

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารตกค้างคลอร์มีควอต ไตควอต เมพิควอต และพาราควอต ในผักและผลไม้โดยเทคนิค LC-MS/MS

เสาวณีษ์ วาจาสิทธิ์ สุวิมล หมวดหมี อัจฉรี อินแก้ว กัญญารัตน์ เชื้อกุลชาติ วิทวัส วังแก้วหิรัญ
สกุรัตน์ สมสันติสุข และ ทองสุข ปายะนันท์
สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ จากสถิติการนำเข้าสารเคมี กลุ่ม herbicides สารคลอร์มีควอต ไตควอต เมพิควอต และพาราควอต พบว่ามีการนำมาใช้ในการกำจัดวัชพืชทางการเกษตร โดยไตควอตและพาราควอตเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้นิดพ่นในพืชไร่ ส่วนคลอร์มีควอตและเมพิควอตเป็นสารสังเคราะห์ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ผลของการใช้สารเหล่านี้ยังไม่เหมาะสม โดยเฉพาะพาราควอตก่อให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และอาจกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค องค์การอนามัยโลกได้จัดให้พิษของพาราควอตอยู่ใน class II คือ มีพิษปานกลางและตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2563 จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ในผักและผลไม้ ซึ่งสารจะถูกสกัดด้วย acidified methanol แล้วนำไปปั่นแยกส่วน ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณด้วย LC-MS/MS โดยสารทั้ง 4 ชนิด มีค่า limit of detection และ limit of quantitation เท่ากับ 0.005 และ 0.010 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ช่วงการวิเคราะห์ที่ให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 0.01-0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ค่าความแม่นยำในช่วง 66.1-117.2% และค่าความเที่ยงอยู่ระหว่าง 0.4-14.5% พร้อมทั้งวิธีนี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 ในปี พ.ศ. 2563 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อการคุ้มครองผู้บริโภคและดำเนินการตามกฎหมายต่อไป นอกจากนี้ได้ทำการสำรวจการตกค้างของสารกลุ่มนี้ในผักและผลไม้สดในปี 2563 จำนวน 219 ตัวอย่าง ผลตรวจพบ 3 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเมพิควอต 2 ตัวอย่าง และคลอร์มีควอต 1 ตัวอย่าง และทุกตัวอย่างตรวจไม่พบพาราควอต

คำสำคัญ: คลอร์มีควอต, ไตควอต, เมพิควอต, พาราควอต, ผักและผลไม้

Corresponding author E-mail: saovanee.w@dmsc.mail.go.th

Received: 19 October 2022

Revised: 6 May 2022

Accepted: 19 May 2022

บทนำ

สารเคมีกำจัดวัชพืช (herbicides) หรือที่เรียกกันทั่วไปว่ายาม่าหญ้า มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย โดยสารเคมีกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการทำงานที่แตกต่างกัน โดยไโดควอต (diquat, 1, 10-ethylene-2, 20-bipyridinium ion, DQ) และพาราควอต (paraquat, 1,10-dimethyl-4,40-bipyridinium ion, PQ) เป็นสารกำจัดวัชพืช (bipyridylum herbicides) แบบชนิดไม่เลือกทำลาย (non-selective herbicide) ใช้กับวัชพืชใบกว้างและหญ้า คลอร์มีควอต (chlormequat, 2-chloroethyltrimethylammonium ion, CQ) และเมพิควอต (mepiquat, 1,1-dimethylpiperidinium ion, MQ) เป็นสารสังเคราะห์ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) แต่ไม่จัดเป็นฮอร์โมน มีคุณสมบัติในการกระตุ้น ยับยั้ง หรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช เช่น กระตุ้นการออกดอกหรือทำให้พืชทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม⁽¹⁻⁵⁾ ผลของการใช้สารอย่างไม่ระมัดระวัง ขาดความเข้าใจ หรือใช้ไม่ตรงตามฉลากระบุ ก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อม และเชื่อมโยงห่วงโซ่อาหาร ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร ผู้ที่ได้รับสัมผัสสารนี้โดยตรงจากการฉีดพ่น และความไม่ปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของกรมวิชาการเกษตรรายงานปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในช่วงปี พ.ศ. 2551-2561 ปริมาณเฉลี่ย 70,000-125,000 ตันต่อปี มีมูลค่ามากกว่าสามหมื่นล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 74 ของสารออกฤทธิ์ทั้งหมด รองลงมา คือ สารเคมีกำจัดแมลง⁽⁶⁾

องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) จำแนกความเป็นพิษของพาราควอต อยู่ใน class II คือ มีอันตรายปานกลาง (moderately hazardous)⁽⁷⁾ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพิษเรื้อรังระยะยาว โดย The United State Environmental Protection Agency (US EPA) ระบุว่าพาราควอต เป็นสารที่ไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง ไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ หรือตัวอ่อน ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์⁽⁸⁾ แต่ในส่วนของ

สารไโดควอต EU ไม่ต่ออายุให้เป็นสารออกฤทธิ์ (active substance) ในผลิตภัณฑ์อารักขาพืช เนื่องจากพบว่าไโดควอตมีความเสี่ยงสูงต่อผู้ใช้งานและนก⁽⁹⁾ ประเทศไทย จัดพาราควอตเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 (วอ.4) ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2563 ควบคุมโดยกรมวิชาการเกษตร⁽¹⁰⁾ ซึ่งมีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2563 ห้ามผลิต นำเข้า ส่งออก ครอบครอง ซึ่งสอดคล้องตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) ระบุต้องตรวจไม่พบวัตถุอันตรายทางการเกษตรชนิดที่ 4 โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์และห้องปฏิบัติการที่มีขีดจำกัดของการวัด (limit of detection: LOD) ต้องเป็นไปตามเงื่อนไขของเอกสารแนบท้ายประกาศนี้ (บัญชีหมายเลข 5)⁽¹¹⁾

การวิเคราะห์สารคลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต ด้วยคุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มนี้เป็นแบบมีขั้วสูง (high polar herbicides: HPH) และเป็นไอออนบวกถาวร ทำให้สารมีพฤติกรรมที่จะจับกับพื้นผิวและสารต่างๆ ได้อย่างดี จำเป็นต้องใช้วิธีการสกัดและสภาวะการแยกสารที่มีความจำเพาะเจาะจง รวมทั้งต้องไม่ส่งผลกระทบต่อสารวิเคราะห์ จึงใช้วิธีวิเคราะห์แบบ single residues methods (SRM) จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ส่วนใหญ่เตรียมตัวอย่างโดยวิธี solid phase extraction (SPE), matrix solid phase dispersion (MSPD) และใช้สารสกัดประเภท methanol หรือ methanol ผสมน้ำ, acetonitrile ผสมน้ำ หรือน้ำที่มีสถานะเป็นกรด และ clean up โดยใช้ C18, Florisil, PSA, GCB⁽¹²⁾ เป็นต้น ตรวจวัดชนิดและปริมาณสารด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น HPLC-post column derivatization ซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลาในการทดสอบนานเพราะต้องมีการเตรียมสารเพื่อมาทำปฏิกิริยา derivatized หรือ liquid chromatography เช่น mixed mode หรือ ion pair chromatography ซึ่งพบความไม่สม่ำเสมอของผลการวิเคราะห์สารพาราควอต และไโดควอต โดยปัญหา chromatographic และ mass spectrometric มาจากการตรวจวัดประจุของสารว่าเป็น [M-H⁺] single charge หรือ [M²⁺] double charge นอกจากนี้ยังมีวิธีวิเคราะห์สำหรับพาราควอต

และไดควอต โดยใช้ isotope labeling standard เพื่อให้ได้ robustness และ accuracy ดีขึ้น^(13,14) ปัจจุบันวิธีการสกัดและการตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มที่มีขั้วสูงอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คือ QuPPE-Method ซึ่งพัฒนาโดย EURL-SRM เนื่องจากมีความเฉพาะเจาะจงกับสารกลุ่มนี้ อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์พร้อมกันได้หลายชนิดในหนึ่งวิธีด้วยเทคนิค LC-MS/MS โดยมี detector เป็นชนิด triple quadrupole ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตกค้างในระดับต่ำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการเลือก interface ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ให้เหมาะสมกับสภาพขั้วของสาร (polar compounds)⁽¹⁵⁾

เพื่อควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมายไทยที่ให้อยู่ภายใต้การใช้พาราควอตและเพื่อทราบสถานการณ์การตกค้าง ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนดำเนินการทางกฎหมายให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ คลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างผักและผลไม้สดได้พร้อมกันในครั้งเดียว ทั้งนี้สามารถเตรียมตัวอย่างได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารเคมีน้อย ประหยัดค่าใช้จ่าย โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบสารที่มีปริมาณน้อยได้อย่างแม่นยำ โดยใช้คะน้ำ ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล เป็นตัวแทนของ matrix ผักและผลไม้

วัสดุและวิธีการ

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน: paraquat dichloride, diquat dibromide, mepiquat chloride และ chlormequat chloride ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer ความบริสุทธิ์ > 98% (บริษัทผู้ผลิต LGC labor GmbH, ประเทศเยอรมนี) สารเคมี: methanol (MeOH), acetonitrile (CH₃CN) เป็น HPLC grade, formic acid, ammonium formate (NH₄HCO₂) เป็น AR grade, acidified methanol เตรียมโดยเปิด formic acid 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ที่มี MeOH และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย MeOH

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock solution ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารมาตรฐานแต่ละชนิด 10 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย MeOH คำนวณความเข้มข้นของสารมาตรฐานเป้าหมาย และเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้น 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย acidified methanol:H₂O (1:1)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม และ 0.01 มิลลิกรัม, refrigerated centrifuge, vortex mixer, เครื่องปั่นตัวอย่าง, micro pipette ขนาด 2–20, 10–200, 20–200 และ 100–1,000 ไมโครลิตร, screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร, micro-spin filter tube 0.45 µm nylon, volumetric flask ชนิด polypropylene ขนาด 10 มิลลิลิตร, vial สีชนิด polypropylene ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย HPLC รุ่น Agilent 1260 series (บริษัทเอจีเลนต์ เทคโนโลยี, ประเทศสิงคโปร์), MS/MS detector ชนิด triple quadrupole mass spectrometer รุ่น 5500 QTRAP (บริษัท AB SCIEX, ประเทศแคนาดา) และ column: Atlantis[®] HILIC Silica (2.1 mm × 150 mm, 3µm)

การเตรียมตัวอย่าง

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ใช้ตัวอย่างคะน้ำ ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล เป็นตัวแทนกลุ่มผักและผลไม้ (representative matrix)

การสำรวจปริมาณการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด ในปี พ.ศ. 2563 รวมทั้งสิ้น 219 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น ตัวอย่างจากแหล่งกระจายสินค้าทั่วประเทศทั้ง 77 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 51 ตัวอย่าง และผลไม้ 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากโครงการสำรวจผักและผลไม้สด ซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ในการประกอบอาหารของโรงพยาบาล เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ครอบคลุมพื้นที่ 12 เขตสุขภาพ จำนวน 154 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 100 ตัวอย่าง และผลไม้ 54 ตัวอย่าง

หลักการการวิเคราะห์

นำผักและผลไม้บดละเอียดมาเติมน้ำกลั่น จากนั้นสกัดสารตกค้างทั้ง 4 ชนิด จากตัวอย่างด้วย acidified methanol โดยเขย่าต่อเนื่องใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตกตะกอนโดยการ centrifuge ดูดส่วนใสใส่ micro spin และนำไป centrifuge เพื่อกรองส่วนใสอีกรอบ จากนั้นนำสารที่สกัดตรวจหาชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS คำนวณปริมาณจาก calibration curve ที่ plot ระหว่าง concentration กับ peak area ของสารมาตรฐาน

วิธีการตรวจวิเคราะห์**การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ (extraction and clean up)**

ชั่งตัวอย่าง 10.0 กรัม ลงใน screw cap centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100% ของค่าความชื้นของตัวอย่าง⁽¹⁵⁾ (ตัวอย่างเช่น ผักกาดขาว มีความชื้นร้อยละ 96.6 ถ้าชั่งตัวอย่างผักกาดขาว 10 กรัมที่ใช้ในการวิเคราะห์ จะมีปริมาตรน้ำเท่ากับ $((96.6 \times 10) / 100) = 9.66$ กรัม ดังนั้นปริมาตรของน้ำกลั่นที่เติมเท่ากับ $10 - 9.66$ เท่ากับ 340 ไมโครลิตร หรือ 0.34 มิลลิลิตร) ปั่นด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำ acidified methanol 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที เขย่าต่อเนื่องใน water bath ที่อุณหภูมิ

80 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วางทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไป centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด micro-spin filters นำไป centrifuge ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายที่กรองได้ใส่ใน vials พลาสติกสีชา นำไปตรวจวัดชนิดและปริมาณด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การตรวจวัดชนิดและปริมาณ

เครื่อง Agilent 1260 series 5500 QTRAP MS/MS: มีสภาวะดังนี้ mobile phase: 20 mM ammonium formate และ CH_3CN ใช้โปรแกรม gradient ในการแยกสาร เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 24 นาที โดยมีสภาวะของ mass spectrometer ประกอบด้วย ion spray voltage: 4,500 volts, temperature (TEM): 500 องศาเซลเซียส, collision gas (CAD): nitrogen; medium, curtain gas (CUR): 23 psig, ion spray nebulizer gas (GAS-1) : 50 psig และ TIS heater gas (GAS-2): 60 psig โดยสารจะถูกทำให้เป็นไอออนบวกด้วย electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) โดยศึกษา mass ที่ m/z ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 MS/MS acquisition parameters ของการวิเคราะห์คลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต

component	precursor ion (m/z)	product ion (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
chlormequat	122.0	58.0 (primary)	148.46	7.07	36.65	7.06
	122.0	63.0 (secondary)	148.46	7.07	27.11	10.40
diquat	183.3	168.0 (primary)	81.20	13.10	30.82	10.32
	183.3	157.1 (secondary)	81.20	13.10	22.00	9.79
mepiquat	114.2	98.0 (primary)	254.96	7.84	34.09	13.57
	114.2	58.0 (secondary)	254.96	7.84	32.53	9.17
paraquat	186.3	171.1 (primary)	80.00	11.69	28.00	11.80
	171.1	77.0 (secondary)	156.30	8.00	46.65	9.24

การคำนวณปริมาณ

คำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบ โดยใช้เทคนิค external calibration เปรียบเทียบกับ calibration curve จากสมการเส้นตรง $Y = aX + b$ ปริมาณสารที่ตรวจพบ \times (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เท่ากับ $(Y-b)/a$ โดย Y คือ พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน, a คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน และ b คือ จุดตัดแกน Y

การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ตรวจสอบ specificity โดยพิจารณาจาก ion ratio และ retention time ของสารละลายตัวอย่างต้องไม่แตกต่างจาก ion ratio และ retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐานเกินเกณฑ์การยอมรับ ซึ่ง retention time ของสารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และ พาราควอต ในตัวอย่างแตกต่างจากสารมาตรฐานได้ไม่เกิน 2%⁽¹⁶⁾

การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียม procedural mixed standard calibration curve โดยซึ่ง matrix blank จำนวน 6 หลอด แล้วเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์เหมือนการสกัดตัวอย่าง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง (แกน x) ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน กับ (แกน y) พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน คำนวณหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (pearson correlation coefficient: r) สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2)

การวิเคราะห์ method blank และ matrix blank

method blank สกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา โดยใช้สารเคมีทั้งหมด แต่ไม่มีตัวอย่างสำหรับ matrix blank ที่ใช้จะครอบคลุมตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างคะน่า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล สกัดและวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนา จากนั้นฉีดสารสกัด method blank และ matrix blank เข้าเครื่อง

LC-MS/MS เพื่อตรวจสอบว่ามี mass หรือ สัญญาณรบกวนตรงสารมาตรฐานหรือไม่ เพื่อป้องกันความผิดพลาดของผลวิเคราะห์

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection: LOD)

กำหนดค่า LOD โดยใช้ค่า 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3) ทดสอบค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นยืนยันค่า LOD โดยทำการทดสอบไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ ผลต้องไม่พบ false negative และต้องให้สัญญาณค่า signal/noise > 3

การหาขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation: LOQ)

กำหนดค่า LOQ โดยใช้ค่า default limit (0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 พ.ศ. 2560 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง เนื่องจากค่าอ้างอิง (target value) ของสารมีค่าแตกต่างกันในแต่ละชนิดพืช ดังนั้นจึงยืนยันค่า LOQ โดยเติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงใน matrix blank วิเคราะห์ไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ คำนวณ %recovery กำหนดเกณฑ์ยอมรับอยู่ในช่วง 60–120, %RSD⁽¹⁷⁾ และ HORRAT (Horwitz ratio) กำหนดเกณฑ์ยอมรับตาม Codex และ EU มีค่า ≤ 2 จากสมการ

$$\text{HORRAT} = \frac{\text{Experimental RSDr}}{\text{Predicted RSDr}}$$

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (linearity and working range)

เติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิดลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ตรวจพบ คำนวณหาสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R^2)

การทดสอบความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ทดสอบโดยเติมสารมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด ลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละไม่น้อยกว่า 6 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าเฉลี่ย %recovery, %RSD และ HORRAT โดยเกณฑ์ยอมรับความแม่นยำ: mean recovery 60–120% เกณฑ์ยอมรับความเที่ยง: HORRAT \leq 2

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (uncertainty)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวัด⁽¹⁸⁾ โดยคำนึงถึงแหล่งของความไม่แน่นอนทุกแหล่งรวมค่าความไม่แน่นอนทั้งหมด แล้วคำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในการประเมินค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ ปริมาณสารที่พบหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (mg/kg) โดยคำนวณความเข้มข้นของสารที่ตรวจพบจาก calibration curve

ผล

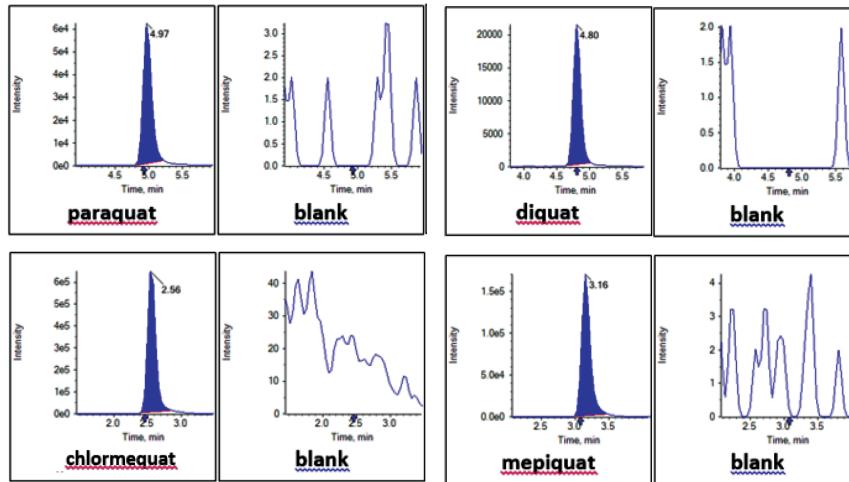
จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ คลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต ภายใต้สภาวะที่กำหนด สามารถสร้างกราฟมาตรฐาน procedural mixed standard calibration curve ซึ่งเป็นการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ลงใน matrix blank และทำการสกัดตามขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง เป็นการชดเชยผลกระทบจากลักษณะตัวอย่างและชดเชยการสูญเสีย

ของสารที่สนใจที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดได้ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับค่าพื้นที่ใต้กราฟ สามารถวิเคราะห์สารดังกล่าวได้ในช่วงความเข้มข้น 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้กราฟที่เป็นเส้นตรง โดยค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.975–0.999 เมื่อวิเคราะห์ method blank ของสารเคมีที่ใช้ทั้งหมด และ matrix blank ของตัวอย่างคะน่า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล ไม่พบสัญญาณรบกวนในช่วงของการตรวจวัดสารเป้าหมาย

ผลการตรวจสอบ specificity ค่า ion ratio และ retention time ของสารละลายตัวอย่างไม่แตกต่างจาก ion ratio และ retention time เฉลี่ยของสารมาตรฐาน โดยยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ และ retention time ของสารคลอร์มีควอต ไโดควอต เมพิควอต และพาราควอต คือ ค่าจากตัวอย่างแตกต่างจากสารมาตรฐานไม่เกิน 2% ดังแสดงในภาพที่ 1

ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยให้สัญญาณพีคมีค่าสูงกว่า 3 เท่าของ signal to noise ส่วนค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในทุกชนิดสาร ผลการพิสูจน์ค่า LOQ โดยการเติมสารมาตรฐาน วิเคราะห์ 6 ซ้ำ ใช้ตัวอย่างคะน่า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล ได้ค่า mean recovery ในช่วง 69.2–114.4%, HORRAT ในช่วง $<$ 0.1–0.6 ดังแสดงในตารางที่ 2

ผลการทดสอบช่วงของการวัด (working range) และความเป็นเส้นตรง (linearity) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่เติมกับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ตรวจพบ ในช่วง 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ได้ค่า R^2 ระหว่าง 0.975–0.999 ดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน และ blank ที่ m/z 186/171 (พาราควอต), m/z 183/168 (ไดควอต), m/z 122/58 (คลอร์มีควอต) และ m/z 114/98 (เมพิควอต)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบค่า mean recovery, %RSD และ HORRAT ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม ต่อกรัม ของสารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล

ชนิดตัวอย่าง	chlormequat			diquat			mepiquat			paraquat		
	%Rec.	%RSD	HOR-RAT	%Rec.	%RSD	HOR-RAT	%Rec.	%RSD	HOR-RAT	%Rec.	%RSD	HOR-RAT
คะน้า	112.8	4.2	0.2	74.3	9.9	0.5	92.9	8.8	0.4	73.4	11.4	0.5
ตำลึง	100.4	0.5	< 0.1	105.9	5.2	0.2	100.6	2.5	0.1	77.3	10.4	0.5
ผักกาดขาว	96.5	13.1	0.6	89.5	10.2	0.5	100.9	2.0	0.1	69.2	4.1	0.2
หัวไชเท้า	100.9	8.6	0.4	104.4	7.8	0.4	108.4	7.7	0.4	108.8	3.9	0.2
มะเขือเทศ	92.3	4.0	0.2	106.8	6.7	0.3	93.5	1.7	0.1	90.3	9.7	0.5
ส้ม	99.6	1.6	0.1	76.6	10.0	0.5	90.8	5.5	0.3	83.4	3.5	0.2
แอปเปิ้ล	99.6	3.6	0.2	110.9	4.8	0.2	114.4	1.8	0.1	89.3	9.3	0.4

ตารางที่ 3 ความเป็นเส้นตรง ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกรัม

ชนิดตัวอย่าง	R ²			
	chlormequat	diquat	mepiquat	paraquat
คะน้า	0.988	0.986	0.999	0.990
ตำลึง	0.987	0.984	0.990	0.994
ผักกาดขาว	0.999	0.999	0.989	0.975
หัวไชเท้า	0.993	0.989	0.991	0.991
มะเขือเทศ	0.976	0.998	0.988	0.997
ส้ม	0.996	0.996	0.999	0.994
แอปเปิ้ล	0.999	0.998	0.999	0.998

การทดสอบค่าความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ พบว่าความแม่นยำที่ประเมินจาก %recovery เฉลี่ยทั้ง 3 ระดับ อยู่ในช่วง 66.1–117.2% และความเที่ยง (precision) ที่ประเมินด้วย %RSD และ HORRAT อยู่ในช่วง 0.4–14.5 และ < 0.1–1.0 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารคลอร์มีควอต ไตควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล

Sample type	compound	Spiked level (mg/kg)	Mean Rec. ± SD	%RSD	HORRAT
คะน้า	chlormequat	0.01	112.8±0.5	4.2	0.2
		0.05	82.0±0.3	0.7	< 0.1
		0.20	86.0±16.7	9.7	0.7
	diquat	0.01	74.3±0.7	9.9	0.5
		0.05	73.5±0.7	1.8	0.1
		0.20	80.8±6.4	4.2	0.3
	mepiquat	0.01	92.9±0.8	8.8	0.4
		0.05	100.1±0.6	1.2	0.1
		0.20	113.5±7.1	3.1	0.2
	paraquat	0.01	73.4±0.8	11.4	0.5
		0.05	80.2±0.6	1.5	0.1
		0.20	102.0±8.4	4.1	0.3
ตำลึง	chlormequat	0.01	100.4±0.1	0.5	< 0.1
		0.05	101.9±4.7	9.1	0.6
		0.20	88.4±7.2	4.1	0.3
	diquat	0.01	105.9±0.6	5.2	0.2
		0.05	94.3±5.6	11.9	0.7
		0.20	76.7±18.6	11.7	0.9
	mepiquat	0.01	100.6±0.3	2.5	0.1
		0.05	93.1±6.7	14.5	0.9
		0.20	86.3±8.3	4.8	0.4
	paraquat	0.01	77.3±0.8	10.4	0.5
		0.05	85.8±9.8	8.5	0.6
		0.20	88.7±15.2	8.5	0.6
ผักกาดขาว	chlormequat	0.01	96.5±1.3	13.1	0.6
		0.05	91.4±4.0	8.8	0.5
		0.20	100.2±0.5	0.5	< 0.1
	diquat	0.01	89.5±0.9	10.2	0.5
		0.05	100.0±4.1	8.3	0.5
		0.20	97.2±7.6	3.9	0.3
	mepiquat	0.01	100.9±0.2	2.0	0.1
		0.05	92.5±4.3	9.3	0.6
		0.20	93.4±5.7	3.0	0.2

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารคลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล (ต่อ)

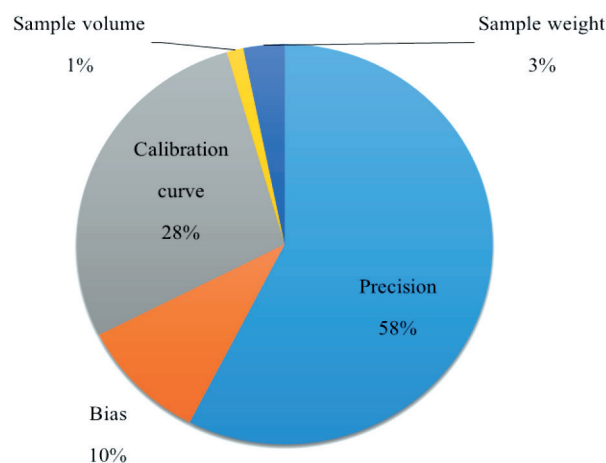
Sample type	compound	Spiked level (mg/kg)	Mean Rec. \pm SD	%RSD	HORRAT
ผักกาดขาว (ต่อ)	paraquat	0.01	69.2 \pm 0.3	4.1	0.2
		0.05	100.7 \pm 1.2	2.4	0.1
		0.20	97.5 \pm 4.8	2.5	0.2
หัวไชเท้า	chlormequat	0.01	100.9 \pm 0.9	8.6	0.4
		0.05	91.2 \pm 0.3	0.8	< 0.1
		0.20	104.2 \pm 2.9	1.4	0.1
	diquat	0.01	104.4 \pm 0.8	7.8	0.4
		0.05	95.1 \pm 1.0	2.0	0.1
		0.20	107.2 \pm 5.9	2.7	0.2
	mepiquat	0.01	108.4 \pm 0.8	7.7	0.4
		0.05	96.2 \pm 0.3	0.7	< 0.1
		0.20	115.5 \pm 3.4	1.5	0.1
	paraquat	0.01	108.8 \pm 0.4	3.9	0.2
		0.05	93.5 \pm 0.2	0.4	< 0.1
		0.20	107.3 \pm 3.0	1.4	0.1
มะเขือเทศ	chlormequat	0.01	92.3 \pm 0.4	4.0	0.2
		0.05	102.8 \pm 1.4	2.7	0.2
		0.20	94.8 \pm 1.6	0.9	0.1
	diquat	0.01	106.8 \pm 0.7	6.7	0.3
		0.05	117.2 \pm 1.0	1.7	0.1
		0.20	96.5 \pm 12.1	6.3	0.5
	mepiquat	0.01	93.5 \pm 0.2	1.7	0.1
		0.05	100.8 \pm 0.3	0.6	< 0.1
		0.20	97.0 \pm 1.3	0.7	0.1
	paraquat	0.01	90.3 \pm 0.9	9.7	0.5
		0.05	105.2 \pm 2.5	4.8	0.3
		0.20	82.2 \pm 6.0	3.7	0.3
ส้ม	chlormequat	0.01	99.6 \pm 0.2	1.6	0.1
		0.05	110.1 \pm 0.8	0.7	< 0.1
		0.20	73.4 \pm 19.6	13.3	1.0
	diquat	0.01	76.6 \pm 0.8	10.0	0.5
		0.05	103.6 \pm 2.4	4.6	0.3
		0.20	86.9 \pm 16.9	3.7	0.3
	mepiquat	0.01	90.8 \pm 0.5	5.5	0.3
		0.05	107.0 \pm 0.9	1.7	0.1
		0.20	66.1 \pm 5.9	4.5	0.3
	paraquat	0.01	83.4 \pm 0.3	3.5	0.2
		0.05	102.2 \pm 2.1	4.0	0.2
		0.20	91.1 \pm 23.8	13.1	1.0

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ %recovery และความเที่ยงในการวิเคราะห์ ของสารคลอโรมีควอต ไตควอต เมพิควอต และพาราควอต ในตัวอย่างคะน้า ตำลึง ผักกาดขาว หัวไชเท้า มะเขือเทศ ส้ม และแอปเปิ้ล (ต่อ)

Sample type	compound	Spiked level (mg/kg)	Mean Rec. \pm SD	%RSD	HORRAT
แอปเปิ้ล	chlormequat	0.01	99.6 \pm 0.4	3.6	0.2
		0.05	86.9 \pm 0.7	1.6	0.1
		0.20	90.6 \pm 5.2	2.9	0.2
	diquat	0.01	110.9 \pm 0.5	4.8	0.2
		0.05	100.8 \pm 1.9	3.7	0.2
		0.20	107.7 \pm 3.5	1.6	0.1
	mepiquat	0.01	114.4 \pm 0.2	1.8	0.1
		0.05	97.3 \pm 0.6	1.3	0.1
		0.20	103.4 \pm 3.3	1.6	0.1
	paraquat	0.01	89.3 \pm 0.8	9.3	0.4
		0.05	106.7 \pm 2.1	3.9	0.2
		0.20	112.0 \pm 6.9	3.1	0.2

จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ตามวิธีที่ได้ทดสอบ โดยนำการวิเคราะห์สารพาราควอตในส้มเป็นตัวแทนการคำนวณ พบแหล่งที่มาของความไม่แน่นอน ได้แก่ การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight: Ms) เครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ (sample volume: Vs) ค่า concentration ที่อ่านได้จาก calibration curve และจากการเตรียมสารมาตรฐาน (concentration of sample: Cs) bias และ precision คำนวณค่าความไม่แน่นอนของสารพาราควอต พบว่ามีค่าเท่ากับ $\pm 26.2\%$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนค่าความไม่แน่นอนจากแหล่งความไม่แน่นอน ที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณสารจากมากไปหาน้อย ได้แก่ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (method precision, 58%) concentration ที่อ่านได้จาก calibration curve และจากการเตรียมสารมาตรฐาน (concentration of sample, 28%) ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (bias, 10%) การชั่งน้ำหนักของตัวอย่าง (sample weight, 3%) และจากเครื่องแก้ววัดปริมาตรที่ใช้ (sample volume, 1%) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 สัดส่วนขององค์ประกอบแหล่งความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์สารพาราควอตในตัวอย่างส้ม

นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2563 ได้นำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการทดสอบความถูกต้องแล้วมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ผักและผลไม้สด เพื่อสำรวจปริมาณการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด ในโครงการอาหารปลอดภัยตามนโยบายสำคัญของกระทรวงสาธารณสุข ประกอบด้วย โครงการพัฒนาแหล่งกระจายสินค้าทั่วประเทศ ซึ่งเก็บตัวอย่างจากแหล่งกระจายสินค้า ตลาดค้าส่ง กลุ่มเกษตรกร และวิสาหกิจชุมชนร้านหรือฟาร์มขายทั้ง 77 จังหวัด เช่น วิสาหกิจชุมชนศูนย์เรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงชุมชนปลูกไม้หลายรวมใจจังหวัดนครปฐม, ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี, ตลาดสดวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี และตลาดเทศบาลเมืองจังหวัดชุมพร เป็นต้น จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 51 ตัวอย่าง และผลไม้ 14 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบสารกลุ่มควอตินในทุกตัวอย่าง โครงการโรงพยาบาลอาหารปลอดภัย เก็บตัวอย่างจากโรงพยาบาลเป้าหมายครอบคลุมพื้นที่ 12 เขตสุขภาพ จำนวน 154 ตัวอย่าง แบ่งเป็นผัก 100 ตัวอย่าง และผลไม้ 54 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่ากำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) กำหนดค่าคลอรัมีควอตเป็นดีฟอลต์ลิมิต (default limits) สำหรับพีช 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามบัญชีหมายเลข 3 แนบท้ายประกาศ กรณีนอกเหนือจากนี้ให้ใช้ค่าดีฟอลต์ลิมิตสำหรับพีชได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าผักและผลไม้ตรวจพบ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.95 โดยพบสารเมพิควอตในถั่วฝักยาวและส้มโชกุนปริมาณ 0.11 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งเกินค่าดีฟอลต์ลิมิตทั้ง 2 ตัวอย่าง และพบสารคลอรัมีควอตในผักโขมแก้ว ปริมาณน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าค่าดีฟอลต์ลิมิต

วิจารณ์

วิธีที่ศึกษานี้สามารถทดสอบสารตกค้างในผักและผลไม้ได้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ คลอรัมีควอต ไคควอต เมพิควอต และพาราควอต โดยค่า molecular masses ได้แก่ 122.0, 183.3, 114.2 และ 186.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ตามลำดับ โดยใช้เครื่อง liquid chromatograph (LC) ซึ่งมี tandem mass spectrometer (MS/MS) เป็นตัวตรวจวัด จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ

LC-MS/MS ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) ใช้หลักการ mass spectrometry ตรวจวัดไอออนของสารที่แยกกันด้วยค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio, m/z) ที่แตกต่างกัน ในการวิเคราะห์นี้เลือก interface ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ion source) ชนิด electro spray ionization (ESI) ไอออนที่ได้จะถูกวิเคราะห์ด้วย multiple reaction monitoring (MRM) mode ใช้ตรวจสอบมวลของไอออนที่แตกออกมา (fragment ion, transition ion) จากไอออนตั้งต้น (parent ion) โดยสามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีมวลเท่ากันได้ เนื่องจาก fragment ion ที่แตกออกจะเป็นชิ้นส่วนที่จำเพาะของไอออนแต่ละชนิด detector ชนิด tandem mass spectrometer ตรวจวัดโดยเลือก mass ถึง 2 ครั้ง ครั้งแรกเลือก precursor ion หรือ parent ion จากนั้นเกิด fragmentation ได้ product ion หรือ daughter ion เลือก product ion 2 ion ที่มีค่า response สูงและไม่มีสารอื่นรบกวน โดยสารใดควอตจะถูก ionized ในรูป $[M+H]$ (dehydrogenated molecular ion) ที่ m/z 183.3 เป็น precursor ion และเลือก product ion ที่ m/z 168.0 กับ 157.1 ส่วนคลอรัมีควอต เมพิควอต และพาราควอต จะถูก ionized ในรูป $[M+]$ ที่ m/z 122.0, 114.2 และ 186.3 ตามลำดับเป็น precursor ion เลือกคู่ product ion ที่ m/z 58.0 กับ 63.0, 98.0 กับ 58.0 และ 171.1 กับ 77.0 ตามลำดับ

สำหรับสภาวะเครื่อง LC ผู้วิจัยได้ปรับจากวิธีของ QuPPE-Method โดยใช้โปรแกรม double gradient ในการแยกสาร ทำให้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เพิ่มจาก 12 นาที เป็น 24 นาที เพื่อป้องกันการเกิด carry over ในระบบ และใช้ column ชนิด hydrophilic interaction (HILIC) มี particle shape เป็นแบบ spherical ซึ่งมีความพิเศษสามารถทำงาน 2 รูปแบบ ผสมผสานกัน (difunctional bonded) ระหว่าง silica-based C18 ซึ่งเป็น reversed-phase กับ normal phase ทำให้มีความจำเพาะในการหน่วงสารที่มีคุณสมบัติ HPH อยู่ใน column ได้นาน ทำให้ retention time ของสารเป้าหมายมีความเหมาะสม ไม่ออกเร็วเกินไป ส่วนวิธีการสกัด

ผู้วิจัยใช้วิธีของ QuPPE-Method Version 8.1 โดยปัจจัยหลักที่ต้องควบคุมสำหรับขั้นตอนการสกัด คือ สภาวะความชื้นของตัวอย่าง ซึ่งต้องเติมน้ำให้ครบ 100% ของชนิดตัวอย่าง โดยคำนวณปริมาตรน้ำที่ต้องเติม และสกัดภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าวิธีการนี้ทำให้สารบริสุทธิ์ก่อนการฉีดเข้าเครื่อง มีเพียงการตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge และใช้ micro-spin filters ช่วยในการกรองตะกอนเท่านั้น ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าตัวอย่างผักและผลไม้มี matrix หลากหลาย ทั้งประเภทคลอโรฟิลสูง น้ำตาลสูง ดังนั้นการตกตะกอนด้วยอุณหภูมิห้องไม่สามารถกำจัดสิ่งรบกวนออกได้ทั้งหมด ทำให้รบกวนผล ดังนั้นการวิเคราะห์จึงได้ทดลองปรับสภาวะอุณหภูมิขณะตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ในทุกขั้นตอนเป็นอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส พบว่าช่วยทำให้สารสกัดในทุกขั้นตอนใส กำจัดสิ่งรบกวนได้ดี สัญญาณพีคที่ตรวจพบชัดเจน ง่ายต่อการประเมินผลวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์ยังได้กำหนดการควบคุมคุณภาพเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้อง ได้แก่ การเลือก identification point ซึ่งเป็นระบบการคิดคะแนน เพื่อการยืนยันชนิดสารในการแปลผลข้อมูล โดยใช้จำนวน parent ion เริ่มต้น และ daughter ion รวมทั้งกำหนดความแตกต่างสูงสุดที่ยอมรับได้ (maximum permitted tolerance) ของ relative ion intensities ตามที่ European Communities (EC) กำหนด⁽¹⁶⁾ นอกจากนี้ค่า precision ที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%RSD) อยู่ในช่วง 0.4–14.5 โดยมีค่า HORRAT < 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ Codex กำหนดไว้ นอกจากนี้ยังได้มีการวางแผนการควบคุมคุณภาพภายใน (internal quality control) เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ตัวอย่างทุก batch โดยกำหนดไว้ไม่เกิน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ method blank, matrix blank, duplicate analysis และ spiked sample ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่ได้ใช้วัสดุอ้างอิงรับรอง (certified reference materials: CRM) ในการประกันคุณภาพของผลการทดสอบและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีทดสอบ แต่ใช้การเติม (spiking) สารมาตรฐานลงใน matrix blank

แทน อย่างไรก็ตามห้องปฏิบัติการมีการควบคุมคุณภาพเพื่อเฝ้าระวังความใช้ได้ของการทดสอบ โดยเข้าร่วมโปรแกรมการทดสอบความชำนาญ การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างห้องปฏิบัติการในตัวอย่างข้าวโอ๊ต 09130 จัดโดย FAPAS รอบระหว่างเดือนเมษายน–มิถุนายน 2563 พบว่าผลการประเมินอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ($|ZI| < 2$) โดยคลอร์มีควอตและเมพิควอต มีค่า Z score เท่ากับ 0.9 และ -0.1 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2563 วิธีตรวจวิเคราะห์นี้ได้รับการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้ทดสอบนี้มีความเหมาะสมในการใช้วิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด ในผักและผลไม้ โดยเทคนิค LC-MS/MS

เมื่อพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน โดยใช้เกณฑ์การคำนวณจากค่า standard deviation ค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็นเท่ากับ 2 predicted Horwitz's RSD⁽¹⁸⁾ เมื่อคำนวณค่าความไม่แน่นอนที่ควรจะเป็น เท่ากับ 31.6% แต่จากวิธีนี้ค่าความไม่แน่นอนที่พิจารณาจากแหล่งความไม่แน่นอนที่มีผลกระทบต่อปริมาณสาร มีค่า 26.2% ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าที่ควรจะเป็น พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้เหมาะสมและสอดคล้องตามเกณฑ์การพิจารณาความสมเหตุสมผลของค่าความไม่แน่นอน

จากผลการสำรวจพบการตกค้างเพียง 3 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 219 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.4 โดยตรวจพบสารเมพิควอตในถั้วฝักยาว 0.11 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และส้มโชกุน 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเกินค่าตีฟอลต์ลิมิตที่กำหนดไว้สำหรับพืชได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้ง 2 ตัวอย่าง และพบสารคลอร์มีควอตในผักโขมแก้ว ปริมาณน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งน้อยกว่าค่าตีฟอลต์ลิมิตที่กำหนดไว้ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามบัญชีหมายเลข 3 แนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) จากผลการสำรวจดังกล่าวพบว่าจำนวนตัวอย่างที่พบปริมาณการตกค้างน้อยมาก แสดงได้ว่าผู้ผลิตมีความตื่นตัวในการยกระดับมาตรฐานสินค้าและแรงผลักดันของภาครัฐที่มีมาตรการตรวจสอบ ผ่านโครงการสำรวจและเฝ้าระวังการตกค้างของสารเคมี

ป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่างกันในผักและผลไม้สดหลายโครงการ ตลอดจนมาตรฐานการผลิตสินค้าทางการเกษตร (Good Agriculture Practices: GAP) มีศักยภาพเพียงพอที่จะผลักดันให้เกิดวงจรผักผลไม้ปลอดภัย (demand driven) ดังนั้นจากผลการสำรวจเบื้องต้นสะท้อนให้เห็นว่าข้อกำหนดและกฎเกณฑ์ต่างๆ เหล่านี้สามารถสร้างความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของผักและผลไม้ที่จะนำมาบริโภคได้

สรุป

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์สารกลุ่ม herbicides ได้ 4 ชนิด ประกอบด้วย คลอร์มีควอต ไดควอต เมพิควอต และพาราควอต ซึ่งผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีดังกล่าว พบว่า calibration curve มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.01–0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่า coefficient of determination ในช่วง 0.975–0.999 ค่าเฉลี่ย %recovery อยู่ในช่วง 66.1–117.2% และ HORRAT อยู่ในช่วง < 0.1–1.0 มีค่า LOD และ LOQ ของทุกสารเท่ากับ 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีคุณลักษณะเฉพาะแสดงสมรรถนะที่ผ่านเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสม มีความถูกต้อง แม่นยำ มีความไว และความจำเพาะต่อสารที่ต้องการทดสอบ ให้ผลทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์ยอมรับของสากล เหมาะกับการใช้งาน (fitness for intended use) สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารตามกฎหมาย และเพื่อความยุติธรรมแก่ผู้ประกอบการและคุ้มครองผู้บริโภคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางลัดดา แก้วกล้าปัญญาเจริญ ที่ช่วยให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และสนับสนุนการศึกษาวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ฝ่ายยาสัตว์และวัตถุออกฤทธิ์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ช่วยเตรียมและสกัดตัวอย่าง จนทำให้งานวิจัยบรรลุผลสำเร็จในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bauer A, Luetjohann J, Rohn S, Kuballa J, Jantzen E. Development of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in plant-derived commodities. *Food Anal Methods* 2018; 11: 2237–43.
2. Chamkasem N, Morris CJ, Harmon T. Determination of paraquat and diquat in potato by liquid chromatography/tandem mass spectrometer. *J Regul Sci* 2017; 05: 1–8.
3. Pizzutti IR, Vela GM, de Kok A, Scholten JM, Dias JV, Cardoso CD, et al. Determination of paraquat and diquat: LC-MS/MS optimization and validation. *Food Chem* 2016; 209: 248–55.
4. กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. พาราควอต (Paraquat). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ฝ่ายศูนย์ข้อมูลสารอันตรายและอนุสัญญาการจัดการสารอันตรายและกากของเสีย; 2541. หน้า 7–12.
5. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. สารเคมีกำจัดวัชพืช (Herbicides). [ออนไลน์]. 2542; [สืบค้น 25 ม.ค. 2565]; [4 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/bulletin/bul99/v7n3/Herb>.
6. กรมวิชาการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. [ออนไลน์]. 2565; [สืบค้น 25 ม.ค. 2565]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.oae.go.th/view/1/ปัจจัยการผลิต/TH-TH>.
7. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticide by hazard and guidelines to classification 2000–2002 (WHO/IPCS/01.5). [online]. 2002; [cited 25 Jan 2022]; [58 screens]. Available from: URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42524>.
8. United States Environmental Protection Agency. R.E.D. FACTS paraquate dichloride. Prevention, pesticides and toxic substances (7508W). [online]. 1997; [cited 25 Jan 2022]; [12

- screens]. Available from: URL: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-061601_1-Aug-97.pdf.
9. Commission Implementing Regulation (EU) 2018/1532 of 12 October 2018 concerning the non-renewal of approval of the active substance diquat, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. Official Journal of the European Union 2018: L 257/10-L 257/12.
 10. พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563) หน้า 56.
 11. พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง ฉบับที่ 3. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563) หน้า 27.
 12. Kaczynski P. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. Food Chem 2017; 230: 524-31.
 13. Halim N, Kuntom A, Shinde R, Banerjee K. Determination of paraquat residues in palm oil by high-performance liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometry. Eur J Lipid Sci Technol 2019; 121: 1900092. (7 pages).
 14. Esparza X, Moyano E, Galceran MT. Analysis of chlormequat and mepiquat by hydrophilic interaction chromatography coupled to tandem mass spectrometry in food samples. J Chromatogr A 2009; 1216: 4402-6.
 15. European Commission (EURL-SRM). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol. (QuPPE-Method) version 8.1. [online]. 2015; [cited 25 Jan 2022]; [60 screens] Available from: URL: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf.
 16. Commission Decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities 2002: L221/8-L221/36.
 17. Fajgelj A, Ambrus A, editors. Principles and practices of method validation. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry; 2000.
 18. Ellison SLR, Williams A, editors. EURACHEM/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2012.

Method Development and Validation of Chlormequat, Diquat, Mepiquat, and Paraquat Residue Determination in Vegetables and Fruits by LC-MS/MS Technique

Saovanee Wajasit, Suwimol Muadmah, Atcharee Inkaew, Kanyarat Chuakunchat, Witthawat Wangkaewhiran, Sakulrat Somsuntisuk, and Thongsuk Payanan

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT According to the statistics on imported chemicals, herbicides, including chlormequat, diquat, mepiquat, and paraquat, have been used as weed control agents. Diquat and paraquat are the herbicides, while chlormequat and mepiquat are synthetic substances for controlling plant growth. The inappropriate use of these agents, especially paraquat, can lead to environmental contamination and cause adverse effects on consumers' health. WHO has categorized paraquat's toxicity as class II, which is moderately hazardous; moreover, paraquat is also classified as a category 4 hazardous substance according to the Hazardous Substances Act, B.E. 2563 (2020). This research aimed to develop and validate the analysis method for the four "quat" substances in fruits and vegetables. Firstly, the sample extraction was undertaken by using acidified methanol, and then centrifuged. After that, the extraction solution was examined to identify and quantify the herbicide residues by LC-MS/MS. The results indicated that the LOD and LOQ were 0.005 and 0.010 mg/kg, respectively, and the linearity was shown in the range of 0.01–0.20 mg/kg. The accuracy of this method was approximately 66.2–117.2%, and the precision was between 0.4% and 14.5%. This method has been recognized as ISO/IEC 17025:2017 accredited method since 2020. Therefore, it is suitable to be applied in a laboratory for consumer protection and law enforcement purposes. This method was also used to survey the contamination of these substances in 219 fresh vegetables and fruits in 2020. It was found that three samples contained herbicide residues: mepiquat in two samples and chlormequat in the other one, while paraquat residues were not detected in any of the three samples.

Keywords: Chlormequat, Diquat, Mepiquat, Paraquat, Vegetables and Fruits