รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปี2563

1.ชุดโครงการวิจัย :วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

2.โครงการวิจัย :พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

3.ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย):การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดวัชพืช บิสไพริแบก-โซเดียม (bispyribac-sodium) อิมาซาพิก (imazapic) เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) และ เฮกซะซิโนน (hexazinone) ในธัญพืช

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ): Method Validation of bispyribac-sodium, imazapic, pendimethalin and hexazinone in grain

4.คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายปิยะศักดิ์ อรรคบุตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวชนิตา ทองแซม	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายวีระสิงห์ แสงวรรณ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง บิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) ทำการสกัดด้วยวิธี QuEChERS-one-step extraction /cleanup ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อน 4 วิธี ได้แก่ (1) เจือจางตัวอย่าง (2) PSA (3) C18 และ (4) $MgSO_4$ พบว่าวิธีกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ PSA ให้ค่าร้อยละการกลับคืนดีกว่าวิธีอื่น ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการโดยการใช้เทคนิค fortified sample สาร บิสไพริแบก-โซเดียม (bispyribac-sodium) อิมาซาพิก (imazapic) เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) และ เฮกซะซิโนน (hexazinone) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พารามิเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้แก่ Linearity, Range,

กรมวิชาการเกษตร

Accuracy, Precision, LOD และ LOQ ผลการวิเคราะห์พบว่า Linearity และ Range มีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดย Range ของการทดสอบอยู่ในช่วง 0.01-0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม การพิสูจน์ accuracy จากการหาค่า % recovery อยู่ในช่วง 69-118 เปอร์เซ็นต์ precision ของสารพิษตกค้างให้ค่า HORRAT ไม่เกิน 2 และ %RSD น้อยกว่า 20 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ สำหรับค่า LOD เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และLOQ เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Abstract

The validation of analytical methods for bispyribac-sodium, imazapic, pendimethalin and hexazinone in soybean using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS). Were extracted by QuEChERS-one-step extraction/cleanup method with comparing four the cleanup method; (A) dilution, (B) PSA, (C) C18, and (D) $MgSO_4$. The cleanup method by PSA gave better %recovery. The method was validated to using fortified sample material at different concentrations. The parameters tested include Linearity, Range, Accuracy, Precision, LOD and LOQ Linearity and Range The analysis showed that the correlation coefficient more than 0.995, which is considered acceptable by Range of testing in the range 0.01-0.2 mg/kg proven accuracy of the values in the range of 69-118% recovery percent precision of the residue to the HORRAT up to two and less than 20% RSD, which is the accepted standard for LOD score of 0.005 mg/kg. and LOQ was 0.01 mg/kg.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นหนึ่งในพืชผลทางการเกษตรที่สำคัญที่สุดในแง่ของการผลิตการใช้งานและคุณค่าทางโภชนาการสำหรับทั้งมนุษย์และสัตว์ พืชตระกูลถั่วนี้ยังเสริมสร้างดินที่มีไนโตรเจนผ่านกระบวนการทางชีวภาพโลก ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาพบว่ามีการปลูกถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นทั่วโลก เนื่องจากประชาชนตื่นตัวทางด้านสุขภาพนิยมบริโภคอาหารที่ทำมาจากถั่วเหลืองมากขึ้น มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตถั่วเหลือง วัชพืชเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของถั่วเหลืองสามารถทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองลดลงได้ถึง 40-80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการควบคุมวัชพืชในแปลง ปลูกถั่วเหลืองเพื่อลดการแข่งขันของวัชพืช การใช้สารกำจัดวัชพืช เป็นวิธีการหนึ่งที่เกษตรกรนิยมใช้กันมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายต่อการปฏิบัติ สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับการใช้แรงงานคนกำจัด โดยสารกำจัดวัชพืชที่ใช้มีทั้งประเภทใช้ก่อนวัชพืชงอกและประเภทหลังวัชพืชงอก สารกลุ่มกำจัดวัชพืชที่มีการแนะนำให้ใช้ คือสารบิสไพริแบก-โซเดียม (bispyribac-sodium)

อิมาซาพิก (imazapic) เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) และ เฮกซะซิโนน (hexazinone) เพื่อทำให้ได้ปริมาณผลผลิตที่มากขึ้น แต่ปัญหาที่ตามมาก็คือการตกค้างของสารกำจัดวัชพืช ในปัจจุบันต้องมีการตรวจสุขอนามัยพืชและสารพิษตกค้างในพืชอย่างเข้มงวด ก่อนส่งออกไปขายยังประเทศปลายทาง ดังนั้นหน่วยงานภาครัฐและบริษัทเอกชน จึงต้องปรับปรุงประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารพิษตกค้างลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการวิเคราะห์

เทคนิคการวิเคราะห์สารกลุ่มกำจัดวัชพืชในธัญพืชมีด้วยกันหลายวิธีขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารว่าจะวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี หรือเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี การวิเคราะห์สารพิษตกค้างนิยมใช้วิธีการสกัด original QuEChERS (Anastassides *et al* ., 2003) ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิกในข้าว เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในเมล็ดทานตะวัน ซึ่งจะประกอบด้วย ขั้นตอนการสกัด และขั้นตอนการขจัดสิ่งปนเปื้อนโดยใช้ PSA, C18, และการเจือจาง (Pareja *et al* ., 2011, Tamilselvan *et al* ., 2014, Rebelo *et al*., 2016, Dong *et al*., 2016) ในปี ค.ศ. 2017 มีการศึกษาวิธีการสกัดสารกลุ่มกำจัดวัชพืชในเมล็ดพืชน้ำมันด้วยวิธี QuEChERS-one-step extraction/cleanup เป็นการพัฒนาวิธีการโดยการเติมสารในขั้นตอนสกัดและขั้นตอนการขจัดสิ่งปนเปื้อนลงไปทำการสกัดพร้อมกันเป็นการลดเวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง (Kaczyński P.,2017)

จากงานวิจัยต่างๆที่ผ่านมา พบว่าขั้นตอนการสกัดและขจัดสิ่งปนเปื้อน ในวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในธัญพืชมีหลายวิธีแต่ยังไม่มีวิธีไหนที่ทำการวิเคราะห์ในถั่วเหลือง ซึ่งทางห้องปฏิบัติการวิจัยสารพิษตกค้างสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 4 ชนิดนี้ในถั่วเหลือง ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ให้เหมาะสม สะดวก รวดเร็ว และประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นข้อกำหนดตามมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการเพื่อขอรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ (Laboratory accreditation) ตามมาตรฐานสากล (ISO/IEC17025,2005) รับรองความสามารถสำหรับวิธีทดสอบ โดยต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามข้อกำหนดต่างๆ ที่ใช้ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีการ ได้แก่ Linearity/ Range, Accuracy, Precision, LOD และ LOQ (กนกพร และทิพวรรณ, 2547, ทิพวัน นิ่งน้อย, 2549) เพื่อเป็นการยืนยันถึงวิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ สามารถสอบกลับ ทำให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์

1.1 สารมาตรฐาน bispyribac-sodium, imazapic, pendimethalin และ hexazinone

1.2 สารเคมี ได้แก่ Acetonitrile (Merck, HPLC grade), Methanol (J.T. baker, HPLC grade), Water (J.T. baker, HPLC grade), Ammonium acetate, Formic acid 96%, magnesium sulfate anhydrous, sodium chloride, sodium citrate anhydrate, primary secondary amine (PSA) , C18

1.3 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง, เครื่องบดตัวอย่าง Retsch รุ่น GM300, vortex และ Centrifuge

1.4 เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ bottle ขนาด 250 mL, tube PTFE ขนาด 250 mL, กระบอกตวง ขนาด 10, 50 mL, volumetric pipette 10 mL, volumetric flask ขนาด 5, 10, 100, 1,000 mL, กรวยแก้ว และ centrifuge tube

1.5 เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) LC รุ่น 1290 infinity และ MS/MS รุ่น 6460 Triple Quad ยี่ห้อ Agilent Technologies

2. วิธีการเตรียมสารมาตรฐาน

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน สารมาตรฐาน บิสไพริแบก-โซเดียม (bispyribac-sodium) อิมาซาพิก (imazapic) เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) และ เฮกซะซิโนน (hexazinone) ที่มีความบริสุทธิ์ 98.0-99.9 % ใน aetonitrile ให้ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock standard solution ทำการ mixed standard ให้ได้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้น 10, 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียม clibration curve ทำการเจือจางจาก mixed standard 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย matrix ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์ สาร

คอลัมน์ Kinetex YMC pack pro C18, 150 x 4.6 mm. , 3 µm (Quantitation)
Mobile Phase A : 5mM ammonium acetate+0.01%formic acid in water
B : ACN
inject 5 µL flow 0.4 mL/min

Gradient :	time	%A	%B	Flow (mL/min)

กรมวิชาการเกษตร

00.01	90	10	0.4
00.50	90	10	0.4
06.00	5	95	0.4
07.00	5	95	0.4
08.00	90	10	0.4

สภาวะของเครื่อง MS/MS

Iornization mode : ESI

Polarity : Positive

Scan type : MRM

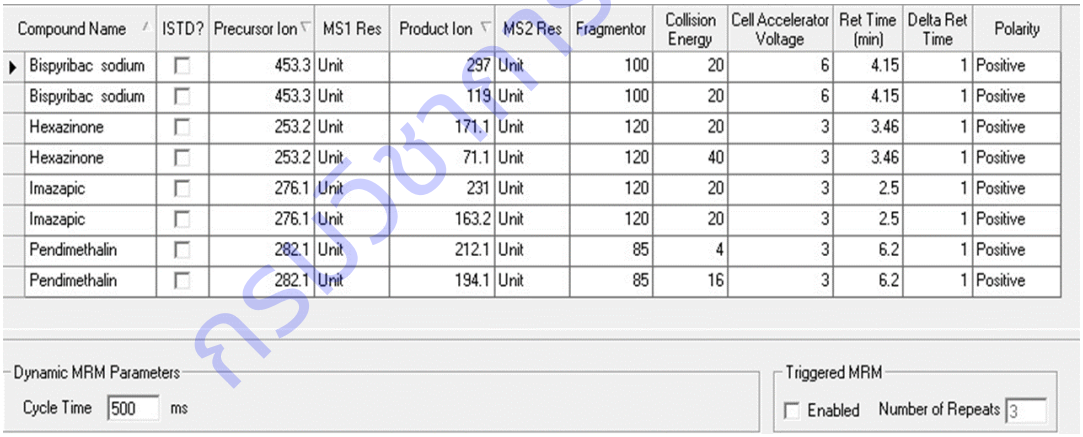
Resolution : Q1,Q3

Gas flow : 11 l/min

Nebulizer : 15 psi

Temperature : 300 °C

Capillary : 4000 V



Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Ret Time (min)	Delta Ret Time	Polarity
Bispyribac sodium	☐	453.3	Unit	297	Unit	100	20	6	4.15	1	Positive
Bispyribac sodium	☐	453.3	Unit	119	Unit	100	20	6	4.15	1	Positive
Hexazinone	☐	253.2	Unit	171.1	Unit	120	20	3	3.46	1	Positive
Hexazinone	☐	253.2	Unit	71.1	Unit	120	40	3	3.46	1	Positive
Imazapic	☐	276.1	Unit	231	Unit	120	20	3	2.5	1	Positive
Imazapic	☐	276.1	Unit	163.2	Unit	120	20	3	2.5	1	Positive
Pendimethalin	☐	282.1	Unit	212.1	Unit	85	4	3	6.2	1	Positive
Pendimethalin	☐	282.1	Unit	194.1	Unit	85	16	3	6.2	1	Positive

Dynamic MRM Parameters — Cycle Time 500 ms

Triggered MRM — ☐ Enabled Number of Repeats 3

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่1 แสดง parameter ต่างๆ ของ mass spectrometer ที่เหมาะสม

3. วิธีเตรียมตัวอย่าง

ถั่วเหลือง 1 กิโลกรัมใส่โถบด เติมไนโตรเจนเหลวลงไปคลุกให้เข้ากัน นำไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง Retsch รุ่น GM300 จนละเอียด

4.วิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์บิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนน เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างถั่วเหลือง ดังนี้

4.1ชั่งถั่วเหลือง 5 กรัมใส่ขวดตัวอย่างขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ 5 mLทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 10 mL 1% formic acid ใน acetonitrile เขย่าด้วยมือ 1 นาที หลังจากนั้น Vortex 1 นาที เติม 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g citrate dehydrate, 0.5 g sesquihydrate เขย่าด้วยมือ 1 นาที หลังจากนั้น Vortex 3 นาที นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 3500รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำมากรองผ่านเมมเบรนด์ PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่ขวดตัวอย่าง 5 mL ทำการลดสารปนเปื้อนด้วยวิธีต่างๆดังนี้

(A) วิธีการเจือจางสิ่งปนเปื้อน ทำการเจือจางตัวอย่าง 2 เท่า โดยดูดตัวอย่าง มา 0.5 mL และสารละลาย matrix ปริมาตร 0.5 mL ใส่ขวด vial

(B) วิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยการเติม สาร PSA 150 mg ลงไปพร้อมสารสกัด salts based

(C) วิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยการเติม สาร C18 150 mg ลงไปพร้อมสารสกัด salts based

(D) วิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนโดยการเติม สาร $MgSO_4$ 1 g ลงไปพร้อมสารสกัด salts based นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 3500รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ใส่ Vial นำไปไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

6. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (validation)

6.1 การหา range ทดสอบ reagent blank และ fortified sample 6 ความเข้มข้นๆ ละ 1 ซ้ำ ทำการสกัดในข้อ 5 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่าง ความเข้มข้นที่ fortified sample (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น

6.2 การหา Linearity ทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นใน range 5 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการสกัดในข้อ 5 นำค่าที่ได้ไป plot graph ระหว่างความเข้มข้นที่ fortified sample (แกน x) กับ response (แกน y) พิจารณาความสัมพันธ์เชิงเส้น จากค่า correlation coefficient, $R^2 \geq 0.995$

6.3 การหา Accuracy ทดสอบ reagent blank, sample blank(X_1) และ fortified sample (X_2) ที่ระดับความข้มข้น (Low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาลบกับ reagent blank และ sample blank นำไปประเมิน Accuracy

6.3.1) โดยการคำนวณ ร้อยละการได้กลับคืน จากสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{X2 - X1}{C}$$

โดยที่ C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

เกณฑ์การยอมรับ % recovery (SANCO, 2013) มีค่าอยู่ในช่วง 70 -120

6.4) การหา Precision

6.4.1) โดยการหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ ($\bar{x}$) จากการทดสอบ 10 ซ้ำ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (SD) นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย (%RSD)

กรมวิทยาศาสตร์

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

6.4.2) ทำการประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

$$\text{HORRAT (Horwitz' s Ratio)} = \frac{\%RSD}{\text{Predicted Horwitz RSD}}$$

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

c = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

หลักเกณฑ์การยอมรับของ precision คือมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

6.5 การหา LOD (Limit of detection, LOD) ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ประเมินค่า LOD โดย LOD เท่ากับ 3 × SD นำค่า LOD จากการคำนวณมา spike ในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ

6.6 การหา LOQ ทำการ fortified sample ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) ประเมินค่า LOQ โดย LOQ เท่ากับ 10 × SD ซึ่ง LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุอันตรายในตัวอย่างที่วิธีทอสอบสามารถตรวจพบ โดยให้ค่า accuracy ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

ระยะเวลา ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

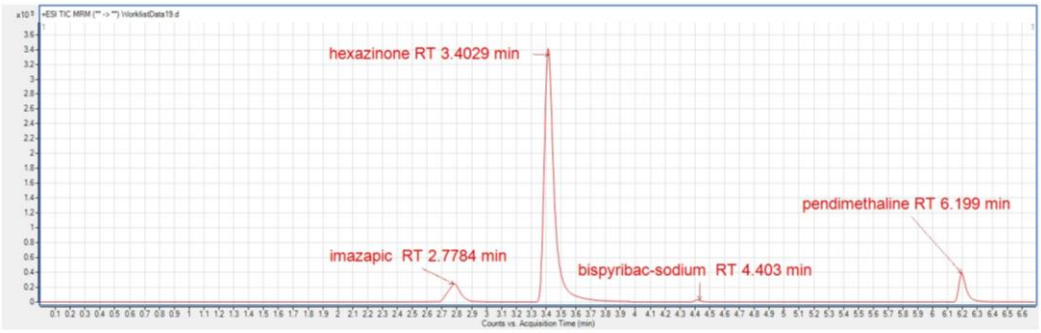
สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ บิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยทำการฉีดสารมาตรฐานที่ทำการผสมรวมกันทั้ง 4 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 0.20 ug/mL ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนน มีค่า retention time ที่ 4.422 2.753 6.191 และ 3.404 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่2



ภาพที่ 2 แสดงโครมาโตแกรมของสาร บิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน

8.2 ผลการศึกษาวิธีสกัดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ บิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน ในถั่วเหลือง

จากการทดลองสกัดตัวอย่างถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg (3 ซ้ำ) พบว่าการใช้วิธี original QuEChERS มาทดสอบด้วยวิธีการเติมสารสกัดและสารcleanup ลงในตัวอย่างพร้อมกัน เรียกว่า QuEChERS-one-step extraction/cleanup ผลการทดสอบมีดังนี้

8.2.1 การใช้สารละลาย matrix เจืองจางตัวอย่าง 2 เท่า ได้ % recovery ของสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน เท่ากับ 80 99 87 และ 97 ตามลำดับมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน อยู่ในช่วง 4-11

8.2.2 การใช้สาร PSA 150 mg ได้ % recovery ของสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน เท่ากับ 86 95 99 และ 103 ตามลำดับมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน อยู่ในช่วง 2-4

8.2.3 การใช้สาร C18 150 mg ได้ % recovery ของสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน เท่ากับ 77 98 88 และ 99 ตามลำดับมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน อยู่ในช่วง 6-8

8.2.4 การใช้สาร $MgSO_4$ 1 g ได้ % recovery ของสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน เท่ากับ 73 109 88 และ 108 ตามลำดับมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน อยู่ในช่วง 1-13

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธี พบว่า การสกัดด้วย QuEChERS-one-step extraction/cleanupโดยใช้ PSA ให้ %recovery ของสารทั้ง 4 อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้และมีความ

กรมวิชาการเกษตร

เบี่ยงเบนของวิธีน้อยกว่าวิธีอื่น ดังนั้นในการทำวิจัยจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบวิธีการการใช้ได้ของวิธี ดังตารางที่1

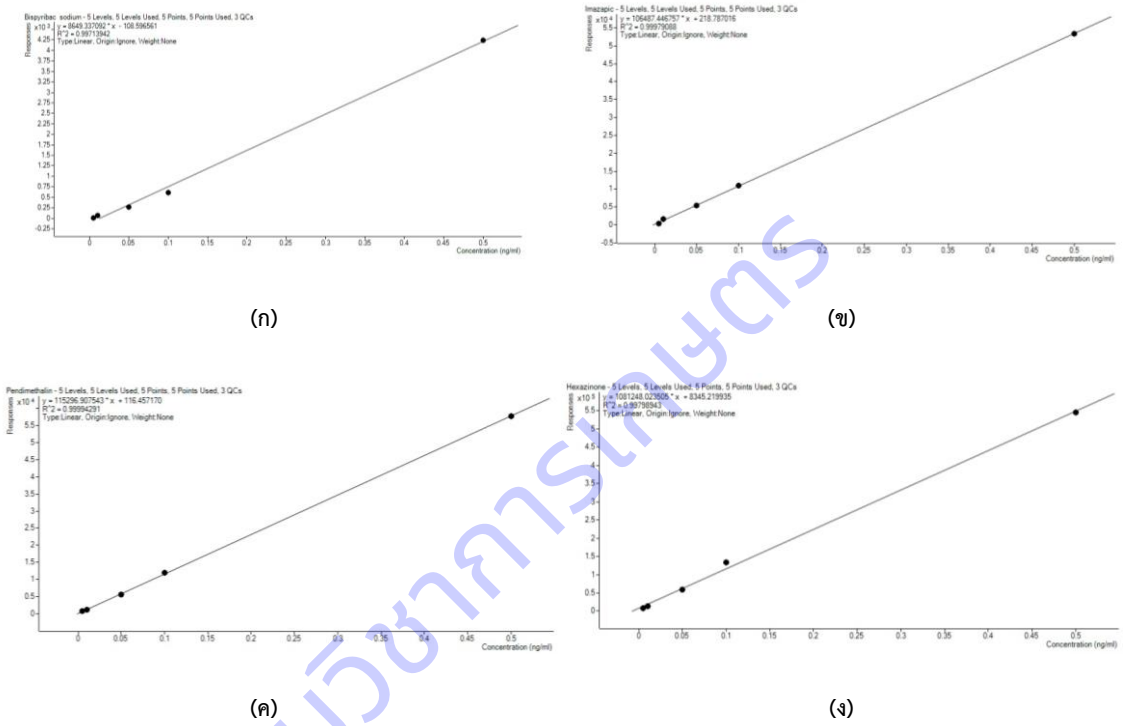
ตารางที่1 เปรียบเทียบวิธีการสกัดสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลินและ เฮกซะซิโนน ในตัวอย่างถั่วเหลืองทั้ง 4 วิธี ที่คว่ามเข้มข้น 0.01 mg/kg

วิธีสกัด	ชื่อสาร	Imazapic	Hexazinone	Pendimethalin	Bispyribac Sodium
A	%recovery Average	99	97	87	80
	SD	11	7	6	4
	%RSD	11	7	7	5
B	%recovery Average	95	103	99	86
	SD	3	2	4	3
	%RSD	3	2	4	4
C	%recovery Average	98	99	88	77
	SD	8	6	6	6
	%RSD	8	6	7	8
D	%recovery Average	109	108	88	73
	SD	10	14	1	1
	%RSD	9	13	2	1

กรมวิชาการเกษตร

8.3 ผลการศึกษาช่วงของการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ working range/ linearity

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในถั่วเหลือง พบว่ามี Range และ Linearity อยู่ในช่วง 0.005 – 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความสัมพันธ์เชิงเส้นมีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.99713942-0.99994291 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด R^2 = 0.990 ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3



(ก) (ข)

(ค) (ง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ภาพที่ 3 แสดงความเป็นเส้นตรงของสาร (ก) บิสไพริแบก-โซเดียม (ข) อิมาซาพิก (ค) เพนดิเมทาลิน และ (ง) เฮกซะซิโนน ในถั่วเหลือง

ตารางที่ 2 แสดงRange, Linearity, และ coefficient of determination (R^2) ของวิธีทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในถั่วเหลืองที่ 5 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ชื่อสาร	สมการเส้นตรง	ความเข้มข้น mg/kg	R^2
bispyribac-sodium	y=8649.337092x-108.596561	0.005-0.5	0.99713942
imazapic	y=106487.446757x+218.787016	0.005-0.5	0.99979088
pendimethalin	y=115296.907546x+116.457170	0.005-0.5	0.99994291
hexzinone	y=1081248.023505+8345.219935	0.005-0.5	0.99798943

8.4 ความแม่น (Accuracy)

ผลการทดสอบ accuracy ของวิธีการสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพดิเมทาลิน และเฮกซะซิโนนที่ fortified sample ตัวอย่างถั่วเหลือง 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01 0.05 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ผลเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืนได้n (%recovery) มีค่าระหว่าง 69-118 (ตารางที่ 3) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับของ SANCO

ตารางที่ 3 แสดง % recovery %RSD และ HORRAT ของวิธีทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในถั่วเหลืองที่ 4 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

ชื่อสาร			bispyribac-sodium	imazapic	pendimethalin	hexzinone
ความเข้มข้น n=10	0.01 mg/kg	%Rec	86.04	97.70	91.20	110.50
		%RSD	10.37	6.84	7.59	7.64
		HORRAT	0.32	0.21	0.24	0.24
		SD	8.28	6.68	6.92	7.75
	0.05 mg/kg	%Rec	72.98	81.94	79.42	78.92
		%RSD	4.48	9.80	6.93	6.53
		HORRAT	0.14	0.31	0.22	0.20
		SD	3.27	8.03	5.51	516
	0.1 mg/kg	%Rec	86.01	81.56	78.99	80.19
		%RSD	12.37	4.81	4.42	4.75
		HORRAT	0.55	0.21	0.20	0.21
		SD	10.64	3.92	3.49	3.81
	0.2 mg/kg	%Rec	83.27	86.79	87.50	87.56
		%RSD	5.04	2.64	4.82	4.28
		HORRAT	0.22	0.12	0.21	0.19
		SD	4.20	2.29	4.22	3.75

กรมวิชาการเกษตร

8.5 ความเที่ยง (precision)

ผลการทดสอบ Precision ได้ค่า %RSD ของสารบิสไพริแบก-โซเดีย อิมาซาพิก เพดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนมีค่า มีค่า %RSD ระหว่าง 4-12 2-6 4-7 และ 4-7 ตามลำดับ และมีค่า HORRAT ระหว่าง 0.92-1.64 (ตารางที่ 3) ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับโดยมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และเกณฑ์ยอมรับคือมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000)

8.6 ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการสกัด (limit of detection, LOD)

หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการทดสอบ 10 ซ้ำของการทดสอบ accuracy โดย LOD เท่ากับ 3 × SD ได้ค่า LOD จากการคำนวณสารวิธีทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในธัญพืชมีค่าเท่ากับ 0.003-0.006 และปรับค่า LOD จากการคำนวณ เป็น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 4 การประเมิน LOD ของวิธีทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และ เฮกซะซิโนนในถั่วเหลืองจากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ 10 ซ้ำ

ชื่อสาร	ความเข้มข้น (mg/kg)		SD	3SD	LOD
	fortified	Average Analyte			
bispyribac-sodium	0.01	0.009	0.00089	0.0026	0.005
imazapic	0.01	0.009	0.00069	0.0020	0.005
pendimethalin	0.01	0.010	0.00077	0.0023	0.005
hexzinone	0.01	0.010	0.000668	0.0020	0.005

กรมวิชาการเกษตร

8.7 ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการทดสอบ 10 ซ้ำ ของการทดสอบ accuracy โดย LOQ เท่ากับ 10 × SD ได้ค่า LOQ จากการคำนวณที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของ (ตารางที่ 4) ซึ่งมีค่า accuracy ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด (ภาคผนวก ก)

ตารางที่ 5 การประเมิน LOQ ของวิธีทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และเฮกซะซิโนนในในถั่วเหลืองจากการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดจากการทดสอบ10 ซ้ำ

ชื่อสาร	ความเข้มข้น (mg/kg)		SD	10SD	LOQ
	fortified	Average Analyte			
bispyribac-sodium	0.01	0.009	0.00089	0.0089	0.01
imazapic	0.01	0.009	0.00069	0.0069	0.01
pendimethalin	0.01	0.010	0.00077	0.0077	0.01
hexzinone	0.01	0.010	0.000668	0.0066	0.01

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างวิธีทดสอบสารบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และเฮกซะซิโนนในธัญพืช โดยใช้พืชตัวแทนคือ ถั่วเหลือง โดยทำการพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่างจากวิธี QuEChERS (2003) มาเป็นแบบ QuEChERS-one-step extraction /cleanup ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ LC-MS/MS ให้ผลการการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำด้วยการพิสูจน์ค่า accuracy และ precision โดยการวิเคราะห์ช่วงของการใช้งานอยู่ในช่วง 0.01-0.2 mg/kg มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.05 mg/kg และ 0.01 mg/kg ดังนั้นห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างจึงสามารถนำวิธีการวิเคราะห์ไปใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้างบิสไพริแบก-โซเดียม อิมาซาพิก เพนดิเมทาลิน และเฮกซะซิโนนในถั่วเหลืองได้

10. การนำไปใช้ประโยชน์

1.ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อนำไปใช้ในงานบริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างรวมทั้งใช้ในงานวิจัย

2.ใช้ในการขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

3.ถ่ายทอดวิธีการวิเคราะห์ให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8

4.เสนอผลงานวิจัยเพื่อให้ผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

11. คำขอบคุณ (-)

12. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method Validation เอกสารประกอบการฝึกอบรม. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว

สถาบันอาหาร. 2547. การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบทางเคมี เอกสารประกอบการฝึกอบรม. ณ โรงแรมมิราเคิล กรุงเทพฯ.

Anastassides, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., and Schenck, F.J. 2003. Fast and Easy Mulitiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/partitioning “Dispersive Solid-phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J. AOAC Int. 86, 412-131.

Dong X, Liang S, Shi Z, Sun H. Development of multi-residue analysis of herbicides in cereal grain by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. Food Chem. 2016 Jul 15;192:432–40.

European Commission (EC). 2000. Guidance Document on Residue Analytical Methods. SANCO/825/00 rev6 20/06/00.16p

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, U.K. 305p

ISO/IEC 17025. 2005. General Requirement for the Competener of Testing and Calibration Laboratories. 280.Kuet A.C.L. and L. Seng. 2004. Solid phase Extraction Clean up Method for the Determination of

กรมวิชาการเกษตร

Organophosphorus Pesticides in vegetables. Malaysian Journal of chemistry 6:029-038

Kaczyński P. Large-scale multi-class herbicides analysis in oilseeds by rapid one-step QuEChERS-based extraction and cleanup method using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Chem. 2017 Sep 1;230:411–22.

Pareja L, Cesio V, Heinzen H, Fernández-Alba AR. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. Talanta. 2011 Feb 15;83(5):1613–22.

Rebelo AM, Dolzan MD, Heller M, Deschamps FC, Abate G, Micke GA, et al. Simultaneous determination of herbicides in rice by QuEChERS and LC-MS/MS using matrix-matched calibration. J Braz Chem Soc. 2016 Jan 1;27(1):186–93.

SANCO. 2013. Guideance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.

Tamilselvan C, Joseph SJ, Angayarkanni V. Determination of Bispyribac Sodium 10% SC (Herbicide) Residue Level in Straw, Grain and Soil Using HPLC Method. Int Lett Nat Sci [Internet]. 2014;17(1):30–40. Available from: http://www.scipress.com/ILNS.17.30

ศรีนครินทร์

13. ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 เกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐาน การพิสูจน์ precision ของวิธีทดสอบโดยประเมินจาก %RSD และ HORRAT (European Commission EC, 2000)

Concentration	%RSD
10 ppm	7.58
1 ppm	10.72
0.1 ppm	15.16
0.01 ppm	21.44
0.001 ppm	30.32

เกณฑ์ประเมิน Precision

HORRAT < 2

กรมวิชาการเกษตร