

แบบรายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. **แผนงานวิจัย :** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย :** การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์เกษตร
3. **ชื่อการทดลอง :** การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ในผัก โดยใช้
Gas Chromatograph/Mass Spectrometry
ชื่อการทดลอง : Technique of pesticide analysis in vegetable using Gas Chromatograph/Mass Spectrometry.
4. **คณะผู้ดำเนินการ**

หัวหน้าโครงการ	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง	นางสาวจินตนา ภู่มงกุฏชัย	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การใช้โปรแกรมช่วยรายงานผล (Deconvolution Report Software) เป็นโปรแกรมการตัดสินใจว่าสารที่ตรวจวิเคราะห์เป็นสารชนิดเดียวกับในฐานข้อมูลที่จัดสร้างไว้แล้วหรือไม่ โดยอาศัยองค์ประกอบ 3 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ Agilent GC/MS Chemstation, NIST (The National Institute of Standards and Technology) และ AMDIS (The Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) ภายใต้การทำงานควบคู่กับ retention time locking (RTL) ที่จะเป็นตัวกำหนดความดันหรือ flow rate ของ carrier gas เพื่อให้สารชนิดเดียวกันมีระยะ RT (Retention time) เท่ากับของ library โดยใช้ chlorpyrifos-methyl เป็นตัวกำหนด RT ในการทดสอบวัตถุที่มีพิษจำนวน 145 ชนิด ด้วยเครื่อง GC/MS สามารถกำหนด LOD (limit of detection) ได้ 107 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 73.8 โดยมีความเข้มข้นของสารในตัวอย่างระหว่าง 0.004-0.1 mg/kg เปรียบเทียบ method ในการตรวจวิเคราะห์ด้วย GC/MS ระหว่าง Japanpest ที่วิเคราะห์สารได้ 430 ชนิดตาม Position list ของประเทศญี่ปุ่น กับ RTLpest วิเคราะห์สารได้ 926 ชนิด ซึ่งมีสารพิษตกค้างที่ทดสอบรวมอยู่ด้วย พบว่า Japanpest จะสามารถวิเคราะห์สารได้มากกว่าและที่ความเข้มข้นต่ำกว่า RTLpest และเปรียบเทียบระหว่างวิธีสกัด 2 วิธี คือ QuEChERS กับ Steinwandter ไม่มีความแตกต่างระหว่างวิธีการสกัด แต่วิธี Steinwandter มีการลดปริมาณสารละลายตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จะต่ำกว่าวิธี QuEChERS และการทดสอบสิ่งปนเปื้อนจากตัวอย่างที่มีผลต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS โดยทดสอบสารที่สกัดจากตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี คื่นช่าย มะเขือเทศ พริกและใบแมงลัก พบว่ากะหล่ำปลีสามารถใช้เป็น

ตัวอย่างในการทดลองแทนคาน้ำได้ และมะเขือเทศแทนพริกได้ สำหรับแมงลัก เมื่อใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS จะสามารถหาชนิดของสารได้มากกว่า วิธีการสกัดแบบ Steinwandter ส่วนผลการทดสอบสาร 145 ชนิด มีสารจำนวน ร้อยละ 26.2 ที่ไม่สามารถวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของสารที่ 0.01, 0.02, 0.05 และ 0.1 µg/ml ได้ อาจใช้เทคนิคอื่นๆ ของเครื่อง GC/MS เช่น การตรวจวิเคราะห์ด้วย SIM mode การใช้ PTV (Programmable Temperature Vaporize) ในการ inject สารปริมาณมากเข้าเครื่อง GC/MS จะทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้เพิ่มขึ้นในความเข้มข้นต่ำ

6. คำนำ

ปัจจุบันการใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้มีการพัฒนาขึ้นมาก จากเดิมใช้ GC ที่มี detector ชนิดต่างๆ เช่น flame photometric detector (FPD), electron capture detector (ECD) เป็นต้น detector แต่ละชนิดมีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์แตกต่างกันไป นอกจากนี้ detector ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในระดับมวลของสาร (mass) ได้แก่ mass selective detector (MSD) ซึ่งเป็นการทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็น ion ในสภาพสุญญากาศ ion จะถูกแยกตามขนาดของมวลต่อประจุ (mass/charge) DRS (Deconvolution Reporting Software) เป็น software ช่วยให้รายงานผลได้ง่ายขึ้น ใช้ library search ในการหาชนิดของสาร ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ Agilent GC/MS Chemstation, NIST (The National Institute of Standards and Technology) เป็น database สำหรับ confirm ผลที่พบใน AMDIS และ AMDIS (The Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) ประกอบด้วย full spectrum และหาชนิดของสารที่มี RT เท่ากัน สามารถสร้าง database เองจากข้อมูลที่มีอยู่ได้ การทำงานของ DRS เริ่มจากเลือก target compounds และ ส่งข้อมูลของ spectrum จาก total ion chromatogram (TIC) ไป search เปรียบเทียบ target compound ใน library ที่สร้างตามรายการใน Japan Positive List (ประกอบด้วยข้อมูลสารพิษตกค้างจำนวน 430 ชนิด) หรือ RTLpest library (มีข้อมูลสารพิษตกค้างรวมอยู่ใน 926 ชนิดด้วย) library ทั้ง 2 ถูกเก็บไว้ใน AMDIS โปรแกรมการเหล่านี้บริษัท Agilent Technology ได้พัฒนาขึ้นมาช่วยในการทำงานให้สะดวกขึ้น และจะต้องใช้ retention time locking (RTL) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาเช่นกัน โดยมี chlorpyrifos-methyl เป็นสารที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อ lock ให้การ inject ได้ RT เท่ากับ RT ของสารใน library ทุกครั้ง และ match กันเพื่อ confirm ผลให้แน่ใจว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างด้วย เครื่องมือชนิดต่างๆ ที่เป็น chromatography เช่น GC, LC, GC/MS หรือ LC/MS ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจะมี matrix ของตัวอย่าง (co-extractive) มาแทรกแทรก

การวิเคราะห์ผล (interfere) ทำให้ผลการวิเคราะห์ over estimate เรียกการเกิด matrix effect อาจเกิดได้จาก active site ของ inlet และ column ของเครื่อง หรือโครงสร้างทางเคมีของสารที่ต้องการวิเคราะห์และชนิดของตัวอย่างที่วิเคราะห์ ซึ่งการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นทำได้หลายวิธี วิธีที่ดีที่สุด คือ additional standard calibrate วิธีนี้ใช้ทั้งเวลาและมีความยุ่งยากในการเตรียมสารละลายมาตรฐานมากในขณะที่การใช้ standard in matrix ซึ่งเป็นการเตรียมสารละลายมาตรฐานในสารละลายตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ (matrix matched) นอกจากนี้การเติมสาร analytical protectant (AP) เป็นตัวช่วยที่ไม่ให้ matrix มีผลต่อการวิเคราะห์ แต่วิธีนี้ต้องเลือกใช้สารที่เหมาะสมในแต่ละพีซีที่ต้องการวิเคราะห์ อาจต้องใช้สารหลายตัวผสมกันเพื่อให้เหมาะสมที่สุด การใช้ AP นี้จะต้องทดสอบในแต่ละ matrix

ในการศึกษานี้เลือกใช้การเตรียมสารละลายมาตรฐานในสารละลายของพีซีผักปลอดสารพิษตกค้าง โดยเลือกใช้พีซีผักอินทรีย์สกัดด้วยวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ นำสารละลายที่ได้ใช้แทนตัวทำละลาย (solvent) ในการเตรียม standard และวิเคราะห์ผลด้วย GC/MS โดยใช้โปรแกรม DRS เพื่อหาปริมาณต่ำสุดที่เครื่องสามารถวิเคราะห์ได้ (LOD)

7. วิธีดำเนินการ

7.1 อุปกรณ์

7.1.1 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ ได้แก่ flat bottom flask, volumetric flask, reagent bottle, pipette, GC vial, glass syringe, test tube, cylinder, beaker

7.1.2 เครื่องมือชนิดต่างๆ เช่น เครื่องหั่นและผสมอาหาร (food processor), เครื่องสกัดวัตถุดิบพืชโดยการปั่น (homogenizer), เครื่องระเหยสารละลาย (rotary evaporator), เครื่องกวนตัวอย่าง (vortex mixer), เครื่องปั่นเหวี่ยงสารละลาย (centrifuge), เครื่องเขย่าสาร (shaker) และเครื่องชั่งไฟฟ้า (electronic balance) 2 และ 5 ตำแหน่ง

7.1.3 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น Teflon tube พร้อมฝาปิด Auto pipette SPE manifold,

7.1.4 เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุดิบพืช gas chromatograph (GC) ที่มีหัวตรวจ(detector) ชนิด mass selective detector (MSD)

7.1.5 สารเคมีต่างๆ ได้แก่

ethyl acetate ;EtAc (PR grade), acetonitrile ;ACN (AR และ PR grade), acetone (AR grade), dichloromethane; CH_2Cl_2 (AR และ PR grade), sodium chloride ;NaCl, sodium sulphate; Na_2SO_4 (ACS grade), disodium citrate, sodium citrate (ACS grade), primary secondary amine ;PSA, magnesium sulfate anhydrous; MgSO_4 , graphitize carbon black; GCB, envicarb

7.2 วิธีการ

7.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (standard)

นำ standard ที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย GC/MS และมีใน list ของ Japan list หรือ RTL list มาเตรียมที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml ด้วยตัวทำละลาย toluene และเจือจางให้มีความเข้มข้นจนถึง 1.0 µg/ml นำสารละลายแต่ละชนิดทดสอบฉีดเข้าเครื่อง GC/MS เพื่อจัดกลุ่ม สารที่มี retention time (RT) ใกล้เคียงกันมากหรือเท่ากันจะถูกแยกให้อยู่คนละกลุ่ม โดยกำหนด 3 กลุ่ม สำหรับ standard ใหม่และอีก 1 กลุ่มเป็น standard ที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่ส่งออก

จากจำนวน standard 129 ชนิด บางชนิดมีอนุพันธ์ ซึ่งมี chromatogram แยกและมี ion สำคัญแตกต่างกัน รวมเป็น 145 ชนิด ผสม standard ที่กำหนดในกลุ่มต่างๆ นำไปฉีดทดสอบการแสดง peak เมื่อได้ RT ของสารทุกตัวในกลุ่มไม่ตรงกัน นำ standard ทั้ง 4 กลุ่มเตรียมให้มีความเข้มข้นของ mix ที่ 0.01, 0.02, 0.05 และ 0.1 µg/ml

7.2.2 การจัดทำ library เพื่อใช้ในการประมวลผล

ตามชนิดของ standard ที่เตรียม 4 กลุ่ม จะได้ library 4 library ย่อย เมื่อ run ด้วย method Japanpest และอีก 4 library ย่อย เมื่อ run ด้วย method RTLpest การสร้าง library เฉพาะสำหรับการวิเคราะห์ mix ของ standard แต่ละชนิดในแต่ละวิธีเริ่มจาก

จาก library ทั้ง 2 จะมีรายชื่อสารใน library listing ซึ่งเป็นอันดับแรกของการจัดทำฐานข้อมูลใหม่ โดยใช้ข้อมูลชื่อสาร, molecular weight, manufacturer weight และ CAS Number และใช้ข้อมูลด้าน ion ที่แตกตัวของสาร เช่น target ion (m/z), experimental RT, และ ion ที่ใช้ยืนยันชนิดสาร (qualifier ion) จาก screen database ของทั้ง Japanpest และ RTLpest โดยมีนามสกุลเป็น .scd

เมื่อได้ข้อมูลชุดใหม่ทำการแปลง file เป็น *.L, *.msp, *.msl, *.csl และ *.cal ซึ่งจะเป็น file ที่มี RT และข้อมูลของสารแต่ละชนิดครบ และใช้ MSD-DRS configuration program match ระหว่าง .msl กับ .cal ที่อยู่ในฐานข้อมูล AMDIS

7.2.3 การสร้าง method

ใช้ chlorpyrifos-methyl เป็นตัว lock เพื่อให้ได้ RT 13.443 min ของ Japanpest method และเท่ากับ 16.596 min ของ RTLpest method

7.2.4 การเตรียม matrix ชนิดต่างๆ โดยใช้วิธีสกัด 2 แบบคือ Steinwandter และ QuEChERS กับตัวอย่าง พืชผัก (matrix) ที่ใช้ทดสอบมี 5 ชนิด ได้แก่ คენัว ผักกาดขาว ฟริก มะเขือเทศ และแมงลัก เลือกตัวอย่างที่ปลูกด้วยระบบอินทรีย์ก่อนจะใช้งานทดสอบตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยวิธีทั้ง 2 และวิเคราะห์ด้วย GC/MS เพื่อหาสารพิษตกค้างจากการใช้ของเกษตรกร โดยต้องไม่พบสารพิษตกค้างในตัวอย่างที่ใช้ นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดด้วย

วิธีการทั้ง 2 แบบและเก็บส่วนสารละลายที่มีเนื้อของพีชนั้นละลายอยู่ (matrix) เก็บรวบรวมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

7.2.5 การเตรียมตัวอย่าง โดยใช้สารละลายที่มี matrix ที่ได้จากการสกัด 2 วิธี แทนตัวทำละลายและเจือจางสารละลายมาตรฐาน 4 กลุ่ม ให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 µg/ml

7.2.6 นำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่สกัดทั้ง 2 วิธี ฉีดด้วย GC/MS โดยใช้ Japanpest method และ RTLpest method เปรียบเทียบกันด้วยการใช้ library ย่อยที่สร้างขึ้นเฉพาะสาร 145 ชนิด และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบตัวแปร เพื่อหาปริมาณต่ำสุด (LOD) ที่เครื่อง GC-MS จะสามารถวิเคราะห์ได้โดยเปรียบเทียบ

- ชนิดของพืช 5 ชนิด ได้แก่ คენำ กะหล่ำปลี พริก มะเขือเทศ และแมงลัก
- วิธีการสกัดพืช 2 วิธี ได้แก่ Steinwandter และ QuEChERS (แผนภูมิที่ 1)
- Condition ของ GC และ MS ที่ใช้ของ Japanpest method และ RTLpest method (แผนภูมิที่ 2)
- ความเข้มข้น 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05 และ 0.1 µg/ml

7.3 เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุพิษการเกษตร สปพ. กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

สารที่ใช้ทำการทดสอบจำนวน 145 ชนิด เมื่อ run ด้วย Japanpest method จะต้องใช้ความเข้มข้น > 0.1 µg/ml มีจำนวน 39 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 26.9 (ตารางที่ 1) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ การ run ด้วย RTLpest method พบว่าสารที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้น > 0.1 µg/ml มีจำนวนถึง 50 ชนิด (ร้อยละ 34.5) แม้ว่าวิธี RTLpest จะสามารถวิเคราะห์ได้ 926 ชนิด ซึ่งมากกว่าวิธี Japanpest ที่วิเคราะห์ได้เพียง 430 ชนิดก็ตาม วิธี RTLpest เป็นวิธีที่ต้องใช้ความเข้มข้นของสารมากกว่าจึงจะสามารถวิเคราะห์ได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้เป็นสารในกลุ่ม pyrethroid เช่น cyfluthrin cypermethrin deltamethrin permethrin fenvalerate รวมถึง endosulfan ทั้ง 3 isomer ในขณะที่สารเหล่านี้วิเคราะห์ได้ดีด้วย GC/ECD ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ต่ำกว่า pg (10^{-12}) แต่ GC/MS Scan mode วิเคราะห์ได้ในระดับ ng (10^{-9}) นอกจากนี้สารที่มี molecular weight ต่ำและสารกลุ่มที่มี polarity สูงเป็นสารที่มีปัญหาในการตรวจวิเคราะห์ด้วย เช่น acephate captan dimethoate omethoate diuron iprodione monocrotophos propagite trichlorfon

จากตารางที่ 2 สารพิษตกค้างจำนวน 40 ชนิดที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS หรือ Steinwandter สามารถวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นเดียวกันจึงไม่มีความแตกต่างระหว่างวิธีสกัด แต่เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ด้วย Japanpest method จะสามารถวิเคราะห์ได้ที่ปริมาณต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วย RTLpest method ที่ความเข้มข้น

เดียวกัน มีเพียง 14 ชนิดที่สามารถใช้ method ของการวิเคราะห์ได้ทั้ง 2 แบบและใช้วิธีการสกัดได้ทั้ง 2 วิธีเช่นกัน ได้แก่ azinphos-ethyl, benalaxyl, carbaryl, dichlorvos, fenbuconazole, flutolanil, kresoxim-methyl, methidathion, pp-DDE, phorate, promecarb, pyrifthalid, tebuconazole และ tebufenpyrad

แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง method ของการวิเคราะห์พบว่า Japanpest method (ตารางที่ 3) มีสาร 43 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 29.7 ที่ผลระหว่างวิธีการสกัดแตกต่างกัน ในขณะที่ RTLpest method มีสารเพียง 19 ชนิด (ร้อยละ 13.1) ที่ผลระหว่างวิธีการสกัดแตกต่างกัน ซึ่งการวิเคราะห์ ด้วย Japanpest method จะให้ผลที่ดีกว่า จากรายละเอียดของ method (แผนภูมิที่ 2) พบว่า Japanpest method ใช้ constant flow ซึ่งจะให้ sensitivity ที่สูง และเที่ยงกว่า RTLpest method ที่ใช้ constant pressure

เมื่อนำผลที่ได้ทั้งหมดจากการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของเครื่อง (LOD) หน่วยเป็น µg/ml จะต้องคูณด้วย factor ของการสกัดในการรายงานผลขั้นสุดท้าย (หน่วยเป็น mg/kg) สำหรับ factor ที่ใช้กับการสกัดแบบ QuEChERS ซึ่งไม่มีการลดปริมาตรสารละลายตัวอย่างจึงมีค่าเท่ากับ 1 แต่การสกัดแบบ Steinwandter มีการลดปริมาตรสารละลายตัวอย่างจึงมีค่าเท่ากับ 0.36 ทำให้ความเข้มข้นต่ำสุดจากวิธี Steinwandter มีค่าต่ำกว่าเดิมมาก ปริมาณสารพิษตกค้างต่ำสุดจำนวน 107 ชนิด จากสารที่ทดสอบ 145 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 73.8 ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS มีปริมาณสารในตัวอย่างระหว่าง 0.004-0.1 mg/kg (ตารางที่ 4)

การทดสอบสิ่งปนเปื้อนจากตัวอย่างที่มีผลต่อการวิเคราะห์ของเครื่องมือวิเคราะห์ GC/MS โดยทดสอบสารที่สกัดจากตัวอย่างพืช 5 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี คื่นช่าย มะเขือเทศ พริกและใบแมงลัก พบว่าสามารถใช้กะหล่ำปลีเป็นตัวอย่างในการทดลองต่างๆ แทนคื่นช่ายได้ และมะเขือเทศแทนพริกได้ สำหรับแมงลัก เมื่อใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS จะสามารถหาชนิดของสารได้มากกว่า วิธีการสกัดแบบ Steinwandter

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าข้อมูลที่ได้จากพืช 5 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี คื่นช่าย มะเขือเทศ พริกและใบแมงลัก สามารถใช้กะหล่ำปลีเป็นตัวอย่างในการทดลองแทนคื่นช่ายได้ และมะเขือเทศแทนพริกได้ สำหรับแมงลัก เมื่อใช้วิธีการสกัดแบบ QuEChERS จะสามารถหาชนิดของสารได้มากกว่าวิธีการสกัดแบบ Steinwandter เมื่อรวมพืชหลายชนิดเพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างการสกัดด้วยวิธี QuEChERS กับ Steinwandter แต่เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์การใช้ Japanpest จะสามารถวิเคราะห์ผลได้มากกว่าใช้ RTLpest LOD ของเครื่องสามารถกำหนดได้จำนวน 107 ชนิดจากสารที่ทดสอบ 145 ชนิด นอกจากนี้มีสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ประมาณ 26.2% ถ้าใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วย SIM mode ของ GC/MS หรือใช้เทคนิค PTV ที่เป็นการ inject สารปริมาณมากเข้าเครื่อง GC/MS จะทำให้สามารถวิเคราะห์สารได้เพิ่มขึ้นในความเข้มข้นต่ำ

ข้อเสนอแนะ

1. สารมาตรฐานมีราคาแพงและต้องใช้จำนวนมากชนิดทำให้ต้องใช้งบประมาณเพิ่มขึ้น
2. ต้องมีการขยายการทดลองโดยใช้ PVT ซึ่งเป็นอุปกรณ์เสริมที่เพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์
3. ควรทดสอบที่ LOD กับการสกัดจริง ตามวิธีที่ได้เพื่อหา LOQ ที่เป็นค่าที่บ่งบอกประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการที่สามารถวิเคราะห์ได้
4. เพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ด้วยการนำสารที่ทดสอบไปใช้ใน SIM mode เพื่อหาปริมาณสารพิษตกค้างในปริมาณต่ำมาก
5. ขยายการทดสอบในพืชชนิดอื่นเพื่อหาพืชที่แทนกันได้ในกลุ่มเดียวกัน
6. ศึกษาพัฒนาการใช้ GC-MS/MS จะให้ข้อมูลที่แม่นยำมากขึ้น และสามารถหาปริมาณสารพิษตกค้างต่ำกว่าการใช้ GC/MS

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ใช้เป็นข้อมูลปริมาณต่ำสุดที่เครื่อง GC/MS จะสามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) ที่แสดงประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์สารได้เพิ่มชนิดขึ้น ควรทดสอบที่ LOD กับการสกัดจริง ตามวิธีที่ได้เพื่อหา LOQ ที่เป็นค่าที่บ่งบอกประสิทธิภาพของห้องปฏิบัติการที่สามารถวิเคราะห์ได้
2. สามารถถ่ายทอดวิธีการไปยังห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ของกรมวิชาการเกษตร
3. ใช้ในการขอการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ของห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้าง
4. ขยายผลนำวิธีการไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สารพิษตกค้างในพืชอื่นๆ

11. เอกสารอ้างอิง

European Committee for Standardization (CEN), 2008. Food 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. European Standard (EN15662).

Steinwandter H., 1985. Universal 5 min on line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrial Chemicals. Fresenius. Z. Anal. Chem. No.1155.

Philip L. Wylie, 2006. Screening for 926 Pesticides and Endocrine Disruptors by GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a New Pesticide Library.

www.agilent.com/chem.

Philip L. Wylie, 2007 Screening for Pesticides in Food Using the Japanese Positive List Pesticide Method: Benefits of Using GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a Retention Time Locked Mass Spectral. www.agilent.com/chem.

ตารางที่ 1 สารที่ต้องใช้ความเข้มข้น >0.1 µg/ml แยกตามวิธีการวิเคราะห์

Japanpest method	RTLpest method
Acephate Acetamiprid a-endo b-endo Captafol Captan carbofuran Chlorothalonil Cyfluthrin I Cyfluthrin II Cyfluthrin III Cyfluthrin IV Cymoxanil Cypermethrin I Cypermethrin II Cypermethrin III Cypermethrin IV deltamethrin dicloran Difenoconazol II dimethoate Diuron Edifenphos endo-sulfate Fenvalerate II Folpet formothion Iprodione Naled omethoate Oxycarboxin Permethrin II Phosmet Phosphamidon I Phosphamidon II propagate Propiconazole II Thiabendazole Trichlorfon	Acephate Acetamiprid acrinathrin a-endo b-endo Captafol Captan Chlorothalonil Cyfluthrin I Cyfluthrin II Cyfluthrin III Cyfluthrin IV Cymoxanil Cypermethrin I Cypermethrin II Cypermethrin III Cypermethrin IV deltamethrin Difenoconazol II dimethoate Dimethomorph-E Dimethomorph-Z Diuron endo-sulfate fenitrothion Fenvalerate I Fenvalerate II Folpet formothion indoxacarb Iprodione malathion monocrotophos Naled omethoate Oxycarboxin p,p'-DDT parathion-ethyl parathion-methyl Permethrin I Phosmet Phosphamidon I Phosphamidon II Prochloraz profenofos propagate Thiabendazole Triadimenol II Trichlorfon Tricyclazole
39 ชนิด (26.9%)	50 ชนิด (34.5%)

ตารางที่ 2 ชนิดของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ Japanpest method และ RTLpest method

method	amount (µg/ml)	substances
Japanpest	0.01	Carbaryl , carboxin, Diflufenican, dithiopyr, Flusilazole, Flutolanil , p,p'-DDE, Pirimicarb, promecarb , Tebuconazole , Tetraconazole
	0.02	Aldrin, azinphos-eth , Benalaxyl , Butachlor, diazinon, kresoxim-methyl , paclobutazole, Permethrin I, Phenthoate, Procymidone, Pyridaben, pyrifthalid , Tetradifon, Trifluralin, Vinclozolin
	0.05	Acetochlor, Bromacil, Chlorfenapyr, Dichlorvos , Dieldrin, Difenoconazol I, Endrin, oxadixyl, Phorate , Tebuconazole , Tolfenpyrad
	0.1	Atrazine, fenbuconazole , methidathion
RTLpest	0.01	Carbaryl , Flutolanil , p,p'-DDE, promecarb , Tebuconazole , Tolfenpyrad
	0.02	azinphos-eth , Benalaxyl , Diflufenican, dithiopyr, Flusilazole, kresoxim-methyl , Pyridaben, Tetraconazole
	0.05	Aldrin, Atrazine, Butachlor, carboxin, Dichlorvos , diazinon, paclobutazole, Permethrin I, Phorate , Pirimicarb, Procymidone, pyrifthalid , Tebuconazole , Tetradifon, Trifluralin, Vinclozolin
	0.1	Acetochlor, Bromacil, Chlorfenapyr, Dieldrin, Difenoconazol I, Endrin, fenbuconazole , methidathion , oxadixyl, Phenthoate

ตารางที่ 3 ปริมาณสารพิษตกค้างที่ในสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิธีสกัด QuEChERS และ Steinwandter ที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยใช้ Japanpest method และ RTLpest method

No.	Japanpest	QuEChERS (µg/ml)	Steinwandter (µg/ml)	No.	Japanpest	QuEChERS (µg/ml)	Steinwandter (µg/ml)
1	alachlor	0.05	0.02	24	Methoxychlor	0.02	0.05
2	ametryn	0.05	0.02	25	op-DDT	0.05	0.02
3	Amitraz	0.1	0.02	26	Oxadiazon	0.01	0.02
4	bifenthrin	0.01	0.02	27	Oxyfluorfen	0.05	0.02
5	Buprofezin	0.02	0.05	28	p,p'-DDD	0.02	0.05
6	Cadusafos	0.05	0.1	29	parathion-ethyl	0.05	0.1
7	Chlorfenvinphos-tran	0.05	0.02	30	phosalone	0.01	0.05
8	esprocarb	0.02	0.01	31	pirimiphos-methyl	0.02	0.01
9	ethion	0.02	0.01	32	Prochloraz	0.1	0.05
10	ethofenprox	0.01	0.02	33	profenofos	0.05	0.1
11	Ethoprophos	0.1	0.05	34	Propoxur	0.1	0.05
12	fenobucarb	0.02	0.05	35	prothiofos	0.01	0.02
13	fenpropathrin	0.05	0.1	36	quintozene	0.05	0.02
14	fenthion	0.02	0.01	37	silafiuofen	0.01	0.02
15	Heptachlor	0.05	0.1	38	triadimefon	0.05	0.02
16	Imazalil	0.05	0.1	39	Triadimenol I	0.1	0.05
17	Iprobenfos	0.02	0.01	40	Triadimenol II	0.1	0.05
18	Isoprocarb	0.05	0.01	41	triazophos	0.02	0.05
19	isoprothiolane	0.01	0.02	42	Tricyclazole	0.1	0.05
20	malathion	0.05	0.1	43	Trifloxystrobin	0.02	0.05
21	metalaxyl	0.05	0.1				
22	methamidophos	0.1	0.05				
23	methiocarb	0.05	0.1				
No.	RTLpest	QuEChERS (µg/ml)	Steinwandter (µg/ml)	No.	RTLpest	QuEChERS (µg/ml)	Steinwandter (µg/ml)
1	alachlor	0.05	0.1	11	methamidophos	0.05	0.1
2	Amitraz	0.05	0.02	12	mevinphos	0.1	0.05
3	Chlorfenvinphos-cis	0.05	0.1	13	Propanil	0.1	0.05
4	chlorpyrifos	0.05	0.01	14	Propiconazole I	0.05	0.1
5	EPN	0.05	0.1	15	Propoxur	0.05	0.1
6	esprocarb	0.05	0.02	16	prothiofos	0.02	0.05
7	Etridiazole	0.1	0.05	17	Pyrazophos	0.02	0.05
8	fenobucarb	0.02	0.05	18	Quinalphos	0.1	0.05
9	fenpropathrin	0.05	0.1	19	Quizalofop-ethyl	0.02	0.05
10	Fipronil	0.02	0.05				

ตารางที่ 4 LOD ของสารที่ได้ของสารพิษตกค้างจำนวน 107 ชนิด

No.	<i>cpd.</i>	<i>RT-Jap</i> (min)	<i>RT-RTL</i> (min)	<i>Target-ion</i> (m/z)	<i>Qualifiers- Japanpest</i> (<i>RTLpest</i>) (m/z)	LOD (mg/kg)
1	Acetochlor	13.410	16.542	146	162, 59, 223	0.018
2	acrinathrin	19.835	30.724	208	181, 289, 93	0.1
3	alachlor	13.587	17.03	160	188, 45, 146	0.007
4	aldrin	14.489	18.528	263	66, 265, 261	0.007
5	ametryn	13.731	17.112	227	212, 170, 185	0.007
6	Amitraz	19.671	30.143	121	162, 132, 147	0.007
7	Atrazine	12.073	13.159	200	215, 58(202), 173	0.036
8	azinphos-eth	20.05	30.645	132	160, 77, 105	0.007
9	Azoxystrobin	23.444	36.630	344	388, 345, 372	0.018
10	Benalaxyl	17.578	26.747	148	91, 206, 204	0.007
11	bifenthrin	18.708	28.839	181	165, 166, 182	0.007
12	Bromacil	14.099	18.350	205	207, 206, 42	0.018
13	Buprofezin	16.474	24.579	105	106, 104, 172	0.018
14	Butachlor	15.789	23.220	176	160, 188, 146	0.007
15	Cadusafos	11.406	11.746	159	158, 97, 88	0.036
16	carbaryl	13.689	16.806	144	115, 116, 145	0.004
17	carboxin	16.510	24.308	143	235, 87, 144	0.004
18	Chlorfenapyr	16.613	25.227	59	247, 249, 408	0.018
19	Chlorfenvinphos-cis	15.215	20.977	267	269, 323, 325	0.007
20	Chlorfenvinphos-tran	15.01	21.574	267	323, 269, 325	0.007
21	chlorpyrifos	14.371	19.234	197	199, 314, 97	0.007
22	ddvp,Dichlorvos	6.595	5.831	109	185, 79, 187	0.018
23	diazinon	12.475	14.466	179	137, 152, 199	0.007
24	dicrotophos	11.117	11.488	127	67, 193, 72	0.036
25	Dieldrin	16.475	23.87	79	263, 277, 279	0.018
26	Difenoconazol I	22.853	35.086	323	265, 325, 267	0.018
27	Diflufenican	18.109	27.785	266	394, 267, 246	0.004

28	Dimethomorph-E	24.065	37.452	301	387, 165, 303	0.018
29	Dimethomorph-Z	23.62	36.684	301	303, 387, 165	0.018
30	dithiopyr	13.824	18.1	354	306, 286, 237	0.004
31	Endrin	16.889	24.745	263	317, 245, 265	0.018

ตารางที่ 4 (ต่อ)

No.	<i>cpd.</i>	<i>RT-Jap</i> (min)	<i>RT-RTL</i> (min)	<i>Target-ion</i> (m/z)	<i>Qualifiers- Jap (RTL)</i> (m/z)	LOD (mg/kg)
32	EPN	18.75	28.660	157	169, 141, 185	0.018
33	esprocarb	14.244	18.252	91	222, 71, 162	0.004
34	ethion	17.125	26.002	231	153, 97, 125	0.004
35	ethofenprox	21.698	33.203	163	164, 135, 107	0.007
36	Ethoprophos	10.855	10.742	158	97, 126, 139	0.018
37	Etridiazole	8.835	7.958	211	183, 213, 185	0.036
38	fenbuconazole	21.028	32.232	129	198, 125, 127	0.036
39	fenitrothion	14.062	18.072	277	125, 109, 260	0.018
40	fenobucarb	10.515	10.280	121	150, 91, 122	0.018
41	fenpropathrin	18.898	28.990	97	181, 125, 265	0.036
42	fenthion	14.461	19.120	278	125, 109, 169	0.004
43	Fenvalerate I	22.317	34.271	167	125, 181, 152	0.05
44	Fipronil	15.064	21.810	367	369, 213, 351	0.004
45	Flusilazole	16.435	24.594	233	206, 234, 315	0.004
46	Flutolanil	16.075	23.840	173	145, 281, 323	0.004
47	Heptachlor	13.775	16.796	272	100, 274, 270	0.036
48	Imazalil	16.153	23.788	41	215, 173, 217	0.036
49	indoxacarb	23.011	7.398	150 (121)	218, 59, 203 (166 122 165)	0.1
50	lprobenfos	13.020	15.347	91	204, 123, 122	0.004
51	Isoprocarb	9.745	9.092	121	136, 91, 77	0.004
52	isoprothiolane	16.195	23.875	118	162, 189, 290	0.007
53	kresoxim-methyl	16.458	24.908	116	206, 131, 132	0.007
54	L-cyha	19.503	30.370	181	197, 208, 209	0.02
55	malathion	14.228	18.800	173	127, 125, 93	0.036
56	metalaxyl	13.728	17.337	206	45, 160, 249	0.036
57	methamidophos	6.43	5.655	94	95, 141, 47	0.018

58	methidathion	15.627	22.300	145	85, 93, 125	0.036
59	methiocarb	14.076	18.049	168	153, 109, 57	0.036
60	Methoxychlor	18.86	28.862	227	228, 152, 114(113)	0.018
61	mevinphos	8.489	7.595	127	192, 109, 67	0.018

ตารางที่ 4 (ต่อ)

No.	<i>cpd.</i>	<i>RT-Jap</i> (min)	<i>RT-RTL</i> (min)	<i>Target-ion</i> (m/z)	<i>Qualifiers- Jap (RTL)</i> (m/z)	LOD (mg/kg)
62	monocrotophos	11.281	11.737	127	192, 67, 97	0.036
63	op-DDT	17.191	25.772	235	237, 165, 236	0.007
64	Oxadiazon	16.315	24.417	175	177, 258, 260	0.007
65	oxadixyl	17.091	25.898	105	45, 163, 132	0.018
66	Oxyfluorfen	16.407	24.732	252	361, 300 (331),302	0.007
67	p,p'-DDD	17.139	25.686	235	237, 165, 236	0.018
68	p,p'-DDE	16.344	24.021	246	318, 316, 248	0.004
69	p,p'-DDT	17.851	26.982	235	237, 165, 236	0.018
70	paclobutazole	15.793	22.551	236	125, 238, 167	0.007
71	parathion-ethyl	14.531	19.275	291	109, 97, 139	0.036
72	parathion-methyl	13.57	16.594	263	109, 125, 79	0.018
73	Pendimethalin	15.02	20.991	252	253, 281, 162	0.018
74	Permethrin I	20.504	31.369	183	163, 165, 184	0.007
75	Phenthoate	15.33	21.712	274	125, 121, 93	0.007
76	Phorate	11.498	11.962	75	121, 260, 97	0.018
77	phosalone	19.375	29.677	182	121, 184, 367	0.018
78	Pirimicarb	12.963	15.677	166	72, 238, 167	0.004
79	pirimiphos-methyl	13.999	18.307	290	276, 305, 233	0.004
80	Prochloraz	20.696	31.73	180	70, 308, 310	0.018
81	Procymidone	15.405	21.962	96	283, 285, 67	0.007
82	profenofos	16.258	23.904	208	139, 206, 339	0.036
83	promecarb	11.429	11.919	135	150, 91, 136	0.004
84	Propanil	13.341	16.116	161	163, 217, 219	0.007
85	Propiconazole I	17.695	26.941	173	69, 259, 175	0.018
86	Propoxur	10.53	10.353	110	152, 111, 57	0.018
87	prothiofos	16.179	23.752	309	267, 162, 113	0.007

88	Pyrazophos	19.87	30.719	221	232, 237, 373	0.007
89	Pyridaben	20.685	31.525	147	117, 148, 132	0.007
90	pyrifthalid	19.939	30.688	318	274, 317, 273	0.007
91	Quinalphos	15.349	21.653	146	157, 156, 118	0.018

ตารางที่ 4 (ต่อ)

No.	cpd.	RT-Jap (min)	RT-RTL (min)	Target-ion (m/z)	Qualifiers- Jap (RTL) (m/z)	LOD (mg/kg)
92	quintozene	12.181	17.992	237	249, 295, 214	0.007
93	Quizalofop-ethyl	21.550	32.908	299	372, 163, 301	0.007
94	silafiuofen	21.841	33.477	179	286, 258, 151	0.007
95	Tebuconazole	18.104	27.432	125	250, 70, 83	0.018
96	Tebufenpyrad	19.001	29.094	318	171, 333, 276	0.004
97	Tetraconazole	14.577	19.864	336	338, 337, 101	0.004
98	Tetradifon	19.267	29.38	159	111, 229, 227	0.007
99	Tolfenpyrad	23.848	36.846	383	197, 171, 211	0.018
100	triadimefon	14.59	19.386	57	208, 85, 210	0.007
101	Triadimenol I	15.412	21.668	112	168, 128, 70	0.018
102	Triadimenol II	15.558	no	112	168, 128, 70	0.018
103	triazophos	17.401	26.457	161	162, 172, 77	0.018
104	Tricyclazole	16.307	23.605	189	162, 161, 135	0.018
105	Trifloxystrobin	17.61	27.314	116	131, 222, 59	0.018
106	Trifluralin	11.111	11.637	306	264, 307, 290	0.007
107	Vinclozolin	13.512	16.630	212	285, 198, 187	0.007

แผนภูมิที่ 1 การสกัดตัวอย่าง

แผนภูมิที่ 2 Condition GC และ MS

Steinwandter	QuEChERS	condition	Japanpest method	RTLpest method
<p>Sample 25 g ± 0.05 g</p> <p>↓ +50 ml acetone</p> <p>Homogenized</p> <p>↓ + 40 ml CH₂Cl₂</p> <p>↓ + ~8 g NaCl</p> <p>Homogenized</p> <p>↓ รินส่วนใสในขวดที่บรรจุ sodium sulfate</p> <p>↓ กรองผ่าน sodium sulfate</p> <p>↓ แบ่งปริมาตร 50 ml</p> <p>↓ ลดปริมาตรจนเกือบแห้ง</p> <p>↓ ปรับปริมาตรให้ได้ 5 ml ด้วย ethyl acetate</p> <p>↓ Take aliquat 2ml เปลี่ยน solvent เป็น acetonitrile</p>	<p>Sample 10 g ± 0.05 g</p> <p>↓ + 10 mL ACN</p> <p>Shake 1 min</p> <p>↓ + 4g MgSO₄</p> <p>↓ + 1g NaCl,</p> <p>↓ + 0.5g Na₂Hcitrate quasihydrate</p> <p>↓ + 1g Na₃citrate. dihydrate</p> <p>Shake and Centrifuge</p> <p>↓ Take aliquot 5 ml</p> <p>↓ +125 mg PSA</p> <p>↓ +750 mg MgSO₄</p> <p>↓ +50 mg GCB</p> <p>Shake and Centrifuge</p> <p>↓ Collect solvent ใช้สำหรับเตรียมสารละลาย ตัวอย่าง</p>	<p>GC</p> <p>column</p> <p>Inlet</p> <p>Inlet Temp</p> <p>oven t. program</p> <p>Retention time locking</p> <p>injection volume</p> <p>mass spectrometer (MS)</p> <p>Tune file</p> <p>mode</p> <p>scan range</p> <p>source</p> <p>solvent delay</p>	<p>Agilent 6890 N</p> <p>DB-5MS</p> <p>split/splitless</p> <p>250°C</p> <p>50 °C (min),25 °C /min to 125 °C (0 min)</p> <p>10 °C /min to 300 °C (10min)</p> <p>chlorryrifos-methyl locked to 13.443 min</p> <p>2µl</p> <p>Agilent 5973 inert</p> <p>Atune.u</p> <p>scan</p> <p>35-500</p> <p>quod, transfer line temp 230,150,280</p> <p>3.5 min</p>	<p>Agilent 6890 N</p> <p>DB-5MS</p> <p>split/splitless</p> <p>250 °C</p> <p>70 °C (2min), 25 °C /min to 150 °C (0min)</p> <p>3 °C /min to 200 °C (0min),8 °C /min to 280 °C (10min)</p> <p>chlorryrifos-methyl locked to 16.596 min</p> <p>2µl</p> <p>Agilent 5973 inert</p> <p>Atune.u</p> <p>scan</p> <p>45-550</p> <p>quod, transfer line temp 230,150,280</p> <p>4 min</p>

<p>+300 mg MgSO₄ +200 mg PSA ↓ +50mg Envicarb Collect solvent ใช้สำหรับเตรียมสารละลาย ตัวอย่าง</p>		<p>software GC/MS instrument control : Agilent GC/MS ChemStation (P/N G1701EA, Ver.E.01.00 or higher) Deconvolution Reporting Software : Agilent Deconvolution Reporting Software (P/N G1716AA, Ver.A.03.00 or higher) Library searching software : NIST MS Search (Ver.2.0d or greater) (comes with NIST05 mass spectral library-Agilent P/N G1033A) Deconvolution Software : Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software (AMDIS_32 version 2.64 ; comes with NIST05 mass spectral library-Agilent P/N G1033A) MS libraries : NIST05 mass spectral library (Agilent P/N G1033A) Agilent Japanese Positive List Pesticide Library in Agilent and NIST formats (P/N G1675AA)</p>
--	--	---