

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย: วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตาม
มาตรฐานสากล

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทาง
การเกษตร

กิจกรรม : ระบุชื่อกิจกรรมตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ระบุชื่อกิจกรรมย่อยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การทดลองที่ 1.21 :

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืช 10 ชนิด ในดินโดยใช้เครื่อง LC-
MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.3

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : ระบุชื่อการทดลองตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

Method Validation for 10 Pesticides Residues Analysis in soil by LC-MS-MS

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายจรรพงค์ ประสพสุข สวพ.3

ผู้ร่วมงาน : นางสาวปริยานุช สายสุพรรณ สวพ.3

: นางวัชรพร ศรีสว่างวงศ์ สวพ.3

5. บทคัดย่อ:

วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างจำนวน 10 ชนิดสาร (alachlor, ametryn, bromacil, butachlor, chlorpyrifos, diuron, phorate, phosalone, profenofos และ propanil) ในดินได้พัฒนาวิธีสกัดแบบ QuEChERS วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS แล้วตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจากค่า specificity, range, linearity, accuracy และ precision, limit of quantification (LOQ) และ limit of detection (LOD) ผลการทดสอบพบว่าให้ค่า LOQ เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม และค่า LOD เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อกรัม ทุกชนิดสาร ส่วนการทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100 และ 500 นาโนกรัมต่อกรัม ของทั้ง 10 ชนิดสาร ให้ค่า recovery ช่วง 84% ถึง 107% และค่า relative standard deviations (%RSD) ระหว่าง 0.5-4.9 % (n=10) ผ่านเกณฑ์ยอมรับตามเอกสารหมายเลข SANTE/11945/2015 ที่กำหนด recovery ระหว่าง 70 ถึง 120% และ RSD<20% ทุกชนิดสาร

คำสำคัญ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารพิษตกค้าง ดิน

Abstract:

A method for the determination of 10 pesticides residues (alachlor, ametryn, bromacil, butachlor, chlorpyrifos, diuron, phorate, phosalone, profenofos and propanil) in soil was developed using the QuEChERS method followed by LC-MS/MS (High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry). The method was validated in terms of specificity, range, linearity, accuracy and precision, limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD). The LOQ for 10 pesticides in soil sample was 10 ng/g and LOD was 1 ng/g at all pesticides. At fortification levels of 10, 100 and 500 ng/g of all pesticides, it was shown that recoveries ranged from 84% to 107% with relative standard deviations (%RSD) of 0.5 to 4.9 % (n=10). Document Number SANTE/11945/2015 recommends mean recovery values within the range 70 to 120% and RSD<20%. All the validation results fulfill the criteria for the acceptance mentioned above.

Key words: Method Validation, pesticide residues, soil

6. คำนำ :

ปัจจุบันภาคการเกษตรของไทยยังคงนำเข้าปัจจัยการผลิตจากต่างประเทศในปริมาณที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะวัตถุดิบทางการเกษตร ที่มีการนำเข้าปีละหลายหมื่นตัน ผลจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างกว้างขวางและต่อเนื่องยาวนาน ทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อม การฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชส่วนหนึ่งจะยังคงค้างในพืช ดิน และน้ำด้วย ดังนั้นเกษตรกรควรจะได้รับทราบข้อมูลสารพิษตกค้างในแปลงปลูกด้วยเพื่อให้เกิดความตระหนักถึงความเสี่ยงและผลกระทบที่จะเกิดขึ้น สำหรับพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน นิยมใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างกว้างขวางแพร่หลายทั้งสารกำจัดแมลงและกำจัดวัชพืช ปัญหาที่พบในพื้นที่คือเกิดกรณีพิพาทเกี่ยวกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชระหว่างเกษตรกรด้วยกัน เกษตรกรได้รับมีอาการแพ้หรือผื่นคันจากการสัมผัสดินและน้ำในแปลง สำหรับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในดินมีระยะเวลาการตกค้างแตกต่างกันตามชนิดสาร สภาพและชนิดของดิน เช่นสารกำจัดแมลง

chlorpyrifos มีรายงานว่าโดยทั่วไปมีครึ่งชีวิตตกค้างในดิน 7-120 วัน phorate มีครึ่งชีวิตตกค้างในดิน 2-173 วัน ส่วน phosalone มีครึ่งชีวิตตกค้างในดิน 7-63 วัน ขณะที่ profenofos มีครึ่งชีวิตตกค้างในดินเพียง 3-7 วัน (Exttoxnet, 2016) สำหรับสารกำจัดวัชพืช ametryn มีครึ่งชีวิตตกค้างในดิน 70-250 วัน, diuron 30-365 วัน, bromacil 60 -240 วัน, alachlor 14-30 วัน, butachlor 21-35 วัน และ propanil มีครึ่งชีวิตตกค้างในดินเพียง 1-3 วัน (Exttoxnet, 2016 ; Terry et.al., 1998)

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินมีความจำเป็นและสำคัญในการดำเนินการติดตามผลกระทบและค้นหาสาเหตุของปัญหาเพื่อนำไปสู่การแก้ไขอย่างเหมาะสม แต่เนื่องจากทางห้องปฏิบัติการ สวพ. 3 ยังไม่มีวิธีมาตรฐานและเหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดิน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ให้ได้อย่างรวดเร็วทันสมัย มีความถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือในระดับสากล การวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินมีความยุ่งยากเนื่องจากดินมีองค์ประกอบทั้งส่วนที่เป็นอินทรีย์วัตถุและอนินทรีย์ (มีขี้, ไม่มีขี้ และไอออน) จึงมีผลต่อการยึดเกาะหรือการตกค้างของแต่ละชนิดสารกำจัดศัตรูพืชในดิน วิธีการสกัดสารพิษในดินจำเป็นต้องใช้สารละลายที่เหมาะสมและใช้เวลาสกัดนานเมื่อเทียบกับการสกัดสารพิษตกค้างในพืช ปัจจุบันมีวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินเทคนิคใหม่ที่น่าสนใจได้แก่ ในการทดสอบของ UCT (2014) และ Zhang et al.(2012) ที่ใช้วิธีการสกัด แบบ QuEChERS ใช้ LC-MS-MS ในการวิเคราะห์และ HPLC ใช้คอลัมน์ C18 สามารถวิเคราะห์ได้ที่หลายชนิดสาร ผลการทดสอบสารพิษตกค้างในดิน 21 ชนิดสาร ได้ค่า recovery และ ค่า reproducibility ผ่านเกณฑ์การยอมรับ การใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดินมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางเช่นในการศึกษาของ Tadeo et al.(2012) และ Jose Vera et al.(2013) ได้ตรวจสอบเอกสารวิธีการสกัดสารพิษตกค้างในดินแบบ QuEChERS พบว่ามีการนำเทคนิคนี้มาใช้สกัดและวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่หลากหลายผลการทดสอบส่วนใหญ่ให้ค่าการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติและเงื่อนไขของวิธีการและยืนยันความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาหรือดัดแปลงมาจาก reference method โดยทั่วไปมีพารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบ ได้แก่ range, linearity limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), accuracy ประเมินจากค่า % recovery และ precision ประเมินจากค่า HORRAT ของ repeatability และ reproducibility สำหรับการทดลองในปีงบประมาณ 2559 มีจุดประสงค์เพื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลง กลุ่ม Organophosphates และสารกำจัดวัชพืชตกค้างในดิน ใช้วิธีสกัดตัวอย่างแบบ QuEChERS ที่ให้มีข้อดีคือทำได้รวดเร็ว ปลอดภัย ประหยัด และมีประสิทธิภาพ โดยใช้เครื่อง LC-MS-MS ผลการทดลองจะนำไปใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักการทางสถิติและเกณฑ์ข้อกำหนดในระดับสากล และเมื่อได้ผลสรุปแล้วจะนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์เพื่อให้บริการตรวจสอบสารพิษตกค้างในดิน ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนต่อไป

7. วิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ครกบดตัวอย่าง
2. ตะแกรงร่อน (Test Sieve) ขนาด 60 Mesh
3. เครื่องชั่งละเอียด (balance) 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
5. เครื่องเขย่าแนวตั้ง (funnel shaker)
6. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
7. เครื่องแก้วและ centrifuge tube
8. ultrasonic bath
9. เครื่อง LC-MS-MS (Thermo scientific Ultimate 3000 HPLC และ Compact quadrupole MS/MS ยี่ห้อ Bruker)
10. column Thermo scientific Acclaim™ RSLC 120 C18 2.2 µm 120Å° 2.1×100 mm

สารเคมี

1. Methanol HPLC grad
2. Water HPLC grad
3. Acetonitrile HPLC grad (ACN)
4. สารมาตรฐานalachlor, ametryn, bromacil, butachlor, chlorpyrifos, diuron, phorate, phosalone, profenofos และ propanil
5. magnesium sulfate ($MgSO_4$) (96%และ 99% Assay), sodium chloride (NaCl), primary secondary amine (PSA)

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารมาตรฐาน (standard solution)

1.1 เตรียม stock standard solution ของสารมาตรฐาน 10 ชนิด ได้แก่alachlor, ametryn, atrazine, butachlor, chlorpyrifos, diuron, phorate, phosalone, profenofos และ propanil โดยชั่งสารแต่ละชนิดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน อยู่ในช่วงประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวด volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Acetonitrile HPLC เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตร จะได้ stock standard solution ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ppm (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

1.2 เตรียม intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดโดยเจือจางจาก stock standard solution เติม Acetonitrile HPLC เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรจะได้ intermediate standard solution ของสารแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 ppm

1.3 เตรียม working standard solution โดยปิเปต intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดใส่รวมกันใน volumetric flask ใบเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile HPLC เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ mix working standard solution 6 ระดับ มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.001-1.0 ppm

2. การปรับสภาวะของ เครื่อง LC-MS/MS

เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ คือ Thermo scientific Ultimate 3000 HPLC และ Compact quadrupole MS/MS ยี่ห้อ Bruker ที่มีระบบเชื่อมต่อแบบ Electrospray Ionization (ESI) โดยปรับสภาวะของเครื่องให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้ความสามารถในการตรวจวัดได้สูงสุด (Optimized condition) ดังนี้

สภาวะเครื่อง HPLC

Column: Thermo scientific Acclaim™ RSLC 120 C18 2.2 µm 120A° 2.1×100 mm

Flow rate: 0.2 ml/min

Column Temperature: 30 °C

Injection Volume: 5 µl

Mobile Phase: A = 10% MeOH + 5 mM ammonium formate + 0.01% formic acid 99%

: B = MeOH + 5 mM ammonium formate + 0.01% formic acid 1%

Total cycle time: 20 min

สภาวะของเครื่อง MS

Positive mode Dry Gas: 8.0 L/min

Dry Temp: 200 °C

Nebulizer: 2.0 Bar

Capillary: 2500 V

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

	Retention time (min)	Flow (ml/min)	%B	%C	%D
1	0.00	0.20	1.00	0.00	0.00
2	0.00	0.20	1.00	0.00	0.00

3	1.00	0.20	1.00	0.00	0.00
4	3.00	0.20	39.00	0.00	0.00
5	14.00	0.40	99.90	0.00	0.00
6	16.00	0.48	99.90	0.00	0.00
7	16.10	0.48	1.00	0.00	0.00
8	19.00	0.48	1.00	0.00	0.00
9	19.10	0.20	1.00	0.00	0.00
10	20.00	0.20	1.00	0.00	0.00

3. วิธีการสกัดตัวอย่างดิน ประยุกต์วิธี QuEChERS

3.1 ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ลงในหลอด Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2 เติม acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง (funnel shaker) 30 นาที

3.3 เติม magnesium sulfate 96% ($MgSO_4$) 4 กรัม และ sodium chloride (NaCl) 1 กรัม เขย่าด้วย Vortex 1 นาที

3.4 นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,800 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ($^{\circ}C$) นาน 5 นาที

3.5 ปิเปตสารละลายส่วนบน (aliquat) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ vial ขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี $MgSO_4$ (99% assay) 750 มิลลิกรัม และ PSA 500 มิลลิกรัม แล้ว vortex อีก 1 นาที

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

3.7 นำสารละลาย aliquat (ชั้น ACN) กรองผ่าน syringe filter PTEE 0.2 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4. ตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานของดินที่นำมาใช้ในการทดลอง

ได้แก่ ค่า pH ค่า OM ธาตุอาหารในดิน (N, P, K, Ca และ Mg) และ soil texture

5. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

5.1 การทดสอบ specificity/ selectivity

โดยทดสอบ spike solvent blank และ matrix blank เปรียบเทียบผล

5.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity range)

5.2.1 การทดสอบช่วงของการวัด (working rang)

ทำการทดสอบ fortified sample (spike mix standard solution ของสารมาตรฐาน ลงในตัวอย่าง) 9 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ (1-1000 ppb) ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัด ในข้อ 3 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับพื้นที่ใต้พีคหรือ peak area (แกน Y) พิจารณายอมรับค่าความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรง

5.2.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

ทำการทดสอบ fortified sample (spike mix standard solution ของสารมาตรฐาน ลงในตัวอย่าง) 6 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ (5-500 ppb) ทำการสกัดตัวอย่างตามวิธีการสกัดใน ข้อ 3 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับพื้นที่ใต้พีค หรือ peak area (แกน Y) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient ; r) เกณฑ์ยอมรับที่ correlation coefficient ; $r \geq 0.995$

5.3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

เป็นการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีทดสอบกับค่าอ้างอิง จากการคำนวณ ทดสอบ fortified sample 5 ระดับความเข้มข้น (sample blank ที่เติม spike mix standard solution) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำไป คำนวณค่า accuracy จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ recovery

5.4 การทดสอบความเที่ยง (Precision)

เป็นการประเมินค่าความใกล้เคียงกันระหว่างข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ทดสอบ fortified sample 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เป็นช่วงครอบคลุม ค่า LOQ ทำการ สกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ คำนวณ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (% RSD) กำหนดเกณฑ์การยอมรับ SANTE/11945/2015 มีค่าไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ถ้า เปอร์เซ็นต์ RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด จากพิจารณาจากค่า HORRAT เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) < 2

5.5 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection ; LOD)

เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับ ความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของ SD ของ Blank ซึ่งค่า $LOD = 3SD$ โดยทำ การทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 1 ppb จำนวน 10 ซ้ำ ทำการสกัดตาม วิธีการสกัดในข้อ 3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินค่า signal to noise ratio (S/N) ≥ 3

5.6 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation ; LOQ)

เป็นการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์และรายงานผลได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สามารถรายงานค่าได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ Blank ซึ่งค่า $LOQ = 10SD$ โดยทำการทดสอบ fortified sample ที่ระดับ ความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ จำนวน 10 ซ้ำ ทำการสกัดตามวิธีการสกัดในข้อ 3 นำผล การวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินค่า accuracy และ precision

เวลาและสถานที่ เริ่มต้นและสิ้นสุดในปีงบประมาณ 2559 สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการตรวจ วิเคราะห์สารพิษตกค้างและวัตถุอันตรายทางการเกษตร สวพ.3

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

1. ตรวจสอบคุณสมบัติทั่วไปพบว่า มีลักษณะเป็นดินทราย มีค่า pH 5.98 ดังแสดงในภาคผนวก และผลการตรวจสอบสารพิษตกค้างในตัวอย่างดิน ใช้ method Screening ผลการวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่มที่ต้องการทดสอบตกค้างในตัวอย่างดิน
2. การทดสอบ spike solvent blank และ matrix blank ให้ผลไม่แตกต่างกันดังนั้นในการเตรียม working standard เพื่อทำกราฟมาตรฐานจึงไม่ต้องใช้ matrix blank
3. การทดสอบวิเคราะห์สาร หลังปรับสภาวะของ เครื่อง LC-MS/MS

เมื่อได้การปรับสภาวะของ เครื่อง LC-MS/MS แล้วทำการทดสอบวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม Organophosphate และ สารกำจัดวัชพืช ที่ใช้ในพื้นที่ (สารละลายมาตรฐาน 10 ppb injection vol. 5 ul) ได้แก่ alachlor, ametryn, atrazine, butachlor, chlorpyrifos, diuron, phorate, phosalone, profenofos และ propanil ให้ peak are สูง และ RT ที่ชัดเจน ดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ด้วยเครื่อง Lc-ms/ms

Analyte	Area	Score	RT [min]	RT[min]exp.	Δ RT [min]
alachlor	71702	++++	10.37	10.37	0.00
ametryn	165089	++++	9.18	9.14	0.04
bromacil	102912	++++	8.17	8.16	0.01
butachlor	64066	++++	12.42	12.48	-0.06
chlorpyrifos	27441	++++	12.68	12.74	-0.05
diuron	68778	++++	8.59	8.58	0.01
phorate	7207	++++	11.38	11.37	0.01
phosalone	35480	++++	11.30	11.31	-0.01
profenofos	29331	++++	12.04	12.07	-0.04
propanil	20001	++++	9.42	9.44	-0.02

4. ผลการทดสอบ working range

แต่ละสารได้ค่า working range แตกต่างกันโดย alachlor, ametryn, butachlor, chlorpyrifos, phorate และ profenofos อยู่ในช่วง 1 -1000 ppb ส่วน bromacil, diuron, phosalone และ propanil อยู่ในช่วง 1 -500 ppb ดังแสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า working range และ correlation coefficient (R^2) ของดิน ทดสอบ 9 ระดับความเข้มข้น 1 ซ้ำ 1 5 10 50 100 200 300 500 และ 1000 ppb

Pesticides	Equation	R^2	conc. ppb
alachlor	$5194.6x + 83969$	0.9957	1-1000
ametryn	$10671x + 152069$	0.9972	1-1000
bromacil	$981.31x + 8531$	0.9970	1-500
butachlor	$3925.8x + 51386$	0.9970	1-1000
chlorpyrifos	$1468.8x + 34492$	0.9957	1-1000
diuron	$4620.8x + 49853$	0.9952	1-500
phorate	$680.57x + 6942.1$	0.9975	1-1000
phosalone	$2237.7x + 24650$	0.9955	1-500
profenophos	$1662.9x + 33503$	0.9951	1-1000
propanil	$1707.2x + 15440$	0.9955	1-500

5. การทดสอบ linearity ทดสอบ 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และความเข้มข้นของสารพิษตกค้าง พบว่า ในช่วงความเข้มข้น 5-500 ppb ทุกชนิดสารผ่านเกณฑ์ยอมรับ $R^2 > 0.995$ ยกเว้น phosalone ที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับในช่วงความเข้มข้น 5-300 ppb ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่า Linearity และ correlation coefficient (R^2) ของดิน ทดสอบ 6 ระดับความเข้มข้น 3 ซ้ำ 5 10 100 200 300 และ 500 ppb

Pesticides	Equation	R^2	conc. ppb
alachlor	$5932.3x + 27252$	0.9989	5-500
ametryn	$11704x + 40145$	0.9997	5-500
bromacil	$998.96x + 9816.2$	0.9965	5-500
butachlor	$4314.7x + 5611.6$	0.9997	5-500
chlorpyrifos	$1684.6x + 21737$	0.9956	5-500
diuron	$4630.9x + 61052$	0.9960	5-500

phorate	731.99x + 1043.3	0.9998	5-500
phosalone	2487.5x + 21632	0.9952	5-300
profenofos	1881.9x + 11729	0.9982	5-500
propanil	1755.5x + 14633	0.9975	5-500

6. ผลการทดสอบ accuracy 5 ความเข้มข้นเป็นช่วงครอบคลุม ค่า LOQ ของสาร ได้แก่ 10 50 100 200 และ 500 ppb จำนวน 10 ซ้ำ จากการประเมินผลการทดสอบ จาก % Recovery พบว่า สารที่ทดสอบส่วนใหญ่ให้ค่า % recovery ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับ 70-110% ทุกระดับความเข้มข้น ยกเว้น diuron และ phosalone ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppb ดังแสดงในตารางที่ 5
7. ผลทดสอบ precision 5 ความเข้มข้นเป็นช่วงครอบคลุม ค่า LOQ ของสาร ได้แก่ 10 50 100 200 และ 500 ppb จำนวน 10 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบ จาก ค่า HORRAT พบว่าทุกชนิดสารผ่านเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 และ %RSD ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ 5
8. ผลการทดสอบ LOQ ได้จากการทดสอบ 10 ซ้ำ แล้วประเมินจากค่า % recovery, % RSD และ Signal to Noise Ratio (S/N) พบว่าที่ความเข้มข้น 10 ppb ค่า recovery อยู่ในช่วง 84-105 % ส่วนค่า % RSD อยู่ในช่วง 0.9-4.9 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง ที่ 6
9. ผลการทดสอบ LOD ทดสอบ 10 ซ้ำ ทดสอบสารที่ความเข้มข้น 1 ppb ให้ค่า S/N 5-56 (เกณฑ์ S/N ≥ 3) ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 5 แสดงค่า % recovery %RSD และ Horrat ของดินที่ 5 ระดับความเข้มข้น

pesticides	n=10 Fortified (ppb)	Average % recovery	%RSD	Horrat
phosalone	10	97.80	2.5	0.12
	50	146.55	2.3	0.15
	100	94.89	1.2	0.08
	200	91.68	0.6	0.05
	500	99.03	1.8	0.15

profenofos	10	97.60	1.6	0.08
	50	83.08	4.0	0.24
	100	92.31	1.9	0.13
	200	88.65	0.7	0.05
	500	77.95	2.2	0.18
propanil	10	87.80	1.7	0.08
	50	100.06	2.9	0.17
	100	83.60	3.6	0.24
	200	92.11	1.4	0.11
	500	97.55	2.5	0.21

ตารางที่ 5 แสดงค่า % recovery %RSD และ Horrat ของดินที่ 5 ระดับความเข้มข้น (ต่อ)

pesticides	N=10	Average	%RSD	Horrat
	Fortified (ppb)	% recovery		
alachlor	10	84.40	1.3	0.06
	50	102.36	2.4	0.14
	100	88.77	2.1	0.14
	200	91.04	1.4	0.11
	500	93.95	1.6	0.13
ametryn	10	95.10	2.3	0.11
	50	101.98	1.4	0.08
	100	92.33	2.6	0.17
	200	92.85	1.7	0.12
	500	95.66	1.3	0.11
bromacil	10	90.80	4.0	0.19
	50	103.22	2.9	0.17
	100	86.32	2.2	0.14
	200	89.30	1.3	0.10
	500	95.67	1.0	0.09
butachlor	10	87.70	0.9	0.04

	50	84.66	2.0	0.12
	100	88.83	2.4	0.16
	200	92.01	0.5	0.04
	500	81.11	1.9	0.15
chlorpyrifos	10	100.50	4.9	0.23
	50	90.78	2.2	0.13
	100	93.25	2.9	0.19
	200	94.15	1.6	0.12
	500	77.90	2.2	0.18
diuron	10	93.60	1.8	0.09
	50	123.58	2.4	0.15
	100	99.23	1.2	0.08
	200	96.75	1.1	0.08
	500	94.96	2.0	0.17
phorate	10	94.90	4.1	0.19
	50	106.72	2.3	0.14
	100	80.29	2.4	0.16
	200	83.06	0.8	0.06
	500	102.64	2.4	0.20

ตารางที่ 6 แสดงค่า LOQ ของชนิดสารพิษที่ตรวจสอบในดิน

Pesticides	LOQ (ppb)	%Recovery n=10	%RSD n=10	S/N
Alachlor	10	84	1.3	40
Ametryn	10	95	2.3	173
Bromacil	10	91	4.0	90
Butachlor	10	88	0.9	63
Chlorpyrifos	10	101	4.9	150
Diuron	10	94	1.8	312
Phorate	10	95	4.1	56
Phosalone	10	98	2.5	879
Profenophos	10	98	1.6	180
Propanil	10	88	1.7	161

ตารางที่ 7 แสดงค่า LOD ของชนิดสารพิษที่ตรวจสอบในดิน

Pesticides	LOD (ppb)	S/N
Alachlor	1	9
Ametryn	1	56
Bromacil	1	5
Butachlor	1	12
Chlorpyrifos	1	26
Diuron	1	44
Phorate	1	9
Phosalone	1	27
Profenophos	1	29
Propanil	1	21

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดแมลง จำนวน 4 ชนิด และสารกำจัดวัชพืชในดิน จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ alachlor, ametryn, butachlor, chlorpyrifos, phorate, profenofos bromacil, diuron, propanil และ phosalone ใช้วิธีสกัดแบบ QuEChERS วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS-MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.3 ผลการตรวจสอบค่า working range ของวิธีทดสอบสามารถ ในช่วงความเข้มข้น 1 - 1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร linearity ให้ค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995 ในทุกชนิดสาร มีค่า accuracy ประเมินจาก %recovery พบว่าชนิดสารส่วนใหญ่ ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น อยู่ในช่วง 70-120% ยกเว้น diuron, phosalone ที่ความเข้มข้น 50 ppb ส่วน precision ของวิธีทดสอบที่ความเข้มข้น 10 – 500 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร ประเมินผลการทดสอบ จาก ค่า HORRAT พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 และ %RSD ไม่เกิน 15% ผ่านเกณฑ์ยอมรับ สำหรับค่า limit of detection เท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อ มิลลิลิตร ส่วนค่า limit of quantification เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากข้อมูลการทดสอบ สามารถนำวิธีการไปใช้ในการวิเคราะห์สารกำจัดแมลง กลุ่ม Organophosphates และสารกำจัด วัชพืชในดิน และให้บริการตรวจสอบสารพิษตกค้างในพื้นที่ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และน่าเชื่อถือได้ อย่างไรก็ตามมีข้อเสนอแนะว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถพัฒนาให้วิเคราะห์สารพิษบางชนิดสารให้ได้ LOD ที่ต่ำกว่า 1 ppb ได้เนื่องจากที่ความเข้มข้น 1 ppb ยังให้ค่า S/N ที่สูงกว่า 3 หลายเท่า ขั้นตอน ที่จะต้องพัฒนาให้ดีขึ้นคือเวลาในการเขย่าตัวอย่างที่ใช้เวลานาน 30 นาที จึงจำเป็นต้องทดสอบใน ช่วงเวลาต่างๆต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :นำมาใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในดิน เพื่อติดตามปัญหาสารพิษตกค้างและแก้ไขปัญหาในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน

11. เอกสารอ้างอิง

ดุขฎฐิ มั่นคงความดี และอุมาพร สุขม่วง. 2554. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (chemical method validation). เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

AOAC. 2004. Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data, HorRat for SLV.doc, 2004-01-18, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

EUROPEAN COMMISSION. 2016. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document No SANTE/11945/2015. Available:https://ec.europa.eu/food/.../pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf. Accessed. January 7, 2017.

Extoxnet . 2016. Pesticide Active Ingredient Information. Pesticide Management Education Program. Available: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/index.html>. Accessed. July 7, 2015.

Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to validate Pesticide Residue Method Performance. In: Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus(eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

Tadeo J.L., Perez R.A., Albero B., Garcia-Valcarcel A.I. and C. Sanchez-Brunete. 2012. Review of Sample Preparation Techniques for the Analysis of pesticide Residues in soil. Journal of AOAC International Vol 95, No. 5.

Terry R Roberts, David H Hutson, Philip W Lee, Peter H Nicholls and R Plimmer Jack. 1998. Metabolic Pathways of Agrochemicals. part I Herbicide and Plant growth Regulators. Print publication date: 20 Jul 1999.

UTC. 2014. Using a QuEChERS Approach for the Determination of Pesticide Residues in Soil. Available: <http://www.spexsampleprep.com>. Accessed. July 7, 2015.

Vera J., Correia-Sa L., Paiga P., Braganca I., Fernandes V.C., Domingues V.F. and C. Delerue-Matos. 2013. QuEChERS and Soil Analysis: An Overview. DOI:10.2478/Sampre-2013-0006.Sampre.2013.54-77. Available: <http://www.degruyter.com/view/j/sampre.2013.1.issue/sampre-2013-0006>. Accessed. July 7, 2015.

Zhang, F. Z., Wang, L., Zhou, L., Wu, D., Pan, H. J., and C. P. Pan (2012). Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 78, 116-122. Available:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.003>. Accessed. July 7, 2015.

12. ภาคผนวก

ผลการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างดินที่ใช้ทดสอบ

ข้อมูลพื้นฐานดินที่ใช้ในการทดลอง ตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ สวพ.3 ผลการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

- pH 5.94
- OM 0.2957 %
- Avail. P 20.88 ppm
- Exch. K 50 ppm
- Exch. Ca 25 ppm
- Exch. Mg 27 ppm
- N 0.0148 %
- Texture sand

สูตรการคำนวณ

การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% recovery)

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

โดยที่ A = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample)

B = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (Unspike sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

การคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

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

Mean; \bar{X} คือ ค่าเฉลี่ย

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คำนวณ 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