



## การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 53 ชนิด อย่างรวดเร็ว

### ด้วยวิธี QuEChERS โดยใช้ GC/MS-PTV Inlet

#### Rapid determination of 53 pesticides by QuEChERS method with GC/MS-PTV Inlet

ประชาติปต์ย์ พงษ์ภิญโญ     ปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร

สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### บทคัดย่อ

สารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้นเนื่องจากมีการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรอย่างแพร่หลายในวงการเกษตรกรรม การค้าระหว่างประเทศ รวมไปถึงด้านความปลอดภัยอาหาร ดังนั้นจึงต้องมีตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์การเกษตร ในการวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาวัตถุที่มีพิษการเกษตรจำนวน 53 ชนิด โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีหัวตรวจวัดชนิดแมสสเปคโตรมิเตอร์ ตรวจวิเคราะห์ภายหลังจากสกัดด้วยวิธี QuEChERS โดยใช้ตัวอย่างมะม่วงเป็นตัวแทนของผลไม้ LOD และ LOQ ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างนี้มีค่าเท่ากับ 0.002 และ 0.02 mg/kg ตามลำดับ Recovery ของวิธีทดสอบจะอยู่ในช่วง 74-126% และวิธีทดสอบนี้ให้ค่า RSD น้อยกว่า 20%

### บทนำ

ในปี พ.ศ. 2547 รัฐบาลได้ประกาศให้เป็นปีอาหารปลอดภัย (Food Safety) กรมวิชาการเกษตรได้กำหนดให้มีนโยบายควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ส่งไปขายยังต่างประเทศ จึงได้มอบหมายให้กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรในผลิตภัณฑ์ที่เป็นสินค้าส่งออก เพื่อออกไปรับรองคุณภาพของสินค้าเกษตร โดยในปัจจุบันวัตถุอันตรายทางการเกษตรแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณมากขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงความเป็นพิษของวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีต่อสิ่งแวดล้อม และโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อผู้บริโภคผ่านทางอาหารและน้ำ ทำให้องค์การอนามัยโลกต้องกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (Maximum residue limit; MRLs) โดยอ้างอิงพื้นฐานมาจากพฤติกรรมปริมาณการบริโภคที่ได้มาจากปริมาณการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรในแปลงของเกษตรกร ปริมาณสารพิษตกค้างในน้ำดื่มและในอาหารที่บริโภค

เพื่อเป็นการลดปัญหาการตรวจพบสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์การเกษตรเกินค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบในประเทศปลายทาง โดยปกติสารพิษมีระดับความเข้มข้นมากจนถึงระดับความเข้มข้นปานกลาง เมื่อทำการสกัดแล้วจะสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้โดยเครื่อง Gas Chromatograph Mass Spectrometer



(GC/MS) ที่มีหัวตรวจวัดชนิด Single Quadrupole (SQ) หรือ Triple Quadrupole Mass Spectrometer (QQQ) ตามวิธีมาตรฐานของ DIN Norm 12393 parts 1-3 ที่ดัดแปลงมาจาก German Norm DFG S19 หรือตามวิธีของ Luke และวิธีล่าสุดคือวิธีที่ดัดแปลงจาก QuEChERS (ย่อมาจาก "Quick, Easy, Rugged และ Safe") ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในปัจจุบันได้นำเครื่อง (GC/MS) มาใช้มากขึ้นเพื่อช่วยในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจำนวนมากในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

การศึกษานี้เพื่อที่จะทดสอบการใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยใช้ GC/SQ-MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างแบบ multiresidue จำนวน 53 ชนิด

## วิธีดำเนินการ

### 1. สารเคมี

- 1.1 สารมาตรฐานวัตถุที่มีพิษการเกษตร: Dr.Ehrenstorfer
- 1.2 Magnesium sulfate anhydrous
- 1.3 Sodium chloride
- 1.4 Sodium citrate dihydrate
- 1.5 Di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate
- 1.6 Ultra-residue reagent toluene
- 1.7 Ultra-residue reagent ethyl acetate

Single standard stock solution จะเตรียมโดยละลายมาตรฐานวัตถุที่มีพิษปริมาณ 10 mg ใน 10 ml toluene GC/MS multicomponent standard stock solution จะเตรียมโดยละลาย 1 mg ของสารมาตรฐานแต่ละตัวใน 100 ml ethyl acetate และเจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 0.02 ug/ml, 0.05 ug/ml, 0.07 ug/ml และ 0.1 ug/ml Matrix-matched multicomponent standards จะเตรียมโดยนำ multicomponent standard solution ความเข้มข้น 10 ug/ml ปริมาณ 10 ml มาเป่าด้วยไนโตรเจนอย่างช้าๆ จนเกือบแห้ง แล้วนำมาละลายด้วย blank extract ของมะม่วง จนได้ปริมาตร 10 ml แล้วนำมาเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้นสำหรับใช้งาน สารละลายมาตรฐานทั้ง single และ multicomponent จะเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 C และห่างจากแสง

ในการศึกษานี้ เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยสกัดด้วยวิธี QuEChERS และตรวจด้วย GC/MS พบว่าตรวจไม่พบสารพิษตกค้างใน Blank samples ที่นำมาใช้ในการทดลองทั้งในส่วนของการทดลอง การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี และในการทำ matrix-matched standards



## 2. การเตรียมตัวอย่าง

- 2.1 Homogenise ตัวอย่างมะม่วงปริมาณ 500 g
- 2.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g ที่ homogenise แล้วลงใน 50 ml Teflon centrifuge tube.
- 2.3 เติม 10 ml acetonitrile (ACN) แล้วเขย่าโดยใช้ vortex mixer เป็นระยะเวลา 1 นาที
- 2.4 เติม 4 g magnesium sulfate anhydrous ( $MgSO_4$ ) 1 g sodium chloride (NaCl) 1 g sodium citrate dihydrate ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) และ 0.5 g di-sodium hydrogen citrate esequihydrate ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ ) แล้วนำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที
- 2.5 ตัวอย่างที่มีความเป็นกรดจะเติมสารละลาย 6 N NaOH 600 ul เพื่อให้ได้ค่า pH อยู่ในช่วง 5-5.5
- 2.6 Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 2.7 Aliquot สารละลายส่วนใสปริมาตร 6 ml ใส่ใน 15 ml Teflon centrifuge tube ที่มี 150 mg PSA และ 950 mg  $MgSO_4$
- 2.8 Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ ที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 2.9 ถ่ายสารละลายที่สกัดได้ใส่ใน autosampler vial ที่มีสารละลาย 5% formic acid 15 ul (เพื่อกันสารละลายที่สกัดได้เกิดการสลายตัว)

## 3. การตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจะใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ คือ Hewlette-Packard (Agilent Technologies) GC/Ms model 6890N Series gas chromatograph ต่อกับ 5973N mass selective detectors. ใช้คอลัมน์ชนิด HP 5MS (30 m x 0.25 mm i.d.) (Agilent Technologies, USA) fused silica capillary column ที่มีขนาดความหนาของฟิล์ม 0.25 um และใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas ที่ constant pressure และทำการปรับความดันทุกวันโดยใช้โปรแกรม RT-Lock (Haloxypop-ethyl RT relocked ที่เวลา 15.40 นาที)



Inlet	EPC PTV		
Mode	Solvent vent	Oven	
Temp ramp	C/min next°C	Oven ramp	C/min
Cryo	On		
Cryo use temp	100°C	Total runtime	26 min
Cryo timeout	10.00 min (On)	Equilibration time	0.5 min
Cryo fault	On	Oven max	325°C
Pressure	11.77 psi (On)	Front Injector	
Vent time	0.60 min	Injection volume	5 microliters
Vent flow	100.0 mL/min	Syringe size	10 microliters
Vent pressure	0.0 psi	MSD	
Purge flow	50.0 mL/min	Low mass	50 amu
Purge time	2.50 min	High mass	500 amu
Total flow	53.9 mL/min	Quad temp	180°C
Gas saver	Off	Source temp	300°C
Gas type	Helium	Transfer line temp	280°C
PTV Liner	Agilent multi-baffle liner no packing		

การระบุชนิดของสารพิษตกค้างจะเป็นไปตามคำแนะนำของ European SANCO นั่นคือ ในกรณีของ Single Quadrupole จะใช้ 1 target ion และ 2 qualifier ions สำหรับสารพิษทั่วไปและ 1 target ion และ 3 qualifier ions สำหรับสารพิษที่มีการประกาศยกเลิกการใช้

#### 4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation Study)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกสารพิษ 53 ชนิด มาศึกษา โดยพิจารณาจากชนิดของวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีการขึ้นทะเบียนในประเทศไทย ตามคุณสมบัติทาง chromatographic และตามวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวิธี QuEChERS โดยเลือกให้มะม่วงเป็นตัวแทนของผลไม้

LOD และ LOQ ของวิธีทดสอบจะทำโดยการทำ full scan สำหรับ target ion และ parent ion ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่เห็นพืดจะต้องมีค่า S/N ratio มากกว่า 3 และ 10 ตามลำดับ การตรวจสอบค่า Accuracy และ Precision จะพิจารณาจากค่า recovery ของการทดสอบที่มีการทำซ้ำ 10 ซ้ำ ตัวอย่างที่มีการ spike จะทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที ก่อนเริ่มการสกัดเพื่อให้วัตถุอันตรายทางการเกษตรแทรกตัวเข้าไปอยู่ในเนื้อมะม่วง



## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. Linearity ของสารมาตรฐาน Matrix-matched standard solution

จากผลการทดลองสารพิษตกค้าง จำนวน 53 ชนิด ได้แสดงคุณสมบัติความเป็นเส้นใน SIM mode ในช่วงของความเข้มข้น 0.02 - 0.1 ug/ml โดยสารพิษตกค้างทุกตัวมีค่า correlation coefficient  $R^2$  มากกว่า 0.99 และพบว่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นจะยังคงเป็นเส้นตรงอยู่แม้ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานมีค่าเพิ่มขึ้น และค่ากำลังของการยืนยันมาค่ามากยิ่งขึ้น (order of magnitude,  $MS^3$ )

### 2. LOD และ LOQ

จากผลการทดลอง ค่า LOD และ LOQ ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มีค่าเท่ากับ 0.002 mg/kg และ 0.02 mg/kg ค่า LOD และ LOQ จากวิธีการวิเคราะห์นี้มีเหมาะสมเนื่องจากเป็นไปตามข้อกำหนดของการทำ organic farming foodstuff ที่กำหนด threshold ไว้ที่ 10 ug/kg

### 3. Recovery

ในตารางที่ 1 จะแสดง recovery และ repeatability ของการทดสอบ fortification ที่ระดับความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.07 และ 0.1 mg/kg จากตารางพบว่า recovery อยู่ในช่วง 74-126 % โดยมีค่าเกินกว่าค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ใน SANCO guideline ที่กำหนดไว้ในช่วง 70-110 % ซึ่งสารพิษที่มีค่าเกินที่กำหนดไว้มีไม่ถึง 1 % ของสารพิษทั้งหมดที่ทำการทดสอบ เมื่อพิจารณาค่า %RSD ของผลการวิเคราะห์ทั้งหมด พบว่าเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ของการหา precision ของวิธีการวิเคราะห์โดยมีค่า %RSD ต่ำกว่า 30 และ predicted Horwitz RSD ที่น้อยกว่า 2

การตรวจสอบ Precision ของวิธีทดสอบ โดยทำ Fortified Sample ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.02, 0.05, 0.10, 0.50 และ 1.00 มก./กก. ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ แล้วนำมาประเมิน Precision โดยใช้ค่า %RSD หรือ HORRAT (Horwitz's ratio)

ผลการทดสอบ Precision ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.07 และ 0.10 mg/kg ตามลำดับ





ตารางที่ 1. แสดงค่า %RSD และ HORRAT ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมท ที่ระดับ 0.10 มก./กก. ในมะม่วง

Compounds/Recovery	Fortified (mg/kg)	Average Recovery	%RSD
Carbaryl	0.1	115	14
Methiocarb	0.1	119	8
Propoxur	0.1	100	12
Ethoprophos	0.1	124	12
Cadusafos	0.1	116	10
Promecarb	0.1	66	26
Cabofuran	0.1	126	9
Quintozene	0.1	101	12
Pirimicarb	0.1	107	34
Propanil	0.1	115	24
Acetochlor	0.1	98	16
Tolclofos-methyl	0.1	100	11
Alachlor	0.1	126	19
Metalaxyl	0.1	107	12
Fenitrothion	0.1	86	8
Pirimiphos-methyl	0.1	97	10
Thiobencarb	0.1	129	20
Malathion	0.1	100	13
Fenthion	0.1	101	9
Parathion	0.1	92	11
Triadimefon	0.1	96	11
Tetraconazole	0.1	101	12
Isoxaflutole	0.1	96	7
Fipronil	0.1	100	11
Quinalphos	0.1	72	24
Phenthoate	0.1	94	10
Folpet	0.1	123	23



ตารางที่ 1. (ต่อ)แสดงค่า %RSD และ HORRAT ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างกลุ่มคาร์บาเมท ที่ระดับ 0.10 มก./กก. ในมะม่วง

Compounds/Recovery	Fortified (mg/kg)	Average Recovery	%RSD
Procymidone	0.1	111	10
Methidathion	0.1	59	23
Haloxypop-ethyl	0.1	100	12
Flumetralin	0.1	76	9
Prothiofos	0.1	120	34
Oxadiazon	0.1	111	18
Flusilazole	0.1	93	13
Iprovalicarb	0.1	103	30
Triazophos	0.1	69	13
Propiconazole	0.1	106	14
Tebuconazole	0.1	100	13
Epoxiconazole	0.1	99	13
Spiromesifen	0.1	76	11
Bifenthrin	0.1	95	9
Methoxychlor	0.1	90	13
Fenpropathrin	0.1	96	18
Tebufenpyrad	0.1	92	12
Fenazaquin	0.1	90	12
Tetradifon	0.1	97	7
Cyhalofop-butyl	0.1	106	8
Acrinathrin	0.1	98	16
Permethrin	0.1	107	12
Pyridaben	0.1	82	27
Quizalofop-ethyl	0.1	101	12
Etofenprox	0.1	100	11
Difenoconazole	0.1	101	10
Indoxacarb	0.1	107	20

จากตารางที่ 1. สรุปผลการทดสอบ Precision ของวิธีทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.07 และ 0.10 mg/kg ได้ HORRAT < 2 จึงสามารถสรุปได้ว่า precision ของวิธีทดสอบนี้ที่ระดับความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.07 และ 0.10 mg/kg อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน



## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง QuEChERS เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ที่เป็น apolar, middle polar และ polar ได้มากถึง 53 ชนิดใน reference matrices นั้นๆ

ผลการทดลองของ recovery, repeatability และ accuracy ของวิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของสารพิษตกค้างทั้ง 53 ชนิด โดยผล recovery นั้นอยู่ในช่วง 74-126% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน และมีสารพิษตกค้างบางตัว (<1%) ที่ให้ผล recovery มากกว่า 110% นอกจากนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้มีผลของ repeatability ซึ่งแสดงโดยค่า RSD น้อยกว่า 30% ตามข้อกำหนดของ European SANCO Guideline (Commission of the European Communities, 2006)

สามารถสรุปได้ว่า การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS สามารถนำมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการสกัดสารพิษตกค้าง ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS โดยเป็นวิธีที่รวดเร็วและให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

## เอกสารอ้างอิง

- Anastassiades, M., & Lehotay, S. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive SPE" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431
- Commission of the European Communities. (2002). Directive 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Directorate General Health and Consumer Protection, Brussels, Belgium.
- Commission of the European Communities. (2006). Directive SANCO/10232/2006 on the quality control procedures for the pesticide residues analysis. Directorate General Health and Consumer Protection, Brussels, Belgium.
- Stan, H.-J. (2000). Pesticide residue analysis in foodstuff applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multimethod S19 and automated data evaluation. *Journal of Chromatography A*, 892, 347-377