รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปัจจัยการผลิตทางการเกษตรตามมาตรฐานสากล

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรม : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างเพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการ

3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้างสไปโรมีซิเฟน (spiromesifen) และอนุพันธ์ในพืชตระกูลมะเขือ

: Development of Method and Validation for Analysis Spiromesifen and its metabolite in Eggplant

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวสุพัตรี หนูสังข์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นายบุญทวีศักดิ์ บุญทวี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้างสไปโรมีซิเฟน (spiromesifen) และสารอนุพันธ์สไปมีซิเฟน-อินอล (spiromesifen-enol) ในตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือ โดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า spiromesifen และ spiromesifen-enol มีค่า retention time ที่ 6.81 นาที และ 3.96 นาที ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.005-0.50 µg/mL มีค่า R^2 = 0.9998 และ 0.9993 ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่ วิธี original QuEChERS วิธี EN QuEChERS และวิธีการสกัดด้วย ethyl acetate ผลจากการศึกษาพบว่าการสกัดด้วย ethyl acetate ให้ค่าร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) ที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธี QuEChERS ทั้ง 2 วิธี โดยให้ %recovery เฉลี่ย สำหรับ spiromesifen และ spiromesifen-enol เท่ากับ 105% และ 87% ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วย ethyl acetate ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือเปราะ โดยศึกษาช่วงการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรงของวิธีการวิเคราะห์ (working range/linearity) สำหรับสารทั้งสองชนิด พบว่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01- 0.50 mg/kg ค่า R^2 > 0.995 และให้ขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.005 และ 0.01 mg/kg ตามลำดับ จากการพิสูจน์ความถูกต้อง (accuracy) โดยประเมินจาก %recovery ทำการสกัดสารที่ 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าสาร spiromesifen

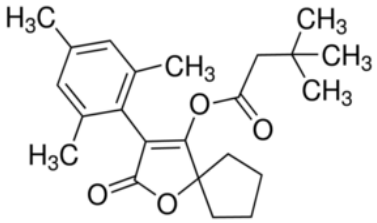
และ spiromesifen-enol ให้ %recovery เท่ากับ 73-102% และ 76-92% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ สำหรับการพิสูจน์ความเที่ยง (precision) ประเมินจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) พบว่าอยู่ในช่วง 3-6% และ 2-7% ตามลำดับ โดยวิธีการดังกล่าวที่พัฒนาขึ้นนี้ พบว่าสามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen และสารอนุพันธ์ในพืชตระกูลมะเขือชนิดต่าง ๆ ได้

Abstract

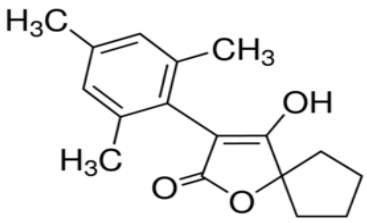
The analysis method for spiromesifen and it metabolite (spiromesifen-enol) in eggplant was developed and validated using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In the optimized condition of LC-MS/MS, spiromesifen and spiromesifen-enol was present at the retention time of 6.81 min and 3.96 min, respectively. Both compounds provided the linearity of 0.005-0.50 µg/mL with R^2 of 0.9998 (spiromesifen) and 0.9993 (spiromesifen-enol). These compounds were first extracted from eggplant by comparing three methods; original QuEChERS, EN QuEChERS and ethyl acetate. Conseqently, the extraction by ethyl acetate of a 0.10 mg/kg spike gave better recovery, 105% for spiromesifen and 87% for spiromesifen-enol. The method was then validated using ethyl acetate extraction. The obtained linearity was 0.01-0.50 mg/kg (R^2>0.995) with limit of detection (LOD) of 0.005 mg/kg and limit of quantitation (LOQ) of 0.01 mg/kg for both compounds. The recoveries of three spike levels were 73-102% (spiromesifen) and 76-92% (spiromesifen-enol). The precision of the method was considered in term of relative standard deviation (%RSD), which were 3-6% (spiromesifen) and 2-7% (spiromesifen-enol). This developed method was successfully applied for thr determination of spiromesifen and spiromesifen-enol in various types of eggplant.

6. คำนำ

สไปโรมีซิเฟน (spiromesifen) เป็นสารป้องกันกำจัดแมลงและไรศัตรูพืช จัดในกลุ่มสารออกฤทธิ์กับขบวนการเมตาโบลิซึม ในการสังเคราะห์ไขมัน (lipid synthesis) และการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth regulation) จุดทำลายแมลงคือการยับยั้งขบวนการทางชีวเคมีในการสังเคราะห์ เป็นสารที่มีการขึ้นทะเบียนแล้วในประเทศไทย มีชื่อทางการค้าคือ โอเบรอน 240 SC ใช้ในการป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชหลายชนิด เช่น ไรขาวพริก, ไรแดง ไรแดงแอฟริกัน แมลงหวี่ขาวยาสูบ spiromesifen มีสารอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ spiromesifen-enol (M0 1), 4-hydroxymethylspiromesifen-enol (M02), 4-hydroxymethylglucoside-spiromesifen-enol (M03) และ dihydroxy- spiromesifen-enol (M04) สารอนุพันธ์ที่พบในตัวอย่างอาหารและพืชโดยส่วนใหญ่ คือ spiromesifen-enol (M01) (EFSA, 2012) ลักษณะโครงสร้างของสาร spiromesifen และ spiromesifen-enol แสดงดังภาพที่ 1



spiromesifen



spiromesifen-enol

ภาพที่ 1. โครงสร้างทางเคมีของ spiromesifen และ spiromesifen-enol

spiromesifen มีการใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อป้องกันปัญหาอาการยอดหงิกของพืช ได้แก่ พริก และมะเขือ ทำให้สารดังกล่าวมีโอกาสที่จะเกิดการตกค้างในตัวอย่างมะเขือได้ การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen และ spiromesifen-enol ในพืชตระกูลมะเขือ เบื้องต้นผู้วิจัยเลือกใช้มะเขือเปราะเนื่องจากเป็นมะเขือที่มีความนิยมนำมารับประทานมากที่สุด และหลังจากที่ได้วิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมแล้ว จะนำวิธีดังกล่าวไปพัฒนาสำหรับตรวจวิเคราะห์พืชตระกูลมะเขือชนิดอื่น ๆ ต่อไป

เทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen ที่นิยมใช้ ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS/MS) (Tran *et al*., 2012) และเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี (LC-MS/MS) (Rajski *et al*., 2013; Pastor-Belda *et al*., 2015) แต่เนื่องจากการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในตัวอย่างมะเขือนั้น อาจมีปัญหาการรบกวนสัญญานการตรวจวัดจาก matrix ที่มีในตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้นและเพื่อลดเวลา ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ การพัฒนาเทคนิคการเตรียมตัวอย่างหรือเทคนิคการสกัดสารพิษตกค้าง spiromesifen และและ spiromesifen-enol จึงเป็นสิ่งจำเป็น

ปัจจุบันนี้มีงานวิจัยหลาย ๆ งานที่ศึกษาวิธีการสกัดและวิธีการ clean up เพื่อวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen ในตัวอย่างผัก ผลไม้ ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น การสกัดด้วย 1% acetic acid in acetonitrile ร่วมกับการ clean up ด้วยวิธี dispersive solid phase extraction (DSPE) โดยใช้ PSA และ $MgSO_4$ ในการ clean up ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Siddamallaiah *et al*., 2016) และการสกัดด้วยวิธี QuEChERS โดยใช้ acetonitrile ร่วมกับการ clean up ด้วย PSA และ $MgSO_4$ ก่อนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Nunez *et al*., 2012)

จากการศึกษาในงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเทคนิคการสกัด การ clean up และการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen มีหลายวิธี ซึ่งสามารถนำมาเป็นแนวทางในการตรวจวิเคราะห์ spiromesifen ในมะเขือเปราะได้ แต่วิธีการดังกล่าวเหล่านี้ยังไม่มีวิธีไหนที่ทำการตรวจวิเคราะห์ spiromesifen-enol ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวิเคราะห์ให้สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้เหมาะสม ที่สำคัญวิธีการที่พัฒนานี้สามารถวิเคราะห์ได้ทั้ง spiromesifen และ spiromesifen-enol โดยทดสอบความใช้ได้ของวิธี เพื่อยืนยันความถูกต้องแม่นยำ และสามารถนำวิธีที่ได้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยสารพิษตกค้างจากแปลงทดลอง เพื่อกำหนดค่า Maximum Residue Limits (MRLs) งานบริการ และการขยายขอบข่ายการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ centrifuge tube ขนาด 15 และ 50 mL ขวดบรรจุสาร ขนาด 15 mL ขวด vial ขนาด 1.5 mL และตัวกรองชนิด PTFE ขนาด 0.2 µm

2. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่ง 2 และ 5 ตำแหน่ง ที่ผ่านการสอบเทียบ, vortex, centrifuge, food processor, dispenser ขนาด 10 mL, micro pipette ขนาด 100-5,000 µL และเครื่องลดปริมาตรด้วยไนโตรเจน (Nitrogen Evaporator)

3. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) และคอลัมน์ชนิด Synergi fusion-RP 100A ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 mm ความยาว 100 mm

- สารเคมี

1. สารมาตรฐานวัตถุมีพิษ ได้แก่ spiromesifen ความบริสุทธิ์ 98.5 % และสารมาตรฐาน spiromesifen-enol ความบริสุทธิ์ 98.0 %

2. สารเคมี ได้แก่ acetonitrile (HPLC grade), ethyl acetate (PR grade), formic acid, ammonium formate, water (HPLC grade), NaCl, $MgSO_4$, trisodiumcitrate di-hydrate, disodium hydrogencitrate, primary secondary amine (PSA), graphitize carbon black (GCB)

3. ตัวแทนพืชที่นำมาทดลอง ได้แก่ มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง และมะเขือพวง จากแหล่งจำหน่าย

- วิธีการ

7.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เป็นการนำสารมาตรฐานมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ สามารถเตรียมสารละลายมาตรฐานชนิดต่าง ๆ ดังนี้

7.1.1 stock solution โดยชั่งสารมาตรฐาน spiromesifen และ spiromesifen-enol ให้ได้น้ำหนักประมาณ 10 mg ใน volumetric flask ขนาด 10 mL และนำค่า % purity มาคำนวณกลับเป็นน้ำหนักสารที่แท้จริง ให้มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานประมาณ 1,000 µg/mL โดยใช้ acetonitrile (HPLC grade) เป็นตัวทำละลาย ในการเตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานสามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (µg/mL)} = \frac{\text{น้ำหนักที่ชั่ง (mg)} \times \text{ความบริสุทธิ์ของสาร (\%)} \times 10^3}{\text{ปริมาตรที่เตรียม (mL)} \times 100}$$

7.1.2 intermediate mix standard solution โดย mix สารทั้ง 2 ชนิด ให้มีความเข้มข้น 100 µg/mL และ 10 µg/mL ใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (µg/mL)

N_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม (µg/mL)

V_1 = ปริมาตรของสารตั้งต้นที่ต้องดูดมา (mL)

V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการเตรียม (mL)

7.1.3 working mix standard solution ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.5 µg/mL โดยใช้สูตรการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 1.2

7.2 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับตรวจวิเคราะห์สาร spiromesifen และ spiromesifen-enol

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol ด้วย LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ความไวในการวิเคราะห์สูง (high sensitivity) และให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ โดยมีสภาวะของเครื่อง ดังนี้

7.2.1 การเตรียมสภาวะเครื่อง LC

Column : Synergi Fusion-RP 100A, 100 mm × 2.0 mm

Column Temperature : 25 °C

Flow rate : 0.4 mL/min

Injection Volume : 5 µL

Mobile phase : 5mM ammonium formate in H_2O (A) and ACN (B) (อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

เวลา (นาที)	อัตราไหล	สารละลาย A (%)	สารละลาย B(%)
0.0	0.4	80	20
5.0	0.4	20	80
8.0	0.4	20	80
10.0	0.4	80	20

7.2.2 การเตรียมสภาวะเครื่อง Triple Quadrupole Mass Spectrometer ดังนี้

Ion mode : Positive ESI

Nebulizer : 45 psi

Drying gas flow : 11 L/min

Capillary : 4000V

Drying gas temp : 350 °

ตารางที่ 2 Parameter ต่างๆ ของ mass spectrometer ที่เหมาะสม

Compound	Precursor	Product ion	Dwell time	Fragmentor	Collission
spiromesifen	371	273	50	102	4
	273	255	50	140	10
	273	187	50	140	15
spiromesifen-enol	273	255	50	140	10
	273	187	50	140	15

7.3 วิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol

เปรียบเทียบวิธีการสกัดตัวอย่างมะเขือเปราะ 3 วิธีดังนี้

7.3.1 วิธี Original QuEChERS (Anastassides *et al.*, 2003)

ชั่งตัวอย่างมะเขือเปราะ 10±0.05 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 mL เติม mix spiromesifen ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (6 ซ้ำ) เติม acetonitrile 10 mL เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติมสารสกัด $MgSO_4$ 4 g, NaCl 1 g เขย่าด้วยมือ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 5 mL ลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 mL ที่มีสารผสมของ PSA 125 mg และ $MgSO_4$ 750 mg เขย่าด้วยมือ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 µm ลงใน vial ขนาด 1.5 mL นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.2 วิธี EN QuEChERS (EN 15662: 2008)

ชั่งตัวอย่างมะเขือเปราะ 10±0.05 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 mL เติม mix spiromesifen ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (6 ซ้ำ) เติม acetonitrile 10 mL เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติมสารสกัด $MgSO_4$ 4 g, NaCl 1 g, Na_2Hcitrate 1.5.H_2O 0.5 g และ Na_3citrate 2.H_2O 1.0 g เขย่าด้วยมือ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 5 mL ลงในหลอด centrifuge ขนาด 15 mL ที่มีสารผสมของ PSA 125 mg, $MgSO_4$ 750 mg และ GCB 50 mg เขย่าด้วยมือ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 µm ลงใน vial ขนาด 1.5 mL นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.3.3 วิธี ethyl acetate (Pihlstrom *et al.*, 2007)

ชั่งตัวอย่างมะเขือเปราะ 5±0.05 g ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม mix spiromesifen ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (6 ซ้ำ) เติม ethyl acetate 10 mL เขย่าด้วยมือ 1 นาที เติมสารสกัด Na_2SO_4 5 g, NaCl 1 g และ $NaHCO_3$ 1.5 g เขย่าด้วยมือ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 µm ลงใน vial ขนาด 1.5 mL เปลี่ยนสารละลายจาก ethyl acetate เป็น acetonitrile ด้วย N-evap และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

7.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol

เมื่อได้วิธีการสกัดตัวอย่างและการตรวจวิเคราะห์ที่เหมาะสม จึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยการศึกษา parameter ต่างๆ ดังนี้

7.4.1 ช่วงการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (working range/linearity)

ศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ด้วยการ spike สารละลาย mix spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือ ได้แก่ มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง และมะเขือพวง 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.50 mg/kg แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 6 ซ้ำ สกัดตัวอย่างด้วยวิธี ethyl acetate และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง (แกนy) และความเข้มข้นของสาร spiromesifen ที่ spike (แกน x) โดยค่า R^2 ต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด (≥ 0.995)

7.4.2 ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการสกัด (limit of detection, LOD)

เป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ด้วยการ spike สารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือ ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOD เท่ากับ 3×SD (Eurachem, 2014)

7.4.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

เป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg และมีความถูกต้อง แม่นยำ ให้ค่าความเที่ยงและความแม่นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ด้วยการ spike สารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ เท่ากับ 10×SD (Eurachem, 2014)

7.4.4 ความแม่น (accuracy)

ศึกษาความแม่นของวิธีวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ด้วยการ spike สารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.10 และ 0.50 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินค่า accuracy จาก %recovery ของสารที่วิเคราะห์ สามารถคำนวณได้จากจากสมการ

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

เมื่อ C_f = ความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ได้ (มีการ spike)

C_a = ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารที่เติมลงในตัวอย่าง

เกณฑ์การยอมรับของ %recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของห้องปฏิบัติการในสหภาพยุโรป (SANCO, 2013) คือ 70-120 % ค่าที่วิเคราะห์ได้ที่ทุก ๆ ความเข้มข้นจะต้องผ่านเกณฑ์ดังกล่าว

7.4.5 ความเที่ยง (precision)

ศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample โดยการ spike สารละลายมาตรฐานผสม spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือ ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.10 และ 0.50 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมินค่า precision จากการคำนวณหาค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) โดย % RSD สามารถคำนวณได้จากสมการ

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

เกณฑ์การยอมรับของ precision คือมีค่า %RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 20 (SANCO, 2013)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา

เริ่มเดือนตุลาคม 2558 และสิ้นสุดเดือนกันยายน 2560 รวมระยะเวลา 2 ปี

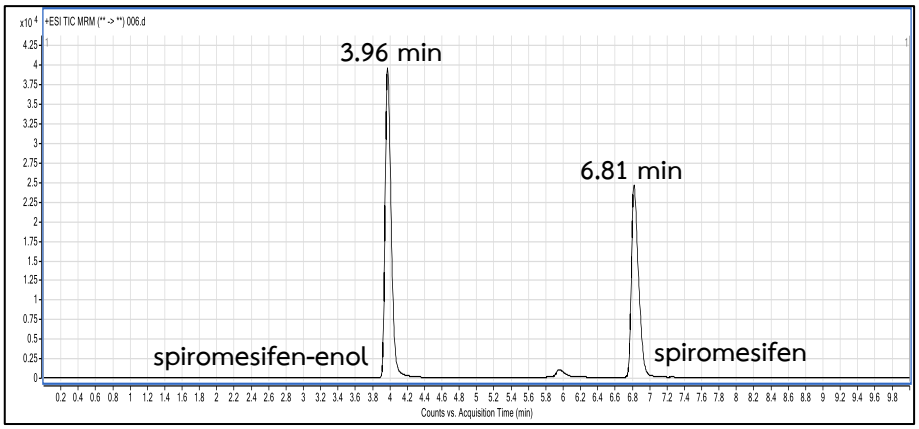
สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษทางการเกษตร กองวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

8.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS ในการตรวจวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol ด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ในตัวทำละลาย acetonitrile และฉีดสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 0.10 µg/mL พบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสาร spiromesifen มีค่า retention time ที่ 6.81 นาที ส่วนสาร spiromesifen-enol มีค่า retention time ที่ 3.96 นาที (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารผสม spiromesifen ตรวจวัดด้วยเทคนิค LC-MS/MS

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า spiromesifen และ spiromesifen-enol ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.005-0.50 µg/mL มีค่า R^2 = 0.9998 และ 0.9993 ตามลำดับ

8.2 ผลการศึกษาวิธีการสกัดตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในมะเขือเปราะ

8.2.1 จากการทดลองสกัดตัวอย่างมะเขือเปราะที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (6 ซ้ำ) ด้วยวิธี Original QuEChERS %recovery ของ spiromesifen และ spiromesifen-enol เท่ากับ 103-106% และ 51-61% ตามลำดับ การสกัดด้วยวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการสกัด spiromesifen อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ 70-120% แต่สำหรับสาร spiromesifen-enol ให้ %recovery ต่ำกว่า 70% ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้สกัดไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถสกัด spiromesifen-enol จากตัวอย่างได้ (ตารางที่ 3) โดยในตัวอย่างมะเขือที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐาน spiromesifen (ตัวอย่าง control) ตรวจไม่พบ spiromesifen และสารอนุพันธ์

8.2.2 จากการทดลองสกัดตัวอย่างมะเขือเปราะที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (6 ซ้ำ) ด้วยวิธี EN QuEChERS พบว่า %recovery สำหรับสาร spiromesifen และ spiromesifen-enol เท่ากับ 105-106% และ 46-51% ตามลำดับ และพบว่าให้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการสกัดด้วยวิธี Original QuEChERS คือ สาร spiromesifen-enol ได้ %recovery ที่ต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ (ตารางที่ 3)

8.2.3 จากการทดลองสกัดตัวอย่างมะเขือเปราะด้วยวิธี ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg (6 ซ้ำ) พบว่า ได้ %recovery สำหรับ spiromesifen และ spiromesifen-enol เท่ากับ 101-109% และ 84-89% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบ %recovery ของการสกัด spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือเปราะทั้ง 3 วิธี ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/kg

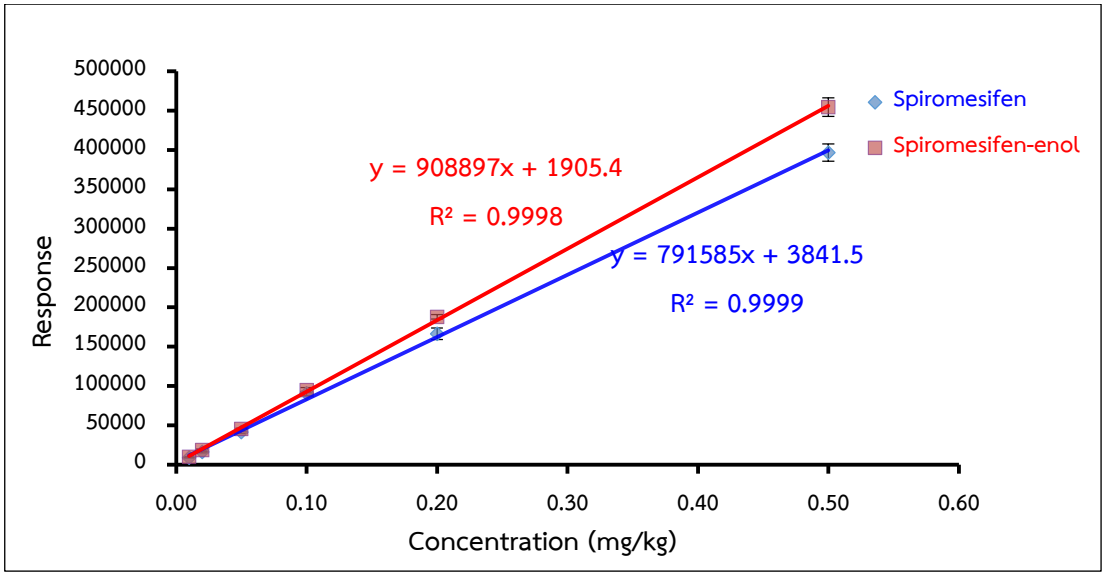
No.	original QuEChERS (n=6)		EN QuEChERS (n=6)		ethyl acetate (n=6)	
	spiromesifen	spiromesifen -enol	spiromesifen	spiromesifen -enol	spiromesifen	spiromesifen -enol
1	104	55	106	51	107	85
2	105	53	106	46	109	88
3	105	51	105	49	104	87
4	106	61	106	48	108	84
5	103	53	106	51	101	89
6	104	54	105	50	104	89
mean	**104**	**55**	**105**	**49**	**105**	**87**
SD	**0.85**	**3.41**	**0.41**	**2.00**	**3.04**	**2.08**
%RSD	**1**	**6**	**1**	**4**	**3**	**2**

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัด ทั้ง 3 วิธี พบว่า การสกัดด้วย ethyl acetate ให้ %recovery ของสารทั้ง 2 ชนิดอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยการสกัด 2 วิธีแรก ใช้ตัวทำละลายในการสกัดเหมือนกันคือ acetonitrile แต่เนื่องจาก spiromesifen-enol สามารถละลายใน ethyl acetate ได้ดีกว่า acetonitrile ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธีการสกัดด้วย ethyl acetate ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validate)

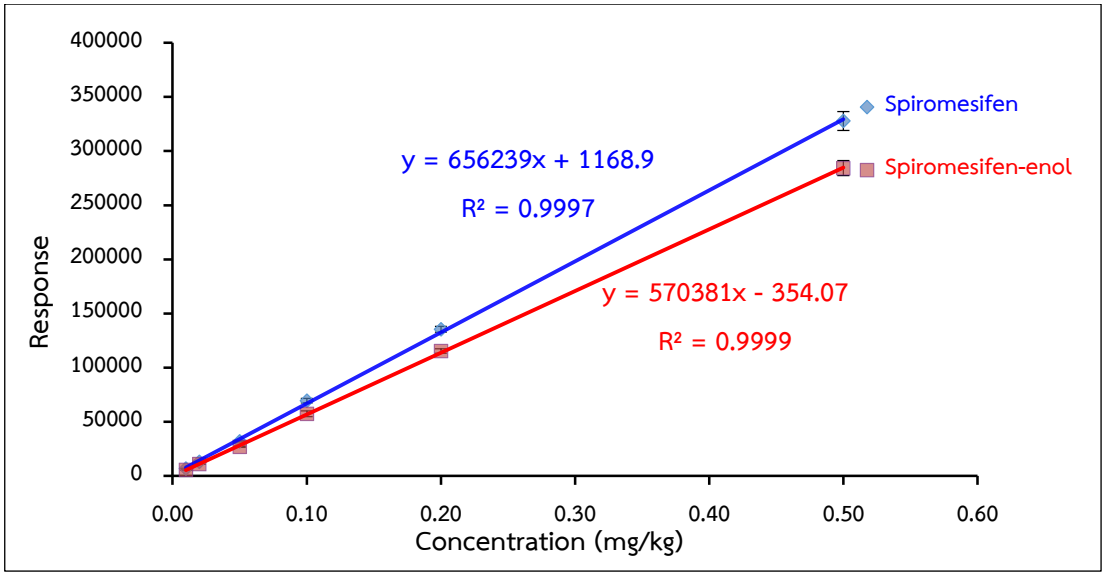
8.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือ และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

8.3.1 ผลการศึกษาช่วงการใช้งาน/ความเป็นเส้นตรงของวิธีวิเคราะห์ (working rang/linearity)

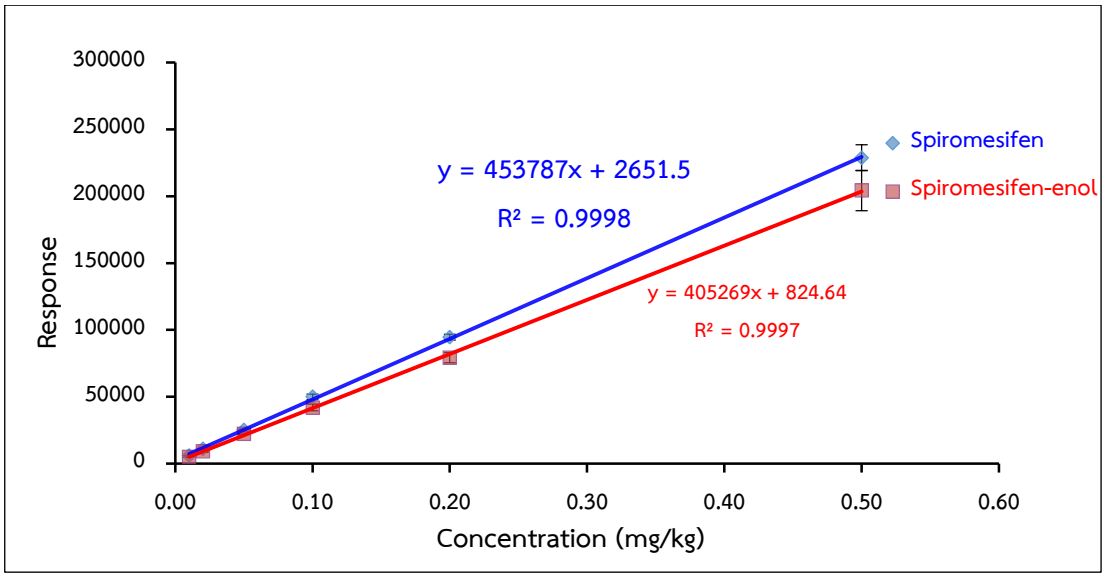
ศึกษาช่วงการใช้งานของ spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือ โดยการ spike สารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ลงในตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ ตั้งแต่ 0.01 ถึง 0.50 mg/kg ความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ และสกัดด้วยวิธี ethyl acetate สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการสกัดตัวอย่าง (แกน y) และความเข้มข้นของสาร spiromesifen ที่ spike (แกน x) พบว่า ความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.01 ถึง 0.50 mg/kg โดยให้ค่า $R^2 > 0.999$ (ภาพที่ 3-6) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (≥ 0.995)



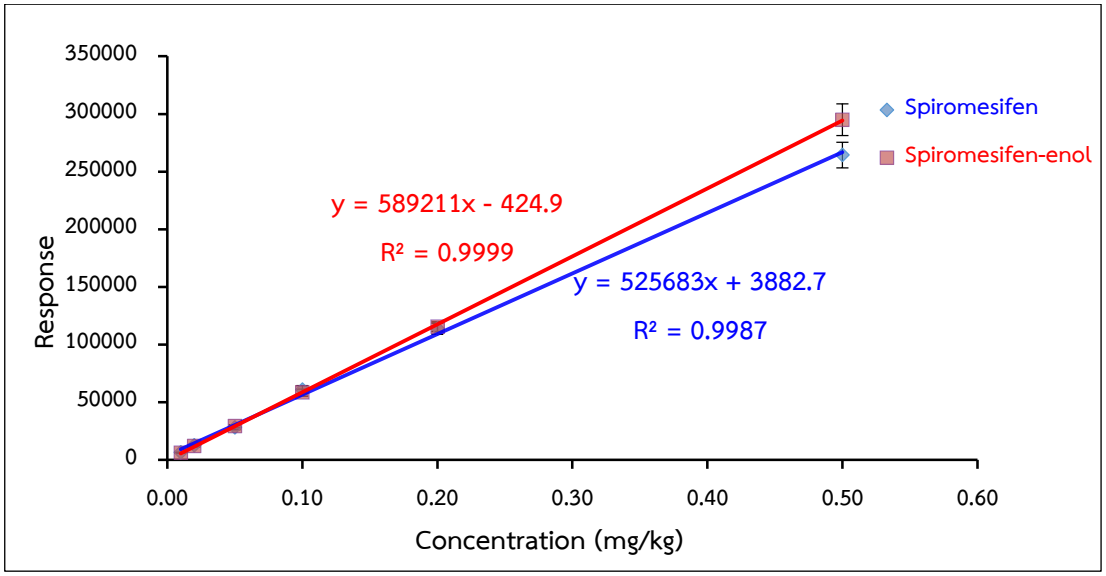
ภาพที่ 3 ความเป็นเส้นตรงของสาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือเปราะ



ภาพที่ 4 ความเป็นเส้นตรงของสาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือยาว



ภาพที่ 5 ความเป็นเส้นตรงของสาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือม่วง



ภาพที่ 6 ความเป็นเส้นตรงของสาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือพวง

8.3.2 ขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธีการสกัด (limit of detection, LOD)

ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOD เท่ากับ 3×SD

จากตาราง (ภาคผนวก ตารางที่ 1) เพื่อพิสูจน์ค่า LOD พบว่า spiromesifen และ spiromesifen-enol มี LOD เท่ากับ 0.0015 และ 0.0009 mg/kg แต่เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการวิเคราะห์ว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol ได้ ในการทดลองนี้จึงเลือกความเข้มข้น 0.005 mg/kg เป็น LOD ของทั้งสองชนิด (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ยังได้ทำการพิสูจน์ด้วยว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าว สามารถตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen และ spiromesifen-enol ได้จริง โดยทำการ

ทดลองสกัดสารทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.005 mg/kg จำนวน 10 ซ้ำ จากการทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าว สามารถตรวจวิเคราะห์ spiromesifen และ spiromesifen-enol ได้ (ภาคผนวก ตารางที่ 2)

8.3.3 ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณได้ ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ เท่ากับ 10×SD

จากการพิสูจน์ LOQ พบว่า spiromesifen และ spiromesifen-enol ได้ LOQ เท่ากับ 0.005 และ 0.003 mg/kg ตามลำดับ (ภาคผนวก ตารางที่ 1) และเพื่อให้มั่นใจว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างได้จริง โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision ในการทดลองนี้ เลือกใช้ความเข้มข้น เท่ากับ 0.01 mg/kg เป็น LOQ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 LOD และ LOQ ของการวิเคราะห์สาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือ

crops	pesticides	linear range (mg/kg)	equation	R^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
มะเขือเปราะ	spiromesifen	0.01-0.50	y = 791585x + 3841.5	0.9999	0.005	0.01
	spiromesifen-enol	0.01-0.50	y = 908897x + 1905.4	0.9998	0.005	0.01
มะเขือยาว	spiromesifen	0.01-0.50	y = 656239x + 1168.9	0.9997	0.005	0.01
	spiromesifen-enol	0.01-0.50	y = 570381x + 354.07	0.9999	0.005	0.01
มะเขือม่วง	spiromesifen	0.01-0.50	y = 525683x + 3882.7	0.9987	0.005	0.01
	spiromesifen-enol	0.01-0.50	y = 589211x + 424.9	0.9999	0.005	0.01
มะเขือพวง	spiromesifen	0.01-0.50	y = 453787x + 2651.5	0.9998	0.005	0.01
	spiromesifen-enol	0.01-0.50	y = 405269x + 824.6	0.9997	0.005	0.01

8.3.4 ความแม่น (accuracy)

จากการ spike สารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือ 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.10 และ 0.50 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่า %recovery ของ spiromesifen และ spiromesifen-enol อยู่ในช่วง 73-102% และ 76-92% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องแม่นยำ

ตารางที่ 5 แสดงค่าร้อยละการได้กลับคืน (%recovery) ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen และสารอนุพันธ์ในตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

Crop	spiked level (mg/kg)	spiromesifen %recovery (n=10)	SD	%RSD	spiromesifen-enol %recovery (n=10)	SD	%RSD
มะเขือเปราะ	0.01	102	4.97	5	91	3.06	3
	0.10	96	2.68	3	87	3.02	4
	0.50	93	2.47	3	83	2.16	3
มะเขือยาว	0.01	90	3.57	4	88	2.72	3
	0.10	89	2.67	3	92	4.22	5
	0.50	88	2.24	3	92	2.24	2
มะเขือม่วง	0.01	90	3.55	4	85	2.88	3
	0.10	86	4.72	6	80	4.35	5
	0.50	73	3.09	4	82	3.79	5
มะเขือพวง	0.01	96	3.52	4	89	4.30	5
	0.10	84	3.20	4	76	4.39	6
	0.50	76	3.05	4	78	5.52	7

8.3.5. ความเที่ยง (precision)

จากการ spike สารละลายมาตรฐาน mix spiromesifen ลงในตัวอย่างมะเขือ ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0.01, 0.10 และ 0.50 mg/kg ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ พบว่าการวิเคราะห์สาร spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างมะเขือเปราะให้ %RSD อยู่ในช่วง 3-6% และ 2-7% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ของ SANCO (SANCO, 2013) คือ ≤20% แสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความเที่ยง

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen และ spiromesifen-enol ในตัวอย่างพืชตระกูลมะเขือ สกัดด้วยวิธี ethyl acetate และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS นั้น ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง ด้วยการพิสูจน์ค่า accuracy และ precision โดยการวิเคราะห์ช่วงการใช้งานอยู่ในช่วง 0.01-0.50 mg/kg มี LOD และ LOQ เท่ากับ 0.005 mg/kg และ 0.01 mg/kg และวิธีการดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen และ spiromesifen-enol ในพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไปได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้างสามารถนำวิธีที่ได้นี้ไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง spiromesifen

2. เพิ่มประสิทธิภาพและศักยภาพให้กับห้องปฏิบัติการสารพิษตกค้างมากยิ่งขึ้น สามารถถ่ายทอดวิธีการดังกล่าวให้แก่เจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 และหน่วยงานอื่นๆ ที่สนใจได้

3. สามารถนำวิธีการที่พัฒนานี้ ไปขยายขอบข่ายในการรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ได้

11. คำขอบคุณ -

12. เอกสารอ้างอิง

Anastassiades, M., Lehotay S. J., Stajnbaher D. and Schenck F.J. 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *J. AOAC Int*., 86, 412-431.

EN 15662: 2008. Foods of plant origin- Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partition 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.

European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance spiromesifen. *EFSA Journal*. 10(10), 2879: 1-56.

Núnez, O., Gallart-Ayala, H., Ferrerb, I., Moyanoa, E. and Galceran, M. T. 2012. Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* 1249: 164-180.

Pastor-Belda, M., Garrido, I., Campillo, N., Vinas, P., Hellín, P., Flores, P. and Fenoll, J. 2015. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of new generation pesticides in soils by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1394: 1-8.

Pihlstrom, T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U. and Osterdahl, B.G. 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*. 389, 1773-1789.

Rajski, L., b, Lozano, A., Uclés, A., Ferrer, C. and Fernández-Alba, A. R. 2013. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1304: 109-120.

SANCO. 2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. European Union, Health and Consumer Protection Directorate General.

Siddamallaiah, L. and Mohapatra, S. 2016. Residue level and dissipation pattern of spiromesifen

in cabbage and soil from 2-year field study. *Environ Monit Assess*, 188: 155. 1-12.

Tran, K., Eide, D., Nickols, S. M., Cromer, M. R., Srur, A. S. and Smith R. E. 2012. Finding of pesticides in fashionable fruit juices by LC–MS/MS and GC–MS/MS. *Food Chemistry*, 134: 2398-2405.

13. ภาคผนวก

ตารางที่ 1 LOD (3SD) และ LOQ(10SD) ของ spiromesifen และ spiromesifen-enol สกัดด้วยวิธี ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 0.01 mg/kg

No.	concentration of residues (mg/kg)	
	spiromesifen	spiromesifen-enol
1	0.0095	0.0086
2	0.0097	0.0088
3	0.0097	0.0092
4	0.0098	0.0093
5	0.0107	0.0089
6	0.0099	0.0088
7	0.0104	0.0093
8	0.0107	0.0095
9	0.0108	0.0089
10	0.0105	0.0094
mean	**0.0102**	**0.0091**
SD	**0.0005**	**0.0003**
3SD (LOD)	**0.0015**	**0.0009**
10SD (LOQ)	**0.0050**	**0.0030**

ตารางที่ 2 การยืนยันค่า LOD ที่ความเข้มข้น 0.005 mg/kg

replication	concentration of residues (mg/kg)	
	spiromesifen	spiromesifen-enol
1	0.0051	0.0047
2	0.0053	0.0053
3	0.0052	0.0050
4	0.0052	0.0051
5	0.0056	0.0052
6	0.0056	0.0051
7	0.0050	0.0051
8	0.0054	0.0050
9	0.0051	0.0052
10	0.0054	0.0051
mean	**0.0053**	**0.0051**
SD	**0.0002**	**0.0002**