

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช

2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

3. การทดลองที่ 1.20 การคัดเลือก สารสกัดจากพืชตัวแทน (Representative Matrix) เพื่อการหาปริมาณ

สารพิษตกค้างในการตรวจวิเคราะห์แบบรวมในผักและผลไม้ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Selection of Representative Matrix for Calibration in Multi-residue Analysis in Vegetables and Fruits by GC MS/MS

### 4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวลักขมี เดชานุรักษ์นุกูล กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน นางสาวมัลลิกา ทองเขียว กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวภาสินี ไชยชนะ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### 5. บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อคัดเลือก matrix จากตัวอย่างพืชผักและผลไม้ สำหรับใช้เป็นตัวแทนที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ representative matrix standard สำหรับใช้เปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์จำนวน 77 ชนิด ด้วยวิธี ethyl acetate method (EURL-FV,2010) ทำการสกัดโดยซังตัวอย่าง น้ำหนัก  $10\pm 0.1$  กรัม ลงใน Centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Ethyl Acetate ปริมาตร  $20\pm 0.1$  มิลลิลิตร เติม  $\text{NaHCO}_3$  จำนวน 3 กรัม และ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  จำนวน 10 กรัม แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS/MS) triple quadrupole, multiple reaction monitoring (MRM) ใช้สารละลายมาตรฐาน Matrix ในคะน้า เป็นตัวแทนกลุ่มผักใบ (Leafy vegetables) ใช้สารละลายมาตรฐาน Matrix ในมะเขือเทศ เป็นตัวแทนกลุ่มพืชตระกูลแตงและมะเขือ (Fruiting vegetables) และใช้สารละลายมาตรฐาน Matrix ในส้มเป็นตัวแทนผลไม้ตระกูลส้ม (Citrus fruits) ทดสอบที่ระดับ LOQ 0.01 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบพบว่า Matrix Standard ส้ม และ Matrix Standard คะน้า สามารถใช้เป็น calibration curve ทดแทนกันได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ส้ม และ คะน้า

จำนวน 37 ชนิดสาร ที่ไม่เกิด Matrix effects ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ โดยมีค่า %ME น้อยกว่า  $\pm 20$  มีค่า % recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 70-120 % HORRAT และ % RSD อยู่ในช่วง 0.08-0.93 และ 8.4-19.6 ตามลำดับ ดังนั้นวิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพ รวดเร็วและสะดวก ช่วยลดขั้นตอนและความลำบากในการเตรียม matrix-matched standards และเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชใน ผักและผลไม้กลุ่มผักใบ และผลไม้ตระกูลส้ม ที่ทำเป็นงานประจำและต้องการผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำด้วยเทคนิค GC-MS/MS

คำสำคัญ : สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช , เมทริกซ์เอฟเฟกต์, %ME, สารพิษตกค้าง, เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ-แมสสเปกโตรมิเตอร์

## ABSTRACT

Study for selecting matrix from vegetable and fruit samples to be used as an appropriate representative matrix standard for calibration of the analysis 77 pesticides and derivatives using the ethyl acetate method (EURL-FV, 2010). Extraction of  $10 \pm 0.1$  g sample with  $20 \pm 0.1$  mL ethyl acetate with 3 g  $\text{NaHCO}_3$  + 10 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and determination by using GC-MS/MS triple quadrupole, multiple reaction monitoring (MRM). Matrix standard in kale represent leafy vegetables. Matrix standard solutions in tomatoes represent groups of melon and eggplant and standard matrix solutions in kale represent citrus fruits. Tested at the level of LOQ 0.01 and 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The results showed that matrix standard in orange and matrix standard in kale can be used as a calibration curve instead. When analyzing 37 pesticides and derivatives in citrus and kale samples, that were not matrix effect. Test results pass the acceptance criteria %ME were less than  $\pm 20$  with average recovery rates between 70-120% HORRAT and % RSD in the range 0.08-0.93 and 8.4-19.6 respectively. Therefore, this method is effective, fast, convenient, reduce the process and hassle of preparation matrix-matched standards and suitable for use in the analysis of pesticide residues in leafy vegetables and citrus fruits. That is routine work and needs fast, accurate analysis results with GC-MS/MS technique.

Key words : pesticide, matrix effect, %ME, residue, gas chromatograph (GC), mass spectrometer (MS)

## 6. คำนำ

ปัญหาหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช คือ ผลของสารรบกวนในตัวอย่าง (matrix effect) ที่มีองค์ประกอบของสารจำพวก co-extractive เช่น รงควัตถุ (pigments) กรดไขมัน (fatty acids) น้ำตาล (sugars) ส่งผลรบกวนการตรวจวิเคราะห์ ทำให้การขจัดสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่าง (clean up) มีความจำเป็นในการวิเคราะห์ (Fialkov et al., 2007)

matrix (สิ่งรบกวนของสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง) มีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ matrix-induced enhancement effects โดยเฉพาะ co-extracted matrix component มีข้อดีสามารถช่วยเพิ่มสัญญาณการตรวจวัด (signal enhancement) และลดปัญหาความไม่คงที่ของสัญญาณการตรวจวัดจาก matrix ทำให้สามารถตรวจวัดสารในระดับที่ต่ำมาก นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือช่วยให้ลักษณะ peak และ peak intensity ของสารในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ดีขึ้น ส่วนข้อเสียทำให้การรายงานผลการวิเคราะห์ผิดพลาดจาก false positive หรือ negative (Maštovská, et al., 2005) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างกับ calibration standards ของสารมาตรฐานในสารละลาย (standard in solvent) ที่ไม่มี matrix ลักษณะของ peak ที่ได้จะไม่ดี ลดสัญญาณการตรวจวัด (signal suppression) ทำให้มีค่า response ต่ำ หรือทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีค่าสูงกว่าที่เป็นจริง (overestimated results) (Anastassiades, et al., 2006)

การลดการเกิด matrix effect มีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ในปี 2002 CVUA-STUTT GART ประเทศเยอรมนี ได้เผยแพร่ผลงานวิจัย การใช้ Analyte Protectants (Aps) ซึ่งเป็นสารเคมีสำหรับเติมลงไปในตัวอย่าง ที่สกัดและสารมาตรฐาน เพื่อทำ calibration curve ในการปรับปรุงคุณลักษณะ peak และปรับ matrix effects ให้เกิดการสมดุล โดย APs จะทำหน้าที่ในการรบกวนการเข้าไปเกาะยึดตรงส่วนที่ active site บน GC-liner และบนพื้นผิวของ column ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ลักษมี และคณะ, 2553 ได้ทำการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

ของการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวิธีการ QuEChERS ด้วยเครื่อง GC/FPD โดยใช้ Analytical Protectants ที่เป็นสารละลายผสมของ Sorbitol, Shikimic acid D(-) Gluconic acid- $\delta$ -lactone และ 3-Ethoxy-1,2-propanediol เติมลงในตัวอย่างที่อยู่ในสารละลาย acetonitrile (MeCN) และสารละลาย Matrix (พริก) ที่สกัดเสร็จแล้ว พบว่าการเติมสารละลาย Analyte Protectants ช่วยทำให้รูปร่างและความสูงของ peak และ peak intensity ในตัวอย่างดีขึ้น ลดการเกิด peak tailing โดยให้ผลเหมือนกับการใช้ matrix matched standard ถึงแม้การใช้ Analyte Protectants จะเป็นวิธีการที่สะดวกกว่าการใช้ matrix matching standard แต่สาร Analytical Protectants นั้นมีราคาสูงมาก อีกวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถที่จะแก้ไขปัญหาการเกิด matrix effect คือ การใช้ matrix standards แต่ก็ยังมีปัญหาในเรื่องการเตรียมสารละลาย matrix จากตัวอย่างพืชผักและผลไม้ที่มีความหลากหลายชนิด การหาตัวอย่างพืชผักและผลไม้ที่ต้องไม่มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชหรือสารรบกวนที่มีผลกระทบต่อวิเคราะห์ เพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการเตรียมสารละลาย matrix นั้น ค่อนข้างจะหายากสิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายในการจัดหาตัวอย่างผักและผลไม้นี้ดังกล่าว อีกทั้งขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง GC-MS/MS ในการควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ จะใช้สารละลายมาตรฐาน matrix-matched standards ที่ตรงกับชนิดและกลุ่มพืช เพื่อให้ผลตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพตามเกณฑ์กำหนด แต่การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการจะมีตัวอย่างที่หลากหลายต่างชนิดและกลุ่มพืช ทำให้ต้องเตรียมสารละลายมาตรฐาน matrix-matched standards หลายชุด และใช้เวลาในขั้นตอนลำดับการฉีดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างด้วยเครื่อง GC นาน ดังนั้นการศึกษาเพื่อคัดเลือก matrix จากตัวอย่างพืชผักและผลไม้ สำหรับใช้เป็นตัวแทนที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ representative matrix standard สำหรับใช้เปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์หลายชนิดแบบรวม (multi-residues method) ในผักและผลไม้ด้วยเครื่อง GC-MS/MS เป็นการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลในการช่วยลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการเตรียม matrix-matched standards ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายทำให้ออกรายงานผลวิเคราะห์ได้เร็วขึ้น สามารถนำไปเป็นข้อมูลและแนวทางในการปรับใช้กับวิธีวิเคราะห์สำหรับงานประจำในห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชน

## 7. วิธีดำเนินการ

### 1. สารเคมี และสารมาตรฐาน

1.1 สารเคมี ได้แก่ ethyl acetate (URA grade) , sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (anhydrous, granular)

1.2 สารมาตรฐาน 77 ชนิด ดังนี้

1.2.1 สารกลุ่ม Pyrethroids จำนวน 30 ชนิด ได้แก่ Acrinathrin<sup>1</sup> Allethrin<sup>2</sup> Anthraquinone<sup>3</sup> Bifenthrin<sup>4</sup> Bioresmethrin<sup>5</sup> Cyfluthrin I<sup>6</sup> Cyfluthrin II<sup>7</sup> Cyfluthrin III<sup>8</sup> Cyfluthrin IV<sup>9</sup> Cyhalothrin (lambda)<sup>10</sup> Cypermethrin I (Zeta)<sup>11</sup> Cypermethrin II<sup>12</sup> Cypermethrin III (Beta)<sup>13</sup> Cypermethrin IV<sup>14</sup> Deltamethrin<sup>15</sup> Fenvalerate I<sup>16</sup> Fenvalerate II<sup>17</sup> Flucythrinate I<sup>18</sup> Flucythrinate II<sup>19</sup> Fluvalinate-tau I<sup>20</sup> Fluvalinate-tau II<sup>21</sup> Permethrin I<sup>22</sup> Permethrin II (trans)<sup>23</sup> Phenothrin I<sup>24</sup> Phenothrin II<sup>25</sup> Resmethrin-cis (Cismethrin)<sup>26</sup> Tefluthrin-cis<sup>27</sup> Tetramethrin I<sup>28</sup> Tetramethrin II<sup>29</sup> Transfluthrin<sup>30</sup>

1.2.2 สารกลุ่ม Organophosphorus จำนวน 47 ชนิด ได้แก่ Azinphos-ethyl<sup>1</sup> Azinphos-methyl<sup>2</sup> Bromfeninfos<sup>3</sup> Bromophos<sup>4</sup> Bromophos-ethyl<sup>5</sup> Carbophenothion<sup>6</sup> Chlorfeninfos<sup>7</sup> Chlorpyrifos<sup>8</sup> Chlorpyrifos-methyl<sup>9</sup> Chlorthiophos<sup>10</sup> Coumaphos<sup>11</sup> Diazinon<sup>12</sup> Disulfoton<sup>13</sup> Edifenphos<sup>14</sup> EPN<sup>15</sup> Ethion<sup>16</sup> Fenamiphos<sup>17</sup> Fenitrothion<sup>18</sup> Fenthion<sup>19</sup> Fonofos<sup>20</sup> Iodofenphos<sup>21</sup> Isazofos<sup>22</sup> Leptophos<sup>23</sup> Malathion<sup>24</sup> Methacrifos<sup>25</sup> Mevinphos<sup>26</sup> Parathion<sup>27</sup> Parathion-methyl<sup>28</sup> Phorate<sup>29</sup> Phosalone<sup>30</sup> Phosmet<sup>31</sup> Piperonyl butoxide<sup>32</sup> Pirimiphos-ethyl<sup>33</sup> Pirimiphos-methyl<sup>34</sup> Profenofos<sup>35</sup> Prothiofos<sup>36</sup> Pyraclofos<sup>37</sup> Pyrazophos<sup>38</sup> Pyridaphenthion<sup>39</sup> Quinalphos<sup>40</sup> Ronnel (Fenchlorphos)<sup>41</sup> Sulfotep<sup>42</sup> Sulprofos<sup>43</sup> Terbufos<sup>44</sup> Tetrachlorvinphos<sup>45</sup> Tolclofos-methyl<sup>46</sup> Triazophos<sup>47</sup>

## 2. เครื่องมือ และอุปกรณ์

เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง, เครื่องปั่นตัวอย่าง, micropipette, เครื่อง Ultrasonic bath, เครื่อง Centrifuge, เครื่อง Vertex, ตู้แช่แข็ง -15±5 °C, เครื่อง GC-MS/MS Agilent Technology 7890A Series Tandem Mass: Agilent 7000B Series, Column: HP-5ms UI 15m x 0.25 mm x 0.25 µm

## 3. การเตรียมตัวอย่างผักและผลไม้

3.1 กลุ่มผักใบ (leafy vegetables) พืชตัวแทน : คะน้า

3.2 กลุ่มพืชตระกูลแตงและมะเขือ (fruiting vegetables) พืชตัวแทน : มะเขือเทศ

3.3 ผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits) พืชตัวแทน : ส้ม (อ้างอิงการจัดกลุ่มพืช: CAC/GL 40-1993

ตัวอย่างผักใบ คะน้า ตัดส่วนรากทิ้ง นำมาตรวจวิเคราะห์ทั้งต้น มะเขือเทศ วิเคราะห์ทั้งผล โดยหั่นตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ส่วนตัวอย่างผลไม้ ส้ม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆพร้อมเปลือก แล้วปั่นให้ละเอียดด้วย เครื่องปั่นย่อย ตัวอย่าง (food processor) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-15\pm 5^{\circ}\text{C}$

#### 4. วิธีวิเคราะห์

##### 4.1 การสกัด (extraction)

สกัดด้วยวิธี Ethyl acetate (EURL-FV,2010) โดยชั่งตัวอย่างผัก ผลไม้ (คะน้า มะเขือเทศ และส้ม) น้ำหนัก  $10\pm 0.1$  กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม ethyl acetate (PR) ปริมาตร  $20\pm 0.1$  มิลลิลิตร เติม  $\text{NaHCO}_3$  จำนวน 3 กรัม และ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  จำนวน 10 กรัม ปิดฝาให้แน่น เขย่าด้วย vortex นาน 1 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 3 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิ  $\leq 35^{\circ}\text{C}$  จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm นาน 3 นาที กรองสารละลายตัวอย่างด้วย syringe filter PTFE ขนาด 0.20 ไมโครเมตร แบ่งสารละลายลงในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตรปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง GC-MS/MS

##### 4.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเครื่อง GC-MS/MS

การตรวจชนิดและปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช จำนวน 77 ชนิด เครื่อง GC-MS/MS Agilent Technology 7890A Series Tandem Mass; Agilent 7000B Series มีสภาวะการทดสอบดังนี้

###### GC Parameter

analytical column: HP-5ms UI 15m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$  inlet: temp  $280^{\circ}\text{C}$   
splitless oven initial temp:  $60^{\circ}\text{C}$  gas flow: 1 ml/min (Constant flow) carrier gas: helium  
GC injection volume: 2  $\mu\text{l}$  post run time: 5 min total run time: 20.75 min

###### MS/MS Parameter

collision gas: nitrogen, solvent delay: 3.5 min, mode: electron impact,  
transfer line temp:  $280^{\circ}\text{C}$ , source temp:  $300^{\circ}\text{C}$ , Quadrupole temp: Q1 and Q2 =  $180^{\circ}\text{C}$ ,

###### MRM Mode Conditions:

MS1 resolution: Wide, MS2 resolution: Wide, Quenching gas flow  $\text{N}_2$  at 1.5 ml/min,  
Detector Gain: 10

##### 4.3 การทดสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ (method validation)

#### 4.3.1 วิเคราะห์ method blank และ matrix blank

การตรวจวิเคราะห์ solvent blank และ matrix blank เพื่อตรวจสอบสารรบกวนที่อาจมาจากสารเคมี อุปกรณ์ หรือตัวอย่าง ที่อาจมีผลกระทบต่อวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการจำแนกชนิดหรือคำนวณปริมาณสาร

solvent blank : สกัดโดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่าง ตามวิธีวิเคราะห์

matrix blank : สกัดตัวอย่างตามวิธีวิเคราะห์ โดยใช้ตัวอย่าง คมน้ำ ส้ม และ มะเขือเทศ ที่ไม่มีการตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ต้องการตรวจวิเคราะห์

#### 4.3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (matrix calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐานสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (matrix standard) จำนวน 77 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย matrix blank แต่ละชนิด (คมน้ำ ส้ม และ มะเขือเทศ) ที่ผ่านขั้นตอนการสกัดตามวิธีการสกัดตัวอย่าง นำสารละลาย matrix standard ไปฉีดด้วยเครื่อง GC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณค่า correlation of determination ( $R^2$ )  $\geq 0.9900$  เก็บรักษาสารมาตรฐานที่อุณหภูมิ  $-15 \pm 5^\circ\text{C}$

#### 4.3.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

การพิสูจน์ความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งาน เติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (fortified sample) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ไปฉีดด้วยเครื่อง GC-MS/MS สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานในสารละลาย ethyl acetate (standard in solvent) และ สารละลาย matrix พีชแต่ละชนิด (matrix standard) ที่ตรวจพบ (แกน X) กับพื้นที่ใต้พีคของสารที่ตรวจพบ (แกน Y) พิจารณาวงความเป็นเส้นตรง จากค่า coefficient of determination ( $R^2$ )  $\geq 0.9900$  หรือ ค่า correlation coefficient ( $r$ )  $\geq 0.995$

#### 4.3.4 การทดสอบ matrix effect (ผลของสารรบกวนในตัวอย่าง)

การเกิด matrix effect นั้นมีผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยเฉพาะ co-extracted matrix component ทำให้สารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์มีความสามารถในการตรวจวัดที่ต่ำ หรือผลการตรวจวิเคราะห์ที่ได้มีค่าสูงกว่าค่าที่เป็นจริง (overestimated results) การรายงานผลการวิเคราะห์ผิดพลาดจาก false positive หรือ false negative การวิเคราะห์ว่าสารชนิดใด ทำให้เกิด Matrix effect (ME%) โดยนำค่า slope จาก calibration curve ของสารมาตรฐานในสารละลาย ethyl acetate และสารละลาย matrix ในพีช 3

ชนิด ได้แก่ ค่ะน้ำ ส้ม และมะเขือเทศ มาประมวลผลข้อมูลเปรียบเทียบผลของ Matrix Effect (%ME) ในพืชแต่ละชนิด สามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้ (Rajski, et al., 2013)

$$\text{Matrix effect (ME\%)} = (a_{\text{matrix}}/a_{\text{standard}}) - 1 \times 100$$

เมื่อ  $a_{\text{matrix}}$  = ค่า slope ของ matrix standard

$a_{\text{standard}}$  = ค่า slope ของ solvent standard

โดยมีเกณฑ์กำหนด ME% > ±20% แสดงว่าสารชนิดนั้นเกิด Matrix effects

#### 4.3.5 การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

โดยหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์ห้กลับคืน (%recovery) ของสารมาตรฐานสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เติมลงในตัวอย่างพืชตัวแทน 3 ชนิด ได้แก่ ค่ะน้ำ ส้ม และ มะเขือเทศ ที่ตรวจไม่พบสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างปนเปื้อน (fortified sample) ทำการทดสอบที่ระดับ LOQ คือ 0.01 และ 0.02 mg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ %Recovery, relative standard deviation (%RSD) และ HORRAT โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีตามเกณฑ์กำหนดดังนี้ ความแม่นยำ (accuracy) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ โดยค่าเฉลี่ย %Recovery ในช่วงร้อยละ 70-120% (Codex Alimentarius, 1993) ความเที่ยง (Precision) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ %RSD มีค่า ≤ 20 (European Commission SANTE/11945/2015) และ HORRAT (Horwitz ratio) มีค่า ≤ 2 (Codex, EU)

HORRAT หรือ Horwitz ratio คือ อัตราส่วนระหว่างค่า %RSD ที่ได้จากการทดลองกับ Predicted Horwitz RSD ของ repeatability) ซึ่ง Predicted Horwitz RSD มีสูตรคำนวณ (Horwitz, W. 2000) ดังนี้

$$\text{HORRAT (Horwitz ratio)} = \frac{\%RSD \text{ จากการทดลอง}}{\text{Predicted Horwitz RSD}} \quad \text{สมการที่ 1}$$

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

$$\text{RSD}_r (\%) = 0.66 \times 2 \times C^{-0.1505} \quad \text{สมการที่ 3}$$

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

(เช่น 0.1 mg/kg, C = 0.1×10<sup>-6</sup>)



ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร  
กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์ จำนวน 77 ชนิดสาร ในผักและผลไม้ที่ใช้เป็นตัวแทน คือ ค่ะน้ำ มะเขือเทศ และ ส้ม โดยวิธี Ethyl acetate (EURL-FV,2010) ด้วยเครื่อง GC-MS/MS เมื่อนำค่า slope ของ calibration curve สารมาตรฐานในสารละลาย ethyl acetate และสารละลาย matrix ใน ค่ะน้ำ ส้ม และ มะเขือเทศ มาเปรียบเทียบผลในพืชแต่ละชนิด โดยมีเกณฑ์กำหนด %ME มากกว่า  $\pm 20\%$  แสดงว่าสารชนิดนั้นเกิด Matrix effects

ผลการวิเคราะห์และพิสูจน์ matrix effect สารมาตรฐานสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์ทั้งหมด 77 ชนิด ในตัวอย่าง มะเขือเทศ ส้ม และค่ะน้ำ ด้วยเครื่อง GC-MS/MS (ตารางที่1) พบว่า สารจำนวน 22 ชนิด ได้แก่ Allethrin<sup>1</sup>, Bifenthrin<sup>2</sup>, Bromophos<sup>3</sup>, Bromophos-ethyl<sup>4</sup>, Chlorpyrifos<sup>5</sup>, Diazinon<sup>6</sup>, Disulfoton<sup>7</sup>, Fenitrothion<sup>8</sup>, Fenthion<sup>9</sup>, Fonofos<sup>10</sup>, Isazofos<sup>11</sup>, Methacrifos<sup>12</sup>, Phorate<sup>13</sup>, Pirimiphos-ethyl<sup>14</sup>, Pirimiphos-methyl<sup>15</sup>, Prothiofos<sup>16</sup>, Ronnel(Fenchlorphos)<sup>17</sup>, Sulfotep<sup>18</sup>, Tefluthrin-cis<sup>19</sup>, Terbufos<sup>20</sup>, Tolclofos-methyl<sup>21</sup>, และ Transfluthrin<sup>22</sup> เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (matrix standard) ใน มะเขือเทศ ส้ม และค่ะน้ำ มีค่า %ME น้อยกว่า  $\pm 20\%$  ดังนั้นจึงสามารถใช้ Matrix Standard มะเขือเทศ ส้ม และค่ะน้ำ ทดแทนกันได้ในการทำ calibration curve เพื่อใช้ในการคำนวณผลวิเคราะห์ และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในสารละลาย (Solvent Standard) มีค่า %ME มากกว่า  $\pm 20\%$  จึงไม่สามารถนำ Solvent Standard มาใช้ในการคำนวณผลวิเคราะห์ ดังภาพที่ 1

สำหรับสารอีกจำนวน 55 ชนิด มีค่า %ME มากกว่า  $\pm 20\%$  (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงต้องใช้ matrix standard ของพืชแต่ละชนิดนั้นๆ ในการทำ calibration curve เพื่อใช้ในการคำนวณผลวิเคราะห์ และไม่สามารถใช้ทั้ง solvent standard และ matrix standard มะเขือเทศ ส้ม และค่ะน้ำ เพื่อมาทดแทนกันได้ ได้แก่ Acrinathrin<sup>1</sup>, Anthraquinone<sup>2</sup>, Azinphos-ethyl<sup>3</sup>, Azinphos-methyl<sup>4</sup>, Bioresmethrin (Resmethrin-trans)<sup>5</sup>, Bromfeninfos<sup>6</sup>, Carbophenothion<sup>7</sup>, Chlorfenvinphos<sup>8</sup>, Chlorpyrifos-methyl<sup>9</sup>, Chlorthiophos<sup>10</sup>, Coumaphos<sup>11</sup>, Cyfluthrin I<sup>12</sup>, Cyfluthrin II<sup>13</sup>, Cyfluthrin III<sup>14</sup>, Cyfluthrin IV<sup>15</sup>, Cyhalothrin (lambda)<sup>16</sup>, Cypermethrin I (Zeta)<sup>17</sup>, Cypermethrin II<sup>18</sup>, Cypermethrin III (Beta)<sup>19</sup>, Cypermethrin IV<sup>20</sup>, Deltamethrin<sup>21</sup>, Edifenphos<sup>22</sup>, EPN<sup>23</sup>, Ethion<sup>24</sup>, Fenamiphos (Phenamiphos)<sup>25</sup>,

Fenvalerate I<sup>26</sup>, Fenvalerate II<sup>27</sup>, Flucythrinate I<sup>28</sup>, Flucythrinate II<sup>29</sup>, Fluvalinate-tau I<sup>30</sup>, Fluvalinate-tau II<sup>31</sup>, Iodofenphos (Jodfenphos)<sup>32</sup>, Leptophos<sup>33</sup>, Malathion<sup>34</sup>, Mevinphos<sup>35</sup>, Parathion<sup>36</sup>, Parathion-methyl<sup>37</sup>, Permethrin I<sup>38</sup>, Permethrin II (trans)<sup>39</sup>, Phenothrin I<sup>40</sup>, Phenothrin II<sup>41</sup>, Phosalone<sup>42</sup>, Phosmet<sup>43</sup>, Piperonyl butoxide<sup>44</sup>, Profenofos<sup>45</sup>, Pyraclofos<sup>46</sup>, Pyrazophos<sup>47</sup>, Pyridaphenthion<sup>48</sup>, Quinalphos<sup>49</sup>, Resmethrin-cis (Cismethrin)<sup>50</sup>, Sulprofos<sup>51</sup>, Tetrachlorvinphos, E-isomer<sup>52</sup>, Tetramethrin I<sup>53</sup>, Tetramethrin II<sup>54</sup> และ Triazophos<sup>55</sup>

จากข้อมูลผลการทดสอบ เมื่อนำมาพิจารณา calibration curve ของสารบางชนิดใน matrix standard ส้ม และ matrix standard ค่ะน้า จะเห็นว่ามีค่าความชัน slope ใกล้เคียงกัน แทบจะซ้อนทับกัน และมีค่า %ME น้อยกว่า  $\pm 20\%$  ในขณะที่ matrix standard มะเขือเทศ และ matrix standard ในสารละลาย ค่า slope แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด และมีค่า %ME มากกว่า  $\pm 20\%$  จากนั้นนำมาทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and precision) เพื่อทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ของการตรวจวิเคราะห์ที่กลับคืน (%recovery) ของสารมาตรฐานสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เติมลงในตัวอย่างพืชตัวแทน 3 ชนิด ได้แก่ ค่ะน้า ส้ม และ มะเขือเทศ ที่ตรวจไม่พบสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างปนเปื้อน (fortified sample) ที่ระดับ LOQ 0.01 และ 0.02 mg/kg ของวิธีการนี้ที่ได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Ethyl acetate method ด้วยเทคนิค GC-MS/MS ความเข้มข้นละ 5  $\mu\text{g/L}$  จำนวนปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณ %Recovery, relative standard deviation (%RSD) และ HORRAT ผลการทดสอบ พบว่า สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์ จำนวน 37 ชนิด ในพืช 2 ชนิด ได้แก่ ส้ม และ ค่ะน้า ที่ระดับ LOQ โดยใช้ matrix standard ส้ม และ matrix standard ค่ะน้า เพื่อเปรียบเทียบและคำนวณผลการตรวจวิเคราะห์ (ตารางที่ 3) สามารถใช้เป็น matrix standard ที่แทนกันได้ โดยประเมินผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีผ่านเกณฑ์ยอมรับตามที่กำหนด ค่าเฉลี่ย %Recovery ในช่วงร้อยละ 70-120% (Codex Alimentarius, 1993) %RSD มีค่า  $\leq 20$  (European Commission SANTE/11945/2015) และ HORRAT (Horwitz ratio) มีค่า  $\leq 2$  (Codex, EU) ได้แก่ Acrinathrin<sup>1</sup>, Bifenthrin<sup>2</sup>, Cyhalothrin ( $\lambda$ )<sup>3</sup>, Cypermethrin II<sup>4</sup>, Permethrin I<sup>5</sup>, Permethrin II (trans)<sup>6</sup>, Tefluthrin-cis<sup>7</sup>, Tetramethrin II<sup>8</sup>, Transfluthrin<sup>9</sup>, Bromophos<sup>10</sup>, Bromophos-ethyl<sup>11</sup>, Carbophenothion<sup>12</sup>, Chlorpyrifos<sup>13</sup>, Chlorpyrifos-methyl<sup>14</sup>, Chlorthiophos<sup>15</sup>, Diazinon<sup>16</sup>, Disulfoton<sup>17</sup>, Ethion<sup>18</sup>, Fenitrothion<sup>19</sup>, Fenthion<sup>20</sup>, Fonofos<sup>21</sup>, Isazofos (Miral, Isazophos)<sup>22</sup>, Malathion<sup>23</sup>, Methacrifos<sup>24</sup>, Mevinphos<sup>25</sup>, Parathion<sup>26</sup>, Parathion-methyl<sup>27</sup>, Phorate<sup>28</sup>, Piperonyl butoxide<sup>29</sup>, Pirimiphos-ethyl<sup>30</sup>, Pirimiphos-methyl<sup>31</sup>, Prothiofos<sup>32</sup>, Ronnel (Fenchlorphos)<sup>33</sup>, Sulfotep<sup>34</sup>, Sulprofos<sup>35</sup>, Terbufos<sup>36</sup>, Tolclofos-methyl<sup>37</sup>

สำหรับ matrix standard มะเขือเทศ เมื่อนำมาใช้เป็น calibration curve เปรียบเทียบผล สำหรับตัวอย่าง ค่ะน้า และ ส้ม ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำ matrix standard มะเขือเทศ มาใช้กับสารทั้ง 37 ชนิดนี้ได้

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาเพื่อคัดเลือก matrix จากตัวอย่างพืชผักและผลไม้ สำหรับใช้เป็นตัวแทนที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ representative matrix standard สำหรับใช้เปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์และอนุพันธ์จำนวน 77 ชนิด เป็นวิธีวิเคราะห์แบบ multi-residues method สกัดด้วยวิธี Ethyl acetate (EURL-FV,2010) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ใช้สารละลายมาตรฐาน matrix ในคะน้า เป็นตัวแทนกลุ่มผักใบ (Leafy vegetables) ใช้สารละลายมาตรฐาน Matrix ในมะเขือเทศ เป็นตัวแทนกลุ่มพืชตระกูลแตง และมะเขือ (Fruiting vegetables) และใช้สารละลายมาตรฐาน matrix ในส้มเป็นตัวแทนผลไม้ตระกูลส้ม (Citrus fruits) โดยพิจารณาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity of method) ทดสอบที่ระดับ LOQ 0.01 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า matrix standard ส้ม และ matrix standard คะน้า สามารถใช้เป็น calibration curve ทดแทนกันได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ส้ม และ คะน้า จำนวน 37 ชนิดสาร ที่ไม่เกิด matrix effects โดยมีค่า %ME น้อยกว่า  $\pm 20$  มีค่า % recovery เฉลี่ย อยู่ในช่วง 70-120 % HORRAT และ % RSD อยู่ในช่วง 0.08-0.93 และ 8.4-19.6 และ ตามลำดับ ให้ผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้กลุ่มผักใบ และผลไม้ตระกูลส้ม

สำหรับสารอื่นๆวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมที่ให้ผลวิเคราะห์ที่ดีและถูกต้องแม่นยำที่สุด ควรใช้ matrix standard ให้ตรงกับตัวอย่างชนิดพืชที่ต้องการวิเคราะห์ ผลการศึกษานี้นำไปใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการปรับใช้กับวิธีวิเคราะห์สำหรับงานประจำในห้องปฏิบัติการทั้งภาครัฐและเอกชน ช่วยลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการเตรียม matrix-matched standards ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ทำให้ออกรายงานผลวิเคราะห์ได้เร็วขึ้น

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำข้อมูลมาใช้เป็นวิธีในการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ทำเป็นงานประจำ(Routine) และงานสำรวจสุ่มเก็บตัวอย่างผักผลไม้จากแหล่งผลิตและแหล่งจำหน่าย(monitoring) ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ เป็นการพัฒนาและเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร
2. ใช้เป็นข้อมูลเผยแพร่ให้ห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาค และห้องปฏิบัติการอื่นๆ นำไปใช้ต่อ
3. นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้ที่ จะทำการพัฒนาและปรับวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ได้วิธีการที่ดี และเหมาะสมและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

4. นำไปถ่ายทอดให้แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างของกรมวิชาการเกษตร ภาครัฐและเอกชน นำไปเป็นแนวทางทดสอบและใช้ในการปฏิบัติงานจริงได้ เพื่อเป็นการพัฒนาและเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างของประเทศไทย

ตารางที่ 1 แสดงค่า Matrix Effect (ME%) < ±20% ในพืชตัวแทนทั้ง 3 ชนิด คือ ฝรั่ง ส้ม และ มะเขือเทศ สามารถใช้เป็น Matrix Standard ที่แทนกันได้ จำนวน 22 ชนิดสาร

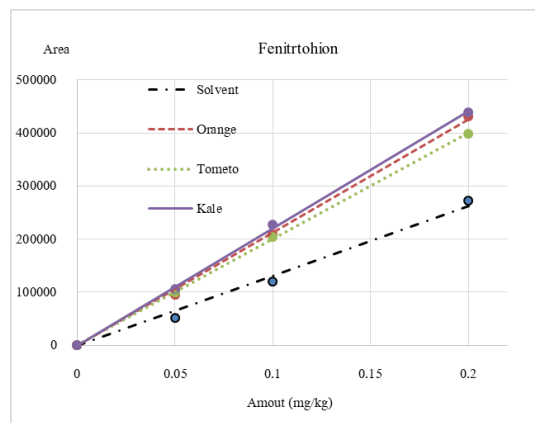
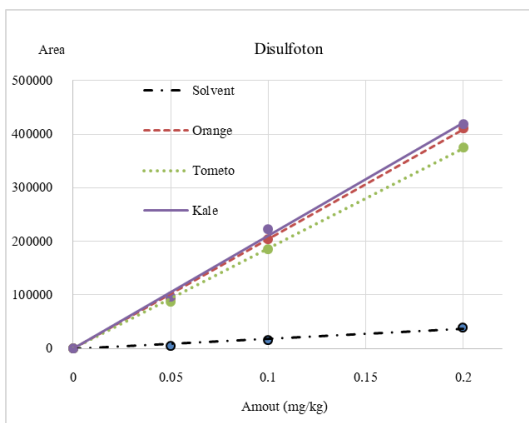
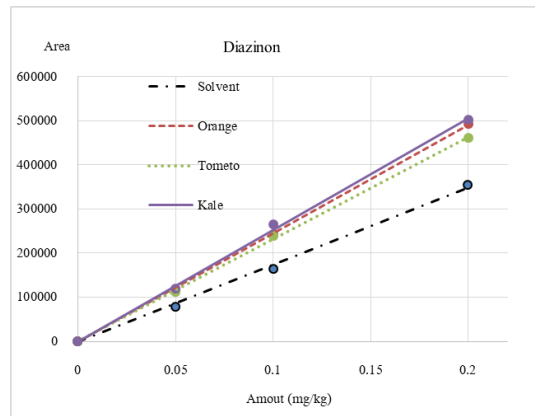
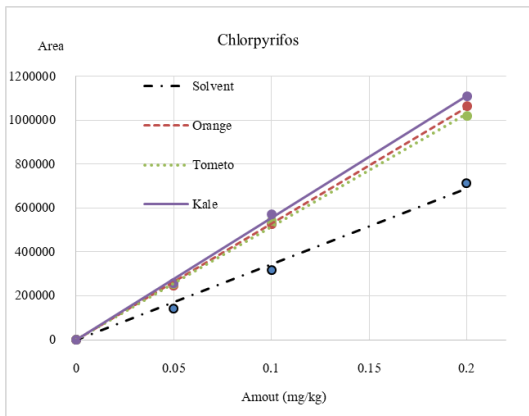
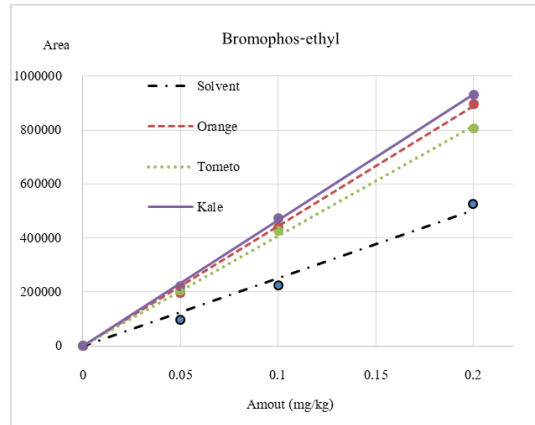
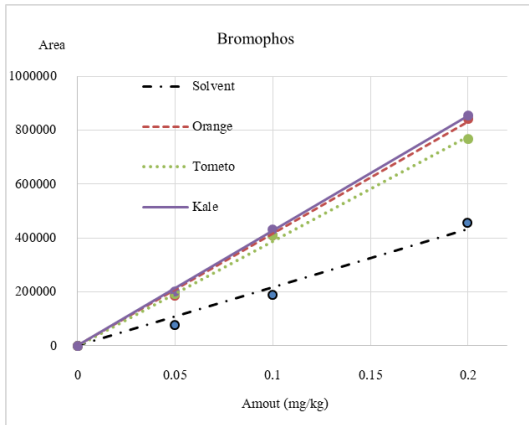
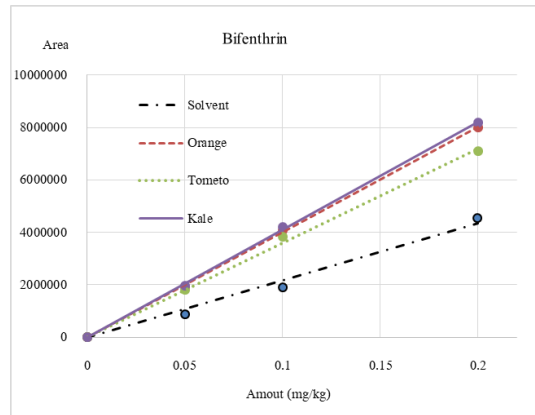
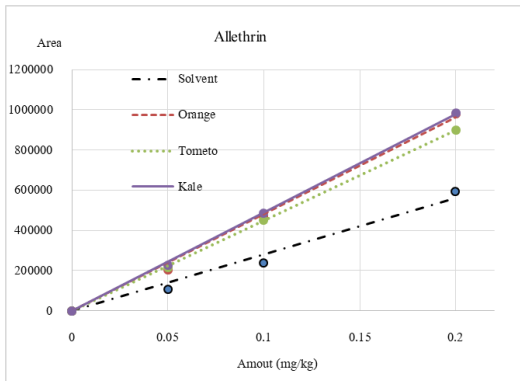
No	Pesticide	Range (mg/kg)	ME (%) = ((slope other matrix/slope solvent) -1)x100			ME (%) = ((slope other matrix/slope Orange) -1)x100		ME (%) = ((slope other matrix/slope Tomato) -1)x100		ME (%) = ((slope other matrix/slope Kale) -1)x100	
			Orange	Tomato	Kale	Tomato	Kale	Orange	Kale	Orange	Tomato
1	Allethrin	0.05-0.2	-36.15	-27.37	-34.74	13.76	2.22	-12.10	-10.15	-2.17	11.29
2	Bifenthrin	0.05-0.2	-38.92	-29.02	-39.99	16.21	-1.75	-13.95	-15.46	1.79	18.29
3	Bromophos	0.05-0.2	-42.18	-33.82	-41.93	14.46	0.44	-12.63	-12.25	-0.43	13.96
4	Bromophos-ethyl	0.05-0.2	-38.86	-28.01	-39.22	17.75	-0.60	-15.07	-15.58	0.60	18.45
5	Chlorpyrifos	0.05-0.2	-30.17	-24.83	-32.34	7.65	-3.11	-7.10	-10.00	3.21	11.11
6	Diazinon	0.05-0.2	-26.93	-20.22	-27.08	9.18	-0.20	-8.41	-8.60	0.20	9.41
7	Disulfoton	0.05-0.2	-89.42	-88.36	-89.45	9.98	-0.34	-9.07	-9.38	0.34	10.35
8	Fenitrothion	0.05-0.2	-33.90	-25.48	-33.10	12.74	1.22	-11.30	-10.22	-1.21	11.38
9	Fenthion	0.05-0.2	-56.76	-51.31	-56.93	12.59	-0.40	-11.18	-11.54	0.41	13.05
10	Fonofos	0.05-0.2	-25.64	-18.69	-27.17	9.34	-2.06	-8.54	-10.42	2.10	11.64
11	Isazofos (Miral, Isazophos)	0.05-0.2	-28.35	-22.85	-28.35	7.68	0.00	-7.13	-7.13	3.82	11.79
12	Methacrifos	0.05-0.2	-28.73	-17.16	-30.40	16.23	-2.35	-13.96	-15.98	2.40	19.02
13	Phorate	0.05-0.2	-49.10	-42.93	-47.89	12.12	2.38	-10.81	-8.69	-2.32	9.51
14	Pirimiphos-ethyl	0.05-0.2	-36.64	-30.22	-38.30	10.15	-2.61	-9.21	-11.58	2.68	13.09
15	Pirimiphos-methyl	0.05-0.2	-33.33	-25.30	-34.33	12.04	-1.49	-10.75	-12.08	1.51	13.74
16	Prothiofos	0.05-0.2	-28.58	-21.88	-31.22	9.39	-3.70	-8.58	-11.96	3.84	13.59
17	Ronnel (Fenclorphos)	0.05-0.2	-39.01	-32.58	-39.36	10.55	-0.58	-9.54	-10.06	0.58	11.19
18	Sulfotep	0.05-0.2	-27.93	-19.99	-27.84	11.02	0.12	-9.93	-9.82	-0.12	10.89
19	Tefluthrin, cis-	0.05-0.2	-26.07	-18.04	-25.81	10.86	0.35	-9.80	-9.48	-0.35	10.47
20	Terbufos	0.05-0.2	-53.13	-48.07	-51.80	10.79	2.84	-9.74	-7.17	-2.76	7.73
21	Tolclofos-methyl	0.05-0.2	-29.39	-23.13	-30.61	8.86	-1.74	-8.14	-9.73	1.77	10.78
22	Transfluthrin	0.05-0.2	-25.94	-17.38	-26.55	11.56	-0.82	-10.36	-11.10	0.83	12.48

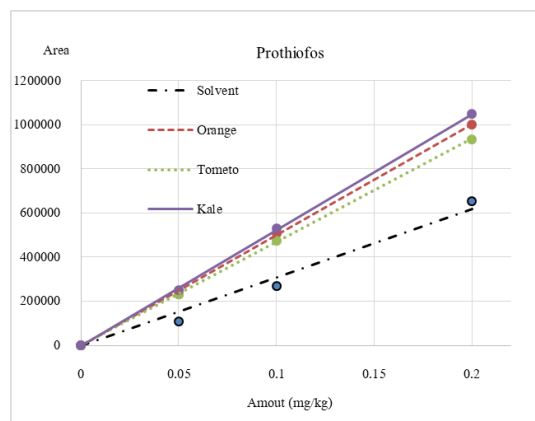
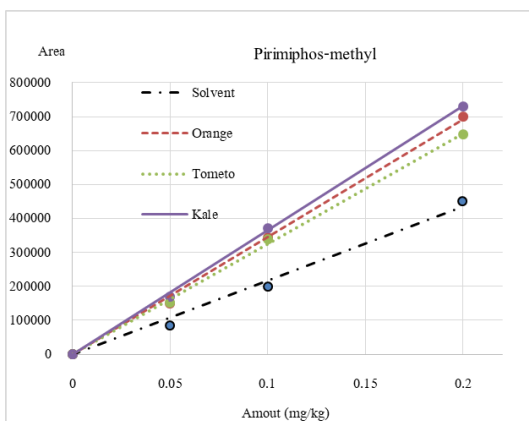
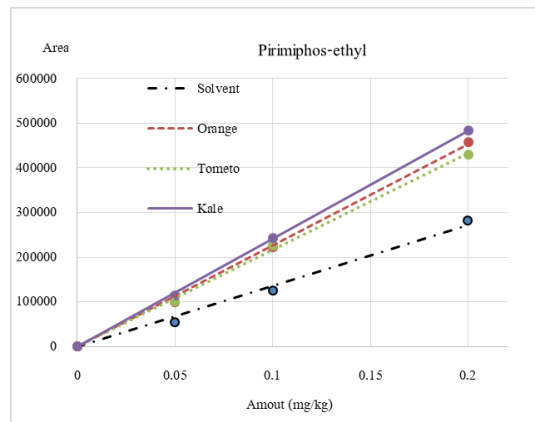
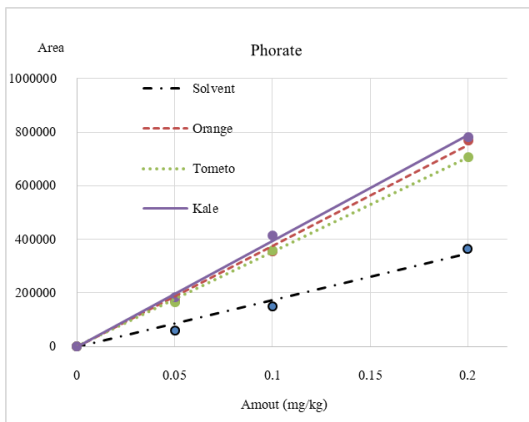
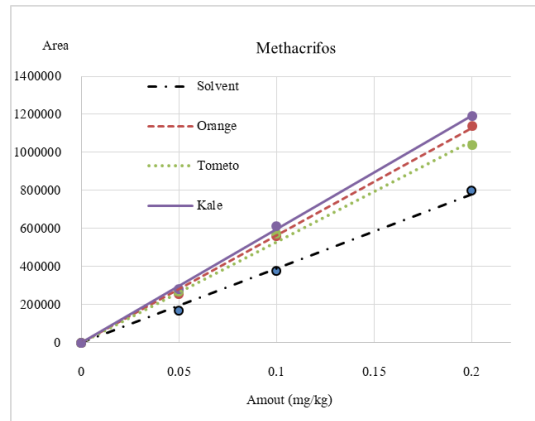
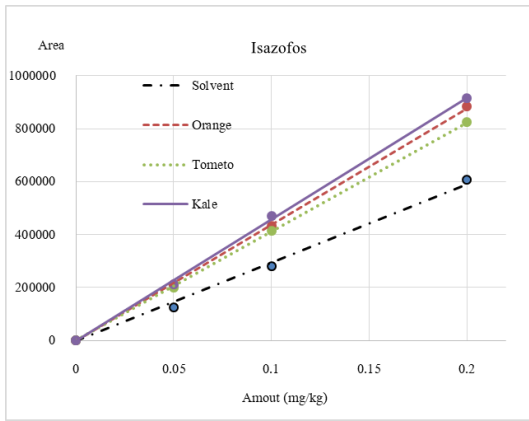
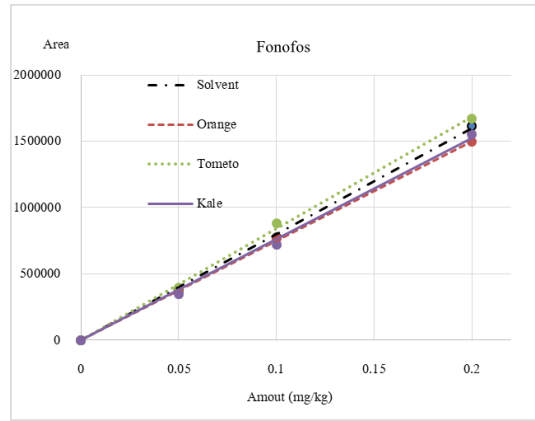
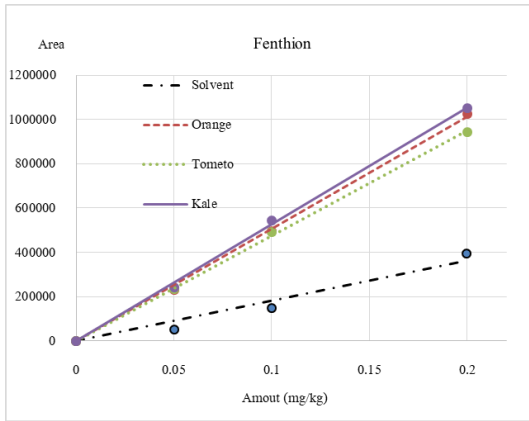
ตารางที่ 2 แสดงค่า Matrix Effect (ME%) > ±20% ในพืชตัวแทน ฝรั่ง ส้ม และมะเขือเทศ ที่ไม่สามารถใช้เป็น Matrix Standard ที่แทนกันได้ จำนวน 55 ชนิดสาร

No	Pesticide	Range (mg/kg)	ME (%) = ((slope other matrix/slope solvent) -1)x100			ME (%) = ((slope other matrix/slope Orange) -1)x100		ME (%) = ((slope other matrix/slope Tomato) -1)x100		ME (%) = ((slope other matrix/slope Kale) -1)x100	
			Orange	Tomato	Kale	Tomato	Kale	Orange	Kale	Orange	Tomato
1	Acinathrin	0.05-0.2	-76.54	-65.16	-75.83	48.54	3.04	-32.68	-30.63	-2.95	44.16
2	Anthraquinone	0.05-0.2	-100.20	-99.95	-100.16	-124.28	-17.51	-511.89	-439.77	21.22	-129.43
3	Azinphos-ethyl	0.05-0.2	-91.76	-86.81	-90.37	60.09	16.88	-37.53	-26.99	-14.45	36.96
4	Azinphos-methyl	0.05-0.2	-65.85	-33.23	-54.38	95.54	33.59	-48.86	-31.68	-25.14	46.37
5	Bioresmethrin (Resmethrin-trans)	0.05-0.2	-40.66	-33.85	-36.41	11.46	7.15	-10.29	-3.87	-6.67	4.03
6	Bromfeninfos	0.05-0.2	-67.00	-57.90	-64.71	27.57	6.95	-21.61	-16.17	-6.49	19.29
7	Carbophenothion	0.05-0.2	-47.31	-38.75	-49.36	16.23	-3.89	-13.97	-17.32	4.05	20.94
8	Chlorfeninfos	0.05-0.2	-58.58	-50.97	-56.84	18.37	4.21	-15.52	-11.97	-4.04	13.59
9	Chlorpyrifos-methyl	0.05-0.2	-40.12	-32.21	-41.55	13.20	-2.40	-11.66	-13.78	2.45	15.98
10	Chlorthiophos	0.05-0.2	-35.39	-24.80	-37.46	16.39	-3.20	-14.08	-16.83	3.31	20.24
11	Coumaphos	0.05-0.2	-95.74	-92.73	-94.54	70.68	28.01	-41.41	-25.00	-21.88	33.33

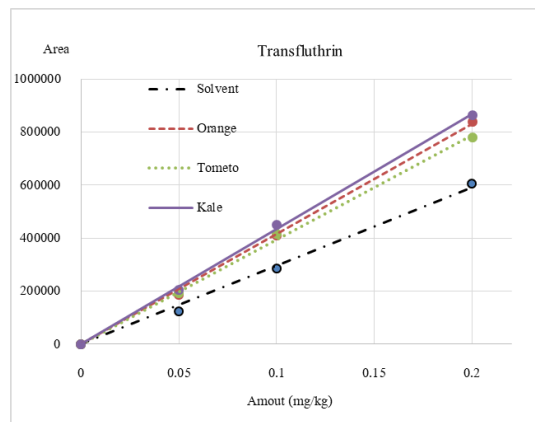
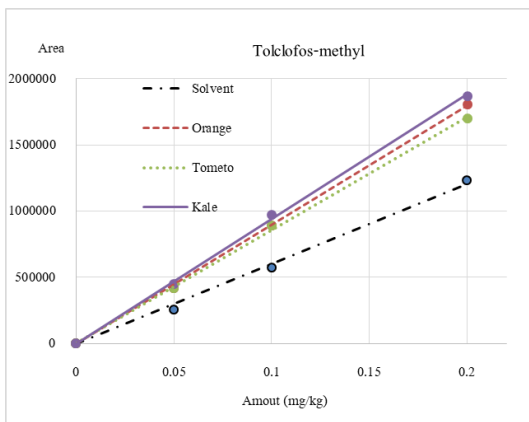
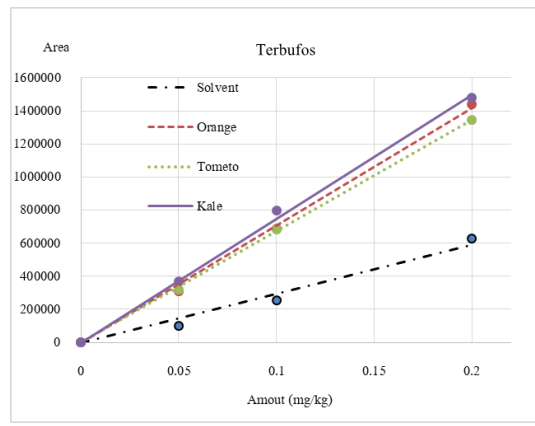
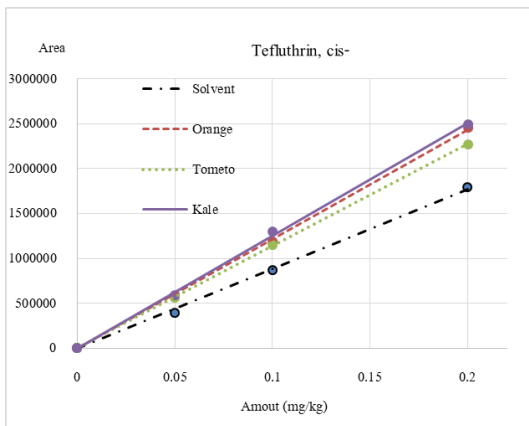
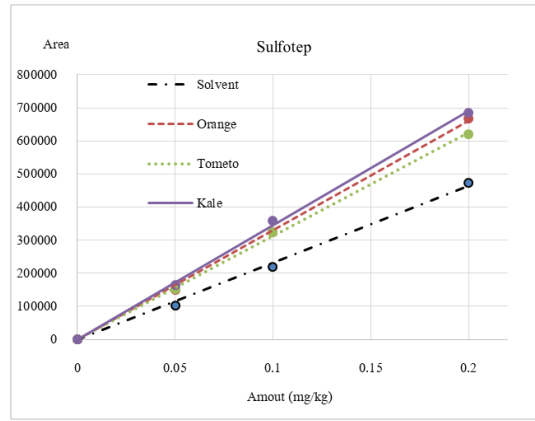
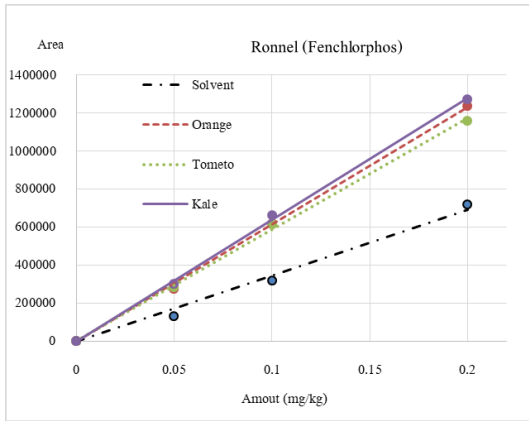
No	Pesticide	Range (mg/kg)	ME (%) = ((slope other matrix/slope solvent) -1)x100			ME (%) = ((slope other matrix/slope Orange) -1)x100		ME (%) = ((slope other matrix/slope Tomato) -1)x100		ME (%) = ((slope other matrix/slope Kale) -1)x100	
			Orange	Tomato	Kale	Tomato	Kale	Orange	Kale	Orange	Tomato
12	Cyfluthrin I	0.05-0.2	-85.33	-79.29	-84.55	41.12	5.28	-29.14	-25.39	-5.02	34.03
13	Cyfluthrin II	0.05-0.2	-86.19	-81.66	-85.48	32.82	5.14	-24.71	-20.84	-4.89	26.33
14	Cyfluthrin III	0.05-0.2	-83.73	-77.20	-82.36	40.14	8.39	-28.65	-22.66	-7.74	29.29
15	Cyfluthrin IV	0.05-0.2	-85.90	-80.83	-85.26	35.95	4.55	-26.45	-23.10	-4.35	30.04
16	Cyhalothrin (lambda)	0.05-0.2	-60.83	-47.53	-63.11	33.97	-5.82	-25.36	-29.70	6.18	42.24
17	Cypermethrin I (Zeta)	0.05-0.2	-83.92	-76.50	-83.12	46.16	4.96	-31.58	-28.19	-4.72	39.26
18	Cypermethrin II	0.05-0.2	-89.26	-84.06	-89.10	48.42	1.47	-32.62	-31.63	-1.45	46.27
19	Cypermethrin III (Beta)	0.05-0.2	-85.31	-79.94	-84.84	36.56	3.23	-26.77	-24.41	-3.13	32.29
20	Cypermethrin IV	0.05-0.2	-88.83	-84.98	-88.19	34.40	5.68	-25.60	-21.37	-5.38	27.17
21	Deltamethrin	0.05-0.2	-91.45	-87.40	-90.64	47.40	9.42	-32.16	-25.77	-8.61	34.71
22	Edifenphos	0.05-0.2	-90.80	-85.17	-88.71	61.24	22.76	-37.98	-23.87	-18.54	31.35
23	EPN	0.05-0.2	-70.94	-56.18	-64.35	50.82	22.71	-33.70	-18.64	-18.51	22.91
24	Ethion	0.05-0.2	-48.97	-40.32	-49.92	16.95	-1.86	-14.49	-16.08	1.89	19.16
25	Fenamiphos (Phenamiphos)	0.05-0.2	-89.19	-86.28	-88.53	26.92	6.10	-21.21	-16.40	-5.75	19.62
26	Fenvalerate I	0.05-0.2	-90.24	-86.97	-89.50	33.41	7.52	-25.04	-19.41	-6.99	24.08
27	Fenvalerate II	0.05-0.2	-92.25	-89.36	-91.27	37.37	12.61	-27.20	-18.02	-11.20	21.98
28	Flucythrinate I	0.05-0.2	-89.16	-85.41	-88.59	34.61	5.33	-25.71	-21.76	-5.06	27.81
29	Flucythrinate II	0.05-0.2	-90.52	-86.70	-89.51	40.32	10.69	-28.74	-21.12	-9.66	26.77
30	Fluvalinate-tau I	0.05-0.2	-94.75	-92.26	-93.87	47.50	16.77	-32.20	-20.84	-14.36	26.32
31	Fluvalinate-tau II	0.05-0.2	-94.15	-89.63	-93.05	77.26	18.88	-43.59	-32.94	-15.88	49.11
32	Iodofenphos (Jodfenphos)	0.05-0.2	-58.82	-49.99	-56.54	21.44	5.54	-17.65	-13.09	-5.25	15.07
33	Leptophos	0.05-0.2	-58.22	-48.08	-57.39	24.29	2.00	-19.54	-17.93	-1.96	21.84
34	Malathion	0.05-0.2	-47.91	-43.52	-50.77	8.43	-5.49	-7.78	-12.84	5.81	14.74
35	Mevinphos	0.05-0.2	-55.45	-40.45	-52.27	33.66	7.13	-25.18	-19.85	-6.66	24.76
36	Parathion	0.05-0.2	-63.25	-55.89	-62.72	20.03	1.45	-16.69	-15.48	-1.43	18.31
37	Parathion-methyl	0.05-0.2	-48.19	-35.26	-47.25	24.95	1.81	-19.97	-18.52	-1.78	22.73
38	Permethrin I	0.05-0.2	-65.76	-56.17	-66.89	28.03	-3.30	-21.89	-24.47	3.41	32.40
39	Permethrin II (trans)	0.05-0.2	-66.28	-53.55	-64.24	37.75	6.05	-27.41	-23.01	-5.70	29.90
40	Phenothrin I	0.05-0.2	-61.25	-48.89	-59.46	31.90	4.61	-24.19	-20.69	-4.41	26.09
41	Phenothrin II	0.05-0.2	-50.17	-40.37	-52.01	19.67	-3.68	-16.44	-19.51	3.82	24.25
42	Phosalone	0.05-0.2	-81.57	-73.94	-80.24	41.36	7.18	-29.26	-24.18	-6.70	31.89
43	Phosmet	0.05-0.2	-88.95	-84.14	-87.83	43.52	10.14	-30.32	-23.26	-9.20	30.31
44	Piperonyl butoxide	0.05-0.2	-54.26	-44.22	-53.95	21.95	0.68	-18.00	-17.44	-0.67	21.13
45	Profenofos	0.05-0.2	-73.18	-65.94	-69.83	26.98	12.50	-21.25	-11.40	-11.11	12.87
46	Pyraclufos	0.05-0.2	-99.15	-98.21	-98.57	109.95	68.04	-52.37	-19.96	-40.49	24.94
47	Pyrazophos	0.05-0.2	-82.81	-76.28	-81.71	37.99	6.37	-27.53	-22.91	-5.99	29.73
48	Pyridaphenthion	0.05-0.2	-88.28	-83.09	-86.71	44.30	13.40	-30.70	-21.41	-11.82	27.25
49	Quinalphos	0.05-0.2	-35.78	-23.39	-36.08	19.29	-0.48	-16.17	-16.57	0.48	19.86
50	Resmethrin-cis (Cismethrin)	0.05-0.2	-40.66	-33.85	-36.41	11.46	7.15	-10.29	-3.87	-6.67	4.03
51	Sulprofos	0.05-0.2	-54.24	-46.58	-56.18	16.72	-4.26	-14.32	-17.97	4.45	21.91
52	Tetrachlorvinphos, E- isomer	0.05-0.2	-86.98	-80.87	-81.27	46.86	43.81	-31.91	-2.08	-30.46	2.12
53	Tetramethrin I	0.05-0.2	-65.81	-55.39	-64.82	30.47	2090	-23.36	-21.14	-2.81	26.80
54	Tetramethrin II	0.05-0.2	-60.25	-49.43	-59.50	27.21	1.87	-21.39	-19.92	-1.84	24.87
55	Triazophos	0.05-0.2	-65.83	-53.54	-65.57	35.96	0.74	-26.45	-25.90	-0.74	34.96

ภาพที่ 1 แสดง calibration curve ของสารมาตรฐาน จำนวน 22 ชนิด ในสารละลาย matrix ใน คะน้ำมะเขือเทศ ส้ม ที่สามารถใช้เป็น matrix standard ที่แทนกันได้









ตารางที่ 3 %Recovery, HORRAT และ %RSD ของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์ จำนวน 37 ชนิด ในส้ม และคะน้า ที่ระดับ LOQ ใน Matrix Standard ส้ม และ Matrix Standard คะน้า ที่สามารถใช้เป็น Matrix Standard ที่ทดแทนกันได้ โดยวิธี Ethyl Acetate Method ด้วยเทคนิค GC-MS/MS (n=5)

No	สาร	Mean %Recovery				HORRAT				%RSD				%ME = ((slope Kale matrix/slope Orange) -1)x100	%ME = ((slope Orange matrix/slope Kale) -1)x100
		matrix std. in Kale		matrix std. in Orange		matrix std. in Kale		matrix std. in Orange		matrix std. in Kale		matrix std. in Orange			
		Orange		Kale		Orange		Kale		Orange		Kale			
		0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	Kale	Orange
1.	Acrinathrin	112	101	74	104	0.57	0.16	0.46	0.32	12.12	3.04	9.62	6.08	3.04	-2.95
2.	Bifenthrin	92	94	91	99	0.12	0.21	0.80	0.28	2.62	4.09	16.92	5.25	-1.75	1.79
3.	Cyhalothrin (lambda)	91	91	114	104	0.21	0.10	0.81	0.30	4.44	1.87	17.16	5.75	-5.82	6.18
4.	Cypermethrin II	117	116	77	68	0.38	0.48	0.86	0.34	8.09	9.14	18.14	6.53	1.47	-1.45
5.	Permethrin I	98	102	87	93	0.22	0.23	0.93	0.23	4.55	4.29	19.58	4.37	-3.30	3.41
6.	Permethrin II (trans)	98	96	97	93	0.20	0.39	0.48	0.19	4.23	7.51	10.18	3.67	6.05	-5.70
7.	Tefluthrin, cis-	84	90	98	104	0.14	0.27	0.65	0.29	2.96	5.15	13.79	5.60	0.35	-0.35
8.	Tetramethrin II	96	102	86	91	0.24	0.32	0.81	0.21	4.98	6.10	17.09	4.04	1.87	-1.84
9.	Transfluthrin	79	89	105	108	0.19	0.25	0.62	0.44	4.05	4.83	13.04	8.39	-0.82	0.83
10.	Bromophos	93	96	82	83	0.24	0.22	0.84	0.21	5.14	4.22	17.79	4.00	0.44	-0.43
11.	Bromophos-ethyl	90	90	99	103	0.17	0.16	0.66	0.19	3.68	2.97	14.01	3.63	-0.60	0.60
12.	Carbophenothion	103	93	89	89	0.09	0.70	0.89	0.27	1.99	13.25	18.73	5.15	-3.89	4.05
13.	Chlorpyrifos	90	92	89	93	0.30	0.22	0.75	0.24	6.37	4.11	15.83	4.49	-3.11	3.21
14.	Chlorpyrifos-methyl	85	90	89	93	0.24	0.20	0.75	0.24	5.07	3.84	15.83	4.49	-2.40	2.45
15.	Chlorthiophos	94	95	93	98	0.13	0.20	0.73	0.15	2.70	3.71	15.38	2.86	-3.20	3.31
16.	Diazinon	77	87	83	103	0.24	0.22	0.74	0.24	5.11	4.26	15.73	4.58	-0.20	0.20
17.	Disulfoton	83	87	83	100	0.24	0.13	0.79	0.27	4.97	2.41	16.79	5.18	-0.34	0.34
18.	Ethion	96	92	91	95	0.15	0.16	0.79	0.19	3.23	3.14	16.65	3.66	-1.86	1.89
19.	Fenitrothion	84	90	90	95	0.29	0.27	0.90	0.17	6.16	5.19	18.97	3.31	1.22	-1.21

No	สาร	Mean %Recovery				HORRAT				%RSD				%ME = ((slope Kale matrix/slope Orange) -1)x100	%ME = ((slope Orange matrix/slope Kale) -1)x100
		matrix std. in Kale		matrix std. in Orange		matrix std. in Kale		matrix std. in Orange		matrix std. in Kale		matrix std. in Orange			
		Orange		Kale		Orange		Kale		Orange		Kale			
		0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02
20.	Fenthion	85	91	88	99	0.28	0.23	0.91	0.19	5.90	4.41	19.28	3.56	-0.40	0.41
21.	Fonofos	68	79	109	117	0.16	0.20	0.60	0.24	3.42	3.88	12.76	4.50	-2.06	2.10
22.	Isazofos (Miral, Isazophos)	110	102	64	89	0.39	0.18	0.76	0.32	8.32	3.47	15.99	6.18	0.00	3.82
23.	Malathion	84	91	83	96	0.34	0.26	0.76	0.19	7.18	4.98	16.09	3.70	-5.49	5.81
24.	Methacrifos	76	87	79	98	0.26	0.23	0.66	0.26	5.55	4.37	13.86	5.01	-2.35	2.40
25.	Mevinphos	96	100	84	71	0.23	0.11	0.67	0.21	4.75	2.17	14.24	4.06	7.13	-6.66
26.	Parathion	93	86	74	91	0.25	0.30	0.92	0.18	5.33	5.68	19.37	3.34	1.45	-1.43
27.	Parathion-methyl	78	90	89	94	0.17	0.19	0.80	0.15	3.58	3.55	17.00	2.84	1.81	-1.78
28.	Phorate	78	83	90	108	0.29	0.19	0.51	0.22	6.20	3.59	10.70	4.13	2.38	-2.32
29.	Piperonyl butoxide	98	103	73	89	0.22	0.24	0.82	0.18	4.74	4.56	17.38	3.51	0.68	-0.67
30.	Pirimiphos-ethyl	80	86	95	104	0.29	0.17	0.69	0.34	6.16	3.26	14.62	6.43	-2.61	2.68
31.	Pirimiphos-methyl	81	90	89	101	0.23	0.22	0.80	0.15	4.83	4.20	16.85	2.91	-1.49	1.51
32.	Prothiofos	85	89	98	104	0.15	0.21	0.79	0.22	3.12	3.90	16.67	4.15	-3.70	3.84
33.	Ronnel (Fenchlorphos)	89	93	96	94	0.23	0.26	0.70	0.22	4.92	4.93	14.69	4.13	-0.58	0.58
34.	Sulfotep	81	85	87	105	0.15	0.25	0.62	0.16	3.17	4.68	13.13	2.96	0.12	-0.12
35.	Sulprofos	91	91	93	97	0.08	0.30	0.82	0.16	1.61	5.76	17.31	3.00	-4.26	4.45
36.	Terbufos	80	83	98	110	0.15	0.20	0.62	0.15	3.14	3.74	13.18	2.92	2.84	-2.76
37.	Tolclofos-methyl	83	88	95	102	0.16	0.22	0.65	0.16	3.42	4.13	13.65	3.10	-1.74	1.77



## 11. เอกสารอ้างอิง

ลักษณะิ เดชานุรักษ์นุกูล ศศิมา มั่งนิมิตร์ และวิทยา บัวศรี. 2553. การเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวิธีการ QuEChERS ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph โดยใช้ Analytical Protectants. การประชุมวิชาการประจำปี 2553 กรมวิชาการเกษตร.

Anastassiades, M., B. Tassdelen, , and E. Scherbaum, 2006. Investigations on the use of analyte protectants for multiresidue GC analysis. EPRW, Stuttgart, Germany,

CAC/GL 40-1993. Guideline on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis.

Codex Alimentarius. 1993. Pesticide Residues in Food, Volume 2, 2<sup>nd</sup> ed. FAO pp. 147-365

EURL-FV. 2010. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1. European Union Reference Laboratory for Pesticide Residue in fruits and Vegetables (EURL-FV). (<http://www.crl-pesticides.eu>)

Fialkov, A.B., U. Steiner, S.J. Lehotay, and A. Amirav. 2007. Sensitivity and noise in GC-MS: Achieving low limits of detection for difficult analytes. International Journal of Mass Spectrometry 260:31-48. doi:10.1016/j.ijms.2006.07.002.

Horwitz, W. 2000. The Potential Use of Quality Control Data to Validate Pesticide Residue Method Performance. In: Principle and Practice of Method Validation. A. Fajgeij and A. Ambrus (eds.), the Royal Society of Chemistry 2000, UK. 305 p.

Maštovská, K., S. J. Lehotay, and M. Anastassiades, 2005. Combination of Analyte Protectants to Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes. Analytical Chemistry, Vol. 77, No. 24, 8129-8137.

Rajski, L., A. Lozano, A. Uclés, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, 2013. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1304. 109.

SANTE/11945/2015. 2015. Guidance document on analytical quality control and validation procedure for pesticide residues analysis in food and feed. European Commission.