

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนตกค้างในผลไม้ด้วยเทคนิค Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry

จิระพงศ์ เหลืองชัยพร ธรณิศวร ไซยมงคล และ วีรวิทย์ วิทยานันท์

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ อีทีฟอน (ethephon) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นิยมใช้หลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเร่งการสุกของผลไม้ โดยผลไม้เขตร้อนที่ศึกษา ได้แก่ กัลลวย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน และผลไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และ สตรอว์เบอร์รี่ การใช้ที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการตกค้างส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนตกค้างในผลไม้โดยอาศัยการสลายตัวของอีทีฟอนภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีน และ ตรวจวัดด้วยเทคนิค headspace–gas chromatography–mass spectrometry (HS–GC–MS) ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่ามีความจำเพาะสูง โดยเอทิลีนมีค่า retention time เท่ากับ 2.45 นาที มีไอออนลักษณะเฉพาะที่ m/z 27, 26 และ 28 ไม่พบสัญญาณรบกวนใน method blank ขณะที่ matrix blank ของผลไม้ทุกชนิดตรวจพบเอทิลีนตามธรรมชาติในระดับต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) การหาปริมาณใช้กราฟมาตรฐานภายนอก เนื่องจาก matrix effect อยู่ในระดับต่ำและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กราฟมาตรฐานช่วง 0.1–4.0 ไมโครกรัมของอีทีฟอน ให้ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 และช่วงการวิเคราะห์ในตัวอย่างผลไม้ให้ค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9986–0.9998 วิธีมีค่า LOD และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) สำหรับผลไม้เขตร้อนเท่ากับ 0.10 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสำหรับผลไม้เขตอบอุ่นเท่ากับ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ผลไม้เขตร้อนให้ค่าการคืนกลับ 81.4–119.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.5–16.0 ขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่นให้ค่าการคืนกลับ 89.8–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.9–13.9 โดยสรุป วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้อง เชื่อถือได้ เหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันการตกค้างของอีทีฟอนในผลไม้

คำสำคัญ: สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้าง, อีทีฟอน, เอทิลีน, ผลไม้, แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

Corresponding author E-mail: jirapong.luangchaiyaporn@gmail.com

Received: 4 March 2026

Revised: 19 June 2026

Accepted: 20 July 2026

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีภูมิอากาศเขตร้อนชื้น เหมาะสมต่อการเพาะปลูกผลไม้เศรษฐกิจหลากหลายชนิด เช่น ทูเรียน มะม่วง สับปะรด และกล้วย ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ และเป็นสินค้าส่งออกหลักในภาคเกษตรกรรม ข้อมูลจากสำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์ ระบุว่าในปี พ.ศ. 2567 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกผลไม้รวมทั้งในรูปแบบสดและแปรรูปสูงถึง 6,510.6 ล้านดอลลาร์สหรัฐ โดยเฉพาะผลไม้สดมีมูลค่าการส่งออก 5,149.4 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ทั้งนี้ทูเรียนเป็นผลไม้สดที่มีมูลค่าการส่งออกสูงสุด มีปริมาณการส่งออก 859,183 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,755.7 ล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือร้อยละ 72.9 ของมูลค่าการส่งออกผลไม้สดทั้งหมดของประเทศ และมีตลาดส่งออกหลัก ได้แก่ จีน ฮองกง เกาหลีใต้ มาเลเซีย และสหรัฐอเมริกา⁽¹⁾ แนวโน้มดังกล่าวสะท้อนถึงบทบาทสำคัญของผลไม้ไทยในระบบเศรษฐกิจโลก และมีความจำเป็นในการรักษามาตรฐานด้านคุณภาพและความปลอดภัยอาหารเพื่อสร้างความเชื่อมั่นแก่ผู้บริโภคในตลาดสากล อย่างไรก็ตามแม้ประเทศไทยจะมีศักยภาพสูงด้านการผลิตและการส่งออกผลไม้ แต่พฤติกรรมผู้บริโภคผักและผลไม้ของประชาชนภายในประเทศยังคงต่ำกว่าเกณฑ์ที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำ โดยผลการสำรวจระดับประเทศของสถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งดำเนินการเก็บข้อมูลในช่วงปี พ.ศ. 2561–2562 และเผยแพร่รายงานในปี พ.ศ. 2565 ชี้ให้เห็นว่าการบริโภคผักและผลไม้ของคนไทยส่วนใหญ่ยังไม่ถึงระดับอย่างน้อย 400 กรัมต่อวัน ซึ่งเป็นปริมาณที่ WHO แนะนำเพื่อช่วยลดความเสี่ยงของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (non-communicable diseases; NCDs)^(2,3) สถานการณ์ดังกล่าวเน้นย้ำถึงความจำเป็นในการส่งเสริมการบริโภคผลไม้ที่มีคุณภาพและปลอดภัยจากสารเคมีตกค้าง เพื่อคุ้มครองสุขภาพผู้บริโภคควบคู่ไปกับการยกระดับมาตรฐานความปลอดภัยอาหารของประเทศ

อีทีฟอน (ethephon; 2-chloroethylphosphonic acid) จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต

ของพืช (plant growth regulator) ที่สามารถสลายตัวภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีน ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชตามธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการสุกของผลไม้^(4,5) โดยในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว (pre-harvest) นิยมใช้เพื่อกระตุ้นการออกดอกให้เกิดพร้อมกัน ขณะที่ในช่วงหลังการเก็บเกี่ยว (post-harvest) ใช้เพื่อเร่งและควบคุมการสุกของผลไม้ให้มีความสม่ำเสมอ^(6,7) ผลไม้ที่มีการใช้อีทีฟอนอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ได้แก่ ทูเรียน มะม่วง และกล้วย อย่างไรก็ตามแม้อีทีฟอนจะมีประโยชน์ต่อการจัดการผลผลิตทางการเกษตร แต่การใช้ที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลให้เกิดสารตกค้างในผลผลิตและก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อผู้บริโภค โดยมีรายงานว่า การได้รับอีทีฟอนในปริมาณสูงอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร ส่งผลต่อระบบประสาท และอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ ซึ่งสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางพิษวิทยาของสารดังกล่าว^(8,9) ด้วยเหตุนี้ประเทศไทยจึงกำหนดมาตรการควบคุมด้านความปลอดภัยอาหารโดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 460) พ.ศ. 2568 ซึ่งออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ได้กำหนดเกณฑ์ค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุด (maximum residue limit; MRL) แตกต่างกันตามชนิดของผลไม้ ได้แก่ กล้วยและลูกผสม 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทูเรียน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มะม่วง 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สับปะรด 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม กลุ่มเชอร์รี่ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และองุ่นรวมถึงแอปเปิลกำหนดค่า MRL เท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ในระดับสากลคณะกรรมการโคเด็กซ์ (Codex Alimentarius Commission) ได้กำหนดค่าปริมาณสารตกค้างสูงสุดของอีทีฟอนในผลไม้หลายชนิดในช่วง 0.8–5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขึ้นกับชนิดของผลไม้⁽¹¹⁾ และยังมีการรายงานเหตุการณ์ที่ผลไม้ไทยถูกตรวจพบสารตกค้างเกินค่ามาตรฐานในต่างประเทศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ของประเทศและการค้าระหว่างประเทศอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹²⁾

แม้จะมีการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานทางกฎหมายที่ชัดเจน แต่การเฝ้าระวังสารตกค้างของ ethephon ยังคงเผชิญข้อจำกัดด้านการตรวจวิเคราะห์ ปัจจุบัน

มีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีหลายวิธีในการวิเคราะห์สารอีทีฟอนในผลไม้ ได้แก่ high-performance liquid chromatography (HPLC-UV), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), ion chromatography-mass spectrometry (IC-MS/MS) และ gas chromatography (GC)⁽¹³⁻¹⁷⁾ โดยเทคนิค LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์อีทีฟอนในรูปเดิมได้โดยตรง มีความไวและความจำเพาะสูง เหมาะสำหรับการตรวจวัดสารตกค้างในระดับต่ำในผลไม้หลายชนิด^(13,15,16,18) อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน และอาจได้รับผลกระทบจาก matrix effect ขององค์ประกอบที่ซับซ้อนของเนื้อผลไม้ ซึ่งอาจส่งผลต่อความถูกต้องและความเชื่อถือได้ของผลการวิเคราะห์^(13,15,18,19) ส่วนการวิเคราะห์ด้วย GC โดยตรวจสารอีทีฟอนโดยตรงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากอีทีฟอนเป็นสารที่มีขี้สูง ละลายน้ำได้ดี และระเหยยาก จึงมักต้องอาศัยการสลายตัวภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีนก่อนตรวจวัดด้วยเทคนิค headspace GC^(14,17,20) ดังนั้นเทคนิค headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) ซึ่งอาศัยการตรวจวัดแก๊สเอทิลีนในเฟสไอเหนือผิวตัวอย่าง จึงมีข้อได้เปรียบด้านการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน ให้สัญญาณที่มีเสถียรภาพ และช่วยลดการรบกวนจากเมทริกซ์ของผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เป็นอีกทางเลือกที่มีศักยภาพสำหรับการวิเคราะห์สารอีทีฟอนในผลไม้^(14,17)

เพื่อสนับสนุนการดำเนินงานด้านการเฝ้าระวังคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์อีทีฟอนในรูปแบบ single residue method ที่มีความจำเพาะ ความถูกต้อง และความเชื่อถือได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์ในผลไม้ เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในด้านการขยายขอบข่ายการตรวจสอบให้สอดคล้องกับกฎหมายอาหาร ประกาศกระทรวงสาธารณสุข และมาตรฐานคณะกรรมการอาหารระหว่าง

ประเทศ (Codex) ตลอดจนการรองรับการค้าระหว่างประเทศ โดยเฉพาะผลไม้ส่งออก นอกจากนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ยังสามารถนำไปใช้ในการประเมินสถานการณ์สารตกค้างในระดับประเทศ สนับสนุนการประเมินความปลอดภัยอาหาร และใช้เป็นข้อมูลประกอบการเตือนภัยเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค รวมถึงการวางแผนป้องกันและแก้ไขปัญหาเชิงรุกอย่างเหมาะสมต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ อีทีฟอนมาตรฐาน (ethephon standard) ความบริสุทธิ์ $\geq 97\%$ เกรดวัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference material; CRM) (Dr. Ehrenstorfer, LGC Standards, Germany)

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ เมทานอล (methanol, gradient grade for LC) (LiChrosolv[®], Supelco, Merck, Germany) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ซึ่งเตรียมจากกรด HCl 37% (EMSURE[®], Supelco, Merck, Germany) น้ำบริสุทธิ์ DI water (Type I, resistivity $> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) โซเดียมไฮดรอกไซด์อิ่มตัว (saturated NaOH) ซึ่งเตรียมโดยเติม NaOH (EMSURE[®], Supelco, Merck, Germany) จนถึงจุดอิ่มตัวและมีผลึกตกค้าง รวมถึงเฮกเซน (n-hexane) และอะซีโตน (acetone) (B&J Brand[™], Honeywell Burdick & Jackson, USA)

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารอีทีฟอนน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลต่อลิตร จากนั้นปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ ≤ -18 องศาเซลเซียส และมีอายุการใช้งานไม่เกิน 3 เดือน

เตรียม intermediate standard solution โดยเจือจาง stock standard solution ด้วยสารละลาย MeOH:HCl อัตราส่วน 6:4 โดยปริมาตร ให้ได้

ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารมาตรฐานระดับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางต่ออีก 10 เท่า ทั้งสองระดับนี้ใช้สำหรับเตรียม working standard solution

เตรียม working standard solutions ในช่วงความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครกรัม ในขวด headspace ขนาด 20 มิลลิลิตร โดยเตรียมก่อนใช้งานทันที หรือสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ≤ -18 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 1 สัปดาห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า (รุ่น LP620S, Sartorius, Germany) ความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลไม้ และเครื่องชั่งไฟฟ้า (รุ่น MC 210S, Sartorius, Germany) ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน เครื่องบดปั่นอาหาร (รุ่น Original 4000, RONIC, Poland) สำหรับทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเนียนสม่ำเสมอ เครื่องหมุนปั่นผสม

สารละลายแบบ vortex (รุ่น G560E Vortex-2 Genie, Scientific Industries, USA) หลอดเซนตริฟิวจ์กันแหลม (conical centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร (JET BIOFIL, China) สำหรับเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ และตู้แช่แข็ง (รุ่น 3552-1, Thermo Scientific, USA) อุณหภูมิ ≤ -18 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บรักษาสารมาตรฐานและตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

การตรวจวัดแก๊สเอทิลีนใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (รุ่น TRACE™ 1610, Thermo Scientific, USA) เชื่อมต่อกับเครื่องวิเคราะห์มวลสาร ISQ™ 7610 Single Quadrupole พร้อมระบบฉีดตัวอย่างอัตโนมัติแบบ headspace TriPlus™ RSH (HS) (รุ่น 365L2321-SM, Thermo Scientific, USA) โดยควบคุมการทำงานและเก็บข้อมูลด้วยซอฟต์แวร์ Chromeleon™ 7 โดยสภาวะการทำงานที่ได้รับการคัดเลือกสำหรับการวิเคราะห์แก๊สเอทิลีนด้วยเทคนิค HS-GC-MS ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สภาวะการทำงานของเครื่อง HS-GC-MS สำหรับการตรวจวัดแก๊สเอทิลีน

Category	Parameter	Condition
Headspace	Vial size	20 mL headspace vial
	Injection volume	2 mL (headspace injection)
Gas Chromatography	Inlet conditions	Inlet temperature 180°C; split mode; split ratio 20:1; septum purge flow 15 mL/min
	Column	PLOT/Q fused silica capillary column, 30 m $\times$ 0.32 mm i.d., film thickness 20 μ m
	Carrier gas and flow rate	Helium, constant flow at 2.5 mL/min 40°C
	Oven temperature program	(4 min) $\rightarrow$ ramp from 40 to 240°C at 30°C/min $\rightarrow$ hold at 240°C for 5 min
Mass Spectrometry	Ionization mode	Electron ionization (EI, 70 eV)
	Acquisition mode	Selected ion monitoring (SIM)
	Target ions (ethylene)	m/z 27 (quantifier), 26 and 28 (qualifiers)
	Ion source temperature	200°C
	Transfer line temperature	250°C

อุปกรณ์ที่ใช้ ได้แก่ micropipette ขนาด 2–20, 20–200 และ 100–1,000 ไมโครลิตร (Eppendorf, Germany) พร้อมหัว tip ปลอดสารปนเปื้อน ขวดแก้ว headspace vial ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิดอลูมิเนียม และ septum ทนความร้อน และ volumetric

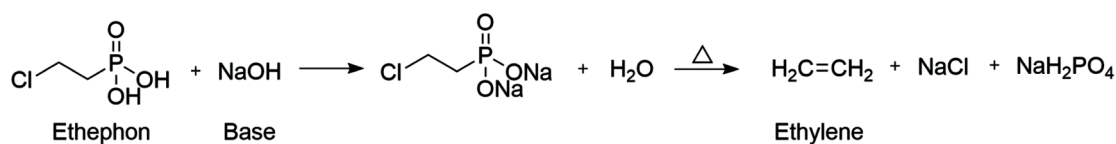
flask สำหรับเตรียมสารละลาย เครื่องแก้วทุกชนิดทำความสะอาดโดยล้างด้วย acetone 2 ครั้ง และ n-hexane 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนใช้งาน เพื่อหลีกเลี่ยงความปนเปื้อนจากสารระเหยหรือคราบอินทรีย์

การพัฒนาวิธีการฉีดตัวอย่างด้วยเทคนิค headspace

ทดลองปรับพารามิเตอร์การฉีดตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง HS-GC-MS โดยเปรียบเทียบสภาวะการฉีดตัวอย่างแบบ split ระหว่าง split ratio ที่ 1:15 และ 1:20 เปรียบเทียบอุณหภูมิของ inlet temperature ระหว่าง 180 และ 220 องศาเซลเซียส และปริมาตรการฉีดระหว่าง 1.0 และ 2.0 มิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ ทำการทดลองแต่ละสภาวะจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบ response signal เฉลี่ยที่ได้ และคัดเลือกสภาวะที่ให้สัญญาณสูงร่วมกับมี peak shape ที่มีความสมมาตร คมชัด ฐานแคบ และตั้งอยู่บนเส้นฐานที่ราบเรียบมากที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

ปฏิกิริยาการเกิดแก๊สเอทิลีน

เมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นในขวด headspace ที่มีสารอีทีฟอน อีทีฟอนจะเกิดการสลายตัวภายใต้สภาวะต่างร่วมกับการเร่งปฏิกิริยา



สมการที่ 1

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ประกอบด้วย ผลไม้เขตร้อน (tropical fruits) ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน และผลไม้เขตอบอุ่น (temperate fruits) ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่

เตรียม matrix blank โดยใช้ตัวอย่างที่ไม่พบสารที่สนใจ (analyte-free sample) โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมดหากมีน้ำหนักไม่เกิน 1 กิโลกรัม หรือสับตัวอย่างด้วยวิธี quartering และเลือกใช้ส่วนตรงข้ามกันของผลหากมีน้ำหนักมากกว่า 1 กิโลกรัม จากนั้นตัดทิ้งเฉพาะส่วนที่ไม่บริโภค ได้แก่ เมล็ด ก้าน และจุกสับปะรด และใช้เฉพาะส่วนที่บริโภคได้ตามชนิดของผลไม้ เตรียมตัวอย่างไม่น้อยกว่า 500 กรัม ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งเป็น

ด้วยความร้อน ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยแก๊สเอทิลีน ดังสมการที่ 1 เอทิลีนที่เกิดขึ้นเป็นสารระเหยง่ายและสามารถกระจายเข้าสู่เฟสแก๊สในบริเวณ headspace ได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นระบบหัวฉีดอัตโนมัติจะดูดส่วนของ headspace และส่งผ่านท่อส่งที่ควบคุมอุณหภูมิเข้าสู่คอลัมน์ชนิด PLOT/Q เพื่อแยกแก๊สเอทิลีนออกจากสารระเหยอื่นที่อาจมีอยู่ในเมทริกซ์ของตัวอย่าง ผลไม้ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดมวลสารแบบ single quadrupole ซึ่งใช้ตัวกรองมวลชนิดควอดรูโพลหนึ่งชุดในการคัดเลือกไอออนตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z) โดยอาศัยสนามไฟฟ้ากระแสตรงร่วมกับสนามไฟฟ้ากระแสสลับความถี่วิทยุ การทำงานในโหมด selected ion monitoring (SIM) ช่วยเพิ่มความไวและความจำเพาะของการตรวจวัดโดยติดตามเฉพาะไอออนเป้าหมายและลดสัญญาณรบกวนจากเมทริกซ์ ส่งผลให้วิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารอีทีฟอนในตัวอย่างอาหารที่มีเมทริกซ์ซับซ้อนได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้

analytical portion และ reserved portion โดยเก็บที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า เพื่อป้องกันการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของสารตกค้าง^(21,22)

การสกัดตัวอย่าง

ก่อนการเตรียมตัวอย่างต้องทำความสะอาดเครื่องแก้วทุกชิ้นโดยล้างด้วย acetone และ n-hexane แล้วคว่ำให้แห้ง เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่อาจส่งผลต่อความถูกต้องของการวิเคราะห์ ตัวอย่างผลไม้ที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จำนวน 5.0 ± 0.1 กรัม นำมาชั่งใส่ขวด headspace ขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเติมเมทานอลอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร และสารละลาย saturated NaOH อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรลงในขวด จากนั้น

ปิดผนึกด้วย aluminum crimp seal ทันทีในขณะที่สารละลายยังมีอุณหภูมิต่ำ เพื่อลดการสูญเสียแก๊สที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างถูกผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเร่งให้เกิดการสลายตัวของอีทีฟอนเป็นแก๊สเอทิลีน จากนั้นนำไป sonication เป็นเวลา 2 นาที เพื่อช่วยจัดฟองอากาศและช่วยให้เข้าสู่ภาวะสมดุลระหว่างเฟสของเนื้อผลไม้และเฟสแก๊สใน headspace แก๊สเอทิลีนที่เกิดขึ้นจะถูกดูดเข้าสู่เครื่อง GC-MS ด้วยเทคนิค headspace injection เพื่อให้ได้การตรวจวัดที่มีความไวและความจำเพาะสูง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

ความจำเพาะของวิธีประเมินโดยการฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบค่า retention time (RT) โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับเป็น ± 0.1 นาที รวมถึงตรวจสอบ quantification ion และ qualification ions จากนั้นทำการวิเคราะห์ method blank ซึ่ง chromatogram ต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และ/หรือค่า m/z ตรงกับสารมาตรฐาน และวิเคราะห์ matrix blank ของตัวอย่างผลไม้ทุกชนิดตามวิธีที่กำหนด โดยต้องไม่พบสัญญาณของสารเป้าหมายหรือหากพบสัญญาณ ปริมาณของสารต้องต่ำกว่าค่าขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection; LOD) ของเครื่องมือ

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยการฉีดสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น โดยระดับต่ำสุดต้องเท่ากับหรือต่ำกว่าค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (x-axis) กับ peak area หรือ intensity/response (y-axis) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับ $R^2 \geq 0.99$

การประเมินผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect)

ทำการศึกษาผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect) ในกลุ่มผลไม้เขตร้อน ซึ่งเป็นเมทริกซ์ที่มีสัญญาณพื้นหลัง (background) สูง และอาจส่งผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์ได้ ดำเนินการโดยเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้จากเมทริกซ์ของผลไม้กับค่าที่ได้จากสารละลายมาตรฐานในเมทานอล (MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยใช้การวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเส้น (linear regression)^(23,24) ระหว่างค่าที่ได้จากเมทริกซ์และจาก MeOH ตามสมการ $C_{\text{matrix}} = aC_{\text{MeOH}} + b$ รายงานค่า slope และ intercept พร้อมช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับว่าผลของเมทริกซ์อยู่ในระดับที่ยอมรับได้เมื่อ 95% CI ของ slope ครอบคลุมค่า 1 และของ intercept ครอบคลุมค่า 0 ความเป็นเส้นตรงของสมการประเมินจากค่า R^2 โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับที่ $R^2 \geq 0.99$ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบ paired t-test แบบ two-tailed เพื่อสนับสนุนการประเมินเชิงสถิติ โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับเมื่อค่า $p\text{-value} > 0.05$ ($n = 6$, $df = 5$, $\alpha = 0.05$)

ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOD and LOQ)

การหาค่า LOD และ LOQ ดำเนินการโดยใช้ 2 แนวทาง ได้แก่ 1) ใช้ target LOD โดยการพิจารณาจากอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio; S/N) โดยกำหนดค่า LOD เป็นระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า $S/N > 3$ และค่า LOQ เป็นระดับความเข้มข้นที่ให้ค่า $S/N > 10$ และ 2) คำนวณจากระดับพื้นหลังของเอทิลีนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเมทริกซ์ โดยทำการวิเคราะห์ matrix blank เพื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และคำนวณค่า LOD ตามสมการ $LOD = \text{Mean (blank)} + 3SD$ ⁽²⁵⁾ จากนั้นทำการยืนยันค่า LOD โดยการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ทุกชนิด ตัวอย่าง ที่ระดับความเข้มข้นของ LOD จำนวน 10 ซ้ำ โดย S/N ต้องให้ค่ามากกว่า 3 ในทุกตัวอย่าง และมีอัตราส่วนความเข้มข้นสัญญาณของ confirmation ion

อยู่ภายใน $\pm 30\%$ ของสารมาตรฐาน สำหรับการยืนยันค่า LOQ ทำการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้นของ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ และประเมินค่าร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย (mean %recovery) และค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับของ %recovery อยู่ในช่วง 70–120% และ %RSD ไม่เกิน 20%

ความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ประเมินโดยการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ของตัวอย่างผลไม้ โดยกำหนดระดับความเข้มข้นในผลไม้เซตร้อน ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน ที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนผลไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เซอร์รี และสตรอว์เบอร์รี ทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่พิสูจน์แล้วว่ามีความเป็นเส้นตรงโดยวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละระดับจำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) และค่า %RSD เพื่อประเมินสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 70–120% และค่า %RSD ไม่เกิน 20% ตามแนวทาง SANTE/11312/2021 v2026⁽²⁶⁾

ช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (working range and linearity)

ยืนยันช่วงการวิเคราะห์ (Range) โดยการเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ของผลไม้เซตร้อน ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน อย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น ภายในช่วงกราฟมาตรฐานที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเส้นตรง โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธี ระดับละ 3 ซ้ำ และประเมินความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ซึ่งต้องไม่น้อยกว่า 0.99 สำหรับเมทริกซ์ของผลไม้เขตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมินช่วงการวิเคราะห์ เนื่องจากช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการประเมินความแม่นยำและความเที่ยงครอบคลุมช่วงที่วิธีวิเคราะห์แสดงความเป็นเส้นตรงได้อย่างเหมาะสม

ความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty)

ประเมินตามแนวทาง EURACHEM และ ISO GUM โดยพิจารณาแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ ได้แก่ การชั่งน้ำหนัก การเตรียมสารมาตรฐานและ working solution การเจือจาง การเตรียมตัวอย่าง ความเป็นเส้นตรง ความแม่นยำ ความเที่ยง และความแปรผันของเครื่องมือ จากนั้นคำนวณค่า combined standard uncertainty และขยายค่าด้วย coverage factor $k = 2$ เพื่อให้ได้ค่าความไม่แน่นอนแบบขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบความชำนาญ (proficiency testing)

เพื่อยืนยันสมรรถนะของวิธี ห้องปฏิบัติการได้เข้าร่วมการทดสอบความชำนาญของ FAPAS® 19436 (Apple Purée) โดยดำเนินการวิเคราะห์ตามวิธี HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้นภายใต้สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง เพื่อยืนยันความถูกต้องและความสามารถของห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล

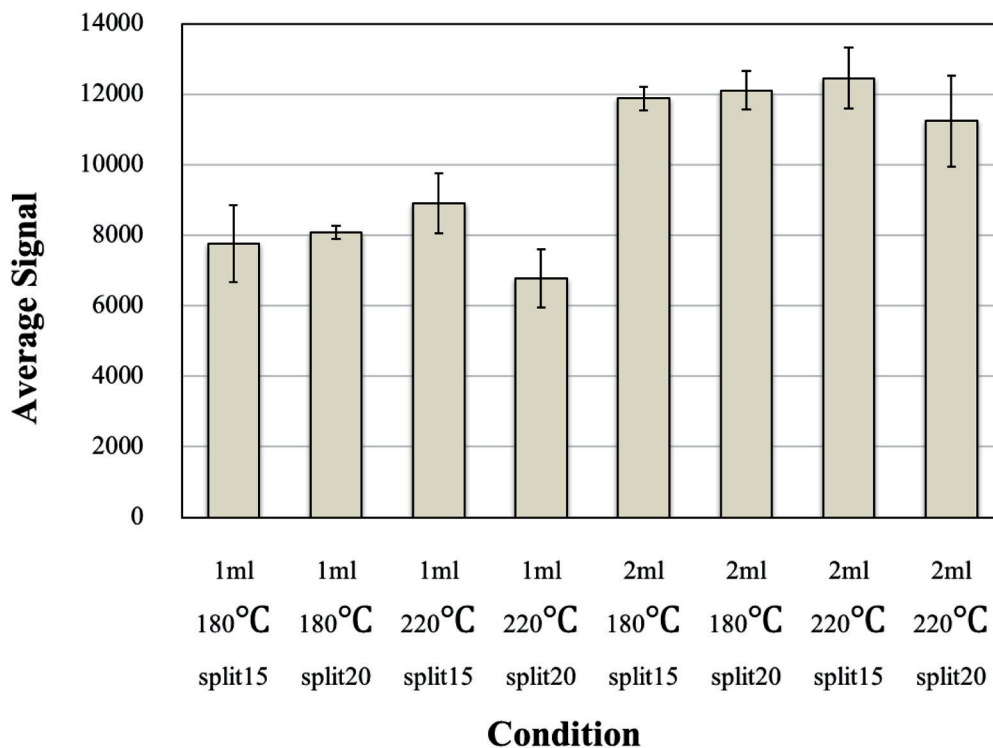
ผล

การพัฒนาวิธีการฉีดตัวอย่างด้วยเทคนิค headspace

เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรการฉีดตัวอย่าง (injection volume) ระหว่าง 1 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองแต่ละสภาวะ จำนวน 3 ซ้ำ ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าเมื่อใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้สัญญาณเฉลี่ยสูงกว่าการใช้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในทุกสภาวะ เมื่อพิจารณาเฉพาะสภาวะที่ใช้ 2 มิลลิลิตร พบว่าสภาวะที่ใช้ inlet temperature 220 องศาเซลเซียส และ split ratio 1:15 ให้สัญญาณเฉลี่ยสูงสุด (average signal = 12,450) รองลงมา คือ สภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 (average signal = 12,110) และสภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:15 (average signal = 11,883) ขณะที่สภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 220 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 ให้สัญญาณเฉลี่ยต่ำที่สุดในกลุ่ม 2 มิลลิลิตร (average signal = 11,238)

โดยสภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:15 มีค่า SD ต่ำที่สุด (331) และสภาวะ 2 มิลลิลิตร inlet temperature 220 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 มีค่า SD สูงที่สุด (1,290) ในกลุ่มเดียวกัน ในการศึกษานี้เลือกใช้สภาวะ 2 มิลลิลิตร

inlet temperature 180 องศาเซลเซียส split ratio 1:20 เนื่องจากให้ sensitivity ที่ดี ใช้อุณหภูมิต่ำโดยไม่ทำลายตัวอย่าง และ split ratio สูงทำให้ได้ peak shape ที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์มากกว่า



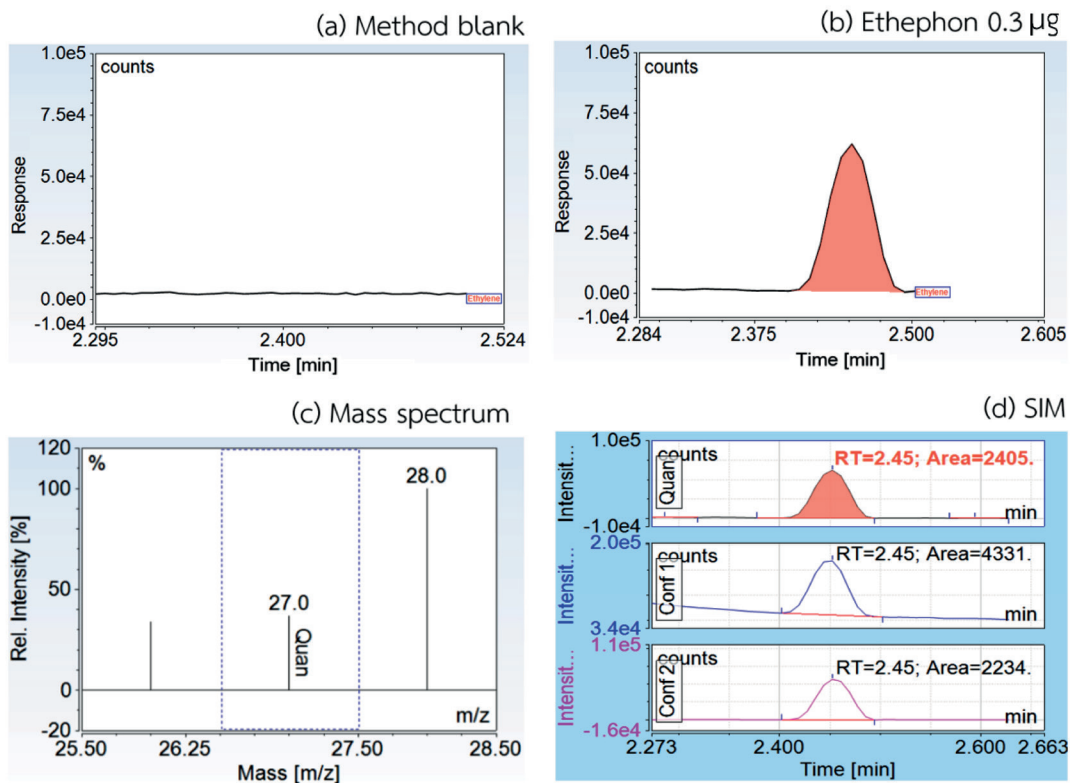
ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบสภาวะการฉีดตัวอย่างต่อสัญญาณเฉลี่ย

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation results)

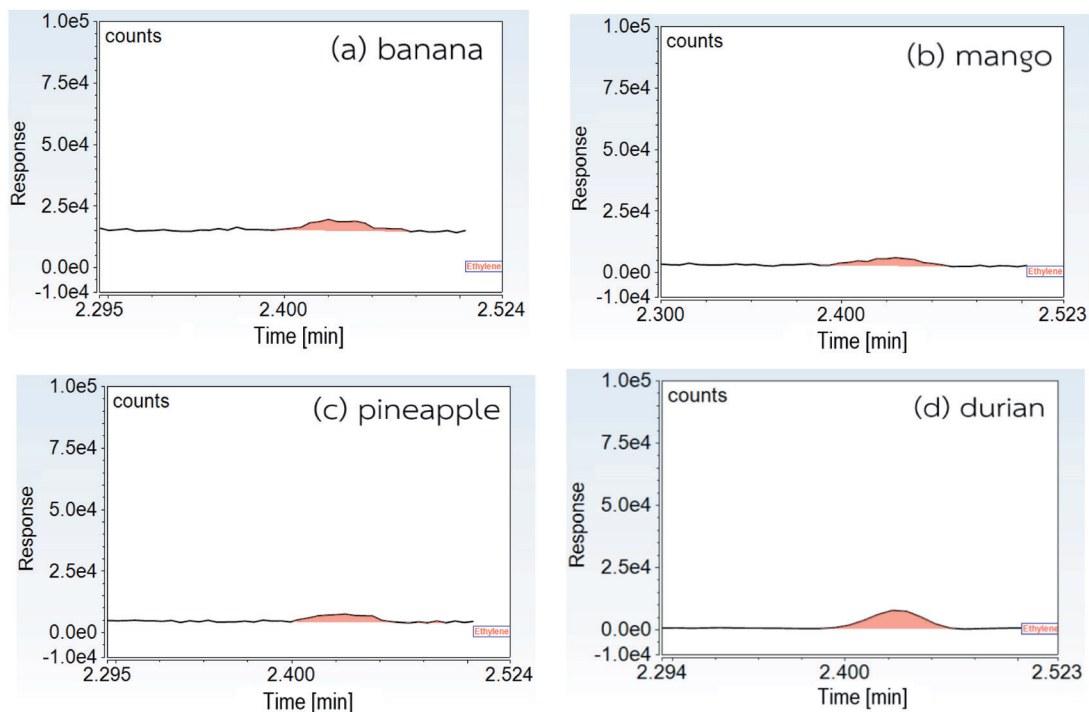
ความจำเพาะของวิธี

การประเมินความจำเพาะของวิธีดำเนินการโดยการฉีดสารมาตรฐานเอทิลีนที่ได้จากการสลายตัวของอีทีฟอน จำนวน 3 ครั้งต่อแต่ละระดับความเข้มข้นเพื่อตรวจสอบ retention time (RT) และสัดส่วนของไอออน โดยกำหนด m/z 27 เป็น quantifier ion และ m/z 26 และ 28 เป็น qualifier ions ผลการทดลองแสดงว่าเอทิลีนมีค่า RT คงที่ที่ 2.45 ± 0.0 นาที ในทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษา ได้แก่ 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 μg และอัตราส่วนของไอออน

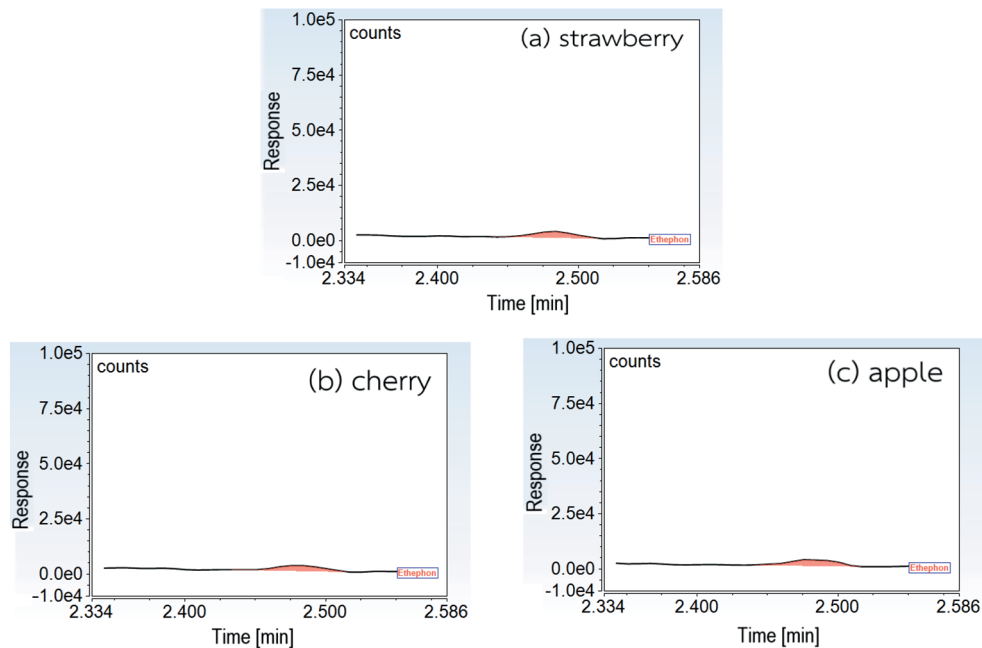
ทั้งสามตัวสอดคล้องกับสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 2 พบว่า method blank ไม่ปรากฏพีคที่ RT 2.45 นาที ขณะที่ตัวอย่างอีทีฟอนความเข้มข้น 0.3 μg หลังการสลายตัวอย่างได้สภาวะต่างให้พีคที่ตำแหน่งเดียวกัน โดย mass spectrum ของพีคดังกล่าวแสดงไอออนที่ m/z 26, 27 และ 28 และโครมาโทแกรมแบบ SIM ของ m/z 26, 27 และ 28 แสดงพีคที่ RT = 2.45 นาที นอกจากนี้การวิเคราะห์ matrix ของทุกชนิดตัวอย่างพบสัญญาณเอทิลีนตามธรรมชาติ แต่เมื่อคำนวณเป็นปริมาณที่พบในตัวอย่างแล้ว พบว่าปริมาณต่ำกว่า LOD ทุกชนิดตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS แสดง (a) method blank, (b) ตัวอย่างอีทีฟอน 0.3 μg หลังการสลายตัวภายใต้สภาวะต่าง, (c) mass spectrum ของเอทิลีน (m/z 26, 27 และ 28) และ (d) extracted ion chromatograms (SIM) ของ m/z 26, 27 และ 28 ที่ $RT = 2.45$ นาที



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS ของเอทิลีนที่ตรวจวัดได้ในเมทริกซ์ผลไม้เขตร้อน ได้แก่ (a) กัลย (banana), (b) มะม่วง (mango), (c) สับปะรด (pineapple) และ (d) ทุเรียน (durian)

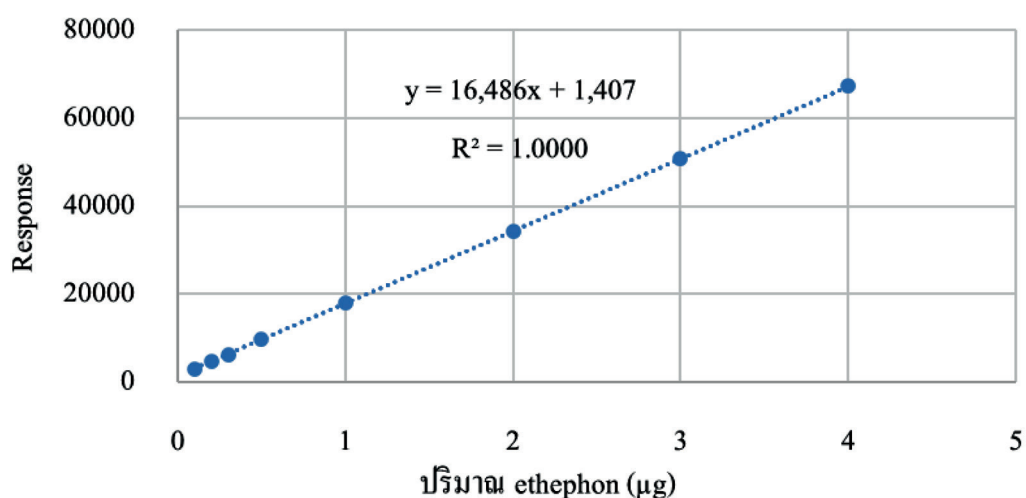


ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมจากเครื่อง GC-MS ของเอทิลีนที่ตรวจวัดได้ในเมทริกซ์ผลไม้เชตอบอุ่น ได้แก่ (a) สตอร์วเบอร์รี่ (strawberry), (b) เชอร์รี่ (cherry) และ (c) แอปเปิล (apple)

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of calibration curve)

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานแบบ external calibration ครอบคลุมช่วงความเข้มข้น 0.1–4.0 ไมโครกรัม (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ไมโครกรัม) โดยวิเคราะห์ซ้ำระดับละ 3 ครั้ง และใช้ค่าเฉลี่ยของ response ในแต่ละระดับความเข้มข้น

ผลการพล็อตความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารอีทีฟอนและพื้นที่พีคของเอทิลีนให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 1.0000 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ($R^2 \geq 0.99$) แสดงให้เห็นถึงความเป็นเส้นตรงของวิธีที่ดีเยี่ยมตลอดช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ethephon (μg) กับ analyte peak area (response)

ผลกระทบจากเมทริกซ์ (matrix effect)

ผลการประเมิน matrix effect ด้วยวิธี linear regression^(23,24) ระหว่างความเข้มข้นที่ได้จากเมทริกซ์ของผลไม้เซตร้อน ได้แก่ มะม่วง สับปะรด ทูเรียน และกล้วย กับความเข้มข้นจากสารละลายมาตรฐานใน MeOH ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเมทริกซ์ทุกชนิดให้ผลการถดถอยที่มีความเป็นเส้นตรงสูง มีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.9987–0.9997 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด ค่า slope อยู่ในช่วง 1.024–1.044 โดยทูเรียนและสับปะรดมีช่วง

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของ slope ครอบคลุมค่า 1 ขณะที่มะม่วงและกล้วยให้ค่า slope สูงกว่า 1 เล็กน้อย นอกจากนี้ค่า intercept ของทุกเมทริกซ์มีค่าต่ำและช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (95% CI) ครอบคลุมศูนย์ ผลจากการทดสอบ paired t-test แบบ two-tailed ($n = 6$, $df = 5$, $\alpha = 0.05$) พบว่าเมทริกซ์ทุกชนิดให้ค่า p -value มากกว่า 0.05 สำหรับเมทริกซ์ของผลไม้เซตตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมิน matrix effect เนื่องจาก background ที่ตรวจพบอยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้เซตร้อน

ตารางที่ 2 ผลการประเมินผลกระทบจากเมทริกซ์ของผลไม้โดยวิธี linear regression และ paired t-test

Matrix	Slope	95% CI (Slope)	Intercept	95% CI (Intercept)	R^2	t	p-value
มะม่วง	1.042	1.007 to 1.078	-0.009	-0.089 to 0.071	0.9994	2.267	0.073
สับปะรด	1.030	0.979 to 1.082	-0.024	-0.139 to 0.092	0.9987	1.099	0.322
ทูเรียน	1.024	0.998 to 1.050	-0.011	-0.069 to 0.048	0.9997	1.418	0.216
กล้วย	1.044	1.014 to 1.074	-0.019	-0.087 to 0.049	0.9996	2.112	0.088

หมายเหตุ: 1) Linear regression คำนวณจากสมการ $C_{\text{matrix}} = aC_{\text{MeOH}} + b$ โดยใช้ MeOH เป็นตัวแปรอิสระ
2) ค่า t และ p-value ได้จากการทดสอบ paired t-test แบบ two-tailed
3) Paired t-test ใช้จำนวนคู่ข้อมูล $n = 6$, $df = 5$ และกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD)

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการตรวจพบในผลไม้เซตร้อน ได้แก่ กล้วย มะม่วง สับปะรด และทูเรียน ดำเนินการโดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ระดับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าค่าอัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (S/N ratio) อยู่ในช่วง 147–399, 182–412, 88–158 และ 108–299 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับผลไม้เซตตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่ คำนวณค่า LOD จากการวิเคราะห์ matrix blank จำนวน 10 ซ้ำ โดยใช้สมการ $LOD = \text{Mean}(\text{blank}) + 3SD$ พบว่าค่า

LOD ที่คำนวณได้ของแอปเปิลและสตรอว์เบอร์รี่เท่ากับ 0.011 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเชอร์รี่เท่ากับ 0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตามเพื่อความเหมาะสมในการใช้งานจริง จึงกำหนดค่า LOD สำหรับผลไม้เซตตอบอุ่นเท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยันโดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับดังกล่าว จำนวน 10 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ตามวิธี พบว่าค่า S/N ratio ของแอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่ อยู่ในช่วง 6–39, 20–36 และ 11–41 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าวิธีสามารถตรวจพบอีทีฟอนได้อย่างเหมาะสมที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว ผลการทดสอบ LOD ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และค่า signal-to-noise ratio (S/N ratio) ของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในตัวอย่างผลไม้แต่ละชนิด

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	LOD ที่คำนวณได้ (mg/kg)	LOD ที่ยืนยันได้ (mg/kg)	S/N ratio at LOD*
ผลไม้เขตร้อน	กล้วย	–	0.10	147–399
	มะม่วง			182–412
	สับปะรด			88–158
	ทุเรียน			108–299
ผลไม้เขตอบอุ่น	แอปเปิล	0.011	0.02	6–39
	เชอร์รี่	0.007		20–36
	สตรอว์เบอร์รี่	0.011		11–41

หมายเหตุ: ค่า S/N ratio ที่ระดับ LOD จากการทดสอบ 10 ซ้ำ, ยืนยันค่า LOD ที่ 0.10 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผลไม้เขตร้อนและผลไม้เขตอบอุ่น ตามลำดับ

การทดสอบค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (%RSD)

การทดสอบค่าขีดจำกัดเชิงปริมาณ ความแม่นยำ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในตัวอย่างผลไม้ดำเนินการโดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ผลไม้เขตร้อน (กล้วย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน) และผลไม้เขตอบอุ่น (แอปเปิล เชอร์รี่ และสตรอว์เบอร์รี่) โดยผลไม้เขตร้อนมีค่า LOQ เท่ากับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่นมีค่า LOQ ต่ำกว่าคือ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับผลการทดสอบในผลไม้เขตร้อนที่ระดับความเข้มข้น 0.30, 1.00 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (n = 10) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า กล้วยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 105.7–112.6% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 7.3–16.0% ขณะที่มะม่วงมีค่า

%recovery 113.0–115.9% และ %RSD 1.5–6.4% สับปะรดมีค่า %recovery 108.3–119.0% และ %RSD 5.6–9.3% ส่วนทุเรียนมีค่า %recovery 81.4–105.5% และ %RSD 5.6–8.5% ในส่วนของผลไม้เขตอบอุ่น ผลทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.30 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (n = 10) พบว่าแอปเปิลมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 98.6–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.9–11.1% ขณะที่เชอร์รี่มีค่า %recovery 89.8–98.2% และ %RSD 7.2–13.9% และสตรอว์เบอร์รี่มีค่า %recovery 90.0–97.1% และ %RSD 5.4–9.6% โดยรวม ผลการประเมินทั้งหมดพบว่าวิธีวิเคราะห์ให้ค่าความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของ SANTE/11312/2021 v2026⁽²⁶⁾ สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างในอาหาร

ตารางที่ 4 ผลการประเมินค่า LOQ ความแม่นยำ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในตัวอย่างผลไม้

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ระดับที่เติมสารมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	%Recovery	%RSD
ผลไม้เขตร้อน	กล้วย	0.30 (LOQ)	105.7	16.0
		1.00	112.6	7.3
		2.00	109.8	15.9

ตารางที่ 4 ผลการประเมินค่า LOQ ความแม่นยำ และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หีฟอนในตัวอย่างผลไม้ (ต่อ)

กลุ่มตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ระดับที่เติมสารมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	%Recovery	%RSD
ผลไม้เขตร้อน	มะม่วง	0.30 (LOQ)	113.0	6.4
		1.00	115.8	1.5
		2.00	115.9	4.5
	สับปะรด	0.30 (LOQ)	108.3	9.3
		1.00	119.0	6.0
		2.00	112.4	5.6
	ทุเรียน	0.30 (LOQ)	91.8	5.6
		1.00	81.4	8.5
		2.00	105.5	7.3
ผลไม้เขตอบอุ่น	แอปเปิล	0.05 (LOQ)	120.0	5.6
		0.30	101.6	2.9
		1.00	98.6	11.1
	เชอร์รี่	0.05 (LOQ)	98.2	7.2
		0.30	89.8	11.8
		1.00	92.8	13.9
	สตรอว์เบอร์รี่	0.05 (LOQ)	97.1	5.4
		0.30	96.6	6.1
		1.00	90.0	9.6

หมายเหตุ: ผลไม้เขตร้อนกำหนด LOQ ที่ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และผลไม้เขตอบอุ่นกำหนด LOQ ที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการทดสอบ 10 ซ้ำ

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ (linearity of working range)

ความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ประเมินเฉพาะในเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อน โดยเติมสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.30, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 และ 4.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และวิเคราะห์ซ้ำระดับละ 3 ครั้ง ผลการประเมินพบว่าสมการกราฟมาตรฐานของแต่ละเมทริกซ์มีความเป็นเส้นตรง

ที่ดี โดยค่าที่ตรวจวัดได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) อยู่ในช่วง 0.9986–0.9998 สำหรับทุกเมทริกซ์ ซึ่งรายละเอียดสมการเชิงเส้นและค่า R^2 ดังแสดงในตารางที่ 5 สำหรับเมทริกซ์ผลไม้เขตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมินช่วงการวิเคราะห์เพิ่มเติม เนื่องจากมีสัญญาณพื้นหลังของเอทิลีนและผลกระทบจากเมทริกซ์อยู่ในระดับต่ำ โดยช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบครอบคลุมช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ได้อย่างเหมาะสม

ตารางที่ 5 สมการกราฟมาตรฐานและค่า R^2 ของช่วงการวิเคราะห์

เมทริกซ์	สมการเชิงเส้น (calibration equation)	R^2
มะม่วง	$y = 1.0453x + 0.0057$	0.9994
สับปะรด	$y = 1.0272x - 0.0137$	0.9986
ทุเรียน	$y = 0.9651x + 0.0022$	0.9995
กล้วย	$y = 1.0412x - 0.0092$	0.9998

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัด (measurement uncertainty; MU)

การประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS ดำเนินการตามแนวทางของ EURACHEM Guide และ ISO GUM (Bottom-up approach)⁽²⁷⁾ โดยคำนวณค่า individual standard uncertainty (u_i) จากแหล่งที่มาที่เกี่ยวข้องในทุกขั้นตอนของกระบวนการวิเคราะห์ และนำมารวมเพื่อหาค่า combined standard uncertainty ตามหลักการรวมกำลังสอง ผลการแจกแจงสัดส่วนความไม่แน่นอนแสดงให้เห็นว่า method precision (repeatability) เป็นแหล่งที่มีอิทธิพลต่อค่าความไม่แน่นอนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 59.03 รองลงมา คือ standard concentration และขั้นตอน

การเจือจาง ร้อยละ 12.97, sample volume (pipette + temperature) ร้อยละ 10.24, sample weight ร้อยละ 6.82, bias (recovery) ร้อยละ 6.66 และ calibration curve (C_0) ร้อยละ 4.27 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อรวมแหล่งที่มาทั้งหมดแล้วคิดเป็น 100% ของความไม่แน่นอนรวม โดยค่า combined relative standard uncertainty (u_c) มีค่าเท่ากับ 0.10534 เมื่อนำไปคำนวณกับผลการวิเคราะห์ที่ระดับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะได้ค่า $u(x)$ เท่ากับ 0.0316 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเมื่อขยายค่าความไม่แน่นอนด้วย coverage factor ($k = 2$) ที่ระดับความเชื่อมั่นประมาณ 95% จะได้ค่า expanded uncertainty (U) เท่ากับ 0.0632 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สรุปลองค์ประกอบความไม่แน่นอนและค่าที่คำนวณได้ของวิธี HS-GC-MS

แหล่งที่มาความไม่แน่นอน	$U(x)/x$	% Contribution
Sample weight	0.01155	6.82
Sample volume (pipette + temperature)	0.01735	10.24
Calibration curve (C_0)	0.00724	4.27
Standard concentration + dilution	0.02198	12.97
Method precision (repeatability)	0.10000	59.03
Bias (recovery)	0.01129	6.66
Total	0.1694	100.0
Combined standard uncertainty (relative)	$u_c = \sqrt{\sum (u(x)/x)^2} = 0.10534$	
Combined standard uncertainty (สำหรับ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	$u(x) = 0.10534 \times 0.30 = 0.0316$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	
Expanded uncertainty (95%, $k = 2$)	$U = 2 \times 0.0316 = 0.063$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	

การทดสอบความชำนาญ (proficiency test)

เข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญ FAPAS[®] 19436 (Apple Purée)⁽²⁸⁾ ซึ่งมีห้องปฏิบัติการรายงานผลการวิเคราะห์อีทีฟอนทั้งสิ้น 50 แห่ง โดย 45 แห่ง ได้รับการประเมินเป็นค่า z-score ส่วนอีก 5 แห่ง รายงานผลเป็นขีดจำกัดการหาปริมาณ (<LOQ) จึงไม่ถูกนำมาคำนวณ z-score เมื่อพิจารณาหลักการวิเคราะห์ (method principle) ที่เปิดเผยใน Appendix I พบว่ามีการระบุเพียง

17 แห่ง ได้แก่ การใช้เทคนิค GC จำนวน 1 แห่ง (ร้อยละ 2.0) และ LC จำนวน 16 แห่ง (ร้อยละ 32.0) ส่วนอีก 33 แห่ง (ร้อยละ 66.0) ไม่ได้ระบุข้อมูลดังกล่าว ทั้งนี้ค่ากำหนด (assigned value) ของอีทีฟอนเท่ากับ 38.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ห้องปฏิบัติการของผู้วิจัย ซึ่งเป็นห้องเดียวที่ใช้เทคนิค GC รายงานค่าอีทีฟอนเท่ากับ 39.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า z-score เท่ากับ 0.2 ในเกณฑ์ยอมรับ ($|z| \leq 2$) เมื่อเปรียบเทียบ

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร (สคอ.) ใช้การแปรสภาพสารในระบบ headspace ภายใต้สภาวะต่างโดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายและไม่มีขั้นตอน clean-up ขณะที่ห้องปฏิบัติการอื่นใช้วิธีเตรียมตัวอย่างที่หลากหลาย ได้แก่ QuEChERS, QuPPE, solvent extraction และ liquid-liquid extraction โดยบางห้องปฏิบัติการมีการปรับค่า pH และมีขั้นตอน clean-up เพิ่มเติมสำหรับการคำนวณผล ห้องปฏิบัติการ สคอ. ใช้ external calibration curve ในขณะที่ห้องปฏิบัติการอื่นใช้ทั้ง external calibration, matrix-matched calibration และ standard-addition calibration และพบทั้งกรณีที่ใช้และไม่ใช้ internal standard

วิจารณ์

ผลการทดลองการเปรียบเทียบระหว่างปริมาตรและสภาวะการฉีดตัวอย่างต่อสัญญาณตอบสนองที่ได้จากเครื่องมือแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาตรการฉีดจาก 1 มิลลิลิตร เป็น 2 มิลลิลิตร ส่งผลให้ได้สัญญาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกสภาวะ เนื่องจากมีปริมาณสารเข้าสู่ระบบมากขึ้น เมื่อพิจารณาเฉพาะสภาวะที่ใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พบว่าสภาวะที่อุณหภูมิ 220 องศาเซลเซียส และ split ratio 1:15 ให้สัญญาณสูงที่สุด แต่มีความแปรปรวนของสัญญาณมากกว่า ขณะที่สภาวะ 180 องศาเซลเซียส ให้สัญญาณในระดับสูงและมีความเสถียรของสัญญาณดีกว่าโดยรวมสำหรับสภาวะ 2 มิลลิลิตร split ratio 1:20 ให้สัญญาณตอบสนองในระดับสูงพร้อมค่าความแปรปรวนที่ยอมรับได้แสดงถึงความสมดุลระหว่างความไวและความเสถียรของการวิเคราะห์ จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้งานวิเคราะห์และการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าเทคนิค HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารอีทีฟอนในผลไม้โดยอาศัยหลักการสลายตัวของอีทีฟอนภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีนซึ่งเป็นสารระเหยง่าย และตรวจวัดในเฟสแก๊สด้วยระบบ GC-MS ในโหมด SIM ซึ่งช่วยเพิ่มทั้งความจำเพาะและความไวของการตรวจวัด แนวทางการวิเคราะห์เป็นการวิเคราะห์

ทางอ้อมโดยตรวจวัดอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถแก้ไขข้อจำกัดของการวิเคราะห์อีทีฟอนโดยตรงซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสูง ระเหยยาก และไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วย GC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารอีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีสมรรถนะที่เหมาะสมและสอดคล้องกับหลักการการเกิดปฏิกิริยาเคมีและการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือในทุกพารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบ โดยเริ่มจากความจำเพาะของวิธี พบว่าแก๊สเอทิลีนซึ่งเกิดจากการสลายตัวของสารอีทีฟอนสามารถตรวจวัดได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยให้ค่า retention time คงที่ที่ 2.45 นาที ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ (0.1–4.0 ไมโครกรัม) และมีอัตราส่วนของไอออน m/z 27 (quantifier) ร่วมกับ m/z 26 และ 28 (qualifiers) ที่สอดคล้องกับสารมาตรฐานในทุกระดับความเข้มข้น ซึ่งยืนยันความถูกต้องเชิงโครงสร้างของสัญญาณที่ตรวจวัดได้อย่างชัดเจน ผลดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์แก๊สเอทิลีนซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กและมี fragmentation pattern จำกัด ทั้งนี้ประสิทธิภาพที่ได้สะท้อนถึงความเหมาะสมของคอลัมน์ชนิด PLOT/Q ในการแยกสารก๊าซโมเลกุลขนาดเล็ก รวมถึงความสามารถของระบบตรวจวัดมวลสารแบบ single quadrupole ในการคัดเลือกไอออนเป้าหมายได้อย่างจำเพาะภายใต้โหมด SIM

การไม่พบพีคของเอทิลีนใน method blank แสดงว่าระบบปราศจากสารปนเปื้อนและมีความเหมาะสมของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ขณะที่การตรวจพบเอทิลีนใน matrix blank ของทั้งผลไม้เขตร้อนและผลไม้เขตอบอุ่น เป็นไปตามธรรมชาติของผลไม้ซึ่งสามารถผลิตเอทิลีนได้เอง โดย matrix blank ของผลไม้เขตร้อน ได้แก่ กัลย มะม่วง สับปะรด และทุเรียน ให้สัญญาณเอทิลีนต่ำกว่า LOD ทั้งหมด ในขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่น ได้แก่ แอปเปิล เชอร์รี่ และสตอร์เบอร์รี่ ตรวจพบสัญญาณเอทิลีนในระดับที่ให้ค่า S/N อยู่ในช่วง 6–41 อย่างไรก็ตามสัญญาณดังกล่าวยังคงต่ำกว่า LOD ที่กำหนด และไม่ก่อให้เกิดการรบกวนในระบบโครมาโทกราฟีหรือผลกระทบต่อการระบุชนิดสารและการคำนวณเชิงปริมาณภายใต้เงื่อนไขของวิธีที่ใช้

จึงสะท้อนให้เห็นว่าวิธีสามารถแยกเอทิลีนที่เกิดจากอีทีฟอนออกจากเอทิลีน background ของเมทริกซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความจำเพาะเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ในเมทริกซ์ผลไม้ที่หลากหลายได้ ในด้านการวิเคราะห์เชิงปริมาณ การสร้างกราฟมาตรฐานแบบ external calibration ในช่วงความเข้มข้น 0.1–4.0 ไมโครกรัม ให้ค่า R^2 เท่ากับ 1.0000 เมื่อพิจารณาถึงลักษณะของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งอาศัยการแปรสภาพทางเคมีของสารก่อนการตรวจวัดด้วยเครื่องมือผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการสลายตัวของอีทีฟอนให้เกิดแก๊สเอทิลีนเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณสารตั้งต้นตลอดช่วงที่ศึกษา และสะท้อนถึงความสม่ำเสมอของกระบวนการนำส่งเอทิลีนเข้าสู่เฟสแก๊สและการตรวจวัดด้วย HS-GC-MS เมื่อพิจารณาความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ในเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อน พบว่าค่า R^2 ของแต่ละเมทริกซ์ยังคงอยู่ในระดับสูงมาก ได้แก่กล้วย 0.9998 มะม่วง 0.9994 ทูเรียน 0.9995 และสับปะรด 0.9986 แม้ว่าความชันของสมการเชิงเส้นจะอยู่ในช่วง 0.9651–1.0453 ซึ่งแตกต่างกันเล็กน้อย ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าความแปรผันของสัญญาณที่สังเกตพบมีความสัมพันธ์กับลักษณะของเมทริกซ์ที่ส่งผลต่อความไวของการตรวจวัดมากกว่าการลดลงของความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ ทั้งนี้ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความทน (robust) ต่ออิทธิพลของเมทริกซ์ และสามารถรองรับผลของ matrix effect ได้ในระดับที่ยอมรับได้

ผลการประเมิน matrix effect พบว่าเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อนทุกชนิดให้ความเป็นเส้นตรงของสัญญาณอยู่ในระดับสูง ($R^2 = 0.9987–0.9997$) โดยค่า slope อยู่ใกล้เคียงค่าอุดมคติ (1.024–1.044) แม้ว่ามะม่วงและกล้วยจะมีช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของค่า slope ไม่ครอบคลุมค่า 1 ซึ่งสะท้อนถึงแนวโน้มของ matrix enhancement effect เล็กน้อย แต่ผลการทดสอบ paired t-test ให้ค่า p -value มากกว่า 0.05 สำหรับทุกเมทริกซ์ แสดงว่าความแตกต่างระหว่างสัญญาณจากเมทริกซ์และสารมาตรฐานใน MeOH ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่สับปะรดและทูเรียนมีช่วงความเชื่อมั่น

ของค่า slope ครอบคลุมค่า 1 แสดงว่าไม่พบผลของเมทริกซ์อย่างชัดเจน นอกจากนี้ค่า intercept ของทุกเมทริกซ์มีค่าต่ำและช่วงความเชื่อมั่นครอบคลุมศูนย์ บ่งชี้ว่าไม่พบสัญญาณรบกวนพื้นฐานจากเมทริกซ์สำหรับผลไม้เขตอบอุ่นไม่ได้ทำการประเมิน matrix effect เนื่องจากสัญญาณพื้นหลังอยู่ในระดับต่ำ และการคำนวณผลใช้สารมาตรฐานใน MeOH สำหรับสร้าง calibration curve ซึ่งเพียงพอและไม่ส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ โดยสรุป matrix effect โดยรวมอยู่ในระดับต่ำ และวิธี HS-GC-MS สามารถใช้สารมาตรฐานใน MeOH สำหรับการคำนวณได้อย่างเหมาะสมโดยไม่ต้องใช้ matrix-matched calibration ภายใต้ช่วงความเข้มข้นและเงื่อนไขที่ศึกษา

การประเมินค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างเมทริกซ์ของผลไม้เขตร้อนและผลไม้เขตอบอุ่น สำหรับผลไม้เขตร้อนกำหนดค่า LOD ที่ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อหลีกเลี่ยงสัญญาณรบกวนจาก ethylene ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของผลไม้เขตร้อน โดยอ้างอิงเกณฑ์อัตราส่วนสัญญาณต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio: S/N) > 3 ซึ่งให้ค่า S/N อยู่ในช่วง 147–399 สำหรับกล้วย, 182–412 สำหรับมะม่วง, 88–158 สำหรับสับปะรด และ 108–299 สำหรับทูเรียน ซึ่งสะท้อนถึงความแตกต่างของโครงสร้างเนื้อเยื่อ ปริมาณน้ำ และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ระเหยง่ายในผลไม้แต่ละชนิดรวมถึงปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ขณะที่ผลไม้เขตอบอุ่นตรวจพบเอทิลีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติใน matrix blank ในระดับต่ำกว่าผลไม้เขตร้อนอย่างชัดเจน จึงประเมินค่า LOD โดยใช้แนวคิด $\text{Mean}(\text{blank}) + 3\text{SD}$ จากการวิเคราะห์ matrix blank จำนวน 10 ซ้ำ เพื่อประเมินปริมาณเอทิลีนที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งให้ค่า LOD ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.011 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับแอปเปิลและสตอร์เบอร์รี่ และ 0.007 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับเชอร์รี่ ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้งานจริงและลดผลกระทบจากความแปรปรวนของสัญญาณพื้นหลัง จึงกำหนดค่า LOD เชิงปฏิบัติสำหรับผลไม้เขตอบอุ่นที่ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และทำการยืนยันค่า LOD

ดังกล่าวโดยการเติมอีทีฟอนที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank ของผลไม้เซตอบอ่อนแล้วประเมินค่า S/N อีกครั้ง ซึ่งให้ค่า S/N อยู่ในช่วง 6–39 สำหรับแอปเปิล, 20–36 สำหรับเชอร์รี่ และ 11–41 สำหรับสตรอว์เบอร์รี่ โดยทุกกรณีมีค่า S/N > 3 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ผลการทดสอบ LOQ ความแม่นยำ (%recovery) และความเที่ยง (%RSD) ของวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนในผลไม้ทั้งเซตร้อนและเซตอบอ่อน แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีสมรรถนะอยู่ในเกณฑ์ยอมรับสำหรับการวิเคราะห์สารตกค้างในอาหาร โดยให้ค่า %recovery อยู่ในช่วง 81.4–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 1.5–16.0% ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 v2026⁽²⁶⁾ อย่างไรก็ตามผลไม้เซตร้อนมีแนวโน้มให้ค่า %recovery สูงและมีความแปรปรวนมากกว่าผลไม้เซตอบอ่อน โดยมะม่วงและสับปะรดให้ค่า %recovery สูงกว่า 110% ในหลายระดับความเข้มข้น ซึ่งอาจเกิดจาก matrix enhancement effect จากองค์ประกอบของเมทริกซ์ เช่น น้ำตาล แป้ง และสารอินทรีย์ ที่ส่งเสริมการตอบสนองของสัญญาณ ขณะที่ทุเรียนให้ค่า %recovery ต่ำที่สุด (81.4%) และกล้วยให้ค่า %RSD สูงที่สุด (16.0%) สะท้อนถึงผลกระทบของเมทริกซ์ต่อประสิทธิภาพการสกัดและความสม่ำเสมอของผลการวิเคราะห์ นอกจากนี้ปริมาณเส้นใยและองค์ประกอบของเมทริกซ์จากทั้งเนื้อและเปลือกในผลไม้บางชนิดอาจรบกวนประสิทธิภาพของปฏิกิริยา derivatization ทำให้การเกิดอนุพันธ์ของอีทีฟอนไม่สมบูรณ์และเพิ่มความแปรปรวนของสัญญาณ สอดคล้องกับผลการประเมินค่า LOD และ LOQ ที่พบว่าผลไม้เซตร้อนมีค่า LOD และ LOQ สูงกว่าผลไม้เซตอบอ่อน โดยมีค่าเท่ากับ 0.10 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เนื่องจากผลไม้เซตร้อนหลายชนิด เช่น กล้วย มะม่วง และทุเรียน เป็นผลไม้ประเภท climacteric ซึ่งมีการผลิตเอทิลีนตามธรรมชาติในปริมาณสูงระหว่างกระบวนการสุก จึงทำให้ตรวจพบสัญญาณพื้นหลังของเอทิลีนได้มากกว่า อย่างไรก็ตามค่า LOQ ดังกล่าวยังต่ำกว่าค่า MRL ของอีทีฟอนในผลไม้เซตร้อน เช่น กล้วย มะม่วง และสับปะรด ที่ 0.5, 2 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁽¹⁰⁾ แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความไวเพียงพอสำหรับ

การตรวจติดตามสารตกค้างในผลไม้กลุ่มนี้ สำหรับผลไม้เซตอบอ่อนให้ค่า %recovery และ %RSD ที่สม่ำเสมอกว่า โดยมีค่า %recovery อยู่ในช่วง 89.8–120.0% และค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.9–13.9% แสดงถึงผลกระทบของเมทริกซ์ที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้เซตร้อน แม้ว่าแอปเปิลที่ระดับ LOQ จะให้ค่า %recovery สูงถึง 120.0% และเชอร์รี่ที่ระดับ 1.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะให้ค่า %RSD เท่ากับ 13.9% แต่ยังคงอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด อีกทั้งผลไม้เซตอบอ่อนมีการประเมินค่า LOD และ LOQ ที่ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าค่า MRL ของอีทีฟอนในแอปเปิลและเชอร์รี่ที่กำหนด 0.8 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ⁽¹⁰⁾ สะท้อนให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์อีทีฟอนตกค้างในผลไม้ที่มีความแตกต่างของเมทริกซ์ทั้งสองกลุ่มได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวัดสำหรับวิธีวิเคราะห์อีทีฟอนด้วยเทคนิค HS-GC-MS ตามแนวทางของ EURACHEM Guide และ ISO GUM (bottom-up approach) แสดงให้เห็นว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนรวมมีที่มาจากสมรรถนะของวิธีวิเคราะห์ (method performance) โดยเฉพาะความเที่ยงของวิธี (method precision/repeatability) มีสัดส่วนสูงที่สุด ซึ่งสะท้อนว่าความแปรปรวนของผลการวัดมีที่มาจากกระบวนการวิเคราะห์โดยรวมมากกว่าความไม่แน่นอนขององค์ประกอบเชิงระบบ (systematic sources) ในขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน การเจือจาง ปริมาตร และน้ำหนักตัวอย่าง รวมถึง calibration และ bias จาก recovery มีบทบาทรองลงมา แสดงให้เห็นว่าการควบคุมขั้นตอนเชิงปริมาณและระบบการสอบเทียบอยู่ในระดับที่เหมาะสมและไม่เป็นตัวกำหนดหลักของความไม่แน่นอนของวิธี โดยค่าระดับความไม่แน่นอนที่ได้มีความเหมาะสมต่อการรายงานผลการวิเคราะห์อีทีฟอนในเมทริกซ์อาหารภายใต้สภาวะการใช้งานจริง และสอดคล้องกับเกณฑ์ความเหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ (fitness for purpose) สำหรับการวิเคราะห์สารตกค้าง ผลการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญเป็นหลักฐานจากภายนอกที่มี

น้ำหนักในการยืนยันความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยจากข้อมูลการทดสอบความชำนาญ FAPAS® 19436 พบว่าห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยเป็นเพียงห้องปฏิบัติการเดียวที่มีการระบุการใช้เทคนิค GC ในการวิเคราะห์อียิปทอน ในขณะที่ผู้เข้าร่วมรายอื่นส่วนใหญ่ระบุเทคนิค LC หรือไม่ได้ระบุรายละเอียดของเครื่องมือที่ใช้ ทั้งนี้ห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยรายงานผลการวิเคราะห์อียิปทอนเท่ากับ 39.8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับค่า assigned value ที่กำหนดไว้เท่ากับ 38.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และให้ค่า z-score เท่ากับ 0.2 ซึ่งอยู่ใกล้ศูนย์และอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่าแม้เทคนิค GC จะเป็นกลุ่มส่วนน้อยในบริบทของการทดสอบความชำนาญครั้งนี้ แต่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลได้ ในทางตรงกันข้ามผลการเปรียบเทียบดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ในกลุ่ม LC มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายของขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง รูปแบบการสอบเทียบ และการจัดการ matrix effect เมื่อพิจารณาในบริบทนี้ วิธี HS-GC-MS ซึ่งอาศัยการแปรสภาพสารและการตรวจวัดในเฟสแก๊ส จึงมีข้อได้เปรียบในด้านการลดความซับซ้อนของเมทริกซ์ ความสม่ำเสมอของขั้นตอนปฏิบัติ และความสามารถในการให้ผลการวิเคราะห์ที่ทำได้ดี โดยภาพรวมผลการทดสอบความชำนาญเมื่อร่วมกับผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสนับสนุนว่าวิธี HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้น เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือในเชิงประจักษ์ สามารถรองรับการวิเคราะห์อียิปทอนในผลไม้หลากหลายเมทริกซ์ตามที่ได้ตรวจสอบความใช้ได้ไว้ และเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในงานตรวจยืนยัน การควบคุมคุณภาพ และการเฝ้าระวังด้านความปลอดภัยอาหารภายใต้ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการในระดับสากล

จากผลการทดสอบความชำนาญที่พบว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เลือกใช้เทคนิค LC ขณะที่วิธี HS-GC-MS ให้ผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกับค่าอ้างอิงในระดับสากล งานวิจัยในอนาคตสามารถต่อยอดโดยออกแบบการศึกษาเปรียบเทียบสมรรถนะของทั้งสองเทคนิคอย่างเป็นระบบภายใต้เมทริกซ์เดียวกัน

โดยประเมินพารามิเตอร์ของการวิเคราะห์ที่สำคัญ ได้แก่ ความไว/ความจำเพาะ ความแม่นยำ ความเที่ยง และความแปรปรวนระหว่างเมทริกซ์ การศึกษาในลักษณะนี้ จะมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับผลไม้เขตร้อน ซึ่งมีองค์ประกอบซับซ้อนและอาจส่งผลกระทบต่อสมรรถนะของวิธีแตกต่างกันในแต่ละเทคนิค นอกจากนี้แม้ว่าวิธี HS-GC-MS จะสามารถลดผลกระทบจากสารไม่ระเหยในเมทริกซ์ได้ดี แต่ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าผลไม้แต่ละชนิดให้ค่า LOD และ LOQ แตกต่างกันอย่างชัดเจน งานในอนาคตจึงควรศึกษาผลขององค์ประกอบเมทริกซ์ต่อการตอบสนองของสัญญาณอย่างเป็นระบบ โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเพกติน น้ำตาล เส้นใย และสารระเหยพื้นหลัง กับประสิทธิภาพการสลายตัวของอียิปทอนและการปลดปล่อยเอทิลีนในระบบ headspace ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดกลุ่มเมทริกซ์หรือการกำหนดเงื่อนไขการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับผลไม้แต่ละประเภท ในด้านการควบคุมคุณภาพ การศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานและสารละลายมาตรฐานทำงานภายใต้สภาวะต่างๆ จะช่วยลดความแปรปรวนระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละ batch และเพิ่มความเชื่อมั่นของผลการวิเคราะห์ในระยะยาว โดยเฉพาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่นำวิธีไปใช้ในงานตรวจวิเคราะห์ประจำ สำหรับการประยุกต์ใช้วิธี HS-GC-MS โดยการนำไปใช้ในงานเฝ้าระวังสารตกค้าง และงานบริการตรวจวิเคราะห์ เช่น การตรวจสอบอียิปทอนในผลไม้ส่งออกหรือการตรวจยืนยันเชิงกฎหมาย งานในอนาคตควรประเมินความเหมาะสมของวิธีในด้านต้นทุนเวลาในการวิเคราะห์ และจำนวนตัวอย่างที่สามารถรองรับได้ต่อวัน เพื่อสนับสนุนการนำไปใช้ในระดับปฏิบัติการ นอกจากนี้หลักการสลายตัวของสารให้เกิดเอทิลีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ยังสามารถต่อยอดไปสู่การวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นที่มีกลไกการสลายตัวคล้ายกัน เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เฉพาะกลุ่ม (class-specific methods) ในอนาคต ผลจากการทดสอบความชำนาญที่แสดงความสอดคล้องกับค่ากำหนดสามารถนำไปต่อยอดสู่การจัดทำแนวทางหรือวิธีปฏิบัติงานมาตรฐาน (standard operating procedure; SOP) สำหรับการวิเคราะห์อียิปทอนด้วย

เทคนิค HS-GC-MS เพื่อสนับสนุนการนำวิธีไปใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นและลดความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการ

สรุป

ผลการศึกษานี้ยืนยันว่าเทคนิค HS-GC-MS ที่พัฒนาขึ้นมีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อีทีฟอนตกค้างในผลไม้ โดยอาศัยการสลายตัวของอีทีฟอนภายใต้สภาวะต่างให้เกิดแก๊สเอทิลีนและตรวจวัดด้วย GC-MS ในโหมด SIM ซึ่งช่วยแก้ข้อจำกัดของการวิเคราะห์อีทีฟอนโดยตรง เนื่องจากเป็นสารที่มีขั้วสูงและระเหยได้ยาก ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธีมีความจำเพาะสูง มีความเป็นเส้นตรง ความไวเหมาะสม และได้รับผลกระทบจากเมทริกซ์ในระดับต่ำ จึงสามารถใช้สารมาตรฐานใน solvent สำหรับการคำนวณได้โดยไม่ต้องใช้ matrix-matched calibration วิธีดังกล่าวสามารถแยกเอทิลีนที่เกิดจากอีทีฟอนออกจากเอทิลีนตามธรรมชาติของผลไม้ได้อย่างชัดเจน แม้ว่าผลไม้เขตร้อนจะมีค่า LOD และ LOQ สูงกว่าผลไม้เขตอบอุ่นจากการมีสัญญาณพื้นหลังของเอทิลีนสูงกว่า แต่ค่าที่ได้ทั้งหมดต่ำกว่าค่า MRL ของอีทีฟอนและเหมาะสมสำหรับการตรวจติดตามสารตกค้างในผลไม้ นอกจากนี้ผลการประเมินความแม่นยำและความเที่ยงเป็นไปตามเกณฑ์ SANTE/11312/2021 v2026 รวมถึงผลการประเมินความไม่แน่นอนของการวัดและการเข้าร่วมแผนทดสอบความชำนาญยังยืนยันถึงความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของวิธี โดยสรุปวิธีที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพเหมาะสมสำหรับการตรวจยืนยันการควบคุมคุณภาพและการเฝ้าระวังอีทีฟอนตกค้างในผลไม้ภายใต้ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

บทความนี้เป็นผลงานที่จัดทำขึ้นด้วยตนเองทั้งหมดและไม่ได้ใช้ระบบปัญญาประดิษฐ์ (AI) ในการสร้างข้อความหรือเนื้อหาทางวิชาการ ผู้เขียนรับผิดชอบต่อความถูกต้องของเนื้อหาทั้งหมดแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวสิริลักษณ์ ชัยรินทร์ สำหรับการช่วยรวบรวมและจัดเตรียมข้อมูลผลการวิเคราะห์ รวมถึงการสนับสนุนการจัดหาสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักงานนโยบายและยุทธศาสตร์การค้า กระทรวงพาณิชย์. พาณิชย์เผยผลไม้ไทยขึ้นแท่นสินค้าเกษตรส่งออกสูงสุด [ออนไลน์]. 2568; [สืบค้น 25 ธ.ค. 2568]; เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.tpsa.go.th/news/2503-0000000006>.
2. สถาบันวิจัยประชากรและสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล. รายงานโครงการศึกษาสถานการณ์การบริโภคผักและผลไม้ของคนไทย (ระดับประเทศ). นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2565.
3. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO technical report series 916. Geneva: World Health Organization; 2003.
4. Biddle E, Kerfoot DG, Kho YH, Russell KE. Kinetic studies of the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonic acid in aqueous solution. Plant Physiol 1976; 58(5): 700-2.
5. Yang SF. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. Plant Physiol 1969; 44(8): 1203-4.
6. Kender WJ. Ethephon-induced flowering in apple seedlings. HortScience 1974; 9(5): 444-5.
7. Cui Y, Zhai Y, Flaishman M, Li J, Chen S, Zheng C, et al. Ethephon induces coordinated ripening acceleration and divergent coloration responses in fig (*Ficus carica* L.) flowers and receptacles. Plant Mol Biol 2021; 105(4-5): 347-64.

8. European Food Safety Authority. Review of the existing maximum residue levels (MRLs) for ethephon. EFSA J 2009; 7(10): 1347. (44 pages).
9. European Food Safety Authority, Alvarez F, Arena M, Auteri D, Binaglia M, Castoldi AF, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance ethephon. EFSA J 2023; 21(1): 7742. (28 pages).
10. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 460) พ.ศ. 2568 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 142 ตอนพิเศษ 240 ง (วันที่ 7 กรกฎาคม 2568).
11. Codex Alimentarius. Pesticide database search: 106-Ethephon. [online]. 2016; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/en/?p_id=106.
12. พืชรพงษ์ แสงวานวงศ์กุล, ยุพิน อ่อนศิริ, เจริญ ขุนพรม. สารเอทีฟอนตกค้างในผลทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ภายหลังเก็บรักษาในสภาพจำลองการส่งออกทางเรือ. ว วิทยาศาสตร์เกษตร 2560; 48(3 พิเศษ): 193-6.
13. Marín JM, Pozo OJ, Beltrán J, Hernández F. An ion-pairing liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of ethephon residues in vegetables. Rapid Commun Mass Spectrom 2006; 20(3): 419-26.
14. Dong JN, Ma YQ, Liu FM, Jiang NW, Jian Q. Dissipation and residue of ethephon in maize field. J Integr Agric 2015; 14(1): 106-13.
15. Hussein MA, El-Zemaity MS, Ryad L, Halawa EM. A rapid and sensitive single residual method for determination of ethephon in grape, tomato and lentil. Middle East J Appl Sci 2015; 5(2): 439-44.
16. Chamkasem N. Determination of glyphosate, maleic hydrazide, fosetyl aluminum, and ethephon in grapes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Agric Food Chem 2017; 65(34): 7535-41.
17. Pereira L, Pujol M, Garcia-Mas J, Phillips MA. Non-invasive quantification of ethylene in attached fruit headspace at 1 ppb by gas chromatography-mass spectrometry. Plant J 2017; 91(1): 172-83.
18. Pham KP, Luu TH, Le MQC, Luu D. Research method for determining ethephon residues in fruit (bananas) on a high-pressure liquid chromatograph with MS/MS detector-LC/MS/MS when using ethephon as a ripening agent. Int J Food Sci Agric 2021; 5(1): 26-32.
19. Farczádi L, Moldovan H, Duca RC, Imre S. A quick, simple, sensitive and selective LC-MS/MS method used for the screening of ethephon, glyphosate and aminomethylphosphonic acid from water and food samples. Acta Biol Marisiensis 2022; 5(1): 41-54.
20. Tseng SH, Chang PC, Chou SS. A rapid and simple method for the determination of ethephon residue in agricultural products by GC with headspace sampling. J Food Drug Anal 2000; 8(3): 213-17.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Pesticide residues in food: report 2024-Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. [online]. 2025; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: <https://doi.org/10.4060/cd5918en>.
22. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9045-1-2568 การจัดหมวดหมู่สินค้าเกษตร เล่ม 1: พืช. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ; 2568.
23. Miller JN, Miller JC, Miller RD. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 7th ed. Harlow: Pearson Education Limited; 2018.

24. Sonamit K, Wittchaiwutthiwong S, Hantawiwatsap Y. Method validation for determination of sucralose in soft beverages by UPLC-ELSD. *J Dept Med Sci* 2019; 61(3): 107–20.
25. Cantwell H, editor. Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics. 3rd ed. [online]. 2025; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_3rd_ed_V1_EN.pdf.
26. European Commission. SANTE/11312/2021 v2026. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Brussels: European Commission; 2026.
27. Ellison SLR, Williams A, editors. Eurachem/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. [online]. 2012; [cited 2025 Dec 25]. Available from: URL: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf.
28. Fera Science Ltd. Fapas[®] Food Chemistry Proficiency Test Report 19436. York: Fera Science Ltd; 2025.

Development and Method Validation for the Analysis of Ethephon Residues in Fruits Using Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry

Jirapong Luangchaiyaporn, Thoranit Chaimongkol, and Weerawut Wittayanan

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

ABSTRACT Ethephon is a plant growth regulator widely used during postharvest handling to accelerate fruit ripening. In this study, tropical fruits including banana, mango, pineapple, and durian, as well as temperate fruits including apple, cherry, and strawberry, were investigated. Improper use of ethephon may result in residue contamination and potential risks to consumer safety. This study aimed to develop and validate a method for the determination of ethephon residues in fruits based on the alkaline decomposition of ethephon to generate ethylene gas, followed by analysis using headspace–gas chromatography–mass spectrometry (HS–GC–MS). The developed method demonstrated high selectivity, with ethylene detected at a retention time of 2.45 min and characteristic ions at m/z 27, 26, and 28. No interfering peaks were observed in the method blank, while naturally occurring ethylene in all fruit matrix blanks was detected below the limit of detection (LOD). Quantification was performed using external calibration because matrix effects were low and statistically insignificant. Linearity was achieved within the range of 0.1–4.0 μg ($R^2 = 1.0000$), while matrix calibration curves showed R^2 values of 0.9986–0.9998. The LOD and limit of quantitation (LOQ) values for tropical fruits were 0.10 and 0.30 mg/kg, respectively, whereas those for temperate fruits were 0.02 and 0.05 mg/kg, respectively. Tropical fruits showed recoveries of 81.4–119.0% with %RSD values of 1.5–16.0, while temperate fruits showed recoveries of 89.8–120.0% with %RSD values of 2.9–13.9. Overall, the developed HS–GC–MS method was accurate, reliable, and suitable for confirmatory determination of ethephon residues in fruits.

Keywords: Pesticide residues, Ethephon, Ethylene, Fruits, Gas chromatography–mass spectrometry