

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย :** การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
2. **โครงการวิจัยกิจกรรม :** การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล

กิจกรรม : -

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม carbamate ในพริกเพื่อขอการรับรองห้องปฏิบัติการของสวพ. 2 (2556)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Method Validation for the Determination of Carbamate in Chilli
รหัสการทดลอง 03-06-54-06-01-02-23-56

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวพรศิริ สายะพันธ์

ผู้ร่วมงาน นางสาวสุธินี สาสีลัง

นางสาวเบญจมาศ ใจแก้ว

นางสาววิภาพร เกียรตินิติประวัติ

5. บทคัดย่อ

การทดลองฉบับนี้ได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก 9 ชนิด ได้แก่ แอลดีคาร์บ, คาร์บาริล, คาร์โบฟูแรน, คาร์โบฟูแรน-3-ไฮดรอกซิล, ฟิโนบูคาร์บ, ไอโซโฟรคาร์บ, เมโทมิล, เมทีโอคาร์บ, โพรมีคาร์บ เพื่อขอการรับรองห้องปฏิบัติการของสวพ.2 ซึ่งเป็นกระบวนการที่พิสูจน์ว่าวิธีการวิเคราะห์มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้งานหรือไม่ ซึ่งคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ ช่วงการใช้งาน (Working Range), ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity), ความแม่นยำ (Accuracy), ความเที่ยง (Precision), ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection), และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation) เทคนิคการเตรียมตัวอย่างสำหรับใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก คือ liquid liquid extraction (LLE) และ dispersive solid phase extraction (d-SPE) ซึ่งดัดแปลง

มาจากวิธี Steinwandter H. กับวิธี QuEChERS ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph) ผลการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธีโดยการหาค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 60-120%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 70-94%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 70-93% ซีดจำกัดของการตรวจพบมีค่า 0.005µg/g ยกเว้นเมโทมิลมีค่า 0.007µg/g, ซีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณมีค่า 0.01 µg/g ยกเว้นเมโทมิลมีค่า 0.02µg/g, ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ประเมินค่าได้น้อยกว่า 2 ทุกตัว และมีช่วงการใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริกที่ 0.01-1.50µg/g สรุปได้ว่าแนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริกสามารถประยุกต์ใช้กับการปฏิบัติงานจริงได้

6. คำนำ

ปัจจุบันการดำเนินกิจกรรมหลายๆ อย่างต้องอาศัยผลการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์จากห้องปฏิบัติการ ซึ่งผลการวิเคราะห์ทดสอบต่างๆ เหล่านี้จะมีผลกระทบโดยตรงต่อการนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ประโยชน์ ผู้ทำการวิเคราะห์จึงต้องวิเคราะห์ให้ได้ผลที่มีความถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือ ดังนั้นเพื่อเป็นการตอบสนองต่อความต้องการของลูกค้า ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จึงต้องแสดงความเป็นมืออาชีพในงาน โดยการรายงานผลที่ชัดเจน และสรุปผลอย่างเหมาะสม ที่สำคัญห้องปฏิบัติการต้องมีหลักฐานที่แสดงว่าวิธีที่วิเคราะห์มีความเหมาะสมตรงตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ นั่นก็คือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนนำไปใช้งาน เพื่อให้ผู้ใช้ผลการทดสอบมีความมั่นใจ และช่วยลดข้อผิดพลาดในการตัดสินใจ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก กรมวิชาการเกษตร ได้ตระหนักความสำคัญดังกล่าว จึงได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก เพื่อเป็นการสร้างหลักประกันคุณภาพผลการวิเคราะห์ว่ามีความถูกต้อง น่าเชื่อถือตามหลักวิชาการ นอกจากนี้เพื่อเตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติในการยื่นขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC17025 ต่อไป หวังเป็นอย่างยิ่งว่าการทดลองฉบับนี้จะทำให้ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรและลูกค้าได้รับประโยชน์และความสะดวกในการให้บริการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

7. วิธีการดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

7.1.1 เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ยี่ห้อ Agilent technologies รุ่น 1100 แบบ Quaternary pump ประกอบด้วย FLD detector ที่ต่อเข้ากับเครื่อง Post column derivatizer ยี่ห้อ Pickering Laboratories-PCX 5200 ใช้สำหรับวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมท

7.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo ช่วงการใช้งาน 0.5- 1500 กรัม

7.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo ช่วงการใช้งาน 10 มิลลิกรัม- 220 กรัม

7.1.4 เครื่องลดปริมาตรตัวทำละลายแบบลดความดัน (Rotavapor Evaporator) ยี่ห้อ Buchi mode R-200 model B-490 rang 20-180 °C พร้อม cooling system รุ่น CTL 911

7.1.5 เครื่องลดปริมาตรตัวทำละลายแบบ Nitrogen-Evaporator (N₂-Evaporator) ยี่ห้อ Organomation Associates Inc.

7.1.6 เตาอบ (Oven) ยี่ห้อ Memmert ชนิด/แบบ UE600 5 °C – 350 °C

7.1.7 เครื่องปั่นตัวอย่าง (Food chopper) ยี่ห้อ Robot coupe รุ่น R201 Ultra

7.1.8 เครื่องผสมตัวอย่าง (Homogenizer) ยี่ห้อ IKA Model T25 basic ความเร็วรอบ 8,000 - 24,000 รอบ/วินาที

7.1.9 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) ยี่ห้อ Napco millenium-2028R รุ่น 2028R

7.1.10 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ยี่ห้อ Labnet รุ่น VX 100

7.1.11 อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Solvent dispenser) ขนาด 10 mL, 50 mL, 100 mL

7.1.12 ปิเปตดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ (Automatic pipette) ช่วงการใช้งาน 10-100µL, 200-1000 µL, 1-10 mL

7.1.13 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 25 mL

7.1.14 ขวดแก้วรูปชมพู่ ฝาเกลียว (Erlenmeyer flask with screw cap) ขนาด 250 mL

7.1.15 ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 100, 500 mL

7.1.16 ขวดก้นสารก้นแบน (Flat bottom flask) ขนาด 250 mL

7.1.17 กรวยแก้ว (Glass funnel) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 mm

7.1.18 ขวดแลป (Laboratory bottle) ขนาด 250 mL

7.1.19 หลอดเซนตริฟิวพลาสติกแบบมีฝาปิด (Centrifuge Tube) ขนาด 15 mL

7.1.20 Autosampler vial ขนาด 2 mL

7.1.21 Syringe filter; Membrane Nylon, Pore size 0.2 μ m, Diameter 13 mm

7.2 สารเคมี

สารมาตรฐานและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองนี้ แสดงในตาราง 7.1 และ 7.2

ตาราง 7.1 รายการสารมาตรฐาน^a

Chemicals	%Purity
1) Aldicarb	98.7
2) Carbaryl	99.5
3) Carbofuran	98.7
4) Carbofuran-3 OH	97.5
5) Fenobucarb	91.8
6) Isoprocarb	95.5
7) Methomyl	94.5
8) Methiocarb	99.5
9) Promecarb	98.8

^a all pesticides were supplied from Dr. Ehrenstorfer (Germany)

ตาราง 7.2 รายการสารเคมี

Chemicals	Suppliers
1) Acetone (analytical grade)	J.T.Baker (USA)
2) Dichloromethane (analytical grade)	J.T.Baker (USA)
3) Acetonitrile (analytical grade)	J.T.Baker (USA)
4) Ethylacetate (pesticide grade)	J.T.Baker (USA)
5) Methanol (HPLC grade)	J.T.Baker (USA)
6) Sodium chloride	Merck (Germany)
7) Sodium sulfate anhydrous ขนาด 12-60 mesh (pesticide grade)	J.T.Baker (Mexico)
8) Primary secondary amine (PSA) sorbent; 40µm particle size	Vertical
9) Graphitized carbon black (GCB) sorbent; 120/400 mesh size	Agilent Technologies
10) O-Phthalaldehyde diluents (chromatographic grade); CB910	Pickering Laboratories
11) Hydrolysis Reagent (chromatographic grade); CB130	Pickering Laboratories
12) Thiofluor (chromatographic grade)	Pickering Laboratories
13) O-Phthalaldehyde (chromatographic grade)	Pickering Laboratories

7.3 วิธีการ

7.3.1 วิธีวิเคราะห์

7.3.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างประมาณ 1 กก. หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในเครื่องปั่นย่อยปั่นนาน 1-2 นาที จนตัวอย่างละเอียด

7.3.1.2 วิธีสกัดสาร

7.3.1.2.1 ชั่งตัวอย่าง 25 ± 0.1 กรัม ใส่ในขวดแลกเปลี่ยนขนาด 250 มิลลิลิตรโดยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

7.3.1.2.2 เติมอะซิโตน 50 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องผสมตัวอย่าง นาน 1 นาที เติมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 8 กรัมและไดคลอโรมีเทน 40 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องผสมตัวอย่างนาน 1 นาที ปิดฝาทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

7.3.1.2.3 เทสารละลายไฮจนหมดลงในขวดแก้วรูปชมพู่ฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร เติม โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสประมาณ 30 กรัม ปิดฝาเขย่าเป็นครั้งคราวตั้งทิ้งไว้ 10 นาที กรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสซึ่งอยู่บนกรวยกรองแก้วที่อุดสำลีรองรับด้วยกระบอกวัดปริมาตรจนได้ปริมาณสารละลาย 50 มิลลิลิตร จากนั้น ถ่ายใส่ขวดกลั่นสารกันแบนขนาด 250 มิลลิลิตร ล้างกระบอกวัดปริมาตรด้วยอะซิโตนแล้วเทรวมในขวดกลั่นสารกันแบน

7.3.1.2.4 นำสารละลายไปลดปริมาตรด้วยเครื่องลดปริมาตรตัวทำละลายแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส จนเกือบแห้งจากนั้นนำขวดกลั่นสารกันแบนมาล้างด้วยเอทิลอะซิเตต 5 มิลลิลิตร

7.3.1.2.5 ใช้ปิเปตดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติดูดสารละลาย 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนติฟิว พลาสติกแบบมีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร

7.3.1.2.6 เป่าให้แห้งด้วย N_2 - Evaporator เติมอะซิโตนไนโตรล 2 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย

7.3.1.2.7 เติม PSA 200 มิลลิกรัม, GCB 50 มิลลิกรัม, $MgSO_4$ 300 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าด้วยมือและเครื่องผสมสารละลาย

7.3.1.2.8 นำไปเหวี่ยงให้สารแยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงชนิดควบคุม อุณหภูมิที่ความเร็ว 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที จนได้สารละลายใสและกรองผ่าน nylon syringe filter ใส่ vial ปิดฝานำไปตรวจปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มคาร์บาเมท

7.3.1.3 การวิเคราะห์สารกลุ่มคาร์บาเมทด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-FLD) ที่ต่อเข้ากับเครื่อง post column derivatizer

หลักการพื้นฐานของลิควิดโครมาโทกราฟีแยกตามคุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด เช่น มีขั้ว (polar) ไม่มีขั้ว (non polar) ความเป็นกรดเบส และอาศัยเฟส 2 เฟส คือวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) คือของแข็งที่มีขนาดเล็กมากๆ บรรจุอยู่ในคอลัมน์กับวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือตัวทำละลายเคลื่อนที่หรือตัวที่นำพาสารเข้าและออกจากคอลัมน์นั่นเอง หัวใจสำคัญของการแยกสารจะอาศัยหลักการ like dissolves like คือ ถ้าสารที่ต้องการวิเคราะห์ชอบจับกับ stationary phase มากกว่า mobile phase ก็จะออกมาจากคอลัมน์ช้ากว่าสารที่ชอบที่จะอยู่กับ mobile phase มีผลทำให้เกิดการแยกสารประกอบนั้น สามารถวัดส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ได้โดยใช้ดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นการวัดสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของตัวถูกละลายหรือของ mobile phase

Fluorescence Detector เป็นดีเทคเตอร์ที่มีความไวสูงและเฉพาะเนื่องจากความสามารถ ในการวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ออกมาจากตัวอย่างที่ถูกกระตุ้น (excited) ด้วยแสงยูวี โดยที่แสงยูวีจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) ผ่านเครื่องแยกแสง (monochromator) เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่มีสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์ เมื่อตัวอย่างถูกกระตุ้นจะปล่อย emission ออกมาทุกทิศทางแต่จะมี

emission ที่ตั้งฉากกับทิศทางกับทิศทางที่แสงผ่านมาที่สาร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเฉพาะผ่านไปยัง filter ตัดแสงที่ไม่ต้องการออกจากนั้นจึงผ่านเข้าไปยัง photo cell ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม ค่าที่วัดได้เป็นค่าความเข้มของการฟลูออเรสเซนซ์ที่ไปถึงเครื่องวัดแสง ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการฟลูออเรสเซนซ์ทั้งหมด ดังนั้นทั้งความยาวคลื่น excitation และ emission จึงเป็นความยาวคลื่นที่เป็นลักษณะจำเพาะกับตัวอย่างนั้นๆ เท่านั้น

ตาราง 7.3 แสดงสภาวะเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-FLD)

Parameter	Condition	
Injection	Injection volume : 10.00 μ l	
Quaternary pump	Column flow : 1.00 mL/min	
	Stoptime: 35.00 min	
	Posttime: 3.00 min	
	Solvent A: 82% (Water)	
	Solvent B: 18% (Methanol)	
	Time	Solvent B
	0.00	18.00
	0.50	18.00
	29.00	70.00
	29.01	100.00
31.00	100.00	
31.02	18.00	
35.00	18.00	
Column	C18 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)	
Fluorescence Detector	Excitation : 330 nm	
	Emission : 465 nm	

7.3.2 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมเครื่องมือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-FLD)

โดยการฉีดสารมาตรฐานผสมคาร์บาเมท ที่ระดับ ต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

7.3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

7.3.3.1 ช่วงของการวัด (Working Range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ช่วงของการวัดเป็นช่วงของความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรงและให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นยำตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ความเป็นเส้นตรงเป็นความสามารถของวิธีที่ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, และ 1.50 µg/g ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลการวัดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาร์บาเมท (ppm) กับ peak area และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับจะต้องมากกว่า 0.995

7.3.3.2 การหาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

Limit of Detection (LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้

Limit of Quantitation (LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง โดยมีความถูกต้องและความแม่นยำที่ยอมรับได้

LOD และ LOQ หาได้โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ 6 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่อ่านได้แล้วหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการที่ 1-2 ตามลำดับ

$$\text{LOD} = 3\text{SD} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10\text{SD} \quad (2)$$

7.3.3.3 การตรวจสอบความแม่นยำ (Accuracy)

ความแม่นยำหรือความถูกต้อง คือ ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดค่าในสารตัวอย่างได้ออกมาตรงกันหรือใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.30, และ 1.00 µg/g ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำที่สถานะการทดสอบเดียวกัน ประเมิน accuracy จากค่า mean % recovery (สมการที่ 3)และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ codex การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร (ตาราง 7.3)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_2 - C_1) \times 100}{C_3} \quad (3)$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ spike ที่หาได้จาก calibration curve

C_2 = ความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่หาได้จาก calibration curve

C_3 = ความเข้มข้นจริงที่รู้แน่นอน (ความเข้มข้นที่ spike ในตัวอย่าง)

ตาราง 7.3 การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร ของ Codex

Concentrations of analyte	Range of mean % recovery
< 1 µg/kg	50-120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	60-120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	70 -120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	70 – 110
> 1 mg/kg	70 – 110

7.3.3.4 การตรวจสอบความเที่ยง (Intermediate precision)

เป็นการหาความเที่ยงโดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันหลายๆ ครั้ง โดยวิเคราะห์คนละวัน ใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือวิเคราะห์เดียวกันและผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.30, และ 1.00 µg/g ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำ

ประเมิน precision โดยการเปรียบเทียบค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง (% RSD_{obs}) กับค่าที่ถูกคำนวณจาก Horwitz Equation (% RSD_r) ดังสมการที่ 4-6 ตามลำดับเกณฑ์การยอมรับคือ ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) < 2

$$\% \text{RSD}_{\text{obs}} = \frac{SD}{X} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{RSD}_r = 0.66 \times 2C^{(1-0.51\log C)} = 0.66 \times 2C^{-1.50} \quad (5)$$

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}_{\text{obs}}}{\text{RSD}_r} \quad (6)$$

7.4 เวลาและสถานที่

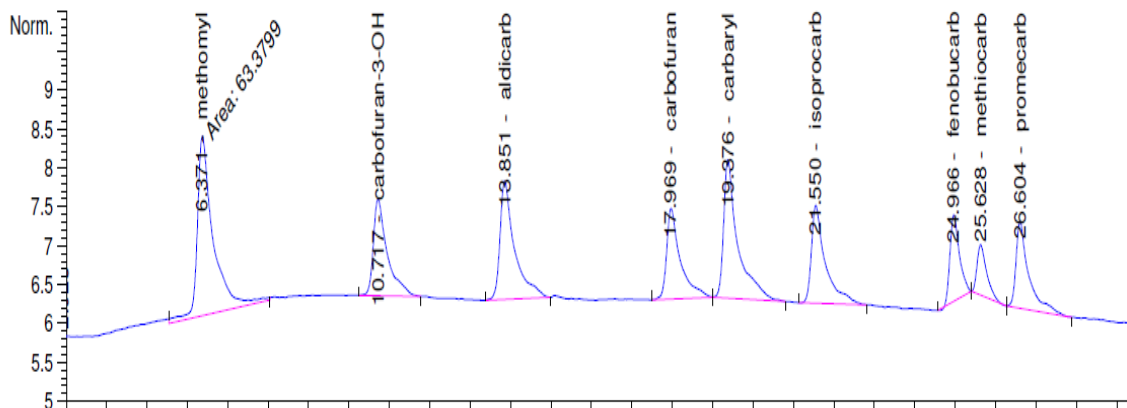
ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) : 1 ตุลาคม 2555-30 กันยายน 2556
สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมท ได้แก่ แอลดีคาร์บ, คาร์บาริล, คาร์โบฟูแรน, คาร์โบฟูแรน-3-ไฮดรอกซิล, ฟิโนบูคาร์บ, ไอโซโพรคาร์บ, เมโทมิล, เมทีโอคาร์บ, โพรมีคาร์บ ในพริกสดโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ liquid liquid extraction (LLE) และ dispersive solid phase extraction (d-SPE) ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph) สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมททั้ง 9 ตัวที่เลือกมานี้เพราะเป็นกลุ่มสารพิษตกค้างที่ทางกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.2 ได้ตรวจวิเคราะห์ให้กับตัวอย่างพืชผักที่ส่งออกต่างประเทศ ตัวอย่างที่ตรวจรับรองแหล่งผลิต (GAP) บางชนิดและตัวอย่างในการวิจัย

8.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โดยฉีดสารมาตรฐานผสมคาร์บาเมท ที่ระดับ ต่ำ กลาง สูง ความเข้มข้นละ 10 $\mu\text{g/ml}$ โดยดูค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของ retention time (Rt) และ peak area จากตาราง 8.1 พบว่า % RSD ของ retention time มีค่าอยู่ในช่วง 0.01-0.56 และ % RSD ของ peak area มีค่าอยู่ในช่วง 0.20-15.91



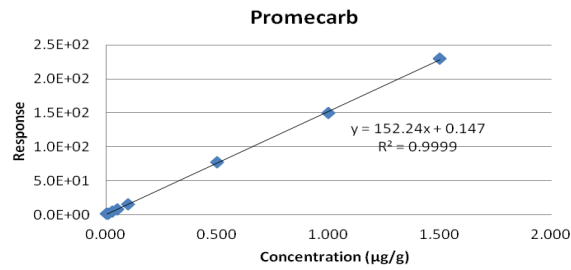
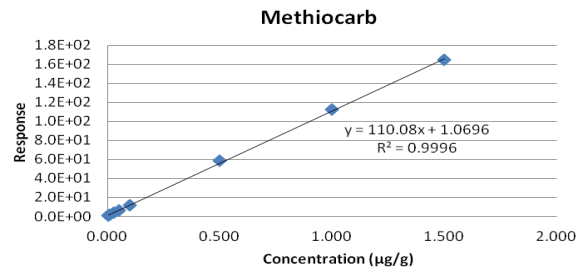
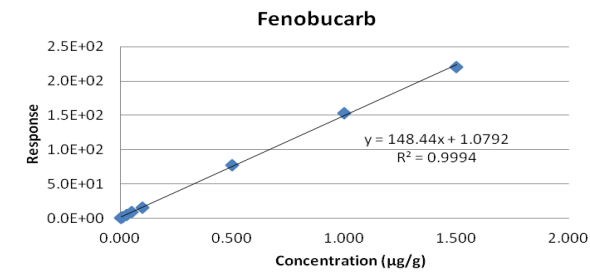
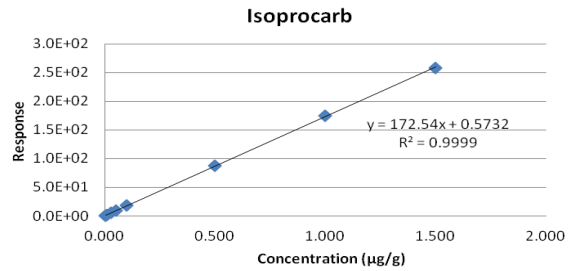
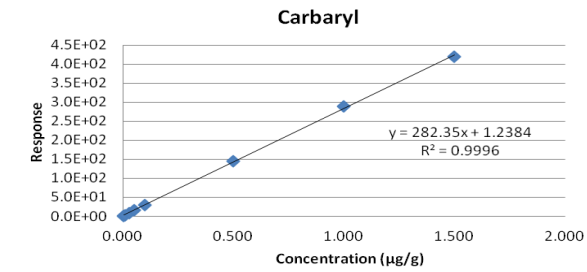
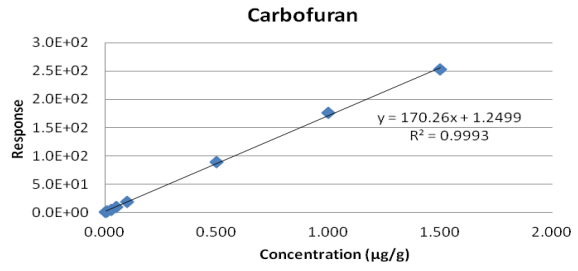
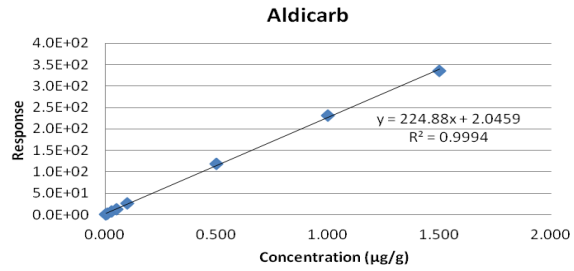
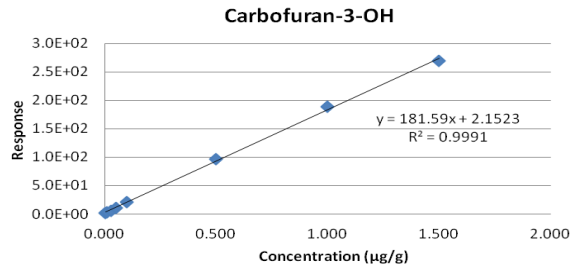
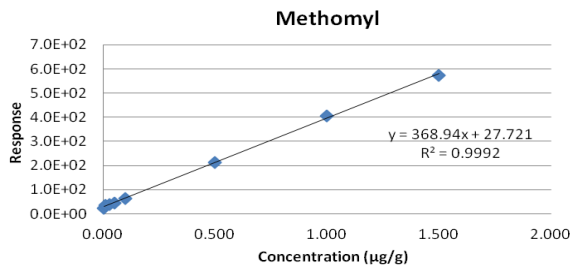
รูป 8.1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมทในตัวทำละลายเมทานอลที่มีความเข้มข้น 0.3 $\mu\text{g/ml}$

ตาราง 8.1 แสดงค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของ retention time (Rt) และ peak area ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Compounds	% RSD (n=10)					
	0.05 µg/ml		0.3 µg/ml		3.0 µg/ml	
	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area
Methomyl	0.56	9.32	0.15	1.59	0.07	0.29
Carbofuran-3-OH	0.39	15.91	0.11	2.24	0.06	0.20
Aldicarb	0.27	4.63	0.11	1.79	0.03	0.22
Carbofuran	0.16	3.20	0.07	2.01	0.02	0.38
Carbaryl	0.19	2.49	0.09	2.18	0.02	0.53
Isoprocab	0.16	3.43	0.06	2.28	0.01	2.44
Fenobucarb	0.17	4.93	0.06	1.72	0.01	1.54
Methiocarb	0.19	4.44	0.07	3.08	0.62	3.55
Promecarb	0.18	15.66	0.06	4.10	0.02	2.83

8.2 วิเคราะห์หาค่าช่วงของการวัด (Working Range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.03, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.0 µg/g ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลการวัดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาร์บาเมท (ppm) กับ peak area และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับจะต้องมากกว่า 0.995 จากการทดสอบพบว่าค่า r อยู่ในช่วง 0.9995-0.9999 แสดงว่าความเข้มข้นของการวิเคราะห์ปริมาณคาร์บาเมททั้งหมดที่ใช้งานมีค่าอยู่ในช่วง 0.01-1.50 µg/g ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังรูป 8.2 และ ตาราง 8.2



รูป 8.2 กราฟแสดงค่า Linearity ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก

ตาราง 8.2 แสดงค่า Range / Linearity ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก

Compounds	Range (µg/g)	R ²	R
Methomyl	0.01-1.50	0.9992	0.9996
Carbofuran-3-OH	0.01-1.50	0.9991	0.9995
Aldicarb	0.01-1.50	0.9994	0.9997
Carbofuran	0.01-1.50	0.9993	0.9996
carbaryl	0.01-1.50	0.9996	0.9998
Isoprocarb	0.01-1.50	0.9999	0.9999
Fenobucarb	0.01-1.50	0.9994	0.9997
Methiocarb	0.01-1.50	0.9996	0.9998
Promecarb	0.01-1.50	0.9999	0.9999

8.3 วิเคราะห์หาค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทระดับความเข้มข้นต่ำ จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่อ่านค่าได้ คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ได้ผลตามตาราง 8.3 พบว่าทุกสารของคาร์บาเมทได้ค่า LOD 0.005 µg/g และ LOQ 0.01 µg/g ยกเว้น methomyl ได้ค่า LOD 0.007 µg/g และ LOQ 0.02 µg/g ตามลำดับ

ตาราง 8.3 แสดงค่า Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก

Compounds	Concentration (µg/g)	
	LOD	LOQ
Methomyl	0.007	0.02
Carbofuran-3-OH	0.005	0.01
Aldicarb	0.005	0.01
Carbofuran	0.005	0.01
carbaryl	0.005	0.01
Isoprocarb	0.005	0.01
Fenobucarb	0.005	0.01
Methiocarb	0.005	0.01
Promecarb	0.005	0.01

8.4. วิเคราะห์หาค่าความแม่นยำ (accuracy)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.30, และ 1.00 µg/g ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำที่สถานะการทดสอบเดียวกัน ประเมิน accuracy จากค่า % recovery และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ codex การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาศัตรูในอาหาร ได้ผลการประเมิน accuracy จากค่า % recovery ตามตาราง 8.4 พบว่า ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.01 µg/g ยกเว้น methomyl ที่ความเข้มข้น 0.02 µg/g ได้ค่า % recoveries อยู่ในช่วง 60-120 ที่ระดับความเข้มข้นระดับกลาง 0.30 µg/g ได้ค่า % recoveries อยู่ในช่วง 70-94 และที่ความเข้มข้นระดับสูง 1.00 µg/g ได้ค่า % recoveries อยู่ในช่วง 70-93 ตามลำดับ

ตาราง 8.4 แสดงค่า % recovery ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก

Compounds	% recoveries (n=6)		
	0.01* µg/g	0.30 µg/g	1.00 µg/g
Methomyl	103-114	73-86	76-93
Carbofuran-3-OH	82-120	83-94	77-90
Aldicarb	74-98	84-94	76-90
Carbofuran	85-120	79-88	72-85
carbaryl	64-85	72-79	70-78
Isoprocarb	71-108	70-77	70-77
Fenobucarb	60-95	70-75	70-75
Methiocarb	64-94	70-84	70-76
Promecarb	60-88	70-77	71-78

* ความเข้มข้นสำหรับ fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับต่ำ คือ 0.01 µg/g ยกเว้น methomyl ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับ 0.02 µg/g

8.5. วิเคราะห์หาค่าความเที่ยง (precision)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.30, และ 1.00 µg/g ความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ซ้ำ ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz's ratio) จากตาราง 8.5 พบว่า ทุกสารของคาร์บาเมท ให้ค่า HORRAT < 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัว ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.01 µg/g ยกเว้น methomyl ที่ความเข้มข้น 0.02 µg/g ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.57-1.68 ที่ระดับความเข้มข้นระดับกลาง 0.30 µg/g ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.23-0.35 และที่ความเข้มข้นระดับสูง 1.00 µg/g ได้ค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.18-0.29 ตามลำดับ

ตาราง 8.5 แสดงค่า Precision ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริก

Compounds	Concentration (n=6-7)					
	0.01* µg/g		0.30 µg/g		1.00 µg/g	
	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT
Methomyl	99-120	0.54	73-82	0.35	84-92	0.20
Carbofuran-3-OH	71-111	0.61	83-92	0.23	85-93	0.21
Aldicarb	60-98	0.57	82-95	0.27	88-92	0.19
Carbofuran	70-98	0.97	75-88	0.27	81-88	0.18
Carbaryl	60-73	1.21	74-82	0.31	72-81	0.29
Isoprocarb	63-86	1.17	70-80	0.24	75-81	0.23
Fenobucarb	60-90	1.33	70-79	0.23	70-78	0.26
Methiocarb	62-120	1.58	70-77	0.26	70-75	0.21
Promecarb	63-120	1.68	70-79	0.24	70-77	0.25

* ความเข้มข้นสำหรับ fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานคาร์บาเมทที่ระดับต่ำ คือ 0.01 µg/g ยกเว้น methomyl ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับ 0.02 µg/g

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ทดสอบ ถือเป็นกระบวนการหนึ่งของการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการทดสอบ ที่ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องดำเนินการ หนึ่งในข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและห้องปฏิบัติการสอบเทียบ ISO/IEC 17025-2005 ข้อที่ 5.4.5 เมื่อห้องปฏิบัติการใช้วิธีทดสอบที่ไม่เป็นมาตรฐาน วิธีที่ห้องปฏิบัติการพัฒนาหรือออกแบบขึ้นเอง วิธีมาตรฐานที่ใช้นอกขอบข่ายที่กำหนดไว้ หรือการขยายและดัดแปลงวิธีมาตรฐาน ต้องทำตรวจสอบความใช้ได้เพื่อยืนยันหาวิธีนั้นเหมาะสมกับการใช้งาน

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมท 9 ชนิด ได้แก่ แอลดีคาร์บ, คาร์บาริล, คาร์โบฟูแรน, คาร์โบฟูแรน-3-ไฮดรอกซิล, ฟิโนบูคาร์บ, ไอโซโฟคาร์บ, เมโทมิล, เมทีโอคาร์บ, โพรมีคาร์บ ในพริกสดโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ liquid liquid extraction และ dispersive solid phase extraction (LLE/d-SPE) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธี Steinwandter H. กับวิธี QuEChERS ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph) (ตามรูป 9.1) ซึ่งต้องตรวจสอบช่วงการใช้งาน ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง ซีดจำกัดในการตรวจพบ และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

ชั่งตัวอย่าง 25g+acetone 50 mL+dichloromethane 40 mL+sodium chloride 7.5 g



ปั่นนาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน



เท solution ลงใน erlenmeyer flask ที่บรรจุ sodium sulphate 2 ซ้อนโต๊ะ ปิดฝา เขย่า



กรองผ่าน sodium sulphate 2 ซ้อนโต๊ะ(โดยใช้กรวยกรอง) ใส่ cylinder ให้ได้ 50 mL



เท solution จาก cylinder ใส่ flat bottle flask



ล้าง cylinder ด้วย 5 mL acetone ลดปริมาตรจนเกือบแห้งด้วย evap.
(water bath 40 °C,P 500 bar)



ล้าง flat bottle flask ด้วย 5 mL EtoAc



pipette 2 mL ใส่ centrifuged tube



เป่าให้แห้งด้วย N₂-Evap.



เติม ACN 2 mL และ clean up ด้วย PSA 200 mg+GCB 50 mg+MgSO₄ 300 mg



เขย่าด้วยมือและ vortex mixer

นำไปเหวี่ยงให้สารแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm ,5 นาที

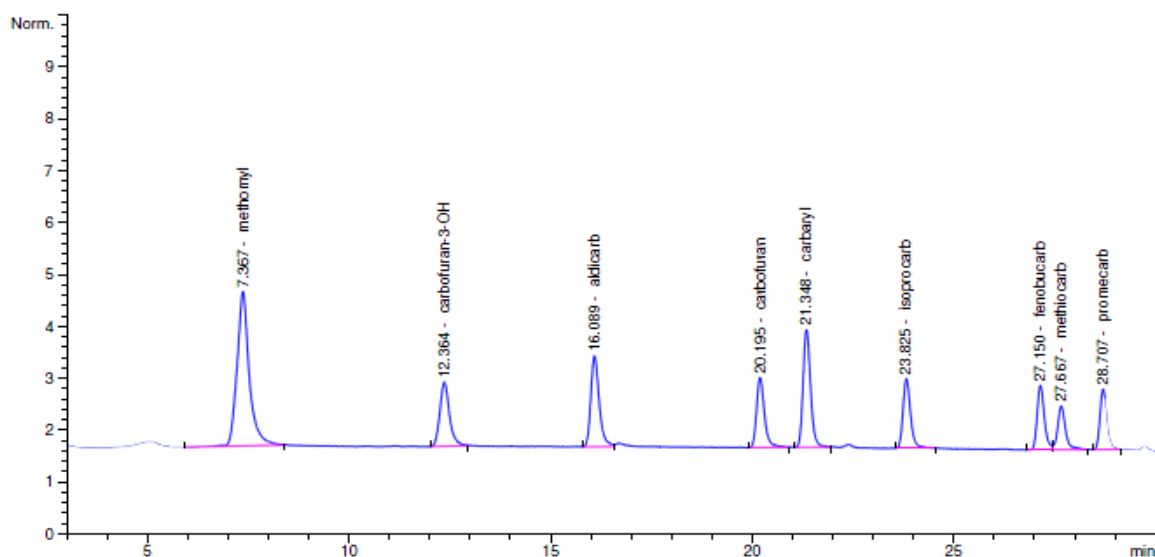


กรองผ่าน syringe filter (nylon, 13mm, pore size 0.2 μm) ใส่ vial
เพื่อวิเคราะห์ CBM (HPLC-FLD)

รูป 9.1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมท

ผลการตรวจสอบพบว่า การหาค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 60-120%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 70-94%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 70-93% ซีดจำกัดของการตรวจพบมีค่าอยู่ในช่วง 0.005-0.007 $\mu\text{g/g}$, ซีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณมีค่าอยู่ในช่วง 0.01-0.02 $\mu\text{g/g}$, ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ประเมินค่าอยู่ในช่วง 0.18-1.68 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกตัว และมีช่วงการใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริกที่ 0.01-1.50 $\mu\text{g/g}$ สรุปได้ว่าแนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในพริกของห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลกสามารถประยุกต์ใช้กับการปฏิบัติงานจริงได้

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ ถือเป็นสิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการทดสอบทุกแห่งต้องทำถึงแม้ว่าจะต้องใช้เวลาและงบประมาณในการดำเนินการ แต่ผลลัพธ์ที่ได้มีความคุ้มค่าเพราะไม่เพียงแต่สร้างความน่าเชื่อถือให้แก่ผลการทดสอบ และความพึงพอใจของลูกค้าแล้ว ห้องปฏิบัติการเองก็มีความเชื่อมั่นในผลการทดสอบของตนเองและสามารถแสดงหลักฐานที่เป็นรูปธรรมได้อย่างชัดเจน



รูป 9.2 โครมาโทแกรมของสารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในตัวอย่างพริกที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/g}$

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ทำให้เกิดความมั่นใจว่าผลการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลกมีความถูกต้อง และน่าเชื่อถือตามหลักวิชาการ

10.2 ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก มีความพร้อมสำหรับการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

คณะผู้ทำงานวิจัยขอขอบคุณ คุณกัลยา เนตรกัลยามิตร ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก และคุณยสิษฐ์ อินทรสถิตย์ ผู้อำนวยการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต ที่ให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณข้าราชการและพนักงานราชการในกลุ่มที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาโดยตลอด

12. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549, แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บริษัทเอจิลแลนท์, คู่มือการใช้งาน HPLC รุ่น HP1100

Steinwandter, H., 1985, Universal 5 min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem. 322 : 752-754.

Anastassiades, M.; Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., and Schenk, F.J., 2003, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86: 412-431.

EURACHEM Guide, 1998, The Fitness for Purpose of Analytical Methods ; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1st ed., Available from internet :<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>, cited Jan. 2013