

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชื่อชุดโครงการ วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. ชื่อโครงการ วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
Research and Development on Analytical System of Agricultural
Production Inputs.
- กิจกรรมที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ
3. ชื่อการทดลอง การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิมในพริกและลำไยด้วย
LCMSMS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.1
Method Validation of Pesticide Residues, Carbendazim in Chilli and
Longan with LCMSMS by Laboratory of DOA1

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางนงพงา โอลเสน	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1
ผู้ร่วมงาน	นางเนาวรัตน์ ตั้งมันคงวรกุล	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

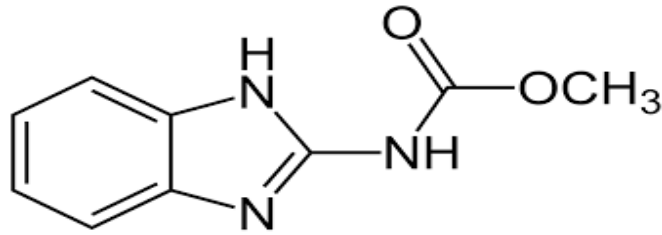
5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริกด้วยเอทิล อะซิเตดในการสกัด และตรวจวัดด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (LCMSMS) เป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ง่าย ประหยัด มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และปลอดภัย พบว่า เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง (specificity) มีความเป็นเส้นตรง (linearity) ค่า $R = 0.999$ ช่วงของการวัดระหว่าง 0.01-0.2 mg/kg LOD ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg Accuracy Precision ความคงทน (ruggedness) ตรวจสอบจากค่า HORRAT ≤ 2 ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน นำไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้

Abstract

Method Validation of Carbendazim in longan and chilli with ethyl acetate by LCMSMS is quick, easy, cheap, effective accurate and safe. The method was proved in many parameters to comply with procedure of validation such as specificity, linearity with $R = 0.999$, range between 0.01 and 0.2 mg/kg, LOD at concentration 0.005 mg/kg, LOQ at concentration 0.01 mg/kg which accuracy, precision and ruggedness have HORRAT ≤ 2 . The validated method can apply for carbendazim analysis in chilli and longan in laboratory.

6. คำนำ



สูตรโครงสร้างของคาร์เบนดาซิม

คาร์เบนดาซิม ชื่อทางเคมี Methyl benzimidazol-2-yl-carbamate มีสูตรโมเลกุล $C_9H_9N_3O_2$ เป็นสารอันตรายเมื่อถูกผิวหนัง ระคายเคืองต่อตา ระบบทางเดินหายใจและผิวหนัง และเป็นสารที่อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Chemtrack.org ,2563) ที่มีกลไกการออกฤทธิ์คือ สารคาร์เบนดาซิมจะไปยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยขัดขวาง หรือทำลายการแบ่งตัวของเซลล์ระหว่างการสืบพันธุ์ ใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชเช่นโรคแอนแทรคโนส โรคราดำ โรคราแป้ง โรคใบจุด โรคใบไหม้ ซึ่งมีการใช้ทั่วไปทั้งในพืชผัก ไม้ผล สนามหญ้าและสนามกอล์ฟ

ลำไยเป็นไม้ผลที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกของไทยโดยมีการส่งออกในปี 2562 จำนวน 583,297,110 กิโลกรัม มูลค่า 20,811,680,485 บาท โดยมีประเทศจีนเป็นคู่ค้าอันดับ 1 (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร,2563) การใช้คาร์เบนดาซิมในลำไยนิยมใช้หลังการเก็บเกี่ยวเพื่อป้องกันโรคพืชก่อนการส่งออก

พริกเป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย และเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการปรุงอาหารไทยเกือบทุกชนิด พริกมักมีโรคและแมลงศัตรูพืชรบกวนมากมาย ทำให้ผลผลิตลดลง ต้นแคระแกรนหรือตาย การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่ถูกต้อง ก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชผลผลิตในผลผลิตพริก ทำให้ผู้บริโภคขาดความมั่นใจในความปลอดภัย และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้า การวิเคราะห์สารตกค้างคาร์เบนดาซิมในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ต่างๆ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสม ประสิทธิภาพในการตรวจวัดจากเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ค่า MRLของคาร์เบนดาซิมในลำไยไม่มีการระบุแต่ใช้ค่าดีฟอลต์ที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและพริกกำหนดไว้ที่ 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (มกษ.9002-2559)

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ได้แก่ การตรวจหาโดยการเปลี่ยนสีของสาร (colorimetric) เป็นการใส่สารไปทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์เพื่อให้เกิดสีได้ วิธีนี้สามารถใช้ในภาคสนามได้ในรูปแบบของชุดน้ำยา เช่น ชุดน้ำยาตรวจสอบยาฆ่าแมลง/สารพิษตกค้าง "จีที" (GT-Pesticide residual test kit) มีข้อเสียคือไม่สามารถระบุชนิดหรือปริมาณของสารได้

การแบ่งส่วนด้วยของเหลว (liquid-liquid partition) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับสกัดสารที่อยู่ในเมทริกซ์ที่มีความแตกต่างของความมีขี้ ในการสกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชวิธี multi-residues สารละลายที่ใช้กันแพร่หลาย เช่น อะซิโตน และอะซิโตนไนไตรล์ ข้อดีของอะซิโตนไนไตรล์ คือ กำจัดไขมันและแว็กซ์ที่อยู่ในเมทริกซ์ของพืชได้ดี แต่ข้อเสียคือมีความพิษสูงและราคาแพง ส่วนอะซิโตนสามารถละลายสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้

หลายชนิด แต่มีจุดเดือดต่ำ (56.5 องศาเซลเซียส) และทำให้เกิดความผิดพลาดเชิงปริมาณ (J.Takel and S.Hatrik, 1996)

การสกัดด้วยของแข็ง (solid phase extraction) เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทำให้สารบริสุทธิ์และลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวดูดซับที่ใช้กัน เช่น non-polar octadecyl (C18) primary secondary amine (PSA) และ aminopropyl (NH₂) เป็นต้น การสกัดด้วยของแข็งสำหรับสกัดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชมักทำใน normal phase mode

วิธีการสกัดด้วยเอทิล อะซิเตด ร่วมกับLCMSMS ถูกพัฒนาขึ้นโดยห้องปฏิบัติการในสวีเดนและได้รับการรับรองให้เป็นวิธีวิเคราะห์โดย EURL (European Union Reference Laboratories for Residues of Pesticides.) ซึ่งสามารถวิเคราะห์สารตกค้างได้มากกว่า 169 ชนิด ด้วย GCMSMS และ LCMSMS (EURL-FV, 2013) เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่สามารถปฏิบัติตามกระบวนการตามวิธีมาตรฐานได้ทั้งหมด ดังนั้นทางห้องปฏิบัติการจึงดัดแปลงวิธีทดสอบจากวิธีมาตรฐาน เพื่อให้วิธีที่ทางห้องปฏิบัติการดัดแปลงความเหมาะสมต่อการใช้งาน จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบตามหลักเกณฑ์ของมาตรฐานสากล สามารถยืนยันความถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ (ดุขภูและอุมาพร, 2544) โดยการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อกำหนดตามมาตรฐาน ISO/IEC17025:2017 จะต้องมีการทดสอบ Range, Linearity, Precision, Accuracy, Robustness, Ruggedness, Specificity และSelectivity (กนกพรและทิพวรรณ, 2547)

ดังนั้น เพื่อให้ได้วิธีการที่เป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริก สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จึงทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเอทิล อะซิเตดในพริกและลำไยโดยเครื่องLCMSMS เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการขยายขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 นอกจากนี้ยังเป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการให้ได้ตามมาตรฐานสากล มีผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้

7. วิธีดำเนินการ

7.1 สารเคมี

- 7.1.1 สารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม Purity ไม่ต่ำกว่า 90%
- 7.1.2 Ethyl acetate (Pesticide Grade, PR)
- 7.1.3 Sodium sulfate (Anhydrous, Granular) เเผาที่ 450 °C นาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 130 °C ก่อนใช้ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน Desiccator
- 7.1.4 Sodium hydrogen carbonate (Analytical Grade)

7.2 อุปกรณ์

- 7.2.1 เครื่องลิกวิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (LC/MS/MS) แบบ QQQ
- 7.2.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 7.2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง
- 7.2.4 เครื่องบดตัวอย่าง
- 7.2.5 ปีเปตต์ ขนาด 1-10 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร

- 7.2.6 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (dispenser) ขนาด 10-50 มิลลิลิตร
- 7.2.7 หลอดสำหรับใช้กับเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 7.2.8 filtered vial ชนิด PTFE ขนาด 0.02 ไมครอน

7.3 การเตรียมสารเคมี

7.3.1 การเตรียมสารมาตรฐาน ใช้ตัวทำละลาย PR หรือ HPLC grade สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสเปกโตรเมตรี (LC/MS/MS) เตรียมสารมาตรฐานเสร็จแล้วให้ขีดเส้นระบุปริมาตรของสารละลาย ติดฉลากระบุชื่อสาร batch number ความเข้มข้น วันที่เตรียม ชื่อผู้เตรียม ตัวทำละลายที่ใช้ และวันหมดอายุ เก็บที่อุณหภูมิ -15 ± 5 องศาเซลเซียส

7.3.1.1 Stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร

ชั่งสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิมที่เป็น primary standard ให้ได้น้ำหนักเนื้อสาร 10 mg โดยประมาณใส่ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) ลงในขวดวัดปริมาตรที่ละน้อยแล้วเขย่าจน primary standard ละลายหมด จากนั้นเติมเอทิลอะซิเตตจนถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายใส่ขวดฝาเกลียวและปิดฝาให้แน่น

7.3.1.2 Intermediate standard solution ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร

ใช้ปิเปตดูด stock standard solution ในปริมาณที่คำนวณ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทิลอะซิเตต เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายใส่ขวดฝาเกลียวและปิดฝาให้แน่น

7.3.1.3 Calibration curve แบบ matrix-matched calibration standard

7.3.1.4.1 เตรียม matrix solution โดยสกัดตัวอย่าง sample blank ที่ปราศจากสารตกค้างตามขั้นตอนการสกัด ข้อ 7.4.2

7.3.1.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานคาร์เบนดาซิมที่ความเข้มข้น 0.005 0.01 0.02 0.05 0.1 0.2 และ 0.5 ppm ในสารละลายตัวอย่างที่สกัด โดยปิเปต Intermediate standard solution ในปริมาณที่คำนวณตามสูตรการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ในภาคผนวก) ใส่ลงในขวด เติม matrix solution จนมีปริมาตรที่ต้องการ ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน

7.4 วิธีการทดสอบ

7.4.1 การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

ลำไย นำตัวอย่างแกะเอาก้านใบและเมล็ดออก บดให้ละเอียดทั้งเปลือก
พริก นำตัวอย่างแกะเอาก้านและใบออก บดให้ละเอียด

7.4.2 การการสกัดตัวอย่าง

7.4.2.1 ชั่งตัวอย่างลำไยหรือพริกบดละเอียดหนัก 10.000 ± 0.01 กรัม ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง ใส่ลงในหลอดสำหรับใช้กับเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

7.4.2.2 เติม เอทิล อะซิเตต 20 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่น เขย่าด้วยมือแรงๆ ประมาณ 1 นาที

7.4.2.3 เติม 3 g NaHCO₃ และ 10 g Na₂SO₄ เขย่า 30 วินาที นำไปเข้าเครื่องล้างความถี่สูง Ultrasonic bath 3 นาทีอุณหภูมิไม่เกิน 35°C

7.4.2.4 นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge ความเร็วรอบ 3,200rpm นาน 3 นาที

7.4.2.5 ดูดสารละลายส่วนใสในข้อ 7.4.2.3 ใส่ลงใน filtered vial ชนิด PTFE 0.2 ไมครอน ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์

7.4.3 การทดสอบด้วยเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (LC/MS/MS) แบบ QQQ ตั้งค่าสถานะของเครื่องดังนี้

7.4.3.1 สถานะของ UHPLC : Agilent Technologies 1290 infinity II UHPLC

Column : Agilent Poroshell 120 EC -C18, 3.0 x 150mm. 2.7 ไมครอน, ที่ 30°C

Mobile phase A : 5 mM ammonium formate +0.1% formic acid in water

Mobile phase B : 5 mM ammonium formate +0.1% formic acid in Methanol

Flow rate : 0.500 mL/min

Gradient :	Time	A	B
	0.50 min	95.00 %	5.00 %
	3.50 min	50.00 %	50.00 %
	17.00 min	0.00 %	100.00 %
	20.00 min	0.00 %	100.00 %

Stop time : 20.00 min Post time : 3.00 min

Injection Volume : 2.00 µL

7.4.3.2 สถานะของ MS : 6495 QQQ

Ionization : Positive/Negative switching

Gas Temp (°C) 120 Gas Flow (l/min) 16

SheathGasHeater 375 SheathGasFlow 11

Nebulizer (psi) 45

Capillary (V) 3500 (positive)/3000(negative)

Precursor Ion และ Product Ion (ภาคผนวก)

7.4.4 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์ ทำการทดสอบสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิมด้วยลิควิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ (LC/MS/MS) โดยทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆได้แก่ ช่วงของการวัด (range), ความเป็นเส้นตรง (linearity), ความแม่นยำ (accuracy), ความเที่ยง (precision), ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD), ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ), ความจำเพาะเจาะจง (specificity), ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness), คุณสมบัตินี้ของ Reproducibility ของการทดสอบภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness) โดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ

เวลาและสถานที่ ดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม 2561–กันยายน 2562 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.1

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีในการวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริก

ในการทดลองได้มีการทดสอบ 9 พารามิเตอร์ในลำไยและพริกด้วยวิธีการสกัดของ EURL-FV:2013 คือ ช่วงของการวัด (range) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ความแม่นยำ (accuracy) ความเที่ยง (precision) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness) คุณสมบัติของ Reproducibility ของการทดสอบภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness) โดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ

8.1 การทดสอบช่วงของการวัด (range)

จากการทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 9 ระดับของสาร คือ 0.005 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 , 0.5 ,1.0 และ 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบช่วงของการวัด (range)

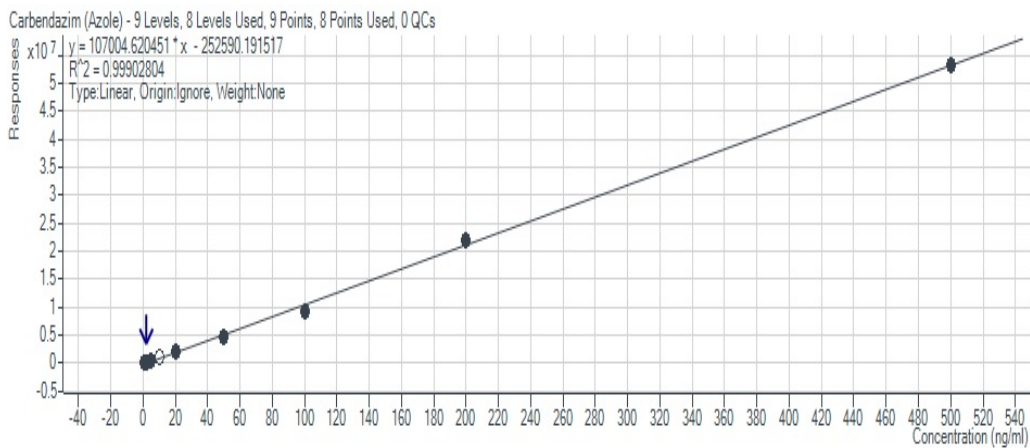
ความเข้มข้น มิลลิกรัม/กิโลกรัม	Peak area	Level
0.005	2,527,533.57	1
0.01	4,941,247.39	2
0.02	11,012,254.25	3
0.05	26,805,306.54	4
0.1	45,855,219.65	5
0.2	66,144,107.58	6
0.5	139,081,939.78	7
1.0	198,546,125.25	8
2.0	354,254,635.85	9

8.2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

เมื่อทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของสารมาตรฐานคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น คำนวณค่า correlation coefficient (r) = 0.999 ผลการทดสอบดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1

ตารางที่ 2 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

ความเข้มข้น (mg/kg)	Peak area	Level
0.01	4,415,254.	1
0.02	9,457,210	2
0.05	24,254,300	3
0.1	45,200,150	4
0.2	70,214,620	5
0.5	139,000,240	6



ภาพที่1 การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

8.3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

เมื่อใช้ fortified sample ที่มีปริมาณสาร 3 ระดับ คือ ในช่วง 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ เพื่อประเมิน accuracy จาก % recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method ที่ความเข้มข้น 0.005-0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม %recovery จะเท่ากับ 60-115% และที่ 0.1-0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม % recovery จะเท่ากับ 80-110 % ผลการทดสอบดังตารางที่ 3 ซึ่ง % recovery ที่ทำการทดสอบอยู่ในเกณฑ์

ตารางที่ 3 การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) แสดงค่า% recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ซ้ำที่	ลำไย			พริก		
	0.01	0.10	0.50	0.01	0.10	0.50
1	71.04	94.59	98.10	85.04	98.12	100.90
2	77.03	95.67	97.59	102.46	100.59	102.39
3	78.71	96.79	99.22	102.96	102.92	98.42
4	94.43	98.25	98.89	74.43	103.67	102.89

5	102.23	98.49	101.65	114.51	103.99	105.65
6	103.16	100.59	98.34	88.91	107.35	102.34
7	104.87	102.25	99.70	114.87	107.79	103.70
8	104.96	102.92	97.53	115.16	107.90	101.53
9	106.51	104.31	100.04	75.03	108.19	96.04
10	108.91	104.73	100.79	78.07	110.91	101.59
Mean	86.53	90.79	90.22	86.50	95.59	92.36

8.4 การทดสอบความเที่ยง (precision)

เมื่อใช้ fortified sample ที่มีปริมาณสาร 3 ระดับในช่วง 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993 (ภาคผนวก) ผลการทดสอบดังตารางที่ 4 เป็นไปตามเกณฑ์ ผลการทดสอบระหว่างลำไยและพริกที่ความเข้มข้นเท่ากัน มีความเบี่ยงเบนแตกต่างกันเนื่องจากชนิดของตัวอย่าง (matrix) ซึ่งจำเป็นในการเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทำ calibration curve ให้เหมาะสม

ตารางที่ 4 การทดสอบความเที่ยง แสดงผลการวิเคราะห์ % RSD และ HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ซ้ำที่	ลำไย			พริก		
	0.01	0.10	0.50	0.01	0.10	0.50
1	7.10	94.59	490.49	8.50	98.12	504.49
2	7.70	95.67	487.97	10.25	100.59	511.97
3	7.87	96.79	496.10	10.30	102.92	492.10
4	9.44	98.25	494.47	7.44	103.67	514.47
5	10.22	98.49	508.27	11.45	103.99	528.27
6	10.32	100.59	491.72	8.89	107.35	511.72
7	10.49	102.25	498.51	11.49	107.79	518.51
8	10.50	102.92	487.63	11.52	107.90	507.63
9	10.65	104.31	500.22	7.50	108.19	480.22
10	10.89	104.73	503.97	7.81	110.91	507.97

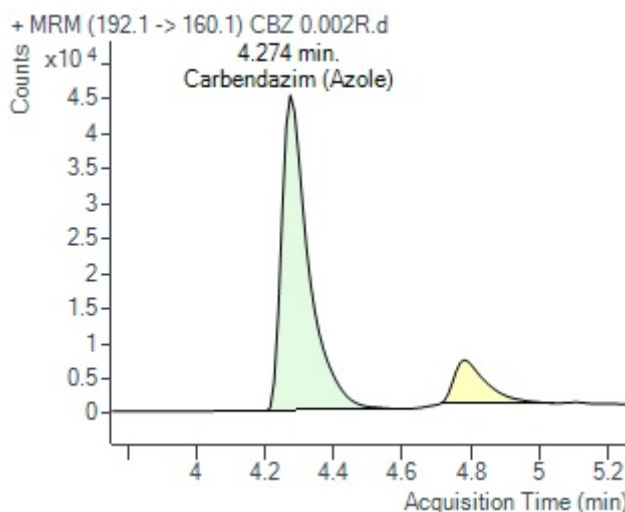
Mean	9.51852	99.8589	495.937	9.51438	105.144	507.737
SD	1.4156	3.62531	6.86156	1.68173	3.95104	13.4534
RSD	0.14872	0.0363	0.01384	0.17676	0.03758	0.0265
%RSD	14.8721	3.63043	1.38356	17.6757	3.75776	2.64969
HORRAT	0.70417	0.2431	0.11804	0.83692	0.25162	0.22606

8.5 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และ การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

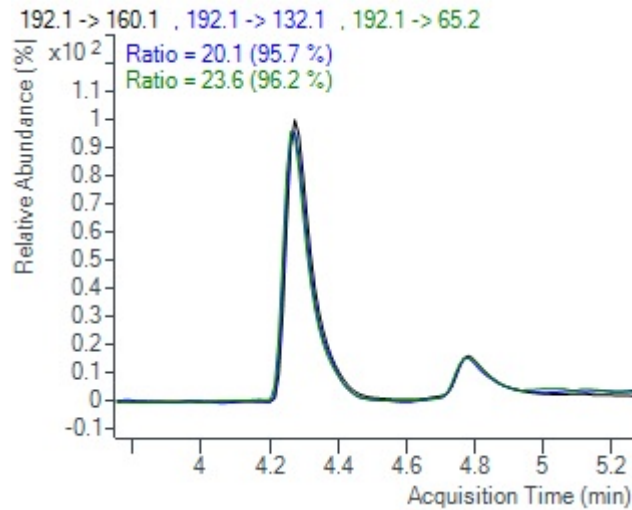
จากการวิเคราะห์ fortified samples 10 ซ้ำที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถแสดงค่าได้เพื่อทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) พบว่า ค่า LOD ของสารคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริกอยู่ที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ จากการวิเคราะห์ fortified samples 10 ซ้ำที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถแสดงค่าและมีความถูกต้อง แม่นยำ การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ของสารคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริกอยู่ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

8.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

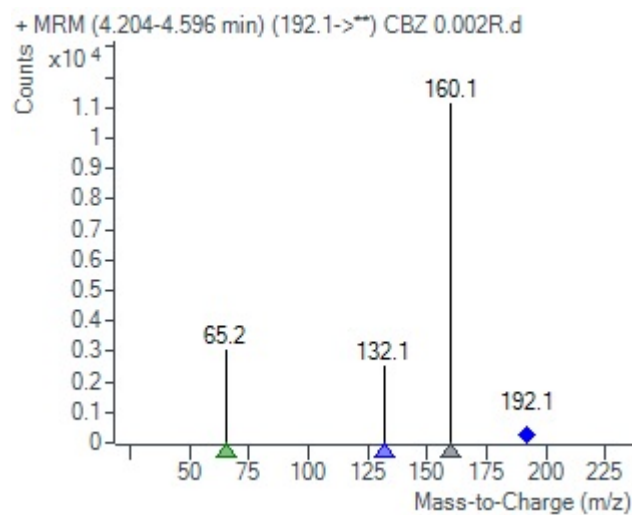
เมื่อฉีดสารมาตรฐานในเครื่อง LCMSMS พบว่า สารคาร์เบนดาซิมให้ precursor ion และ product ion ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสารนั้น เช่น ที่ 4.274 นาที แตกตัวให้อิออนที่มี m/z เท่ากับ 192.1 เมื่อนำ m/z เท่ากับ 192.1 ไปแตกไอออนต่อได้ m/z เท่ากับ 132.1 และ 65.2 ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง



ภาพที่ 2 Retention Time ของสารคาร์เบนดาซิม ที่เวลา 4.274 นาที



ภาพที่ 3 การแตกตัวของไอออน 192.1 ไปเป็น 132.1 และ 65.2



ภาพที่ 4 สเปกตรัมของการแตกตัวของไอออน 192.1 ไปเป็น 132.1 และ 65.2

8.7 การทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness)

จากการวิเคราะห์ fortified samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์เดิมกับวิธีวิเคราะห์ที่เปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการหมუნเหวียงครั้งแรกจาก 3 นาที เป็น 5 นาที และประเมิน HORRAT ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 5

ในการทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า การเปลี่ยนแปลงเวลาที่ใช้ในการหมუნเหวียงครั้งแรกจาก 3 นาที เป็น 5 นาที ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าผลวิเคราะห์ของตัวอย่างจาก % RSD และ HORRAT ที่ได้จากการเปลี่ยนเวลาที่ใช้ในการหมუნเหวียงครั้งแรกจาก 3 นาที เป็น 5 นาที ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ซ้ำ	ลำไย		พริก	
	3 นาที	5 นาที	3 นาที	5 นาที
1	7.1043	8.4543	8.5043	9.4043
2	7.7026	9.4417	10.2457	9.8574
3	7.8715	9.4960	10.2960	8.9988
4	9.4432	9.8732	7.4432	8.5188
5	10.2232	10.6507	11.4507	11.4507
6	10.3161	9.8906	8.8906	8.9569
7	10.4872	9.8772	11.4872	10.3187
8	10.4960	9.4611	11.5161	11.2093
9	10.6507	9.2259	7.5026	9.5589
10	10.8906	8.9148	7.8075	8.6748
Mean	9.5185	9.5285	9.5144	9.6948
SD	1.4156	0.6024	1.6817	1.0191
RSD	0.1487	0.0632	0.1768	0.1051
%RSD	14.8721	6.3222	17.6757	10.5122
HORRAT	0.7042	0.2993	0.8369	0.4977

8.8 การทดสอบคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ (ruggedness)

จากการวิเคราะห์ fortified samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 10 ซ้ำ โดยเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ และประเมิน HORRAT ผลวิเคราะห์ดังตารางที่ 5

ในทดสอบคุณสมบัติของ reproducibility ของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า การเปลี่ยนผู้วิเคราะห์ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของผลการวิเคราะห์

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบค่าของผลการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.01 จากผู้วิเคราะห์ 2 คน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ซ้ำ	ลำไย		พริก	
	ผู้วิเคราะห์ที่ 1	ผู้วิเคราะห์ที่ 2	ผู้วิเคราะห์ที่ 1	ผู้วิเคราะห์ที่ 2
	1	7.1043	8.1043	8.5043
2	7.7026	9.2232	10.2457	8.9457
3	7.8715	10.4960	10.2960	9.8883
4	9.4432	9.4432	7.4432	9.5188
5	10.2232	9.6507	11.4507	11.2067
6	10.3161	10.8906	8.8906	9.2687
7	10.4872	9.4872	11.4872	10.4703
8	10.4960	10.3161	11.5161	10.9347
9	10.6507	8.7026	7.5026	10.5589
10	10.8906	8.8715	7.8075	9.2748
Mean	9.5185	9.5185	9.5144	9.9171
SD	1.4156	0.8609	1.6817	0.8174
RSD	0.1487	0.0904	0.1768	0.0824
%RSD	14.8721	9.0443	17.6757	8.2421
HORRAT	0.7042	0.4282	0.8369	0.3903

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริก

1. ช่วงการวัด Range ด้วยเครื่อง อยู่ระหว่าง 0.005- 2.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม
2. ช่วงความเป็นเส้นตรง จากการการวัดด้วยเครื่อง 0.005-0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ค่า correlation coefficient =0.999
3. ตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy) โดยพิจารณาจาก % recovery ในพริกที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อยู่ในช่วง 74 - 115, 98 -110 และ 96-105 ตามลำดับ ในลำไยที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าอยู่ในช่วง 71 -108, 94 -104 และ 97 -101 ตามลำดับ
4. Precision ประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.10, และ 0.50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในพริกพบว่า %RSD อยู่ในช่วง 2.6496-17.6757 และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.226 – 0.8369 ในลำไย %RSD อยู่ในช่วง 1.3835 – 14.8721 และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.118 – 0.704

5.หาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) 0.005 มก./กก.

6. หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) 0.01 มก./กก.

7. ทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) สามารถแยกพีคของคาร์เบนดาซิมออกจากสารอื่นอย่างชัดเจน มี Retention time 4.274 นาที แยกตัวให้อิออนที่มี m/z เท่ากับ 192.1เมื่อนำ m/z เท่ากับ 192.1 ไปแตกไอออนต่อได้ m/z เท่ากับ 132.1 และ 65.2

8. ทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะของการทดสอบ (robustness) ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการเพิ่มระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยงจาก 3 นาทีเป็น 5 นาที นำผลมาเปรียบเทียบกัน

ในลำไย วิธีปกติ 3 นาที ค่า HORRAT= 0.7042 เพิ่มเวลาเป็น 5 นาที ค่า HORRAT= 0.2993

ในพริก วิธีปกติ 3 นาที ค่า HORRAT= 0.8369 เพิ่มเวลาเป็น 5 นาที ค่า HORRAT= 0.4977

9. ทดสอบความคงทนของการทดสอบ ภายใต้สภาวะการทดสอบปกติ โดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ (ruggedness) ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

ในลำไย ผู้ทดสอบคนที่ 1 ค่า HORRAT= 0.7042 ผู้ทดสอบคนที่ 2 ค่า HORRAT= 0.4282

ในพริก ผู้ทดสอบคนที่ 1 ค่า HORRAT= 0.8369 ผู้ทดสอบคนที่ 2 ค่า HORRAT= 0.3903

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างคาร์เบนดาซิมในลำไยและพริกโดยใช้เครื่องลิวิดโครมาโตกราฟีชนิดแมสสปีคเตเตอร์ LCMSMS มีค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบผ่านเกณฑ์สามารถนำวิธีการทดสอบนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีความเชื่อมั่นและตรวจสอบย้อนกลับได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ห้องปฏิบัติการได้วิธีการที่เป็นมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิม ในลำไยและพริก

10.2 เป็นข้อมูลในการขยายขอบข่ายการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

10.3 ห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งเป็นการยกระดับห้องปฏิบัติการให้ได้ตามมาตรฐานสากล ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ และสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้

11. คำขอคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างและวัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตร เขตที่ 1

12. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และ ทิพวรรณ ینگน้อย (2547). Method Validation, เอกสารประกอบการฝึกอบรม กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ดุขุณี มั่นความดี และ อุมพร สุขม่วง (2544). การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี

(Chemical Method Validation), เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์บริการ

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563. สถิติการส่งออกลำไยสดปี2562

http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2562&E_YEAR=2563&PRODUCT_GROUP=5252&PRODUCT_ID=4990&wf_search=&WF_SEARCH=Y สืบค้นเมื่อ 12 กุมภาพันธ์ 2563

Chemtract.org, 2563. ฐานความรู้เรื่องความปลอดภัยด้านสารเคมี <http://www.chemtrack.org/Chem-Detail.asp?ID=07513&NAME=%E0%B8%84%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%8C%E0%B9%80%E0%B8%9A%E0%B8%99%E0%B8%94%E0%B8%B2%E0%B8%8B%E0%B8%B4%E0%B8%A1> สืบค้นเมื่อ 8 มกราคม 2563

EURL-FV, 2013. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with Ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1

J. Takel and S. Hatik, 1996. Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. *J. Chromatogr. A*, **733:1-2** (1996) 217-233.

ภาคผนวก

- สูตรการคำนวณหาน้ำหนักของสารมาตรฐานจากชั่งสารมาตรฐาน

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

- สูตรการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (standard solution)

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของ สารตั้งต้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

N_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูมา (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (มิลลิลิตร)

- การประเมินค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993 คำนวณโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) ตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC Peer-Verified Method, Nov. 1993

$$\text{HORRAT (Horwitz's ratio)} = \frac{\%RSD}{\text{PredictedHorwitzRSD}}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)}$$

C = concentration ratio

- เกณฑ์ประเมิน precision :
1. HORRAT ≤ 2 ; [AOAC]
 2. % RSD ≤ 21 ; [AOAC] ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

□ ค่า %RSD ตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov.1993

ความเข้มข้นของ Analyte ในตัวอย่าง	Concentration ratio (C)	RSD %
100%	1	1.3
10%	0.1	2.8
1%	0.01	2.7
0.10%	0.001	3.7
100 ppm	10 ⁻⁴	5.3
10 ppm	10 ⁻⁵	7.3
1 ppm	10 ⁻⁶	11
100 ppb	10 ⁻⁷	15
10 ppb	10 ⁻⁸	21
1 ppb	10 ⁻⁹	30

□ ค่า% recovery ตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov.1993

ความเข้มข้นของ analyte ในตัวอย่าง	Recovery (%)
100%	98 - 102
10%	98 - 102
1%	97 - 103
0.10%	95 - 105
100 ppm	90 - 107
10 ppm	80 - 110
1 ppm	80 - 110
100 ppb	80 - 110
10 ppb	60 - 115
1 ppb	40 - 120