

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปี 2557

- 1. ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
- 2. โครงการวิจัย** : การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของวัตถุอันตรายให้ถูกต้องแม่นยำตามมาตรฐานสากล
กิจกรรม : การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารพิษตกค้าง
กิจกรรมย่อย : พัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร
- 3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย)** : การพัฒนาและตรวจสอบความความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Fipronil และสารอนุพันธ์ในผลไม้
ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Development of Method and Validation for Analysis Fipronil and its metabolites in Fruit
- 4. คณะผู้ดำเนินงาน**
หัวหน้าการทดลอง : นายวิษณุ แจ่มใบ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
ผู้ร่วมงาน : นายประชาติปต์ย์ พงษ์ภิญโญ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
: นางสมสมัย ปาลกุล กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.
: นางสาวพรนภัส วิชานนธานนท์ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กปผ.

5. บทคัดย่อ

พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างฟิโพรนิลและสารอนุพันธ์ในองุ่น โดยใช้เทคนิคเทคนิค Gas Chromatograph Micro-Electron Capture Detector (GC/ μ ECD) และ Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) สำหรับการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค GC/ μ ECD ได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐานฟิโพรนิลและสารอนุพันธ์ออกจากกัน การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างโดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ซึ่งวิธี Steinwandter, H. 1985 มีค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) ในการตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 22-40 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด ส่วนวิธี Original QuEChERS กับวิธี EN QuEChERS เท่ากับ 84-102 และ 90-99 ผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดเฉพาะฟิโพรนิล, ซัลโฟน, ซัลไฟด์, ดีซัลฟีนิล ยกเว้นคาร์บอน็อกซาไมด์ ปัญหาของเทคนิค GC/ μ ECD มีสภาพความไว (sensitivity) ลดลงเมื่อน้ำดีสารละลายตัวอย่างเข้าไปอาจเนื่องมาจากวิธีการเตรียมตัวอย่างยังไม่เหมาะสมเพียงพอในการกำจัดสารรบกวนทำให้สภาพความไวของเครื่องต่ำลง ดังนั้นในอนาคตถ้าจะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ควรที่จะต้องหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมและสามารถกำจัดสารรบกวนได้เป็นอย่างดี

ในส่วนการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ฟีโพรนิล และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้สภาวะของเครื่องที่เหมาะสมในการแยกและมีความเฉพาะเจาะจงสูงในการตรวจวิเคราะห์ฟีโพรนิล และสารอนุพันธ์ สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ใช้วิธี QuEChERS ในการสกัดตัวอย่าง และเปรียบเทียบขั้นตอนการกำจัดสารปนเปื้อน (clean up) ที่อัตราส่วนและชนิดของ sorbent แตกต่างกัน ($MgSO_4$, PSA, C18 และ GCB) ซึ่งอัตราส่วนของ $MgSO_4$: PSA อัตราส่วน 150:25 มิลลิกรัม และ $MgSO_4$: PSA : GCB อัตราส่วน 150:25:75 มิลลิกรัม ให้ประสิทธิภาพการกำจัดสารปนเปื้อนดีที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่น เมื่อได้สภาวะของเครื่องและวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ฟีโพรนิล และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS จึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์พบว่าวิธีทดสอบมีความจำเพาะเจาะจงไม่มีสารอื่นรบกวน จากการทดสอบ ช่วงของการวัด (Range) และความเป็นเส้นตรง (Linearity) อยู่ในช่วง 0.001 จนถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.995 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Accuracy) โดยประเมินจาก %Recovery ของฟีโพรนิล และสารอนุพันธ์ในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 96-106 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความเที่ยง (Precision) มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.32-7.75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการคำนวณความเที่ยงจากสมการ Horwitz ของฟีโพรนิล และสารอนุพันธ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 และค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.001 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ

Abstract

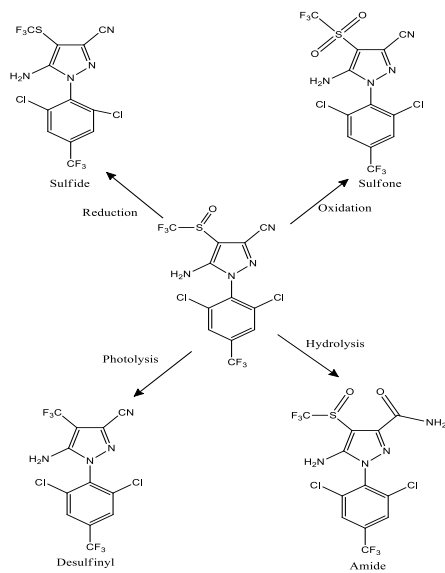
A gas chromatograph micro-electron capture detector (GC/ μ ECD) and liquid chromatograph tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were used to develop and validate the determination of fipronil and its metabolites in grape. The GC/ μ ECD condition was optimized to separate fipronil and its metabolite. Three extraction methods as Steinwandter, H (1985), Original QuEChERS and EN QuEChERS were compared for these pesticides. As the results, the recoveries (fipronil, sulfone, sulfide and desulfinyl) obtained from Steinwandter, H 1985, Original QuEChERS and EN QuEChERS method were range 22-40, 84-102 and 90-99%, respectively. However, GC/ μ ECD presented lower sensitivity after injected sample. Therefore, it implied this preparation method could not remove interferences and the methods should be developed to increase higher sensitivity of fipronil and metabolites analysis in the future. In case of LC-MS/MS, It presented the excellent sensitivity and condition for separated fipronil and metabolites. The QuEChERS methods was selected to modify for increased the extraction efficiency by varies sorbent ratio (PSA, C18 and GCB) which used to remove contaminants in the clean up steps. As

the results, the $MgSO_4$: PSA, 150:25 mg and $MgSO_4$: PSA : GCB, 150:25:75 mg were the best for clean up step. The method for determination fipronil and its metabolites by LC-MS/MS has been validated. Linearity ranges were between 0.001 – 0.5 mg/kg and correlation coefficient (r) was more than 0.995. The recoveries of the method evaluated at three spiked levels (0.001, 0.005 and 0.01 mg/kg) were in the ranges 96-106%. The precision values associated with the analytical method, expressed as RSD values, were 3.32-7.75% (HORRAT<2). The limits of quantitation (LOQ) and the limits of detection (LOD) of fipronil and its metabolites were 0.005 and 0.001 mg/kg respectively.

6. คำนำ

ฟีโพรนิลเป็นสารฆ่าแมลงในกลุ่มฟีนิลไพราโซล (phenylpyrazole) โดยออกจำหน่ายเป็นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาเมื่อปีพ.ศ. 2539 เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมแมลงในบ้านและในสัตว์เลี้ยง โดยปรากฏในผลิตภัณฑ์รูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ กัดแมลงสาบและมด สเปรย์และยาหยดภายนอกสำหรับสุนัขเพื่อกำจัดหมัดและเห็บ ฟีโพรนิลออกฤทธิ์ในการกำจัดหมัดและเห็บโดยรบกวนการทำงานของระบบประสาท โดยผ่านทาง GABA-gated chloride channel ขัดขวางการไหลผ่านของคลอไรด์ไอออนในเซลล์ประสาท ทำให้การทำงานของระบบประสาทผิดปกติ มีผลให้แมลงตายในที่สุด ข้อดีของฟีโพรนิลคือเป็นพิษต่อระบบประสาทเฉพาะของแมลง เนื่องจากฟีโพรนิลจับได้ไม่ดีกับ GABA receptor ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ฟีโพรนิลจัดเป็นสารฆ่าแมลงที่มีอันตรายระดับกลาง (กลุ่ม WHO class II moderately hazardous pesticide) มีค่า LD50 (ขนาดยาที่ทำให้หนูทดลองตายจำนวนร้อยละ 50) เท่ากับ 97 มก./กก. (WHO, 2009) มีพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม น้อยกว่าในนก ปลา และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

ฟีโพรนิลประกอบด้วยสารอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ Fipronil sulfone Fipronil sulfide Fipronil carboxamid และ Fipronil desulfinyl ซึ่งกลไกการเกิดสารอนุพันธ์ของ Fipronil แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Fipronil และการเกิดสารอนุพันธ์ชนิดต่างๆ

การตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างชนิด Fipronil และสารอนุพันธ์ในผักและผลไม้ส่วนใหญ่ใช้เทคนิค Gas Chromatograph Electron Capture (GC/ECD), Gas Chromatograph Mass Spectrometry (GC/MS) และ Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) โดยมีผู้ศึกษา และพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์อธิบายไว้ดังนี้

Paramasivam และคณะ (M. Paramasivam et al., 2013) ได้พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ของ Fipronil จำนวน 3 ชนิด โดยตรวจวิเคราะห์ในผัก ผลไม้ และดิน โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) และใช้วิธี QuEChERS ในการสกัดตัวอย่าง สำหรับ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กระเจี๊ยบ มะเขือเทศ องุ่น และดิน กำจัดสารปนเปื้อน (clean up) ด้วย d-SPE จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ค่า Range เท่ากับ 0.01-0.5 $\mu\text{g/ml}$ และค่า $r^2 > 0.999$ สำหรับค่า Accuracy อยู่ในช่วง 86-112% โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 mg/kg ค่า Precision มีค่า RSD น้อยกว่า 10.15% ในทุกตัวอย่าง วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปใช้ในการประเมินสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัยในผลิตผลทางการเกษตร

Mahmoud และคณะ (A. El-Moneim et al., 2010) ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจำนวน 150 ชนิดในองุ่น โดยวิธีที่พัฒนามีความสะดวกรวดเร็ว และประหยัดสารเคมี โดยใช้วิธี QuEChERS ในการสกัดสารตัวอย่าง โดยใช้ Acetonitrile และ Buffer Salts ($\text{MgSO}_4 + \text{NaCl} + \text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O} + \text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9$) และตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการตรวจวิเคราะห์ Fipronil ในองุ่นมี %Recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 mg/kg เท่ากับ 94, 102 และ 85 ตามลำดับ และมี %CV เท่ากับ 9, 15 และ 5 ตามลำดับ

Tseng SuHsiang และคณะ (T. Suttisang et al., 2009) ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างจำนวน 81 ชนิด รวมถึงสารอนุพันธ์ ในตัวอย่างผักและผลไม้ โดยใช้เทคนิค liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) การสกัดตัวอย่างใช้ Acetone และใช้คอลัมน์ชนิด Macroporous diatomaceous earth ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนซึ่งข้อดีคือช่วยลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง สิ้นเปลืองสารเคมีน้อย สะดวกและไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยสารที่ตรวจวิเคราะห์ 81 ชนิดประกอบด้วย สารกำจัดแมลง สารกำจัดไร สารกำจัดเชื้อรา สารกำจัดวัชพืช สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้คอลัมน์ Atlantis T3 ต่อกับเครื่อง LC-MS/MS สำหรับแยกสาร และชะสารออกจากคอลัมน์แบบ gradient เวลาในการวิเคราะห์ 25 นาที และเลือกตัวอย่างอุณหภูมิมาทดสอบโดยผลจากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีของ Fipronil ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.1 mg/kg มี %Recovery เท่ากับ 63.9(15.6) และ 46.3(7.25) ตามลำดับ มีค่า LOD เท่ากับ 0.05 µg/g วิธีที่พัฒนาช่วยลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ ลดปริมาณการใช้สารเคมี และมีความไวสูง

จากการทบทวนบทวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องเพื่อนำมาเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Fipronil และสารอนุพันธ์ เพื่อให้มีความไวสูงและเฉพาะเจาะจงมากขึ้นรวมถึงการหาวิธีการเตรียมตัวอย่างมีความสะดวกรวดเร็ว ประหยัดและให้ผลการทดสอบที่มีความถูกต้องและแม่นยำ และวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้จะได้ใช้ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง และถ่ายทอดไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้องภายใต้สังกัดกรมวิชาการเกษตรต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารมาตรฐานวัตถุพิษได้แก่ Fipronil 97.5%, Fipronil sulfone 99.5%, Fipronil sulfide 99.5%, Fipronil carboxamide 95% และ Fipronil desulfenyl 100 mg/l
2. สารเคมีได้แก่ Acetone (AR grade), Dichloromethane (AR grade), Acetonitrile (HPLC grade), Methanol (HPLC grade), Hexane (PR grade), Ethyl acetate (PR grade), Formic acid, Ammonium formate, Water (HPLC grade), NaCl , MgSO₄, Na₃Citrate dehydrate, Na₂HCitrate sesquihydrate, Primary secondary amine (PSA), C18, Graphitize carbon black (GCB)
3. เครื่องมือในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 5 ตำแหน่งที่ผ่านการสอบเทียบ, Centrifuge, Food processor, Dispenser ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร, Micro pipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร
4. เครื่องแก้วต่างๆในห้องปฏิบัติการเช่น Erlenmeyer flask, Volumetric flask, Beaker, Cylinder, Centrifuge tube (Teflon) ขนาด 50 มิลลิลิตร

5. เครื่องมือตรวจวัดวัตถุที่มีพิษชนิด Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ต่อกับเครื่อง Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) และเครื่อง Gas chromatograph Electron capture Detector (ECD)
6. ตัวแทนผลไม้ที่นำมาทดลองได้แก่ องุ่น

วิธีการ

1. ค้นคว้าเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย และวางแผนการทดลอง
2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ Fipronil, Fipronil sulfone, Fipronil sulfide Fipronil desulfenyl และ Fipronil carboxamide ได้แก่ 1,000 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน acetonitrile และนำสารมาตรฐานที่เตรียมแล้วมา Mixed เพื่อใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานและ spike ลงในตัวอย่าง
3. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค GC/ECD

3.1 ปรับสภาวะการทำงานของเครื่อง GC/ECD ที่เหมาะสมดังนี้

Column : capillary column ชนิด DB-1MS (Inert column) ขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 0.32 mm.ยาว 30 m ความหนาของ Film thickness 0.25 um.

Temperature : Oven 100 °C (1 min), 15 °C/min to 250 °C

(5 min), 20 °C/min to 270 °C (15 min) run time = 30 min

Injector, splitless mode : 250 °C, Detector : 300 °C

Carrier gas : He = 2 ml/min, H₂ = 4 ml/min , Air = 60 ml/min, make up gas

: N₂ = 100 ml/min

3.2 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม

ออกแบบการทดลองโดยเปรียบวิธีการสกัดสารตัวอย่าง 3 วิธี ดังนี้

3.2.1 สกัดด้วยวิธี Steinwandter, H. 1985 (Steinwandter, 1985)

ชั่งตัวอย่างองุ่น 25.00 กรัม เติม Mixed fipronil 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เติม acetone 50 มิลลิลิตร dichloromethane 40 มิลลิลิตร และ NaCl 8 กรัม นำไปปั่นด้วย Homogenizer 1 นาที เทสารละลายส่วนที่ใสลงใน MgSO₄ ประมาณ 30 กรัม ซึ่งอยู่ใน Erlenmeyer flask ที่มีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เทสารละลาย 50 มิลลิลิตร ลงในขวดกั้นแบนนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Evaporator จนเกือบแห้งเติม ethyl acetate 5 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร เป่าด้วย

N₂ Evaporator จนแห้งเติม Hexane นำไปกำจัดสิ่งปนเปื้อน (Cleanup) ด้วย silica gel ที่ deactivated และนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างด้วยเครื่อง GC-ECD

3.2.2 สกัดด้วยวิธี Original QuEChERS (Anastassiades, et al., 2003)

ชั่งตัวอย่างอ่อน 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ทำ 3 ซ้ำ) และเติม จากนั้นเติม Acetonitrile 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ MgSO₄ 4 กรัม NaCl 1 กรัม Na₃Citrate dehydrate 1 กรัม และ Na₂HCitrate sesquihydrate 0.5 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารผสมระหว่าง PSA 125 มิลลิกรัม กับ MgSO₄ 750 มิลลิกรัม นำไป vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD

3.2.3 สกัดด้วยวิธี EN QuEChERS (Anastassiades, et al., 2003) ชั่งตัวอย่างอ่อน 10 กรัม ลงในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Mixed standard ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นเติม Acetonitrile 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที เติมสารผสมของ MgSO₄ 4 กรัม NaCl 1 กรัม เขย่าด้วยมือประมาณ 1 นาที นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ใส 1 มิลลิลิตร เติมสารผสมระหว่าง PSA 50 มิลลิกรัม MgSO₄ 150 มิลลิกรัม และ C 18 จำนวน 200 มิลลิกรัม นำไป vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้น centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm 5 นาที กรองสารละลายส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-ECD

4. การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

4.1 ตั้งสภาวะเครื่อง Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

- คอลัมน์ชนิด Kinetex-C18 ความยาว 10 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.10 มิลลิเมตร ขนาดของอนุภาคภายใน 2.6 ไมครอน
- การชะสารออกจากคอลัมน์เป็นแบบ gradient โดยที่สาร A เป็น Ammonium acetate buffer เข้มข้น 5 mM กับ 0.01 % Formic acid ส่วนสาร B เป็น Acetonitrile อัตราส่วนแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนการชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient

เวลา (นาที)	อัตราไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	สารละลาย A (เปอร์เซ็นต์)	สารละลาย B (เปอร์เซ็นต์)
0	0.4	95	5
2	0.4	40	60
4	0.4	25	75
6	0.4	0	100
7	0.4	0	100
7.01	0.4	95	5
9.50	0.4	95	5

- ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 2 ไมโครลิตร
- อุณหภูมิของคอลัมน์ 50 องศาเซลเซียส

4.2 การตั้งสภาวะเครื่อง Tandem mass spectrometry

MS QQQ Mass Spectrometer

- Scan type : Multi Reaction Monitoring (MRM)
- Ion mode : Electrospray Ionization (ESI)

Source parameter

- Gas Temp 280°C
- Gas Flow 4 (l/min)
- Nebulizer 30 psi
- Capillary 3500 V (Negative mode)

ตารางที่ 2 แสดง Parameter ต่างๆ ของ Mass spectrometry ที่เหมาะสมกับ Fipronil และสารอนุพันธ์

Compound	Precursor	Product ion	Dwell time	Fragmentor	Collision
Fipronil	434.9	329.9	20	1	8
	434.9	250	20	90	24

Fipronil sulfone	450.9	414.9	20	1	8
	450.9	282	20	1	24
Fipronil sulfide	418.9	382.9	20	1	4
	418.9	262	20	1	24
Fipronil desulfinyl	387	350.9	20	1	4
	387	282	20	1	28
Fipronil carboxamide	452.9	416.9	20	1	8
	452.9	282	20	1	24

4.3 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม

เลือกใช้วิธีการสกัด QuEChERS มาใช้ในการศึกษา โดยขั้นตอนการสกัดทำตามข้อ 3.2.2 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการ clean up ด้วย sorbents ชนิดต่างๆ ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันซึ่งแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและอัตราส่วนของ sorbent ที่ใช้ในการ clean up สารละลายตัวอย่าง

Clean up	MgSO ₄ (mg)	PSA (mg)	GCB (mg)	C18 (mg)
1	150	25	-	-
2	150	50	-	-
3	150	25	25	-
4	150	25	75	-
5	50	50	-	200

5. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์

เมื่อได้วิธีการตรวจวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตาม parameter ต่างๆ ดังนี้

5.1 ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

ทดสอบ matrix blank และ spiked matrix blank ที่ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบสัญญาณ matrix blank และ spiked matrix blank

5.2 ช่วงของการวัด (Range)

ทำการ spike สารละลายมาตรฐานลงในตัวอย่างอ่อน ให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ ได้แก่ 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่ละความเข้มข้นทดสอบ 1 ซ้ำ ทำการสกัดตาม

ขั้นตอนวิธีการที่พัฒนาขึ้นมา และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้างกราฟมาตรฐานโดยแกน y คือพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน และแกน x คือความเข้มข้นของสารในตัวอย่างและพิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงซึ่งมีค่า correlation coefficient (R^2) ≥ 0.995

5.3 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับ range โดย spike ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ พิจารณาค่า correlation coefficient (R^2) จะต้องอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้คือ 0.995

5.4 ความแม่นยำ (Accuracy)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.001, 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ตามวิธีการทดสอบ แล้วคำนวณร้อยละการกลับคืนของสารที่วิเคราะห์ (%Recovery) จากสมการ

$$\%Recovery = \frac{X1 - X2}{C} \times 100$$

เมื่อ X1 = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่างที่ตรวจพบ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

X2 = ความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบใน sample blank (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

C = ความเข้มข้นของสารที่เติมลงในตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

การประเมิน %recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method (AOAC, 2002)

5.5 ความเที่ยง (Precision)

ทำการทดสอบ reagent blank, sample blank และ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงการทดสอบ 3 ระดับความเข้มข้นได้แก่ 0.001, 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ การประเมิน precision โดยการหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (X) และหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ (SD) นำมาคำนวณหาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย %RSD

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

ประเมินค่า Precision โดยใช้ HORRAT โดยคำนวณจากสมการ

$$\text{HORRAT (Horwitz' s Ratio)} = \frac{\%RSD}{\text{Predicted HorwitzRSD}}$$

$$\text{Predicted Horwitz RSD} = 0.66 \times c^{(1-0.5\log c)}$$

C = อัตราส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างที่เติมในการตรวจวิเคราะห์

หลักเกณฑ์การยอมรับของ Precision คือมีค่า %RSD น้อยกว่า 20 และค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (AOAC, 2002)

5.6 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection)

ทำการวิเคราะห์ fortified sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOD เท่ากับ 3×SD นำค่า LOD ที่ได้จากการคำนวณมา fortified ลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า signal/noise ของแต่ละสารซึ่งจะต้องมีค่า ≥3

5.7 ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

ทำการวิเคราะห์ fortified sample blank ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ ทดสอบ 10 ซ้ำ หาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ประเมินค่า LOQ เท่ากับ 10×SD โดยค่า LOQ เป็นค่าปริมาณต่ำสุดของวัตถุอันตรายในตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้ค่า accuracy และ precision ผ่านเกณฑ์ที่กำหนด

ระยะเวลา

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2556 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2557

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

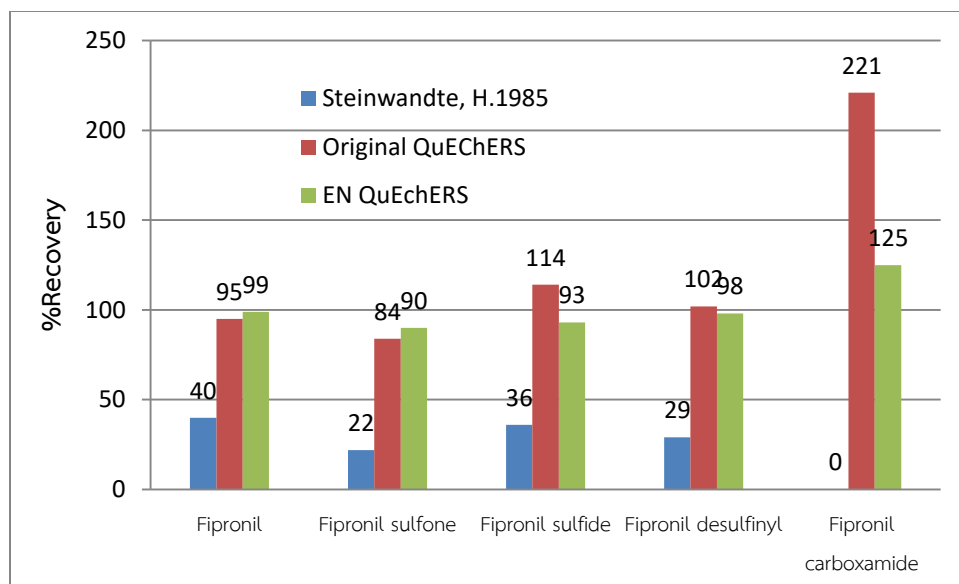
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการพัฒนาการตรวจวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค GC/ECD

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร fipronil และสารอนุพันธ์สามารถแยก fipronil และสารอนุพันธ์ออกจากกันได้จากนั้นดำเนินการหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมโดยใช้ของุ่นเป็นตัวอย่างในการทดสอบและเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี ได้แก่วิธี Steinwandter, H. 1985, Original QuEChERS และ EN QuEChERS

โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมลงในตัวอย่าง และสกัดด้วยวิธีที่ทำการศึกษาตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) ดังตารางที่ 4 ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่า Recovery ของ Fipronil และสารอนุพันธ์ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ

Pesticides	Steinwandter, H. 1985			Original QuEChERS			EN QuEChERS		
	%Rec (n=3)	SD	%RSD	%Rec (n=3)	SD	%RSD	%Rec (n=3)	SD	%RSD
Fipronil	40	5.00	12.5	95	5.29	5.6	99	9.85	9.9
Fipronil sulfone	22	2.65	12.0	84	1.53	1.8	90	8.74	9.7
Fipronil sulfide	36	6.03	16.6	114	2.08	1.8	93	10.58	11.4
Fipronil desulfinyl	29	2.52	8.6	102	1.53	1.5	98	10.69	10.9
Fipronil carboxamide	-	-	-	221	15.28	6.9	125	21.36	17.0



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบค่า Recovery ของ Fipronil และสารอนุพันธ์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีต่างๆ

จากตารางแสดงผลการเปรียบเทียบค่า recovery ของการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี ซึ่งเมื่อนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแท่งเพื่อเปรียบเทียบ (ภาพที่ 2) จะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยวิธี Steinwandter ให้ค่า recovery ของ fipronil และสารอนุพันธ์ 3 ชนิด อยู่ในช่วง 22-40% ซึ่งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด (60-115, (AOAC,2002)) ส่วน carboxamide ไม่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งจากผลที่ได้ อาจเกิดจากในขั้นตอนการ clean up โดยอัตราส่วนของ eluent ที่ใช้ไม่เหมาะสมจึงไม่สามารถ elute สารออกมาได้หมด สำหรับวิธี Original QuEChERS สามารถสกัด

recovery ของ fipronil, sulfone sulfide และ desulfinyl เท่ากับ 95, 84, 114 และ 102 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่กำหนด แต่สำหรับ carboxamide มีค่า recovery สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และวิธี EN QuEChERS สามารถสกัด recovery ของ fipronil, sulfone sulfide และ desulfinyl เท่ากับ 99, 90, 93 และ 98 แต่สำหรับ carboxamide มีค่า recovery สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดเช่นกัน ดังนั้นวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี สามารถสกัด fipronil และสารอนุพันธ์ได้ 3 ชนิด

ปัญหาสภาพความว่องไวของการตรวจวัดด้วยเทคนิค GC/ μ ECD คือเมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานลักษณะของพีคจะเป็นปกติ และฉีดสารตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดพีคของสารที่ตรวจพบจะมี tailing และมี sensitivity ที่ต่ำลง และเมื่อฉีดสารมาตรฐานอีกครั้งใน batch เดียวกัน sensitivity ก็ต่ำลงเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจาก matrix ของตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดยังมีสารที่ไม่ระเหยและสามารถเกาะติดใน liner ของเครื่อง GC/ μ ECD จึงทำให้ sensitivity ลดลง ดังนั้นในอนาคตถ้าทางห้องปฏิบัติการจะใช้เทคนิค GC/ μ ECD ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้าง fipronil และสารอนุพันธ์จึงจำเป็นต้องศึกษาและพัฒนาวิธีการสกัดที่เหมาะสมกว่านี้เพื่อกำจัดสิ่งรบกวน และเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัด fipronil และสารอนุพันธ์ต่อไป

ผลการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

การหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC-MS/MS

สามารถได้สภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ที่เหมาะสมในการการแยก fipronil และสารอนุพันธ์ รวมถึงมีความเฉพาเจาะจง และว่องไวสูงในการตรวจวัด โดย fipronil, desulfinyl, sulfone, carboxamide, และ sulfide มีค่า retention time (t_R) เท่ากับ 3.644, 3.764, 3.970, 3.970 และ 3.980 นาทีตามลำดับ และใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ fipronil และสารอนุพันธ์ 9.50 นาที

การศึกษาผลของ Matrix effect

จากการทดสอบผลของ Matrix effect โดยการเตรียม Calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.001-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยแบ่งออกเป็น 2 ชุด ซึ่งชุดแรกเตรียมใน Acetonitrile และชุดที่สองเตรียมใน Matrix ของส้มเขียวหวานที่ได้จากการสกัด และตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลจากการเขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีค (แกน y) กับความเข้มข้น (แกน x) นำค่าความชันจากสมการเส้นตรงของทั้ง solvent และ matrix มาเปรียบเทียบค่าความแตกต่าง (%RPD) (ตารางที่ 5) พบว่า Fipronil, sulfone, sulfide, desulfinyl และ carboxamide มีค่า %RPD เท่ากับ 16.06, 6.90, 8.93, 7.76 และ 11.15 ตามลำดับ ซึ่ง matrix มีผลต่อ

ทดสอบ fipronil และ carboxamide ซึ่งมีค่ามากกว่า 10 % (NATA, 2012) ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารพิษตกค้าง fipronil และสารอนุพันธ์ สารมาตรฐานควรเตรียมในสารละลาย matrix

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความชัน (slope) ของสารมาตรฐานที่เตรียมใน Solvent และ Matrix

Pesticides	Equation		Slope		%RPD
	Solvent	Matrix	Solvent	Matrix	
Fipronil	Y=398320x+356.5 R ² =0.9998	Y=339116x+1436.5 R ² =0.9991	398320	339116	16.06
Fipronil sulfone	Y=696299x+2619.7 R ² =0.9993	Y=649829x+2160.9 R ² =0.9997	696299	649829	6.90
Fipronil sulfide	Y=314323x+1667.1 R ² =0.9981	Y=287458x+1475.6.2 R ² =0.9984	314323	287458	8.93
Fipronil desulfinyl	Y=1254393x+850.9 R ² =1.0000	Y=1160711x+501.3 R ² =1.0000	1254393	1160711	7.76
Fipronil carboxamide	Y=254228x+873.39 R ² =0.9995	Y=227388x+1015.9 R ² =0.9993	254228	227388	11.15

ผลการเปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่าง

จากการศึกษาวิธีการสกัด fipronil และสารอนุพันธ์ในองุ่นโดยเลือกใช้วิธีการสกัด QuEChERS และเปรียบเทียบขั้นตอนการกำจัดสิ่งรบกวนในตัวอย่าง (Clean up) โดยใช้ชนิดและอัตราส่วนของสาร sorbents ที่แตกต่างกัน โดย sorbent ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ PSA ซึ่งมีคุณสมบัติในการกำจัดน้ำตาลในตัวอย่าง GCB ช่วยกำจัดคลอโรฟิลล์ และสารออร์แกนิกที่ไม่มีขั้ว สำหรับ C18 จะกำจัดไขมัน โดยขั้นตอนการศึกษาทำการเปรียบเทียบค่า recovery ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (3 ซ้ำ) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 จากผลการทดลองการ clean up 1 (MgSO₄ 150 mg+PSA 25 mg) ซึ่งเป็นวิธีการ clean up ของวิธี QuEChERS และวิธีการ clean up อีก 4 วิธี อัตราส่วนตามตารางที่ 3 ให้ค่า recovery อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (AOAC,2002) และเมื่อนำข้อมูลมาคำนวณทางสถิติด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) พบว่า clean up 1 และ 4 ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญ และสามารถสกัด fipronil และสารอนุพันธ์ได้ดีที่สุด ดังนั้นวิธีการ clean up ทั้ง 2 วิธีสามารถใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนได้ดี และเมื่อได้สภาวะของเครื่อง และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการ Clean up ด้วย sorbent ต่างๆ ตามอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

Pesticides	Recovery (%) n=3				
	Clean up 1	Clean up 2	Clean up 3	Clean up 4	Clean up 5
Fipronil	99 ^a	108 ^{b c}	111 ^c	103 ^{a b}	119 ^d
Fipronil sulfone	102 ^a	109 ^b	100 ^a	100 ^a	111 ^b
Fipronil sulfide	100 ^a	104 ^a	103 ^a	103 ^a	109 ^a
Fipronil desulfinyl	99 ^{ab}	108 ^b	103 ^{a b}	99 ^a	114 ^c
Fipronil carboxamide	98 ^a	109 ^b	100 ^a	97 ^a	111 ^b

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1. ความเฉพาะเจาะจง (Specificity/Selectivity)

วิเคราะห์ matrix blank กับ spiked matrix blank เมื่อนำสัญญาณที่ตรวจพบมาเปรียบเทียบกับพบว่าสัญญาณของ matrix blank น้อยมากเมื่อเทียบกับสัญญาณของ spiked matrix blank แสดงว่าไม่มีการรบกวนจากสารอื่นในตัวอย่าง

2. ช่วงของการวัด (Range)

ผลการตรวจสอบ range โดยนำค่าความเข้มข้นที่ fortified sample 7 ระดับ ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ กับค่าพื้นที่ใต้พีคในแต่ละระดับความเข้มข้นมาเขียนกราฟ และคำนวณค่า correlation coefficient (r) มีค่ามากกว่า 0.995 ดังนั้นวิธีการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจสอบสารพิษตกค้าง fipronil และสารอนุพันธ์ในองุ่นตั้งแต่ช่วง 0.001-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (แสดงดังตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงค่า Range, Correlation coefficient (R²) ของ Fipronil และสารอนุพันธ์ที่ 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ซ้ำ

Pesticides	Equation	r	conc.
------------	----------	---	-------

			(mg/kg)
Fipronil	$y = 339371x - 1242.3$	0.9992	0.001-0.5
Fipronil sulfone	$y = 650114x - 1860.4$	0.9998	0.001-0.5
Fipronil sulfide	$y = 287605x - 1348.4$	0.9986	0.001-0.5
Fipronil desulfinyl	$y = 1160744x - 1860.4$	1.0000	0.001-0.5
Fipronil carboxamide	$y = 227472x - 1087.8$	0.9989	0.001-0.5

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ผลการตรวจสอบ Linearity โดยนำค่าความเข้มข้น fortified sample 7 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ กับค่าพื้นที่ใต้พีคในแต่ละระดับความเข้มข้นมาเขียนกราฟและคำนวณค่า correlation coefficient (r) ของ fipronil และสารอนุพันธ์ พบว่าค่า $r \geq 0.995$ ซึ่งสรุปได้ว่า Linearity ของวิธีการตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.001-0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (แสดงดังตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงค่า Linearity, Correlation coefficient (R^2) ของ Fipronil และสารอนุพันธ์ ที่ 7 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

Pesticides	Equation	r	conc. (mg/kg)
Fipronil	$y = 339116x - 1438.5$	0.9992	0.001-0.5
Fipronil sulfone	$y = 649829x - 2160.9$	0.9997	0.001-0.5
Fipronil sulfide	$y = 287458x - 1475.6$	0.9984	0.001-0.5
Fipronil desulfinyl	$y = 1160711x - 501.3$	1.0000	0.001-0.5
Fipronil carboxamide	$y = 227388x - 1015.9$	0.9993	0.001-0.5

1. ความแม่นยำ (Accuracy)

การตรวจสอบ accuracy โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.001, 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ ประเมิน accuracy จาก %recovery โดยเกณฑ์การยอมรับ recovery ใช้เกณฑ์กำหนดของ AOAC Peer-Verified Method (AOAC, 2002) โดยผลการทดสอบ %recovery แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดง %Recovery ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Fipronil และสารอนุพันธ์ที่ช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆ ในองุ่น (10 ซ้ำ)

Pesticides	0.001* mg/kg		0.005* mg/kg		0.01*mg/kg	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Fipronil	102	5.05	104	4.29	104	2.83
Fipronil sulfone	103	2.71	97	6.71	100	4.58
Fipronil sulfide	101	4.09	105	2.58	106	3.26
Fipronil desulfinyl	104	1.66	101	3.61	101	4.13
Fipronil carboxamide	100	6.24	96	8.12	102	3.18

* n = 10 SD = Standard deviation

2. ความเที่ยง (Precision)

ผลการทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ fipronil และสารอนุพันธ์ ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.001- 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แสดงดังตารางที่ 10 โดยค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.60-8.12 % ซึ่งมีค่าไม่เกิน 10% อยู่เกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (AOAC, 2002) สำหรับการคำนวณความเที่ยงจากสมการ Horwitz ของสารทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.05-0.49 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 ตามเกณฑ์ที่กำหนด (Horwitz et al., 2006.)

ตารางที่ 10 แสดงค่าความเข้มข้นเฉลี่ย, %RSD และ HORRAT ของการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง Fipronil และสารอนุพันธ์ ในองุ่น (10ซ้ำ)

Pesticides	0.001 mg/kg (n=10)			0.005 mg/kg (n=10)			0.01mg/kg (n=10)		
	Mean	%RSD	HORRAT	Mean	%RSD	HORRAT	Mean	%RSD	HORRAT
Fipronil	102	4.96	0.17	104	4.29	0.26	104	2.83	0.13
Fipronil sulfone	103	2.62	0.09	97	6.71	0.40	100	4.58	0.22
Fipronil sulfide	101	4.06	0.14	105	2.58	0.16	106	3.26	0.15
Fipronil desulfinyl	104	1.60	0.05	101	3.61	0.22	101	4.13	0.20
Fipronil carboxamide	100	6.24	0.21	96	8.12	0.49	102	3.18	0.15

1. ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ทดสอบ LOD ของวิธีการตรวจวิเคราะห์โดยประเมินจากค่า Signal/Noise (S/N) ต้องมีค่ามากกว่า 3 โดยทำการ fortified sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากผลการทดสอบ

fipronil และสารอนุพันธ์มีค่า S/N มากกว่า 3 ดังนั้นขีดจำกัดของการตรวจพบสำหรับวิธีนี้เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัม ต่อ กิโลกรัม

2. ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

ทดสอบ LOQ ของวิธีการทดสอบที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision ซึ่ง fipronil, fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil desulfinyl และ fipronil carboxamide มีค่า accuracy เท่ากับ 104, 97, 105, 101 และ 96 ค่า%RSD เท่ากับ 4.29, 6.71, 2.58, 3.61 และ 8.12 ค่า HORRAT เท่ากับ 0.26, 0.40, 0.16, 0.22 และ 0.49 ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดสอบสามารถยอมรับค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ fipronil และสารอนุพันธ์ในองุ่น โดยใช้เทคนิค GC/ECD และ LC-MS/MS ผลจากการใช้เทคนิค GC/ECD ได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารมาตรฐาน fipronil และวิธีการสกัดที่ให้ประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดเฉพาะ fipronil, sulfone, sulfide, desulfinyl ส่วน carboxamide วิธีการสกัดให้ผลเกินมาตรฐานที่กำหนด ปัญหาของเทคนิค GC/ECD มี sensitivity ลดลงเมื่อฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าไป พิกัดสารตัวอย่าง และสารมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพทดสอบมี tailing และ sensitivity ต่ำลง อาจเนื่องมาจากวิธีการเตรียมตัวอย่างยังกำจัดการรบกวนออกไม่หมด และเมื่อฉีดเข้าเครื่องทำให้ไม่ระเหยและเกาะติดบริเวณ liner ส่งผลให้ sensitivity ต่ำลง ดังนั้นในอนาคตถ้าจะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ควรที่จะต้องหาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม สามารถกำจัดการรบกวนได้ดี

สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ fipronil และสารอนุพันธ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้สภาวะของเครื่องที่เหมาะสมในการแยกสารและตรวจวัด สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ใช้วิธี QuEChERS และเปรียบเทียบขั้นตอนการกำจัดการปนเปื้อน (clean up) ที่อัตราส่วนและชนิดของ sorbent แตกต่างกัน ($MgSO_4$, PSA, C18 และ GCB) ซึ่งอัตราส่วนของ $MgSO_4$: PSA อัตราส่วน 150 : 25 มิลลิกรัม และ $MgSO_4$: PSA : GCB อัตราส่วน 150 : 25 : 75 มิลลิกรัม ให้ประสิทธิภาพการกำจัดการปนเปื้อนดีที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่น เมื่อได้สภาวะของเครื่องและวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมจึงดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยการพิสูจน์ในแต่ละพารามิเตอร์ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

1. Range/Linearity ของวิธีการตรวจวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.001 จนถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยมีค่า R^2 มากกว่า 0.995

2. Accuracy (%Recovery) ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่า %recovery อยู่ในช่วง 96 ถึง 106

3. Precision ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 0.001- 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากการคำนวณค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.97-8.12 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการคำนวณความเที่ยงจากสมการ Horwitz ของสารทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีค่า HORRAT<2

4. LOD ของ Fipronil และสารอนุพันธ์ เท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

5. LOQ โดยยืนยันผลการทดสอบจากค่า accuracy และ precision มีค่า LOQ เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ได้วิธีวิเคราะห์ Fipronil และสารอนุพันธ์ ในผลไม้ที่ถูกต้องและแม่นยำสูง
- เผยแพร่วิธีการวิเคราะห์แก่ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างที่อยู่ภายใต้กรมวิชาการเกษตร และหน่วยงานที่สนใจ
- ขยายขอบข่ายการขอรับรองมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025

11. เอกสารอ้างอิง

กนกพร อธิสุข และทิพวรรณ นิ่งน้อย. 2547. Method validation. เอกสารประกอบการฝึกอบรม.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

World Health Organization (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification.

Anonymous (2013). EU Pesticides Database. From web site

http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=homepage&CFID=7288577&CFTOKEN=96827652&jsessionid=08045fc97da7246e303aTR. (15 November 2014)

Anonymous (2012). Maximum Residue Limits Under Positive List System, Food Sanitation Law : Japan.

M. Anastassiades, D.I.Kolberg, D.Mack, I.Sigalova, D.Roux and D.Fugel (2011). Quick Method for the Analysis of Residues of Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin Involving Simultaneous Extraction with Methanol and LC-MS/MS Determination.version 6:1-37

- M. Paramasivam and S. Chandrasekarn (2013). Determination of fipronil and its major metabolites in vegetables fruit and soil using QuEChERS and gas chromatography mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* Vol. 88, No. 11; 1203-1211.
- A. Fl-Moneim, A. Mahmoud, H.A. El-Gammal and E.R. Attallah (2010). Multiresidue method of analysis for determination of 150 pesticides in grape using quick and easy method (QuEChERS) and LC-MS/MS determination. *J. Food Agri. & Environ.* Vol.8(2) ; 602-606.
- T. SuHsiang, L. ChinCheng, L.YuJu and C. HsinChih (2009). Analysis of 81 pesticides and metabolite residue in fruits and vegetable by diatomaceous earth column extraction and LC-MS/MS determination. *J. Food Drug Anal.* Vol 17 No. 5: 319-332.
- M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D.Stajnbaher, F.J. Schenck (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.
- NATA Technical Note 17 (2012). Guideline for the Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Method.
- AOAC (2002). AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods. DRAFT 2002-11-07, \AOAC\leCam\Single-Lab_Validation_47.doc. from web site: http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf. (15 November 2914)
- W. Horwitz and R. Alibert. 2006. The Horwitz ratio (Horrat) : a useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International.* 89,4,2006, 1095-1108.
- 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.

12. ภาคผนวก

ภาคผนวก 1.เกณฑ์การยอมรับ %RSD ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของ AOAC Peer-Verified Method, 2002

Unit	RSD (%)
100%	1
10%	1.5

1%	2
0.1%	3
100 ppm	4
10 ppm ($\mu\text{g/g}$)	6
1 ppm	8
10 ppb ($\mu\text{g/kg}$)	15

ภาคผนวก 2.เกณฑ์การยอมรับ% Recovery ใช้เกณฑ์กำหนดโดยทั่วไปของAOAC Peer-Verified Method, 2002

Analyte (%)	Unit	Mean Recovery (%)
100	100%	98-102
10	10%	98-102
1	1%	97-103
0.1	0.1%	95-105
0.01	100 ppm	90-107
0.001	10 ppm	80-110
0.0001	1 ppm	80-110
0.00001	100 ppb	80-110
0.000001	10 ppb	60-115
0.0000001	1 ppb	40-120