RESEARCH ARTICLE ISSN 2985-2641 (Online)

การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในส้มเปลือกล่อนด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี โดยสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN *CITRUS RETICULATA* USING GC-MS/MS WITH ETHYL ACETATE EXTRACTION

***ศิริรัตน์ ไพศาลสุทธิชล*[1]*, *สุรีวัลย์ แสงศรีจันทร์*[1], *นงพงา โอลเสน*[2]

***Sirirat Phaisansuthichol*[1]*, *Sureewan Saengsrichan*[1], *Nongpanga Olsen*[2]

[1]*สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้*

[1]*Program in Chemistry, Faculty of Science, Maejo University.*

[2]*สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตร*

[2]*Office of Agricultural Research and Development Region 1, Department of Agriculture.*

**Corresponding author, e-mail: phaisansuthichol@gmail.com*

***Received:** 8 August 2023; **Revised:** 8 March 2024; **Accepted:** 10 April 2024*

บทคัดย่อ

การสกัดด้วยวิธีเอทิลอะซิเตท เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และมีความไวสูง เหมาะสำหรับพัฒนาใช้ในการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในส้มเปลือกล่อน สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือ น้ำหนักส้มตัวอย่าง (กรัม) ต่อโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (กรัม) ต่อโซเดียมซัลเฟต (กรัม) ต่อเอทิลอะซิเตท (มิลลิลิตร) เท่ากับ 10:3:10:20 การวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้าง 11 ชนิด ในส้มเปลือกล่อนด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS/MS) กราฟมาตรฐานมีค่าอยู่ในช่วง 0.005 ถึง 1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.9950 ค่าร้อยละการกลับคืนและค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) อยู่ในช่วง 68.38-108.16 และ 2.51-19.19 ตามลำดับ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) เท่ากับ 0.50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 1.70 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการวิเคราะห์ตัวอย่างส้ม 50 ตัวอย่าง พบว่ามียาฆ่าแมลงตกค้าง จำนวน 43 ตัวอย่าง และมีปริมาณเกินเกณฑ์มาตรฐานรับรองสินค้าเกษตร จำนวน 5 ตัวอย่าง เทคนิคการสกัดยาฆ่าแมลงด้วยเอทิลอะซิเตทและวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS ให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างในตัวอย่างส้มเปลือกล่อน

คำสำคัญ: ส้มเปลือกล่อน; สารเคมีตกค้าง; เอทิลอะซิเตท; แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

Abstract

A simple, fast, inexpensive, and sensitive method, namely ethyl acetate extraction was developed for analysis of pesticide residues in *Citrus Reticulata*. The optimum conditions for extraction of pesticide residues were orange sample (g): sodium hydrogen carbonate (g): sodium sulphate (g): ethyl acetate (ml) in the ratio of 10:3: 10:20. Eleven types of pesticide residues in *Citrus Reticulata* were analyzed by using gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). The linear calibration curve was in the range of 0.005 - 1.000 mg/kg^{-1} with a correlation coefficient (R^2) higher than 0.9950. The percentage recovery and relative standard deviations (%RSD) were in the range of 68.38 – 108.16 and 2.51 – 19.19, respectively. The limit of detection of the method was 0.50 µg/kg^{-1} and limit of quantification was 1.70 µg/kg^{-1}. From the analysis of 50 citrus samples, it was found that there were pesticide residues in 43 samples, and the amount exceeded the Agricultural Product Certification Standards in 5 samples. The ethyl acetate extraction followed by GC-MS/MS determination were suitable method for the analysis of pesticide residues in *Citrus Reticulata* samples.

Keywords: *Citrus Reticulata*; Pesticide Residues; Ethyl Acetate; GC-MS/MS

บทนำ

ส้ม จัดเป็นต้นไม้ชนิดไม้ผลและไม้ยืนต้น อยู่ในวงศ์ Rutaceae สกุล *Citrus* เติบโตกระจายอยู่ทั่วโลก โดยจะมีน้ำมันหอมระเหยในใบ ดอก และผล มีกลิ่นฉุน เป็นผลไม้ที่ใช้รับประทานสดหรือคั้นน้ำ และนำมาปรุงอาหาร มีรสเปรี้ยวหรือหวาน และหวานอมเปรี้ยว มักจะมีแคลเซียม โพแทสเซียม วิตามินเอ และวิตามินซี การปลูกมักจะพบปัญหาเรื่องโรครากเน่า โคนเน่า และศัตรูพืชทำให้ผลผลิตลดลงเป็นสาเหตุให้เกิดการขาดทุน รายได้ลดลง จึงทำให้เกษตรกรบางรายหันมาใช้สารเคมีในการป้องกัน กำจัดโรค และแมลงศัตรูพืช ซึ่งการใช้สารเคมีดังกล่าวอาจเป็นอันตรายทั้งต่อเกษตรกรที่ใช้และตกค้างในส้ม ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้ สารเคมีกำจัดศัตรูพืช หมายถึง สารหรือส่วนประกอบของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น หรือออกมาในรูปของสารเคมี หรืออาจสกัดจากธรรมชาติ มีประสิทธิภาพในการป้องกัน ควบคุม และทำลายศัตรูพืช (แมลงและวัชพืช) ศัตรูสัตว์ (เชื้อโรค แมลง และสัตว์ที่เป็นพาหะนำโรค เช่น หนู แมลงสาบ เป็นต้น) ซึ่งสารฆ่าแมลงสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม [1] คือ สารเคมีกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) สารเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (Organophosphate) สารเคมีกลุ่มคาร์บาเมต (Carbamate) และสารเคมีกลุ่มไพรีทรัมและสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Pyrethrum and Pyrethroids) เกษตรกรส่วนมากนิยมใช้สารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในการกำจัดศัตรูพืช เช่น ส้ม พริก ผักคะน้า ถั่วฝักยาว แตงกวา และมะเขือ เป็นต้น

สารเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เป็นสารอินทรีย์สังเคราะห์ที่มีธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท โดยเป็นตัวยับยั้งการทำงาน (Inhibitor) ของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสารสื่อประสาทชนิด Acetyl Choline ที่ทำหน้าที่ถ่ายทอดกระแสประสาทที่บริเวณปลายประสาท (Synapse) จากเซลล์ประสาทหนึ่งไปสู่อีกเซลล์ประสาทหนึ่งในระบบประสาทส่วนกลางของแมลง (Central Nervous System, CNS) การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสทำให้มีการคั่งของสารสื่อประสาท Acetyl Choline ที่บริเวณปลายประสาทในปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดการถ่ายทอดกระแสประสาทไม่หยุดและเกิดมากเกินไป (Hyperexcitation) จนทำให้แมลงตาย สารกลุ่มนี้ ได้แก่ ไดคลอร์วอส (Dichlorvos) ไดอะซินอน (Diazinon) มาลาไธออน (Malathion) คลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos) และพาราไธออน-เมทธิล (Parathion-Methyl) เป็นต้น

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาปริมาณสารตกค้างยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในผัก ผลไม้ เช่น ผักคะน้า พริก แตงกวา มะเขือ ธัญพืช ถั่วเมล็ดแห้ง มังคุด และส้ม วิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้าง เช่น GC-MS [2-3], GC-MS/MS [4-5] และ LC-MS/MS [6-7] โดยการวิเคราะห์สารตกค้างนิยมเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัด เทคนิคการสกัดมีหลายแบบ เช่น การสกัดด้วยของเหลว (Liquid Liquid Extraction: LLE) ซึ่งทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูก ข้อเสีย คือ ใช้ปริมาตรสารอินทรีย์ในการสกัดมาก ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์จะมีความเป็นพิษต่อผู้วิเคราะห์และสิ่งแวดล้อม ใช้เวลานานในการสกัด ในขณะที่การสกัดแบบ QuEChERS [8-9] ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และการกำจัดเมทริกซ์ในสารสกัด โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็งแบบกระจาย (Dispersive Solid Phase Extraction) ใช้ตัวดูดซับที่มีคุณสมบัติเฉพาะ เช่น PSA, C18 และ $MgSO_4$ ซึ่งอาจต้องนำมาผ่านการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction; SPE) อีกครั้ง โดย SPE เป็นการสกัดผ่านเฟสของแข็ง โดยสารที่ต้องการจะถูกดูดซับไว้ใน Solid–Phase Cartridge จากนั้นชะสารที่ต้องการออกด้วยสารละลายที่เหมาะสมที่อัตราการไหลที่เหมาะสม ข้อเสียของการสกัดแบบ QuEChERS คือ ขั้นการกำจัดสารรบกวนยุ่งยาก หลายขั้นตอน ในขั้นตอนนี้ตัวดูดซับ PSA เป็นสารที่มีราคาแพง ในการสกัดต้องมีความชำนาญสูง

ปัจจุบันนิยมใช้การสกัดแบบเอทิลอะซิเตท ได้รับการยอมรับจากสหภาพยุโรป (European Union Reference Laboratories: EURLs) จากการเตรียมตัวอย่างตามมาตรฐาน EU 2013 [10] ในการวิเคราะห์สารตกค้างในผลไม้และผักแบบ MRM การสกัดด้วยวิธีนี้ของส้มที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.050 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้ค่าร้อยละการกลับคืนมากกว่า 80 ซึ่งสูงกว่าการสกัดแบบ QuEChERS (ร้อยละ 60-70) การสกัดแบบเอทิลอะซิเตท เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และมีความไวสูงในการตรวจวัดสารเคมีปราบศัตรูพืชตกค้างจากผลิตผลทางการเกษตร สามารถวิเคราะห์สารที่สนใจได้ในระดับไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (µg/kg; ppb) หรือน้อยกว่าและมีรูปแบบการทำงานแบบจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Selected Reaction Monitoring; SRM หรือ Multiple Reaction Monitoring; MRM)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะวิเคราะห์ปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างในส้มเปลือกล่อนของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธีการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS/MS) และการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายน้อย มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดโดยวิธีการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทในตัวอย่างส้มเปลือกล่อนของจังหวัดเชียงใหม่

2. เพื่อหาปริมาณยาฆ่าแมลงในกลุ่มของออร์กาโนฟอสเฟต 11 ชนิดที่ตกค้างในตัวอย่างส้มโดยการวิเคราะห์ด้วย เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี/แมสสเปกโทรเมตรี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและเครื่องมือ

(1) สารละลายมาตรฐานยาฆ่าแมลง เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade; A.R. grade) ผลิตโดยบริษัท Dr.Ehrenstorfer GmbH ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

(2) สารละลายเอทิลอะซิเตท เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade; A.R. grade) ผลิตโดยบริษัท J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา

(3) สารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เกรดวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade; A.R. Grade) ผลิตโดยบริษัท EMSURE ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

(4) สารละลายโซเดียมซัลเฟต เกรดวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade; A.R. Grade) ผลิตโดยบริษัท EMSURE ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

(5) เครื่อง GC-MS/MS รุ่น 8890/7000D, Triple Quad. ผลิตโดยบริษัท Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นการวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีต่อกับเครื่องแมสสเปกโทรเมตรี จำนวน 2 เครื่อง (GC-MS/MS) ซึ่งจะให้ค่าสเปกตรัมที่ต่างกับแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (GC-MS) คือเครื่อง GC-MS จะให้สเปกตรัมหลายเส้นของสารแต่ละตัวที่วิเคราะห์ ขึ้นอยู่กับการแตกพันธะของสารนั้น ๆ แต่เครื่อง GC-MS/MS ผลของสเปกตรัมจะมีแค่เส้นเดียวเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารที่ต้องวิเคราะห์ถูกต้อง และแม่นยำกว่าเครื่อง GC-MS ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ การวิเคราะห์เชิงปริมาณต้องมาจากพื้นที่ใต้พีกของโครมาโทแกรมจากเครื่อง GC เท่านั้น เครื่อง GC-MS/MS อาจเขียนได้หลายแบบคือ Triple Quadrupole GC-MS/MS หรือ Triple Quadrupole GC-MS หรือ Triple Quadrupole GC/MS หรือ GC-MS/MS

2. การเตรียมสารตัวอย่าง [10]

(1) ตัวอย่างส้ม (ไม่ปอกเปลือก) ประมาณ 1 กิโลกรัม ผ่าเป็น 4 ซีก แล้วนำ 2 ซีกที่อยู่ตรงข้ามกันของทุกลูกมาปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นย่อย (Food Processer)

(2) ชั่งตัวอย่างส้ม 10 ± 0.1 กรัม ลงใน Falcon Tube ขนาด 50 มิลลิลิตร

(3) เติมเอทิลอะซิเตท 20 มิลลิลิตร โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 3 กรัม และโซเดียมซัลเฟต 10 กรัม ลงในตัวอย่าง จากนั้นเขย่าแรง ๆ ด้วยมือให้เข้ากัน และนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer) เป็นเวลา 1 นาที

(4) นำไปเข้าเครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic Bath) เป็นเวลา 3 นาที อุณหภูมิไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

(5) ดูดสารละลายปริมาตร 650 ไมโครลิตร กรองผ่าน Syringe Filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ลงใน Auto-Sampler Vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

(6) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ ในสภาวะที่เหมาะสม ปริมาณของสารตกค้างแปลหน่วยความเข้มข้นมิลลิกรัมต่อลิตรให้เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องสารพิษตกค้าง พ.ศ. 2560 และปริมาณสารตกค้างสูงสุด

3. การศึกษาความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Validation Method)

3.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (Linear Range) และการสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

ในการหาช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.200, 0.500 และ 1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เตรียมสารละลายมาตรฐาน 8 ความเข้มข้น โดยใช้ Micropipette ดูดสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาตร 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเอทิลอะซิเตท ดูดใส่ขวดแก้วเล็ก และนำไปฉีดด้วยเครื่อง GC-MS/MS ทำการทดลอง 1 ซ้ำ เมื่อศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงแล้วทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานซ้ำในช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง และนำไปฉีดด้วยเครื่อง GC-MS/MS ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยพล็อตกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทั้ง 11 ชนิด กับค่าความสูงของพีค

3.2 การวิเคราะห์หาความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

เติมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้นในช่วง 0.010-0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่าง 10 กรัม ตามลำดับ ทำการสกัดตามข้อ 1 จากนั้นนำผลการทดลองมาหาค่าความถูกต้องในรูปแบบร้อยละการกลับคืน (%recovery) ทำการทดลองซ้ำ 10 ซ้ำ พิจารณาตามเกณฑ์ %Recovery ของ AOAC-1993 [11] จะพิจารณาที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ กลาง สูง จากกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้นในช่วง 0.010-0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ จากนั้นนำมาหาค่าความเที่ยงในรูปของค่า %RSD และค่า HORRAT น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 พิจารณาตามเกณฑ์ AOAC-1993 และ Codex Alimentarius Commission (CAC-2019) [12] โดยจะพิจารณาที่ความเข้มข้นน้อยสุด ตรงกลาง และมากสุด (ระดับต่ำ กลาง สูง) จากกราฟมาตรฐาน

****หมายเหตุ:** HORRAT เป็นค่าแนะนำสำหรับการยอมรับได้ของวิธีวิเคราะห์ว่ามีความแม่นยำเพียงใด โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่คำนวณจากข้อมูลที่เก็บจากระหว่างห้องปฏิบัติการ (RSD(R)) กับ RSD(R) ที่คำนวณจากสูตรของ Horwitz (PRSD(R)) คือ $2C^{-0.1505}$ โดย C เท่ากับส่วนของทศนิยมของเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น เช่น 100% = 1, 1% = 0.01, 0.01% = 0.0001 ทั้งนี้ค่า HORRAT ที่อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.5 ถือเป็นค่าที่ยอมรับได้

3.3 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

นำสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดลองซ้ำ 10 ครั้ง โปรแกรมจากเครื่อง GC-MS/MS จะคำนวณ S/N ที่ความเข้มข้นทั้งสองของสารมาตรฐานแต่ละชนิด นำผลที่ได้มาคำนวณเทียบบัญญัติไตรยางค์ เพื่อหาค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD) หรือ 3S/N หมายความว่า 3 เท่าของความสูงของพีคของสารที่ความเข้มข้นนั้นต่อความสูงของสัญญาณรบกวน และคำนวณค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 10S/N

4. การวิเคราะห์ตัวอย่างส้มด้วยเทคนิคการสกัดแบบวิธีเอทิลอะซิเตท

ทำการสุ่มตัวอย่างส้มสด จำนวน 50 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างมาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท แล้วนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี ในสภาวะที่เครื่องกำหนดไว้ คำนวณหาปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. การกำหนดสภาวะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรมิเตอร์ (GC-MS/MS) สำหรับการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างในส้มเปลือกล่อน การกำหนดสภาวะดำเนินการของเครื่อง GC-MS/MS แสดงในตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำการทดสอบสกัดแบบวิธีเอทิลอะซิเตทวิเคราะห์ด้วย GC-MS/MS ได้ผลพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในตารางที่ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรมิเตอร์

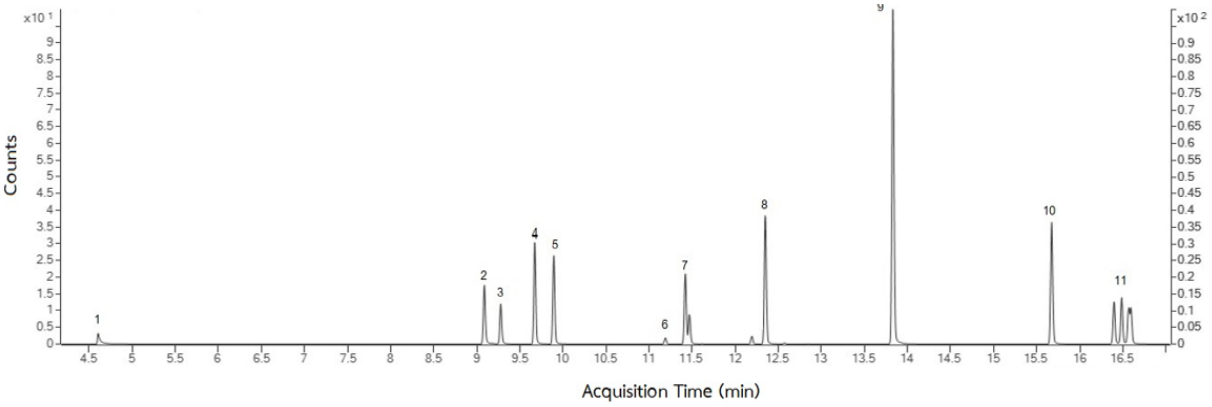
พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
Capillary Column	HP-5MS UI: 15 m × 250 µm × 0.25 µm 2 Column ต่อกัน
Temperature Condition	Inlet 280 ^{o}C
Oven Temperature	Initial Temp: 60 ^{o}C hold 1 min, Rate: 40 ^{o}C/min to 170 ^{o}C hold 0 min, Rate: 10 ^{o}C/min to 310 ^{o}C hold 3 min
Gas Flow Rate	Helium 0.908 ml/min
Injection Mode	Spitless
Inject Volume	1 µl
Source Temperature	300 ^{o}C
Ionization Mode	EI
Electron Energy	70 eV

ผลโครมาโทรแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมในภาพที่ 1 จากโครมาโทแกรมพบว่าสารมาตรฐาน Cypermethrin มีค่า Retention time 4 ค่า เนื่องจากสารนี้มีโครงสร้างไอโซเมอร์ได้ 4 แบบ คือ : 1S-3S-RS + 1R-3R-RR (cis), 1R-3S-RR + 1S-3R-RS (trans), 1R-3R-RS + 1S-3S-RR (cis), และ 1S-3R-RR + 1R-3S-RS (trans) [13-14] จึงทำให้เกิด 4 พีก และค่า Retention Time 4 ค่า

ตารางที่ 2 ค่า Retention time, Precursor ion และ Product ion ของสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานยาฆ่าแมลง	Retention time (min)	Precursor ion	Product ion
1. Methamidophos	4.61	141	64
		141	95
2. Parathion-methyl	9.09	125	79
		262.9	109
3. Metalaxyl	9.28	234	174.1
		220	192.1
4. Malathion	9.67	172.9	99
		157.8	125
5. Chlorpyrifos	9.89	196.9	169
		198.9	171
6. Prothiofos	11.42	308.9	238.9
		266.9	239
7. Profenofos	11.47	207.9	83
		296.8	268.7
8. Ethion	12.35	152.9	96.9
		230.9	175

9. Bifenthrin	13.43	166.2	165.2
		181.2	166.2
10. Pyridaben	15.68	147.2	105.1
		147.2	117.1
11. Cypermethrin	16.40,16.49,	165.1	91.1
	16.57,16.59	163.1	127.1



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของยาฆ่าแมลงมาตรฐาน 11 ชนิดที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

2. ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Validation Method)

2.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ (Linear Range) และสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

การศึกษาช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานทั้ง 11 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.010, 0.020, 0.050, 0.100, 0.200,0.500 และ 1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลการศึกษาพบว่า ช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานทั้ง 11 ชนิด อยู่ระหว่าง 0.005 ถึง 1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงนำความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงดังกล่าวมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ซ้ำ ผลการศึกษาพบว่า ความสัมพันธ์เชิงเส้นและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของสารละลายมาตรฐาน มีค่ามากกว่า 0.9950 เชื่อถือได้ เพราะมีค่าเข้าใกล้ 1.000 แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดของสารมาตรฐานยาฆ่าแมลง สมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)

สารมาตรฐานยาฆ่าแมลง	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
1. Bifenthrin	y=89347.040x + 96950.5650	0.9990
2. Chlorpyrifos	y=19096.776x - 53531.1596	0.9994
3. Cypermethrin	y=33005.159x + 611710.3739	0.9956
4. Ethion	y=30057.046x - 363384.3784	0.9981
5. Malathion	y=19966.595x - 101262.7252	0.9965
6. Metalaxyl	y=7799.106x - 52845.8006	0.9995
7. Methamidophos	y=6536.958x - 88835.2459	0.9961

8. Parathion-methyl	y=21568.295x - 256505.8782	0.9986
9. Profenofos	y=6289.560x - 75161.5504	0.9988
10. Prothiofos	y=10789.208x + 83819.3219	0.9958
11. Pyridaben	y=35162.789x - 393347.7046	0.9981

2.2 ผลการวิเคราะห์หาความแม่นยำ (Accuracy) และค่าความเที่ยง (Precision) ของการวิเคราะห์

จากการศึกษาหาค่าความแม่นยำ โดยใช้สารละลายมาตรฐานในช่วง 0.010 ถึง 0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ค่าความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง พบว่า สารละลายมาตรฐาน 4 ชนิด มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.010, 0.100 และ 0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสารละลายมาตรฐาน 7 ชนิด มีความเข้มข้น 0.020, 0.100 และ 0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผลของค่าร้อยละการกลับคืนที่ความเข้มข้น 0.010, 0.020, 0.100 และ 0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 68-108, 68-94, 80-96 และ 81-90% ตามลำดับ ค่าร้อยละการกลับคืนจะใช้เกณฑ์กำหนดของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC-1993) และ Codex Alimentarius Commission (CAC-2019) ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 60-115% หรือที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 80-110% จากผลการทดลองอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานและสามารถยอมรับได้

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.010 ถึง 0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำมาประเมินโดยใช้ค่า %RSD และค่า HORRAT (Horwitz's Ratio) พิจารณาตามเกณฑ์ %RSD ของ AOAC-1993 และ CAC-2019 โดยใช้เกณฑ์ประเมินค่าความเที่ยง: 1. HORRAT $\leq$ 2 และ 2. %RSD $\leq$ 20; ในช่วงความเข้มข้น 0.01-2.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ผลการทดสอบความเที่ยง 4 ความเข้มข้น คือ 0.010, 0.020, 0.100 และ 0.500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยพิจารณาจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน มีค่า %RSD อยู่ในช่วง 2.86-19.19 และค่า HORRAT อยู่ในช่วง 0.14-1.64 แสดงดังตารางที่ 4 พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานคือช่วง 60-115 ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) มีค่าน้อยกว่า 20 และได้ค่า HORRAT ไม่เกิน 2.0 สรุปได้ว่าวิธีการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีความแม่นและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานและยอมรับได้

ตารางที่ 4 ค่าร้อยละการกลับคืน ค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) และค่า HORRAT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (mg/kg)	**ความแม่น (%Recovery)**	**ความเที่ยง (%RSD)**	**HORRAT**
0.010	68.61-108.16	2.86-12.35	0.14-0.58
0.020	68.38-93.98	3.92-14.87	0.21-0.78
0.100	80.06-96.14	5.25-11.38	0.35-0.76
0.500	81.91-90.00	5.74-19.19	0.49-1.64

2.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ (Limit of Detection, LOD และ Limit of Quantitation, LOQ)

วิเคราะห์ Fortified Samples ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (10 ซ้ำ) คำนวณอัตราส่วน Signal/Noise ของแต่ละสาร จากผลการทดลองตารางที่ 5 พบว่าค่าเฉลี่ยของ S/N มีค่ามากกว่า 3.0 จึงนำค่า Signal/Noise มาคำนวณโดยการเทียบบัญญัติไตรยางค์ เช่น สาร Bifenthrin ที่ความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่า S/N เท่ากับ 29.54 ถ้า S/N เท่ากับ 3 (LOD) จะมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.0005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ S/N เท่ากับ 10 (LOQ) จะมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 0.0017 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (LOD) จะอยู่ในช่วง 0.50-9.40 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) อยู่ในช่วง 1.70-25.20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

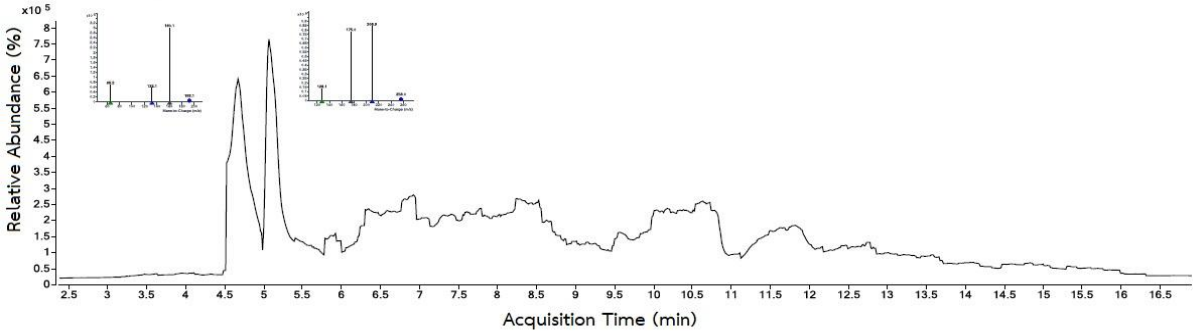
3. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างส้มด้วยเทคนิคการสกัดแบบวิธีเอทิลอะซิเตท

จากการศึกษายาฆ่าแมลงตกค้าง 11 ชนิด ในส้มตัวอย่างทำการสกัดแบบวิธีเอทิลอะซิเตทและตรวจวัดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรมิเตอร์ จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าส้มจำนวน 43 ตัวอย่าง มียาฆ่าแมลงตกค้าง 7 ชนิด คือ ไบเฟนทริน ไซเปอร์เมทริน อีไธออน เมทาแลกซิล โปรฟีโนฟอส โปรธิโอฟอส และไพริดาเบน ปริมาณที่ตรวจพบแสดงดังตารางที่ 6 ยาฆ่าแมลงที่พบในตัวอย่างมากที่สุด คือ ไซเปอร์เมทริน คิดเป็นร้อยละ 34 ต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด รองลงมาคือ อีไธออน ร้อยละ 28 และโปรฟีโนฟอส ร้อยละ 10

ส้ม จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณยาฆ่าแมลงตกค้างเกินเกณฑ์มาตรฐานรับรองสินค้าเกษตร คือโปรฟีโนฟอส โปรธิโอฟอส และไพริดาเบน โครมาโทแกรมและแมสสเปกตรัมของตัวอย่างแสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 5 ค่า Signal/Noise ของการตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันค่า Limit of Detection (LOD) และค่า Limit of Quantitation (LOQ) ของยาฆ่าแมลง จำนวน 11 ชนิด ในตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน ระดับความเข้มข้น 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

สารมาตรฐานยาฆ่าแมลง	ความเข้มข้น (mg/kg)	ค่าเฉลี่ย S/N	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
1. Bifenthrin	0.005	29.54	0.0005	0.0017
2. Chlorpyrifos	0.005	4.56	0.0033	0.0109
3. Cypermethrin	0.010	3.97	0.0076	0.0252
4. Ethion	0.005	4.40	0.0034	0.0114
5. Malathion	0.005	5.74	0.0026	0.0087
6. Methalaxyl	0.005	5.40	0.0027	0.0093
7. Metamidophos	0.010	3.19	0.0094	0.0313
8. Parathion-methyl	0.005	9.56	0.0016	0.0052
9. Profenofos	0.005	5.19	0.0029	0.0096
10. Prothiofos	0.005	9.75	0.0015	0.0051
11. Pyridaben	0.005	4.35	0.0034	0.0115



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมและแมสสเปกตรัมของตัวอย่างส้ม

ตารางที่ 6 ปริมาณสารยาฆ่าแมลงตกค้าง 7 ชนิดในตัวอย่างส้ม

ชนิดยาฆ่าแมลง	ปริมาณที่ตรวจพบ (±SD mg/kg)	เกณฑ์มาตรฐานรับรอง		เกณฑ์
		Thai	Codex	
1. Bifenthrin	0.040±0.001	-	0.05	ไม่เกิน
2. Cypermethrin	0.010±0.004 - 0.290±0.010	0.3	-	ไม่เกิน
3. Ethion	0.010±0.002 - 1.750±0.010	2.0	-	ไม่เกิน
4. Malathion	0.150±0.004 - 0.270±0.020	7.0	-	ไม่เกิน
5. Profenofos	0.020±0.002 - 0.25±0.012	0.1	-	เกิน
6. Prothiofos	0.030±0.004	0.01	-	เกิน
7. Pyridaben	0.030±0.002	0.01	-	เกิน

สรุปและอภิปรายผล

การประยุกต์เทคนิค GC-MS/MS ในการวิเคราะห์ยาฆ่าแมลงตกค้างของกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต 11 ชนิด ได้แก่ ไบเฟนทริน คลอร์ไพริฟอส ไซเปอร์เมทริน อีไธออน มาลาไธออน เมทาแลกซิล เมธามิโดฟอส พาราไธออนเมทิล โปรฟีโนฟอส โปรไทโอฟอส และไพริดาเบน จากการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานผสมอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.005-1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.9950 ค่าความแม่นจากค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) มากกว่าร้อยละ 60 ความเที่ยงจากค่าร้อยละเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) น้อยกว่า 20 และค่า HORRAT น้อยกว่า 2 อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานการตรวจสอบที่ยอมรับได้

การสกัดยาฆ่าแมลงตกค้างในส้มเปลือกล่อนด้วยการสกัดแบบเอทิลอะซิเตท และตรวจวัดด้วยเทคนิค GC-MS/MS พบว่ามียาฆ่าแมลงตกค้าง 7 ชนิด คือ ไบเฟนทริน ไซเปอร์เมทริน อีไธออน มาลาไธออน โปรฟีโนฟอส โปรไทโอฟอส และไพริดาเบน มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.010±0.002 ถึง 1.750±0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยาฆ่าแมลงที่มีค่าเกินค่ามาตรฐาน คือ โปรฟีโนฟอส (0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) โปรไทโอฟอส (0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) และไพริดาเบน (0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

การสกัดแบบเอทิลอะซิเตทดีกว่าการสกัดแบบ QuEChERS เพราะเป็นการสกัดขั้นตอนเดียว ขั้นตอนไม่ซับซ้อนยุ่งยาก ไม่มีขั้นตอนการขจัดสารรบกวนที่ต้องใช้สารดูดซับที่มีความจำเพาะและราคาแพง การสกัดแบบเอทิลอะซิเตทเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายน้อย มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำ ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิค

การสกัดแบบวิธีเอทิล-อะซิเตทและตรวจวัดด้วยเทคนิค GC-MS/MS ให้ผลการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่ตกค้างในตัวอย่างส้มเปลือกล่อนของจังหวัดเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

[1] Gupta, R. C., and Milatovic, D. (2012). Chapter 4 Toxicity of organophosphates and carbamates. In T. C. Marrs (Ed.), *Mammalian Toxicology of Insecticides* (pp. 104-126). rsc publishing.

[2] Souza Caldas, S., Marian Bolzan, C., Jaime De Menezes, E., Laura Venquiaruti Escarrone, A., De Martinez Gaspar Martins, C., Bianchini, A., and Gilberto Primel, E. (2013). A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC–MS. *Talanta*, *112*, 63-68.

[3] Brugnerotto, P., Costa, A. C. O., Fuente-Ballesteros, A., Ares, A. M., Gonzaga, L. V., Fett, R., and Bernal, J. (2023). Determination of seven pesticide residues in Mimosa scabrella honeydew honey from Brazil by GC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, *122,* Article number 105433.

[4] Girame, R., Shabeer, T. A., Ghosh, B., Hingmire, S., Natarajan, R., and Dubey, P. N. (2022). Multi-residue method validation and safety evaluation of pesticide residues in seed spices cumin (Cuminum cyminum) and coriander (Coriandrum sativum) by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC–MS/MS). *Food Chemistry*, *374*, Article number 131782.

[5] Abo-Gaida, A.-A. H., Shendy, A. H., Taha, S. M., Mahmoud, H. A., Attallah, E. R., and Fernandez-Alba, A. R. (2022). Fennel-seeds extract as an analyte protectant for the GC-MS/MS residue analysis of 182 pesticide in strawberries: Comparing the manual mixing and sandwich injection. *Journal of Chromatography Open*, *2*, Article number 100056.

[6] Issa, M. M., Taha, S. M., El-Marsafy, A. M., Khalil, M. M., and Ismail, E. H. (2020). Acetonitrile-Ethyl acetate based method for the residue analysis of 373 pesticides in beeswax using LC-MS/MS and GC–MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1145*, Article number 122106.

[7] Shin, J. M., Choi, S.-J., Park, Y. H., Kwak, B., Moon, S. H., Yoon, Y. T., Jo, S. A., Yi, H., Kim, S. J., Park, S. K., and Park, J. S. (2022). Comparison of QuEChERS and Liquid–Liquid extraction methods for the simultaneous analysis of pesticide residues using LC-MS/MS. *Food Control*, *141*, Article number 109202.

[8] De Mastro, F., Cocozza, C., Traversa, A., Cacace, C., Mottola, F., Mezzina, A., and Brunetti, G. (2022). Validation of a modified QuEChERS method for the extraction of multiple classes of pharmaceuticals from soils. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 9*(1), Article number 49.

[9] Sarraf, M., Beig-babaei, A., and Naji-Tabasi, S. (2020). Application of QuEChERS method for extraction of functional compounds. *SN Applied Sciences, 2*(11), Article number 1858.

[10] Fernández-Alba, A. R. (2013). EURL-PROFICIENCY TEST-FV-15: Generalitat Valenciana and Universidad de Almería. n.p.

[11] International, A. (1993). *AOAC Peer-verified methods program: Manual on policies and procedures*. Association of Official Analytical Chemists.

[12] FAO, and WHO. (2019). *Codex 2019: The year of food safety*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

[13] Liu, W., and Gan, J. J. (2004). Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(4), 755-761.

[14] Li, Z., Zhang, Z., Zhang, L., and Leng, L. (2008). Stereo and enantioselective degradation of β-cypermethrin and β-cyfluthrin in soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *80*, 335-339.