

## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย -

2. โครงการวิจัยเดี่ยว

กิจกรรมที่ : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มโทลเฟนไพเรด (tolfenpyrad) และ ทีบูเฟนไพเรด (tebufenpyrad) ในมะเขือเทศ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)

Development of Method for Analysis of tolfenpyrad and tebufenpyrad in tomato by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	วีระสิงห์ แสงวรรณ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	ชนิตา ทองแซม	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างโทลเฟนไพเรด และ ทีบูเฟนไพเรดในมะเขือเทศ ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี/แมสสเปกโตรเมตรี ให้ได้สถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง โดยพัฒนาวิธีวิเคราะห์ QuEChERS multiresidue method พืชตัวแทนคือ มะเขือเทศ พริก และมะเขือเปราะ ดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ ผ่านเกณฑ์มาตรฐานดังนี้ ความเป็นเส้นตรง และช่วงของการวัด ของวิธีตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.005 - 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า  $R^2$  มากกว่า 0.995 และยืนยันผลการทดสอบด้วย ความแม่นยำ และความเที่ยงของทุกระดับความเข้มข้นผ่านเกณฑ์มาตรฐานกำหนด ความแม่นยำ (%recovery) ทุกระดับความเข้มข้น มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 70 - 120 % ความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้น 0.005 - 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม % RSD มีค่า  $\leq 20$  LOD มีค่าเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ LOQ มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

คำหลัก : โทลเฟนไพเรด, ทีบูเฟนไพเรด, LC-MS/MS

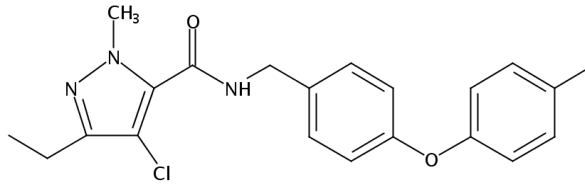
## Abstract

A Liquid Chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used to develop and validate the determination of tolfenpyrad and tebufenpyrad in tomato. Pesticide residue were determinate by developing analytical used to QuEChERS multiresidue method. Representative plant was Tomato, Chilli and Thai eggplant. As the results, Linearity and Range were 0.005 - 0.2 mg/kg. The correlation coefficient ( $R^2$ ) was more than 0.995. The recoveries (tolfenpyrad and tebufenpyrad) were range 70 - 120 %. Precision at the concentration level 0.005 - 0.5 mg/kg expressed as relative standard deviation (% RSD) values  $\leq 20$ . The limits of quantitation (LOQ) and the limits of detection (LOD) were 0.01 and 0.005 mg/kg respectively.

**Key - words :** tolfenpyrad, tebufenpyrad, LC-MS/MS

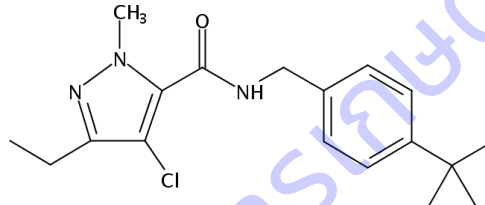
## 6. คำนำ

สินค้าเกษตรกรรมที่มีการซื้อขายกัน พบว่ามีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้น มีสารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนผสมมากกว่า 1,100 ชนิด ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในปัจจุบันต้องการความถูกต้อง และแม่นยำ มีความน่าเชื่อถือ ประกอบกับจะต้องมีความสะดวกรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ โดยจะต้องมีความเหมาะสมกับวัสดุและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการนั้น โทลเฟนไพเรต และทีบูเฟนไพเรต เป็นวัตถุมีพิษในกลุ่ม pyrazole ที่มีการขึ้นทะเบียนในประเทศไทยและใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ มีแนวโน้มว่าจะเป็นสารทดแทนสารเคมีในปัจจุบัน เนื่องจากออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงกับศัตรูพืช สารในกลุ่มนี้ที่เป็นสารกำจัดแมลง มีความเป็นพิษสูงต่อแมลงและมีความเป็นพิษต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ได้แก่ สาร chlorantraniliprole และสารที่เป็นสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่เริ่มมีการใช้กันมากขึ้น ได้แก่ สาร pyraclostrobin โทลเฟนไพเรต, ทีบูเฟนไพเรต เป็นกลุ่มสารเคมีที่มีกลไกออกฤทธิ์ที่ระบบหายใจ (Respiration) ของแมลง จัดกลุ่มตามกลไกการออกฤทธิ์ในกลุ่มที่ 21 จะยับยั้งขบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย คอมเพล็กซ์ที่ 1 (Mitochondrial complex 1 electron transport inhibitors) การออกฤทธิ์จัดในกลุ่มสารออกฤทธิ์ที่ขบวนการสร้างพลังงาน (Energy metabolism) ในกลุ่มนี้แยกเป็น 2 กลุ่มย่อย ตามองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ กลุ่ม 21A METI acaricide มีหลายชนิด ได้แก่ ฟินาซาควิน, เฟนไพร์ออคซีเมต, ไพริมีไดเฟน, ไพริดาเบน, ทีบูเฟนไพเรต และโทลเฟนไพเรต ในประเทศไทยมีการขึ้นทะเบียนเป็นทั้งสารป้องกันกำจัดแมลงและไร กลุ่ม 21B โรติโนน (Rotenone) มีเพียงชนิดเดียวคือ โรติโนน



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ tolfenpyrad

สูตรโมเลกุล คือ  $C_{21}H_{22}ClN_3O_2$  มีน้ำหนักโมเลกุล 527.8 ใช้ป้องกันและกำจัดหนอนใยผักได้ทุกระยะ ในค่น้ำ ส้มเขียวหวาน กำจัดด้วงหมัดผักแถบภายในผักกาดหัว เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ และเพลี้ยไก่แจ้ส้ม



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ tebufenpyrad

สูตรโมเลกุล คือ  $C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$  มีน้ำหนักโมเลกุล 527.8 ป้องกันและกำจัดไรในไม้ผล พืชไร่ ไม้ดอกไม้ประดับ เช่น ส้มเขียวหวาน มันสำปะหลัง ทุเรียน มะละกอ กัลยไม้ เป็นต้น กำจัดไรได้ทุกระยะ ทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ในการทดลองตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างโทเลเฟนไพเรด และทีบูเฟนไพเรดในตัวอย่าง อ้างอิงตาม EURACHEM Guide, 1998 และ NATA Technical Note 17, 2009 ได้ให้แนวทางไว้ ดังนี้ ความแม่นยำ (Accuracy) เป็นคุณลักษณะที่ชี้ว่าผลการทดสอบมีค่าใกล้เคียงค่าจริงหรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ เนื่องในทางปฏิบัติยากที่จะทราบค่าจริง จึงใช้วิธีเปรียบเทียบกับค่าที่ยอมรับแทน เป็นคุณลักษณะที่แสดงถึงความสอดคล้องกับค่าจริง โดยทั่วไปการตรวจสอบ accuracy ของวิธี ทำได้ 2 แบบคือ การเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ (reference value) และการตรวจสอบค่าคืนกับ (recovery test) กรณีไม่มีวัสดุอ้างอิง เป็นการตรวจ accuracy โดยการเติมสารที่วิเคราะห์ซึ่งเป็นสารมาตรฐานและรู้ค่าที่แน่นอน ปริมาณน้อยลงไป (spike/fortified sample) แล้ววิเคราะห์ และคำนวณหาค่า %recovery ความเที่ยง (Precision) เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถในการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำหลายครั้งแล้วให้ผลใกล้เคียงกัน หรือ หมายถึง การวิเคราะห์นั้นให้ผลที่ใกล้เคียงเมื่อทำด้วยวิธีเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่ใกล้เคียงกัน มักแสดงในรูปของค่าเบี่ยงเบน (Standard Deviation; s หรือ SD) หรือค่าความแปรปรวน (Variance;  $s^2$ ) หรือสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation; CV) หรือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation; RSD)

อย่างไรก็ตาม ความเที่ยงไม่ได้บอกถึงความถูกต้องของผลวิเคราะห์ แต่ชี้ว่าการวิเคราะห์นั้นมีความสม่ำเสมอ เที่ยงตรงในระดับใดเมื่อมีการวิเคราะห์ซ้ำ ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection; LOD) หมายถึง ปริมาณ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างถูกต้องได้ (ไม่จำเป็นต้องพิสูจน์ ความแม่นยำ (accuracy) และ ความเที่ยง (precision) คุณลักษณะข้อนี้จำเป็นต้องมีในกรณีที่วัดสารปริมาณน้อยมาก ๆ มีการรายงานว่าไม่พบในตัวอย่าง และจำเป็นต้องรายงานค่า Limit of Detection; LOD ด้วย ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) คือปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ ซึ่งสามารถหาปริมาณได้โดยมี accuracy และ precision ที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ ดังนั้น Limit of Quantitation; LOQ จึงเป็น คุณสมบัติของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความสามารถของวิธีที่สามารถรายงานผลที่ความเข้มข้นต่ำสุดมี accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ โดยทั่วไป LOQ จะมีค่าเป็น 3 เท่าของ LOD หรือประมาณ 10 เท่าของส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน แต่บางกรณี LOQ อาจมากกว่าหรือน้อยกว่า 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ก็ได้ ขึ้นอยู่กับแต่ละเทคนิคของการวิเคราะห์ และนำผลมาตรวจสอบ accuracy พิจารณาปรับใช้ตามความเหมาะสม ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) เป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วน โดยตรง ระหว่างปริมาณที่ทราบค่ากับปริมาณจากการวัด/วิเคราะห์ จำเป็นต้องตรวจสอบสำหรับวิธีที่มีช่วงการ วิเคราะห์หรือช่วงการใช้งานที่กว้าง โดยทั่วไป การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากสัดส่วนโดยตรงระหว่าง สัญญาณจากเครื่องมือวัด (respond) และความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งาน โดยใช้กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ตามทฤษฎีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกับสัญญาณจากเครื่องมือเป็นเส้นตรง ในการหา ปริมาณความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเครื่องมือเกี่ยวข้องกับ sensitivity อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ไม่ใช่คุณสมบัติเชิงปริมาณ หากการตรวจสอบพบว่าความสัมพันธ์ไม่เป็นเส้นตรง อาจสามารถแก้ไขด้วยสมการอื่น หรือกำหนดช่วงให้แคบลงที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ช่วงความเข้มข้นที่วิเคราะห์หรือช่วงการใช้งาน (Working range) หมายถึงขอบข่ายของการวิเคราะห์หรือช่วงการใช้งานหรือช่วงการวัด เป็นช่วงของความเข้มข้นที่วิธีนั้นๆ จะใช้วิเคราะห์ได้ โดยมี accuracy และ precision ที่อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด โดยต้องดำเนินการตรวจสอบ accuracy และ precision อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น คือ ต่ำ กลาง และสูง ครอบคลุมช่วงการใช้งาน

## 7. วิธีดำเนินการ

### 7.1 อุปกรณ์

#### 7.1.1 เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุที่มีพิษ เครื่องมือตรวจวัด

วัตถุที่มีพิษชนิด Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ต่อกับเครื่อง Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

เครื่อง LC-MS/MS ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1290 หัวตรวจวัดชนิด QQQ Mass Spectrophotometer คอลัมน์ (HPLC Column) คือ Kinetex 2.6u XB-C18 100A 100 x 2.1 mm

1) Drying gas 12 L/min 350°C

2) Nebulizer gas 60 psi

3) Mobile phase A: 5 mM AF + 0.01%FA

4) Mobile phase B: Acetonitrile

5) Flow rate 0.3 mL/min

6) Sample size 2.00 uL

7.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ มีดหั่นตัวอย่างพร้อมเขียง และภาชนะบรรจุตัวอย่าง

7.1.3 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ และวัสดุวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

7.1.4 เครื่องชั่งชนิดหยาบและละเอียด

7.1.5 เครื่องสับตัวอย่าง (Food Processor)

7.1.6 เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง

7.2 สารเคมี ได้แก่

7.2.1 สารมาตรฐาน tolfenpyrad 99.39 % เตรียมสารละลายมาตรฐานด้วยตัวทำละลาย Acetonitrile

7.2.2 สารมาตรฐาน Tebufenpyrad 99.90 % เตรียมสารละลายมาตรฐานด้วยตัวทำละลาย Acetonitrile

7.2.3 Acetonitrile

7.2.4 Extract powder; Magnesium sulphate anhydrous, sodium chloride, 1 g trisodium citrate dehydrate และ disodium hydrogencitrate sesquihydrate

7.4.5 สารกำจัดสิ่งปนเปื้อน; GCB, PSA, และ MgSO<sub>4</sub>

7.3 วิธีการ

7.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน tolfenpyrad 99.39 % และสารละลายมาตรฐาน Tebufenpyrad 99.90 % ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1,000 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย acetonitrile และนำสารมาตรฐานที่เตรียมแล้วมา Mixed เพื่อใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานและ spike ลงในตัวอย่าง

7.3.2 เตรียมตัวอย่างมะเขือเทศ น้ำหนัก 2 กิโลกรัม ล้างสะอาด ผึ่งให้แห้ง เด็ดขั้วก้านผลมะเขือเทศ ออกหั่นเป็นชิ้นเล็กๆเท่าๆกัน นำไปใส่ไว้ในตู้แช่แข็งประมาณ 1 คืน นำมาปั่นผสมละเอียดด้วยเครื่องสับตัวอย่าง (Food Processor) โดยเติมไนโตรเจนเหลวในอัตราส่วนประมาณ 1:1 ปั่นตัวอย่างจนได้ผงละเอียดเท่าๆกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

7.3.3 เตรียมความพร้อมของเครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS

ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทกราฟี โดยเตรียมสารละลายผสม ที่บูเฟนไพเรต และ โทลเฟนไพเรต ในตัวทำละลาย อะซีโตนไนไตรล์ ทดสอบฉีดสารผสมที่ระดับความเข้มข้น 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสถานะของเครื่องดังนี้

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent 1290 HPLC

HPLC Column: Kinetex 2.6um XB-C18 100A° LC column 100 x 2.1 mm.

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

Mobile phase B: acetonitrile ( LCMS grade )

Flow: 0.30 mL/min, Total run time: 14.00 min, posttime: 2.00 min

อัตราส่วนผสมของ Mobile phase แบบ Gradient

เวลา (นาที)	อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	สารละลาย A (เปอร์เซ็นต์)	สารละลาย B (เปอร์เซ็นต์)
0.00	0.30	95	5
1.00	0.30	95	5
2.00	0.30	45	55
8.00	0.30	45	55
11.00	0.30	20	80
12.00	0.30	20	80
14.00	0.30	95	5

สภาวะเครื่อง MS

Positive mode

Gas temp. 350°C

Gas flow 12 L/min

Nebulizer 60

Capillary 4000 v

Time Segment

Compound	Precursor ion	Product ion	Dwell time	Fragmentor (V)	Collision energy (V)
tolfenpyrad	384.15	197.1	100	120	20
tolfenpyrad	384.15	171.1	100	120	20
tebufenpyra	334.17	145.1	100	175	24
tebufenpyra	334.17	117.0	100	175	32

จากการทดสอบที่สภาวะดังกล่าว tolfenpyrad มีค่า retention time ที่ 10.1 นาที

tebufenpyra มีค่า retention time ที่ 10.3 นาที

7.3.4 ทดสอบวิธีสกัดสารผสม tolfenpyrad และ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศ 2 วิธีทดสอบ

คือ สกัดด้วยวิธี EN QuEChERS (Anastassiades *et al.*, 2003) และ สกัดด้วยวิธี SweEt method

1.) สกัดด้วยวิธี EN QuEChERS ซึ่งตัวอย่างมะเขือเทศ 10 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg (ทำ 6 ซ้ำ) จากนั้นเติม Acetonitrile 10 ml ปิดฝาเขย่าด้วยมือ ประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ 4g MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 1g tri-sodium citrate dehydrate และ 0.5 d di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 5 ml เติมสารผสมของ 125 g PSA, 250 mg MgSO<sub>4</sub>, และ 50 mg GCB vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใส 1 ml ผ่าน PTFE syringe filter ขนาด 0.2 um ลงใน vial ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย 10 ul 5% formic acid นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

2.) สกัดด้วยวิธี SweEt method ซึ่งตัวอย่างมะเขือเทศ 10 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg (ทำ 6 ซ้ำ) จากนั้นเติม Ethyl Acetate 20 ml ปิดฝาเขย่าด้วยมือ ประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ 3 g sodium hydrogen carbonate, 10 g sodium sulphate เขย่าด้วยมือ ประมาณ 1 นาที นำไป ultrasonic นาน 3 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 35°C จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm 3 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใส 2 ml ลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 ml ระบายแห้งด้วย nitrogen gas แล้วปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile 2 ml กรองสารละลายส่วนที่ใส 1 ml ผ่าน PTFE syringe filter ขนาด 0.2 um ลงใน vial ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย 10 ul 5% formic acid นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ นำวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด มาตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธี ( method performance characteristic ) โดยเลือกสกัดด้วยวิธี EN QuEChERS

1.) working range

Spike สารละลายมาตรฐานผสมลงในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 และ 0.2 mg/kg ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำไปสกัดตามกรรมวิธี และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างบนแกน x ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง พิจารณาช่วงเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( Coefficient of Determination; R<sup>2</sup>)

2.) linear range

Spike สารละลายมาตรฐานผสมลงในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 และ 0.2 mg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปสกัดตามกรรมวิธี และตรวจ



วิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างบนแกน x ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง พิจารณาช่วงเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R<sup>2</sup>)

### 3.) ศึกษา matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเทศ

ผลการทดสอบ matrix effect จากการนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัด standard in matrix และ standard in solvent มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้ พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างบนแกน x จากนั้นนำความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in matrix และความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in solvent มาคำนวณหา %ME จากสูตรด้านล่าง

$$\%ME = \frac{X1 - X2}{X2} \times 100$$

โดยที่ X1 = ความชันของ standard in matrix

X2 = ความชันของ standard in solvent

### 4.) การตรวจสอบความแม่นยำ (accuracy) และ ความเที่ยง (precision)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ Spike สารละลายมาตรฐานผสมลงในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.05, 0.01, 0.1 และ 0.2 mg/kg ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ นำไปสกัดตามกรรมวิธี และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ประเมินค่าความแม่นยำ จาก %recovery ของสารที่วิเคราะห์ได้ เกณฑ์การยอมรับคือ 70-120% (SANCO,2013) ประเมินค่าความเที่ยง จากการคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ

$$\% RSD = (SD / \bar{X}) \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับคือมีค่า % RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (SANCO, 2013)

7.3.6 เพิ่มตัวอย่างพืชชนิดอื่นมาทดสอบวิธีวิเคราะห์ โดยเลือกจากเกณฑ์การจัดกลุ่มสินค้าเกษตรมะเขือเทศถูกจัดกลุ่มอยู่ในประเภทที่ 1 กลุ่มผลไม้ กลุ่มหลัก 012 ผักบรีโกคผล นอกเหนือจากตระกูลแตง (fruiting vegetables, other than cucurbits) สินค้าเกษตรกลุ่มนี้ ใช้รหัส VO 0050 (มาตรฐานสินค้าเกษตร มกอช.,2559) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อย 012A มะเขือเทศเป็นพืชหลัก (major crop) กลุ่มย่อย 012B พริกและสินค้าเกษตรที่คล้ายพริก เลือกตัวอย่างเป็นพริกชี้ฟ้ามาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และกลุ่มย่อย 012C มะเขือและสินค้าเกษตรที่คล้ายมะเขือ จากนั้นดำเนินการเตรียมตัวอย่างพริกชี้ฟ้า น้ำหนัก 2 กิโลกรัม ล้างสะอาด ผึ่งให้แห้ง เด็ดขั้วก้านพริก นำไปใส่ไว้ในตู้แช่แข็งประมาณ 1 คืน นำออกมาปั่นด้วยเครื่องสับตัวอย่าง (Food Processor) โดยเติมไนโตรเจนเหลวในอัตราส่วนประมาณ 1:1 ปั่นตัวอย่างจนได้ผงละเอียดเท่าๆกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

#### 1.) ผลการศึกษา matrix effect ในตัวอย่างพริก

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมโทลเฟนไพเรด (tolfenpyrad) และ ทีบูเฟนไพเรด (tebufenpyrad) ในสารละลายจากการสกัดตัวอย่างพริก (standard in matrix) และในตัวทำละลายอะซีโตนไตรรล์ (standard in solvent) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 และ 0.2 mg/kg ความ



เข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัด standard in matrix และ standard in solvent มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างบนแกน x จากนั้นนำความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in matrix และความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in solvent มาคำนวณหา %ME จากสูตรด้านล่าง

$$\%ME = \frac{X1 - X2}{X2} \times 100$$

โดยที่ X1 = ความชันของ standard in matrix

X2 = ความชันของ standard in solvent

## 2.) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.1) สกัดตัวอย่างด้วยวิธี EN QuEChERS ซั่งตัวอย่างพริก 10 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 mg/kg (ทำ 10 ซ้ำ) จากนั้นเติม Acetonitrile 10 ml ปิดฝา เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ 4g MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 1g tri-sodium citrate dehydrate และ 0.5 d di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 6 ml เติมสารผสมของ 150 g PSA, 885 mg MgSO<sub>4</sub>, และ 15 mg Envicarb ปิดฝา vortex 30 วินาที เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใส 1 ml ผ่าน PTFE syringe filter ขนาด 0.2 um ลงใน vial ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย 10 ul 5% formic acid นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ประเมินค่าความแม่นยำ จาก %recovery ของสารที่วิเคราะห์ได้ เกณฑ์การยอมรับคือ 70-120% (SANCO,2013) ประเมินค่าความเที่ยง จากการคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากสมการ

$$\% RSD = (SD / \bar{X}) \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับคือมีค่า % RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (SANCO, 2013)

7.3.7 เพิ่มตัวอย่างพืชชนิดอื่นมาทดสอบวิธีวิเคราะห์ โดยเลือกจากเกณฑ์การจัดกลุ่มสินค้าเกษตร ในประเภทที่ 1 กลุ่มผลไม้ กลุ่มหลัก 012 ผักบริโภคผล นอกเหนือจากตระกูลแตง (fruiting vegetables, other than cucurbits) คือ มะเขือเปราะ ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ มะเขือเทศ และพริก จากนั้นดำเนินการเตรียมตัวอย่างมะเขือเปราะ น้ำหนัก 2 กิโลกรัม ล้างสะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปใส่ไว้ในตู้แช่แข็งประมาณ 1 คืน นำออกมาปั่นด้วยเครื่องสับตัวอย่าง (Food Processor) โดยเติมไนโตรเจนเหลวในอัตราส่วนประมาณ 1:1 ปั่นตัวอย่างจนได้ผงละเอียดเท่าๆกัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

### 1.) การศึกษา matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเปราะ

1.1) สกัดตัวอย่างด้วยวิธี EN QuEChERS (Anastassiades, et al., 2008) ซั่งตัวอย่างมะเขือเปราะ 10 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml จากนั้นเติม Acetonitrile 10 ml ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ 4g MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 1g tri-sodium citrate dehydrate และ 0.5 d di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm 5 นาที

จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 6 ml เติมสารผสมของ 150 g PSA, 885 mg MgSO<sub>4</sub>, และ 15 mg Encicarb ปิดฝา vortex 30 วินาที เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาทีจากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่าน PTFE syringe filter เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา

1.2) เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมโทลเฟนไพเรด (tolfenpyrad) และ ทีบูเฟนไพเรด (tebufenpyrad) ในสารละลายจากการสกัดตัวอย่างมะเขือเปราะ ข้อ 1.1 (standard in matrix) และในตัวทำละลายอะซีโตไนไตรล์ (standard in solvent) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 และ 0.2 mg/kg ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัด standard in matrix และ standard in solvent นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างเป็นบนแกน x จากนั้นนำความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in matrix และความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in solvent มาคำนวณหา %ME จากสูตรด้านล่าง

$$\%ME = \frac{X1 - X2}{X2} \times 100$$

โดยที่ X1 = ความชันของ standard in matrix

X2 = ความชันของ standard in solvent

2.) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างเป็นมะเขือเปราะที่ระดับความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 mg/kg

สกัดตัวอย่างด้วยวิธี EN QuEChERS (Anastassiades, et al., 2008) ซ้ำตัวอย่างมะเขือเปราะ 10 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 ml จากนั้นเติม Acetonitrile 10 ml ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ 4g MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 1g tri-sodium citrate dehydrate และ 0.5 d di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 6 ml เติมสารผสมของ 150 g PSA, 885 mg MgSO<sub>4</sub>, และ 15 mg Encicarb ปิดฝา vortex 30 วินาที เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาทีจากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,500 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่าน PTFE syringe filter เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา

#### ระยะเวลา

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

### 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ผลทดสอบวิธีสกัดสารผสม tolfenpyrad และ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศ 2 วิธีทดสอบ คือ สกัดด้วยวิธี EN QuEChERS และสกัดด้วยวิธี SweEt method

ตารางที่ 1 %Recovery ของการทดสอบวิธีวิเคราะห์ tolfenpyrad ในมะเขือเทศ 2 วิธีทดสอบ ความเข้มข้น 0.10 mg/kg

## Tolfenpyrad

method	%Recovery						min	max
	1	2	3	4	5	6		
QuEChERS	82	82	79	81	83	93	79	93
SweEt	70	68	70	70	67	66	67	70

ตารางที่ 2 %Recovery ของการทดสอบวิธีวิเคราะห์ tebufenpyrad ในมะเขือเทศ ความเข้มข้น 0.10 mg/kg

## Tebufenpyrad

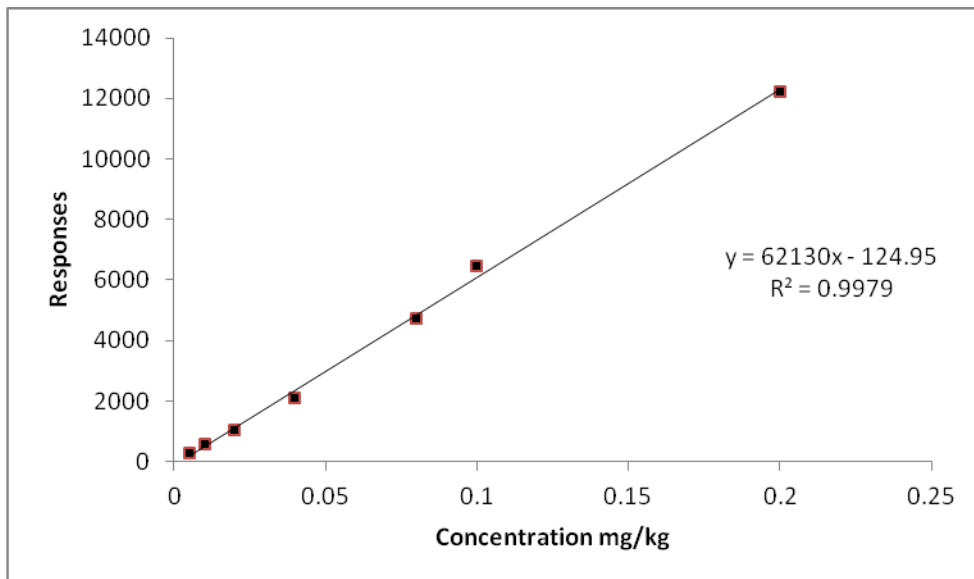
method	%Recovery						min	max
	1	2	3	4	5	6		
QuEChERS	89	91	90	93	91	95	89	95
SweEt	70	68	69	67	66	62	62	70

นำวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดมาตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธี (method performance characteristic ) โดยเลือกการวิเคราะห์ tebufenpyrad และTebufenpyrad ในมะเขือเทศ ด้วยวิธี EN QuEChERS

## 8.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ working range

ตารางที่ 3 พื้นที่ใต้พีคที่ 7 ระดับความเข้มข้น tolfenpyrad ในตัวอย่าง

Fortified (mg/kg)	Responses
0.005	270.54
0.01	571.37
0.02	1060.8
0.04	2086.2
0.08	4739.2
0.1	6448.4
0.2	12218

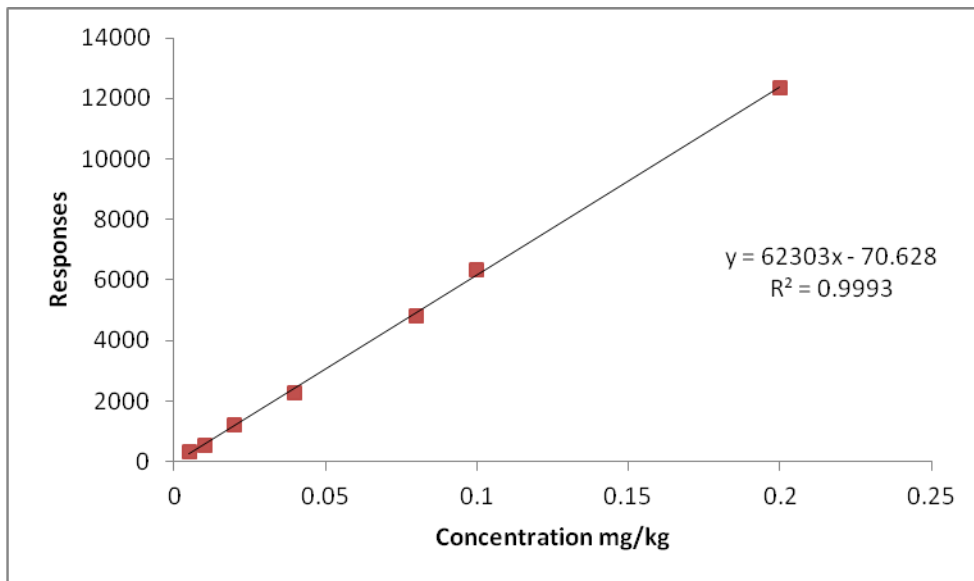


ภาพที่ 1 Coefficient of Determination; ( $R^2$ ) ของสารละลายมาตรฐาน tolfeipyrad

พบว่าสามารถตรวจสอบสาร tolfeipyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศได้ตั้งแต่ในช่วง 0.005 – 0.2 mg/kg มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9979 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 4 พื้นที่ใต้พีคที่ 7 ระดับความเข้มข้น tebufenpyrad ในตัวอย่าง

Fortified (mg/kg)	Responses
0.005	304.89
0.01	536.66
0.02	1218.4
0.04	2256.5
0.08	4823.7
0.1	6359.3
0.2	12354

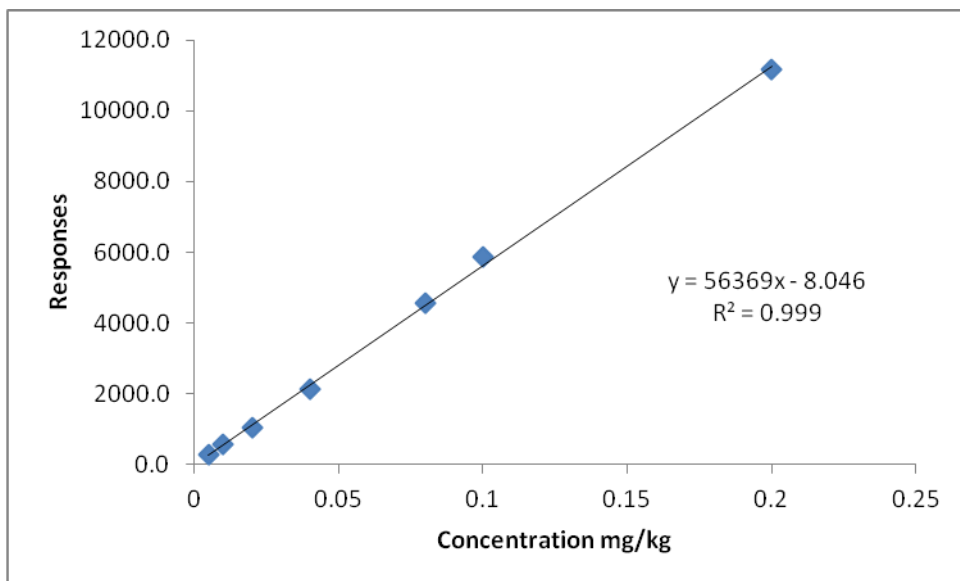


ภาพที่ 2 Coefficient of Determination; ( $R^2$ ) ของสารละลายมาตรฐาน tebufenpyrad

พบว่าสามารถตรวจสอบสาร tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศได้ตั้งแต่ในช่วง 0.005 – 0.2 mg/kg มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9993 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ linear range  
ตารางที่ 5 พื้นที่ใต้พีคที่ 7 ระดับความเข้มข้น tolfenpyrad ในตัวอย่าง

Fortified (mg/kg)	Responses			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
0.005	270.54	251.55	302.28	274.8
0.01	571.37	567.51	542.82	560.6
0.02	1060.8	1081.2	1011.1	1051.0
0.04	2086.2	2093.8	2175.1	2118.4
0.08	4739.2	4571.6	4417.4	4576.1
0.1	6448.4	5314.7	5805.5	5856.2
0.2	12218	10615	10630	11154.3

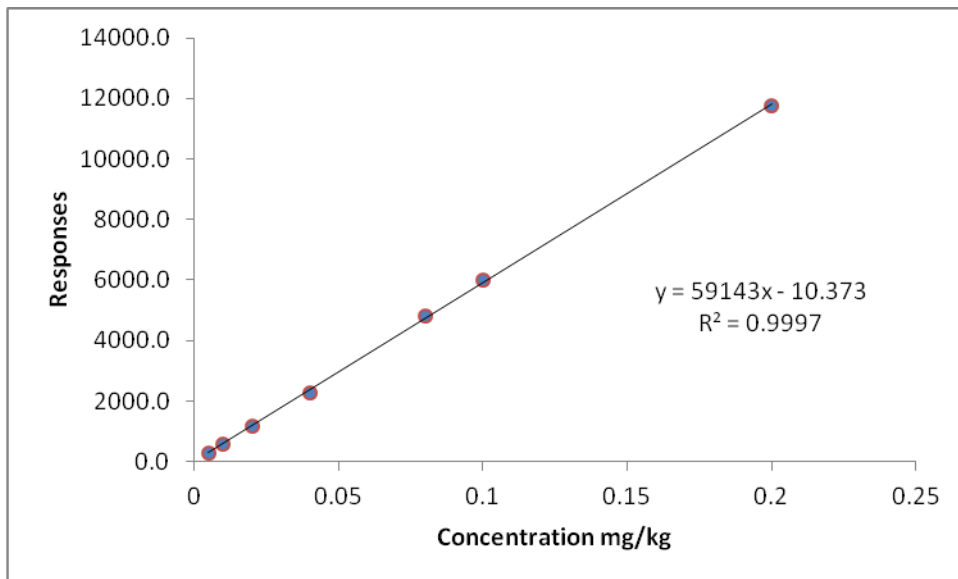


ภาพที่ 3 Coefficient of Determination; ( $R^2$ ) ของสารละลายมาตรฐาน tolfenpyrad

พบว่าสามารถตรวจสอบสาร tolfenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศได้ตั้งแต่ในช่วง 0.005 – 0.2 mg/kg มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.999 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

ตารางที่ 6 พื้นที่ใต้พีคที่ 7 ระดับความเข้มข้น tebufenpyrad ในตัวอย่าง

Fortified (mg/kg)	Responses			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
0.005	304.89	280.51	254.46	280.0
0.01	536.66	574.34	598.92	570.0
0.02	1218.4	1141.8	1146.1	1168.8
0.04	2256.5	2350	2159.6	2255.4
0.08	4823.7	4936.8	4654.7	4805.1
0.1	6359.3	5626.8	6018.2	6001.4
0.2	12354	11532	11385	11757.0



ภาพที่ 4 Coefficient of Determination; ( $R^2$ ) ของสารละลายมาตรฐาน tebufenpyrad

พบว่าสามารถตรวจสอบสาร tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศได้ตั้งแต่ในช่วง 0.005 – 0.2 mg/kg มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9997 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.4 ผลของ matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเทศ ด้วยวิธีวิเคราะห์ EN QuEChERS

ตารางที่ 7 ผลการศึกษา matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเทศ

Compound Name	slope		%ME	Matrix effect
	standard in matrix	standard in solvent		
tolfenpyrad	70935.51	70818.79	0.16	not different
tebufenpyrad	51734.58	52018.6	-0.55	not different

ค่า %ME ของสารทั้งสองมีค่าน้อยกว่า 10% แสดงว่าความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน (NATA, 2018) คือไม่เกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง



8.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ความแม่นยำ (accuracy) และ ความเที่ยง (precision)

ตารางที่ 8 ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์ tolfenpyrad ในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Fortification level (mg/kg)	Commodity	Type of Recovery	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	Average Recovery (Standard Deviation) (%)	%RSD
0.005	tomato	MV	0.0040	80	94.50±9.37	12.60
		MV	0.0039	78		
		MV	0.0040	80		
		MV	0.0043	86		
		MV	0.0044	88		
		MV	0.0035	70		
		MV	0.0032	64		
		MV	0.0048	96		
0.01	tomato	MV	0.0081	81	90.75±9.92	9.73
		MV	0.0080	80		
		MV	0.0077	77		
		MV	0.0077	77		
		MV	0.0101	101		
		MV	0.0090	90		
		MV	0.0088	88		
		MV	0.0081	81		
0.05	tomato	MV	0.0398	80	91.35±4.00	13.47
		MV	0.0449	90		
		MV	0.0407	81		
		MV	0.0429	86		

		MV	0.0392	78		
		MV	0.0394	79		
		MV	0.0398	80		
		MV	0.0563	113		
0.1	tomato	MV	0.0819	82	90.79±3.62	7.65
		MV	0.0815	82		
		MV	0.0795	80		
		MV	0.0813	81		
		MV	0.0831	83		
		MV	0.0935	94		
		MV	0.0957	96		
		MV	0.0788	79		
0.2	tomato	MV	0.1676	84	90.10±2.14	4.11
		MV	0.1550	78		
		MV	0.1704	85		
		MV	0.1728	86		
		MV	0.1587	79		
		MV	0.1591	80		
		MV	0.1582	79		
		MV	0.1584	79		

ตารางที่ 9 ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์ tebufenpyrad ในตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Fortification level (mg/kg)	Commodity	Type of Recovery	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	Average Recovery (Standard Deviation) (%)	%RSD
0.005	tomato	MV	0.0055	110	94.50±9.37	9.91
		MV	0.0047	94		
		MV	0.0043	86		
		MV	0.0052	104		
		MV	0.0047	94		
		MV	0.0044	88		
		MV	0.0041	82		
		MV	0.0049	98		
0.01	tomato	MV	0.0075	75	90.75±9.92	10.94
		MV	0.0080	80		
		MV	0.0084	84		
		MV	0.0094	94		
		MV	0.0101	101		
		MV	0.0102	102		
		MV	0.0096	96		
		MV	0.0094	94		
0.05	tomato	MV	0.0436	87	91.35±4.00	4.38
		MV	0.0493	99		
		MV	0.0463	93		
		MV	0.0469	94		
		MV	0.0435	87		
		MV	0.0440	88		

		MV	0.0466	93		
		MV	0.0452	90		
0.1	tomato	MV	0.0889	89	90.79±3.62	3.99
		MV	0.0905	91		
		MV	0.0901	90		
		MV	0.0927	93		
		MV	0.0909	91		
		MV	0.0951	95		
		MV	0.0945	95		
		MV	0.0836	84		
0.2	tomato	MV	0.1817	91	90.10±2.14	2.38
		MV	0.1719	86		
		MV	0.1851	93		
		MV	0.1848	92		
		MV	0.1791	90		
		MV	0.1790	90		
		MV	0.1822	91		
		MV	0.1778	89		

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์สารผสม tolfenpyrad และ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศ โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ ประเมิน accuracy จาก %recovery โดยผลการทดสอบ แสดงดังตารางที่ 8 และ 9 ผ่านการทดสอบอยู่เกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (70-120 %) ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ จากค่า %RSD อยู่ระหว่าง 4.11-13.47 % และ 2.38-10.94 ตามลำดับซึ่งอยู่เกณฑ์มาตรฐานเช่นเดียวกัน กำหนด Limit of Quantification (LOQ) ที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกำหนด Limit of Detection (LOQ) ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

## 8.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างพริก และมะเขือเปราะ

### 8.6.1 การศึกษา matrix effect ในตัวอย่างพริก

ตารางที่ 10 ผลการศึกษา matrix effect ในตัวอย่างพริก

Compound Name	slope		%ME	Matrix effect
	standard in matrix	standard in solvent		
tolfenpyrad	80429.895870	79997.167489	0.54	not different
tebufenpyrad	74046.201982	73402.24761	0.88	not different

ค่า %ME ของสารทั้งสองมีค่าน้อยกว่า 10% แสดงว่าความชันไม่มีความแตกต่างกัน (NATA, 2018) คือไม่เกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง

ตารางที่ 11 ผลการศึกษา matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเปราะ

Compound Name	slope		%ME	Matrix effect
	standard in matrix	standard in solvent		
tolfenpyrad	211705.211059	210726.389100	0.46	not different
tebufenpyrad	227512.150333	231087.1536	-1.55	not different

ค่า %ME ของสารทั้งสองมีค่าน้อยกว่า 10% แสดงว่าความชันไม่มีความแตกต่างกัน (NATA, 2018) คือไม่เกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง

8.6.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างพริก ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 mg/kg

ตารางที่ 12 ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์ tolfenpyrad ในตัวอย่างพริก

Fortification level (mg/kg)	Commodity	Type of Recovery	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	Average Recovery (Standard Deviation) (%)	%RSD
0.005	chili	MV	0.0060	120	107.80±9.86	9.15
		MV	0.0054	108		
		MV	0.0061	122		
		MV	0.0053	106		

		MV	0.0054	108		
		MV	0.0052	104		
		MV	0.0056	112		
		MV	0.0054	108		
		MV	0.0052	104		
		MV	0.0043	86		

ตารางที่ 13 ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์ tebufenpyrad ในตัวอย่างพริก

Fortification level (mg/kg)	Commodity	Type of Recovery	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	Average Recovery (Standard Deviation) (%)	%RSD
0.005	chili	MV	0.0062	124	118.20±6.14	5.20
		MV	0.0057	114		
		MV	0.0064	128		
		MV	0.0060	120		
		MV	0.0058	116		
		MV	0.0057	114		
		MV	0.0060	120		
		MV	0.0061	122		
		MV	0.0059	118		
		MV	0.0053	106		

กำหนด Limit of Quantification (LOQ) ที่ 0.01 mg/kg

กำหนด Limit of Detection (LOQ) ที่ 0.005 mg/kg

8.6.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างมะเขือเปราะ ที่ระดับความเข้มข้น

0.005 และ 0.01 mg/kg

ตารางที่ 14 ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์ tolfenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเปราะ

Fortification level (mg/kg)	Commodity	Type of Recovery	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	Average Recovery (Standard Deviation) (%)	%RSD
0.005	aubergine	MV	0.0049	98		6.27
		MV	0.0050	100		
		MV	0.0050	100		
		MV	0.0050	100		
		MV	0.0050	100		
		MV	0.0056	112		
		MV	0.0055	110		
		MV	0.0056	112		
		MV	0.0056	112		
		MV	0.0057	114		
0.01	aubergine	MV	0.0089	89		5.87
		MV	0.0087	87		
		MV	0.0088	88		
		MV	0.0091	91		
		MV	0.0087	87		
		MV	0.0093	93		
		MV	0.0094	94		
		MV	0.0095	95		
		MV	0.0102	102		
		MV	0.0101	101		



ตารางที่ 15 ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเปราะ

Fortification level (mg/kg)	Commodity	Type of Recovery	Concentration (mg/kg)	Recovery (%)	Average Recovery (Standard Deviation) (%)	%RSD
0.005	aubergine	MV	0.0046	92		5.81
		MV	0.0049	98		
		MV	0.0054	108		
		MV	0.0053	106		
		MV	0.0051	102		
		MV	0.0053	106		
		MV	0.0048	96		
		MV	0.0056	112		
		MV	0.0051	102		
		MV	0.0051	102		
0.01	aubergine	MV	0.0091	91		6.03
		MV	0.0091	91		
		MV	0.0089	89		
		MV	0.0090	90		
		MV	0.0092	92		
		MV	0.0100	100		
		MV	0.0101	101		
		MV	0.0104	104		
		MV	0.0102	102		
		MV	0.0099	99		

กำหนด Limit of Quantification (LOQ) ที่ 0.01 mg/kg

กำหนด Limit of Detection (LOQ) ที่ 0.005 mg/k

## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

9.1 เปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธี ได้แก่วิธี EN QuEChERS และ SweEt method โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/kg ลงในตัวอย่าง สกัดด้วยวิธีที่ทำการศึกษาตัวอย่างละ 6 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) พบว่าวิธี EN QuEChERS มี % recovery ของ tolfeprad ในช่วง 73-93 และ tebufenpyrad ในช่วง 89-95 ส่วนวิธี SweEt method มี % recovery ในช่วง 67-70 และ 62-70 ตามลำดับจึงเลือกสกัดด้วยวิธี EN QuEChERS ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

9.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเทศ ผลการทดสอบ matrix effect จากการนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจวัด standard in matrix และ standard in solvent มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณการวัดหรือพื้นที่ใต้พีคบนแกน y กับความเข้มข้นของสารในตัวอย่างบนแกน x จากนั้นนำความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in matrix และความชันจากสมการเส้นตรงของ standard in solvent มาคำนวณหา %ME พบว่ามีค่า อยู่ในช่วง -0.55 ถึง 0.16 แสดงว่าไม่มี matrix effect (เกณฑ์ $\pm 10\%$ ) จึงสามารถใช้ calibration curve ที่เตรียมใน solvent ในการตรวจวิเคราะห์ได้

9.3 working range/linear range โดย Spike สารละลายมาตรฐานผสมลงในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 7 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1 และ 0.2 mg/kg พบว่าสามารถตรวจสอบสาร tolfeprad และ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศได้ตั้งแต่ในช่วง 0.005 – 0.2 mg/kg มีค่า  $R^2 > 0.995$  ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

9.4 % recovery และ Precision ทำการทดสอบ Spike sample ตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับ ได้แก่ 0.005, 0.05, 0.01, 0.1 และ 0.2 mg/kg ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ พบว่า ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) เฉลี่ยของการวิเคราะห์ tolfeprad ในตัวอย่างมะเขือเทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อยู่ใน ช่วง 80-86 และ tebufenpyrad อยู่ใน ช่วง 90-95 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์จากค่า %RSD อยู่ระหว่าง 4.11-13.47 % และ 2.38-10.94 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานเช่นเดียวกัน กำหนด Limit of Quantification (LOQ) ที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกำหนด Limit of Detection (LOQ) ที่ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9.5 เพิ่มตัวอย่างพืชชนิดอื่นมาทดสอบวิธีวิเคราะห์ โดยเลือกจากเกณฑ์การจัดกลุ่มสินค้าเกษตร มะเขือเทศ ถูกจัดกลุ่มอยู่ในประเภทที่ 1 กลุ่มผลไม้ กลุ่มหลัก 012 ผักบรีโกลผล นอกเหนือจากตระกูลแตง (fruiting vegetables, other than cucurbits) สินค้าเกษตรกลุ่มนี้ ใช้รหัส VO 0050 (มาตรฐานสินค้าเกษตร มกอช. ,2559) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อย 012A มะเขือเทศเป็นพืชหลัก (major crop) กลุ่มย่อย 012B พริก และสินค้าเกษตรที่คล้ายพริก เลือกตัวอย่างเป็นพริกชี้ฟ้ามาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และกลุ่มย่อย 012C มะเขือและสินค้าเกษตรที่คล้ายมะเขือ โดยใช้ตัวอย่าง พริก และมะเขือเปราะ วิเคราะห์ด้วยวิธี EN QuEChERS ตรวจสอบ matrix effect, LOD และ LOQ

matrix effect ในตัวอย่างพริก และมะเขือเปราะ พบว่าค่า %ME ของสารทั้งสองมีค่าน้อยกว่า 10% แสดงว่าความชันไม่มีความแตกต่างกัน (NATA, 2018) คือไม่เกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง และกำหนด Limit of Quantification (LOQ) ที่ 0.01 mg/kg กำหนด Limit of Detection (LOQ) ที่ 0.005 mg/kg กับทั้งสอง ตัวอย่าง

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นวิธีการในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง โทลเฟนไพเรต (tolfenpyrad) และ ทีบูเฟนไพเรต (tebufenpyrad) ในมะเขือเทศ
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง โทลเฟนไพเรต (tolfenpyrad) และ ทีบูเฟนไพเรต (tebufenpyrad) ในพืชกลุ่มหลัก 012 ผักบริโภคผล นอกเหนือจากตระกูลแตง (fruiting vegetables, other than cucurbits)

## 11. คำขอบคุณ

-

## 12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา. 2553. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูศัตรูพืช ปี 2553. เอกสารวิชาการ เกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด กรุงเทพฯ. 303 หน้า.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2559. “มาตรฐานสินค้าเกษตร สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (มกษ. 9002 – 2559)”. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

FAO/WHO. 2016. Codex alimentarius commission. [Online]. Source: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/> (June 30, 2018)

Anastassiades, M. S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 86, 412-431.

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