

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
Research and Development on Analytical System of Agricultural Inputs
Following the International Standards
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
กิจกรรมที่ 3 : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ในดินด้วยวิธีการ QuEChERS โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีของห้องปฏิบัติการสวพ.2
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางพรศิริ สายะพันธ์	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2
ผู้ร่วมงาน	นายวิษณุ แจ่มใบ	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2
	นางสาวสุธินี สาสีลัง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2
	นางสาวเบญจมาศ ใจแก้ว	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2
	นางสาวบังอร แสนคาน	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคและวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์แกโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ในดิน เพื่อให้ได้วิธีการที่เป็นมาตรฐาน มีความถูกต้องแม่นยำ เหมาะสม รวดเร็ว ทันต่อความต้องการ เสียค่าใช้จ่ายน้อย โดยใช้วิธีการ modified method ของ QuEChERS โดยใช้ acetonitrile, MgSO₄ และ NaCl สกัด และใช้ PSA, และ MgSO₄ ในการ clean up ในปีงบประมาณ 2559 ได้มีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์แกโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเทนดีแมสสเปกโตรเมตรี และมีการศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ผลต่อประสิทธิภาพการสกัดด้วยเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ซึ่งวิธีการเหล่านี้ต้องผ่านการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) ตามมาตรฐานสากล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้ดียิ่งขึ้น รองรับการตรวจวิเคราะห์ดินและผลผลิตทางการเกษตรตามโครงการอาหารปลอดภัย คุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่ทำการตรวจสอบได้แก่ ช่วงการใช้งาน (Working Range), ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity), ความแม่นยำ (Accuracy), ความเที่ยง (Precision), ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection), และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation) ผลการศึกษาคุณลักษณะเฉพาะของวิธี

พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดี คือ ช่วง 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ให้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 ยกเว้น methamidophos, mevinphos, omethoate, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ซึ่งยังให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ไม่ผ่านเกณฑ์ ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าอยู่ในช่วง 0.003-0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าอยู่ในช่วง 0.01-0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม ยกเว้น mevinphos, dimethoate, phosalone ได้ค่า LOD 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัมและ LOQ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม methamidophos, dicrotophos, monocrotophos, alpha-endosulfan, azinphos, และ EPN ได้ค่า LOD 0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม และ LOQ 0.07 ไมโครกรัมต่อกรัม นอกจากนั้นพบว่า omethoate ให้ค่า LOD, LOQ ที่สูง คือ 0.40 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม การหาค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 43-150%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 43-150%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 70-112% ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ประเมินค่าอยู่ในช่วง 0.2-1.9 ยกเว้น methamidophos, mevinphos, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ให้ค่า HORRAT > 2 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 0.30 ไมโครกรัมต่อกรัม

6. คำนำ

ประเทศไทยเราเป็นประเทศเกษตรกรรมในเขตร้อนที่มีศัตรูพืชชุกชุม จึงยังคงมีความจำเป็นในการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในผลิตผลการเกษตรโดยเฉพาะพืชผัก สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในทางการเกษตรที่มีการจำหน่ายทางการค้ามีมากมายหลายชนิดซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการควบคุมและกำจัด คือ สารกำจัดแมลง สารป้องกันกำจัดวัชพืช สารป้องกันกำจัดเชื้อรา สารกำจัดหนูและสัตว์ เป็นต้น แต่ในการจำแนกตามสูตรเคมี แบ่งประเภทใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มสารประกอบคลอรีน เป็นกลุ่มสารที่มีการใช้มากในการเกษตรยุคแรกๆ แต่ต่อมาพบว่าสารกลุ่มนี้เป็นสารที่สลายตัวช้า มีพิษตกค้างปนเปื้อนอยู่ในสภาวะแวดล้อมยาวนานจึงมีประกาศห้ามใช้ทางการเกษตร กลุ่มสารประกอบฟอสเฟต กลุ่มสารคาร์บาเมท มีการใช้มาก มีพิษค่อนข้างสูงแต่สลายตัวได้เร็วมากกว่ากลุ่มอื่น และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ สารในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์เร็ว ความเป็นพิษในสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำสลายตัวได้เร็ว ผู้ที่สัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยตรง เช่น เกษตรกร หรือผู้บริโภคจะได้รับพิษทางอ้อม ซึ่งเกิดจากการบริโภคผลผลิตทางการเกษตรที่มีสารเคมีปนเปื้อนหรือตกค้างอยู่ ซึ่งการได้รับสารพิษตกค้างในอาหารแม้ว่าจะได้รับในปริมาณต่ำ แต่การที่ได้รับเป็นประจำ สารพิษอาจสะสมเป็นปัญหาเรื้อรัง และส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานต่างๆ ในร่างกาย ดังนั้นเพื่อให้ผู้บริโภคได้บริโภคอาหารอย่างปลอดภัย จึงต้องมีระบบการดูแลควบคุมและตรวจสอบคุณภาพความปลอดภัยในอาหารที่ผลิตทุกขั้นตอน ทั้งนี้มาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมต้องมีความเท่าเทียมกับมาตรฐานสากล ทำให้ต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีและสร้างองค์ความรู้ที่หลากหลายเพื่อเพิ่มสมรรถนะกับการแข่งขันกับต่างประเทศ

ดินเป็นทรัพยากรธรรมชาติ เกิดขึ้นจากการผุพังของหินและแร่ รวมทั้งอินทรีย์วัตถุผสมคลุกเคล้าเป็นเนื้อเดียวกัน เป็นส่วนต่างๆ ที่ปกคลุมผิวโลกที่เป็นแผ่นดิน เมื่อมีองค์ประกอบของอากาศและน้ำ เป็นปริมาณที่

เหมาะสม จะช่วยกำจัด และเอื้ออำนวยการยังชีพ และการเจริญเติบโตของพืช กล่าวได้ว่า ดินเป็นแหล่งที่มาที่สำคัญของธาตุอาหารและน้ำตามธรรมชาติ ที่กำจัดพืชและสัตว์ให้เจริญเติบโต ก่อนถูกทำลาย เพื่อนำที่ดินมาใช้ทำการเพาะปลูก ธาตุอาหารพืชในดินจะสะสมหมุนเวียนอยู่บนผิวดินอย่างอุดมสมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงของดินจากสภาพดินดีไปเป็นดินเลว จะเกิดขึ้นได้เร็วหรือช้า แตกต่างกันตามสภาพการใช้งานเพื่อการเกษตร และวิธีการอนุรักษ์ปรับปรุงบำรุงดินของเกษตรกร ถ้าเกษตรกรมีความรู้ และเข้าใจในความสำคัญของดิน ดินก็จะเสื่อมสภาพช้า ในทางตรงข้ามถ้าเกษตรกรไม่เข้าใจ และไม่รู้จักความสำคัญของดิน ดินเป็นต้นกำเนิดของความเจริญทางเศรษฐกิจ และความอยู่ดีกินดีของมนุษย์ ดินดีจะส่งผลให้เกิดผลิตผลทางการเกษตรที่ได้ผลดี ความอุดมสมบูรณ์ของดิน จึงเสมือนเป็นทรัพยากรที่สำคัญที่สุดของชาติ ที่ทุกคนจะต้องสงวนไว้ ทรัพยากรนี้จะหมดไปอย่างรวดเร็วเมื่อมีการใช้ดิน เพื่อการเพาะปลูก อย่างไม่ระมัดระวัง และขาดความรู้ ดังนั้น ผู้ที่ทำการเพาะปลูก จึงต้องมีความรู้ความเข้าใจในเรื่องการใช้ และการอนุรักษ์ดินเป็นอย่างดี เพื่อที่เราจะได้สามารถใช้ประโยชน์จากทรัพยากรแหล่งนี้เพื่อการเพาะปลูก

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรเป็นขั้นตอนหนึ่งที่จะต้องรวดเร็ว ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และเพิ่มความเข้มข้นของสารที่สนใจวิเคราะห์ให้อยู่ในระดับที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดได้ ข้อเสีย สำหรับการเตรียมตัวอย่างวิธีทั่วไป คือ เรื่องของเวลาการเตรียมมีหลายขั้นตอนในการทำ ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์มาก ทำแบบอัตโนมัติได้ยาก และผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญ เพราะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายและกระบวนการให้เหมาะสม เป็นต้น ปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างแบบใหม่ ซึ่งใช้เวลาการเตรียมตัวอย่างน้อย มีประสิทธิภาพสูงและใช้ปริมาณตัวอย่างและปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อยลง มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากมาก เนื่องจากงานวิจัยที่เกี่ยวกับเทคนิค QuEChERs ส่วนใหญ่จะวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรในตัวอย่างพืชผักและผลไม้ ที่มีเนื้อสารที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค QuEChERs มาใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตรในตัวอย่างดิน ที่มีส่วนประกอบของน้ำน้อย เพื่อลดขั้นตอนการสกัดตัวอย่างให้ง่ายรวดเร็ว และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์น้อย

7. วิธีการดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์และเครื่องมือหลัก

- 7.1.1 เครื่อง gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MSMS) ยี่ห้อ bruker
- 7.1.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ mettler toledo ช่วงการใช้งาน 0.5 - 1500 กรัม
- 7.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ mettler toledo ช่วงการใช้งาน 10 มิลลิกรัม - 220 กรัม
- 7.1.4 เครื่องปั่นตัวอย่าง (food chopper) ยี่ห้อ robot coupe รุ่น R201 Ultra
- 7.1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ยี่ห้อ napco millennium-2028R รุ่น 2028 R
- 7.1.6 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) ยี่ห้อ labnet รุ่น VX 100

7.1.7 อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (solvent dispenser) ขนาด 10, 50, 100 มิลลิลิตร

7.1.8 ปิเปตดูด-จ่ายสารละลายอัตโนมัติชนิดปรับปริมาตรได้ (automatic pipette) ช่วงการใช้งาน 10-100 ไมโครลิตร, 200-1000 ไมโครลิตร, 1-10 มิลลิลิตร

7.1.9 ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5, 25 มิลลิลิตร

7.1.10 ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 500 มิลลิลิตร

7.1.11 หลอดเซนติฟิวพลาสติกแบบมีฝาปิด (centrifuge tube) ขนาด 2, 50 มิลลิลิตร

7.1.12 ขวดตัวอย่าง (autosampler vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร

7.2 สารมาตรฐาน

7.2.1 สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส (OPPs) จำนวน 23 ชนิด ได้แก่ dichlorvos (DDVP), methamidophos, mevinphos, diazinon, omethoate, dicrotophos, monocrotophos, dimethoate, pirimiphos- methyl, chlorpyrifos, parathion-methyl, pirimiphos, malathion, fenitrothion, parathion, prothiophos, methidathion, profenofos, triazophos, ethion, EPN , phosalone, และ azinphos

7.2.2 สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (OCLs) จำนวน 3 ชนิด คือ α -endosulfan, β -endosulfan, และ endosulfan sulphate

7.2.3 สารฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ (PYs) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ lambda-cyhalothrin , permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, FS-fenvalerate, และ deltamethrin

การเตรียม Stock Standard Solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐาน (% purity) มาคำนวณหาน้ำหนักที่แท้จริง โดยชั่งสารมาตรฐานประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนไทรเกรด (PR Grade) ลงในขวดวัดปริมาตรที่เล็กน้อยแล้วเขย่า จนสารมาตรฐานละลายหมดจากนั้นเติมเอทิล อะซิเตทจนถึงขีดปริมาตร

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานคำนวณดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง (mg)} \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร (\%)} \times 10^3}{\text{ปริมาตรที่เตรียม (ml)} \times 100}$$

การเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับ Fortified ลงในตัวอย่างและใช้ในการเตรียม Working Mixed Standard Solution

เตรียมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตดูด stock standard solution 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารแต่ละชนิดในปริมาณที่คำนวณโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอะซีโตนไตรล์ (PR Grade) ลงในขวดวัดปริมาตรที่ล้นน้อยจนถึงขีดปริมาตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายมาตรฐานผสมกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส กลุ่มออร์กาโนคลอรีน และกลุ่มไพรีทรอยด์ ลงในขวดแก้วเก็บสารละลาย (stock bottle)

การเตรียม Working Mixed Standard Solution ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005 - 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารมาตรฐานผสมความเข้มข้นมากกว่า 3 ระดับ (level) โดยกำหนดความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005 - 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้เป็น calibration curve โดยใช้ปิเปตดูด intermediate mixed standard solution 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณที่คำนวณโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร เติมอะซีโตนไตรล์ ลงในขวดวัดปริมาตรที่ล้นน้อยจนถึงขีดปริมาตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายมาตรฐานผสมลงในขวดแก้วเก็บสารละลาย (stock bottle)

7.3 วิธีการทดลอง

7.3.1 หาสารที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์แกโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ได้แก่ dichlorvos (DDVP), methamidophos, mevinphos, diazinon, omethoate, dicrotophos, monocrotophos, dimethoate, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, parathion-methyl, pirimiphos, malathion, fenitrothion, parathion, prothiophos, methidathion, profenofos, triazophos, ethion, EPN, phosalone และ azinphos กลุ่มออร์กาโนคลอรีน ได้แก่ alpha endosulfan, belta endosulfan, endosulfan sulfate และกลุ่มไพรีทรอยด์ ได้แก่ lambda-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fs-Fenvalerate, และ deltamethrin ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเทนดัมแมสสเปกโตรเมตรี ได้แก่ อุณหภูมิของการฉีดสารตัวอย่างและตู้อบให้ความร้อน, อัตราการไหลของแก๊สตัวพา และเลือกแมสที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์สารตัวอย่างดิน

7.3.2 ศึกษาวิธี QuEChERS และปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมตัวอย่างดินและประสิทธิภาพการสกัด โดยการประเมินค่าร้อยละการคืนกลับของสารที่ต้องการวิเคราะห์และปริมาณสารรบกวนที่สกัดได้

7.3.3 ได้จัดหาและเตรียมตัวอย่างดินสำหรับใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

ดินที่เก็บมารวมกันในครั้งนี้ถือว่าเป็นตัวอย่างดิน เนื่องจากดินมีความชื้นจึงต้อง ทำให้แห้งโดยเทดินในแต่ละถังลงบนแผ่นผ้าพลาสติกเกลี่ยดินผึ่งไว้ในที่ร่มจนแห้ง ดินที่เป็นก้อนให้ใช้ไม้ทุบให้ละเอียดพอประมาณ แล้วคลุกเคล้าให้เข้ากันจนทั่วก่อนไปทดสอบหาความชื้นในดินให้อยู่ในช่วง 10-20%

ตาราง 1 ความชื้นหลังจากเก็บตัวอย่างดิน และผึ่งไว้ในที่ร่ม 45 วัน

จำนวนตัวอย่างดิน	% ความชื้น
1	15.41
2	12.35

3	13.56
4	17.45
5	15.88
6	14.97

7.3.4 คุณลักษณะของวิธีและระดับความเข้มข้นที่จะศึกษา

7.3.4.1 ช่วงของการวัด (working range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ช่วงของการวัดเป็นช่วงของความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ระหว่างค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดที่เป็นเส้นตรงและให้ผลการทดสอบที่มีความเที่ยง ความแม่นยำตามเกณฑ์ที่ยอมรับ ความเป็นเส้นตรงเป็นความสามารถของวิธีที่ให้ผลการทดสอบเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานระดับความเข้มข้น คือ 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 0.7, และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำผลการวัดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ppm) กับ peak area และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับจะต้องมากกว่า 0.995

7.3.4.2 การหาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

limit of detection (LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้

limit of quantitation (LOQ) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง โดยมีความถูกต้องและความแม่นยำยอมรับได้

LOD และ LOQ หาได้โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่ำ มาวิเคราะห์อย่างน้อย 6 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่อ่านได้ แล้วหาค่า LOD และ LOQ ดังสมการที่ 1-2 ตามลำดับ

$$\text{LOD} = 3 \text{ SD} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ SD} \quad (2)$$

7.3.4.3 การตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy)

ความแม่นยำหรือความถูกต้อง คือ ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดค่าในสารตัวอย่างได้ออกมาตรงกันหรือใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.10, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นอย่างน้อย 7 ซ้ำที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน

ประเมิน accuracy จากค่า mean % recovery (สมการที่ 3) และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ codex การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร (ตาราง 2)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_2 - C_1) \times 100}{C_3} \quad (3)$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ spike ที่หาได้จาก calibration curve

C_2 = ความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่หาได้จาก calibration curve

C_3 = ความเข้มข้นจริงที่รู้แน่นอน (ความเข้มข้นที่ spike ในตัวอย่าง)

ตาราง 2 เกณฑ์การยอมรับ % recovery ของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร

Concentrations of analyte	Range of mean % recovery
< 1 µg/kg	50-120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	60-120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	70-120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	70-110
> 1 mg/kg	70-110

ที่มา Codex (2005)

7.3.4.4 การตรวจสอบความเที่ยง (intermediate precision)

เป็นการหาความเที่ยงโดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกันหลายๆ ครั้ง โดยวิเคราะห์คนละวัน ใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือวิเคราะห์เดียวกัน และผู้วิเคราะห์ต่างคน

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.30, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นอย่างน้อย 7 ซ้ำ ประเมิน precision โดยการเปรียบเทียบค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง (% RSD_{obs}) กับค่าที่ถูกคำนวณจาก Horwitz Equation (% RSD_r) ดังสมการที่ 4-6 ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับ คือ ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) < 2 (AOAC, 2002)

$$\% \text{ RSD}_{\text{obs}} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ RSD}_r = 0.66 \times 2C^{(1-0.5 \log C)} = 0.66 \times 2C^{-1.50} \quad (5)$$

$$\text{HORRAT} = \frac{RSD_{obs}}{RSD_r} \quad (6)$$

7.4 เวลาและสถานที่

ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด) :	1 ตุลาคม 2558 - 30 กันยายน 2560
สถานที่ทำการทดลอง :	กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 พิษณุโลก

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

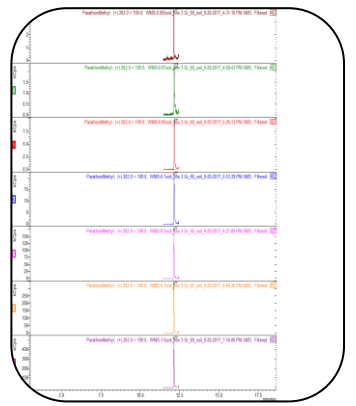
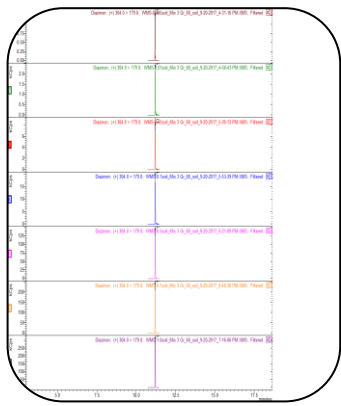
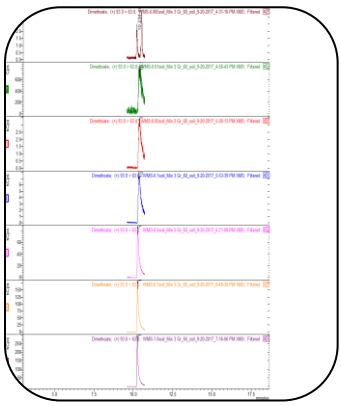
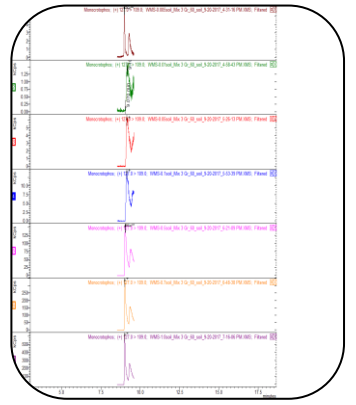
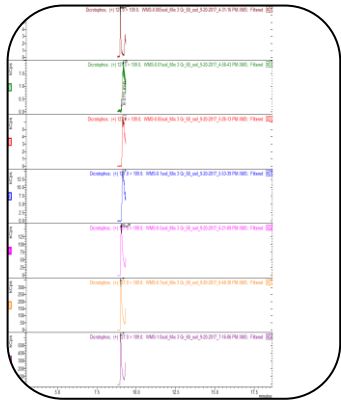
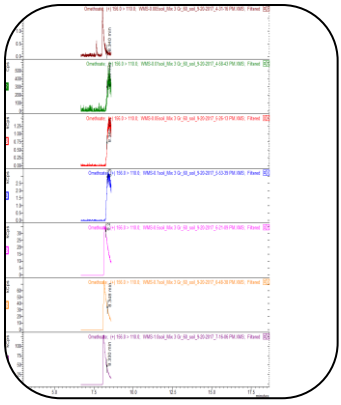
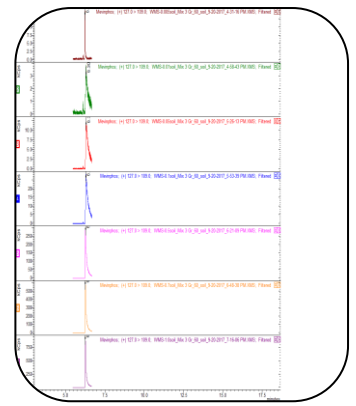
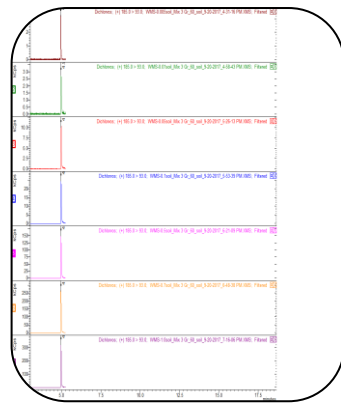
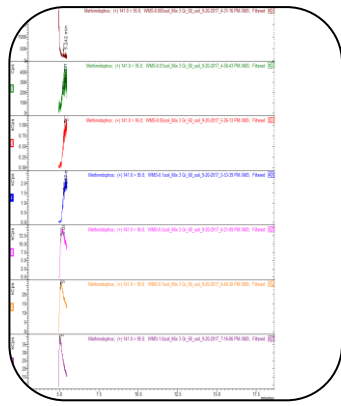
8.1 ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเทนเต็มแมสสเปกโตรเมตรี (GC-MSMS)

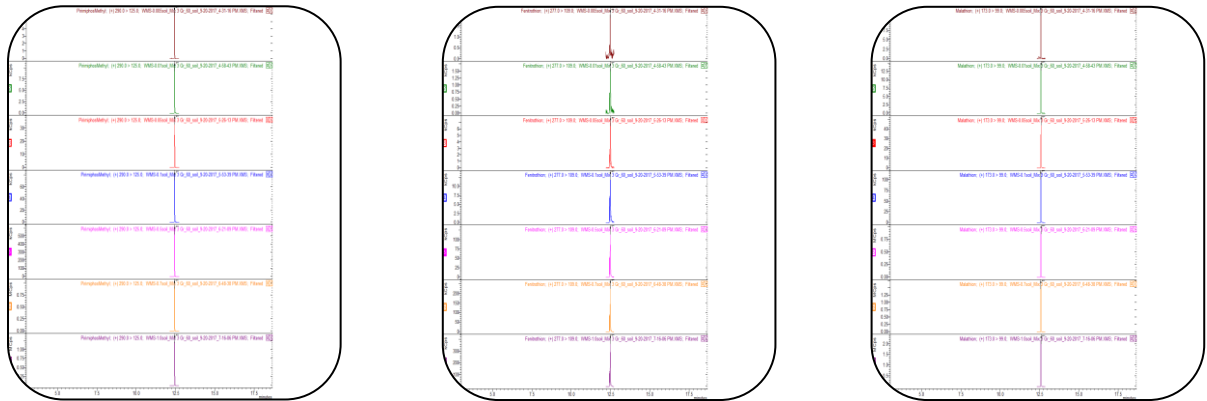
การวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์แกโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีเทนเต็มแมสสเปกโตรเมตรี แบบ electron impact ionization (EI) ที่ 70 eV และตรวจวัดในรูปแบบ MRM โดยใช้เครื่องยี่ห้อ Bruker รุ่น 436 GC/ Scion MS คอลัมน์ที่ใช้แยกสารเป็นแบบบรรจุด้วยซิลิกา Rxi-5Sil MS (30m× 0.25mm I.D ×0.25µm film thickness) โพรแกรมอุณหภูมิที่ใช้แยกสารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ เริ่มที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1.00 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 80 °C ถึง 180 °C อัตราความเร็ว 20 °C / นาที, เพิ่มอุณหภูมิจาก 180 °C ถึง 220 °C อัตราความเร็ว 5 °C / นาที เป็นเวลา 1.00 นาที, เพิ่มอุณหภูมิจาก 220 °C ถึง 270 °C อัตราความเร็ว 15. °C / นาที เป็นเวลา 8.00 นาที, และเพิ่มอุณหภูมิจาก 270 °C ถึง 320 °C อัตราความเร็ว 40 °C / นาที เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้แก๊สฮีเลียมความบริสุทธิ์ 99.9995% เป็นแก๊สพาด้วยอัตราความเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที การฉีดสารพิษตกค้างเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นแบบ splitless ที่อุณหภูมิ 220 °C ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

ตาราง 3 การเลือกไอออนสำหรับทำ MRM ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 32 ชนิดโดยใช้เครื่อง GC-MSMS

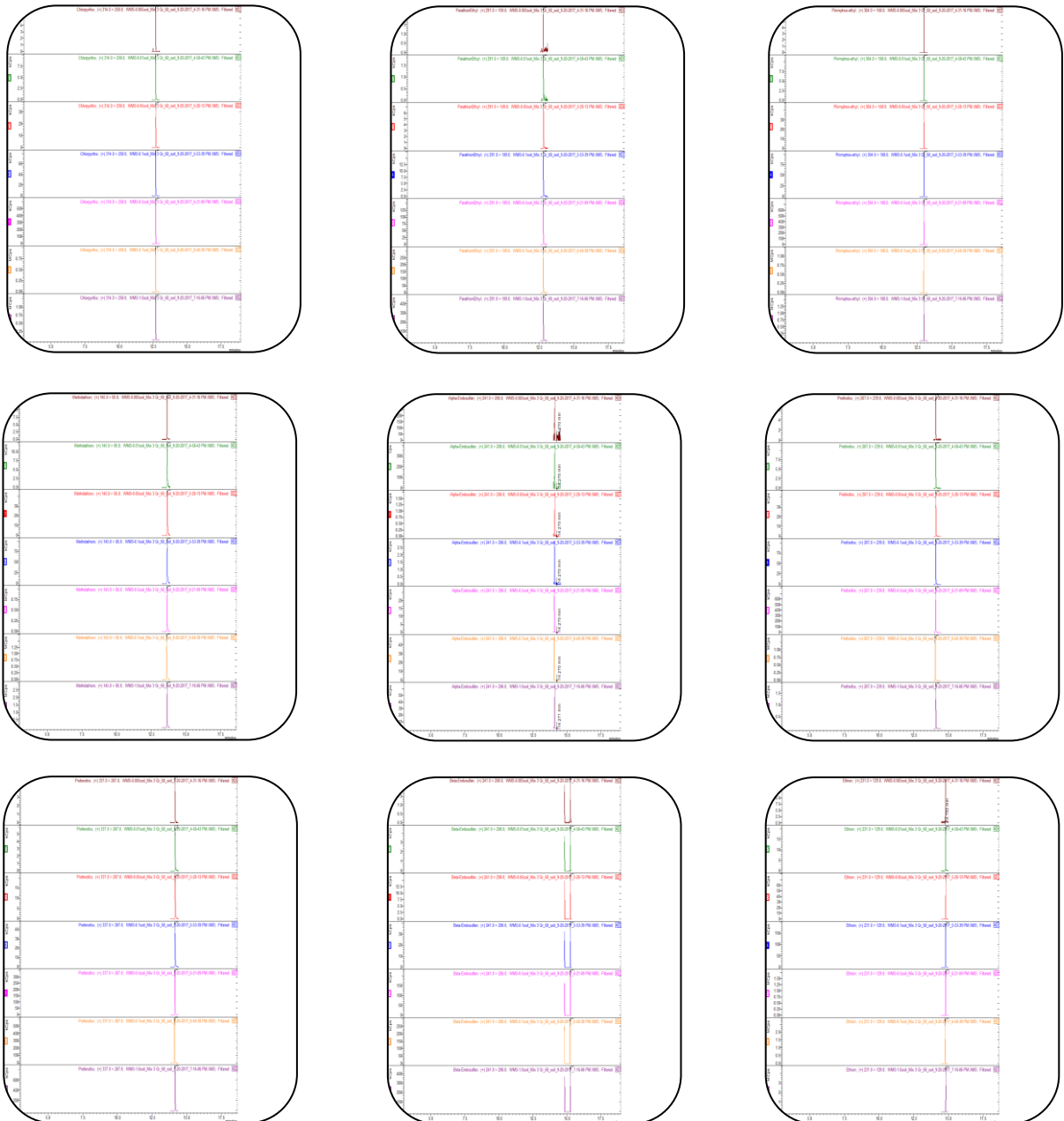
substances to be analyzed	Rt	precursor ion	product ion		
			quan ion	qualifier1	qualifier2
methamidophos	5.370	141	95	94	
dichlorvos	5.520	185	93	109	
mevinphos	6.830	127,192	109	95	127
omethoate	8.370	156	110	79	
dicrotophos	9.120	127,193	109	127	95

substances to be analyzed	Rt	precusor ion	product ion		
			quan ion	qualifier1	qualifier2
monocrotophos	9.220	127	109	95	
dimethoate	10.016	125,93	63	79	
diazinon	10.776	304,179	179	137	121
parathion-methyl	11.990	263,233	109	79	109
pirimiphos- methyl	12.800	290	125	233	151
fenitrothion	12.883	277,260	109	125	260
malathion	13.060	173,158,173	99	125	127
chlorpyrifos	13.342	314	258	166	286
parathion	13.410	291	109	81	
pirimiphos	14.195	318,304,333	168	166	180
methidathion	15.230	145	85	58	
alpha-endosulfan	15.620	241,265	206	170	229
prothiophos	16.090	309,267	239	239	221
profenofos	16.344	337,339	267	269	188
beta-endosulfan	17.080	195,241	159	206	
ethion	17.355	231	129	175	203
triazophos	17.660	257,161	162	119	105
endosulfan sulfat	17.990	387,272	253	237	
EPN	19.070	157,169	141	111	77
phosalone	19.880	182,367	111	138	182
lambda-cyhalothrin	20.370	181	127	152	
azinphos	20.790	160,132	77		
permethrin	21.720	183	128	152	168
cyfluthrin	22.970	206,163	151	127	
cypermethrin	23.680	181	127	152	
fenvalerate	26.310	225	119	147	
deltamethrin	27.268	253	172	199	

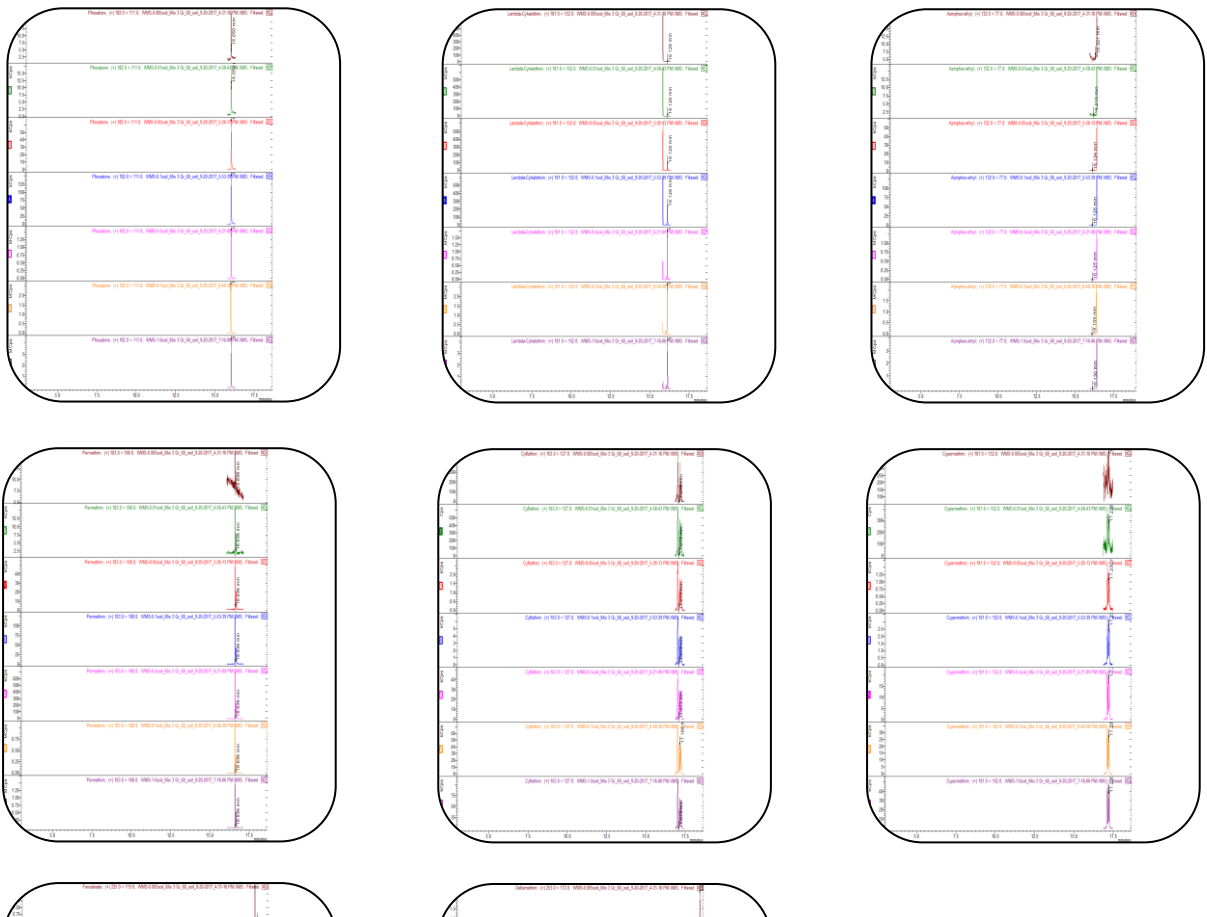




ภาพ 1 แสดง TIC ของสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
เรียงจากซ้ายไปขวา : methamidfos, dichlorvos, mevinphos, omethoate, dicrotophos, monocrotophos, dimethoate, diazinon,
parathion-methyl, pirimiphos-methyl, fenitrothion, malathion



ภาพ 1 (ต่อ) แสดง TIC ของสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 เรียงจากซ้ายไปขวา : chlorpyrifos, parathion, pirimiphos, methidathion, alpha-endosulfan, prothiophos, , profenofos,
 beta-endosulfan, ethion, triazophos, endosulfan sulfate, EPN



ภาพ 1 (ต่อ) แสดง TIC ของสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 เรียงจากซ้ายไปขวา : phosalone, lambda-cyhalothrin, azinphos, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, , fenvalerate,
 deltamethrin

8.2 ศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์

ในปีงบประมาณ 2559 งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดสารพิษตกค้าง
 ในดิน สำหรับการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต ได้แก่ dichlorvos (DDVP), methamidophos,
 mevinphos, diazinon, omethoate, dicrotophos, monocrotophos, dimethoate, pirimiphos-methyl,
 chlorpyrifos, parathion-methyl, pirimiphos, malathion, fenitrothion, parathion, prothiophos,
 methidathion, profenofos, triazophos, ethion, EPN, phosalone และ azinphos กลุ่มออร์กาโนคลอรีน
 ได้แก่ alpha endosulfan, belta endosulfan, endosulfan sulfat และกลุ่มไพรีทรอยด์ ได้แก่ lambda
 cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fs-Fenvalerate, และ deltamethrin โดยใช้แก๊สโคร
 มาโทกราฟีเทนเต็มแมสสเปกโตรเมตรี วิธีการสกัดดินจะดัดแปลงมาจากวิธีของ QuEChERS คือ โดยการชั่ง
 ตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในหลอดเซนต์ปีทิวพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอะซิโตน
 ไตรล์ 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติม 1 กรัมของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 4 กรัมของแมกนีเซียม

ซัลเฟต ($MgSO_4$) เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนต์ปีทพลาสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อให้ตัวอย่างสะอาดโดยการเติม 150 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต และ 50 มิลลิกรัมของ primary secondary amine (PSA) เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที นำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MSMS

8.3 วิเคราะห์หาช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (range / linearity)

fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานผสมระดับความเข้มข้น คือ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 0.7, และ 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำผลการวัดมาหาค่าเฉลี่ยและสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (ppm) กับการตอบสนองของเครื่อง (response) โดยใช้เครื่อง GC-MSMS และพิจารณาความเป็นเส้นตรงโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) โดยค่า r ที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับจะต้องมากกว่า 0.995 จากการลองทดสอบ พบว่า ค่า r อยู่ในช่วง 0.9950-0.9986 ระดับความเข้มข้น 0.005 – 1.0 ไมโครกรัมต่อกรัมของการวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้าง ยกเว้น methamidophos, mevinphos, omethoate, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ซึ่งยังให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ไม่ผ่านเกณฑ์

ตาราง 4 แสดงค่า range / linearity ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 32 ชนิดโดยใช้เครื่อง GC-MSMS ในตัวอย่างดิน

substances to be analyzed	range ($\mu g/g$)	r
methamidophos	0.01 – 1.0	0.9962
dichlorvos	0.05 – 1.0	0.9873
mevinphos	0.01 – 1.0	0.9945
omethoate	0.1 – 1.0	0.8758
dicrotophos	0.01 – 1.0	0.9912
monocrotophos	0.05 – 1.0	0.9583
dimethoate	0.01 – 1.0	0.9578
diazinon	0.005 – 1.0	0.9952
parathion-methyl	0.005 – 1.0	0.9953
pirimiphos- methyl	0.005 – 1.0	0.9950
fenitrothion	0.005 – 1.0	0.9973
malathion	0.005 – 1.0	0.9978
chlorpyrifos	0.005 – 1.0	0.9972

substances to be analyzed	range ($\mu\text{g/g}$)	r
parathion	0.005 – 1.0	0.9952
pirimiphos	0.005 – 1.0	0.9965
methidathion	0.005 – 1.0	0.9951
alpha-endosulfan	0.005 – 1.0	0.9742
prothiophos	0.005 – 1.0	0.9958
profenofos	0.005 – 1.0	0.9956
beta-endosulfan	0.005 – 1.0	0.9975
ethion	0.005 – 1.0	0.9959
triazophos	0.005 – 1.0	0.9951
endosulfan sulfate	0.005 – 1.0	0.9975
EPN	0.01 – 1.0	0.9962
phosalone	0.005 – 1.0	0.9965
lambda-cyhalothrin	0.005 – 1.0	0.9952
azinphos	0.01 – 1.0	0.9937
permethrin	0.005 – 1.0	0.9986
cyfluthrin	0.005 – 1.0	0.9711
cypermethrin	0.005 – 1.0	0.9969
fenvalerate	0.005 – 1.0	0.9953
deltamethrin	0.005 – 1.0	0.9981

8.4 วิเคราะห์หาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานระดับความเข้มข้นต่ำ จำนวน 10 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของความเข้มข้นที่อ่านค่าได้ คำนวณหาค่า LOD และ LOQ ได้ผลตามตาราง 5 พบว่าส่วนใหญ่ได้ค่า LOD 0.003-0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม และ LOQ 0.01-0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม ยกเว้น mevinphos, dimethoate, phosalone ได้ค่า LOD 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม และ LOQ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม methamidophos, dicrotophos, monocrotophos, alpha-Endosulfan, azinphos, และ EPN ได้ค่า LOD 0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม และ LOQ 0.07 ไมโครกรัมต่อกรัม นอกจากนั้นพบว่า omethoate ให้ค่า LOD, LOQ ที่สูง คือ 0.40 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

ตาราง 5 แสดงค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitation (LOQ) ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 32 ชนิดโดยใช้เครื่อง GC-MSMS ในตัวอย่างดิน

compounds	concentration ($\mu\text{g/g}$)	
	LOD	LOQ
methamidophos	0.003	0.01
dichlorvos	0.02	0.07
mevinphos	0.01	0.05
omethoate	0.40	1.00
dicrotophos	0.02	0.07
monocrotophos	0.02	0.07
dimethoate	0.01	0.05
diazinon	0.003	0.01
parathion-methyl	0.003	0.01
pirimiphos- methyl	0.003	0.01
fenitrothion	0.003	0.01
malathion	0.003	0.01
chlorpyrifos	0.003	0.01
parathion	0.003	0.01
pirimiphos	0.003	0.01
methidathion	0.003	0.01
alpha-endosulfan	0.02	0.07
prothiophos	0.003	0.01
profenofos	0.003	0.01
beta-endosulfan	0.003	0.01
ethion	0.003	0.01
triazophos	0.003	0.01
endosulfan sulfate	0.003	0.01
EPN	0.02	0.07
phosalone	0.01	0.05
lambda-cyhalothrin	0.003	0.01
aziphos	0.02	0.07
permethrin	0.003	0.01
cyfluthrin	0.005	0.02
cypermethrin	0.005	0.02
fenvalerate	0.005	0.02

compounds	concentration ($\mu\text{g/g}$)	
	LOD	LOQ
deltamethrin	0.003	0.01

8.5 วิเคราะห์หาค่าความแม่นยำ (accuracy)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.1, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นอย่างน้อย 7 ซ้ำที่สภาวะการทดสอบเดียวกัน ประเมิน accuracy จากค่า % recovery และนำไปเปรียบเทียบกับเกณฑ์ของ codex การยอมรับทั่วไปของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ในอาหาร ได้ผลการประเมิน accuracy จากค่า % recovery ตามตาราง 6 พบว่า ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม ได้ค่า % recoveries อยู่ในช่วง 30-120 ที่ระดับความเข้มข้นระดับกลาง 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัม ได้ค่า % recoveries อยู่ในช่วง 43-150 และที่ความเข้มข้นระดับสูง 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ได้ค่า % recoveries อยู่ในช่วง 70-112 ตามลำดับ ยกเว้น omethoate ไม่สามารถหาค่าความแม่นยำได้ เนื่องจากเครื่อง GC-MSMS ไม่สามารถตรวจวัดได้

ตาราง 6 แสดงค่า % recovery ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 32 ชนิดโดยใช้เครื่อง GC-MSMS ในตัวอย่างดิน

compounds	% recoveries (n=10)		
	0.01 $\mu\text{g/g}$	0.10 $\mu\text{g/g}$	1.00 $\mu\text{g/g}$
methamidophos	50-60	65-94	74-99
dichlorvos	40-50	62-68	61-72
mevinphos	70-80	73-90	92-111
omethoate	0	0	0
dicrotophos	30-61	35-58	104-110
monocrotophos	40-60	43-66	67-72
dimethoate	40-60	110-150	83-120
diazinon	60-70	70-85	84-97
parathion-methyl	60-70	59-79	76-97
pirimiphos- methyl	70-80	71-80	84-100
fenitrothion	50-60	74-77	84-97
malathion	50-60	57-68	82-99
chlorpyrifos	60-100	75-102	89-99
parathion	60-70	69-76	76-97

compounds	% recoveries (n=10)		
	0.01 µg/g	0.10 µg/g	1.00 µg/g
pirimiphos	60-70	69-80	72-98
methidathion	40-60	55-78	76-94
alpha-endosulfan	40-120	52-78	64-115
prothiophos	60-80	68-77	89-99
profenofos	60-70	62-74	69-104
beta-endosulfan	60-120	79-91	102-113
ethion	40-50	68-76	87-100
triazophos	50-60	60-80	86-106
endosulfan sulfate	70-80	83-95	108-120
EPN	50-60	57-64	91-101
phosalone	40-50	55-72	70-75
lambda-cyhalothrin	60-80	51-68	74-95
azinphos	50-60	56-68	85-112
permethrin	60-100	66-90	74-110
cyfluthrin	103-134	105-136	123-154
cypermethrin	60-100	60-73	89-95
fenvalerate	50-118	68-79	85-97
deltamethrin	50-70	48-65	70-88

8.6 วิเคราะห์หาค่าความเที่ยง (precision)

โดย fortified sample blank ทดสอบสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงใช้งาน คือ 0.01, 0.30, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม ความเข้มข้นอย่างน้อย 7 ซ้ำ ประเมิน precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz's ratio) จากตาราง 6 พบว่า ส่วนใหญ่ให้ค่า HORRAT < 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ ยกเว้น methamidophos, mevinphos, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ให้ค่า HORRAT > 2 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 0.30 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามตาราง 7

ตาราง 7 แสดงค่า Precision ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 32 ชนิดโดยใช้เครื่อง GC-MSMS ในตัวอย่างดิน

Compounds	Concentration (n=6-7)		
	0.01 µg/g	0.30 µg/g	1.00 µg/g

	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT
methamidophos	40-60	0.5	62-91	0.7	74-99	0.4
dichlorvos	40-50	2.1	70-76	0.9	61-72	0.9
mevinphos	60-80	2.2	73-90	0.7	92-111	0.8
omethoate	0	0	0	0	0	0
dicrotophos	30-61	2.5	35-58	2.3	104-110	1.6
monocrotophos	30-60	2.2	33-68	1.4	67-72	1.7
dimethoate	40-60	2.3	110-120	1.7	83-100	1.5
diazinon	60-80	1.6	70-85	0.3	84-97	0.2
parathion-methyl	60-80	1.7	68-82	0.4	76-97	0.5
pirimiphos- methyl	60-80	1.6	76-88	1.3	74-86	1.5
fenitrothion	60-70	1.8	67-72	0.7	82-110	0.7
malathion	50-60	1.4	60-87	0.6	72-89	0.4
chlorpyrifos	60-100	1.7	73-108	1.2	89-110	1.1
parathion	60-70	1.2	61-74	1.1	72-79	0.8
pirimiphos	60-70	1.2	70-88	1.2	70-110	2.0
methidathion	40-60	1.5	60-78	1.2	76-94	0.6
alpha-endosulfan	60-120	2.4	60-120	2.2	74-112	1.8
prothiophos	60-80	0.8	72-79	0.3	79-99	0.5
profenofos	60-70	0.5	60-75	1.3	69-104	0.9
beta-endosulfan	70-110	1.3	73-87	1.1	102-113	0.8
ethion	50-60	1.5	75-84	0.4	87-100	0.4
triazophos	50-60	1.3	60-80	1.2	76-110	0.9
endosulfan sulfate	70-120	0.8	83-95	0.5	88-109	0.4
EPN	50-60	2.3	57-64	1.8	65-76	1.9
phosalone	40-50	0.9	60-72	0.4	70-75	0.5
lambda-cyhalothrin	60-80	0.8	73-86	0.5	74-95	0.4
azinphos	50-60	2.0	50-67	2.2	85-112	1.8
permethrin	60-100	0.7	76-90	0.5	74-110	0.3
cyfluthrin	50-74	2.1	65-128	1.8	68-122	1.5
cypermethrin	65-100	1.2	60-78	1.3	74-91	0.8
fenvalerate	50-118	1.8	69-85	1.2	75-85	0.9

Compounds	Concentration (n=6-7)					
	0.01 µg/g		0.30 µg/g		1.00 µg/g	
	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT	% recoveries	HORRAT
deltamethrin	50-70	1.9	50-78	1.8	74-82	1.0

9 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วิธีการ QuEChERS (Quick, Easy Cheap, Effective Rugged and safe) เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่รวดเร็วใช้สารเคมีและเครื่องมือที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนสามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลายชนิด (multiresidue method) และเป็นวิธีมาตรฐาน โดยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และในต่างประเทศมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ได้นำมาทดสอบเพื่อปรับให้เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดิน โดยการชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ในหลอดเซนติฟิวลัสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติม 1 กรัมของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และ 4 กรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄) เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที และนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดสารละลายชั้นบน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนติฟิวลัสติกแบบมีฝาปิด ขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อให้ตัวอย่างสะอาดโดยการเติม 150 มิลลิกรัมของแมกนีเซียมซัลเฟต และ 50 มิลลิกรัมของ primary secondary amine (PSA) เขย่าด้วยมือ 1 นาที เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) 1 นาที นำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 4,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ในขวดตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MSMS

มีการศึกษาคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัส ออร์แกโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ ในดิน คือ ตรวจสอบช่วงการใช้งาน ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ซีดจำกัดในการตรวจพบ ซีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความเที่ยง ภายใต้เงื่อนไขของวิธีที่พัฒนาพบว่าช่วงการใช้งานมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดี คือ ช่วง 0.005-1.0 ไมโครกรัมต่อกรัม ให้ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 ยกเว้น methamidophos, mevinphos, omethoate, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ซึ่งยังให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ไม่ผ่านเกณฑ์ ซีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) มีค่าอยู่ในช่วง 0.003-0.005 ไมโครกรัมต่อกรัม ซีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าอยู่ในช่วง 0.01-0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม ยกเว้น mevinphos, dimethoate, phosalone ได้ค่า LOD 0. ไมโครกรัมต่อกรัม และ LOQ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม methamidophos, dicrotophos, monocrotophos, alpha-endosulfan, azinphos, และ EPN ได้ค่า LOD 0.02 ไมโครกรัมต่อกรัม และ LOQ 0.07 ไมโครกรัมต่อกรัม นอกจากนี้พบว่า omethoate ให้ค่า LOD, LOQ ที่สูง คือ 0.40 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 1.00 ไมโครกรัมต่อกรัม การหาค่าความแม่นยำให้ค่าการนำกลับคืนมาทุกสารพิษตกค้างที่ความเข้มข้นระดับต่ำมีค่าอยู่ในช่วง 43-

150%, ที่ความเข้มข้นระดับกลางให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 43-150%, และที่ความเข้มข้นระดับสูงให้ค่าการนำกลับคืนมาอยู่ในช่วง 70-112% ความเที่ยงโดยใช้ HORRAT ประเมินค่าอยู่ในช่วง 0.2-1.9 ยกเว้น methamidophos, mevinphos, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ให้ค่า HORRAT > 2 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 0.30 ไมโครกรัมต่อกรัม

10. ข้อเสนอแนะ

วิธีที่ใช้เตรียมตัวอย่างดินข้างต้น ยังไม่เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์สาร methamidophos, mevinphos, omethoate, dicrotophos monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos และ cyfluthrin ซึ่งจำเป็นต้องปรับวิธี และปรับสภาพเครื่อง GC-MSMS ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ให้เหมาะสมต่อไป

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน ของกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.2 เพื่อนำไปใช้ในการให้บริการการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ออร์กาโนคลอรีน และไพรีทรอยด์ในตัวอย่างดิน

10.2 ใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 โดยจะต้องนำวิธีตรวจวิเคราะห์ไปทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี และทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการก่อนจะขอการรับรอง

12. เอกสารอ้างอิง

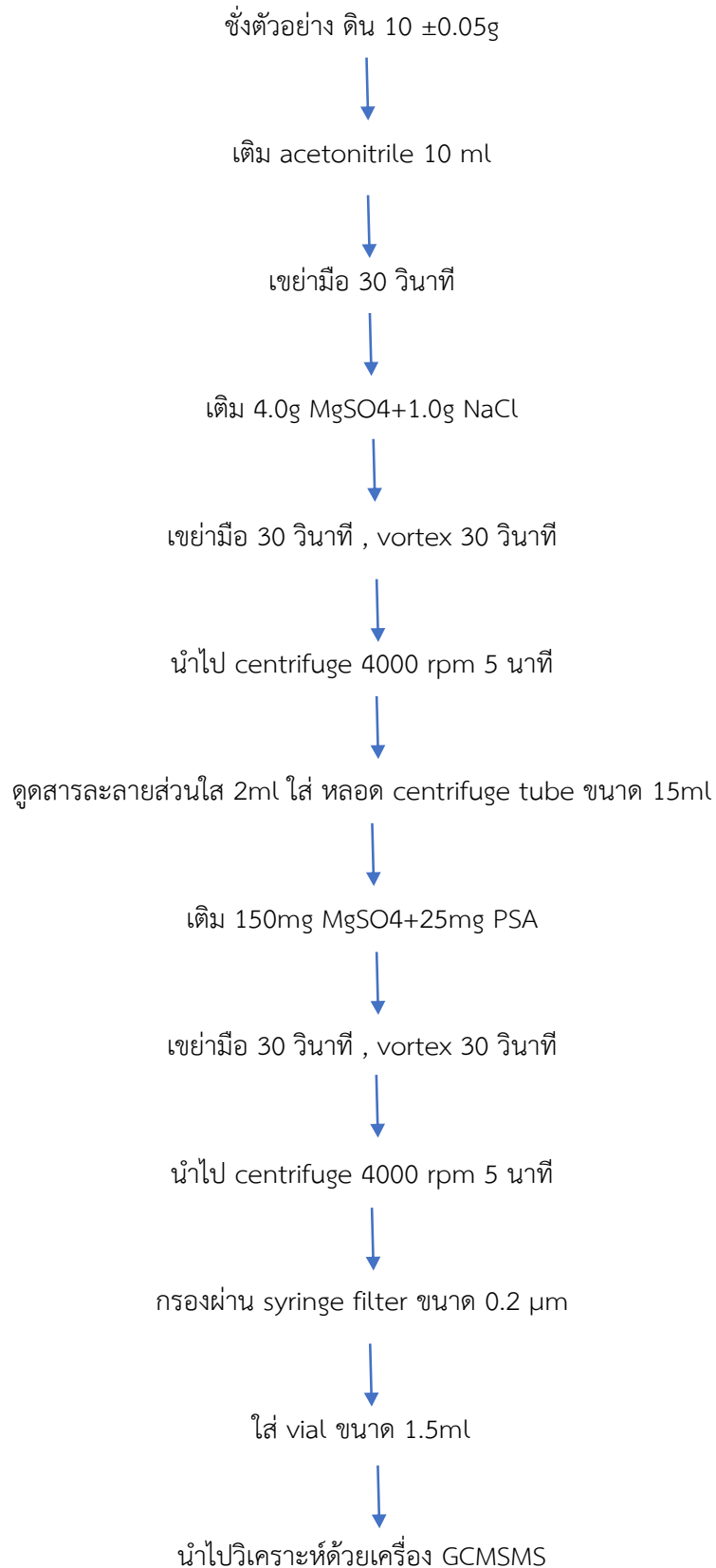
- กองวัตถุมีพิษ. 2544. ความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างทางวัตถุมีพิษการเกษตร. เอกสารวิชาการประกอบการบรรยายในการฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8, 14 – 19 มีนาคม. กรมวิชาการเกษตร.
- ปรีดา พากเพียร ประพิศ แสงทอง และพิชิต พงษ์สกุล, 2547, การปนเปื้อนของโลหะหนักในดินและพืชอาหารในประเทศไทย, วารสารดินและปุ๋ย. 26:31-36
- พิชิจ พงษ์สกุล และสุรสิทธิ์ อรรถจารุสิทธิ์, 2542, การประเมินความปนเปื้อนของธาตุในโลหะหนักในดิน, วารสารดินและปุ๋ย. 21:71-82
- ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549, แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี โดยห้องปฏิบัติการเดียว, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- Anastassiades M., S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F.J. Schenk,. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction

for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86: 412–431.

Codex. 1999. Recommended Methods of Sampling for The Determination of Pesticide Residues for compliance with MRLs (CAC/GL 33). 18 p.

EURACHEM Guide, 1998, The Fitness for Purpose of Analytical Methods ; A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 1st ed., Available from internet :<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>, cited Jan. 2013

13. ภาคผนวก



ภาพผนวก 1 วิธีการสกัดตัวอย่างดินที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ QuEChERS (2007)