

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย: วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตาม  
มาตรฐานสากล

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทาง  
การเกษตร

กิจกรรม : ระบุชื่อกิจกรรมตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ระบุชื่อกิจกรรมย่อยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การทดลองที่ 3.7 :

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ในพริกโดยใช้เครื่อง  
LC- MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.3

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) :

Method Validation for Pesticides Residues Analysis of Organophosphorus Group in  
Chili by LC-MS-MS

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายจรรพงค์ ประสพสุข สวพ.3

ผู้ร่วมงาน : นางสาวปริยานุช สายสุพรรณ สวพ.3

: นางวัชรพร ศรีสว่างวงศ์ สวพ.3

5. บทคัดย่อ:

วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์แกโนฟอสฟอรัส จำนวน 15 ชนิดสารในพริกได้พัฒนาวิธีสกัด  
แบบ QuEChERS วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS แล้วตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบจาก ค่า  
specificity, range, linearity, accuracy และ precision, limit of quantification (LOQ) และ  
limit of detection (LOD) ผลการทดสอบพบว่าทั้ง 15 ชนิดสาร ให้ค่า LOQ เท่ากับ 10 นาโนกรัม  
ต่อกรัม ยกเว้น EPN กับ pirimiphos-ethey ซึ่งมีค่าไม่เกินค่า MRLs ของสารพิษตกค้างในพริก  
สำหรับ ค่า LOD ส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น azoxystobin, dichlorvos,  
EPN, Imidacloprid และ parathion-methyl มีค่า LOD เท่ากับ 3 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนการ  
ทดสอบ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 200 และ 500 นาโนกรัมต่อกรัม ทั้ง 15  
ชนิดสารส่วนใหญ่ ให้ค่า recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับระหว่าง 80% ถึง 110% ยกเว้น EPN กับ  
pirimiphos-ethey ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม, chlorpyrifos และ  
parathion-methyl ที่ระดับความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อกรัม ค่า relative standard  
deviations (%RSD) ระหว่าง 0.74 ถึง 14.5% (n=10) ผ่านเกณฑ์ SANTE/11945/2015 ที่กำหนด  
RSD<20% ทุกชนิดสาร

## คำสำคัญ สารพิษตกค้าง พริก

### Abstract:

A method for the determination of 15 organophosphorus pesticides residues in chili 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 13 pesticides in chili sample was 10 ng/g; all of pesticides not over MRLs. Most of pesticides LOD were 1 ng/g; except azoxystobin, dichlorvos, EPN, Imidacloprid and parathion-methyl which this were 3 ng/g. At fortification levels of 10, 100, 200 and 500 ng/ml most of pesticides, it was shown that recoveries ranged from 80% to 110% with relative (except; EPN, pirimiphos-ethy 10 and 100 ng/g, chlorpyrifos and parathion-methyl 200 ng/g) standard deviations (%RSD) of 0.74 to 14.5 % (n=10).

**Key words:** pesticide residues, chili

## 6. คำนำ :

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 มีจุดประสงค์เพื่อทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช กลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสตกค้างในพริก ใช้วิธีสกัดตัวอย่างแบบ QuEChERS (Anastassiades, 2003) ที่ให้ข้อดีคือ ทำได้รวดเร็ว ปลอดภัย ประหยัด และมีประสิทธิภาพ โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ผลการทดลองจะนำไปใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามหลักการทางสถิติและเกณฑ์ข้อกำหนดในระดับสากล และเมื่อได้ผลสรุปแล้วจะนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์เพื่อให้บริการตรวจสอบสารพิษตกค้างในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนต่อไป

## 7. วิธีการ

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) ชนิด 3 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องเหวี่ยงสารให้ตกตะกอน (centrifuge) เครื่องเขย่าแนวตั้ง (funnel shaker) เครื่องเขย่า (shaker) เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เครื่องเป่าระเหยด้วยไนโตรเจน (N-evaporator)
2. อุปกรณ์และเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์ 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
3. เครื่อง LC-MS/MS (Thermo scientific Ultimate 3000 HPLC และ Compact quadrupole MS/MS ยี่ห้อ Bruker)
4. column Thermo scientific Acclaim™ RSLC 120 C18 2.2  $\mu\text{m}$  120A° 2.1×100 mm

### สารเคมี

1. methanol HPLC grad
2. water HPLC grad
3. acetonitrile HPLC grad (ACN)
4. สารมาตรฐาน azoxystrobin, chlorpyrifos, diazinon, dicotophos, EPN, ethion, imidacloprid, malathion, parathion-methyl, phosalone, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, prochloraz, profenophos และ triazophos
5. magnesium sulfate anhydrous ( $\text{MgSO}_4$ )
6. graphitized carbon black (GCB)
7. sodium chloride (NaCl)
8. primary secondary amine (PSA)

### วิธีดำเนินการ

#### 1. การเตรียมสารมาตรฐาน (standard solution)

1.1 เตรียม stock standard solution ของสารมาตรฐาน 15 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, chlorpyrifos, diazinon, dicotophos, EPN, ethion, imidacloprid, malathion, parathion-methyl, phosalone, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, prochloraz, profenophos และ triazophos โดยชั่งสารแต่ละชนิดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน อยู่ในช่วงประมาณ 10 มิลลิกรัม ใส่ในขวด volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ methanol เพื่อละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับ

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

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

1.3 เตรียม working standard solution โดยปิเปต intermediate standard solution ของสารมาตรฐานแต่ละชนิดใส่รวมกันใน volumetric flask ใบเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย matrix blank (methanol) เขย่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้ mix working standard solution 7 ระดับ มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.003-1.0 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. วิธีการสกัดตัวอย่างพริก ประยุกต์วิธี QuEChERS

3.1 ชั่งตัวอย่างพริก 15 กรัม ลงในหลอด Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร

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

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

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

3.5 ปิเปตสารละลายส่วนบน (aliquat) 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 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง 2 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วย vertex mixer อีก 2 นาที

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

3.7 ปิเปตสารละลายส่วนบนปริมาตร 2 ml ลงใน Test tube นำไปลดปริมาตรด้วย N-evap จากนั้นเติม methanol 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน Nylon syringe filter 0.2 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง

4. วิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างพริกที่นำมาทดลองจะต้องไม่พบสารพิษตกค้างในรายการที่ทดสอบ

5. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

5.1 การทดสอบ specificity/ selectivity

โดยทดสอบ spike สารมาตรฐานลงไป ใน matrix blank จะต้องไม่มี peak รบกวน

5.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity range )

5.2.1 การทดสอบช่วงของการวัด (working rang)

ทำการทดสอบ fortified sample ( spike mix standard solution ของสารมาตรฐาน ลงในตัวอย่าง ) 7 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ (3-1000 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 (3-500 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 4 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 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) กำหนดเกณฑ์การยอมรับ โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ SANTE/11945/2015 มีค่าไม่ เกิน 20% ถ้าเปอร์เซ็นต์ RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด จากพิจารณาจากค่า HORRAT เกณฑ์การ ยอมรับตาม 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)  $\geq 3$

#### 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 การวิเคราะห์ที่ได้มา ประเมินค่า accuracy และ precision ตามเกณฑ์การยอมรับ SANTE/11945/2015

**เวลาและสถานที่** เริ่มต้นและสิ้นสุดในปีงบประมาณ 2559 สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการตรวจ วิเคราะห์สารพิษตกค้างและวัตถุอันตรายทางการเกษตร สวพ.3

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### ผลการทดลอง

1. ทดสอบวิเคราะห์สารในกลุ่ม Organophosphate และกลุ่มอื่นๆที่ใช้ในแปลงปลูกพริก โดยทดสอบฉีดสารละลายมาตรฐาน 10 ppb ขนาด injection vol. 5 ul ให้ค่า peak area และ score ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** แสดงผลทดสอบวิเคราะห์สารในกลุ่ม Organophosphate และกลุ่มอื่นๆ ที่ใช้ในแปลงปลูกพริก (สารละลายมาตรฐาน 10 ppb injection vol. 5 ul)

Analyte	Area	Score	RT [min]	RT[min]exp.	$\Delta$ RT [min]
Azoxystobin	105432	++++	8.99	8.97	0.02
Chlorpyrifos	27441	++++	12.68	12.74	-0.05
Diazinon	153821	++++	11.04	11.05	-0.01
Dichlorvos	14325	++++	6.98	6.98	0.00
Dicrotophos	44855	+++	4.48	4.44	0.04
Dimethoate	63872	++++	5.23	5.21	0.03
Diuron	68778	++++	8.59	8.58	0.01
EPN	7019	+++	11.69	11.70	-0.01
Ethion	82732	++++	12.44	12.50	-0.06
Ethoprophos	120496	++++	10.20	10.20	0.00
Fenitrothion	5672	+++	9.93	9.92	0.01
Imidacloprid	21323	++++	4.75	4.71	0.04
Malathion	72929	++++	9.63	9.63	0.00
Methomyl	68258	+++	4.12	4.07	0.05
Parathion-methyl	3681	+++	9.27	9.24	0.03
Pirimiphos-ethyl	168365	++++	12.32	12.37	-0.05
Pirimiphos-methyl	155404	++++	11.37	11.37	0.00
Phosalone	35480	++++	11.30	11.31	-0.01
Prochloraz	47158	+++	11.29	11.29	0.00
Profenophos	29331	++++	12.04	12.07	-0.04
Prothiophos	4847	+++	13.68	13.61	0.07
Triazophos	134180	++++	9.92	9.92	0.00

2. ตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างพริกที่ใช้ทดสอบ โดยการตรวจสอบสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง LC-MS/MS ใช้วิธีสกัดแบบ QuEChERS ใช้ method Screening ผลการวิเคราะห์ไม่พบสารพิษตกค้างกลุ่มที่ต้องการทดสอบตกค้างในตัวอย่างพริก

3. ทดสอบวิธี วิเคราะห์ ตาม parameter ได้แก่ linearity, range, accuracy, precision, LOQ และ LOD
- 3.1 ผลการทดสอบ Working range ที่ 7 ระดับความเข้มข้น 3 5 10 50 100 500 และ 1000 ppb ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และความเข้มข้นของสารพิษตกค้าง ดังแสดงในตารางที่ 3
- 3.2 ผลการทดสอบ Linearity ที่ 6 ระดับความเข้มข้น 3 5 10 50 100 และ 500 ppb ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ประเมินค่า correlation coefficient ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง response และความเข้มข้นของสารพิษตกค้าง ได้ค่า  $R^2$  อยู่ในเกณฑ์  $> 0.995$  ดังแสดงในตารางที่ 4
- 3.3 ผลการทดสอบ accuracy ที่ 4 ระดับความเข้มข้นครอบคลุม ค่า LOQ และหรือค่า MRLs ของสาร ได้แก่ 10 100 200 และ 500 ppb จำนวน 10 ซ้ำ จากการประเมินผลการทดสอบ จาก % recovery พบว่า การทดสอบสารที่ความเข้มข้น 100-500 ppb ส่วนใหญ่ให้ค่า % recovery ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับ ยกเว้น ยกเว้น EPN กับ pirimiphos-ethy ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม, chlorpyrifos และ parathion-methyl ที่ 200 ppb ดังแสดงในตารางที่ 5
- 3.4 ผลการทดสอบ precision ที่ 4 ระดับความเข้มข้นเป็นช่วงครอบคลุม ค่า LOQ และหรือค่า MRLs ได้แก่ 10 100 200 และ 500 ppb จำนวน 10 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบ จาก %RSD พบว่าผ่านเกณฑ์ยอมรับ ทุกชนิดสาร (%RSD  $< 15\%$ ) ส่วนค่า HORRAT ผ่านเกณฑ์การยอมรับ คือ น้อยกว่า 2 ดังแสดงในตารางที่ 6
- 3.5 ผลการทดสอบ LOQ ได้จากการทดสอบ 10 ซ้ำ % recovery % RSD และ S/N ผลการทดสอบ พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ 70-120% ยกเว้น EPN และ pirimiphos-ethyl สารทั้งสองชนิดนี้ จึงให้ค่า LOQ ที่ความเข้มข้น 200 ppb ดังแสดงในตารางที่ 7
- 3.6 ผลการทดสอบ LOD 10 ซ้ำ ให้ค่า S/N ในช่วง 3-88 ดังแสดงในตารางที่ 8



ตารางที่ 3 แสดงค่า range และ correlation coefficient ( $R^2$ ) ของพริก ทดสอบ 7 ระดับ ความเข้มข้น 1 <sup>๓</sup> 3 5 10 50 100 500 และ 1000 ppb

Pesticides	Equation	$R^2$	conc. ppb
Azoxystrobin	$5513.5x + 10648$	0.9993	3.0 - 1,000.0
Chlorpyrifos	$1718x + 15693$	0.9971	3.0 - 1,000.0
Diazinon	$8186.9x - 14055$	0.9997	3.0 - 1,000.0
Dicrotophos	$4791.8x - 14885$	0.9994	3.0 - 1,000.0
EPN	$528.45x - 1822.3$	0.999	3.0 - 1,000.0
Ethion	$4191.2x + 28031$	0.9981	3.0 - 1,000.0
Imidacloprid	$1465.9x - 4103.4$	0.9996	3.0 - 1,000.0
Malathion	$3925.8x + 10876$	0.9988	3.0 - 1,000.0
Parathion-methyl	$186.13x - 971.08$	0.9992	3.0 - 1,000.0
Phosalone	$1219.3x + 12503$	0.9938	3.0 - 1,000.0
Pirimiphos-ethyl	$6394.4x - 18179$	0.9995	3.0 - 1,000.0
Pirimiphos-methyl	$7093x - 26351$	0.9996	3.0 - 1,000.0
Prochloraz	$1417.2x + 3328.5$	0.9983	3.0 - 1,000.0
Profenophos	$2076.6x + 15053$	0.9966	3.0 - 1,000.0
Triazophos	$5913.1x + 1616.3$	0.9998	3.0 - 1,000.0

**ตารางที่ 4** แสดงค่า Linearity และ correlation coefficient ( $R^2$ ) ของพริก ทดสอบ 6 ระดับความเข้มข้น 3 5 10 50 100 และ 500 ppb (3 ซ้ำ)

Pesticides	Equation	$R^2$	conc. ppb
Azoxystrobin	$5762.3x - 8128.4$	0.9998	3.0 - 500
Chlorpyrifos	$1896.2x + 161.07$	0.9999	3.0 - 500
Diazinon	$8379.6x - 28029$	0.9994	3.0 - 500
Dicrotophos	$4959.8x - 26827$	0.9986	3.0 - 500
EPN	$549.28x - 3762$	0.9982	3.0 - 500
Ethion	$4570.6x + 654.8$	0.9999	3.0 - 500
Imidacloprid	$1500.8x - 6683.1$	0.9991	3.0 - 500
Malathion	$4126.1x - 9418.5$	0.9998	3.0 - 500
Parathion-methyl	$186.07x - 1231.6$	0.9988	3.0 - 500
Phosalone	$1386.2x - 1585$	0.9999	3.0 - 500
Pirimiphos-ethyl	$6683.4x - 34663$	0.9988	3.0 - 500
Pirimiphos-methyl	$7335.2x - 42810$	0.9986	3.0 - 500
Prochloraz	$1505.2x - 5498$	0.9996	3.0 - 500
Profenophos	$2303.4x - 2024.3$	1	3.0 - 500
Triazophos	$6216.1x - 32604$	0.9989	3.0 - 500

ตารางที่ 5 แสดงค่า % recovery %RSD และ Horrat ของพริกที่ 4 ระดับความเข้มข้น

pesticides	Fortified (ppb) N=10	Average %recovery	%RSD	HORRAT
Azoxystrobin	10	98.60	3.80	0.18
	100	107.83	1.63	0.11
	200	91.10	2.17	0.16
	500	101.62	1.35	0.12
Chlorpyriphos	10	95.60	2.75	0.13
	100	87.75	1.73	0.11
	200	113.64	1.17	0.09
	500	103.02	1.76	0.15
Diazinon	10	80.50	1.58	0.07
	100	95.50	2.28	0.15
	200	96.04	2.67	0.20
	500	97.80	1.48	0.13
Dicrotophos	10	104.20	8.86	0.42
	100	94.10	2.58	0.17
	200	97.39	1.91	0.14
	500	95.93	3.16	0.27
EPN	10	62.30	14.52	0.64
	100	72.92	3.51	0.22
	200	107.18	1.14	0.09
Ethion	10	76.00	2.97	0.14
	100	86.08	1.69	0.11
	200	97.67	1.65	0.12
	500	101.87	1.10	0.09

Imidacloprid	10	98.56	2.15	0.10
	100	87.64	1.90	0.12
	200	97.38	0.87	0.06
	500	100.71	0.94	0.08
malathion	10	80.00	5.34	0.24
	100	81.78	4.78	0.31
	200	97.73	1.37	0.10
	500	99.97	0.61	0.05

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงค่า % recovery %RSD และ Horrat ของพริกที่ 4 ระดับความเข้มข้น

pesticides	Fortified (ppb)	Average	%RSD	HORRAT
	N=10	%recovery		
parathion-m	10	104.80	3.92	0.19
	100	97.46	3.48	0.23
	200	113.96	5.04	0.38
	500	100.38	1.95	0.17
pirimiphos-e	10	67.30	4.09	0.18
	100	73.71	1.75	0.11
	200	93.11	2.95	0.22
	500	103.58	2.17	0.19
pirimiphos-m	10	104.80	3.92	0.19
	100	81.55	4.90	0.32
	200	102.05	0.74	0.06
	500	100.17	1.82	0.16
phosalone	10	81.70	4.28	0.20
	100	83.27	2.65	0.17
	200	92.30	4.48	0.33
	500	96.28	4.12	0.35

Prochloraz	10	94.90	12.92	0.61
	100	94.17	4.09	0.27
	200	82.08	3.97	0.29
	500	99.80	1.28	0.11
Profenophos	10	84.60	3.35	0.15
	100	80.06	2.04	0.13
	200	103.46	1.49	0.11
	500	98.86	1.24	0.11
Triazophos	10	81.80	2.43	0.11
	100	102.73	1.75	0.12
	200	92.56	1.21	0.09
	500	106.45	1.92	0.17

ตารางที่ 6 แสดงค่า LOQ ของชนิดสารพิษที่ตรวจสอบในพริก

Pesticides	LOQ (ppb)	%Recovery N=10	%RSD	S/N
Azoxystobin	10	99	3.8	451
Chlorpyrifos	10	96	2.8	150
Diazinon	10	81	1.6	259
Dichlorvos	10	104	8.5	27
EPN	10	62	14.5	77
Ethion	10	76	3.0	800
Imidacloprid	10	99	2.2	62
Malathion	10	80	5.3	379
Parathion-methyl	10	105	3.9	94
Pirimiphos-ethyl	10	67	4.1	390
Pirimiphos-methyl	10	105	3.9	247
Phosalone	10	82	4.3	879

Prochloraz	10	95	12.9	414
Profenophos	10	85	3.4	180
Triazophos	10	82	2.4	580

**ตารางที่ 13** แสดงค่า LOD ของชนิดสารพิษที่ตรวจสอบในพริก

Pesticides	LOD (ppb)	S/N
Azoxystobin	3	70
Chlorpyrifos	1	20
Diazinon	1	38
Dichlorvos	3	9
EPN	3	20
Ethion	1	77
Imidacloprid	3	20
Malathion	1	36
Parathion-methyl	3	30
Pirimiphos-ethyl	1	76
Pirimiphos-methyl	1	36
Phosalone	1	9
Prochloraz	1	88
Profenophos	1	19
Triazophos	1	39

**9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :**

ในการทดสอบวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์แกโนฟอสฟอรัส จำนวน 15 ชนิดสารในพริกโดยใช้วิธีสกัดแบบ QuEChERS ผ่านเกณฑ์การทดสอบในหลายระดับความเข้มข้นโดยเทียบเกณฑ์มาตรฐานตามเอกสารแนะนำ SANTE/11945/2015 จำนวน 11 ชนิดสาร ชนิดสารที่ไม่ผ่านพบว่า % recovery ของ EPN กับ pirimiphos-ethyl ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb ให้ค่า recovery 63 และ 67% ตามลำดับ (เกณฑ์ 70-120%) และที่ระดับ 100 ppb ให้ค่า recovery 72 และ 73% ตามลำดับ (เกณฑ์ 80-110%) ส่วน chlorpyrifos และ parathion-methyl ที่ระดับความเข้มข้น 200 ppb ให้ค่า recovery 113.6 และ 113.9% ตามลำดับ (เกณฑ์ 80-110%) ค่า relative

standard deviations (%RSD) ระหว่าง 0.74 ถึง 14.5% (n=10) ผ่านเกณฑ์ SANTE/11945/2015 ที่กำหนด RSD<20% ทุกชนิดสาร แสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ดีขึ้นเมื่อพิจารณาสาเหตุที่ทำให้ recovery ไม่ผ่านเกณฑ์ อาจมาจากขั้นตอนการเปลี่ยน solvent จาก ACN มาเป็น MeOH โดยอาศัยเครื่อง N-evaporator ซึ่งหากนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS โดยที่ไม่ต้องเปลี่ยน solvent น่าจะให้ค่าการทดสอบที่ดีขึ้นได้

**10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :** สามารถนำวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพริกเพื่อบริการตรวจสอบสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนได้ และสามารถนำไปสู่การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของ สวพ.3 ต่อไป

## 11. เอกสารอ้างอิง

- ดุขฎิ มั่นคงความดี และอุมาพร สุขม่วง. 2554. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี (chemical method validation). เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ. มกช. 2559. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกช.9002-2559. สารพิษตกค้าง ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 133 ตอนพิเศษ 288 ง.วันที่ 13 ธันวาคม พุทธศักราช 2559.
- AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Available:www.aoac.org/aoac.../AOAC.../SLV\_Guidelines\_Dietary\_Supplements.pdf. Accessed. January 7, 2017.
- AOAC. 2004. Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data, HorRat for SLV.doc, 2004-01-18, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Anastassiades, M., S.J. Lehotay, D. Stajnbaher and F.J. Schenck. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetone extraction/partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the determination of pesticide residues in produce, J. AOAC 86: 412-431.
- 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.
- European Union. 2007. MRL Status report. Chillies (Green chillies). V2.0-07/12/2007. Available:www.nda.agric.za/daDev/.../doc/Chillies%20MRL%20Datasheet.pdf. Accessed. January 31, 2017.

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. 305p.

## 12. ภาคผนวก

### สูตรการคำนวณ

1. การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% recovery)

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

โดยที่ A = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (Spike sample)

B = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐาน (Unspike sample)

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมในตัวอย่าง

2. การคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD)

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

Mean;  $\bar{X}$  คือ ค่าเฉลี่ย

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. 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 ( $\text{RSD}_r$ ) 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