

## รายงานผลงานเรื่องเติมการทดลองที่สิ้นสุด

- 1. แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อการรับรองมาตรฐานปัจจัยการผลิตและสินค้าพืช
- 2. โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนากระบวนการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช  
**กิจกรรม** : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ  
**กิจกรรมย่อย** : -
- 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง เมทอกซีฟิโนไซด์ (methoxyfenozide) ทีบูฟีโนไซด์ (tebufenozide) และโครมาฟีโนไซด์ (chromafenozide) ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง  
**ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Modification and method validation of methoxyfenozide, tebufenozide and chromafenozide in vegetables with high water and chlorophyll
- 4. คณะผู้ดำเนินงาน**  
**หัวหน้าการทดลอง** : นางสาววาเลนไทน์ เจือสกุล กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร  
**ผู้ร่วมงาน** : นางสาววิชุดา ควรหัตถ์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร  
นายวีระสิงห์ แสงวรรณ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### 5. บทคัดย่อ

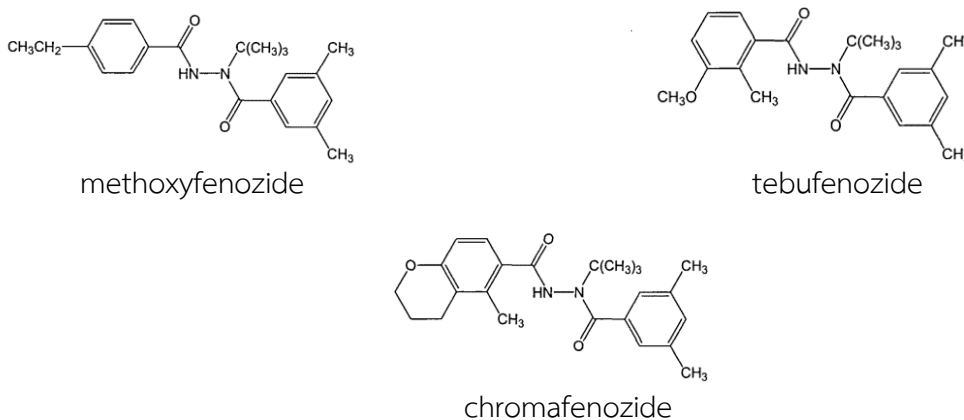
พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง โดยเลือกคะน้าเป็นตัวแทนพืชที่ศึกษา เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างเพื่อหาวิธีที่เหมาะสม 2 วิธี ได้แก่ วิธี QuEChERS (EN15662, 2008) และ วิธี ethyl acetate (Pihlstrom *et al.*, 2007) โดยศึกษาที่ความเข้มข้นในตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 5 ซ้ำ ดังนี้ methoxyfenozide ที่ 0.005-0.5 mg/kg, tebufenozide ที่ 0.01-1.0 mg/kg และ chromafenozide ที่ 0.01-0.5 mg/kg ตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS) จากผลการศึกษาพบว่าการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS ให้ค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery) ดีกว่าการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี ethyl acetate ซึ่งมี %recovery อยู่ในช่วง 50-123% และมี %RSD ในช่วง 1-24% จึงใช้วิธี QuEChERS มาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตาม parameter ต่างๆ ในตัวอย่างคะน้า พบว่ามีช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (range/linearity) อยู่ที่ 0.005-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความแม่นยำ (accuracy) โดยประเมินจากร้อยละการกลับคืน (%recovery) อยู่ในช่วง 93-104% มีความเที่ยง (precision) โดยประเมินจาก %RSD มีค่าอยู่ในช่วง 2-9% วิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง มีความเข้มข้นต่ำสุดที่

สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 0.005, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) เท่ากับ 0.001, 0.002 และ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Modification and method validation of methoxyfenozide, tebufenozide and chromafenozide in vegetables with high water and chlorophyll were studied. Kale samples were chosen to represent and analysis with QuEChERS method by using LC-MS/MS instrument. The procedure was validated for methoxyfenozide, tebufenozide and chromafenozide at 0.005-0.5 mg/kg, 0.01-1.0 mg/kg and 0.01-0.5 mg/kg with the recovery within 77-102%, 91-102% and 77-100%, respectively. The linear range of those compounds was 0.005-0.5 mg/kg. Recoveries for the accuracy ranged from 93 to 104% and the RSD of precision ranged from 2 to 9%. The limit of quantification (LOQ) of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide were 0.005, 0.01 and 0.01 mg/kg and the limit of detection (LOD) of methoxyfenozide, chromafenozide and tebufenozide were 0.001, 0.02 and 0.03 mg/kg, respectively.

## 6. คำนำ

เมทอกซีฟิโนไซด์ (methoxyfenozide) ทีบูฟิโนไซด์ (tebufenozide) และโครมาฟิโนไซด์ (chromafenozide) เป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร แบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์หรือตำแหน่งของการออกฤทธิ์ตามมาตรฐานของ Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) อยู่ในกลุ่มสารเคมีที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ ขบวนการเจริญเติบโตของแมลง (Ecdysone agonists/moulting disruptors Growth regulation) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพที่ 1 (Su-Jin *et al.*, 2010) เป็นสารกำจัดแมลงประเภทไม่ดูดซึม ออกฤทธิ์แบบกินตาย (ingestion) มีฤทธิ์ทางสัมผัสน้อย รบกวนฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบและส่งผลกับการฟักตัวของไข่ในผีเสื้อบางชนิด (สุเทพ, 2561) ใช้กำจัดหนอนกระทู้ผัก (common cutworm) ในกลุ่มไม้ดอก ได้แก่ กุหลาบ ดาวเรือง และกล้วยไม้ (กลุ่มบริหารศัตรูพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2554)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide

จากคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรให้ใช้ methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก (common cutworm) ในกลุ่มไม้ดอก แต่ข้อมูลจากการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย พบว่ามีการนำ methoxyfenozide มาใช้กำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพด (ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2563) chromafenozide ใช้กำจัดหนอนกระทู้หอมและหนอนใยผักในคะน้า และ tebufenozide ใช้กำจัดหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอมในพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น คะน้า กวางตุ้ง กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดขาวปลี และผักกาดเขียว (รักบ้านเกิด, 2556)

จะเห็นได้ว่าการนำสารเคมีกลุ่มนี้มาใช้กำจัดแมลงในกลุ่มพืชไร่และกลุ่มผักใบ เช่น ข้าวโพดและคะน้า แต่ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาตัวอย่างพืชที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง เช่น คะน้า เนื่องจากเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจปลูกง่ายและปลูกได้ทั่วประเทศสามารถปลูกและให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี แต่จากข้อมูลของกรมวิชาการเกษตรพบว่าคะน้าเป็นพืชที่พบสารพิษตกค้างมากที่สุดชนิดหนึ่ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาและพัฒนาตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน ในตัวอย่างผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูงโดยเลือกคะน้าเป็นตัวแทนกลุ่มพืช ใช้หลักการวิเคราะห์แบบ Multi-residue โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์

## 7. วิธีดำเนินการ

### 7.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1) สารมาตรฐาน chromafenozide ความบริสุทธิ์ 99.9%, สารมาตรฐาน methoxyfenozide ความบริสุทธิ์ 99.0% และสารมาตรฐาน tebufenozide ความบริสุทธิ์ 99.6%

2) เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 5 ตำแหน่ง

3) เครื่องแก้ว ได้แก่ กระจบอกรตวง ปีกเกอร์ ขวดแก้ว ขวดปรับปริมาตร autosampler vial และแท่งแก้วคนสาร

4) micropipette ขนาด 10-20, 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร

5) centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร

6) syringe filter PTFE ขนาด 0.2 ไมครอน

7) เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่อง vortex mixer, centrifuge และ nitrogen evaporator

8) สารเคมี ได้แก่ acetonitrile (ACN), ethyl acetate, magnesium sulfate anhydrous ( $MgSO_4$ ), primary-secondary amine (PSA), graphitized carbon black (GCB), sodium chloride (NaCl), sodium hydrogen carbonate ( $NaHCO_3$ ), sodium sulfate ( $Na_2SO_4$ ), trisodium citrate dehydrate ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ), di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ ), ammonium formate, formic acid

9) เครื่องตรวจวิเคราะห์ Liquid chromatography tandem mass spectrometer (LC/MS-MS)

### 7.2 วิธีการ

1) เตรียม stock standard solution ของสาร chromafenozide, methoxyfenozide และ tebufenozide โดยใช้เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง ชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรและละลายสารด้วย ACN นำค่า % ความบริสุทธิ์ของสารมาคำนวณ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารมาตรฐานที่เตรียม ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง (mg)} \times \% \text{ ความบริสุทธิ์} \times 1000}{\text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times 100}$$

2) เตรียม intermediate standard solution โดยเตรียมจาก stock standard solution ให้ได้ความเข้มข้น 100, 10 และ 1  $\mu\text{g/mL}$  ในตัวทำละลาย ACN เพื่อใช้เตรียม spiked sample สามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่  $N_1$  = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ( $\mu\text{g/mL}$ )

$N_2$  = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V_1$  = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูมา (mL)

$V_2$  = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (mL)

3) เตรียม working standard solution ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.50  $\mu\text{g/mL}$  ในตัวทำละลาย ACN โดยใช้สูตรการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 2 เพื่อใช้ปรับสภาวะของเครื่องมือวิเคราะห์ และเพื่อสร้าง calibration curve

4) ปรับสภาวะเครื่องตรวจวิเคราะห์ โดยฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาช่วงต่ำสุดและสูงสุดของการวัด และหาสัญญาณการตรวจวัดความเข้มข้นต่ำสุดของสารมาตรฐาน โดยมีสภาวะการทำงานของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์ chromafenozide, methoxyfenozide และ tebufenozide ดังนี้

Column : Phenomenex 2.6  $\mu\text{m}$  XB C18 100A, 100 mm x 2.1 mm

Temperature : 40  $^{\circ}\text{C}$

Ion source : ESI (positive)

Source parameters : Gas Temp ( $^{\circ}\text{C}$ ) 300

Gas Flow (L/min) 12

Nebulizer (psi) 60

Capillary (V) 4000

Injection volume : 2  $\mu\text{L}$

Mass parameters :

| Compound name | RT | Precursor ion | Product ion |
|---------------|----|---------------|-------------|
|---------------|----|---------------|-------------|

|                 |       |       |       |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Methoxyfenozide | 4.038 | 313.2 | 91.1  |
|                 |       | 313.2 | 149.1 |
|                 |       | 369.2 | 149.1 |
| Chromafenozide  | 4.142 | 395.2 | 175.0 |
|                 |       | 395.2 | 133.0 |
| Tebufenozide    | 5.110 | 353.2 | 297.2 |
|                 |       | 353.2 | 133.1 |

Mobile phase : 5 mM ammonium formate in water + 1% formic acid (A), ACN (B)

Run time : 10 min

| Time | Flow rate | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
|------|-----------|---------------|---------------|
| 0    | 0.4       | 80            | 20            |
| 2.0  | 0.4       | 50            | 50            |
| 4.0  | 0.4       | 20            | 80            |
| 8.0  | 0.4       | 20            | 80            |
| 9.0  | 0.4       | 80            | 20            |
| 10.0 | 0.4       | 80            | 20            |

5) ทดสอบวิธีการสกัดตัวอย่างผักตบชวาที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง คือคะน้า เปรียบเทียบ 2 วิธีการสกัดตัวอย่าง ดังนี้

#### 5.1) วิธี QuEChERS (EN15662, 2008)

ชั่งตัวอย่างคะน้า 10 กรัม ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร spiked สารมาตรฐานลงในตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นดังนี้ methoxyfenozide ที่ 0.005, 0.05 และ 0.5 mg/kg, chromafenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 0.05 mg/kg และ tebufenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เติม ACN 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติม  $MgSO_4$  4 กรัม NaCl 1 กรัม  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  1 กรัม และ  $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$  0.5 กรัม เขย่าอีก 1 นาที นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบน 5 มิลลิลิตร ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี  $MgSO_4$  885 มิลลิกรัม PSA 150 มิลลิกรัม และ GCB 45 มิลลิกรัม เขย่าด้วย vortex mixer 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที อีก 5 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วย syringe filter PTFE ขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ autosampler vial และเติม 10% formic acid 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลายที่กรองแล้ว 1.0 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS-MS

#### 5.2) วิธี Ethyl acetate (Pihlstrom *et al.*, 2007)

ชั่งตัวอย่างคะน้า 10 กรัม ใส่ centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร spiked สารมาตรฐานลงในตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นดังนี้ methoxyfenozide ที่ 0.005, 0.05 และ 0.5 mg/kg, chromafenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 0.05 mg/kg และ tebufenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ เติม ethyl acetate 20 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 นาที เติม  $NaHCO_3$  3 กรัม และ  $Na_2SO_4$  10 กรัม เขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที นำไป ultrasonic 3 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้น้อยกว่า 35 °C จากนั้นนำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 5 มิลลิลิตร ใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี magnesium sulfate anhydrous 750 มิลลิกรัม PSA 125 มิลลิกรัม และ GCB 45 มิลลิกรัม เขย่าด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที อีก 5 นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วย

syringe filter PTFE ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นดูดสารละลายที่กรองแล้ว 1.0 มิลลิลิตร ใส่ autosampler vial นำไปประเหยแห้งด้วยเครื่อง nitrogen evaporator ปรับปริมาตรด้วย ACN และเติม 10% formic acid 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS-MS

6) ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยทดสอบวิธีวิเคราะห์ตาม parameter ต่างๆ ดังนี้

#### 6.1 ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

ศึกษาสัญญาณการตรวจวัดสารละลาย matrix blank ตัวอย่างคั้นน้ำด้วยเครื่อง LC-MS/MS กับสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ และศึกษาผลของ matrix ที่มีต่อสัญญาณการตรวจวัดหรือ matrix effect เพื่อกำหนดวิธีการเตรียมสารมาตรฐานในการหาปริมาณสารตกค้าง โดยวิเคราะห์ผลจาก signal suppression/enhancement (SSE) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$SSE = \frac{\text{slope matrix match calibration}}{\text{standard calibration in solvent}}$$

#### 6.2 ช่วงความเป็นเส้นตรง (range/linearity)

ศึกษา range/linearity เครื่อง LC-MS/MS ของสาร chromafenozide , tebufenozide และ methoxyfenozide ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.50 µg/mL ในสารละลาย ACN ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ย response ของสารมาสร้างกราฟเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ศึกษาเพื่อหาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีทดสอบ

#### 6.3 ความแม่นยำ (accuracy)

ศึกษาความแม่นยำ โดยวิเคราะห์ตัวอย่างคั้นน้ำที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับ ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ โดย spiked สารมาตรฐานลงในตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นดังนี้ methoxyfenozide ที่ 0.005, 0.05 และ 0.5 mg/kg, chromafenozide ที่ 0.01, 0.05 และ 0.05 mg/kg และ tebufenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/kg

##### 6.3.1 ร้อยละการกลับคืน (%recovery) คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\%recovery = C_f / C_a \times 100$$

โดยที่  $C_f$  = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้

$C_a$  = ความเข้มข้นของสารที่แท้จริงที่เติมลงในตัวอย่าง

6.3.2 ความเที่ยง (precision) ได้จากการคำนวณร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\%RSD = \frac{SD}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100$$

$$\bar{x}$$

#### 7) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ (LOQ)

ประเมินค่า LOQ จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เท่ากับ 10SD (Eurachem, 2014) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นดังนี้ methoxyfenozide 0.005 mg/kg, chromafenozide 0.01 mg/kg และ tebufenozide 0.01 mg/kg ทดสอบตัวอย่างที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พิสูจน์ accuracy ที่ความเข้มข้น LOQ

#### 8) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของวิธีวิเคราะห์ (LOD)

ประเมินค่า LOD จากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เท่ากับ 3SD (Eurachem, 2014) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้นดังนี้ methoxyfenozide 0.001 mg/kg, chromafenozide 0.003 mg/kg และ tebufenozide 0.002 mg/kg ทดสอบตัวอย่างที่ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินผลที่ได้จาก peak area และคำนวณค่า signal to noise (S/N) ของแต่ละซ้ำต้องมีค่า  $\geq 3$  (Eurachem, 2014)

**เวลาและสถานที่ :** เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2560 และสิ้นสุดเดือนกันยายน 2562 ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษ ตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

### 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง โดยเลือกค่น้ำเป็นพืชตัวแทน มีผลการทดลองดังนี้

#### 8.1 ทดสอบวิธีการสกัดตัวอย่าง

เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่าง 2 วิธี คือวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) และวิธี ethyl acetate (Pihlstrom *et al.*, 2007) โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นในตัวอย่าง ดังนี้ methoxyfenozide ที่ 0.005, 0.05 และ 0.5 mg/kg chromafenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 0.05 mg/kg และ tebufenozide ที่ 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/kg ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ จากผลการทดลองพบว่าการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS ค่า %recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 77-102% และ %RSD อยู่ในช่วง 2-5% (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (SANTE, 2013) ส่วนวิธี ethyl acetate ค่า %recovery เฉลี่ยอยู่ในช่วง 48-123% และ %RSD อยู่ในช่วง 1-24% (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธี QuEChERS (EN15662, 2008) ในการสกัดตัวอย่างผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง สำหรับวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในการพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ต่อไป

**ตารางที่ 1** ผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในค่น้ำด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008)



| สารพิษตกค้าง    | ความเข้มข้น<br>(mg/kg) | %recovery              | ค่าเฉลี่ย<br>%recovery | %RSD |
|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------|
| methoxyfenozide | 0.005                  | 89, 91, 91, 92, 94     | 91                     | 2    |
|                 | 0.05                   | 98, 100, 102, 103, 105 | 102                    | 3    |
|                 | 0.5                    | 99, 102, 103, 103, 105 | 102                    | 2    |
| chromafenozide  | 0.01                   | 91, 96, 96, 97, 99     | 96                     | 3    |
|                 | 0.05                   | 97, 98, 98, 99, 102    | 99                     | 2    |
|                 | 0.5                    | 92, 97, 97, 99, 101    | 97                     | 3    |
| tebufenozide    | 0.01                   | 79, 73, 82, 72, 77     | 77                     | 5    |
|                 | 0.1                    | 95, 90, 94, 96, 95     | 94                     | 3    |
|                 | 1.0                    | 99, 100, 96, 100, 100  | 99                     | 2    |

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในคะน้ำด้วยวิธี ethyl acetate (Pihlstrom *et al.*, 2007)

| สารพิษตกค้าง    | ความเข้มข้น<br>(mg/kg) | %recovery               | ค่าเฉลี่ย<br>%recovery | %RSD |
|-----------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------|
| methoxyfenozide | 0.005                  | 68, 40, 52, 45, 45      | 50                     | 22   |
|                 | 0.05                   | 123, 105, 102, 113, 105 | 116                    | 7    |
|                 | 0.5                    | 129, 117, 130, 116, 102 | 119                    | 10   |
| chromafenozide  | 0.01                   | 71, 60, 61, 61, 62      | 63                     | 1    |
|                 | 0.05                   | 66, 53, 57, 59, 60      | 59                     | 8    |
|                 | 0.5                    | 124, 120, 122, 124, 127 | 123                    | 2    |
| tebufenozide    | 0.01                   | 68, 40, 42, 44, 44      | 48                     | 24   |
|                 | 0.1                    | 62, 53, 51, 56, 58      | 56                     | 8    |
|                 | 1.0                    | 64, 59, 65, 66, 71      | 65                     | 7    |

8.2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในตัวอย่างผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง ด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS มีผลการตรวจวิเคราะห์ ดังนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (specificity/selectivity)

เนื่องจากการตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS มีความเฉพาะเจาะจงสูง เมื่อเปรียบเทียบสัญญาณการตรวจวัดในสารละลายตัวอย่าง matrix blank ค่ะน้ำ กับสารละลายมาตรฐาน methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ไม่พบว่ามีสัญญาณการตรวจวัดที่ตรงกับสารมาตรฐาน (ตารางที่ 3) แสดงว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นนำค่าเฉลี่ย peak area ของ chromafenozide, methoxyfenozide และ tebufenozide มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นทั้งในตัวทำละลาย ACN และใน matrix blank ค่ะน้ำ พบว่ามีค่า SSE (signal suppression/enhancement) อยู่ในช่วง -0.9804-1.003 (ตารางที่ 4) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (Yuanbo *et al.*, 2013) แสดงให้เห็นว่า matrix ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้าง วิธีทดสอบนี้จึงเตรียมสารมาตรฐานในตัวทำละลาย ACN

ตารางที่ 3 สัญญาณการตรวจวัด (response) ของสารมาตรฐานและ matrix blank

| สารพิษตกค้าง    | ความเข้มข้น<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | response สารพิษตกค้าง | response matrix blank |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| methoxyfenozide | 0.005                               | 1960                  | ND                    |
| chromafenozide  | 0.01                                | 935                   | ND                    |
| tebufenozide    | 0.01                                | 4302                  | ND                    |

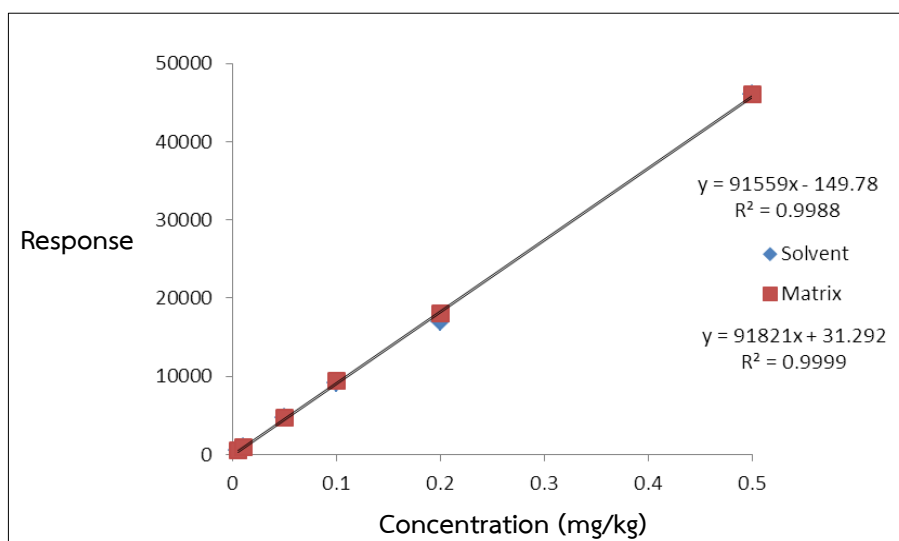
ND = not detect

ตารางที่ 4 ผล matrix effect ของวิธีทดสอบ

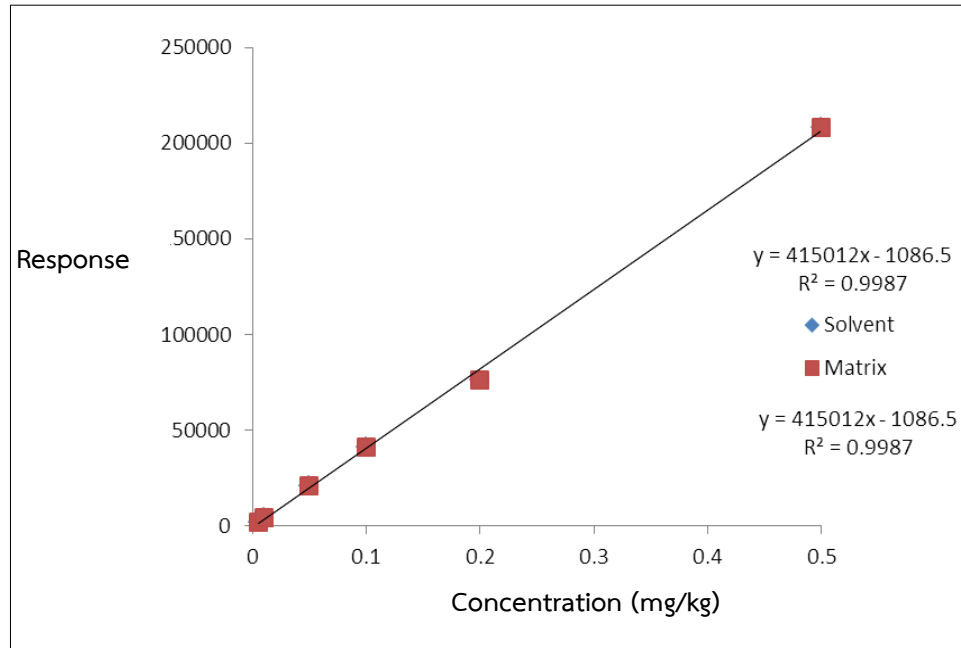
| สารพิษตกค้าง    | Slope  |        | SSE    |
|-----------------|--------|--------|--------|
|                 | ACN    | matrix |        |
| methoxyfenozide | 415012 | 415012 | 1      |
| chromafenozide  | 91559  | 91821  | 1.003  |
| tebufenozide    | 330760 | 324282 | 0.9804 |

2) ช่วงความเป็นเส้นตรง (range/linearity) ของวิธีวิเคราะห์

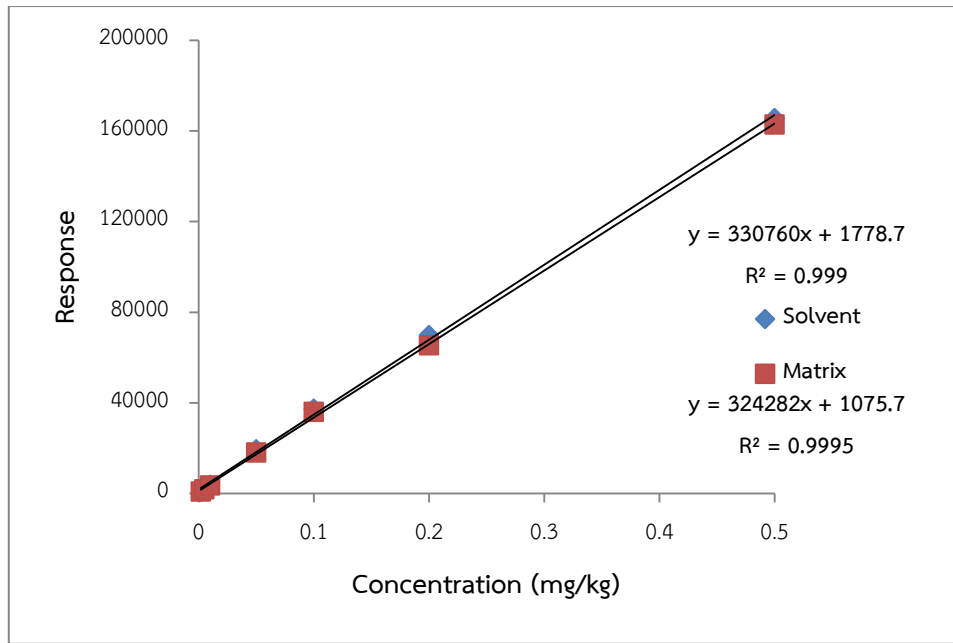
ศึกษา range/linearity ในตัวอย่างค่น้ำที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.50  $\mu\text{g/mL}$  ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ย peak area ของ chromafenozide, methoxyfenozide และ tebufenozide มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้น พบว่ามีค่า  $R^2 > 0.990$  แสดงดังภาพที่ 2, 3 และ 4 แสดงว่าวิธีทดสอบมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.005-0.5  $\mu\text{g/mL}$



ภาพที่ 2 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง response กับ chromafenozide ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง response กับ methoxyfenozide ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 4 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง response กับ tebufenozide ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

### 3) ความแม่นยำ (accuracy)

พิสูจน์ความแม่นยำ (accuracy) จากร้อยละการกลับคืน (%recovery) และพิสูจน์ความเที่ยง (precision) จากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (%RSD) โดยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 8 ซ้ำ สำหรับ chromafenozide ศึกษาที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, และ 0.5 mg/kg methoxyfenozide ศึกษาที่ความเข้มข้น 0.005, 0.05 และ 0.5 mg/kg และ tebufenozide ศึกษาที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, และ 1.0 mg/kg พบว่าสารพิษตกค้างทั้ง 3 ชนิด มี %recovery อยู่ในช่วง 79-113% และ %RSD อยู่ในช่วง 2-9% โดยเกณฑ์การยอมรับของ %recovery คือ 70-120% และ %RSD ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (SANCO, 2013) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับทั้ง chromafenozide, methoxyfenozide และ tebufenozide แสดงค่าในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง chromafenozide, methoxyfenozide และ tebufenozide ในคะน้ำ

| สารพิษตกค้าง    | ความเข้มข้น<br>(mg/kg) | %recovery                                | ค่าเฉลี่ย<br>%recovery | %RSD |
|-----------------|------------------------|--|------------------------|------|
| chromafenozide  | 0.01                   | 91, 96, 96, 97, 99, 103, 101, 106        | 99                     | 3    |
|                 | 0.05                   | 97, 98, 98, 99, 102, 110, 108, 110       | 103                    | 6    |
|                 | 0.5                    | 99, 102, 103, 103, 105, 104, 110,<br>104 | 104                    | 3    |
| methoxyfenozide | 0.005                  | 89, 91, 91, 92, 94, 84, 84, 82           | 100                    | 5    |
|                 | 0.05                   | 98, 100, 102, 103, 105, 110, 109,<br>107 | 103                    | 6    |
|                 | 0.5                    | 99, 102, 103, 103, 105, 108, 113,<br>112 | 104                    | 3    |
| tebufenozide    | 0.01                   | 99, 92, 97, 95, 93, 79, 82, 104          | 93                     | 9    |
|                 | 0.10                   | 95, 90, 94, 96, 95, 99, 101, 94          | 96                     | 3    |
|                 | 1.0                    | 95, 94, 95, 96, 95, 99, 100, 96          | 96                     | 2    |

#### 4) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ (LOQ)

ประเมินค่าจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เท่ากับ 10SD จากผลการทดลองที่ 0.005, 0.01 และ 0.01 mg/kg ของสาร methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide (ตารางที่ 6-8) พบว่ามีค่า 10SD ที่ 0.0036, 0.0054 และ 0.0105 mg/kg ตามลำดับ จึงมีการปรับค่า LOQ เนื่องจากค่าจากการประเมินมีค่าต่ำมาก โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่มี methoxyfenozide ความเข้มข้น 0.005 mg/kg, chromafenozide และ tebufenozide ความเข้มข้น 0.01 mg/kg ทดสอบตัวอย่างละ 10 ซ้ำ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 6-8 พบว่า methoxyfenozide มีค่า LOQ อยู่ที่ 0.005 mg/kg มี %RSD เท่ากับ 8% , chromafenozide มีค่า LOQ อยู่ที่ 0.01 mg/kg มี %RSD เท่ากับ 5% และ tebufenozide มีค่า LOQ อยู่ที่ 0.01 mg/kg และ %RSD เท่ากับ 12%

#### 5) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของวิธีวิเคราะห์ (LOD)

ประเมินค่าจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) เท่ากับ 3SD ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01 และ 0.01 mg/kg ของสาร methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide (ตารางที่ 6-8) พบว่ามีค่า 3SD ที่ 0.0011, 0.0016 และ 0.0032 mg/kg ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่าจากการประเมินมีค่าต่ำมาก จึงปรับค่า LOD ของสาร methoxyfenozide , chromafenozide และ tebufenozide เป็น 0.001, 0.002 และ 0.003 mg/kg ตามลำดับ และทำ

การตรวจวิเคราะห์ spiked sample ค่ะน้ำ จำนวน 10 ซ้ำ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 6-8 พบว่า response ของการวัดมีค่า signal to noise (S/N) ของสารทั้ง 3 ชนิด อยู่ในช่วง 40.7-71.1 ซึ่งมีค่า S/N > 3 ทั้ง 10 ซ้ำที่ทดสอบ และพบสัญญาณการตรวจวัดทั้งหมด จึงสรุปได้ว่าค่า LOD ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง เช่น ค่ะน้ำ เท่ากับ 0.001, 0.002 และ 0.003 mg/kg ตามลำดับ

ตารางที่ 6 การทดสอบ LOQ ที่ 0.005 mg/kg และ LOD ที่ 0.001 mg/kg ของ methoxyfenozide ในค่ะน้ำ

| ตัวอย่างที่ | ความเข้มข้นที่พบ (mg/kg) |          | peak area<br>(LOD) | S/N  |
|-------------|--------------------------|----------|--------------------|------|
|             | LOQ                      | LOD      |                    |      |
| 1           | 0.0045                   | 0.0008   | 489                | 45.1 |
| 2           | 0.0046                   | 0.0007   | 481                | 40.7 |
| 3           | 0.0046                   | 0.0009   | 492                | 42.0 |
| 4           | 0.0046                   | 0.0010   | 489                | 47.7 |
| 5           | 0.0047                   | 0.0008   | 496                | 48.2 |
| 6           | 0.0042                   | 0.0009   | 487                | 49.7 |
| 7           | 0.0042                   | 0.0008   | 489                | 46.7 |
| 8           | 0.0041                   | 0.0007   | 421                | 48.1 |
| 9           | 0.0038                   | 0.0008   | 455                | 43.6 |
| 10          | 0.0037                   | 0.0008   | 476                | 44.9 |
| เฉลี่ย      | 0.0043                   | 0.0009   | 428                | 45.7 |
| SD          | 0.000356                 | 0.000827 | -                  | -    |
| %RSD        | 8                        | 11       | -                  | -    |
| 10SD        | 0.0036                   |          |                    |      |
| 3SD         | 0.0011                   |          |                    |      |

ตารางที่ 7 การทดสอบ LOQ ที่ 0.01 mg/kg และ LOD ที่ 0.002 mg/kg ของ chromafenozide ในค่ะน้ำ

| ตัวอย่างที่ | ความเข้มข้นที่พบ (mg/kg) |        | Peak area<br>(LOD) | S/N  |
|-------------|--------------------------|--------|--------------------|------|
|             | LOQ                      | LOD    |                    |      |
| 1           | 0.0091                   | 0.0017 | 181                | 61.2 |

|        |          |          |     |      |
|--------|----------|----------|-----|------|
| 2      | 0.0096   | 0.0018   | 190 | 62.5 |
| 3      | 0.0096   | 0.0019   | 189 | 66.7 |
| 4      | 0.0097   | 0.0020   | 187 | 63.7 |
| 5      | 0.0099   | 0.0020   | 192 | 71.1 |
| 6      | 0.0103   | 0.0020   | 197 | 65.3 |
| 7      | 0.0107   | 0.0019   | 182 | 63.4 |
| 8      | 0.0106   | 0.0018   | 190 | 60.1 |
| 9      | 0.0101   | 0.0019   | 185 | 69.0 |
| 10     | 0.0107   | 0.0020   | 175 | 70.2 |
| เฉลี่ย | 0.0100   | 0.0019   | 185 | 65.3 |
| SD     | 0.000544 | 0.000105 | -   | -    |
| %RSD   | 5        | 6        | -   | -    |
| 10SD   | 0.0054   |          |     |      |
| 3SD    | 0.0016   |          |     |      |

ตารางที่ 8 การทดสอบ LOQ ที่ 0.01 mg/kg และ LOD ที่ 0.003 mg/kg ของ tebufenozide ในค่น้ำ

| ตัวอย่างที่ | ความเข้มข้นที่พบ (mg/kg) |        | Peak area<br>(LOD) | S/N  |
|-------------|--------------------------|--------|--------------------|------|
|             | LOQ                      | LOD    |                    |      |
| 1           | 0.0099                   | 0.0031 | 1374               | 43.8 |
| 2           | 0.0092                   | 0.0033 | 1437               | 63.5 |
| 3           | 0.0097                   | 0.0032 | 1426               | 51.4 |
| 4           | 0.0095                   | 0.0032 | 1420               | 53.7 |
| 5           | 0.0093                   | 0.0031 | 1417               | 46.3 |
| 6           | 0.0079                   | 0.0025 | 1310               | 50.4 |
| 7           | 0.0073                   | 0.0027 | 1377               | 44.4 |
| 8           | 0.0082                   | 0.0026 | 1342               | 43.7 |
| 9           | 0.0077                   | 0.0026 | 1376               | 41.6 |
| 10          | 0.0104                   | 0.0025 | 1352               | 43.3 |
| เฉลี่ย      | 0.0089                   | 0.0029 | 1354               | 45.4 |
| SD          | 0.00105                  | 0.0003 | -                  | -    |
| %RSD        | 12                       | 11     | -                  | -    |
| 10SD        | 0.0105                   |        |                    |      |
| 3SD         | 0.0032                   |        |                    |      |



## 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูง โดยมีคือน้ำเป็นตัวแทนพืช สกัดตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (EN15662, 2008) วิเคราะห์สารพิษตกค้างทั้ง 3 ชนิดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง โดย methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide มีช่วงการตรวจวิเคราะห์อยู่ที่ 0.005-0.5, 0.01-0.5 และ 0.01-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้หรือ LOQ เท่ากับ 0.005, 0.01 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้หรือ LOD เท่ากับ 0.001, 0.002 และ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นี้ ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในกลุ่มผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูงที่มีสารพิษตกค้างทั้ง 3 ชนิดอยู่รวมกันได้โดยการตรวจวิเคราะห์แค่ครั้งเดียวหรือแบบ multi-residue method อีกทั้งยังสามารถนำวิธีทดสอบนี้ไปใช้วิเคราะห์หาสารพิษตกค้าง methoxyfenozide, chromafenozide และ tebufenozide ในกลุ่มพืชชนิดอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับกลุ่มผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูงได้

## 10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุดิบพืชการเกษตร สามารถนำวิธีทดสอบนี้ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารพิษตกค้าง methoxyfenozide, tebufenozide และ chromafenozide ในผักที่มีน้ำและคลอโรฟิลล์สูงได้
2. จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์นี้ สามารถนำไปขยายขอบข่ายในการรับรองห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025:2017 ได้
3. ห้องปฏิบัติการหรือหน่วยงานอื่นๆ ที่สนใจ สามารถนำวิธีการทดสอบนี้ไปประยุกต์ใช้กับงานหรือหน่วยงานของตนเองได้

## 11. เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มบริหารศัตรูพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2554. *แมลงศัตรูผัก เห็บ และไม้ดอก*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 74 หน้า
- รักบ้านเกิด. 2556. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <https://rakbankerd.com/agriculture/print.php?id=6400&s=tblplant> (30 มกราคม 2563).
- ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา <http://www.doa.go.th/fc/nakhonsawan/k?p=1332ppsf.doae> (30 มกราคม 2563).
- สุเทพ สหยา. 2561. *กลไกการออกฤทธิ์สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง 29 กลุ่ม*. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา [ppsf.doae.go.th/worldpress/wp-content/uploads/2018/08/กลไกการออกฤทธิ์-29กลุ่ม.pdf](http://ppsf.doae.go.th/worldpress/wp-content/uploads/2018/08/กลไกการออกฤทธิ์-29กลุ่ม.pdf) (30 มกราคม 2563).

- EN15662. 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.*
- Eurachem. 2014. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.* 2<sup>nd</sup> ed.
- Pihlstrom, T., G. Blomkvist, P. Friman, U. Pagard and B.G. Osterdahl. 2007. *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.* Anal Bioanal Chem. 398. 1773-1789.
- SANCO. 2013. *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed.* European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.
- Su-Jin, L., K. Young-Hak, H. Young-Sun, K. Chan Hyeok, D. Jung-A, I. Moo Hyeog, L. Young Deuk and C. Myoung-Gun. 2010. *Determination of Methoxyfenozide, Chomafenozide and Tebufenozide Residues in Agricultural Commodities Using HPLC-UVD/MS.* The Korean Journal of Pesticide Science. 14. 37-48.
- Yuanbo, L., D. Fengshou, L. Xingang, X. Jun, C. Xiu, H. Yongtao and L. Xuyang. 2013. *Development of 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. 9-1. 250-251.