

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2556

.....

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
กิจกรรม : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อย : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : 1.2.7 การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Chlormquat และ Mepiquat ในผลไม้โดยใช้ Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Development of Method for Analysis Chlormequat and Mepiquat in Fruit by Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry
4. คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : นายวิษณุ แจ้งใบ กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษทางการเกษตร สปผ.
ผู้ร่วมงาน : นางสมสมัย ปาลกุล กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษทางการเกษตร สปผ.
: นายประชาติปต์ย์ พงษ์ภิญโญ กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษทางการเกษตร สปผ.
: นางสาวปฐิมาภรณ์ สังข์น้อย กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษทางการเกษตร สปผ.
5. บทคัดย่อ

ดำเนินการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด Chlormequat chloride และ Mepiquat chloride ในมะม่วง โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometry ต่อกับคอลัมน์ชนิด Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) ให้มีความเฉพาะเจาะจง ถูกต้องและแม่นยำสูง และเพื่อให้วิธีที่พัฒนาขึ้นมาเป็นที่น่าเชื่อถือมากขึ้นจึงจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) โดยรายการที่ตรวจสอบได้แก่ ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) ช่วงของการวัด (Working range) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ความแม่นยำ (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat พบว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะเจาะจงไม่มีสารอื่นรบกวน จากการทดสอบ Working Range อยู่ในช่วง 0.005 จนถึง 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ Linearity ในช่วง 0.005 จนถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า Correlation coefficient (R^2) มากกว่า 0.995 การพิสูจน์ Accuracy โดยประเมินจาก %Recovery ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01 – 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดย Chlormequat มี %recovery อยู่ในช่วง 90 ถึง 103 เปอร์เซ็นต์ และ Mepiquat อยู่ในช่วง 94 ถึง

105 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Precision ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.01- 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการคำนวณค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.32-7.75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการคำนวณความเที่ยงจากสมการ Horwitz ของสารทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 สำหรับค่า LOD ของ Chlormequat และ Mepiquat เท่ากับ 0.01 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ และค่า LOQ ของสารทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Abstract

A sensitivity and selective method for determination of chlormequat chloride (CQ) and mepiquat chloride (MQ) in mango was developed by hydrophilic interaction liquid chromatograph tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS). The method was validated in terms of specificity, working range, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and limit quantitation (LOQ). The method was found to be specific against matrix interferences. Working range and linearity for both pesticides were obtained in the range 0.005-5.0 mg/kg and 0.005-2.0 mg/kg, respectively (Correlation coefficient (R^2) > 0.995). The accuracy of the method were determined from recovery experiments at 0.01 – 1.0 mg/kg (n=7). The recoveries were obtained in the range of 90 – 103% for CQ and 94 – 105 % for MQ. Excellent precision for range 0.01-1.0 mg/kg was calculated (%RSD <10, HORRAT < 2). Limit of detection for CQ and MQ were 0.01 mg/kg and 0.005 mg/kg, respectively. Limit of quantitation were 0.02 mg/kg for both pesticides.

6. คำนำ

ในปัจจุบันการใช้วัตถุพิษทางการเกษตรของเกษตรกรได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในสังคมเกษตรกรรม ดังนั้นประเทศไทยจึงจำเป็นต้องนำเข้าวัตถุอันตรายเหล่านี้เข้ามาในประเทศ แต่ผลกระทบที่ตามมาคือการตกค้างของสารพิษบนผลิตผลทางการเกษตร โดยผลิตผลที่ได้มีการบริโภคเองภายในประเทศและส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยสิ่งจำเป็นที่ต้องเร่งพัฒนาในขณะนี้คือการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างให้มีความถูกต้องและแม่นยำสูง และเป็นที่ยอมรับในระดับสากลเพื่อช่วยในการลดการกีดกันทางการค้าของประเทศปลายทางโดยห้องปฏิบัติการสามารถพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ขึ้นมาจากภายในห้องปฏิบัติการ (In-house Method) ได้ แต่เพื่อให้วิธีที่พัฒนาเป็นที่ยอมรับจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบก่อนว่าสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้องตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนาวิธี ปรับปรุง หรือตัดแปลงวิธีให้เหมาะสมแล้วและมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นหรือเลือกมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ (ทิพวรรณ, 2549) สำหรับขั้นตอนในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มี

รายการที่ทำการพิสูจน์คุณลักษณะเฉพาะได้แก่ ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity) ช่วงของการใช้งาน (Working Range) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ความถูกต้อง (Accuracy) ความเที่ยง (Precision) ขีดจำกัดของวิธีเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (Limit of Detection, LOD and Limit of Quantitation, LOQ) และความคงทนของวิธี (Ruggedness/Robustness) เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจสอบของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด Chlormequat และ Mepiquat ในผลไม้โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์และปรับปรุงสถานะให้เหมาะสม (Optimized) ซึ่งผลที่ได้จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสามารถพิสูจน์ให้เห็นถึงความน่าเชื่อถือของวิธีการตรวจวิเคราะห์ และเป็นที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานสากลตลอดจนยังสามารถนำไปใช้ในการขยายขอบข่ายในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งสองชนิดในผักผลไม้ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

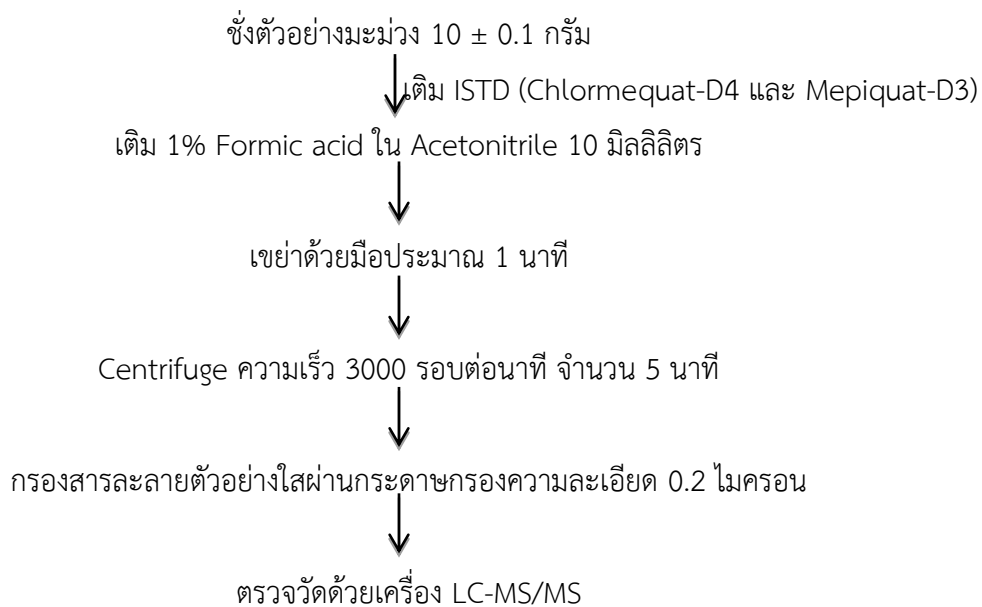
1. สารมาตรฐานวัตถุพิษได้แก่ Chlormequat chloride Mepiquat chloride Chlormequat chloride 1,1,2,2-D4 ความบริสุทธิ์ 98-99% และสารละลายมาตรฐาน Mepiquat iodide D3 (methyl D3) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารเคมีได้แก่ Acetonitrile (HPLC grade) Formic acid Ammonium formate Water (HPLC grade)
3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง (ผ่านการสอบเทียบ), Centrifuge, Food processor, Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร, Micro pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร(ผ่านการสอบเทียบ)
4. เครื่องแก้วต่างๆในห้องปฏิบัติการเช่น ขวดวัดปริมาตร (ผ่านการสอบเทียบ) ปีกเกอร์ กระจกบดวง Centrifuge tube (Teflon) ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. เครื่องมือตรวจวัตถุพิษชนิด Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ต่อกับเครื่อง Tandem mass spectrometry
6. ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาทดลองได้แก่ มะม่วง

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Chlormequat chloride, Mepiquat chloride, Chlormequat chloride 1,1,2,2-D4 (Internal standard), Mepiquat iodide D3 (methyl D3) (Internal standard) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1,000 100 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน acetonitrile และนำสารมาตรฐานที่เตรียมมาใช้ในการกระบวนการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

2. ขั้นตอนการสกัด

วิธีการสกัดสารพิษตกค้างชนิด Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงที่พัฒนาขึ้นมาใน
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด Chlormequat และ Mepiquat

3. การตั้งสภาวะเครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

- คอลัมน์ชนิด HILIC ความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.10 มิลลิเมตร ขนาดของอนุภาคภายใน 2.6 ไมครอน
- การชะสารออกจากคอลัมน์เป็นแบบ gradient โดยที่สารละลาย A เป็น Ammonium formate buffer เข้มข้น 50 mM pH 3.75 ส่วนสารละลาย B เป็น Acetonitrile อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

เวลา (นาที)	อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	สารละลาย A (เปอร์เซ็นต์)	สารละลาย B (เปอร์เซ็นต์)
0.5	0.4	20	80
1	0.4	40	60
3	0.4	60	40
5	0.4	60	40
6	0.4	20	80

8	0.4	20	80
---	-----	----	----

- ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 2 ไมโครลิตร

- อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส

1. การตั้งสภาวะเครื่อง Tandem mass spectrometry Source parameter

- Gas Temp 325°C

- Gas Flow 10 (l/min)

- Nebulizer 45 psi

- Capillary 4000 V

ตารางที่ 2 แสดง Parameter ต่างๆ ของ Mass spectrometry ที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด

Compound	Precursor	Product ion 1	Product ion 2	Dwell time	Fragmentor	Collision
Chlormequat Chloride	122.1	63.1	59.2	100	100	5
Chlormequat-D4(ISTD)	126.1	59.3	58.1	100	100	5
Mepiquat Chloride	114.2	98.1	58.1	100	135	10
Mepiquat-D3(ISTD)	117.2	101.03	98.3	100	100	10

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

1. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ทดสอบ matrix blank และ spiked matrix blank ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบสัญญาณ matrix blank และ spiked matrix blank

2. ช่วงของการวัด (Working range)

ทำการ spike สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างมะม่วง ให้มีความเข้มข้น 9 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 1 ซ้ำ ทำการสกัดตามขั้นตอนวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกับ Internal standard (แกน y) และอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของสารในตัวอย่างกับความเข้มข้นของ Internal standard (แกน x) และพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงซึ่งมีค่า correlation coefficient (R^2) ≥ 0.995

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ working range โดย spike ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พิจารณาค่า correlation coefficient (R^2) จะต้องอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้คือ 0.995

4. ความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 5 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ตามวิธีการทดสอบ แล้วคำนวณร้อยละการกลับคืนของสารที่วิเคราะห์ (%Recovery) จากสมการ

$$\%Recovery = \frac{X1 - X2}{C} \times 100$$

เมื่อ $X1$ = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่างที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

$X2$ = ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบใน sample blank (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

C = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

การประเมิน %recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method (AOAC, 2002)

5. ความเที่ยง (Precision)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ การประเมิน precision โดยการหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (\bar{X}) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (SD) นำมาคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย %RSD

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

ประเมินค่า Precision โดยใช้ HORRAT โดยคำนวณจากสมการ

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

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

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เดิมในการตรวจวิเคราะห์

หลักเกณฑ์การยอมรับของ Precision คือมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (AOAC, 2002)

6. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection)

ทำการวิเคราะห์ fortified sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ทดสอบ 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOD เท่ากับ $3 \times SD$ นำค่า LOD ที่ได้จากการคำนวณมา fortified ลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 7 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า signal/noise ของแต่ละสาร ซึ่งจะต้องมีค่า ≥ 3

7. ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

ทำการวิเคราะห์ fortified sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ทดสอบ 7 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ เท่ากับ $10 \times SD$ โดยค่า LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุอันตรายในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ค่า accuracy และ precision ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

8. การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency test, PT)

เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency test. PT) กับ EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (EURL-SRM)

ระยะเวลา

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2555 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ

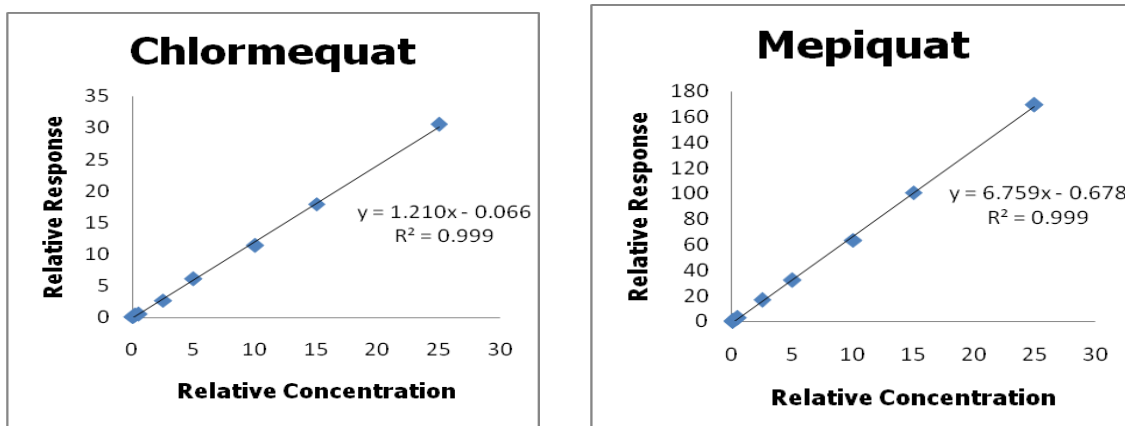
กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุเคมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

วิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank เมื่อนำสัญญาณที่ตรวจพบได้มาเปรียบเทียบพบว่าสัญญาณของ matrix blank น้อยมากเมื่อเทียบกับสัญญาณของ spiked matrix blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง

2. ช่วงของการวัด (Working range)



ผลการตรวจสอบ Working range โดยนำค่าอัตราส่วนของความเข้มข้น fortified sample 9 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ กับค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคในแต่ละระดับความเข้มข้นมาเขียนกราฟ แสดงดังภาพที่ 2 และคำนวณค่า correlation coefficient (R^2) พบว่าสามารถตรวจสอบสารพิษตกค้าง chlormequat และ mepiquat ในมะม่วงได้ตั้งแต่ช่วง 0.005-5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (แสดงดังตารางที่ 3) ภาพที่ 2 แสดงค่า Correlation coefficient (R^2) ของสารพิษตกค้างชนิด chlormequat และ mepiquat เพื่อตรวจสอบ working range

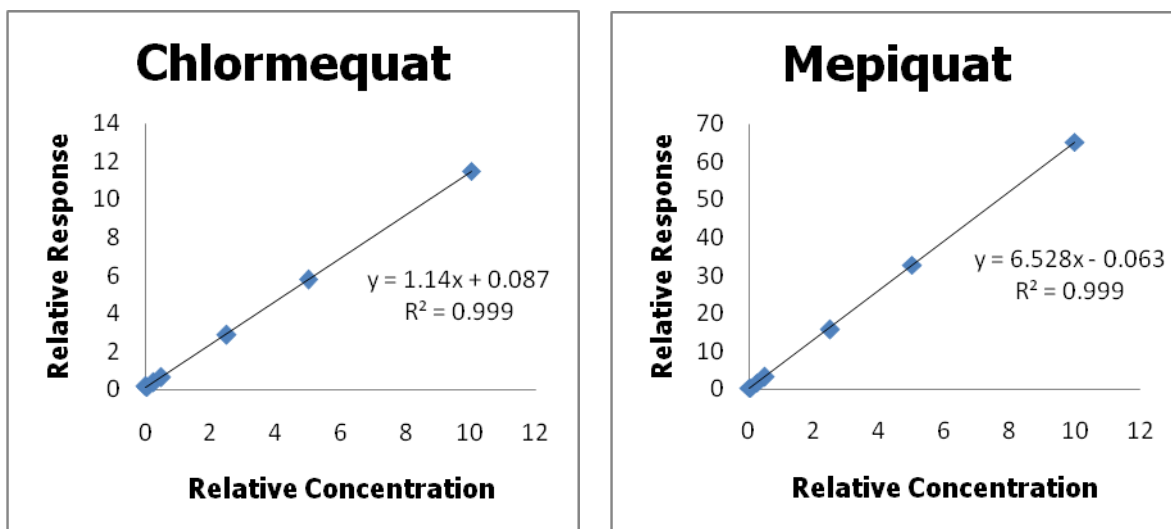
ตารางที่ 3 แสดงค่า Working Range, Correlation coefficient (R^2) ของ Chlormequat และ Mepiquat ที่ 9 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ผลการตรวจสอบ Linearity โดยนำค่าอัตราส่วนของความเข้มข้น fortified sample 7 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กับค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคในแต่ละระดับความเข้มข้นมาเขียนกราฟ แสดงดังภาพที่ 3 และคำนวณค่า correlation coefficient (R^2) ของสารทั้ง 2 ชนิด พบว่าค่า $R^2 \geq 0.995$ ซึ่งสรุปได้ว่า Linearity ของ

Pesticides	Equation	R^2	conc. (mg/kg)	วิธี การ ตรวจ จ วิเคราะห์
Chlormequat	$y = 1.2102x - 0.0665$	0.9993	0.005-5.0	
Mepiquat	$y = 6.759x - 0.6781$	0.9995	0.005-5.0	

ระหอยู่ในช่วง 0.005-2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (แสดงดังตารางที่ 4)



ภาพที่ 3 แสดงค่า Correlation coefficient (R^2) ของสารพิษตกค้างชนิด chlormequat และ mepiquat เพื่อตรวจสอบ linearity

ตารางที่ 4 แสดงค่า Linearity, Correlation coefficient (R^2) ของ Chlormequat และ Mepiquat ที่ 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Pesticides	Equation	R^2	conc. (mg/kg)
Chlormequat	$y = 1.14x + 0.0876$	0.9999	0.005-2.0
Mepiquat	$y = 6.5288x - 0.0638$	0.9998	0.005-2.0

4. ความแม่นยำ (Accuracy)

การตรวจสอบ accuracy โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ ประเมิน accuracy จาก %recovery โดยเกณฑ์การยอมรับ recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method (AOAC, 2002) โดยผลการทดสอบ %recovery แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดง %Recovery ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด chlormequat และ mepiquat ที่ช่วงระดับความเข้มข้น 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในมะม่วง (7 ซ้ำ)

Pesticide	Sample blank (mg/kg)	Fortified (mg/kg)	% Recovery							
			1	2	3	4	5	6	7	Average
Chlormequat	0.0000	0.010	98	92	82	84	98	96	100	93
	0.0000	0.020	83	84	94	92	91	98	90	90
	0.0000	0.050	96	90	105	96	100	99	98	98
	0.0000	0.500	104	107	100	98	100	103	107	103
	0.0000	1.000	101	105	90	105	94	95	97	98
Mepiquat	0.0000	0.010	102	90	94	96	84	98	94	94
	0.0000	0.020	81	104	94	100	104	93	99	96
	0.0000	0.050	104	97	104	103	99	100	107	102
	0.0000	0.500	105	102	102	95	100	101	94	100
	0.0000	1.000	114	105	102	97	105	104	104	105

5. ความเที่ยง (Precision)

ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ chlormequat และ mepiquat ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.01- 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงดังตารางที่ 6 โดยค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.32-7.75 %:ซึ่งอยู่เกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (AOAC, 2002) สำหรับการคำนวณความเที่ยงจากสมการ Horwitz (Horwitz et al., 2006.) ของสารทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีค่า HORRAT<2

ตารางที่ 6 แสดงค่า %RSD และ HORRAT ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วง (7ซ้ำ)

Sample No.	Concentration (mg/kg)									
	Chlormequat					Mepiquat				
1	0.010	0.020	0.048	0.521	1.007	0.010	0.020	0.052	0.527	1.143
2	0.009	0.018	0.045	0.535	1.052	0.009	0.018	0.049	0.509	1.053
3	0.008	0.016	0.053	0.499	0.901	0.009	0.019	0.052	0.508	1.021
4	0.008	0.017	0.048	0.491	1.051	0.010	0.019	0.052	0.473	0.970
5	0.010	0.020	0.050	0.502	0.940	0.008	0.017	0.050	0.498	1.053
6	0.010	0.019	0.049	0.513	0.948	0.010	0.020	0.050	0.503	1.041
7	0.010	0.020	0.049	0.537	0.972	0.009	0.019	0.053	0.472	1.043
Mean	0.009	0.019	0.049	0.514	0.982	0.009	0.019	0.051	0.499	1.046
SD	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.00	0.00	0.00	0.02	0.05
%RSD	7.75	7.75	4.61	3.45	5.85	6.14	6.14	3.32	4.04	4.92
Fortified	0.010	0.020	0.050	0.500	1.000	0.010	0.020	0.050	0.500	1.000
HORRAT	0.37	0.41	0.28	0.29	0.55	0.29	0.32	0.20	0.34	0.47

6. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบ LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยประเมินจากค่า Signal/Noise (S/N) ต้องมีค่ามากกว่า 3 โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการทดสอบ chlormequat ที่ความเข้มข้น 0.01 และ mepiquat ที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่า S/N มากกว่า 3

7. ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

ทดสอบ LOQ ของวิธีการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision ซึ่ง chlormequat และ mepiquat มีค่า accuracy 83– 98 % ,81-104% ค่า%RSD 7.75%, 6.14% และค่า HORRAT เท่ากับ 0.41, 0.32 ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดสอบสามารถยอมรับค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

8. การเข้าร่วมทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency test, PT)

หลังจากพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chlormequat และ mepiquat ทางห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency test, PT) กับ EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (EURL-SRM) โดยได้ตัวอย่างเป็นมันฝรั่ง ผลการทดสอบตรวจพบ mepiquat ที่ความเข้มข้น 0.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อส่งผลการทดสอบกลับไปยัง PT provider เพื่อคำนวณผลกับห้องปฏิบัติการอื่นๆที่เข้าร่วม ผลปรากฏว่าผลจากห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้างมีค่า z-score เท่ากับ 0.58 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ดังนั้นผลของการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ซึ่งเป็นเรื่องยืนยันสำหรับความใช้ได้ของวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด chlormequat และ mepiquat ในมะม่วงโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธีการทดสอบนี้มีความเหมาะสม โดยยืนยันความใช้ได้ของวิธีด้วยการพิสูจน์ในแต่ละพารามิเตอร์ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. Working range ของวิธีการตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.005 จนถึง 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
2. Linearity ที่ทำการทดสอบอยู่ในช่วง 0.005 ถึง 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า R^2 มากกว่า 0.995
3. Accuracy (%Recovery) ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ chlormequat มี %recovery อยู่ในช่วง 90 ถึง 103 เปอร์เซ็นต์ และ mepiquat อยู่ในช่วง 94 ถึง 105 เปอร์เซ็นต์
4. Precision ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.01- 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการคำนวณค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.32-7.75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการคำนวณความเที่ยงจากสมการ Horwitz ของสารทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีค่า HORRAT<2
5. LOD ของ chlormequat เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ mepiquat เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

6. LOQ โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision สารพิษตกค้างทั้ง 2 ชนิด มีค่า LOQ เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

7. เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency test. PT) กับ EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides (EURL-SRM) ตรวจพบ mepiquat ที่ความเข้มข้น 0.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่า z-score เท่ากับ 0.58 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้างสามารถนำวิธีที่ผ่านการตรวจสอบนี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chlormequat และ mepiquat ในผลไม้

2. สามารถนำวิธีการนี้ไปขยายขอบข่ายในการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้

3. ห้องปฏิบัติการมีศักยภาพในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพิ่มมากขึ้นเพื่อรองรับการเข้าร่วมเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการ (Proficiency test)

4. ถ่ายทอดวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8

11. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

World Health Organization. 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification.

M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 86, 412-431.

NATA Technical Note 17. 2012. Guideline for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Method.

AOAC. 2002. AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods.

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

SANCO. 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.