รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรม : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ไกลโฟเซต (glyphosate) และกลูโฟซิเนต (glufosinate) ในพืชตระกูลส้ม

: Method Development and Method Validation for Residue Analysis of Glyphosate and Glufosinate in Oranges

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศศิณิฎา คงแช่มดี

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นางสาวสุพัตรี หนูสังข์ นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี

นายประพันธ์ เคนท้าว นางสาวจิตนา ภู่มงกุฎชัย

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารสารพิษตกค้างในส้ม โดยไกลโฟลเซตใช้เทคนิค GC-MS/MS และกลูโฟซิเนต ใช้เทคนิค LC-MS/MS พบว่า วิธีที่ดัดแปลงวิธีสกัดตามวิธีของ Borjesson *et al*. (2000) โดยสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและ clean up ด้วย SPE ชนิด ion exchange resin ให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยเมื่อทำการทดสอบความแม่น พิจารณาร้อยละการได้กลับคืนเฉลี่ยของสารทั้งสองชนิดอยู่ในช่วงร้อยละ 86-100 และ 73-82 ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไกลโฟลเซตและกลูโฟซิเนตพบอยู่ในช่วงร้อยละ 11-13 และ 3-14 สำหรับช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับไกลโฟลเซตและกลูโฟซิเนตพบว่า ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.005-0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้ค่า ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.995 มีขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ไกลโฟลเซตและกลูโฟซิเนตเท่ากับ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของไกลโฟลเซตและกลูโฟซิเนตเท่ากับ 0.05 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Abstract

The research studies and developed to determine glyphosate and glufosinate in oranges. This methods involved derivatisation by GC-MS/MS and LC-MS/MS. The results performed acceptance criteria. Accuracy and precision were 86-100% and 11-13 %RSD for glyphosate same as glufosinate, accuracy and precision were 73-82% and 3-14 %RSD. Under the optimized conditions, linearity of this method were obtained the correlation coefficients (R^2)

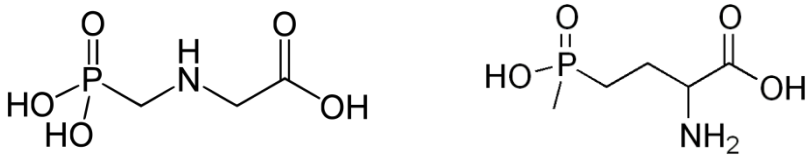
กองวิจัยการเกษตร

greater than 0.995. For both compounds showed the limit of detection (LOD) were 0.02 and 0.05 mg/kg. The limits of quantitation (LOQ) in this experiment were 0.05 and 0.10 mg/kg, respectively.

Keywords: method validation, glyphosate, glufosinate

6. คำนำ

วัชพืชนับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับพืชเศรษฐกิจ เกษตรกรจำเป็นต้องเสียทั้งค่าใช้จ่าย เวลา และแรงงานในการกำจัดวัชพืช ปัจจุบันจึงนิยมใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชทั้งประเภทแบบพ่นเมื่อวัชพืชเริ่มงอก (early post emergence) พ่นแบบก่อนงอก (pre emergence) พ่นหลังวัชพืชงอก (post emergence) หรือพ่นก่อนการปลูกพืช (pre planting) เป็นต้น ไกลโฟเซต (glyphosate) จัดอยู่ในกลุ่ม Glycine มีสูตรโมเลกุล $C_3H_8NO_5P$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 169.07 องค์การอนามัยโลกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มความเป็นพิษน้อย Class III (Slightly hazardous) ค่า LD_{50} (ขนาดที่ทำให้หนูทดลองตายจำนวนร้อยละ 50) มากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม (World Health Organization, 2019) glyphosate เป็นสารกำจัดวัชพืชชนิดไม่เลือกทำลาย ออกฤทธิ์ดูดซึมโดยสามารถเคลื่อนย้ายไปตามส่วนต่าง ๆ ทั้งทางท่ออาหาร ท่อลำเลียงน้ำของพืช หรือทางใบ ซึมเข้าสู่รากได้ เมื่อตกลงดินสามารถถูกยึดด้วยอนุภาคของดินเหนียวได้ดี glyphosate ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ EPSP synthase ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนแอโรแมติก (aromatic amino acid) ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนพืช (เพ็ญศรี, 2559) สำหรับกลูโฟซิเนต (glufosinate) มักอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียม (ammonium salt) เนื่องจากละลายน้ำได้ง่าย สะดวกต่อการดูดซึม glufosinate จัดอยู่ในกลุ่มสาร Phosphinic acid มีสูตรโมเลกุล $C_5H_{12}NO_4P$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 181.13 มีฤทธิ์เข้ายับยั้งการสร้างเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) โดยก่อให้เกิดการสร้างแอมโมเนียมสะสมในพืช ส่งผลต่อการสังเคราะห์แสง glufosinate มีคุณสมบัติเป็นสารประเภทสัมผัส ซึ่งจะไม่เคลื่อนย้ายในพืช เมื่อพ่นไปแล้วสารจะไปทำลายเฉพาะจุดที่พ่น การเข้าสู่พืชจะผ่านทางใบและส่วนที่มีสีเขียว สลายตัวได้เร็วในสภาพแวดล้อม (เพ็ญศรี, 2559) องค์การอนามัยโลกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มความเป็นพิษปานกลาง Class II (Moderately Hazardous) ค่า LD_{50} (ขนาดที่ทำให้หนูทดลองตายจำนวนร้อยละ 50) มากกว่า 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กิโลกรัม World Health Organization, 2019)



glyphosate glufosinate

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ glyphosate และ glufosinate

ศรีปทุมสินธุ

ในการการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างสามารถใช้วิธีวิเคราะห์ได้หลายวิธี จึงจำเป็นต้องหาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับชนิดของสารที่ทำการตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง ได้เลือกทำวิธีการตรวจวิเคราะห์ glyphosate ตามวิธีมาตรฐานของ US EPA Method 547 (1990) โดยวิธีดังกล่าวใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) ที่ต่อผ่าน post-column ก่อนตรวจวิเคราะห์ด้วยหัวตรวจวัดชนิด Fluoresence (FLD) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะสามารถนำวิธีดังกล่าวมาปรับใช้ได้กับเครื่องมือที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการได้ แต่เนื่องจากวิธีวิเคราะห์นี้เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันมานาน อีกทั้งมีขั้นตอนที่ซับซ้อนในการเตรียมเครื่องมือ ขั้นตอนของการเตรียมสารเคมีสำหรับทำ derivatization ทำให้ค่อนข้างใช้เวลาในการวิเคราะห์ ดังนั้น เพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ จึงพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น GC-MS/MS หรือ LC-MS/MS ให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการที่สามารถปฏิบัติงานได้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้นต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว ตู้แช่ตัวอย่าง (freezer) เครื่องปั่นตัวอย่าง (food processer) ไมโครปิเปต (auto pipette) ขนาด 10-100, 20-200, 100-1000, 500-5,000 ไมโครลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) เครื่องผสมตัวอย่างสาร (vortex mixer) เครื่องระเหยแห้ง (evaporator) เครื่องอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) เครื่องเป่าไนโตรเจน (N_2 evaporator)

7.1.2 เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด กระบอกตวง (cylinder) บีกเกอร์ (beaker) ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) หลอดหยดสาร (dropper) หลอดฉีดยา (syring) ขนาด 10 มิลลิลิตร และตัวกรองชนิด PTFE (PTFE syring filter) ขนาด 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร ขวดบรรจุสาร (vial) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และขวดบรรจุสาร (auto samplerl) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

7.1.3 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษ Gas Chromatograph Tandem Mass Spectrometer (GC-MS/MS) และคอลัมน์ HP5-MS ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ความยาว 15 เมตร เคลือบฟิล์มหนา 0.25 ไมโครเมตร

7.1.4 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษ Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) และคอลัมน์ HILIC Column 2.1 มิลลิเมตร ความยาว 150 มิลลิเมตร

7.2 สารเคมี

7.2.1 สารมาตรฐาน glyphosate และ glufosinate

7.2.2 สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ acetonitrile (CH_3CN) ชนิด HPLC grade, formic acid (CH_2O_2), ammonium formate, ethyl acetate ($C_4H_8O_2$) ชนิด HPLC grade, methanol (CH_3OH) ชนิด HPLC grade, water (H_2O) ชนิด HPLC grade และ Hydrochloric acid

7.3 วิธีการ

7.3.1 เตรียมสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

กรมวิชาการเกษตร

7.3.1.1 เตรียมสารมาตรฐาน stock standard solution ของสาร glyphosate และ glufosinate โดยใช้เครื่องชั่งไฟฟ้าความละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง ชั่งสารมาตรฐาน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 10 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำค่าร้อยละความบริสุทธิ์ของสาร (% purity) มาคำนวณกลับเพื่อให้เป็นน้ำหนักของสารที่แท้จริง โดยมีระดับของความเข้มข้นอยู่ที่ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.3.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน intermediate standard solution โดยเตรียมจากสารละลาย stock standard solution จากข้อ 1.1 ให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.3.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน working standard solution โดยเตรียมจากสาร intermediate standard solution จากข้อ 7.3.1.2 ที่ระดับความเข้มข้นตามที่ต้องการใช้งาน ได้แก่ 0.005 0.01 0.02 0.05 0.10 และ 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

7.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิด ด้วยเทคนิค GC-MS/MS และ LC-MS/MS สภาวะเหมาะสมของ แสดงดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 สภาวะการทำงานของเครื่อง GC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์สาร glyphosate

GC System	Agilent Technologies 7890B	
Column:	HP-5MS UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 µm	
Gas flow:	1.7 mL/min (constant flow mode)	
Carrier gas:	Helium	
Inject volume:	10 µL	
GC inlet:	Set point Temperature:	260 (°C)
	Mode:	Splitless
	Post run:	280 (°C)
GC Oven:	Initial Temperature:	70 (°C)
	Post run:	280 (°C)

Rate (°C/min)	Final Temperature (°C)	Hold Time (min)	Total Time (min)
	70	2	
15	160	0	
20	200	0	
30	280	3	25

MSD: Agilent 7000 GC Triple Quadrupole

Mass parameter:

Compound	Precursor ion	Product ion	Dwell	CE (V)
glyphosate	511	384	10	15
	511	411	10	15

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 สภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์สาร glufosinate

Column: Hilic 3 µm 100 A (2.1×150 mm)

Temperature (°C): 45 °C

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

Mobil phase B: acetonitrile

Inject volume: 10 µL

Total run time: 15.00 min

Elution gradient

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A	Mobile phase B
2	0.3	5	95
5	0.3	95	5
9	0.3	95	5
12	0.3	5	95
15	0.3	5	95

Ion source: ESI

Source parameter:

Gas temp (°C):	300
Gas flow (l/min):	11
Nebulizer (psi):	60
Capillary (V):	3500

Mass parameter:

Compound	Precursor ion	Product ion	Dwell	CE (V)
glufosinate	180	63	70	66
	180	85	70	24
	180	136	70	22

กรมวิชาการเกษตร

7.3.3 ทดสอบวิธีสกัดตัวอย่าง ศึกษาหาวิธีสกัดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สาร glyphosate และ glufosinate ในส้ม การหาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์สามารถพิสูจน์ความแม่น (accuracy) จากการประเมินค่าร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) โดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างส้ม ให้มีความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สกัดตัวอย่าง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างส้ม ดังนี้

7.3.3.1 การสกัดด้วยวิธี Anastassides *et al*. (2020) ปั่นตัวอย่างส้มด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งตัวอย่าง 10±0.1 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวละลาย 1% formic acid ที่ผสมใน methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที นำตัวอย่างดังกล่าวไป centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter

membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ลงใน auto sampler ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างต่อไป

7.3.3.2 การสกัดด้วยวิธี Chamkasem *et al*. (2015) ปั่นตัวอย่างส้มด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งตัวอย่าง 5±0.05 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายผสม methanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 10 นาที นำตัวอย่างดังกล่าวไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำสารละลายตัวอย่างดังกล่าวไปสกัดโดยผ่านเฟสของแข็งโดยใช้ SPE กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane ขนาด 0.20 ไมครอน ลงใน auto sampler ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างต่อไป

7.3.3.3 การสกัดด้วยวิธี Borjesson *et al*. (2020) ปั่นตัวอย่างส้มด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งตัวอย่าง 5±0.05 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่านาน 1 นาที นำตัวอย่างดังกล่าวไป centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำซ้ำโดยเติมน้ำและสารละลายกรด HCl ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลิลลิตร ปรับ pH จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างดังกล่าวไปสกัดโดยผ่านเฟสของแข็งโดยใช้ SPE (ion exchange resin) ใส่สารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และเติมสารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซ้ำ 2 ครั้ง นำไประเหยจนแห้ง แล้วเติมสารละลายผสมของน้ำ methanol และกรด HCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำ derivertisation หลังจากนั้นเติมสารละลาย ethyl acetate ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน auto sampler ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างต่อไป

7.3.4 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ทดสอบและประเมินค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องสำหรับการวิเคราะห์

7.3.4.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการใช้งาน (range) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ (response) และความเข้มข้นของสาร glyphosate และ glufosinate ที่เตรียม ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of determination; R^2) ที่ได้จากกราฟเส้นตรง ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด $R^2 \geq 0.995$

7.3.4.2 ความแม่น (acuraacy)

1) เป็นการตรวจสอบร้อยละการได้กลับคืน (% recovery) โดยใช้เกณฑ์กำหนดของห้องปฏิบัติการในสหภาพยุโรป (SANTE/11813, 2017) คือ ร้อยละ 70-120 ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ทุกๆ ค่าต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับดังกล่าว โดยทำการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างส้มที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ

2) ความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์ซ้ำ เป็นการวัดความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยนำผลการวิเคราะห์ % recovery หาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) เกณฑ์การยอมรับของ precision คือ มี %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (SANTE/11813, 2017) นอกจากนี้สามารถประเมินการยอมรับจากการเปรียบเทียบค่าที่คำนวณได้จากสมการ Horwitz's equation

ศรีปทุมการพิมพ์

ซึ่ง %RSD ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า Predicted Horwitz RSD โดยมีเกณฑ์การยอมรับของ HORRAT น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 (AOAC, 2002)

7.3.4.3 ขีดจำกัดการการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) เป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยมี accuracy และ precision ที่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ทดสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างส้มที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ คำนวณ %recovery และ %RSD ค่าที่ได้ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ เท่ากับ 10×SD (Eurachem, 2014)

7.3.4.4 ขีดจำกัดการตรวจวัดได้ของวิธีวิเคราะห์ (Limit of detection, LOD) เป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ โดยไม่จำเป็นต้องมี accuracy ทดสอบโดยการเติมสารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างส้มที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่า SD ประเมินค่า LOD เท่ากับ 3×SD (Eurachem, 2014) ความเข้มข้นดังกล่าวที่ทดสอบทั้ง 10 ครั้ง ต้องมีสัญญาณการวัด signal to noise ratio (S/N) ≥ 3 จึงจะถือว่าเป็นค่า LOD ของวิธี

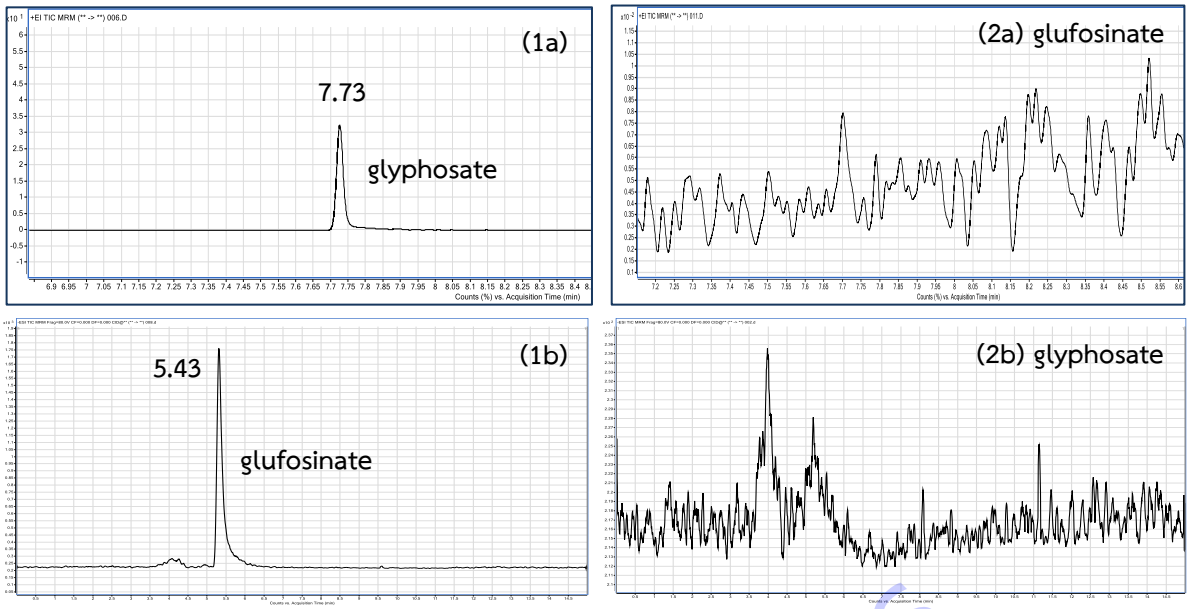
- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา	ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563
สถานที่ดำเนินการทดลอง	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ glyphosate และ glufosinate ด้วยเทคนิค GC-MS/MS และ LC-MS/MS โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า glyphosate สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค GC-MS/MS โดยมีค่า retention time เท่ากับ 7.73 นาที สำหรับ glufosinate นั้น พบว่าไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS เช่นเดียวกับ glyphosate ได้ จึงได้เปลี่ยนไปใช้วิธีตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ทดสอบสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ glufosinate มีค่า retention time เท่ากับ 5.43 นาที เมื่อตรวจวิเคราะห์ glyphosate ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ที่สภาวะเดียวกันกับสาร glufosinate พบว่าสัญญาณ (response) การตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวน้อยมาก จำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ค่อนข้างสูง จึงจะสามารถเริ่มมองเห็นสัญญาณของโครมาโทแกรมของ glyphosate ได้ การใช้สารมาตรฐานที่มีระดับความเข้มข้นสูงเกินไป สามารถทำให้เกิดการตกค้างหรือปนเปื้อนของสารทั้งในคอลัมน์และระบบของเครื่องมือวิเคราะห์ทำให้อาจส่งผลต่อผลการตรวจวิเคราะห์ได้ แสดงลักษณะโครมาโทแกรม ดังภาพที่ 2

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน (1a) glyphosate และ (2a) glufosinate ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS และ ลักษณะโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน (1b) glufosinateและ (2b) glyphosate ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

8.2 การทดสอบวิธีการสกัดตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด เมื่อสกัดตัวอย่างส้มที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ด้วยวิธีที่ดัดแปลงตามวิธีของ Anastassiades *et al*. (2020) (QuPPe-PO-Method version 11) % recovery ของ glufosinate ที่ได้ค่อนข้างต่ำ ไม่ผ่านเกณฑ์การยอมรับห้องปฏิบัติการจึงได้ทดลองศึกษาวิธีทดสอบของ Chamkasem *et al*. (2015) โดยสกัดตัวอย่างส้มที่ระดับความเข้มข้นความเข้มข้นเดียวกัน จากผลการทดสอบพบว่า วิธีทดสอบดังกล่าวให้ร้อยละการได้กลับคืนต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากขั้นตอนการสกัดที่ยังไม่เหมาะสมจึงยังไม่สามารถดึงสารออกมาจากตัวอย่างได้ สำหรับสาร glyphosate นั้น เนื่องจากวิธีสกัดดังกล่าวไม่สามารถแยกในคอลัมน์ ทำให้ไม่สามารถแปรผลของสัญญาณของสาร glyphosate ออกมาเป็นโครมาโทรแกรมได้ ห้องปฏิบัติการจึงได้ดัดแปลงวิธีสกัดตามวิธีของ Borjesson *et al*. (2000) พร้อมทั้งเปลี่ยนสภาวะที่ใช้สำหรับสารทั้ง 2 ชนิด ทำการสกัดตัวอย่างส้มที่ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า glufosinate และ glyphosate ได้ร้อยละการได้กลับคืนเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 72-79 และ 109-112 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

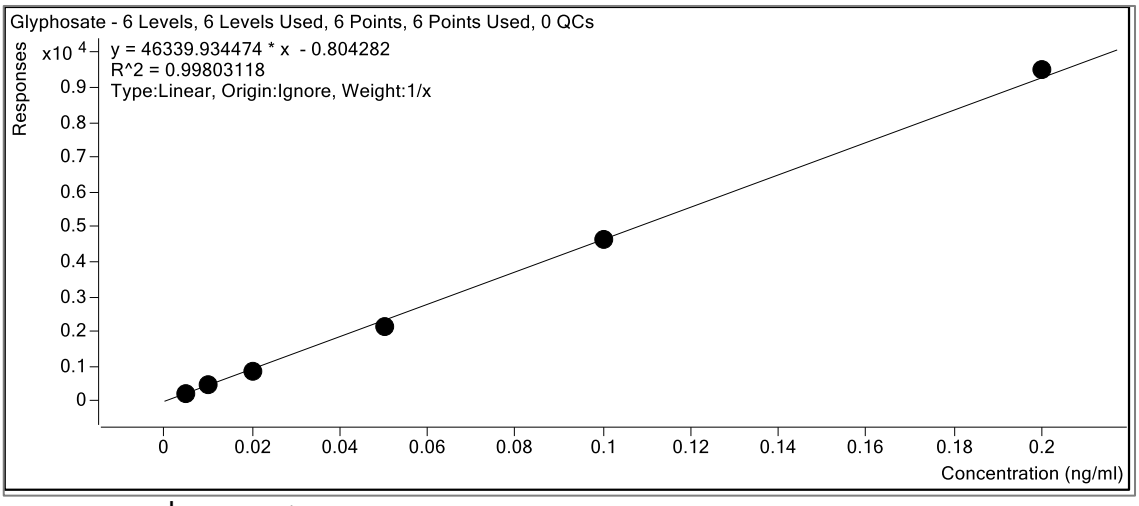
8.3 การตรวจความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ glyphosate และ glufosinate ในส้ม

วิธีสกัดที่ดัดแปลงตามวิธีของ Borjesson *et al*. (2000) โดยไกลโฟลเซตใช้เทคนิค GC-MS/MS และกลูโฟซิเนต ใช้เทคนิค LC-MS/MS มีผลดังนี้

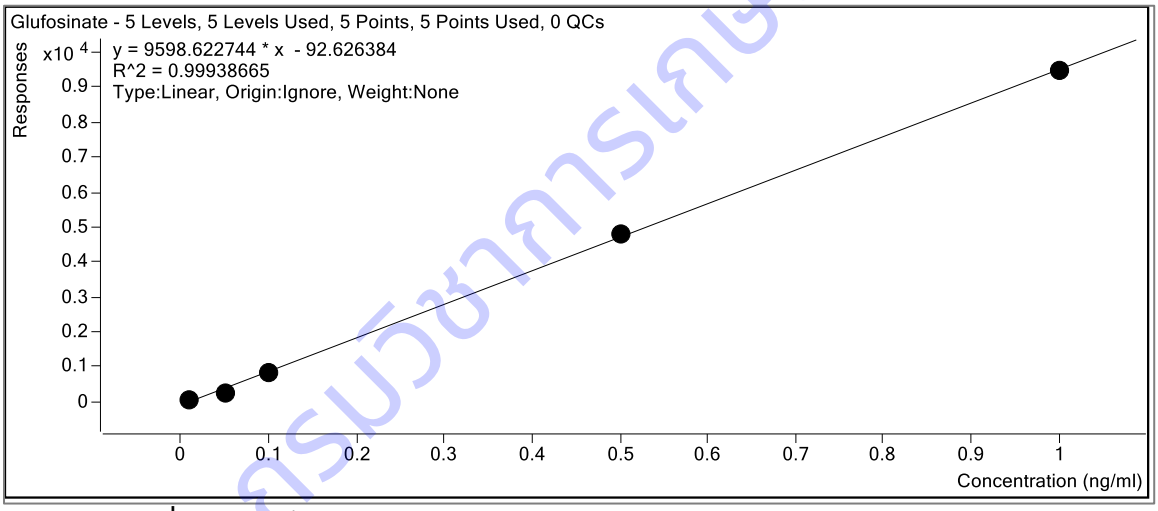
8.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการใช้งาน (range) ของการตรวจวิเคราะห์ จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า glyphosate ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 0.005-0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า coefficient of

กรมวิชาการเกษตร

determination (R^2) เท่ากับ 0.9980 (ภาพที่ 3) สำหรับสาร glufosinate ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้นอยู่ที่ 0.01-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9994 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของ glyphosate ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS/MS



ภาพที่ 4 ความเป็นเส้นตรงของ glufosinate ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

8.3.2 ความแม่น (accuracy) ในการประเมินค่า accuracy พิจารณาจาก

1) % Recovery สำหรับ glyphosate ที่ระดับความเข้ม 0.02 0.05 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 73-108, 83-110 และ 85-115 ตามลำดับ และ %recovery ของ glufosinate ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าอยู่ในช่วง 70-100, 70-77 และ 70-88 ตามลำดับ

2) Precision สามารถหาได้จาก %RSD พบว่า glyphosate และ glufosinate มีค่าอยู่ในช่วง 11-13 และ 3-14 โดย %RSD ที่ยอมรับได้ของ SANTE (SANTE/11813, 2017) ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 แสดงว่าวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มี precision และเมื่อคำนวณค่า HORRAT ของสาร ครอบคลุมในระดับความเข้มข้นต่ำ และ glufosinate ที่ความเข้มข้นดังกล่าว พบว่ามีค่า HORRAT ของ glyphosate อยู่ที่ 0.44, 0.52,

กรมวิชาการเกษตร

0.50 และ glufosinate อยู่ที่ 0.54, 0.14, 0.47 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์การยอมรับเนื่องจากมีค่าน้อยกว่า 2 และเมื่อเปรียบเทียบค่าที่คำนวณได้จากสมการ Horwitz's equation ซึ่ง %RSD ต้องมีค่าน้อยกว่าค่า Predicted Horwitz RSD แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง glyphosate และ glufosinate ในส้ม

สาร	spiked level (mg/kg)	%recovery (n=10)	ค่าเฉลี่ย % recovery	% RSD	Predicted Horwitz RSD	HORRAT
glyphosate	0.02	79, 108, 78, 81, 84, 99, 77, 84, 98, 77	86	13	29.49	0.44
	0.05	109, 110, 109, 109, 110, 111, 80, 87, 83, 88	100	13	25.13	0.53
	0.10	97, 99, 115, 112, 105, 98, 85, 89, 85, 86	97	11	22.73	0.50
glufosinate	0.05	72, 79, 73, 95, 97, 100, 72, 88, 70, 77	82	14	25.87	0.54
	0.10	76, 72, 71, 72, 77, 73, 73, 70, 72, 70	73	3	23.76	0.14
	0.50	82, 84, 70, 76, 72, 88, 85, 73, 71, 72	77	9	18.47	0.47

8.3.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) ผลจากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ สำหรับสาร glyphosate ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ glufosinate ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) โดยนำมาประเมินค่า LOQ เท่ากับ 10×SD เมื่อทำการพิสูจน์ค่า LOQ จากผลการทดลองพบว่า glyphosate และ glufosinate มีค่าเท่ากับ 0.02 และ 0.06 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เพื่อให้มั่นใจว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้จริง โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น LOQ สำหรับ glyphosate และที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น LOQ สำหรับ glufosinate แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4

8.3.4 ขีดจำกัดการตรวจวัดได้ของวิธีวิเคราะห์ (limit of detection, LOD) ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ สำหรับสาร glyphosate ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ glufosinate ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่า SD โดยนำมาประเมินค่า LOD เท่ากับ 3×SD พบว่าเมื่อทำการพิสูจน์ค่า LOD ของ glyphosate และ glufosinate มีค่าเท่ากับ 0.01 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เพื่อให้มั่นใจว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความสามารถในการตรวจพบสารพิษตกค้างได้จริง โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision ในการทดลองนี้เลือกใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น LOD สำหรับ glyphosate และที่ความเข้มข้น เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็น LOD สำหรับ glufosinate แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 การคำนวณ LOD (3SD) และ LOQ (10SD) ของ glyphosate และ glufosinate ในส้ม

สาร	detected concentration (mg/kg)	mean	SD	%RSD	3SD (LOD)	10SD (LOQ)
glyphosate (0.02 mg/kg)	0.0157, 0.0215, 0.0115, 0.0161, 0.0167, 0.0197, 0.0154, 0.0167, 0.0196, 0.0153	0.0172	0.0022	13	0.0066	0.0222
glufosinate (0.05 mg/kg)	0.0360, 0.0395, 0.0365, 0.0474, 0.0483, 0.0501, 0.0358, 0.0438, 0.0352, 0.0386	0.0411	0.0058	14	0.0173	0.0576

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารตกค้างในส้มสำหรับ glyphosate ใช้เทคนิค GC-MS/MS และ glufosinate ใช้เทคนิค LC-MS/MS วิธีที่ดัดแปลงวิธีสกัดตามวิธีของ Borjesson *et al*. (2000) โดยสกัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและ clean up ด้วย SPE ชนิด ion exchange resin พบว่าให้ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ โดยเมื่อทำการทดสอบความแม่น (accuracy) พิจารณาร้อยละการได้กลับคืนเฉลี่ย (% recovery) ของสารทั้งสองอยู่ในช่วง 86-100 และ 73-82 ตามลำดับ ค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของ glyphosate และ glufosinate พบอยู่ในช่วง 11-13 และ 3-14 ตามลำดับ สำหรับช่วงความเป็นเส้นตรง glyphosate อยู่ในช่วง 0.005-0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9980 และ glufosinate อยู่ในช่วง 0.01-1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9994 มีขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) และขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ของ glyphosate เท่ากับ 0.02 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสำหรับสาร glufosinate เท่ากับ 0.05 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีการเตรียมสารตัวอย่างให้เป็นอนุพันธ์ (derivatization) ก่อนทำการวิเคราะห์เพื่อเพิ่มความเป็นไอของสาร ลดความเป็นขั้วของสารลง เพื่อให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกสารได้ จำเป็นต้องใช้เวลา ในขั้นตอนดังกล่าวอาจทำให้สารตัวอย่างบางชนิดสลายได้ในขั้นตอนนี้ อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากสารที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ส่วนใหญ่มีราคา มีกลิ่นแรง จึงควรพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ให้ครอบครอบคลุมชนิดของสารในระดับความเข้มข้นต่ำต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เนื่องจากการพัฒนาวิธี เป็นวิธีที่ดัดแปลงเพื่อให้เหมาะกับเครื่องมือที่มีอยู่ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร เพื่อให้สามารถนำไปพัฒนาต่อในการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในพืชที่มีความแตกต่างกัน

11. คำขอบคุณ

-

12. เอกสารอ้างอิง

เพ็ญศรี นันทสมสราญ. 2559. สารกำจัดวัชพืชในประเทศไทย (Herbicides in Thailand). 107 หน้า

Anastassiades M., Kolberg D. I., Eichhorn E., Wachtler A.-K., Benkenstein A., Zechmann S.,

สำนักวิชาการเกษตร

Mack D., Wildgrube C., Barth A., Sigalov I., Görlich S., Dörk D. and Cerchia G. 2020. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPPe-PO-Method version 11)
Source: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11(1).pdf (retrieved on 25 January 2021)

AOAC. 2002. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals
Source: https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf (retrieved on 25 January 2021)

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

Chamkasem N., Morris C. and Harmon T. 2015. Direct Determination of Glyphosate, Glufosinate, and AMPA in milk byLiquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Regulatory Science.* 2015(02):20–26.

Eurachem. 2014. The Fitness for Purpose of Analytical Methods a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. (2nd edition).

SANTE/11813. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
Source: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf. (retrieved on 27 January 2021)

US EPA METHOD 547. 1990. Determination of glyphosate in drinking eater by direct-aqueousinjection HPLC, post-column derivatization, and fluorescence detection
Source: https://www.o2si.com/docs/epa-method-547.pdf (retrieved on 15 January 2021)

World Health Organization. 2019. The WHO Recommended Classification of Pesticide by Hazard and Guidelines to Classification (2019 edition)
Source: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332193/9789240005662-eng.pdf (retrieved on 25 January 2021)