

รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
- กิจกรรม : 1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ
3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารฟโลนิคามิด (flonicamid) และสารอนุพันธ์ในพืชตระกูลแตง ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS)
- : Analytical method Development and validation for the determination of flonicamid and its metabolites in cucurbitaceae by LC-MS/MS technique

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายประพันธ์ เคนท้าว	สังกัด	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมการทดลอง	นางสาวจินตนา ภู่มงกุฎชัย	สังกัด	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวสุพัตร์ หนูสังข์	สังกัด	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวศศิณีญา คงเข้มดี	สังกัด	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	สังกัด	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

วิธีวิเคราะห์นี้พัฒนาขึ้นมาเพื่อตรวจสอบสารตกค้างของสารฟโลนิคามิด (flonicamid) และสารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดคือ TFNA และ TFNG ในพืชตระกูลแตง (แตงกวา แคนตาลูป และแตงโม) ซึ่งพัฒนาขั้นตอนการสกัดสารจากวิธี QuEChERS (EN15662) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี ใช้ acetonitrile ในสถานะกรด (กรดฟอร์มิก 1% V/V) เป็นสารละลายในการสกัด และ partition ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.005 – 0.1 µg/mL พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) > 0.990 ทำการเติมสารมาตรฐานกลุ่มฟโลนิคามิดที่ 4 ระดับคือ 0.01 0.02 0.05 และ 0.1 mg/kg ในตัวอย่างแตงกวา พบว่าให้ค่าร้อยละการกลับคืนมาของสารอยู่ในช่วง 70 – 120 % ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) อยู่ในช่วง 5.56 – 9.16 % ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณในตัวอย่างแตงกวา แคนตาลูป และแตงโม มีค่าเท่ากับ 0.01 mg/kg วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบสารพิษตกค้างของสารฟโลนิคามิดและสารอนุพันธ์

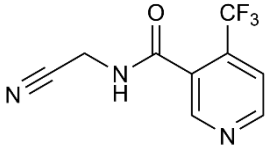
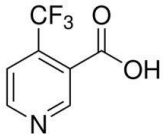
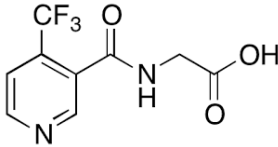
Abstract

An analytical method was developed for the determination of flonicamid and two metabolites (TFNA and TFNG) in cucurbitaceae (cucumber, cantaloupe and watermelon). The method developed herein uses a rapid extraction procedure based on Quick, Easy, Cheap, effective, Rugged and Safe (QuEChERS) method followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Acidified acetonitrile (containing 1 % V/V formic acid) was used as an extraction solvent and partitioning was carried out using sodium chloride. The linearity over a concentration range of 0.005 – 0.1 µg/mL was good with a determination coefficient (R^2) > 0.990 with relative standard deviation (RSD) of 5.56 – 9.16 %. At four fortification levels of 0.01 0.02 0.05 and 0.1 mg/kg in cucumber, the recoveries (% recovery) range from 70 – 120%. The limit of quantification (LOQ) was 0.01 mg/kg for cucumber, cantaloupe and watermelon. The developed method was successfully applied to determination of flonicamid and its metabolites in cucurbitaceae.

6. คำนำ

พืชตระกูลแตง นับเป็นพืชผักทางเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมปลูกเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นพืชล้มลุกที่มีช่วงอายุสั้น ปลูกได้ตลอดทั้งปี เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ประกอบกับให้ผลตอบแทนที่รวดเร็ว โดยพืชตระกูลแตงที่เกษตรกรไทยนิยมปลูกมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ แตงกวา แตงโม และแคนตาลูป แต่ทั้งนี้พืชผักดังกล่าวก็มีความอ่อนแอต่อแมลงที่เข้าทำลายทำให้ผลผลิตเสียหาย โดยศัตรูศัตรูที่สำคัญของพืชตระกูลนี้มีอยู่หลายชนิด เช่น เพลี้ยจักจั่นฝ้าย เพลี้ยอ่อนในมะเขือเปราะ เพลี้ยไก่แจ้ และแมลงหวี่ขาว เป็นต้น แต่พบว่าสารกำจัดแมลงกลุ่มฟโลนิคามิด (flonicamid) สามารถป้องกันหรือกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวได้ โดยสารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ที่ระบบประสาท ซึ่งเข้าไปปรับเปลี่ยนการทำงานของ chordotonal organ ที่เป็นอวัยวะรับความรู้สึกที่กระจายอยู่ทั่วร่างกายของแมลง โดย organ นี้มีหน้าที่สำคัญในการรับความรู้สึกต่างๆ เช่น การสัมผัสและประสานงานเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวส่วนต่างๆของร่างกายให้เป็นไปตามปกติ แต่เมื่อสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้เข้าสู่ร่างกายแมลงจะไปรบกวนการทำงานของ organ ดังกล่าว จึงทำให้แมลงไม่สามารถดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชได้ (กลุ่มบริหารศัตรูพืชและกลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2563) โดยสารดังกล่าวจะออกฤทธิ์ดูดซึมและเริ่มเห็นผลภายใน 2 – 5 วัน หลังการสัมผัสสารของแมลงศัตรูพืช ซึ่ง flonicamid จัดเป็นสารที่มีความปลอดภัยสูง และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรผู้ใช้ คุณสมบัติทางเคมีของสาร flonicamid แสดงดังตารางที่ 1 (EURL-SRM, 2015)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่ม flonicamid

No.	Structure	IUPAC Name	MW. (g/mol)
1.	 <p style="text-align: center;">FNX</p>	N-(cyanomethyl)-4-(trifluoromethyl)pyridine-3-carboxamide	229.162
2.	 <p style="text-align: center;">TFNA</p>	4-trifluoromethyl nicotinic acid	191.11
3.	 <p style="text-align: center;">TFNG</p>	N-(4-trifluoromethylnicotinoyl) glycine	248.16

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่าข้อมูลการพิจารณาสารพิษตกค้างในพืชทั้ง EU MRLs (CODEX, 2019) และ Japan MRLs (Japan, 2019) กำหนดให้สาร flonicamid ประเมินได้จากผลรวมของทั้งสาร flonicamid (FNX) และสารอนุพันธ์อีกสองชนิด คือ 4-trifluoromethyl nicotinic acid (TFNA) และ N-(4-trifluoro methylnicotinoyl) glycine (TFNG) ดังนั้นหากต้องการวิเคราะห์หาสารพิษตกค้างของสารข้างต้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องประเมินสารทั้ง 3 ชนิด คือ FNX, TFNA และ TFNG

Hengel and Miller (2007) พัฒนารีวิววิเคราะห์สารพิษตกค้าง flonicamid และสารอนุพันธ์ในฮ็อพแห้ง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 66 – 119 โดย fortified สารมาตรฐานในตัวอย่างฮ็อพ ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.005 0.02 0.2 2.0 และ 4.0 mg/kg ขณะที่มีค่า LOD และ LOQ อยู่ที่ 0.0025 และ 0.005 mg/kg ตามลำดับ และสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาไปใช้ในการวิเคราะห์หาสารพิษตกค้าง flonicamid ในฮ็อพแห้งจาก 3 แปลงทดลองได้เป็นอย่างดี

Xu, et al. (2011) จำลองวิธีตรวจวัดสารพิษตกค้าง flonicamid และสารอนุพันธ์ในพืชผักโดยสกัดด้วยวิธี QuEChERS และตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่า linearity อยู่ในช่วง 0.0002 – 0.5 ug/mL โดยให้ค่า $R^2 > 0.998$ ไม่มีผลรบกวนจากอิทธิพลสารเจือปนตัวอย่าง จากการ fortified สารมาตรฐานที่ 4 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 6 ซ้ำ คือ 0.01 0.05 0.5 และ 2.0 mg/kg ในตัวอย่างผักโขมและแตงกวา พบว่า % recovery อยู่ในช่วง 81.3 – 94.8 % และค่า RSD อยู่ในช่วง 2.4 – 7.0 ซึ่งชี้บ่งได้ว่าวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดสารพิษตกค้าง flonicamid และสารอนุพันธ์ในพืชผักได้

EURL-SRM. (2015) วิเคราะห์สารพิษตกค้าง flonicamid และสารอนุพันธ์ คือ TFNA และ TFNG สกัดตัวอย่างด้วยวิธี acidified QuEChERS โดยผสม 1% V/V formic acid ในสารละลาย acetonitrile และตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารกลุ่มดังกล่าว

สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ FNX, TFNA และ TFNG ในตัวอย่างพืชตระกูลแตง ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสม และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ตามปัจจัยต่างๆ เพื่อยืนยันถึงความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และขอการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการในอนาคตต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

1) เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ปีกเกอร์ (Beaker) กระจกบอกรวง (Cylinder) ชุดกรองสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (LC-mobile phase filtration) หลอดปั่นเหวี่ยง (Screw-capped polypropylene centrifuge tubes) ขนาด 50 และ 15 mL และกระจกบอกรวงที่มีตัวกรองเมมเบรน (Syringe with membrane filter) ขนาด 0.20 μ m

2) อุปกรณ์ดูด – จ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto pipette) ขนาดต่างๆ เช่น 2 – 20, 10 – 100, 20 – 200, 100 – 1,000, 500 – 5,000 μ L และ 1 – 10 mL

3) เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่งไฟฟ้า (Electronic balance) ชนิดทศนิยม 5 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง เครื่องบดตัวอย่าง (Food processor) เครื่องผสมตัวอย่าง (Vortex mixer) และเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

4) เครื่องตรวจวิเคราะห์ปริมาตรสารพิษตกค้างชนิด Liquid chromatography ยี่ห้อ Agilent technologies รุ่น 1290 infinity ที่ต่อกับ Mass spectrometry (LC-MS/MS) R2 รุ่น 6410 Triple quad

7.2 สารเคมี

1) สารมาตรฐานอ้างอิง (Reference standards) กลุ่มฟโลนิคามิด 3 ชนิด ได้แก่ FNX : (N-cyanomethyl-4-trifluoromethyl nicotinamide) ,TFNA : (4-trifluoromethyl nicotinic acid) และ TFNG : (N-(4-trifluoro methylnicotinoyl) glycine)) จาก Dr. Ehrenstorfer™ ประเทศเยอรมนี

2) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง เช่น acetonitrile (ACN), sodium chloride (NaCl), magnesium sulfate (MgSO₄), primary secondary amine (PSA) และ formic acid (HCO₂H)

7.3 วิธีการ

7.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

1) การเตรียม Stock standard solution

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิ (Primary standard solution) ของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด โดยมีรายละเอียดดัง ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิของสารกลุ่ม flonicamid ในตัวทำละลาย ACN

No.	Name	Lot No.	Purity (%)	Weight (g)	Conc. (ug/mL)	Manufacturer
1.	flonicamid	G141217	99.2	0.01099	1,090.21	Dr.Ehrenstorfer
2.	TFNA	975404	99.5	0.01150	1,144.25	Dr.Ehrenstorfer
3.	TFNG	976936	96.3	0.01063	1,023.67	Dr.Ehrenstorfer

2) Intermediate standard solution

เจือจางสารละลายมาตรฐาน Stock standard solution ที่ได้ด้วยตัวทำละลาย acetonitrile (PR grade) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 µg/mL จากนั้นถ่ายใส่ขวดสีชา ปิดฝาและระบุชื่อและรายละเอียดที่สำคัญ เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ - 20 ± 5°C

3) Working standard solution

เจือจางสารละลาย Intermediate standard solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 µg/mL จากนั้นนำมาเตรียม calibration standard solution ในช่วง working range โดยเตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการใช้งาน

7.3.2 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.3 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์

1) QuEChERS (EN15662) ชั่งตัวอย่าง 10 ± 0.01 g ใน Centrifuge tubes ขนาด 50 mL เติม acetonitrile 10 mL เขย่าด้วยมือ นาน 1 นาที เติมสารสกัด NaCl 1 g และ MgSO₄ 4 g เขย่าต่ออีก 1 นาที นำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที สุกทำยกรองสารละลายส่วนใสใส่ใน LC-vial ให้ได้

ปริมาตร 1 mL โดยใช้ PTFE syringe filter ขนาด 0.2 μm พร้อมทั้งเติม 5 % HCO_2H 10 μL นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

2) QuEChERS (EN15662) + clean-up ทำเหมือนวิธี QuEChERS (15662) แต่หลังจากนำไป Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วให้ปั่นเปตสารละลายส่วนใส 5 mL ใส่ลงใน Centrifuge tube ขนาด 15 mL ที่บรรจุด้วยสารทำความสะอาด (MgSO_4 750 mg, PSA 125 mg และ GCB 50 mg) จากนั้น Vertex ต่ออีก 1 นาที แล้วนำไป Centrifuge อีกครั้งที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสใส่ใน LC-vial ให้ได้ปริมาตร 1 mL โดยใช้ PTFE syringe filter ขนาด 0.2 μm พร้อมทั้งเติม 5 % HCO_2H 10 μL นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3) Developed method ทำเหมือนวิธี QuEChERS (EN15662) แต่มีการเติม formic acid (Conc.) 1 % V/V ในสารละลาย acetonitrile

7.3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทำการตรวจสอบปัจจัยต่างๆที่ส่งผลต่อวิธีทดสอบ เพื่อให้สามารถยืนยันถึงประสิทธิภาพของวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ได้ โดยปัจจัยที่ศึกษามีดังต่อไปนี้

- 1) Matrix effect
- 2) Accuracy
- 3) Range/Linearity
- 4) LOD และ LOQ

7.4 เวลาและสถานที่ : ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุเม็พิษการเกษตร

กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตการเกษตรกรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

8.1 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

- 1) การปรับเปลี่ยนสถานะต่างๆของเครื่อง LC-MS/MS เพื่อให้สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ดีที่สุด (Sensitivity) ผลที่ได้จากการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 – 4

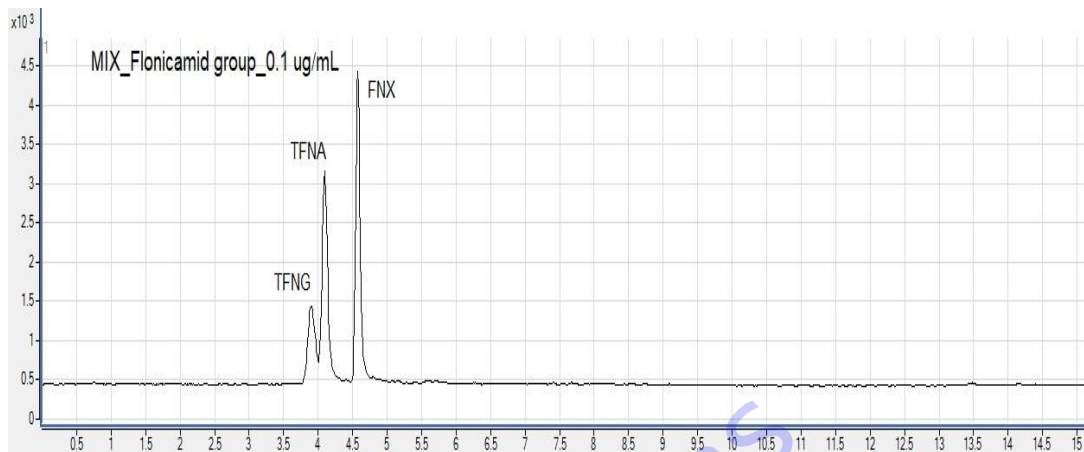
ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมของ Mobile phase

Time (min)	Mobile phase (%)		Flow rate (mL/min)
	A	B	
0	98	2	0.4
2	98	2	0.4
10	10	90	0.4
12	10	90	0.4
14	98	2	0.4
15	98	2	0.4
Condition	Post run : 1 min, Temperature : 40 °C and Injection volume : 2 µL		
Instrument and Column	LC-MS/MS R2 Agilent 1100 series and Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 x 75 mm, 1.8 µm		
Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water (with 5% acetonitrile) B : 0.1% formic acid in acetonitrile		

ตารางที่ 4 MRM Precursor/Product Ion Transitions และ MS Condition

Analyte	Formula	RT (min)	Ion transition		Dwell	CE	Fragmentor	Voltage	Polarity
			Precursor	Product					
TFNG	C ₉ H ₇ F ₃ N ₂ O ₃	0.96	249	203	70	20	100	7	Positive
				148	70	30	100	7	Positive
				98	70	50	100	7	Positive
TFNA	C ₇ H ₄ F ₃ NO ₃	1.21	230	203	70	15	100	7	Positive
				174	70	20	100	7	Positive
				148	70	30	100	7	Positive
FNX	C ₉ H ₆ F ₃ N ₃ O	1.33	192	148	70	25	100	7	Positive
				98	70	30	100	7	Positive

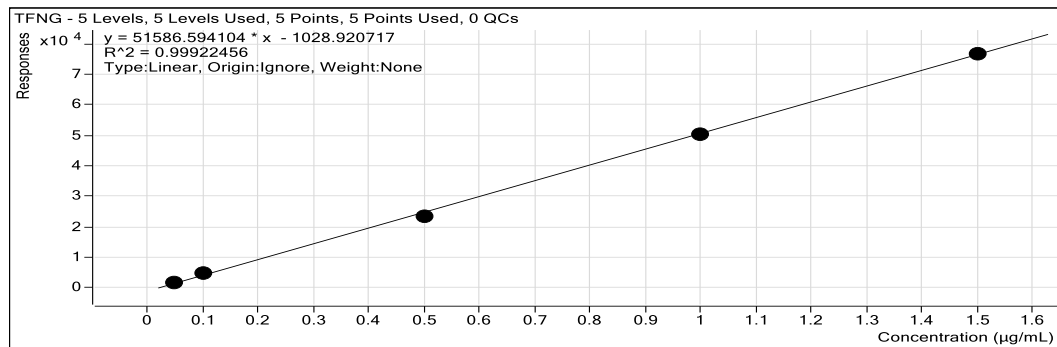
2) ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของการวัดสาร จากสถานะข้างต้น โดยเลือกศึกษาที่ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานผสมของสารกลุ่ม flonicamid ที่จุดความเข้มข้น 0.1 µg/mL ผลที่ได้แสดงดังภาพที่ 1 พบว่าพีคของสารทั้ง 3 ชนิดสามารถแยกออกจากกันได้เป็นอย่างดี โดยตรวจพบสัญญาณของสาร TFNG ที่ retention time (RT) 3.8 นาที ขณะที่ TFNA ปรากฏที่ 4.2 นาที และ FNX เกิดที่ 4.7 นาที



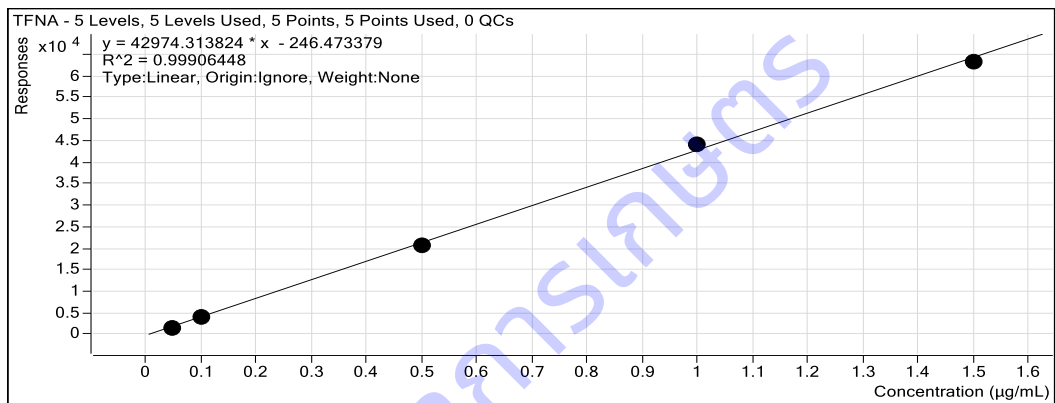
ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมรวมของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม flonicamid ที่จุดความเข้มข้น 0.1 µg/mL

3) วิเคราะห์หาช่วงของการวัด (range) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่ม flonicamid (TFNG TFNA และ FNX) ด้วยตัวทำละลาย Acetonitrile จำนวน 9 ระดับความเข้มข้นๆละ 1 ข้ำ ได้แก่ 0.001 0.005 0.01 0.05 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 µg/mL นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ตามสถานะที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พิจารณา Working range จากการประเมินด้วยสายตา (Visual evaluation) แล้วนำค่า ณ ช่วงนั้น มาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณที่ตรวจวัดได้ (Respond) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฯ ดังแสดงใน ภาพที่ 2 (A ถึง C) จากกราฟดังกล่าวพบว่าที่ช่วงความเข้มข้น 0.05 – 1.5 µg/mL ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination : R^2) ≥ 0.990 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งชี้บ่งได้ว่าช่วงดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงสูงสุด เหมาะสมสำหรับใช้เป็น range ของวิธีวิเคราะห์นี้

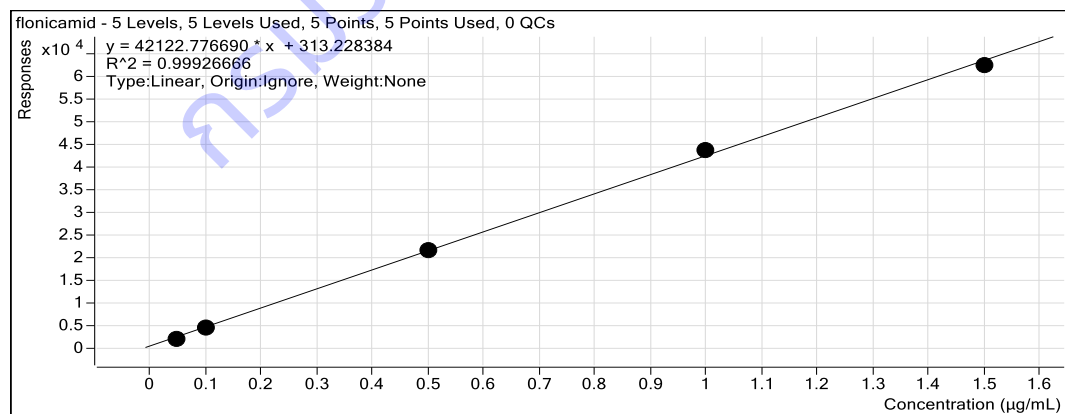
A)



B)



C)



ภาพที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Respond กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม flonicamid ที่ช่วง Working range ตั้งแต่ 0.05 – 1.5 µg/mL (A) TFNG (B) TFNG และ (C) FNX

แต่เนื่องจากจุด upper limit ของ Working range ดังกล่าวมีค่าสูงเกินไป โดยมีค่าอยู่ที่จุดความเข้มข้น 1.5 ug/mL ซึ่งอาจทำให้เกิดการตกค้างของสารมาตรฐานในคอลัมน์และส่งผลกระทบต่อเครื่อง LC-MS/MS จึงทำการทดสอบช่วง Working range ใหม่อีกครั้ง โดยเตรียมสารมาตรฐานกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ในตัวทำละลาย ACN ที่ช่วงความเข้มข้นลดทอนคือตั้งแต่ 0.001- 1.0 ug/mL ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วย เครื่อง LC-MS/MS ประเมินช่วง working range ของสารทั้ง 3 ชนิด อีกครั้งและเลือกจุด upper limit ให้ต่ำลง พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.005 – 0.10 ug/mL ดังนั้นช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจึงถูกใช้เป็น Working range ของวิธีวิเคราะห์นี้

4) ตรวจสอบความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (Linearity) โดยทดสอบสารละลายมาตรฐานดังกล่าวในตัวทำละลาย acetonitrile ที่ช่วง working range ที่ประเมินใหม่ คือที่ระดับความเข้มข้น **0.005 – 0.10 ug/mL** ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า working range ดังกล่าวให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเป็น อย่างดี โดยพิจารณาจากค่า $R^2 \geq 0.990$ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การตรวจสอบ Linearity ของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม flonicamid ที่ช่วงความเข้มข้น 0.005 – 0.10 ug/mL ในตัวทำละลาย acetonitrile ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

concentration (ug/mL)	response		
	TFNA	TFNG	FNX
0.005	1219.26	4467.34	3468.00
0.01	4891.73	12171.70	6777.13
0.02	11848.58	24810.66	13677.14
0.05	29031.99	68479.52	36888.63
0.10	68533.88	146700.54	78998.68
R²	0.9957	0.9993	0.9989

8.2 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสารกลุ่ม flonicamid เฉพาะในตัวอย่างแตงกวา โดยทำการ Fortified สารละลายมาตรฐานของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิดที่จุดความเข้มข้น 0.06 mg/kg ลงในตัวอย่างแตงกวา จากนั้นสกัดสารกลุ่มดังกล่าวด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ QuEChERS : EN15662 ที่ไม่มีการ Clean-up, QuEChERS : EN15662 + Clean-up และวิธีที่พัฒนาขึ้นมา (QuEChERS : EN15662 + 1 % V/V ของ formic acid in ACN) วิธีละ 3 ซ้ำ (ดังตารางที่ 6) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จากผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงค่าจริงมากที่สุด (Trueness) โดยพิจารณาจากค่า % Recovery ที่ได้มีค่าเท่ากับ 83.78 และ 91 % ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ เมื่อพิจารณาจากเกณฑ์ที่กำหนดคือ % Recovery ต้องอยู่ในช่วง 70 – 120 %

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบวิธีต่างๆในการสกัดสารละลายมาตรฐานของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ที่จุดความเข้มข้น 0.06 mg/kg เฉพาะในตัวอย่างแตงกวา

Method	% Recovery (0.06 ug/mL), n = 3		
	TFNG	TFNA	FNX
EN15662 not clean-up	58	42	93
EN15662 + clean-up	10	21	104
Developed method	83	78	91

ยืนยันความเข้มข้นที่เหมาะสมของ formic acid (Conc.) สำหรับใช้ในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างของ วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ (QuEChERS : EN15662 + formic acid) ที่ 5 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ คือ 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 % V/V ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0 % v/v ให้ค่า % Recovery ของสารกลุ่ม flonicamid ทั้งสามชนิด คือ TFNG, TFNA และ FNX ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 79 82 และ 105 % ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1.0 % V/V formic acid เติมลงในสารละลาย acetonitrile ในขั้นตอนการสกัด

ตารางที่ 7 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ formic acid

Formic acid (%V/V)	Recovery (%) เมื่อ n = 3		
	TFNG	TFNA	FNX
0.1	59	46	100
0.5	77	72	94
1.0	79	82	105
1.5	77	78	93
2.0	74	79	89

8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

1) Matrix effect

จากนั้นตรวจสอบ Linearity ของช่วงความเข้มข้นดังกล่าวในตัวอย่างจริงที่ต้องการวิเคราะห์ โดยเตรียม สารละลายมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.005 – 0.10 ug/mL ในตัวทำละลายแตงกวาสกัด (Matrix) ซึ่งเตรียมที่ ช่วงความเข้มข้นขยายอย่างน้อย 5 จุดความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ คือ 0.005 0.01 0.02 0.05 และ 0.10 ug/mL ใน ตัวทำละลาย Matrix ที่สกัดได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมา (QuEChERS : EN15662 + 1 % V/V ของ formic acid in ACN) จุดความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พบว่า working range ดังกล่าว มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยพิจารณาจาก $R^2 \geq 0.990$ แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การตรวจสอบ Linearity ของสารละลายมาตรฐานกลุ่ม flonicamid ที่ช่วงความเข้มข้น 0.005 – 0.10 ug/mL ในตัวทำละลายตัวอย่างแตงกวา (Matrix) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

concentration (ug/mL)	Response (n = 3)		
	TFNA	TFNG	FNX
0.005	4356.51	5674.84	2438.92
0.01	6986.98	10473.69	4800.52
0.02	13611.10	23425.55	9472.35
0.05	29378.03	49807.87	20456.04
0.10	44771.40	75523.82	30561.54
R²	0.9994	0.9991	0.9988

เปรียบเทียบอิทธิพลของสารเจือในตัวอย่งแตงกวา (Matrix effect) ของสารกลุ่ม flonicamid ระหว่างตัวทำละลาย acetonitrile และตัวทำละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างแตงกวา (matrix) เพื่อใช้ในการเตรียม Calibration curve ของวิธีวิเคราะห์นี้ พบว่าสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลการรบกวนจาก Matrix effect (ME) จากแตงกวาแต่อย่างใด โดยพิจารณาจาก % Matrix effect (%ME) ≤ 20% (Ana, 2014) ดังนั้นจึงสามารถเตรียมสารละลายมาตรฐานได้ทั้งในตัวทำละลาย acetonitrile และใน matrix ของแตงกวาเอง แสดงดัง ตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบ Matrix effect ระหว่างตัวทำละลาย acetonitrile (ACN) และสารสกัดตัวอย่างแตงกวา (matrix) จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมา (QuEChERS : EN15662 + 1 % V/V ของ formic acid in ACN)

Fortified (ug/mL)	Respond					
	TFNG		TFNA		FNX	
	ACN	Mtrx	ACN	Mtrx	ACN	Mtrx
0.01	9540.98	4435.84	171.70	5030.79	6310.04	1983.52
0.02	20727.12	7682.90	35228.85	9753.80	12915.63	3641.33
0.04	48017.95	44422.63	76083.61	74683.36	28787.60	25880.26
0.06	71429.69	70213.32	118857.71	117618.00	43438.32	41697.39
0.08	102937.02	96556.60	169975.46	162558.74	61773.52	57973.31
Slope	1323169.93	1382065.36	2337137.21	2368725.73	788305.80	840913.43
% Matrix effect	4.45		1.35		6.67	

คำนวณหาอิทธิพลสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่ง จากค่าความชัน (slope) ของการเตรียมสารมาตรฐานระหว่างในตัวอย่งแตงกวา แต่งโม และแคนตาลูป (Mtrx) กับ slope ที่เตรียมในตัวทำละลาย acetonitrile (ACN) ตามสมการ % Matrix effect = (slope Mtrx/slope ACN) × 100 พบว่าแคนตาลูปมีอิทธิพลของสิ่งปนเปื้อนสูงมาก

เนื่องจากให้ค่า % Matrix effect ในสาร TFNG และ TFNA เกิน 20 % (ตารางที่ 10) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ตัวทำละลาย acetonitrile ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อตรวจวิเคราะห์หาสารในตัวอย่างแคนตาลูปได้

ตารางที่ 10 การตรวจสอบผลของ matrix effect ของพีชตระกูลแตงทั้ง 3 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับ ACN

%Matrix effect TFNG			%Matrix effect TFNA			%Matrix effect flonicamid		
Cucumber	Watermelon	Cantaloupe	Cucumber	Watermelon	Cantaloupe	Cucumber	Watermelon	Cantaloupe
4	5	23	1	7	44	7	4	13

2) Accuracy

ขณะที่ทำการ fortified 4 ระดับความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ คือ 0.01 0.02 0.05 และ 0.1 mg/kg พบว่าให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 70 — 120 % แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการตรวจสอบ accuracy

Respond (average)			Theory Conc.	Display Conc. (average)			% Accuracy (average)		
TFNG	TFNA	FNX		TFNG	TFNA	FNX	TFN	TFNA	FNX
6956	11030	4654	0.01	0.0107	0.0113	0.0104	107	113	104
13801	22118	9585	0.02	0.0197	0.0195	0.0196	99	98	98
44823	75848	31078	0.05	0.0509	0.0595	0.0598	101	99	100
73379	132952	52982	0.10	0.0987	0.1019	0.1007	99	102	101

3) Range

จากการตรวจสอบข้างต้นในช่วงการทดสอบที่อยู่ในช่วง 0.005 – 0.1 mg/kg พบว่าค่า % recovery ของสารทั้ง 3 ชนิด TFNA TFNG และ FNX ให้ค่าผ่านเกณฑ์กำหนดทุกตัว

4) LOD และ LOQ

ทดสอบหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดได้ของสารทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ (LOD และ LOQ) โดยทำการ Fortified สารละลายมาตรฐานกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg ในตัวอย่างแตงกวา จำนวน 10 ซ้ำ สกัดและตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ QuEChERS : EN15662 + 1.0 % V/V ของ formic acid และ LC-MS/MS ตามลำดับ จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation: SD) ซึ่ง LOD มีค่าเท่ากับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (LOD = 3 × SD) ส่วน LOQ มีค่าเท่ากับสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (LOQ = 10 × SD) พบว่าค่า Predicted-LOD ของสารทั้งสามชนิดอยู่ที่ 0.0015

— 0.0030 mg/kg ขณะที่ค่า Predicted-LOQ ของวิธีดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 0.0049 — 0.00995 mg/kg จึงกำหนดให้ LOQ ของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากับ 0.01 mg/kg โดยมีค่า % Recovery อยู่ในช่วง 86 — 113 ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ ดังแสดงใน ตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการ Fortified สารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg เมื่อ n = 10 ซ้ำ

No.	flonicamid Group					
	TFNG		TFNA		FNX	
	Conc.	Rec. (%)	Conc.	Rec. (%)	Conc.	Rec. (%)
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.011	110	0.0091	91	0.0113	113
2	0.009	86	0.0077	77	0.0099	99
3	0.011	105	0.0091	91	0.0092	92
4	0.010	95	0.0083	83	0.0109	109
5	0.011	112	0.0091	91	0.0101	101
6	0.010	103	0.0085	85	0.0087	87
7	0.011	113	0.0083	83	0.0108	108
8	0.011	112	0.0090	90	0.0109	109
9	0.009	88	0.0082	82	0.0097	97
10	0.010	101	0.0087	87	0.0099	99
Avg.	0.0103	103	0.0086	86	0.0101	101
SD.	9.95×10^{-4}	-	4.86×10^{-4}	-	8.31×10^{-4}	-
10 × SD.	9.95×10^{-3}	-	4.86×10^{-3}	-	8.31×10^{-3}	-

ดังนั้นจึงกำหนดค่า LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg และจากการ Confirm-LOD จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าสารกลุ่ม flonicamid มีค่า % Recovery ในช่วง 77 – 119 และ % RSD ในช่วง 5.7 – 9.0 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 13) ดังนั้นจึงสามารถยืนยันค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นมาได้

ตารางที่ 13 ผลการ Fortified สารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 mg/kg เมื่อ n = 10 ซ้ำ

No.	flonicamid Group					
	TFNG		TFNA		FNX	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
1	0.0059	117	0.0037	74	0.0046	91
2	0.0057	114	0.0044	89	0.0054	107
3	0.0049	98	0.0050	101	0.0055	110
4	0.0054	109	0.0046	92	0.0052	103
5	0.0051	101	0.0047	93	0.0058	116
6	0.0058	115	0.0044	89	0.0048	95
7	0.0055	109	0.0048	95	0.0052	103
8	0.0053	106	0.0047	93	0.0050	101
9	0.0056	111	0.0047	93	0.0057	114
10	0.0053	106	0.0038	77	0.0060	119
Avg.	0.0054	103	0.0045	86	0.0053	101
SD.	3.07×10^{-4}	-	4.06×10^{-4}	-	4.45×10^{-4}	-

ทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงคุณภาพ (LOD) ของสารกลุ่มฟโลนิคามิดในพีชตระกูลแตงชนิดอื่น นอกจากแตงกวา โดย fortified สารละลายมาตรฐาน ทั้ง 3 ชนิด คือ FNX, TFNA และ TFNG ที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg ในตัวอย่างแคนตาลูป จำนวน 10 ซ้ำ สกัดด้วยวิธีที่ QuEChERS : EN15662 โดยใช้ acetonitrile + 1.0 % V/V formic acid, MgSO₄ และ NaCl เป็นสารสกัด และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ประเมินค่า จากการทดลองที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg พบว่าค่า LOD ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 0.002 mg/kg แต่พบว่าให้ สัญญาณการตรวจวัดด้วยเครื่องต่ำมากจึงปรับค่าเป็น 0.005 mg/kg และจากการยืนยันค่า LOD โดยทำ 10 ซ้ำ พบว่าที่ความเข้มข้นจุดดังกล่าวนี้สามารถตรวจวิเคราะห์สัญญาณของตัวอย่างสารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 3 ชนิด ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงกำหนดให้ LOD ของวิธีวิเคราะห์นี้มีค่าเท่ากับ 0.005 mg/kg ผลการทดสอบแสดงดังตาราง ที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างแคนตาลูป ที่จุดความเข้มข้น 0.005 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ

Fortification of flonicamid group in Cantaloupe (0.005 mg/kg)						
No.	TFNG		TFNA		flonicamid	
	Conc.	Rec. (%)	Conc.	Rec. (%)	Conc.	Rec. (%)
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0055	111	0.0046	93	0.0052	105
2	0.0048	96	0.0045	89	0.0051	101
3	0.0054	108	0.0042	85	0.0053	106
4	0.0054	109	0.0041	81	0.0050	100
5	0.0052	105	0.0052	104	0.0056	111
6	0.0055	110	0.0049	98	0.0052	104
7	0.0058	116	0.0054	108	0.0053	106
8	0.0058	116	0.0055	110	0.0057	114
9	0.0055	109	0.0046	93	0.0058	116

10	0.0053	106	0.0044	88	0.0053	107
Avg.	0.0054	108	0.0047	95	0.0052	107
SD.	2.78×10^{-4}		4.91×10^{-4}		2.67×10^{-4}	
RSD	5.13		10.35		4.99	

ทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของสารกลุ่มฟโลนิคามิดในแคนตาลูป ซึ่งประเมินค่า LOQ ได้จากสลิปเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/kg ($LOQ = 10 \times SD$) พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005 – 0.007 mg/kg แต่ในเบื้องต้นได้กำหนดให้ความเข้มข้น 0.05 mg/kg เป็นค่า LOD แล้ว ดังนั้นจึงกำหนดให้ความเข้มข้นที่ 0.01 mg/kg เป็นค่า LOQ ซึ่งจากการ fortified สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg ลงในตัวอย่างแคนตาลูป จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างทดสอบทุกตัวให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 70 – 120 % ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ และมี % RSD อยู่ในช่วง 5.56 – 7.23 ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์กำหนด ผลการทดสอบแสดงดัง ตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการ fortified สารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ในแคนตาลูป
ที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ

Fortification of flonicamid group in Cantaloupe (0.01 mg/kg)						
No.	TFNG		TFNA		flonicamid	
	Conc.	Rec. (%)	Conc.	Rec. (%)	Conc.	Rec. (%)
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0090	90	0.0087	87	0.0096	96
2	0.0098	98	0.0091	91	0.0102	102
3	0.0103	103	0.0084	84	0.0092	92
4	0.0087	87	0.0076	76	0.0086	86
5	0.0095	95	0.0082	82	0.0091	91

6	0.0084	84	0.0083	83	0.0090	90
7	0.0083	83	0.0089	89	0.0084	84
8	0.0091	91	0.0084	84	0.0090	90
9	0.0098	98	0.0092	92	0.0090	90
10	0.0095	95	0.0092	92	0.0089	89
Avg.	0.0092	92	0.0086	86	0.0091	91
SD.	6.67×10^{-4}		5.31×10^{-4}		5.07×10^{-4}	
RSD	7.23		6.17		5.56	
3 × SD	0.002		0.002		0.002	
10 × SD	0.007		0.005		0.005	

ทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงคุณภาพ (LOD) ของสารกลุ่ม flonicamid ในตัวอย่างแดงโมซึ่งเป็นหนึ่งในพืชตระกูลแตง ตามวิธีการข้างต้นพบว่าค่า LOD ที่คำนวณได้มีค่าเท่ากับ 0.002 mg/kg แต่กลับให้สัญญาณการตรวจวัดด้วยเครื่องต่ำมากจึงปรับค่าเป็น 0.005 mg/kg และจากการยืนยันค่า LOD โดยทำ 10 ซ้ำ ที่ความเข้มข้น 0.005 mg/kg พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์สัญญาณของตัวอย่างสารละลายมาตรฐานผสมทั้ง 3 ชนิดได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงกำหนดให้ LOD ของวิธีวิเคราะห์นี้ในตัวอย่างแดงโม มีค่าเท่ากับ 0.005 mg/kg ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการยืนยันค่า LOD ของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างแตงโม ที่จุดความเข้มข้น 0.005 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ

Fortification of flonicamid group in Watermelon (0.005 mg/kg)						
No.	TFNG		TFNA		flonicamid	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
1	0.0059	119	0.0044	89	0.0056	113
2	0.0036	72	0.0046	91	0.0048	96
3	0.0046	92	0.0052	103	0.0046	92
4	0.0050	101	0.0049	98	0.0044	88
5	0.0048	96	0.0048	96	0.0058	116
6	0.0038	76	0.0058	115	0.0049	98
7	0.0035	70	0.0042	85	0.0051	101
8	0.0041	82	0.0058	116	0.0050	101
9	0.0053	107	0.0046	93	0.0050	101
10	0.0058	116	0.0050	100	0.0053	106
Avg.	0.0047	93	0.0049	99	0.0051	101
SD.	8.78E-04		5.24E-04		4.36E-04	
RSD.	19		11		9	

ทดสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของสารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างแตงโมตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งประเมินค่า LOQ ได้จากสิบเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg ($LOQ = 10 \times SD$) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.006 – 0.008 mg/kg แต่เพื่อให้ครอบคลุมสารในกลุ่มทุกตัวจึงกำหนดให้ที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg เป็นค่า LOQ ซึ่งจากการ fortified สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นดังกล่าวในตัวอย่างแตงโม จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าตัวอย่างทดสอบทุกตัวให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 70 – 120 %

ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ และมี % RSD อยู่ในช่วง 6.05 – 9.16 ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่ระดับ LOQ มีความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์กำหนด ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการ fortified สารกลุ่ม flonicamid ทั้ง 3 ชนิด ในแตงโม ที่จุดความเข้มข้น 0.01 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ

Fortification of flonicamid group in Watermelon (0.01 mg/kg)						
No.	TFNG		TFNA		flonicamid	
	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)	Conc. (mg/kg)	Rec. (%)
1	0.0083	83	0.0099	99	0.0092	92
2	0.0078	78	0.0092	92	0.0087	87
3	0.0087	87	0.0100	100	0.0096	96
4	0.0101	101	0.0107	107	0.0090	90
5	0.0087	87	0.0094	94	0.0097	97
6	0.0079	79	0.0096	96	0.0099	99
7	0.0075	75	0.0081	81	0.0080	80
8	0.0086	86	0.0086	86	0.0094	94
9	0.0095	95	0.0098	98	0.0095	95
10	0.0084	84	0.0093	93	0.0096	96
Avg.	0.0086	86	0.0095	95	0.0093	93
SD.	7.85E-04		7.33E-04		5.61E-04	
RSD.	9.16		7.74		6.05	
3 × SD	0.002		0.002		0.002	
10 × SD	0.008		0.007		0.006	

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม flonicamid ในพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าในขั้นตอนการสกัดตามวิธี QuEChERS: EN15662 ที่เติม 1% V/V formic acid (Conc.) ในสารละลายสกัด acetonitrile ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดสารดังกล่าว วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีช่วงการทดสอบอยู่ในช่วง 0.005 – 0.1 mg/kg ที่ระดับความเข้มข้นการ fortified 4 ระดับความเข้มข้นๆละ 3 ซ้ำ คือ 0.01 0.02 0.05 และ 0.1 mg/kg ให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 70 – 120 % ค่า LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบมีค่าเท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ และพบว่าแคนตาลูปมีผลรบกวนจากอิทธิพลของสารเจือในตัวอย่างขณะที่แตงกวาและแตงโมไม่พบการรบกวนดังกล่าวแต่อย่างใด

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ ไปตรวจวัดหาปริมาณสารพิษตกค้างของสารกลุ่ม flonicamid ในพืชตระกูลแตงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการและนำไปขอการรับรองมาตรฐาน ISO 17025 ของห้องปฏิบัติการต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มบริหารศัตรูพืชและกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2563. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลง-ศัตรูพืชอย่างปลอดภัยจากงานวิจัย 2563. หน้า 31
- EURL-SRM. Analysis of Flonicamid-Metabolites TFNA and TFNG using acidified QuEChERS method. Version 2. European union reference laboratories for residues of pesticides. 2015, 1 – 8.
- Flonicamid pesticide database search. CODEX Alimentarius international food standards. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide_detail/en/?p_id=282. Sited on 1 January 2019.
- Flonicamid search engine for MRLs. The Japan food chemical research foundation. http://db.ffcr.or.jp/front/pesticide_detail?id=65450. Sited on 1 January 2019.
- Hengel M.J. and Miller M. Analysis of Flonicamid and Its metabolites in dried hops by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food chemistry. 2007, 55: 8033 – 8039.

Xu Y., Shou L.F. and Wu Y.L. Simultaneous determination of flonicamid and its metabolites in vegetables using QuEChERS and reverse-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218: 6663 — 6666.

Ana M. Domínguez, Fabian Placencia, Francisco Cereceda, Ximena Fadic and Waldo Quiroz. Analysis of tomato matrix effect in pesticide residue quantification through QuEChERS and single quadrupole GC/MS. *Chilean journal of agricultural research*. 2014, 74(2): 148 — 156.

คณะวิทยาศาสตร์