

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** : แผนงานวิจัยและระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช  
**กิจกรรมที่ 2** : การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายใน และการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ
3. **ชื่อการทดลอง** : การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphorus) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในผักที่มีปริมาณน้ำและคลอโรฟิลสูงและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ  
**ชื่อการทดลอง** : Sample Preparation of Organophosphorus, Pyrethroid, Carbamate and Fungicide in Vegetables for IQC and Proficiency Test.
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

<b>หัวหน้าการทดลอง</b>	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
<b>ผู้ร่วมงาน</b>	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวจินตนา ภู่มงกุฏชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวสุพัตรี หนูสังข์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### 5. บทคัดย่อ

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในขอบข่าย ได้แก่ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มไพรีทรอยด์ กลุ่มคาร์บาเมต และสารป้องกันกำจัดโรคพืชและอื่นๆ ในปี 2559 มีการจัดโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง : DOA-PRL-01-16 ดำเนินการในช่วง สิงหาคม - กันยายน 2559 โดยเตรียมตัวอย่าง ผักกาดหอม ได้แก่ blank sample และ fortified sample มีการแจ้งขอเชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบรวม 24 ห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ และ ในปี 2560 จัดโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-17 ดำเนินการในช่วง กรกฎาคม - กันยายน 2560 โดยเตรียมตัวอย่าง มะเขือเทศ ได้แก่ blank sample และ fortified sample แจ้งขอเชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบรวม 28 ห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ

การเตรียม fortified sample สำหรับตัวอย่างผักกาดหอม มีการเติมสาร endosulfan sulfate, cypermethrin, carbaryl, triazophos และ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0.05 -0.30 mg/kg ตัวอย่างมะเขือเทศ มีการเติมสาร atrazine, carbaryl, cypermethrin,  $\beta$ -endosulfan, permethrin และ triazophos ที่ความเข้มข้น 0.05-0.5 mg/kg นำตัวอย่างมาประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้สถิติ โดยใช้สถิติ ISO 13528 (2005) และสถิติ IUPAC (2006) พบว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนการทดสอบความคงตัวของสารตกค้างในตัวอย่าง ศึกษาที่ อุณหภูมิห้อง ( $25\pm 5$  °C) ที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน นับจากวันส่งตัวอย่าง และที่อุณหภูมิ freezer (ไม่น้อยกว่า  $-18$  °C) ที่ 30 วัน (นับจากวันส่งตัวอย่าง) ซึ่งเป็นวันรายงานผล ทำการตรวจวิเคราะห์วันละ 5 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่าง (%RPD) ของความเข้มข้นเฉลี่ยที่ระยะเวลาต่างๆ กับความเข้มข้นเฉลี่ยที่ 0 วัน และหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณเทียบกับปริมาณสารที่ 0 วัน ผลการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสารที่เติมในตัวอย่างผักกาดหอม มีความคงทนที่ 0-7 วัน ส่วนตัวอย่างมะเขือเทศ พบว่าสารมีความคงทนที่ 0-3 วัน การศึกษาที่อุณหภูมิ freezer ทุกสารในตัวอย่างมีความคงทนจนถึง 30 วัน

ผลการประเมินค่า z-Score โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-16 (ตัวอย่างผักกาดหอม) พบว่าผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 68 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \leq 2$  อยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย 8.2 % โดยมีค่า  $2 < |z\text{-Score}| < 3$  และอยู่ในเกณฑ์ไม่เป็นที่น่าพอใจ 11.8 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \geq 3$  โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-17 (ตัวอย่างมะเขือเทศ) พบว่าผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 84 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \leq 2$  อยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย 4 % โดยมีค่า  $2 < |z\text{-Score}| < 3$  และไม่เป็นที่น่าพอใจ 12 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \geq 3$  ซึ่งห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบใช้วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ คือวิธี Steinwandter H. (1985) และ วิธี QuEChERS ส่วนเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เป็นเครื่องมือที่มีความถูกต้อง แม่นยำและยอมรับได้ ได้แก่ GC, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC, LC-MS และ LC-MS/MS.

## Abstract

Two inter-laboratory comparison programs for pesticide residue analysis were conducted, during August - September 2016 (Program : DOA-PRL-01-16) and July - September 2017 (Program : DOA-PRL-01-17). The scope of the testing program consisted of pesticide residues, which covered to organochlorine, organophosphorus, pyrethroid, carbamate, fungicide and others. Forward program : DOA-PRL-01-16, Twenty-one laboratories participated in this program. Lettuce fortified sample contained with endosulfan sulfate, cypermethrin, carbaryl, triazophos and metalaxyl in concentration range of 0.05 -0.30 mg/kg. Forward program : DOA-PRL-01-17, Twenty-one laboratories participated in this program. Tomato fortified sample contained with atrazine, carbaryl,

cypermethrin, b-endosulfan, permethrin and triazophos in concentration range of 0.05 - 0.50 mg/kg.

The sample was rechecked and considered homogeneous according to ISO 13528 (2005) and IUPAC (2006). Stability of fortified sample was studied at room temperature at 1, 3, 5 and 7 days (from sample shipment date) and in the freezer at 30 days (reported date). The fortified residues in lettuce sample were considered to have stability in the studied period. The fortified residues in tomato sample were considered to have stability for 0-3 days at room temperature. All samples were considered to have stability for storage in freezer.

The assigned values and the standard deviation for laboratory comparison, evaluation was calculated, according to ISO 13528(2005). The z-Score of test results for the program : DOA-PRL-01-16 (lettuce) were considered following : 68 % satisfactory (  $| z\text{-Score} | \leq 2$  ), 8.2 % questionable (  $2 < | z\text{-Score} | < 3$  ) and 11.8 % not satisfactory (  $| z\text{-Score} | \geq 3$  ). The z-Score of test results for the program : DOA-PRL-01-17 (tomato) were considered following : 84 % satisfactory (  $| z\text{-Score} | \leq 2$  ), 4 % questionable (  $2 < | z\text{-Score} | < 3$  ) and 12 % not satisfactory (  $| z\text{-Score} | \geq 3$  ). Method and instruments for pesticide residue analysis, participated laboratories mostly used were Steinwandter H. (1985) and the QuEChERS method and GC, GC-MS, GC-MS/MS , HPLC, LC-MS and LC-MS/MS instruments.

## 6. คำนำ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ได้ดำเนินการจัดโปรแกรมการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ในการตรวจวิเคราะห์ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัส ไพรีทรอยด์ และคาร์บาเมท ในผัก-ผลไม้ ข้อมูลที่ได้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ สามารถใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ ทั้งเป็นการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการเมื่อเทียบกับห้องปฏิบัติการอื่นๆ และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร จะนำข้อมูลเกี่ยวกับสภาพตัวอย่าง ไปใช้ในการปรับปรุง รูปแบบและ วิธีการจัดส่งตัวอย่าง ให้เหมาะสมต่อไป

## 7. วิธีดำเนินการ

### 7.1 อุปกรณ์

7.1.1 วัตถุมีพิษมาตรฐาน ความบริสุทธิ์  $> 90 \%$

7.1.2 สารเคมี ได้แก่ acetone, dichloromethane, ethyl acetate, acetonitrile, sodium sulfate, sodium chloride, sodium acetate, anhydrous magnesium sulfate, primary secondary amine (PSA) และ graphite carbon black (GCB)

7.1.3 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, food processor, rotary evaporator, homogenizer และ centrifuge

7.1.4 เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ขวดแก้วปากกว้างมีฝาปิด, กระจกตวง, บีกเกอร์, volumetric pipette, test tube, volumetric flask, กรวยแก้ว และ centrifuge tubes ขนาด 15 และ 50 ml

7.1.5 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุที่มีพิษเครื่อง GC/ECD/FPD และ LC/MS/MS

7.1.6 ตัวอย่างผักกาดหอม และมะเขือเทศ

## 7.2 วิธีดำเนินการ

### 7.2.1 การจัดโปรแกรมทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

7.2.1.1 โปรแกรมการทดสอบสารพิษตกค้าง : DOA-PRL-01-16 ดำเนินการดังนี้

1) แจ้งขอเชิญเข้าร่วมการทดสอบในวันที่ 27 สิงหาคม 2559 รวม 24 ห้องปฏิบัติการ

2) กำหนดการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ ภายในวันที่ 4 กันยายน 2559 มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ จัดส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบ ทางไปรษณีย์ ในวันที่ 5 กันยายน 2559

3) กำหนดการรายงานผลการทดสอบ ส่งผลภายใน วันที่ 30 กันยายน 2559 มีห้องปฏิบัติการส่งผลการทดสอบรวมทั้งสิ้น 21 ห้องปฏิบัติการ

4) ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร ประเมินผล จัดทำและจัดส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ ใน เดือน กุมภาพันธ์ 2559

7.2.1.2 โปรแกรมการทดสอบสารพิษตกค้าง : DOA-PRL-01-17 ดำเนินการดังนี้

1) แจ้งขอเชิญเข้าร่วมการทดสอบในวันที่ 24 กรกฎาคม 2560 รวม 28 ห้องปฏิบัติการ

2) กำหนดการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ ภายในวันที่ 31 กรกฎาคม 2560 มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ จัดส่งตัวอย่างให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบ ทางไปรษณีย์ ในวันที่ 7 สิงหาคม 2560

3) กำหนดการรายงานผลการทดสอบ ส่งผลภายใน วันที่ 1 กันยายน 2560 มีห้องปฏิบัติการส่งผลการทดสอบรวมทั้งสิ้น 21 ห้องปฏิบัติการ

4) ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษการเกษตร ประเมินผล จัดทำและจัดส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ ใน เดือน กุมภาพันธ์ 2561

### 7.2.2 รายชื่อวัฏมีพิษ

รายชื่อวัฏมีพิษ ที่ระบุในการทดสอบทดสอบความสามารถของห้องปฏิบัติการ มีดังนี้

- 1) สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ได้แก่  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan และ endosulfan sulfate
- 2) สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส ได้แก่ azinphos ethyl, chlorpyrifos, DDVP, diazinon, dicrotophos, dimethoate, ethion, EPN, fenitrothion, malathion, methamidophos, methidathion, methyl parathion, mevinphos, monocrotophos, omethoate, parathion, phosalone, pirimiphos ethyl, primiphos methyl, profenofos, prothiophos และ triazophos
- 3) สารกลุ่มไพรีทรอยด์ ได้แก่ bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate, deltamethrin, lambda – cyhalothrin และ Permethrin
- 4) สารกลุ่มคาร์บาเมท ได้แก่ aldicarb, carbaryl, carbofuran, 3-OH carbofuran, 3-keto carbofuran, fenobucarb, isoprocarb, methiocarb และ methomyl, promecarb propamecarb
- 5) สารป้องกันกำจัดโรคพืชและอื่นๆ ได้แก่ acetameprid , ametryn, atrazine, azoxystrobin, benalaxyl, carbendazim, clothianidin, cymoxanil, cyproconazole, duron, dimethomorph, dinotefuran, difenoconazole, epoxiconazole, etofenprox, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, oxycarboxin, penconazole, procloraz, propagite, pyrimethanil, metalaxyl, spiromesifen, tebuconazole, thiamethoxam, thiophanate-methyl, triadimefon, triadimenol, trifloxystrobin

### 7.2.3 การจัดการตัวอย่าง

#### 1) การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

**1.1) วิธีวิเคราะห์** ใช้วิธีตรวจวิเคราะห์ ใช้วิธี QuEChERS method (EN 15662, 2008) ในการทดสอบสารพิษตกค้างในตัวอย่างก่อนนำมาเตรียม ใช้ในการทดสอบ homogeneity และ stability วิธีวิเคราะห์ดำเนินการดังนี้

ชั่งตัวอย่างผัก 10 g ใส่ centrifuge tubes ขนาด 50 ml เติม acetonitrile 10 ml เขย่าด้วยมือ แล้วเติม magnesium sulfate 5 g, NaCl 1 g, Disodium hydrogencitrate sesquihydrate 0.5 g และ Trisodium citrate dihydrate 1 g ปิดฝา เขย่าด้วยมือ และเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และนำสารละลายตัวอย่าง 5 ml ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml

เติม Magnesium sulfate 750 mg, GCB 50 mg และ PSA 125 mg ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer นาน 30 วินาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตูดสารละลาย 1 ml ใส่ใน GC-vial นำไปลดปริมาตรเพื่อเปลี่ยนตัวทำละลายเป็น hexane นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD ส่วนที่เหลือนำไปตรวจวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง GC-FPD และ LC/MS/MS

**1.2) เครื่องมือตรวจวิเคราะห์** ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ด้วยเครื่อง GC-ECD สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสด้วยเครื่อง GC-FPD และสารกลุ่มคาร์บาเมทและอื่นๆ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

**1.2.1) GC-ECD/FPD** : Agilent รุ่น Agilent-6890 สำหรับ ECD ใช้ capillary column ชนิด ultra-1 เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 mm ความยาว 30 m ความหนาของฟิล์ม liquid phase ที่ใช้เคลือบใน column 0.25  $\mu\text{m}$  และสำหรับ FPD ใช้ capillary column ชนิด DB-1701P เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 mm ความยาว 30 m ความหนาของฟิล์ม liquid phase ที่ใช้เคลือบใน column 0.25  $\mu\text{m}$  การตั้ง carrier gas ใช้ mode : constant flow

**1.2.2) LC/MS//MS** : Agilent: 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS/MS รายละเอียดในส่วนของ HPLC มีดังนี้ ใช้ column : Kinetex™ 2.6  $\mu\text{m}$  XB-C18 100 Å, LC Column 100 x 2.1 mm , mobile phase : 5 mM ammonium formate in water และ acetonitrile, flow rate 0.4 ml/min, injection volume 2  $\mu\text{l}$  รายละเอียดในส่วนของ MS มีดังนี้ ใช้ ESI, Positive mode, gas temperature 350 OC, gas flow 12 L/min , nebulizer 40 psi และ capillary 4000 V และ ใช้ MRM

**1.3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน** เตรียม mixed working standard solution ในสารละลายที่สกัดจาก Blank Sample ตามวิธีการสกัด เพื่อทำ calibration curve รวม 3 ระดับความเข้มข้น ครอบคลุมช่วงของการวิเคราะห์

## 2) การเตรียมตัวอย่าง

**2.1) ตัวอย่างผักกาดหอม** นำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในรายชื่อสารที่ทดสอบ (ข้อ 7.2.2) เมื่อไม่พบสารพิษตกค้างหรือพบในปริมาณที่น้อยสามารถใช้เป็นตัวอย่าง Blank sample ได้จึง เตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ เตรียมโดยนำตัวอย่างมาล้าง ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ตัดใบส่วนที่รับประทานได้ ชั่งน้ำหนักให้ได้ ประมาณ 15 kg ปั่นตัวอย่างกับ dry ice ให้ละเอียด เก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำประมาณ  $-18^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมง เตรียม Blank sample โดยแบ่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดแล้วน้ำหนัก 7 kg กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวด ตัวอย่างละประมาณ 80 g ตัดป้ายตัวอย่าง ปิดฝาขวดเก็บไว้ในตู้แช่  $-18^{\circ}\text{C}$  ส่วนตัวอย่าง Fortified sample เตรียมโดย แบ่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดแล้วน้ำหนัก 7 kg เติมสารละลายวิตามินพีช กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวด ขวดละประมาณ 80 g ตัดป้ายตัวอย่าง ปิดฝาขวดเก็บไว้ในตู้แช่  $-18^{\circ}\text{C}$

**2.2) ตัวอย่างมะเขือเทศ** นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในรายชื่อสารที่ทดสอบ (ข้อ 7.2.2) เมื่อไม่พบสารพิษตกค้างหรือพบในปริมาณที่น้อยสามารถใช้เป็นตัวอย่าง Blank sample ได้ จึงนำมาเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างมาล้าง ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ตัดก้านและจุกออก ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้ ประมาณ 15 kg ปั่นตัวอย่างกับ dry ice ให้ละเอียด เก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำประมาณ  $-18^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลามากกว่า 12 ชั่วโมง นำมาเตรียม Blank sample โดยแบ่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดแล้วน้ำหนัก 7 kg กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวด ตัวอย่างละประมาณ 100 g ตัดป้ายตัวอย่าง ปิดฝาขวดเก็บไว้ในตู้แช่  $-18^{\circ}\text{C}$  ส่วน Fortified sample เตรียมโดย แบ่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดแล้วน้ำหนัก 7 kg เติมสารละลายวิตามินพีช กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวด ขวดละประมาณ 100 g ตัดป้ายตัวอย่าง ปิดฝาขวดเก็บไว้ในตู้แช่  $-18^{\circ}\text{C}$

## 3) Homogeneity Test

สุ่มตัวอย่าง fortified sample จำนวน 10 ขวด นำมาตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ขวดละ 2 ซ้ำ (จำนวนข้อมูล (n) =20) หาปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC และ LC-MS/MS โดยใช้ calibration curve แบบ matrix-matched standards

## 4) Stability Test

สุ่มตัวอย่าง fortified sample มาทำการทดสอบความคงตัวของสารตกค้างในตัวอย่าง ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยศึกษาที่ อุณหภูมิห้อง ( $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) ที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน นับจากวันส่งตัวอย่าง และ ที่อุณหภูมิ freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) ที่ 30 วัน (วันรายงานผล) นับจากวันส่งตัวอย่าง โดยทำการตรวจวิเคราะห์วันละ 5 ซ้ำ (n=5)

### 7.2.4 การประเมินผลการทดสอบ

#### 1) False Positive and False Negative

False positive เป็นการรายงานผลทดสอบว่า ตรวจพบสารพิษตกค้าง ชนิดที่ไม่มี การตรวจพบโดยห้องปฏิบัติการผู้จัดเตรียมตัวอย่างและไม่มีรายงานว่าตรวจพบโดย ห้องปฏิบัติการที่เข้า

ร่วมทดสอบส่วนใหญ่ และปริมาณสารที่รายงานว่าตรวจพบมีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ (LOQ) (DG-SANCO, 2010)

False negative เป็นผลการทดสอบที่รายงานว่า ไม่พบสารพิษตกค้าง ชนิดที่มีการเติมลงในตัวอย่าง (DG-SANCO, 2010)

## 2) การประเมิน Assigned (consensus) Values

การคำนวณค่า assigned values ที่ใช้ในการประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ ตามแนวทางของ The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analysis Laboratories และ ISO 13528 (2005) โดยใช้ robust mean ( $X^*$ ) ที่คำนวณจากผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ

## 3) การประเมิน Target Standard Deviation

ใช้ค่าของ Horwitz predicted SD (SDp) ที่คำนวณจากความเข้มข้นของสารที่เป็นค่า assigned values หรือค่า robust mean ( $X^*$ ) ตามสมการที่ 1 และ 2 (Horwitz and Albert, 2006)

$$RSDp = 2^{(1-0.5\log C)} \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$SDp = (RSDp \times \text{mean}) / 100 \quad \text{สมการที่ 2}$$

## 4) การประเมิน z-Score

ประเมินผลการทดสอบ ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับค่า assigned value โดยใช้ z score ในการประเมินผล ตามสมการที่ 3

$$z = \frac{(X - X^*)}{\sigma} \quad \text{สมการที่ 3}$$

$\sigma$

X ผลวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ

$X^*$  assigned value ใช้ค่า robust mean

$\sigma$  target standard deviation ใช้ค่า SDp

การประเมินผลค่า z-Scores ดังนี้

$|z| \leq 2$  ผลทดสอบเป็นที่น่าพอใจ (Satisfactory)

$2 < |z| < 3$  ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย (Questionable)

$|z| \geq 3$  ผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ (Unsatisfactory)

ระยะเวลา : ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ : กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปพ. กรมวิชาการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง blank sample พบสารพิษตกค้าง cypermethrin และ difenoconazole ซึ่งอยู่ในรายชื่อสารที่ทดสอบ (ข้อ 7.2.2) ในตัวอย่าง มะเขือเทศ ส่วนตัวอย่าง ผักกาดหอมตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง blank sample ของผักกาดหอม และมะเขือเทศ

Sample	Residue concentration (mg/kg)
--------	-------------------------------



	Organochlorine	Organophosphate	Pyrethroid	Carbamate	Fungicide and others
Lettuce	ND	ND	ND	ND	ND
Tomato	ND	ND	cypermethrin 0.01	ND	difenoconazole < 0.01

ND = not detectable ไม่พบสารพิษตกค้าง หรือพบปริมาณ น้อยกว่าค่า LOD (0.005 mg/kg)

**8.2 การเตรียม Fortified sample** มีการเติมสารมาตรฐาน 5 ชนิดลงในตัวอย่างผักกาดหอม ให้มีความเข้มข้นในตัวอย่างในช่วง 0.05-0.30 mg/kg และเติมสารมาตรฐาน 6 ชนิดลงในตัวอย่างมะเขือเทศ ให้มีความเข้มข้นในตัวอย่างในช่วง 0.05-0.50 mg/kg ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อวัตถุที่มีพิษที่เติมลงในตัวอย่างและความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง

Sample	Sample code	Pesticide	Spiked concentration (mg/kg)
Lettuce	S1	endosulfan sulfate	0.05
		cypermethrin	0.10
		carbaryl	0.20
		triazophos	0.10
		metalaxyl	0.30
Tomato	S1	atrazine	0.13
		$\beta$ -endosulfan	0.05
		carbaryl	0.10
		cypermethrin	0.15
		permethrin	0.50
		triazophos	0.20

### 8.2.1 Homogeneity Test

ผลการตรวจวิเคราะห์มาประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้สถิติ ISO 13528 (2005)

พบว่า ค่า  $S_s$  น้อยกว่า ค่า  $0.3 \cdot SD_p$  แสดงว่าตัวอย่าง มีความเป็นเนื้อเดียวกัน และจากการใช้สถิติ IUPAC (2006) ในการประเมิน พบว่าค่า  $S_{2sam}$  น้อยกว่าค่า C แสดงว่า ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงว่าการเตรียมตัวอย่าง ผักกาดหอม และมะเขือเทศ ตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ Homogeneity test

Homogeneity test	Lettuce					
	endosulfan sulfate	cypermethrin	carbaryl	triazophos	metalaxyl	
Mean,mg/kg	0.0485	0.0980	0.1977	0.0991	0.2870	
ISO 13528 (2005)						
$S_s$ ,mg/kg	0.00088	0.00122	0.00810	0.000747	0.001471	
$SD_p$	0.01217	0.02216	0.04030	0.022422	0.055024	
$0.3 \cdot SD_p$	0.00365	0.00665	0.01209	0.006727	0.016507	
$S_s < 0.3 \cdot SD_p$	√	√	√	√	√	
Pass/Failed	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	
IUPAC ( 2006 )						
$S^2_{sam}$	7.78E-07	1.49E-06	6.56E-05	3.91E-06	2.16E-06	
C	2.95E-05	1.77E-04	4.17E-04	1.14E-04	5.18E-04	
$S^2_{sam} < C$	√	√	√	√	√	
Pass/Failed	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	
Homogeneity test	Tomato					
	atrazine	carbaryl	cypermethrin	$\beta$ -endosulfan	permethrin	triazophos
Mean,mg/kg	0.1341	0.1049	0.1569	0.0516	0.5406	0.1995
ISO 13528 (2005)						
$S_s$ ,mg/kg	0.0010	0.0044	0.0019	0.0017	0.0152	0.0001
$SD_p$	0.0290	0.0236	0.0332	0.0129	0.0949	0.0407
$0.3 \cdot SD_p$	0.0087	0.0071	0.0100	0.0039	0.0285	0.0122
$S_s < 0.3 \cdot SD_p$	√	√	√	√	√	√
Pass/Failed	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass
IUPAC ( 2006 )						
$S^2_{sam}$	1.060E-06	2.995E-06	3.502E-06	2.723E-06	2.311E-04	8.111E-09

C	1.440E-04	9.516E-05	1.977E-04	3.106E-05	1.844E-03	1.726E-04
$S^2_{sam} < C$	√	√	√	√	√	√
Pass/Failed	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

## 8.2.2 Stability Test

ผลการศึกษาสรุป ได้ดังนี้ (ตารางที่ 4-7)

1) ตัวอย่างผักกาดหอม ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างใน fortified sample ที่ระยะเวลาและ อุณหภูมิ ที่เก็บรักษาตัวอย่าง พบว่า % recovery เพื่อควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 69.8-105.5 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าทุกสารมี % RPD ของปริมาณสาร เทียบกับความเข้มข้นที่ 0 วัน ไม่เกิน 10 % สรุปได้ว่าสารที่เติมในตัวอย่าง มีความคงทน ที่ 0 7-วัน และ มีความคงทนที่ 30 วันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ freezer ส่วน เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารเทียบความเข้มข้นที่ 0 วัน เมื่อคิดความเข้มข้นที่ 0 วันเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 0 7-วัน ปริมาณสารในช่วง 75 ถึง 114 % พบว่า carbaryl ที่ 5 และ 7 วันมีเปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารเทียบความเข้มข้นที่ 0 วัน น้อยกว่า 80 % แสดงว่า carbaryl มีความคงทนจนถึง 3 วัน

2) ตัวอย่างมะเขือเทศ ผลการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างใน fortified sample ที่ ระยะเวลาและ อุณหภูมิ ที่เก็บรักษาตัวอย่าง พบว่า % recovery เพื่อควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์ อยู่ในช่วง 72.0-113.0 เมื่อเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสารมีความคงทน ที่ 0 ถึง 3 วัน โดยมี % RPD อยู่ในช่วง -8.1 ถึง 6.5 ส่วน เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารเทียบความเข้มข้นที่ 0 วัน พบว่าที่ 0 ถึง 3 วัน มีปริมาณสารในช่วง 94.5 ถึง 106.7 % (carbaryl และ cypermethrin สามารถคงทนถึง 7 วันมี เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารในช่วง 80.2 ถึง 88.0 %) ส่วนที่อุณหภูมิ freezer ตัวอย่างมีความคงทนที่ 30 วัน โดยมี % RPD อยู่ในช่วง -6.8 ถึง 2.1 มีปริมาณสารในช่วง 93.4 ถึง 102.1 %

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นเฉลี่ย (5 ซ้ำ) และ % concurrent recovery จากการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่าง ผักกาดหอม ที่อุณหภูมิและระยะเวลา ต่างๆ

Temp.	Day	Lettuce								
		endosulfan sulfate			cypermethrin			carbaryl		
		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery	
			conc. (mg/kg)	% Rec.		conc. (mg/kg)	% Rec.		conc. (mg/kg)	% Rec.
Room temp.	0	0.049	0.050	97.8	0.098	0.100	102.3	0.198	0.200	80.1
	1	0.044	0.050	71.5	0.104	0.100	69.8	0.166	0.200	91.0
	3	0.050	0.050	82.0	0.104	0.100	88.1	0.176	0.200	96.9
	5	0.052	0.050	82.0	0.110	0.100	88.1	0.148	0.200	96.9
	7	0.042	0.050	101.4	0.111	0.100	107.9	0.153	0.200	91.8
Freezer	0	0.049	0.050	97.8	0.098	0.100	102.3	0.198	0.200	80.1
	30	0.045	0.050	105.5	0.092	0.100	110.1	0.183	0.200	77.8

Temp.	Day	Lettuce					
		triazophos			metalaxyl		
		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery	
			conc. (mg/kg)	% Rec.		conc. (mg/kg)	% Rec.
Room temp.	0	0.100	0.100	89.0	0.287	0.300	80.5
	1	0.094	0.100	80.7	0.282	0.300	89.3
	3	0.113	0.100	100.9	0.281	0.300	88.6
	5	0.104	0.100	100.9	0.271	0.300	88.6
	7	0.088	0.100	71.0	0.294	0.300	89.1
Freezer	0	0.100	0.100	89.0	0.287	0.300	80.5
	30	0.096	0.100	88.5	0.278	0.300	90.2

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบความแตกต่าง (%RPD) และเปอร์เซ็นต์ของสารในตัวอย่างผักกาดหอม ที่ระยะเวลาต่างๆ เทียบกับความเข้มข้นที่ 0 วัน

Temp.	Day	Lettuce									
		endosulfan sulfate		cypermethrin		carbaryl		triazophos		metalaxyl	
		% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue
Room temp.	0	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100
	1	-2.3	91	1.4	106	-4.4	84	-1.5	94	-0.4	98
	3	1.0	104	1.4	106	-3.0	89	3.0	113	-0.6	98
	5	1.6	107	3.0	113	-7.2	75	1.0	104	-1.5	94
	7	-3.8	86	3.2	114	-6.4	78	-3.2	88	0.6	102
Freezer	0	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100
	30	-1.7	94	-1.5	94	-2.0	93	-1.0	96	-0.8	97

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นเฉลี่ย (5 ซ้ำ) และ % concurrent recovery จากการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างมะเขือเทศที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

Temp.	Day	Tomato								
		Atrazine			β-endosulfan			carbaryl		
		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery	
		conc. (mg/kg)	% Rec.		conc. (mg/kg)	% Rec.		conc. (mg/kg)	% Rec.	
Room temp.	0	0.134	0.130	109.2	0.052	0.050	98.6	0.105	0.100	107.8
	1	0.137	0.130	108.0	0.048	0.050	97.7	0.105	0.100	107.0
	3	0.136	0.130	109.5	0.048	0.050	88.3	0.109	0.100	106.3
	5	0.103	0.130	99.6	0.035	0.050	96.2	0.088	0.100	96.4
	7	0.099	0.130	94.5	0.034	0.050	89.9	0.084	0.100	92.0
Freezer	0	0.134	0.130	109.2	0.052	0.050	98.6	0.105	0.100	107.8
	30	0.133	0.130	103.3	0.048	0.050	72.0	0.107	0.100	107.1

Temp.	Day	Tomato								
		cypermethrin			permethrin			triazophos		
		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery		Conc. (mg/kg)	concurrent recovery	
		conc. (mg/kg)	% Rec.		conc. (mg/kg)	% Rec.	% Rec.	conc. (mg/kg)	% Rec.	
Room temp.	0	0.157	0.150	102.8	0.541	0.500	103.3	0.200	0.200	100.7
	1	0.167	0.150	113.0	0.513	0.500	97.3	0.192	0.200	100.3
	3	0.153	0.150	97.7	0.514	0.500	72.8	0.202	0.200	103.3
	5	0.138	0.150	84.6	0.403	0.500	89.2	0.160	0.200	91.5
	7	0.138	0.150	94.8	0.400	0.500	86.7	0.163	0.200	88.6
Freezer	0	0.157	0.150	102.8	0.541	0.500	103.3	0.200	0.200	100.7
	30	0.157	0.150	86.7	0.518	0.500	74.7	0.198	0.200	107.0

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความแตกต่าง (%RPD) และเปอร์เซ็นต์ของสารในตัวอย่างมะเขือเทศ ที่ระยะเวลาต่างๆ เทียบกับความเข้มข้นที่ 0 วัน

Temp.	Day	Tomato											
		atrazine		b-endosulfan		carbaryl		cypermethrin		permethrin		triazophos	
		% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue	% RPD	% Residue
Room temp.	0	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100
	1	2.5	102.5	-8.1	92.2	0.4	100.4	6.5	106.7	-5.3	94.8	-3.9	96.2
	3	1.0	101.0	-7.8	92.5	3.6	103.7	-2.7	97.4	-5.0	95.1	1.3	101.4
	5	-26.4	76.7	-39.7	66.9	-18.0	83.5	-12.9	87.9	-29.2	74.5	-22.0	80.2
	7	-29.9	74.0	-42.5	65.0	-21.9	80.2	-12.8	88.0	-29.8	74.0	-20.3	81.6
Freezer	0	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100	0.0	100
	30	-1.2	98.8	-6.8	93.4	2.1	102.1	-0.1	99.9	-4.3	95.7	-0.7	99.3

### 8.3 การประเมินผลการทดสอบ

#### 8.3.1 False Positive and False Negative

##### 1) False positive

เป็นการรายงานผลทดสอบว่า ตรวจพบสารพิษตกค้างชนิดที่ไม่มีการตรวจพบ โดยห้องปฏิบัติการผู้จัดเตรียมตัวอย่างและไม่มีรายงานว่าตรวจพบโดยห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ที่เข้าร่วมทดสอบ และ ปริมาณสารที่รายงานว่าตรวจพบมีปริมาณมากกว่าหรือเท่ากับค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ (LOQ) (DG-SANCO, 2010) พบว่ามีห้องปฏิบัติการรายงานผลเป็น false positive จำนวน 5 ห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างผักกาดหอม-blank sample พบสาร EPN ตัวอย่างผักกาดหอม-fortified sample พบสาร Isoprocarb และ dicrotophos ตัวอย่างมะเขือเทศ-blank sample ไม่พบสารที่เป็น false positives ตัวอย่างมะเขือเทศ-fortified sample พบสาร  $\alpha$ -endosulfan, methoxychlor และ prochloraz มีปริมาณที่พบ สูงกว่าค่า LOQ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การรายงานผลที่เป็น False positive

Sample	จำนวนห้องปฏิบัติการ	Pesticide	Result (mg/kg)	%Recovery	LOQ (mg/kg)	
Lettuce	Blank sample	1	EPN	0.04	84	0.01
	Fortified sample	1	Isoprocarb	0.24	98	0.05
		1	dicrotophos	0.01	112	
Tomato	Blank sample	-	-	-	-	-
	Fortified sample	1	$\alpha$ -endosulfan	0.070	105.17	0.02
		1	methoxychlor	0.044	106.32	0.02
		1	prochloraz	0.006	114-120	0.005

## 2) False negative

พบว่ามีห้องปฏิบัติการรายงานผลของตัวอย่างผักกาดหอม- fortified sample เป็น false negative 4 ห้องปฏิบัติการ โดยไม่รายงานผล endosulfan sulfate, carbaryl และ triazophos

ตัวอย่างมะเขือเทศ-blank sample มี 10 ห้องปฏิบัติการไม่รายงานผล cypermethrin ส่วน fortified sample มี 5 ห้องปฏิบัติการ ไม่รายงานผล  $\beta$ -endosulfan และ triazophos (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การรายงานผลที่เป็น False negatives

Sample	จำนวนห้องปฏิบัติการ	Pesticide	
Lettuce	Blank sample	-	
	Fortified sample	3	endosulfan sulfate
		1	carbaryl
	1	triazophos	
Tomato	Blank sample	10	cypermethrin
	Fortified sample	4	$\beta$ -endosulfan
		1	triazophos

\* ห้องปฏิบัติการรายงานผลเป็น False negatives จำนวน 2 สาร

### 8.3.2 การประเมิน Assigned (consensus) Values

การคำนวณค่า assigned values ที่ใช้ในการประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่ร่วมทดสอบตามแนวทางของ The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analysis Laboratories และ ISO 13528 (2005) โดยใช้ robust mean ( $X^*$ ) ที่คำนวณจากผลการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ (ตารางที่ 10)

จะเห็นว่าความเข้มข้นของ robust mean มีค่าใกล้เคียง หรือเท่ากับ ค่า median ของความเข้มข้น ของผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ

ตารางที่ 10 Assigned Values (Robust mean( $X^*$ )) ที่ใช้ในการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ (n : จำนวนข้อมูล)

Sample	Sample	Pesticide	Participants			Robust mean( $x^*$ ) (mg/kg)
			Mean (mg/kg)	Median (mg/kg)	n	
Lettuce	Fortified sample	endosulfan sulfate	0.028	0.030	17	0.030
		cypermethrin	0.085	0.080	20	0.080
		carbaryl	0.157	0.150	15	0.160
		triazophos	0.092	0.080	19	0.090
		metalaxyl	0.283	0.285	8	0.290
Tomato	Fortified sample	atrazine	0.128	0.130	11	0.130
		$\beta$ -endosulfan	0.041	0.040	11	0.040
		carbaryl	0.082	0.080	16	0.080
		cypermethrin	0.158	0.150	19	0.146
		permethrin	0.391	0.410	19	0.403
		triazophos	0.221	0.220	18	0.215

### 8.3.3 การประเมิน Target Standard Deviation

ใช้ค่าของ Horwitz predicted SD (SDp) ที่คำนวณจากความเข้มข้นของสารที่เป็นค่า assigned values หรือค่า robust mean ( $X^*$ ) (ตารางที่ 10) โดยคำนวณ ตามสมการที่ 1 และ 2 (Horwitz and Albert, 2006) พบว่า ค่า % RSD ของผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ มีค่า สูงกว่า % RSDp จากการคำนวณ เมื่อทำการตัด outline ของผลการทดสอบออก พบว่า % RSD จะมีค่าใกล้เคียงกับ % RSDp จึงใช้ค่า Horwitz predicted % RSDp ซึ่งใช้สูตรการคำนวณ สำหรับ reproducibility และหา Target Standard Deviation หรือ SDp สำหรับตัวอย่างผักกาดหอม ส่วนตัวอย่างมะเขือเทศ มีการปรับ % RSD เป็น 20 ตามเกณฑ์ reproducibility ของ SANTE/11813/2017 (2017) เพื่อประเมิน Target Standard Deviation กรณีที่ Horwitz predicted % RSDp มีค่ามากกว่า 20 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่า Target Standard Deviation ที่ใช้ในการเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ

Sample		Pesticide	Participants %RSD	Horwitz predicted% RSDp	Evaluation		
					Robust mean( $X^*$ ) (mg/kg)	% RSDp	target SD (mg/kg)
Lettuce	Fortified sample	endosulfan sulfate	43.3	27.1	0.03	27.1	0.008
		cypermethrin	41.8	23.4	0.08	23.4	0.019
		carbaryl	29.6	21.1	0.16	21.1	0.033
		triazophos	42.5	23.0	0.09	23.0	0.021
		metalaxyl	17.4	19.3	0.29	17.4	0.049 *
Tomato	Fortified sample	atrazine	26.5	21.7	0.132	20.0	0.026
		$\beta$ -endosulfan	25.2	26.0	0.040	20.0	0.008
		carbaryl	29.8	23.4	0.080	20.0	0.016
		cypermethrin	45.6	21.4	0.146	20.0	0.029
		permethrin	27.6	18.3	0.403	18.3	0.074
		triazophos	21.1	20.2	0.215	20.0	0.043

\* ใช้ค่า target SD ของกลุ่ม

### 8.4 การประเมินผลการทดสอบของห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการที่ตอบรับเข้าร่วมทดสอบตัวอย่างผักกาดหอม 21 ห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างมะเขือเทศ 21 ห้องปฏิบัติการ มีการส่งผลการทดสอบตามเวลาที่กำหนดครบทุกห้องปฏิบัติการ สำหรับ

ตัวอย่างมะเขือเทศ โดยมี 2 ห้องปฏิบัติการ ได้ส่งรายงานผลการทดสอบ 2 ชุด โดยใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ในการรายงานผลห้องปฏิบัติการได้แจ้งชนิดของสารพิษตกค้างที่ไม่ได้อยู่ในรายการทดสอบ (NT-not tested) เพื่อประเมินการรายงานผลที่เป็น false negative

#### 8.4.1 การประเมินตัวอย่าง Blank sample

1) ตัวอย่างผักกาดหอม พบว่ามีห้องปฏิบัติการรายงานผลเป็น false positives จำนวน 1 ห้องปฏิบัติการ โดยพบสาร EPN ปริมาณสูงกว่าค่า LOQ

2) ตัวอย่างมะเขือเทศ พบว่ามีห้องปฏิบัติการรายงานผล cypermethrin เป็น false negative จำนวน 10 ห้องปฏิบัติการ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยสารพิษตกค้าง ซึ่งพบ cypermethrin ปริมาณ 0.01 mg/kg

#### 8.4.2 การประเมินตัวอย่าง fortified sample

1) ตัวอย่างผักกาดหอม มีการรายงานผลการทดสอบตามวันเวลาที่กำหนดรวมทั้งสิ้น 21 ห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบที่คาดหวังรวมทั้งสิ้น 105 ข้อมูล มีการรายงานผลทั้งสิ้น 79 ข้อมูล คิดเป็น 83 % ของผลการทดสอบที่คาดหวัง พบว่า รายงานเป็น false negative 6.3 % และชนิดสารไม่อยู่ในขอบข่ายของห้องปฏิบัติการ 21.0 % สารที่มีการรายงานผลมากที่สุด ได้แก่ cypermethrin สารที่รายงานผลน้อยที่สุดได้แก่ metalaxyl ข้อมูลสรุป ดังตารางที่ 12

ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ใน เกณฑ์น่าพอใจ 80 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \leq 2$  ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ น่าสงสัย 8.2 % โดยมีค่า  $2 < |z\text{-Score}| < 3$  และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 11.8 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \geq 3$  ผลการทดสอบ metalaxyl และ carbary มีผลการทดสอบเป็นที่น่าพอใจมากที่สุด ในการประเมินผลได้มีการนำผลการทดลองที่เป็น false negative หรือ ไม่มีการรายงานผล ของ endosulfan sulfate, carbaryl และ triazophos ในตัวอย่าง มาประเมินค่า z-Score โดยให้ความเข้มข้นที่ใช้ในการประเมิน เท่ากับ 0.00 mg/kg ข้อมูลสรุปดังตารางที่ 13

2) ตัวอย่างมะเขือเทศ มีการรายงานผลการทดสอบตามวันเวลาที่กำหนดรวมทั้งสิ้น 21 ห้องปฏิบัติการ และมี 2 ห้องปฏิบัติการ ที่รายงานผลการทดสอบ 2 ชุดตามวิธีวิเคราะห์ จึงประเมินเป็น 23 ห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบที่คาดหวังประเมินจากชนิดสารและจำนวนห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบรวมทั้งสิ้น 138 ข้อมูล มีการรายงานผลทั้งสิ้น 94 ข้อมูลคิดเป็น 68.1 % ของผลการทดสอบที่คาดหวัง พบว่า รายงานเป็น false negative 4.3 % ชนิดสารไม่อยู่ในขอบข่ายของห้องปฏิบัติการ 27.5 % ข้อมูลสรุป ดังตารางที่ 12

ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ใน เกณฑ์น่าพอใจ 84.0 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \leq 2$  ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ น่าสงสัย 4.0 % โดยมีค่า  $2 < |z\text{-Score}| < 3$  และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 12.0 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \geq 3$  ในการประเมินผลได้มีการนำผล



การทดลองที่เป็น false negative ของสาร  $\beta$ -endosulfan และ triazophos มาประเมินค่า z-Score โดยกำหนดให้ความเข้มข้นที่ใช้ในการประเมิน เท่ากับ 0.00 mg/kg ข้อมูลสรุป ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ภาพรวมของการรายงานผลการทดสอบ และ เปอร์เซ็นต์ผลการทดสอบสารแต่ละชนิด

Sample		Pesticide	Reported	FALSE Negative	Not Tested	Participated LAB. (n)	% Result *
Lettuce	Fortified sample	endosulfan sulfate	17	4		21	81.0
		cypermethrin	20		1		95.2
		carbaryl	15	1	5		71.4
		triazophos	19	1	1		90.5
		metalaxyl	8		13		38.1
Total			79	6	20		
% **			83.0	6.3	21.0		
Tomato	Fortified sample	atrazine	11		12	23	47.8
		$\beta$ -endosulfan	11	5	7		47.8
		carbaryl	16		7		69.6
		cypermethrin	19		4		82.6
		permethrin	19		4		82.6
		triazophos	18	1	4		78.3
Total			94	6	38		
% ***			68.1	4.3	27.5		

หมายเหตุ \* เทียบกับจำนวนห้องปฏิบัติการที่ร่วมทดสอบแต่ละตัวอย่าง \*\* เทียบกับผลที่คาดหวัง (105 ข้อมูล)

\*\*\* เทียบกับผลที่คาดหวัง (138 ข้อมูล)

ตารางที่ 13 % ของผลการทดสอบ ที่มีค่า z-Score ในช่วงต่างๆ

Sample		Pesticide	Reported data	$ z  \leq 2$		$2 <  z  < 3$		$ z  \geq 3$	
				Result	% Result	Result	% Result	Result	% Result
Lettuce	Fortified sample	endosulfan sulfate *	21	13	62	4	19	4	19
		cypermethrin	20	17	85			3	15
		carbaryl *	16	14	88	1	6	1	6
		triazophos *	20	16	80	2	10	2	10
		metalaxyl	8	8	100				
Total			85	68		7		10	
% **			100	80		8.2		11.8	
Tomato	Fortified sample	atrazine	11	10	90.9			1	9.1
		$\beta$ -endosulfan*	16	10	62.5	1	6.25	5	31.3
		carbaryl	16	15	93.7			1	6.3
		cypermethrin	19	15	78.9	1	5.3	3	15.8
		permethrin	19	17	89.5	1	5.3	1	5.3
		Triazophos*	19	17	89.5	1	5.3	1	5.3
Total			100	84		4		12	
% **			100	84.0		4.0		12.0	

หมายเหตุ \* นำข้อมูลที่เป็น false negative มาคำนวณ z- score โดยให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.00 mg/kg

\*\*\* เทียบกับจำนวนข้อมูลที่ยังไม่รายงานผล

$|z| \leq 2$  ผลทดสอบเป็นที่น่าพอใจ (Satisfactory)

$2 < |z| < 3$  ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย (Questionable)

$|z| \geq 3$  ผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ (Unsatisfactory)

#### 8.4.3 วิธีและเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์

ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบใช้วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ คือวิธี In house method base on Steinwandter H. (1985) วิธี QuEChERS และวิธี EURL-FV (2013) ส่วนเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เป็นเครื่องมือที่มีความถูกต้อง แม่นยำและยอมรับได้ โดยเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและไพรีทรอยด์ ได้แก่ GC- $\mu$ -ECD, GC-ECD, GC-MS/MS และ GC-MS สารกลุ่ม

ออร์กาโนฟอสฟอรัส ได้แก่ GC-FPD, GC-MS, GC-MS/MS และ LC-MS/MS สารกลุ่มคาร์บาเมท ได้แก่ LC-MS, LC-MS/MS และ HPLC/FLD และสารกลุ่ม Fungicide และอื่นๆ ได้แก่ LC-MS/MS และ GC-MS สรุปดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เครื่องมือตรวจวิเคราะห์และวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

Pesticide	Measurement technique	Ref. of Test Method
Organochlorine and Pyrethroid	GC- $\mu$ -ECD GC-ECD GC-MS/MS GC-MS	In house method base on Steinwandter, H.(1985) QuEChERS ( Anastassiades at al., 2003) QuEChERS (EN 15662, 2008) QuEChERS (AOAC Official Method 2007.01., 2007) EURL-FV (2013)
Organophosphorus	GC-FPD GC-MS GC-MS/MS LC-MS/MS	
Carbamate	LC-MS LC-MS/MS HPLC/FLD	
Fungicide and others	LC-MS/MS GC-MS	

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่มออร์กาโนคลอรีน กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มไพรีทรอยด์ กลุ่มคาร์บาเมท และ สารป้องกันกำจัดโรคพืชและอื่นๆ โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-16 ดำเนินการในช่วง สิงหาคม - กันยายน 2559 เตรียมตัวอย่างผักกาดหอม ได้แก่ blank sample และ fortified sample มีการแจ้งขอเชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบรวม 24 ห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ และ โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-17 ดำเนินการในช่วง กรกฎาคม - กันยายน 2560 เตรียมตัวอย่างมะเขือเทศ ได้แก่ blank sample และ fortified sample แจ้งขอเชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบรวม 28 ห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่าง fortified sample ดังนี้ ผักกาดหอม มีการเติมสาร endosulfan sulfate, cypermethrin, carbaryl, triazophos และ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0.05 -0.30 mg/kg ตัวอย่างมะเขือเทศ มีการเติมสาร atrazine, carbaryl, cypermethrin,  $\beta$ -endosulfan, permethrin และ triazophos ที่ความเข้มข้น 0.05-0.5 mg/kg การประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity test) โดยใช้สถิติ โดยใช้สถิติ ISO 13528 (2005) และสถิติ IUPAC (2006) พบว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนการทดสอบความคงตัวของสารตกค้างในตัวอย่าง (stability test) โดยศึกษาที่อุณหภูมิห้อง ( $25 \pm 5$  °C) ที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน นับจากวันส่งตัวอย่าง และที่อุณหภูมิ freezer (ไม่น้อยกว่า -18 °C) ที่ 30 วัน นับจากวันส่งตัวอย่าง (วันรายงานผล) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างวันละอย่างน้อย 5 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่าง (%RPD) ของความเข้มข้นเฉลี่ยที่ระยะเวลาต่างๆ กับความเข้มข้นเฉลี่ยที่ 0 วัน พบว่าการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง สารที่เติมในตัวอย่างผักกาดหอม มีความคงทนที่ 0-7 วัน ส่วน

ตัวอย่างมะเขือเทศ พบว่า ทุกสารมีความคงทนที่ 0-3 วัน การศึกษาที่อุณหภูมิ freezer ทุกสารในตัวอย่างมีความคงทนจนถึง 30 วัน

โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-16 (ตัวอย่างผักกาดหอม) ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 68 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \leq 2$  ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ น่าสงสัย 8.2 % โดยมีค่า  $2 < |z\text{-Score}| < 3$  และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 11.8 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \geq 3$  โปรแกรมการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง: DOA-PRL-01-17 (ตัวอย่างมะเขือเทศ) เกณฑ์น่าพอใจ 84 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \leq 2$  ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ น่าสงสัย 4 % โดยมีค่า  $2 < |z\text{-Score}| < 3$  และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 12 % โดยมีค่า  $|z\text{-Score}| \geq 3$  ซึ่งห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบใช้วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ คือวิธี Steinwandter H. (1985) และ วิธี QuEChERS ส่วนเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เป็นเครื่องมือที่มีความถูกต้อง แม่นยำและยอมรับได้ ได้แก่ GC, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC, LC-MS และ LC-MS/MS .

ข้อมูลการเตรียมตัวอย่างและการจัดโปรแกรมการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการสามารถประเมินการทำงานของห้องปฏิบัติการว่า ยังคงมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่ทัดเทียมกับห้องปฏิบัติการอื่นหรือไม่ และนำข้อมูลไปกำหนดแผนการป้องกันและปรับปรุงห้องปฏิบัติการเพื่อคงความสามารถในการตรวจวิเคราะห์

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

12.1 นำขั้นตอนการดำเนินการไปใช้ในการทดสอบความสามารถ ในการตรวจวิเคราะห์สารและพิษชนิดอื่นๆในครั้งต่อไป

12.2 ใช้เตรียมตัวอย่างเพื่อเป็น ตัวอย่างอ้างอิงเพื่อควบคุมประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตร.

12.3 ใช้ในการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 และ ISO/IEC 17043 ของห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง

## 11. คำขอบคุณ -

## 12. เอกสารอ้างอิง

Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. 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., 2003, 86(2), 412-31.

AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

- DC-SANCO. 2010. General Protocol for EU Proficiency Tests for Pesticide Residues in Food and Feed. European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.
- EN 15662. 2008. Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method
- EURL-FV. 2007. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1 Anal Bioanal. Chem. 389:1773-1789. (<http://www.crl-pesticides.eu>)
- Horwitz, W. and Alibert, R. 2006. The Horwitz ratio (Horrat) : a useful index of method performance with respect to precision. Journal of AOAC International. 89,4, 2006, 1095-1108.
- ISO Guide 35. 2006. Reference materials- General and statistical principles for certification. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO 13528. 2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
- SANTE/11813/2017. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
- Steinwandter H. 1985. Universal 5 min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residue and Industrial Chemicals. Fresenius Z. Anal. Chem. No. 1155.
- The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories . Pure Appl. Chem., 78, 1 : 145-196. (2006).