แบบรายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2563

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรม

กิจกรรมย่อย การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)**

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างพืชกลุ่ม High water and low or no chlorophyll content ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.4

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)

Verification of the validity of the pesticide residues analysis method by QuEChERS method in the samples of plants in the group High water and low or no chlorophyll content by the LC-MS/MS technique of the laboratory DOA.4

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นายอิทธิพล บ้งพรม กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

ผู้ร่วมงาน นางนาตยา จันทร์ส่อง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

ผู้ร่วมงาน นางสุภาพร บ้งพรม กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ/เรื่องย่อ

ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 เห็นความสำคัญของวิธีการทดสอบสารพิษตกค้าง ซึ่งเป็นการยืนยันคุณลักษณะของวิธีวิเคราะห์ทดสอบ มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือตามมาตรฐานสากล

ห้องปฏิบัติการจึงได้ดำเนินการศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้าง ในพืชกลุ่ม High water and low or no chlorophyll content นำไปวิเคราะห์ทดสอบด้วยด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chlormatography – Mass/Mass (HPLC-MS/MS) โดยศึกษาในพืชตัวแทน ได้แก่ องุ่น และสตอเบอร์รี่และผักกาดขาว จำนวน 19 ชนิดสาร ได้แก่ atrazine clomazone coumaphos cymoxanil diazinon epoxiconazole ethabozam fenoxaprop-p-ethyl flonicamid imidaclopid monocrotophos omethoate pencycuron propanil pyraclostrobin pyriproxyfen quinoxyphen triazophos และ tricyclazole จากผลการทดลองพบว่า มีค่า Specification /selectivity ที่ดีไม่มีสัญญาณรบกวนของสารชนิดอื่น ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ค่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05 – 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) /การทดสอบช่วงของการวัด (Working range) ของสารมาตรฐาน ทั้ง 19 ชนิดสาร ที่ความเข้มข้นภายใน Linearity พบว่าค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า r ที่ได้เข้าใกล้ 1 และผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า r ≥ 0.995 การประเมินค่า LOD ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 20 ชนิดสาร เท่ากับ 0.005, 0.01, 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม การประเมินค่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.10 ไมโครกรัมต่อกรัม การทดสอบความแม่น (Accuracy) ในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบมีค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด การทดสอบความเที่ยง (Precision) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบมีค่า HORRAT (Horwitz's ratio) อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งมีค่าไม่เกิน 2 (Howitz's ratio < 2)

จากการประเมินผลการทดสอบทุกคุณลักษณะที่กล่าวมา พบว่าวิธีทดสอบนี้ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำและสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 และเป็นข้อมูลประกอบสำหรับยื่นขอขยายขอบข่ายการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

รหัสการทดลอง

[1/]กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

Abstract/Summary

Pesticide Residue Inspection Laboratory Plant and Production Factors Inspection Development Group The Office of Agricultural Research and Development Region 4 recognizes the importance of pesticide residue testing methods. which confirms the characteristics of the test analysis method. Accurate, accurate and reliable according to international standards.

Therefore, the laboratory conducted a study to verify the validity of the pesticide residue test method in plants in the group High water and low or no chlorophyll content and analyzed by using the High Performance Liquid Chlormatography – Mass/Mass (HPLC-MS/MS) technique.) were studied in 19 representative plants, namely grapes, strawberries and Chinese cabbage, including atrazine clomazone coumaphos cymoxanil diazinon epoxiconazole ethabozam fenoxaprop-p-ethyl flonicamid imidaclopid monocrotophos omethoate pencycuron propanil pyraclostrobin pyraclostrobin pyriproxyphenazol from the experimental results. It was found that the specification /selectivity was good, no interference of other substances. The results of the linearity test were in the concentration range of 0.005, 0.01, 0.05 – 2.0 µg/mL. Linearity check / Working range test of all 19 standard substances at concentrations within Linearity found that the correlation coefficient (r) value r obtained Near 1 and passed the acceptance criteria for r value 0.995. The LOD evaluation of all 20 pesticide residue test methods was 0.005, 0.01, 0.05 micrograms/gram. LOQ estimates were 0.01 and 0.10 micrograms/gram. Accuracy test in 3 test intervals, low, medium, high. All concentrations tested had %Recovery within the specified criteria. Precision testing found that all concentrations tested had HORRAT (Horwitz's ratio) within the specified criteria. which is not more than 2 (Howitz's ratio < 2).

From the evaluation of testing all the features mentioned above. It was found that this test method gave the test results within the required criteria and was accepted according to the international acceptance criteria. It can be used as an accurate analytical method. It is accurate and can be used as a standard method for laboratory testing for pesticide residues. Agricultural Research and Development Bureau, Region 4 and is a supporting information for applying to expand the scope of ISO/IEC 17025 accreditation further.

Experiment code :

Plant Inspection and Production Development Group. Office of Agricultural Research and Development Region 4.

กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนา ปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีที่เหมาะสมแล้ว และมีจุดมุ่งหมายเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนั้นหรือเลือกมานั้นมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งานวิเคราะห์ให้มีความถูกต้อง เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติและเงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ ก่อนที่จะนำวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่าง การทำ method validation จึงมีความจำเป็นเพื่อใช้ยืนยันความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่ผู้วิเคราะห์พัฒนาขึ้น หรือดัดแปลงมาจาก reference method เพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการของห้องปฏิบัติการ เป็นการยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ยอมรับได้ตามมาตรฐานสากล ตัวแปรที่จำเป็นต้องศึกษาตามวิธีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ดังนั้นห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 ได้มองเห็นความสำคัญในการ ศึกษาหาวิธีการทดสอบที่เหมาะสมกับแต่ละชนิดสาร คือการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างในพืชผัก High water and chlorophyll โดยดำเนินการทดสอบตามคุณลักษณะของวิธีที่เกี่ยวข้องกับการใช้งานดังต่อไปนี้

1) ช่วงของการวัด (Working rang) และความเป็นเส้นตรง (linearity) ช่วงของการใช้งานหรือช่วงของการวัด (Working rang) เป็นช่วงของความเข้มข้นของสารซึ่งวิธีวิเคราะห์นั้นใช้ได้ ความเป็นเส้นตรง (linearity) เป็นคุณสมบัติลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือตรวจวัดและความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งาน ช่วงของการใช้งานจะเริ่มต้นจาก LOD หรือ LOQ ช่วงความเป็นเส้นตรงจะเป็นส่วนหนึ่ง ของช่วงการใช้งาน และจะเริ่มต้นที่ LOQ ทั้งช่วงการใช้งานและช่วงความเป็นเส้นตรงเป็นช่วงที่วัดได้ในสารละลายที่วัดค่าด้วยเครื่องมือวัด (final solution) ไม่ใช่ตัวอย่างตั้งต้น (original sample) การทดสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) และทดสอบ matrix effect (matrix effect หมายถึง การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัญญาณจากเครื่องมือวัดอันเป็นผลมาจากส่วนประกอบอื่นๆที่มีในตัวอย่างแต่ไม่ใช่จากสารที่กำลังศึกษา)

2) ความถูกต้องหรือความแม่น (accuracy) หมายถึง คุณลักษณะของวิธีที่แสดงความใกล้เคียงของผลการทดสอบต่อค่าจริงหรือค่าอ้างอิง การทดสอบความถูกต้องทำได้โดยการประเมินทั้ง systematic และ random effect ที่มีผลต่อการทดสอบ ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด การหา accuracy ทำได้โดยวิเคราะห์ CRM (Certified Reference Material) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และ นำมาคำนวณหาระดับความถูกต้องในรูปของความผิดพลาดสัมพัทธ์ (relative error) หรือ ความถูกต้องสัมพัทธ์ (relative accuracy) และการหาค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนมีทั้งในกรณีที่ไม่สามารถหา CRM ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้โดยใช้ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ซึ่งจะมีข้อจำกัดว่า accuracy ที่ได้นั้นครอบคลุมเฉพาะขั้นตอนที่วิเคราะห์ spiked sample เท่านั้น การทำ recovery จะทำ 3 ระดับความเข้มข้น และอย่างน้อยความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

3) การตรวจสอบความแม่นยำหรือความเที่ยง (precision) หมายถึง คุณลักษณะเฉพาะของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงถึงความใกล้เคียงของการวิเคราะห์ซ้ำภายใต้สภาวะที่กำหนด ความแม่นยำบ่งบอกถึงความคลาดเคลื่อนสุ่ม (random error) ที่เกิดขึ้นซึ่ง precision ของวิธีการวิเคราะห์มี 2 ลักษณะคือ repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่

กรมวิชาการเกษตร

เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆในสภาวะเดียวกันโดยใช้วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการเดียวกันเครื่องมือชุดเดียวกันและผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน และ Within laboratory reproducibility หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน หรือมากกว่า 1 คน ในช่วงเวลาต่างวันกันอาจเป็นเวลาหลายสัปดาห์

ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 เป็นห้องปฏิบัติการที่ให้บริการตรวจสอบสารพิษตกค้าง ในตัวอย่างปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงตอนล่าง มีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำเป็นที่น่าเชื่อถือ และใช้ผลการวิเคราะห์เพื่อขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพื่อเป็นการสนับสนุนการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานด้านการให้การรับรองมาตรฐานการผลิตพืชในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง โดยผู้ดำเนินงานวิจัยมีการประยุกต์วิธีการทดสอบให้ทันสมัยเหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

วัตถุประสงค์

1. เพื่อยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของวิธีที่ใช้ในการทดสอบสารพิษตกค้างในพืชผัก High water and low or no chlorophyll content และเพื่อสร้างหลักประกันคุณภาพผลการทดสอบสารพิษตกค้าง มีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือตามหลักวิชาการ และใช้เป็นวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

2. เพื่อใช้ข้อมูลประกอบในการยื่นขอการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

1. อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องโครมาโตกราฟชนิดของเหลวความดันสูงพร้อมแมสสเปคโตมิเตอร์ (Liquid Chromatography – Mass spectrometry/Mass spectrometry ; LC-MS/MS)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
4. เครื่องปั่นบดตัวอย่าง
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
6. เครื่องผสมสารละลาย Vortex mixer
7. Beaker ขนาด 100, 250, 600 และ 2000 ml
8. ปิเปตอัตโนมัติ (Auto pipette) ขนาด 20-200 µL, 1-5 ml
9. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25, 50, 100, 1000 ml
10. Syringe ขนาด 5 ml
11. PTFE / Nylon syringe filter ขนาด 0.45, 0.20 µm
12. เครื่องเขย่าสารความถี่สูง (Ultrasonic)
13. Centrifuge tube ขนาด 15, 50 ml
14. ขวดใส่สาร (Vial) ขนาด 2, 10 ml

กรมวิชาการเกษตร

สารเคมี

1. Acetonitrile, HPLC Grade, PR Grade
2. Methanol, HPLC Grade
3. Formic acid, AR Grade
4. Isopropanol, HPLC Grade, AR Grade
5. DI water
6. Magnesium sulfate anhydrous ($MgSO_4$) ≥ 97%
7. Sodium chloride (NaCl)
8. Sodium citrate dibasic sesquihydrate ($C_6H_6Na_2O_7.1.5H_2O$) ≥ 99.0%
9. Trisodium citrate dihydrate ($C_6H_5Na_3\ O_7.2H_2O$)
10. Sodium hydroxide (NaOH), AR Grade
11. Primary (1°) secondary (2°) amines (PSA)
12. Ammonium formate
13. Sodium Formate
14. Acetone, CMOS Grade

2. ประเภทของวิธีทดสอบ

In house method base on : QuEChERS BS EN 15662 : 2008

3. วิธีดำเนินการ

3.1 สารมาตรฐานที่ห้องปฏิบัติการใช้ต้องได้รับการตรวจสอบคุณสมบัติตามวิธีการปฏิบัติงาน การควบคุมคุณภาพสารเคมี และวัสดุอ้างอิง (WI-6.6-01) เมื่อได้รับสารมาตรฐานจัดทำบัญชีรายชื่อสารมาตรฐาน และจัดเก็บให้ถูกต้องตามคำแนะนำตามเอกสารรับรองผลิตภัณฑ์ของบริษัทผู้ผลิต

3.2 การเตรียมสารเคมีและสารมาตรฐาน

3.2.1 เตรียมสารละลาย 5% Formic acid in Acetonitrile

ตวงสารละลาย Acetonitrile มา 50 ml ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 ml จากนั้นเติม Formic acid 100 % ปริมาตร 5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ให้ได้ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลาย 5% Formic acid in Acetonitrile

3.2.2 เตรียมสารมาตรฐาน Stock Standard Solution 1,000 µg/ml

เตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้นประมาณ 1000 µg/ml โดยชั่งสารมาตรฐานที่เป็น Primary Standard ให้ได้น้ำหนักเนื้อสาร 10 mg โดยประมาณใส่ลงใน Volumetric Flask ขนาด 10 ml เติม Acetonitrile ลงใน Volumetric Flask เขย่าจน Primary Standard ละลายหมดจากนั้นเติม Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายลงในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาดที่เหมาะสม ปิดฝาเกลียวให้แน่น ติดฉลากระบุชื่อสาร ความเข้มข้น วันที่เตรียม ตัวทำละลาย วันหมดอายุ และผู้เตรียม เก็บรักษาในตู้แช่ -18 ± 4 °C มีอายุการใช้

กรมวิชาการเกษตร

งาน 1 ปี (นับตั้งแต่วันที่เตรียม) บันทึกข้อมูลการเตรียมลงในบันทึกการเตรียมสารมาตรฐาน ตามแบบบันทึกการเตรียม Stock Standard Solution (FS-7.2-01) ความเข้มข้นของสารมาตรฐานคำนวณดังนี้

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

3.2.3 เตรียมสารมาตรฐาน Stock Standard Solution สำเร็จรูป

เตรียมโดยห้องปฏิบัติการเครือข่ายของกรมวิชาการเกษตร ที่ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งดำเนินการเตรียม Stock Standard ความเข้มข้นประมาณ 1000 µg/ml โดยชั่งสารมาตรฐานที่เป็น Primary Standard ให้ได้น้ำหนักเนื้อสารประมาณ 100 mg ใน Volumetric Flask ขนาด 100 ml เติม Acetonitrile แล้วเขย่าจน Primary Standard ละลายหมด จากนั้นเติม Acetonitrile จนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายลงในขวดแก้วฝาเกลียว ขนาดที่เหมาะสม ปิดฝาเกลียวให้แน่น ติดฉลากระบุชื่อสาร ความเข้มข้น วันที่เตรียม ตัวทำละลาย วันหมดอายุ และผู้เตรียม เก็บรักษาในตู้แช่ -18 ± 4°C มีอายุการใช้งาน 1 ปี (นับตั้งแต่วันที่เตรียม) บันทึกข้อมูลการเตรียมลงในบันทึกการเตรียมสารมาตรฐาน ตามแบบบันทึกการเตรียมสารมาตรฐานของห้องปฏิบัติการเครือข่ายของกรมวิชาการเกษตร จากนั้นสำเนาเอกสารหลักฐานการเตรียม Stock Standard Solution และเอกสารใบ Certificate แจกจ่ายให้กับหน่วยงานเครือข่ายนำกลับไปใช้อ้างอิงประกอบการปฏิบัติงานต่อไป

3.2.4 การเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution

ใช้สูตรการคำนวณ $N_1V_1 = N_2V_2$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของ สารตั้งต้น (µg/ml)

N_2 = ความเข้มข้นของ สารที่ต้องการเตรียม (µg/ml)

V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูดมา (ml)

V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (ml)

ตัวอย่างการเตรียม

- การเตรียม Intermediate Standard Solution 100 µg/ml โดยใช้ Auto Pipette ดูด Stock Standard Solution 1000 µg/ml ของแต่ละสารในปริมาณที่คำนวณได้ ใส่ลงใน Volumetric Flask ปรับปริมาตรโดยใช้ Acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายลงในขวดแก้วฝาเกลียว ปิดฝาเกลียวให้แน่น ติดฉลากระบุชื่อสาร ความเข้มข้น วันที่เตรียม ตัวทำละลาย ผู้เตรียม และวันหมดอายุ เก็บรักษาตามที่ระบุในเอกสารใบ Certificate ของแต่ละชนิดสาร สารละลายมาตรฐาน Intermediate มีอายุการใช้งาน 6 เดือน (นับตั้งแต่วันที่เตรียม) บันทึกข้อมูลการเตรียมลงในแบบบันทึกการเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution /Working Standard Solution (FS-7.2-02)

- การเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution 10 µg/ml ใช้ Autto Pipette ดูด Intermediate Stock Standard Solution 100 µg/ml ใส่ลงใน Volumetric flask ปรับปริมาตรโดยใช้ Acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายลงในขวดแก้ว ปิดฝาเกลียวให้แน่น ติดฉลากระบุชื่อสาร ความเข้มข้น

กรมวิชาการเกษตร

วันที่เตรียม ตัวทำละลาย ผู้เตรียมและวันหมดอายุเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 ± 4°C สารมาตรฐานมีอายุการใช้งาน 3 เดือน (นับตั้งแต่วันที่เตรียม) บันทึกข้อมูลการเตรียมลงในแบบบันทึกการเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution /Working Standard Solution (FS-7.2-02)

- การเตรียมสารมาตรฐานสำหรับใช้งาน (Working Range) ดำเนินการเตรียมสารมาตรฐาน Working Range สำหรับ Calibration Curve ไม่น้อยกว่า 5 ระดับความเข้มข้น โดยใช้ Autto Pipette ดูด Intermediate Mixed Standard Solution ใส่ลงใน Volumetric flask ปรับปริมาตรโดยใช้ Acetonitrile เขย่าให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายลงในขวดแก้วปิดฝาเกลียวให้แน่น ติดฉลากระบุชื่อสาร ความเข้มข้น วันที่เตรียม ตัวทำละลาย ผู้เตรียม และวันหมดอายุเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 ± 4 °C สารมาตรฐานมีอายุการใช้งาน 1 เดือน (นับตั้งแต่วันที่เตรียม) บันทึกข้อมูลการเตรียมลงในบันทึกการเตรียม Intermediate Mixed Standard Solution /Working Standard Solution (FS-7.2-02)

3.3 การเตรียมตัวอย่าง

1) กรณีไม่สามารถเตรียมตัวอย่างในวันเดียวกับวันที่รับตัวอย่าง ให้เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 8 ± 4°C เป็นเวลาไม่เกิน 3 วัน

2) การสุ่มตัวอย่างโดยใช้มีด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ปั่นแล้วทั้งหมดใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้ เพื่อนำไปสู่ขั้นตอนการชั่งต่อไป

3) นำตัวอย่างที่ปั่นละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่ง 10± 0.1g ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ติดป้ายระบุหมายเลขตัวอย่าง

4) ตัวอย่างที่ปั่นละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ดำเนินการจัดเก็บเป็นตัวอย่างสำรอง ในตู้แช่อุณหภูมิ -18 $\pm$ 4°C ตามขั้นตอนการจัดการตัวอย่างทดสอบ

5) ดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างภายในวันเดียวกับวันที่เตรียมตัวอย่าง กรณีไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างในวันเดียวกันให้เก็บในตู้แช่อุณหภูมิ -18 $\pm$ 4°C แล้วดำเนินการวิเคราะห์ให้เร็วที่สุด

6) ดำเนินการชั่งตัวอย่างที่ปั่นละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกันประมาณ 250 กรัม เพื่อเก็บเป็นตัวอย่างสำรอง เก็บไว้ไม่น้อยกว่า 3 เดือน เมื่อตัวอย่างสำรองครบกำหนดทำลายตัวอย่าง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการดำเนินการขออนุมัติทำลายตัวอย่าง โดยดำเนินการตามแบบฟอร์มใบกำกับตัวอย่างและการจัดการตัวอย่างทดสอบ (FS-7.4-02)

3.4 การสกัดตัวอย่าง ปฏิบัติตามขั้นตอนดังนั้น

1) ชั่งตัวอย่าง 10±0.1g ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 ml

2) เติมสารละลาย acetonitile จำนวน 10 ml

3) เติม magnesium sulfate ($MgSO_4$) จำนวน 4.0 g

4) เติม Sodium chloride (NaCl) จำนวน 1.0 g

5) เติม Sodium Citrate จำนวน 1.0 g

6) เติม Sodium citrate dibasic sesquihydrate จำนวน 0.5 g

7) ปิดฝาเขย่าด้วยมือและเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุดนาน 1 นาที

8) นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ > 3,500 rpm นาน 3 นาที

กรมวิทยาศาสตร์

การ clean up ทำความสะอาดตัวอย่างโดย Dispersive-SPE Cleanup

1) ดูดสารละลายส่วนบนตัวอย่าง จำนวน 5 ml ด้วย Auto pipette ใส่ใน Centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุ magnesium sulfate ($MgSO_4$) ประมาณ 0.9 กรัม และ PSA ประมาณ 0.15 กรัม ปิดฝาแล้วเขย่าด้วย vortex mixer ระดับความเร็วรอบสูงสุด นาน 1 นาที

2) นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ > 3,500 rpm นาน 3 นาที

3) ดูดสารละลายส่วนบนของตัวอย่างด้วย Auto pipette จำนวน 1 มิลลิลิตร กรองสารทั้งหมดผ่าน Syring filter (PTFE /Nylon) ขนาด 0.2 / 0.45 ไมครอน ใส่ใน vial ขนาด 2 ml

4) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.5 การเตรียมเครื่องมือ

สำหรับเครื่อง LC-MS/MS คือ รุ่น Compact ESI-Q-TOF ยี่ห้อ Buker 1และ HPLC รุ่น Ultimate 3000 ยี่ห้อ Thermo Sciencetific กำหนดสภาวะการทดสอบสำหรับเครื่อง LC-MS/MS ดังนี้

สภาวะของเครื่อง HPLC

Column : Thermo scientific Acclaim™ RSLC 120 C18 2.2 µm 120A° 2.1×100 mm

Flow rate : 0.2 ml/min

ColumnTemperature : 30 °C

Injection Volumn : 5 µl

Mobile Phase : **เตรียม buffer concentrate**

1) ชั่งของแข็ง Ammonium formate 3.9427 g ในบีกเกอร์ เติมน้ำ 5 ml ใช้แท่งแก้วคนจนสารละลายหมด

2) เทสารละลาย Ammonium formate ที่เตรียมไว้ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 ml และ Rinse บีกเกอร์ด้วยน้ำ DI 3 ml 2 ครั้ง

3) เติมกรดฟอร์มิกเข้มข้นปริมาตร 1.25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 25 ml

Mobile Phase A : เติม methanol 900 ml ในขวด Duran ขนาด 1000 ml เติม buffer concentrate จำนวน 1.8 ml และเติม Mobile Phase B จำนวน 100 ml เขย่าให้เข้ากัน

Mobile Phase B : เติม methanol 1000 ml ในขวด Duran เติม buffer concentrate จำนวน 2 ml เขย่าให้เข้ากัน

Total cycle time : 20 min

กรมวิชาการเกษตร

ตารางแสดงอัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

	Retention time (min)	Flow (ml/min)	%B
1	0.00	0.20	1.00
2	0.00	0.20	1.00
3	1.00	0.20	1.00
4	3.00	0.20	39.00
5	14.00	0.40	99.90
6	16.00	0.48	99.90
7	16.10	0.48	1.00
8	19.00	0.48	1.00
9	19.10	0.20	1.00
10	20.00	0.20	1.00

Hold 12 min

สภาวะของเครื่อง MS	
Source : ESI	End Plate Offset : 500 V Capillary : 4500 V
Spray condition	Positive mode Dry Gas : 8.0 L/min Dry Temp : 200 °C Neburizer : 2.0 Bar
Tune	Transfer : Funnel1 RF 200 Vpp, Funnel2 RF 200 Vpp, Hexapole RF 50 Vpp Quadrupole : Ion energy 4 eV, Low Mass 50 m/z Collision Cell : Collision energy 4 eV, Collision RF 200 – 700 Vpp, Transfer time 20 – 70 µs
MS/MS	Precursor Ion : No. of Precursors 3 Cycle time : 3.0 sec Width : ± 0.5 Ion Polarity : Positive Scan Mode : bbCID (MS, MS/MS) Mass range : 30-1000 m/z

กรมวิทยาศาสตร

ลำดับของการฉีดสารสำหรับแต่ละชุดการทดสอบ (LC-MS/MS Analysis Sequence for Each Batch) เรียงตามลำดับดังนี้

ลำดับที่ รายละเอียด

1. Solvent (Instrument blank)
2. Low Calibration Level
3. Medium Calibration Level (2-3 Concentration)
4. High Calibration Level
5. Solvent (Instrument blank)
6. Blank sample
7. Sample (1-10)
8. Duplicate Sample (% RPD ไม่เกิน 20%)
9. Spike Recovery (ตามเกณฑ์การยอมรับของ Codex)
10. Solvent (Instrument blank)
11. Medium Calibration Level (1 Concentration) ไม่เกิน 80 - 120%
12. Solvent (Instrument blank)

ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น กันยายน 2562 สิ้นสุด ตุลาคม 2563 รวม 1 ปี

กรรมวิธีการทดลอง

ดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบ QuEChERS เพื่อวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชกลุ่ม High water and low or no chlorophyll content **(ชนิดพืช :** องุ่น สตอเบอร์รี่**)** จำนวน 19 ชนิดสาร นำไปวิเคราะห์ทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ มีขั้นตอนการปฏิบัติงานการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยกำหนดขอบเขตหรือคุณลักษณะของวิธีทดสอบตามคุณลักษณะที่กำหนดไว้ประกอบด้วยรายละเอียดดังนี้

1) ความเฉพาะเจาะจง (Specificity / Selectivity) โดย Spike matrix blank ที่ระดับใกล้เคียง LOQ โครมาโตรแกรมจะต้องมีสัญญาณของ Matrix blank จะต้องไม่รบกวนหรือไม่ตรงสัญญาณของ Spike matrix blank ที่ค่า Retention Time (RT) เดียวกัน

2) การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของสารพิษตกค้าง 19 ชนิดสาร ในสารละลาย (ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร) โดยทดสอบอย่างน้อย 6 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ (แกน x) กับ Area Response (แกน Y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรง

3) การตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) /การทดสอบช่วงของการวัด (Working range) ของสารมาตรฐาน จำนวน 20 ชนิดสาร ที่ความเข้มข้นภายใน Linearity โดยทดสอบอย่างน้อย 6 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2) และหาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า r ที่ได้เข้าใกล้ 1 และผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า $r \geq 0.995$

4) การประเมินค่า LOD ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร

5) การประเมินค่า LOQ ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร

กรมวิชาการเกษตร

6) การทดสอบความแม่น (Accuracy) ประเมินจากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของสารพิษตกค้าง ตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร ในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละ ไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ ทุกระดับความเข้มข้นที่จะต้องมีค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดและสามารถยอมรับได้

7) การทดสอบความเที่ยง (Precision) ประเมินจากค่า % RSD เพื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) ของสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร ในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ค่า HORRAT (Horwitz's ratio) อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งมีค่าไม่เกิน 2 (Howitz's ratio < 2) และยอมรับได้

เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืชกลุ่ม High water and low or no chlorophyll content ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และเป็นไปตามมาตรฐานสากล

การทดสอบความแม่น (Accuracy)

- ทดสอบ Reagent blank, Sample blank และ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ
- หาค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ Fortified sample และค่า Sample blank
- ประเมิน accuracy จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ recovery โดยใช้สูตรดังนี้

การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% recovery)

จากสูตร % recovery = [(A - B)/C] x 100

โดยที่

A = ปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่าง ที่หาได้จาก cal. Curve

B = ปริมาณความเข้มข้นที่วัดได้ของสัญญาณของตัวอย่างที่ไม่ได้มีการ spiked ที่หาได้จาก cal. Curve

C = ปริมาณความเข้มข้นจริงที่ spiked ในตัวอย่าง (spiked level)

เกณฑ์การยอมรับ recovery โดยใช้เกณฑ์กำหนดตาม analyte recovery ของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ตกค้างในอาหารของ Codex อ้างอิงตามเกณฑ์ที่กำหนดและสามารถยอมรับได้ ดังนี้

ความเข้มข้นของ analyte	Range of Mean Recovery
< 1 μg/kg	50 - 120 %
> 1 μg/kg ≤ 0.01 mg/kg	60 - 120 %
> 0.01 mg/kg ≤ 0.10 mg/kg	70 - 120 %
> 0.10 mg/kg ≤ 1 mg/kg	70 - 110 %
> 1 mg/kg	70 - 110 %

กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบความเที่ยง (Precision)

ทดสอบ Fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นภายในช่วงการทดสอบอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ บันทึกผลการทดสอบ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (Mean; $\overline{X}$) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของผลการทดสอบ

คำนวณ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (% RSD) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

ประเมิน Precision โดยใช้ HORRAT (Horwitz's ratio) หรือ จาก % RSD จากสูตร

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

คำนวณ Predicted Horwitz RSD ได้จาก Howitz equation แบบ Repeatability (RSD_r) ตามสูตร

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

เมื่อ C = Concentration ration

เกณฑ์การยอมรับ

ตามเกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ Precision, % RSD ของ AOAC Peer-Verified Methods. Nov. 1993 ตามวิธีการปฏิบัติงานการทดสอบความใช้ได้ของวิธี WI-05-04-02 เกณฑ์ยอมรับค่า HORRAT (Horwitz' s ratio) ดังนี้

AOAC < 2 Codex , EU $\leq$ 2

ผลการทดสอบ

1. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity / Selectivity)

ดำเนินการทดสอบสารมาตรฐานสารพิษตกค้าง จำนวน 19 ชนิดสาร ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ซึ่งบ่งชี้ว่าโมเลกุลไอออนของสารพิษตกค้างแต่ละชนิดสารมีความเสถียรมาก จากส่วนของ precursor ion ที่ m/z เกิดที่ collision energy (CE) เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วให้ product ions m/z ภายใต้สภาวะ collisionally activated dissociation (CAD) หลาย mass โดยใช้ โปรแกรมคำนวณผลการวิเคราะห์ ในการตรวจวัดการแตกตัวของสารพิษตกค้างภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS รายละเอียดดัง

ตารางที่ 1

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดง Retention Time, precursor ion และ product ions (m/z) ของสารมาตรฐานสารพิษตกค้าง

ลำดับที่	Pesticide Name	Retention time (min)	precursor ion (m/z)	product ions (m/z)
1	atrazine	9.86	216	174
2	clomazone	10.35	240	125
3	coumaphos	12.40	363	227
4	cymoxanil	6.90	128	111
5	diazinon	12.46	305	169
6	epoxiconazole	11.74	330	121
7	ethabozam	9.35	321	183
8	fenoxaprop-p-ethyl	13.30	362	364
9	flonicamid	5.11	230	148
10	imidaclopid	5.73	256	209
11	monocrotophos	5.18	224	127
12	omethoate	3.90	214	125
13	pencycuron	12.74	329	125
14	propanil	11.08	218	127
15	pyraclostrobin	12.50	388	163
16	pyriproxyfen	13.71	378	96
17	quinoxyphen	14.08	308	308
18	triazophos	11.38	314	162
19	tricyclazole	7.26	190	136

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบช่วงของการวัด (Working range)/การทดสอบหาสอบหาความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ผลการตรวจสอบช่วงของการวัด (Working range) และทดสอบหาสอบหาความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยทดสอบสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 6 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน x) กับ Area Response (แกน Y) พบว่ามีความเป็นเส้นตรง ผลการทดสอบสารพิษตกค้างทั้งหมด 19 ชนิดสาร แสดงดังตารางที่ 2 โดยค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2) และหาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า r ที่ได้เข้าใกล้ 1 และผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า $r \geq 0.995$

ตารางที่ 2 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับ Area Response (แกน Y) ของสารพิษตกค้างทั้งหมด 19 ชนิดสาร

ลำดับที่	Pesticide Name	Concentration (µg/g)	R^2	r
1	atrazine	0.01 - 2.00	0.9975	0.9987
2	clomazone	0.01 - 2.00	0.9989	0.9994
3	coumaphos	0.01 - 2.00	0.9962	0.9981
4	cymoxanil	0.01 - 2.00	0.9986	0.9993
5	diazinon	0.01 - 2.00	0.9989	0.9994
6	epoxiconazole	0.01 - 2.00	0.9995	0.9997
7	ethabozam	0.01 - 2.00	0.9985	0.9992
8	fenoxaprop-p-ethyl	0.01 - 2.00	0.9975	0.9987
9	flonicamid	0.01 - 2.00	0.9974	0.9987
10	imidaclopid	0.01 - 2.00	0.9983	0.9991
11	monocrotophos	0.01 - 2.00	0.9982	0.9991
12	omethoate	0.01 - 2.00	0.9994	0.9997
13	pencycuron	0.01 - 2.00	0.9976	0.9988
14	propanil	0.01 - 2.00	0.9971	0.9985
15	pyraclostrobin	0.01 - 2.00	0.9985	0.9992
16	pyriproxyfen	0.01 - 2.00	0.9995	0.9997
17	quinoxyphen	0.01 - 2.00	0.9993	0.9996
18	triazophos	0.01 - 2.00	0.9978	0.9989
19	tricyclazole	0.01 - 2.00	0.9975	0.9987

กรมวิชาการเกษตร

3. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (Limit of Detection; LOD)

ทดสอบโดย Spike สารมาตรฐาน ในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ที่ระดับความเข้มข้น LOD (0.005 และ 0.01 µg/g) จำนวนไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของสารพิษตกค้างในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตารางที่ 3 - 4

ตารางที่ 3 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างองุ่นที่ระดับ LOD (0.005 และ 0.01 µg/g)

Pesticide Name	องุ่น ระดับ LOD (0.005 และ 0.01 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 60-120
atrazine	0.0048	0.0001	0.11	1.35	95.20
clomazone	0.0085	0.0001	1.47	1.12	85.00
coumaphos	0.0045	0.0001	2.17	1.65	89.20
cymoxanil	0.0044	0.0001	2.59	1.98	87.60
diazinon	0.0088	0.0001	0.89	0.68	88.2
epoxiconazole	0.0043	0.0001	2.39	1.82	86.4
ethabozam	0.0036	0.0001	2.18	1.66	72.40
fenoxaprop-p-ethyl	0.0036	0.0001	2.43	1.85	72.20
flonicamid	0.0087	0.0001	1.43	1.09	87.00
imidaclopid	0.0086	0.0001	1.36	1.04	86.40
monocrotophos	0.0090	0.0001	1.33	1.13	90.00
omethoate	0.0043	0.0001	2.55	1.95	86.20
pencycuron	0.0088	0.0002	2.51	1.92	88.40
propanil	0.0090	0.0002	2.53	1.93	90.10
pyraclostrobin	0.0092	0.0001	1.38	1.05	91.60
pyriproxyfen	0.0092	0.0001	1.30	0.99	91.90
quinoxyphen	0.0044	0.0001	2.59	1.98	87.60
triazophos	0.0045	0.0001	2.43	1.85	89.00
tricyclazole	0.0047	0.0001	2.63	2.00	93.6

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างสตอเบอร์รี่ที่ระดับ LOD (0.005 และ 0.01 µg/g)

Pesticide Name	สตอเบอร์รี่ ระดับ LOD (0.005, 0.01 µg/g)				
	Mean Concentration	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 60-120
atrazine	0.0044	0.0001	2.57	1.96	88.40
clomazone	0.0078	0.0001	1.46	1.11	77.80
coumaphos	0.0044	0.0001	1.31	1.59	88.40
cymoxanil	0.0043	0.0001	2.45	1.87	86.00
diazinon	0.0087	0.0001	1.30	0.99	87.20
epoxiconazole	0.0044	0.0001	2.27	1.73	87.80
ethabozam	0.0038	0.0001	2.61	1.99	76.20
fenoxaprop-p-ethyl	0.0040	0.0001	2.59	1.98	79.60
flonicamid	0.0085	0.0002	2.09	1.59	84.70
imidaclopid	0.0081	0.0001	1.30	0.99	81.30
monocrotophos	0.0088	0.0002	2.15	1.64	88.40
omethoate	0.0044	0.0001	2.42	1.85	88.80
pencycuron	0.0089	0.0002	2.31	1.76	89.40
propanil	0.0089	0.0002	2.38	1.82	88.70
pyraclostrobin	0.0083	0.0002	1.89	1.44	83.40
pyriproxyfen	0.0084	0.0001	1.72	1.31	83.50
quinoxyphen	0.0046	0.0001	2.54	1.94	91.40
triazophos	0.0046	0.0001	2.26	1.72	91.60
tricyclazole	0.0043	0.0001	2.54	1.94	85.00

กรมวิชาการเกษตร

4. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation; LOQ)

ทดสอบโดย Spike สารมาตรฐาน ในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ที่ระดับความเข้มข้น LOQ (0.01 และ 0.05 µg/g) จำนวนไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของสารพิษตกค้างในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตารางที่ 5 - 6

ตารางที่ 5 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างองุ่นที่ระดับต่ำ (Low) / LOQ (0.01 และ 0.05 µg/g)

Pesticide Name	องุ่น ระดับ LOQ (0.01 และ 0.05 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 70-120
atrazine	0.0088	0.0002	1.96	1.50	88.10
clomazone	0.0517	0.0009	1.74	1.33	103.46
coumaphos	0.0090	0.0002	1.99	1.52	90.10
cymoxanil	0.0089	0.0002	2.40	1.83	88.90
diazinon	0.0481	0.0012	2.56	1.96	96.28
epoxiconazole	0.0090	0.0002	2.58	1.97	89.70
ethabozam	0.0079	0.0002	2.31	1.76	79.30
fenoxaprop-p-ethyl	0.0079	0.0002	2.27	1.73	78.50
flonicamid	0.0436	0.0011	2.46	1.88	87.28
imidaclopid	0.0437	0.0010	2.23	1.70	87.32
monocrotophos	0.0468	0.0012	2.53	1.93	93.54
omethoate	0.0089	0.0002	2.51	1.91	88.60
pencycuron	0.0470	0.0011	2.44	1.86	93.90
propanil	0.0470	0.0011	2.39	1.83	94.08
pyraclostrobin	0.0472	0.0011	2.34	1.79	94.32
pyriproxyfen	0.0460	0.0010	2.21	1.69	91.92
quinoxyphen	0.0086	0.0001	1.56	1.19	86.40
triazophos	0.0089	0.0002	2.02	1.54	88.90
tricyclazole	0.0093	0.0002	2.29	1.75	93.10

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างสตอเบอร์รี่ที่ระดับต่ำ (Low) / LOQ (0.01 และ 0.05 µg/g)

Pesticide Name	สตอเบอร์รี่ ระดับ LOQ (0.01 และ 0.05 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 70-120
atrazine	0.0089	0.0002	2.15	1.64	88.50
clomazone	0.0519	0.0008	1.63	1.25	103.80
coumaphos	0.0089	0.0002	2.27	1.73	89.10
cymoxanil	0.0088	0.0002	2.48	1.89	88.10
diazinon	0.0490	0.0012	2.40	1.83	97.94
epoxiconazole	0.0087	0.0002	2.56	1.96	87.10
ethabozam	0.0079	0.0001	1.73	1.32	79.10
fenoxaprop-p-ethyl	0.0079	0.0002	2.60	1.98	79.00
flonicamid	0.0432	0.0010	2.36	1.80	86.46
imidaclopid	0.0434	0.0010	2.31	1.76	86.88
monocrotophos	0.0473	0.0009	1.94	1.48	94.56
omethoate	0.0087	0.0002	2.54	1.93	87.30
pencycuron	0.0463	0.0010	2.17	1.66	92.56
propanil	0.0460	0.0010	2.10	1.60	92.04
pyraclostrobin	0.0478	0.0011	2.27	1.73	95.50
pyriproxyfen	0.0468	0.0012	2.57	1.96	93.56
quinoxyphen	0.0089	0.0002	2.27	1.73	89.10
triazophos	0.0089	0.0002	2.06	1.57	89.40
tricyclazole	0.0090	0.0002	1.88	1.43	89.80

กรมวิชาการเกษตร

5. การทดสอบหาค่าความแม่น (Accuracy) และค่าความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (medium)

ทดสอบโดย Spike สารมาตรฐาน ในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ที่ระดับความเข้มข้น 0.50 µg/g จำนวนไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของสารพิษตกค้างในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตารางที่ 7 - 8

ตารางที่ 7 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างองุ่นที่ระดับ medium (0.5 µg/g)

Pesticide Name	องุ่น ระดับ medium (0.50 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 70-110
atrazine	0.4600	0.0099	2.16	1.65	91.99
clomazone	0.4565	0.0053	1.16	0.88	91.31
coumaphos	0.4643	0.0109	2.35	1.79	92.86
cymoxanil	0.4617	0.0079	1.70	1.30	92.33
diazinon	0.4731	0.0097	2.04	1.56	94.62
epoxiconazole	0.4430	0.0088	1.98	1.51	88.60
ethabozam	0.4282	0.0097	2.27	1.73	85.64
fenoxaprop-p-ethyl	0.4253	0.0050	1.17	0.90	85.06
flonicamid	0.4299	0.0073	1.70	1.29	85.99
imidaclopid	0.4318	0.0079	1.83	1.40	86.37
monocrotophos	0.4567	0.0112	2.44	1.86	91.34
omethoate	0.4571	0.0079	1.73	1.32	91.41
pencycuron	0.4551	0.0102	2.25	1.72	91.02
propanil	0.4604	0.0078	1.69	1.29	92.08
pyraclostrobin	0.4604	0.0110	2.38	1.82	92.08
pyriproxyfen	0.4606	0.0073	1.59	1.21	92.13
quinoxyphen	0.4570	0.0071	1.55	1.18	91.40
triazophos	0.4603	0.0089	1.94	1.48	92.05
tricyclazole	0.4616	0.0073	1.57	1.20	92.31

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างสตอเบอร์รี่ที่ระดับ medium (0.5 µg/g)

Pesticide Name	สตอเบอร์รี่ ระดับ medium (0.50 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 70-110
atrazine	0.4599	0.0117	2.55	1.94	91.98
clomazone	0.4550	0.0036	0.80	0.61	91.00
coumaphos	0.4559	0.0086	1.89	1.44	91.19
cymoxanil	0.4572	0.0082	1.79	1.37	91.43
diazinon	0.4682	0.0084	1.79	1.37	93.63
epoxiconazole	0.4356	0.0100	2.29	1.75	87.11
ethabozam	0.4303	0.0072	1.68	1.28	86.05
fenoxaprop-p-ethyl	0.4257	0.0058	1.37	1.05	85.15
flonicamid	0.4417	0.0109	2.47	1.88	88.34
imidaclopid	0.4363	0.0083	1.91	1.46	87.26
monocrotophos	0.4613	0.0111	2.40	1.83	92.26
omethoate	0.4581	0.0100	2.18	1.66	91.62
pencycuron	0.4584	0.0113	2.47	1.88	91.68
propanil	0.4632	0.0082	1.76	1.35	92.63
pyraclostrobin	0.4576	0.0106	2.32	1.77	91.51
pyriproxyfen	0.4553	0.0106	2.34	1.78	91.05
quinoxyphen	0.4510	0.0106	2.34	1.79	90.20
triazophos	0.4553	0.0106	2.32	1.77	91.05
tricyclazole	0.4434	0.0108	2.45	1.87	88.68

กรมวิชาการเกษตร

6. การทดสอบหาค่าความแม่น (Accuracy) และค่าความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับสูง (high)

ทดสอบโดย Spike สารมาตรฐาน ในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ที่ระดับความเข้มข้น 1.00 µg/g จำนวนไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง (Accuracy) และแม่นยำ (Precision) ของสารพิษตกค้างในตัวอย่างองุ่นและสตอเบอร์รี่ ผลการทดสอบแสดงรายละเอียดตามตารางที่ 9 - 10

ตารางที่ 9 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิดในตัวอย่างองุ่น ที่ระดับ high (1.0 µg/g)

Pesticide Name	องุ่น ระดับ high (1.0 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 70-110
atrazine	0.9644	0.0129	1.34	1.02	96.44
clomazone	0.9553	0.0200	2.09	1.60	95.53
coumaphos	0.9582	0.0136	1.42	1.08	95.82
cymoxanil	0.9462	0.0245	2.59	1.97	94.62
diazinon	0.9611	0.0228	2.37	1.81	96.11
epoxiconazole	0.9676	0.0224	2.31	1.76	96.76
ethabozam	0.8688	0.0210	2.42	1.85	86.88
fenoxaprop-p-ethyl	0.8048	0.0190	2.36	1.80	80.48
flonicamid	0.9045	0.0210	2.32	1.77	90.45
imidaclopid	0.9000	0.0216	2.40	1.83	90.00
monocrotophos	0.9164	0.0180	1.96	1.50	91.64
omethoate	0.8939	0.0227	2.54	1.94	89.39
pencycuron	0.9430	0.0226	2.39	1.83	94.30
propanil	0.9346	0.0141	1.51	1.15	93.46
pyraclostrobin	0.9496	0.0223	2.35	1.79	94.96
pyriproxyfen	0.9501	0.0168	1.77	1.35	95.01
quinoxyphen	0.9627	0.0209	2.17	1.66	96.27
triazophos	0.9692	0.0123	1.27	0.97	96.92
tricyclazole	0.9617	0.0169	1.76	1.34	96.17

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 10 แสดงค่า Precision และค่า Accuracy ของสารมาตรฐานจำนวน 19 ชนิด ในตัวอย่างสตอเบอร์รี่ที่ระดับ high (1.0 µg/g)

Pesticide Name	สตอเบอร์รี่ ระดับ high (1.0 µg/g)				
	Mean Concentration (µg/g)	Standard Deviation (SD)	Relative Standard Deviation (RSD)	Precision (HORRAT ≤ 2)	Accuracy Recovery (%) codex 70-110
atrazine	0.9562	0.0184	1.92	1.47	95.62
clomazone	0.9657	0.0205	2.12	1.62	96.57
coumaphos	0.9633	0.0147	1.53	1.16	96.33
cymoxanil	0.9567	0.0155	1.62	1.23	95.67
diazinon	0.9601	0.0186	1.94	1.48	96.01
epoxiconazole	0.9747	0.0161	1.65	1.26	97.47
ethabozam	0.8660	0.0182	2.11	1.61	86.60
fenoxaprop-p-ethyl	0.8354	0.0182	2.18	1.66	83.54
flonicamid	0.8989	0.0230	2.56	1.95	89.89
imidaclopid	0.9039	0.0194	2.15	1.64	90.39
monocrotophos	0.9189	0.0238	2.59	1.98	91.89
omethoate	0.9022	0.0221	2.45	1.87	90.22
pencycuron	0.9189	0.0238	2.59	1.98	91.89
propanil	0.9337	0.0203	2.18	1.66	93.37
pyraclostrobin	0.9572	0.0216	2.25	1.72	95.72
pyriproxyfen	0.9540	0.0215	2.26	1.72	95.40
quinoxyphen	0.9628	0.0220	2.28	1.74	96.28
triazophos	0.9548	0.0109	1.14	0.87	95.48
tricyclazole	0.9596	0.0182	1.90	1.45	95.96

กรมวิชาการเกษตร

7. สรุปผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของสารพิษตกค้างในผลไม้กลุ่ม High water and low or no chlorophyll content **(ชนิดพืช : องุ่น สตอเบอร์รี่)** จำนวน 19 ชนิดสาร ได้แก่ atrazine, clomazone, coumaphos, cymoxanil, diazinon, epoxiconazole, ethabozam, fenoxaprop-p-ethyl, flonicamid, imidaclopid, monocrotophos, omethoate, pencycuron, propanil, pyraclostrobin, pyriproxyfen, quinoxyphen, triazophos และ tricyclazole ตามคุณลักษณะที่กำหนดไว้ประกอบด้วย Specificity /

Selectivity, Linearity, Range, LOD, LOQ, Accuracy และ Precision เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ และเป็นไปตามมาตรฐานสากล สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

7.1 สารพิษตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร ผลการทดลองพบว่ามี Specification /selectivity ที่ดี ไม่มีสัญญาณอื่นรบกวน รายละเอียดตามตารางที่ 1

7.2 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของสารพิษตกค้าง 19 ชนิดสาร ในสารละลายค่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.005, 0.01 – 2.0 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร Plot graph ระหว่างความเข้มข้นของ (แกน x) กับ Area Response (แกน Y) พิจารณาพบว่ามีความเป็นเส้นตรง

7.3 ผลการตรวจสอบความเป็นเส้นตรง (Linearity) /การทดสอบช่วงของการวัด (Working range) ของสารมาตรฐาน จำนวน 19 ชนิดสาร ที่ความเข้มข้นภายใน Linearity โดยทดสอบอย่างน้อย 6 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ ผลการทดสอบพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination: R^2) และหาค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า r ที่ได้เข้าใกล้ 1 และผ่านเกณฑ์การยอมรับค่า $r \geq 0.995$ รายละเอียดตามตารางที่ 2

7.4 ผลการประเมินค่า LOD ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 0.005 และ 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัม รายละเอียดตามตารางที่ 3 - 4

7.5 ผลการประเมินค่า LOQ ของวิธีทดสอบสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.05 ไมโครกรัมต่อกรัม รายละเอียดตามตารางที่ 5 - 6

7.6 การทดสอบความแม่น (Accuracy) ประเมินจากค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร ในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบมีค่า %Recovery อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดของ Codex และสามารถยอมรับได้ รายละเอียดตามตารางที่ 7 - 10

7.7 การทดสอบความเที่ยง (Precision) ประเมินจากค่า % RSD เพื่อนำไปประเมิน HORRAT (Horwitz's ratio) ของสารพิษตกค้างตกค้างทั้ง 19 ชนิดสาร ในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้น LOQ = ต่ำ, กลาง สูง (low, medium, high) ความเข้มข้นละไม่น้อยกว่า 7 ซ้ำ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบมีค่า HORRAT (Horwitz's ratio) อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งมีค่าไม่เกิน 2 (Howitz's ratio < 2) และยอมรับได้ รายละเอียดตามตารางที่ 7 - 10

จากการประเมินผลการทดสอบทั้ง 7 คุณลักษะ พบว่าวิธีทดสอบนี้ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์กำหนดและยอมรับได้ตามเกณฑ์การยอมรับสากล สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำและสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 ได้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

นาตยา จันทร์ส่อง, อิทธิพล บ้งพรม, สุภาพร บ้งพรม, จำลอง กกรัมย์ และ สุนทรี มีเพ็ชร์. 2553. ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในพืชผักและผลไม้ในพื้นที่ สวพ. 4 หลังการรับรองระบบ GAP. การประชุมวิชาการประจำปี 2553, สวพ. 3-4-5. กรมวิชาการเกษตร. 3-5 มีนาคม 2553. ศูนย์ศิลปวัฒนธรรมกาญจนาภิเษก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.

AOAC. 1993. Peer- Verified methods Program, Manual on policies and procedures, AOAC International Arlington, Virginia, USA.

AOAC. 1998. Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC. 2004. Definitions and Calculations of HorRat Values from Intralaboratory Data, HorRat for SLV.doc, 2004-01-18, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

CIPAC. 1999. Guidelines on Method Validation to be performed in Support of Analytical Methods for Agrochemical Formulations. Collaborative International Pesticides Analytical Council, Document No. 3807, Black Bear Press, Cambridge, UK.

Henriet, J., Martijn, A. and Povlsen, H.H. 1985, CIPAC Handbook, Vol.1C, Analysis of Technical and Formulated Pesticide, Collaborative International Pesticides Analytical Council, Limited.

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.

กรมวิชาการเกษตร