

รายงานผลงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด

1. **แผนงานวิจัย :** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล
2. **โครงการวิจัย :** วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพาทค้ำของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
กิจกรรมที่ 1. พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ
3. **ชื่อการทดลอง :** การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพาทค้ำ 2,4-ดี (2,4-D) และ เอ็มซีพีเอ (MCPA) ในธัญพืช

ชื่อการทดลอง : Development and Validation of Method for Analysis 2,4-D and MCPA in cereal

4. คณะผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ : นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

หัวหน้าการทดลอง : นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นางสาวจินตนา ภู่มงกุฏชัย กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวสุพัตริ หนูสังข์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางสาวศศิณิภา คงเข้มดี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นายประพันธ์ เคนท้าว กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ :

ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างธัญพืช โดยใช้ลูกเดียว และแก้วเหลืองเป็นธัญพืชตัวแทนด้วยเครื่อง LC-MS/MS จากการเปรียบเทียบของ 3 วิธีคือ วิธี Ethyl acetate extraction (Pihlstrom *et al.*, 2007), QuEChERS EN (EN 15622, 2008) และ Acidified QuEChERS (EURL, 2015) วิธีที่มีผลการทดสอบที่ดีที่สุดคือวิธี Acidified QuEChERS (EURL, 2015) มีช่วงการใช้งานอยู่ที่ 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มี Accuracy โดย %Recovery อยู่ในช่วง 81-119 เปอร์เซ็นต์ ผ่านเกณฑ์ยอมรับ 70-120 เปอร์เซ็นต์ Precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.0009-0.019 เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ≤ 2 และ Matrix Effect มีผลกระทบเฉพาะการตรวจวิเคราะห์ MCPA ในตัวอย่างแก้วเหลือง ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ MCPA ในแก้วเหลือง ต้องเตรียมสารมาตรฐานในสารละลายตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Acidified QuEChERS (EURL, 2015)

Abstract :

Validation Method by using LC-MS/MS for determination of 2,4-D and MCPA in cereals grain millet and soy bean were representative sample. The three method Ethyl acetate extraction (Pihlstrom *et al.*, 2007), QuEChERS EN (EN 15622, 2008) and Acidified QuEChERS (EURL, 2015) were tested. And Acidified QuEChERS is the most suitable analysis method, working range 0.01-0.50 mg/kg, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) 0.005 and 0.010 mg/kg respectively. Accuracy with % recovery in the range of 81-119 percent within the acceptance criteria of %recovery 70-120 percent (SANCO, 2013). Precision within the acceptable criteria HORRAT ≤ 2 , HORRAT in the range 0.0009-0.019. And matrix effect when analyte MCPA in soy bean.

6. คำนำ :

2,4-D ชื่อ IUPAC คือ 2,4-dichlophenoxy acetic acid และ MCPA ชื่อ IUPAC คือ 4-chloro-o-tolyloxyacetic acid จัดเป็นสารกำจัดวัชพืช (herbicide) กลุ่ม phenoxy acetic acid ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชใบกว้าง ในแปลงธัญพืช สนาบหญ้า สวนสาธารณะ สนามกอล์ฟ และใช้กำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อเพิ่มผลผลิต 2,4-D ถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในสิ่งแวดล้อม โดยในดินถูกย่อยสลายได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน โดยแบคทีเรียในดินเช่น *Flavobacterium peregrinum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis*, *Strptomyces SP.* ในน้ำย่อยสลายโดยเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยมีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา(กรมควบคุมมลพิษ, 2553) 2,4-D มีค่า Oral LD₅₀ rat 400 - 2000 mg/kg bw (FAO, 1996) MCPA มีค่า Oral LD₅₀ rat > 500 mg/kg bw (FAO, 2005)

2,4-D และ MCPA เป็นสารกำจัดวัชพืชใบกว้าง ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในแปลงธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต (Steven D. Wright) นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1942 ที่มีการพบ 2,4-D ได้มีการใช้ 2,4-D และ MCPA ในการกำจัดวัชพืชใบกว้างในแปลงข้าว ข้าวโพด และธัญพืชอื่นๆ (คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) จึงมีโอกาที่ 2,4-D และ MCPA จะตกค้างในธัญพืชได้ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็ว เพื่อใช้ในงานบริการและงานตรวจวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ :

7.1 อุปกรณ์

1. ตู้อบ และเตาเผา
2. centrifuge tubes ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร
3. autosampler vials for GC,HPLC ขนาด 1.8 มิลลิลิตร
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง
5. เครื่องบดสับตัวอย่าง (food processor)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

7. อุปกรณ์ดูด-จ่ายสารละลาย (auto pipette) ขนาด 10-100 ไมโครลิตร , 20-200 ไมโครลิตร 100-1000 ไมโครลิตร
8. เครื่องแก้วชนิดและขนาดต่างๆ เช่น volumetric flask, beaker
9. เครื่อง Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS)

7.2. สารเคมี

1. สารมาตรฐานของ 2,4-D purity 98.0 เปอร์เซ็นต์ และ PCPA purity 99.1 เปอร์เซ็นต์
2. Acetonitrile, และ Toluene ชนิด Pesticide grade (J.T baker)
3. Water HPLC grade
4. Anhydrous Magnesium sulfate (ACS powder-Fisher) เผาที่ 500°C นาน 5 ชั่วโมง
5. Sodium chloride ชนิด Analytical grade (Merck)

7.3. วิธีการ

7.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

7.3.1.1 Stock standard solution

ชั่งสารมาตรฐาน 2,4-D และ MCPA ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ให้ได้น้ำหนักประมาณ 10 มิลลิกรัม แล้วละลายและปรับปริมาตรด้วย toluene ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของ stock standard solution คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน}(\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{น้ำหนักสารมาตรฐานที่ชั่ง}(\text{mg}) \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร}(\%) \times 10^3}{\text{ปริมาตรที่เตรียม}(\text{ml}) \times 100}$$

7.3.1.2 Mix. intermediate and working standard solution

ความเข้มข้นต่างๆ เป็นการเตรียมสารผสมของ 2,4-D และ MCPA ความเข้มข้นที่ต้องการจากสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 คือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ($\mu\text{g/ml}$)

N_2 คือ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม ($\mu\text{g/ml}$)

V_1 คือ ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูมา (ml)

V_2 คือ ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (ml)

7.3.2 การเตรียมและตั้งสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS

Injection volume : 5 μ l

Column temperature : 40 °C

Flow rate : 0.40 ml/ min.

Column : Synergy fusion-RP C18 100A, 100mm x 2.0 mm

Ionisation mode : ESI negative

Gas temp. : 300 °C

Gas flow : 5 /min

Nubilizer : 45 psi

Sheath gas heater : 400 °C

Sheath gas flow : 10 V/min

Capillary : 3500 V

Post time : 2 min

Mobile phase : A : 0.01% acetic acid in water (with 5% acetonitrile)

B: 0.01% acetic acid in acetonitrile

Gredient :

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase A (%)
0	0.40	80	20
4.0	0.40	70	30
7.0	0.40	10	90
8.5	0.40	10	90
8.6	0.40	80	20

QQQ mass spectrometer papameter :

Compound	Precusor ion	Product Ion	Dwell time	Fragment (V)	CE (V)	Cell Acc. (V)	Polarity
2,4-D	221	163	50	90	15	7	negative
2,4-D	219	161	50	90	15	7	negative
2,4-D	219	125	50	90	15	7	negative
MCPA	201	143	50	100	15	7	negative
MCPA	199	141	50	100	15	7	negative

7.3.3 เปรียบเทียบวิธีการสกัด 2,4-D และ MCPA

ทำการสกัดตัวอย่างธัญพืชที่ได้มีการเติมสาร 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างธัญพืช โดยในเบื้องต้นใช้ ลูกเต๋อยเป็นตัวอย่างแล้วเติมสาร 2,4-D และ MCPA ให้มีความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิด ในตัวอย่าง 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แล้วสกัดตัวอย่างด้วย 3 วิธี ดังต่อไปนี้

7.3.3.1 วิธี Ethyl acetate extraction (Pihlstrom *et al.*, 2007)

ชั่งตัวอย่างลูกเต๋อย 5 กรัม ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารผสม 2,4-D และ MCPA ให้มีความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม ethyl acetate 10 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที เติม NaCl 1 กรัม Na_2SO_4 5 กรัม และ NaHCO_3 1.5 กรัม เขย่า 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane 0.2 ไมครอน ใส่ vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเป่าให้แห้งด้วย nitrogen evaporator แล้วเติมตัวทำละลายเป็น acetonitrile โดยสกัดตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 7 ซ้ำนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.3.2 วิธี QuEChERS (EN 15622, 2008)

ชั่งตัวอย่างลูกเต๋อย 5 กรัม ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารผสม 2,4-D และ MCPA ให้มีความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที เติม MgSO_4 4 กรัม NaCl 1 กรัม $\text{Na}_3\text{Citrinate dehydrate}$ 1 กรัม และ $\text{Na}_2\text{HCitrinate sesquihydrate}$ 0.5 กรัม เขย่า 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี PSA 125 มิลลิกรัม MgSO_4 750 มิลลิกรัม และ GCB 50 มิลลิกรัม เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane 0.2 ไมครอน ใส่ vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยสกัดตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 7 ซ้ำนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.3.3 วิธี Acidified QuEChERS : A-QuEChERS (EURL, 2015)

ชั่งตัวอย่างลูกเต๋อย 5 กรัม ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารผสม 2,4-D และ MCPA ให้มีความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม 1% formic acid in acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที เติม MgSO_4 4 กรัม และ NaCl 1 กรัม เขย่า 15 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane 0.2 ไมครอน ใส่ vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยสกัดตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 7 ซ้ำนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA

เมื่อได้ทำการสกัดตัวอย่างลูกเต๋อยที่ได้มีการเติม 2,4-D และ MCPA และเปรียบเทียบกันทั้ง 3 วิธีดังกล่าวข้างต้นแล้วพบว่า วิธี Acidified QuEChERS (A-QuEChERS) ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าอีก 2 วิธี จึงเลือกวิธี A-QuEChERS เป็นวิธีที่จะนำไปใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี และได้ทำการทดสอบในตัวอย่างแก้วเหลืองเพิ่มอีกหนึ่งชนิดตัวอย่าง

7.3.4.1 ศึกษา Matrix effect

เตรียมสารมาตรฐานของ 2,4-D และ MCPA ความเข้มข้นในช่วง 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ชุด โดยชุดที่ 1 เตรียมใน acetonitrile ชุดที่ 2 และ 3 เตรียมในสารละลายที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง sample blank ของลูกเต๋อย และแก้วเหลืองด้วยวิธี A-QuEChERS (Matrix solvent) ตามลำดับ นำสารมาตรฐานทั้ง 3 ชุด ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำผลวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟ โดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสาร แกน y เป็นพื้นที่ใต้พีค (peak area) ประเมิน matrix effect จากสมการ

$$\text{Matrix effect(\%)} = \frac{[(\text{slope analytical curve std. in matrix}) - (\text{slope analytical curve std. in solvent})]}{(\text{slope analytical curve std. in solvent})} \times 100$$

ถ้า matrix effect (%) ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า matrix ไม่มีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ทดสอบ กรณีที่ matrix effect มีค่าสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (NATA, 2018) ในการเตรียมสารมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ต้องเตรียมใน Matrix solvent เพื่อแก้ปัญหาจาก matrix effect

7.3.4.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (Linearity and Range)

ทดสอบโดยการเติม 2,4-D และ MCPA ลงในตัวอย่างลูกเต๋อย และ แก้วเหลือง ให้มีความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สกัดตัวอย่างด้วยวิธี Acidified QuEChERS (A-QuEChERS) ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำผลทดสอบที่ได้มาสร้างกราฟโดยแกน x เป็นความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง แกน y เป็นพื้นที่ใต้พีคของสารที่ตรวจพบ ซึ่งค่า R² ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.995

7.3.4.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบโดยการ fortified sample blank ด้วย 2,4-D และ MCPA ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างลูกเต๋อย และแก้วเหลือง ตัวอย่างละ 8 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOD จาก LOD เท่ากับ 3SD

7.3.4.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ทดสอบโดยการ fortified sample blank ด้วย 2,4-D และ MCPA ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง ตัวอย่างละ 8 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ จาก LOQ เท่ากับ 10SD และ มีค่า accuracy และ precision ผ่านเกณฑ์กำหนด

7.3.4.5 ความแม่นยำ (Accuracy)

ทดสอบโดยการ fortified sample blank ตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง ด้วย 2,4-D และ MCPA ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือที่ 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ ประเมิน accuracy จากค่าร้อยละการกลับคืนของสารที่ทดสอบ (%Recovery) จาก

1) ค่าร้อยละการกลับคืนของสารที่ทดสอบ (%Recovery) จากสมการ

$$\%Recovery = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

เมื่อ C1 คือความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

C2 คือความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
เกณฑ์ยอมรับ %Recovery คือ 70-120 เปอร์เซ็นต์ (SANCO, 2013)

2) ความเที่ยง (Precision)

ประเมินความเที่ยงด้วยค่า HORRAT โดยใช้ Horwitz equation เกณฑ์การยอมรับคือ
ค่า HORRAT ≤ 2 (AOAC)

$$\text{Horwitz equation : PRSD} = 0.66 \times 2 \times C^{-0.1505}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}}{\text{PRSD}}$$

$$\text{PRSD}$$

เมื่อ RSD คือ ค่า RSD จากผลการทดสอบ

PRSD คือ RSD ที่คำนวณจาก Horwitz equation

C คือ ค่า Concentration ratio

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

จากการทดสอบสภาวะของการตรวจวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่าง ถั่วเหลืองและลูกเดือย ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ตามสภาวะดังวิธีการข้อ 7.3.2 โดยการ fortified sample blank ตัวอย่างลูกเดือย และถั่วเหลือง ด้วยสาร 2,4-D และ MCPA ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า 2,4-D และ MCPA มีค่า retention time ที่ 3.9 และ 4.3 นาที ตามลำดับ

8.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัด

ในการเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยวิธี Ethyl acetate extraction (Pihlstrom *et al.*, 2007), QuEChERS (EN 15622, 2008), Acidified QuEChERS : A-QuEChERS (EURL, 2015) ใช้ตัวอย่างลูกเดือย เติมสาร 2,4-D และ MCPA ให้มีความเข้มข้นในตัวอย่างเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 8 ซ้ำ ทั้ง 3 วิธี % Recovery ของแต่ละวิธีดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง %Recovery ของ 2,4-D และ MCPA สกัดด้วยวิธี Ethyl acetate extraction, QuEChERS (EN), Acidified QuEChERS (A-QuEChERS)

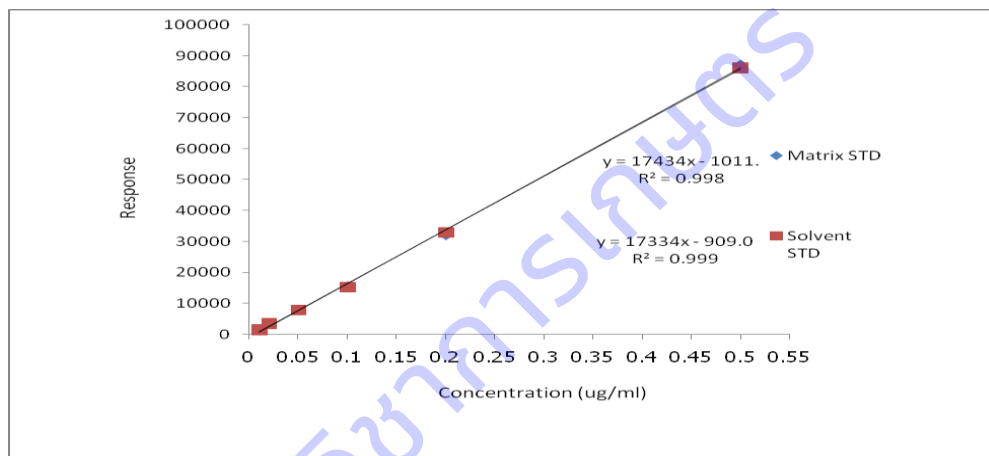
Sample	Ethyl acetate extract		QuEChERS (EN)		A-QuEChERS	
	2,4-D	MCPA	2,4-D	MCPA	2,4-D	MCPA
1	70	72	75	74	100	92
2	76	77	85	83	115	84
3	74	70	70	77	89	85
4	77	70	72	75	119	96
5	80	75	73	71	89	92
6	72	69	88	82	117	93
7	74	75	80	85	119	90
8	75	70	81	75	107	93
mean	75	72	78	78	107	91
SD	3	3	7	5	13	4
%RSD	4	4	8	6	12	5

จากตารางที่ 1 จะเห็นวิธี Acidified QuEChERS (A-QuEChERS) ให้ผลทดสอบที่ดีกว่าอีก 2 วิธี และผ่านเกณฑ์กำหนดคือ % Recovery อยู่ในช่วง 70-120 เปอร์เซ็นต์ และ %RSD \leq 20 (SANCO, 2013) ดังนั้นจึงใช้วิธี Acidified QuEChERS (A-QuEChERS) ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างธัญพืช โดยใช้ ลูกเดือย และ ถั่วเหลือง เป็นธัญพืชตัวแทน

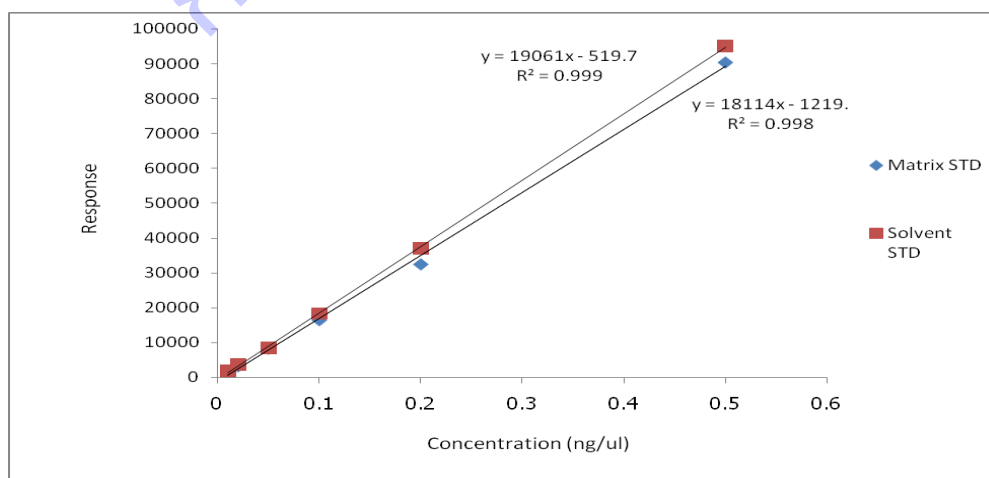
8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋ยและถั่วเหลือง

8.3.1 ศึกษา Matrix effect

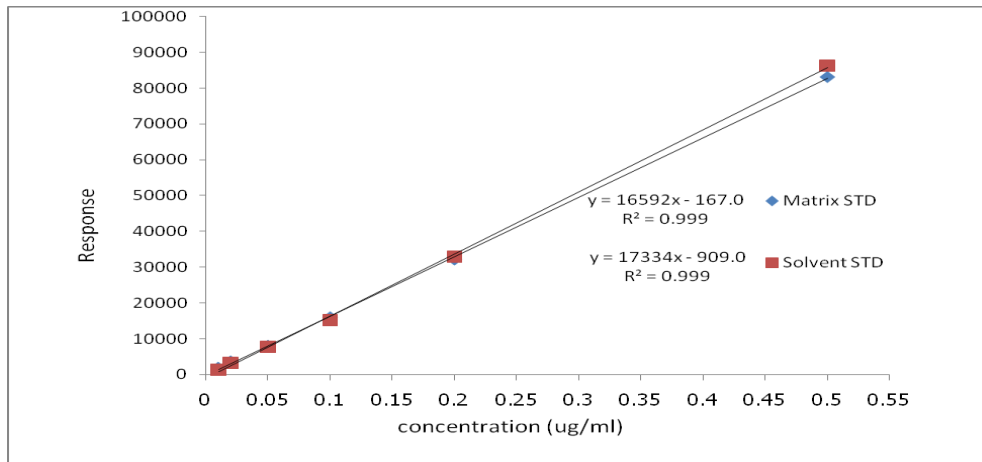
เมื่อนำสารมาตรฐานทั้ง 3 ชุด ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำผลวิเคราะห์ที่ได้ไปสร้างกราฟ โดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสาร หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แกน y เป็นพื้นที่ใต้พีค (peak area) ผลดังแสดงในภาพที่ 1 ถึงภาพที่ 4



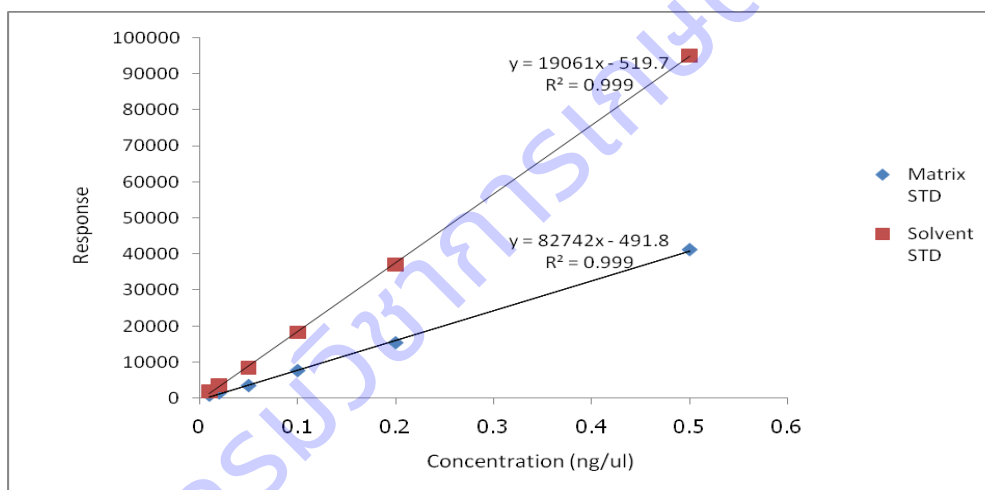
ภาพที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคของ 2,4-D ที่เตรียมใน solvent กับเตรียมใน matrix solvent ลูกเต๋ย



ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคของ MCPA ที่เตรียมใน solvent กับเตรียมใน matrix solvent ลูกเต๋ย



ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคของ 2,4-D ที่เตรียมใน solvent กับเตรียมใน matrix solvent ถั่วเหลือง



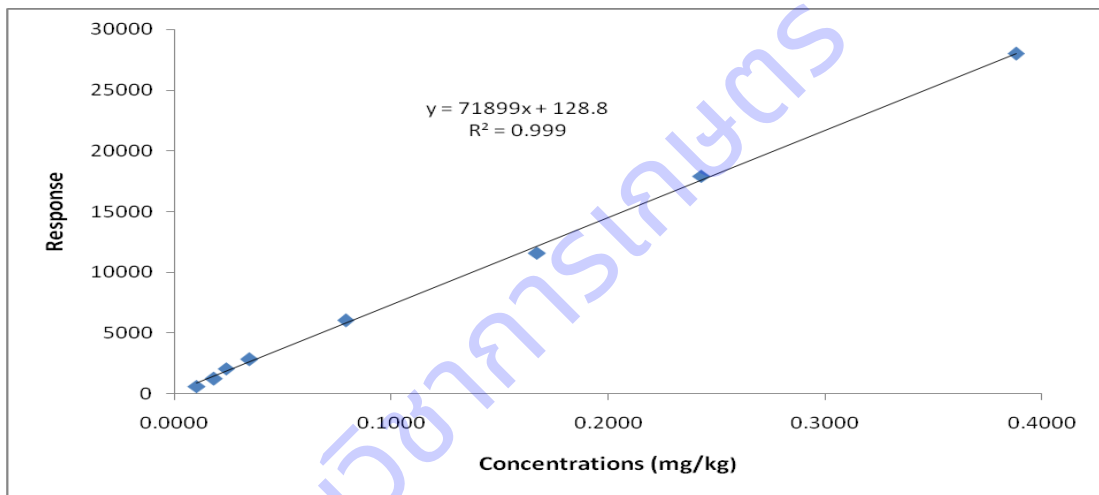
ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคของ MCPA ที่เตรียมใน solvent กับเตรียมใน matrix solvent ถั่วเหลือง

Matrix effect (%) ของ 2,4-D ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 0.57 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ของ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง มีค่าเท่ากับ 5 และ 77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เกณฑ์การยอมรับของ Matrix effect <10 เปอร์เซ็นต์ (NATA, 2018) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการวิเคราะห์หา 2,4-D ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง และ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย Matrix effect ไม่มีผลกระทบต่อวิเคราะห์และทดสอบเนื่องจากมีค่า Matrix effect <10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการวิเคราะห์หา 2,4-D ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง และ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อยสามารถเตรียม standard curve ได้ทั้งใน solvent และ matrix solvent ในขณะที่ Matrix effect (%) ของ MCPA ในตัวอย่างถั่วเหลือง มีค่ามากถึง 77 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อ

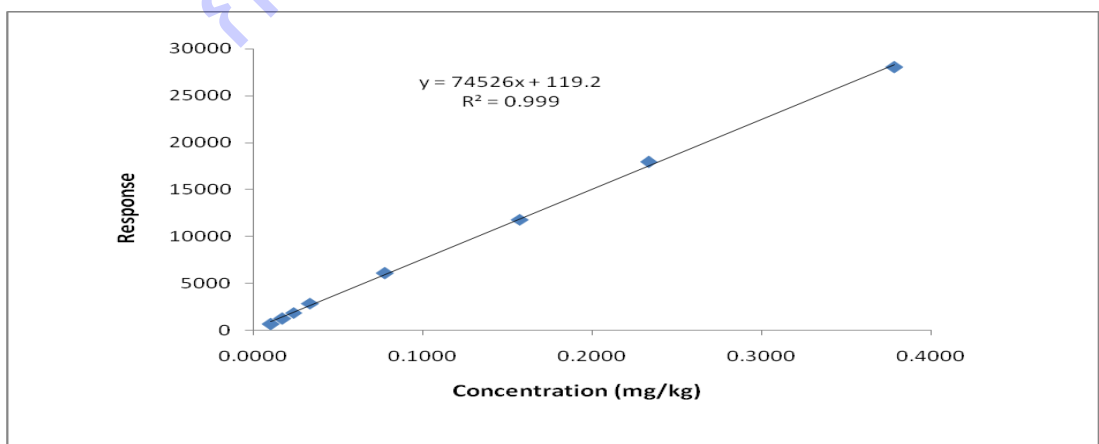
ต้องการวิเคราะห์ MCPA ในตัวอย่างถั่วเหลือง ด้วยวิธี Acidified QuEChERS (A-QuEChERS) ต้องเตรียม standard curve ในสารละลายตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี Acidified QuEChERS (matrix solvent) เท่านั้น

8.3.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงการใช้งานของวิธีวิเคราะห์ (Linearity and Range)

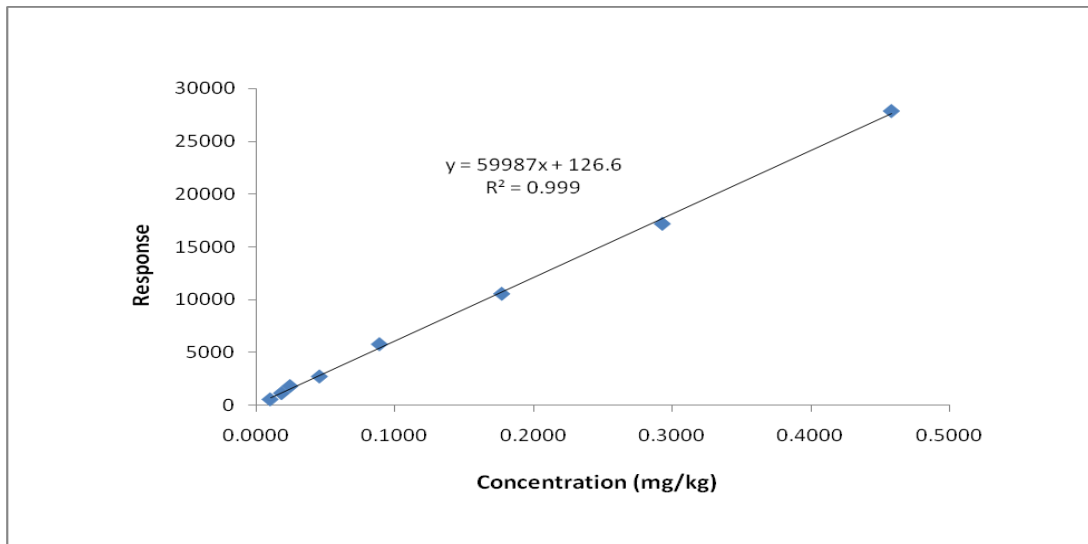
จากการเติมสาร 2,4-D และ MCPA ลงในตัวอย่างลูกเดือย และ ถั่วเหลือง ให้มีความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สกัดตัวอย่างด้วยวิธี Acidified QuEChERS (A-QuEChERS) นำผลทดสอบที่ได้ไปสร้างกราฟ โดยแกน x เป็นความเข้มข้นของสารในตัวอย่าง แกน y เป็นพื้นที่ใต้พีคของสาร พบว่าในช่วงการทดสอบที่ความเข้มข้นสาร 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกราฟมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยมีค่า $R^2 \geq 0.995$ ดังแสดงในภาพที่ 5 ถึงภาพที่ 8



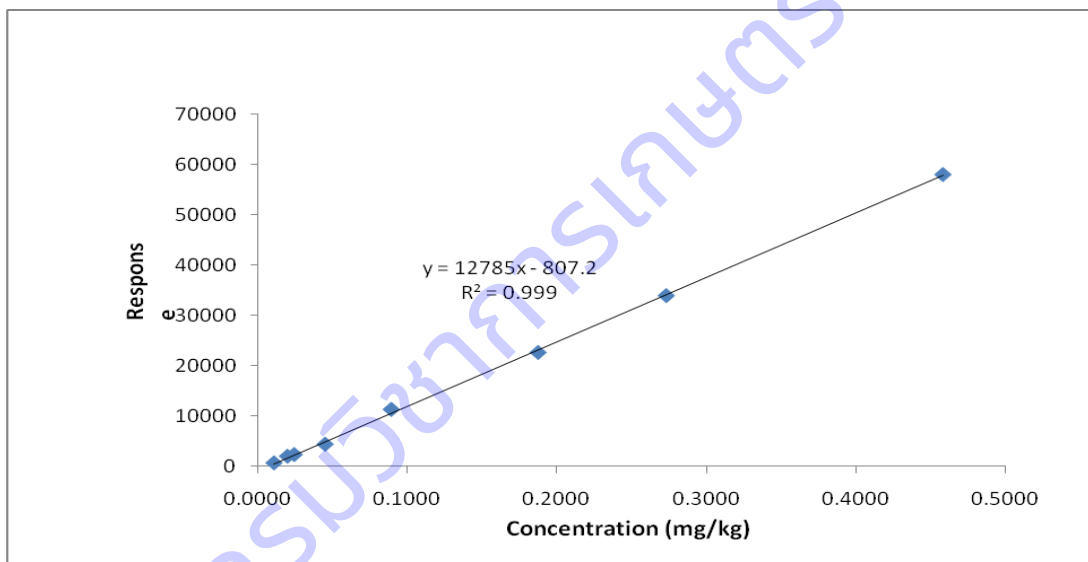
ภาพที่ 5 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของการทดสอบ 2,4-D ในตัวอย่างลูกเดือย



ภาพที่ 6 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของการทดสอบ MCPA ในตัวอย่างลูกเดือย



ภาพที่ 7 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของการทดสอบ 2,4-D ในตัวอย่างแก้วเหลือง



ภาพที่ 8 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของการทดสอบ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย

8.3.3 ความแม่นยำ (Accuracy)

ผลของการ fortified sample blank ตัวอย่างลูกเต๋อย และแก้วเหลือง ด้วย 2,4-D และ MCPA ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ของช่วงการใช้งานคือที่ 0.01, 0.10 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้น ละ 8 ซ้ำ ประเมิน accuracy จากค่า

1) ค่าร้อยละการกลับคืนของสารที่ทดสอบ (%Recovery) ประเมินจากสมการ

$$\%Recovery = \frac{C1}{C2} \times 100$$

C2

เมื่อ C1 คือความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

C2 คือความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง หน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จากการคำนวณ %Recovery ที่ได้จากการสกัด 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลืองพบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับที่ 70-120 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 2-5 โดย %Recovery ของ 2,4-D ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง อยู่ในช่วง 89-119 เปอร์เซ็นต์ และ 81-100 เปอร์เซ็นต์ %Recovery ของ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง อยู่ในช่วง 96-113 และ 84-96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2) ความเที่ยง (Precision) ประเมินความเที่ยงด้วยค่า HORRAT โดยใช้ Horwitz equation

$$\text{Horwitz equation : PRSD} = 0.66 \times 2 \times C^{-0.1505}$$

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{RSD}}{\text{PRSD}}$$

PRSD

เมื่อ RSD คือ ค่า RSD จากผลการทดสอบ

PRSD คือ RSD ที่คำนวณจาก Horwitz equation

C คือ ค่า Concentration ratio

ค่า HORRAT ของ 2,4-D ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง อยู่ในช่วง 0.006-0.019 และ 0.001-0.016 ค่า HORRAT ของ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง อยู่ในช่วง 0.0009-0.0173 และ 0.009-0.0109 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ถึง ตารางที่ 5 ผ่านเกณฑ์การยอมรับคือค่า HORRAT \leq 2 (AOAC)

ตารางที่ 2 แสดง % Recovery ของ MCPA ในตัวอย่างลูกเต๋อย

Sample No.	Fortified concentration (mg/kg)					
	0.010	%Recovery	0.100	%Recovery	0.500	%Recovery
1	0.0109	109	0.0970	97	0.5294	106
2	0.0100	100	0.0988	99	0.5066	101
3	0.0100	100	0.0963	96	0.5027	101
4	0.0113	113	0.0962	96	0.5007	100
5	0.0109	109	0.0981	98	0.4923	98
6	0.0109	109	0.0999	100	0.5064	101
7	0.0107	107	0.0992	99	0.5141	103
8	0.0109	109	0.0984	98	0.4883	98
Average	0.0107	107	0.0980	98	0.5049	101
SD	0.0005		0.0014		0.0128	
RSD	0.043		0.014		0.025	
%RSD	4.33		1.39		2.53	

C	1.1E-08	9.8E-08	5.0E-07
PRSD	20.84	14.98	1.46
HORRAT	0.0021	0.0009	0.0173

ตารางที่ 3 แสดง % Recovery ของ 2,4-D ในตัวอย่างลูกเต๋อย

Sample No.	Fortified concentration (mg/kg)					
	0.0100	%Recovery	0.1000	%Recovery	0.5000	%Recovery
1	0.0100	100	0.0919	92	0.5127	103
2	0.0115	115	0.0923	92	0.4927	99
3	0.0089	89	0.0900	90	0.4868	97
4	0.0119	119	0.0935	94	0.4869	97
5	0.0089	89	0.0963	96	0.4684	94
6	0.0117	117	0.0951	95	0.4870	97
7	0.0119	119	0.0948	95	0.5041	101
8	0.0107	107	0.0915	92	0.4788	96
Average	0.0107	107	0.0932	93	0.4897	98
SD	0.001		0.002		0.014	
RSD	0.120		0.023		0.028	
%RSD	11.99		2.28		2.83	
C	1.1E-08		9.3E-08		4.9E-07	
PRSD	20.90		15.09		1.47	
HORRAT	0.006		0.002		0.019	

ตารางที่ 4 แสดง % Recovery ของ MCPA ในตัวอย่างถั่วเหลือง

Sample No.	Fortified concentration (mg/kg)					
	0.0100	%Recovery	0.1000	%Recovery	0.5000	%Recovery
1	0.0092	92	0.0869	87	0.4555	91
2	0.0084	84	0.0863	86	0.4528	91
3	0.0085	85	0.0861	86	0.4510	90
4	0.0096	96	0.0879	88	0.4435	89
5	0.0092	92	0.0895	90	0.4562	91
6	0.0093	93	0.0888	89	0.4631	93

7	0.0090	90	0.0882	88	0.4398	88
8	0.0093	93	0.0870	87	0.4531	91
Average	0.0091	91	0.0876	88	0.4519	90
SD	0.0004		0.0012		0.0073	
RSD	0.046		0.014		0.016	
C	9.3E-09		8.8E-08		4.5E-07	
PRSD	21.35		15.23		1.49	
HORRAT	0.0021		0.0009		0.0109	

ตารางที่ 5 แสดง % Recovery ของ 2,4-D ในตัวอย่างถั่วเหลือง

Sample No.	Fortified concentration (mg/kg)					
	0.0100	%Recovery	0.1000	%Recovery	0.5000	%Recovery
1	0.0081	81	0.0822	82	0.4452	89
2	0.0094	94	0.0826	83	0.4399	88
3	0.0099	99	0.0805	81	0.4399	88
4	0.0098	98	0.0837	84	0.4232	85
5	0.0100	100	0.0851	85	0.4401	88
6	0.0097	97	0.0848	85	0.4555	91
7	0.0098	98	0.0819	82	0.4326	87
8	0.0087	87	0.0825	83	0.4527	91
Average	0.0094	94	0.0829	83	0.4411	88
SD	0.0007		0.0015		0.0104	
RSD	0.072		0.019		0.024	
C	8.7E-09		8.3E-08		4.4E-07	
PRSD	21.56		15.36		1.49	
HORRAT	0.003		0.001		0.016	

8.3.4 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

จาก fortified sample blank ด้วย 2,4-D และ MCPA ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง ตัวอย่างละ 8 ซ้ำ หาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ จาก LOQ เท่ากับ 10SD จากตารางที่ 2 ถึง ตารางที่ 5 จะได้ค่า LOQ ของ 2,4-D ในตัวอย่างตัวอย่างลูกเต๋อย และถั่วเหลือง ได้เท่ากับ 0.010 และ 0.006 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม LOQ ของ MCPA ในตัวอย่างตัวอย่างลูกเต๋อย

และถั่วเหลือง เท่ากับ 0.004 และ 0.004 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ แต่เมื่อทำการพิสูจน์ accuracy และ precision จึงกำหนดค่า LOQ ของ 2,4-D และ MCPA ในถั่วเหลือง และลูกเดือยมีค่าเท่ากัน คือ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA ในธัญพืชโดยเลือกลูกเดือย และถั่วเหลือง เป็น ธัญพืชตัวแทนด้วยวิธี Acidified QuEChERS : A-QuEChERS (EURL, 2015) มีช่วงการใช้งานที่ 0.01-0.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ มี Accuracy ผ่านเกณฑ์ยอมรับโดยค่า %Recovery อยู่ในช่วง 81-119 เปอร์เซ็นต์ เกณฑ์ยอมรับ 70-120 เปอร์เซ็นต์ มี Precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ โดยค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.0009-0.019 เกณฑ์การยอมรับค่า HORRAT ≤ 2 และ Matrix Effect มีผลกระทบเฉพาะการตรวจวิเคราะห์ MCPA ในตัวอย่างถั่วเหลือง

10. การนำไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัสดุพืชการเกษตร ใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างลูกเดือย และถั่วเหลือง
2. นำวิธีนี้ไป verified method โดยการทดสอบหา accuracy และ precision เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์หา 2,4-D และ MCPA ในตัวอย่างธัญพืชชนิดอื่นๆ
3. นำไป verified method เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์หา acid pesticides ตัวอื่นๆ เช่น bentazon, bromocil, bromoxynil, clopyralid, dalapon, fluroxypyr และ dicamba เป็นต้นในตัวอย่างธัญพืช หรือตัวอย่างพืชอื่นๆ

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมมลพิษ.2553. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการของสารเคมีเฉพาะเรื่อง 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซีติก แอซิด (2,4-ดี) 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) สำนักจัดการกากของเสียและสารอันตราย กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

คณะทรัพยากรธรรมชาติ. วัชพืชและการจัดการ (weeds and weed control) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Pdf. 1-45 <http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/weed/pdf/part3.pdf> (21 กุมภาพันธ์ 2564)

EURL.2015. Analysis of Acidic Pesticides using QuEChERS (EN15662) and acidified QuEChERS method

EN 15662. 2008. Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method

FAO. 1996. Pesticid Residues in Food – 1996. Report Sponsored Jointly by FAO and WHO. (FAO Plant Production and Protection Paper – 140)

FAO.2005.MCPA toxicology.

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report12/MCPA.pdf

NATA.2018 General Accreditation Guidance – Validation and verification of quantitative and qualitative test method.

Pihlstrom,T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U. and Osterdahl, B.G.2007. Analysis of Pesticide Residues in fruit and vetable with ethyl acetate extraction using gas and liquid Chromatography with tandem mass spectrometric detection. And Bioanal Chem. 389,1733-1789.

SANCO.2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedure for pesticide residue analysis in feed. European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.

Steven D. Wright. Weed control in small grains. University of California. Pdf. page88-92

<http://ucanr.edu/repository/a/?a=161654> (21 กุมภาพันธ์ 2564)