

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS

อคราพิชญ์ ศิริประภารัตน์ และ วีรุฒิ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพสุธา 11000

บทคัดย่อ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชถูกใช้ในการผลิตผักและผลไม้ของภาคเกษตรกรรมอย่างกว้างขวาง เพื่อป้องกันรักษา และเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทำให้อาจมีการตกค้าง เพื่อให้มั่นใจว่าผักผลไม้ปลอดภัยจากสารเคมีที่เป็นอันตราย จึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์สำหรับการตรวจสอบสารพิษตกค้างในอาหารและผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้นำเสนอประสิทธิภาพของเครื่องมือ LC-QTOF/MS สำหรับการตรวจวัดเชิงปริมาณของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด พร้อมกันในตัวอย่างผักและผลไม้ด้วยเทคนิค full-scan acquisition ทดสอบความใช้ได้ของวิธีร่วมกับวิธี QuEChERS ในการเตรียมตัวอย่าง พบว่าขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 5 และ 10 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในผักและผลไม้ทุกชนิด ตรวจสอบความแม่นยำและความเที่ยงโดยเติมสารมาตรฐานในตัวอย่างที่ระดับ 10, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ระดับละ 10 ซ้ำ พบค่าเฉลี่ยการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ยอมรับระหว่าง 70-120% และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่น้อยกว่า 20% วิธีมีความเป็นเส้นตรงของช่วงการใช้งานที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-100 นาโนกรัมต่อกรัม ($R^2 > 0.99$) ทำการควบคุมคุณภาพภายนอกโดยการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญ ผล z-scores เป็นที่น่าพอใจ ($|z| \leq 2$) การวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS ให้ผลที่สอดคล้องกับเครื่อง LC-MS/MS ที่ได้รับการรับรองความสามารถของห้องปฏิบัติการ บ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาและทดสอบความใช้ได้ด้วยเครื่องมือดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้สำหรับตอบสนองข้อกำหนดทางกฎหมายและการแจ้งเตือนภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช, ผักและผลไม้, QuEChERS, LC-QTOF/MS

Corresponding author E-mail: akarapitch.s@dmsc.mail.go.th

Received: 4 June 2025

Revised: 10 November 2025

Accepted: 11 November 2025

บทนำ

ผักและผลไม้จัดเป็นอาหารที่มีความสำคัญต่อร่างกายและได้รับความนิยมจากผู้บริโภคที่ใส่ใจต่อสุขภาพ เนื่องจากผักและผลไม้เป็นแหล่งของวิตามินเกลือแร่ใยอาหาร และสารพฤกษเคมีต่างๆ ที่มีประโยชน์และจำเป็นต่อร่างกาย เมื่อมีความต้องการบริโภคผักและผลไม้มากขึ้น ทำให้มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชระหว่างการผลิตผักและผลไม้มีปริมาณสูงขึ้น เพื่อเป็นการลดการสูญเสียจากกระบวนการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิต ทำให้เพิ่มรายได้ของเกษตรกรและผู้ประกอบการ โดยข้อมูลจากสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตรในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา ระบุว่าปริมาณการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง⁽¹⁾ สารเคมีเหล่านี้อาจมีการตกค้างจากการใช้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทั้งแบบเฉียบพลันและในระยะยาวต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น เป็นอันตรายต่อระบบต่อมไร้ท่อ ระบบประสาท และระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดมะเร็งด้วยการสะสมในเนื้อเยื่อไขมันของร่างกายมนุษย์ในระยะยาว⁽²⁾ รวมทั้งยังส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการให้ความสำคัญกับการควบคุมการใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค โดยการออกระเบียบข้อบังคับในการกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit, MRL) สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศของกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽³⁾ ระบุค่า MRL ของสารแต่ละชนิดในอาหารแต่ละประเภท และในกรณีของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ไม่ได้กำหนดค่า MRL กฎหมายกำหนดให้ใช้ค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) ตามที่ระบุในบัญชีหมายเลข 3 นอกเหนือจากนั้นให้ใช้ค่า default limit สำหรับพืชที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นค่ามาตรฐานสำหรับอาหารทุกชนิด โดยต้องพิจารณาในบัญชีหมายเลข 1 วัตถุอันตรายชนิดที่ 4 (วอ. 4) ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และที่แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551 ที่กำหนดว่า หากตรวจพบเกิน Limit of Detection ของวิธี จะถือว่าอาหารนั้นเป็นอาหารผิดมาตรฐาน นอกจากนี้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563⁽⁴⁾ กำหนด

คุณลักษณะของวิธีสำหรับตรวจวิเคราะห์สารบางชนิดที่จัดเป็น วอ. 4 และฉบับที่ 449 พ.ศ. 2567⁽⁵⁾ กำหนดค่า MRL เพิ่มเติมจากฉบับที่ 387 ทำให้จำนวนชนิดสารที่มี MRL เพิ่มขึ้นจาก 305 ชนิด เป็น 314 ชนิด กรณีของประเทศในสหภาพยุโรปใช้ค่า default limit ที่ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เช่นเดียวกับกฎหมายของไทยเป็นค่ามาตรฐานของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชราว 1,100 ชนิด ในอาหารทุกชนิดเช่นเดียวกัน⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นการกำหนดค่ามาตรฐานที่เข้มงวดโดยใช้ cautionary principle หรือการป้องกันไว้ก่อนกรณีไม่ทราบความเสี่ยง⁽⁷⁾ ข้อมูลจากการแจ้งเตือนภัยในปี พ.ศ. 2565 ของ Rapid Alert System for Food and Feed network (RASFF) ของสหภาพยุโรป พบว่าในบรรดาการแจ้งเตือนภัยทั้งหมดเป็นการแจ้งเตือนภัยการพบสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากที่สุด โดยพบการตกค้างในผักและผลไม้ซึ่งจัดเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงเป็นอันดับหนึ่ง จำนวน 594 ครั้ง และรองลงมา คือ พืชสมุนไพรและเครื่องเทศ จำนวน 116 ครั้ง⁽⁸⁾ แสดงให้เห็นว่าอาหารประเภทผักและผลไม้จำเป็นต้องได้รับการตรวจติดตามด้านความปลอดภัยอย่างเป็นระบบและต่อเนื่อง

การวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารสามารถใช้เทคนิคและเครื่องมือที่หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่จะทำการวิเคราะห์โดยใช้ chromatography technique ได้แก่ gas chromatography (GC)⁽⁹⁾ และ liquid chromatography (LC)⁽¹⁰⁾ สำหรับสารเคมีที่ละลายน้ำได้ดีและระเหยเป็นไอยากมักใช้เครื่องมือชนิด LC ซึ่งเป็นเทคนิคการแยกสารและตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยใช้หลักการแยกตามความสามารถในการดูดซับหรือแยกสารในเฟสต่างๆ⁽¹¹⁾ ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์สารอินทรีย์ เช่น การวิเคราะห์ยา การตรวจหาสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และใช้สำหรับการวิเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น ในงานวิจัยนี้เป็นการนำเครื่อง LC ที่ใช้งานควบคู่กับเครื่องตรวจวัดชนิดที่มีความละเอียดสูง (high resolution) คือ Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (QTOF/MS)⁽¹²⁾ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารตกค้างจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ในผักและผลไม้ได้ในเวลาไม่นานมานี้ โดย detector ชนิด QTOF/MS นั้นนอกจากจะเป็นเทคนิคที่มี high sensitivity แล้ว ยังให้ high mass accuracy ที่ทำให้การระบุชนิดสารทำได้แม่นยำอีกด้วย เนื่องจากอาศัยหลักการตรวจวัดมวลสารที่ความละเอียดสูง เครื่องมือชนิดนี้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์หาสารตกค้างในน้ำ อาหาร และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่นหลายชนิด โดยในปี พ.ศ. 2561 มีการนำเสนอฐานข้อมูล The sequential window acquisition of all theoretical fragment ions (SWATH)⁽¹³⁾ ที่สร้างโดย LC-QTOF/MS ใช้สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในไข่ไก่และอาหารทารก ซึ่งสามารถระบุชนิดและปริมาณได้อย่างถูกต้องน่าเชื่อถือ โดยมี linearity ของวิธีในช่วง 0.001–0.250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับไข่ไก่ และ 0.003–0.200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับอาหารทารก และเป็นไปตามค่ามาตรฐาน (MRL) ของสหภาพยุโรป (EU) ในปี พ.ศ. 2562 มีการรายงานการตรวจคัดกรองสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบ non-target analysis ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS ในตัวอย่างอาหารที่มีเมทริกซ์ซับซ้อน ได้แก่ พริกและพริกไทยเสฉวน สามารถวิเคราะห์ที่ปริมาณต่ำมากได้ถึง 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁴⁾ สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างหรือการสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหารมีหลายวิธี เช่น วิธี QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe)⁽¹⁵⁾ วิธี Solid-Phase Extraction (SPE)⁽¹⁶⁾ และวิธี Liquid-Liquid Extraction (LLE)⁽¹⁷⁾ เนื่องจากวิธีเหล่านี้เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ มีประสิทธิภาพดี และสามารถลด matrix interference จากอาหารได้ดี นอกจากนี้มีเทคนิคเตรียมตัวอย่างขั้นสูงอื่นๆ เช่น Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE)⁽¹⁸⁾ Microwave-Assisted Extraction (MAE)⁽¹⁹⁾ และ Pressurized Liquid Extraction (PLE)⁽²⁰⁾ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้เช่นเดียวกัน ในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานวิธีการสกัดตัวอย่างด้วยไมโครเวฟ (Microwave-assisted extraction) ถูกนำมาใช้ควบคู่กับ LC-MS/MS⁽¹⁹⁾ เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ในแอปเปิล อย่างไรก็ตามเทคนิคขั้นสูงเหล่านี้ยังไม่ได้ถูกนำไปใช้งานอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีข้อจำกัดด้วยเป็นเทคนิคการสกัดที่ยุ่งยาก ซับซ้อน มีราคาสูง และการควบคุมเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดให้มีประสิทธิภาพคงที่ยังเป็นเรื่องท้าทาย สำหรับการพัฒนายุทธวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยขั้นนี้ใช้ตัวอย่างประเภทผักและผลไม้ (vegetables and fruits commodities) ที่มีความหลากหลายด้านองค์ประกอบของเนื้อตัวอย่าง เช่น สัตว์ส่วนของน้ำที่เป็นองค์ประกอบ ความเป็นกรดต่างชนิดและปริมาณรงควัตถุ ปริมาณไขมัน เป็นต้น นอกจากนี้วิธีต้องครอบคลุมสารจำนวนมากถึง 144 ชนิด สารเหล่านี้ถูกคัดเลือกเพื่อให้ครอบคลุมชนิดสารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขที่เกี่ยวข้อง และมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) มากที่สุด ซึ่งสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลายทั้งด้านขนาด องค์ประกอบ และความเป็นขั้วของสารการตรวจวิเคราะห์สารตกค้างจำนวนมากจำเป็นต้องมีวิธีการเตรียมตัวอย่างหรือการสกัดที่ครอบคลุมสารได้กว้างขวาง แต่มีค่าการคืนกลับที่เหมาะสมในทุกชนิดสารเมื่อวิเคราะห์ในคราวเดียวกัน วิธี QuEChERS รวดเร็ว ง่าย ราคาถูก มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย เป็นวิธีที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าดีมีข้อดีหลายประการ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสกัดสารที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันและสามารถประยุกต์ใช้กับชนิดตัวอย่างที่หลากหลายได้ ปัจจุบันวิธี QuEChERS เป็นหนึ่งในเทคนิคที่เป็นที่นิยมสำหรับการสกัดตัวอย่างผักและผลไม้ที่ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อพัฒนายุทธวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยใช้เครื่อง LC-QTOF/MS ควบคู่กับวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ QuEChERS ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์สารเคมีเป้าหมาย จำนวน 144 ชนิด การศึกษานี้ได้เลือกตัวแทนตัวอย่างผักและผลไม้ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ แอปเปิล กะหล่ำปลี แครอท แตงกวา อุ่น ผักกาดหอม มะนาว มะม่วง สตรอว์เบอร์รี และมะเขือเทศ⁽²¹⁾ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค LC-QTOF/MS กับเครื่องมือ LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานเป้าหมาย (goal standard method)

ที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 โดยการทดสอบทางสถิติและเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำ ทำการเข้าร่วมโปรแกรมทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing, PT) กับหน่วย PT provider ทั้งในและต่างประเทศ เพื่อประเมินความแม่นยำและความน่าเชื่อถือของวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้กับข้อกำหนดทางกฎหมายและมาตรฐานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้านอาหารได้ และสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการภายใต้ภารกิจหลักของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: เป็นสารละลายผสมของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด รายชื่อสาร ดังแสดงในตารางที่ 1 เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (Certified Reference Material, CRM) RD0686521.5: KIT of 144 components-part 1-13 of 13:144 components, มีความเข้มข้นอ้างอิงรับรองประมาณ 100 ± 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ยี่ห้อ CPACHEM, C.P.A. Chem Ltd., France)

สารเคมี: acetonitrile (HPLC, Merck, USA) QuEChERS Extraction Packet, 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 และ Dispersive SPE EN เป็นส่วนผสมของ $MgSO_4$ 900 มิลลิกรัม Primary and Secondary Amine (PSA) 50 มิลลิกรัม และ graphite carbon black (GCB) 50 มิลลิกรัม (Agilent Technologies, USA) DI water (Type I มีค่า resistivity > 18 mΩ.cm) water (LC-MS grade, Supelco, Germany) และ methanol (Hyper grade for LC-MS, LiChrosolv, USA)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายผสมความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐาน 144 ชนิด ใน acetonitrile โดยเปิดสารละลายมาตรฐานผสมแต่ละขวด จำนวน 6 ขวด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-18^{\circ}C$ (EVERmed รุ่น LF 625 S xPRO, ITALY) เตรียม intermediate standard solution ก่อนการใช้งาน ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน intermediate standard solution ลง centrifuge tube ที่บรรจุตัวอย่างที่เป็น blank น้ำหนัก 10.0 ± 0.1 กรัม จำนวน 6 หลอด คำนวณปริมาณสารมาตรฐานที่เติมให้ได้ช่วงความเข้มข้น 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม แล้วสกัดตามวิธี ใช้สารสกัดที่ได้สำหรับการวิเคราะห์ทันทีหรือสามารถเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-18^{\circ}C$ ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียด 0.001 กรัม (LC 620S) และ 0.01 มิลลิกรัม (MC 210S) (Sartorius, Germany), เครื่องบดป่นอาหาร (RONIC, Poland), เครื่องหมุนปั่นผสมสารละลาย Vortex-2Genie (Scientific Industries, USA), เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (ยี่ห้อ REACTI-THERM III #TS-18824, Thermo Scientific, USA), micropipette ขนาด 2-20 ไมโครลิตร ขนาด 20-200 ไมโครลิตร และขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany), centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร, ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า $-18^{\circ}C$, certified volumetric flask, เครื่องแก้วทุกชนิดล้างด้วย acetone 2 ครั้ง (Optima LC/MS grade, Fisher Brand, UK) และ n-hexane (n-Hexane AR, MERCK, Germany) 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

เครื่อง LC-QTOF/MS: Agilent 1290 Infinity II-G6546A (Agilent Technology, USA) ใช้ ZORBAX Eclipse Plus C18 $1.8 \mu m$ 3.0×150 mm (Agilent Technology, USA) มีสถานะเครื่อง ดังนี้

mobile phase A: water + 4.5 mM ammonium formate + 0.5 mM ammonium fluoride
+ 0.1% formic acid

mobile phase B: methanol + 4.5 mM ammonium formate + 0.5 mM ammonium
fluoride + 0.1% formic acid

flow rate: 0.45 ml/min

injection volume: 5 μ l

column temperature: 45°C

gradient profile – Agilent G7120A

Total time (min)	flow rate (ml/min)	% mobile phase A	% mobile phase B
0.0	0.45	98	2
0.5	0.45	98	2
1.0	0.45	50	50
4.0	0.45	35	65
16.0	0.45	0	100
18.0	0.45	0	100
18.1	0.45	98	2
20.0	0.45	98	2

QTOF/MS conditions:

Polarity: Positive ionization

Ionization mode: Dual AJS ESI

Drying gas temperature: 325°C

Drying gas flow rate: 10 L/min

Nebulizer gas pressure: 40 psig

Sheath gas temperature: 400°C

Sheath gas flow rate: 12 L/min

Capillary voltage: 4,000 V

MS scan range (m/z): 50 to 1,000

Scan mode: Agilent All Ions MS/MS screening workflow

CE value (V): 0, 15, 35

Reference ions (m/z): 121.0509/922.0098

หมายเหตุ: Reference ions คือ ไอออนที่มีค่ามวลประจุ (m/z) คงที่และถูกใช้เป็นตัวอ้างอิงเพื่อปรับเทียบความแม่นยำของมวล (mass accuracy) ของเครื่อง LC-QTOF/MS แบบ real-time ระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
3-hydroxy carbofuran	3.633	238.1074	107.0491	163.0754	
Abamectin B1a	15.247	895.4791	145.0851	577.5173	876.7986
Acetamiprid	3.633	223.0745	98.9996	126.0105	
Acibenzolar-S-methyl (BTH)	7.579	210.9994	136.0090		
Aldicarb	4.546	116.0530	61.0106	89.0419	
Aldicarb Sulphoxide	2.851	89.0420	65.0056		
Aldicarb Sulfone	2.918	223.0747	62.9899		
Ametoctradin	11.181	276.2183	149.0819	176.0931	
Aminocarb	2.918	209.1285	137.0835		
Anilazine	8.162	276.9624	126.0105	274.9653	
Atrazine	6.387	216.1010	182.9954	111.9944	
Azamethiphos	4.917	324.9809	182.9954	111.9944	
Azoxystrobin	7.169	404.1241	329.0795	372.0979	
Bendiocarb	5.129	224.0917	109.0284		
Bioresmethrin	15.022	339.1955	128.0616	171.0799	
Bixafen	9.420	414.0382	265.9927	394.0309	
Boscalid (Nicobifen)	7.712	343.0399	307.0633		
Bromacil	5.315	261.0233	187.9342	131.9443	
Bupirimate	9.129	317.1642	166.0975	108.0114	
Carbaryl	5.341	202.0863	127.0542	145.0648	115.542
Carbendazim (Azole)	3.421	192.0768	160.0505		
Carbetamide	4.758	237.1234	118.0863	120.0444	
Carbofuran	5.288	222.1125	55.0542	123.0441	
Carbofuran-3-keto	9.314	253.1183	115.0542	161.0597	
Carbosulfan	15.658	381.2206	118.0685	76.0216	
Carboxin	5.540	236.0740	93.0573	143.0161	
Chlorbromuron	7.659	292.9687	203.9205	182.0241	
Chloridazon (PAC)	3.845	222.0429	104.0495		
Chloroxuron	8.321	291.0895	72.0449		
Chlortoluron (Chlorotoluron)	6.030	213.0789	72.0449		
Clethodim	11.844	360.1395	136.0757	164.0706	
Clothianidin	3.48	250.0160	131.9669		
Cyanazine (Fortrol)	4.785	241.0963	104.0010		
Cycluron	6.811	199.1805	72.0444	89.0709	
Cyflumetofen	11.897	448.1730	173.0208		
Cyproconazole (I)	8.162	292.1211	125.0153	70.0400	
Cyproconazole (II)	8.546	292.1211	125.0153	169.0083	
Demeton-S-Methylsulfone	3.063	263.0171	169.0083		
Demeton-S-Methyl sulfoxide	3.010	247.0222	169.0083		
Diethofencarb	7.394	268.1543	180.1019	152.0706	
Dimefox	3.500	155.0744	110.0166		

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
Dimethachlor	6.864	256.1099	148.1121	224.0837	
Dimethomorph (E)	7.500	388.1310	301.0626	165.0546	
Dimethomorph (Z)	7.963	388.1310	301.0626	165.0546	
Diphenamid	6.811	240.1383	134.0964		
Diuron	6.493	233.0243	132.9606	72.0449	
Epoxiconazole (BAS 480F)	8.983	330.0804	123.0241	121.0448	
Ethiofencarb	5.871	226.0896	77.0386	107.0491	
Ethiofencarb sulfone	3.341	258.0795	58.0287	107.0491	
Ethiofencarb sulfoxide	3.408	242.0845	185.0631	107.0491	
Ethiofumesate	6.626	287.0948	241.0529	259.0635	
Ethirimol	4.931	210.1601	140.1070		
Etofenprox	15.764	359.2006	183.0804	107.0491	
Etoxazole	13.592	360.1770	304.1132	141.0146	
Famoxadone	10.400	392.1605	239.0941	93.0573	
Fenamidone	7.579	312.1165	236.1182	92.0495	
Fenamiphos	9.354	304.1131	201.9848		
Fenarimol	8.745	331.0399	268.0524	81.0447	
Fenbuconazole	9.036	337.1215	125.0153	70.0400	
Fenhexamid	8.718	302.0709	143.0128	97.1012	
Fenobucarb (Baycarb)	7.288	208.1332	95.0491		
Fenothiocarb	9.504	254.1209	72.0443		
Fenoxycarb	9.354	302.1387	88.0393		
Fenpropidin	6.533	274.2529	86.0964		
Fensulfothion	6.281	309.0379	140.0290	252.9753	
Fenthion-sulfoxide (Mesulfenfos)	5.288	295.0222	109.0049	279.9987	
Flufenacet (Fluthiamide)	8.851	364.0737	124.0539	152.0506	
Flufenoxuron	13.314	489.0435	141.0113		
Fluometuron	5.858	233.0896	145.0260	72.0444	
Fluopyram	8.533	397.0537	208.0130	173.0205	
Fluquinconazole	8.559	376.0163	272.0147		
Fluridone	6.957	330.1100	309.0960		
Flurtamone	7.328	334.1049	227.0667		
Flusilazole	9.288	316.1076	169.0473		
Hexazinone	5.315	253.1659	71.0604	171.0876	
Hexythiazox	13.115	353.1085	168.0570	228.0240	
Imazalil (Enilconazole)	5.791	297.0556	158.9763	69.0447	
Imidacloprid	3.381	256.0596	209.0589		
Indoxacarb	11.248	528.0780	150.0100	203.0184	
Iprovalicarb	8.758	321.2173	116.0706	119.0855	

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
Isoprocarb	6.387	216.1019	77.0386	95.0491	
Isoproturon	6.440	207.1492	165.1022		
Linuron	7.354	249.0192	182.0241	159.9715	
Lufenuron	12.585	510.9857	158.0412	141.0135	
Malaoxon	5.156	315.0662	71.0128		
Mepanipyrim	8.665	224.1182	77.0386		
Metaflumizone	12.572	507.1250	178.0463		
Metalaxyl	6.507	280.1543	220.1332	192.1383	
Methiocarb (Mercaptodimethur)	7.526	226.0896	107.0491	121.0648	
Methomyl	3.116	88.0216	58.0287	72.9981	
Methoxyfenozide (Intrepid)	8.122	369.2173	149.0597		
Metobromuron	6.122	259.0077	169.9600	91.0416	
Metolachlor	9.341	284.1412	176.1434	252.1150	
Metrafenone	10.850	409.0645	166.0624	209.0808	
Monocrotophos (Azodrin)	3.129	224.0682	58.0287		
Monolinuron	5.606	215.0582	126.0100	98.9996	
Novaluron	11.539	493.0196	141.0146	158.0412	
Omethoate	2.785	214.0297	78.9943		
Oxamyl	2.931	72.0444	72.0444	124.9821	
Penconazole	9.857	284.0716	158.9763		
Phenthoate (Fenthoate)	9.619	321.0379	124.9821		
Pirimicarb	5.513	239.1503	72.0444		
Promecarb	7.871	208.1332	94.0413	109.0648	
Prometon	6.533	226.1662	86.0349		
Prometryn	8.321	242.1434	68.0243	200.0964	
Propiconazole	10.307	342.0771	158.9763		
Propoxur	5.116	111.0440	58.0287	93.0335	
Propyzamide (Pronamide)	8.162	256.0290	189.9821	172.9556	
Prosulfocarb	11.870	252.1417	91.0542		
Prothoate	6.652	286.0695	124.9821	96.9508	
Pyraclostrobin	10.466	388.1059	133.0522	163.0628	
Pyridaben	14.651	365.1449	132.0934	147.1168	
Propoxur	8.824	295.0399	93.0573		
Propyzamide (Pronamide)	7.420	200.1182	82.0651	80.0495	
Prosulfocarb	9.354	395.1489	213.0910	192.0781	
Prothoate	8.281	332.1569	159.0750		
Pyraclostrobin	5.328	202.0854	68.0243	124.0869	
Pyridaben	11.460	748.4994	142.1222		
Pyrifenoxy	10.480	732.4681	98.0964	142.1226	
Pyrimethanil	11.274	746.4838	142.1226	144.1383	
Rotenone	7.367	298.2741	100.1121		

ตารางที่ 1 ข้อมูล mass transition ของสารต่างๆ ในเครื่อง LC-QTOF/MS (ต่อ)

Pesticides	RT (min)	Quantifier ion (m/z)	Quantifier ion I (m/z)	Quantifier ion II (m/z)	Quantifier ion III (m/z)
Rotenone	7.367	298.2741	100.1121	144.1383	
Sedaxane	3.765	202.0433	175.0324	131.0604	
Simazine	9.937	308.1524	125.0153	70.0400	
Spinetoram	9.486	297.1598	133.0648		
Spinosyn A	12.466	334.1681	145.0522	117.0209	
Spinosyn D	6.533	226.1662	170.1036		
Spiroxamine	7.818	230.1167	104.0010	174.0541	
Thiabendazole (Tiabendazole)	8.705	372.0288	160.9731	158.9761	
Tebuconazole (Terbuconazole)	3.898	253.0309	90.0338	126.0105	
Tebufenozide	3.116	292.0266	131.9664		
Tebufenpyrad	10.864	258.0714	90.0464	125.0153	
Terbumeton	5.593	355.0563	107.9936	88.0215	
Terbutylazine (TERBA)	4.838	241.0981	119.0481		
Tetraconazole	3.288	251.1060	76.0393		
Thiacloprid	3.447	104.0165	63.9977		
Thiamethoxam	4.944	343.0529	85.9695	151.0324	
Thiobencarb (Benthiocarb)	10.652	300.9616	174.9710	124.9821	
Thiodicarb	8.480	296.1160	99.0791		
Thiofanox	13.314	304.0091	142.9217		
Thiofanox-sulfone	4.282	190.0433	109.0107	136.0215	
Thiofanox-sulfoxide	11.407	409.1370	116.0495	186.0525	
Thiophanate-methyl	11.46	346.0929	69.0447	73.0648	
Tolclofos-methyl	8.851	318.1368	125.0153	70.0400	
Triadimenol	3.580	288.0488	146.0634	58.0287	
Triallate	3.633	238.1074	107.0491	163.0754	
Tricyclazole	15.247	895.4791	145.0851	577.5173	876.7986
Trifloxystrobin	3.633	223.0745	98.9996	126.0105	
Triflumizole	7.579	210.9994	136.0090		
Triticonazole	4.546	116.0530	61.0106	89.0419	
Vamidothion	2.851	89.0420	65.0056		

หมายเหตุ: Collision Energy (CE) = 0, 15, 35 V

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดตัวอย่าง
ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีเป็น
ผักและผลไม้ 10 ชนิด คัดเลือกตาม SANTE/
11312/2021 (V2)⁽²¹⁾ ได้แก่แอปเปิล กะหล่ำปลี แครอท
แตงกวา องุ่น ผักกาดหอม มะนาว มะม่วง สตรอว์เบอร์รี
และมะเขือเทศ โดยบดปั่นแต่ละชนิดให้เป็น
เนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดปั่น ชั่งแบ่งตัวอย่างเพื่อเป็น
analytical portions โดยชั่งตัวอย่างสำหรับวิธี

QuEChERS น้ำหนัก 10.0 ± 0.1 กรัม ลงใน
centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม acetonitrile
10 ml เขย่า เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม QuEChERS
Extraction Packets, EN method เขย่า เป็นเวลา
1 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 4,000 รอบ
ต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารสกัดส่วนใส ปริมาตร
2 ml clean up ด้วย dispersive SPE เขย่า เป็นเวลา
1 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม

จากนั้นนำส่วนสารละลายใส่กรองด้วย Filter Tubes Nylon 0.2 μm นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ (Method development)

พัฒนาวิธีโดยอ้างอิงจากวิธีมาตรฐานของสหภาพยุโรป EN 15662:2018⁽²²⁾ ซึ่งเป็นการตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชหลายชนิดพร้อมกันในอาหารที่มาจากพืช เช่น ผักและผลไม้ มีกระบวนการสกัดแบบ QuEChERS ด้วย citrate-buffered ทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive SPE และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC และ LC ดัดแปลงวิธีอ้างอิง โดยใช้เครื่อง LC-QTOF/MS ค้นหาสถานะของเครื่องมือทั้งขั้นตอนการแยกสารด้วยเครื่อง LC ปรับสัดส่วนของสารเคมีตัวทำละลาย mobile phase และ column ที่ใช้ พัฒนาขั้นตอนการตรวจวัดด้วย detector ชนิด QTOF/MS ตั้งเกณฑ์พิจารณาความถูกต้องของมวลสาร (≤ 5 ppm) คัดเลือกรูปแบบไอโซโทป ตั้งเกณฑ์ความแตกต่างของ RT โดยใช้ $RT \pm 0.2$ min และคัดเลือกไอออนที่เหมาะสมอย่างน้อย 2 ไอออน ที่จำเพาะของสารสนใจแต่ละชนิดด้วยการหา mass transition condition สำหรับใช้เป็น quantification ion และ qualification ion

ความจำเพาะของวิธี (Specificity/Selectivity)

ฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่ 50 นาโนกรัมต่อกรัม เข้าเครื่อง LC-QTOF/MS ตามสภาวะที่กำหนด จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกค่า retention time (RT) แล้วทดสอบความจำเพาะของวิธีโดยวิเคราะห์ method blank (reagent blank) และ sample blank ทั้ง 10 ชนิด เมื่อไม่พบพีคหรือพบพีคที่มีสัญญาณ signal-to-noise ratio (S/N) น้อยกว่า 3 ที่มี RT และ/หรือค่า m/z ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานถือว่าวิธีปราศจากสารรบกวนและวิธีมีความจำเพาะ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity of calibration curve)

สร้างกราฟมาตรฐานแบบ procedural standard calibration โดยเติม intermediate standard solution ใน sample blank ทั้ง 10 ชนิด ที่ 6 ระดับ

ความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม จากนั้นสกัดตามวิธีแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC-QTOF/MS แบบสุ่ม (random, $n = 3$) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (determination coefficient, R^2) ค่าที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 (เกณฑ์ยอมรับ $R^2 > 0.99$) นอกจากนี้ทำการตรวจสอบความถูกต้องของความเข้มข้นที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยค่าที่คำนวณได้ต้องไม่ต่างจากความเข้มข้นที่เตรียมเกิน 20%

ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

หาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับ LOD (5 นาโนกรัมต่อกรัม) ใน sample blank แล้วสกัดตามขั้นตอนฉีดเข้าเครื่อง LC-QTOF/MS จำนวน 10 ซ้ำ ($n = 10$) คำนวณค่า (S/N) ค่า estimated LOD คือ ระดับความเข้มข้นที่มีสัญญาณ S/N มากกว่า 3

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

หาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) กรณี pesticide residue สามารถประมาณค่า LOQ เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม (target LOQ) ซึ่งถือว่าเป็นค่า default limit ตามกฎหมายได้ ทำโดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับ LOQ (10 นาโนกรัมต่อกรัม) ใน sample blank แล้วสกัดตามขั้นตอน วิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ ($n = 10$) วิเคราะห์ตามวิธี แล้วคำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 70-120% และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) กำหนดเกณฑ์ยอมรับ $\leq 20\%$

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (Linear of working range)

ศึกษาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ โดยเติมสารมาตรฐานลงใน sample blank ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ ($n = 3$) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง spiked concentration กับ concentration found คำนวณหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) โดยค่า R^2 ที่ได้ต้องมีค่าเข้าใกล้ 1 (เกณฑ์ยอมรับ $R^2 > 0.95$)

ความแม่นยำและความเที่ยง (Accuracy and Precision)

เติมสารมาตรฐานในตัวอย่าง (sample blank) ที่ระดับ LOQ, $5 \times \text{LOQ}$ และ $10 \times \text{LOQ}$ ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ วิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ ($n = 10$) แล้วคำนวณ %recovery และ %RSD โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ (accuracy): mean recovery 70–120% และเกณฑ์ยอมรับความเที่ยง (precision): %RSD มีค่า $\leq 20\%$

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด (Estimation of Measurement Uncertainty, MU) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอาหาร ที่ทำการทดสอบใช้วิธีการของ EURACHEM⁽²³⁾ ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้ทุกแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน จากนั้นคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ค่า $k = 2$ เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน

การเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ระหว่างเครื่อง LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS

วิเคราะห์ตัวอย่างที่ส่งตรวจ ณ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จำนวน 40 ตัวอย่าง ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS เปรียบเทียบผลที่ได้กับผลวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS ที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อประเมินความสามารถของเครื่องมือ โดยใช้การทดสอบของสถิติที่เหมาะสม

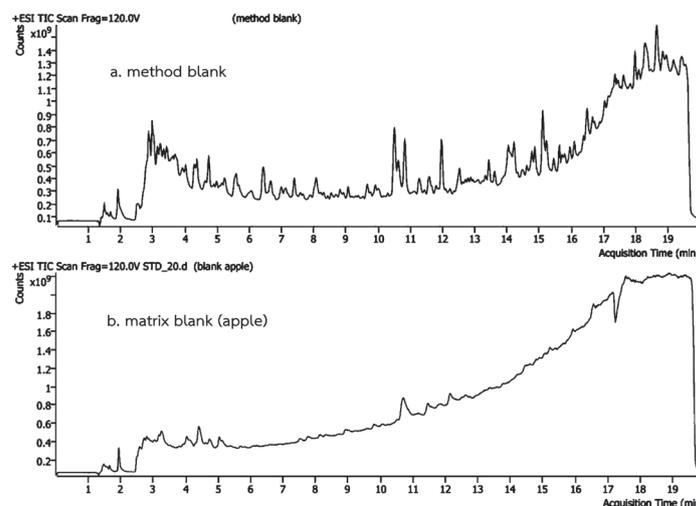
การเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญในตัวอย่างวิเคราะห์

เข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญ (Proficiency Testing program) กับหน่วยงานหรือองค์กรที่ได้รับการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2023 ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น FAPAS สหราชอาณาจักร, Progetto Trieste สาธารณรัฐอิตาลี, บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด และหน่วยงานราชการ เช่น สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (NIMT) กรมวิชาการเกษตร เป็นต้น ซึ่งถือเป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ (Interlaboratory comparison)

ผล

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาการวิเคราะห์ method blank และ sample blank ในตัวอย่างผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ตรวจไม่พบสารรบกวนที่ทำให้พีคตรงหรือใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS ทำให้สามารถตรวจวัดพีคของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้ง 144 ชนิด ได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีความจำเพาะและมีความไวในการตรวจวัดสารสนใจได้ถูกต้อง ตัวอย่าง Total ion chromatogram (TIC) ของการวิเคราะห์ method blank และ apple ที่เป็น matrix blank ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Total ion chromatogram ของการวิเคราะห์ method blank (a) และ matrix blank (apple) (b)

สามารถสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area (response) ของสารสนใจมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 5-100 นาโนกรัมต่อกรัม ตัวอย่างสาร idoxacarb และ metalaxyl ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยกราฟมาตรฐานของสารทุกชนิดมีค่า R^2 ในช่วง 0.990-1.00 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ยอมรับที่ 0.99 ผลการทวนสอบความเข้มข้นแต่ละจุดโดยการทำ “back-calculated concentration” พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างไม่เกิน 20% ของความเข้มข้นที่เตรียม ตัวอย่างสาร acetamiprid, diuron, indoxacarb, metalaxyl และ oxamyl ดังแสดงในตารางที่ 2

การยืนยันความถูกต้องของชนิดสารสนใจจาก chromatogram แสดงด้วยการซ้อนทับกันระหว่าง quantifier ion peak และ qualifier ion peak (I, II และ III) ของสารมาตรฐานที่ RT 6.586 และ 11.306 min ของสาร idoxacarb และ metalaxyl ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 สอดคล้องตามเกณฑ์ข้อกำหนดการยืนยันสารที่ต้องการวิเคราะห์ตาม SANTE⁽²¹⁾

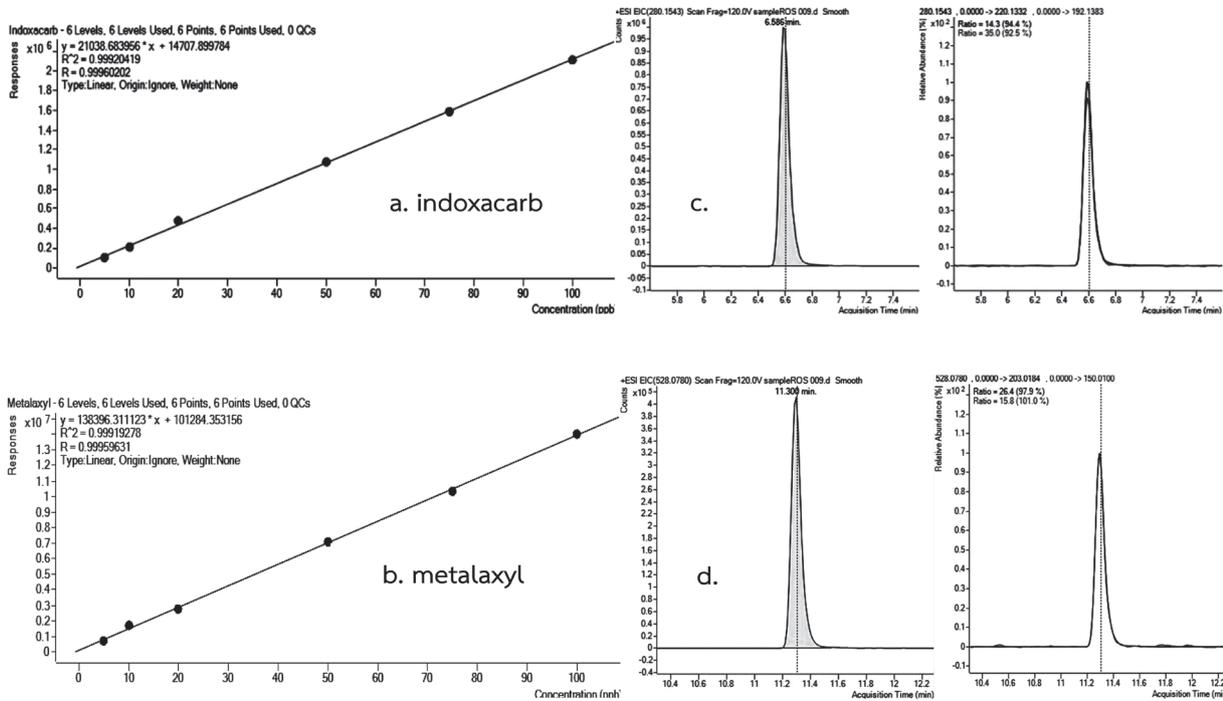
ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) ของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทุกชนิดเมื่อฉีดเข้าเครื่อง LC-QTOF/MS เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม คำนวณค่า signal to noise (S/N) มีค่ามากกว่า 3 และยืนยันค่า LOD โดยการสกัดตัวอย่างแล้ววิเคราะห์ 10 ซ้ำ ($n = 10$) ผลพบสารทุกชนิดทั้ง 10 ซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยมีขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) มีค่าเท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีดังแสดงในตารางที่ 3 หาคความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ, $5 \times LOQ$ และ $10 \times LOQ$ ที่ 10, 50 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ผลการทดสอบความแม่นยำ (%recovery) ที่ระดับ LOQ มีค่าระหว่าง 77.2-119.3% และความเที่ยงจาก RSD มีค่าระหว่าง 1.5-19.6% ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับกลาง ($5 \times LOQ$) มีค่า 74.0-119.8% และ 1.3-19.0% ตามลำดับ และที่ระดับสูง ($10 \times LOQ$) มีค่า 74.0-119.8% และ 0.7-17.0% ตามลำดับ ซึ่งอยู่

ในเกณฑ์ยอมรับ 70-120% และ $\leq 20\%$ ยกเว้น abamectin B1a, anilazine และ carbosulfan ในบางชนิด ตัวอย่างผักและผลไม้

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linearity of working range) พบว่าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 10-100 ng/g โดยช่วงของการวิเคราะห์นี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเนื่องจากการเตรียมสารมาตรฐานโดยการสกัด (procedural calibration curve) ด้วยคุณลักษณะทั้งหมดที่ทำการทดสอบความใช้ได้นี้ แสดงว่าสามารถใช้วิธีวิเคราะห์สารสนใจดังกล่าวได้ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัดตามแนวของ ISO GUM Approach⁽²³⁾ หรือ Bottom-up Approach (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$) พบว่าแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่สุดคือ standard concentration (36.3%) และ method precision (36.3%) ตามด้วย recovery (9.8%), sample weigh (7.0%), calibration curve (C_0) (5.5%) และ Volume of sample taken (5.0%) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 ตัวอย่างการคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยาย (Expanded Uncertainty) พบค่า Combined Relative Standard Uncertainty ($u_c(X)/X$) มีค่าเป็น 0.044 ในกรณีตัวอย่างตรวจพบสาร carbaryl ปริมาณ 0.05 mg/kg ได้ค่า $u_c(x) = 0.044 \times 0.05 = 0.0022$ mg/kg จากนั้นขยายความไม่แน่นอนมาตรฐานด้วยการคูณด้วยค่า Coverage factor, k ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Expanded Uncertainty at Confidence Interval (C.I.) 95% ($k = 2$) ได้ $U(x) = 2 \times 0.0022 = 0.0044$ mg/kg การรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ เช่น พบ carbaryl 0.05±0.0044 mg/kg (ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95%, $k = 2$) โดยค่าความไม่แน่นอนที่รายงานมีค่าคิดเป็น ร้อยละ 8.8 ของค่าที่รายงาน ซึ่งสัดส่วนที่น้อยนี้อาจมาจากการทำการทดสอบความใช้ได้ที่วันและเวลาเดียวกันที่สถานะเดียวกัน ทำให้ได้ค่าความไม่แน่นอนจากความเที่ยงต่ำ หากเก็บข้อมูลการวิเคราะห์ต่างวันเวลากันจะได้ข้อมูลที่สะท้อนความเป็นจริงมากขึ้น



ภาพที่ 2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและ Chromatogram แสดง quantification ion peak, qualification ion peak, ion intensity ratio และ mass-to-charge (m/z) ของ indoxacarb (a และ c) และ metalaxyl (b และ d)

ตารางที่ 2 Linear equation และ R² จากการทำการกราฟสารมาตรฐานของตัวอย่างผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด ในช่วงตั้งแต่ 5, 10, 20, 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อกรัม

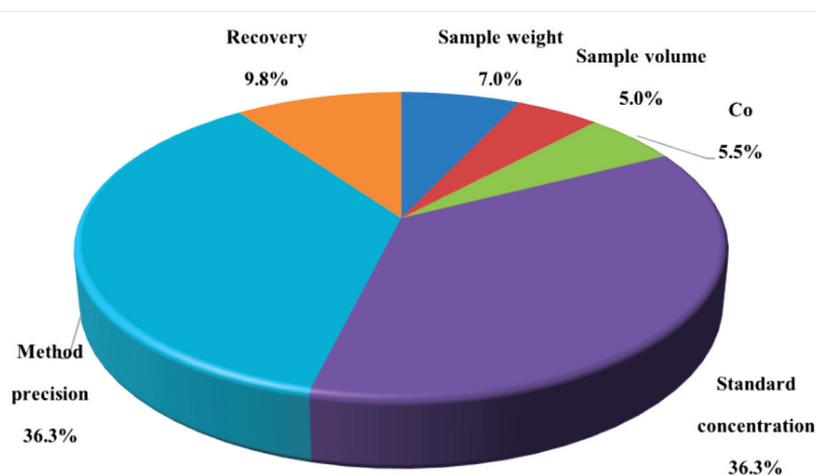
Matrix	Linear equation (R ²)				
	acetamiprid	diuron	indoxacarb	metalaxyl	oxamyl
apple	y = 89689x + 226048 (0.9985)	y = 52489x + 1075 (0.9990)	y = 37589x + 404563 (0.9990)	y = 138396x + 101284 (0.9992)	y = 49346x + 23043 (0.9988)
cabbage	y = 31358x + 30632 (1.0000)	y = 5272.x + 220054.19 (0.9926)	y = 26308x + 14621 (0.9988)	y = 109507x + 317990 (0.9933)	y = 36378x + 138561 (0.9901)
carrot	y = 73392x + 406424 (0.9945)	y = 56230x + 294752 (0.9921)	y = 4043261x + 103926 (0.9977)	y = 11753038x - 13295 (0.9938)	y = 46363x + 132805 (0.9973)
cucumber	y = 67514x + 285462 (0.9949)	y = 53456x + 217815 (0.9951)	y = 35945x + 93284 (0.9959)	y = 110431x + 387731 (0.9941)	y = 43661x + 122220 (0.9982)
grapes	y = 95098x + 333708 (0.9985)	y = 48728x + 223415 (0.9905)	y = 37584x + 162191 (0.9937)	y = 120555x + 48788 (0.9978)	y = 50758x + 93579 (1.0000)
lettuce	y = 79172x + 335949 (0.9976)	y = 45116x + 193429 (0.9973)	y = 32251x + 89784 (0.9988)	y = 1121826x + 25760 (0.9994)	y = 41987x + 60370 (0.9999)
lemon	y = 14606x - 10204 (0.9975)	y = 98088x + 3176 (0.9934)	y = 8134x - 10400 (0.9905)	y = 164635x + 883 (0.9900)	y = 23809x - 17997 (0.9959)
mango	y = 55941x + 213735 (0.9962)	y = 58963x - 8962 (0.9925)	y = 11996x + 20166 (0.9979)	y = 112544x + 293017 (0.9977)	y = 15525x + 70750 (0.9924)
strawberry	y = 1.0033x + 0.3902 (0.9967)	y = 1.0041x + 0.8509 (0.9928)	y = 1.0018x + 0.3826 (0.9984)	y = 0.9952x + 0.8337 (0.9972)	y = 0.9998x + 0.0076 (0.9999)
tomato	y = 1102631x + 305788 (0.9920)	y = 122626x + 879648 (0.9905)	y = 36701x + 11881 (0.9970)	y = 180865x + 1932336 (0.9914)	y = 48780x + 192210 (0.9962)

ตารางที่ 3 ความแม่นยำ (Mean %recovery) ความเที่ยง (%RSD) และความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linear of working range) ของการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้ทั้ง 10 ชนิด

Matrix	S/N at LOD	Accuracy & precision (n = 10)					
		10 ng/g		50 ng/g		100 ng/g	
		%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD	%Recovery	%RSD
apple	> 3	77.2-119.8	3.9-19.1	77.2-119.8	3.9-19.0	77.2-119.8	3.9-19.3
cabbage	> 3	83.1-112.6	3.3-19.3	83.1-112.6	1.3-5.4	83.1-112.6	0.7-17.0
carrot	> 3	73.5-118.5	1.8-18.7	73.5-118.5	1.6-18.6	73.5-118.5	1.3-8.2
cucumber	> 3	74.0-115.1	5.5-19.0	74.0-115.1	1.1-4.6	74.0-115.1	1.1-14.9
grapes	> 3	79.9-119.9	2.0-12.0	79.9-119.9	0.3-3.3	79.9-119.9	0.4-10.9
lettuce	> 3	80.2-119.1	4.8-19.2	80.2-119.1	2.1-15.1	80.2-119.1	0.7-4.5
lemon	> 3	79.1-116.1	1.0-18.8	80.0-116.1	1.8-15.8	79.1-116.1	1.4-10.6
mango	> 3	79.8-119.3	1.8-19.8	79.8-119.3	0.8-6.3	79.8-119.3	1.5-15.2
strawberry	> 3	89.9-117.8	1.9-11.6	89.9-117.8	0.9-13.3	89.9-117.8	0.8-9.2
tomato	> 3	87.2-114.9	1.5-19.6	87.2-115.0	1.0-14.8	87.2-114.9	1.8-19.9

หมายเหตุ: 1) Signal to noise (S/N) ratio at LOD = 5 ng/g (n = 10)

- Apple: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ abamectin B1a, anilazine และ carbosulfan สารที่มี linearity of working range อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับ ได้แก่ abamectin B1a, anilazine และ carbosulfan
- Cabbage: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ carbosulfan สารที่มี linearity of working range อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับ ได้แก่ carbosulfan และ anilazine
- Cucumber: สาร anilazine มี linearity of working range ในช่วง 20-100 ng/g
- Grapes: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ระดับ 10 ng/g ได้แก่ abamectin B1a และ anilazine ที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ carbosulfan สาร abamectin B1a มี linearity of working range ในช่วง 20-100 ng/g และสาร anilazine มีความเป็นเส้นตรงช่วง 50-100 ng/g สาร carbosulfan ไม่มีช่วงความเป็นเส้นตรง
- Lemon: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ carbosulfan
- Strawberry: สารที่มี accuracy & precision อยู่นอกเหนือเกณฑ์ยอมรับที่ทุกระดับความเข้มข้น ได้แก่ abamectin B1a และ carbosulfan



ภาพที่ 3 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ carbaryl ในผักและผลไม้ (apple)

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS กับเครื่อง LC-MS/MS เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำ จำนวน 40 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่ตรวจพบ จำนวน 4 ตัวอย่าง พบสารชนิดเดียวกัน ประเมินผลโดยใช้ค่า %difference

เกณฑ์ยอมรับการทำซ้ำที่ $\leq 20\%$ พบว่าการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด มี %difference อยู่ระหว่าง 1.60-17.84% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ 36 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบด้วยเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด เช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และ LC-QTOF/MS ในงานประจำ

Matrix	Analyte	Concentration found (ng/g)		%Difference
		LC-MS/MS	LC-QTOF/MS	
blue berry	boscalid	20.64	20.97	1.60
	omethoate	54.92	64.72	17.84
	penconazole	78.83	92.42	17.24
Chinese cabbage	pyraclostrobin	9.55	8.73	8.59
grapes	amectotradin	7.39	8.03	8.66
	indoxacarb	6.87	8.03	16.89
water spinach	oxamyl	38.68	37.76	2.38
	propiconazole	67.70	60.00	11.37

การทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติของการวิเคราะห์สาร indoxacarb และ metalaxyl ใน apple ที่ระดับ LOQ (10 นาโนกรัมต่อกรัม) นำข้อมูลที่ได้จากการทำ method validation ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS โดยการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ($n = 10$) ดังแสดงในตารางที่ 5 สาร indoxacarb มีค่า mean \pm SD ของการวิเคราะห์ ปริมาณโดยเครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS เท่ากับ 9.42 ± 0.48 และ 10.12 ± 0.62 นาโนกรัมต่อกรัม และสาร metalaxyl มีค่าเป็น 11.00 ± 1.37 และ 10.77 ± 0.79 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าความแปรปรวน (variance) ของข้อมูล 2 ชุด โดยใช้ F-test คำนวณค่า $F_{calculated}$ ของสาร indoxacarb และ metalaxyl จากสมการที่ 1 จะได้ค่า $F_{calculated} = 2.686$ และ 3.084 ตามลำดับ เมื่อ $n_1 = n_2 = 10$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$) ได้ค่า $F_{critical} = 3.137^{(18-20)}$

จะได้ $F_{calculated}$ น้อยกว่า $F_{critical}$ ทั้ง 2 สาร หรือข้อมูล 2 ชุด ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS ไม่มีความแตกต่างของค่าความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทำการทดสอบความมีนัยสำคัญโดยใช้ t-test ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ย (mean) ของข้อมูล 2 ชุด โดยคำนวณค่า $t_{calculated}$ จากสมการที่ 2 และ SD_{pooled} จากสมการที่ 3 เมื่อ SD_{pooled} ของสาร indoxacarb และ metalaxyl ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.556 และ 1.118 ตามลำดับ จะได้ค่า $t_{calculated} = 0.29$ และ 1.78 ตามลำดับ เมื่อ degrees of freedom = $n_1 + n_2 - 2 = 18$ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($\alpha = 0.05$)⁽²¹⁻²³⁾ ได้ค่า $t_{critical} = 2.101$ จะได้ $t_{calculated}$ น้อยกว่า $t_{critical}$ ทั้ง 2 สาร หรือข้อมูล 2 ชุด ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผลการวิเคราะห์สาร indoxacarb และ metalaxyl ใน apple ที่ได้จากเครื่อง LC-QTOF/MS และ LC-MS/MS

Replicate	Result (ng/g) Spike at 10 ng/g			
	indoxacarb		metalaxyl	
	LC-QTOF/MS	LC-MS/MS	LC-QTOF/MS	LC-MS/MS
1	9.02	10.50	9.35	11.53
2	10.62	10.65	9.25	11.88
3	9.30	10.23	13.34	11.08
4	9.50	9.88	10.65	10.87
5	9.24	9.80	11.78	11.49
6	8.91	10.33	11.93	11.10
7	9.21	8.56	12.70	10.61
8	9.03	10.05	9.36	9.99
9	9.74	11.01	10.82	9.21
10	9.70	10.21	10.87	9.98
Mean	9.42	10.12	11.00	10.77
SD	0.48	0.62	1.37	0.79
%RSD	5.08	6.15	12.42	7.32
Min	9.02	8.56	9.25	9.21
Max	10.62	10.65	13.34	11.88
Median	9.27	10.22	10.85	10.97

$$F_{calculated} = \frac{(SD_1)^2}{(SD_2)^2} \quad ; SD_1 > SD_2 \quad \text{สมการที่ 1}$$

$$t_{calculated} = \frac{(\text{mean}_1 - \text{mean}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) SD_{pooled}^2}} \quad \text{สมการที่ 2}$$

$$SD_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1-1) \times SD_1^2 + (n_2-1) \times SD_2^2}{(n_1-1) + (n_2-1)}} \quad \text{สมการที่ 3}$$

สำหรับการควบคุมคุณภาพภายนอก (external quality control) ได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานที่ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17043:2023 ประเมินผลด้วยค่า z-score เกณฑ์ยอมรับ $|z| \leq 2$ ผลพบว่าการวิเคราะห์สารในขอบข่าย 144 ชนิด มีค่า z-score อยู่ระหว่าง -0.67 ถึง 1.18 ซึ่งอยู่

ในเกณฑ์ยอมรับ ดังแสดงในตารางที่ 6 เป็นการยืนยันว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-QTOF/MS มีความถูกต้องเหมาะสมและสอดคล้องกับมาตรฐานห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ ISO/IEC 17025:2017

ตารางที่ 6 ผลการเข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่าง ๆ

PT provider	matrix	analyte	z-score
FAPAS 19409	spring onion	acetamiprid	0.4
		fenhexamid	0.7
		spiroxamine	0.3
		tetraconazole	0.5
Progetto trieste VF4800P	spinach	atrazine	-0.23
		boscalid	-0.02
		linuron	-0.24
NIMT-PT-OA-009	apple	ametryn	-0.67
		atrazine	0.67
Central Lab Thai PT08-6707	choy	carbaryl	1.18
		oxamyl	0.88
DOA: 2566 ME	mango	atrazine	0.7
		azoxystrobin	0.4
		carbaryl	-0.1

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS โดยใช้วิธีมาตรฐาน QuEChERS ในการสกัดตัวอย่าง ผลการทดสอบพบว่ามีความขีดจำกัดการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 5 นาโนกรัมต่อกรัม และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 10 นาโนกรัมต่อกรัม มีความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ระหว่าง 10-100 นาโนกรัมต่อกรัม ความแม่นยำและความเที่ยงที่แสดงด้วย %Recovery และ %RSD อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ SANTE⁽²¹⁾ ซึ่งคุณลักษณะของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ ตามพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง⁽³⁾ วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ค่ากำหนดของปริมาณสารพิษตกค้างที่มีได้ในอาหารสำหรับวัตถุประสงค์สูงสุดหรือ default limit ที่ระดับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (หรือ 10 นาโนกรัมต่อกรัม) เป็นค่าตั้งต้นเพื่อกำหนดค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (target LOQ) แล้วทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง รวมทั้งต้อง

พิจารณา signal to noise ratio ต้องมากกว่า 10 ขึ้นไป นอกจากนี้พบว่าค่าความแปรปรวนค่าความไม่แน่นอนของวิธีวิเคราะห์ที่คำนวณได้มาจาก method precision และ standard concentration เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความไม่แน่นอนของการวัด ซึ่งเป็นความไม่แน่นอน type A สามารถประมาณได้จากการทำซ้ำ และ type B ที่ได้จากการสอบกลับได้ทางมาตรวิทยา ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าที่ประมาณได้นี้สามารถยอมรับได้และมีความสมเหตุสมผล เนื่องจากยังน้อยกว่าค่ามาตรฐานที่ร้อยละ 50 กำหนดโดย SANTE (Fit for purpose)⁽²¹⁾ วิธีการเตรียมตัวอย่างเลือกใช้วิธี QuEChERS สำหรับการสกัดผักและผลไม้ ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์แบบ multi-residue method สามารถสกัดสารหลายชนิดออกจากตัวอย่างได้พร้อมกัน พบว่าวิธีนี้มีผลกระทบของเมทริกซ์ที่มีในตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการสกัดรบกวนการตรวจวัดด้วยเครื่องมือ เช่น มีองค์ประกอบของแป้ง โปรตีน ไขมัน และกรดไขมัน ทำให้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชบางชนิดถูกสกัดออกจากตัวอย่างได้ยากที่ระดับความเข้มข้นต่ำ แม้จะมีการใช้วัสดุสำหรับการทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ที่มีส่วนผสมของ MgSO₄, PSA, GCB และ C18 แล้วก็ตาม สารที่ได้รับผลกระทบดังกล่าว ได้แก่ abamectin B1a, carbosulfan และ

anilazine ในตัวอย่างบางประเภทที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จะไม่สามารถตรวจวัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 เนื่องจาก คุณสมบัติเฉพาะของสารเหล่านี้อาจจำเป็นต้องทำการ วิเคราะห์โดยการเตรียมตัวอย่างแบบ single residue analysis ในกรณีที่ตัวอย่างผักและผลไม้มีเมทริกซ์ ที่ส่งผลกระทบบอย่างรุนแรง (high matrix effect) ดังนั้นการวิเคราะห์สารจำนวนมากพร้อมกันยังคงเป็น ความท้าทายในการทำการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและ เชิงปริมาณ

เนื่องจากเครื่อง LC-QTOF/MS เป็นเครื่องมือ ชนิดใหม่ที่น่าสนใจใช้ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ จึงจำเป็นต้องมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องมือชนิดนี้ กับเครื่องมือที่ห้องปฏิบัติการใช้ในงานประจำและได้รับการรับรอง ISO/IEC 17025:2017 คือ เครื่องมือ triple quadrupole mass spectrometry หรือ LC-MS/MS โดยได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในงานประจำในเครื่องมือ ทั้ง 2 ชนิด ใช้วิธีการสกัดเดียวกัน ฉีดสารสกัดที่ได้เข้า เครื่องมือทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน เปรียบเทียบความแตกต่าง ของชนิดและปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้โดยใช้เกณฑ์ $\%Difference \leq 20\%$ กำหนดให้วิธีมาตรฐาน LC-MS/MS (goal standard) เป็น 100% ผลพบว่าเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด สามารถตรวจวัดชนิดสารได้สอดคล้องกันและ ให้ปริมาณที่แตกต่างกันไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ ทำการทดสอบทางสถิติโดยนำข้อมูลผลการวิเคราะห์ ที่ระดับ LOQ จากเครื่องมือ 2 ชนิด ชนิดละ 10 ข้อมูล ผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องมือทั้ง 2 ชนิด ไม่พบ ความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยและความแปรปรวน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสามารถสรุปได้ว่าเครื่องมือ ชนิดใหม่นี้สามารถใช้งานทดแทนเครื่องมือมาตรฐาน ได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ผลการวิเคราะห์ที่ ไม่แตกต่างกัน เป็นการลดภาระงานของเครื่องมือที่มี อยู่ในห้องปฏิบัติการ ลดรอบการให้บริการ และเพิ่ม ความพึงพอใจของผู้ใช้บริการ อย่างไรก็ตามเครื่องมือ LC-QTOF/MS ยังมีข้อจำกัดสำหรับการใช้งาน คือ เครื่องมือมีช่วงการวิเคราะห์สั้น ระหว่าง 5-100 นาโนกรัม ต่อกรัม ในขณะที่เครื่อง LC-MS/MS มีความเป็นเส้นตรง ในช่วง 5-500 นาโนกรัมต่อกรัม เนื่องจากเครื่อง LC-QTOF/MS มีเครื่องตรวจจับมวลสารที่จะอิ่มตัว เมื่อตรวจวัดสารที่ปริมาณสูง ทำให้เมื่อวิเคราะห์สาร

ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 นาโนกรัมต่อกรัม จะได้กราฟ มาตรฐานที่เป็นเส้นโค้งและจะคงที่มีลักษณะเป็นเส้นราบ (plateau) ส่งผลให้การตรวจวัดที่ระดับสูงต้องทำการ dilute สารสกัดหรือการลดปริมาณตัวอย่างเพื่อ ความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้ต้องทำการ ยืนยันผลการวิเคราะห์โดยการทำซ้ำ (retest) เมื่อ การตรวจพบสารตกค้างเกินช่วงของการวิเคราะห์การ เป็นเส้นตรงแบบ duplicate test แล้วรายงานโดยใช้ ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำดังกล่าว และเกณฑ์ยอมรับของ การทำซ้ำ %RPD ต้องไม่เกิน 25%⁽²¹⁾ แม้เครื่อง LC-QTOF/MS จะมีช่วงการวิเคราะห์สั้นแต่มี ข้อได้เปรียบ คือ ให้สัญญาณของสารสูงและมีความละเอียด แม่นยำ (high mass resolution) ที่ดีกว่า LC-MS/MS จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานประเภทการตรวจ คัดกรองที่ไม่ทราบชนิดล่วงหน้า (untargeted screening method) สำหรับการประกันคุณภาพภายนอกได้ เข้าร่วมทดสอบความชำนาญกับหน่วยงานต่างๆ เช่น FAPAS สหราชอาณาจักร, Progetto Trieste สาธารณรัฐอิตาลี, สถาบันมาตรวิทยาแห่งชาติ (NIMT), บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด (Central Lab Thai) และกรมวิชาการเกษตร (DOA) เป็นต้น ผล z-score อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ $|z| \leq 2$ เป็นสิ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความถูกต้องเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการ และสามารถนำวิธีการนี้เข้าสู่กระบวนการขอการรับรอง ความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์ต่อไป สำหรับการใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS มีความ ยุ่งยากกว่าการใช้เครื่อง LC-MS/MS คือ การทำ instrument set up โดยเฉพาะขั้นตอนการทำ tuning เครื่องมือก่อนการใช้งานจำเป็นต้องมีการ เปลี่ยนหรือเตรียมสารที่ใช้สำหรับการ tuning (tuning solution) ทุก 6 เดือน เป็นการทำให้ เครื่องตอบสนองต่อสัญญาณคงที่และป้องกันไม่ให้ สัญญาณลดลงระหว่างการวัด อาจทำให้ผลการวิเคราะห์ ที่คลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้ต้องทำ tuning calibration ทุก 1 เดือน เพื่อให้ได้ linear range ตรงตาม ที่ต้องการและต้องทำ mass calibration ทุกครั้งก่อน ทำการวิเคราะห์ เพื่อเป็นการ calibrate มวลสารให้

มีความเที่ยงตรงและแม่นยำ โดยสารผสมที่ใช้สำหรับขั้นตอนการทำ tuning และ mass calibration มี mass range อยู่ระหว่าง 200–3000 m/z ซึ่งครอบคลุมชนิดสารที่ต้องการตรวจวัด สำหรับการบำรุงรักษาเครื่องมือต้องมีการทำความสะอาด ion capillary ทุกครั้งก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย methanol หรือ 50 %v/v ของ isopropanol เพื่อให้มั่นใจว่าจะไม่มีสิ่งสกปรกเข้าสู่ระบบ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบสารสนใจที่มี signal to noise, $S/N \geq 3$ ต้องตรวจสอบพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อยืนยันชนิดสารก่อนการรายงาน ได้แก่ retention time ($\Delta RT \leq 0.1$ นาที), ion intensity ratio ระหว่าง quantification peak และ qualification peak ของสารสนใจและสารมาตรฐานต้องแตกต่างกันน้อยกว่า 30% และรูปร่างของ peak ที่ได้จากใน extracted ion chromatogram ต้องมีการซ้อนทับกันโดยสมบูรณ์

การพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักและผลไม้โดยใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS ที่ทำขึ้นนี้ นอกจากจะสามารถนำไปใช้งานสำหรับการตรวจวิเคราะห์สาร 144 ชนิดได้แล้ว ยังสามารถนำเครื่องมือไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการขยายขอบข่ายชนิดของสารให้ครอบคลุมเพิ่มขึ้นได้และการตรวจวิเคราะห์แบบคัดกรองที่ไม่ทราบชนิดสาร (untargeted analysis) เชิงคุณภาพได้อีกด้วย รวมถึงการขอการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือภายใต้ระบบคุณภาพที่เป็นสากล ศักยภาพของเครื่องมือชนิด high resolution นี้สามารถต่อยอดในการตรวจวิเคราะห์อาหารปลอมและการยืนยันประเภทหรือชนิดอาหารในวัตถุประสงค์ต่างๆ (food authenticity) ได้ในอนาคต ทั้งนี้การวิเคราะห์อาหารโดยใช้หลักการทางสถิติและการตรวจวัดมวลสารที่มีความแม่นยำสูงนี้เป็นสิ่งใหม่ในประเทศไทย โดยในปัจจุบันยังไม่มีหน่วยงานใดที่เปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการดังกล่าว ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์สามารถใช้เครื่องมือ LC-QTOF/MS พัฒนาศักยภาพการตรวจวิเคราะห์อาหารในภาพรวมของประเทศต่อไป

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่ได้จากการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช 144 ชนิด ในผักและผลไม้ด้วยเทคนิค LC-QTOF/MS มีคุณลักษณะของวิธีสอดคล้องกับมาตรฐานวิธีของประเทศและระหว่างประเทศ โดยมีค่า LOD และ LOQ เป็น 5 และ 10 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์อยู่ระหว่าง 5–100 นาโนกรัมต่อกรัม เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในขอบข่ายได้อย่างถูกต้อง มีความไวและความจำเพาะต่อสารทั้งหมด มีความแม่นยำและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตรงตามวัตถุประสงค์เหมาะสมที่จะนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมคุณภาพมาตรฐานและความปลอดภัยของอาหารประเภทผักและผลไม้ นำไปใช้สำหรับเปิดให้บริการของหน่วยงานสำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ และยังสามารถใช้วิธีตรวจวิเคราะห์อาหารเพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคหรือใช้ในโครงการสำรวจติดตามการตกค้างของสารเคมีอันตรายเพื่อประกอบการบริหารจัดการสารเคมีทางการเกษตรในภาพรวมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางเลขา ปราสาททอง อดีตผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร สำหรับการสนับสนุนการจัดหาเครื่องมือหลักของงานวิจัยชิ้นนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Sapbamrer R, Kitro A, Panumasvivat J, Assavanopakun P. Important role of the government in reducing pesticide use and risk sustainably in Thailand: current situation and recommendations. *Front Public Health* 2023; 11: 1141142. (11 pages).
2. รัตนา ทรัพย์บำรุง. ผลกระทบของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อระบบอวัยวะในร่างกาย. เชียงใหม่: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2565.

3. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560). หน้า 8.
4. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563). หน้า 27.
5. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 449 (พ.ศ. 2567) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 4). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 141 ตอนพิเศษ 158 ง (วันที่ 11 มิถุนายน 2567). หน้า 7.
6. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union 2005 Mar 16; L 70/1.
7. Pongsapitch P. Preparation and submission of data for the establishment of international standard on pesticide residue for important Thai agricultural commodities. Thai Agric Res J 2008; 26(3): 291-306.
8. Rapid Alert System for Food and Feed network (RASFF). RASFF notifications by food hazard category 2020-2022. [online]. 2023; [cited 2025 Sep 5]; [25 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-10/acn_annual-report_2022.pdf.
9. Heena S, Fatih O. Mass spectrometry-based techniques for identification of compounds in milk and meat matrix. Adv Food Nutr Res 2023; 104: 43-76.
10. Stachniuk A, Fornal E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. Food Anal Methods 2016; 9(6): 1654-5.
11. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev 2009; 30(1): 19-34.
12. Yang M, Li J, Zhao C, Xiao H, Fang X, Zheng J. LC-Q-TOF-MS/MS detection of food flavonoids: principle, methodology, and applications. Crit Rev Food Sci Nutr 2021; 63(1): 3750-70.
13. Vázquez PP, Lozano A, Ferrer C, Martínez Bueno MJ, Fernández-Alba AR. Improvements in identification and quantitation of pesticide residues in food by LC-QTOF using sequential mass window acquisition (SWATH[®]). Anal Methods 2018; 10: 2821-33.
14. Liu X, Liu Z, Bian L, Ping Y, Li S, Zhang J, et al. Determination of pesticide residues in chili and Sichuan pepper by high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Food Chem 2022; 387: 132915.
15. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. In: 18th Annual Waste Testing & Quality Assurance Symposium (WTQA), Arlington, VA, August 10-15, 2002. p. 231-241.
16. Poole CF. New trends in solid-phase extraction. TrAC Trends Anal Chem 2003; 22(6): 362-73.
17. Kaufmann A. The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. Anal Bioanal Chem 2012; 403(5): 1233-49.
18. Chemat F, Rombaut N, Meullemiestre A, Turk M, Perino S, Fabiano-Tixier AS, et al. Review of green food processing techniques: preservation, transformation, and extraction. Innov Food Sci Emerg Technol 2017; 41: 357-77.

19. Kalogiouri NP, Papadakis E-N, Maggalou MG, Karaoglanidis GS, Samanidou VF, Menkissoglu-Spiroudi U. Development of a microwave-assisted extraction protocol for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticide residues in apples by LC-MS/MS. *Appl Sci* 2021; 11(22): 10931. (16 pages).
20. Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal Chem* 1996; 68(6): 1033-9.
21. SANTE 11312/2021 v2. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [online]. 2024; [cited 2024 Nov 4]; [55 screens]. Available from: URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.
22. BS EN 15662:2018. 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]. 2018; [cited 2025 April 3]; [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.
23. Eurachem. EURACHEM/CITAC Guide CG 4: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. [online]. 2012; [cited 2021 Oct 2]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.

Development and Validation for Analysis of 144 Pesticides in Vegetables & Fruits by LC-QTOF/MS Technique

Akarapitch Siripraparat and Weerawut Wittayanan

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

ABSTRACT In agricultural production, the widespread use of pesticides to prevent, eliminate, or repel pests has been greatly increased. As a result, vegetables and fruits may be contaminated with high tendency for the pesticide residue to remain in the food, creating a risk to humans. Therefore, there are many attempts to monitor this residue in food materials and products. In this study, liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-QTOF/MS) was selected for the quantitative detection of the simultaneous determination of 144 pesticides in vegetables and fruits by using the high resolution full-scan acquisition method. The extraction experiments were validated with QuEChERS method. The limit of detection and quantification of the validated method were 5 and 10 ng/g for the pesticides, respectively. In particular, each sample underwent ten analyses of fortified pesticides at three different concentration levels: 10, 50, and 100 ng/g. Consequently, the recoveries for most pesticides in particular matrices were within the criteria of 70-120%, with a relative standard deviation (RSD) lower than 20%. Furthermore, this method's linear range can be applied from 10 to 100 ng/g ($R^2 > 0.99$). Participation in the PT program to evaluate the method performance for external quality control showed satisfactory z-scores ($|z| \leq 2$). Additionally, a significant number of routine samples were checked and were compared favorably with those from LC-MS/MS accredited methods. Based on these results, the method's validation to detect and quantify pesticides in vegetable and fruit matrices for regulatory proposals and health warnings was entirely successful.

Keywords: Pesticides, Vegetables and fruits, QuEChERS, LC-QTOF/MS