

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** โครงการวิจัยการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตร ให้ถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานสากล
กิจกรรม การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อย การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย)** การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่ม carbamate ใน มะม่วง

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Method Validation of carbamate in Mango.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางวัชรพร ศรีสว่างวงศ์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3
ผู้ร่วมงาน นางสาวปริญานุช สายสุพรรณ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3
 นายจารุงศ์ ประสพสุข สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

5. บทคัดย่อ

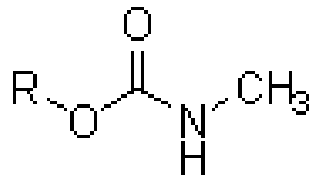
การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในมะม่วงเพื่อการขอรับรองห้องปฏิบัติการของ สวพ.3 โดยวิธี HPLC-Post Column Derivatization ที่มีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence Detector ; FLD) เพื่อยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์และประเมินด้วยวิธีทางสถิติว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือและเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ โดยวิธีทดสอบที่นำมาใช้ดัดแปลงมาจากวิธี QuEChERS ของ AOAC Method ทำการทดสอบและประเมินผลการวิเคราะห์ต่างๆ ด้วยวิธีทางสถิติ ได้แก่ rang, linearity, accuracy, precision, LOD และ LOQ สารพิษที่ทำการทดสอบเป็นสารกลุ่มคาร์บาเมท จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ aldicarb, carbofuran, carbaryl, methomyl และ oxamyl ผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่า ให้ค่า rang ในช่วงความเข้มข้น 0.02-5.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ค่า linearity ในช่วงความเข้มข้น 0.02-5.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า correlation coefficient (r) ระหว่าง 0.998-0.999 ผลการตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ ประเมินผลจาก % recovery พบว่าที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 92.75-98.92 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระดับกลาง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 89.92-102.67 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นระดับสูง 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 87.52-98.04 เปอร์เซ็นต์ การตรวจสอบความแม่นยำ (precision) ประเมินจาก % RSD ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง สูง มีค่าระหว่าง 1.41-4.36, 2.97-6.12 และ 3.87-9.16 ตามลำดับ และเมื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) พบว่า ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นมีค่า HORRAT อยู่ในเกณฑ์กำหนดซึ่งค่าไม่เกิน 2 ตามเกณฑ์ของ AOAC และยอมรับ

ได้ (Howitz's ratio < 2) คือมีค่าระหว่าง 0.10-0.95 ค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบมีค่า 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากการประเมินผลการทดสอบโดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ เหล่านี้ พบว่าวิธีทดสอบนี้ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการได้

6. คำนำ

คาร์บาเมท (carbamates) เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเนื่องจากสามารถใช้กำจัดแมลงได้เทียบเท่ากับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสมีความเป็นพิษสูง แต่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ค่อนข้างต่ำและสลายตัวได้เร็ว ทำให้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยใช้วิธีฉีดพ่นโดยตรงที่ ผัก ผลไม้หรือเมล็ดพืช ซึ่งเป็นสาเหตุให้สารชนิดนี้ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งเข้าไปปนเปื้อนในแหล่งน้ำในบริเวณใกล้เคียงที่ทำเกษตรกรรมได้ โดยเฉพาะถ้าเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรโดยทิ้งระยะเวลาหลังการฉีดพ่นไม่นานเพียงพอจะทำให้สารกลุ่มนี้ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลต่อผู้บริโภคได้ คาร์บาเมทมีผลต่อระบบประสาทโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetyl cholinesterase หรือ AChE) ทำให้สารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนถูกทำลายลดลง ทำให้เกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนที่ซินแนปส์ของเส้นประสาทเนื่องจากเอนไซม์ไม่สามารถไปไฮโดรไลสอะซิติลโคลีนให้เป็นโคลีนและกรดอะซิติคได้ จึงทำให้เกิดการกระตุ้นปลายประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมาก จึงเกิดอาการพิษเนื่องจากการทำงานของระบบสื่อประสาท โคลิเนอร์จิก (cholinergic neurotransmission) ทำงานมากเกินไป สารกำจัดแมลงกลุ่มนี้สามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ โดยเฉพาะรอยแผลหรือรอยข่วน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสโดยตรง ซึ่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายอาจมีผลต่ออวัยวะส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น ระบบ ประสาท กล้ามเนื้อ การหายใจและสมอง เป็นต้น ซึ่งถ้ารุนแรงจะทำให้เสียชีวิตได้ (วิภาดาและคณะ, 2556)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในมะม่วง ด้วยวิธี HPLC-Post Column Derivatization ที่มีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence Detector ; FLD) (ประชาติปต์ย์และคณะ, 2550) โดยวิธีทดสอบที่นำมาใช้ดัดแปลงมาจากวิธี QuEChERS ของ AOAC Method ทำการทดสอบและประเมินผลการวิเคราะห์ต่างๆ ด้วยวิธีทางสถิติ ได้แก่ rang, linearity, accuracy, precision, LOD และ LOQ (จิราพรรณ, 2549) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์จึงเป็นการพิสูจน์วิธีการทดสอบที่ใช้ว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับได้ และเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ (ทิพวรรณ, 2549) รวมทั้งสามารถนำผลการทดสอบที่ได้ไปเป็นข้อมูลในการยื่นขอรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025 ต่อไป



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมท

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ชนิด 3 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องเหวี่ยงสารให้ตกตะกอน (centrifuge) เครื่องเขย่าแนวตั้ง (funnel shaker) เครื่องเขย่า (shaker) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เครื่องลดปริมาตรชนิด nitrogen evaporator และ ตู้ดูดความชื้น (desiccator)

7.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ beaker, cylinder, volumetric flask (class A), centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร, dispense, auto pipette, glass vial for auto sample, glass syringe ขนาด 5 มิลลิลิตร, disposable pasture pipette และ test tube

7.1.3 สารเคมี ได้แก่ acetonitrile (AR grade), methanol (HPLC grade), Acetic acid (AR grade), Sodium chloride (NaCl), Magnesium sulfate anhydrous (MgSO₄), OPA diluents, thioflour Graphitized carbon black (GCB), Primary secondary amine (PSA), o-phthaldehyde (OPA) และ sodium hydroxide solution

7.1.4 สารพิษมาตรฐาน(pesticide grade)กลุ่มคาร์บาเมท จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ aldicarb, carbofuran, carbaryl, methomyl และ oxamyl

7.1.5 เครื่อง Pickering รุ่น PCX 5200 Post-Column Derivatization

7.1.6 เครื่องตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 ซึ่งมีหัวตรวจวัดชนิด Fluorescence Detector (FLD)

7.2 วิธีการ

7.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน (standard solution)

7.2.1.1 เตรียม stock standard solution

เตรียม stock standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมท 5 ชนิด ได้แก่ aldicarb, carbofuran, carbaryl, methomyl และ oxamyl โดยชั่งสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมทแต่ละชนิดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน อยู่ในช่วงประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวด volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมนethonal (HPLC grade) เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับ

ปริมาณ จะได้ stock standard solution ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ppm (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

7.2.1.2 เตรียม intermediate standard solution

เตรียม intermediate standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมตแต่ละชนิด โดยเจือจางจาก stock standard solution เติม methanol (HPLC grade) เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรจะได้ intermediate standard solution ของสารแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10-100 ppm

7.2.1.3 เตรียม working standard solution

เตรียม working standard solution โดยปิเปต intermediate standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมตแต่ละชนิดใส่รวมกันใน volumetric flask ใบเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วย methanol (HPLC grade) เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ mix working standard solution ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงประมาณ 0.05-5.0 ppm

7.2.2 การเตรียมเครื่องวิเคราะห์สารพิษตกค้าง HPLC ควบคุมสถานะการทำงานของเครื่องดังนี้
สถานะการทำงานของเครื่อง HPLC ชนิด FLD ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100

Column : Carbamate Column, C18, Stainless steel ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร, ยาว 250 มิลลิเมตร, particle size 5 ไมครอน

Mobile phase: Methanol 12% : water 88%

อัตราส่วนของ Mobile phase เป็นแบบ gradient

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่

เวลา (นาที)	Solvent A (% Water)	Solvent B (% Methanol)
0.00	88	12
2.00	88	12
42.00	34	66
46.00	34	66
46.10	0	100
49.00	0	100
55.00	88	12

อัตราการไหล(Flow rate)	:	0.80 มิลลิลิตร/นาที
Stop time (นาที)	:	55 นาที
Post time (นาที)	:	5 min
อุณหภูมิคอลัมน์(Column Temperature)	:	42 องศาเซลเซียส
ปริมาตรที่ฉีด(Injection Volume)	:	10 ไมโครลิตร
Detector	:	FLD (Fluorescence Detector) Excitation wavelength 330 nm Emission wavelength 465 nm

7.2.3 วิธีการสกัดตัวอย่างประยุกต์วิธี QuEChERS ของ AOAC 2007.1 Method

ชั่งตัวอย่างมะม่วง 15 กรัม ลงในหลอด Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร

7.2.3.1 เติม 1% acetic acid ใน acetonitrile ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือให้เข้ากัน 1 นาที จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง (funnel shaker) 2 นาที

7.2.3.2 เติม magnesium sulfate ($MgSO_4$) 4 กรัม และ sodium chloride (NaCl) 1 กรัม เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) อีก 2 นาที

7.2.3.3 ทำการ Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส($^{\circ}C$) นาน 5 นาที

7.2.3.4 ปิเปตสารละลายส่วนบน (aliquot) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ใส่ Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี $MgSO_4$ 900 มิลลิกรัม graphitized carbon black (GCB) 45 มิลลิกรัม และ primary secondary amine (PSA) 150 มิลลิกรัม (หากสีเข้มมากใช้ GCB 60 มิลลิกรัม) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วย vertex mixer อีก 2 นาที

7.2.3.5 นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้ง

7.2.3.6 ปิเปตสารละลายส่วนบนปริมาตร 2 ml ลงใน Test tube นำไปลดปริมาตรด้วย N-evap จากนั้นเติม methanol 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน Nylon syringe filter 0.2 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC หัวตรวจวัดชนิด Fluorescence Detector(FLD) ต่อกับเครื่อง Post-Column Derivatization (Pickering)

7.2.4 ขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

7.2.4.1 การทดสอบช่วงของการวัด (Rang)

เป็นการตรวจสอบช่วงความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ทำการทดสอบ sample blank ที่เติม spike mix standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมท ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 7 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

(แกน X) กับพื้นที่ใต้พีคหรือ peak area (แกน Y) พิจารณายอมรับค่าความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรง

7.2.4.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ทดสอบ sample blank ที่เติม spike mix standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมท ที่ระดับความเข้มข้นภายใน rang ของการทดสอบ 6 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับ peak area (แกน Y) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient ; r) เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient ; $r \geq 0.995$

7.2.4.3 การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

เป็นการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิธีที่ศึกษากับค่าอ้างอิงจากตัวอย่าง ทดสอบ sample blank และ sample blank ที่เติม spike mix standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำไปคำนวณค่า accuracy จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ recovery โดยใช้สูตรดังนี้

การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% recovery)

$$\text{จากสูตร } \% \text{ recovery} = [(A - B)/C] \times 100$$

โดยที่ A = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample)

B = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (Unspiked sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

กำหนดเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์ recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ Codex (Codex, 1993) มีค่าอยู่ในช่วง 70-110 เปอร์เซ็นต์

7.2.4.4 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

เป็นการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ทดสอบ sample blank ที่เติม spike mix standard solution ของสารมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Mean; \bar{X}) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของผลการทดสอบ คำนวณ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) โดยใช้สูตรดังนี้

การคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

กำหนดเกณฑ์การยอมรับเปอร์เซ็นต์ RSD โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC peer-verified Method Nov. 1993 มีค่าไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเปอร์เซ็นต์ RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดสามารถประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz's ratio) จากสูตร

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ได้จาก Horwitz equation แบบ Repeatability (RSD_r) ตามสูตร

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

เมื่อ C = Concentration ration

เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) < 2

7.2.4.5 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection ; LOD)

เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของ SD ของ Blank ซึ่งค่า LOD = 3SD โดยทำการทดสอบ ที่เติม spike mix standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 หากไม่ได้ ให้ยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

7.2.4.6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation ; LOQ)

เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สามารถรายงานค่าได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ Blank ซึ่งค่า LOQ = 10SD โดยทำการทดสอบ sample blank ที่เติม spike mix standard solution ของสารพิษมาตรฐานกลุ่มคาร์บาเมทที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินค่า accuracy และ precision ว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้ตามมาตรฐาน Codex (Codex, 1993) หากไม่ผ่านเกณฑ์ จะต้องทำการยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นและทำซ้ำตามขั้นตอนจนผ่านเกณฑ์การประเมินจึงยอมรับค่า LOQ

7.3 เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น 1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินงาน ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและ

ปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบและประเมินผลจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารสารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในมะม่วง ด้วยวิธี HPLC–Post Column Derivatization เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ที่กำหนดจากช่วงที่เป็นเส้นตรงจะได้ rang ของสารพิษกลุ่มคาร์บาเมท ทั้ง 5 ชนิด คือ aldicarb, carbofuran, carbaryl, methomyl และ oxamyl อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.02-5.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำไปตรวจสอบ linearity จะได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.999, 0.999, 0.999, 0.999 และ 0.998 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (correlation coefficient ; $r \geq 0.995$) (ตารางที่ 2) ผลการประเมินค่าความแม่นยำ (accuracy) ประเมินจากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery พบว่าที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 92.75-98.92 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นระดับกลาง 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 89.92-102.67 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นระดับสูง 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าระหว่าง 87.52-98.04 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (ภาคผนวก1) และสามารถยอมรับได้

ผลการประเมินค่าความเที่ยง (precision) ประเมินจากค่า % RSD ที่ความเข้มข้นระดับ ต่ำ กลาง สูง มีค่าระหว่าง 1.41-4.36, 2.97-6.12 และ 3.87-9.16 ตามลำดับ และเมื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) พบว่าทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นมีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.10-0.95 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนดซึ่งค่าไม่เกิน 2 (Howitz's ratio < 2) และยอมรับได้ (ตารางที่ 4) ผลการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection ; LOD) และผลการประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation ; LOQ) ของวิธีทดสอบ มีค่าเท่ากับ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบ range และ linearity ของวิธีทดสอบ

pesticide	Range (mg/kg)	linearity (correlation coefficient ; r)
aldicarb	0.02 - 5	0.999
carbofuran	0.02 - 5	0.999
carbaryl	0.02 - 5	0.999
methomyl	0.02 - 5	0.999
oxamy	0.02 - 5	0.998

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบ accuracy ประเมินจาก %recovery

pesticide	% recovery		
	low	medium	high
	0.2	1.0	2.0
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
aldicarb	96.1	89.9	89.9
carbofuran	92.7	102.7	93.4
carbaryl	96.4	97.7	93.3
methomyl	98.9	101.5	98.0
oxamyl	95.5	97.3	87.5

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบ precision ประเมินจาก %RSD และ HORRAT

pesticide	% RSD			HORRAT (Horwitz's ratio)		
	low	medium	high	low	medium	high
	0.2	1.0	2.0	0.2	1.0	2.0
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
aldicarb	4.36	4.69	5.50	0.32	0.44	0.57
carbofuran	3.51	5.58	9.16	0.26	0.53	0.95
carbaryl	2.72	6.12	3.87	0.20	0.58	0.40
methomyl	1.41	3.59	4.03	0.10	0.34	0.42
oxamyl	3.71	2.97	8.20	0.27	0.28	0.84

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในมะม่วงเพื่อการขอรับรองห้องปฏิบัติการ สวพ.3 ด้วยวิธี HPLC-Post Column Derivatization ที่มีตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence Detector ; FLD) จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ aldicarb, carbofuran, carbaryl, methomyl และ oxamyl ผลการประเมินและตรวจสอบค่าต่างๆ ได้แก่ rang, linearity, accuracy, precision, LOD และ LOQ อยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ ซึ่งจากการประเมินผลจากการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ เหล่านี้พบว่าวิธีทดสอบนี้ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในมะม่วงสำหรับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

2. ใช้เป็นข้อมูลในการขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการในรายการทดสอบสารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในมะม่วง ด้วยวิธี HPLC–Post Column Derivatization

11. เอกสารอ้างอิง

จิราพรรณ ทองหยอด. 2549. คู่มือการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation). กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว (A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods). นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

ประชาติปต์ย์ พงษ์ภิญโญ, วิษณุ แจ่มใบ และ สุนันทา ชมภูนิช. 2550. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ การหาสารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมทในผัก. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิภาดา ขจรเอนกกุล, ขนิษฐา เส และ พิมพิกา เกมาหะยุง. 2556. การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มคาร์บาเมท 8 ชนิดในเนื้อสัตว์ด้วยวิธี HPLC –Post Column Derivatization. (วันที่ สี่ บ คั น 12 พ ฤ ศ จิ ก า ย น 2556) จ า ก : URL: <http://www.dld.go.th/qcontrol/images/stories/download/201109/2-8.doc>

12. ภาคผนวก

เกณฑ์การยอมรับ Recovery สำหรับพิจารณาการยอมรับ % recovery โดยทั่วไป Analyte recovery ของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลง และยาสัตว์ตกค้างในอาหาร (ตาม Codex)

ความเข้มข้นของ analyte	% 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

ที่มา : แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว

(A Practical Guide for Single Laboratory Method Validation of Chemical Methods).

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.