การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัส 5 ชนิดตกค้างในลำไยสดส่งออกคล้อยตาม ISO/IEC 17025: 2005

Analytical method validation of the determination of five organophosphorus pesticide residues in exporting fresh longans in compliance with ISO/IEC 17025: 2005

เนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกูล[1]
Naowarat Tangmunkongvorakul[1]

Abstract

Analytical method validation for organophosphorus pesticide residues analysis in exporting fresh longans using an extraction of modified method based on the Steinwandter (1985) by GC-FPD (Gas Chromatography with Flame Photometric Detection) was investigated. Five organophosphorus pesticide residues, i.e. diazinon, malathion, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos and ethion in fortified longan samples were analyzed by GC-FPD and separated on a (5%-phenyl)-methylpolysiloxane capillary column. It was found that the range and linearity of the method were 0.005 - 5 mg/kg (R2 > 0.995). The specificity indicated by relative standard deviation percentage (%RSD) of the retention time was from 0.053 to 1.178 % when the resolution values had more than 1.0. The accuracy indicated by the percentage of recovery test at low, medium and high concentration levels of pesticide residues at 0.01, 0.20 and 2.00 mg/kg were 91-105, 90-98 and 94-97%, respectively. The precision of the method were investigated at 0.01-2.0 mg/kg (n=10). The result indicated that %RSD was 3.32-15.67% and HORRAT was less than 2.0. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.006 and 0.01 mg/kg, respectively. In conclusion, the performance characteristic of this method was suitable to be used in the determination of five organophosphorus pesticide residues in exporting fresh longans in compliance with ISO/IEC 17025: 2005. The accredited laboratory of Office of Agricultural Research and Development Region 1 has approved this method for pesticide residue analyses in fresh longan for export, there were 139 longan samples in total analyzed during November 2009 to February 2011.

Keywords: GC-FPD, organophosphorus residue analysis, method validation

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัสในเนื้อลำไยสดส่งออก โดยใช้วิธีสกัดดัดแปลงจากวิธีของ Steinwandter (1985) เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ ร่วมกับการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC-FPD) เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 5 ชนิดตกค้างในตัวอย่างลำไยสดด้วยเทคนิค fortified sample ได้แก่ diazinon, pirimiphos – methyl, malathion, chlorpyrifos และ ethion โดยใช้ capillary column ชนิด (5%-phenyl)-methylpolysiloxane พบว่า ช่วงของการวัด (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) อยู่ระหว่าง 0.005 – 5 มก./กก. (R^2 > 0.995) เมื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ได้ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของเวลาในการหน่วงอยู่ในช่วง 0.053 – 1.178% และค่าการแยกพีคสารแต่ละชนิด (resolution) > 1.0 ค่าความแม่น (accuracy) ของวิธีทดสอบโดยการหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery test) ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ, กลาง และสูงของสารตกค้าง ได้แก่ 0.01, 0.20 และ 2.00 มก./กก. พบค่าอยู่ในช่วง 91-105, 90-98 และ 94-97% ตามลำดับ การหาค่าความเที่ยง (precision) ของวิธีทดสอบในช่วง 0.01 ถึง 2.0 มก./กก. (n=10) พบว่า %RSD มีค่าระหว่าง 3.32-15.67% และค่า HORRAT < 2 ส่วนขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่า 0.006 และ 0.01 มก./กก. ตามลำดับ โดยสรุปแล้ววิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการทดสอบหาสารปราบศัตรูพืชออร์กาโนฟอสฟอรัส 5 ชนิดตกค้างในลำไยสดส่งออก ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 โดยห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ที่ผ่านการรับรองได้นำวิธีการนี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างลำไยสดส่งออกที่ผ่านระบบนี้ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2552 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 รวมจำนวน 139 ตัวอย่าง

[1] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50000
[1] Office of Agricultural Research and Development Region 1, Mueang, Chiang Mai, 50290

คำสำคัญ : แก๊สโครมาโทกราฟ, การวิเคราะห์ปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัส, การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

คำนำ

ลำไยเป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสินค้าเพื่อการส่งออก โดยส่วนใหญ่ส่งออกไปยังประเทศจีนและอินโดนีเซีย พื้นที่ปลูกลำไยส่วนมากอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ลำปาง แพร่ และน่าน ซึ่งอยู่ในเขตความรับผิดชอบของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ปัญหาหนึ่งที่มักพบได้ในลำไย คือ การตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยเฉพาะสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสที่พบการตกค้างในกลุ่มนี้ ได้แก่ คลอไพริฟอส และอีไธออน เป็นต้น เนื่องจากสารพิษในกลุ่มนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก ละลายได้ดีในน้ำ สลายตัวได้ดีในธรรมชาติ มีพิษค่อนข้างสูง สลายตัวเร็ว มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนโซม์โคลีนเอสเตอเรสแบบถาวร นอกจากนี้บางชนิดยังดูดซึมเข้าไปในพืชและออกฤทธิ์ได้นานเป็นเหตุให้ประเทศผู้นำเข้าออกกฎระเบียบ และมาตรการสุขอนามัยที่เข้มงวดต่อสารเคมีตกค้าง ตามมา

การวิเคราะห์สารปราบศัตรูพืชตกค้างจึงมีความสำคัญอย่างมากสำหรับสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออก เนื่องจากเป็นการควบคุมคุณภาพให้เป็นไปตามข้อกำหนดของประเทศคู่ค้า ผลการตรวจสอบจากห้องปฏิบัติการเป็นสิ่งที่ยืนยันถึงความปลอดภัยของอาหาร ดังนั้นในการตรวจสอบ และรายงานผลการวิเคราะห์เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ออกมามีความถูกต้องแม่นยำ และน่าเชื่อถือ อีกทั้งเป็นตามข้อกำหนดในมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 (นิรนาม, 2548) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (ทิพวรรณ นิ่งน้อย, 2549) ที่ใช้ โดยมีวิธีการพิสูจน์ความถูกต้องแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการรายงานผลการวิเคราะห์นั้นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการวิเคราะห์ reagent blank และ fortified sample เพื่อทดสอบพารามิเตอร์ 7 ตัว คือ ช่วงของการวัด (range), ความเป็นเส้นตรง (linearity), accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) และ specificity ใช้วิธีทดสอบเพื่อหาปริมาณออร์กาโนฟอสฟอรัส 5 ชนิดในผลลำไยสด (Steinwandter H,1985.) โดยมีกรรมวิธีในการวิเคราะห์ดังนี้ คือ นำตัวอย่างลำไยสดประมาณ 2 กก. แยกกิ่งและใบออก จากนั้นผ่ากลางผลและแกะเมล็ดออก เอาเนื้อครึ่งซีกของผลทุกผลมาปั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยเครื่องปั่นย่อย (food processer) แล้วชั่งตัวอย่างที่ปั่นย่อยแล้ว 25 ± 0.1 กรัม ใส่ขวด (laboratory bottle) ขนาด 250 มล. เติมอะซิโตน 50 มล. ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer ที่ความเร็วประมาณ 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เติมโซเดียมคลอไรด์ ประมาณ 8 กรัม และ ไดคลอโรมีเธน 40 มล. แล้วปั่นอีกครั้งนาน 1 นาที นำส่วนใสใส่ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ที่มีโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัสประมาณ 30 กรัม ปิดฝาแล้วทิ้งไว้นานประมาณ 10 นาที กรองผ่านกรวยกรองที่มีโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัสบรรจุอยู่ลงสู่กระบอกตวง นำสารละลายที่ผ่านการกรอง 50 มล. ถ่ายลงขวดก้นแบน (flat-bottom flask) กลั้วล้างกระบอกตวงด้วยอะซิโตนประมาณ 10 มล. จำนวน 2 ครั้ง นำไปลดปริมาตรด้วยเครื่อง rotary evaporator (ระวังอย่าให้แห้ง) ปรับปริมาตรด้วยอะซิโตนให้ได้ 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายใส่ขวดฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (autosampler vial) เพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (GC-FPD) โดยใช้ capillary column ชนิด (5%-phenyl)-methylpolysiloxane

ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ที่ผ่านการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบ (ISO/IEC 17025:2005) ได้นำวิธีการนี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างลำไยสดส่งออกตั้งแต่ พฤศจิกายน 2552 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554 รวมจำนวน 139 ตัวอย่าง

ผล

ในการทดสอบ reagent blank และ fortified sample ที่มีความเข้มข้น 10 ระดับตั้งแต่ 0.005 - 5.0 มก./กก. ของสารปราบศัตรูพืชตกค้าง 5 ชนิด ได้แก่ diazinon, pirimiphos methyl, malathion, chlorpyrifos และ ethion ทำความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ เมื่อตรวจสอบช่วงของการวัดโดยนำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่าของพื้นที่ใต้พีกมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นและคำนวณค่า correlation coefficient (R^2) ของสารทั้ง 5 ชนิด พบว่า R^2 เท่ากับ 0.9987, 0.9987, 0.9986, 0.9987 และ 0.9989 ตามลำดับ

เมื่อทดสอบ fortified sample ของสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส 5 ชนิด ตามความเข้มข้น 10 ระดับ ตั้งแต่ 0.005 - 5 มก./กก. ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เมื่อตรวจสอบความเป็นเส้นตรงโดยนำค่าความเข้มข้นของ fortified sample และค่าของ

พื้นที่ใต้พีกมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นและคำนวณค่า correlation coefficient (R^2) ของ diazinon, pirimiphos methyl, malathion, chlorpyrifos และ ethion พบว่า R^2 เท่ากับ 0.9997, 0.9997, 0.9997, 0.9998 และ 0.9998 ตามลำดับ

การทำ fortified sample ที่ 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง และสูงในช่วง 0.01-2.00 มก./กก. โดยทำความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า %recovery ของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในลำไยที่ระดับต่ำอยู่ในช่วง 91-105 % ระดับกลางอยู่ในช่วง 90-98 % และ ระดับสูงอยู่ในช่วง 94-97 % ส่วนค่า %การเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation; %RSD) อยู่ระหว่าง 3.32-15.67 และค่า HORRAT (Horwitz's ratio) < 2

Table 1 Average %recovery of diazinon, pirimiphos methyl, malathion, chlorpyrifos and ethion in fresh longan flesh at 0.01, 0.20 and 2.00 mg/kg (n=10).

Average %recovery	diazinon	pirimiphos methyl	malathion	chlorpyrifos	ethion
0.01	98.02	91.82	93.13	104.3	94.33
0.20	90.77	91.93	97.76	93.89	94.02
2.00	96.24	95.86	96.83	94.17	95.04

Table 2 %RSD and HORRAT values of diazinon, pirimiphos methyl, malathion, chlorpyrifos and ethion in fresh longan flesh at 0.01, 0.20 and 2.00 mg/kg (n=10).

Pesticide name	0.01mg/kg		0,20 mg/kg		2.00mg/kg	
	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT
diazinon	9.23	0.44	3.44	0.26	7.47	0.79
pirimiphos-methyl	7.03	0.34	3.32	0.25	7.82	0.83
malathion	15.67	0.74	3.84	0.29	9.04	0.95
chlorpyrifos	6.04	0.30	4.31	0.33	8.31	0.89
ethion	8.30	0.39	4.05	0.30	8.11	0.84

การทำ fortified samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.006 มก./กก. (10 ซ้ำ) ตามวิธีทดสอบการหาปริมาณสารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในเนื้อลำไยสด พบว่าอัตราส่วน signal/noise ของ diazinon, pirimiphos methyl, malathion, chlorpyrifos และ ethion เท่ากับ 5.9, 4.4, 3.1, 4.6 และ 3.1 ตามลำดับ

จากการตรวจสอบสารละลายมาตรฐาน diazinon, pirimiphos-methyl, malathion, chlorpyrifos และethion ซึ่งมีความเข้มข้นช่วง 0.005-5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 7 ซ้ำ พบว่า retention time (t_R) เฉลี่ยเท่ากับ 7.096 , 8.949 , 9.231 , 9.575 และ 16.183 นาที ตามลำดับ ส่วน %RSD ของ retention time (t_R) อยู่ในช่วง 0.010, 0.025, 0.024, 0.148 และ 0.020 พบค่า Resolution น้อยที่สุด ได้แก่ Resolution ของการแยกสาร pirimiphos-methyl และ malathion ที่ความเข้มข้น 0.005 มก./กก. มีค่าเท่ากับ 2.43

Table 3 Average resolution of diazinon, pirimiphos methyl, malathion, chlorpyrifos and ethion at 0.005 – 5 µg/ml (n=7).

Pesticide name	Concentration (µg/ml)							
	[0.005]	[0.01]	[0.02]	[0.1]	[0.5]	[1]	[2]	[5]
diazinon	-	-	-	-	-	-	-	-
pirimiphos methyl	27.37	31.19	31.33	31.12	30.95	31.06	30.94	31.47
malathion	2.43	3.91	4.08	4.04	4.05	4.05	4.03	4.09
chlorpyrifos	2.97	4.44	4.73	4.64	4.67	4.69	4.62	4.76
ethion	44.80	63.48	63.85	62.16	62.17	62.93	62.99	63.73

วิจารณ์ผล

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบในความเข้มข้นช่วง 0.005 - 5 มก./กก. ค่า correlation coefficient (R^2) $\geq$ 0.995 แสดงว่าในช่วงของการวัด (range) นี้มีการตอบสนองเป็นเส้นตรง นอกจากนี้พีคสารแต่ละชนิดมีการแยกไม่น้อยกว่า 1.0 ดังนั้นวิธีนี้จึงมีความจำเพาะ เมื่อ fortified sample ที่ 3 ระดับ คือ ในช่วง 0.01-2.00 มก./กก. แล้วพิจารณา % recovery ที่ความเข้มข้น 0.01 และ 2.00 มก./กก. มีค่าไม่เกินช่วง 60-115 % และ 80-110 % ตามลำดับ ส่วน %RSD อยู่ในช่วง 3.32-15.67 ซึ่งน้อยกว่า 21 และพิจารณา HORRAT (Horwitz ' s ratio) $\leq$ 2 พบว่ามีค่าน้อยกว่า 2 ดังนั้นจึงเป็นไปตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-verified method และสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) เมื่อหาค่า LOQ และ LOD โดยการทำ fortified samples ที่ความเข้มข้นต่ำ แล้วพิจารณา LOQ จาก accuracy และ precision ที่ความเข้มข้น 0.01 มก./กก มีผลการทดสอบ accuracy และ precision ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ดังนั้น LOQ จึงเท่ากับ 0.01 มก./กก. ส่วนค่า LOD พิจารณาจากอัตราส่วน signal/noise $>$ 3 ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.006 มก./กก. สารทุกตัวมีอัตราส่วน signal/noise เป็นไปตามเกณฑ์

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 ในขอบข่ายการทดสอบหาสารปราบศัตรูพืชตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในลำไยสดส่งออก 5 ชนิดและได้วิเคราะห์ตัวอย่างลำไยสดส่งออกด้วยวิธีนี้ทั้งสิ้น 139 ตัวอย่าง (ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2552 ถึงกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2554)

สรุป

วิธีทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการทดสอบหาสารปราบศัตรูพืชตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสในลำไยสด 5 ชนิด ได้แก่ diazinon, pirimiphos-methyl, malathion, chlorpyrifos และ ethion โดยมีช่วงของการวัด (range) ที่มีความจำเพาะเจาะจง และความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.005 - 5 มก./กก. สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.01-2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยค่า LOD และ LOQ ของสารทั้ง 5 ชนิด เท่ากัน คือ 0.006 และ 0.01 มก./กก. ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2549. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการ. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กรุงเทพฯ. 33-76 น.

นิรนาม. 2548. คู่มือประกอบการประเมินตาม มอก.17025-2548 ฉบับแปลความเป็นภาษาไทย. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (ฉบับภาษาไทย). กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ. 15-18 น.

Steinwandter, H. 1985. Universal 5 min on-line method for extracting and isolating pesticide residues and industrial chemicals. Fresenius Z Anal. Chem. 322: 752-754.