รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2555

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล

กิจกรรม : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

กิจกรรมย่อย : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) : การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Chlormquat และ Mepiquat ในผลไม้โดยใช้ Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Development of Method for Analysis Chlormequat and Mepiquat in Fruit by Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นายวิษณุ แจ้งใบ	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.
ผู้ร่วมงาน	: นางสมสมัย ปาลกูล	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.
	: นายประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.
	: นางสาวปฏิมาภรณ์ สังข์น้อย	กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร สปผ.

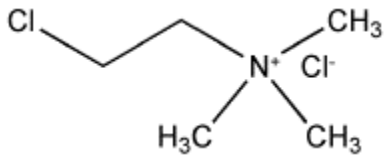
5. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด Chlormequat chloride และ Mepiquat chloride ซึ่งเป็นสารสำหรับชะลอการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry ต่อกับคอลัมน์ชนิด Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) และใช้สารละลาย Ammonium formate buffer เข้มข้น 50 mM pH 3.75 กับสารละลาย Acetonitrile เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ จากการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดในตัวอย่างมะม่วงที่พัฒนามาจากวิธี QuPPe-Method (Anastassiades et al., 2011) โดยเปรียบเทียบสารละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันในการสกัดพบว่าสารละลาย 1% Formic acid ใน Acetonitrile ให้ผลร้อยละการกลับคืน (%Recovery, n=3) ของ Chlormequat และ Mepiquat เท่ากับ 104 และ 98 โดยมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 6.66 และ 3.52 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าสารละลายชนิดอื่นที่ใช้ในการสกัด และเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาได้กับวิธี QuREChERs (Anastassiades, et al., 2003) ด้วยวิธีทางสถิติ t-test ให้ผลการทดสอบของทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดสอบผลของ Matrix effect

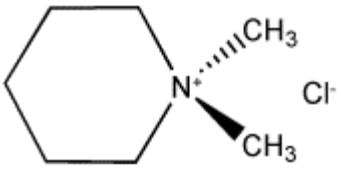
พบว่าในกรณีที่ใช้ Internal standard (ISTD) ผลของ Matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพของวัตถุมีพิษทั้ง 2 ชนิด แต่ในกรณีที่ใช้ External standard (ESTD) ผลของ Matrix ไม่มีผลต่อ Mepiquat แต่มีผลต่อ Chlormequat เพื่อป้องกันผลที่เกิดจาก Matrix effect จึงต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานใน Matrix ในกรณีที่ใช้ ESTD ดังนั้นเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีในการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ในขั้นตอนต่อไปจะดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation) ให้มีความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

6. คำนำ

สารชะลอการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth regulators) มีคุณสมบัติหลักในการชะลอการแบ่งเซลล์และการยืดตัวของเซลล์บริเวณใต้ปลายยอดของกิ่งพืช ทำให้พืชได้รับสารมีความสูงน้อยกว่าปกตินั่นคือสารกลุ่มนี้จะไปยับยั้งการสร้างหรือการทำงานของฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน ควบคุมความสูงและขนาดทรงพุ่มของพืชเช่นในไม้ดอกไม้ประดับควบคุมความสูงให้มีขนาดกะทัดรัดเหมาะแก่การปลูกในกระถางหรือลดความสูงของต้นทำให้ปล้องสั้นลงในพืชไร่ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการติดผลและคุณภาพผล เพิ่มการออกดอก สารในกลุ่มนี้ได้แก่ คลอมีควอท (Cholormequat), ดามิโนไซด์ (Daminozide), แอนไซมิโดล (Ancymidol), เมพิควอทคลอไรด์ (Mepiquat chloride) และพาโคลบิวทราโซล (Paclobutrazol) (แหล่งที่มา : http://www.thaikasetsart.com) ข้อมูลพื้นฐานความเป็นพิษจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ระบุความเป็นพิษของ Chlormequat และ Mepiquat จัดอยู่ในกลุ่มอันตรายเล็กน้อย มีค่า LD_{50} ในหนูเท่ากับ 670 และ 1490 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (WHO, 2009) ในสหภาพยุโรปได้กำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (MRL) ชนิด Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (MRL EU, 2013) สำหรับประเทศญี่ปุ่นกำหนดค่า MRL ของ Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงเท่ากับ 0.05 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (MRL Japan, 2012) สำหรับประเทศไทยและ Codex ไม่มีการกำหนดค่า MRL สำหรับสูตรโครงสร้างทางเคมีของวัตถุมีพิษทั้งสองชนิดแสดงดังรูปที่ 1 และ 2



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Chlormequat chloride



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Mepiquat chloride

จากการทบทวนวรรณกรรมของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat โดยส่วนใหญ่จะใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography ต่อกับตัวตรวจวัดชนิด Mass spectrometry โดยมีผู้ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อธิบายไว้ดังนี้

Esparza และคณะ (X. Esparza et al.,2009) ได้ตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และใช้คอลัมน์ชนิด Atlantis HILIC ขนาด 150 mm × 2.1 mm 3 µm โดยใช้หลักการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ gradient อัตราส่วนระหว่าง Acetonitrile กับ Ammonium formate buffer pH 3.75 การไหล 0.4 µl/min ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่า 4 นาทีต่อตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างผักผลไม้ น้ำผลไม้ อาหารเด็ก กาแฟ เบียร์ เป็นต้น โดยในขั้นตอนการสกัดใช้ SPE C18 ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด

Oscar และคณะ (N. Oscar et al.,2004) ทำการตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Quaternary ammonium จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Paraquat Diquat Difenzoquat Chlormequat และMepiquat ด้วยเทคนิค LC-MS/MS 2 แบบได้แก่ Triple quadrupole และ Time of fight (TOF) ใช้คอลัมน์ Kromasil ขนาด 200 mm × 21 mm 5 µm และใช้การชะสารออกจากคอลัมน์แบบ gradient โดยใช้ Mobile phase ระหว่าง 20 mM HFBA ใน 100 mM Formic acid /Ammonium formate buffer (pH 3.3) กับ Acetonitrile ตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างน้ำดื่ม โดยใช้วิธีการสกัดเป็นแบบ On-line SPE preconcentration

Anastassiades และคณะ (M. Anastassiades et al.,2011) พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่มีสภาพความขั้วเป็นขั้วสูง ได้แก่ Paraquat Diquat Chlormequat Mepiquat Daminozide Cyromazine ETU PTU Trimesium เป็นต้น ซึ่งตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS และใช้คอลัมน์ชนิด Obelisc R 2.1 mm×150 mm 5 µm 100A และใช้ Ammonium formate buffer กับ acetonitrile เป็น mobile phase เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ สำหรับวิธีการสกัดตัวอย่างใช้ 1% Formic acid ใน Methanol ในการสกัด และไม่มีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ในผลไม้ โดยใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS และใช้คอลัมน์ชนิด Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) เพื่อให้มีความว่องไวสูงและเฉพาะเจาะจงมากขึ้นรวมถึงการหาวิธีการเตรียมตัวอย่างมีความสะดวกรวดเร็ว ประหยัดและให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารมาตรฐานวัตถุมีพิษได้แก่ Chlormequat chloride Mepiquat chloride Chlormequat chloride 1,1,2,2-D4 ความบริสุทธิ์ 98-99% และสารละลายมาตรฐาน Mepiquat iodide D3 (methyl D3) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารเคมีได้แก่ Acetonitrile (HPLC grade) Methanol (HPLC grade) Formic acid Ammonium formate Water (HPLC grade)
3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่ง, Centrifuge, Food processor, Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร, Micro pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร
4. เครื่องแก้วต่างๆในห้องปฏิบัติการเช่น volumetric flask บีคเกอร์ กระบอกตวง Centrifuge tube (Teflon) ขนาด 50 มิลลิลิตร
5. เครื่องมือตรวจวัดวัตถุมีพิษชนิด Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ต่อกับเครื่อง Tandem mass spectrometry
6. ตัวอย่างผลไม้ที่นำมาทดลองได้แก่ มะม่วง

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารและวางแผนการทดลอง

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน Chlormequat chloride Mepiquat chloride Chlormequat chloride 1,1,2,2-D4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1,000 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetonitrile ส่วนสารละลายมาตรฐาน Mepiquat iodide D3 (methyl D3) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารมาตรฐานที่เตรียมแล้วมา Mixed standard และเตรียมกราฟมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.005-0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การตั้งสภาวะเครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

- คอลัมน์ชนิด HILIC ความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.10 มิลลิเมตร ขนาดของอนุภาคภายใน 2.6 ไมครอน
- การชะสารออกจากคอลัมน์เป็นแบบ gradient โดยที่สาร A เป็น Ammonium acetate buffer เข้มข้น 50 mM pH 3.75 ส่วนสาร B เป็น Acetonitrile อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

เวลา (นาที)	อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	สารละลาย A (เปอร์เซ็นต์)	สารละลาย B (เปอร์เซ็นต์)
0.5	0.4	20	80
1	0.4	40	60
3	0.4	60	40
5	0.4	60	40
6	0.4	20	80
8	0.4	20	80

- ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 2 ไมโครลิตร
- อุณหภูมิของคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส

4. การตั้งสภาวะเครื่อง Tandem mass spectrometry

Source parameter

- Gas Temp 325°C
- Gas Flow 10 (l/min)
- Nebulizer 45 psi
- Capillary 4000 V

ตารางที่ 2 แสดง Parameter ต่างๆ ของ Mass spectrometry ที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด

Compound	Precursor	Product ion 1	Product ion 2	Dwell time	Fragmentor	Collision
Chlormequat Chloride	122.1	63.1	59.2	100	100	5
Chlormequat-D4(ISTD)	126.1	59.3	58.1	100	100	5
Mepiquat Chloride	114.2	98.1	58.1	100	135	10
Mepiquat-D3(ISTD)	117.2	101.03	98.3	100	100	10

5. การหาความเข้มข้นของ Ammonium formate buffer ที่เหมาะสม

เตรียมสารละลาย Ammonium formate buffer ที่ความเข้มข้น 5, 10 ,20 และ50 mM และปรับ pH 3.75 ด้วย Formic acid ใช้สารละลาย buffer เป็น Mobile phase คู่กับสารละลาย Acetonitrile ในการชะสารออกจากคอลัมน์ เปรียบเทียบผลของพื้นที่ใต้พีค ความสูงของพีค และค่า Retention time (RT) ของวัตถุมีพิษแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นของ buffer ที่แตกต่างกัน

6. ขั้นตอนการสกัด

6.1 ขั้นตอนการสกัดพัฒนาจากวิธี Quppe-Method (Anastassiades,M. 2011) โดย เปรียบเทียบผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายชนิดต่างๆที่ใช้ในการสกัด

จำนวน 3 ชนิด ดังนี้

1. 1% Formic acid ในน้ำ
2. 1% Formic acid ใน Methanol
3. 1% Formic acid ใน Acetonitrile

ชั่งตัวอย่างมะม่วง 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard (Chlormequat และ Mepiquat) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นเติมสารละลายที่ใช้ในการสกัด (ทดสอบสารละลายแต่ละชนิดๆละ 3 ซ้ำ) จำนวน 10 มิลลิลิตร และเติม Mixed Internal Standard (Chlormequat-D4 และ Mepiquat-D3) เข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm จากนั้นเทสารละลายใสกรองผ่านกระดาษกรองงขนาด 0.22 ไมครอน ลงในขวดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

6.2 เปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาจากวิธี QuPPe-Method กับวิธี QuREChERs

ทำการเปรียบเทียบผลของวิธีการทดสอบประสิทธิภาพที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 กับวิธี QuREChERs (Anastassiades, et al., 2003) โดยขั้นตอนการสกัดด้วยวิธี QuREChERs ทำโดยชั่งตัวอย่างมะม่วง 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเติม Mixed ISTD ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม Acetonitrile 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ $MgSO_4$ 4 กรัม NaCl 1 กรัม Na_3Citrate dehydrate 1 กรัม และ Na_2HCitrate sesquihydrate 0.5 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 5 มิลลิลิตร

ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารผสมระหว่าง PSA 125 มิลลิกรัม กับMgSO4 750 มิลลิกรัม นำไป vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในขวดเติม 5% Formic acid ใน Acetonitrile ปิดฝาแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7. **การเปรียบเทียบการใช้ Internal standard กับ External standard**

เติมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำ และเติม ISTD ที่ความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสกัดสารตัวอย่างด้วย 1% Formic acid ใน Acetonitrile และเตรียมสารละลายมาตรฐานใน Acetonitrile เพื่อใช้เป็น Calibration curve ตรวจวิเคราะห์หา %Recovery และนำผลของ %Recovery มาเปรียบเทียบระหว่างการคำนวณโดยใช้วิธี ISTD และ ESTD

8. **การทดสอบ Matrix effect**

ทำการทดสอบและเปรียบเทียบระหว่าง Matrix match calibration curve กับ Standard calibration curve ของสาร Chlormequat chloride และ Mepiquat chloride โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ชุด โดยที่ชุดแรกเตรียมใน Acetonitrile ส่วนชุดที่สองเตรียมในสารละลาย Matrix ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีที่เหมาะสม และเติม ISTD ลงในสารละลายมาตรฐานทั้งสองชุด ตรวจวิเคราะห์สารทั้งสองชุดด้วยเครื่อง LC-MS/MS นำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ประเมินผลของ Matrix จากความชันของกราฟทั้งสอง โดยค่าผลต่างของความชันต้องมีค่าความแตกต่างไม่เกิน 10% จากนั้นพิจารณาผลของ Matrix ในกรณีที่ใช้ ESTD พิจารณาจากค่าความชันจากการเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้น และใช้หลักการประเมินเช่นเดียวกับการใช้ ISTD

ระยะเวลา

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2555

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของความเข้มข้น Ammonium formate buffer

สารละลาย Ammonium formate buufer ใช้เป็นตัวชะสารออกจากคอลัมน์ร่วมกับสารละลาย Acetonitrile เพื่อให้วิธีมีค่าความว่องไวสูง (Sensitivity) จึงต้องมีการหาความเข้มข้นของ buffer ที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของ buffer ที่ความเข้มข้นในช่วง 5-50 mM ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ Ammonium formate buffer

Ammonium formate buffer	Chlormequat			Mepiquat		
	RT (min)	Peak Hight	Peak Area	RT (min)	Peak Hight	Peak Area
5 mM	2.309	622	3607	3.027	334	2856
10 mM	2.288	635	3576	2.976	340	2869
20 mM	2.018	736	3401	2.618	466	2764
50 mM	1.886	775	3684	2.402	511	2720

จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ Buffer เพิ่มขึ้นความแรงของ ionic strange ก็สูงขึ้นมีผลทำให้ทำให้พื้นที่ใต้พีค ความสูงของพีคเพิ่มขึ้นตามลำดับ และสารจะถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว แต่ข้อจำกัดของการใช้ buffer คือเมื่อความเข้มข้นของ buffer เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้เกิดเกลือของ buffer ซึ่งจะทำให้ความดันของคอลัมน์สูงขึ้น และอาจเกิดการอุดตันได้ง่าย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ Ammonium formate buffer ที่ความเข้มข้น 50 mM

ผลของสารละลายชนิดต่างๆที่ใช้ในการสกัด

จากการพัฒนาวิธี QuPPe-method โดยวิธีนี้ใช้สารละลาย 1% Formic acid ใน Methanol เป็นตัวสกัดและไม่มีการกำจัดสารปนเปื้อน ดังนั้นจึงมีการเปรียบเทียบสารละลายจำนวน 3 ชนิด ที่มีสภาพขั้วที่แตกต่างกันในการสกัดตัวอย่างมะม่วง ได้แก่ น้ำ Methanol และ Acetonitrile โดยที่สารละลายแต่ละชนิดจะถูกเตรียมใน Formic acid เข้มข้น 1% ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดแสดงดังตารางที่ 4 จากตารางพบว่าสารละลายที่ใช้ในการสกัดแต่ละชนิดให้ผลของ %Recover อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (80-110%) (AOAC,1993) แต่สารละลายแต่ละชนิดมีค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ที่แตกต่างกันโดยที่สารละลาย 1%Formic acid ใน Acetonitrile มีค่า %RSD น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายอีกสองชนิด สำหรับปัญหาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้สารละลาย 1% Formic acid ในน้ำและ Methanol เป็นตัวสกัดในขั้นตอนของการกรองตัวอย่างจะกรองได้ยากเพราะสารละลายที่ได้จะขุ่น และมีตะกอนแขวนลอยซึ่งจะแตกต่างจากสารละลายตัวอย่างที่ใช้ 1 % Formic acid ใน Acetonitrile เป็นตัวสกัดซึ่งสารละลายตัวอย่างที่ได้จะใส กรองได้ง่าย และผลจากการ

เพิ่มความเข้มข้นของกรด formic เป็น 5% ในสารละลายที่ใช้สกัด ให้ผล % Recovery ที่ไม่แตกต่างจากการใช้กรด 1% ดังนั้นความเข้มข้น 1% ของกรดเพียงพอสำหรับในการสลายพันธะ (Bond Breaking) ของสารที่ตรวจวิเคราะห์ที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ถูกสกัดออกมาอยู่ในสารละลายที่ใช้สกัด ดังนั้นจึงเลือกใช้ 1 % Formic acid ใน Acetonitrile เป็นสารละลายในการสกัดสารละลายตัวอย่าง

ตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบร้อยละการกลับคืนของการใช้สารละลายในการสกัดตัวอย่างที่แตกต่างกัน

Extract solvent	Spike (mg/kg)	Chlormequat Chloride %Rec (n=3)	%RSD	Mepiquat Chloride %Rec (n=3)	%RSD
1% Formic acid in Water	0.05	101	7.37	93	10.12
1% Formic acid in Methanol	0.05	110	8.50	99	7.30
1% Formic acid in Acetonitrile	0.05	104	6.66	98	3.52

ผลของการเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาจาก วิธี Quppe-Method กับวิธี **QuREChERs**

วิธีที่พัฒนามาจาก QuPPe-Method มีลักษณะคล้ายกับวิธี QuREChERs แต่จะแตกต่างกันที่วิธี QuPPe-Method จะเตรียม Acetonitrile ในกรด แต่วิธี QuREChERs จะใช้สารละลาย Acetonitrile ในการสกัดและใช้เกลือของ Buffer ในขั้นตอนการสกัด และมีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนด้วย PSA และ Graphitized Carbon (GCB) ผลจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดทั้งสองวิธีแสดงผลดังตารางที่ 5 เมื่อนำข้อมูลของ %Recovery มาประเมินความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยที่ n=5 พบว่า Chlormequat และ Mepiquat มีค่า t_{cal} เท่ากับ 2.31 และ 2.29 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า $t_{critical}$ จากตาราง (t table - critical values) มีค่าเท่ากับ 2.571 จะเห็นได้ว่าค่า t_{cal} ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า $t_{critical}$ ดังนั้นวิธีการสกัดทั้งสองวิธีให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบผลของ % Recovery ที่ได้จากการสกัดด้วย 1% Formic acid ใน Acetonotrile กับวิธี QuREChERs

No.	Chlormequat		Mepiquat	
	1% Formic acid in Acetonitrile	QuREChERs	1% Formic acid in Acetonitrile	QuREChERs
1	95	102	105	88
2	99	101	113	97
3	107	88	106	109
4	94	96	104	101
5	98	104	97	96
Mean	98.60	98.20	105.00	98.20
SD	5.13	6.42	5.70	7.66
%RSD	5.20	6.54	5.43	7.80

ผลการเปรียบเทียบการใช้ Internal standard กับ External standard

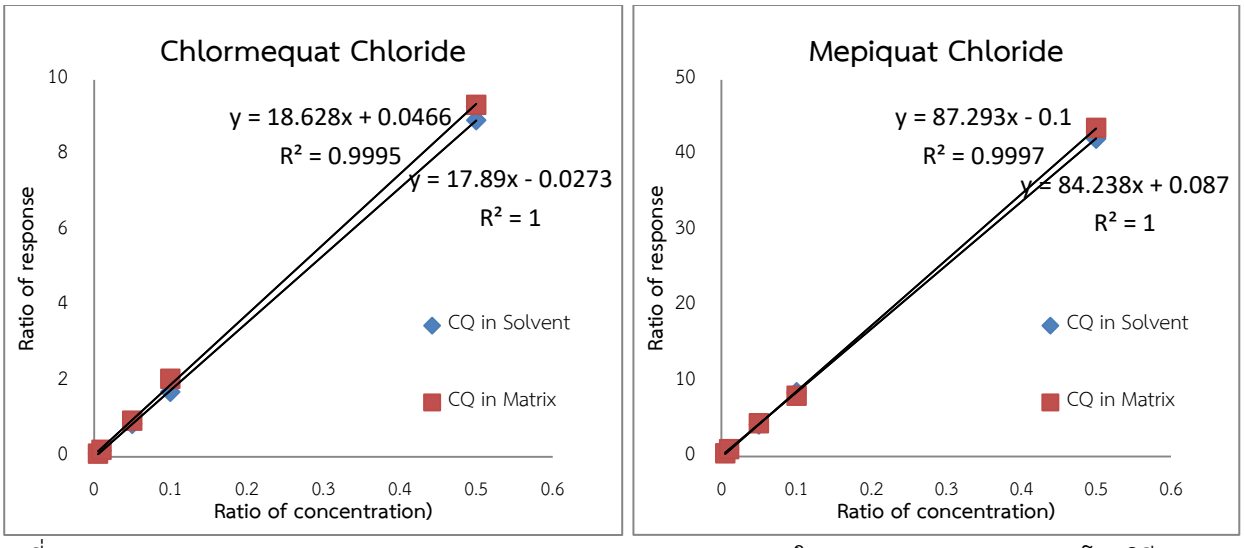
จากการเปรียบเทียบผลของ %Recovery ที่ระดับวามเข้มข้น 0.05 mg/kg (ตารางที่ 6) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทำ Calibration curve ใน Acetonitrile จากผลการทดสอบที่ได้โดยการใช้ ISTD พบว่า Mepiquat ให้ผล %Recovery อยู่ในช่วง 99-108% และ Chlormequat อยู่ในช่วง 93-99% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ สำหรับผลของ %Recovery ที่ได้จากการใช้ ESTD พบว่า Mepiquat อยู่ในช่วง 94-99% แต่ Chlormequat อยู่ในช่วง 45-55% ซึ่งจากการใช้ ESTD ไม่มีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพของ Mepiquat แต่มีผลต่อ Chlormequat ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาผลของ Matrix ในหัวข้อต่อไป

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบผลของ %Recovery ระหว่างการใช้ Internal Standard และ External standard

No.	%Recovery			
	Used ISTD		Used ESTD	
	Chlormequat	Mepiquat	Chlormequat	Mepiquat
1	108	97	45	97
2	102	93	52	94
3	99	99	55	99
Mean	103	96	51	97
SD	4.58	3.06	5.13	2.52
%RSD	4.45	3.17	10.13	2.60

ผลของ Matrix effect

จากการทดสอบผลของ Matrix effect โดยการเตรียม Calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.005-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลาย ISTD เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรในทุกความเข้มข้น โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด ซึ่งชุดแรกเตรียมใน Acetonitrile และชุดที่สองเตรียมใน Matrix ผลจากการเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคกับอัตราส่วนของความเข้มข้นแสดงดังรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟที่ได้ของวัตถุมีพิษทั้งสองชนิดที่เตรียมใน Acetonitrile และ Matrix มีค่าความชันไม่แตกต่าง และเมื่อนำค่าความชันที่ได้มาคำนวณค่าความแตกต่าง (%RPD) (ตารางที่ 7) พบว่า Chlormequat มีค่าความแตกต่างของความชันเท่ากับ 4.04% และ Mepiquat มีค่าเท่ากับ 3.56% ซึ่งมีค่า%RSD ไม่เกิน 10% (NATA, 2012) และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ซึ่งแสดงว่า Matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบ

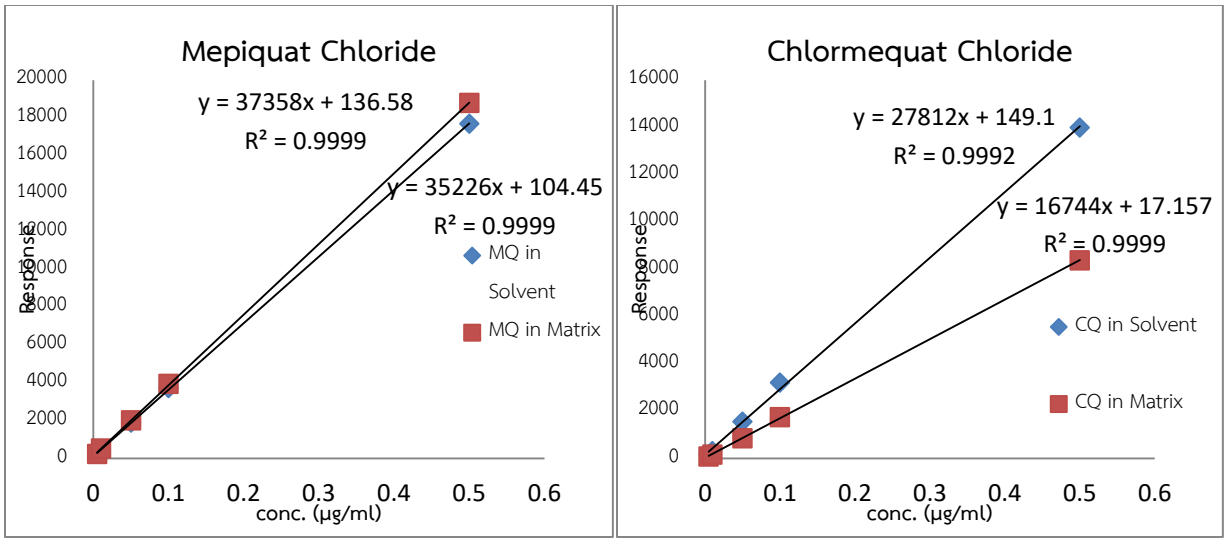


รูปที่ 3 แสดง Calibration curve ของ Chlormequat และ Mepiquat ใน Solvent และ Matrix โดยวิธี ISTD

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชันของสารมาตรฐานที่เตรียมใน Solvent และ Matrix โดยใช้วิธี ISTD

Pesticide	Equation	Slope	%RPD
Chlormequat in solvent	y = 17.89x - 0.0273	17.89	4.04
Chlormequat in matrix	y = 18.628x + 0.0466	18.628	
Mepiquat in solvent	y = 84.238x + 0.087	84.238	3.56
Mepiquat in matrix	y = 87.293x - 0.1	87.293	

สำหรับผลการทดสอบ Matrix โดยใช้วิธี ESTD ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการใช้ ISTD แต่เขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นแสดงดังรูปที่ 4 จากการประเมินความแตกต่าง (%RPD) ระหว่างค่าความชันของสารมาตรฐานที่เตรียมใน Acetonitrile กับ Matrix (ตารางที่ 8) พบว่า Mepiquat และ Chlormquat มีค่า %RPD เท่ากับ 5.87% และ 49.68% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดสอบ Matrix มีผลต่อการทดสอบ Chlormequat ซึ่งมีค่าความแตกต่างกันมากกว่า 10 %



รูปที่ 4 แสดง Calibration curve ของ Chlormequat และ Mepiquat ใน solvent และ matrix โดยวิธี ESTD

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชันของสารมาตรฐานที่เตรียมใน solvent และ Matrix โดยใช้วิธี ESTD

Pesticide	Equation	Slope	%RPD
Chlormequat in solvent	y = 27812x + 149.1	27812	49.68
Chlormequat in matrix	y= 16744x + 17.157	16744	
Mepiquat in solvent	y = 35226x + 104.45	35226	5.87
Mepiquat in matrix	y = 37358x + 136.58	37358	

ดังนั้นจากการศึกษาผลของ Matrix effect ทำให้ทราบว่าถ้าในกรณีตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษทั้งสองชนิด โดยใช้วิธี ISTD ไม่จำเป็นต้องเตรียมสารมาตรฐานใน Matrix เพื่อทำ Calibration curve เพราะ Matrix ไม่มีผลต่อการทดสอบ แต่ถ้าใช้วิธี ESTD ต้องเตรียม Calibration curve ในสารละลาย Matrix เพื่อป้องกันการเกิดผลของ Matrix ที่มีต่อ Chlormequat

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Chlormequat และ Mepiquat ในมะม่วงโดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ต่อกับคอลัมน์ชนิด HILIC และใช้ Ammonium formate buffer เข้มข้น 50 mM pH 3.75 กับสารละลาย Acetonitrile เป็น Mobile phase สำหรับขั้นตอนในการสกัดได้พัฒนามาจากวิธี QuPPe-Method โดยใช้สารละลาย 1% Formic acid ใน Acetonitrile เป็นตัวสกัดสารตัวอย่างซึ่งให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาได้ กับวิธี QuREChERs ด้วยวิธีทางสถิติ t-test ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดโดยใช้ 1% Formic acid ใน Acetonitrile ในการสกัดตัวอย่าง จากการศึกษาผล Matrix effect พบว่า Matrix มีผลต่อ Chlormequat ในกรณีที่ใช้ ESTD แต่ผลของ Matrix ไม่มีผลในกรณีที่ใช้ ISTD ดังนั้นถ้าใช้ ISTD ไม่จำเป็นต้องเตรียมสารมาตรฐานใน Matrix แต่ถ้าใช้วิธี ESTD ต้องเตรียมสารมาตรฐานใน Matrix เพื่อไม่ให้เกิดผลของ Matrix effect และให้ผลของการตรวจวิเคราะห์ที่ความถูกต้องมากที่สุด ผลจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ทำให้ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษทั้งสองชนิดที่เหมาะสม ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจะดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้งสองชนิด เพื่อให้มีความถูกต้อง และแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ Chlormequat chloride และ Mepiquat Chloride ที่เหมาะสมในตัวอย่างผลไม้ และเป็นแนวทางสำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษที่มีสภาพความเป็นขั้วชนิดอื่น และวิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเพื่อยื่นขอขยายขอบข่ายในการรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการการระบบ ISO/IEC 17025 ตลอดจนนำวิธีนี้ไปเผยแพร่กับหน่วยในสังกัดกรมวิชาการเกษตร

11. เอกสารอ้างอิง

Anonymous (2013). EU Pesticides Database. From web site http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7288577&CFTOKEN=96827652&jsessionid=08045fc97da7246e303aTR. (15 January 2013)

Anonymous (2012). Maximum Residue Limits Under Positive List System, Food Sanitation Law : Japan.

M. Anastassiades, D.I.Kolberg, D.Mack, I.Sigalova, D.Roux and D.Fugel (2011). Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination.version 6:1-37

X. Esparza, E. Moyano and M.T. Galceran (2009). Analysis of Chlormequat and Mepiquat by

Hydrophilic Interaction Chromatographhy Coupled to Tandem Mass Spectrometry in Food Sample. J. of Chromatography A 1216 : 4402-4406.

N. Oscar , E.Moyano and M.T. Galceran (2004). Time-of-Flight High Resolution Versus Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Quaternary Ammonium Herbicides in Drinking Water. Anal.Chim.Acta. 525:183-190.

Anonymous (2009). Commonity Reference Laboratory for Single Residue Method.Version2:1-11

Alder L. and J.R. Startin (2005). Determination of chlormequat and Mepiquat in Foods by Liquid Chlormatography/Mass Spectrometry or Liquid Chromatography/Tandem Mass Chromatography: Interlaboratory Study.J. of AOAC International Vol.88, No6 : 1762-1776.

World Health Organization (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification.

Anonymous (2013). From web site http://www.thaikasetsart.com. (15 January 2013)

M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D.Stajnbaher, F.J. Schenck., 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 86, 412-431.

NATA Technical Note 17 (2012). Guideline for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Method.

AOAC (1993). The AOAC Manual for the Peer-verified Methods Program.

12.ภาคผนวก

ภาคผนวก 1. เกณฑ์การยอมรับ Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer-Verified Method, Nov.1993

ความเข้มข้นของ Analyte ในตัวอย่าง	Recovery, %
100%	98-102
10%	98-102
1%	97-103
0.1%	95-105
100ppm	90-107
10ppm	80-110
1ppm	80-110
100ppb	80-110
10ppb	60-115
1ppb	40-120