

1. **ชุดโครงการ** วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chlorothalonil ในผักและผลไม้

กิจกรรมที่ 1 : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 : การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3. **ชื่อการทดลอง** : 1.2.30 การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chlorothalonil ในผักและผลไม้.

4. คณะผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ	นางสาวพนิดา ไชยยันต์บุรณ์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
หัวหน้าการทดลอง	นางสาวจินตนา ภู่มงกุฏชัย	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	นางสาวสุพัตริ หนูสังข์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chlorothalonil ในผักและผลไม้ระหว่าง ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558 ได้พัฒนาจากการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ระหว่าง Steinwandter กับ QuEChERS และในมะม่วงและผักคะน้า โดยเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์สารมาตรฐานในสารสกัดตัวอย่าง (matrix) โดยใช้ GC-ECD, LC-MS/MS และ GC-MS/MS พบว่าวิธี QuEChERS ให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าวิธี Steinwandter ซึ่งวิธี QuEChERS ใช้สารเคมีน้อยและประหยัดเวลา สาร matrix ของมะม่วงให้ sensitivity ที่ดีกว่า matrix ของคะน้าและเครื่องตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสม คือ GC-MS/MS การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี QuEChERS ซึ่งใช้วิธีตาม EN 15662, 2008 chlorothalonil ในตัวอย่างมะม่วงโดยเทคนิค GC-MS/MS สรุปผลดังนี้ linearity ของ calibration curve ของสารละลายมาตรฐาน chlorothalonil อยู่ในช่วงที่ความเข้มข้น 0.01-0.5 ug/ml และมี matrix effect เมื่อเปรียบเทียบ calibration curve ของ chlorothalonil ที่เตรียมใน acetonitrile กับเตรียมด้วย matrix มะม่วง ดังนั้นการหาปริมาณต้องเตรียมใน matrix ที่เรียกว่า matrix match calibration curve การทดสอบ accuracy และ precision ที่ความเข้มข้น 0.01-0.5 mg/kg พบว่าอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้โดยมี % recovery ในช่วง 90 - 105% และ %RSD ในช่วง 3 - 11% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนดคือ % recovery ในช่วง 70-120% และ %RSD <20% ส่วน linearity of working range ของวิธีตรวจวิเคราะห์ในช่วง 0.01 – 0.5 mg/kg LOQ = 0.01 mg/kg และ LOD = 0.005 mg/kg วิธีการนี้สามารถนำไปขอเพิ่มการรับรองห้องปฏิบัติการตามระบบ ISO/IEC 17025 ใช้เป็นวิธีมาตรฐานและถ่ายทอดให้ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคใช้ต่อไป

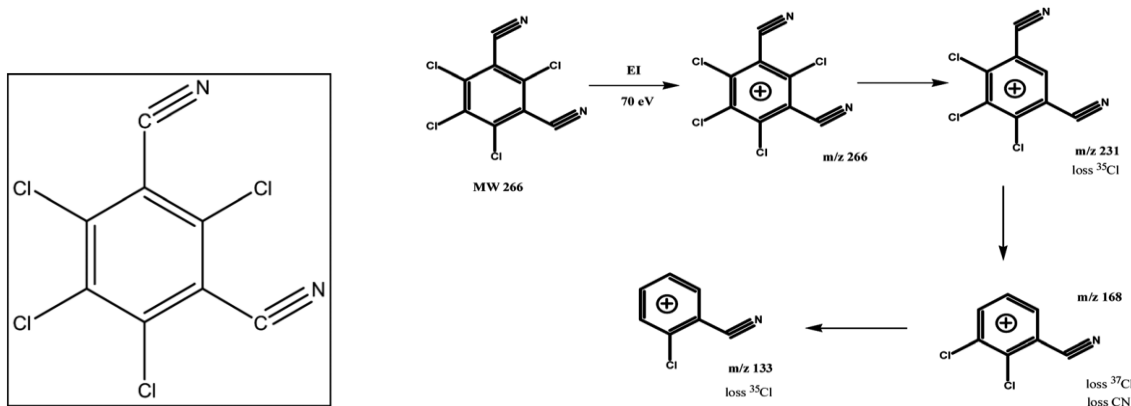
Abstract

Method development and method validation of chlorothalonil in fruit and vegetable were performed during 2013 – 2015. Method developing was divided into three parts; first was choose the method for extraction between Steinwandter and QuEChERS; second was choose the matrix of mango or Chinese kale; and the final was choose the instrument for analysis such as GC-ECD, GC-MS/MS and LC-MS/MS. The proper method was using QuEChERS in mango and using GC-MS/MS for residue analysis. The method was validated using blank samples; mango, spiked at 6 levels. This method was also validated with respect to parameters of linearity, matrix effect, precision and accuracy, LOQ and LOD. Linearity of the calibration curves was studied in the range of 0.01 – 0.5 µg/ml with standard solutions at different concentration levels, prepared in solvent and in matrix extracts of mango, obtained by QuEChERS method. They were analysed with GC-MS/MS, EI mode. The linearity of the detector response within the studied concentration range was good, with correlation coefficients better than 0.995 in all cases. The matrix effect was evaluated by the ratio of the slope of the calibration curves of standards in matrix and in solvent. Interpretation of the results, should be done with care. The accuracy was estimated by average of recovery experiments from blank samples fortified with chlorothalonil (n=5) at 6 concentration levels; 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mg/kg and the precision was calculated in the terms of relative standard deviation from the recovery experiments. The average recoveries of chlorothalonil on mango were observed to be 105, 112, 99, 95, 92 and 90%, with relative standard deviation of 3, 8, 7, 5, 11 and 7% respectively. The validated LOQ is defined as the lowest validated fortified level for which a recovery in the range of 70-120% with corresponding RSD < 20% can be obtained. The LOQ for mango was found to be 0.01 mg/kg. LOD was estimated from calculation of 3x standard deviation which was 0.003 mg/kg. This concentration of which was then experimentally tested by the injection of the said concentration prepared in the matrix, used 0.005 mg/kg, followed by confirmation of the required response. The results are demonstrating that using QuEChERS method and GC-MS/MS for analyse chlorothalonil in mango was the suitable for this purpose. For more confidentially LOD was used at 0.005 mg/kg.

6. คำนำ

ปัจจุบันการใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้มีการพัฒนาขึ้นมา detector แต่ละชนิดมีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์แตกต่างกันไป เครื่องมือที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ถูกต้องในระดับมวลของสาร (mass) เช่น mass spectrometric detector (MSD) quadrupole เป็น MS ชนิดหนึ่ง ที่ใช้กันแพร่หลาย ต่อมาได้พัฒนาเป็นชนิด triple quadrupole หรือ QQQ ที่สามารถต่อกับเครื่องมือหลักได้ทั้งชนิด GC และ HPLC ได้เป็น GC-MS/MS และ LC-MS/MS อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่องมือชนิดต่างๆ ที่เป็น chromatography เช่น GC, LC, GC/MS หรือ LC/MS ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยปกติจะเทียบกับ calibration curve ของ standard แต่ในตัวอย่างหลายชนิดจะมี matrix ของตัวอย่าง (co-extractive) มาแทรกแซงการวิเคราะห์ผล ทำให้ผลการวิเคราะห์เบี่ยงเบนจากค่าจริง เรียกการเกิด matrix effect การแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นทำได้หลายวิธี เช่น additional standard calibrate แต่วิธีที่นิยมใช้คือ matrix calibration curve

chlorothalonil เป็นสารป้องกันกำจัดโรคพืชแบบไม่ดูดซึมใช้เพื่อป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้าง ราแป้ง โรคใบจุด โรคใบไหม้ เป็นต้น มีความเป็นพิษเล็กน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม chlorothalonil เป็นสารประกอบ aromatic halogen มี MW 265.89g /mol ตัวมันจะสลายตัวใน hydrochloric acid มีความสามารถในการละลายในน้ำที่ 0.6 mg/l ที่ 25°C และยังสามารถละลายได้ใน acetone จึงมีการทดสอบด้วยการสกัดด้วย ethyl acetate และวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS



สูตรโครงสร้าง chlorothalonil

การแตกตัวของ chlorothalonil ด้วย EI ของ GC-MS/MS

chlorothalonil เป็นสารที่มีโครงสร้างใหญ่ EU ใช้วิธีการหาด้วยการทำให้แตกตัวด้วยกรด ให้สาร 4 hydroxy - chlorothalonil และใช้ LC-MS/MS negative mode ในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ EU ตาม Regulation No.1107/2009 ได้ approved สารนี้แล้วและอนุญาตให้ใช้ได้ในยุโรป จนถึง 31/10/2017 จึงจะประเมินใหม่ EFSA (European Food Safety Authorize) ได้พิจารณาข้อมูล toxicological ของ chlorothalonil

มี ADI=0.015 mg/kg bw/d RfD =0.6 mg/kg bw/d ในขณะที่ JMPR (1994) กำหนดค่า ADI =0.03 mg/kg bw/d chlorothalonil เป็นสารที่สกัดได้ยากชนิดหนึ่ง ในการทดสอบความสามารถระหว่างห้องปฏิบัติการของ สหภาพยุโรป พบว่า chlorothalonil เป็นสารชนิดหนึ่งที่พบการรายงานผิดพลาด false negatives ว่าพบ chlorothalonil ใน leek ถึง 50% (Belmonte และคณะ,2012) chlorothalonil สามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง GC-ECD, GC/MS, LC-MS/MS และ GC-MS/MS นอกจากนี้ Perugia และคณะ (2013) ยังได้นำ chlorothalonil มาหา robustness ของวิธี GC-MS/MS ในผักและผลไม้ในขณะที่ Single Residue Method ใช้ LC-MS/MS ion source (APCI-neg-mode) ในการวิเคราะห์ (EURL, 2007)

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

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 GC-MS/MS, GC-ECD และ LC-MS/MS

7.1.5 สารมาตรฐาน chlorothalonil มีความบริสุทธิ์ 99.5%

7.1.6 สารเคมีต่างๆ ได้แก่ ethyl acetate ;EtAc (PR grade), acetonitrile; ACN (AR และ PR grade), acetone (AR grade), dichloromethane; CH₂Cl₂ (AR และ PR grade), sodium chloride; NaCl, sodium sulphate; Na₂SO₄ (ACS grade), disodium citrate, sodium citrate (ACS grade), primary secondary amine; PSA, magnesium sulfate anhydrous; MgSO₄, graphitized carbon black; GCB, envicarb.

7.2. วิธีการ

7.2.1 การเปรียบเทียบและเลือกวิธีวิเคราะห์

7.2.1.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

นำ สารมาตรฐาน chlorothalonil มาเตรียมที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml ด้วยตัวทำละลาย ACN และเจือจางให้มีความเข้มข้นจนถึง 0.01 µg/ml

7.2.1.2 การเตรียม matrix ของค่น้ำ และมะม่วง

เตรียม matrix ชนิดต่างๆ โดยใช้วิธีสกัด 2 แบบคือ Modified Steinwandter (1985) และ QuEChERS (EN15662, 2008) ในตัวอย่าง ค่น้ำ และมะม่วง โดยเลือกตัวอย่างพืชที่ปลูกด้วยระบบอินทรีย์ ตรวจสอบวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยวิธีทั้ง 2 และวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS และ LC-MS/MS ผลการวิเคราะห์ต้องไม่พบสารพิษตกค้างในตัวอย่าง จึงนำตัวอย่างพืชทั้งสองชนิดมาสกัดด้วยวิธีการทั้ง 2 แบบ (แผนภูมิที่ 1) และนำส่วนสารละลายที่มี matrix ของพืชนั้นละลายอยู่เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐานต่อไป

7.2.1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานใน matrix

นำสารละลายที่มี matrix ที่ได้จากการสกัด 2 วิธี แทนตัวทำละลายและเจือจางสารละลายมาตรฐาน chlorothalonil ให้มีความเข้มข้น 0.005 – 0.5 mg/kg

7.2.1.4 การตั้งสภาวะของเครื่องตรวจวิเคราะห์

1) Gas Chromatograph ชนิดที่มีหัวตรวจเป็น Electron Capture Detector (ECD)

GC model : Agilent 6890 N

Column ECD : Ultra 1 0.17 µm filter thickness, 25m length, 0.32 mm id.

Temperature : injector 200 °C , detector , 250 °C

Injection volume : 1 µl

2) Liquid Chromatograph /Triple Quadrupole Mass-spectrometry (LC-MS/MS)

instrument : Agilent Technologies 6460 Triple Quadrupole LC/MS

column : Kinetex 2.6µ XB – C18 100A 100 × 2.10 mm

Flow rate : 0.5 ml/min

column temp : 50°C

injection volume : 2 µl

mobile phase : A : 95% Water +5% ammonium formate ;

B : ACN+0.01% acetic acid

gradient :	Time	%B	flowrate (ml/min)
	0.00	30.00	0.5
	3.00	90.00	0.5
	6.00	90.00	0.5

6.01	30.00	0.5
11.00	30.00	0.5

run time : 11.00 min

MS conditions : gas temp : 300 °C
gas flow : 5 L/min
nebulizer : 45 psi
capillary : 3500 V

mode : ESI, positive, MRM

3) Gas Chromatograph tandem triple quadrupole mass-spectrometry (GC-MS/MS)

GC System : Agilent Technologies 7890B

mode : EI, MRM (70eV)

column : HP5-MS UI, 15m x 250um x 0.25um

carrier gas : He

Injection volumn: 2 ul

Injection mode: splitless

flow rate: 1 mL/min 280°C (RT locked)

MSD : Agilent 7000 GC Triple Quadrupole

ion source temp : 230°C

pre cursor ion : 263.8 m/z ;

product ion : 231, 229, 168 m/z

collision gas flow : N₂ 1.5 mL/min

dwel time 10 ms

collision enery: 20, 20, 25 V ตามลำดับ

7.2.1.5 การเลือกวิธีวิเคราะห์

- 1) เลือกวิธีการสกัด 2 วิธี คือ QuEChERS (EN15662, 2008) และ Modified Stainwandter (1985)
- 2) เลือก matrix ที่ใช้ระหว่างมะม่วงกับคะน้า
- 3) เลือกเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ GC-ECD, LC-MS/MS และ GC-MS/MS

7.2.1.6 การเลือกวิธีวิเคราะห์ที่ผลการทดสอบอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ และนำมาทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ด้วย parameter ต่างๆดังนี้ โดยเลือกวิธีการและเครื่องมือที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้วจึงนำมาทดสอบความใช้ได้ของวิธี

1) ความเป็นเส้นตรง (linearity)

นำสารละลายมาตรฐานของ chlorothalonil ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0.01-0.5 µg/ml อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น inject เข้าเครื่องที่ตรวจวิเคราะห์ นำ response หรือ peak area และความเข้มข้นของ chlorothalonil plot กราฟเส้นตรง โดย $R^2 \geq 0.995$

2) matrix effect

นำผลการ inject สารละลาย chlorothalonil ใน solvent (ACN) เปรียบเทียบกับ ผลการ inject สารละลาย chlorothalonil ใน matrix โดย plot graph ระหว่าง peak areas หรือ response กับ ความเข้มข้นของ chlorothalonil โดย $R^2 \geq 0.995$

3) accuracy ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยทำ recovery test ด้วยการ spike สารละลายมาตรฐาน chlorothalonil ลงในตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.50 mg/kg อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 5 ซ้ำ สกัดด้วยวิธีที่เลือกและตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องที่เหมาะสม เกณฑ์การยอมรับของ %recovery อยู่ระหว่าง 70-120% (SANCO,2013) %Recovery สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%Recovery = (C_f)/C_a \times 100$$

เมื่อ C_f = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้

C_a = ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารที่ spike ลงในตัวอย่าง

4) precision ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ หาได้จากการทำซ้ำ ซึ่งได้จากการทำ recovery 5 ซ้ำ นำผลที่ได้คำนวณหา SD และ %RSD SANCO (2013) กำหนดให้ %RSD จะต้อง <20%

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

5) linearity of working range

เป็นการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีตรวจวิเคราะห์ โดยการ spike สารละลายมาตรฐาน chlorothalonil ลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้น อย่างน้อย 5 ระดับ แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 5 ซ้ำ สกัด

ตัวอย่างด้วยวิธีที่เลือกและตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องที่เหมาะสมนำผลที่ได้ area peak หรือ response กับความเข้มข้นของ chlorothalonil plot กราฟเส้นตรง โดย R^2 มีค่า ≥ 0.995

6) Limit of quantitation, LOQ

เป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ด้วยการ spike สารละลายมาตรฐาน chlorothalonil ลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ได้จากการทำ linearity of working range ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) โดย $LOQ = 10SD$

7) Limit of detection, LOD นำผลของ SD ที่ได้จากการศึกษา LOQ คำนวณหา LOD

$LOD = 3SD$ และพิสูจน์ด้วย spike test การ spike สารละลายมาตรฐาน chlorothalonil ที่คำนวณได้ลงในตัวอย่าง ทำการสกัด 10 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบ response ที่ได้กับ matrix blank (control)

8. ระยะเวลา : ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

9. สถานที่ดำเนินการ : กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบและเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์

จากการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วย 2 วิธีการได้แก่ การสกัดด้วยวิธี Steinwandter และ QuEChERS พบว่า การสกัดด้วยวิธี Steinwandter ในตัวอย่างค่น้ำ สามารถวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ 0.002 mg/kg และในตัวอย่างมะม่วง 0.003 mg/kg ส่วนวิธีการสกัดด้วย QuEChERS ในตัวอย่างค่น้ำให้ผลวิเคราะห์ต่ำสุดที่ 0.01 mg/kg และในตัวอย่างมะม่วง 0.002 mg/kg วิธีการทั้งหมดใช้ LC-MS/MS (positive mode) ในการวิเคราะห์ในขณะที่ EU Reference Laboratories for Residue of Pesticides แนะนำให้ใช้ LC-MS/MS ion source (APCI-negative-mode) ซึ่งวิธีนี้ไม่ต้องใช้ buffer salt และไม่ใช่ dispersive-SPE cleanup เพียงทำตัวอย่างให้มี pH-1 แต่เนื่องจากห้องปฏิบัติการไม่มีอุปกรณ์ APCI วิธีการนี้จึงไม่สามารถใช้ได้จึงจำเป็นต้องพัฒนาในเฉพาะส่วนที่เครื่องมือมีอยู่ (EURL, 2007) จึงใช้ส่วน GC-ECD ใช้ตรวจวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ chlorothalonil ในมะม่วงและค่น้ำ เนื่องจากโครงสร้างของ chlorothalonil ซึ่งประกอบด้วย Cl3 atom จึงสามารถวิเคราะห์ด้วย GC-ECD ได้ ปริมาณที่ 0.002 mg/kg แต่ในการวิเคราะห์ พบ impurity มาก ซึ่งไม่เหมาะกับการพัฒนาเป็นวิธี

มาตรฐานประกอบกับจึงใช้ GC-MS/MS ในการวิเคราะห์หา chlorothalonil ได้และความซับซ้อนมีน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS จึงพัฒนาวิธีการด้วยการใช้ GC-MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์และใช้วิธี QuEChERS เป็นวิธีการสกัด ซึ่งใช้สารเคมีน้อยกว่าวิธี Steinwandter และประหยัดเวลามากกว่า ส่วนตัวอย่างทั้งคะน้ำและมะม่วงสามารถใช้ได้ใกล้เคียงกัน การเลือกใช้มะม่วงเป็น matrix จะเหมาะสมกว่าการใช้คะน้ำ โดยใช้เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ดังนี้ LC-MS/MS positive mode, GC-ECD, GC-MS/MS และทดสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ chlorothalonil ในตัวอย่างมะม่วงด้วยวิธีการสกัด QuEChERS และใช้ GC-MS/MS ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

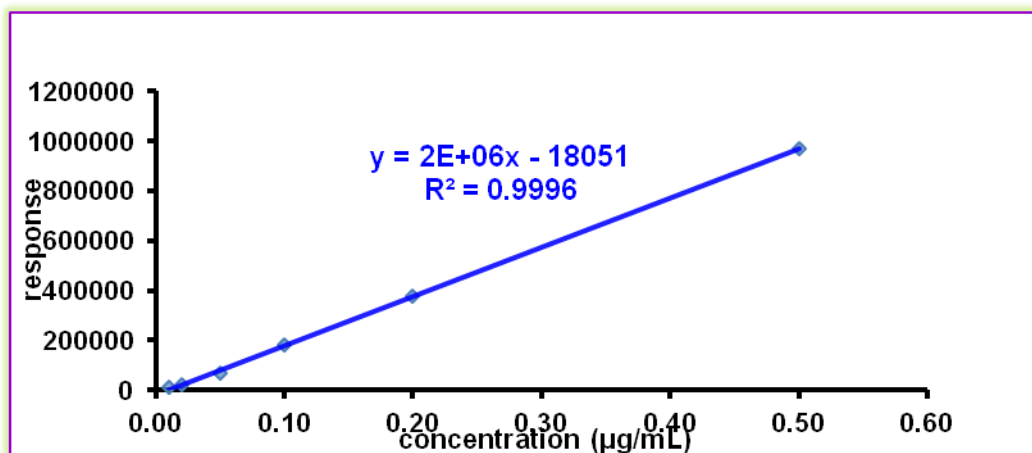
2. การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

วิธีการสกัด QuEChERS (EN15662, 2008) ในตัวอย่างมะม่วงโดยใช้ GC-MS/MS

2.1 ความเป็นเส้นตรง (linearity)

ผลจากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของสาร chlorothalonil ในตัวทำละลาย acetonitrile โดยนำ response ที่ได้จากการ inject chlorothalonil ที่ความเข้มข้นต่างๆ plot (ตารางที่ 1) กราฟ พบว่า ให้ความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.50 $\mu\text{g/ml}$ (รูปที่ 1) ให้สมการเส้นตรง ที่ $R^2 \geq 0.995$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่าง response กับความเข้มข้นของ chlorothalonil ที่ระดับต่างๆ

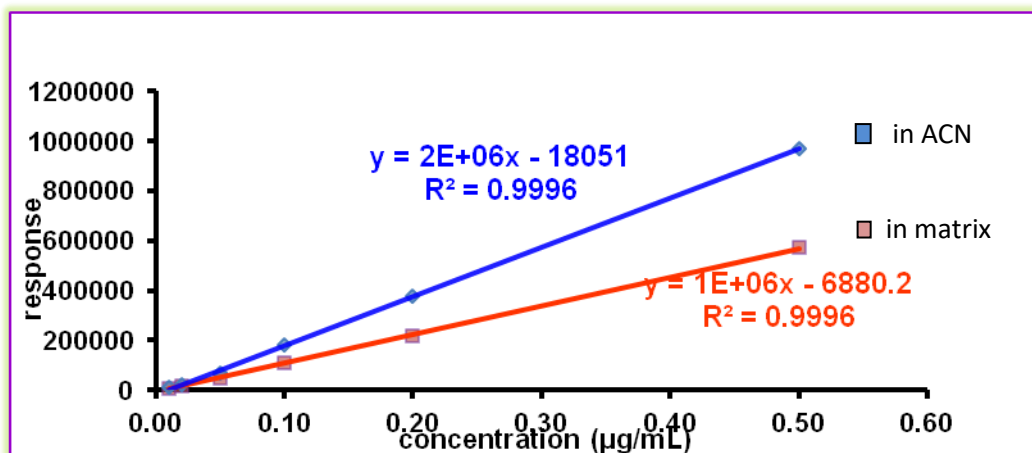


ตารางที่ 1 response ของ chlorothalonil ใน acetonitrile และใน matrix (mango) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Conc (µg/mL)	Peak area of Chlorothalonil	
	in ACN	in Mango
0.01	10906	8283
0.02	22611	16155
0.05	68239	50258
0.10	182138	111069
0.20	375106	215547
0.50	970598	572984

2.2 matrix effect

จากการ plot กราฟของ chlorothalonil ใน solvent เปรียบเทียบกับกราฟของ chlorothalonil ในมะม่วงที่ความเข้มข้น 0.01-0.50 µg/ml พบว่าที่ความเข้มข้นมากขึ้น chlorothalonil ที่ละลายใน solvent ให้ response สูง แต่เมื่อ chlorothalonil อยู่ใน matrix จะให้ response ต่ำกว่าใน solvent ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผลทำให้เกิดความผิดพลาดจาก matrix นั่นคือ เกิด matrix effect สำหรับในการวิเคราะห์หาปริมาณ chlorothalonil จะต้องเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่ละลายในเนื้อ matrix (มะม่วง) จึงจะได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องซึ่งเรียกว่า (ตารางที่ 1, รูปที่ 2 เส้นกราฟของ chlorothalonil ใน solvent ดังที่ได้กล่าวมาในข้อ 1 linearity ส่วนกราฟของ chlorothalonil ใน matrix มะม่วงให้ $R^2 = 0.9996$ แต่เส้นกราฟทั้ง 2 เส้น (กราฟของสารละลายมาตรฐานใน ACN และกราฟของสารละลายมาตรฐานใน matrix ของมะม่วง) มี slope ไม่เท่ากัน แสดงว่า matrix มีผลต่อการวิเคราะห์ matrix match calibration curve



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง response กับความเข้มข้นของ chlorothalonil ใน ACN ที่ระดับต่างๆ

2.3 Accuracy ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

จากการทำ recovery test ของ chlorothalonil ในมะม่วงที่ 6 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ สกัดด้วยวิธี QuEChERS และนำสารสกัดที่ได้ตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS คำนวณหา %recovery พบว่า average recovery อยู่ระหว่าง 90-105 % (ตารางที่ 2) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ SANCO (2013) ที่กำหนดให้อยู่ระหว่าง 70-120%

ตารางที่ 2 %recovery, SD และ %RSD ของ chlorothalonil ใน มะม่วง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Spiked level (mg/kg)	%Recovery							
	T1	T2	T3	T4	T5	mean	SD	%RSD
0.01	110	104	104	101	105	105	3.3	3
0.02	113	110	124	116	99	112	9.0	8
0.05	102	88	101	100	106	99	6.7	7
0.10	93	97	87	99	99	95	4.9	5
0.20	93	91	108	84	83	92	10.0	11
0.50	96	79	92	92	91	90	6.4	7

2.4 Precision ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

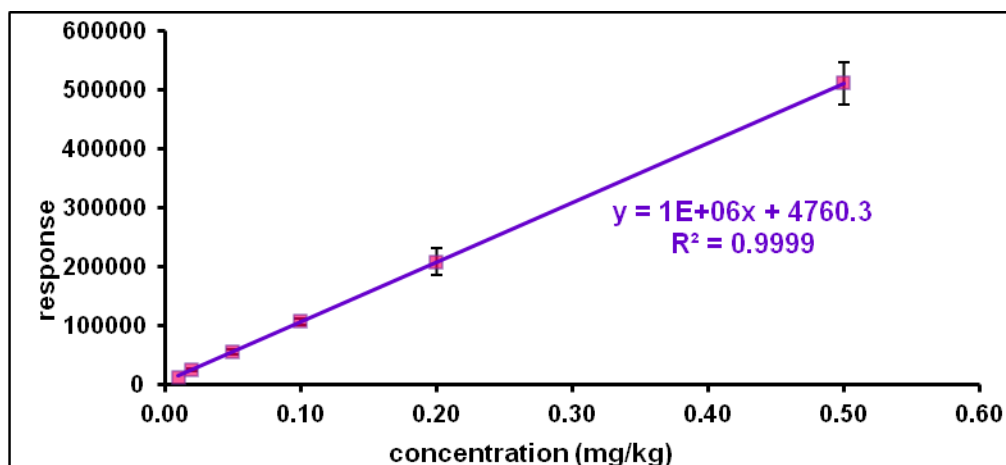
เป็นการนำผลที่ได้จากการทำซ้ำ 5 ซ้ำใน recovery test จากการหา accuracy มาคำนวณหา SD และ %RSD แต่ละความเข้มข้น โดย SANCO (2013) กำหนดให้ %RSD ของวิธีการจะต้อง <20% ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ด้วย QuEChERS ในมะม่วงและตรวจวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS นี้ได้ %RSD อยู่ระหว่าง 3-11% (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นช่วงของการยอมรับได้ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มี precision ที่เป็นค่าสากล

2.5 linearity of working range

เป็นการศึกษาหาช่วงความเข้มข้นของสารในการตรวจวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรงและที่มี accuracy และ precision ได้จากการ plot graph ระหว่าง response ของวิธีวิเคราะห์ chlorothalonil ในมะม่วงกับความเข้มข้น ที่ 0.01-0.5 mg/kg จะได้กราฟเส้นตรงมี $R^2=0.9999$ ซึ่งช่วงของความเข้มข้นนี้ใช้เป็นเกณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป (ตารางที่ 3, รูปที่ 3)

ตารางที่ 3 response ของ chlorothalonil ใน matrix (mango) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Conc (mg/kg)	response of Chlorothalonil in matrix						
	1	2	3	4	5	Average	SD
0.01	12424	11813	11740	11420	11813	11842.00	363.63
0.02	25655	24894	28055	26351	22445	25480.00	2060.01
0.05	57983	49940	57267	56437	59974	56320.20	3799.08
0.10	105691	109802	99124	111910	112642	107833.80	5569.12
0.20	211274	206044	245624	191173	188923	208607.60	22777.97
0.50	546425	450239	522979	523569	513446	511331.60	36241.34



รูปที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของ chlorothalonil ในตัวอย่างมะม่วงที่สกัดด้วยวิธี QuEChERS

2.6 Limit of quantitation, LOQ

เป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้หา accuracy และ precision ต้องมีความถูกต้อง แม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยการ spike สารละลายมาตรฐาน chlorothalonil ลงในตัวอย่างมะม่วง ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg 10 ซ้ำ นำผลของปริมาณที่ได้มาคำนวณหา SD และ LOQ = 10SD เมื่อ SD=0.001 LOQ = 10x0.001 = 0.01 mg/kg พิสูจน์ LOQ=0.01 mg/kg (ตารางที่ 4)

2.7 Limit of detection, LOD

LOD เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของวิธีที่เครื่องสามารถ detect ได้ทุกซ้ำ จากการศึกษ LOQ (ตารางที่ 4) เมื่อนำ $SD \times 3$ จะได้ค่า $LOD = 0.003 \text{ mg/kg}$ แต่สำหรับการทดลองนี้ปรับเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเพื่อให้มั่นใจสำหรับการตรวจวิเคราะห์ได้จึงใช้ $LOD = 0.005 \text{ mg/kg}$ ซึ่งสามารถทำได้โดย LOD ด้วยการทดสอบซ้ำ โดยการ spike chlorothalonil ในสารละลาย matrix 10 ซ้ำ inject GC-MS/MS พบว่าทุกค่าให้ response ซึ่งมากกว่า control สำหรับการทดลองนี้พิสูจน์ LOD ได้เท่ากับ 0.005 mg/kg

ตารางที่ 4 LOQ LOD และ response ที่ได้จากการสกัด chlorothalonil ในมะม่วง

Time	Conc (mg/kg)	Conc (mg/kg)	Response	
	0.01 (LOQ)	0.005 (LOD)	0.005 (LOD)	Control
1	0.0110	0.0085	3716	28
2	0.0104	0.0104	4561	
3	0.0104	0.0048	2089	
4	0.0101	0.0067	2959	
5	0.0105	0.0064	2804	
6	0.0082	0.0047	2079	
7	0.0090	0.0065	2862	
8	0.0089	0.0052	2299	
9	0.0086	0.0039	1731	
10	0.0082	0.0047	2050	
Ave.	0.00953	0.00618	-	
SD	0.001055	0.002	-	
%RSD	11	32	-	

LOQ= 10SD 0.010

LOD= 3SD 0.003

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ chlorothalonil ที่สกัดจากตัวอย่างมะม่วงโดยใช้วิธี QuEChERS และ GC-MS/MS นำมาสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 method performance ของการวิเคราะห์สาร chlorothalonil ในตัวอย่างมะม่วง

Pesticide	Linear range (mg kg ⁻¹)	Regression equation	R ²	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)
Chlorothalonil	0.01-0.5	$y = 1 \times 10^6 x + 4760.3$	0.999	0.005	0.01

11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเพื่อหาวิธีการตรวจวิเคราะห์ chlorothalonil ในคื่นหัดและมะม่วง ระหว่างการใช้วิธีวิธี Steinwandter กับ QuEChERS และระหว่าง matrix ของมะม่วงกับคื่นหัดและการเลือกใช้เครื่องมือสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทั้ง LC-MS/MS , GC-ECD และ GC-MS/MS วิธีการตรวจวิเคราะห์ chlorothalonil ในมะม่วงที่เหมาะสมที่สุดคือวิธี QuEChERS โดยใช้ GC-MS/MS ซึ่งได้พิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี(method validation) ด้วย parameter ต่างๆ ได้แก่ ความเป็นเส้นตรง linearity อยู่ที่ความเข้มข้น 0.01-0.5 µg/ml accuracy ความแม่นยำของวิธีโดย recovery อยู่ระหว่าง 90-105% precision ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยมี %RSD ระหว่าง 3-11% ช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ linearity of working range อยู่ระหว่าง 0.01-0.5 mg/kg และวิธีการนี้ได้ LOQ เท่ากับ 0.01 mg/kg และ LOD เท่ากับ 0.005 mg/kg วิธีการวิเคราะห์โดยใช้ GC-MS/MS เกิด matrix effect สารละลายมาตรฐานที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณจะต้องละลายใน matrix เสมอหรือใช้ matrix match calibration curve จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานได้

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- นำวิธีการตรวจวิเคราะห์ขอการรับรองห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ. กรมวิชาการเกษตร ได้โดยเพิ่ม method ที่ขอการรับรองในระบบ ISO/IEC17025
- นำวิธีการตรวจวิเคราะห์เผยแพร่ให้ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคใช้ chlorothalonil ได้
- เป็นวิธีมาตรฐานกลางเพื่อตรวจวิเคราะห์ chlorothalonil ในมะม่วง

13. เอกสารอ้างอิง

EN15662, 2008. Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and /or LC-MS/MS following acetonitrile extraction /partitioning and clean up dispersive SPE-QuEChERS-method. European Standard.

EURL, 2007. Modified QuEChERS-Method for the analysis of Chlorothalonil in Fruits and Vegetables.

http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuEChERSforChlorothalonil_2010.PDF

SANCO/12571/2013. Guidance document of analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed,

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

N.Belmonte Valles, M.Retamal, M. A.Martinez-Uroz, M.Mezcua, A.R.Fernandez-Alba and A.de Kok,, 2012. Determination of Chlorothalonil in difficult-to-analyse vegetable matrices using various multiresidue method in Analyst; 13; 2513-2520.

แผนภูมิที่ 1 การสกัดตัวอย่าง

<p style="text-align: center;">Modified Steinwandter (1985)</p>	<p style="text-align: center;">QuEChERS (EN15662,2008)</p>
<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 aliquot 2ml เปลี่ยน solvent เป็น acetonitrile</p> <p>↓ +300 mg MgSO₄</p> <p>↓ +200 mg PSA</p> <p>↓ +50mg Encicarb</p> <p>Collect solvent ใช้สำหรับเตรียมสารละลาย ตัวอย่าง</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</p> <p>↓ quasinhydrate</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</p> <p>ใช้สำหรับเตรียมสารละลาย ตัวอย่าง</p>