

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้ง โดย GC-MS/MS

ธรรณิศจ์ ไชยมงคล และวีรภูมิ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งเป็นอาหารที่ถูกบริโภคเป็นปริมาณมากทั่วโลก การเพาะปลูกพืชเหล่านี้อาจมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อป้องกัน รักษา และเพิ่มปริมาณผลผลิต และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ผลผลิตทางการเกษตรจึงต้องได้รับการตรวจสอบว่าปราศจากสารพิษอันตรายตกค้างด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ ได้ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างระหว่างวิธี QuEChERS และ FaPEX® แล้วเลือกวิธี QuEChERS เพื่อพัฒนา ปรับปรุง และทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่น่าสนใจ 122 ชนิด พร้อมกันในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งได้ โดยตัวอย่างจะถูกสกัดด้วยอะซิโตนไตริสและผ่านการ salting out ด้วยสารผสมของแมกนีเซียม ซัลเฟต และโซเดียม อะซิเตท สารสกัดถูกทำให้เข้มข้นแล้วเปลี่ยนตัวทำละลายที่เหมาะสม สารทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS โดยเทคนิค MRM เพื่อลดสารรบกวน ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณเป็น 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตัวอย่างข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.05, 0.20 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ระดับละ 8 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยการคืนกลับอยู่ระหว่าง 74.3-119.8% และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์น้อยกว่า 20% วิธีมีช่วงความเป็นเส้นตรงเป็น 0.05-2.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($r > 0.995$) วิเคราะห์ภายใต้กระบวนการควบคุมคุณภาพภายใน และมีผลการควบคุมคุณภาพภายนอกจากการเข้าร่วม PT ให้ค่าเป็นที่น่าพอใจ บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งเพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคและตอบสนองกฎหมายที่เกี่ยวข้องได้ตรงตามวัตถุประสงค์

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง, ธัญพืช, ถั่วเมล็ดแห้ง, GC-MS/MS, QuEChERS

Corresponding E-mail: thoranit.c@dmsc.mail.go.th

Received: 12 November 2020

Revised: 2 June 2021

Accepted: 10 July 2021

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในธัญพืชที่กว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกบริโภคเป็นอาหารหลัก^(1, 2) ถือเป็นอาหารประจำชาติไทยและเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ พลังงาน วิตามิน และแร่ธาตุ แม้อัตราการบริโภคข้าวจะแตกต่างกันไปตามวิถีชีวิตและสิ่งแวดล้อมโดยคนเมืองจะบริโภคข้าวน้อยกว่าสังคมชนบท⁽³⁾ แต่มีการคาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2567 อัตราการบริโภคข้าวเฉลี่ยของคนไทยจะสูงถึง 147.2 กิโลกรัมต่อคนต่อปี⁽⁴⁾ นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชที่มีมูลค่าทางการค้าสูงที่สุดในโลก⁽⁵⁾ โดยไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ที่สุด ในปี พ.ศ. 2562 ไทยส่งออกข้าวปริมาณเกือบ 4.6 ล้านตัน มีมูลค่ากว่า 1.3 แสนล้านบาท⁽⁶⁾ จากอัตราการบริโภคข้าวที่สูงของทั้งคนไทยและประชากรโลก หากมีสารพิษตกค้างจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพ

การเพาะปลูกธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งในปัจจุบันเป็นกิจกรรมเชิงอุตสาหกรรมและการพาณิชย์ เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณผลผลิตจึงมีการนำสารเคมีทางการเกษตร เช่น ปุ๋ยเคมี และสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมาใช้⁽⁷⁾ สารเคมีเหล่านี้สามารถกำจัดวัชพืชและแมลงศัตรูพืชได้ดี แต่สามารถตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน การได้รับสัมผัสสารพิษโดยการบริโภคโดยตรงถือว่ามีความเสี่ยงสูง จึงมีการกำหนดค่ามาตรฐานปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit; MRL) พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 และได้รับการปรับปรุงให้เป็นปัจจุบันมาอย่างต่อเนื่อง โดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽⁸⁾ กำหนดค่า MRLs ของสารหลายชนิดไว้ในข้าวสาร ข้าวเปลือก และถั่วเมล็ดแห้ง นอกจากนี้ประเทศคู่ค้าที่สำคัญของไทย เช่น สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป และกลุ่มประเทศอาเซียน ได้กำหนดค่ามาตรฐานต่างๆ ไว้เพื่อเป็นการคุ้มครองสุขภาพผู้บริโภคด้วยเหตุผลนี้ กระทรวงสาธารณสุขจึงต้องมีวิธีตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและครอบคลุมจำนวนสารที่มีค่ากำหนดตามกฎหมายเพื่อการเฝ้าระวังความปลอดภัยจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารที่จำหน่ายในประเทศและยังเป็นการส่งเสริมคุณภาพสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกให้มีการพัฒนาทางเศรษฐกิจไปพร้อมกัน

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารเป็นสิ่งยุ่งยาก มีขั้นตอนซับซ้อน ใช้เวลานาน เดิมมีข้อจำกัดด้านขอบข่ายชนิดสารที่วิเคราะห์ได้จาก detector ชนิด ECD, FPD และ NPD ผู้วิเคราะห์ต้องมีความชำนาญและมีประสบการณ์สูง ปัจจุบันมีการพัฒนาการเตรียมตัวอย่างให้ง่าย สะดวก รวดเร็วขึ้น เช่น วิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)⁽⁹⁾ เพื่อใช้เป็นวิธีมาตรฐานในระดับนานาชาติ อาทิ AOAC 2007.01⁽¹⁰⁾ และ EN 15662⁽¹¹⁾ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารประเภทผักผลไม้ที่มีความชื้นสูงและไขมันต่ำ⁽¹²⁾ มีการดัดแปลงปรับปรุงวิธีตั้งต้นนี้ให้ใช้ได้กับอาหารที่มีไขมันปานกลางและสูง เช่น น้ำมันจากพืชและสัตว์ ไข่⁽¹³⁾ และอาหารที่มีความชื้นต่ำมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น ข้าวบาร์เลย์⁽¹⁴⁾ เป็นต้น ซึ่งเป็นการปรับวิธีด้วยการคืนสภาพตัวอย่างให้มีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมก่อนการสกัดแล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะสูง เช่น gas และ liquid chromatograph-mass spectrometer/mass spectrometer (GC and LC-MS/MS) เป็นต้น⁽¹⁵⁾ ยังคงประสบปัญหาสารรบกวนในเมทริกซ์อีกหลายชนิด เช่น ธัญพืช (cereal grains) และถั่วเมล็ดแห้ง (pulse) ที่จำเป็นต้องกำจัดสารรบกวนได้อย่างมีประสิทธิภาพก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งต้องคำนึงถึงในการตรวจวัดที่ระดับความเข้มข้นต่ำมากในระดับ ppm และ ppb⁽¹⁶⁾

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือเพื่อให้ได้วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหารกลุ่มธัญพืชและกลุ่มถั่วเมล็ดแห้งสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบความปลอดภัยของอาหาร สำหรับการคุ้มครองผู้บริโภคซึ่งเป็นภารกิจหลักของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงดำเนินการศึกษา พัฒนา ปรับปรุงวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างจำนวน 122 ชนิด ที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่หลากหลายพร้อมกันด้วยเครื่อง GC-MS/MS ที่ห้องปฏิบัติการใช้อยู่ในตัวอย่างผักผลไม้สดและได้รับการรับรองตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025: 2017 เพื่อขยายขอบข่ายชนิดตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งเป็นตัวแทนของกลุ่มธัญพืชและกลุ่มถั่วเมล็ดแห้ง ตามลำดับ ในขั้นตอนการคัดเลือกวิธีเตรียมตัวอย่างทำการเปรียบเทียบ

คุณลักษณะและประสิทธิภาพวิธี QuEChERS ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานกับวิธี FaPEX[®] (Fast Pesticides Extraction)⁽¹⁷⁾ ซึ่งเป็นวิธีเตรียมตัวอย่างแบบใหม่ที่น่าจะมีศักยภาพในการลดรอบเวลาการวิเคราะห์ได้ จากนั้นจึงคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมนำไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ วิธีที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ความปลอดภัยของธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้ง ตรวจสอบติดตามการตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรเพื่อให้ทราบสถานการณ์และความรุนแรงของปัญหา นำมาประเมินความปลอดภัยของผู้บริโภคและสามารถนำไปใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สำหรับสนับสนุนการส่งออกของประเทศ นอกจากนี้ยังได้ถ่ายทอดองค์ความรู้และวิธีไปยังห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จัดทำโครงการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Inter laboratory comparison, ILC) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 เพื่อการพัฒนาศักยภาพการตรวจวิเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ในภูมิภาคอีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: acetonitrile, HPLC (Merck สหรัฐอเมริกา) acetone, AR (RCI Labscan สหรัฐอเมริกา) n-hexane, PG (Burdick & Jackson สหรัฐอเมริกา) ethyl acetate, HPLC (Burdick & Jackson เกาหลีใต้) QuEChERS Extraction Packets, EN Method Part No: 5982-7650 เป็นส่วนผสมของ MgSO_4 4 กรัม NaCl 1 กรัม sodium citrate dehydrate 1 กรัม และ disodium hydrogen citrate sesquihydrate 0.5 กรัม (Agilent Technologies สหรัฐอเมริกา) น้ำ reverse osmosis (RO), D-sorbitol, AR $\geq 98\%$ glacial acetic acid (Merck KGaA เยอรมนี) และ SiliaFast FaPEX Cereals Part No: FPX-CER-50 (SILICYCLE Inc. แคนาดา)

สารมาตรฐาน (Standards): เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified reference material, CRM) เป็นสารละลายผสมของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 122 ชนิด มีความเข้มข้นอ้างอิงรับรองประมาณ 100 ± 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยี่ห้อ CPACChem (C.P.A. Chem Ltd. ฝรั่งเศส)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน: เตรียมสารละลายผสมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐาน 122 ชนิด ใน acetone โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแต่ละขวดจำนวน 6 ขวด ประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C เตรียม intermediate solution ก่อนการใช้งาน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารสกัดที่ได้จากตัวอย่าง และ working solution ช่วงความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25 และ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย D-sorbitol 3% (analytical protectant) ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ใช้วิเคราะห์ทันที หรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า -18°C ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งตัวอย่าง เครื่องบดปั่น mill machine POWEQ รุ่น HM100 เครื่องปั่นตกตะกอน (centrifuge) รุ่น HERMLE Z366 เครื่องระเหยสารละลายแบบ heating box และใช้แก๊สไนโตรเจนในการระเหยสารสกัด REACTI-THERM III #TS-18824 Thermo scientific เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vortex-2Genie micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร amber vial ขนาด 4 มิลลิลิตร centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -18°C certified volumetric flask ก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

เครื่อง GC-MS/MS: Agilent Technology 7890B, TQ7000C Triple Quadrupole MS/MS โดยใช้ analytical column: DB-5MS (30 m, 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness) มีสถานะเครื่องดังนี้

ส่วน injector เป็น ALS, pulsed splitless mode, initial temperature 80°C hold 0.1 min, 300°C to 300°C cryogenic temperature 50°C มี injection volume เป็น 4 ไมโครลิตร oven temperature program เป็น initial 70°C hold 1 min, rate 50°C/min to 150°C, rate 6°C/min to 200°C, rate 16°C/min to 280°C hold 8.5 min, rate 50°C/min to final 300°C hold 0.5 min และ post-run at 70°C ใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 30 นาที ใช้ ion source temperature 280°C ใช้ quadrupole temperature MS1 และ MS2 เป็น 180°C ใช้ mode constant pressure ที่ 15.8 psi และทำ RT locked สาร chlorpyrifos ที่ 12.0 ± 0.1 นาที สารสนใจเมื่อเข้าสู่เครื่อง GC-MS/MS จะถูกทำให้แตกตัวเป็นประจุโดยใช้แก๊ส He เป็น quench gas และ N₂ เป็น collision gas ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และถูกตรวจวัดด้วย multiple reaction monitoring, MRM mode ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
DDD-p,p'	14.75	234.9>199.1	10	15	234.9>165.1	10	20
DDE-p,p'	14.03	246.1>176.2	10	15	315.8>246.0	10	15
DDT-p,p'	15.34	234.9>165.1	10	20	234.9>199.1	10	15
acephate	5.09	136.0>94.0	10	10	142.0>96.0	10	5
alachlor	10.92	160.0>132.1	10	10	188.1>132.1	10	15
aldrin	12.01	254.9>220.0	10	20	262.9>190.9	10	35
ametryn	11.19	185.0>170.0	10	5	227.0>170.1	10	10
atrazine	8.85	214.9>58.1	10	10	200.0>122.1	10	5
azinphos-ethyl	17.24	160.0>77.1	10	20	132.0>77.1	10	15
azinphos-methyl	16.68	160.0>132.1	10	4	132.0>77.1	10	15
bendiocarb	7.76	126.0>108.0	10	5	126.0>52.1	10	15
BHC-alpha	8.20	218.9>183.0	10	5	180.9>145.0	10	15
BHC-beta	8.89	218.9>183.1	10	5	216.9>181.1	10	5
BHC-delta	9.91	217.0>181.1	10	5	219.0>183.1	10	5
BHC-gamma	9.07	218.9>183.1	10	5	216.9>181.0	10	5
bifenazate	16.14	199.0>184.2	20	10	184.0>156.2	20	10
bifenthrin	16.02	166.2>165.2	10	20	181.2>165.2	10	25
bromacil	11.72	207.0>190.0	30	15	205.0>162.0	30	15
bromophos-ethyl	13.34	302.8>284.7	10	15	358.7>302.8	10	15
bromopropylate	16.09	338.8>182.9	10	20	341.0>185.0	10	20
buprofezine	14.17	305.0>172.0	10	5	105.0>104.1	10	10
butachlor	13.53	160.1>132.1	10	10	176.1>147.1	10	10
cadusafos	7.95	158.8>131.0	10	5	158.8>97.0	10	15
carboxin	14.21	234.9>143.0	10	10	234.9>87.0	10	20
chlordan-alpha	13.62	372.9>265.9	10	20	271.9>236.9	10	15

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
chlordane-oxy	12.89	114.9>87.0	10	15	114.9>51.1	10	25
chlordane-gamma	13.38	372.8>265.8	10	15	374.8>265.8	10	15
chlorfenapyr	14.32	246.9>227.0	10	15	136.9>102.0	10	15
chlorfenvinphos	12.96	266.9>159.1	10	15	268.9>161.0	10	15
chlorobenzilate	14.61	251.1>139.1	10	15	139.1>75.1	10	30
chloroneb	5.82	208.0>193.1	10	10	191.0>113.0	10	15
chlorothalonil	9.51	263.8>168.0	10	25	265.8>231.0	10	20
chlorpropham	7.59	213.0>171.0	10	5	213.0>127.0	10	5
chlorpyrifos	11.98	196.9>169.0	10	15	313.8>257.8	10	15
chlorpyrifos-methyl	10.70	285.9>92.9	10	20	124.9>47.0	10	15
cyanophos	9.21	242.9>109.0	10	10	124.9>47.0	10	15
cyfluthrin I	18.32	226.0>206.0	20	10	198.9>170.1	20	25
cyfluthrin II	18.45	226.0>206.0	20	10	165.0>91.0	10	5
cyfluthrin III	18.52	226.0>206.0	20	10	162.9>91.1	20	5
cyfluthrin IV	18.58	226.0>206.0	20	10	162.9>91.1	20	5
cyhalothrin-lambda	16.86	197.0>161.0	10	10	197.0>141.0	10	10
cypermethrin I	18.77	181.0>152.0	30	20	162.9>91.1	30	5
cypermethrin II	18.91	181.0>152.0	30	20	163.0>127.0	30	5
cypermethrin III	18.99	181.0>152.0	30	20	165.0>91.0	30	10
cypermethrin IV	19.05	181.0>152.0	30	20	165.0>91.0	30	10
DCPA	12.07	300.9>223.0	10	25	331.8>300.9	10	10
DEET	6.59	119.1>91.0	10	10	119.1>65.1	10	20
deltramethrin	21.72	253.0>172.0	20	5	253.0>174.0	20	8
demeton-S-methyl	7.15	88.0>60.0	10	5	112.0>79.0	10	5
diazinon	9.38	199.1>93.0	10	15	179.0>137.0	10	20
dichlorvos	3.75	184.9>93.0	10	10	144.9>109.0	10	10
dicofol	12.35	139.0>111.0	10	10	250.0>139.0	10	8
dicrotophos	7.64	127.0>109.0	20	15	193.0>127.1	20	5
dieldrin	14.12	345.0>263.0	10	8	262.9>191.0	10	30
dimethoate	8.52	92.9>63.0	10	10	86.9>86.0	10	5
dioxathion	9.06	270.0>197.0	10	5	152.9>96.9	10	10
disulfoton	9.68	142.0>109.0	10	5	153.0>96.9	10	10
ditalimfos	13.67	148.0>130.1	10	10	130.0>102.1	10	10

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
endosulfan-alpha	13.61	194.5>125.0	10	20	194.9>160.0	10	5
endosulfan-beta	14.68	194.9>124.9	10	25	206.9>172.0	10	15
endosulfan sulfate	15.29	387.0>289.0	10	5	273.8>236.9	10	15
endrin	14.48	316.7>280.8	10	5	262.8>193.0	10	35
EPN	16.07	157.0>110.0	10	15	169.0>141.1	10	5
ethion	14.75	230.9>129.0	10	25	230.9>175.0	10	10
ethoprophos	7.30	138.9>97.0	20	5	157.9>114.0	20	5
etrimfos	9.84	291.9>181.0	10	5	168.0>153.1	10	5
fenchlorphos	11.19	285.0>269.9	10	15	286.9>272.0	10	15
fenitrothion	11.60	277.0>260.1	10	5	125.1>47.0	10	15
fenobucarb	6.93	121.0>77.0	10	20	149.9>121.1	10	5
fenpropathrin	16.19	181.1>152.1	10	25	265.0>210.0	10	10
fenthion	12.10	278.0>109.0	10	15	124.9>79.0	10	5
fenvalerate I	20.20	167.0>125.1	10	5	181.0>152.0	10	25
fenvalerate II	20.58	167.0>125.1	10	5	125.0>89.0	10	20
fipronil	12.86	366.8>212.8	10	25	350.8>254.8	10	15
folpet	13.22	261.8>130.1	10	15	259.8>130.1	10	15
fosthiazate I	12.53	199.0>102.0	10	5	195.0>139.0	10	5
fosthiazate II	12.59	195.0>103.0	10	5	195.0>139.0	10	5
heptachlor	11.10	271.7>236.9	10	15	273.7>236.9	10	15
heptachlor epoxide (cis)	12.89	352.8>262.9	10	15	354.8>264.9	10	15
heptachlor epoxide (trans)	12.97	216.9>181.9	10	20	262.9>193.0	10	35
heptenophos	6.50	124.0>89.0	10	10	108.9>78.9	10	5
hexachlorobenzene	8.26	283.8>248.8	10	15	283.8>213.8	10	35
hexazinone	15.42	171.0>71.1	10	10	171.0>85.1	10	10
isofenphos	12.93	212.9>185.1	10	5	212.9>121.1	10	10
isoprocarb	6.13	121.0>103.1	10	10	121.1>77.1	10	20
isoxathion	14.39	177.1>130.0	10	10	105.0>77.1	10	15
malathion	11.86	126.9>99.0	10	5	157.8>125.0	10	5
metacrifos	5.69	208.0>180.0	10	5	208.0>93.0	10	15
metalaxyl	11.15	234.0>174.1	10	10	234.0>146.1	10	20
methamidophos	3.70	95.0>64.0	10	10	141.0>95.0	10	5

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
methidathion	13.35	144.9>85.0	10	5	144.9>58.1	10	15
methoxychlor	16.16	227.0>169.0	10	25	227.0>141.1	10	40
metolachlor	11.92	238.0>162.2	10	10	162.2>133.2	10	15
metribuzin	10.74	198.0>82.0	10	15	198.0>55.0	10	30
mevinphos	5.01	192.0>127.0	10	10	127.0>95.0	10	15
monocrotophos	7.87	127.1>109.0	10	10	127.1>95.0	10	15
naled	7.55	184.9>109.0	10	15	144.9>109.0	10	15
omethoate	6.78	155.9>110.0	10	5	155.9>79.0	10	20
parathion	12.18	138.9>109.0	10	5	290.9>109.0	10	10
parathion-methyl	10.91	262.9>109.0	10	10	125.0>47.0	10	10
permethrin I	17.70	183.1>168.1	10	10	183.1>165.1	10	10
permethrin II	17.84	182.9>168.1	10	10	182.9>155.1	10	10
phenthoate	13.07	274.0>121.0	10	10	274.0>125.0	10	15
phorate	8.07	121.0>65.0	10	10	231.0>129.0	10	20
phosalone	16.60	182.0>111.0	10	15	182.0>102.1	10	15
phosmet	16.04	160.0>77.1	10	20	160.0>133.1	10	10
phosphamidon	10.48	192.9>127.0	10	5	127.0>109.0	10	10
picoxystrobin	13.65	145.0>117.1	10	10	145.0>115.1	10	15
pirimiphos-ethyl	12.51	318.1>182.0	10	10	318.1>166.1	10	10
pirimiphos-methyl	11.54	232.9>151.0	10	5	232.9>125.0	10	5
profenofos	13.97	296.8>268.7	10	5	337.0>309.0	10	6
propachlor	6.97	176.1>57.1	10	5	120.0>77.1	10	20
propargite	15.57	149.9>135.1	10	5	135.0>107.1	10	10
propetamphos	9.18	138.0>110.0	10	5	138.0>64.0	10	15
prothiofos	13.89	266.9>239.0	10	5	309.0>221.0	10	25
pyrimethanil	9.51	198.0>183.1	10	15	198.0>118.1	10	25
quinalphos	13.08	146.0>118.0	10	10	157.0>129.1	10	15
quintozene	8.90	295.0>265.0	10	10	295.0>237.0	10	15
simazine	8.72	201.1>173.1	10	5	173.0>138.2	10	5
tebufenpyrad	16.27	332.9>276.0	10	5	332.9>171.0	10	20
tecnazene (TCNB)	6.79	214.9>179.0	10	10	258.9>201.0	10	10
terbacil	9.74	160.0>117.1	10	5	161.1>144.1	10	10
terbufos	9.20	230.9>175.0	10	10	152.9>97.0	10	5

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง GC/MS/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Transition 1			Transition 2		
		Quantifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)	Qualifier (m/z)	Dwell time (ms)	CE (eV)
tetrachlorvinphos	13.47	330.8>108.9	10	15	328.8>108.9	10	15
tetradifon	16.50	226.9>199.0	10	15	356.0>159.0	10	10
thiometon	8.38	93.0>63.0	10	5	125.0>47.0	10	15
tolclofos-methyl	10.93	265.0>250.0	10	15	265.0>93.0	10	25
tolyfluanid	12.92	136.9>91.1	10	20	237.9>137.0	10	15
triadimefon	12.25	208.0>181.1	10	5	208.0>127.0	10	15
triazophos	15.00	161.2>134.2	10	10	161.2>106.1	10	10
trifluralin	7.61	305.9>264.0	10	5	264.0>160.1	10	15

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่ ข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งบดเป็นตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดปั่น ซึ่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น analytical portions โดยชั่งตัวอย่างสำหรับวิธี QuEChERS น้ำหนัก 2.0 ± 0.02 กรัม ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับวิธี FaPEx[®] น้ำหนัก 0.5 ± 0.01 กรัม ลงใน syringe พลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า -15°C

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี QuEChERS และวิธี FaPEx[®]

ทดสอบประสิทธิภาพของ 2 วิธี โดยการเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวนวิธีละ 8 ซ้ำ ($n=8$) ในตัวอย่างข้าว คำนวณ mean %recovery และ %RSD วิธีที่มีจำนวนสารที่ให้ %recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70–120% และ $\leq 20\%$ ตามลำดับ มากกว่าถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า และเลือกวิธีนั้นเพื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

วิธี QuEChERS: นำตัวอย่างที่ชั่งไว้มาเติมน้ำ RO ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เขย่าผสมกันแล้ววางทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เติม acetonitrile ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมืออย่างแรง 1 นาที แล้วเติม QuEChERS extraction kit เขย่าต่ออีก 1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แบ่งสารสกัดส่วนใส ด้านบน 2 มิลลิลิตร ใส่ใน amber vial ขนาด 8 มิลลิลิตร นำไประเหยแห้งปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายผสมของ n-hexane: ethyl acetate (3:1) เป็น 2 มิลลิลิตร เติม D-sorbitol 3% ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้น ตัวอย่าง 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

วิธี FaPEx[®]: ตัวอย่างน้ำหนัก 0.5 ± 0.1 กรัม ใน syringe พลาสติกที่ปิดปลายไว้ ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ RO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปิดด้วย plunger ไล่อากาศออกบางส่วน เขย่าผสมกันแล้ววางทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เติม 1% acetic acid in acetonitrile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Vortex นาน 1 นาที แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ต่ปลาย syringe เข้ากับ FaPEx[®] cartridge กด plunger ให้สารสกัดผ่าน cartridge อัตราเร็ว 1 หยดต่อวินาที ลงใน amber vial นำสารสกัด 2 มิลลิลิตร ไประเหยแห้งปรับปริมาตรด้วย ตัวทำละลายผสมของ n-hexane: ethyl acetate (3:1) เป็น 1 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นตัวอย่าง 0.2 กรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะของวิธี

ฉีดสารมาตรฐานเข้าเครื่อง GC-MS/MS ตามสภาวะที่กำหนดจำนวน 3 ซ้ำ บันทึก Retention time (RT) และ ion intensity ratio แล้วทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank (reagent blank) ที่ใช้น้ำ RO แทนตัวอย่าง และ sample blank ได้แก่ ข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี RT และ/หรือค่า m/z ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

สร้างกราฟมาตรฐานแบบ matrix-matched calibration (MMC) โดยใช้สารสกัดที่ได้จากข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่เป็น blank เป็นตัวทำละลาย เจือจาง intermediate standard solution ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS แบบสุ่ม (random, $n=3$) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.995

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

หาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารสกัดจากข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ระดับ LOD แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง GC-MS/MS คำนวณค่า signal-to-noise ratio (S/N) จากนั้นยืนยันค่า LOD ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง แล้วสกัดตามขั้นตอน วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ ($n=8$) แล้วคำนวณค่า S/N ค่า LOD คือระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N มากกว่า 3

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ)

หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) โดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์จำนวน 8 ซ้ำ ($n=8$) แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วงร้อยละ 70-120 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์โดยการเติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n=3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: r) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ r มีค่ามากกว่า 0.95

ความแม่นยำและความเที่ยง

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับ LOQ, 4xLOQ และ 25xLOQ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.2 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 8 ซ้ำ ($n=8$) แล้วคำนวณ %recovery และ RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 70-120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): RSD มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty, MU) ของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในอาหารที่ทำการทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k = 2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

การถ่ายทอดองค์ความรู้เพื่อพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการเครือข่าย

เพื่อเป็นการสนับสนุนและยกระดับความสามารถห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในภูมิภาค จึงดำเนินการฝึกอบรมวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้แก่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ชั้นพื้นฐานและชั้นสูงรวม 7 แห่ง และเพื่อทดสอบความสามารถห้องปฏิบัติการที่เข้ารับการอบรม จึงดำเนินการจัดโครงการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison, ILC) การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าว ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 (ILC-PR01-63) มีสมาชิก 3 แห่ง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้าง สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อีก 2 แห่ง ใช้ค่าอ้างอิงของวัสดุทดสอบ (QC sample) ซึ่งเป็นตัวอย่างข้าวบาสมати (Basmati Rice) ที่ได้จากการทดสอบความชำนาญของ FAPAS Product Code: FCPM2-CCP51 Test No. 09128 แจกจ่ายให้แก่ผู้เข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ ผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจะถูกประเมินความเท่าเทียมกันโดยใช้ค่า RU (Relative expanded uncertainty)⁽¹⁸⁾ คำนวณได้จาก Reference value และ Expanded uncertainty (U) ที่ระบุใน reference data sheet ของ FAPAS โดยค่า reference value $\pm$ U ของสาร alpha-BHC, methamidophos, profenofos และ fenpropathrin เป็น 18.2 ± 8.0 , 42.0 ± 18.5 , 45.4 ± 20.0 และ 59.8 ± 26.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq U$ หรือ $RU \leq \pm 1$ เมื่อ $RU = \text{Relative expanded uncertainty}$, $RV_x = \text{Reported value}$, $RV_o = \text{Reference value}$, $U = \text{Expanded uncertainty}$ ดังสมการ

$$RU = (RV_x - RV_o) / U$$

ผล

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี QuEChERS และวิธี FaPEX[®]

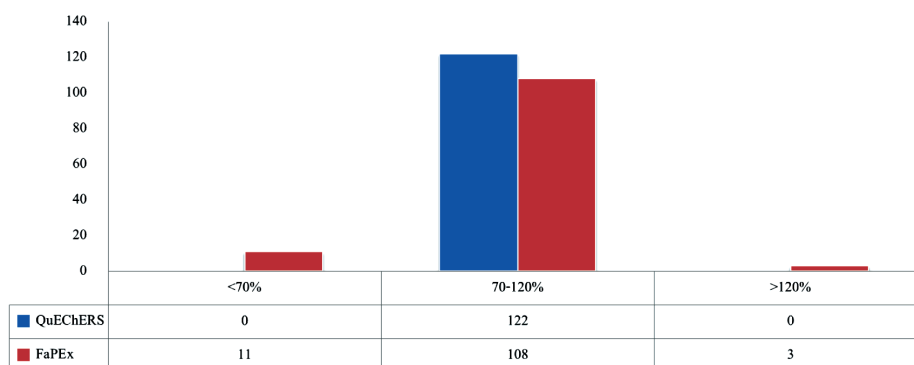
เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี ก่อนการคัดเลือกวิธีที่จะนำไปทดสอบความใช้ได้ ได้แก่ วิธี QuEChERS ซึ่งห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารใช้สำหรับวิเคราะห์ผักผลไม้สด กับวิธี FaPEX[®] ซึ่งผู้ผลิตระบุว่ามีหลักการเดียวกัน แต่ได้ลดขนาดและขั้นตอนทำให้รวดเร็วขึ้น ซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้ทดแทนวิธีเดิมได้ โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 8 ซ้ำ ($n=8$) คำนวณ %recovery และ %RSD ดังแสดงในภาพที่ 1 สำหรับวิธี QuEChERS อ้างอิงจากวิธี EN 15662 เป็นวิธีที่ใช้กับตัวอย่างความชื้นสูง ได้พัฒนาปรับปรุงก่อนการใช้งานให้สามารถใช้วิเคราะห์ของแห้งได้ เนื่องจากต้องคืนสภาพให้ตัวอย่างที่มีความชื้น 10-15% ให้มีความชื้นที่เหมาะสมกับวิธี (ความชื้น $\geq 70\%$) โดยการเติมน้ำ 4 เท่าของปริมาณตัวอย่าง ในส่วนของวิธี FaPEX[®] ใช้หลักการที่อ้างอิงจากวิธี AOAC 2007.01 ดังแสดงในภาพที่ 1

จากการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีเตรียมตัวอย่าง ผลพบว่าวิธี QuEChERS ให้จำนวนสารที่มี %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% จำนวน 122 สาร คิดเป็นร้อยละ 100 และความเที่ยงที่แสดงด้วยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ สารทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ($\leq 20\%$) ในขณะที่วิธี FaPEX[®] ให้จำนวนสารที่มี %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% จำนวน 108 สาร คิดเป็นร้อยละ 88 และมี 2 สาร ให้ %RSD ไม่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ แสดงว่าวิธี QuEChERS มีความเหมาะสมที่จะใช้สำหรับการเตรียมตัวอย่างมากกว่า จึงเลือกใช้วิธีนี้สำหรับการทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

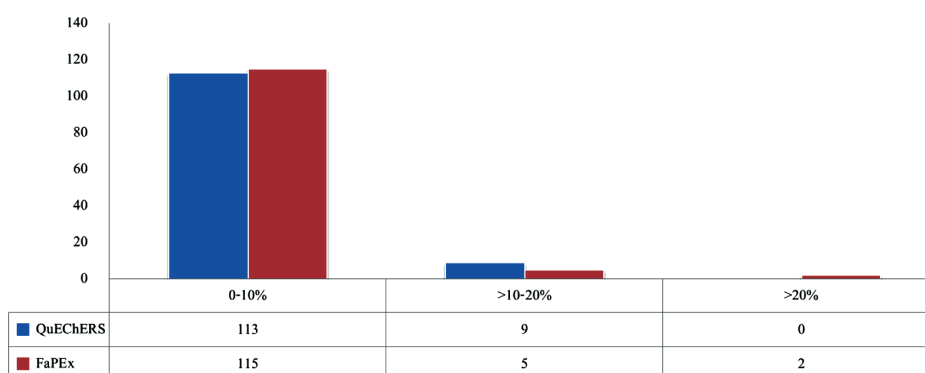
ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ที่เป็นข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน การวิเคราะห์แบบ MRM ด้วยเครื่อง GC-MS/MS ทำให้สามารถตรวจวัดพีคสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างชัดเจน เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจวัดสารสนใจในเมทริกซ์ที่มีสารรบกวนได้ดีดังแสดงในภาพที่ 2

ผลการเปรียบเทียบร้อยละการคืนกลับระหว่างวิธี QuEChERS กับ FaPEx



ผลการเปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวิธี QuEChERS กับ FaPEx

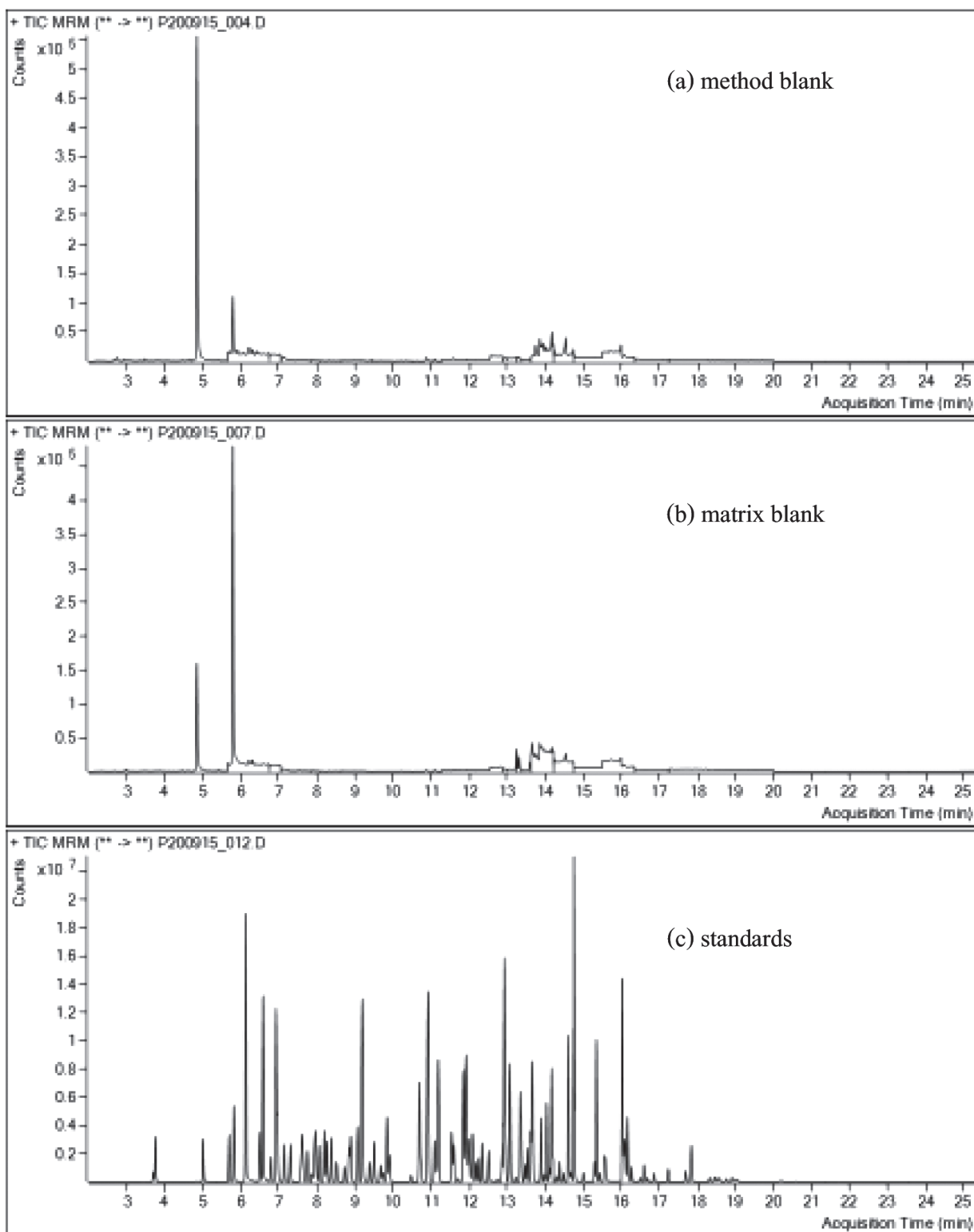


ภาพที่ 1 ผลการเปรียบเทียบร้อยละการคืนกลับและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ระหว่างวิธี QuEChERS กับ FaPEx® แสดงจำนวนสารที่มี %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% และ %RSD ≤20%.

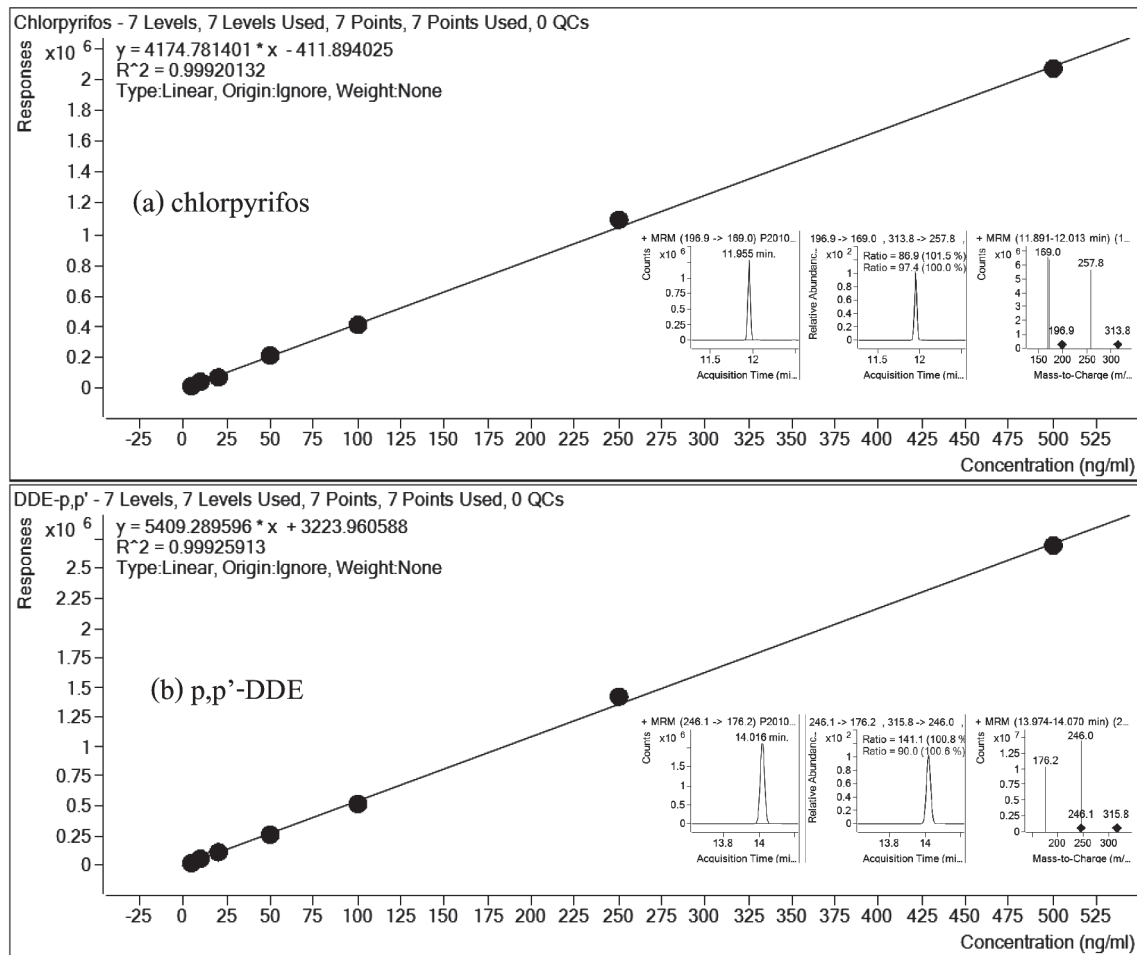
สามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area (response) ของสารสนใจมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.005 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า r ในช่วง 0.995-0.999 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ยอมรับที่ 0.995

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของสารทุกชนิดเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ($S/N > 3$) และการยืนยันโดยการสกัดตัวอย่างที่ระดับ LOD ผลพบว่าพบสารทุกชนิดทั้ง 8 ขั้ว โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีดังแสดงในตารางที่ 2 ค่าความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ, 4xLOQ และ 25xLOQ ที่ 0.05, 0.20 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 122 ชนิด ในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง ผลการทดสอบความแม่นยำ (%recovery) ที่ระดับ LOQ มีค่าระหว่าง 74.3-119.8% และความเที่ยงจาก RSD มีค่าระหว่าง 1.2-20.0% ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับกลาง (4xLOQ) และ สูง (25xLOQ) มีค่า 91.3-120.0 % และ 0.5-20.0% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 70-120% และ ≤20% ตามลำดับ



ภาพที่ 2 Total ion chromatogram แสดง (a) method blank (b) matrix blank ปราศจากสารรบกวน และ (c) พืชสารมาตรฐาน 122 ชนิด



ภาพที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและ Chromatogram แสดง quantification transition, qualification transition, ion intensity ratio และ mass-to-charge (m/z) ของ (a) chlorpyrifos และ (b) p,p'-DDE

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
DDD-p,p'	110.5	2.9	118.1	19.1	102.1	3.3	103.7	1.9	110.1	5.7	98.4	1.5
DDE-p,p'	104.3	3.9	118.2	12.4	100.2	2.2	104.6	2.1	109.9	6.0	99.9	0.9
DDT-p,p'	103.8	1.8	119.9	7.8	105.3	4.2	102.1	2.1	108.6	6.1	99.6	0.9
acephate	119.5	8.2	74.6	13.8	119.8	4.0	105.3	6.3	106.6	8.9	107.8	1.4
alachlor	109.4	4.2	119.1	6.3	100.6	2.0	105.6	3.1	104.4	16.9	104.4	0.9
aldrin	100.8	4.2	117.6	16.4	97.5	1.9	103.6	3.8	106.9	6.7	98.7	1.0
ametryn	107.0	4.1	119.6	11.2	100.7	2.1	106.3	2.6	105.2	15.5	101.5	0.8
atrazine	104.3	2.7	118.1	11.9	100.6	1.6	103.0	1.7	106.5	10.0	100.5	0.6
azinphos-ethyl	112.4	4.0	116.8	13.9	120.0	9.5	101.5	2.5	108.9	6.6	105.2	1.5

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ต่อ)

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
azinphos-methyl	111.0	13.5	113.0	18.7	118.2	11.3	104.5	1.5	109.0	6.4	105.2	1.4
bendiocarb	106.5	3.3	120.7	6.7	107.7	2.2	102.4	1.8	111.0	6.4	101.6	0.8
BHC-alpha	104.2	4.6	116.1	10.7	98.0	1.8	103.4	3.5	112.2	6.3	101.0	0.7
BHC-beta	104.6	4.8	119.5	11.2	98.9	1.4	103.1	3.3	110.0	6.1	100.1	0.6
BHC-delta	107.7	4.8	115.8	14.7	101.0	1.5	102.9	3.6	109.7	5.5	100.2	0.7
BHC-gamma	103.6	4.9	107.4	19.8	98.9	1.1	104.5	3.5	111.4	5.4	101.0	0.8
bifenazate	105.6	8.7	119.2	11.3	92.8	8.1	106.1	8.2	115.0	8.0	87.4	4.5
bifenthrin	108.7	2.5	114.4	18.5	104.1	4.7	103.3	2.1	112.5	5.6	101.5	0.9
bromacil	105.2	18.2	119.4	8.0	110.6	2.7	104.3	3.8	107.2	6.7	99.3	1.1
bromophos-ethyl	102.3	4.6	119.9	7.2	100.7	2.4	105.0	3.7	109.6	5.4	100.2	0.9
bromopropylate	109.3	3.2	119.4	9.9	106.3	4.8	102.6	1.3	108.9	6.5	97.3	1.3
buprofezine	106.9	5.2	116.6	14.5	101.3	2.5	108.2	4.0	111.0	5.8	98.7	1.2
butachlor	103.8	2.3	119.3	6.2	103.5	2.2	107.2	1.9	109.3	5.3	101.0	1.1
cadusafos	107.8	5.1	119.9	18.1	99.7	1.9	106.3	3.2	111.1	5.5	100.3	0.7
carboxin	74.3	19.9	155.2	18.1	110.7	4.4	109.5	4.4	105.6	7.1	102.2	1.0
chlordane-alpha	104.6	3.9	119.6	8.6	98.6	1.9	105.1	2.4	108.1	5.7	99.0	1.4
chlordane-oxy	100.3	2.7	119.5	10.3	99.2	2.1	110.1	1.9	109.9	6.1	99.6	0.9
chlordane-gamma	104.0	2.7	118.7	12.9	98.6	2.2	106.0	3.6	108.1	5.7	98.5	0.7
chlorfenapyr	110.3	7.4	116.0	18.7	102.7	3.4	96.4	3.4	108.8	5.6	99.4	1.2
chlorfenvinphos	112.4	5.5	117.0	16.3	108.4	2.8	107.0	1.9	110.6	6.1	101.6	0.9
chlorobenzilate	108.3	2.6	115.4	16.6	105.0	3.2	102.5	1.8	110.6	5.8	100.5	0.8
chloroneb	104.1	7.4	115.2	9.4	96.4	2.5	107.8	4.9	109.5	5.9	100.3	1.0
chlorothalonil	110.9	5.0	120.0	14.4	107.3	2.1	101.2	3.9	109.5	5.8	101.8	0.7
chlorpropham	105.8	5.7	117.9	12.7	98.7	1.5	103.9	3.9	111.5	6.4	101.9	0.9
chlorpyrifos	108.6	3.6	118.8	16.8	101.4	1.8	104.6	2.3	109.2	5.9	100.9	0.8
chlorpyrifos-methyl	106.4	3.0	117.7	14.1	104.1	1.4	104.6	2.1	111.3	5.7	102.4	1.1
cyanophos	104.2	4.1	119.8	11.7	101.7	1.8	104.5	2.5	110.3	5.8	106.1	0.8
cyfluthrin I	112.4	7.7	118.7	8.6	118.6	8.7	108.7	2.9	112.8	6.4	108.9	3.7
cyfluthrin II	100.0	5.5	119.5	11.9	116.5	10.3	113.9	4.5	108.3	5.8	106.0	2.8
cyfluthrin III	97.0	14.5	119.8	7.8	118.2	9.6	105.0	4.1	107.7	6.3	105.5	3.4
cyfluthrin IV	109.6	13.9	119.7	10.4	115.4	9.3	104.8	3.4	114.1	6.7	108.7	3.6

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
cyhalothrin-lambda	119.4	7.5	116.9	17.6	111.6	7.1	106.7	3.0	109.9	6.8	101.7	0.8
cypermethrin I	95.7	16.1	119.3	10.1	120.0	7.4	118.1	3.9	100.2	6.9	103.6	3.1
cypermethrin II	102.0	18.2	119.7	9.7	117.0	10.0	111.5	4.5	108.4	7.2	104.6	2.5
cypermethrin III	114.6	20.0	117.3	13.3	119.0	6.7	116.9	8.5	103.9	9.7	101.2	2.5
cypermethrin IV	117.2	14.4	119.9	11.5	115.6	8.9	96.2	5.2	108.8	6.9	111.2	3.0
DCPA	104.7	4.1	119.4	12.1	100.1	1.8	105.6	2.6	109.5	5.9	99.9	0.9
DEET	107.1	3.6	115.3	15.8	101.3	1.7	104.9	3.4	109.9	6.0	109.2	0.6
deltramethrin	101.3	9.8	119.8	10.4	114.0	8.6	103.2	3.6	107.3	6.7	105.9	3.1
demeton-S-methyl	96.1	12.0	119.9	5.8	107.4	2.1	112.7	2.9	108.3	6.4	103.0	0.8
diazinon	103.8	3.5	119.4	8.0	100.7	1.4	106.9	1.8	110.6	6.2	100.5	0.8
dichlorvos	109.5	8.7	119.0	7.1	98.5	2.2	105.2	4.6	111.7	5.7	106.4	0.8
dicofol	106.3	2.3	116.7	13.7	101.1	2.5	111.1	3.0	111.0	5.5	105.8	1.3
dicrotophos	111.5	6.1	119.8	4.9	116.0	3.0	104.0	2.8	110.8	5.8	113.1	1.5
dieldrin	105.2	6.1	119.4	5.4	100.9	2.6	105.3	5.2	108.9	4.4	100.1	1.3
dimethoate	108.7	4.4	119.6	4.4	110.0	2.3	106.2	1.9	111.2	5.9	102.6	1.0
dioxathion	98.0	7.1	119.9	6.4	95.9	1.7	103.1	2.7	111.9	6.8	102.7	1.1
disulfoton	94.3	16.5	119.1	2.4	100.9	1.0	112.2	3.6	109.4	5.8	101.4	0.9
ditalimfos	107.5	2.7	119.7	10.5	104.9	2.9	104.9	2.1	108.2	5.9	99.5	0.6
endosulfan-alpha	103.7	6.5	119.1	6.7	100.8	2.8	102.6	7.4	109.0	4.9	99.0	1.0
endosulfan-beta	97.8	3.1	119.7	7.4	102.3	2.9	106.6	2.0	110.8	5.6	96.4	1.5
endosulfan sulfate	104.3	6.5	116.8	17.2	102.5	2.8	103.1	3.6	107.2	6.8	95.9	1.4
endrin	98.1	9.6	119.3	5.0	96.9	3.6	107.6	9.3	106.6	5.4	92.1	3.6
EPN	104.1	4.0	118.4	7.9	112.6	5.1	111.4	1.5	112.7	5.8	110.2	3.6
ethion	109.1	3.4	118.7	11.4	104.3	3.3	107.2	1.9	111.1	5.8	102.1	0.9
ethoprophos	104.0	3.8	117.1	11.7	100.9	1.7	103.7	3.0	111.0	5.6	101.2	0.6
etrimfos	109.0	6.1	119.0	10.2	99.9	1.5	105.8	2.7	111.1	5.7	101.3	0.5
fenchlorphos	105.1	4.9	118.4	9.9	101.7	1.5	105.3	3.4	110.5	5.8	101.4	1.0
fenitrothion	102.5	4.3	119.5	10.4	107.8	2.0	107.1	4.2	116.7	5.4	111.1	4.2
fenobucarb	104.8	3.8	121.3	4.3	101.4	1.4	104.4	2.4	110.0	5.9	109.9	0.6
fenpropathrin	108.8	4.1	118.1	12.6	105.3	5.8	105.9	2.7	110.1	6.1	99.8	0.8
fenthion	105.3	3.1	116.7	15.2	102.2	1.7	105.1	1.8	110.7	5.5	101.2	0.8

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

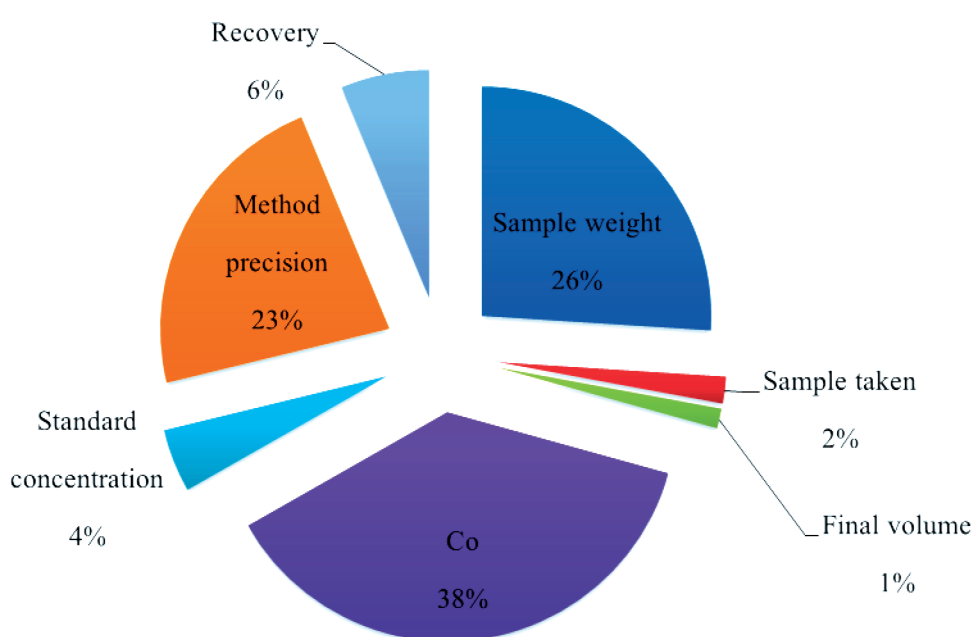
Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
fenvalerate I	102.4	4.1	119.7	10.7	118.4	11.1	108.0	3.2	108.2	6.7	106.1	2.2
fenvalerate II	115.4	5.6	119.8	17.1	118.6	10.7	107.6	4.3	107.6	6.2	106.6	2.6
fipronil	107.0	4.9	120.0	10.2	108.3	3.0	108.5	3.0	113.6	5.5	106.3	2.5
folpet	103.4	6.5	119.1	6.8	113.9	4.1	101.3	4.4	109.3	6.7	105.1	1.4
fosthiazate I	109.0	7.6	106.3	14.0	118.9	3.3	98.8	2.1	108.1	6.7	102.4	1.5
fosthiazate II	117.6	15.8	118.3	19.0	116.8	3.8	104.5	2.5	112.7	5.7	106.3	2.5
heptachlor	106.6	4.4	116.2	11.9	101.2	1.6	105.9	3.1	111.2	5.6	101.4	1.0
heptachlor epoxide (cis)	105.0	3.4	117.7	7.2	98.4	1.9	106.2	3.5	109.9	5.3	98.7	1.0
heptachlor epoxide (trans)	99.2	3.7	119.8	9.9	100.4	1.9	104.3	3.6	110.0	6.2	99.2	1.0
heptenophos	111.3	4.3	118.3	8.7	104.6	1.6	103.6	3.0	110.3	5.9	102.0	0.8
hexachlorobenzene	103.5	6.1	119.4	3.6	96.4	1.8	105.1	4.2	110.9	6.1	100.7	0.6
hexazinone	107.9	4.4	120.9	5.4	105.4	2.4	104.5	1.2	108.2	6.5	103.0	1.0
isofenphos	102.5	3.1	119.4	10.2	100.3	2.5	105.1	2.3	109.7	5.8	99.3	0.9
isoprocab	105.5	3.9	124.1	8.3	100.9	1.1	107.3	4.0	109.4	5.8	106.8	0.7
isoxathion	104.4	4.6	116.7	4.4	119.7	9.5	109.4	3.2	119.3	5.4	123.1	8.1
malathion	107.0	3.6	119.6	11.4	105.3	2.4	107.2	2.5	110.2	5.7	101.4	1.0
metacrifos	105.8	7.3	119.7	5.1	96.6	2.1	106.2	4.6	109.7	5.6	101.5	0.7
metalaxyl	103.9	4.9	117.0	3.2	103.3	2.8	102.6	1.9	108.0	6.3	99.4	0.6
methamidophos	98.6	3.9	118.6	14.5	105.9	1.9	105.5	5.8	108.7	5.9	102.0	1.2
methidathion	110.9	2.9	118.8	10.7	108.5	3.1	106.5	1.5	110.9	5.4	101.9	0.9
methoxychlor	107.7	2.9	118.3	14.8	106.0	5.3	104.9	2.7	108.2	6.7	99.1	0.7
metolachlor	105.4	3.1	119.6	3.9	101.9	2.3	104.3	2.8	109.7	5.9	98.9	0.7
metribuzin	110.8	2.7	117.9	15.2	103.4	1.6	110.5	2.0	120.0	6.3	107.8	2.8
mevinphos	111.1	7.6	115.1	11.2	102.2	1.9	106.4	4.4	109.0	5.9	101.7	0.8
monocrotophos	108.7	10.0	119.6	3.8	114.6	5.0	104.2	2.9	109.6	6.0	106.9	1.7
naled	116.7	16.4	126.1	17.6	94.1	8.9	112.6	6.0	107.5	7.9	92.6	5.0
omethoate	112.2	9.4	104.0	17.8	119.6	3.3	104.6	6.5	109.4	6.4	112.1	1.4
parathion	109.8	4.4	119.9	11.0	107.0	2.3	110.5	2.1	113.2	5.4	110.4	3.4
parathion-methyl	113.3	2.5	118.9	12.7	110.4	2.3	110.2	3.0	117.7	5.3	113.5	5.2

ตารางที่ 2 ความแม่นยำ (average %recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งที่ความเข้มข้นต่างๆ (ต่อ)

Pesticides	ข้าว						ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง					
	0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg		1.25 mg/kg	
	(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)		(n=8)	
	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD	Rec	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
permethrin I	117.4	14.2	117.6	13.5	114.4	8.0	98.6	4.5	109.2	7.8	100.0	3.4
permethrin II	119.8	6.3	119.0	14.8	110.3	8.3	106.6	2.6	109.3	6.6	98.8	1.5
phenthoate	105.1	2.4	118.7	5.2	103.6	2.2	104.4	2.3	112.7	5.4	103.6	1.2
phorate	104.5	3.5	119.7	5.3	99.7	1.1	107.1	2.2	112.6	5.6	102.2	0.8
phosalone	115.3	3.8	116.9	16.8	117.1	9.0	105.5	1.7	110.2	6.3	102.5	1.1
phosmet	118.2	5.5	118.8	9.5	118.7	5.8	104.4	1.4	108.0	6.4	102.5	1.4
phosphamidon	115.6	5.8	117.4	14.4	118.4	3.9	104.3	3.6	111.9	5.4	103.0	1.3
picoxystrobin	114.1	5.7	127.0	14.5	101.7	3.0	95.8	4.5	108.2	7.8	101.4	1.2
pirimiphos-ethyl	104.8	2.7	116.2	14.8	100.7	2.2	108.4	2.5	110.4	5.4	101.1	1.0
pirimiphos-methyl	98.8	4.5	119.6	6.8	102.0	2.0	107.2	2.3	110.9	5.5	100.9	1.0
profenofos	112.2	8.6	119.9	7.5	107.2	6.6	102.2	5.9	105.8	7.3	98.0	6.1
propachlor	107.1	3.3	117.5	10.5	101.5	1.4	104.4	2.9	111.2	6.1	100.8	0.6
propargite	111.1	3.7	117.5	9.8	103.6	5.0	102.4	1.7	107.2	6.3	91.3	4.1
propetamphos	105.3	4.0	119.5	3.6	101.1	0.9	105.4	2.3	114.1	5.5	112.5	1.8
prothiofos	106.7	3.5	119.1	8.7	101.4	2.8	102.9	2.8	109.1	5.9	99.9	0.7
pyrimethanil	106.1	3.7	119.7	5.6	98.8	1.5	108.7	3.2	110.5	5.9	102.5	0.7
quinalphos	107.3	2.4	118.2	7.0	102.9	2.7	105.8	2.2	109.9	5.6	101.8	0.8
quintozen	109.6	7.5	117.4	6.7	99.2	1.5	107.9	5.0	111.6	4.8	104.8	2.0
simazine	106.3	4.0	122.8	4.1	100.0	1.6	104.2	3.8	111.2	5.8	102.2	0.7
tebufenpyrad	107.2	5.1	119.6	11.3	108.5	5.7	103.3	3.5	109.8	6.0	99.5	0.6
tecnazene (TCNB)	108.2	5.9	119.8	2.1	97.9	1.8	106.0	4.0	111.9	5.6	103.7	1.0
terbacil	111.2	4.1	120.0	8.1	108.0	2.4	104.7	3.0	110.0	6.6	101.8	1.0
terbufos	104.0	5.9	117.5	10.5	98.7	1.5	106.2	3.5	111.8	5.8	101.9	0.7
tetrachlorvinphos	113.9	2.5	112.9	9.9	115.4	4.1	103.4	1.9	110.4	5.6	100.9	1.3
tetradifon	111.3	5.7	104.1	17.8	107.5	6.4	106.2	2.6	109.7	6.6	98.1	1.8
thiometon	100.4	12.0	115.8	8.5	101.3	1.3	110.9	3.5	107.6	6.5	100.7	0.8
tolclofos-methyl	105.0	4.6	118.2	5.5	99.5	1.4	106.6	3.3	111.0	5.7	101.1	1.0
tolyfluanid	108.1	2.9	117.5	10.8	103.7	2.0	106.0	2.3	112.0	5.1	101.0	1.1
triadimefon	106.5	3.0	118.9	7.8	103.4	2.9	104.5	2.2	110.2	5.7	101.0	0.9
triazophos	113.0	6.2	122.9	14.1	110.4	5.1	103.7	1.4	109.9	6.2	102.1	1.2
trifluralin	106.6	6.1	114.4	14.2	100.0	1.9	107.5	4.3	115.3	5.3	105.9	2.0

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ พบว่าสารทั้งหมดมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 0.05–2.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยคุณลักษณะทั้งหมดที่ทำการทดสอบความใช้ได้นี้แสดงว่าสามารถใช้วิธีนี้วิเคราะห์สารสนใจดังกล่าวได้ และเมื่อพิจารณาข้อกำหนดทางกฎหมายของประเทศไทยที่กำหนดค่า Maximum Residue Limit (MRL) ของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชไว้ที่ 0.01–10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิธีนี้สามารถใช้ในการวิเคราะห์แบบคัดกรอง (screening) สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มธัญพืชและกลุ่มถั่วเมล็ดแห้งได้ตรงตามวัตถุประสงค์

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach หรือ Bottom-up Approach ผลจากการประมาณค่าความไม่แน่นอนพบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุด คือ calibration curve (38%) sample weight (26%) และ method precision (23%) ส่วน bias หรือ recovery และ standard concentration (6 และ 4%) และองค์ประกอบอื่น ๆ นั้นถือเป็นองค์ประกอบที่น้อยมาก ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ chlorpyrifos ในข้าว

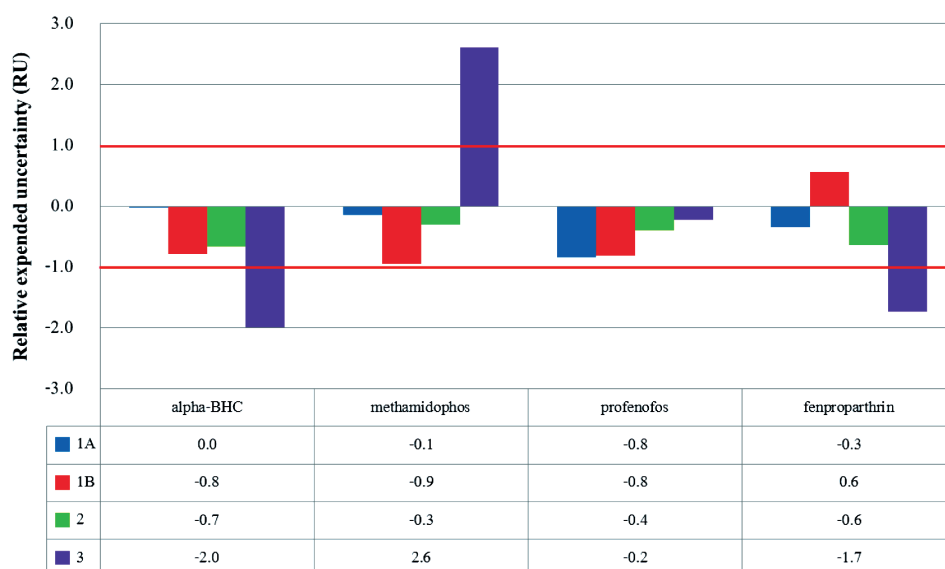
ผลการถ่ายทอดองค์ความรู้เพื่อพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการเครือข่าย

ห้องปฏิบัติการเครือข่ายได้รับการฝึกอบรมวิธีวิเคราะห์ของแห่งจากสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ในปี พ.ศ. 2563 จำนวน 7 แห่ง แบ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องมือขั้นสูง 4 แห่ง ทั้งหมดเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์แล้ว และห้องปฏิบัติการที่ใช้เครื่องมือพื้นฐานอีก 3 แห่ง เปิดให้บริการแล้ว 1 แห่ง เพื่อเป็นการทดสอบความสามารถและประเมินประสิทธิภาพการฝึกอบรมจึงจัดทำโครงการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าว โดยใช้ค่าอ้างอิง (Reference value) และ Expanded uncertainty $U (k = 2)$ ของสารที่ศึกษา 4 ชนิด คือ alpha-BHC, methamidophos, profenofos และ fenpropathrin ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมีห้องปฏิบัติการเข้าร่วม 3 แห่ง รายงาน 4 ค่า (1A, 1B, 2 และ 3) จากการประเมินผลสมาชิกโดยใช้ Relative expanded uncertainty (RU) ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับเป็น $RU \leq \pm 1$ สมาชิกรายงานผลปริมาณสาร profenofos ได้ในระดับที่น่าพอใจทั้ง 3 แห่ง (ร้อยละ 100) ส่วนสาร alpha-BHC, methamidophos และ fenpropathrin มีค่า RU ในระดับที่น่าพอใจ 2 แห่ง (ร้อยละ 66.7) ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการเดียวกัน และมีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง ที่มีค่า RU ในระดับไม่น่าพอใจทั้ง 3 สาร ซึ่งสรุปได้ว่ามีห้องปฏิบัติการที่สามารถวิเคราะห์

สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวได้ในระดับที่น่าพอใจทั้ง 4 สาร มีจำนวน 2 แห่ง และอีก 1 แห่ง สามารถวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวได้ในระดับที่น่าพอใจ 1 สาร ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการสามารถทบทวนผลการวิเคราะห์เพื่อดำเนินการพัฒนาปรับปรุงงานในระบบคุณภาพการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น

ตารางที่ 3 ค่าอ้างอิง (Reference value) และ Expanded uncertainty U (k = 2) ของสารที่ศึกษา

Pesticides	Reference value (µg/kg)	Expanded uncertainty
alpha-BHC	18.2	8.0
methamidophos	42.0	18.5
profenofos	45.4	20.0
fenpropathrin	59.8	26.4



ภาพที่ 5 RU ของการวิเคราะห์สาร alpha-BHC, methamidophos, profenofos และ fenpropathrin ในตัวอย่างข้าวบาสมาดิ เกณฑ์ยอมรับ RU ≤ ±1

วิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี QuEChERS และ FaPEX[®] พบว่าวิธีมาตรฐาน QuEChERS ให้ค่า %recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับมากกว่าวิธี FaPEX[®] แม้วิธีนี้จะใช้เวลาและสารเคมีน้อยกว่า แต่เกณฑ์การคัดเลือกต้องมาจากความถูกต้องของวิธีเป็นอันดับแรก และการใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยจะส่งผลถึงความแม่นยำและความเที่ยงของวิธี รวมทั้งเป็น cartridge ที่บรรจุ SPE สำเร็จรูปที่มีผลต่อความแม่นยำของวิธียังเป็นลิขสิทธิ์เฉพาะของบริษัทผู้ผลิต ทั้งนี้วิธี FaPEX[®] มีศักยภาพที่สามารถพัฒนาให้เป็นวิธีมาตรฐานได้เมื่อมีการพัฒนา SPE ให้เหมาะสมในอนาคตต่อไป

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS/MS ในขั้นตอน instrument method development เป็นสิ่งสำคัญและมีความจำเป็นต่อการวิเคราะห์แบบ multi-residue method อย่างมาก โดยเฉพาะการหาสภาวะและ MRM transitions ที่เหมาะสม โดยต้องคำนึงถึงเมทริกซ์ที่อยู่ในสารสกัด การเลือก transitions ที่ไม่เหมาะสม

จะทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดพลาดจากสารรบกวน และการวิเคราะห์สารจำนวนมากพร้อมกันยังถือเป็นความท้าทายเชิงเทคนิคต่อผู้วิเคราะห์

วิธีเตรียมตัวอย่าง QuEChERS ได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกให้ใช้ได้กับตัวอย่างที่มีความชื้นสูงมากกว่า 70% ประเภทผักและผลไม้สด ในขณะที่การวิเคราะห์อาหารกลุ่มธัญพืชและถั่วเมล็ดแห้งซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มของแห้ง ความชื้นต่ำ มีแป้ง โปรตีน และกรดไขมันอยู่ปริมาณมาก ซึ่งจะแสดงเป็นสารรบกวนในระบบ chromatography ทำให้การวิเคราะห์ในระดับต่ำเป็นไปได้ยาก เพื่อกำจัดสารเหล่านี้มีความพยายามใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น dispersive SPE ที่มีส่วนผสมของ PSA และ C18 เพื่อกำจัดกรดอินทรีย์ กรดไขมันและน้ำตาลบางชนิดได้ หรือการ centrifuge ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อกำจัด co-extracts การเลือกใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะสูงจะสามารถทำให้ลดสารรบกวนได้ดีโดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน การสกัดโดยใช้ acetonitrile เป็นตัวทำละลายสามารถละลายสารที่มีคุณสมบัติหลากหลายได้ทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว หากฉีดเข้าเครื่องมือวิเคราะห์โดยตรง สารชนิดนี้จะทำลาย stationary phase ทำให้อายุการใช้งานของ analytical column สั้นลง เพื่อเป็นการยืดอายุให้สามารถวิเคราะห์สารได้นานขึ้นและเป็นการประหยัดทรัพยากรจึงทำการเปลี่ยนตัวทำละลายโดยการระเหยแห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจนแล้วปรับปริมาตรโดยใช้สารผสมของ ethyl acetate และ n-hexane อัตราส่วน 1 ต่อ 3 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS สารหลายชนิดอาจทำปฏิกิริยากับ active site ในเครื่องมือ จึงต้องมีการเติม analytical protectant (D-sorbitol) ลดการ adsorption และการ degradation ของสารสนใจก่อนฉีดเข้าเครื่องมือ วิธีการนี้จะช่วยให้ repeatability ดีขึ้น⁽¹⁹⁾

การเลือกใช้ inlet ชนิด PTV (programmable temperature vaporizer) โดยการค่อย ๆ ปรับอุณหภูมิให้สูงขึ้นเป็นการช่วยให้สารที่มี volatility ที่แตกต่างกันเข้าสู่ column ไม่พร้อมกัน เพิ่มประสิทธิภาพการแยกสารได้ดี ในกรณีที่เครื่องมือไม่มี inlet ชนิดนี้สามารถใช้ MMI (multimode inlet) ที่ใช้ได้ทั้งแบบ split/splitless และปรับอุณหภูมิขึ้นลงได้ เครื่องตรวจวัดสารชนิด triple quadrupole mass spectrometer ใน mode MRM, multiple reaction monitoring ถูกใช้เพื่อเพิ่ม sensitivity และ selectivity สามารถตรวจวัดสารที่ระดับต่ำมากได้และเป็นเครื่องมือที่มีความทน (robustness) โดยทั่วไปจะใช้ในงานวิเคราะห์ drug metabolism, pharmacokinetics, environmental contaminants, biological analyses และงานสารตกค้างในอาหาร ต้องมีการตรวจสอบสถานะที่เหมาะสมก่อนการใช้เครื่องมือทุกครั้ง พารามิเตอร์ที่มักมีการตรวจสอบ ได้แก่ ความคงที่ของ retention time, peak area (response) หรือในบางกรณีสามารถตรวจสอบค่า ion intensity ratio ได้เช่นกัน

ดำเนินการควบคุมคุณภาพผลการวิเคราะห์ทั้งภายในและภายนอก โดยการวิเคราะห์ method blank, spiked sample และ duplicate sample ทุกชุดของการสกัดหรืออย่างน้อยประมาณ 5% ของตัวอย่างทดสอบ ในกรณีที่ตัวอย่างจำนวนมาก และหากพบสารที่สงสัยว่าเป็นสารตกค้างสนใจจะต้องทำการตรวจยืนยันด้วยทุกครั้ง การยืนยันชนิดของสารที่ตรวจพบต้องยืนยันผลด้วย ion intensities ratio โดยค่า ion intensities ratio ของสารที่วิเคราะห์แต่ละตัวในตัวอย่าง และ ion intensities ratio เฉลี่ยของสารมาตรฐานนั้น ต้องแตกต่างกันไม่เกิน 30% และยืนยันปริมาณที่ตรวจพบโดยทำการทดสอบตัวอย่างใหม่ (retest) แบบ duplicate test แล้วรายงาน โดยใช้ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำดังกล่าว และเกณฑ์ยอมรับของ %RPD ต้องไม่เกิน 25% สำหรับการควบคุมคุณภาพภายนอก ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับ FAPAS ผล z-score ≤ 2 เป็นการยืนยันว่ากระบวนการวิเคราะห์ทั้งหมดมีความถูกต้องเหมาะสมและสอดคล้องกับเอกสารอ้างอิงเฉพาะด้านและสอดคล้องกับมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025:2017

ผลการเปรียบเทียบระหว่างห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าว โดยใช้ตัวอย่างข้าวบาสมати (Basmati Rice) มีจำนวนสมาชิก ห้องปฏิบัติการเข้าร่วม 3 แห่ง ห้องปฏิบัติการทุกแห่งส่งผลมาเพื่อรับการประเมิน และมีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง รายงานผลการวิเคราะห์ 2 ค่า เนื่องจากใช้วิธีวิเคราะห์ที่ต่างกัน จึงมีผลวิเคราะห์ที่นำมาประเมินจำนวน 4 ค่าของสารแต่ละชนิด เมื่อนำค่าที่สมาชิกรายงานมาเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงและใช้ Expanded

uncertainty (U) คำนวณเป็นค่า RU พบว่าการประเมินความสามารถการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวของสมาชิก ห้องปฏิบัติการ ทั้ง 3 แห่งนั้น อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจสำหรับการวิเคราะห์สาร profenofos มีห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง รายงานผลการวิเคราะห์สาร alpha-BHC, methamidophos, และ fenpropathrin อยู่ในเกณฑ์น่าพอใจ แต่มีห้องปฏิบัติการ 1 แห่ง รายงานผลอยู่ในเกณฑ์ไม่น่าพอใจ โดยห้องปฏิบัติการแห่งนี้รายงานปริมาณไปในทิศทางที่มากกว่าค่าอ้างอิงกรณีวิเคราะห์สาร methamidophos ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงในกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส และรายงานไปในทางน้อยกว่าค่าอ้างอิง กรณีวิเคราะห์สาร alpha-BHC และ fenpropathrin ที่อยู่ในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำ จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าห้องปฏิบัติการมีความเปราะบางเชิงระบบ ซึ่งอาจเกิดจากเทคนิคการวิเคราะห์ในขั้นตอนการสกัด หรือการเตรียมสารมาตรฐาน ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการดังกล่าวควรติดตามหาสาเหตุที่แท้จริงเพื่อการป้องกัน และพัฒนาคุณภาพการวิเคราะห์ที่เป็นงานประจำของห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุป

วิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในข้าวและถั่วเหลืองเมล็ดแห้งด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธี multi-residue method โดยใช้วิธีที่อ้างอิงจาก EN 15662 หรือ QuEChERS ใช้ GC-MS/MS เป็นเครื่องมือตรวจวัด เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี FaPEX[®] ผ่านการทดสอบความใช้ได้เป็นวิธีที่มีคุณลักษณะและสมรรถนะที่เหมาะสม มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะ อยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม SANTE/12682/2019⁽²⁰⁾ เมื่อใช้วิธีพร้อมกับการควบคุมคุณภาพภายในและภายนอก สามารถใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบคุณภาพและความปลอดภัยให้เป็นไปตามข้อกำหนดทางกฎหมายที่ระบุในพระราชบัญญัติอาหาร ปี พ.ศ.2522 และตรวจสอบคุณภาพให้เป็นไปตามมาตรฐานระหว่างประเทศเพื่อการส่งออกสินค้าทางการเกษตรได้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 12 สงขลา สำหรับการเข้าร่วมการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ บริษัท S.M. Chemical Supplies Co., Ltd. สำหรับการสนับสนุน FaPEX[®] cartridge นางวิชาดา จงมีวาสนา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำหรับคำแนะนำข้อเสนอแนะทางวิชาการ

เอกสารอ้างอิง

1. Food and Agriculture Organization (FAO). Save and grow in practice: maize, rice and wheat – a guide to sustainable cereal production. [online]. 2016; [cited 2020 Nov 6]; [124 screens]. Available from: URL: <http://www.fao.org/3/a-i4009e.pdf>.
2. Kukusamude C, Kongsri S. Elemental and isotopic profiling of Thai jasmine rice (Khao Dawk Mali 105) for discrimination of geographical origins in Thung Kula Rong Hai area, Thailand. Food Control 2018; 91: 357–64.

3. United States Department of Agriculture (USDA). Thailand grain and feed annual. GAIN report number: TH9031. [online]. 2019; [cited 2020 Nov 6]; [17 screens]. Available from: URL: https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Grain%20and%20Feed%20Annual_Bangkok_Thailand_3-14-2019.pdf.
4. Hensawang S, Chanpiwat P. Health impact assessment of arsenic and cadmium intake via rice consumption in Bangkok, Thailand. *Environ Monit Assess* 2017; 189(11): 599. (10 pages).
5. FAOSTAT. Online statistical database: production - value of agricultural production. [online]. 2019; [cited 2020 Nov 6]; [1 screen]. Available from: URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.
6. สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย รายประเทศ ระหว่างปี 2561-2563. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 6 พ.ย. 2563]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://www.thairiceexporters.or.th/export%20by%20country%202020.html>.
7. Yang A, Park JH, Abd El-Aty AM, Choi JH, Oh JH, Do JA, et al. Synergistic effect of washing and cooking on the removal of multi-classes of pesticides from various food samples. *Food Control* 2012; 28(1): 99-105.
8. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560). หน้า 8.
9. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 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* 2003; 86(2): 412-31.
10. AOAC Official method 2007.01 pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with Magnesium Sulfate. [online]. 2007; [cited 2020 Nov 6]; [9 screens]. Available from: URL: https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC_2007_01.pdf.
11. BS EN 15662:2008. Foods of plant origin - determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and cleanup by dispersive SPE QuEChERS-method. [online]. 2008; [cited 2020 Nov 6]; [84 screens]. Available from: URL: http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf.
12. Wittayan W, Chaimongkol T, Jongmevasna W. Multiresidue method for determination of 20 organochlorine pesticide residues in fruits and vegetables using modified QuEChERS and GC-ECD/GC-MSD. *Int Food Res J* 2017; 24(6): 2340-6.
13. วีรฤติ วิทยานันท์, ธณิศวรร ไชยมงคล. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัสและกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ตกค้างพร้อมกันในอาหารบางชนิดโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี. *ว กรมวิทย พ* 2561; 60(1): 29-44.

14. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends Analyt Chem* 2011; 30(6): 814-26.
15. Díez C, Traag WA, Zommer P, Marinero P, Atienza J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *J Chromatogr A* 2006; 1131(1-2): 11-23.
16. Lehotay SJ, de Kok A, Hiemstra M, Van Bodegraven P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J AOAC Int* 2005; 88(2): 595-614.
17. Chuang WC, Chen JW, Huang CH, Shyu TH, Lin SK. FaPEX[®] multipesticide residues extraction kit for minimizing sample preparation time in agricultural produce. *J AOAC Int* 2019; 102(6): 1864-76.
18. Sutarno R, Steger HF. The use of certified reference materials in the verification of analytical data and methods. *Talanta* 1985; 32(6): 439-45.
19. Anastassiades M, Mastovská K, Lehotay SJ. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J Chromatogr A* 2003; 1015(1-2): 163-84.
20. SANTE/12682/2019 – analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2020; [cited 2020 Nov 6]; [52 screens]. Available from: URL: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf

Method Development for Pesticide Residue Analysis in Cereal Grains and Pulses using GC-MS/MS

Thoranit Chaimongkol and Weerawut Wittayanon

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Cereal grains and pulses are the most common consumed foods worldwide and the use of pesticides in agricultural production for plant protection has been the cause for increasing concern. The safety of these products must be checked for toxic pesticide residue contamination by reliable and trustable analytical method. The efficiency of QuEChERS and FaPEX[®] method for sample preparation procedure was compared. A modified QuEChERS method was selected and was improved for simultaneous determination of 122 pesticide residues in rice and dried soybeans and the method was established and validated. The samples were initially extracted with acetonitrile (MeCN) and combined with salting out step by the mixture of MgSO_4 and CH_3COONa . The final extract was concentrated and reconstituted with appropriate solvent. The target pesticides were detected by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with MRM technique to minimized interference. The limit of detection and the limit of quantification of the validated method were 0.02 and 0.05 mg/kg for the pesticides respectively. Analysis of fortified rice and dried soybean samples were performed at three different levels (0.05, 0.2 and 1.25 mg/kg). Mean recoveries from eight replicates ranged from 74.3–119.8%, with relative standard deviation, RSD lower than 20. The evaluation showed that the QuEChERS method held excellent linearity at 0.05–2.5 mg/kg ($r > 0.995$). The participation in PT scheme for external quality control showed the satisfactory results and internal quality control was applied for routine analysis. Based on our results, the developed method was successfully applied for the detection and quantification of pesticide residues in rice and cereal grains for health concern and regulatory propose.

Keywords: Pesticide residues, Cereal grains, Pulses, GC-MS/MS, QuEChERS