมาณ 2556**

1. ชื่อชุดโครงการ : วิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. ชื่อหัวหน้าชุดโครงการ : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตร ให้ถูกต้อง แม่นยำ ตามหลักสากล
- กิจกรรมที่ 1. การพัฒนาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
- กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง : 1.2.10 การศึกษาความคงตัว (Stability) ในการเก็บรักษา สารมาตรฐานกลุ่ม carbamate ที่อุณหภูมิต่างๆ
- ชื่อการทดลอง : The study stability of retention carbamate standard as various temperature
4. คณะผู้ดำเนินการ
- |                 |                          |                               |      |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|------|
| หัวหน้าการทดลอง | นางสาวระวีดา สุขประเสริฐ | กลุ่มวิจัยวัตถุพิษทางการเกษตร | สปผ. |
| ผู้ร่วมงาน      | นายยงยุทธ ไม้แก้ว        | กลุ่มวิจัยวัตถุพิษทางการเกษตร | สปผ. |
|                 | นายวีระสิงห์ แสงวรรณ     | กลุ่มวิจัยวัตถุพิษทางการเกษตร | สปผ. |

**Abstract**

To support the documentation in laboratory, TM-T04-R02, ISO/IEC 17025 Standard. The carbamate group (e.g. carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, carbaryl, isoprocarb, methiocarb, methomyl and promecarb) has been studied the stability by liquid chromatograph tandem spectrometry (LC-MS/MS) technique. The analysis has been applied to three types of solutions below:

- i) Primary Standard (expired 0 to > 3 years)
- ii) Intermediate Standard; study on the period of time by comparison to the fresh standard solution (0 - 7 months at -20 °C)
- iii) Working Standard; study on the period of time by comparison to the fresh working standard (0-75 days at -20 °C, 4 °C and 25 °C)

The results of stability study showed following

a) The results of Primary Standard have shown that the expired standard which not over than 3 years can be used in the laboratory analysis due to %Difference is 1.005-9.524, in the range (Refer to SANCO.2013, %Difference <10%) and %Relative response is 91.0-100.0 % . Meanwhile, the expired standard which over than 3 years cannot be used, due to %Difference is 22.222-85.714 that over range (>10%) and %Relative response is 40-80 %.

b) The results of Intermediate Standard have shown that all carbamate group did not decrease significantly in 0-6 months at -20 °C (%Difference = 0.125-9.189, %Relative response = 91.7- 103.9).

c) The results of Working Standard have shown that all of them can did not decrease in 0-4 weeks at -20 °C, in 0-2 weeks at 4 °C (except isoprocarb showed the stability at 0-3 weeks).

## 5. บทคัดย่อ

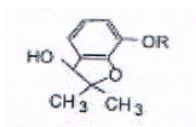
ศึกษาข้อมูลความคงตัว(stability) ในการเก็บรักษาสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, carbaryl, isoprocarb, methiocarb, methomyl และ promecarb ณ อุณหภูมิต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค liquid chromatograph tandem spectrometry(LC-MS/MS) เพื่อเปรียบเทียบอายุการใช้งานของสารละลายมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต และเป็นข้อมูลสนับสนุนเอกสารTM-T04-R02 ใช้ในห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐานของ ISO/IEC 17025 โดยเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานที่หมดอายุ และสารมาตรฐานที่ยังไม่หมดอายุ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ Intermediate Standard และ Working Standard ที่ระยะเวลาต่างๆ ในการเก็บรักษารวมถึงสภาวะที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สารละลายมาตรฐาน methiocarb, isoprocarb, carbaryl, promecarb, carbofuran และ methomyl ซึ่งมีค่า เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) ไม่เกิน 10% คือ 0.096, 8.333, 5.128, 5.128, 9.424 และ 9.424 ตามลำดับ และมีค่า Relative Response เท่ากับ 96.0, 92.0, 95.0, 95.0, 91.0 และ 91.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำมาใช้งานได้ เพราะมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference)ไม่เกิน 10% และ สารละลายมาตรฐานที่หมดอายุมากกว่า 3 ปีขึ้นไป ได้แก่ methiocarb และ carbofuran-3-hydroxy มีค่า เปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) เท่ากับ 22.222 และ 85.714 มีค่า Relative Response เท่ากับ 40.0 และ 80.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ (เกณฑ์ที่ยอมรับได้ เท่ากับ 10%, SANCO.2013) การศึกษาความคงตัวของ Intermediate standard ตรวจวิเคราะห์ที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เดือน เปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ (fresh intermediate) กับความเข้มข้นที่เก็บรักษาที่เวลาแตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงเดือนที่ 1-6 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 0.128-9.189 ซึ่งไม่เกิน 10% และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 91.7-

103.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และศึกษาความคงตัวของ working standard ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 วัน โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทดลองโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (Difference) พบว่า ที่ระยะเวลา 0-45 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 1.829-10.001 และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 90.5-98.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 °C, 4°C และ -20 °C ผลการทดลองพบว่าที่ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 4 สัปดาห์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 0.027-9.692 และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 92.6-110.7 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 0.117-9.815 มีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 91.1-106.2 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น isoprocarb มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) เท่ากับ 1.321 และมีค่า Relative Response เท่ากับ 101.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเก็บได้ 4 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 1.792-9.952 และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 90.9-98.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

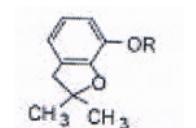
## 6. คำนำ

สารกลุ่มคาร์บาเมต เป็นสารสังเคราะห์จากสารอนุพันธ์ของสาร Physostigmine เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากพืช Calabar bean(Physostigma venenosum) ต่อมาการสังเคราะห์สาร Prostigmine ซึ่งเป็นสาร analogue ของ Physostigmine เป็นสารประกอบอีกกลุ่มหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการกำจัดแมลง อาการเป็นพิษเกิดขึ้นได้เร็วและสลายตัวเร็ว สารกลุ่มนี้มีคาร์บาริลรูปเป็นตัวหลักที่สำคัญที่รู้จักกันดีได้แก่ เมทโธมิล (methomyl), คาร์โบฟูราน(carbofuran), คาร์บาริล(carbaryl), เมทธิโอคาร์บ(methiocarb), โพรมีคาร์บ(promecarb) สารกลุ่มคาร์บาเมต มีผลต่อระบบประสาทในระยะสั้น มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase เช่นเดียวกับออร์กาโนฟอสเฟต แต่ระยะเวลาออกฤทธิ์ที่สั้น มีการตกค้างสั้น และสลายตัวได้อย่างรวดเร็วจึงมีฤทธิ์อ่อน ดังนั้นพิษที่เกิดขึ้นจึงไม่รุนแรง

1. carbofuran-3-hydroxy

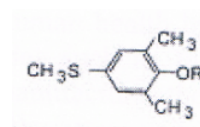


2. carbofuran

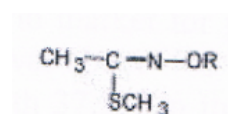


3. carbaryl

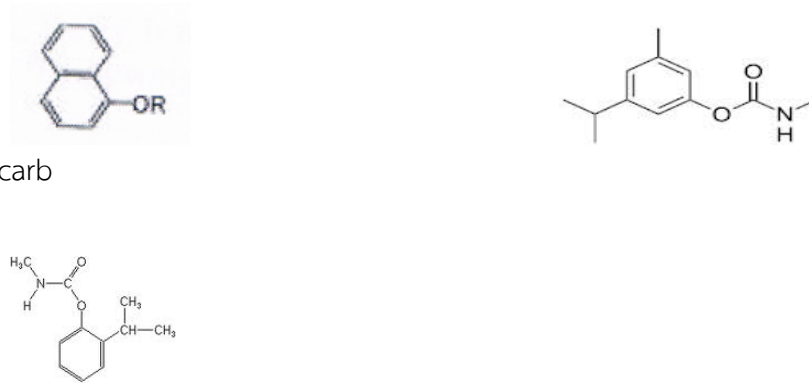
5. methiocarb



6. methomyl



7. promecarb



4. isoprocarb

ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารกลุ่มคาร์บาเมต

carbofuran สารคาร์โบฟูรานหรือที่คนไทยเรารู้จักกันในชื่อ พูราดาน นั้นเอง คาร์โบฟูราน(carbofuran) เป็นยาเม็ดสีม่วง ที่มีคุณลักษณะดูดซึมทางรากเท่านั้น สารคาร์โบฟูรานเป็นสารพิษที่ถูกใช้เหมือนยาสามัญประจำบ้าน และมีการใช้มาอย่างยาวนาน ทั้งที่ผู้ใช้อาจรู้และไม่รู้ถึงพิษภัยของสารเคมีตัวนี้เลย เพราะเป็นสารเคมีปราบศัตรูพืชชนิดแรกๆที่นำเข้ามาจากต่างประเทศมาใช้ในประเทศไทย สารคาร์โบฟูรานมีชื่อทางการค้ามากมายหลายชื่อ นำเข้ามาจากประเทศจีน อินเดียเอเชีย เวียดนามเป็นหลัก นิยมใช้รองกันหลุมในการปลูกพืช และโรยเพื่อกำจัดมดแมลง สารคาร์โบฟูรานนั้น มีปริมาณการตกค้างสูงเกินกว่าสารกำจัดศัตรูพืชที่กำหนดให้มีได้ในพืชผลเกษตร ซึ่งหากได้รับสารเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดดม หรือกลืนกินเข้าไป จะเกิดอาการวิงเวียน เหงื่อแตก อาเจียน กล้ามเนื้อเกร็ง น้ำลายฟูมปาก และอาจหมดสติได้ อีกทั้งยังมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม กล่าวคือ เป็นยาเม็ดที่ดูเหมือนเมล็ดของพืช จึงทำให้คนมาเก็บกินได้ง่าย ยาคาร์โบฟูราน หนึ่งเม็ดสามารถฆ่านกได้หนึ่งตัว เมื่อนกตายสัตว์อื่นที่มากินซากนกก็จะได้รับการถ่ายทอดสาร คาร์โบฟูราน ต่อไป

methomyl เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร (pesticides) ในกลุ่มคาร์บาเมต ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดแมลงที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ใช้ฆ่าแมลงศัตรูพืชในผลิตผลทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ และเมล็ดพืชที่เป็นอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์ปีก ปศุสัตว์ และสัตว์เลี้ยง เพื่อกำจัดแมลงรบกวน และยังใช้กำจัดหอยทากและหนอนตัวกลม (nematodes) บางชนิดได้ มีค่า LD<sub>50</sub> เท่ากับ 17-24 มิลลิกรัมยังการทำงานของเอนไซม์คอลีนเอสเทอเรสแบบชั่วคราว ระยะเวลาออกฤทธิ์สั้น และสลายตัวได้เร็ว ทำให้ความเป็นพิษลดลง เมื่อได้รับทางปาก ผิวหนัง และสูดดมจะมีอาการมึนงง ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย กระวนกระวาย ม่านตาหรี่ คลื่นไส้ อาเจียน น้ำตา และน้ำลายไหล เหงื่อออกมาก ปวดท้องเกร็ง ชีพจรเต้นช้า กล้ามเนื้อเกร็ง

isoprocarb(ไอโซโพรคาร์บ) หรือ เอ็มไอพีซี(MIPC) เป็นสารกำจัดแมลงคาร์บาเมต ออกฤทธิ์ในทางสัมผัสและการกิน มีพิษเฉียบพลันทางปาก เช่น (หนู) 485 มก./กก. ทางผิวหนัง (หนู) มากกว่า 500 มก./กก. ศัตรูพืชที่กำจัดได้แก่ เพลี้ยจักจั่นชนิดต่าง ๆ เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว เพลี้ยจักจั่นมะม่วง เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ และแมลงทั่วไป พืชที่ใช้ เช่น ข้าว มะม่วง ฝ้าย กาแฟ มันฝรั่ง อ้อย ถั่วลิสง ไม้ผลทั่วไป ไม้ดอกและไม้ประดับ อาการเกิดพิษคือ ทำให้เกิดอาการระคายเคืองที่ผิวหนัง นัยน์ตา เยื่อบุจมูก ถ้าซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกาย เมื่อออกฤทธิ์ ร่างกายจะมีอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน เหงื่อออกมาก

น้ำลายไหล ม่านตาหรี่ ปวดท้องและมีอาการท้องเดิน กล้ามเนื้อบิดเกร็ง ทำให้พูดและเดินลำบาก ไม่รู้สึกตัว และอาจมีอาการชัก-ออกฤทธิ์ตกค้างอยู่ได้นานปานกลาง

methiocarb(เมทธิโอคาร์บ) หรือมีชื่อทางการค้าว่า เมซูโรล ไบโซล ความเป็นพิษ LD<sub>50</sub> 15-35 (mg/kg) มักใช้ฆ่าแมลงศัตรูพืชในผลิตผลทางการเกษตร เช่น ผัก ผลไม้ และเมล็ดพืชที่เป็นอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้กับสัตว์ปีก ปศุสัตว์ และสัตว์เลื้อย เพื่อกำจัดแมลงรบกวน และยังใช้กำจัดหอยทากและหนอนตัวกลม (nematodes) บางชนิดได้

promecarb(โพรเมคาร์บ) เป็นสารกำจัดเชื้อราในกลุ่ม carbamate ประเภทดูดซึม ออกฤทธิ์ให้ผลในทางป้องกันโรคพืชสามารถดูดซึมเข้าไปในต้นโดยทางรากเคลื่อนย้ายไปอยู่ที่ใบพืชความเป็นพิษมีพิษเฉียบพลันทางปาก 7,860 มก/กก. (หนู) ทางผิวหนัง มากกว่า 3,600 (กระต่าย) ใช้เป็นสารป้องกันโรคพืชใช้ร่วมกับสารกำจัดเชื้อราอย่างอื่นเพื่อเพิ่มขอบเขตการกำจัดโรคพืช ไม่เป็นพิษต่อปลาและสัตว์ป่า ออกฤทธิ์ตกค้างอยู่ได้ 10-21 วัน  
อ้างอิง: สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย, ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์ ฝ่ายสารวัตรเกษตร กองควบคุมโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

carbaryl หรือ ชื่อการค้า- เซฟวิน85, เอส85 เป็นสารกำจัดแมลงคาร์บาเมต ออกฤทธิ์ในทางสัมผัสและกินตายศัตรูพืชที่กำจัดได้พลัยอ่อน พลัยจ๊กจั่น พลัยหอย พลัยแป้ง มวนแดงฝ้าย มวนเขียวตักแตน หนอนม้วนใบ หนอนคืบ หนอนเจาะพสมอเมริกัน หนอนเจาะสมอสีชมพูหนอนกระตุ้งหมัดผักกาด หนอนกอลาย หนอนกอสีขาว รวมทั้งแมลงศัตรูคนและสัตว์ เช่น แมลงสาบ มด แมลงวันเห็บสุนัข ตัวสามง่ามหมัด เหา ดั๋งวงงข้าว มอดแป้ง และผีเสื้อข้าวเปลือก ระยะเวลาที่ใช้ก่อนเก็บเกี่ยว ผลไม้7 วัน ผัก 14วัน ห้ามผสมกำสารที่มีสภาพเป็นด่างเป็นพิษต่อผึ้งและแมลงอื่นๆที่ช่วยในการผสมเกสรอย่าใช้ในเวลาที่ต้นไม้ออกดอก ความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น

การวิเคราะห์หรือการทดลองในห้องปฏิบัติการ จำเป็นอย่างยิ่งที่ผลการทดลองที่ได้จะต้องมีความถูกต้องแม่นยำ โดยเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ทดลอง อุปกรณ์การทดลองจะต้องมีการ Calibrate อยู่เสมอ ตลอดจนสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนั้น จะต้องมั่นใจว่าสามารถใช้ในการทดลองได้ กล่าวคือ มีอายุการใช้งานที่เหมาะสม ซึ่งสารมาตรฐานมีราคาค่อนข้างแพงและมีอายุการใช้งานน้อย ดังนั้นในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษา เพื่อเปรียบเทียบอายุการใช้งาน และสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต จำนวน 7 ชนิด ซึ่งสภาวะที่ใช้ในการศึกษา ทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย ระยะเวลาในการเก็บรักษา และอุณหภูมิต่างๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษา ทั้งที่เป็น Primary Standard, Intermediate Standard และ working Standard โดยสภาวะที่กล่าวถึงนี้จะมีผลต่ออายุของสารละลายมาตรฐาน และเพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนคู่มือคุณภาพ TM-T04-R02 เพื่อกำหนดอายุของสารมาตรฐานกลุ่ม carbamate ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานของ ISO/IEC 17025 ตลอดจนเป็นข้อมูลอ้างอิงให้กับห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐและเอกชนเพื่อนำไปใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

## 7. วิธีดำเนินการ

### 7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 7.1.1 Auto pipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร, 100-1,000 ไมโครลิตร
- 7.1.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง
- 7.1.3 เครื่อง vortex mixture
- 7.1.4 ตู้เย็น ตู้ incubator, freezer ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
- 7.1.5 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker, cylinder, pipette
- 7.1.6 ขวดบรรจุตัวอย่างสำหรับฉีดเครื่อง LC-MS/MS ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 7.1.7 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิด LC-MS/MS

## 7.2 สารเคมี

7.2.1 สารมาตรฐานกลุ่ม carbamate จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, carbaryl, isoprocarb, methiocarb, methomyl และ promecarb

7.2.2 สารเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ Acetonitrile HPLC grade

## 7.3 วิธีการ

### 7.3.1 วางแผนการดำเนินการ

ศึกษาข้อมูลความคงตัว(Stability) ในการเก็บรักษาสารมาตรฐาน กลุ่ม carbamate ที่อุณหภูมิต่างๆ รวมถึงเอกสารที่เกี่ยวข้อง ตรวจสอบสารมาตรฐานที่มีอยู่ บันทึกวันหมดอายุ ปริมาณสาร (จัดซื้อเพิ่มเติมกรณีที่ยังไม่มีสารที่ยังไม่หมดอายุสำหรับการเปรียบเทียบ) และวางแผนการทดลอง เตรียมวัสดุอุปกรณ์เพื่อใช้ในการทดลอง เตรียมความพร้อมของเครื่อง LC-MS/MS โดยปรับสภาวะของเครื่องให้เหมาะสมกับวิธีการวิเคราะห์โดยฉีดสารละลายมาตรฐานเพื่อทดสอบสภาวะและการทำงานของเครื่อง

### 7.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock standard

เตรียม stock standard (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 mg/l) จากสารมาตรฐานบริสุทธิ์ที่หมดอายุ และสารมาตรฐานที่ยังไม่หมดอายุ และนำไปเตรียมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ intermediate standard(ความเข้มข้น 100 ppm) และ working standard(ความเข้มข้น 0.1 ppm) ตรวจวิเคราะห์ working standard ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เปรียบเทียบความแตกต่างของสัญญาณ(respond) ของสารมาตรฐานที่หมดอายุ กับ สารมาตรฐานที่ยังไม่หมดอายุ โดยสัญญาณที่ได้ต้องแตกต่างกันไม่เกิน 10 %

7.3.3 นำสารมาตรฐานที่เตรียมไว้ ที่ยังไม่หมดอายุ มาเตรียม Mix intermediate standard solution และ working standard แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 25 °C, 4 °C และ -20 °C เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้

- Intermediate standard ตรวจวิเคราะห์ที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 เดือน
- Working standard solution ตรวจวิเคราะห์ที่ 0, 15, 30, 45 และ 60 วัน และที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 °C, 4 °C และ -20 °C โดยศึกษาที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของสัญญาณ (respond) ที่ได้กับสารมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ แปรผลข้อมูลและสรุปข้อมูลหรือประเมินอายุของสารมาตรฐานกลุ่ม carbamate และรายงานผลการทดลอง ที่ระยะเวลาต่างๆ

รายละเอียดและสภาวะการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS มีรายละเอียด ดังนี้

LC-MS/MS determination for carbamate

1. Equipment: LC-MS/MS Agilent 1100 series
2. Column: Agilent Eclipse Plus C18, 1.8  $\mu$ m 4.6x75 mm
3. Mobile phase:
  - a. A: 5 mM Ammonium Formate Buffer: 80
  - b. B: Acetonitrile: 20
  - c. Time table: 

time (min)	A (%)	B (%)	flow
0.00	80	20	0.3
3.00	80	20	0.3
5.00	60	40	0.3
7.00	40	60	0.3
10.00	20	80	0.3
13.00	20	80	0.3
15.00	80	20	0.3
4. Flow: 0.3 mL/min, Temp. 40 °C, Injection volume: 2  $\mu$ l

8. ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2555 - กันยายน 2556

9. สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

## 10. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบ Stability test

10.1 ศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน กลุ่มคาร์บาเมต ที่มีวันหมดอายุที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน กลุ่มคาร์บาเมต จำนวน 7 ชนิด ที่เป็น Primary standard โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่หมดอายุกับสารละลายมาตรฐานที่ไม่หมดอายุ พบว่า สารละลายมาตรฐานที่หมดอายุ 1 ปี ได้แก่ isoprocarb สารละลายมาตรฐานที่หมดอายุ 2 ปี ได้แก่ carbaryl และ promecarb สารละลายมาตรฐานที่หมดอายุ 3 ปี ได้แก่ carbofuran และ methomyl จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) ไม่เกิน 10% คือ 8.333, 5.128, 5.128, 9.424 และ 9.424 ตามลำดับ และมีค่า Relative Response เท่ากับ 92.0, 95.0, 95.0, 91.0 และ 91.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารละลายมาตรฐานที่มีอายุมากกว่า 3 ปีขึ้นไป และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) เกินกว่า 10% ได้แก่ methiocarb ซึ่งหมดอายุ 7 ปี คือ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) เท่ากับ 22.222 ค่า Relative Response เท่ากับ 80.0 เปอร์เซ็นต์ และ carbofuran-3-hydroxy หมดอายุ 9 ปี มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง

(Difference) เท่ากับ 85.714 มีค่า Relative Response เท่ากับ 40.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ (เกณฑ์ที่ยอมรับได้ เท่ากับ 10%, SANCO.2013) ดังนั้นห้องปฏิบัติการสามารถใช้สารมาตรฐาน กลุ่มคาร์บาเมตที่หมดอายุแล้วไม่เกิน 3 ปี ในการตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** แสดงผลการเปรียบเทียบความแตกต่าง (%Difference & Relative Response Compared with Fresh) ของสารละลายมาตรฐาน กลุ่มคาร์บาเมต ที่หมดอายุ กับ ที่ไม่หมดอายุ ดังนี้

ชื่อสารมาตรฐาน	Lot number	เดือน ปี ที่หมดอายุ	จำนวนปีที่หมดอายุ	ความเข้มข้นที่ตรวจพบ (mg/L)	% Difference	Relative Response Compared with fresh	Can be used?
Carbofuran-3-hydroxy	10301	มี.ค. 2558	-	0.100	0.000	100.0	Yes
	01030	ธ.ค. 2547	9	0.040	85.714	40.0	No
Carbofuran	10911	ก.ย. 2560	-	0.100	0.000	100.0	Yes
	80820	ก.ย. 2555	1	0.110	9.524	110.0	Yes
	40311	มี.ค. 2553	3	0.091	9.424	91.0	Yes
	20312	มี.ค. 2551	5	0.07	35.294	70.0	No
Carbaryl	00609	ส.ค. 2557	-	0.100	0.000	100.0	Yes
	90306	มี.ค. 2556	0	0.100	0.000	100.0	Yes
	70319	พ.ค. 2554	2	0.095	5.128	95.0	Yes
Isoprocarb	90810	ก.ย. 2556	-	0.100	0.000	100.0	Yes
	80327	เม.ย. 2555	1	0.092	8.333	92.0	Yes
Methiocarb	10630	ส.ค. 2560	-	0.100	0.000	100.0	Yes
	254-94B	พ.ย. 2556	0	0.099	1.005	99.0	Yes
	70131	ก.พ. 2556	0	0.096	4.082	96.0	Yes
	20712	ก.ค. 2549	7	0.080	22.222	80.0	No
Methomyl	00908	ม.ค. 2558	-	0.100	0.000	100.0	Yes
	71220	ม.ค. 2555	1	0.093	7.254	93.0	Yes
	60421	ม.ค. 2553	3	0.091	9.424	91.0	Yes
	301-7B	มี.ค. 2552	4	0.080	22.222	80.0	No
	30617	ก.ค. 2550	6	0.070	35.294	70.0	No
	265-65B	มิ.ย. 2550	6	0.065	42.424	65.0	No
Promecarb	90924	พ.ย. 2556	-	0.100	0.000	100.0	Yes



	70104	ม.ค. 2554	2	0.095	5.128	95.0	Yes
--	-------	-----------	---	-------	-------	------	-----

10.2 ศึกษาความคงตัวของ Intermediate standard กลุ่มคาร์บาเมต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ

จากการศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน กลุ่มคาร์บาเมต จำนวน 7 ชนิด โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบความเข้มข้นระหว่างสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นใหม่ (fresh intermediate) กับความเข้มข้นที่เก็บรักษาที่เวลาแตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลอง สารละลาย Intermediate ที่ระยะเวลาต่างๆ ในช่วงเดือนที่ 1-6 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 0.128-9.189 ซึ่งไม่เกิน 10% (เกณฑ์ที่ยอมรับได้ เท่ากับ 10%, SANCO.2013) และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 91.7- 103.9 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแสดงว่าในการทดลองนี้สารละลายมาตรฐานมีอายุ 6 เดือน โดยการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 2 และ 3

**ตารางที่ 2** การเปรียบเทียบความแตกต่าง (%Difference) ของสารละลายมาตรฐาน Intermediate Carbamate ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ

(% Difference)								
Compound	t=1 m	t=2 m	t=3 m	t=4 m	t=5 m	t=6 m	t=7 m	Final concluded stability
Carbofuran-3-Hydroxy	0.524	0.125	0.348	8.615	3.293	2.590	23.308	6 m
Carbofuran	1.998	0.258	1.750	7.347	1.908	2.317	13.497	6 m
Cabaryl	1.490	0.691	0.267	8.587	0.530	3.121	19.351	6 m
Isoprocarb	1.370	0.128	0.548	7.251	0.214	3.870	26.104	6 m
Methiocarb	0.753	0.206	2.486	6.242	0.343	3.376	17.772	6 m
Methomyl	1.734	1.028	1.014	4.471	1.980	1.499	16.728	6 m
Promecarb	1.487	0.350	0.382	9.189	0.273	2.452	13.685	6 m

**ตารางที่ 3** การเปรียบเทียบ % Relative response compared with t=0 (%) ของสารละลายมาตรฐาน Intermediate Carbamate ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ

Relative response compared with t=0 (%)								
Compound	t=1 m	t=2 m	t=3 m	t=4 m	t=5 m	t=6 m	t=7 m	Final concluded stability
Carbofuran-	99.5	99.9	100.3	91.7	103.3	102.6	79.1	6 m

3-Hydroxy								
Carbofuran	98.0	99.7	101.8	92.9	98.1	102.3	87.4	6 m
Cabaryl	98.5	99.3	100.3	91.8	100.5	103.2	82.4	6 m
Isoprocarb	98.6	100.1	99.5	93.0	99.8	103.9	76.9	6 m
Methiocarb	99.2	99.8	102.5	93.9	99.7	103.4	83.7	6 m
Methomyl	98.3	101.0	101.0	95.6	98.0	101.5	84.6	6 m
Promecarb	98.5	99.7	100.4	91.2	100.3	102.5	87.2	6 m

### 10.3 ศึกษาความคงตัวของ working standard กลุ่มคาร์บาเมต ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากการศึกษาความคงตัวของ working standard ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 15, 30, 45, 60 และ 75 วัน โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) พบว่า ที่ระยะเวลา 0-45 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 1.829-10.001 ซึ่งไม่เกิน 10% (เกณฑ์ที่ยอมรับได้ เท่ากับ 10%, SANCO.2013) และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 90.5-98.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าในการทดลองนี้ working standard มีอายุการใช้งาน 45 วัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

### ตารางที่ 4 ศึกษาความคงตัวของ working standard กลุ่มคาร์บาเมต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ ณ อุณหภูมิ -20 °C

		Carbofuran-3-Hydroxy	Carbofuran	Cabaryl	Isoprocarb	Methiocarb	Methomyl	Promecarb
Day 0	%Difference	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	%Relative response	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Day 15	%Difference	2.956	2.237	1.829	2.442	2.033	3.162	2.064
	%Relative response	97.1	97.8	98.2	97.6	98.0	96.9	98.0
Day 30	%Difference	4.826	3.991	4.408	4.303	3.991	4.617	4.199
	%Relative response	95.3	96.1	95.7	95.8	96.1	95.5	95.9
Day 45	%Difference	8.654	7.761	6.687	5.775	6.195	10.001	6.195
	%Relative response	91.7	92.5	93.5	94.4	94.0	90.5	94.0
Day 60	%Difference	15.045	17.445	15.714	16.473	14.155	13.076	13.078
	%Relative response	86.0	84.0	85.4	84.8	86.8	87.7	87.7
Day	%Difference	27.064	22.915	25.427	28.444	22.102	18.536	17.531

75	%Relative response	76.2	79.4	77.4	75.1	80.1	83.0	83.9
Final concluded stability		45 days	45 days	45 days	45 days	45 days	45 days	45 days

10.4 ศึกษาความคงตัวของ working standard กลุ่มคาร์บาเมต ที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 °C, 4 °C และ -20 °C

จากการศึกษาความคงตัวของ working standard ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25 °C, 4 °C และ -20 °C จากผลการทดลองที่ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 4 สัปดาห์ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (Difference) อยู่ในช่วง 0.027-9.692 และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 92.6-110.7 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (Difference) อยู่ในช่วง 0.117-9.815 มีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 91.1-106.2 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น isoprocarb มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (Difference) เท่ากับ 1.321 และมีค่า Relative Response เท่ากับ 101.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถเก็บได้ 4 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (Difference) อยู่ในช่วง 1.792-9.952 และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 90.9-98.2 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้ แสดงว่าควรเก็บรักษา working standard ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ถึงจะมีความคงทนสามารถเก็บรักษาได้ถึง 1 เดือน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ศึกษาความคงตัวของ working standard กลุ่มคาร์บาเมต ที่อุณหภูมิต่างๆ

1) ที่อุณหภูมิ -20 °C

	t=1 w		t=2 w		t=3 w		t=4 w		Final concluded stability
	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	
Carbofuran -3-Hydroxy	7.958	92.6	9.692	110.7	7.522	93.0	4.327	95.9	4 w
Carbofuran	5.033	95.2	9.654	110.7	3.864	96.3	4.190	96.0	4 w
Cabaryl	2.945	103.0	8.009	108.7	4.653	95.6	3.949	96.2	4 w
Isoprocarb	6.534	107.0	6.571	107.0	4.343	95.8	3.172	96.9	4 w
Methiocarb	0.027	100.0	7.378	108.0	7.410	93.1	7.385	93.1	4 w
Methomyl	1.244	98.8	8.727	109.6	5.810	94.5	3.717	96.4	4 w
Promecarb	0.471	100.5	5.785	106.1	6.066	94.3	6.365	94.0	4 w

2) ที่อุณหภูมิ 4 °C

	t=1 w		t=2 w		t=3 w		t=4 w		Final concluded stability
	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	

Carbofuran-3-Hydroxy	1.044	101.1	8.991	91.8	9.815	91.1	11.542	89.7	3 w
Carbofuran	0.117	99.9	0.647	99.4	2.973	97.1	12.476	88.9	3 w
Cabaryl	0.982	99.0	1.833	101.9	1.387	98.6	12.593	88.8	3 w
Isoprocarb	0.605	99.4	5.866	106.2	2.608	102.7	1.321	101.3	4 w
Methiocarb	1.193	98.8	1.266	98.8	6.068	94.3	11.175	89.9	3 w
Methomyl	1.096	98.9	2.339	97.7	4.498	95.7	11.718	89.5	3 w
Promecarb	1.157	98.9	0.265	99.7	2.457	97.6	12.881	88.6	3 w

### 3) ที่อุณหภูมิ 25 °C

	t=1 w		t=2 w		Final concluded stability
	%Diff	%Relative response	%Diff	%Relative response	
Carbofuran-3-Hydroxy	7.818	92.7	7.178	93.3	2 w
Carbofuran	7.809	92.8	8.160	92.5	2 w
Cabaryl	8.473	92.2	5.298	95.0	2 w
Isoprocarb	8.376	92.3	1.792	98.2	2 w
Methiocarb	9.449	91.4	9.067	91.7	2 w
Methomyl	8.813	91.9	9.952	90.9	2 w
Promecarb	7.863	92.7	8.957	91.8	2 w

## 11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาความคงตัว (Stability) ในการเก็บรักษา สารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ carbofuran-3-hydroxy, carbofuran, carbaryl, isoprocarb, methiocarb, methomyl และ promecarb ที่ระยะเวลาและที่อุณหภูมิต่างๆ ทำให้ได้ข้อมูลความคงตัวของสารกลุ่มนี้ โดยผลการทดลองสารละลายมาตรฐานที่หมดอายุกับสารละลายมาตรฐานที่ไม่หมดอายุ พบว่า สารละลายมาตรฐานที่หมดอายุไม่เกิน 3 ปี สามารถยอมรับและนำกลับมาใช้ได้ สำหรับการศึกษาคงตัวของ Intermediate ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับสารละลาย Intermediate ที่เตรียมขึ้นใหม่ทุกครั้ง พบว่า สารละลายมาตรฐาน Intermediate สามารถเก็บรักษาได้ที่ระยะเวลา 6 เดือน เนื่องจาก มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 0.125-9.189 ซึ่งไม่เกิน 10% (เกณฑ์ที่ยอมรับได้ เท่ากับ 10%, SANCO.2013) และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 91.7- 103.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาคงตัวของ working standard ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 1 เดือน เนื่องจากมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) อยู่ในช่วง 0.027-9.692 และมีค่า Relative Response อยู่ในช่วง 92.6-110.7 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ ยกเว้น isoprocarb ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง(Difference) เท่ากับ 1.321 ซึ่งสามารถเก็บได้ 3 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ที่ระยะเวลา 1 สัปดาห์ ตามลำดับ จาก การทดลองนี้ แสดงว่าควรเก็บรักษา working standard ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จึงจะมีความเหมาะสม

สารละลายไม่เสื่อมสภาพ อย่างไรก็ตามเนื่องจากระยะเวลาในการศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต ในงานวิจัยนี้ มีระยะเวลาเพียง 1 ปี ซึ่งอาจทำให้ได้ข้อมูลไม่มากเพียงพอ ดังนั้นถ้าสามารถขยายระยะเวลาในการศึกษาให้มากกว่านี้ ผู้ทดลองจะสามารถทำการทดลองหลายๆ ซ้ำได้ ทำให้ข้อมูลที่ได้น่าจะมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์อาจมีความคลาดเคลื่อนได้เนื่องจาก ในระหว่างทำการทดลอง มีการทำ PM หรือ OQPV ทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องมือเปลี่ยนไปหรือไม่คงที่ ดังนั้นหากมีการศึกษา stability อีกควรมีการ Calibrate เครื่องมือให้เรียบร้อยก่อนการศึกษาเสมอ

## 12. การนำไปใช้ประโยชน์

12.1 ข้อมูลที่ได้จากการวิจัย สามารถเป็นแนวทางในการ เก็บรักษาสารละลายมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมต ที่เหมาะสม สำหรับผู้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

12.2 นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความคงตัว(Stability) ของสารกลุ่มคาร์บาเมต ไปใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนอ้างอิงในเอกสารคู่มือคุณภาพ TM-T04-R02 เพื่อกำหนดอายุของสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมตที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานของ ISO/IEC 17025

12.3 จัดทำเป็นเอกสารเผยแพร่ เพื่อเป็นแนวทางให้ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งในภาครัฐและเอกชนนำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

## 13. เอกสารอ้างอิง

ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์. สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย ฝ่ายสารวัตรเกษตร กองควบคุมโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

ประกาศี่ ฎวเสถียร และ ครรชิต จุดประสงค์. 2555. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ :สถิติที่ใช้ในการจัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญ. สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล

Horwitz, W. and Alibert,R. 2006. The Horwitz ratio(Horrat) : a useful index of method performance with respect to precision. Journal of AOAC International. 89,4, 2006, 1095-1108.

ISO 13528. 2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO, Geneva, Switzerland.

ISO Guide 35. 2006. Reference materials-General and statistical principles for certification. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland

Sango.2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.