รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

   กิจกรรม : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ chiral pesticides 6 ชนิดในมะม่วง โดยใช้คอลัมน์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรกราฟี (high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry)

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of multi-residue analysis method for 6 chiral pesticides in mango by chiral column chromatography coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวพรนภัส วิชานนะณานนท์	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
ผู้ร่วมงาน	: นายประชาธิปัตย์ พงษ์ภิญโญ	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
	นางสาวพชร เมินหา	กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้เสนอวิธีพัฒนาและตรวจสอบสารพิษตกค้าง chiral pesticides 6 ชนิด (benalaxyl, difenoconazole, fenamiphos, indoxacarb, paclobutrazol และ quizalofop-ethyl) ในมะม่วงด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเดมแมสสเปกโทรกราฟี โดยใช้คอลัมน์ amylose chiral stationary phase (i-Amylose-1 column) ภายใต้ gradient elution ระหว่าง acetonitrile กับ 2 mM ammonium acetate ในน้ำ ในการหาชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง chiral pesticides ในมะม่วง สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN15662:2008) และ cleaned-up ด้วยตัวดูดซับของแข็ง จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด มีค่าเฉลี่ยของการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 80-103 ซึ่งมีความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ยไม่เกิน 11 ขีดจำกัดของการตรวจพบ เท่ากับ 0.002 mg/kg และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.005 mg/kg นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาตัวแปรต่างๆ ประกอบด้วยความเฉพาะเจาะจง, ผลกระทบของเมทริกซ์, ความแม่น, ความเที่ยง, ช่วงของการทดสอบ และ ความเป็นเส้นตรง จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดในมะม่วงมีความน่าเชื่อถือ

Abstract

The objective of this work is to study an appropriated enantioselective method for 6 chiral pesticides determination; benalaxyl, difenoconazole, fenamiphos, indoxacarb, paclobutrazol and quizalofop-ethyl in mangoes by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The residues of chiral pesticides in mangoes were extracted by QuEChERS method (EN15662:2008) following cleaning up with solid phase extraction (SPE). Separations of the chiral pesticides were performed via an amylose chiral stationary phase, i-Amylose-1 column, under gradient elution using a mixture of acetonitrile and 2 mM ammonium acetate in water as mobile phase. Under optimal conditions, mean recoveries for all studied analytes were ranged from 80% to 103% with the relative standard deviations (RSD) less than 11%. Limits of detection (LOD) for all enantiomers were 0.002 mg/kg, while limits of quantification were 0.005 mg/kg. In addition, parameters including the specificity/selectivity, matrix effect, accuracy, precision working range and linearity were also investigated. The results of method validation confirmed that this developed method is reliable for determination of 6 chiral pesticides in mangoes.

6. คำนำ

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา การใช้สารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งร้อยละ 30 ของการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชนั้น เป็นสารประกอบ chiral หรือ chiral pesticides ในกระบวนการผลิต chiral pesticides นั้นจะเป็นสารผสมของ enantiomer ที่เรียกว่า racemic mixture ของสารนั้นๆ ในการประเมินและพิจารณาคุณสมบัติของสาร chiral pesticides นี้ จึงมีลักษณะเดียวกับ achiral pesticides แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาโครงสร้าง stereoisomer ที่แตกต่างกันของสารประกอบ chiral พบว่า อาจส่งผลมีคุณสมบัติต่างๆที่แตกต่างกัน เช่น ฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactivity), ความเป็นพิษ (toxicity), เมแทบอลิซึม (metabolism) และกระบวนการการสลายตัว (degradation behavior) เป็นต้น ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ enantiomerselective ของ chiral pesticide จะทำให้ได้ข้อมูลในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ chiral pesticides ที่ถูกต้อง ซึ่งมีผลต่อการประเมินความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัยของด้านอาหาร (Li X., et al., 2011)

High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ enantiomerselective ของ chiral pesticides ภายใต้ stationary phase ต่างๆ เช่น cellulose, cyclodextrin และ amylase เป็นต้น จากการทบทวนวรรณกรรมของการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ในตัวอย่างชนิดต่างๆ พบว่า คอลัมน์ที่มี amylase tris (3, 5-dimethylphenylcarbamate) เป็นตัวดูดซับที่สามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง chiral pesticides ได้อย่างหลากหลาย ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงเลือกคอลัมน์ดังกล่าวมาใช้ในการพัฒนาและตรวจสอบ

ความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ chiral pesticides 6 ชนิดมะม่วง (Yaunbo L., *et al.,* 2013)

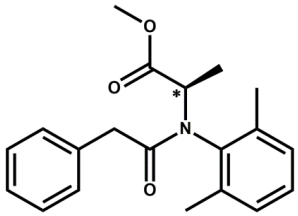
มะม่วง เป็นผลไม้ที่หากินได้ง่ายและมีการปลูกในทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีการศึกษาหรืองานวิจัยรองรับจำนวนมาก มีผลการวิจัยและการค้นพบประโยชน์ทางสุขภาพ เช่น ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรค หรือช่วยชะลอวัย มะม่วงจัดอยู่ในกลุ่มหลัก 006 ผลไม้เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนที่เปลือกบริโภคไม่ได้ (assorted tropical and sub-tropical fruits-inedible peel) นอกจากนี้มะม่วงมีความสมดุลระหว่างปริมาณผลผลิตแต่ละปีกับปริมาณความต้องการของผู้บริโภค และมีการพัฒนาจนสามารถกระจายผลผลิตได้ตลอดปี ดังนั้น มะม่วงจึงเป็นตัวอย่างที่ง่ายต่อการนำทำงานวิจัยต่อไป (Paul M. G., 2009)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการพัฒนา ปรับปรุง หรือดัดแปลงวิธีให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และมีจุดมุ่งหมายเพื่อแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นมานั้นเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ สำหรับขั้นตอนในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์มีรายการที่ทำการพิสูจน์คุณลักษณะต่างๆ ได้แก่ ความเฉพาะเจาะจง (specificity/Selectivity), ช่วงของการใช้งาน (working range), ความเป็นเส้นตรง (linearity), ความถูกต้อง (accuracy), ความเที่ยง (precision), ขีดจำกัดของวิธีเชิงคุณภาพ (limit of detection, LOD) และขีดจำกัดของวิธีเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) เป็นต้น (ทิพวรรณ, 2549)

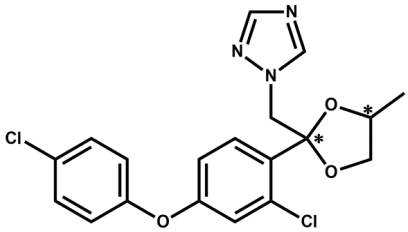
7. วิธีดำเนินการ

7.1 สารเคมี

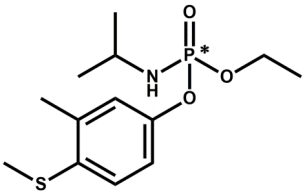
1) สารมาตรฐาน chiral pesticide 6 ชนิด ได้แก่ benalaxyl, difenoconazole, fenamiphos, indoxacarb, paclobutrazol และ quizalofop-etyl
2) acetonitrile (AR และ HPLC grade)
3) ethyl acetate (AR grade)
4) ammonium acetate (CH_3COONH_4)
5) น้ำ (HPLC grade)
6) magnesium sulphate ($MgSO_4$, anhydrous)
7) Primary Secondary Amine (PSA)
8) sodium chloride (NaCl, AR grade)
9) sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
10) sodium sulphate (Na_2SO_4, anhydrous, granular)
11) di-sodium hydrogen citrate esequihydrate ($C_6H_6Na_2O_7 \bullet 1.5H_2O$)
12) tri-sodium citrate dehydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \bullet 2H_2O$)



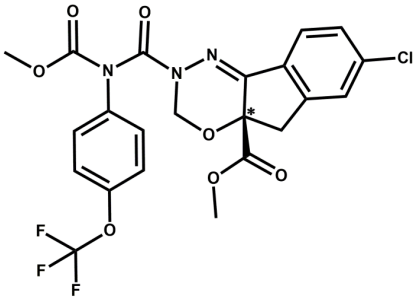
Benalaxyl



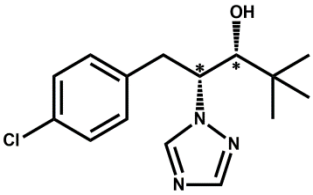
Difenoconazole



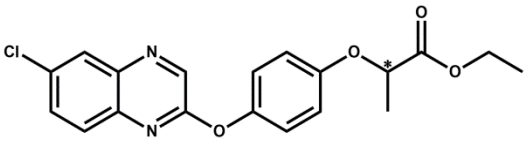
Fenamiphos



Indoxacarb



Paclobutrazol



Quizalofop – ethyl

Figure 1 Chemical structure of studied chiral pesticides, *chiral center (Elin M. U., *et al.*, 2012)

7.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1) ตัวอย่างมะม่วงที่ตรวจไม่พบสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด

2) เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น autosampler vial บีกเกอร์ ขวดแก้ว ขวดปรับปริมาตร และแท่งแก้วคนสาร เป็นต้น

3) หลอด centrifuge ขนาด 15 และ 50 mL

4) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งและ 5 ตำแหน่ง

5) micropipette ขนาด 10-100, 100-1,000 และ 500-5,000 µL

6) syringe filter, PTFE 0.2 µm

7) เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ nitrogen evaporator, centrifuge, ultrasonic bath, freezer (-20°C) และ เครื่องปั่นตัวอย่าง

8) คอลัมน์ Lux 5 µm i-Amylose-1 (amylase tris(3, 5-dimethylphenylcarbamate)) ขนาด 150 x 4.6 mm

9) เครื่องตรวจวิเคราะห์ high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS)

7.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HPLC-MS/MS

ทดสอบโดยการเตรียมสารมาตรฐาน chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วย เทคนิค HPLC-MS/MS ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1) ส่วน high performance liquid chromatograph ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ buffer ที่เหมาะ เพื่อใช้เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) คู่กับ acetonitrile, อุณหภูมิคอลัมน์ และ ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานรวม (mixed standard) ของสารพิษตกค้างของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-MS/MS ที่สภาวะต่างๆ และเปรียบเทียบค่าความไวในการตรวจวัด (sensitivity) และ Retention time (RT) ของสารพิษตกค้างทั้ง 6 ชนิด

2) ส่วน mass spectrometer ศึกษา precursor, product ion 1, product ion 2, fragmentor และ collision ที่เหมาะสมของสารพิษตกค้างของ chiral pesticide แต่ละชนิด โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานของ chiral pesticides แยกแต่ละชนิด ทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-MS/MS ที่สภาวะต่างๆ และเปรียบเทียบ sensitivity ของสารพิษตกค้างแต่ละชนิด หลังจากนั้น เตรียมสารละลาย mixed standard ของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL ฉีดเข้าเครื่อง HPLC-MS/MS อีกครั้ง เพื่อศึกษา dwell time ที่เหมาะสม

7.4 การเตรียมตัวอย่าง (Sample Preparation)

1) บดเนื้อและเปลือกมะม่วงโดยใส่ไนโตรเจนเหลวและบดด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20±5°C

2) สุ่มชั่งตัวอย่างมะม่วง 10 g ในหลอด centrifuge ขนาด 50 mL เพื่อสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS และ ethyl acetate ดังนี้

2.1) วิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) สกัดตัวอย่างด้วย acetonitrile 10 mL เขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติม $MgSO_4$ 4 g, NaCl 1 g, $C_6H_5Na_3O_7 \bullet 2H_2O$ 1 g และ $C_6H_6Na_2O_7 \bullet 1.5H_2O$ 0.5 g แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลาย 5 mL ใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 mL ที่มี $MgSO_4$ 750 mg และ PSA 125 mg เขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วกรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter ใส่ขวดแก้วขนาด 10 mL ดูดสารละลายที่ได้ 500 µL ใส่ autosampler vial เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของ chiral pesticide ทั้ง 6 ชนิดต่อไป

2.2) วิธี Ethyl acetate (Tuija P., 2007) สกัดตัวอย่างด้วย ethyl acetate 20 mL เขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติม $NaHCO_3$ 3 g และ Na_2SO_4 10 g เขย่าเป็นเวลา 1 นาที และนำไป ultrasonic นาน 3 นาที แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น กรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe

filter ใส่ขวดแก้วขนาด 10 mL ดูดสารละลายที่ได้ 500 µL ใส่ autosampler vial และเป่าให้แห้งด้วยเครื่อง nitrogen evaporator แล้วเติม acetonitrile 500 µL เพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของ chiral pesticide ทั้ง 6 ชนิดต่อไป

3) เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่าง โดย spiked samples ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05 และ 0.5 mg/kg ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS และ ethyl Acetate แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS คำนวณร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด

7.5 การตรวจสอบความใช้ได้ของของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ศึกษาตัวแปรสำคัญ (key parameters) ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด (Eurachem, 2014) โดยวิธี QuEChERS (EN 15662, 2008) ได้แก่

1) ความเฉพาะเจาะจง (specificity/selectivity) เตรียมสารละลาย matrix blank และ spiked สารมาตรฐานในสารละลาย matrix blank ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL จำนวน 3 ซ้ำ (n=3) แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS เพื่อเปรียบเทียบ chromatogram ของ matrix blank กับ spiked matrix blank

2) ผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect) ทดสอบที่ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.002, 0.005, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 และ 1.2 µg/mL ในตัวทำละลาย acetonitrile และ สารละลาย spiked matrix blank ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่าง standard calibration in solvent กับ matrix matched calibration หา slope และวิเคราะห์ signal suppression/enhancement (SSE) ตามสมการที่ (1) (Xinzhong Z., *et al.*, 2014)

$$\mathrm{SSE} = \frac{\textbf{slope matrix match calibration}}{\textbf{standard calibration in solvent}} \qquad \text{สมการที่ (1)}$$

3) ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (Precision) ทดสอบโดยการ spiked samples ที่ 11 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.005 ถึง 10.0 mg/kg ไม่น้อยกว่า 8 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น (n≥8) แล้วสกัดตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS

3.1) คำนวณ %recovery ของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ตามสมการที่ (2) เพื่อตรวจสอบ accuracy

$$\%\mathrm{Recovery} = \frac{x_1 - x_2}{c} \times 100 \qquad \text{สมการที่ (2)}$$

เมื่อ x_1 = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่างที่ตรวจพบ (mg/kg)

X_2= ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบใน sample blank (mg/kg)

c = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง (mg/kg)

3.2) คำนวณร้อยละความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย (%RSD) ตามสมการที่ (3) เพื่อประเมิน precision

$$\%\mathrm{RSD} = \frac{\mathrm{SD}}{\bar{x}} \times 100 \qquad \text{สมการที่ (3)}$$

เมื่อ $\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้

%RSD = ร้อยละความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย

4) ช่วงของการทดสอบ (working range) และ ความเป็นเส้นตรง (linearity) ทำการ spiked samples ที่ 11 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.005 ถึง 10.0 mg/kg ไม่น้อยกว่า 8 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น ($n \geq 8$) แล้วสกัดตัวอย่าง เพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS

4.1) คำนวณ accuracy และ precision ของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ที่ทุกระดับความเข้มข้น เพื่อตรวจสอบ working range

4.2) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ที่ spiked ทั้ง 6 ชนิด (แกน x) กับ ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (แกน y) เพื่อพิสูจน์ linearity

5) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ) ทำการ spiked samples ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แล้วสกัดตัวอย่าง เพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS ซึ่ง LOQ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ปริมาณได้ ซึ่งพิสูจน์ที่ 10 ซ้ำ (n=10) โดยมี accuracy และ precision อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

6) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) นำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของ LOQ พิจารณา 3SD และ 10SD มาประเมินค่า LOD และทำการ spiked samples ที่ความเข้มข้นดังกล่าว 10 ซ้ำ (n=10) แล้วสกัดตัวอย่าง เพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS

เวลาและสถานที่

เวลา: ตุลาคม พ.ศ. 2560 - กันยายน พ.ศ. 2562

สถานที่: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด โดยเทคนิค HPLC-MS/MS

จากการศึกษาสภาวะในการวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL ด้วยเครื่อง HPLC-MS/MS: Agilent 1200 HPLC และ Agilent 6410 Triple Quadrupole LC/MS-MS พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด มีรายละเอียดดังนี้

<u>High Performance Liquid Chromatograph</u>

Column:	Lux 5 µm i-Amylose-1 (Amylase tris(3, 5-dimethylphenylcarbamate)) ขนาด 150 x 4.6 mm
Mobile phase:	A: 2 mM Ammonium Acetate ในน้ำ B: Acetonitrile
Flow rate:	0.45 mL/min

Gradient Program:	Time	A (%)	B (%)
	0.0	94	6
	15.0	94	6
	25.0	2	98
	26.0	2	98
	31.0	94	6
	32.0	45	55
	35.0	45	55

Column Oven Control Temperature: 25°C

Injection volume: 2 µL

Mass Spectrometer

Ionization Mode: Electrospray ionization in positive mode

Gas temperature: 250°C

Gas flow: 11 L/min

Nebulizer: 35 psi

Sheath Gas Heater: 300°C

Sheath Gas Flow: 10

Capillary: 4,000 V

MS/MS Scan Parameter: Multi Reaction Monitoring (MRM)

	Precursor ion	Product ion	Frag (V)	CE (V)
Benalaxyl	326.2	294.1	100	4
	326.2	148.1	100	27
	326.2	91.1	100	48
Difenoconaazole	406.1	337	80	10
	406.1	251	80	20
	406.1	188	80	40
Fenamiphos	304.1	234	120	12
	304.1	217.1	120	20
	304.1	202	120	36
Indoxacarb	528.1	218.2	100	10
	528.1	190	100	28
	528.1	150	100	20

Paclobutrazol	294.1	125.2	80	30
	294.1	89.1	80	70
	294.1	70.1	80	10
Quizalofop-ethyl	373.1	299.1	110	16
	373.1	271.2	110	24
	373.1	91.1	110	32

เมื่อทดสอบฉีดสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า สามารถแยก peak ระหว่าง enantiomer ของสารมาตรฐาน chiral pesticide ทั้ง 6 ชนิด ได้ดัง Figure 2 และสามารถหา enantiomer resolution (R_s) ของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดได้ตามสมการที่ (4) (Yuanbo L., *et al.*, 2013) ดังแสดงใน Table 1

$$R_s = 2\left(\frac{RT_2 - RT_1}{W_1 + W_2}\right)$$ สมการที่ (4)

เมื่อ RT_1 = retention time of first-eluted analyte enantiomer

RT_2 = retention time of second-eluted analyte enantiomer

R_s = enantiomer resolution

Table 1 Enantiomer separation of 6 chiral pesticides through i-amylose-1 column (n=3)

Analyte	RT_1	RT_2	R_s
Benalaxyl	13.30	15.03	0.87±0.01
(2R, 4R; 2S, 4S)-Difenoconazole	22.43	23.87	0.62±0.01
Fenamiphos	11.15	13.55	1.06±0.05
Indoxacarb	22.69	24.33	0.95±0.08
(2R, 3R; 2S, 3S)-Paclobutrazol	9.26	12.87	1.91±0.08
Quizalofop-ethyl	28.21	30.11	0.77±0.08

RT_1 = retention time of first-eluted analyte enantiomer

RT_2 = retention time of second-eluted analyte enantiomer

R_s = enantiomer resolution

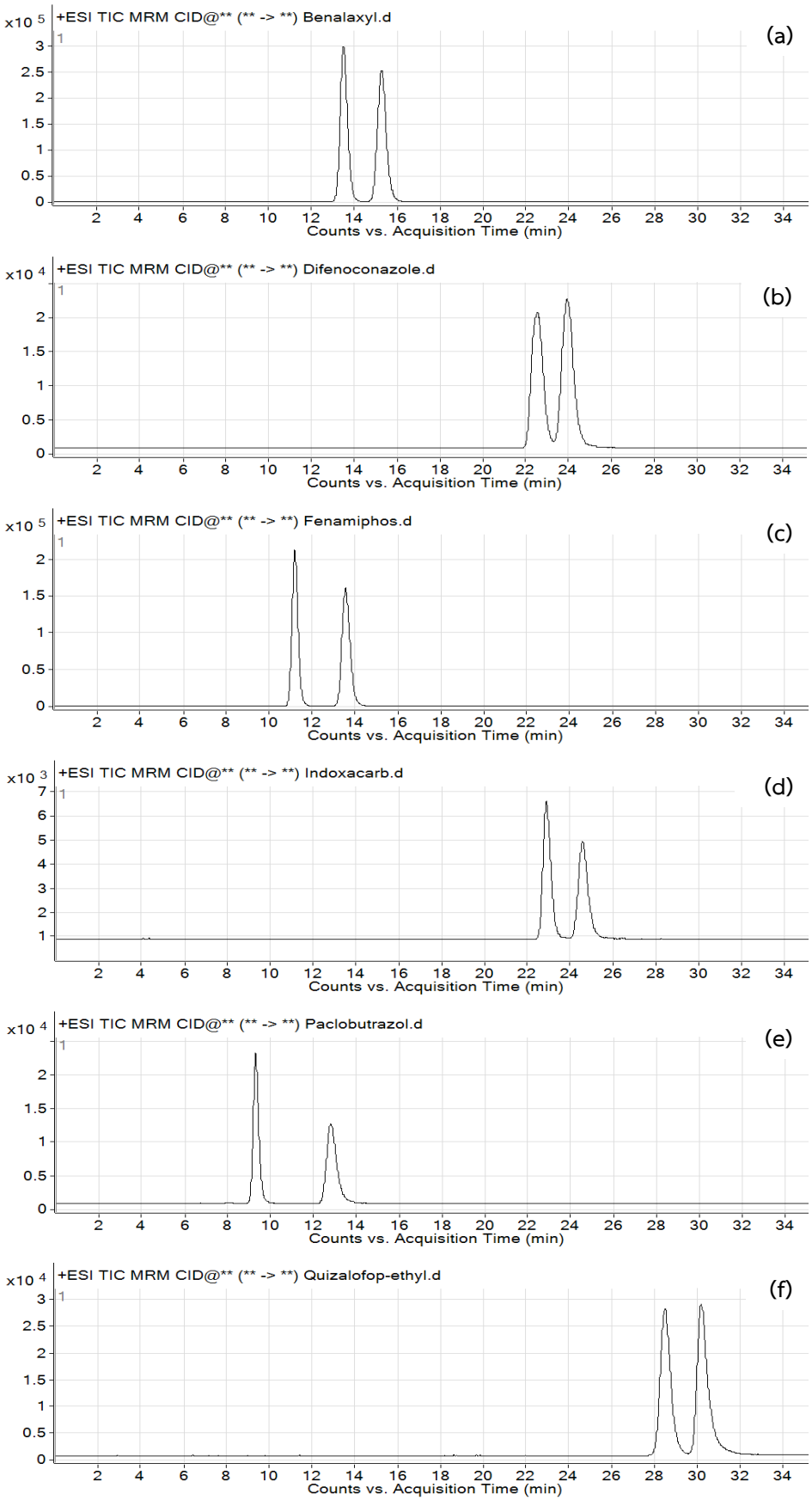

+ESI TIC MRM CID@** (** -> **) Benalaxyl.d
(a)
+ESI TIC MRM CID@** (** -> **) Difenoconazole.d
(b)
+ESI TIC MRM CID@** (** -> **) Fenamiphos.d
(c)
+ESI TIC MRM CID@** (** -> **) Indoxacarb.d
(d)
+ESI TIC MRM CID@** (** -> **) Paclobutrazol.d
(e)
+ESI TIC MRM CID@** (** -> **) Quizalofop-ethyl.d
(f)
Counts vs. Acquisition Time (min)

Figure 2 Total ion chromatogram (TIC) of chiral pesticides; (a) benalaxyl (b) difenoconazole (c) fenamiphos (d) indoxacarb (e) paclobutrazol and (f) quizalofop-ethyl

8.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีสกัดตัวอย่าง

ศึกษาและเปรียบเทียบขั้นตอนการสกัดในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดด้วยวิธี QuEChERS และ ethyl Acetate พบว่า การวิเคราะห์ด้วยวิธี QuEChERS มี recovery อยู่ในช่วง 75-101% และ RSD ในช่วง 1-4% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ คือ 70-120% และ RSD<20% (SANTE, 2019) ส่วนวิธี ethyl acetate มี recovery อยู่ในช่วง 49-104% และ RSD ในช่วง 1-14% ดังแสดงใน Table 2 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธี QuEChERS ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validate) ต่อไป

Table 2 Recovery of chiral pesticide determination by QuEChERS and Ethyl Acetate Method (n=3)

Spike Level (mg/kg)	Mean Recovery (%) [RSD (%)]											
	Benalaxyl		(2R, 4R; 2S, 4S)-Difenoconazole		Fenamiphos		Indoxacarb		(2R, 3R; 2S, 3S)-Paclobutrazol		Quizalofop-ethyl	
	Q	E	Q	E	Q	E	Q	E	Q	E	Q	E
0.005	91 [2]	92 [9]	83 [3]	68 [7]	83 [1]	74 [7]	101 [1]	85 [10]	93 [3]	73 [4]	94 [3]	104 [8]
0.05	89 [2]	64 [1]	79 [1]	62 [4]	83 [1]	65 [1]	95 [3]	77 [3]	93 [3]	74 [3]	75 [2]	57 [5]
0.5	86 [1]	65 [2]	80 [3]	57 [2]	85 [2]	70 [3]	88 [3]	66 [3]	83 [0]	71 [4]	83 [3]	49 [2]

Q = QuEChERS Method

E = Ethyl Acetate Method

8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

1) ความเฉพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

HPLC-MS/MS เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ที่มีความเฉพาะเจาะจงสูง และเมื่อเปรียบเทียบ chromatogram ของ matrix blank และ spiked matrix blank ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL จำนวน 3 ซ้ำ (n=3) พบว่า สัญญาณของ matrix blank น้อยมาก เมื่อเทียบกับสัญญาณของ spiked matrix blank ดังแสดงใน Table 3 แสดงให้เห็นว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่างในการวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ chiral pesticide ทั้ง 6 ชนิด ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์มีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจวัด

Table 3 Sensitivity comparison of matrix blank and spiked matrix blank at 1.0 µg/mL

Analyte	Response	
	matrix blank	spiked matrix blank
Benalaxyl	not detected	5401695
(2R, 4R; 2S, 4S)-Difenoconazole	not detected	14,204,231
Fenamiphos	not detected	4,822,932
Indoxacarb	not detected	99,244
(2R, 3R; 2S, 3S)-Paclobutrazol	not detected	1,211,723
Quizalofop-ethyl	not detected	1,228,876

2) ผลกระทบของเมทริกซ์ (matrix effect)

จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ เปรียบเทียบระหว่าง standard calibration in solvent กับ matrix-matched calibration สามารถหา slope ของกราฟ และนำไปวิเคราะห์ signal suppression/ enhancement (SSE) พบว่า slope ratio ระหว่าง matrix-matched calibration กับ standard calibration in solvent ของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดอยู่ในช่วง 0.8333 ถึง 1 ซึ่งไม่เกิน 10% ของ 1 แสดงว่าการเตรียม standard calibration in solvent กับ matrix-matched calibration แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมทริกซ์จึงไม่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด (Xinzhong Z., *et al.*, 2014)

Table 4 Slopes of calibration curves and calculation of signal suppression/enhancement (SSE) in solvent and in mango matrices, 0.002-1.2 μg/mL (n=3)

Analyte	Matrix	Slope	y-intercept	r^2	SSE
Benalaxyl	ACN	6.0×10^6	-9078	0.9999	0.8333
	Mango	5.0×10^6	54807	0.9999	
(2R, 4R; 2S, 4S)-Difenoconazole	ACN	1.0×10^6	1377	0.9994	1
	Mango	1.0×10^6	12406	0.9997	
Fenamiphos	ACN	5.0×10^6	-7772	1.0000	1
	Mango	5.0×10^6	47007	0.9999	
Indoxacarb	ACN	104,915	-244	0.9998	0.9360
	Mango	98,158	1225	0.9997	
(2R, 3R; 2S, 3S)-Paclobutrazol	ACN	1,000,000	3888	0.9999	1
	Mango	1,000,000	16993	0.9999	
Quizalofop-ethyl	ACN	1,000,000	-5117	0.9996	1
	Mango	1,000,000	23596	0.9981	

3) ความแม่น (accuracy) และ ความเที่ยง (precision)

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ใน spiked samples ที่ 11 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.005 ถึง 10.0 mg/kg ไม่น้อยกว่า 8 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น ($n\geq8$) โดยทดสอบความเข้มข้นละ 2-3 ซ้ำ/วัน ในช่วง 3 เดือน พบว่า

3.1) ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด มี recovery อยู่ในช่วง 80-103% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Sante, 2017) ดังแสดงใน Table 4 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องแม่นยำสูง

3.2) เมื่อคำนวณ RSD พบว่า การตรวจวิเคราะห์สาร chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด มี RSD อยู่ในช่วง 1-11% ซึ่งอยู่เกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (Sante, 2017) แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความเที่ยง

4) ช่วงของการทดสอบ (working range) และ ความเป็นเส้นตรง (linearity)

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ใน spiked sample ที่ 11 ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.005 ถึง 10.0 mg/kg ไม่น้อยกว่า 8 ซ้ำต่อระดับความเข้มข้น ($n \geq 8$) พบว่า ในการตรวจวิเคราะห์สาร chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ให้ recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังแสดงใน Table 5 แสดงว่า การตรวจวิเคราะห์ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด มีช่วงการใช้งานในช่วงความเข้มข้น 0.005 ถึง 10.0 mg/kg เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารพิษตกค้างของ chiral pesticides ที่ spiked ทั้ง 6 ชนิด (แกน x) กับ ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (แกน y) พบว่า ให้ค่า $r>0.999$ ดังแสดงใน Table 6 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ คือ $r \geq 0.995$

Table 5 Recovery of chiral pesticide determination (n≥8)

Spike Level (mg/kg)	Mean Recovery (%) [RSD (%)]					
	Benalaxyl	(2R, 4R; 2S, 4S)-Difenoconazole	Fenamiphos	Indoxacarb	(2R, 3R; 2S, 3S)-Paclobutrazol	Quizalofop-ethyl
0.005	87 [6]	86 [5]	87 [3]	99 [6]	97 [4]	81 [11]
0.01	89 [4]	88 [3]	88 [3]	103 [5]	98 [6]	80 [6]
0.05	92 [2]	94 [1]	88 [2]	100 [4]	95 [3]	88 [4]
0.1	91 [4]	89 [4]	88 [5]	102 [3]	94 [3]	83 [3]
0.3	96 [6]	87 [3]	93 [4]	93 [2]	92 [5]	89 [4]
0.5	94 [1]	86 [3]	91 [2]	95 [5]	92 [4]	84 [3]
0.7	97 [5]	86 [3]	94 [4]	92 [2]	93 [5]	88 [5]
1.0	96 [5]	86 [2]	92 [5]	93 [4]	92 [6]	89 [7]
2.0	98 [3]	90 [6]	94 [2]	93 [3]	98 [4]	85 [4]
5.0	94 [1]	87 [3]	91 [1]	90 [2]	94 [2]	85 [4]
10.0	89 [2]	88 [2]	86 [1]	92 [3]	91 [2]	83 [3]

Table 6 Characteristic to consider linearity of chiral pesticides determination (n=3)

Analyte	Equation	r^2	r	Concentration (mg/kg)
Benalaxyl	y = 1.0386x + 0.0028	0.9998	0.9999	0.005 – 1.0
(2R, 4R; 2S, 4S)-Difenoconazole	y = 0.8583x + 0.0018	0.9999	0.9999	0.005 – 1.0
Fenamiphos	y = 0.9274x - 0.0013	0.9997	0.9998	0.005 – 1.0
Indoxacarb	y = 0.9204x + 0.0041	0.9997	0.9998	0.005 – 1.0
(2R, 3R; 2S, 3S)-Paclobutrazol	y = 0.9161x + 0.0011	1	1	0.005 – 1.0
Quizalofop-ethyl	y = 0.8814x - 0.003	0.9994	0.9997	0.005 – 1.0

5) ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantification, LOQ)

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ใน spiked samples ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงใน Table 5 พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำที่ 10 ซ้ำ (n=10) เท่ากับ 0.005 mg/kg จึงเป็นค่า LOQ

6) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD)

จากการประเมินค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของ LOQ พบว่า chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดให้ LOD เท่ากับ 0.002 mg/kg โดยทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดและสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.002 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ (n=10) ดังแสดงใน Table 7

Table 7 Detected concentration of chiral pesticides determination at spike level 0.002 mg/kg (n=10)

n	Detected concentration(mg/kg)					
	Benalaxyl	(2R, 4R; 2S, 4S)-difenoconazole	Fenamiphos	Indoxacarb	(2R, 3R; 2S, 3S)-paclobutrazol	Quizalofop-ethyl
1	0.0020	0.0017	0.0017	0.0024	0.0021	0.0016
2	0.0019	0.0017	0.0018	0.0025	0.0022	0.0013
3	0.0020	0.0017	0.0018	0.0025	0.0021	0.0014
4	0.0020	0.0015	0.0018	0.0023	0.0019	0.0016
5	0.0020	0.0014	0.0018	0.0017	0.0022	0.0016
6	0.0019	0.0020	0.0021	0.0022	0.0022	0.0016
7	0.0020	0.0020	0.0023	0.0025	0.0019	0.0018
8	0.0016	0.0020	0.0022	0.0021	0.0020	0.0015
9	0.0015	0.0018	0.0018	0.0022	0.0021	0.0014
10	0.0014	0.0017	0.0018	0.0023	0.0021	0.0012
Mean	0.0018	0.0018	0.0019	0.0023	0.0021	0.0015

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

9.1 สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chiral pesticides 6 ชนิดในมะม่วงด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS โดยใช้คอลัมน์ i-Amylose-1 stationary phase ภายใต้ gradient elution ระหว่าง acetonitrile กับ 2 mM ammonium acetate ในน้ำนั้น สามารถแยก peak ระหว่าง enantiomer ของสารมาตรฐาน chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด ประกอบด้วย benalaxyl, (2R, 4R; 2S, 4S)-difenoconazole, fenamiphos, indoxacarb, (2R, 3R; 2S, 3S)-paclobutrazol และ quizalofop-ethyl ได้ภายในระยะเวลา (run time) 35 นาที ในขั้นตอนการสกัด พัฒนาจากวิธี QuEChERS ซึ่งได้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ชนิดและสารพิษตกค้าง chiral pesticides ภายใต้ตัวแปรต่างๆ ดังนี้

1) specificity/selectivity เทคนิค HPLC-MS/MS มีความเฉพาะเจาะจงสูง และไม่พบสัญญาณการตรวจวัดของสารที่ทดสอบทั้ง 6 ชนิดในตัวอย่าง blank sample ของมะม่วง

2) matrix effect ไม่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของ chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด จึงสามารถใช้สารมาตรฐานที่เตรียมใน acetonitrile ในการหาปริมาณได้

3) accuracy ที่ระดับความเข้มข้น 0.005-10.0 mg/kg รวม 11 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละไม่น้อยกว่า 8 ซ้ำ มีค่าเฉลี่ย recovery ของ benalaxyl, difenoconazole, fenamiphos, indoxacarb, paclobutrazol และ quizalofop-ethyl ในช่วง 87-98%, 86-94%, 86-94%, 90-103%, 91-98% และ 80-88% ตามลำดับ และ precision พบว่ามี RSD ในช่วง 1-6% 1-5% 1-5% 2-6% 2-6% และ 3-11% ตามลำดับ ซึ่งมี accuracy อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ

4) working range และ linearity ของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด อยู่ในช่วง 0.005-10.0 mg/kg โดยมีค่า r>0.999

5) limit of quantification (LOQ) และ limit of detection (LOD) ของสารพิษตกค้าง chiral pesticides ทั้ง 6 ชนิด เท่ากับ 0.005 และ 0.002 mg/kg ตามลำดับ

9.2 ข้อเสนอแนะ

จากการพิจารณาสูตรโครงสร้างของ difenoconazole และ paclobutrazol นั้น พบว่า สารประกอบทั้งสองชนิด มี 2 chiral centers ทำให้สารประกอบดังกล่าว มีทั้งหมด 4 stereoisomers แต่ในการตรวจวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ i-amylose-1 นั้น สามารถแยกสารทั้งสองชนิด ได้เพียงชนิดละ 2 peak ดังนั้น หากมีความจำเป็นต้องแยกแต่ละ stereoisomers ของ difenoconazole และ paclobutrazol อาจจำเป็นต้องใช้คอลัมน์ที่มีความเฉพาะเจาะจงชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม

จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของ chiral pesticide ทั้ง 6 ชนิดในงานวิจัยนี้ ไม่สามารถระบุได้ว่า แต่ละ peak ของ chiral pesticides แต่ละชนิด เป็น enantiomer ใด หากต้องการทราบข้อมูลดังกล่าว สามารถทำได้โดยการนำสารมาตรฐานไม่ผสมของ enantiomer (non-racemic mixture) ของ chiral pesticides แต่ละชนิดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS ภายใต้สภาวะเดียวกัน แล้วเปรียบเทียบ retention time จะสามารถระบุ peak ของแต่ละ enantiomer ได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ enantiomerselective ของสารประกอบ chiral pesticides ทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง ทำให้ทราบถึงลักษณะของสัญญาณตรวจวัดที่มีความเฉพาะเจาะจง

10.2 นำไปใช้ขอการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ของห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

ทิพวรรณ นิ่งน้อย. (2549) แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดี่ยว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

Yuanbo L., Fengshou D., Xingang L., Jun X., Xiu C., Yongtao H., Xuyang L. (2013) Development of a multi-residue enantiomeric analysis method for 9 pesticides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of hazardous materials international journal of current research*, 250-251, 9-1.

Elin, M. U., Candice, N. M., Michael, R. G. William, T. F. (2012) Chiral pesticides: identification, description, and environmental implications. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 217, 1-74.

Eurachem. (2014) The Fitness for Purpose of Analytical Methods a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed.

European commission directorate general for health and food safety. (2017) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. *Sante*, 11813, 1-42.

Paul M. G. (2009) Superfruits. *McGraw-Hill Education*, 240 pages [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.goodreads.com/book/show/10700593-superfruits (31 มกราคม 2563)

QuEChERS EN 15662. (2008) Food of plant origin-determination of pesticide residue using GC-MS and/or lC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS method.

Tuija P., Gun B., Paula F., Ulla P., Bengt G. O. (2007) Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 1773–1789.

Xinzhong Z., Fengjian L., Zhengyun L., Meiling L., Zongmao C. (2014) Simultaneous and enantioselective determination of cis-epoxiconazole and indoxacarb residues in various teas, tea infusion and soil samples by chiral high performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1359, 212-223.

13. ภาคผนวก

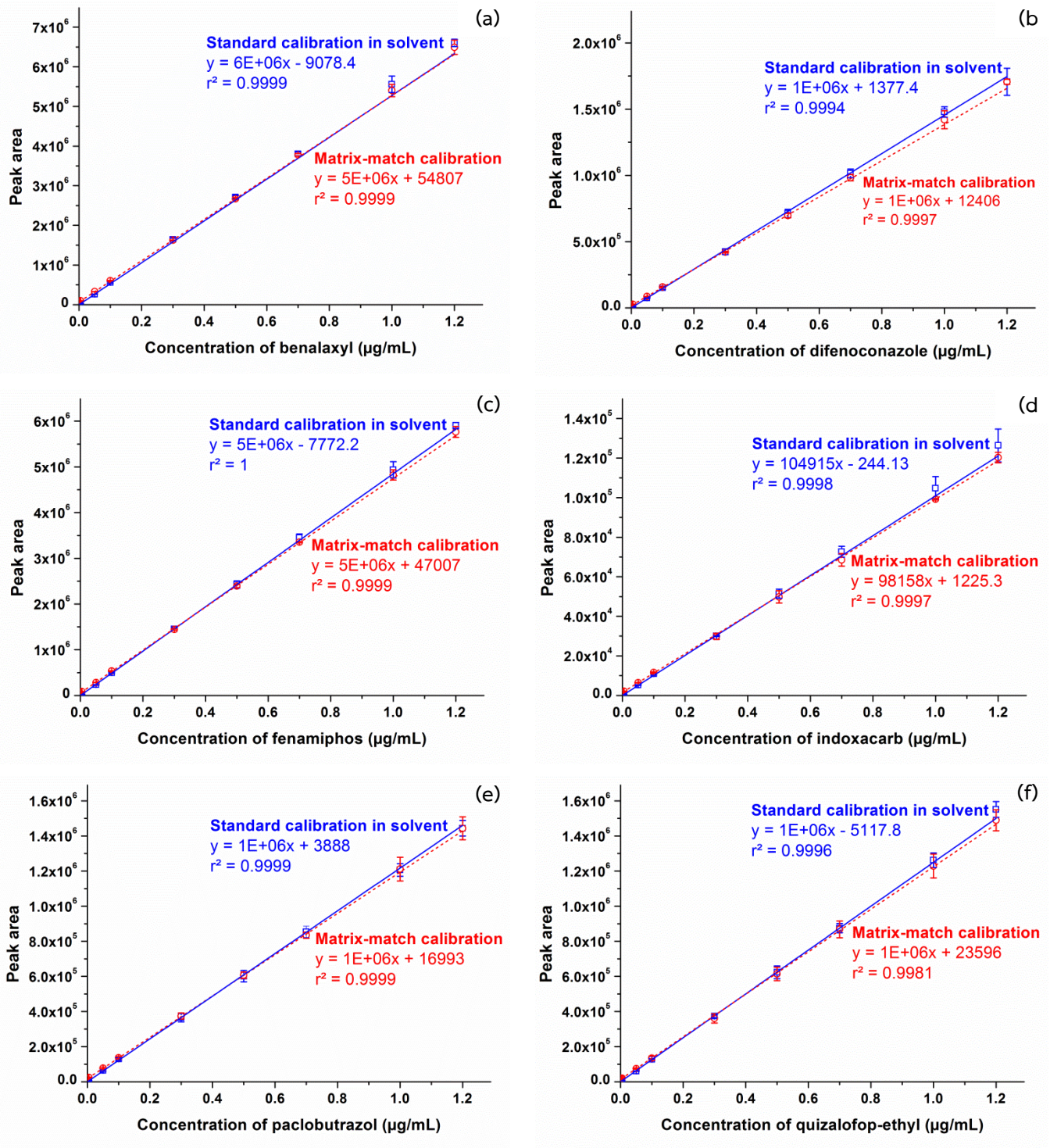


Figure 3 Matrix effects of chiral pesticides residue; (a) benalaxyl (b) difenoconazole (c) fenamiphos (d) indoxacarb (e) paclobutrazol and (f) quizalofop-ethyl

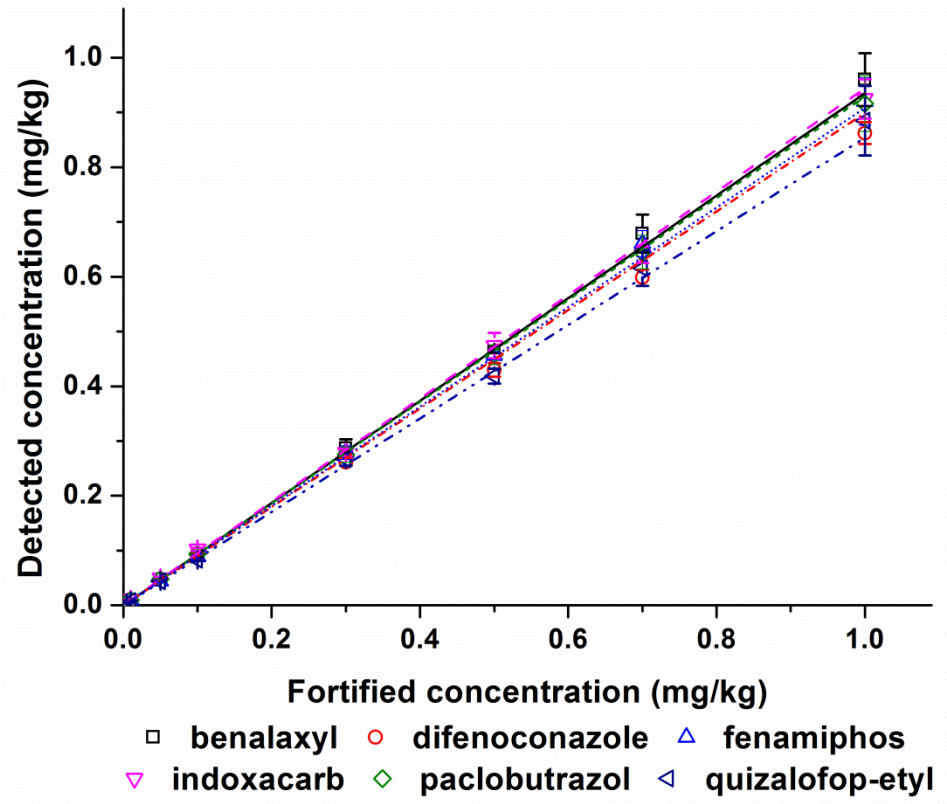


Figure 4 Linearity of chiral pesticides residue with different concentration, 0.005-1.0 mg/kg