

# การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์พาราควอต ไตควอต คลอร์มีควอต และเมพิควอต ในเนื้อสัตว์ นม และไข่ โดยเทคนิค LC-MS/MS

รติยากร ศรีโคตร ภรพรรณ สงศรี และ ณิชนันท์ บุญนิ่ม

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

**บทคัดย่อ** พาราควอต เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ที่ห้ามผลิต นำเข้า ส่งออก นำผ่าน หรือมีไว้ครอบครองตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่องบัญชีวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563) นอกจากนั้นประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่องอาหารที่มีสารพิษตกค้าง กำหนดขีดจำกัดการตรวจวัดของวิธี (method detection limit) อาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการ คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์พาราควอตในเนื้อสัตว์ นม และไข่ ด้วยเทคนิค LC-MS/MS รวมทั้งสารในกลุ่มควอต 3 ชนิด ได้แก่ ไตควอต คลอร์มีควอต และเมพิควอต ในคราวเดียวกัน เพื่อให้ได้วิธีที่มีความจำเพาะสูงและตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ในระดับที่กฎหมายกำหนด โดยสกัดตัวอย่างด้วย acidic acetonitrile ตกตะกอนและทำให้บริสุทธิ์ผ่าน hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) SPE cartridge และตรวจวัดปริมาณแคปโธออนด้วย multiple reaction monitoring (MRM) วิธีนี้มีขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ความแม่นยำ (%recovery) ความเที่ยง (%RSD) มีค่าเฉลี่ยในช่วง 64.8-108.6 และ 2.1-13.0 ตามลำดับ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ที่ 0.01-0.20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยไม่มีผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง การนำวิธีที่พัฒนาไปตรวจวิเคราะห์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ จำนวน 29 ตัวอย่าง ผลตรวจไม่พบการตกค้างของสารทั้ง 4 ชนิด โดยสรุปวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพเหมาะสมในการวิเคราะห์เนื้อสัตว์ นม และไข่ สอดคล้องตามข้อกำหนดทางกฎหมาย เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างในอาหาร

**คำสำคัญ:** กลุ่มควอต, เนื้อสัตว์, นม, ไข่, LC-MS/MS

Corresponding author E-mail: rattiyakorn.s@dmsc.mail.go.th

Received: 27 October 2022

Revised: 16 May 2023

Accepted: 18 May 2023

## บทนำ

พาราควอต (paraquat; PQ) คือ สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งในกลุ่มสารกำจัดวัชพืช เป็นที่รู้จักในชื่อการค้าว่า กรัมม็อกโซน (grammoxone) ออกฤทธิ์โดยการดูดซึมทางใบอย่างไม่จำเพาะชนิดของวัชพืช มีผลทำลายเนื้อเยื่อพืชโดยรบกวนการสังเคราะห์แสงและเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดใบแห้งเหี่ยวอย่างรวดเร็ว เกษตรกรไทยนิยมใช้กำจัดวัชพืชในไร่อ้อย มันสำปะหลัง ยางพารา และพืชผล<sup>(1)</sup> คุณสมบัติทางพิษวิทยาขององค์การอนามัยโลก (WHO) ระบุว่า PQ เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง มีค่าปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (acceptable daily intake; ADI) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมพาราควอตแคทไอออนต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว<sup>(2)</sup> ปัจจุบันมีหลายประเทศที่สั่งห้ามใช้ PQ เนื่องจากมีความเป็นพิษจากการใช้กำจัดวัชพืชของเกษตรกร ทำให้เข้าสู่ผิวหนังได้จากแผลเดิมบนผิวหนัง และแผลเผาไหม้ที่เกิดจากฤทธิ์ของ PQ<sup>(3)</sup> การได้รับสัมผัส PQ ทางผิวหนังอาจทำให้ระคายเคือง ผิวหนังพุพอง ผิวหนังไหม้ แผลในปากและตาบอดได้ มีรายงานการเสียชีวิตเป็นจำนวนมากจากการกลืนกินและฉีด PQ เข้าได้ผิวหนัง ทำให้ปอดถูกทำลายและเสียชีวิตภายใน 3 สัปดาห์<sup>(4)</sup> งานวิจัยที่ผ่านมาบ่งชี้ว่า PQ สามารถถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดและกระจายไปตามเนื้อเยื่อ เช่น ตับ ปอด ไต จากนั้นถูกขจัดออกทางไต ทำให้เกิดภาวะไตวายและส่งผลกระทบต่อระบบประสาท อีกทั้งพบปัญหาการปนเปื้อนของ PQ ในสิ่งแวดล้อมและการตกค้างในนมแม่สูทากร แต่ภาคการเกษตรของประเทศไทยนิยมใช้ PQ ยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช ซึ่งอาจมีการตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรและห่วงโซ่อาหาร ปัจจุบันคณะกรรมการวัตถุอันตรายมีมติห้ามใช้ PQ ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 พ.ศ. 2563 ซึ่งกำหนดให้ PQ เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ที่ห้ามผลิต นำเข้า ส่งออก นำผ่าน หรือมีไว้ครอบครอง โดยมีผลบังคับใช้เมื่อวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2563<sup>(5)</sup> เป็นต้น ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 419 พ.ศ. 2563 เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง กำหนดว่าห้องปฏิบัติการจะต้องใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) ของวิธีทดสอบอย่างน้อย

ต่ำถึงระดับที่กำหนด ซึ่งในเนื้อสัตว์ นม และไข่ มีค่ากำหนด (method detection limit; MDL) เท่ากับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม<sup>(6)</sup> ซึ่งมีค่าเท่ากับค่ากำหนดของคณะกรรมการโครงการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (codex)<sup>(7)</sup> ส่วนค่ากำหนดในสหภาพยุโรปของ PQ มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม<sup>(8)</sup> PQ มีสูตรเคมี  $C_{12}H_{14}N_2^{+2}$  มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองหรือสีขาวนวล ไม่มีกลิ่น มักจำหน่ายในรูปของเหลว เพื่อไม่ให้สับสนกับเครื่องดื่มจึงมีการเติมสีและกลิ่นจุนลงไปและสารที่ทำให้หาเจียนหากมีผู้ดื่ม<sup>(9)</sup>

มีรายงานบทความวิจัยในต่างประเทศเกี่ยวกับวิธีตรวจวิเคราะห์ PQ, ไดควอต (diquat; DQ) คลอร์มีควอต (chlormequat; CQ) และเมพิควอต (mepiquat; MQ) ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ โดยเทคนิค UPLC-MS/MS ข้อดีของงานวิจัย คือ ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงในตัวอย่างที่เป็นกรดและมีน้ำเป็นองค์ประกอบ ส่วนข้อเสียคือ วิธีไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีไขมันสูง<sup>(10)</sup> ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีหน่วยงานหรือห้องปฏิบัติการใดให้บริการตรวจวิเคราะห์รายการทดสอบ PQ ในเนื้อสัตว์ นม และไข่ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ PQ ในตัวอย่าง เนื้อสัตว์ นม และไข่ ให้เป็นวิธีมาตรฐานตอบสนองต่อนโยบายกระทรวงสาธารณสุขตามที่กฎหมายกำหนด นอกจากนั้นยังสามารถตรวจวิเคราะห์สารในกลุ่มควอต (quats) อีก 3 ชนิด ในคราวเดียวกัน ได้แก่ DQ, CQ และ MQ ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติทางเคมีและความเป็นพิษคล้าย PQ<sup>(11)</sup> มีเพียง CQ เท่านั้นที่มีค่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดของวัตถุอันตรายทางการเกษตร (maximum residue limit; MRLs) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม<sup>(12)</sup> DQ มีค่ากำหนดตาม codex โดยมีค่ากำหนดในเนื้อสัตว์ นม และไข่ เท่ากับ 0.01, 0.001 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ<sup>(7)</sup> ส่วน MQ ไม่มีค่ากำหนดทั้งในประกาศกระทรวงสาธารณสุข และ codex จึงใช้ค่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นค่าดีฟอลต์ลิมิต (default limit) ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2563 ห้องปฏิบัติการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์

PQ, DQ, CQ และ MQ ในผักและผลไม้ และได้ผ่านการรับรองความสามารถห้องปฏิบัติการระบบคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2017 จึงได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อรองรับข้อกำหนดตามกฎหมาย โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์สารกลุ่มควอตในเนื้อสัตว์ นม และไข่ได้จากการสกัดในคราวเดียวกัน

## วัสดุและวิธีการ

### สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: methanol (MeOH), HPLC grade รุ่น I1107807034 (Supelco, Germany), acetonitrile (ACN) HPLC grade รุ่น K52651891034 (Supelco, China), ammonium formate, (NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>), AR grade รุ่น 102315819 (Sigma-Aldrich, India), formic acid (HCOOH), AR grade, รุ่น K34234564503 (Merck, Germany) สารละลาย acidified methanol เตรียมโดยการปิเปต formic acid 1.0 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มี MeOH และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย MeOH, mobile phase 20 มิลลิโมลาร์ ส่วน ammonium formate pH 3 เตรียมโดยการชั่ง ammonium formate 1.261 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เติม formic acid 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น, 0.5% v/v formic acid ใน ACN และ 0.5% v/v formic acid ในน้ำ

สารมาตรฐาน: สารมาตรฐานทั้งหมดเป็นชนิดเดี่ยว ในรูปเกลือ (single standard) paraquat dichloride ความบริสุทธิ์ 81.57% ค่าความไม่แน่นอน 1.63%, diquat dibromide ความบริสุทธิ์ 94.37% ค่าความไม่แน่นอน 1.60%, chlormequat chloride ความบริสุทธิ์ 98.19% ค่าความไม่แน่นอน 2.33% และ mepiquat chloride ความบริสุทธิ์ 99.20% ค่าความไม่แน่นอน 2.00% (Dr. Ehrenstorfer, Germany) ผ่านการรับรองมาตรฐานตามระบบคุณภาพ ISO 17034 ซึ่งเป็น reference material certificate เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานชนิดละประมาณ 0.01 กรัม ลงใน volumetric flask ชนิดพลาสติก ขนาด 10 มิลลิลิตร นำมาละลายใน MeOH และคำนวณความเข้มข้นให้อยู่

ในรูป paraquat cation, diquat cation, chlormequat cation และ mepiquat cation ก่อนนำไปวิเคราะห์ เช่น paraquat dichloride มี molecular weight เท่ากับ 257.16 กรัมต่อโมล แต่น้ำหนักจริงที่นำมาคำนวณเท่ากับ 186.3 กรัมต่อโมล (molecular weight ของ paraquat cation ที่หักลบ dichloride แล้ว) โดย stock standard แต่ละชนิด มีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

### เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง HPLC รุ่น 1260 series (Agilent, Singapore), เครื่อง MS/MS รุ่น 5500 QTRAP (AB SCIEX, Singapore), analytical column ขนาด 2.1 × 150 มิลลิเมตร, 3 ไมครอน (Atlantis<sup>®</sup> HILIC Silica รุ่น 1911068BF0362110141, Water<sup>™</sup>, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม รุ่น LP 620 S (Sartorius, Germany), เครื่องชั่งความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม รุ่น MC 210 S (Sartorius, Germany), เครื่องปั่นตกตะกอน รุ่น Multifuge X Pro Series (Thermo Scientific, Germany) ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที, เครื่องระเหยแบบ heating block รุ่น 18790 (Pierce, USA), แก๊สไนโตรเจน ความบริสุทธิ์ 99.95%, เครื่องหมุนปั่นสารละลาย Vortex Genie 2 รุ่น G560E (Scientific, USA), volumetric flask ชนิด polypropylene ขนาด 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร, screw cap centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, micro-spin filters ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมครอน รุ่น 3883 (Vertical, Thailand), vial สีชา ชนิด polypropylene ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, syringe ขนาด 6 มิลลิลิตร พร้อม SPE adapter และ volumetric flask ชนิดพลาสติก ขนาด 10, 25 และ 50 มิลลิลิตร

### ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยใช้น้ำเนื้อหมูเป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ นมโคเป็นตัวแทนของตัวอย่างนม และไข่ไก่เป็นตัวแทนของตัวอย่างไข่ วิธีการเตรียมตัวอย่างโดยนำเนื้อหมูจากฟาร์มที่ได้รับรองมาตรฐานการผลิตจากกรมปศุสัตว์

จำนวน 8 ตัวอย่าง ละ 500 กรัม เป็นส่วนผสมเนื้อแดง นำมาหั่นและบดปั่นรวมกัน ซึ่งตัวอย่างใส่ในขวดตัวอย่าง ขวดละ 5 กรัม นมโคชนิด ยู เอช ที ี่ห่อต่างๆ จำนวน 8 ตัวอย่าง ละ ประมาณ 500 มิลลิลิตร นำมาผสมรวมกัน ซึ่งตัวอย่างใส่ในขวดตัวอย่าง ขวดละ 5 กรัม และไข่ไก่จากฟาร์มที่ได้รับรองมาตรฐานการผลิตจากกรมปศุสัตว์ จำนวน 8 ตัวอย่าง ละ 6 ฟอง ตอกไข่รวมกันทั้งไข่ขาวและไข่แดง ซึ่งตัวอย่างใส่ในขวดตัวอย่าง ขวดละ 5 กรัม สำหรับทดสอบความใช้ได้ของวิธี

### วิธีวิเคราะห์

#### การสกัด

วิธีที่นำมาทดสอบเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Korean Journal of Environmental Agriculture, 2020<sup>(10)</sup> เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง นำตัวอย่าง 5 กรัม ไปสกัดโดยเติม 0.5% formic acid ในน้ำ 2 มิลลิลิตร และ 0.5% formic acid ใน ACN 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer นาน 1 นาที ปั่นแบบตกระก่อนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทำให้บริสุทธิ์ด้วย SPE cartridge HLB 200 มิลลิกรัม (Oasis, water) โดยใช้ syringe ชนิดพลาสติก ขนาด 6 มิลลิลิตร พร้อม SPE adapter ล้าง SPE ด้วย 5 มิลลิลิตร 0.5% formic acid ในน้ำ และ 5 มิลลิลิตร 0.5% formic acid ใน ACN จากนั้นนำตัวอย่าง (ส่วนใส) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงใน SPE cartridge HLB 200 มิลลิกรัม กรองผ่าน SPE cartridge โดยใช้ plunger เก็บสารละลายที่ถูกชะลงใน screw cap centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร และชะด้วย 2 มิลลิลิตร ของ 0.5% formic acid ใน ACN เก็บสารละลายที่ถูกชะลงใน screw cap centrifuge tube ชนิด polypropylene ขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนให้เกือบแห้ง ปรับปริมาตรด้วย 0.5% formic acid ใน ACN ให้ได้ 1 มิลลิลิตร โดยใช้ autopipette กรองผ่าน micro-spin filters ชนิด nylon ขนาด 0.2 ไมครอน ปั่นแบบตกระก่อนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายที่กรองได้ใส่ใน vial พลาสติกสีขาว ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

### การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณโดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สภาวะ column oven 35 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 10 ไมโครลิตร mobile phase A:B (20 มิลลิโมลาร์ ammonium formate: ACN)<sup>(13)</sup> ตรวจวัดปริมาณไอออนโดยใช้ multiple reaction monitoring (MRM) รายงานในรูปแบบแคตไอออน (cation) ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณของสารที่ตรวจพบคำนวณจาก standard curve

$$\text{โดย ใช้สมการเส้นตรง} \quad Y = aX + b$$

$$\text{ปริมาณของสารที่ตรวจพบ (mg/kg)} = \frac{(Y-b)}{a}$$

โดย  $X$  = concentration, C (mg/kg)  
 $Y$  = peak area ของสารมาตรฐาน  
 $a$  = slope ของ calibration curve  
 $b$  = intercept ของ calibration curve

### การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

#### การสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

เตรียมสารมาตรฐานผสมของ PQ, DQ, CQ และ MQ 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 1% volume/volume formic acid ใน MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1) จากนั้นฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS สร้าง calibration curve ระหว่าง concentration กับ peak area คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (determination coefficient; R<sup>2</sup>) กำหนดเกณฑ์การยอมรับเป็น: R<sup>2</sup> มากกว่าหรือเท่ากับ 0.99<sup>(14)</sup>

### การทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity)

เป็นการแสดงการแตกตัวเป็นไอออนและค่าพลังงานอิเล็คตรอนของสารมาตรฐาน เพื่อให้เกิดความจำเพาะเจาะจงของสารแต่ละชนิด โดยฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกค่า retention time (RT) วิเคราะห์ matrix blank

โดยพิจารณา chromatogram ของ matrix blank ผลต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT หรือค่ามวลต่อประจุ (mass transition: m/z) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน

#### ผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง (matrix effect: ME)

การประเมินค่า ME คำนวณโดยใช้ค่า %recovery ของสารมาตรฐานจากการเปรียบเทียบความชันของการวิเคราะห์แบบ calibration curve on solvent ที่ระดับความเข้มข้น 10–200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ calibration curve on matrix ใน matrix เนื้อหมู นมโค และไข่ไก่ ที่ระดับความเข้มข้น 10–200 นาโนกรัมต่อกรัม วิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ เกณฑ์การประเมิน %ME, (-20 ถึง 20%) หมายถึง soft, (-50 ถึง -20% และ 20 ถึง 50%) หมายถึง medium และ (> 50% และ < -50%) หมายถึง strong<sup>(15)</sup> คำนวณจากสูตร

$$MF \text{ (matrix factor)} = b \text{ (matrix)} / b \text{ (solvent)}$$

โดย b คือ peak area ของสารมาตรฐาน

$$ME \text{ (\%)} = (MF - 1) \times 100$$

#### การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ลงใน matrix blank ที่ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งเป็นค่ากำหนดตามกฎหมาย (MDL) เป็นระดับที่สามารถตรวจวัดได้ตาม sensitivity ที่เหมาะสมของเครื่องมือ ทำการสกัดและตรวจวิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ หา signal-to-noise (S/N) ของสารแต่ละชนิด คำนวณปริมาณสารมาตรฐานที่ทำให้พีคมีความสูง 3 เท่า (S/N) และคำนวณความเข้มข้นต่อน้ำหนักตัวอย่าง

#### การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ที่ความเข้มข้นประมาณ 2 เท่าของค่า LOD

ลงในตัวอย่าง blank sample ทำการสกัดและวิเคราะห์ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน %recovery เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 60–120% และ %RSD เกณฑ์การยอมรับ  $\leq 20\%$ <sup>(14)</sup>

#### การทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง (accuracy and precision)

ทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ใน spiked sample ที่ระดับ LOQ, 8 × LOQ และ 20 × LOQ ได้แก่ ที่ความเข้มข้น 10, 80 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเทียบกับสารมาตรฐาน %recovery เกณฑ์การยอมรับอยู่ในช่วง 60–120 % และ %RSD เกณฑ์การยอมรับ  $\leq 20\%$ <sup>(14)</sup>

#### ช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (linearity and working range)

วิเคราะห์ matrix blank เติมสารมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ อย่างน้อย 5 ระดับ ภายในช่วงกราฟมาตรฐานที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเส้นตรงวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ตามวิธี สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นที่เติม (x axis) กับค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่ตรวจพบ (y axis) คำนวณค่า R<sup>2</sup> กำหนดเกณฑ์การยอมรับเป็น R<sup>2</sup> มากกว่าหรือเท่ากับ 0.95<sup>(14)</sup>

#### การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ (uncertainty)

ความไม่แน่นอนของการวัดต้องคำนึงถึงแหล่งความไม่แน่นอนทุกแหล่ง ที่มีผลกระทบต่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ เมื่อนำมารวมกันให้คำนวณค่าความไม่แน่นอนขยายที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า k = 2 เป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับและเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน คำนวณปริมาณสารที่วัด โดยใช้ค่าความเข้มข้น (C<sub>0</sub>) ที่อ่านได้จาก calibration curve ที่สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ peak area

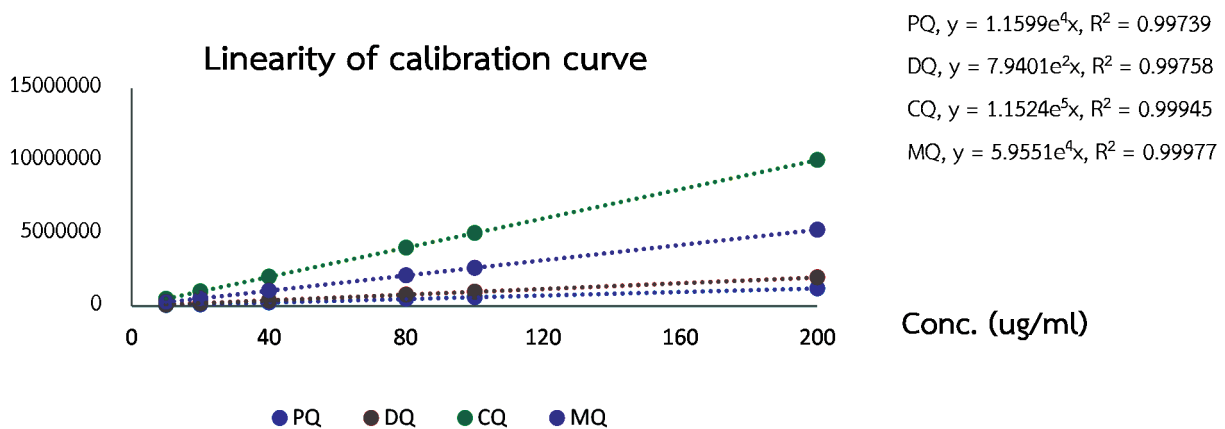
**ผล**

ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยเตรียมสารมาตรฐานผสมของ PQ, DQ, CQ และ MQ 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 5, 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในสารละลาย 1% volume/volume formic acid ใน MeOH:น้ำ (1:1) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS สร้าง calibration curve ระหว่าง concentration กับ peak area คำนวณค่า R<sup>2</sup> มีค่าตั้งแต่ 0.997-0.999 ดังแสดงในภาพที่ 1

ความจำเพาะเจาะจงเป็นการแสดงการแตกตัวเป็นไอออนและค่าพลังงานอิเล็กตรอนของสารมาตรฐาน

แต่ละชนิด ทดสอบโดยฉีดสารมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย 1% volume/volume formic acid ใน MeOH:น้ำ (1:1) จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกค่า retention time (RT) วิเคราะห์ matrix blank โดยพิจารณา chromatogram ของ matrix blank ผลต้องไม่พบสัญญาณที่มีค่า RT และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ตรงกับสารมาตรฐาน โดย PQ, DQ, CQ และ MQ มี RT ที่ 3.0, 2.1, 2.6 และ 2.7 ตามลำดับ PQ จะให้ 1 product ion ที่เกิดจาก 2 precursor ion ส่วน DQ, CQ และ MQ จะให้ 1 product ion ที่เกิดจาก 1 precursor ion ซึ่งค่า m/z เป็นค่าคงที่เสมอ<sup>(13)</sup> ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

**Peak area**



ภาพที่ 1 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารกลุ่มควอต

ตารางที่ 1 Multiple reaction monitoring (MRM) condition ของการวิเคราะห์ PQ, DQ, CQ และ MQ

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
PQ	186.3	171.1 (primary)	80.00	1.69	28.00	11.80
		171.1 (secondary)	156.30	8.00	46.65	8.24
DQ	183.3	168.0 (primary)	81.20	13.10	30.82	10.32
		157.1 (secondary)	81.20	13.10	22.00	9.79
CQ	122.0	58.0 (primary)	148.46	7.07	36.65	7.06

ตารางที่ 1 Multiple reaction monitoring (MRM) condition ของการวิเคราะห์ PQ, DQ, CQ และ MQ (ต่อ)

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
MQ	122.0	63.0 (secondary)	148.46	7.07	27.11	10.40
	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

หมายเหตุ: DP คือ declustering potential, EP คือ entrance potential energy, CE คือ collision energy และ CXP คือ collision cell exit potential

ตารางที่ 2 ค่า retention time (RT) และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของสารมาตรฐาน PQ, DQ, CQ และ MQ

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	RT (min)	Ion Ratio
PQ	186.3	171.1	3.0	0.91
		77.0		
DQ	183.3	168.0	2.6	0.90
		157.1		
CQ	122.0	58.0	2.1	0.96
		63.0		
MQ	114.2	98.0	2.7	0.97
		58.0		

การพิสูจน์ ME โดยการประเมินค่า ME จากค่า %recovery ของสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์แบบ calibration curve on solvent (calibration curve ของ standard ที่เตรียมใน 1% formic acid: น้ำ (1:1) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10–200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ calibration curve on matrix (calibration curve ที่เกิดจากการสกัด matrix เนื้อหมู นมโค และไข่ไก่) ที่ความระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10–200 นาโนกรัมต่อกรัม เกณฑ์การประเมิน %ME, (-20 ถึง 20%) หมายถึง soft, (-50 ถึง -20% และ 20 ถึง 50%) หมายถึง medium และ (> 50% และ < -50%) หมายถึง strong ผลพบว่า %ME อยู่ในเกณฑ์ soft ทุก matrix

การยืนยันค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งเป็นระดับที่สามารถตรวจวัดได้ตาม sensitivity ที่เหมาะสมของเครื่องมือ ซึ่งเป็นค่ากำหนดตามกฎหมาย (MDL) ทำการสกัดและหาค่า S/N ของสารแต่ละชนิด คำนวณปริมาณสารมาตรฐานที่ทำให้พีคมีความสูง 3 เท่า S/N โดย PQ มีค่า S/N อยู่ในช่วงตั้งแต่ 11–19 DQ มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 11–20 CQ มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 460–903 และ MQ มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 274–625 ทั้งนี้ค่า S/N สูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า signal-to-noise (S/N) ที่ระดับ LOD (5 นาโนกรัมต่อกรัม) ของตัวอย่างเนื้อหมู นมโค และไข่ไก่

Compounds	ค่า S/N*		
	เนื้อหมู (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)	นมโค (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)	ไข่ไก่ (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)
PQ	13-21	12-19	11-19
DQ	13-20	11-13	12-17
CQ	570-708	533-903	460-743
MQ	274-448	463-625	414-625

หมายเหตุ: \*เกณฑ์ยอมรับ S/N > 3

ความแม่นยำและความเที่ยงทดสอบโดยการฉีดสารมาตรฐานผสม PQ, DQ, CQ และ MQ ใน (spiked sample) ที่ระดับ LOQ, 8 × LOQ และ 20 × LOQ ได้แก่ ความเข้มข้น 10, 80 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม

ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ที่ระดับละ 10 ซ้ำ คำนวณปริมาณเทียบกับกราฟของสารมาตรฐานแล้วคำนวณ %recovery %RSD เกณฑ์ยอมรับโดย mean recovery อยู่ในช่วง 64.8-108.6% เกณฑ์ยอมรับ %RSD อยู่ในช่วง 2.1-13.0% ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงที่ระดับ LOQ (10 นาโนกรัมต่อกรัม) 8 × LOQ (80 นาโนกรัมต่อกรัม) และ 20 × LOQ (200 นาโนกรัมต่อกรัม)

Compounds	Spiked level (ng/g)	เนื้อหมู		นมโค		ไข่ไก่	
		%recovery*	%RSD*	%recovery*	%RSD*	%recovery*	%RSD*
PQ	10	80.0	12.2	101.7	7.9	100.6	9.6
	80	99.6	13.0	101.1	7.48	100.8	13.0
	200	93.9	12.8	105.2	7.19	94.9	12.3
DQ	10	64.8	3.9	91.9	12.9	103.6	12.1
	80	106.3	6.9	107.4	4.9	98.6	7.5
	200	104.7	8.8	97.2	10.8	92.6	11.0
CQ	10	98.0	5.3	100.5	11.6	103.0	10.9
	80	99.9	8.6	100.2	4.9	108.6	3.3
	200	104.5	2.6	94.5	7.8	98.4	3.5
MQ	10	85.8	4.7	102.1	12.4	103.2	11.6
	80	106.3	2.1	94.7	9.1	105.2	2.0
	200	101.8	3.6	95.9	10.7	100.6	4.6

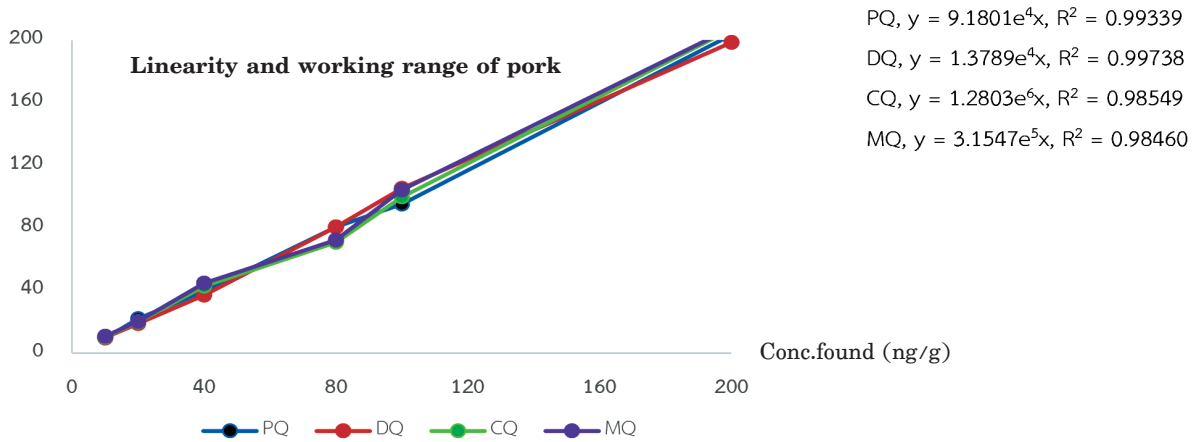
หมายเหตุ: \*เกณฑ์การยอมรับ %recovery = 60-120%, %RSD ≤ 20%<sup>(14)</sup>



ช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงใน matrix blank ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ภายในช่วงกราฟมาตรฐานที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นเส้นตรง ทำการสกัดและวิเคราะห์ระดับละ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความ

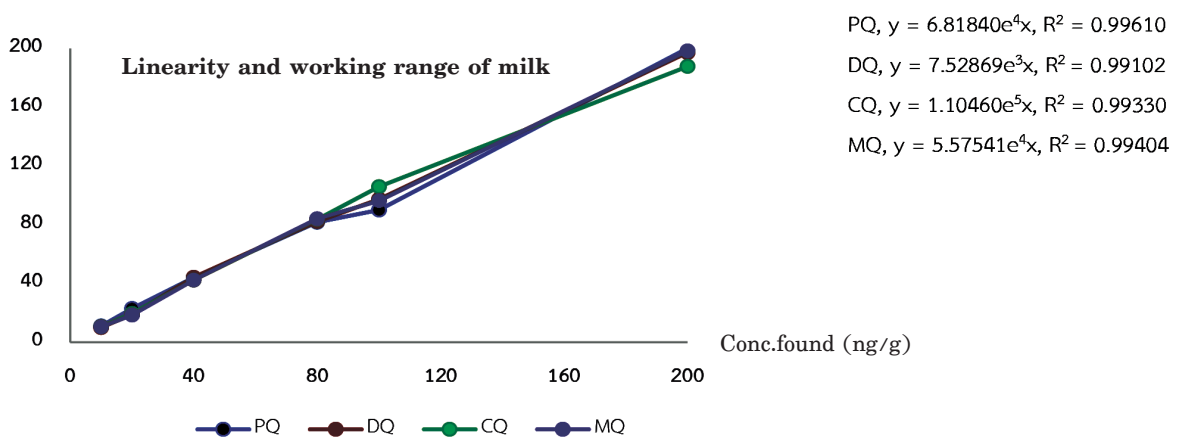
เข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ตรวจพบ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ( $R^2$ ) โดยมีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.985-0.997 ความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ที่อยู่ในช่วง 10-200 นาโนกรัมต่อกรัม ดังแสดงในภาพที่ 2, 3 และ 4

Conc spiked (ng/g)



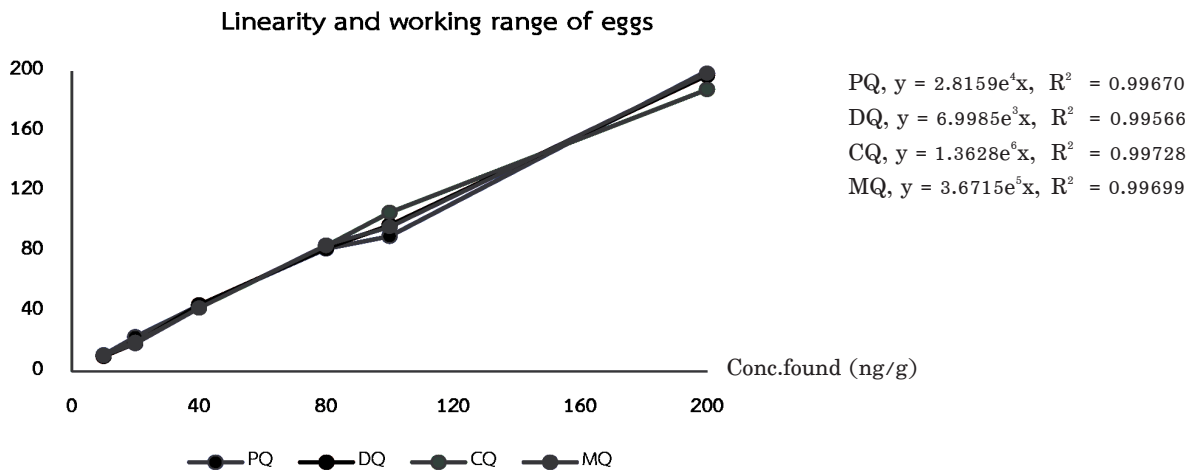
ภาพที่ 2 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์เนื้อหมู

Conc spiked (ng/g)



ภาพที่ 3 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์นมโค

Conc spiked (ng/g)

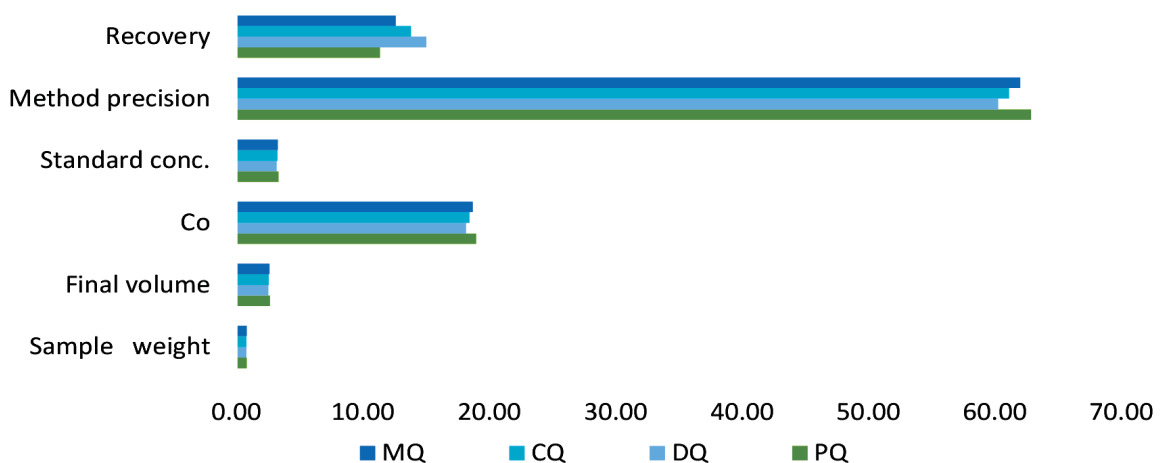


ภาพที่ 4 ช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์ไข่ไก่

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์ แสดงให้เห็นถึงสายโซ่การสอบกลับได้ของการวัด ได้พิจารณาแหล่งความไม่แน่นอนที่จะมีผลกระทบต่อ การตรวจวิเคราะห์<sup>(16)</sup> ได้แก่ ความไม่แน่นอนจากค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน ความเที่ยงของวิธีเมื่อทำซ้ำ รวมไปถึงประสิทธิภาพของวิธีที่ทำให้เกิด bias เมื่อนำค่าความ

ไม่แน่นอนของการตรวจวิเคราะห์เนื้อหมูที่เดิมสารมาตรฐานกลุ่มควอตที่ระดับ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ โดยมีค่าความไม่แน่นอนที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และสัดส่วนของแหล่งความไม่แน่นอนที่สำคัญที่มีผลต่อการตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่มาจาก method precision รองลงมา คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่อ่านได้จาก calibration curve สารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 5

### Relative standard uncertainty of quats in pork (%)



ภาพที่ 5 relative standard uncertainty contributions ของสารกลุ่มควอตในเนื้อหมู

หลังจากพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์และนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ ในโครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับจากการบริโภค ปี พ.ศ. 2565 (total diet study) โดยเก็บตัวอย่างอาหารประเภทเนื้อสัตว์ นม และไข่ จากตลาดค้าส่งหรือศูนย์กระจายสินค้าในแต่ละภาค ๆ ละ 2 จังหวัด รวม 8 จังหวัด

จำนวน 29 ตัวอย่าง รายละเอียดและวิธีการจัดการตัวอย่าง โครงการประเมินความเสี่ยงการได้รับสัมผัสสารเคมีและสารปนเปื้อนที่คนไทยได้รับจากการบริโภค ระบุไว้ในรายงานประจำปี 2565 ของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์<sup>(17)</sup> ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่พบการตกค้างของสารกลุ่มควอตในทุกตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์การตกค้างของสารกลุ่มควอตในตัวอย่าง total diet study ในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 29 ตัวอย่าง

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณที่ตรวจพบ (mg/kg)			
	PQ	DQ	CQ	MQ
1. เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ (23 ตัวอย่าง) เนื้อไก่, ลูกชิ้นไก่, ไส้กรอกไก่, ตับไก่, เนื้อหมู, ลูกชิ้นหมู, หมูแป้ง, ไส้กรอกหมู, หมูยอ, ตับหมู, ลูกชิ้นเนื้อ, เนื้อวัว/เนื้อควาย, ปลานิล/ปลาทับทิม, ปลาช่อน, ปลาดุก, ปลาน้ำจืดตากแห้ง, กุ้งน้ำจืด, ปลาทะเล, กุ้งทะเล, ปลาหมึก, ลูกชิ้นปลา, ปลากระป๋อง, หอยแครง/หอยแมลงภู่	ND	ND	ND	ND
2. นม (4 ตัวอย่าง) นมโค, นมถั่วเหลือง, นมเปรี้ยว, นมปรุงแต่งพร้อมดื่ม	ND	ND	ND	ND
3. ไข่ (2 ตัวอย่าง) ไข่ไก่, ไข่เป็ด	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND = not detected

## วิจารณ์

ตามระบบคุณภาพมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2017<sup>(18)</sup> กำหนดว่า วิธีการทดสอบต้องผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีครั้งนี้ใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ ใช้นมโคเป็นตัวแทนของตัวอย่างนม และไข่ไข่ไก่เป็นตัวแทนของตัวอย่างไข่ เนื่องจากมีอัตราการบริโภคของคนไทยในปริมาณที่สูง<sup>(19)</sup> ถึงแม้ว่าเนื้อไก่จะมีอัตราการบริโภคที่สูงไม่ต่างจากเนื้อหมู แต่เนื้อไก่มีปริมาณไขมันสูงกว่าเนื้อหมู<sup>(20)</sup> ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีของสารกลุ่มควอตที่ไม่ละลายในไขมันเนื่องจากแคทไอออน จึงเลือกใช้เนื้อหมูซึ่งมีไขมันระดับกลาง

ประกอบกับปริมาณไขมันในเนื้อหมูจะไม่รบกวนการวิเคราะห์เท่ากับเนื้อไก่ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) SPE cartridge และเนื้อหมูสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า ตาม CXG 40-1993 (codex guideline)<sup>(21)</sup> ในการกำหนดชนิดของอาหารเพื่อเป็นตัวแทนกลุ่มอาหาร (representative matrix) ตามความเหมาะสม โดยทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็น representative commodity (species) 1 ชนิด เป็นอย่างน้อย ใน 1 commodity categories (class) ซึ่งเนื้อหมูและเนื้อไก่จัดอยู่ใน class เดียวกัน จึงเลือกใช้เนื้อหมูเป็นตัวแทนของตัวอย่างเนื้อสัตว์ เมื่อทดสอบ

ประสิทธิภาพการสกัดในตัวอย่างเนื้อไก่ พบว่า %recovery ผ่านเกณฑ์ยอมรับ จากการศึกษาค่าความจำเพาะเจาะจงของวิธี PQ ให้ product ion ที่เกิดจาก 2 precursor ion ส่วน DQ, CQ และ MQ product ion จะเกิดจาก 1 precursor ion เท่านั้น ซึ่งสัดส่วนของมวลต่อประจุของ precursor ion และมวลต่อประจุของ product ion เป็นค่าคงที่เสมอ การวิเคราะห์ calibration curve ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน มีค่า  $R^2$  อยู่ในช่วง 0.997–0.999 และความเป็นเส้นตรงของช่วงการวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อกรัม ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างผ่านกระบวนการสกัดและคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่ตรวจพบ มีค่า  $R^2$  อยู่ในช่วง 0.985–0.997 ซึ่งคุณลักษณะและคุณสมบัติอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตาม pesticide analytical guideline ของสหภาพยุโรป SANTE/11312/2021<sup>(14)</sup> สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้ และ calibration curve ที่ใช้เป็น calibration curve on solvent ซึ่งไม่มีผลกระทบจากคุณสมบัติของเนื้อตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบความชันกับ calibration curve on matrix ของเนื้อหมู นมโค และไข่ไก่ พบว่า %ME อยู่ในเกณฑ์ soft ในความยากของวิธี จึงตัดแปลงขั้นตอนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ โดยการปรับใช้ HLB SPE cartridge จากขนาดความจุ 500 มิลลิกรัม เป็นขนาดความจุ 200 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรสารที่ใช้ในการสกัดจาก 20 มิลลิลิตร เป็น 10 มิลลิลิตร และปริมาตรสารละลายที่ใช้ชะจาก 12.5 มิลลิลิตร เป็น 10 มิลลิลิตร เพื่อให้เหมาะสมกับความจุของ HLB SPE cartridge ขนาด 200 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นวัสดุวิทยาศาสตร์ที่มีในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยปรับความเร็วรอบในการ centrifuge จาก 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เป็นความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกสารสกัดกับเนื้อตัวอย่างได้ชัดเจน มีความใสมากขึ้น และง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ ใช้ syringe plunger พร้อม SPE adapter ต่อกับ HLB SPE cartridge ในการทำให้บริสุทธิ์ แทน

การใช้ชุดกรองแบบ manifold pressure และปรับสภาวะของเครื่อง LC-MS/MS ตามที่ได้กล่าวในส่วนของวัสดุและวิธีการ แต่ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS คือ 1 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน และประสิทธิภาพการสกัด %recovery อยู่ในช่วง 60–120% ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบประสิทธิภาพวิธี ขั้นตอนการสกัดหลังจากปั่นแบบตกตะกอน พบว่าตัวอย่างนมโคและไข่ไก่ให้สารสกัด ลักษณะใสกว่าตัวอย่างเนื้อหมู เนื่องจากนมโคและไข่ไก่มีลักษณะเป็นของเหลว ขั้นตอนการสกัดเมื่อมีน้ำเป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง จะทำให้การสกัด analyte ออกมาได้ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่มีน้ำ<sup>(13)</sup> ก่อนการสกัดเติม 0.5% formic ในน้ำ ลงไปในตัวอย่างก่อนการสกัดทำให้ประสิทธิภาพการสกัดดีกว่าสารมาตรฐานที่ใช้เป็นเกลือของสารในกลุ่มควอต เช่น พาราควอตไดคลอไรด์ ซึ่งเป็นวัตถุอันตรายทางการเกษตร แต่ชนิดสารที่ออกฤทธิ์ คือ พาราควอต แคทไอออน<sup>(22)</sup> ดังนั้นในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ต้องคำนวณความเข้มข้นให้อยู่ในรูปพาราควอตแคทไอออนก่อนนำไปวิเคราะห์และเตรียมในภาชนะบรรจุชนิดพลาสติกทั้งหมด<sup>(13)</sup> เนื่องจากสารในกลุ่มควอตจะทำปฏิกิริยากับกับผิวของภาชนะบรรจุที่เป็นแก้ว ในการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ แสดงตัวอย่างการประมาณค่าความไม่แน่นอนเฉพาะการวิเคราะห์เนื้อหมูที่เติมสารมาตรฐานกลุ่มควอตที่ระดับ 0.1 นาโนกรัมต่อกรัม ทำการวิเคราะห์ 10 ซ้ำ เท่านั้น ส่วนตัวอย่างนมโคและไข่ไก่ สัดส่วนของแหล่งความไม่แน่นอนสามารถประมาณค่าและคำนวณได้เช่นเดียวกับการตรวจวิเคราะห์เนื้อหมูที่ระดับความเข้มข้น 95%

วิธีการสกัดตัวอย่างที่พัฒนานี้สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ PQ, CQ และ MQ ในเนื้อสัตว์ นม และไข่โดยเทคนิค LC-MS/MS ที่สอดคล้องตามข้อกำหนดในพระราชบัญญัติอาหาร เพื่อเฝ้าระวังการตกค้างของสารดังกล่าวในอาหารในประเทศได้ ยกเว้นการตรวจวิเคราะห์ DQ ที่ค่ากำหนดของ codex ในนม มีค่าเท่ากับ 0.001 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แม้ว่าวิธีที่พัฒนาจะไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในระดับที่กำหนด แต่ถ้าตรวจพบการตกค้างของ DQ ในนม ที่ระดับ 0.005 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามวิธี ถือว่าตรวจพบการตกค้างเกินกว่ากฎหมายกำหนด



- <http://lib1.dss.go.th/5datasci/index.php/th/standard-rules/2020-09-29-09-53-26/158-paraquat-057>.
- คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ศูนย์พิษวิทยารามาธิบดี. ภาวะเป็นพิษจาก paraquat. [ออนไลน์]. [สืบค้น 23 ก.ย. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.rama.mahidol.ac.th/poisoncenter/th/pois-cov/PQ>.
  - Gawarammana IB, Buckley NA. Medical management of paraquat ingestion. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 72(5): 745-57.
  - ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม เรื่อง บัญชีรายชื่อวัตถุอันตราย ฉบับที่ 6 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 117 ง (วันที่ 19 พฤษภาคม 2563).
  - ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 419 (พ.ศ. 2563) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง (ฉบับที่ 3). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 257 ง (วันที่ 2 พฤศจิกายน 2563).
  - Codex Alimentarius International Food Standard. Codex pesticides residues in food online database. [online]. 2021; [cited 2022 Sep 23]; [1 screen]. Available from: URL: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/en/>.
  - European Commission (EURL-SRM). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement. Food of Animal Origin (QuPpe-AO-Method). [online]. 2021; [cited 2022 Oct 1]; [87 screens]. Available from: URL: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm\\_meth\\_QuPpe\\_PO\\_V11\\_1.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V11_1.pdf).
  - Gao L, Yuan H, Xu E, Liu J. Toxicology of paraquat and pharmacology of the protective effect of 5-hydroxy-1-methylhydantoin on lung injury caused by paraquat based on metabolomics. *Sci Rep* 2020; 10: 1790. (16 pages).
  - Cho IK, Rahman M, Seol JU, Noh HH, Jo HW, Moon JK. Development of a simultaneous, analytical method for diquat, paraquat and chlormequat in animal products using UPLC-MS/MS. *Korean J Environ Agric* 2020; 39(4): 368-74.
  - Zhang C, Cui F, Zeng GM, Jiang M, Yang ZZ, Yu ZG, et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Sci Total Environ* 2015; 518-519: 352-62.
  - ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 387 (พ.ศ. 2560) เรื่อง อาหารที่มีสารพิษตกค้าง. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 134 ตอนพิเศษ 228 ง (วันที่ 18 กันยายน 2560).
  - European Commission (EURL-SRM). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food involving extraction with acidified methanol and LC-MS/MS measurement I. Food of Plant Origin (QuPpe-PO-Method). [online]. 2019; [cited 2022 Oct 1]; [86 screens]. Available from: URL: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm\\_meth\\_QuPpe\\_PO\\_V11.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/EurlSrm_meth_QuPpe_PO_V11.pdf).
  - EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. *SANTE* 2021; 11312: 1-55.
  - Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 2011; 1218(42): 7634-9.
  - Williams A, Ellison SL, Rosslein M. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2<sup>nd</sup> ed. United Kingdom: EURACHEM/CITAC; 2000.
  - สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. รายงานประจำปี 2565 สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2565.
  - ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration

- laboratories. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2017.
19. สำนักงานมาตรฐานสินค้าและระบบคุณภาพ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. ข้อมูลการบริโภคอาหารของประเทศไทย. [ออนไลน์]. 2549; [สืบค้น 23 ก.ย. 2565]; เข้าถึงได้ที่: URL: [https://dol.thaihealth.or.th/resourcecenter/sites/default/files/documents/1\\_451.pdf?download](https://dol.thaihealth.or.th/resourcecenter/sites/default/files/documents/1_451.pdf?download).
  20. สำนักโภชนาการ กรมอนามัย. ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไทย. นนทบุรี: กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
  21. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis CXG 40-1993. Rome, Italy: Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR); 2010.
  22. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9002-2559. สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์; 2559.
-

---

# Analytical Method Development of Paraquat, Diquat, Chlormequat and Mepiquat in Meat, Milk and Eggs by LC-MS/MS

---

**Rattiyakorn Srikote Phornphan Songsri and Nichanan Boonnim**

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

**ABSTRACT** Paraquat is a type 4 hazardous substance that has been banned for manufacturing, import, export, transit, or possession according to the Notification of the Ministry of Industry No. 6 (B.E. 2563) Re: List of Hazardous Substances. Additionally, the Notification of the Ministry of Public Health No. 419 (B.E. 2563) Re: Food Containing Pesticide Residues indicates the criteria for regulating paraquat level in meat, milk and eggs that the analytical method used for detection must have a minimum detection limit of 0.005 mg/kg. Based on these notifications, an efficient laboratory was developed using LC-MS/MS to simultaneously determine paraquat and three quats; diquat, chlormequat and mepiquat in meat, milk and eggs. Samples were extracted using acidic acetonitrile, centrifuged, purified through hydrophilic-lipophilic-balanced (HLB) SPE cartridge and quantify using multiple reaction monitoring (MRM). The method had a limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.005 mg/kg and 0.01 mg/kg, respectively, with a linearity range of 0.01–0.20 mg/kg and accuracy (%recovery) at 64.8–108.6 and precision (%RSD) at 2.1–13.0. This method was used to analyze 29 food samples and it was found no quat residues. Therefore, this developed method is effective for determining quat residues in meat, milk, and eggs and suitable for monitoring quat residues in food regulations.

**Keywords:** Quats, Meat, Milk, Eggs, LC-MS/MS