

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการ QuEChERS เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ โดยใช้ Gas Chromatograph/Mass Spectrometry

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Screening for Pesticide in Fruits and Vegetable by QuEChERS Method with GC-MS/MS

คณะทำงาน

ประชาติปต์ย์ พงษ์ภิญโญ พรณภัส วิชาชนะณานนท์ พชร เมินหา

กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ศึกษาหาวิธี และ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร โดยเลือกศึกษาวัตถุมีพิษการเกษตร bromfeninfos-methyl, bromfenvinphos, bromophos-ethyl, bromophos-methyl, carbophenothion, chlofenvinphos, chlorthiophos, coumaphos, edifenphos, ethion, fenamiphos, fenchlorphos, fenthion, iodofenphos, leptophos, malathion, methacrifos, profenofos, prothiofos, sulfotep, sulprofos, tebufos, tetrachlorvinfos และ tolclofos-methyl โดยใช้ GC-MS/MS วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณหลังจากการสกัดด้วยวิธี QuEChERS โดยใช้ตัวอย่างมะม่วงเป็นตัวแทนของผลไม้ที่มีไขมันและคลอโรฟิลล์ปริมาณน้อย จากผลการทดลองวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ยอมรับได้ โดยให้ค่า Recovery ของวิธีตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 74-118% และวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้ให้ค่า RSD น้อยกว่า 20%

Abstract

Method validation of the pesticide residue analysis in fruit and vegetable method were studied. The compounds of bromfeninfos-methyl, bromfenvinphos, bromophos-ethyl, bromophos-methyl, carbophenothion, chlofenvinphos, chlorthiophos, coumaphos, edifenphos, ethion, fenamiphos, fenchlorphos, fenthion, iodofenphos, leptophos, malathion, methacrifos, profenofos, prothiofos, sulfotep, sulprofos, tebufos, tetrachlorvinfos and tolclofos-methyl were selected for analysis by QuEChERS extraction and cleanup method and detected with GC-MS/MS instrument. Mango sample were chosen to represent the low fat and low chlorophyll sample. The study shown that the analysis method for the mentioned compounds were suitable with the recovery within 74-118% with overall of RDS less than 20%

บทนำ

ในปี พ.ศ. 2547 รัฐบาลได้ประกาศให้เป็นปีอาหารปลอดภัย (Food Safety) กรมวิชาการเกษตรได้กำหนดให้มียุทธศาสตร์ความปลอดภัยของผลิตผลการเกษตรที่ส่งไปขายยังต่างประเทศ จึงได้มอบหมายให้กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายทางการเกษตรในผลิตผลการเกษตรที่เป็นสินค้าส่งออก เพื่อออกใบรับรองคุณภาพของสินค้าเกษตร โดยในปัจจุบันวัตถุอันตรายทางการเกษตรแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณมากขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงความเป็นพิษของวัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีต่อสิ่งแวดล้อม และโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อตัวผู้บริโภคผ่านทางอาหารและน้ำ ทำให้องค์การอนามัยโลกต้องกำหนดค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้าง (Maximum residue limit; MRLs) โดยอ้างอิงพื้นฐานมาจากพฤติกรรมปริมาณการบริโภคที่ได้มากจากปริมาณการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรในแปลงของเกษตรกร ปริมาณสารพิษตกค้างในน้ำดื่มและในอาหารที่บริโภค

เพื่อเป็นการลดปัญหาการตรวจพบสารพิษตกค้างในผลิตผลการเกษตรเกินค่าปริมาณสูงสุดของสารพิษตกค้างที่ตรวจพบในประเทศปลายทาง โดยปกติสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงมากจนถึงระดับความเข้มข้นปานกลาง เมื่อทำการสกัดแล้วจะสามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้โดยเครื่อง Gas Chromatograph Mass Spectrometer (GC-MS/MS) ที่มีหัวตรวจวัดชนิด Triple Quadruple Mass Spectrometer (QQQ) สกัดสารพิษตกค้างตามวิธีมาตรฐานของ QuEChERS (ย่อมาจาก “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged และ Safe) ซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดสารพิษตกค้างที่เป็นที่นิยมที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากใช้ปริมาณตัวอย่างและสารเคมีในปริมาณน้อย ทำให้ลดการสิ้นเปลืองสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จึงห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรในปัจจุบันได้นำเครื่อง (GC-MS/MS) มาใช้มากขึ้นเพื่อช่วยในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจำนวนมากในผลิตผลทางการเกษตร

การศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะทดสอบการใช้ได้ของวิธีทดสอบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS ในตัวอย่างผลิตผลทางการเกษตร โดยใช้ GC-MS/MS สำหรับการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างแบบ multiresidue

## วิธีดำเนินการ

### 1. สารเคมี

- 1.1 สารมาตรฐานวัตถุมีพิษการเกษตร: 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 เตรียมโดยซึ่งสามารถมาตรฐานวัตถุมีพิษปริมาณประมาณ 10 mg โดยใช้เครื่องซึ่งความละเอียด 5 ตำแหน่ง นำมาละลายใน 10 ml toluene ส่วน GC/MS mixed standard stock solution จะเตรียมโดยละลาย 1 ml ของสารมาตรฐานแต่ละตัวใน 100 ml ethyl acetate และเจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 0.5 ug/ml, 1.00 ug/ml และ 2.00 ug/ml Matrix-matched mixed standards จะเตรียมโดยนำ mixed standard solution ความเข้มข้น 10 ug/ml ปริมาณ 10 ml มาเป่าด้วยไนโตรเจนอย่างช้าๆจนเกือบแห้ง แล้วนำมาละลายด้วย blank extract ของมะม่วง จนได้ปริมาตร 10 ml แล้วนำมาเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้นสำหรับใช้งาน สารละลายมาตรฐานทั้ง single และ mixed จะเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 C และห่างจากแสง

ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยสกัดด้วยวิธี QuEChERS และตรวจด้วย GC-MS/MS พบว่าตรวจไม่พบสารพิษตกค้างใน Blank samples ที่นำมาใช้ในการทดลองทั้งในส่วนของการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี และในการทำ matrix-matched standards

## 2. การเตรียมตัวอย่าง

- 2.1 Homogenize ตัวอย่างมะม่วงปริมาณ 500 g
- 2.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 g ที่ homogenize 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 sesquihydrate ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ ) แล้วนำไปเขย่าทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที
- 2.5 ตัวอย่างที่มีความเป็นกรดจะเติมสารละลาย 6 N NaOH 600  $\mu$ l เพื่อให้ได้ค่า pH อยู่ในช่วง 5-5.5
- 2.6 Centrifuge สารละลายที่สกัดได้ ที่ความเร็วรอบ 3500 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 3500 rpm เป็นเวลา 3 นาที
- 2.9 ถ่ายสารละลายที่สกัดได้ใส่ใน autosampler vial ที่มีสารละลาย 5% formic acid 15  $\mu$ l (เพื่อกันสารละลายที่สกัดได้เกิดการสลายตัว)

## 3. การตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจะใช้เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์คือ (Agilent Technologies) GC-MS/MS. ใช้คอลัมน์ชนิด HP 5MS (30 m x 0.25 mm i.d.) (Agilent Technologies, USA) fused silica capillary column ที่มีขนาดความหนาของฟิล์ม 0.25  $\mu\text{m}$  และใช้ฮีเลียมเป็น carrier gas ที่ constant pressure และทำการปรับความดันทุกวันโดยใช้โปรแกรม RT-Lock

#### สภาวะของ GC

Column:	Agilent J&W DB-5ms, 30 m x 0.25 mm, 0.25 $\mu\text{m}$
Inlet:	Split/Split less
Inlet liner:	Splitless, single taper, Ultra Inert liner with glass wool
Carrier:	Helium
Inlet pressure:	36 psi (constant pressure mode) ระหว่างรัน, 1 psi ระหว่าง backflush
Inlet temp:	280 C
Inj vol:	1 $\mu\text{L}$
Purge flow to split vent:	30 mL/min at 0.75 min
Gas saver:	On (20 mL/min at 2.0 min)
Oven temp:	70 C (1 min) 50 C/min to 150 C (0 min) 6 C/min to 200 C (0 min) 16 C/min to 280 C (5.5 min)
Capillary flow:	Back flushing และ retention gap
Retention time locking:	Chlorpyrifos-methyl locked ที่เวลา 16.593 min

#### สภาวะของ Mass Spectrometer

Spectrometer:	Triple Quadrupole
Mode:	Electron Impact
Transfer line temp:	280 C
Solvent delay:	2.3 min
Source temp:	300 C
Quadrupole temp:	Q1 และ Q2 = 180 C

#### 4. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Validation Study)

ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวิธี QuEChERS โดยเลือกให้มะม่วงเป็นตัวแทนของผลไม้ การตรวจสอบค่า Accuracy และ Precision จะพิจารณาจากค่า recovery ของการทดสอบที่มีการทำซ้ำ 10 ซ้ำ ตัวอย่างก่อนการตรวจวิเคราะห์จะทำการ spike ที่ไว้อย่างน้อย 30 นาทีก่อนเริ่มการสกัดเพื่อให้วัตถุอันตรายทางการเกษตรแทรกตัวเข้าไปอยู่ในเนื้อมะม่วง

#### ผลการทดลองและวิจารณ์

วิเคราะห์ตัวอย่างที่ทำการ spike ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ 0.5 มก./กก. และ calibration curve อยู่ในช่วง 0.05, 0.01, 0.1 และ 0.5 มก./กก. ซึ่งทุกตัวได้กราฟที่มีความเป็นเส้นตรงมากกว่า  $R^2=0.995$  ค่าความสามารถของการวิเคราะห์ Recovery มีค่าอยู่ในช่วง 74 ถึง 118 % ตามที่ได้แสดงในตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** แสดงผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง, Limit of Detection (LOD), Limit of Quantitation (LOQ), RSD, Recovery และ MRM transitions

Pesticide	RT(min)	LOD	LOQ	RSD(%)	Rec(%)	Quant	CE(V)	Qual	CE(V)
Methacrifos	10.00	0.0089	0.01	12.5	94	125>79	6	180>93 240>180	8 10
Sulfotep	12.49	0.0007	0.025	9.7	93	202>146	10	322>146 322>202	23 10
Terbufos	13.66	0.0085	0.0257	12.6	87	231>129	23	231>175 231>203	12 8
Tolclofos-methyl	15.17	0.0017	0.0122	7.5	110	265>250	10	267>252 265>93	10 25
Fenchlorphos	15.41	0.0057	0.0135	16	87	285>270	11	285>240 287>272	23 11
Malathion	15.93	0.0095	0.0105	11.2	92	127>99	6	173>99 173>127	13 6
Fenthion	16.15	0.044	0.013	13.4	110	278>109	18	279>169 278>125	17 22
Bromophos-methyl	16.60	0.0014	0.0023	18.0	89	331>316	13	329>314 331>286	13 26
Chlorfenvinphos 1	16.87	0.0059	0.0135	10.1	110	267>159	15	323>267 295>267	10 5
Bromfenvinphos-methyl	17.13	0.0229	0.0757	15.7	87	295>109	15	109<79 295>93	5 10
Chlorfenvinphos 2	17.13	0.0050	0.0115	13	97	267>159	15	323>267 295>267	10 5
Bromophos-ethyl	17.58	0.0067	0.0115	16.9	87	359>303	17	357>301 331>303	15 8
Tetrachlorvinphos	17.74	0.0076	0.0110	15.7	110	331>109	20	333>109 331>79	17 30
Fenamiphos	17.98	0.0055	0.0112	11.9	84	303>195	8	217>202 303>154	9 15
Bromfenvinphos	17.98	0.0091	0.0105	16.1	77	323>267	10	267>159 325>269	15 10

Iodofenfos	18.10	0.0066	0.0117	13.1	86	377>362	15	377>322 377>93	30 34
Prothiofos	18.15	0.0086	0.0103	17.9	78	309>239	15	267>239 267>221	8 16
Profenofos	18.22	0.0078	0.0116	14.6	79	337>267	13	339>269 339>188	13 30
Chlorthiophos 1	18.94	0.0096	0.0150	19.0	88	257>239	12	257>165 257>193	26 16
Chlorthiophos 2	19.12	0.0084	0.0132	16.4	77	257>239	12	257>165 257>193	26 16
Ethion	19.32	0.0077	0.0125	14.6	76	153>97	10	231>129 231>175	24 10
Chlorthiophos 3	19.40	0.0068	0.0118	17.6	89	257>239	12	257>165 257>193	26 16
Sulprofos	19.58	0.0098	0.0108	13.5	87	156>141	13	322>156 322>97	8 24
Carbophenothion	19.78	0.0078	0.0112	14.3	87	125>97	6	342>157 199>143	10 10
Edifenfos	19.88	0.0078	0.0114	16.9	78	173>109	8	109>65 310>109	13 29
Leptophos	21.94	0.0068	0.0110	14.5	92	171>77	18	171>124 377>269	8 37
Coumaphos	23.40	0.0086	0.0128	17.6	78	210>182	10	362>109 362>226	17 13

ผลการวิเคราะห์ที่ได้ในตารางที่ 1 นำค่า Recovery และผลการคำนวณ RSD มาใช้ในการคำนวณ Limit of Quantitation (LOQ) โดยอ้างอิงจากข้อกำหนดของ SANCO European SANCO Guideline (Commission of the European Communities, 2006)ที่ได้กำหนดไว้ว่า ค่า Recovery ต้องอยู่ในช่วง 70 ถึง 120% และ RSD ต้องมีค่าต่ำกว่า 20%

#### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การตรวจวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างด้วยวิธี QuEChERS สามารถนำมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการสกัดสารพิษตกค้าง bromfeninfos-methyl, bromfenvinphos, bromophos-ethyl, bromophos-methyl, carbophenothion, chlorfenvinphos, chlorthiophos, coumaphos, edifenfos, ethion, fenamiphos, fenchlorphos, fenthion, iodofenfos, leptophos, malathion, methacrifos, profenofos, prothiofos, sulfotep, sulprofos,

tebufos, tetrachlorvinfos และ tolclofos-methyl ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS/MS โดยเป็นวิธีที่รวดเร็วและให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

### เอกสารอ้างอิง

Anastassiades, M., & Lehothay, 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 auto-

mated data evaluation. Journal of Chromatography A, 892, 347-377