

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. ชื่อโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
กิจกรรมที่ 1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ
3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างอะมิทราซ (Amitraz) และสารอนุพันธ์ในพริก
ชื่อการทดลอง : Method Development and Validation for Amitraz and Its Metabolites in Chilli
4. คณะผู้ดำเนินการ
หัวหน้าการทดลอง นางสาววนิดา สุขประเสริฐ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน นายวีระสิงห์ แสงวรรณ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างอะมิทราซและสารอนุพันธ์ในพริก โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Spectrometry (LC-MS/MS) ได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐานอะมิทราซและสารอนุพันธ์ออกจากกัน และมีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจวิเคราะห์ โดยศึกษาเปรียบเทียบในพริก 2 ชนิด ได้แก่ พริกจินดาแดง และพริกมันดำ ทดสอบวิธีการสกัดตัวอย่าง 3 วิธี ได้แก่ สกัดด้วยวิธี Original QuEChERS (Anastassiades, et.al, 2003) วิธี EN QuEChERS (Anastassiades, et.al, 2008) และวิธี Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV, 2010) ในพริกจินดาแดง พบว่าได้ค่า %recovery ที่แตกต่างกัน ดังนี้ วิธี Original QuEChERS ได้ค่า recovery amitraz และ DMPF เฉลี่ยร้อยละ 52 และ ร้อยละ 78 ตามลำดับ วิธี EN QuEChERS recovery ได้ค่า recovery amitraz และ DMPF เฉลี่ยร้อยละ 57 และ ร้อยละ 85 ตามลำดับ ส่วนวิธี Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV 2010) ได้ค่า recovery amitraz และ DMPF เฉลี่ยร้อยละ 86 และ ร้อยละ 153 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ EN QuEChERS มาใช้ในการศึกษา DMPF และเลือกวิธีการสกัดแบบ Ethyl acetate Extraction (EURL-FV) มาใช้ในการสกัด Amitraz ส่วนในพริกมันดำ เลือกวิธีการสกัดแบบ EN QuEChERS มาใช้ในการศึกษา ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ทดสอบช่วงของการวัด (Range) และความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 และยืนยันผลการทดสอบด้วย % recovery ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า %recovery อยู่ในช่วง ร้อยละ 83 -104 ในพริกจินดาแดง และช่วงร้อยละ 75-105 ในพริกมันดำ และ สำหรับความเที่ยง (precision) มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง ช่วงร้อยละ

ละ 1.8 – 11.4 ในพริกจินดาแดง และช่วงร้อยละ 3.23 -11.91 ในพริกมันดำ ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limits Of Detection : LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เชิงปริมาณ (Limited Of Quantitation: LOQ) เท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Abstract

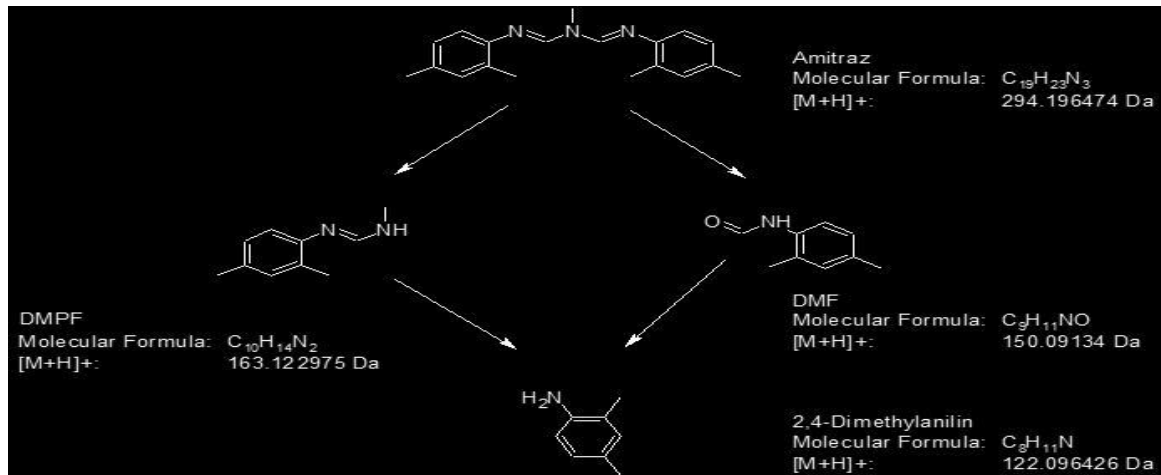
Amitraz and its derivative (DMPF: N-2,4-dimethylphenyl-N-methyl formamidine) in Chilli (e.g. Red Hot Chilli and Green Chilli : *Capsicum frutescens* Linn.) were studied by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) technique. Both residues were separated in suitable condition and selected method. Three extraction methods were studied and compared with % recovery such as Original QuEChERS (Anastassiades, et al., 2003), EN QuEChERS (Anastassiades. et al., 2008) and Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV, 2010). The % recovery in each method of amitraz DMPF were 52 and 78%; 57 and 85% ; 86 and 153% respectively. As the results the Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV) was applied to detect amitraz, while EN QuEChERS was to detect its derivative. The method validation was carried out the linearity ranges were between 0.01 – 0.5 mg/kg with correlation coefficient (r) is more than 0.995. In addition, the %recovery at level 0.01, 0.1 and 0.5 mg/kg were 83 – 104% for Red Hot Chilli and 75 – 105% for Green Chilli. % RSD was shown between 1.8 – 11.4% for Red Hot Chilli and 3.23 – 11.91% for Green Chilli. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) of amatraz and its derivative is 0.005 and 0.01 mg/kg, respectively.

6. คำนำ

อะมิทราซ (Amitraz) เป็นสารเคมีกลุ่ม amidin มีสารสำคัญคือ N-2,4-dimethylphenyl-N-methyl formamidine (DMPF) ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์กำจัดได้ทั้งไรและแมลง ไม่ออกฤทธิ์ในทางดูดซึม กำจัดไรได้ทุก ระยะของการเจริญเติบโต มีพิษเฉียบพลัน (acute oral LD₅₀) ทางปากต่อหนู 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทาง ผิวหนังมากกว่า 1,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีพิษต่อผึ้งน้อยมาก ศัตรูพืชที่กำจัดได้ ได้แก่ ไรแมงมุมแดงและไร อื่น ๆ เพลี้ยอ่อน แมลงหริ้วขาวฝาย เพลี้ยหอย หนอนมวนใบ ไชและหนอนผีเสื้อระยะแรก ตัวเบียนภายนอกของสัตว์ เลี้ยง รวมทั้งเห็บและเหา สำหรับในพริก ใช้กำจัดไรขาวในพริก และไรศัตรูพืชต่างๆ มีคุณสมบัติในการคุมไข่ อัตรา การใช้ 30-60 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นให้ทั่วต้น เมื่อพบโรครบาด ระยะเวลาที่ใช้ก่อนการเก็บเกี่ยว 2-7 สัปดาห์ ขึ้น ทะเบียนในไทยเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 เลขทะเบียน CAS No. 33089-61-1 เปนอันตรายต่อปลา ไม่เข้ากับ สารเคมีที่มีฤทธิ์ปนดาง ปลอดภัยต่อแมลงที่เป็นประโยชน์ทั้งหมด จะใช้ได้ผลดีเมื่อสภาพอากาศแห้ง มีอันตราย เมื่อถูกผิวหนังและกลืนกินเขาไป นอกจากนี้ อะมิทราซ ยังเป็นสารที่มีการนำมาใช้ในทางสัตวแพทย์เพื่อป้องกัน และกำจัดแมลงที่รบกวนสัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์ กลไกการเกิดพิษพบว่า อะมิทราซมีฤทธิ์เป็น α 2-adrenergic agonist และ monoamine oxidase inhibitor (MAOI) มีผลต่อระบบประสาท ระบบหลอดเลือดและหัวใจ นอกจากนี้การที่อะมิทราซสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายสารสื่อ ประสาท norepinephrine และ serotonin จึงส่งผลกระทบต่อระบบประสาท ทั้งยังมีรายงานว่าอะมิทราซมีผล ยับยั้งการหลั่ง prostaglandin อีกด้วย ความเป็นพิษจากสารพิษชนิดนี้มักเกิดจากการกินผลิตภัณฑ์ที่มีสารอะ

मितราซเป็นส่วนผสมหรือจากการใช้อย่างไม่ถูกวิธี (<https://www.bloggang.com/mainblog.php?id=yakkeaw&month=01-12-2010&group=7&gblog=5>)

อะมิตราซ ประกอบด้วยสารอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ อะมิตราซ และ N-2,4-dimethylphenyl-N-methylformamidine (DMPF) ซึ่งกลไกการเกิดสารอนุพันธ์ของอะมิตราซ แสดงไว้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะมิตราซและการเกิดสารอนุพันธ์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ (Method Validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนาวิธี ปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีให้เหมาะสมแล้วและมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นหรือเลือกมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ (ทิพวรรณ, 2549) สำหรับขั้นตอนในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มีรายการที่ทำการพิสูจน์คุณลักษณะเฉพาะได้แก่ ความจำเพาะเจาะจง (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 (วิชญ์ แจ้งใบ และคณะ, 2557)

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาประยุกต์เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างอะมิตราซและสารอนุพันธ์ให้มีความไวสูงและจำเพาะเจาะจงมากขึ้น รวมถึงการหาวิธีการเตรียมตัวอย่างให้มีความสะดวกรวดเร็วและประหยัด รวมถึงการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาให้มีความถูกต้องและแม่นยำ สำหรับวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จะได้นำไปใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร และถ่ายทอดไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้องภายใต้สังกัดกรมวิชาการเกษตรต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารมาตรฐานวัตถุที่มีพิษ ได้แก่ amitraz 99.0% และ N-2,4-dimethylphenyl-N-methylformamide (DMPF) 99.0%
2. สารเคมี ได้แก่ Acetone (AR grade) Dichloromethane (AR grade) Acetonitrile (HPLC grade) Methanol (HPLC grade) Hexane (PR grade) Ethyl acetate (PR grade) Formic acid Ammonium formate Water (HPLC grade) NaCl MgSO₄ Na₃Citrate dehydrate Na₂HCitrate sesquihydrate Primary secondary amine (PSA) C18 Graphitized carbon black (GCB)
3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่งที่ผ่านการสอบเทียบ, Centrifuge, Food processor Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร Micro pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร
4. เครื่องแก้วต่างๆในห้องปฏิบัติการเช่น Erlenmeyer flask Volumetric flask Beaker Cylinder Centrifuge tube (Teflon) ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. เครื่องมือตรวจวัดวัตถุที่มีพิษชนิด Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ต่อกับเครื่อง Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น LCMSD QQQ 6460
6. ตัวแทนพืชที่นำมาทดลอง ได้แก่ พริกจินดาแดง และพริกมันดำ

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย และวางแผนการทดลอง
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ amitraz และ N-2,4-dimethylphenyl-N-methylformamide (DMPF) ใน acetonitrile โดย เตรียม stock standard (ความเข้มข้นประมาณ 1,000 ppm) จากสารมาตรฐานของ amitraz และ N-2,4-dimethylphenyl-N-methylformamide (DMPF) และนำไปเตรียม intermediate standard (ความเข้มข้น 100 ppm) และ working standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำเป็น calibration curve และ spike ลงในตัวอย่าง
3. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ อะมิทราซและอนุพันธ์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS
 - 3.1 ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS ที่เหมาะสมดังนี้
 - 3.1.1 เตรียมเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ LC-MS/MS
 - 3.1.2 ตั้งสภาวะเครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)
 - 3.1.3 คอลัมน์ชนิด Synergi fusion-RP18 ความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดของอนุภาคภายใน 2.0 ไมครอน ขนาดของอนุภาคภายใน 5 มิลลิเมตร
 - 3.1.4 Mobile phase สาร A เป็น Ammonium formate buffer เข้มข้น 5 mM กับ 0.01 % Formic acid ส่วนสาร B เป็น Acetonitrile อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนผสมของ Mobile phase แบบ Gradient

| เวลา (นาที) | อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที) | สารละลาย A (เปอร์เซ็นต์) | สารละลาย B (เปอร์เซ็นต์) |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0 | 0.3 | 50 | 50 |
| 4 | 0.3 | 50 | 50 |
| 5 | 0.3 | 30 | 70 |
| 5.1 | 0.3 | 0 | 100 |
| 13.5 | 0.3 | 0 | 100 |
| 14.0 | 0.3 | 95 | 5 |
| 15.0 | 0.3 | 50 | 50 |

3.1.5 ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 2 ไมโครลิตร

3.1.6 อุณหภูมิของคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส

3.1.7 การตั้งสภาวะเครื่อง Tandem mass spectrometry

3.1.8 MS QQQ Mass Spectrometer

1) Scan type : Multi Reaction Monitoring (MRM)

2) Ion mode : Electrospray Ionization (ESI)

3.1.9 Source parameter

1) Gas Temp 325°C

2) Gas Flow 10 (l/min)

3) Nebulizer 60 psi

4) Capillary 4500 V (Positive mode)

ตารางที่ 2 แสดง Parameter ต่างๆ ของ Mass spectrometry ที่เหมาะสมกับ อะมิทราซและสารอนุพันธ์

| Compound | RT (min) | Ion transition (primary) | Dwell time | Frag (V) | CE (V) | Ion transition (secondary) | Dwell time | Frag (V) | CE (V) |
|----------|-------------|-----------------------------|---------------|-------------|-----------|-------------------------------|---------------|-------------|-----------|
| amitraz | 7.215 | 292.2 > 107.0 | 50 | 110 | 15 | 294.2 > 122.1 | 50 | 110 | 30 |
| DMPF | 3.991 | 163.0 > 107.0 | 50 | 110 | 15 | 294.2 > 117.0 | 50 | 110 | 35 |

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร อะมิทราซและสารอนุพันธ์ด้วยเครื่อง LC-MS/MSสามารถแยกอะมิทราซและสารอนุพันธ์ออกจากกันได้ และมีลำดับการออกจากคอลัมน์ของสารและค่า retention time แสดงดังตารางที่ 3 รวมถึงมีความเฉพาะเจาะจง และมีความไวสูงในการตรวจวัด โดย DMPF และ Amitraz มีค่า

retention time (t_R) เท่ากับ 3.991 และ 7.215 นาที ตามลำดับ และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ อะมิทราซและ สารอนุพันธ์ 15 นาที

ตารางที่ 3 ค่า Retention time ของอะมิทราซและสารอนุพันธ์

| Pesticides | Retention time (min) |
|------------|----------------------|
| DMPF | 3.991 |
| Amitraz | 7.215 |

3.2 ศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสม โดยออกแบบการทดลองโดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารตัวอย่าง 3 วิธี ดังนี้

3.2.1 สกัดด้วยวิธี Original QuEChERS (Anastassiades, et al., 2003)

ชั่งตัวอย่างพริก 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ทำ 7 ซ้ำ) จากนั้นเติม Acetonitrile 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ $MgSO_4$ 4 กรัม กับ NaCl 1 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 1 มิลลิลิตร เติมสารผสมระหว่าง PSA 50 มิลลิกรัม $MgSO_4$ 150 มิลลิกรัม และ C 18 จำนวน 200 มิลลิกรัม นำไปผสมด้วย vortex mixer ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.2.2 สกัดด้วยวิธี EN QuEChERS (Anastassiades, et al., 2008)

ชั่งตัวอย่างพริก 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ทำ 7 ซ้ำ) จากนั้นเติม Acetonitrile 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ $MgSO_4$ 4 กรัม NaCl 1 กรัม Sodium Citrate dehydrate 1 กรัม และ Sodium Hydrogen Citrate sesquihydrate 0.5 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารผสมระหว่าง PSA 125 มิลลิกรัม กับ $MgSO_4$ 750 มิลลิกรัม นำไปผสมด้วย vortex mixer ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.2.3 สกัดด้วยวิธี Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV, Analysis of pesticide residue in fruit and vegetable with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1, 2010)

ชั่งตัวอย่างพริก 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ทำ 7 ซ้ำ) จากนั้นเติม Ethyl acetate 20 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ $NaHCO_3$ 3 กรัม Na_2SO_4 10 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที แล้วเอาไป

เขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath 3 นาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,200 rpm 3 นาที หลังจากนั้น เป่าเปลี่ยน solvent เป็น acetonitrile แล้วกรองสารละลายส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

เมื่อได้สถานะของเครื่อง LC-MS/MS ในการแยกและตรวจวิเคราะห์และวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสม จึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตาม parameter ต่างๆ ดังนี้

4.1 ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ทดสอบ matrix blank และ spiked matrix blank ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบสัญญาณ matrix blank และ spiked matrix blank

4.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Range)

Range ทดสอบโดย spike สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างพริกที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.05 0.1 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 7 ซ้ำ ทำการสกัดตามขั้นตอนวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน y คือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน และแกน x คือความเข้มข้นของสารในตัวอย่างและพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงซึ่งมีค่า correlation coefficient (r) \geq 0.995

Linearity ทดสอบเช่นเดียวกับ range โดย spike ที่ความเข้มข้น 0.01 0.02 0.05 0.1 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พิจารณาค่า

4.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 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)

4.4 ความเที่ยง (Precision)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ การประเมิน precision โดยการหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (X) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (SD) นำมาคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย %RSD

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

4.5 ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of detection)

ทำการวิเคราะห์ fortified sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOD เท่ากับ $3 \times SD$ นำค่า LOD ที่ได้จากการคำนวณมา fortified ลงในตัวอย่าง นำผลที่ได้มาคำนวณค่า signal/noise

4.6 ปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

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

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2558 - กันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ อะมิทราซและสารอนุพันธ์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร อะมิทราซและสารอนุพันธ์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สามารถแยกอะมิทราซและสารอนุพันธ์ออกจากกันได้ และมีลำดับการออกจากคอลัมน์ของสารและค่า retention time ดังแสดงตารางที่ 4 รวมถึงมีความเฉพาะเจาะจง และมีความไวสูงในการตรวจวัด โดย DMPF และ amitraz มีค่า retention time (t_R) เท่ากับ 3.991 และ 7.215 นาที ตามลำดับ และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ อะมิทราซและสารอนุพันธ์ 15 นาที

1.2 เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่าง

ดำเนินการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ฟริกจินดาแดงเป็นตัวอย่างในการทดสอบ และเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ วิธี Original QuEChERS, EN QuEChERS และ Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV) โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมลงในตัวอย่าง และสกัดด้วยวิธีที่ทำการศึกษาตัวอย่างละ 7 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่า Recovery ของ Amitraz และ DMPF ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ

| Pesticides | No | Original QuEChERS | | | EN QuEChERS | | | EURL-FV,2010 | | |
|------------|----|-------------------|------|------|-------------|------|------|--------------|-------|------|
| | | %Rec (n=7) | SD | %RSD | %Rec (n=7) | SD | %RSD | %Rec (n=7) | SD | %RSD |
| Amitraz | 1 | 52 | 1.36 | 2.64 | 57 | 2.48 | 4.34 | 86 | 2.88 | 3.35 |
| DMPF | 2 | 78 | 5.39 | 6.95 | 85 | 2.21 | 2.61 | 153 | 14.32 | 9.37 |

จากตารางแสดงผลการเปรียบเทียบค่า recovery ของการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี วิธีละ 7 ซ้ำ จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยวิธี Original QuEChERS และ EN QuEChERS ให้ค่า recovery ของ Amitraz เฉลี่ย 52% และ 57% ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ส่วนวิธีสกัดแบบ Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV) สามารถสกัด recovery ของ Amitraz ได้เฉลี่ย 86% ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด แต่สำหรับ DMPF วิธีสกัดแบบ Ethyl acetate Extraction (EURL-FV) มีค่า recovery สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด วิธี Original QuEChERS และ วิธี EN QuEChERS สามารถสกัด recovery ได้เฉลี่ยเท่ากับ 78 และ 85 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกวิธีในการสกัด Amitraz แบบ Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV) และ สกัด DMPF แบบ EN QuEChERS ในการสกัดตัวอย่างพริกจินดาแดงครั้งนี้

1.3 การศึกษา Matrix effect

ทำการทดสอบและเปรียบเทียบ Matrix match calibration curve กับ Standard calibration curve ของอะมิทราซและสารอนุพันธ์ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.001-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด ซึ่งชุดแรกเตรียมใน acetonitrile และชุดที่สองเตรียมใน matrix ของพริกที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี En QuEChERS และตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลจากการเขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีค (แกน y) กับความเข้มข้น (แกน x) นำค่าความชันจากสมการเส้นตรงของทั้ง solvent และ matrix มาเปรียบเทียบค่าความแตกต่าง (%RPD) พบว่า Amitraz และ DMPF มีค่า %RPD เท่ากับ 113.9 และ 12.6 ตามลำดับ ซึ่ง matrix มีผลต่อทดสอบ Amitraz และ DMPF ซึ่งมีค่ามากกว่า 10 % ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารพิษตกค้าง Amitraz และ DMPF สารมาตรฐานควรเตรียมในสารละลาย matrix พริกจินดาแดงที่ได้จากวิธีการสกัด

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชัน (slope) ของสารมาตรฐานที่เตรียมใน Solvent และ Matrix

| Pesticides | Equation | | Slope | | %RPD |
|------------|-------------------------|----------------------|---------|--------|-------|
| | Solvent | Matrix | Solvent | Matrix | |
| Amitraz | $Y=9265190.888700x+$ | $Y=2541631.549092x+$ | 9265190 | 254163 | 113.9 |
| | 11449.883598 | 359.579749 | | 1 | |
| | $R^2=0.99565359$ | $R^2=0.99968185$ | | | |
| DMPF | $Y=251354.618984x+285.$ | $Y=221542.699432x-$ | 251354 | 221542 | 12.6 |
| | 820264 | 445.627951 | | | |
| | $R^2=0.99993197$ | $R^2=0.99965402$ | | | |

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ อะมิทราซ และสารอนุพันธ์ ด้วยเทคนิค

LC-MS/MS

2.1 ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

วิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank เมื่อนำสัญญาณที่ตรวจพบมาเปรียบเทียบกับ (ตารางที่ 7) พบว่าไม่มีสัญญาณของ Amitraz และ DMPF ใน matrix blank เมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ spiked matrix blank ซึ่งตรวจพบ Amitraz และ DMPF แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างและวิธีการตรวจวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงในการตรวจวัด

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบสัญญาณของ Matrix blank กับ Spike matrix blank เพื่อพิสูจน์ความจำเพาะเจาะจง ในพริกจินดาแดง

| Pesticides | Precursor | Product ion 1 | Product ion 2 | Matrix blank | Spiked matrix blank (Area) | | |
|------------|-----------|---------------|---------------|--------------|----------------------------|--------|-------|
| | | | | | TIC | Ion 1 | Ion 2 |
| Amitraz | 294.2 | 107.0 | 122.1 | ND | 31827 | 702243 | 1804 |
| DMPF | 163.0 | 107.0 | 117.0 | ND | 60370 | 22826 | 58996 |

ND = Not detectable

TIC = Total Ion Chromatogram

สำหรับพริกมันดำ เปรียบเทียบสัญญาณของ Matrix blank กับ Spike matrix blank พิสูจน์ได้ ดังแสดงใน ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบสัญญาณของ Matrix blank กับ Spike matrix blank เพื่อพิสูจน์ความจำเพาะเจาะจง

| Pesticides | Precursor | Product ion 1 | Product ion 2 | Matrix blank | Spiked matrix blank (Area) | | |
|------------|-----------|---------------|---------------|--------------|----------------------------|--------|-------|
| | | | | | TIC | Ion 1 | Ion 2 |
| Amitraz | 294.2 | 107.0 | 122.1 | ND | 41827 | 802243 | 2004 |
| DMPF | 163.0 | 107.0 | 117.0 | ND | 69370 | 32826 | 68996 |

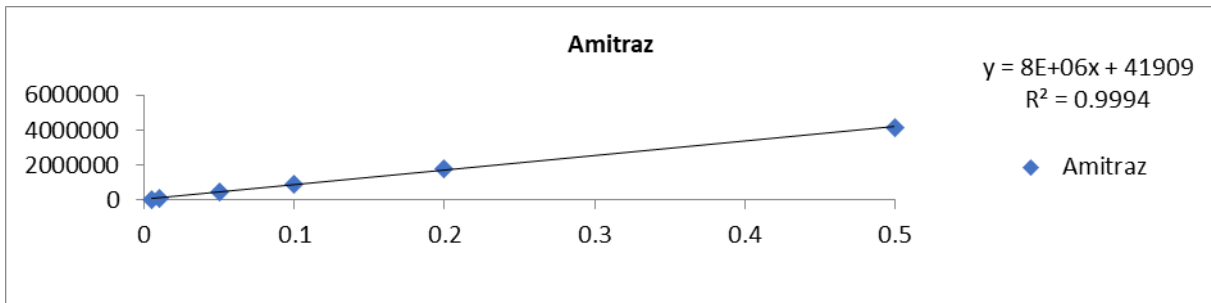
ND = Not detectable

TIC = Total Ion Chromatogram

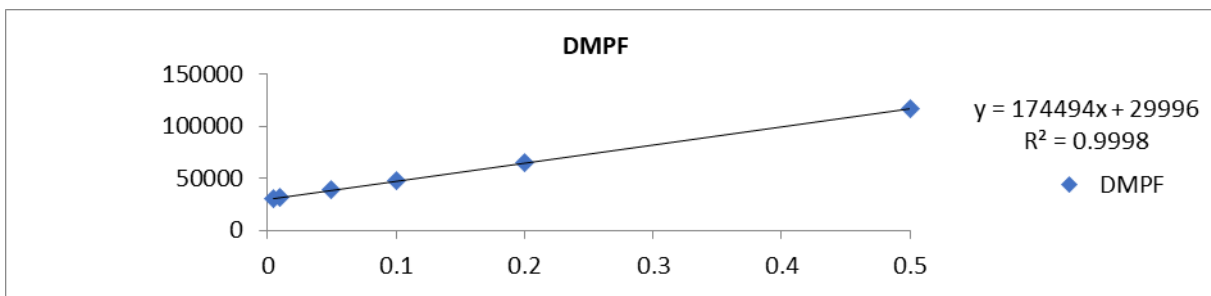
2.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working range)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง โดยการ spike สารละลายมาตรฐาน Amitraz และ DMPF ลงใน ตัวอย่างพริก ที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ ละความเข้มข้นทดสอบ 7 ซ้ำ สกัดตัวอย่าง Amitraz ด้วยวิธี Ethyl acetate Extraction (EURL-FV) และ DMPF

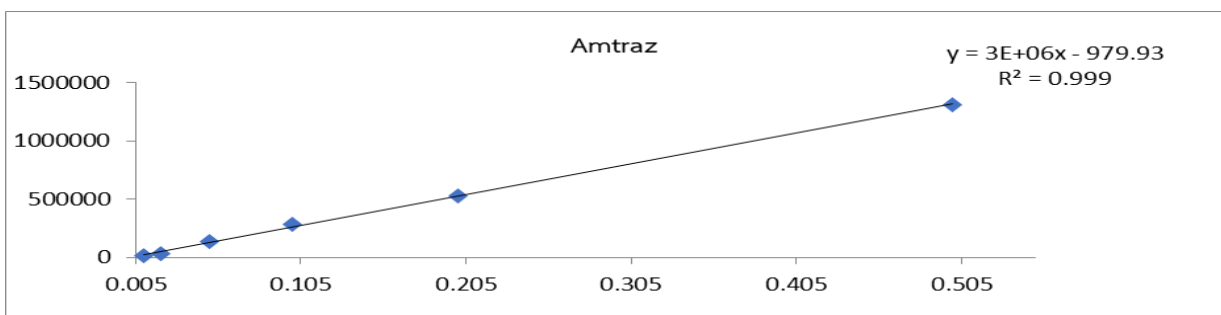
ด้วยวิธี EN QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการนำมาสร้างกราฟมาตรฐานอัตราส่วนพื้นที่ที่ได้พีคและความเข้มข้นของสาร Amitraz และ DMPF พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Amitraz และ DMPF ได้ตั้งแต่ช่วง 0.001-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยยืนยันผลการตรวจสอบมีค่า $r \geq 0.995$ และมีค่าความถูกต้องและแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานที่กำหนด ดังแสดงดังกราฟที่ 1-4



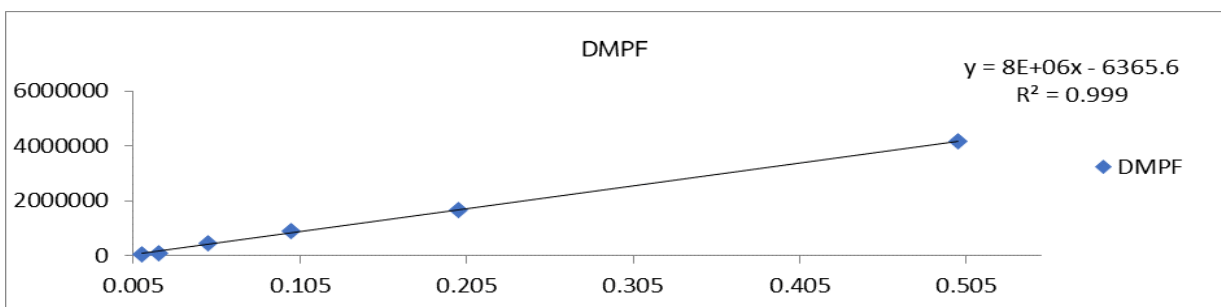
กราฟที่ 1 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของ Amitraz ในตัวอย่างพริกจินดาแดง



กราฟที่ 2 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของ DMPF ในตัวอย่างพริกจินดาแดง



กราฟที่ 3 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของ Amitraz ในตัวอย่างพริกมันดำ



กราฟที่ 4 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของ DMPF ในตัวอย่างพริกมันดำ

2.3 ศึกษาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

การตรวจสอบ accuracy โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ และ ที่ความเข้มข้น 0.02 0.05 และ 0.2 ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ประเมิน accuracy จาก %recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method (AOAC, 2002) และผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ Amitraz และ DMPF ในพริกจินดาแดง ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อ โดยค่า %RSD อยู่ระหว่าง 2.8 – 11.4 % ดังแสดงในตารางที่ 8 และในพริกมันดำ %RSD อยู่ระหว่าง 3.23 – 11.91 % ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 แสดงร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Amitraz และ DMPF ที่ช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างพริกจินดาแดง

| Spike Level (mg/kg) | (n) | Amitraz | | | DMPF | | |
|---------------------|-----|------------|------|------|------------|------|------|
| | | % Recovery | SD | %RSD | % Recovery | SD | %RSD |
| 0.01 | 10 | 83 | 3.97 | 4.7 | 89 | 8.01 | 8.9 |
| 0.02 | 6 | 87 | 2.04 | 2.3 | 104 | 6.41 | 6.2 |
| 0.05 | 6 | 87 | 2.42 | 2.8 | 98 | 1.96 | 2.0 |
| 0.10 | 10 | 87 | 4.34 | 5.0 | 96 | 8.01 | 8.3 |
| 0.20 | 6 | 87 | 2.48 | 2.8 | 98 | 1.77 | 1.8 |
| 0.50 | 10 | 85 | 9.7 | 11.4 | 86 | 8.80 | 10.2 |

ตารางที่ 9 แสดงร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Amitraz และ DMPF ที่ช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆ ในตัวอย่างพริกมันดำ

| Spike Level (mg/kg) | (n) | Amitraz | | | DMPF | | |
|---------------------|-----|------------|------|-------|------------|------|-------|
| | | % Recovery | SD | %RSD | % Recovery | SD | %RSD |
| 0.01 | 7 | 105 | 3.40 | 3.23 | 101 | 6.18 | 6.10 |
| 0.02 | 7 | 76 | 9.09 | 11.91 | 94 | 8.71 | 9.30 |
| 0.05 | 7 | 95 | 7.72 | 8.09 | 96 | 3.64 | 3.77 |
| 0.10 | 7 | 84 | 5.08 | 6.03 | 81 | 6.08 | 7.50 |
| 0.20 | 7 | 75 | 4.57 | 6.12 | 81 | 3.49 | 4.29 |
| 0.50 | 7 | 83 | 5.9 | 7.18 | 84 | 8.87 | 10.58 |

2.4 ศึกษาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบ LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยประเมินจากค่า Signal/Noise (S/N) ต้องมีค่ามากกว่า 3 โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการ Amitraz และ DMPF ในตัวอย่างพริก ทั้งพริกจินดาแดงและพริกหวานสีเขียว มีค่า S/N มากกว่า 3 ซึ่งเครื่องสามารถ detect ได้ทุกซ้ำ จากการศึกษา พบว่า Amitraz และ DMPF ให้ response มากกว่า control สำหรับการทดลองนี้ ให้ขีดจำกัดการตรวจวัด เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 Response ที่ได้จากการสกัด Amitraz และ DMPF ในพริก

| No. | response C0nc. | Amitraz | DMPF | Control |
|-----|-------------------|---------|------|---------|
| 1 | 0.005 | 2014 | 3187 | 69 |
| 2 | 0.005 | 2087 | 3298 | |
| 3 | 0.005 | 1981 | 2789 | |
| 4 | 0.005 | 2741 | 3297 | |
| 5 | 0.005 | 1823 | 2956 | |
| 6 | 0.005 | 2092 | 3989 | |
| 7 | 0.005 | 1509 | 3834 | |

2.5 ศึกษาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบ LOQ ของวิธีการทดสอบ ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยยืนยันผลการทดสอบจาก accuracy และ precision จากผลการศึกษา Amitraz และ DMPF ในตัวอย่างพริก ทั้งพริกจินดาแดงและพริกมันดำ ยอมรับค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์อะมิทราซและสารอนุพันธ์ในพริก โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการแยกอะมิทราซและสารอนุพันธ์ออกจากกัน และมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สำหรับในพริกจินดาแดง วิธีการเตรียมตัวอย่างได้ประยุกต์ใช้วิธีการสกัดแบบ EN QuEChERS มาใช้ในการศึกษา DMPF และเลือกวิธีการสกัดแบบ Ethyl Acetate Extraction (EURL-FV) มาใช้ในการสกัด Amitraz และในพริกมันดำ เลือกวิธีการสกัดแบบ EN QuEChERS มาใช้ในการศึกษาทั้ง amitraz และ DMPF และดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ ตรวจวิเคราะห์ด้วยการพิสูจน์ในแต่ละพารามิเตอร์ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. Linearity และ Working range ของวิธีการตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.01 - 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า r มากกว่า 0.995 และยืนยันผลการทดสอบด้วย accuracy และ precision ของทุกระดับความเข้มข้นผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด

2. Accuracy (%Recovery) ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 83 ถึง 104 ในพริกจินดาแดง และในพริกมันดำ อยู่ในช่วง 75 ถึง 105 ตามลำดับ

3. Precision ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการคำนวณค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.8 – 11.4 เปอร์เซ็นต์ ในพริกจินดาแดง และในพริกมันดำ อยู่ระหว่าง 3.23 – 11.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. LOD ของอะมิทราซและสารอนุพันธ์ เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

5. LOQ โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม

10. การนำไปใช้ประโยชน์

1. เพื่อใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง amitraz ในพริก
2. เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2005 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง
3. เผยแพร่วิธีการวิเคราะห์แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่อยู่ภายใต้กรมวิชาการเกษตร และหน่วยงานที่สนใจ เพื่อนำไปทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

- กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- วิชญ์ แจ้งใบ สมสมัย ปาลกุล ประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ และพรนภัส วิชาชนะฉานนท์ 2557. ผลการปฏิบัติงาน ประจำปีงบประมาณ 2557 กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร หน้า 147
- Anastassiades. M. D.I.Kolberg, D.Mack, I.Sigalova, D.Roux and D.Fugel (2008). Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination.version 6:1-37
- Anastassiades. M., Lehotay.S J., Stajnbaher D. and 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.
- Anna Stachniuk., Agnieszka Szmagara., Renata Czczeko and Emilia Fornal., Analysis for determination of 150 pesticides in fruits and vegetables using quick and easy method (QuEChERS) and LC- MS/MS determination. *J. Food Agri. & Environ.* Vol.8(2), 446-457
- AOAC 2002. AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOAC\Cam\Single-Lab_Validation_47.doc. from web site: http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf. (15 November 2914)
- DG SANCO. 2014. EU Pesticide Database. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index
- Pihlstrom,T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U. and Osterdahl, B.G. 2007. Analysis of pesticide Residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid Chromatography with tandem mass spectrometric detection. *And Bioanal Chem.* 389, 1773-1789.

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.

<https://www.bloggang.com/mainblog.php?id=yakkeaw&month=01-12-2010&group=7&gblog=5>