

แบบรายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2556

1. **ชุดโครงการ:** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย:** การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามหลักสากล
กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย)**การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างอีมาเม็กตินเบนโซเอท ในมะพร้าว

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ)method development and Method validation of emamectin benzoate in coconut.

4. คณะผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง	นางสาวชนิตา ทองแถม	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวลมัย ชูเกียรติวัฒนา	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นายปิยะศักดิ์ อรรคบุตร	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นวิธีการในการยืนยันความสามารถของวิธีวิเคราะห์ว่า มีความถูกต้อง แม่นยำตามหลักสากล โดยทำการพิสูจน์ตาม parameter ต่างๆ คือ linearity/range, accuracy, precision, Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าวจากวิธีสกัดปรับจากวิธี QuEChERS ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งผลการทดสอบ parameter ต่างๆ ดังนี้ linearity/range ทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 4 ระดับ ที่ความเข้มข้น 0.002-0.250mg/kg พบว่ามีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($R^2 \geq 0.995$) และมี %Recovery ในช่วง 85-97 สำหรับ accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างระดับต่างๆ รวม 10 ค่าผลการทดสอบมีดังนี้ ที่ 0.004 mg/kg มี %Recovery ในช่วง 93 -102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 ที่ 0.020 mg/kg มี %Recovery ในช่วง 85-90 มี %RSD เท่ากับ 2.00 และที่ 0.100 mg/kg มี % Recovery ในช่วง 83 -87 มี %RSD เท่ากับ 1.57 ซึ่งค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ % Recovery ในช่วง 60-120 และ %RSD มีค่าน้อยกว่า 20 ส่วนการทดสอบ LOQ พบว่าอยู่ที่ระดับ 0.004 mg/kg มี % Recovery ในช่วง 93-102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 และค่า LOD เท่ากับ 0.002 mg/kg วิธีการตรวจ

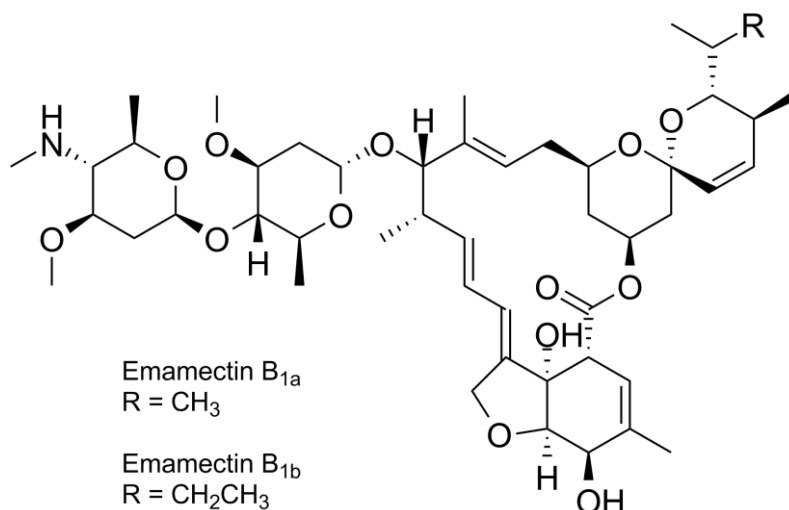
วิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าว ที่ได้ผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

Abstract

Verification the capability of the analysis method for emamectin benzoate in coconut as international principles by with following parameter; linearity/range, accuracy, precision, Limit of Detection(LOD) and Limit of Quantitation(LOQ). Method validation of emamectin benzoate in coconut from by of QuEChERS method to analysis pesticide residues with LC-MS/MS that has the result as follow linearity/range; concentrated sample in 4 levels were found that the concentration range from 0.0002-0.250 mg/kg had correlation coefficient (R^2) at 0.9998 which is considered acceptable ($R^2 \geq 0.995$). The accuracy and precision were considered by 10 replicated samples. The spiked concentration at level 0.004 mg/kg were found that recovery were range from 93-102% with %RSD at 2.80, the spiked concentration at level 0.02 mg/kg were found that recovery were range from 85-90% with %RSD at 2.00, the spiked concentration at level 0.100 mg/kg were found that recovery were range from 83-97% with %RSD at 1.57 and the 3 of the spiked concentration result were acceptable by the standard at 60-120% recovery and %RSD low than 20. The Limit of Quantitation(LOQ) of this study were found at level 0.002 mg/kg The mention statement above is proof that the analysis were laboratory to further analysis.

6. คำนำ

อิมามิเก็คติน เบนโซเอท (Emamectin benzoate) (ภาพที่ 1)เป็นสารกำจัดแมลง (Insecticide) ที่ผลิตจากเชื้อราอยู่ในดินชื่อ *Streptomyces avermitilis* ซึ่งเป็นสารประกอบตระกูลเดียวกับ avermectin สารทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพและความเป็นพิษคล้ายคลึงกัน



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ emamectin(<http://en.wikipedia.org/wiki/Emamectin>)

ค่าความเป็นพิษของสาร emamectin benzoate อยู่ในระดับมีพิษเล็กน้อยโดยมีค่าความเป็นพิษทางปาก (Oral LD50) 2,950 mg/kg ส่วนค่าพิษทางผิวหนัง (Dermal LD50) มากกว่า 2,000 mg/kg ในส่วนของผลต่อศัตรูธรรมชาติและแมลงมีประโยชน์ (Janssan et al.) (no year) รายงานว่า สาร emamectin benzoate มีพิษน้อยต่อผึ้งตัวห้ำและตัวเบียนโดยมีความเป็นพิษต่อหนู (rat) ทางปากที่ระดับ 10 mg/kg จัดอยู่ในระดับสารเคมีที่เป็นพิษมากต่อหนูแต่มีพิษน้อยต่อกระต่ายที่ระดับมากกว่า 2,000 mg/kg เป็นพิษน้อยต่อนกกระทา (quail) ที่ระดับมากกว่า 2,000 mg/kg แต่เป็นพิษสูงต่อปลาและผึ้งที่ระดับ >0.003 mg/l และ >0.009 µg/bee ตามลำดับ

ซึ่งจากการทดลองวิธีการใช้สาร emamectin benzoate กำจัดหอนหัวดำในมะพร้าวโดยวิธี Trunk injection ของกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งเป็นวิธีที่ประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดหอนหัวดำในปัจจุบัน

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

7.1 อุปกรณ์

- 7.1.1 วัสดุที่มีพิษมาตรฐาน Emamectin benzoate มี %purity เท่ากับ 90
- 7.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง 5 ตำแหน่ง
- 7.1.3 สารเคมี ได้แก่ acetonitrile, Sodium chloride, magnesium sulfate anhydrous (MgSO₄), sodium chloride (NaCl), sodium citrate dihydrate (C₆H₅Na₃O₇•2H₂O) และ di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate (C₆H₆Na₂O₇•1.5H₂O)
- 7.1.4 syringe filter membrane ชนิด PTFE
- 7.1.5 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Food Processor

7.1.6 เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Teflon centrifuge, tube, Autopipette และ volumetric flask เป็นต้น

7.2 วิธีดำเนินการ

7.2.1 การวางแผนการทดลอง

โดยการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับวิธีการตรวจวิเคราะห์ Emamectin benzoate พร้อมทั้งทำการทดลองสกัดสารพิษตกค้าง Emamectin benzoate

7.2.2 พิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) โดยกำหนด parameter ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ได้แก่

1. Linearity / working range

Linearity เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารมา plot เทียบกับค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 4 ความเข้มข้น (0.002, 0.010, 0.050 และ 0.250 mg/kg) ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ส่วน range เป็นค่าความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้ ต่ำสุดจนถึงสูงสุดที่อยู่ใน linearity ซึ่งมี ค่า accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการทดสอบ linearity / working range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างรวม 4 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ

2. Accuracy precision

การทดสอบ accuracy โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์ที่กลับคืน (% recovery) ของวัตถุที่มีพิษที่เติมลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับคือ ต่ำ (0.004 mg/kg) กลาง (0.020 mg/kg) และ สูง (0.010 mg/kg) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ส่วน precision เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยนำผลการวิเคราะห์ accuracy มาหา %RSD (relative standard deviation)

3. Limit of Quantitation (LOQ)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมีความถูกต้อง (accuracy) และ แม่นยำ (precision) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ทำการประมาณค่า LOQ จาก การคำนวณ และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.004 mg/kg รวม 10 ซ้ำ

4. Limit of Detection (LOD)

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยไม่ต้องพิสูจน์ accuracy และ precision ทำการประมาณค่า และทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.002 mg/kg รวม 10 ซ้ำ

7.2.3 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

7.2.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเนื้อมะพร้าวและน้ำมะพร้าวมาปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน

7.2.3.2 วิธีวิเคราะห์

สกัด ปรับจากวิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g ที่ homogenize แล้วลงใน 50 ml Teflon centrifuge tube.
2. เติม 10 ml acetonitrile (ACN) แล้วเขย่าโดยใช้ vortex mixer เป็นระยะเวลา 1 นาที
3. เติม 4 g magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) 1 g sodium chloride (NaCl) 1 g sodium citrate dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) และ 0.5 g di-sodium hydrogen citrate esequihydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$) แล้วนำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที
4. ตัวอย่างที่มีความเป็นกรดจะเติมสารละลาย 6 N NaOH 600 μ l
5. Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ ที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
6. Aliquot สารละลายส่วนใสปริมาตร 6 ml ใส่ใน 15 ml Teflon centrifuge tube ที่มี 150 mg PSA 950 mg $MgSO_4$ และ 75 mg C18
7. Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ ที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
8. กรองผ่านกระดาษกรอง 0.2 ไมครอนแล้วถ่ายสารละลายที่สกัดได้ใส่ใน autosampler vial ที่มี สารละลาย 5% formic acid 15 μ l (เพื่อกันสารละลายที่สกัดได้เกิดการสลายตัว)
9. วางทิ้งไว้ในตู้แช่แข็งเป็นเวลา 1 คืน

7.2.3.3 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจะใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์คือ Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS system ที่มีระบบเชื่อมต่อแบบ Electrospray Ionization โดยปรับสภาวะของเครื่อง ให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ความสามารถในการตรวจได้สูงสุด (Optimized condition) ดังนี้

1. สภาวะของเครื่อง HPLC

Column: Agilent ZORBAX Solvent Saver Plus Eclipse, 3.0 x 100 mm, 3.5 μ m

Flow rate: 0.4 mL/min

Column Temperature: 40°C

Injection volumn: 5 μ L

Mobile Phase: A, 10 mM Ammonium formate+0.1% Formic acid

B, Acetonitrile

Post run: 4 min

Total cycle time: 18 min

2. สภาวะของเครื่อง MS

Positive mode Gas temp: 350°C

Gas flow: 10 L/min

Nebulizer: 45 Psi

Capillary: 4000 V

7.2.3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยเตรียม working standard solution ของ Emamactin benzoate ใน acetonitrile เพื่อทำ calibration curve รวม 4 ระดับ ความเข้มข้นครอบคลุมช่วงของการวิเคราะห์คือที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.002-0.250mg/kg

8. ระยะเวลา: ตุลาคม 2550 – กันยายน 2551

9. สถานที่ดำเนินการ: กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร สปพ. กรมวิชาการเกษตร

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Emamactin benzoate ในมะพร้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัด ปรับจากวิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งผลการทดสอบ parameter ต่างๆ (ตารางที่ 1-2) สรุปได้ดังนี้

10.1 linearity/range ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.002-0.250mg/kg มีค่า correlation coefficient (R^2) = 0.9998 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคือมีค่า $R^2 \geq 0.995$ (FDA, 2005) และ % recovery ของ ระดับความเข้มข้นที่ทดสอบรวม 3 ระดับอยู่ในช่วง 70-102 (ตารางที่ 1) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery ในช่วง 60-120 (Codex, 1995)

10.2 accuracy และ precision ที่ความเข้มข้นในตัวอย่างระดับต่างๆ มีดังนี้ ที่ 0.004 mg/kg มี % recovery ในช่วง 93-102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 ที่ 0.020mg/kg มี % recovery ในช่วง 85-90 มี %RSD เท่ากับ 2.00 และที่ 0.100mg/kg มี % recovery ในช่วง 83 -87 มี %RSD เท่ากับ 1.57

10.3 LOD และ LOQ พบว่า LOD พบว่ามีที่ระดับ 0.002 mg/kg ยังพบว่าที่ระดับ LOD มีค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ % recovery ในช่วง 89-104 และมี % RSD เท่ากับ 8.30 ส่วนการทดสอบ LOQ ที่ระดับ 0.004 mg/kg มี % recovery ในช่วง 93 - 102 มี %RSD เท่ากับ 2.80 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (ตารางที่ 1-2)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ linearity/working range, LOD และ LOQ

parameter	conc.(mg/kg)	R^2	replication	level no.
linearity and	0.002-0.250	0.9999	1	4
working		0.9998	3	4

range				
-------	--	--	--	--

level no.	conc.(mg/kg)	average % recovery (3 rep.)
1	0.004	97
2	0.020	90
3	0.10	85

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ accuracy และ precision ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ ระดับ LOD และ LOQ จากการทดลอง 10 ซ้ำ

parameter	% recovery		precision		
	average	range	average conc.	sd	%RSD
LOD (0.002)	97	89-104	0.0019	8.05	8.30
LOQ (0.004)	97	93-102	0.0039	2.72	2.80
0.020	88	85-90	0.0175	1.78	2.00

11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัด ปรับจากวิธี QuEChERS ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LCMS/MS ซึ่งช่วงของการตรวจวิเคราะห์อยู่ที่ 0.002-0.250 mg/kg มี accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ %recovery อยู่ในช่วง 83-104 วิธีการนี้มีค่า LOQ = 0.004 mg/kg และ LOD = 0.002 mg/kg ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องแม่นยำแม้ที่ระดับ LOD สามารถให้ค่า accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง emamectin benzoate ในมะพร้าว ซึ่งใช้วิธีการสกัด ปรับจากวิธี QuEChERS ตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS เป็นวิธีการที่ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรใช้ในการตรวจสารพิษตกค้างแบบ multiresidue จึงทำให้ง่ายต่อการปฏิบัติ อีกทั้งเทคนิคการวิเคราะห์ไม่ยุ่งยาก

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Emamectin benzoate ในมะพร้าว

2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Emamectin benzoate ในพืชอื่นๆ

13. เอกสารอ้างอิง

กองกัญและสัตววิทยา. 2545. คำแนะนำ การป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืช ปี 2545. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

FAO / WHO. 2005. Codex Alimentarius Commission. CX/PR 05/37/5 March 2005.

Food and Drug Administration (FDA). 2005. Validation and Verification Guidance for Human Drug Analytical Method. ORA Laboratory Procedure. USA.

Food Standard Agency. 2004. Food Standard Agency Information Bulletin on Methods of Analysis and Sampling for Foodstuffs. Institute of Food Research, UK. www.food.gov.uk.

Anastassiades, M., &Lehotay, S. (2003).Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive SPE” for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International, 86, 412-431