



รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัด
ศัตรูพืช

Expansion the Efficiency of Pesticide Multi-Residue Analysis to
the International Standard

พนิดา ไชยยันต์บุรณ์

Panida Chaiyanboon

ปี พ.ศ. 2563

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	1
ชื่อผู้วิจัย	2
บทคัดย่อ	4
บทนำ	6
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	8
ขอบเขตของโครงการวิจัย	9
การทบทวนวรรณกรรม	9
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	11
กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของ ห้องปฏิบัติการ	11
กิจกรรมที่ 2 : การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่าง ห้องปฏิบัติการ	47
กิจกรรมที่ 3 : การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐาน ห้องปฏิบัติการ	54
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	71
เอกสารอ้างอิง	73

ชื่อผู้วิจัย

พนิดา ไชยยันต์บุรณ์	ผกาสินี คล้ายมาลา	อรพิน หนูทอง
กัญญารัตน์ เต็มปิยพล	พชร เมินหา	อชลี นามวงษ์
เกษสิริ ฉันทพิริยะพูน	พรนภัส วิชานนะณานนท์	อิทธิพล บังพรม
ชนิษฐา วงษ์นิกร	พรศิริ สายะพันธ์	
ณัฐนัย ตั้งมั่นคงวรกุล	มณฑาทิพย์ อรุณวารากรณ์	
จันทิมา ผลกอง	มัลลิกา ทองเขียว	
จารุพงศ์ ประสพสุข	ลภัสสรดา อักษรเนียม	
จินตนา ภูมังกุฎชัย	ลักษมี เดชานุรักษ์นุกูล	
จิราภา เมืองคล้าย	ระนิดา สุขประเสริฐ	
ชลิตตา นันชัย	วัชรภาพร ศรีสว่างวงศ์	
ชนิตา ทองแซม	วาเลนไทน์ เจือสกุล	
ดาวนภา ช่องวารินทร์	วิชุดา ควรหัตร์	
เนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกุล	วิทยา บัวศรี	
นงพงา โอลเสน	วิภาพร เกียรตินิติประวัติ	
นาตยา จันท์ส่อง	วีระสิงห์ แสงวรรณ	
นิกร โคตรสมบัติ	ศศิณิภา คงเข้มดี	
เบญจมาศ ใจแก้ว	ศศิมา มั่งนิมิตร	
บุญทวีศักดิ์ บุญทวี	สมชาย ฉันทพิริยะพูน	
ปภัสรา คุณเลิศ	สรัญญา ช่วงพิมพ์	
ประชาธิปไตย พงษ์ภิญโญ	สาวิตรี เขมวงศ์	
ประพันธ์ เคนท้าว	สุธินี สาสีลัง	
ปริยานุช สายสุพรรณ	สุพัตรี หนูสังข์	
ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร	สุภาพร บังพรม	
ปิยะมากรณ์ เหล่าคงถาวร	สุวรรณี ศรีทองอินทร์	

Research Team

Panida Chaiyanboom	Pornnaphat Wichanananon	Orapin Nuthong
Kanyarat Tempiyapon	Phonsiri Sayaphan	Utchalee Namvong
Kedsiri Chantapiriyapoon	Pasinee Chaicana	Ittipon Bongprom
Kanitta Wongnikorn	Montatip Arunwarakorn	
Natdanai Tungmunkongworakul	Malisa Wetchayanon	
Jantima Phonkong	Malliga Thongkheaw	
Jarupong Prasopsuk	Lapasrada Aksornneam	
Jintana Poomongkutchai	Laksamee Dachanuraknukul	
Chirapha Muangkla	Wanida Sukprasert	
Chalitta Nuchai	Watcharaporn Srisawangwong	
Chanita Thongsam	Valentine Juasakul	
Daonapha Chongwarin	Wichuta Kuanhut	
Naowarat Tangmunkongvorakul	Wittaya Buasr	
Nongpanga Olsen	Wipaporn Kiatnitiprawat	
Nattaya Jansong	Weerasing Saengwan	
Nikorn Kotsombate	Sasinida Khongchamdee	
Benjamard Jaikaew	Sasima Mungnimitr	
Piyasak Akcaboot	Somchai Chantapiriyapoon	
Paphatsara Khunlert	Saranya Choungpim	
Prachathipat Pongpinyo	Sawitri Khemvong	
Praphan Kenthao	Sutinee Saseelung	
Pariyanuch Saisuphan	Supattri Noosang	
Pariyanuch Saisuphan	Supapron Bongprom	
Pachara Meanha	Suwannee Sritongin	

บทคัดย่อ

โครงการ วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีการศึกษาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ของสารพิษตกค้างใน parameter ต่างๆ ได้แก่ range/linearity, accuracy (ประเมินจาก % recovery และ % Relative Standard Deviation ; RSD), Matrix effect , LOQ (Limit of Quantitation) และ LOD (Limit of Detection) วิธีการทดสอบ ดำเนินการตามข้อกำหนดของ SANTE/12682 (2019) และ Eurachem (2014) เกณฑ์ยอมรับ accuracy คือ % recovery 70-120 และ % RSD \leq 20 (SANTE/12682, 2019) ยอมรับ precision ที่ HORRAT \leq 2 (Horwitz, 2000) สำหรับ matrix effect ยอมรับ % ME \leq 10 (NATA, 2018) และ \leq 20 (SANTE/12682, 2019) การวิจัยและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์และตรวจสอบใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารพิษตกค้าง มีการศึกษาสารและตัวอย่างหลายชนิด ดังนี้

วิธีวิเคราะห์ที่เป็นวิธีเฉพาะ ของสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ paraquat, glyphosate, aminomethylphosphonic acid, glufosinate, bispyribac- sodium, imazapic, pendimethalin, hexazinone, 2,4- D และ MCPA ตัวอย่างที่ศึกษาได้แก่ ในดิน น้ำ พืชตระกูลส้มและธัญพืช โดยใช้ เทคนิค ได้แก่ HPLC, GC-MS/MS และ LC-MS/MS พบว่าวิธีวิเคราะห์มีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างและอนุพันธ์ ได้แก่ flonicamid, amitraz และ spiromesifen ในพืชตระกูลแตง พืชตระกูลมะเขือและพริก สาร Chiral Pesticides 6 ชนิดในมะม่วง และสารพิษตกค้างอื่นๆ ที่มีการศึกษาแบบ multiresidue ไม่น้อยกว่า 250 ชนิด โดยศึกษาในตัวอย่างหลายชนิด ได้แก่ เนื้อปลา ดิน และผัก ผลไม้ 19 ชนิด ส่วนใหญ่ใช้ วิธี QuEChERS และมีบางส่วนใช้ Steinwandter (1985) ใช้เทคนิค GC, HPLC, LC-MS/MS, GC-MS/MS พบว่าวิธีวิเคราะห์มีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ศึกษา matrix effect ในการตรวจวิเคราะห์สาร 77 ชนิดด้วยวิธี ethyl acetate (EURL-FV, 2010) ในมะเขือเทศ ส้ม และคะน้าโดยใช้เทคนิค GC-MS/MS และ matrix effect ของการตรวจ วิเคราะห์สาร 129 ชนิดในมะเขือเทศ ส้ม มะม่วง กะเพราและคะน้าด้วยวิธี QuEChERS และใช้เทคนิค LC-MS/MS พบว่าสารส่วนใหญ่ matrix มีผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์สารพิษกลุ่ม carbamate อย่างรวดเร็วในพริกโดยใช้วิธีวัดสี พบว่ามีประสิทธิภาพ ในการตรวจวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

การศึกษากิจการจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17043 (2010) และ ISO 13528 (2005) ในผักผลไม้ ได้แก่ ผักกาดหอม มะเขือเทศ แอปเปิล และแตงโม ในธัญพืช ได้แก่ ข้าวสาร ข้าวโพดและข้าวสาร (ไรซ์เบอร์รี่) มีห้องปฏิบัติการ เข้าร่วมการทดสอบจำนวน 12 - 24 ห้องปฏิบัติการ พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ (74- 87 %) โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ การจัดการตัวอย่างเป็นไปตามข้อกำหนด สามารถใช้เป็นข้อมูลในการ ขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17043 ได้

Abstract

Project of expansion the efficiency of pesticide multi-residue analysis to the international standard has been studied. The required parameters were range / linearity, accuracy (estimated by % recovery and % RSD), matrix effect, LOQ (Limit of Quantitation) and LOD (Limit of Detection). The international guidelines of both SANTE/12682 (2019) and Eurachem (2014) set to e.g. 1) 70-120% for %recovery, (2) %RSD \leq 20 (SANTE), (3) HORRAT \leq 2 for precision, (4) %ME \leq 10 for matrix effect (NATA,2018). The studies have separated the analysis method by the chemistry of the pesticides as follows ;

Specific analysis method for herbicide, paraquat, glyphosate, aminomethylphosphonic acid, glufosinate, bispyribac-sodium, imazapic, pendimethalin, hexazinone, 2,4-D and MCPA were studied in soil, water, citrus and grain samples. The HPLC, GC-MS/MS and LC-MS/MS were used in this study and the results were met the acceptable ranges.

Analysis of flonicamid, amitraz, spiromesifen and their metabolites in cucumber, aubergine and chili samples, six chiral pesticides in mango samples and study on multi-residue analysis method coverage of 250 compounds in various types of sample such as raw fish, soil and 19 types of fruits and vegetables, were studied in this project. QuEChERS and Steinwandter (1985) extraction methods were chosen and analyzed with GC, HPLC, LC-MS/MS and GC-MS/MS. The results were met the acceptable requirements.

The studies on matrix effect, 77 compounds of pesticide in the tomato, orange and Chinese kale, analysis by ethyl acetate (EURL-FV) method and GC-MS/MS technique and 129 compounds of pesticide in the tomato, orange, mango, holly basil and Chinese kale, analysis of QuEChERS method and LC-MS/MS technique; the results showed that the matrix in commodities gave major impact to the test analysis.

Determination of the carbamate pesticide in chili by colorimetric method was shown that the validation data were in the acceptable ranges.

The study on the internal reference sample preparation for the inter-laboratory comparison, according to ISO/IEC17043 (2010) and ISO 13528 (2005) in fruits and vegetable were conducted. The sample covered the variety of lettuce, tomatoes, apples, watermelons and cereal grains. Twelve-twenty four Laboratories participated in inter-laboratory comparison programs. The results shown that most laboratories have their capacity in the acceptable range with satisfactory score Z-score \leq 2. The sample preparation and data handing were compliance with ISO/IEC17043 standard.

บทนำ

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างส่วนใหญ่มักประสบปัญหาการวิเคราะห์ชนิดของวัตถุที่มีจำนวนมาก มีความหลากหลายของชนิดตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ไม่สามารถวิเคราะห์พืชที่มีความยุ่งยากและมีสารปนเปื้อนสูงได้ ประกอบกับวิธีการวิเคราะห์ที่มีหลากหลาย ไม่สามารถสรุปว่าวิธีการใดเป็นวิธีการที่เหมาะสมและสมควรใช้เป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือที่มีอยู่ สารเคมีที่ระบุให้ใช้ไม่สามารถจะหาได้ ทำให้เกิดความยุ่งยากเสียเวลา และไม่พร้อมในการทำงาน จึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างให้เหมาะสมกับวัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ทันกับความต้องการของผู้ใช้บริการ ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติ และมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ เพื่อยืนยันความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานวิธีทดสอบที่ยอมรับได้นอกจากมีความถูกต้องแม่นยำแล้ว ค่าต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ต้องต่ำกว่าค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด ที่มีได้ในผลผลิตเกษตร (Maximum Residue Limits; MRLs) ของประเทศคู่ค้า เช่น ประเทศในสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่น ซึ่งส่วนใหญ่ค่า MRL จะมีค่าต่ำมากเท่ากับค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้หรือค่า LOQ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลิตผลและผลิตภัณฑ์การเกษตรส่วนใหญ่ใช้วิธีวิเคราะห์แบบรวม (Multiresidue Method) ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้หลายชนิดในการตรวจวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ Gas Chromatograph (GC), high performance liquid chromatograph (HPLC), Gas Chromatograph -Mass Spectrometer (GC-MS), Gas Chromatograph- Mass Spectrometer /Mass Spectrometer (GC-MS/MS) หรือ liquid chromatograph -Mass Spectrometer (LC-MS), liquid chromatograph -Mass Spectrometer/ Mass Spectrometer (LC-MS/MS) การใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคใหม่ ๆ มุ่งเน้นให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพ ประหยัดเวลาและงบประมาณมากขึ้น โดยความเข้มข้นในตัวอย่างน้อยที่มีค่าต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (LOQ) ต้องต่ำกว่ามาตรฐานสารพิษตกค้างสูงสุดที่ยอมรับได้ในผลผลิตเกษตร หรือ MRLs ซึ่งประเทศที่นำเข้าสินค้าเกษตรของไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่นได้กำหนด MRLs ของสารหลายชนิดไว้ที่ 0.01 mg/kg ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำมากทำให้เป็นความยุ่งยากของห้องปฏิบัติการที่ต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายที่มีความเข้มข้นในตัวอย่างระดับ 0.01 mg/kg ให้ได้ ซึ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ได้รับความสนใจจากห้องปฏิบัติการทั่วโลกคือวิธีการ QuEChERS (Quick, Easy Cheap, Effective Rugged and safe) เป็นวิธีสกัดสารพิษตกค้างที่รวดเร็วใช้สารเคมีและเครื่องมือที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถตรวจวิเคราะห์สารได้หลายชนิด (multiresidue method) และสามารถตรวจสารในตัวอย่างในระดับต่ำมากได้ ด้วยการใช้อุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์ GC-MS/MS และ LC-MS/MS ซึ่งวิธีการนี้ใช้ได้ทั้งเป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative method)

เพื่อหาชนิดของสารพิษตกค้างและใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative method) เพื่อหาปริมาณของสารพิษตกค้าง โดยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและในต่างประเทศมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาในพืชที่เป็นพืชเขตร้อนที่มีสารปนเปื้อนในตัวอย่างแตกต่างกัน เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการได้

สารพิษตกค้างหลายชนิดไม่สามารถใช้วิธีตรวจวิเคราะห์แบบรวมได้ เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของสารหรือมีสารปนเปื้อนในตัวอย่างจึงต้องใช้วิธีการจัดสิ่งปนเปื้อนที่แตกต่างไป และบางสารต้องตรวจวิเคราะห์สารที่เกิดจากการสลายตัวของสารนั้นตาม residue definition (residue definition หมายถึง สารพิษตกค้างและสารเคมีที่เกี่ยวข้อง ที่กำหนดให้ตรวจวิเคราะห์ เพื่อแสดงความสอดคล้องกับค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างที่ยอมให้มีได้ในผลผลิต (MRL)) สารที่ต้องตรวจวิเคราะห์สารอนุพันธ์ที่เกิดจากการสลายตัวตาม residue definition ที่กำหนดใน เช่น spiromesifen, hexythiazox, flonicamid และ amitraz เป็นต้น (Codex Alimentarius Commission, 2021) นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจวิเคราะห์สาร chiral pesticide ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเดียวกัน แต่การจัดเรียงตัวของหมู่อะตอมในสามมิติแตกต่างกัน ทำให้สัญญาณการตรวจวัดด้วยเครื่องวิเคราะห์อาจมีมากกว่าหนึ่งพีค จึงต้องศึกษาเพื่อให้สามารถแยกสารที่มีสูตรโครงสร้างแบบ chiral ได้อย่างชัดเจน เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้องทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ

สารหลายชนิดจำเป็นต้องใช้วิธีที่เฉพาะเจาะจงในการตรวจวิเคราะห์ (single residue method) ซึ่งต้องมีการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีการ แยกตามชนิดของวัตถุอันตรายและชนิดพืช วัตถุอันตรายที่ต้องใช้วิธีเฉพาะ เช่น วัตถุอันตรายที่มีขั้ว (polar pesticide) มีการละลายในน้ำได้ดี ได้แก่ glyphosate และ glufosinate เป็นต้น ทำให้ยากในการสกัดสารออกมาจากน้ำ ส่วนวัตถุอันตรายที่เป็นกรด (acidic pesticide) มักมีการสลายตัวเมื่อสภาพตัวอย่างเป็นด่างหรือสภาพตัวอย่างไม่เหมาะสม ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีปริมาณสารต่ำกว่าความเป็นจริง

การศึกษานี้ได้มุ่งเน้นการใช้เทคนิคที่ทันสมัย เช่น LC-MS/MS หรือ GC-MS/MS เพื่อให้สามารถรองรับการตรวจวิเคราะห์วัตถุอันตรายได้มากขึ้นและเป็นการพัฒนามาตรฐานห้องปฏิบัติการให้มีความทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล

ในโครงการได้มีการศึกษาเพื่อสนับสนุนการแก้ปัญหาการตรวจวัดที่สำคัญคือสารปนเปื้อนที่มีอยู่ในตัวอย่างไปรบกวนการตรวจวิเคราะห์ ทำให้สัญญาณการตรวจวิเคราะห์เพิ่มขึ้นหรือลดลงเรียกว่า matrix effect ซึ่งจะส่งผลให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณไม่ถูกต้อง การแก้ปัญหา matrix effect คือต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานด้วยตัวทำละลายที่สกัดจากตัวอย่างเรียกว่า matrix-matched calibration ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการช่วยลดการเกิด matrix effect แต่ปัญหาคือการตรวจวิเคราะห์

ตัวอย่างพืชผักและผลไม้มีความหลากหลายของชนิดพืชและชนิดสาร การเตรียมสารละลาย matrix-matched calibration สำหรับใช้ในพืชชนิดนั้นๆ ทำให้เกิดความยุ่งยากและเสียเวลาเนื่องจากในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้งมีตัวอย่างพืชมากกว่าหนึ่งชนิด จึงได้มีการศึกษาว่าสารและตัวอย่างชนิดใดที่เกิดปัญหา matrix effect เพื่อจัดกลุ่มสารและตัวอย่างพืชและสามารถคัดเลือก matrix ในการเตรียมสารมาตรฐาน จากตัวอย่างพืชผักและผลไม้ที่เป็นตัวแทนพืชอื่นๆ หรือถ้าไม่พบปัญหา matrix effect กับสารและตัวอย่างพืช ทำให้การตรวจวิเคราะห์สามารถใช้สารมาตรฐานที่เตรียมใน solvent ได้ ซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เกิดประโยชน์แก่นักวิจัย ในการกำหนดวิธีการเตรียมสารมาตรฐานได้อย่างถูกต้องเหมาะสมกับชนิดสารและชนิดพืชเพื่อให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณมีความถูกต้อง

โครงการวิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ประกอบด้วย 3 กิจกรรม ได้แก่ กิจกรรมที่ 1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ กิจกรรมที่ 2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการและกิจกรรมที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาตัวอย่างหลากหลาย ได้แก่ ดินและน้ำ ผัก ผลไม้หลายชนิด และศึกษาวัตถุมีพิษหลายชนิดส่วนใหญ่เป็นการตรวจวิเคราะห์แบบ multiresidue ทำให้เพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์ โดยใช้วิธีการสกัดตัวอย่างแบบใหม่และใช้เทคนิคที่ทันสมัย เช่น LC-MS/MS และ GC-MS/MS นอกจากนี้เป็นการพัฒนาบุคลากรด้านวิเคราะห์และทดสอบแล้ว ยังสามารถนำผลการศึกษาไปประกอบการรับรองตามระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้ นอกจากนี้มีการศึกษาการเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบความสามารถหรือการทดสอบความชำนาญของห้องปฏิบัติการโดยดำเนินการตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17043 เป็นวิธีการการประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการและใช้สำหรับการเฝ้าระวังสมรรถนะในการดำเนินงานอย่างต่อเนื่องของห้องปฏิบัติการให้เป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ซึ่งเป็นการยกระดับการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการและเป็นส่วนสนับสนุนที่ดีกับห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตร และลดปัญหาของห้องปฏิบัติการที่ได้รับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ในการซื้อตัวอย่างจากต่างประเทศเพื่อทดสอบ Proficiency testing ; PT ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และไม่สามารถหาชนิดตัวอย่างและชนิดสารที่ตรงกับขอบข่ายการรับรองของห้องปฏิบัติการได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการ ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่มีความถูกต้อง แม่นยำเหมาะสม กับชนิดสารและพืชที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ เป็นการเพิ่มความสามารถให้กับห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025

3. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียม การจัดการตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่าง อ้างอิงภายในห้องปฏิบัติการ
4. เพื่อศึกษาขั้นตอน วิธีดำเนินการในการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการด้านสารพิษตกค้าง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรในผัก ผลไม้ ในดินและน้ำ โดยใช้วิธีการและเทคนิคการตรวจวัดที่เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล
2. ศึกษาวิธีการจัดเตรียมตัวอย่างอ้างอิงภายในห้องปฏิบัติการ (internal quality control sample) ในผัก ผลไม้ที่มีปริมาณน้ำและคลอโรฟิลสูงและธาตุฟอส และนำไปใช้ในการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

การทบทวนวรรณกรรม

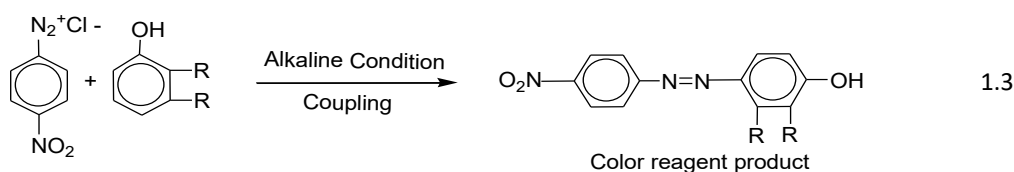
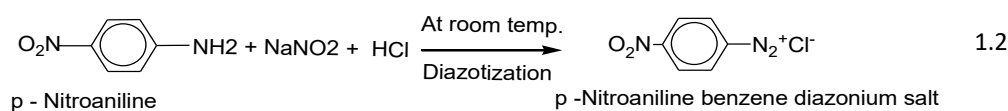
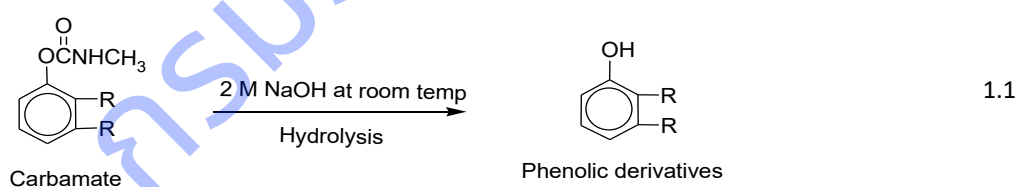
การใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ไม่เป็นวิธีมาตรฐานหรือวิธีการดัดแปลงจากวิธีการมาตรฐาน หรือวิธีที่พัฒนาขึ้นเอง (In-house Method) เลือกวิธีการต่างๆ มาปรับปรุง พัฒนา เปลี่ยนแปลง หรือลดขั้นตอน เหมาะสมกับวัสดุ อุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ถือเป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ (analytical method development) ซึ่งต้องมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธี parameter ที่ต้องพิสูจน์ ได้แก่ working range/linearity, matrix effect, accuracy, limit of quantitation (LOQ) และ limit of detection (LOD) (Eurachem, 2014) (SANTE/12682, 2019)

วิธีการ QuEChERS (Quick, Easy Cheap, Effective Rugged and Safe) เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับในระดับสากล เป็นวิธีที่น่าสนใจและนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ใช้คน สารเคมีและเครื่องมือ น้อย มีการศึกษาและพิสูจน์ความใช้ได้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างหลายชนิด ในผักผลไม้หลายชนิด โดยใช้เทคนิค Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection (Lehotay et al., 2005) ; (Anastassiades et al., 2003)

การตรวจวัดด้วยเครื่อง Chromatograph เช่น GC HPLC มักมีปัญหาการเกิด matrix-induced enhancement effects เนื่องจากสารที่มีอยู่ในตัวอย่าง (matrix) ไม่สามารถถูกขจัดให้หมดไป ในขั้นตอนการสกัดและขจัดสิ่งปนเปื้อน ทำให้สัญญาณการตรวจวัดสูงขึ้นหรือต่ำกว่าความเป็นจริง จึงส่งผลกระทบต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เช่น ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสารที่มีปริมาณต่ำได้ เกิดการรายงานผลการวิเคราะห์ผิดพลาดทั้งปริมาณสารและการพบสารทั้งที่ไม่มีสารในตัวอย่าง (false positive) หรือไม่พบสารทั้งที่มีสารในตัวอย่าง (false negative) (Maštovská, et al., 2005)

แต่ matrix ก็มีข้อดี คือช่วยให้ลักษณะของ peak และ peak intensity ของสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ดีขึ้นและมีสัญญาณการตรวจวัดสูงกว่าสารมาตรฐานในตัวทำละลาย (solvent) แต่ก็มีผลเสียคือผลการตรวจวิเคราะห์มีค่าสูงกว่าที่เป็นจริง (over estimated results) เมื่อใช้ calibration standards ที่เตรียมในตัวทำละลาย (solvent) (Anastassiades et al., 2006) ตัวอย่างบางชนิด ผลของ matrix ทำให้สารมีการแยกของสัญญาณการตรวจวัด (peak) ไม่ดี มีลักษณะ tailing peak และสัญญาณการตรวจต่ำกว่าสารมาตรฐานในตัวทำละลาย (solvent) (Maštovská, et al., 2005) ทำให้ผลการตรวจวิเคราะห์มีค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง เมื่อใช้ calibration standards ที่เตรียมในตัวทำละลาย (solvent) เพื่อแก้ปัญหา matrix effect นี้จึงต้องทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบสัญญาณการตรวจวัดของสารมาตรฐานในตัวทำละลาย (solvent) กับ สารมาตรฐานในตัวทำละลายตัวอย่าง (matrix) ที่สกัดด้วยวิธีที่ตรวจวิเคราะห์

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม carbamate ปัจจุบันใช้เทคนิค เช่น HPLC และ LC-MS/MS ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง การใช้เทคนิคอื่นที่น่าสนใจและไม่ต้องใช้เครื่องมือทันสมัยคือการวิเคราะห์ปริมาณ carbamate ด้วยวิธีวัดสี ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารคาร์บาเมตกับสารละลาย p-nitroaniline ในสภาวะเบส (ภาพที่ 1) ซึ่งมีขั้นตอนของการวิเคราะห์ คือ ทำการ hydrolysis สาร carbamate ในสภาวะเบสและที่อุณหภูมิห้อง เกิดผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์ของ phenol ดังสมการ 1.1 จากนั้น diazotization สาร p-nitroaniline กับ NaNO_2 และ HCl ที่อุณหภูมิห้อง ได้สาร p-Nitrobenzene diazonium salt ดังสมการ 1.2 ขั้นตอนต่อไปทำปฏิกิริยา Coupling ระหว่างผลิตภัณฑ์ของสมการ 1.1 และ 1.2 เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 525 nm ดังสมการ 1.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสัมพันธ์กับปริมาณคาร์บาเมต นำหลักการนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บาเมตในตัวอย่างได้ (Chu and Fan, 2009)



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาการเกิดสีของสารกลุ่มคาร์บาเมต (Chu and Fan, 2009)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัด

ศัตรูพืช มี 3 กิจกรรม

กิจกรรมที่ 1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของ

ห้องปฏิบัติการ

1.1 ชื่อการทดลอง ประกอบด้วย 23 การทดลอง

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
1.1	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างพาราควอต (paraquat) ในดินและน้ำ	จันทิมา ผลทอง ^{1/} มลิสา เวชยานนท์ อำนาจ กลิ่นเทศ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.2	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ไกลโฟเสต (glyphosate) กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก (aminomethylphosphonic acid) และกลูโฟซิเนต (glufosinate) ในน้ำ	พกาสิณี คล้ายมาลา ^{1/} ปภัสรดา คุณเลิศ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการ ผลิตทางการเกษตร
1.3	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างสไปโรมีซีเฟน (spiromesifen) และอนุพันธ์ ในพืชตระกูลมะเขือ	สุพัตริ หนูสังข์ ^{1/} บุญทวีศักดิ์ บุญทวี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการ ผลิตทางการเกษตร
1.4	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างไกลโฟเสต (glyphosate) และกลูโฟซิเนต (glufosinate) ในพืชตระกูลส้ม	ศศิณิภา คงเข้มดี ^{1/} สุพัตริ หนูสังข์ บุญทวีศักดิ์ บุญทวี ประพันธ์ เคนท้าว จินตนา ภู่มงกุฏชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการ ผลิตทางการเกษตร
1.5	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างเมทอกซีฟีโนไซด์ (methoxyfenozide) ทีบูฟีโนไซด์ (tebufenozide) และโครมาฟีโนไซด์ (chromafenozide) ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลสูง	วาเลนทร์ เจือสกุล ^{1/} วิชุดา ควรหัตร์ วีระสิงห์ แสงวรรณ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการ ผลิตทางการเกษตร
1.6	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารฟลอนิคามิด (flonicamid) และสารอนุพันธ์ ในพืชตระกูลแตง ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี/แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS)	ประพันธ์ เคนท้าว ^{1/} บุญทวีศักดิ์ บุญทวี สุพัตริ หนูสังข์ ศศิณิภา คงเข้มดี จินตนา ภู่มงกุฏชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการ ผลิตทางการเกษตร

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

1.1 ชื่อการทดลอง (ต่อ)

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
1.7	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 2,4- ดี (2,4- D)) และเอ็มซีพีเอ (MCPA) ในธัญพืช	บุญทวีศักดิ์ บุญทวี ^{1/} สุพัตรี หนูสังข์ ศศิณีญา คงเข้มดี ประพันธ์ เคนท้าว จินตนา ภู่มงกุฏชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.8	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างอะมิทราซ (amitraz) และอนุพันธ์ในพริก	ระนิดา สุขประเสริฐ ^{1/} วีระสิงห์ แสงวรรณ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.9	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ในดิน	ประกิจ จันทรดี ^{1/} ผกาสินี คล้ายมาลา จันทิมา ผลทอง	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.10	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย (benzoylurea) ในหน่อไม้ฝรั่ง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS	ประพันธ์ เคนท้าว ^{1/} บุญทวีศักดิ์ บุญทวี สุพัตรี หนูสังข์ ศศิณีญา คงเข้มดี จินตนา ภู่มงกุฏชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.11	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดวัชพืช บิสไพริแบค-โซเดียม (bispyribac- sodium) อิมาซาพิก (imazapic) เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) และเฮกซะซีโนน (hexazinone) ในธัญพืช	ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร ^{1/} ชนิตา ทองแถม วีระสิงห์ แสงวรรณ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.12	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ Chiral Pesticides 6 ชนิด ในมะม่วง โดยใช้คอลัมน์ที่มีความเฉพาะเจาะจง กับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)	พรณัท วิชานนะนันท์ ^{1/} ประชาติปต์ย์ พงษ์ภิญโญ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร
1.13	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างโทลเฟนไพเรด (tolfenpyrad) และทีบูเฟนไพเรด (tebufenpyrad) ในมะเขือเทศ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)	วีระสิงห์ แสงวรรณ ^{1/} ชนิตา ทองแถม ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัย การผลิตทางการเกษตร

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

1.1 ชื่อการทดลอง (ต่อ)

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
1.14	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ QuEChERS เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี/แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)	ประชาติปัทม์ พงษ์ภิญโญ ^{1/} พรนภัส วิชาชนะนันท์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
1.15	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และ ไตรอะซีน (triazine) ในเนื้อปลา	มลิสตา เวชยานนท์ ^{1/} จันทิมา ผลกอง อำนาจ กฐินเทศ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
1.16	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของออกซีฟลูอออร์เฟน (oxyfluorfen) ไพรีดาเบน (pyridaben) ไดฟิโนโคนาโซล (difenoconazole) คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) แลมด้า-ไซฮาโลทริน (L-cyhalothrin) คลอร์ฟินาเพอร์ (chlorfenapyr) เบต้า-ไซฮาโลทริน (beta-cyfluthrin) และเฟนโพรพาทริน (fenpropathrin) ในกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง (high water content) และกลุ่มพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง (high acid and high water content)	ศศิมา มั่งนิมิตร ^{1/} ลักขมี เดชานุรักษ์นุกูล วิทยา บัวศรี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
1.17	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างในมะเขือเทศ ส้ม และคะน้า ด้วยวิธี ethyl acetate method โดยใช้การตรวจวัดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection)	ลักขมี เดชานุรักษ์นุกูล ^{1/} ศศิมา มั่งนิมิตร วิทยา บัวศรี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

1.1 ชื่อการทดลอง (ต่อ)

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
1.18	การศึกษาผลของสารสกัดจากพืช (matrix effect) สำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร 129 ชนิด ในผัก ผลไม้ ด้วยวิธี QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโท-กราฟี แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry)	ชนิตา ทองแถม ^{1/} วีระสิงห์ แสงวรรณ ปิยะศักดิ์ อรรคบุตร	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
1.19	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) อย่างรวดเร็วในพริกโดยใช้วิธีวัดสี	สุภาพร บังพรม ^{1/} นาคยา จันทร์ส่อง อิทธิพล บังพรม	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 4
1.20	การคัดเลือก สารสกัดจากพืชตัวแทน (representative matrix) เพื่อการหาปริมาณสารพิษตกค้างในการตรวจวิเคราะห์แบบรวม ในผักและผลไม้ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ	ลักษมี เตชานุรักษ์นุกูล ^{1/} มัลลิกา ทองเขียว ภาสินี ไชยชนะ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
1.21	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ในดิน โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS	จารุพงศ์ ประสพสุข ^{1/} ปริยานุช สายสุพรรณ วัชรพร ศรีสว่างวงศ์	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 3
1.22	การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พิษตกค้างกลุ่ม ไอโซโพรคาร์บ (isoprocarb) ไอโพรวาลิคาร์บ (iprovalicarb) และไทโอเบนคาร์บ (thiobencarb) ในธัญพืชด้วยเทคนิคลิกวิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี/แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS)	วีระสิงห์ แสงวรรณ ^{1/} ระนิดา สุขประเสริฐ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
1.23	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ใน กระจับปี่ หอมแดง และใบชา (แห้ง)	อชลิ นามวงษ์ ^{1/} ลภัสสรดา อักษรเนียม	กองควบคุมพืชและวัสดุ ทางการเกษตร

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

1.2 ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ มีดังนี้

1.2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

- 1) จัดหาสารเคมี สารมาตรฐาน ตัวอย่างดิน น้ำ พืช อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น คอลัมน์สำหรับเครื่อง GC, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC และ LC-MS/MS สอบเทียบเครื่องมือที่มีผลต่อการทดสอบ เช่น เครื่องชั่ง เทอร์โมมิเตอร์ เครื่องแก้วปริมาตร เป็นต้น
- 2) เตรียมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษที่มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทำให้ทราบความเข้มข้นของสารในตัวอย่างแน่นอน (spiked sample) และเพื่อสร้าง calibration curve
- 3) ปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ โดยฉีดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาช่วงต่ำสุดจนถึงสูงสุดของการวัดตามความเหมาะสม เพื่อให้มีสัญญาณการตรวจวัดได้ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานต่ำสุดและ range ของ calibration curve ของสารมาตรฐาน
- 4) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยใช้วิธีการใดวิธีการหนึ่ง que เลือกใช้ในการทดสอบ ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบหรือมีสัญญาณการตรวจวัดของสารพิษตกค้างปริมาณน้อยกว่าที่ระดับ Limit of Quantitation ; LOQ และต้องพบไม่เกิน 30 % ของระดับ LOQ (SANTE/12682, 2019)
- 5) ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารที่มีสัญญาณการตรวจวัดตรงกับสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบในสารเคมี เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆ โดยตรวจวิเคราะห์ solvent blank ตามวิธีทดสอบ ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ
- 6) ทดสอบวิธีวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงในตัวอย่าง (spike) และหาเปอร์เซ็นต์การวิเคราะห์ กลับคืน (% recovery) ดังนี้
 - 6.1) ทดสอบวิธีวิเคราะห์อย่างน้อย 2 วิธี ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานในตัวอย่าง อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ประเมินผลการทดสอบจากค่าร้อยละการกลับคืนของสารที่ทดสอบ (% recovery) และความเที่ยง (precision) ซึ่งประเมินจากค่า % Relative Standard Deviation; % RSD ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้องแม่นยำ (LOQ) ควรมีค่าน้อยกว่าค่า MRL (Maximum Residue Limit) เพื่อใช้ประโยชน์จากวิธีวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการ
 - 6.2) ปรับวิธีการที่ให้ผลการวิเคราะห์มีแนวโน้มอยู่ในเกณฑ์ โดยปรับในขั้นตอนสกัดและ clean up ตัวอย่าง เพื่อให้ได้วิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำและมีค่า LOQ น้อยกว่าค่า MRL
 - 6.3) สร้างวิธีและความถูกต้องของวิธีทดสอบ

7) การบันทึกข้อมูล

บันทึก น้ำหนัก ปริมาตร และความเข้มข้น ในการเตรียมสารมาตรฐาน น้ำหนัก ตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารมาตรฐานในตัวอย่างที่เติมและที่ตรวจวิเคราะห์ได้ สัญญาณการตรวจวัดของ เครื่องตรวจวิเคราะห์ Signal to Noise Ratio ของสัญญาณการตรวจวัดที่ความเข้มข้นระดับ LOD และ LOQ และสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์

1.2.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1) จัดหา สารเคมี สารมาตรฐาน ตัวอย่างดิน น้ำ พืช อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น คอลัมน์สำหรับเครื่อง GC, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC และ LC-MS/MS สอบเทียบเครื่องมือที่มีผลต่อการทดสอบ เช่น เครื่องชั่ง เทอร์โมมิเตอร์ และเครื่องแก้วปริมาตร เป็นต้น

2) เตรียมสารมาตรฐานของวัตถุที่มีพิษที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้เตรียม spiked sample และเพื่อสร้าง calibration curve

3) ปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ โดยฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาช่วงต่ำสุดจนถึงสูงสุดของการวัดตามความเหมาะสม เพื่อให้มีสัญญาณการตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานต่ำสุด และ range ของ calibration curve ของสารมาตรฐาน

4) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง sample blank โดยใช้วิธีทดสอบที่เลือก ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ หรือมีสัญญาณการตรวจวัดของสารพิษตกค้างน้อยกว่าที่ระดับ LOQ และหากพบสารในตัวอย่างต้องพบไม่เกิน 30 % ของระดับ LOQ

5) ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารที่มีสัญญาณการตรวจวัดตรงกับสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบใน สารเคมี เครื่องแก้ว อุปกรณ์ต่าง ๆ โดยตรวจวิเคราะห์ solvent blank ตามวิธีทดสอบ ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ

6) ทดสอบวิธี วิเคราะห์ ตาม parameter ต่างๆดังนี้

6.1) Linearity / range

6.1.1) ตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 3-5 ความเข้มข้น ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อสร้าง calibration curve นำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่าง response ของการตรวจวัดกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ประเมินค่า correlation coefficient; r หรือค่า coefficient of determination; R^2

6.1.2) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่กำหนด หาความสัมพันธ์ระหว่าง response ของการตรวจวัดกับความเข้มข้นของสารพิษตกค้างที่เติมในตัวอย่าง หรือความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นของสารพิษตกค้างที่เติมในตัวอย่าง ประเมินค่า correlation coefficient; r หรือค่า coefficient of determination; R^2 (Eurachem, 2014)

6.2) Matrix effect

โดยการเปรียบเทียบสัญญาณการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ หรือความเข้มข้น (slope) ของ calibration curve ของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่เตรียมในตัวทำละลาย (solvent) กับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่เตรียมในสารละลายตัวอย่าง (matrix) ที่สกัด และ clean up ด้วยวิธีที่ใช้ทดสอบ โดยสัญญาณการตรวจวัดต้องแตกต่างกันไม่เกิน 20% (SANTE/12682, 2019) หรือ slope แตกต่างกันไม่เกิน 10% (NATA, 2018) หากพบว่ามี matrix effect ต้องเตรียมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (matrix) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร โดยกรณีใช้ slope ประเมิน matrix effect จากสมการดังนี้

$$\text{Matrix effect(\%)} = \left[\frac{(\text{slope of calibration curve in matrix}) - (\text{slope of calibration curve in solvent})}{(\text{slope analytical curve std. in solvent})} \right] \times 100$$

6.3) Accuracy

ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นในตัวอย่าง (spiked sample) อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5- 10 ซ้ำ ประเมิน trueness และ precision ดังนี้

6.3.1) Trueness ประเมินจากค่าร้อยละการกลับคืนของสารในตัวอย่างที่ทดสอบ (% recovery) เกณฑ์ยอมรับคือ 70-120% (SANTE/12682, 2019) ซึ่งเกณฑ์ยอมรับจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C1}{C2}$$

C1 - ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ หน่วย mg/kg หรือ $\mu\text{g/g}$ หรือ mg/L หรือ $\mu\text{g/mL}$

C2 - ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง mg/kg หรือ $\mu\text{g/g}$ หรือ mg/L หรือ $\mu\text{g/mL}$

6.3.2) Precision ประเมินจาก % Relative Standard Deviation; RSD โดย เกณฑ์ยอมรับของ % RSD ≤ 20 (SANTE/12682, 2019) หรือนำ % RSD ไปคำนวณค่า HORRAT โดยมีเกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (Horwitz, 2000) ซึ่งการคำนวณค่า Predicted Horwitz RSD (สำหรับการทำซ้ำแบบ repeatability) % RSD และ HORRAT มีสูตรการคำนวณดังนี้

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

C = concentration ratio

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

SD- Standard Deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

\bar{x} - ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

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

6.4) LOQ (Limit of Quantitation) และ LOD (Limit of Detection)

6.4.1) LOQ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมี accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ อาจประเมินโดยใช้ค่า SD- standard deviation ของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่ต่ำที่สุดที่นำมาหา accuracy โดย $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$ และ $\text{LOD} = 3 \times \text{SD}$ พิสูจน์ด้วยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 10 ซ้ำ ประเมินค่า % recovery และ % RSD ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่สัญญาณการวัดมี noise สัญญาณการตรวจวัดที่ระดับ LOQ ต้องมี Signal to Noise Ratio ≥ 10

6.4.2) LOD เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยต้องพบสัญญาณการตรวจวัดสารในตัวอย่างทุกตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (ตัวอย่างต้องพบสารในมีระดับความเชื่อมั่น 99%) อาจประเมินโดยใช้ค่า SD- standard deviation ของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่ต่ำที่สุดที่นำมาหา accuracy โดย $\text{LOD} = 3 \times \text{SD}$ ทดสอบด้วยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 10 ซ้ำ ประเมินจาก signal ของการตรวจวัด สำหรับเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่สัญญาณการวัดมี noise ต้องมี Signal to Noise Ratio ≥ 3

7) สรุปและรายงานผล

สรุปและรายงานผลการทดสอบตามรูปแบบที่กำหนด มีการวิจารณ์ผลการทดลอง เสนอแนะและกล่าวถึงการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

8) การบันทึกข้อมูล

บันทึก น้ำหนัก ปริมาตร และความเข้มข้น ในการเตรียมสารมาตรฐาน น้ำหนัก ตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารมาตรฐานในตัวอย่างที่เติมและที่ตรวจวิเคราะห์ได้ สัญญาณการตรวจวัดของ เครื่องตรวจวิเคราะห์ Signal to Noise Ratio ของสัญญาณการตรวจวัดที่ความเข้มข้นระดับ LOD และ LOQ และสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์

1.3 ผลการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 23 การทดลอง มีดังนี้

1.1 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง พาราควอต (paraquat) ในดินและน้ำ

1.1.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC

ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง high performance liquid chromatography ; HPLC ปริมาตรในการฉีดสาร 20 μ l อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) 1 mL ต่อนาที ตรวจวัดด้วย Diode Array Detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 258 nm อุณหภูมิคอลัมน์ 40 $^{\circ}$ C สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ มี 2 ชนิด คือ สารละลาย ammonium formate 250 mM, pH 3.7 และ acetonitrile ในอัตราส่วน 80:20

การทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) ของกราฟมาตรฐานของ working standard solution ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.0252- 2.5168 μ g/mL พบว่ามีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.997

1.1.2 การตรวจวิเคราะห์ paraquat ในตัวอย่างดิน

1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยดัดแปลงมาจากวิธี ของ ICI Plant Protection Division Method (Kennedy, 1986)

ทดสอบวิธีการสกัดโดยทดสอบอัตราส่วนและปริมาตรของ conc. sulfuric acid และน้ำกลั่น และทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการต้มระเหยควบแน่น ที่ระยะเวลา 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง พบว่า มี % recovery 80.8, 81.4, 90.6, 94.1 และ 95.9 ตามลำดับ ซึ่งทุกระยะเวลาให้ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ จึงเลือกระยะเวลาที่น้อยที่สุดคือ 2 ชั่วโมง ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบการ clean up ตัวอย่าง โดยทดสอบประสิทธิภาพของ SPE cartridge 3 ชนิด คือ C_{18} , Si-OH และ ENVI-CarbTM พบว่าการ clean up ด้วย ENVI-CarbTM SPE cartridge มีประสิทธิภาพสูงกว่า SPE ชนิดอื่น ปริมาตรของสารสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมในการนำไป clean up ผ่าน SPE cartridge คือ 5 mL และใช้ความเข้มข้นของ ammonium formate ใน elution solution ที่ใช้ชะตัวอย่างเท่ากับ 250 mM

2) นำวิธีที่ปรับแล้วไปตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดินทรายปนร่วน ดินทราย และดินร่วนเหนียวปนทราย ที่ความเข้มข้นของ paraquat ในตัวอย่าง 0.5311, 1.0067 และ 3.0349 mg/kg พบว่ามีค่า % recovery ในช่วง 71-115 และมี % RSD ในช่วง 5.17-13.16 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และ % RSD \leq 20 และได้เปรียบเทียบผลการวัดด้วยเครื่อง HPLC ของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับผลการวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ตามวิธีทดสอบเดิม (Kennedy, 1986) พบว่าการใช้เครื่อง HPLC ให้ % recovery และ precision ที่ดีกว่า

3) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบ fortified sample พบว่าช่วงความเข้มข้นของวิธีทดสอบ (range/linearity) อยู่ในช่วง 0.1 - 20 μ g/g โดยมีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9989 ส่วน

accuracy ทดสอบที่ 0.1, 1.0 และ 20.0 $\mu\text{g/g}$ (n=7) พบว่ามี % recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 79.5-107.0 % RSD อยู่ในช่วง 0.4-13.7 และ HORRAT ในช่วง 0.06-0.90 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOQ เท่ากับ 0.10 $\mu\text{g/g}$ และ LOD เท่ากับ 0.05 $\mu\text{g/g}$

1.1.3 การตรวจวิเคราะห์ paraquat ในตัวอย่างน้ำ

1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ทดสอบการ clean up ตัวอย่างโดยทดสอบประสิทธิภาพของ SPE cartridge 2 ชนิด ได้แก่ Si-OH และ ENVI-Carb™ SPE cartridge เมื่อเปรียบเทียบค่า % recovery พบว่า SPE cartridge ทั้งสองชนิดให้ผลการทดสอบที่ค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ Si-OH SPE cartridge เนื่องจากมีราคาถูกกว่า ทดสอบปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบผ่าน SPE cartridge พบว่าปริมาตรของตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 500 mL และทดสอบปริมาตรของ elution solution ที่ชะผ่าน SPE cartridge ที่อัตราการไหล 1 mL/min พบว่าปริมาตรของ elution solution ที่เหมาะสมคือ 5 mL

นำวิธีที่ปรับแล้วไปทดสอบในตัวอย่างน้ำชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำกลั่น (distilled water) น้ำผิวดิน (surface water) และน้ำประปา (tap water) ที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/L}$ (n=3) ได้ค่า % recovery ในช่วง 97-109 และ % RSD ในช่วง 2.4-3.7 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด

2) การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบ range/linearity โดยตรวจวิเคราะห์ fortified sample พบว่าอยู่ในช่วง 0.25 - 20 $\mu\text{g/L}$ มีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9983 สำหรับ accuracy ทดสอบที่ 1, 10 และ 20 $\mu\text{g/L}$ พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 77.4-85.8 และ % RSD อยู่ในช่วง 4.7-10.9 และ HORRAT ในช่วง 0.22-0.56 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.25 $\mu\text{g/g}$ และ LOQ เท่ากับ 0.50 $\mu\text{g/L}$ ซึ่งผลการทดสอบที่ระดับ LOQ มี % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 88.3 % RSD เท่ากับ 9.08 และ HORRAT เท่ากับ 0.27

1.2 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ไกลโฟเสต (glyphosate) กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก (aminomethylphosphonic acid) และกลูโฟซิเนต (glufosinate) ในน้ำ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างไกลโฟเสต (glyphosate) กรดอะมิโนเมทิลฟอสโฟนิก (aminomethylphosphonic acid) และกลูโฟซิเนต (glufosinate) ในน้ำ โดยใช้สาร 9-fluorenylmethyl methoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (Borate buffer) เพื่อเปลี่ยนรูปสารในการตรวจวิเคราะห์ด้วย เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph ที่ต่อกับหัวตรวจวัดชนิด Fluorescence Detector (FLD) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ โดยทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.04-9.0 $\mu\text{g/L}$ พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 78-105 มี % RSD < 20 ค่า LOD และ LOQ พบว่าเท่ากับ 0.05 และ 0.15 $\mu\text{g/L}$ ตามลำดับ

1.3 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างสไปโรมีซิเฟน (spiromesifen) และอนุพันธ์ในพืชตระกูลมะเขือ

ศึกษาการตรวจวิเคราะห์ spiromesifen และสารอนุพันธ์คือ spiromesifen-enol ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ในพืชตระกูลมะเขือ

1.3.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

การตรวจวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol พบว่ามีค่า retention time ที่ 6.81 นาที และ 3.96 นาที ตามลำดับ ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.005-0.50 µg/mL มีค่า $R^2 = 0.9998$ และ 0.9993 ตามลำดับ โดยตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

1) เครื่อง LC

LC-MS/MS : Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole
 Column : Synergi Fusion-RP 100A, 100 mm × 2.0 mm
 Column Temperature : 25 °C
 Flow rate : 0.4 mL/min
 Injection Volume : 5 µL
 Mobile phase : 5mM ammonium formate in H₂O (A) and ACN (B)

2) เครื่อง Triple Quadrupole Mass Spectrometer

Ion mode : Positive ESI
 Nebulizer : 45 psi
 Drying gas flow : 11 L/min
 Capillary : 4000 V
 Drying gas temp : 350 °C

MS/MS

Compound Name	Retention time (min)	Precursor	Product ion
spiromesifen	6.81	371	273
		273	187, 255
spiromesifen-enol	3.96	273	187, 255

1.3.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ วิธี original QuEChERS (Anastassides et al., 2003) วิธี EN QuEChERS (EN 15662, 2008) และวิธีการสกัดด้วย ethyl acetate (Pihlstrom et al., 2007) ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (n=6) ผลการศึกษา % recovery ของ spiromesifen และ

spiromesifen-enol วิธี Original QuEChERS (Anastassides et al., 2003) เท่ากับ 105 และ 55 และ มี % RSD เท่ากับ 1 และ 6 ตามลำดับ วิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) มี % recovery เท่ากับ 105 และ 59 และ % RSD เท่ากับ 1 และ 4 ตามลำดับ และวิธี ethyl acetate (Pihlstrom et al., 2007) มี % recovery เท่ากับ 105 และ 87 และ % RSD เท่ากับ 3 และ 2 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่สกัด ตัวอย่างด้วย ethyl acetate ให้ % recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้สำหรับสารทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นในการ ทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

1.3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธี ethyl acetate (Pihlstrom et al., 2007) ในการวิเคราะห์ spiromesifen และสารอนุพันธ์ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วงและ มะเขือพวง ผลการทดสอบพบว่า working range/linearity อยู่ในช่วง 0.01-0.50 mg/kg มีค่า $R^2 > 0.995$ ส่วน accuracy ทดสอบที่ 0.01, 0.10 และ 0.50 mg/kg (n=10) พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 73-102 และ % RSD อยู่ในช่วง 2-7 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ % recovery 70-120 และ % RSD ≤ 20 มีค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg และ LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg (n=10)

1.4 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างไกลโฟเซต (glyphosate) และกลูโฟซิเนต (glufosinate) ในพืชตระกูลส้ม

1.4.1 สภาพะการทำงานของเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร glyphosate ด้วยเทคนิค GC-MS/MS โดยมีค่า retention time เท่ากับ 7.73 นาที ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.005-0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9980 และตรวจวิเคราะห์สาร glufosinate ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีค่า retention time เท่ากับ 5.43 นาที ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ 0.01-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9994 ตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

1) GC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์สาร glyphosate

GC-MS/MS	Agilent Technologies 7890B Agilent 7000 GC Triple Quadrupole
Column	HP-5MS UI 15 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm
Gas flow	1.7 mL/min (constant flow mode)
Carrier gas	Helium
Inject volume	1.0 μL
GC inlet	Set point Temperature : 260 $^{\circ}\text{C}$
	Mode : Splitless

MS/MS	Compound	Precursor ion	Product ion
	glyphosate	511	384, 411

2) LC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์สาร glufosinate

Column: Hilic 3 μm 100 A (2.1 \times 150 mm)

Temperature: 45 $^{\circ}\text{C}$

Mobil phase A: 100 mM ammonium formate in water+ 1% formic acid

Mobil phase B: acetonitrile

Inject volume: 10 μL

Total run time: 15.00 min

MS parameter:

Ion source: ESI

Source

Gas temp:	300 $^{\circ}\text{C}$
Gas flow :	11 L/min
Nebulizer:	60 psi

MS/MS	Compound	Precursor ion	Product ion
	glufosinate	180	63, 85, 136

1.4.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

ทดสอบวิธีสกัดตัวอย่างส้ม 3 วิธี ได้แก่ Anastassiades et al. (2020) วิธี Chamkasem et al. (2015) และวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Borjesson and Torstensson (2000) โดยประเมินจาก % recovery พบว่าวิธีที่ดัดแปลงวิธีสกัดจากวิธีของ Borjesson and Torstensson (2000) โดยสกัดด้วยสารละลาย hydrochloric acid และ clean up ด้วย SPE ชนิด ion exchange resin ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ

1.4.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่ดัดแปลงวิธีสกัดตามวิธีของ Borjesson and Torstensson (2000) โดยทดสอบ accuracy ของสาร glyphosate ที่ 0.02, 0.05 และ 0.10 mg/kg (n=10) และ glufosinate ที่ 0.05, 0.10 และ 0.20 mg/kg (n=10) พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 73-100 และ % RSD อยู่ในช่วง 3-14 ค่า ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOQ และ LOD ของ glyphosate เท่ากับ 0.05 และ 0.02 mg/kg ตามลำดับและ glufosinate เท่ากับ 0.10 และ 0.05 mg/kg ตามลำดับ

1.5 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างเมทอกซีฟีโนไซด์ (methoxyfenozide) ทีบูฟีโนไซด์ (tebufenozide) และโครมาฟีโนไซด์ (chromafenozide) ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลสูง

1.5.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

LC-MS/MS : Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS-MS

Column : Phenomenex 2.6 μ m XB C18 100A, 100 mm x 2.1 mm

Temperature : 40 °C

Mobile phase : 5 mM ammonium formate in water + 1% formic acid (A), ACN (B)

Run time : 10 min

Injection volume : 2 μ L

Mass parameters :

Ion source : ESI (positive)

Source parameters :

Gas Temp.	300 °C
Gas Flow	12 L/min
Nebulizer	60 psi
Capillary	4000 V

MS/MS

Compound name	Retention time (min)	Precursor ion	Product ion
methoxyfenozide	4.038	313.2	91.1 , 149.1
		369.2	149.1
chromafenozide	4.142	395.2	133.0, 175.0
tebufenozide	5.110	353.2	133.1, 297.2

1.5.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างคะน้า 2 วิธี ได้แก่ วิธี QuEChERS (EN15662, 2008) และ วิธี ethyl acetate (Pihlstrom et al., 2007) ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลสูงโดยเลือกคะน้าเป็นพืชตัวแทน โดยศึกษาที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับ (n=5) ดังนี้ methoxyfenozide ที่ 0.005-0.5 mg/kg สาร tebufenozide ที่ 0.01-1.0 mg/kg และ chromafenozide ที่ 0.01-0.5 mg/kg จากผลการศึกษาพบว่าวิธี QuEChERS ให้ค่า % recovery ดีกว่าวิธี ethyl acetate จึงใช้วิธี QuEChERS สำหรับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1.5.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) ในตัวอย่างคะน้า ผลการตรวจสอบ matrix effect โดยเปรียบเทียบ slope ของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในสารละลาย

ตัวอย่างค่อน้ำที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) กับสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย โดยประเมินจาก signal suppression/enhancement (SSE) พบว่าไม่มี matrix effect โดยมีค่า SSE อยู่ในช่วง -0.9804-1.003 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ SSE น้อยกว่า 10 (Yuanbo et al., 2013) จึงเตรียมสารมาตรฐานในตัวทำละลาย acetonitrile เพื่อสร้าง calibration curve ในการหาปริมาณสารตกค้างในตัวอย่าง ซึ่ง SSE สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$SSE = \frac{\text{slope matrix match calibration}}{\text{slope standard calibration in solvent}}$$

ทดสอบ range/linearity ของวิธีวิเคราะห์พบว่าอยู่ในช่วง 0.005-0.5 mg/kg ทดสอบ accuracy โดยประเมินจาก % recovery พบว่าอยู่ในช่วง 93-104 และ precision มี % RSD อยู่ในช่วง 2-9 วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลสูง มี LOQ เท่ากับ 0.005, 0.01 และ 0.01 mg/kg และมี LOD เท่ากับ 0.001, 0.002 และ 0.003 mg/kg ตามลำดับ

1.6 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารฟลอนิคามิด (flonicamid) และสารอนุพันธ์ ในพืชตระกูลแตง ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS)

1.6.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS เพื่อตรวจหาวิธีวิเคราะห์สารตกค้างของสาร flonicamid และสารอนุพันธ์คือ TFNA และ TFNG พบว่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ของการตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานในตัวทำละลาย acetonitrile ที่ 0.005 - 0.10 µg/mL ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงมีค่า $R^2 > 0.990$ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ flonicamid และสารอนุพันธ์ TFNA และ TFNG มี retention time ดังนี้ 0.96, 1.21 และ 1.33 นาที ตามลำดับ มีสภาวะของเครื่องดังนี้

LC-MS/MS	Agilent 1100 series
Column	Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 x 75 mm, 1.8 µm
Condition	Post run : 1 min, Temperature : 40 °C
Injection volume	2 µL
Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water (with 5% acetonitrile) B : 0.1% formic acid in acetonitrile

MRM Precursor/Product Ion Transitions และ MS Condition

Analyte	Ion transition		Polarity
	Precursor ion	Product ion	
flonicamid	249	203, 148, 98	Positive
TFNA	230	203, 174, 148	Positive
FNX	192	148, 98	Positive

1.6.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ทดสอบวิธีการสกัดตัวอย่างแดงกว่า 2 วิธี คือ QuEChERS (EN15662, 2008) ที่ไม่มีการ clean-up พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 42-93 และ QuEChERS (EN15662, 2008) มีการ clean-up พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 10-104 ทำการปรับวิธีวิเคราะห์ QuEChERS (EN15662, 2008) ไม่มีการ clean-up และใช้ 1 % V/V ของ formic acid ใน acetonitrile ในการสกัดตัวอย่าง พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 79-105 และเลือกมาทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

1.6.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (QuEChERS (EN15662, 2008) ไม่มีการ clean-up และใช้ 1 % V/V ของ formic acid ใน acetonitrile ในการสกัดตัวอย่าง ทดสอบในตัวอย่างแดงกว่า แดงโม และแคนตาลูป ผลการทดสอบ matrix effect โดยเปรียบเทียบค่าความชัน (slope) ของกราฟที่มาจากสารมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย acetonitrile และสารมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายที่สกัดจากตัวอย่าง พบว่าสาร flonicamid และ TFNA ในแคนตาลูปมี % matrix effect > 20 ส่วนแดงกว่าและแดงโมพบว่ามี % matrix effect ในช่วง 1-7 (สารปนเปื้อนไม่มีผลต่อการทดสอบคือ % matrix effect ≤ 20) ส่วน accuracy ทดสอบในตัวอย่างแดงกว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.05 และ 0.1 mg/kg พบว่ามีค่า % recovery อยู่ในช่วง 98-107 วิธีทดสอบมีช่วงการใช้งาน 0.005-0.1 mg/kg ส่วนการทดสอบ accuracy ในตัวอย่างแดงโมและแคนตาลูป ที่ 0.01 mg/kg พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 75 -119 และ % RSD อยู่ในช่วง 5.6 - 9.2 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ ค่า LOQ และ LOD ของสาร flonicamid และสารอนุพันธ์ในพืชตระกูลแดงเท่ากับ 0.01 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ

1.7 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 2,4-ดี (2,4-D) และเอ็มซีพีเอ (MCPA) ในธัญพืช

1.7.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

Instrument	Agilent Technologies 6464 Triple Quad
Column	Kinetex 2.6 μm XB C18 100 Å ,100X21 mm.
Injection Volume	5 μL
Flow Rate	0.4 mL/min
Column Temperature	40 °C
MS QQQ Condition	MRM ESI+Agilent Jet Sream EMV 300

Eluent	A : 0.01% acetic acid in water (with 5% acetonitrile)
	B : 0.01% acetic acid in acetonitrile

MS/MS			
Analyte	Precursor Ion	Product Ion	Polarity
2,4-D	219	125, 161, 163	Negative
MCPA	201	141, 143	Negative

1.7.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีการสกัด 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย 3 วิธี ได้แก่วิธี ethyl acetate extraction (Pihlstrom et al., 2007) วิธี QuEChERS (EN 15622, 2008) และ Acidified QuEChERS (EURL-SRM, 2015) ที่ 0.01 mg/kg (n=8) พบว่าทุกวิธีมี % recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับคืออยู่ในช่วง 70-120 และ % RSD \leq 20 (SANCO, 2013) แต่วิธี acidified QuEChERS (A-QuEChERS) ให้ % recovery เฉลี่ยที่สูงกว่า คือ 93-107 ส่วนอีก 2 วิธี อยู่ในช่วง 72-78 จึงเลือกวิธี Acidified QuEChERS ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างธัญพืช โดยใช้ลูกเต๋อยและถั่วเหลืองเป็นธัญพืชตัวแทน

1.7.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธี Acidified QuEChERS (EURL-SRM, 2015) ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างลูกเต๋อยและถั่วเหลือง ผลการทดสอบ matrix effect โดยเปรียบเทียบ slope ของ calibration curve ของสารมาตรฐานที่เตรียมใน acetonitrile กับสารมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Acidified QuEChERS โดยมีเกณฑ์การยอมรับของ matrix effect $<$ 10% (NATA, 2018) พบว่า MCPA ในตัวอย่างถั่วเหลืองมี matrix effect (%) เท่ากับ 77 นอกนั้นไม่พบ matrix effect ส่วน range/linearity ของวิธีทดสอบมีช่วงการใช้ 0.005- 1.0 mg/kg มีค่า coefficient of determination (R^2) $>$ 0.995 การทดสอบ accuracy ที่ 0.01, 0.10 และ 0.50 mg/kg (n=8) พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 89-119 และ precision มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.0009-0.019 อยู่ในเกณฑ์การยอมรับคือ % recovery อยู่ในช่วง 70-120% และ HORRAT $<$ 2 ส่วน LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.010 mg/kg ตามลำดับ

1.8 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างอะมิทราซ (amitraz) และอนุพันธ์ในพริก

1.8.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

LC-MS/MS: Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS-MS

Column : Synergi fusion-RP18 2.0 μ m, 100 mm x 5 mm
 Temperature : 30 °C
 Injection volume : 2 μ L
 Mobile phase : A : 5 mM ammonium formate in water + 0.01% formic acid
 B : Acetonitrile

Run time: 15 min

Mass parameters :

Ion source : ESI (positive)

Source parameters : Gas Temp 325°C

Gas Flow 10 L/min

Nebulizer 60 psi

Capillary 4500 V (Positive mode)

MS/MS:

Compound name	RT (min)	Precursor ion	Product ion
amitraz	7.215	292.2	122.1
DMPF	3.991	294.2	117.0

1.8.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างพริกจินดาแดง 3 วิธี ได้แก่ วิธี Original QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) วิธี EN QuEChERS (Anastassiades et al., 2008) และวิธี ethyl acetate extraction (EURL-FV, 2010) โดยทดสอบที่ 0.01 mg/kg (n=7) จากผลการศึกษาพบว่า วิธี ethyl acetate extraction (EURL-FV, 2010) สามารถตรวจวิเคราะห์สาร amitraz ได้โดยมี % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 86 ส่วน DMPF ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และวิธี EN QuEChERS สามารถตรวจวิเคราะห์สาร DMPF ได้โดยมี % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 85 ส่วน amitraz ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

1.8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร amitraz โดยใช้วิธี ethyl acetate extraction (EURL-FV, 2010) และวิเคราะห์สาร DMPF โดยใช้วิธี EN QuEChERS (Anastassiades, et al., 2008) ในตัวอย่างพริกจินดาแดงและพริกมันดำ โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS

การทดสอบ matrix effect โดยเปรียบเทียบความชันจากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย acetonitrile (solvent) กับสารมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างพริกจินดา (matrix) พบว่า amitraz และ DMPF มีค่า % RPD เท่ากับ 113.9 และ 12.6 ตามลำดับ ดังนั้น matrix มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ จึงต้องเตรียมสารมาตรฐานในสารละลาย matrix ส่วนการทดสอบ specificity/selectivity พบว่าทั้งพริกจินดาแดงและพริกมันดำ มีความจำเพาะเจาะจง

ในการตรวจวัดโดยไม่มีสารในตัวอย่างรบกวนการตรวจวิเคราะห์ ส่วน range/linearity พบว่าวิธีวิเคราะห์ มีช่วงการใช้งานที่ 0.01-0.5 mg/kg มีค่า $r > 0.995$ การทดสอบ accuracy ที่ 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg ($n=10$) พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 75-105 มีค่า % RSD อยู่ในช่วง 1.8 -11.91 ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ

1.9 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม triazole ในดิน

1.9.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง GC

สารกลุ่ม triazole 4 ชนิด ได้แก่ tetraconazole, hexaconazole, propiconazole และ difenoconazole สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatograph; GC) ที่มีหัวตรวจวัดชนิด Electron Capture detector (ECD) หรือ Nitrogen-phosphorus detector (NPD) จากการทดสอบพบว่า การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC- ECD ให้สัญญาณที่ดีกว่าเครื่อง GC-NPD โดยได้ค่า signal/noise ratio สูงกว่า จึงเลือกใช้เครื่อง GC- ECD ในการตรวจวิเคราะห์ต่อไป ซึ่งสภาวะการทำงานของเครื่อง GC ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม triazole มีดังนี้

Inlet temperature	:	260 °C
Injection volume	:	1 µL
Detector	:	µECD
Detector temperature	:	300 °C
Column	:	DB-5ms, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm
Carrier gas	:	He, make up N2 58.8 mL/min
Flow rate	:	1.5 mL/min
Run time	:	41.00 min

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานแต่ละชนิด (linearity) โดยสร้าง calibration curve ที่ 6 ระดับความเข้มข้น พิจารณา ค่า correlation coefficient (r) ≥ 0.995 ซึ่งจากผลการทดสอบ พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01 - 2.50 µg/mL มีค่า r อยู่ในช่วง 0.997-0.999

1.9.2 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์

ตรวจวิเคราะห์กลุ่ม triazole 4 ชนิด ในตัวอย่างดินทราย โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 In house method TM-T04-I02 (วิธีการตรวจวิเคราะห์ดินของกลุ่มวิจัยวัตถุที่มีพิษ การเกษตร) วิธีที่ 2 In house method TM-T04-I02) และ clean up ด้วย SPE ขนาด 3 mL และวิธีที่ 3 สกัดด้วย acetonitrile และ clean up ด้วย SPE ขนาด 3 mL พบว่า % recovery ของวิธีอยู่ในช่วง 127-170, 38-65 และ 35-60 ตามลำดับ จึงเลือกวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 มาทดสอบโดยปรับการ clean up จาก SPE ขนาด 3 mL เป็น SPE ขนาด 6 mL ผลการทดลองพบว่า % recovery ทั้งสองวิธีอยู่ในเกณฑ์

ที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 70 -120 จึงเลือกวิธีวิธีที่ 3 คือสกัดด้วย acetonitrile และ clean up ด้วย SPE สำเร็จรูปขนาด 6 mL ในการศึกษาดินชนิดอื่นได้แก่ ดินทราย ดินร่วน และดินเหนียว ผลการทดสอบพบว่า % recovery อยู่ในช่วง 81-100 , 88- 105 และ 78-99 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ

1.9.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการสกัดด้วย acetonitrile และ clean up ด้วย SPE สำเร็จรูปขนาด 6 mL ในดินทราย ผลการทดสอบ range/linearity ใน fortified sample 7 ระดับ ความเข้มข้น พบว่าช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์สาร tetraconazole และ hexaconazole อยู่ในช่วง 0.005-0.36 mg/kg สาร propiconazole อยู่ในช่วง 0.01-0.75 mg/kg และ difenoconazole อยู่ในช่วง 0.01-0.92 mg/kg โดยมีค่า correlation of determination (R^2) > 0.995 ส่วน accuracy ทดสอบ 4 ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.010 - 0.026 mg/kg (n=7) พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 82-113 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับคืออยู่ในช่วง 70-120 (SANTE/12682, 2019) และ precision มี % RSD ในช่วง 4-12 น้อยกว่าเกณฑ์ยอมรับคือ 22% (AOAC, 2016) การทดสอบ LOD และ LOQ ในดินทราย ดินร่วนปนทราย และดินเหนียว พบว่าค่า LOD ของ tetraconazole และ hexaconazole เท่ากับ 0.005 mg/kg สาร propiconazole และ difenoconazole เท่ากับ 0.010, และ 0.013 mg/kg ตามลำดับ โดยมี S/N Ratio > 3 (เกณฑ์การยอมรับ S/N Ratio \geq 3) และค่า LOQ ของ tetraconazole และ hexaconazole เท่ากับ 0.01 mg/kg สาร propiconazole และ difenoconazole เท่ากับ 0.02, และ 0.03 mg/kg ตามลำดับ โดยมี S/N Ratio >10 (เกณฑ์การยอมรับ S/N Ratio \geq 10) และผลการทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้นระดับ LOQ ของดิน 3 ชนิดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

1.10 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดแมลงกลุ่มเบนโซอิลยูเรีย (benzoylurea) ในหน่อไม้ฝรั่งด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1.10.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม benzoylurea 5 ชนิด ได้แก่ diflubenzuron, triflumuron, triflumuron, lufenuron และ flufenoxuron ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ความเข้มข้นในช่วง 0.01 - 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ที่ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยมีค่า $R^2 \geq 0.990$) มีสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

LC-MS/MS: Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS-MS

Column : Kinetex XB-C18, 100 mm \times 2.1 mm of Internal diameter (particle size 2.6 μm)

Mobile phase : A ; 5 mM (NH_4) HCO_2 0.01% HCO_2H in water

Mobile phase : B ; acetonitrile

Run time : 12 min

Mass parameters :

Pesticide name	Retention time (min)	Precursor ion	Product ion
----------------	----------------------	---------------	-------------

diflubenzuron	2.52	311	141, 158
triflumuron	3.29	359	139, 156
teflubenzuron	3.98	381	141, 158
lufenuron	4.93	511	141, 158
flufenoxuron	5.35	489	141, 158

1.10.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่ง 2 วิธี ได้แก่ วิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) และ SweEt method (EURL-FV, 2010) ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.02 mg/kg (n=10) พบว่า % recovery ของวิธี QuEChERS อยู่ในช่วง 86-97 ส่วนวิธี SweEt method อยู่ในช่วง 28-52 จึงเลือกวิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) ในการศึกษาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความเหมาะสมของปริมาณ GCB ในขั้นตอนการขจัดสิ่งเจือปนในตัวอย่าง ปริมาณ 50, 25, 15 และ 5 mg ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.1 mg/kg (n = 2) พบว่า GCB 15 mg มี % recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับคือ 70-120 ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี QuEChERS และขจัดสิ่งเจือปนในตัวอย่างด้วย GCB 15 mg ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1.10.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม benzoylurea 5 ชนิดในหน่อไม้ฝรั่งด้วยเทคนิค LC-MS/MS ใช้วิธีการสกัด QuEChERS (EN 15662, 2008) และมีการขจัดสิ่งเจือปนในตัวอย่างด้วย GCB 15 mg มีผลดังนี้

การศึกษา matrix effect โดยเปรียบเทียบ slope จากสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานที่เตรียมในตัวทำละลาย acetonitrile (solvent) และที่เตรียมในสารละลายที่สกัดจากตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS นำมาคำนวณ % Matrix effect พบว่ามี % ME อยู่ในช่วง -4 ถึง -10 แสดงว่าไม่มีผลกระทบจากสิ่งเจือปนในตัวอย่าง (% ME \leq 20) พบว่า range/linearity ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.02 - 0.2 mg/kg ส่วนการศึกษา accuracy ศึกษา 5 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.02-0.2 mg/kg (n = 10) พบว่าให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 83 - 105 และมีค่า % RSD อยู่ในช่วง 2.04 - 8.52 มีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.02 mg/kg ตามลำดับ

การศึกษา Intra-laboratory reproducibility ที่ความเข้มข้น 0.02 - 0.2 mg/kg พบว่า % RSD อยู่ในช่วง 3.0 - 11.4 ส่วนการศึกษาค่าปริมาณต่ำสุดที่เครื่อง LC-MS/MS สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ พบว่าสารกลุ่ม benzoylurea 5 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 0.05 - 0.17 ng และการศึกษาความทนของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง 0.02, 0.10 และ 0.20 mg/kg โดยมีการปรับเปลี่ยนปริมาตรการฉีดสารเข้าเครื่อง LC-MS/MS ตั้งแต่ 5, 3 และ 7 μ L พบว่าทุกปริมาตรให้ค่า % recovery และ % RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

1.11 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกำจัดวัชพืชบิสไพริแบค-โซเดียม (bispiribac-sodium) อิม азаพิค (imazapic) เพนดิเมทาลิน (pendimethalin) และเฮกซะซีโนน (hexazinone) ในธัญพืช

1.11.1 สภาพะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

Column : Kinetex YMC pack pro C18, 150 x 4.6 mm. , 3 μ m
 Mobile phase A : 5mM ammonium acetate+0.01%formic acid in water
 B : acetonitrile

Inject volume : 5 μ L

Flow rate : 0.4 mL/min

Mass parameters

Ionization mode : ESI

Polarity : Positive

Scan type : MRM

Resolution : Q1,Q3

Gas flow : 11 L/min

Nebulizer : 15 psi

Temperature : 300 $^{\circ}$ C

Capillary : 4000 V

MS/MS

Pesticide name	RT (min)	Precursor ion	Product ion	Polarity
bispiribac-sodium	4.15	453	119, 297	Positive
imazapic	2.5	276	163, 231	Positive
hexazinone	3.46	253	71, 171	Positive
pendimethalin	6.2	282	194, 212	Positive

1.11.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

ทดสอบวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง bispiribac-sodium, imazapic, pendimethalin และ hexazinone ในถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS-one-step extraction /cleanup เปรียบเทียบวิธีการขจัดสิ่งปนเปื้อน 4 วิธี ได้แก่ (1) เจือจางตัวอย่าง (2) PSA (3) C18 และ (4) MgSO₄ พบว่าการใช้ PSA ให้ค่าร้อยละการกลับคืนดีกว่าวิธีอื่น

1.11.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี QuEChERS-one-step extraction /cleanup และขจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA โดยตรวจวิเคราะห์ fortified sample สาร bispyribac-sodium, imazapic, pendimethalin และ hexazinone ในถั่วเหลือง พบว่า range/linearity ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.01-0.2 mg/kg มีค่า correlation coefficient > 0.995 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ การพิสูจน์ accuracy พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 69-118 และ precision มีค่า % RSD ≤ 20 และ HORRAT ไม่เกิน 2 มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg

1.12 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของ วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ Chiral Pesticides 6 ชนิด ในมะม่วง โดยใช้คอลัมน์ที่มีความเฉพาะเจาะจง กับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

1.12.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

ตรวจวิเคราะห์ chiral pesticide 6 ชนิด ได้แก่ benalaxyl, difenoconazole, fenamiphos, indoxacarb , paclobutrazol และ quizalofop-ethyl โดยใช้คอลัมน์ที่มีความเฉพาะเจาะจง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

LC-MS/MS	: Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole
Column	: Lux 5 µm i-Amylose-1 (Amylase tris(3, 5-dimethylphenylcarbamate)) 150 x 4.6 mm
Temperature	: 25°C
Mobile phase	: 2 mM ammonium acetate in water (A), ACN (B)
Flow rate	: 0.45 mL/min
Injection volume	: 2 µL
Run time	: 35 min
Mass parameters	
Ion source	: ESI (positive)
Gas Temp	: 250 °C
Gas Flow	: 11 L/min
Nebulizer	: 35 psi
Sheath Gas Heater	: 300 °C
Sheath Gas Flow	: 10 L/min
Capillary	: 4000 V
MS/MS	

Compound name	Retention time ₁ (min)	Retention Time ₂ (min)	Resolution (n=3)	Precursor ion	Product ion
---------------	-----------------------------------	-----------------------------------	------------------	---------------	-------------

benalaxyl	13.30	15.03	0.87±0.01	326.2	91.1, 148.1, 294.1
difenoconazole	22.43	23.87	0.62±0.01	406.1	188, 251, 337
fenamiphos	11.15	13.55	1.06±0.05	304.1	202, 217.1, 234
indoxacarb	22.69	24.33	0.95±0.08	528.1	150, 190, 218.2
paclobutrazol	9.26	12.87	1.91±0.08	294.1	70.1, 89.1, 125.2
quizalofop-ethyl	28.21	30.11	0.77±0.08	373.1	91.1, 271.2, 299.1

1.12.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างมะม่วง 2 วิธี ได้แก่ QuEChERS (EN 15662, 2008) และ ethyl acetate (EURL-FV, 2010) พบว่าวิธี QuEChERS มี % recovery อยู่ในช่วง 75-101 และ % RSD ในช่วง 1-4 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ 70-120 และ % RSD ≤ 20 ส่วนวิธี ethyl acetate มี recovery อยู่ในช่วง 49-104 และ % RSD ในช่วง 1-14 ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี QuEChERS ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1.12.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สาร chiral pesticide 6 ชนิด ในมะม่วงด้วยเทคนิค LC-MS/MS ใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS (EN 15662, 2008) มีผลการทดลองดังนี้ การทดสอบ specificity/selectivity พบว่า LC-MS/MS เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างในการวิเคราะห์ ส่วน matrix effect โดยการเปรียบเทียบ slope ของกราฟ standard calibration in solvent กับ matrix-matched calibration และนำไปวิเคราะห์ signal suppression/ enhancement (SSE) พบว่า % SSE ของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดอยู่ในช่วง 0.83-1 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับไม่เกิน 10% (Xinzhong, et al., 2014) แสดงว่า matrix ไม่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด พบว่าวิธีวิเคราะห์มีช่วงการใช้งาน 0.005 -10.0 mg/kg การทดสอบ accuracy ทดสอบ ที่ 11 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.005-10.0 mg/kg (n≥8) โดยทดสอบความเข้มข้นละ 2-3 ซ้ำ/วัน ในช่วง 3 เดือน พบว่า มี % recovery อยู่ในช่วง 80-103 และ % RSD อยู่ในช่วง 1-11% วิธีทดสอบมีค่า LOQ และ LOD เท่ากับ 0.005 และ 0.002 mg/kg ตามลำดับ

1.13 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างโทลเฟนไพเรต (tolfenpyrad) และทีบูเฟนไพเรต (tebufenpyrad) ในมะเขือเทศ โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

1.13.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

LC condition

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

Flow rate : 0.30 mL/min

Total run time : 14.00 min

MS condition

Positive mode

Gas temp : 350°C

Gas flow : 12 L/min

Nebulizer : 60 psi

Capillary : 4000 v

MS/MS

Compound	Precursor ion	Product ion
tolfenpyrad	384.15	171.1, 197.1
tebufenpyrad	334.17	145.1, 117.0

1.13.2 การทดสอบวิธีวิเคราะห์

เปรียบเทียบวิธีการสกัดในตัวอย่างมะเขือเทศ 2 วิธี ได้แก่วิธี EN QuEChERS (Anastassiades et al., 2008) และ SweEt method (EURL-FV, 2010) ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg พบว่า % recovery วิธี EN QuEChERS อยู่ในช่วง 79-95 และ SweEt method อยู่ในช่วง 62-70 จึงเลือกสกัดด้วยวิธี EN QuEChERS ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1.13.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ EN QuEChERS (Anastassiades et al., 2008) สาร tolfenpyrad และ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศ พบว่าวิธีวิเคราะห์มีช่วงการใช้งานอยู่ในช่วง 0.005-0.2 mg/kg มีค่า coefficient of determination (R^2) > 0.995 ผลการศึกษา matrix effect ในตัวอย่างมะเขือเทศ พริกและมะเขือเปราะ พบว่า % matrix effect อยู่ในช่วง 0.16 - 1.55 แสดงว่าสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างไม่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ (% matrix effect < 10%) (NATA, 2018) การทดสอบ accuracy ในตัวอย่างมะเขือเทศ ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 5 ระดับในช่วง 0.005-0.2 mg/kg (n=8) พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับคือ % recovery ในช่วง 70-120 และ % RSD ≤ 20 มีการทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01 mg/kg ในตัวอย่างพริกและมะเขือเปราะ พบว่า % recovery และ % RSD ผ่านเกณฑ์การยอมรับ วิธีวิเคราะห์สาร tolfenpyrad และ tebufenpyrad ในตัวอย่างมะเขือเทศ พริกและมะเขือเปราะมีค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ

1.14 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ QuEChERS เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี/แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry /Mass Spectrometry)

1.14.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS

ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรโดยใช้ตัวอย่างมะม่วงเป็นตัวแทนของผลไม้ที่มีไขมันและคลอโรฟิลปริมาณน้อย โดยศึกษาสาร bromfeninfos-methyl, bromfeninfos, bromophos-ethyl, bromophos-methyl, carbophenothion, chlorfeninfos, chlorthiophos, coumaphos, edifenfos, ethion, fenamiphos, fenchlorphos, fenthion, iodofenfos, leptophos, malathion, methacrifos, profenofos, prothiofos, sulfotep, sulprofos, tebufos, tetrachlorinfos และ tolclofos-methyl โดยใช้เทคนิค GC-MS/MS สภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้

Gas Chromatography

Column:	Agilent J&W DB-5ms, 30 m x 0.25 mm, 0.25 um
Inlet:	Split/Splitless
Inlet liner:	Splitless, single taper, Ultra Inert liner with glass wool
Carrier:	Helium
Inlet pressure:	36 psi (constant pressure mode)
Inlet temp:	280 °C
Inj vol:	1 µL
Purge flow to split vent:	30 mL/min at 0.75 min
Gas saver:	On (20 mL/min at 2.0 min)
Capillary flow:	Back flushing and retention gap
Retention time locking:	Chlorpyrifos-methyl locked at 16.593 min

Mass Spectrometer

Spectrometer:	Triple Quadrupole
Mode:	Electron Impact
Transfer line temp:	280 °C
Solvent delay:	2.3 min
Source temp:	300 °C
Quadrupole temp:	Q1 and Q2 = 180 °C

1.14.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

สกัดตัวอย่างมะม่วงด้วยวิธี QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) ผลการสอบ accuracy ที่ 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg พบว่า % recovery ของวิธีตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 74-118 และวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ให้ค่า % RSD < 20

1.15 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และไตรอะซีน (triazine) ในเนื้อปลา

1.15.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง GC

1) สารกลุ่ม organophosphate

ทดสอบสาร 19 ชนิด ได้แก่ diazinon, pirimiphos methyl, chlorpyrifos, parathion methyl, malathion, methidathion, profenofos, ethion, triazophos และ EPN มีสภาวะการทำงานของเครื่อง GC ดังนี้

Column : DB-5, 30 m length x 0.25 mm id. x 0.25 μ m film thickness

Detector : FPD

Injection mode : Splitless

Temperature : Injector 230 $^{\circ}$ C,
Detector 250 $^{\circ}$ C

Carrier gas : Helium, flow rate 1.4 mL/min

Ignite gas : Hydrogen 150 mL/min
Air 110 mL/min

Injection volume : 1 μ L,

Run time : 46.60 min

2) สารกลุ่ม organochlorine และ pyrethroid

สารกลุ่ม organochlorine ทดสอบสาร 16 ชนิด ได้แก่ α -BHC, γ -BHC, heptachlor, aldrin, heptachlor epoxide, o,p' -DDE, α -endosulfan, p,p' -DDE, dieldrin, o,p' -TDE, endrin, o,p' -DDT, p,p' -TDE, β -endosulfan, p,p' -DDT และ endosulfan sulfate และสารกลุ่ม pyrethroid ทดสอบสาร 4 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, permethrin, cypermethrin และ fenvalerate มีสภาวะการทำงานของเครื่อง GC ดังนี้

Column : DB-1701, 30 m length x 0.32 mm id. x 0.25 μ m film thickness

Detector : μ ECD

Injection mode : Splitless

Temperature : Injector 230 $^{\circ}$ C
Detector 300 $^{\circ}$ C

Carrier : Helium, flow rate 1.4 mL/min

Injection volume : 1 μ L

Run time : 49 min

3) สารกลุ่ม carbamate และ triazine

กลุ่ม carbamate ทดสอบสาร 2 ชนิด ได้แก่ carbofuran และ promecarb กลุ่ม triazine ทดสอบสาร 3 ชนิด ได้แก่ ametryn, atrazine และ metribuzin สภาวะการทำงานเครื่อง GC ดังนี้

Column : DB-35, 30 m length x 0.25 mm id. x 0.25 μ m film thickness
Detector : NPD,
Injection mode : Pulsed splitless
Temperature : Injector 230 $^{\circ}$ C,
Detector 300 $^{\circ}$ C
Carrier gas : Helium, flow rate 1.4 mL/min
Ignite gas : Hydrogen 2 mL/min
Air 120 mL/min
Injection volume : 1 μ L
Run time : 26.5 min

1.15.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ทดสอบวิธีการสกัดสารกลุ่ม organophosphate ในตัวอย่างเนื้อปลาชนิด 4 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 In house method TM-T04-I02 based on AOAC (1995) 970.52 วิธีที่ 2 In house method TM-T04-I02 based on AOAC (1995) 970.52 ร่วมกับเทคนิค freezing out วิธีที่ 3 Solid Phase Extraction (SPE) based on Sun et al. (2000) วิธีที่ 4 Solid Phase Extraction (SPE); commercial kits from Agilent Technologies co., Ltd. พบว่าวิธีที่ 3 SPE based on Sun et al. (2000) ให้ค่า % recovery 131–85% จึงเลือกใช้วิธีที่ 3 สำหรับการศึกษ โดยศึกษาปริมาณสารเคมี acetonitrile ที่ใช้สกัดคือ 70, 90, 100, 150 และ 200 mL ผลการทดสอบ พบว่า % recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับทุกปริมาณ ทดสอบวิธีสกัดกับตัวอย่างปลาช่อน (*Channa striata*) และปลาดุก (*Clarias batrachus*) พบว่า % recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ทดสอบวิธีการสกัดสารกลุ่ม organochlorine และ pyrethroid ในเนื้อปลานิล โดยทดสอบเครื่องมือที่ใช้สกัด 3 ชนิด ได้แก่ shaker, ultrasonic sonicator และ homogenizer พบว่าการสกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile ปริมาตร 50 mL โดยใช้เครื่อง homogenizer นาน 1 นาที มี % recovery 82-110 ทดสอบชนิดสารเคมีที่ใช้สกัดได้แก่ dichloromethane, ethyl acetate และ hexane โดยใช้เครื่อง homogenizer พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 55-109 ซึ่งการใช้ acetonitrile ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่า จึงนำวิธีการที่ใช้ acetonitrile และ homogenizer มาทดสอบกับตัวอย่างเนื้อปลาดุก ปลาช่อน ปลาสวาย ปลาตะเพียนและปลากะพง พบว่า % recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

1.15.3 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของของวิธีทดสอบที่ปรับจากวิธี Sun et al. (2000) โดยการสกัดตัวอย่างเนื้อปลา ด้วย acetonitrile ใช้เครื่อง Homogenizer และกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย SPE ชนิด C18 และ Florisil ในการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate, organochlorine, pyrethroid, carbamate และ triazine พบว่าวิธีวิเคราะห์มีช่วงการใช้งานที่ 0.01-0.20, 0.003-0.05, 0.02-0.50, 0.02-0.20 และ 0.02-0.20 mg/kg ตามลำดับ ค่า LOQ ของสาร 5 กลุ่มอยู่ในช่วง 0.003-0.02 mg/kg และ LOD อยู่ในช่วง 0.0005-0.005 mg/kg สำหรับการทดสอบ accuracy พบว่ามี % recovery และ % RSD ผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ

1.16 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของออกซีฟลูอร์เฟน (oxyfluorfen) ไพริดาเบน (pyridaben) ไดฟิโนโคนาโซล (difenoconazole) คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) แลมด้า-ไซฮาโลทริน (L-cyhalothrin) คลอร์ฟิनाเพอร์ (chlorfenapyr) เบต้า-ไซฮาโลทริน (beta-cyfluthrin) และเฟนโพรพาทริน (fenpropathrin) ในกลุ่มพืชที่มีปริมาณน้ำสูง (High water content) และกลุ่มพืชที่มีปริมาณความเป็นกรดและน้ำสูง (High acid and high water content)

1.16.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS

GC-MS/MS : Agilent Technologies ,7890A Mass Spectrometry, 7000 Triple Quadrupole

Column : HP-5MS , 15 m 0.25 mm id. 0.25µm film thickness

carrier gas: He 1.2 mL/min

MSD Transfer line : 280 °C

Inlet temperature : 280 °C

Injection volume : 2 µl

Oven temperature : 60° C (1min) 80 ° C / min 170 ° C (0min) 10 ° C/min 310 ° C (3 min)

MS/MS

Pesticide Name	Retention time (min)	Quantitative		Qualitative			
		Precursor ion	Product ion	Precursor 1 ion	Product 1 ion	Precursor 2 ion	Product 2 ion
beta-cyfluthrin	16.54	226.9	76.9	198.9	170	162.9	90.9, 127.0
chlorfenapyr	12.03	327.8	246.8	246.9	227.0	136.9	75.0, 102.0
chlorpyrifos	9.95	313.8	285.8	196.9	169.0	313.8	258
difenoconazole	18.05	324.8	266.8	264.9	202.0, 139.0	324.8	264.9

fenproprathrin	14.25	264.9	210	125.0	55.1	181.1	152.1
lamda-cyhalothrin	15.01	208	181	181.1	152.0	197.0	141.0, 161.0
oxyfluorfen	11.82	361	299.8	299.9	222.8	252.0	146.0, 196.0
pyridaben	16.03	147.2	132.2	132.1	117.1	147.2	105.1, 117.1

1.16.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธี ethyl acetate extraction (EURL-FV, 2010) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS ใช้ matrix-matched calibration standards ในการตรวจวิเคราะห์ มีผลการทดสอบดังนี้

1) ตัวอย่างมะเขือเทศและผักกาดหอม ทดสอบสาร 6 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, oxyfluorfen, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, pyridaben และ fenproprathrin พบว่ามีช่วงการใช้งาน 0.005-0.1 mg/kg ส่วน accuracy ทดสอบที่ 0.005, 0.01, 0.02 0.05 และ 0.1 mg/kg พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และ % RSD < 20 และมีค่า LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg

2) ตัวอย่างองุ่น และ กวี ทดสอบสาร 8 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, oxyfluorfen, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, fenproprathrin, pyridaben, cyfluthrin และ difenoconazole พบว่ามีช่วงการใช้งาน ในช่วง 0.005-0.1 mg/kg ส่วน accuracy ผ่านเกณฑ์ยอมรับ และ LOQ อยู่ในช่วง 0.005 -0.02 mg/kg

1.16.3 เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ

เติมสาร oxyfluorfen ,pyridaben, chlorpyrifos, L-cyhalothrin, chlorfenapyr, beta-cyfluthrin, difenoconazole และ fenproprathrin ในตัวอย่างมะเขือเทศ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/kg ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่าง โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ethyl acetate และเทคนิค GC-MS/MS ผลการประเมินพบว่าตัวอย่างมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่าง 2 ห้องปฏิบัติการ โดยตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี ethyl acetate และเทคนิค GC-MS/MS ใช้การประเมินด้วย t-Test พบว่ามีสาร fenproprathrin, L-cyhalothrin และ pyridaben ที่มีค่า $t_{stat} < t_{critical}$ แสดงว่าผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ส่วน difenoconazole ไม่สามารถประเมินการทดสอบได้เนื่องจากให้ค่า % recovery ที่ต่ำมาก

1.17 การพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างในมะเขือเทศ ส้มและคะน้า ด้วยวิธี Ethyl Acetate Method โดยใช้การวัดด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทกราฟี (Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection)

1.17.1 สภาพะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS

ตรวจชนิดและปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช จำนวน 162 ชนิด ได้แก่ pyrethroid จำนวน 26 ชนิด organophosphate จำนวน 41 ชนิด organonitrogen จำนวน 59 ชนิด

organochlorine จำนวน 29 ชนิด และ herbicide methyl ester จำนวน 7 ชนิด โดยมีสภาวะการทำงาน of เครื่อง GC-MS/MS ดังนี้

GC-MS/MS : Agilent Technology 7890A Series Tandem Mass: Agilent 7000B Series

GC Parameter

Column	: HP-5ms UI 15m x 0.25 mm x 0.25 μ m
Inlet temperature	: 280 $^{\circ}$ C ,Splitless mode
Oven temperature	: Initial temp. 60 $^{\circ}$ C
Carrier gas	: Helium
Gas flow	: 1 mL/min (Constant flow)
Injection volume	: 2 μ l
Total run time	: 20.75 min

MS/MS Parameter

Collision gas	: Nitrogen
Solvent Delay	: 3.5 min
Mode	: Electron impact
Transfer line temp	: 280 $^{\circ}$ C
Source temperature	: 300 $^{\circ}$ C
Quadrupole temperature	: Q1 and Q2 = 180 $^{\circ}$ C

1.17.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทดสอบในผักและผลไม้โดยใช้ คื่นช่าย มะเขือเทศ และส้มเป็นพืชตัวแทนด้วยวิธี ethyl acetate method (EURL-FV,2010) ของหน่วยงาน The National Food Administration (NFA) ประเทศ Sweden โดยชั่งตัวอย่าง น้ำหนัก 10 ± 0.1 g ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 mg เติม ethyl acetate ปริมาตร 20 ± 0.1 mL เติม NaHCO_3 3 g และ Na_2SO_4 10 g แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS/MS) triple quadrupole โดยใช้ matrix-matched calibration เพื่อลดปัญหาสารรบกวนในตัวอย่าง (matrix effects)

ทดสอบ accuracy ที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.01, 0.02, 0.04 และ 0.1 mg/kg (n= 5) พบว่า % recovery ในช่วง 70-120 และ precision ที่ประเมินด้วย % RSD มีค่า 0.67–19.90 และ HORRAT มีค่า 0.04–1.60 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ที่ 0.01-2.0 mg/kg โดยมีค่า correlation coefficients ≥ 0.995 มีค่า LOQ ในช่วง 0.01-0.02 mg/kg และ LOD ในช่วง 0.005-0.01 mg/kg

1.18 การศึกษาผลของสารสกัดจากพืช (Matrix effect) สำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร 129 ชนิด ในผัก ผลไม้ ด้วยวิธี QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry

ศึกษาผลของการสกัดพืช (matrix effect) โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงของ standard in matrix และ standard in solvent โดยเกณฑ์ยอมรับมีค่า % Matrix effect มีค่าน้อยกว่า 10 แสดงว่าความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน (NATA, 2018) คือไม่เกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง ทดสอบ matrix effect สาร 129 ชนิดในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยสกัดตัวอย่าง blank sample ด้วยวิธี QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ผลการทดสอบในพืชตัวแทนมีดังนี้ ส้ม (mandarin) ตัวแทนจากกลุ่มผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruit) พบว่าสารส่วนใหญ่มี matrix effect มะม่วง (mango) ตัวแทนจากกลุ่มผลไม้เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนที่เปลือกบริโภคไม่ได้ (assorted tropical and subtropical fruit : inedible peel) พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่มี matrix effect มีสารเพียง 11 ชนิดที่มี matrix effect มะเขือเทศ ตัวแทนจากกลุ่มผักบริโภคผลนอกเหนือจากตระกูลแตง (fruiting vegetable, other than cucurbit) พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่มี matrix effect มีสารเพียง 8 ชนิดที่มี matrix effect และคะน้า ตัวแทนจากกลุ่มผักใบ (leafy vegetable) พบว่าสารส่วนใหญ่มี matrix effect และกะเพรา ตัวแทนจากกลุ่มพืชสมุนไพร (herb) พบว่าสารส่วนใหญ่มี matrix effect จากผลการทดสอบสรุปได้ว่า เพื่อให้การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารพิษตกค้าง 129 ชนิด ที่สกัดโดยวิธี QuEChERS และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีความถูกต้องแม่นยำต้องใช้สารมาตรฐานที่เตรียมจากสารละลายตัวอย่าง (matrix) หรือ matrix matched calibration

1.19 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) อย่างรวดเร็วในพริกโดยใช้วิธีวัดสี

1.19.1 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารกลุ่มคาร์บาเมตด้วยวิธีวัดสี

ทดสอบในตัวอย่างพริก โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารกลุ่มคาร์บาเมตกับสารพาราไนโตรอะนิลีน (p-nitroaniline) (Chu and Fan, 2009) ในสภาวะเบสที่เหมาะสม สำหรับค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ λ_{max} ของสารกลุ่มคาร์บาเมต จำนวน 4 ชนิดสาร (carbofuran, isoprocarb, propoxur และ fenobucarb) ด้วยเทคนิคการวัดสี พบว่า ค่า λ_{max} อยู่ในช่วง 507-515 nm ปริมาตรที่เหมาะสมของสาร 2.0 M NaOH ในการปฏิกิริยาคือ 2.0 mL pH เท่ากับ 12.37 สาร 0.05 % PNA ปริมาตร 1.0 mL pH เท่ากับ 12.42 สาร 0.2% NaNO₂ ปริมาตร 0.5 mL pH เท่ากับ 12.42

1.19.2 ทดสอบหาวิธีการสกัดตัวอย่าง

ทดสอบการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย ที่แตกต่างกัน 6 ชนิด พบว่า สารละลาย acetonitrile สามารถสกัดสารพิษตกค้างกลุ่ม carbamate ได้เหมาะสม ส่วน calibration curve ที่ใช้ในการหาปริมาณสาร เตรียมจากการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างและสกัดตามวิธีการสกัดตัวอย่าง

1.1.9.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

พบว่าค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) อยู่ในช่วง 0.50 - 8.00 mg/kg ค่า R^2 เท่ากับ 0.999 (เกณฑ์มาตรฐาน > 0.995) พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 0.01 mg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 0.5 mg/kg การทดสอบ accuracy พบว่า % RSD และ HORRAT ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

1.20 การคัดเลือก สารสกัดจากพืชตัวแทน (Representative Matrix) เพื่อการหาปริมาณสารพิษตกค้างในการตรวจวิเคราะห์แบบรวมในผักและผลไม้ ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ

1.20.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS

ตรวจวิเคราะห์สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอนุพันธ์จำนวน 77 ชนิด ได้แก่ pyrethroid จำนวน 30 ชนิด และ organophosphorus จำนวน 47 ชนิด มีสภาวะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS ดังนี้

GC-MS/MS : Agilent Technology 7890A Series Tandem Mass: Agilent 7000B Series

GC Parameter

Column	: HP-5ms UI 15m x 0.25 mm x 0.25 μ m
Inlet temperature	: 280 $^{\circ}$ C ,Splitless mode
Oven temperature	: initial temp. 60 $^{\circ}$ C
Carrier gas	: Helium
Gas flow	: 1 mL/min (Constant flow)
Injection volume	: 2 μ l
Total run time	: 20.75 min

MS/MS Parameter

Collision gas	: Nitrogen
Solvent Delay	: 3.5 min
Mode	: Electron impact
Transfer line temperature	: 280 $^{\circ}$ C
Source temperature	: 300 $^{\circ}$ C
Quadrupole temperature	: Q1 and Q2 = 180 $^{\circ}$ C

1.20.2 การคัดเลือก สารสกัดจากพืชตัวแทน (Representative Matrix)ของ ส้ม ฝรั่ง และ

มะเขือเทศ

สกัดตัวอย่างด้วยวิธี ethyl acetate method (EURL-FV, 2010) โดยสกัดด้วย ethyl acetate, NaHCO_3 และ Na_2SO_4 แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ; triple quadrupole, multiple reaction monitoring (MRM) เตรียมสารมาตรฐานใน matrix คะน้า ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มผักใบ (leafy vegetables) ใน matrix มะเขือเทศ ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มพืชตระกูลแตงและมะเขือ (fruiting vegetables) และใน matrix ส้ม ซึ่งเป็นตัวแทนผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits) โดยทดสอบที่ระดับ LOQ คือ 0.01 และ 0.02 $\mu\text{g/g}$

ผลการทดสอบเมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างส้มและคะน้า พบว่าสาร 37 ชนิดที่ไม่เกิด matrix effects โดยมีผลการทดสอบผ่านเกณฑ์ยอมรับ โดยมีค่า % matrix effects น้อยกว่า ± 20 มีค่า % recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 70-120 ค่า HORRAT และ % RSD อยู่ในช่วง 0.08-0.93 และ 8.4-19.6 ตามลำดับ ดังนั้น matrix standard ส้มและคะน้า สามารถใช้เป็น calibration curve ทดแทนกันได้ในการตรวจวิเคราะห์สาร 37 ชนิดด้วยวิธี ethyl acetate method (EURL-FV, 2010) และเทคนิค GC-MS/MS

1.21 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ในดินโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS

การทดสอบวิเคราะห์สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม organophosphate และ สารกลุ่ม fungicide รวม 10 ชนิด ได้แก่ alachlor, ametryn, atrazine, butachlor, chlorpyrifos, diuron, phorate, phosalone, profenofos และ propanil

1.21.1 สภาวะการทำงานของ เครื่อง LC-MS/MS

เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ คือ Thermo scientific Ultimate 3000 HPLC และ Compact quadrupole MS/MS ยี่ห้อ Bruker ที่มีระบบเชื่อมต่อแบบ Electrospray Ionization (ESI) โดยปรับสภาวะของเครื่อง ดังนี้

HPLC

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

Flow rate : 0.2 mL/min

Column Temperature : 30 °C

Injection Volume : 5 μl

Mobile Phase : A = 10% MeOH + 5 mM ammonium formate + 0.01% formic acid 99%

: B = MeOH + 5 mM ammonium formate + 0.01% formic acid 1%

Total cycle time: 20 min

MS/MS

Dry Gas : 8.0 L/min

Dry Temp : 200 °C

Nebulizer : 2.0 Bar

Capillary : 2500 V
 Mode : Positive

1.21.2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธีวิเคราะห์ประยุกต์วิธี QuEChERS (Vera et al., 2013) โดยสกัดตัวอย่างดินทราย ด้วย acetonitrile เขย่าด้วยเครื่องเขย่าแนวตั้ง (funnel shaker) 30 นาที เติม magnesium sulfate และ sodium chloride เขย่าด้วย Vortex mixer นำไป Centrifuge และแบ่งสารละลายมา clean up แบบdispersive โดยใช้ $MgSO_4$ และ PSA และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ผลการทดสอบ specificity พบว่ามีความเฉพาะเจาะจงและไม่พบสารตกค้างที่ศึกษาใน solvent blank และ matrix blank ส่วน working range/linearity ของวิธีทดสอบอยู่ในช่วง 10-500 $\mu\text{g/g}$ มีค่า correlation coefficient > 0.995 ส่วนการทดสอบ accuracy ที่ 5 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างในช่วง 10- 500 $\mu\text{g/g}$ (n=10) พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 78 – 103 และ % RSD อยู่ในช่วง 0.6-4.9 มีค่า LOQ เท่ากับ 10 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งมี % recovery อยู่ในช่วง 84-105 และ % RSD อยู่ในช่วง 0.9-4.9 และมี Signal to Noise Ratio (S/N) ในช่วง 40 - 879 และค่า LOD เท่ากับ 1 $\mu\text{g/g}$ มี Signal to Noise Ratio (S/N) ในช่วง 9 - 56

1.22 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พิษตกค้าง ไอโซโพรคาร์บ (isoprocarb) ไอโพรวาลิคาร์บ (iprovalicarb) และ ไทโอเบนคาร์บ (thiobencarb) ในธัญพืชด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1.22.1 สภาพะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

LC-MS/MS : Agilent 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent 1290 HPLC
 HPLC Column : Kinetex 2.6u XB-C18 100A 100 x 2.1 mm
 Mobile phase A : 5 mM ammonium formate in water + 0.01 % formic acid, pH 4
 Mobile phase B : acetonitrile
 Flow rate : 0.30 mL/min
 Total run time : 7.00 min

1.22.2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ วิธี QuEChERS

(Anastassiades et al., 2003)

โดยชั่งตัวอย่างบดละเอียด 5 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 mL เติมน้ำ 10 mL ที่ไว้อย่างน้อย 30 นาที หลังจากนั้นเติม 10 mL ของ acetonitrile ปิดฝาเขย่า vortex 30 วินาที สกัดด้วยmagnesium sulphate, sodium chloride, di-sodium hydrogen citrate และ tri-sodium citrate dehydrate นำไป centrifuge จากนั้นกรองสารละลายส่วนใสผ่าน PTFE filter ขนาด 0.2 μm นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ isoprocarb, iprovalicarb และ thiobencarb ในตัวอย่างข้าวและถั่วเหลือง พบว่า working range/ linearity ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.005 - 0.5 mg/kg โดยมีค่า correlation coefficient (r) > 0.990 ส่วน accuracy ทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 6 ระดับ ในช่วง 0.005-0.5 mg/kg พบว่า มี % recovery อยู่ในช่วง 69--108 และ % RSD อยู่ในช่วง 1.0-6.9 ซึ่งเกณฑ์ยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 60 -120 และ % RSD <20 ค่า LOQ และ LOD เท่ากับ 0.01 และ 0.005 mg/kg

1.23 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และไพเรทรอยด์ (pyrethroid) ในกระเทียม หอมแดง และใบชา(แห้ง)

1.23.1 สภาพการทำงานของเครื่อง GC

ตรวจวิเคราะห์ pyrethroid และ organophosphate มีสภาพการทำงานของเครื่อง GC ดังนี้ column ชนิด HP-5 สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid และ DB-1701P สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate มี flow rate ของ column 2.4 mL/นาที และอุณหภูมิของ oven เริ่มต้นที่ 95 °C จากนั้นเพิ่มขึ้น 20 °C/นาที จนถึง 160 °C คงไว้เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มขึ้น 20 °C/นาที จนถึง 180 °C คงไว้เป็นเวลา 2 min จากนั้นเพิ่มขึ้น 80 °C/นาที จนถึง 280 °C คงไว้เป็นเวลา 10 นาที มี post run ที่ 280 °C เป็นเวลา 2 นาที

1.23.2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธีการวิเคราะห์ QuEChERS Method โดยศึกษาสารกลุ่ม pyrethroid 7 ชนิด organophosphate 23 ชนิด ในตัวอย่างหอมแดง (แห้ง) กระเทียม (แห้ง) และใบชา (แห้ง) โดยมีวิธีวิเคราะห์ดังนี้ นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียด จากนั้นนำมาชั่ง เติมน้ำกลั่น สกัดด้วย acetonitrile และสารสกัดซึ่งประกอบด้วย magnesium sulfate anhydrous, sodium chloride, tri-sodium citrate dihydrate, และ sodium hydrogencitrate sesquihydrate และ clean up ด้วยสาร Primary Secondary Amine, calcium chloride และ C₁₈ Endcapped SPE Bulk Sorbent ตรวจวัดปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง Gas Chromatograph ที่มีหัวตรวจวัด μ ECD (สำหรับสารกลุ่ม pyrethroid) และ FPD (สำหรับสารกลุ่ม organophosphate)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีวิเคราะห์ไม่มี selectivity ในการตรวจวิเคราะห์สารบางชนิด โดยสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ มีดังนี้ หอมแดง (แห้ง)และกระเทียม (แห้ง) ได้แก่สารกลุ่ม pyrethroid 7 ชนิด organophosphate 11 ชนิด และ ใบชา(แห้ง) ได้แก่ สารกลุ่ม pyrethroid 7 ชนิด organophosphate 15 ชนิด

ผลการศึกษา matrix effect พบว่าทั้งสารกลุ่ม pyrethroid และorganophosphate มีสารบางชนิดที่มีค่า % ME > 20% แสดงว่าเกิดสิ่งรบกวนจากตัวอย่าง ดังนั้นจึงเตรียมมาตรฐานใน

สารละลายตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS ผลการทดสอบ accuracy ของสารกลุ่ม pyrethroid ทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.05 - 1.0 $\mu\text{g/g}$ (n=5) และ organophosphate ทดสอบที่ 3 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 0.05 - 2.0 $\mu\text{g/g}$ (n=5) พบว่า % recovery และ % RSD ผ่านเกณฑ์ยอมรับ (% recovery อยู่ในช่วง 60-120 และมีค่า HORRAT < 2) ส่วน LOD และ LOQ พบว่าสารกลุ่ม pyrethroid มี LOD อยู่ในช่วง 0.005-0.02 $\mu\text{g/g}$ และ LOQ อยู่ในช่วง 0.01-0.02 $\mu\text{g/g}$ สารกลุ่ม organophosphate มี LOD อยู่ในช่วง 0.005-0.03 $\mu\text{g/g}$ และ LOQ อยู่ในช่วง 0.02-0.05 $\mu\text{g/g}$ ส่วนช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม pyrethroid อยู่ในช่วง 0.01-1.00 $\mu\text{g/g}$ และสารกลุ่ม organophosphate อยู่ในช่วง 0.02-2.00 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งมีค่า correlation coefficient (r) > 0.995

กิจกรรมที่ 2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

2.1 ชื่อการทดลอง ประกอบด้วย 3 การทดลอง

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
2.1	การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในผักที่มีปริมาณน้ำและคลอโรฟิลสูง และการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ	พนิดา ไชยยันต์บุรณ์ ^{1/} บุญทวีศักดิ์ บุญทวี จินตนา ภู่มงกุฏชัย สุพัตริ์ หนูสังข์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2.2	การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในผลไม้ที่มีปริมาณน้ำสูง และการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ	บุญทวีศักดิ์ บุญทวี ^{1/} พนิดา ไชยยันต์บุรณ์ จินตนา ภู่มงกุฏชัย สุพัตริ์ หนูสังข์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2.3	การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate) ในธัญพืชและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ	วิทยา บุญศรี ^{1/} ศศิมา มั่งนิมิตร ลักษมี เดชานุกฤษ์นุกูล	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

2.2 ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดังนี้

2.2.1 เตรียมสารมาตรฐาน เครื่องตรวจวิเคราะห์และ Blank Sample

1) เตรียมสารมาตรฐาน organophosphate , organochlorine, pyrethroid, carbamate และ สารป้องกันกำจัดโรคพืชและอื่นๆ จัดหาอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น คอลัมน์สำหรับเครื่อง GC, LCMS/MS สอบเทียบเครื่องมือที่มีผลต่อการทดสอบ เช่น เครื่องชั่ง เทอร์โมมิเตอร์ เครื่องแก้วปริมาตร เตรียมสารมาตรฐานของวัตถุมีพิษที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง GC, HPLC และ LC-MS/MS เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ใช้เตรียม spiked sample และใช้สร้าง calibration curve

2) จัดหาตัวอย่าง ผัก ผลไม้ และธัญพืช ที่ไม่มีสารพิษตกค้างที่อยู่ในขอบข่ายการทดสอบ กรณีที่ไม่สามารถหาตัวอย่างผัก ผลไม้ที่ไม่มีสารพิษตกค้างอยู่ในขอบข่ายการทดสอบได้ อาจระบุให้เป็นสารพิษตกค้างในการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจเติมสารมาตรฐานเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง ตามความเหมาะสม

3) ปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ GC-ECD/FPD ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate, organochlorine และ pyrethroid ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง HPLC และ LC-MS/MS ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม carbamate สารป้องกันกำจัดโรคพืชและอื่นๆ เพื่อให้มีสัญญาณการตรวจวัดได้ที่ชัดเจนคงที่

4) เตรียมตัวอย่าง

4.1) ตรวจวิเคราะห์ blank sample ด้วยวิธีที่ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แล้ว ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ กรณีที่พบสารที่ต้องการให้มีในตัวอย่างทำการคำนวณปริมาณสารพิษตกค้าง และตรวจสอบการปนเปื้อนของสารที่มีสัญญาณการตรวจวัดตรงกับสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ โดยตรวจวิเคราะห์ solvent blank ตามวิธีทดสอบต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ กรณีพบสารพิษตกค้างอยู่ในขอบข่ายการทดสอบ ตรวจสอบและรายงานปริมาณสารพิษตกค้าง

4.2) เตรียมตัวอย่าง blank sample โดยผักและผลไม้ หั่นตัวอย่างเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1-2 นิ้ว นำไปแช่ไว้ในตู้แช่ -18 ถึง -20 °C ชำคืน นำมาปั่นกับน้ำแข็งแห้งจนละเอียด แช่ไว้ในตู้แช่ -18 ถึง -20 °C เพื่อให้ คาร์บอนไดออกไซด์ระเหยจนหมด ส่วนตัวอย่างธัญพืชนำมาบดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง แช่ไว้ในตู้แช่ -18 ถึง -20 °C

2.2.2 การจัดโปรแกรมการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

1) ติดต่อห้องปฏิบัติการที่มีความสามารถด้านการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในส่วนภูมิภาคของ กรมวิชาการเกษตรและห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพื่อร่วมทดสอบ โดยส่งรายละเอียดโปรแกรม (protocol) ใบสมัครและแบบตอบรับ ให้กับห้องปฏิบัติการต่างๆ

2) เตรียมตัวอย่าง สำหรับโปรแกรมการทดสอบ ดังนี้

2.1) นำ blank sample มาทิ้งไว้ให้ละลาย กรณีมีชิ้นใหญ่หรือไม่สม่ำเสมอ ให้กรองผ่านตะแกรงร่อน แบ่งตัวอย่างใส่ขวดสีชา ซึ่งน้ำหนักตัวอย่าง ตัดป้ายตัวอย่าง ขณะแบ่งตัวอย่างต้องกวนผสมตัวอย่างตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวน

2.2) การเตรียม fortified sample โดยชั่งน้ำหนัก blank sample และเติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างตามที่กำหนด กวนผสมตัวอย่างตลอดเวลาโดยใช้เครื่องกวน แบ่งตัวอย่างใส่ขวดสีชา ซึ่งน้ำหนักตัวอย่าง และตัดป้ายตัวอย่าง

2.2.1) ทดสอบความเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneity) โดยสุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้หลักสถิติ เช่น ISO 13528 (2005), IUPAC (2006), Cochran test, และ One Way ANOVA เป็นต้น

2.2.2) ทดสอบความคงทน (stability) ของตัวอย่าง โดยการแบ่งตัวอย่าง spiked sample นำไปเก็บที่สภาวะต่าง ๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 5 °C) นำมาทดสอบ ที่ 1, 3, 5 และ 7 วัน อุณหภูมิตู้เย็น และอุณหภูมิ freezer (แช่แข็ง) (ไม่น้อยกว่า -18 °C) นำมาทดสอบ ที่ 30 วัน เพื่อดูแนวโน้มของ การสลายตัวของสารพิษที่สภาวะและระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกชนิดสารที่เติมลงในตัวอย่างต้องไม่สลายตัวในระหว่างการส่งตัวอย่าง คำนวณผลการทดสอบความคงทนของตัวอย่าง โดยใช้สถิติ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน ความแปรปรวนของข้อมูล และผลการทดสอบหา % recovery

2.2.3) เก็บตัวอย่าง spiked sample และ blank sample โดยแช่ไว้ในตู้แช่ (ไม่น้อยกว่า -18 °C)

3) ส่งตัวอย่างให้กับห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ตามวันเวลาที่กำหนด โดยทางไปรษณีย์ แห่งละ 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็น spiked sample ชุดที่ 2 เป็น blank sample โดยบรรจุในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม เพื่อรักษาความเย็นให้ได้นานที่สุดก่อนถึงห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ พร้อมแนบหมายเลข Code ของห้องปฏิบัติการ แบบฟอร์มรายงานผลและแบบสอบถามสภาพตัวอย่างไปพร้อมกับตัวอย่าง

4) นำรายงานผลการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการมาประเมินและเปรียบเทียบผล โดยใช้สถิติ z-Score

5) จัดทำรายงานประเมินผลการทดสอบและจัดส่งให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ

2.2.3 สรุปและรายงานผล

สรุปและรายงานผลการทดสอบตามรูปแบบที่กำหนด มีการวิจารณ์ผลการทดลอง เสนอแนะ และกล่าวถึงการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

2.2.4. การบันทึกข้อมูล

1) น้ำหนัก ปริมาตร และความเข้มข้น ในการเตรียมสารมาตรฐาน น้ำหนักตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารมาตรฐานในตัวอย่างที่เติมและที่ตรวจวิเคราะห์ได้ สภาวะการใช้งานของเครื่อง GC, HPLC และ LC-MS/MS

2) ปริมาณสารพิษตกค้าง ในการทดสอบ homogeneity และ stability

- 3) รายชื่อของผู้เข้าร่วมทดสอบ พร้อม Code ของห้องปฏิบัติการ
- 4) การส่งตัวอย่างได้แก่ รูปแบบการส่งตัวอย่าง สภาพตัวอย่างที่ปลายทางตามแบบสอบถามสภาพตัวอย่าง
- 5) ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างที่เป็นผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบและผลการ ประเมินความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

2.3 ผลการวิจัย

กิจกรรมที่ 2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 3 การทดลอง มีดังนี้

2.1 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในผักที่มีปริมาณน้ำและคลอโรฟิลสูงและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

2.1.1 ตัวอย่างผักกาดหอม

ทดสอบ stability ของสารกลุ่ม fungicide จำนวน 29 ชนิด ในตัวอย่างผักกาดหอม ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/kg โดยสกัดและ clean up ตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) และเครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS ทดสอบความคงทนที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เพื่อเลือกสารที่มีความคงทน ที่เติมลงในตัวอย่างที่ส่งให้ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการทดสอบ พบว่าสาร 12 ชนิด ได้แก่ oxycarboxin, metalaxyl, dimethomorph, triadimenol, cyproconazole, fenamedone, azoxystrobin, triadimefon, epoxiconazole, tebuconazole, flusilazole และ benalaxyl มีความคงทนจนถึงระยะเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาช้าที่สุดของตัวอย่างที่จัดส่งจะถึงห้องปฏิบัติการจึงสามารถเติมในตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการได้ การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดำเนินการในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งมีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในขอบข่าย ได้แก่ organochlorine 3 ชนิด organophosphate 23 ชนิด pyrethroid 7 ชนิด carbamate 8 ชนิด และ fungicide และอื่นๆ 20 ชนิด รวมทั้งสิ้น 61 ชนิด โดยเตรียมตัวอย่างผักกาดหอม ได้แก่ blank sample และ fortified sample มีการแจ้งขอเชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบรวม 24 ห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ

การเตรียม fortified sample ตัวอย่างผักกาดหอม มีการเติมสาร endosulfan sulfate, cypermethrin, carbaryl, triazophos และ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0.05 -0.30 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) เครื่องมือวิเคราะห์ LC-MS/MS และ GC-ECD ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและทดสอบความคงตัวของสารตกค้างในตัวอย่าง พบว่าสารมีความคงทนที่อุณหภูมิห้อง 0-7 วัน และอุณหภูมิ freezer 0-30 วัน

ผลการทดสอบจำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ พบว่ามี % RSD ในช่วง 17.7-46.3 ซึ่งสูงกว่า % RSD ของ Horwitz จึงทำการประเมิน z-Score โดยคำนวณค่า Assigned Values ใช้แนวทางของ The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analysis Laboratories (Thompson et al., 2006) และ ISO 13528 (2005) และประเมิน Target Standard Deviation โดยใช้ % RSD ของกลุ่มร่วมกับ Horwitz predicted RSD พบว่าผลการทดสอบจำนวน 80 % มีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ (ผลทดสอบเป็นที่น่าพอใจ) มีจำนวน 8.2 % มีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ (ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย) จำนวน 11.8 % มีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$ (ผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ) เครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ ได้แก่ GC, GC-MS/MS, GC-MSD, LC-MS, LC-MS/MS และ HPLC และวิธีวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบใช้เป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานสากลและยอมรับได้คือ Steinwandter (1985) และวิธี QuEChERS

2.1.2 ตัวอย่างมะเขือเทศ

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการดำเนินการในปี พ.ศ. 2560 สารพิษตกค้างในขอบข่าย ได้แก่ organochlorine 3 ชนิด organophosphate 23 ชนิด pyrethroid 7 ชนิด carbamate 11 ชนิด และ fungicide และอื่นๆ 32 ชนิดรวมทั้งสิ้น 69 ชนิด แจ้งขอเชิญห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 28 ห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 22 ห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่าง fortified sample มะเขือเทศ โดยเติม atrazine, β -endosulfan, carbaryl, cypermethrin, permethrin และ triazophos ที่ความเข้มข้น 0.05 - 0.50 mg/kg ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและทดสอบความคงตัวของสารตกค้างในตัวอย่าง พบว่าสารมีความคงทนที่อุณหภูมิห้อง 0- 3 วัน และที่อุณหภูมิ freezer 0-30 วัน

ผลการทดสอบรวมทั้งสิ้น 21 ห้องปฏิบัติการ สารที่มีการรายงานผลมาก ได้แก่ cypermethrin, permethrin, triazophos, carbaryl, β -endosulfan และ atrazine ตามลำดับ ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 84.0 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ น่าสงสัย 4.0 % โดยมีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 12.0 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$ ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบใช้วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ คือวิธี Steinwandter H. (1985) และวิธี QuEChERS ส่วนเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์เป็นเครื่องมือที่มีความถูกต้อง แม่นยำและยอมรับได้ ได้แก่ GC, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC, LC-MS และ LC-MS/MS

2.2 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในผลไม้ที่มีปริมาณน้ำสูงและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

2.2.1 ตัวอย่างแดงโม

ทำการทดสอบความคงทนของสารกลุ่ม fungicide จำนวน 31 ชนิด ในตัวอย่างแดงโม โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 25 °C ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาเลือกสารพิษตกค้าง ที่จะใช้ในการเติมลงในตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี QuEChERS (EN 15662 2008) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบว่าที่ระยะเวลา 5 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาของการจัดส่งตัวอย่าง พบว่าสารที่ทดสอบยังคงมีความคงทน 20 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, benalaxyl, cyproconazole, cymoxanil, difenoconazole, dimethomorph, epoxiconazole, fenamedone, flusilazole, imazalil, kresoxim-methyl, oxycarboxin, metalaxyl , penconazole, pyrimethanil , thiophanate-methyl, triadimenol, triadimefon, tebuconazole และ trifloxystrobin

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดำเนินการในปี พ.ศ. 2559 เตรียมตัวอย่างแดงโมโดยเติมสาร bifenthrin, pirimiphos-ethyl, isoprocarb และ azoxystrobin ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงทน (stability) ของสารในตัวอย่าง พบว่าที่อุณหภูมิห้องทุกสารมีความคงทนที่ 0-3 วัน และที่อุณหภูมิ freezer มีความคงทนที่ 0-30 วัน

ติดต่อห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมในการเปรียบเทียบความสามารถของห้องปฏิบัติการ มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 20 ห้องปฏิบัติการ ผลการทดสอบพบว่ามี % RSD ในช่วง 12.7-53.0 มีบางสารที่ % RSD สูงกว่า % RSD ของ Horwitz จึงทำการประเมิน z-Score โดยคำนวณค่า Assigned Values และประเมิน Target Standard Deviation โดยใช้ % RSD ของกลุ่มร่วมกับ Horwitz predicted RSD พบว่าผลการทดสอบจำนวน 81 % มีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ (ผลทดสอบเป็นที่น่าพอใจ) ไม่พบผลที่มีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ (ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย) และจำนวน 19 % มีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$ (ผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ)

2.2.2 ตัวอย่างแอปเปิล

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดำเนินการในปี พ.ศ. 2560 เชิญเข้าร่วมทดสอบรวม 28 ห้องปฏิบัติการมีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 21 ห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่าง fortified sample แอปเปิล โดยเติม chlorpyrifos, fenvalerate, carbaryl และ difenoconazole ที่ความเข้มข้น 0.08 - 0.15 mg/kg ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างและทดสอบความคงตัวของสารในตัวอย่าง พบว่าที่อุณหภูมิห้องสารมีความคงทน 0 -7 วัน ยกเว้น chlorpyrifos มีความคงทนที่ 0-3 วัน ที่อุณหภูมิ freezer มีความคงทนที่ 0- 30 วัน

มีการรายงานผลการทดสอบรวมทั้งสิ้น 21 ห้องปฏิบัติการ สารที่มีการรายงานผลมากตามลำดับได้แก่ chlorpyrifos, fenvalerate, carbaryl และ difenoconazole ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 79 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ ผลทดสอบอยู่

ในเกณฑ์น่าสงสัย 6 % โดยมีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 14 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$

2.3 การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate) ในธัญพืช และการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

2.3.1 ตัวอย่างข้าวสาร

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดำเนินการในปี พ.ศ. 2559 มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 15 ห้องปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่างโดยเติมสารมาตรฐาน profenophos, triazophos, L-cyhalothrin และ carbofuran ลงในตัวอย่างข้าวสารบดละเอียด ตรวจวิเคราะห์โดยวิธี modified QuEChERS (Walorczyk and Drozdzyński, 2012) ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงทนของสารในตัวอย่างพบว่าสารมีความคงทนที่ 0-7 วันที่อุณหภูมิ และ 0-30 วันที่อุณหภูมิ freezer

ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบส่งรายงานผลตามวันเวลาที่กำหนดรวมทั้งสิ้น 12 ห้องปฏิบัติการ ผลการประเมินค่า z-Score เมื่อเทียบกับผลการทดสอบทั้งหมดที่รายงานพบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 73.9 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย 6.5 % โดยมีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 19.6 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$

2.3.2 ตัวอย่างข้าวโพด

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดำเนินการในปี พ.ศ.2560 มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบจำนวน 12 ห้องปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่างโดยเติมสารมาตรฐาน carbaryl, cypermethrin, chlorpyrifos และ thiamethoxam ลงในตัวอย่างข้าวโพด(แห้ง)บดละเอียด ตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี modified QuEChERS (Walorczyk and Drozdzyński, 2012) ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงทนของสารในตัวอย่างพบว่าสารมีความคงทนที่ 0-7 วันที่อุณหภูมิ และ 0-30 วันที่อุณหภูมิ freezer

ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ ได้รายงานผลการทดสอบตามวันเวลาที่กำหนดรวมทั้งสิ้น 12 ห้องปฏิบัติการ สารที่มีการรายงานผลมากที่สุดตามลำดับ ได้แก่ carbaryl, cypermethrin, chlorpyrifos และ thiamethoxam ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 84.3 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์ น่าสงสัย 5.9 % โดยมีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 9.8 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$

2.3.3 ตัวอย่างข้าวสาร(ไรซ์เบอร์รี่)

การทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ ดำเนินการในปี พ.ศ. 2561 มีห้องปฏิบัติการตอบรับเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 12 ห้องปฏิบัติการ

เตรียมตัวอย่างโดยเติมสารมาตรฐาน azoxystrobin, carbaryl, chlorpyrifos และ metalaxyl ลงในตัวอย่างข้าวสาร(ไรซ์เบอร์รี่)บดละเอียด ตรวจวิเคราะห์ โดยวิธี modified

QuEChERS method (Walorczyk and Drozdzyński, 2012) ประเมินความเป็นเนื้อเดียวกันและความคงทนของสารในตัวอย่างพบว่า สารมีความคงทนที่ 0-7 วันที่อุณหภูมิ และ 0-30 วันที่อุณหภูมิ freezer ห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมทดสอบ ได้รายงานผลการทดสอบตามวันเวลาที่กำหนดรวมทั้งสิ้น 7 ห้องปฏิบัติการ สารที่มีการรายงานผลมากตามลำดับ ได้แก่ chlorpyrifos, carbaryl, metalaxyl และ azoxystrobin ผลการประเมินค่า z-Score พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ 87.0% โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ ผลทดสอบอยู่ในเกณฑ์น่าสงสัย 4.3 % โดยมีค่า $2 < |z\text{-Score}| < 3$ และผลทดสอบไม่เป็นที่น่าพอใจ 8.7 % โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \geq 3$

กิจกรรมที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

3.1 ชื่อการทดลอง ประกอบด้วย 14 การทดลอง

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
3.1	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate) ในลำไยของห้องปฏิบัติการ สวพ.1	เนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกุล ^{1/} นงพา โอวเสน ชลิตตา นันชัย	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 1
3.2	การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในดินด้วยวิธีการ QuEChERS โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีของห้องปฏิบัติการ สวพ.2	พรศิริ สายะพันธ์ ^{1/} สุธินี สาสีลัง เบญจมาศ ใจแก้ว วิภาพร เกียรตินิติประวัติ	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 2
3.3	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในมะม่วงของห้องปฏิบัติการ สวพ. 8	สาวิตรี เขมวงค์ ^{1/} สรัญญา ช่วงพิมพ์	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 8
3.4	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในพริกของห้องปฏิบัติการ สวพ.4	นาดยา จันทร์ส่อง ^{1/} สุภาพร บังพรม อิทธิพล บังพรม	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 4
3.5	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน	นิกร โคตรสมบัติ ^{1/} อรพิน หนูทอง	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 7

	(organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในมะม่วง และผักกาดก้านขาวของห้องปฏิบัติการ สวพ. 7		
3.6	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง โดยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างผักกลุ่ม high water and chlorophyll content ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.4	สุภาพร บังพรม ^{1/} อิทธิพล บังพรม นาตยา จันทร์ส่อง	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 4
3.7	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ในพริกโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.3	จารุพงศ์ ประสพสุข ^{1/} ปริยานุช สายสุพรรณ วัชรภาพ ศรีสว่างวงศ์	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 3

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

3.1 ชื่อการทดลอง (ต่อ)

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
3.8	การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโน-ฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต(carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ด้วยวิธีการ QuEChERS ในพืชที่มีปริมาณน้ำและคลอโรฟิลสูงโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีของห้องปฏิบัติการ สวพ.2	พรศิริ สายะพันธ์ ^{1/} สุธินี สาสีลัง เบญจมาศ ใจแก้ว วิภาพร เกียรตินิติประวัติ	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 2
3.9	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine)ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในมะม่วง ลำไย ทุเรียนและมังคุด ด้วยวิธีการ QuEChERS และเทคนิคโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีของห้องปฏิบัติการ สวพ. 6	เกษสิริ ฉันทพิริยะพูน ^{1/} ดาวนภา ช่องวารินทร์ ชนิษฐา วงษ์นิกร สมชาย ฉันทพิริยะพูน	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 6
3.10	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และ คาร์บาเมต (carbamate) ในมะเขือของห้องปฏิบัติการ สวพ. 5	กัญญารัตน์ เต็มปิยะพล ^{1/} มณฑาทิพย์ อรุณวารกรณ์ จิราภา เมืองคล้าย	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 5

3.11	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในลำไยและพริกของห้องปฏิบัติการ สวพ.1	นางพางา โอลเสน ^{1/} เนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกุล ณัฐนัย ตั้งมั่นคงวรกุล	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 1
3.12	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในพริกของห้องปฏิบัติการ สวพ.1	นางพางา โอลเสน ^{1/} เนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกุล ชลิตตา นันชัย ปิยมภรณ์ เหล่าคงถาวร	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 1

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

3.1 ชื่อการทดลอง (ต่อ)

การทดลองที่	ชื่อการทดลอง	ผู้ดำเนินการ	สังกัด
3.13	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างผลไม้กลุ่ม high water and low or no chlorophyll content ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.4	อิทธิพล บังพรม ^{1/} นาตยา จันทรส่อง สุภาพร บังพรม	สำนักวิจัยและพัฒนา การเกษตรเขตที่ 4
3.14	การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในชมพูและแก้วฝักยาวของห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี	สุวรรณี ศรีทองอินทร์ ^{1/}	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการ เกษตรกาญจนบุรี

^{1/} หัวหน้าการทดลอง

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

กิจกรรมที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการมี

ดังนี้

1) จัดหา สารเคมี สารมาตรฐาน ตัวอย่างดิน น้ำ พืช อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น คอลัมน์สำหรับเครื่อง GC, GC-MS, GC-MS/MS, HPLC และ LC-MS/MS สอบเทียบเครื่องมือที่มีผลต่อการทดสอบ เช่น เครื่องชั่ง เทอร์โมมิเตอร์ และเครื่องแก้วปริมาตร เป็นต้น

2) เตรียมสารมาตรฐานของวัตถุที่มีพิษที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ เพื่อใช้เตรียม spiked sample และเพื่อสร้าง calibration curve

3) ปรับสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์ โดยฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาช่วงต่ำสุดจนถึงสูงสุดของการวัดตามความเหมาะสม เพื่อให้มีสัญญาณการตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐานต่ำสุด และ range ของ calibration curve ของสารมาตรฐาน

4) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง sample blank โดยใช้วิธีทดสอบที่เลือก ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ หรือมีสัญญาณการตรวจวัดของสารพิษตกค้างน้อยกว่าที่ระดับ LOQ และหากพบสารในตัวอย่างต้องพบไม่เกิน 30 % ของระดับ LOQ

5) ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารที่มีสัญญาณการตรวจวัดตรงกับสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบใน สารเคมี เครื่องแก้ว อุปกรณ์ต่าง ๆ โดยตรวจวิเคราะห์ solvent blank ตามวิธีทดสอบ ต้องไม่พบสารพิษตกค้างที่ต้องการทดสอบ

6) ทดสอบวิธี วิเคราะห์ ตาม parameter ต่างๆดังนี้

6.1) Linearity / range

6.1.1) ตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 3-5 ความเข้มข้น ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์เพื่อสร้าง calibration curve นำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่าง response ของการตรวจวัดกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ประเมินค่า correlation coefficient; r หรือค่า coefficient of determination; R^2

6.1.2) ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่กำหนด หาความสัมพันธ์ระหว่าง response ของการตรวจวัดกับความเข้มข้นของสารพิษตกค้างที่เติมในตัวอย่าง หรือความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารที่ตรวจวิเคราะห์ได้กับความเข้มข้นของสารพิษตกค้างที่เติมในตัวอย่าง ประเมินค่า correlation coefficient; r หรือค่า coefficient of determination; R^2 (Eurachem, 2014)

6.2) Matrix effect

โดยการเปรียบเทียบสัญญาณการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ หรือความชัน (slope) ของ calibration curve ของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่เตรียมในตัวทำละลาย (solvent) กับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่เตรียมในสารละลายตัวอย่าง (matrix) ที่สกัด และ clean up ด้วยวิธีที่ใช้ทดสอบ โดยสัญญาณการตรวจวัดต้องแตกต่างกันไม่เกิน 20% (SANTE/12682, 2019) หรือ slope แตกต่างกันไม่เกิน 10% (NATA, 2018) หากพบว่ามี matrix effect ต้องเตรียมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่าง (matrix) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร โดยกรณีใช้ slope ประเมิน matrix effect จากสมการดังนี้

$$\text{Matrix effect(\%)} = \frac{[(\text{slope of calibration curve in matrix}) - (\text{slope of calibration curve in solvent})]}{(\text{slope analytical curve std. in solvent})} \times 100$$

6.3) Accuracy

ทดสอบโดยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นในตัวอย่าง (spiked sample) อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5- 10 ซ้ำ ประเมิน trueness และ precision ดังนี้

6.3.1) Trueness ประเมินจากค่าร้อยละการกลับคืนของสารในตัวอย่างที่ทดสอบ (% recovery) เกณฑ์ยอมรับคือ 70-120% (SANTE/12682, 2019) ซึ่งเกณฑ์ยอมรับจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C1}{C2}$$

C1 -ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ หน่วย mg/kg หรือ $\mu\text{g/g}$ หรือ mg/L หรือ $\mu\text{g/mL}$

C2 -ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง mg/kg หรือ $\mu\text{g/g}$ หรือ mg/L หรือ $\mu\text{g/mL}$

6.3.2) Precision ประเมินจาก % Relative Standard Deviation; RSD โดย เกณฑ์ยอมรับของ % RSD ≤ 20 (SANTE/12682, 2019) หรือนำ % RSD ไปคำนวณค่า HORRAT โดยมีเกณฑ์ยอมรับ HORRAT ≤ 2 (Horwitz, 2000) ซึ่งการคำนวณค่า Predicted Horwitz RSD (สำหรับการทำซ้ำแบบ repeatability) % RSD และ HORRAT มีสูตรการคำนวณดังนี้

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

C = concentration ratio

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

SD- Standard Deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

\bar{x} - ค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบ

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

6.4) LOQ (Limit of Quantitation) และ LOD (Limit of Detection)

6.4.1) LOQ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมี accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ อาจประเมินโดยใช้ค่า SD- standard deviation ของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่ต่ำที่สุดที่นำมาหา accuracy โดย LOQ = 10 x SD และ LOD = 3 x SD พิสูจน์ด้วยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 10 ซ้ำ ประเมินค่า % recovery และ % RSD ต้องอยู่เกณฑ์ยอมรับ เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่สัญญาณการวัดมี noise สัญญาณการตรวจวัดที่ระดับ LOQ ต้องมี Signal to Noise Ratio ≥ 10

6.4.2) LOD เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยต้องพบสัญญาณการตรวจวัดสารในตัวอย่างทุกตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ (ตัวอย่างต้องพบสารในมีระดับความเชื่อมั่น 99%) อาจประเมินโดยใช้ค่า SD- standard deviation ของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่ต่ำที่สุดที่นำมาหา accuracy โดย $LOD = 3 \times SD$ ทดสอบด้วยการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนอย่างน้อย 10 ซ้ำ ประเมินจาก signal ของการตรวจวัด สำหรับเครื่องมือตรวจวิเคราะห์ที่สัญญาณการวัดมี noise ต้องมี Signal to Noise Ratio ≥ 3

7) สรุปและรายงานผล

สรุปและรายงานผลการทดสอบตามรูปแบบที่กำหนด มีการวิจารณ์ผลการทดลอง เสนอแนะและกล่าวถึงการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

8) การบันทึกข้อมูล

บันทึก น้ำหนัก ปริมาตร และความเข้มข้น ในการเตรียมสารมาตรฐาน น้ำหนัก ตัวอย่าง ความเข้มข้นของสารมาตรฐานในตัวอย่างที่เติมและที่ตรวจวิเคราะห์ได้ สัญญาณการตรวจวัดของ เครื่องตรวจวิเคราะห์ Signal to Noise Ratio ของสัญญาณการตรวจวัดที่ความเข้มข้นระดับ LOD และ LOQ และสภาวะการทำงานของเครื่องตรวจวิเคราะห์

3.3 ผลการวิจัย

กิจกรรมที่ 3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐาน

ห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วย 14 การทดลอง ดังนี้

3.1 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของ สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) และคาร์บาเมต (carbamate) ในลำไยของห้องปฏิบัติการ สวพ.1

ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate, organochlorine และ pyrethroid ด้วย เครื่อง GC-MS/MS และสารกลุ่ม carbamate ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ QuEChERS ของสารกลุ่ม organophosphate 29 ชนิด ในลำไยสด ทดสอบ accuracy ที่ 3 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg พบว่าสารทุกชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับ ที่ 0.05 และ 0.5 mg/kg โดยมี % recovery อยู่ในช่วง 60-120 มี HORRAT < 2 ค่า LOD ที่ 0.01 mg/kg และ LOQ ที่ 0.05 mg/kg

สารกลุ่ม organochlorine 3 ชนิด ได้แก่ alpha-endosulfan, beta-endosulfan และ endosulfan sulfate ทดสอบ accuracy ที่ 3 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg พบว่าผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ มี % recovery อยู่ในช่วง 96-119 มี HORRAT < 2 ค่า LOD ที่ 0.005 mg/kg และ LOQ ที่ 0.01 mg/kg

สารกลุ่ม pyrethroid 7 ชนิด ทดสอบ accuracy ที่ 3 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg พบว่า lambda cyhalothrin ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ 0.01, 0.05 และ 0.5 mg/kg ส่วน permethrin, cyfluthrin, cypermethrin และ fenvalerate ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ 0.05 และ 0.5 mg/kg และ cypermethrin ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ 0.5 mg/kg สารที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมี % recovery อยู่ในช่วง 60-120 โดยมี HORRAT < 2 ค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.01-0.05 mg/kg และ LOD อยู่ในช่วง 0.005-0.01 mg/kg ส่วน deltamethrin ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ

สารกลุ่ม carbamate 19 ชนิด ทดสอบ accuracy ที่ 4 ระดับความเข้มข้นในตัวอย่างที่ 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 mg/kg มีสาร 3 ชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ มีสาร 15 ชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ 0.01, 0.05 และ 0.1 mg/kg และมีสาร 18 ชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ 0.05 และ 0.1 mg/kg สารที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมี % recovery อยู่ในช่วง 60-120 มี HORRAT < 2 ค่า LOD อยู่ในช่วง 0.005-0.05 mg/kg และ LOQ อยู่ในช่วง 0.01-0.5 mg/kg

3.2 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในดินด้วยวิธีการ QuEChERS โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีของห้องปฏิบัติการ สวพ.2

3.2.1 สภาพะการทำงาน of เครื่อง GC-MS/MS

หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphate 23 ชนิด organochlorine 3 ชนิด และ pyrethroid 5 ชนิด โดยตั้งสภาวะการทำงาน of เครื่อง GC-MS/MS ดังนี้ เครื่อง GC-MS/MS แบบ electron impact ionization (EI) ที่ 70 eV และ ตรวจวัดในรูปแบบ MRM โดยใช้เครื่องยี่ห้อ Bruker รุ่น 436 GC/ Scion MS คอลัมน์ชนิด Rxi-5Sil MS (30m x 0.25mm I.D x 0.25µm film thickness) โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับ oven เริ่มที่อุณหภูมิ 80 °C คงไว้เป็นเวลา 1.00 min เพิ่มอุณหภูมิจาก 80 °C ถึง 180 °C อัตราความเร็ว 20 °C /min เพิ่มอุณหภูมิจาก 180 °C ถึง 220 °C อัตราความเร็ว 5 °C /min คงไว้เป็นเวลา 1.00 min เพิ่มอุณหภูมิจาก 220 °C ถึง 270°C อัตราความเร็ว 15 °C /min คงไว้เป็นเวลา 8.00 min และเพิ่มอุณหภูมิจาก 270 °C ถึง 320°C อัตราความเร็ว 40 °C /min คงไว้เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้แก๊สฮีเลียมความบริสุทธิ์ 99.9995% เป็น carrier gas ด้วยอัตราความเร็ว 1.0 mL/min ส่วนฉีดสาร injection mode เป็น splitless ที่อุณหภูมิ 220 °C

3.2.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

วิธีการสกัดดินจะดัดแปลงมาจากวิธีของ QuEChERS คือ โดยการชั่งตัวอย่างดิน 10 g สกัดด้วย acetonitrile และ clean up ด้วย MgSO₄ และ primary secondary amine (PSA) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS พบว่ามีสารกลุ่ม organophosphate 4 ชนิด และ pyrethroid 3 ชนิด ที่ % recovery ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

3.2.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการสกัดดินที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ QuEChERS พบว่ามีช่วงการใช้งานในช่วง 0.005-1.0 µg/g มีค่า $r > 0.995$ ยกเว้น methamidophos, mevinphos, omethoate, dicrotophos, monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos ethyl และ cyfluthrin ซึ่งค่า r ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ ส่วนการทดสอบ accuracy ที่ 3 ระดับ ความเข้มข้น ประเมินจากค่า % recovery พบว่าที่ 0.01 µg/g อยู่ในช่วง 43-150, ที่ 0.0-3 µg/g อยู่ในช่วง 43-150 และที่ 1.0 µg/g อยู่ในช่วง 70-112 ส่วน precision ประเมินโดยค่า HORRAT พบว่าอยู่ในช่วง 0.2-1.9 ยกเว้น methamidophos, mevinphos, dicrotophos, monocrotophos, dimethoate, alpha-endosulfan, azinphos ethyl และ cyfluthrin ให้ค่า HORRAT > 2 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับ ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 µg/g และ 0.30 µg/g

ค่า LOD อยู่ในช่วง 0.003-0.005 µg/g และ LOQ อยู่ในช่วง 0.01-0.02 µg/g ยกเว้น mevinphos, dimethoate, phosalone ได้ค่า LOD 0.01 µg/g และ LOQ 0.05 µg/g methamidophos, dicrotophos, monocrotophos, alpha-endosulfan, azinphos ethyl และ EPN ได้ค่า LOD 0.02 µg/g และ LOQ 0.07 µg/g นอกจากนั้นพบว่า omethoate ให้ค่า LOD, LOQ ที่สูง คือ 0.40 µg/g และ 1.00 µg/g ตามลำดับ

3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และ ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในมะม่วงของห้องปฏิบัติการ สวพ. 8

3.3.1 สภาพะการทำงาน of เครื่อง GC-FPD/ECD

ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate 7 ชนิด ได้แก่ dichlorvos, diazinon, chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos และ pirimiphos-ethyl มีสภาพะการทำงาน of เครื่องดังนี้

GC-FPD (Agilent 6890N)

detector	: flame photometric detector (FPD-Detector)
column	: capillary column DB-1701P (5% phenyl methyl siloxane)
	: model, Agilent 122-7732
	: length, 30 m
	: diameter (i.d.), 0.25 mm
	: film thickness, 0.25 µm
temperature	: injector 250°C
	: detector 250°C

สารกลุ่ม pyrethroid 4 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, lambda cyhalothrin, cypermethrin และ deltamethrin มีสภาพะการทำงาน of เครื่อง ดังนี้

GC-ECD (Agilent 6890N)

Detector	: electron capture detector (ECD-Detector)
column	: capillary column DB-5 (5% phenyl methyl siloxane)
	: model, Agilent 122-5032
	: length, 30 m
	: diameter (i.d.), 0.25 mm
	: film thickness, 0.25 μ m
temperature	: detector 250 $^{\circ}$ C
carrier gas	: helium, flow rate 2.2 mL/min
make up gas	: nitrogen, flow rate 60 mL/min
injection mode	: splitless, purge time 1 min
	: injection volume, 1 μ L

3.3.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธีการวิเคราะห์ ที่พัฒนามาจากวิธีของ Steinwandter (1985) ตรวจสอบวิเคราะห์มะม่วงด้วยเครื่อง GC-FPD/ECD

สารกลุ่ม organophosphate มี working range/linearity ที่ 0.01- 2 mg/kg โดยมี ค่า $r > 0.995$ ผลการทดสอบ accuracy ที่ 0.01, 0.1 และ 1 mg/kg พบว่ามี % recovery ในช่วง 95-111 และ precision แบบ repeatability มี % RSD ในช่วง 1.0-12.1 precision แบบ reproducibility มี % RSD ในช่วง 1.0-10.3 มีค่า LOD อยู่ในช่วง 0.006-0.007 mg/kg และค่า LOQ ที่ 0.01 mg/kg

สารกลุ่ม pyrethroid มี working range/linearity ที่ 0.01- 1 mg/kg โดยมีค่า $r > 0.995$ การทดสอบ accuracy ที่ 0.01, 0.1 และ 1 mg/kg พบว่ามี % recovery ในช่วง 90-101 และ precision แบบ repeatability มี % RSD ในช่วง 2.2-10.7 precision แบบ reproducibility มี % RSD ในช่วง 0.8-2.9 มีค่า LOD ที่ 0.005 mg/kg และค่า LOQ ที่ 0.01 mg/kg

3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในพริก ของห้องปฏิบัติการ สวพ.4

ศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มไพรีทรอยด์ 6 ชนิด ได้แก่ lambda-cyhalothrin, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin, fenvalerate และ deltamethrin ในพริก โดยใช้วิธีที่พัฒนามาจากวิธีของ Steinwandter (1985) ในการสกัดตัวอย่าง ใช้ acetone และ dichloromethane ใช้ sodium sulphate กำจัดน้ำในกระบวนการสกัดตัวอย่าง และนำไปลดปริมาตรและ clean up ด้วยสารละลาย hexane : dichloromethane ตรวจสอบหาชนิดและปริมาณโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง (Gas Chromatograph ชนิด Electron Capture Detector)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ผลการทดสอบ selectivity / specificity โดยตรวจวิเคราะห์ matrix blank ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง ส่วน range/linearity ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.01 - 4.00 mg/kg มีค่า correlation of determination (R^2) > 0.995 ผลการทดสอบ accuracy ที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 0.005, 0.10, 0.5 ,1.0 และ 2.0 mg/kg (n=10) พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 70.5 –108.5 มีค่า % RSD ในช่วง 1.5-19.8 อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ส่วน ค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg ค่า LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg

3.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในมะม่วงและผักกาดก้านขาวของห้องปฏิบัติการ สวพ. 7

ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate 5 ชนิด ได้แก่ diazinon, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, pirimiphos-ethyl และ ethion (ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-FPD) สารกลุ่ม organochlorine 9 ชนิด ได้แก่ gamma-HCH, heptachlor, aldrin, dicofol, 2,4-DDE, α -endosulfan , β -endosulfan , 2,4-DDD และ dieldrin และสารกลุ่ม pyrethroid 2 ชนิด ได้แก่ permethrin และ cypermethrin (ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-ECD)

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate, organochlorine และ pyrethroid ในมะม่วงและผักกาดก้านขาว โดยใช้วิธีวิเคราะห์ QuEChERS พบว่ามี working range/linearity ที่ 0.01- 4 mg/kg โดยมี correlation coefficient; $r \geq 0.995$ การทดสอบ accuracy ในมะม่วงและผักกาดก้านขาว ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 7 ระดับ ในช่วง 0.01-4.00 mg/kg พบว่ามี % recovery อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คืออยู่ในช่วง 70-120 และ HORRAT < 2 มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.10 mg/kg

3.6 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างผักกลุ่ม High water and chlorophyll content ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.4

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์สาร 20 ชนิด ได้แก่ oxamyl, methomyl, monocrotophos, dicrotophos, dimethoate, aldicarb, propoxur, dichlorvos, carbofuran, carbaryl, isoprocarb, methidathion, fenobucarb, promecarb, triazophos, azinphos-ethyl, pirimiphos-methyl, EPN, profenofos และ pirimiphos-ethyl ในตัวอย่าง ถั่วฝักยาว คื่นช่าย และ ผักกาดขาว ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่ามี specification /selectivity ที่ดีโดยไม่มีสัญญาณการตรวจวัดที่ตรงกับสารมาตรฐาน การทดสอบ working range/linearity ของการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องพบว่าอยู่ในช่วง 0.2 – 0.05. 0 μ g/mL โดยมี ค่า r ผ่านเกณฑ์การยอมรับคือ $r \geq 0.995$ ทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับ คือ 0.01, 0.50 และ 2.00 μ g/g (n=10)

พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบมีค่า % recovery, % RSD และ HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005, 0.01 และ 0.05 µg/g และค่า LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.1 µg/g

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ QuEChERS ในการตรวจวิเคราะห์สาร 17 ชนิด ได้แก่ acephate, acetamiprid, acetochlor, alachlor, azoxystrobin, fenthion, indoxacarb, metalaxyl methoxyfenozide, mevinphos, prometon, pyrazosulfuron-ethyl, temephos, thiacloprid, thiamethoxam, thiobencarb และ trifloxystrobin ในตัวอย่างถั่วฝักยาว คื่นช่าย และ ผักกาดขาว ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่ามี specification /selectivity ที่ดี working range/linearity ของการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องพบว่าอยู่ในช่วง 0.005-2.0 µg/mL โดยมีค่า r ผ่านเกณฑ์การยอมรับคือ $r \geq 0.995$ ส่วน accuracy ทดสอบที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับ คือ 0.005-0.05, 0.20 และ 2.00 µg/g พบว่าทุกระดับความเข้มข้นมีค่า % recovery, % RSD และ HORRAT อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.001, 0.005, และ 0.01 µg/g และค่า LOQ เท่ากับ 0.005, 0.01 และ 0.05 µg/g

3.7 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ในพริกโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.3

3.7.1 สภาพะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

ศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphate และสารกลุ่มอื่นๆ จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, EPN, ethion, imidacloprid, malathion, parathion-methyl, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, phosalone, prochloraz, profenophos และ triazophos

เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ คือ Thermo scientific Ultimate 3000 HPLC และ Compact quadrupole MS/MS ยี่ห้อ Bruker ที่มีระบบเชื่อมต่อแบบ Electrospray Ionization (ESI) โดยปรับสภาพะการทำงานของเครื่องให้เหมาะสม ดังนี้

HPLC

Column : Thermo scientific Acclaim™ RSLC 120 C18 2.2 µm 120Å 2.1x100 mm

Flow rate : 0.2 mL/min

Column Temperature : 30 °C

Injection Volume : 5 µl

Mobile Phase : A = 10% MeOH + 5 mM ammonium formate + 0.01% formic acid 99%

: B = MeOH + 5 mM ammonium formate + 0.01% formic acid 1%

Total cycle time : 20 min

MS/MS

Positive mode Dry Gas	:	8.0 L/min
Dry Temp	:	200 °C
Nebulizer	:	2.0 Bar
Capillary	:	2500 V

3.7.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ใช้วิธีสกัดแบบ QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างพริก ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าสารทั้ง 15 ชนิด มี range/linearity ของวิธีวิเคราะห์อยู่ในช่วง 10-500 $\mu\text{g/g}$ ส่วนการทดสอบ accuracy ที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง 10, 100, 200 และ 500 $\mu\text{g/g}$ (n=10) พบว่าสาร ทั้ง 15 ชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับ โดยมี % recovery อยู่ในช่วง 72.9-113.6 มี % RSD อยู่ในช่วง 0.61-14.5 มีค่า LOQ เท่ากับ 10 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งที่ระดับ LOQ มี % recovery อยู่ในช่วง 62-105 และ % RSD อยู่ในช่วง 1.6-14.5 และมี signal to noise ratio อยู่ในช่วง 27-879 สำหรับ ค่า LOD ส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 1 $\mu\text{g/g}$ ยกเว้น azoxystobin, dichlorvos, EPN, imidacloprid และ parathion-methyl มีค่า LOD เท่ากับ 3 $\mu\text{g/g}$ ซึ่งที่ระดับ LOD มี signal to noise ratio อยู่ในช่วง 9-88

3.8 การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต(carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ด้วยวิธีการ QuEChERS ในพืชที่มีปริมาณน้ำและคลอโรฟิลสูงโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ของห้องปฏิบัติการ สวพ.2

3.8.1 สภาพการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม carbamate, organophosphate และกลุ่ม fungicide รวม 28 ชนิด ได้แก่ aldicarb, aldicarb-sulfone, aldicarb-sulfoxide, benfuracarb, carbaryl, carbofuran, 3-OH-carbofuran, 3-keto-carbofuran, cyproconazole, diazinon, dicrotophos, dimethomorph(E), ethiofencarb, ethion, fenobucarb, imazali, indoxacarb, lprovalicarb, isoprocarb, methiocarb, methomyl, mevinphos, pirimicarb, promecarb, propoxur, tebuconazole, thiobencarb และ triazophos ด้วยเทคนิค LC-MS/MS สภาพการทำงานของเครื่องดังนี้

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Injection volume : 2 μl

Column : Zorbax C18 ความยาว 100 mm

Mobile phase A : 0.005M ammonium formate Buffer : 0.01% formic Acid

B : Acetonitrile

Tandem mass spectrometry

Scan type	: Multi Reaction Monitoring (MRM)
Ion mode	: Electrospray Ionization (ESI)
Gas Temp	: 300 °C
Gas Flow	: 7 L/min
Nebulizer	: 45 psi
Capillary	: 4500 V

3.8.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การศึกษาประสิทธิภาพการสกัดตัวอย่างกะหล่ำปลี โดยประเมินจาก % recovery ได้แก่ ชนิดและปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้สกัด เช่น acetonitrile, 1% acetic acid in acetonitrile, acetone+dichloromethane พบว่า acetonitrile มีผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่า การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดของวิธีวิเคราะห์ 3 วิธี ได้แก่ วิธี Original QuEChERS (Anastassiades et al., 2003) วิธี EN QuEChERS (EN15662, 2008) และ วิธี QuEChERS แบบ AOAC 2007.01 QuEChERS (AOAC, 2007) พบว่าผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน เปรียบเทียบปริมาณสารในการ clean up พบว่าการใช้ GCB 7.7 mg และ C18 50 mg มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการอื่น และเปรียบเทียบการสกัดตัวอย่างแบบใช้มือเขย่ากับเครื่อง homogenizer ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างพบว่าให้ผลการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกัน สรุปจึงใช้วิธีทดสอบ EN QuEChERS (EN15662, 2008) ที่มีการใช้ GCB และ C18 ในขั้นตอนการ clean up เป็นวิธีที่นำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

3.8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1) ตัวอย่างกะหล่ำปลี

ทดสอบ range / linearity ของวิธีวิเคราะห์พบว่าอยู่ในช่วง 0.002-0.7 µg/g โดยค่า r อยู่ในช่วง 0.9950-0.9998 ยกเว้น aldicarb-sulfoxide, aldicarb-sulfone, methomyl, dicrotophos, imazalil, thiobencarb, และ benfuracarb มีค่า r < 0.9950 มีค่า LOD ที่ 0.003 mg/kg และค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.005-0.01 mg/kg (ยกเว้น aldicarb-sulfoxide, 3-keto-carbofuran, thiobencarb, indoxacarb, และ benfuracarb ไม่สามารถคำนวณค่า LOD และ LOQ ได้เนื่องจากให้ค่า % recovery ไม่ผ่านเกณฑ์) ส่วน accuracy ศึกษา 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.01 และ 0.1 mg/kg พบว่า สารที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 64-110 มีค่า % RSD < 20 (ยกเว้น aldicarb-sulfoxide, aldicarb, 3-keto-carbofuran, thiobencarb, indoxacarb, และ benfuracarb มีค่า % RSD > 20 และ % recovery ไม่ผ่านเกณฑ์) ศึกษา intermediate precision พบว่ามีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.08-1.64 (ยกเว้น aldicarb-sulfoxide, aldicarb, 3-keto-carbofuran, thiobencarb, indoxacarb, และ benfuracarb ค่า HORRAT ไม่ผ่านเกณฑ์)

2) ตัวอย่างผักกาดหอม

การศึกษา matrix effect พบว่าสารปนเปื้อนในตัวอย่างไม่มีผลกระทบต่อ การทดสอบ (ยกเว้น 3-keto-carbofuran) range / linearity ของวิธีวิเคราะห์พบว่าอยู่ในช่วง 0.002 – 0.1,

0.002 – 0.3, 0.002 – 0.5, 0.002 – 0.7 และ 0.005 – 0.5, 0.005 – 0.7 mg/kg (ยกเว้น benfuracarb ไม่สามารถประเมินความเป็นเส้นตรงได้เนื่องจาก % recovery ไม่ผ่านเกณฑ์) ค่า LOD เท่ากับ 0.003 mg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg (ยกเว้น aldicarb-sulfoxide ได้ค่า LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg และพบว่า 3-keto- carbofuran, thiobencarb และ benfuracarb ไม่สามารถประเมินค่า LOD และ LOQ ได้เนื่องจาก % recovery ไม่ผ่านเกณฑ์) ส่วน accuracy ศึกษา 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.01 และ 0.1 mg/kg (n=10) พบว่าสารที่ผ่านเกณฑ์ยอมรับมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 60-120 (ยกเว้นที่ 3-keto- carbofuran ไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับที่ 0.005 mg/kg thiobencarb ไม่ผ่านเกณฑ์ที่ 0.005, 0.01 mg/kg ส่วน carbofuran และ benfuracarb ไม่ผ่านเกณฑ์ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ)

3.9 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine)ไพรีทรอยด์ (pyrethroid) คาร์บาเมต (carbamate) และสารป้องกันกำจัดโรคพืช (fungicide) ในมะม่วง ลำไย ทุเรียนและมังคุดด้วยวิธีการ QuEChERS และเทคนิคโครมาโทกราฟแมสสเปกโตรเมตรีของห้องปฏิบัติการ สวพ. 6

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ In house method base on QuEChERS ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ของสารกลุ่ม organophosphate 19 ชนิด ในตัวอย่างมะม่วง พบว่า range/ linearity อยู่ในช่วง 0.01-2 mg/kg ผลทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.5, 1 และ 2 mg/kg พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และ ค่า HORRAT <2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 0.01 และ 0.02 mg/kg

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ วิธีทดสอบ In house method base on QuEChERS ด้วยเทคนิค GC-MS/MS ของสารกลุ่ม organophosphate 21 ชนิด และสารกลุ่ม pyrethroid 4 ชนิด ในตัวอย่างมังคุดพบว่า range/ linearity อยู่ในช่วง 0.01-0.2 mg/kg มีค่า $R^2 > 0.995$ ผลทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.5, 1 และ 2 mg/kg พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และค่า HORRAT <2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 และ 0.02 mg/kg และค่า LOQ เท่ากับ 0.01และ0.05 mg/kg

3.10 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และคาร์บาเมต (carbamate) ในมะเขือของห้องปฏิบัติการ สวพ. 5

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphate จำนวน 20 ชนิด ได้แก่ carbophenothion, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, cyanofenphos, cyanophos, diazinon, dichlorvos, EPN, ethion, fenitrothion, malathion, methidathion, parathion, parathion-methyl, phosphamidon, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, prothiofos และ triazophos ด้วยวิธี in house method base on QuEChERS EN Method (EN15662, 2008) วิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS ในตัวอย่างมะเขือ พบว่ามีช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ในช่วง 0.01-1.0 mg/kg ผลทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 mg/kg

พบว่า มี % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และค่า HORRAT <2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม carbamate จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ methomyl, carbosulfan, promecarb, methiocarb, 3-OH-carbofuran, 3-keto-carbofuran, carbaryl, ethiofencarb, pirimicarb, isoprocarb, propoxur และ fenobucarb ด้วยวิธี in house method base on QuEChERS EN Method (EN15662, 2008) วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ในตัวอย่างมะเขือพบว่ามีช่วงการใช้งาน 0.01-0.2 mg/kg ผลทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 mg/kg พบว่า มี % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และ ค่า HORRAT <2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ มีค่า LOQ 0.01 mg/kg และ ค่า LOD 0.003 mg/kg (ยกเว้น 3-keto-carbofuran มีค่า LOD 0.005 mg/kg)

3.11 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง คาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในลำไยและพริก ของห้องปฏิบัติการ สวพ. 1

3.11.1 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS

1) UHPLC : Agilent Technologies 1290 infinity II UHPLC

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

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

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

Flow rate : 0.500 mL/min

Stop time : 20.00 min

Post time : 3.00 min

Injection Volume : 2.00 μ L

2) MS : 6495QQQ

Ionization : Positive/Negative switching

Gas Temp : 120 °C

Gas Flow : 16 L/min

Sheath Gas Heater : 375 °C

Sheath Gas Flow :11 L/min

Nebulizer : 45 psi

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

Precursor Ion :192.1

Product Ion :160.1 and 132.1

Retention Time : 4.29 min

3.11.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารคาร์เบนดาซิมโดยใช้วิธี QuEChERS ในตัวอย่างพริกและลำไย ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบว่าช่วงการวัดสารด้วยเครื่องอยู่ในช่วง 0.005-2 mg/l ผลการทดสอบ accuracy ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.2 mg/kg พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 71-115 ค่า % RSD อยู่ในช่วง 3.6-17.7 และค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.24-0.84 มีค่า LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg และ LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg วิธีวิเคราะห์มี specificity สามารถแยกพืชของคาร์เบนดาซิมออกจากสารอื่นอย่างชัดเจน การทดสอบความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดสอบ โดยการเพิ่มระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยงจาก 3 นาทีเป็น 5 นาที ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg นำผลมาเปรียบเทียบกับวิธีปกติคือ 3 นาที ซึ่งมีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.7042-0.8369 เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 5 นาทีพบว่ามีค่า HORRAT เท่ากับ 0.4977 ดังนั้นการเพิ่มระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยงจึงไม่มีผลต่อการทดสอบ ส่วนการทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์ โดยเปลี่ยนผู้ทดสอบ ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg พบว่าวิธีวิเคราะห์มีความคงทน โดยผู้ทดสอบคนที่ 1 และ 2 มีค่า HORRAT = 0.7042-0.8369 และ 0.3903-0.4282 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

3.12 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธีการ QuEChERS ของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออร์กาโนคลอรีน (organochlorine) และไพเรทรอยด์ (pyrethroid) ในพริกของห้องปฏิบัติการ สวพ.1

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphate 24 ชนิด organochlorine 3 ชนิด และ pyrethroid 5 ชนิด ในพริก ด้วยวิธีการ QuEChERS และเทคนิค GC-MS/MS พบว่า range/linearity ของวิธีทดสอบอยู่ในช่วง 0.01-1.0 mg/kg ทดสอบ accuracy ที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg พบว่ามี % recovery อยู่ในช่วง 70-120 และ ค่า HORRAT < 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม carbamate 16 ชนิดด้วยวิธีการ QuEChERS และเทคนิค LC-MS/MS พบว่ามีช่วงของการวัดที่ 0.005 – 1.0 mg/kg ค่า $r > 0.995$ ยกเว้น carbosulfan, benfuracarb และ aldicarb-sulfone การทดสอบ accuracy ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg พิจารณา % recovery พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.1 และ 0.5 mg/kg มีสารไม่ผ่านเกณฑ์ยอมรับ 16, 5, 12 และ 14 ชนิดตามลำดับ

3.13 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างผลไม้กลุ่ม High water and low or no chlorophyll content ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ของห้องปฏิบัติการ สวพ.4

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ QuEChERS เพื่อวิเคราะห์สารพิษตกค้างจำนวน 55 ชนิด ได้แก่ fenobucarb, fenthion, formetanate, indoxacarb, Isoprocarb, metalaxyl, methidathion, methomyl, methoxyfenozide, mevinphos, monocrotophos, oxamyl,

phenthoate, phosalone, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, promecarb, prometon, propoxur, pyrazosulfuron-ethyl, pyridaben, quizalofop-methyl, quizalofop-p-ethyl, rotenone, tebufenozide, tebufenpyrad, temephos, thiacloprid, thiamethoxam, thiobencarb, thiodicarb, triazophos, trifloxystrobin, triflumizole และ zoxamide ในพืชกลุ่ม high water and low or no chlorophyll content (สตอเบอร์รี่ องุ่น) พบว่าช่วงการวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS อยู่ในช่วง 0.005-2.00 µg/mL การทดสอบ accuracy ที่ระดับความเข้มข้น low, medium และ high (n=10) พบว่ามีสารผ่านเกณฑ์ยอมรับจำนวน 51 ชนิด วิธีทดสอบมี working range อยู่ในช่วง 0.005-1.0 µg/g ค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.005-0.1 µg/g และ LOD อยู่ในช่วง 0.001-0.005 µg/g การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของสารพิษตกค้างจำนวน 19 ชนิด ได้แก่

atrazine, clomazone, coumaphos, cymoxanil, diazinon, epoxiconazole, ethabozam, fenoxaprop-p-ethyl, flonicamid, imidacloprid, monocrotophos, omethoate, pencycuron, propanil, pyraclostrobin, pyriproxyfen, quinoxiphen, triazophos และ tricyclazole ในผลไม้กลุ่ม High water and low or no chlorophyll content (สตอเบอร์รี่ องุ่น) พบว่าช่วงการวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS อยู่ในช่วง 0.005 - 2.00 µg/mL การทดสอบ accuracy ที่ระดับความเข้มข้น low, medium และ high (n=10) พบว่ามีสารผ่านเกณฑ์ยอมรับจำนวน 19 ชนิด วิธีทดสอบมี working range อยู่ในช่วง 0.005-1.0 µg/g มีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.01-0.05 µg/g และ LOD อยู่ในช่วง 0.005-0.01 µg/g

3.14 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) และไพรีทรอยด์ (pyrethroid) ในชมพู่และถั่วฝักยาวของห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ Buffered QuEChERS (EN15662, 2008) ของสารพิษตกค้างกลุ่ม organophosphate 20 ชนิด ได้แก่ chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, dicrotophos, dimethoate, EPN, ethion, fenitrothion, malathion, methamidophos, methidathion, mevinphos, monocrotophos, parathion ethyl, parathion methyl, pirimiphos ethyl, pirimiphos methyl, profenophos, phosalone และ triazophos และกลุ่ม pyrethroid จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ bifenthrin, beta-cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, permethrin และ cyhalothrin ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph มีผลดังนี้

1) ตัวอย่างชมพู่

การทดสอบ range/linearity ของวิธีวิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate อยู่ในช่วง 0.02-1 mg/kg และ pyrethroid อยู่ในช่วง 0.01-1 mg/kg มีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995 การทดสอบ accuracy พบว่ามีค่า % recovery อยู่ในช่วง 71-119 และ precision มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 การทดสอบค่า LOQ พบว่าสารกลุ่ม organophosphate อยู่ในช่วง 0.02-0.1 mg/kg สารกลุ่ม pyrethroid มี อยู่ในช่วง 0.01-0.05 mg/kg ส่วนการทดสอบ matrix effect พบว่ามีสารจำนวน 6 ชนิดใน

กลุ่ม organophosphate ได้แก่ dichlorvos, diazinon, pirimiphos-methyl, pirimiphos-ethyl, parathion-ethyl, ethion และสารในกลุ่มไพรีทรอยด์ 1 ชนิด ได้แก่ deltamethrin ที่ matrix ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ตัวอย่างชมพู

2) ตัวอย่างถั่วฝักยาว

การทดสอบ range/linearity วิเคราะห์สารกลุ่ม organophosphate และ pyrethroid อยู่ในช่วง 0.01-1 mg/kg โดยมีค่า correlation coefficient มากกว่า 0.995 การทดสอบ accuracy มีค่า % recovery อยู่ในช่วง 73-114 ส่วน precision มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 การทดสอบค่า LOQ พบว่าสารกลุ่ม organophosphate อยู่ในช่วง 0.02-0.1 mg/kg กลุ่ม pyrethroid อยู่ในช่วง 0.02-0.05 mg/kg ส่วน matrix effect พบว่ามีสารจำนวน 15 ชนิดในกลุ่ม organophosphate ได้แก่ dichlorvos, mevinphos, diazinon, dicrotophos, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, parathion-methyl, pirimiphos-ethyl, malathion, fenitrothion, methidathion, profenophos, triazophos, EPN และ phosalone และสารในกลุ่ม pyrethroid 2 ชนิด ได้แก่ beta-cyfluthrin และ deltamethrin ที่ matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โครงการ วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช มีการศึกษาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ของสารพิษตกค้างใน parameter ต่างๆ ได้แก่ range/linearity, accuracy (ประเมินจาก % recovery และ % relative standard deviation; RSD), matrix effect, LOQ (limit of quantitation) และ LOD (limit of detection) วิธีการทดสอบดำเนินการตามข้อกำหนดของ SANTE/12682 (2019) และ Eurachem (2014) เกณฑ์ยอมรับ accuracy คือ % recovery 70-120 และ precision มี % RSD \leq 20 (SANTE/12682, 2019) ยอมรับ precision ที่ HORRAT \leq 2 (Horwitz, 2000) สำหรับเกณฑ์ยอมรับ matrix effect มี % ME \leq 10 (NATA, 2018) หรือ % ME \leq 20 (SANTE/12682, 2019) โครงการมี 3 กิจกรรม ผลการดำเนินการ มีดังนี้

1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

การศึกษาวิธีวิเคราะห์ที่เป็นวิธีเฉพาะของสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ paraquat, glyphosate, aminomethylphosphonic acid, glufosinate, bispyribac- sodium, imazapic, pendimethalin, hexazinone, 2,4- D และ MCPA ตัวอย่างที่ศึกษาได้แก่ ในดิน น้ำ พืชตระกูลส้มและธัญพืช โดยใช้เทคนิค ได้แก่ HPLC, GC-MS/MS และ LC-MS/MS พบว่าวิธีวิเคราะห์มีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างและอนุพันธ์ ได้แก่ flonicamid, amitraz และ spiromesifen ในพืชตระกูลแตง พืชตระกูลมะเขือและพริก การศึกษาสาร chiral pesticide 6 ชนิด ในมะม่วง และสารพิษตกค้างอื่นๆ ที่มีการศึกษาแบบ multiresidue ไม่น้อยกว่า 250 ชนิด โดยศึกษา

ในตัวอย่างหลายชนิด ได้แก่ เนื้อปลา ดิน และผักผลไม้ 19 ชนิด ส่วนใหญ่ใช้ วิธี QuEChERS และมีบางส่วนใช้ Steinwandter (1985) โดยใช้เทคนิค GC, HPLC, LC-MS/MS, GC-MS/MS พบว่าวิธีวิเคราะห์มีประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

การศึกษา matrix effect ในการตรวจวิเคราะห์สาร 77 ชนิดด้วยวิธี ethyl acetate (EURL-FV, 2010) ในมะเขือเทศ ส้ม และคะน้าโดยใช้เทคนิค GC-MS/MS และการศึกษา matrix effect ของการตรวจวิเคราะห์สาร 129 ชนิด ด้วยวิธี QuEChERS โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ใน มะม่วง ส้ม คะน้า กะเพราและมะเขือเทศ ผลการศึกษาพบว่าสารส่วนใหญ่ matrix มีผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์

การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่ม carbamate อย่างรวดเร็วในพริกโดยใช้วิธีวัดสี พบว่ามีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ผ่านเกณฑ์ยอมรับ

2. การจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ

ดำเนินการในช่วง พ.ศ. 2559-2561 โดยการจัดทำตัวอย่างอ้างอิงภายในและการทดสอบ ความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการดำเนินการตามข้อกำหนดของ ISO/IEC 17043 (2010) และ ISO 13528 (2005) มีสารที่อยู่ในขอบข่ายทดสอบ ได้แก่ organophosphate, organochlorine pyrethroid, carbamate, fungicide และอื่นๆ รวมทั้งสิ้น 61 ชนิด ตัวอย่างที่ทดสอบมีดังนี้ ผักผลไม้ ได้แก่ ผักกาดหอม มะเขือเทศ แอปเปิลและแตงโม ธัญพืช ได้แก่ ข้าวสาร ข้าวโพดและข้าวสาร(ไรซ์เบอร์รี่) โดยเตรียม fortified sample ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.05-0.5 mg/kg มีห้องปฏิบัติการเข้าร่วมการทดสอบ จำนวน 12-24 ห้องปฏิบัติการ พบว่าผลการทดสอบส่วนใหญ่คือ 74- 87 % อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ โดยมีค่า $|z\text{-Score}| \leq 2$ วิธีการและขั้นตอนการดำเนินการเพื่อทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการ และการจัดการตัวอย่าง เป็นไปตามข้อกำหนด สามารถใช้เป็นข้อมูลในการขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17043 ได้

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ

การศึกษาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างสารกลุ่มต่างๆ ได้แก่ organophosphate, organochlorine, pyrethroid, carbamate, fungicide และอื่นๆ ไม่น้อยกว่า 150 ชนิด ในตัวอย่าง ผัก ได้แก่ ผักกาดก้านขาว กระหล่ำปลี ผักกาดหอม มะเขือ ถั่วฝักยาวและพริก ตัวอย่างผลไม้ ได้แก่ ลำไย มะม่วง สตอเบอร์รี่ องุ่น ชมพู่และมังคุด ส่วนใหญ่ใช้วิธีการ QuEChERS และมีบางส่วนใช้ Steinwandter (1985) โดยใช้เทคนิค GC, HPLC, LC-MS/MS, GC-MS/MS พบว่าวิธีวิเคราะห์มี ประสิทธิภาพอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการนำผลการศึกษาไปจัดพิมพ์ในรูปแบบ เล่ม หรือ เผยแพร่ใน website เพื่อเผยแพร่ให้กับ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ได้นำไปใช้และใช้เป็นแนวทางในการตรวจวิเคราะห์
2. ควรมีการเพิ่มชนิดของสารกลุ่มสารกำจัดวัชพืชในการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างดิน และน้ำ เนื่องจากมีความจำเป็นต้องใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างดินและน้ำในโครงการการปลูกพืชระบบ GAP

และเกษตรกรอินทรีย์ เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีใช้กันอย่างแพร่หลาย และมักมีปัญหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งมีปัญหาปนเปื้อนในแปลงปลูกจึงมีตัวอย่างที่เป็นงานบริการที่ต้องตรวจวิเคราะห์อยู่เสมอ

3. ควรจัดทำเป็นรายงานผลการทดสอบที่สอดคล้องกับขอการรับรองมาตรฐาน หรือทำเป็นคู่มือวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทดสอบ

4. ควรมีการนำผลงานวิจัยไปจัดทำเอกสารเพื่อขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17043 การเป็นผู้จัดโปรแกรมทดสอบความชำนาญด้านสารพิษตกค้าง

เอกสารอ้างอิง

- Anastassiades, M., S. J. Lehotay, D. Stajnbaher and 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.
- Anastassiades, M., B. Tisdelen and E. Scherbaum. 2006. Investigations on the use of analyte protectants for multiresidue GC analysis. The European Pesticide Residue Workshop (EPRW). 21-25 May 2006, Corfu Island, Greece. Available at : http://cvuas.xn--untersuchungsmter-bw-nzb.de/pdf/poster_scherbaum_eprw2006_ap.pdf : January 25, 2021.
- Anastassiades. M., D. I. Kolberg, D. Mack, I. Sigalova, D. Roux and D. Fugel. 2008. Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination. QuPPE-Method, Version 6, EU Reference Laboratory for Single Pesticide Residue Methods (EURL-SRM).
- Anastassiades, M., D. I. Kolberg, E. Eichhorn, A. K. Wachtler, A. Benkenstein, S. Zechmann, D. Mack, C. Wildgrube, A. Barth, I. Sigalov, S. Görlich, D. Dörk and G. Cerchia. 2020. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method version 11). Available at : [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_PO_V11\(1\).pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE_PO_V11(1).pdf) : January 25, 2021.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th edition, Arlington VA USA, Vol. 1, Method No. 970.52.

AOAC. 2007. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. AOAC Official Method 2007.01.

AOAC. 2016. Appendix F: Guidelines for standard Method Performance Requirements. AOAC Official Methods of Analysis, AOAC International.

Borjesson, E. and L. Torstensson. 2000. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil. *Journal of Chromatography A*. 886 : 207–216.

Chamkasem, N., C. Morris and T. Harmon. 2015. Direct Determination of Glyphosate, Glufosinate and AMPA in milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Regulatory Science* 02 (2015) 20–26. Available at : <https://journals.tdl.org/regsci/index.php/regsci/article/view/15> : January 25, 2021.

Chu, N. and S. Fan. 2009. Sequential injection kinetic spectrophotometric determination of quaternary mixtures of carbamate pesticides in water and fruit samples using artificial neural networks for multivariate calibration. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 74 (5) : 1173-1181.

Codex Alimentarius Commission. 2021. Codex Pesticides Residues in Food Online Database. Available at : <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/> : January 25, 2021.

EN 15662. 2008. Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS-method.

Eurachem. 2014. The fitness for purpose of analytical methods-A laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem Guide : 2nd ed. Available at : https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf : January 25, 2021.

- EURL-FV. 2010. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection 0.1. European Union Reference Laboratory for Pesticide Residue in fruits and Vegetables. Available at : https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/fv/ethyl_acetate_extraction.pdf : January 25, 2021.
- EURL-SRM. 2015. Analysis of Acidic Pesticides using QuEChERS (EN15662) and acidified QuEChERS method. Available at : https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_Observations_AcidicPesticides.pdf : January 25, 2021.
- 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. 305 p.
- ISO/IEC 17043. 2010. Conformity assessment- General requirements for proficiency testing.
- ISO 13528. 2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.
- IUPAC. 2006. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. Pure Appl. Chem. 78 (1) : 145-196.
- Kennedy, S. H. 1986. The Determination of Residues of Paraquat in Soil - A Spectrophotometric Method. ICI Plant Protection Division Residue Analytical Method No. 2B, Jealott's Hill Research Station, UK.
- Lehotay, S. J., A. de Kok, M. Hiemstra and P. van Bodegraven. 2005. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of 229 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. J. AOAC Int. 88 (2) : 595.
- Mastovska, K., S. J. Lehotay and M. Anastassiades. 2005. Combination of Analyte Protectants to Overcome Matrix Effects in Routine GC Analysis of Pesticide Residues in Food Matrixes. Analytical Chemistry 77 (24) : 8129-8137.
- NATA. 2018. Validation and verification of quantitative and qualitative test methods. National Association of Testing Authorities, Australia.

- Pihlstrom, T., G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard and B.G. Osterdahl. 2007. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 389 (6) : 1773-1789.
- SANTE/12682. 2019. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Available at : https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf : January 25, 2021.
- Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min on-line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residue and Industrial Chemicals. *Fresenius Z. Anal. Chem.* No. 1155.
- Sun, F., F.Y. Lin, S. S. Wong and G. C. Li. 2000. Determination of organochlorine and Nitrogen-Containing Pesticides in Fish with Different Fat Content. *Journal of Food and Drug Analysis* 8 (2) : 103-111.
- Thompson, M., S. L. R. Ellison and R. Wood. 2006. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories . *Pure Appl. Chem.* 78 (1) : 145-196.
- Vera, J., L. Correia-Sá, P. Paíga, I. Bragança, V. C. Fernandes, V.F. Domingues, C. Delerue-Matos. 2013. QuEChERS and soil analysis. An overview. Available at : [file:///C:/Users/Panida/Downloads/10.2478_sampre-2013-0006%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Panida/Downloads/10.2478_sampre-2013-0006%20(1).pdf) : January 25, 2021.
- Walorczyk, S. and D. Drozdzyński . 2012. Improvement and extension to new analytes of multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited. *J. Chromatography A.* 1251: 219-231.
- Yuanbo, L., D. Fengshou, L. Xingang, X. Jun, C. Xiu, H. Yongtao and L. Xuyang. 2013. Development of Multi-residue Enantiomeric Analysis Method for 9 Pesticides in Soil and Water by Chiral Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry. *Journal of Hazardous Materials* 250–251 : 9-18.

กรมวิชาการเกษตร