การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารที่ยากต่อการวิเคราะห์

Development of Sample Preparation for Pesticide Residues Analysis in Difficult Food Matrices

ธรณิศวร์ ไชยมงคล* และ วีรวุฒิ วิทยานันท์

Thoranit Chaimongkol* and Weerawut Wittayanan

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences

Received : 11 June 2018

Accepted : 1 October 2018

Published online : 2 October 2018

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักผลไม้โดยวิธี QuEChERS ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่เร็ว ง่าย ประหยัด และมีประสิทธิภาพ แต่เมื่อใช้วิธีดังกล่าวกับผักผลไม้บางชนิด ได้แก่ พืชสกุล *Allium* ซึ่งมีกำมะถันสูง เช่น หอมหัวใหญ่ กระเทียม พืชที่มีรงควัตถุสูง เช่น แครอท และพืชที่มีไขมันสูง เช่น อะโวคาโด พบว่ามีปัญหาการเกิดสัญญาณสารรบกวนในการตรวจวัด ทำให้การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณมีข้อผิดพลาด จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาการเตรียมตัวอย่าง ปรับปรุงให้ได้วิธีที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสกัดที่สะอาด โดยทดลองใช้การเตรียมตัวอย่างและการทำให้บริสุทธิ์หลายวิธี ทดลองใช้ dispersive SPE (d-SPE) หลายชนิด เพื่อกำจัดสารสกัดร่วมและให้ได้สัญญาณรบกวนน้อยที่สุด ผลพบว่าในการสกัดผักสกุล *Allium* หอมหัวใหญ่และกระเทียม ต้องทำการปั่นตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งแล้วกับกรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 โดยน้ำหนักก่อนทำการสกัด สำหรับ แครอท และอะโวคาโด สกัดตามวิธีมาตรฐาน แล้วใช้ d-SPE ที่มีส่วนผสมของ $MgSO_4$, PSA, GCB และ C18 ในการทำให้บริสุทธิ์สามารถกำจัดสิ่งรบกวนออกจากสารสกัดได้ดีที่สุด นำวิธีที่ได้ไปประเมินประสิทธิภาพโดยเปรียบเทียบการคืนกลับและความสามารถในการวัดซ้ำกับวิธี U.S. FDA PAM 302 ตรวจวัดด้วยเครื่องมือ GC-ECD และ GC-FPD โดยเลือกสารกำจัดศัตรูพืช 3 ชนิดที่มีความถี่ในการตรวจพบการตกค้างสูง เป็นตัวแทนของสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัส และสารสังเคราะห์ไพริทรอยด์ ได้แก่ trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos และ cypermethrin ตามลำดับ ผลแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นให้การคืนกลับและค่า RSD ของสารทั้งสามชนิดที่ระดับความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็น 63.7-119.6% และ 0.8-19.8% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในงานประจำในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในผักผลไม้ที่มีคุณสมบัติเหล่านี้ได้เป็นไปตามวัตถุประสงค์

คำสำคัญ : การเตรียมตัวอย่าง, ผักผลไม้, สารกำจัดศัตรูพืช, QuEChERS

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

Abstract

QuEChERS method has been widely used for pesticide residues analysis in fruits and vegetables because it is found to be quick, easy, cheap and effective. But some fruits and vegetables such as onion, garlic, carrot, and avocado which are complex matrices can cause some particular difficulties for instrumental determination. This article describes the development of extraction and cleanup step of representative pesticides i.e, trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos and cypermethrin in complex matrices sample. For extraction, the main factors (sulfur-containing compounds, pigment and oil) were studied and optimized in experiments to maximize analyze recoveries. Various sample preparation procedures and d-SPE with different sorbents were also investigated to minimize co-extractives and interferences. As the result, in *Allium* plant, the use of 3% aqueous phosphoric acid blended with frozen samples prior to extraction step was required and for carrot and avocado were treated by standard method. For all commodities, the mixture of $MgSO_4$, PSA, GCB and C18 showed to be much more efficient to remove interferences than the original method. The final selected method was evaluated and compared with U.S. FDA PAM 302 method using both detection techniques (GC-ECD and GC-FPD). The results demonstrated that the method achieved acceptable recoveries of 63.7-119.6% with RSD of 0.8-19.8% at 0.2 mg/kg. This method can be applied for routine analysis of these pesticide residues in onion, garlic carrot and avocado.

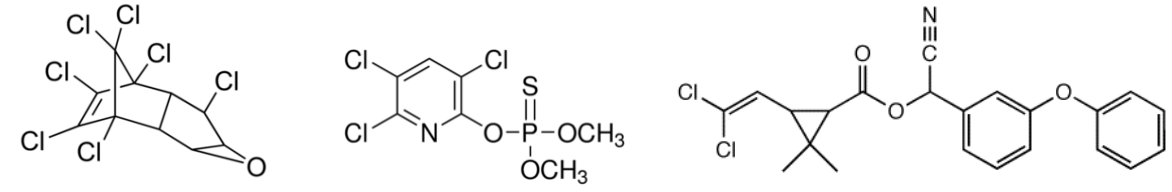
Keywords : sample preparation, fruits and vegetables, pesticide residues, QuEChERS

บทนำ

การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในอาหารนั้นถือเป็นความท้าทายของกระบวนการทำให้อาหารปลอดภัยสำหรับการบริโภค เนื่องจากต้องตรวจหาการตกค้างในปริมาณต่ำ (residue) และตรวจวัดได้ยาก ประกอบกับอาหารถือเป็น matrix ที่มีสารรบกวนปริมาณมากยากต่อการกำจัด การบริโภคอาหารที่ปลอดภัยจากการตกค้างของสารเคมีอันตรายถือเป็นภารกิจหนึ่งของกระทรวงสาธารณสุข โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่สามารถครอบคลุมสารที่มีคุณสมบัติจากเคมีที่หลากหลายในตัวอย่างอาหารชนิดที่คนไทยนิยมบริโภค การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชโดยทั่วไปเป็นการวิเคราะห์แบบ multiresidue วิเคราะห์สารหลายชนิดพร้อมกัน เช่น การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) ที่ Anastasiades เป็นผู้เสนอขึ้นในปี 2003 (Anastassiades *et al*., 2003) และได้เป็นวิธีมาตรฐานของ AOAC (Gaithersburg, 2007) และถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง (Wilkowska & Biziuk, 2011) ในการสกัดสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักและผลไม้ที่มีความชื้นสูง มีไขมันต่ำและสารรบกวนอื่นน้อย เป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายอะซิโตไนไตรล์ (MeCN) และใช้เกลือบางชนิดเป็นตัวสกัดแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย dispersive solid phase extraction (d-SPE) ปัจจุบันวิธีดังกล่าวได้ถูกปรับปรุงให้ใช้กับตัวอย่างที่มีความหลากหลายมากขึ้น เช่น ตัวอย่างที่มีความชื้นต่ำ ตัวอย่างที่มีไขมันสูง และยังสามารถใช้สกัดสารสนใจกลุ่มอื่นๆ นอกเหนือจากสารกำจัดศัตรูพืชได้อีกด้วย สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้นำวิธีนี้มาปรับปรุงและพัฒนาให้ใช้ในงานวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC amiable) ได้แก่กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine compounds, OCs) กลุ่มอร์กาโนฟอสฟอรัส (oranophophorus compounds, OPs) และกลุ่มสารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (synthetic pyrethroids, SPs) ใน

งานบริการและได้รับการรับรองคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025: 2005 (Wittayanan *et al*., 2017) อย่างไรก็ตาม ยังประสบปัญหาจากการพบสารรบกวนเป็นจำนวนมากในผักผลไม้บางชนิด เช่น พืชสกุล *Allium* มีสารที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ หอมหัวใหญ่ กระเทียม และต้นหอมญี่ปุ่น ส่วนแครอทมีรงควัตถุสูง และอะโวคาโดเป็นผลไม้ที่มีไขมันสูง วิธีนี้ไม่สามารถกำจัด co-extractive ออกจากสารสกัดดังกล่าวได้ สารรบกวนในพืชเหล่านี้จะทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารสนใจและความสามารถในการตรวจวัดของเครื่องมือลดลง และยังทำให้การวิเคราะห์ peak ของสารกำจัดศัตรูพืชทำได้ยาก สำหรับวิธี AOAC 2007.01 นั้น ใช้เครื่องมือตรวจวัดที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงคือเครื่อง GC-MS สารรบกวนจากพืชสกุล *Allium* และแครอท จึงไม่เป็นอุปสรรค แต่ในเครื่อง GC-ECD ซึ่งเป็น universal detector จะตรวจจับสารได้จำนวนมากและรบกวนระบบวิเคราะห์ได้ เพื่อแก้ไขปัญหานี้จึงมีความพยายามพัฒนาการเตรียมตัวอย่าง เช่น การใช้สารสกัดที่ไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ (clean up) ฉีดเข้าเครื่อง GC แล้วใช้ backflush mode เพื่อกำจัดสารรบกวน (interferences) (Norli *et al*., 2016) การเปลี่ยนไปใช้เอธิล อะซีเตต (ethyl acetate) ในการสกัดแทนอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) (Rahman *et al*., 2013) แต่วิธีเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดและยังไม่สามารถกำจัดสารรบกวนได้ อีกหนึ่งปัญหาสำคัญคืออาหารที่มีไขมันสูง มีรายงานการนำไขมันออกจากตัวอย่างที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์และผลไม้ไขมันสูง (Wittayanan & Chaimongkol, 2018; Chamkasem *et al*., 2013) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ครอบคลุมสารที่ละลายได้ดีในไขมัน เช่น สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (OCs)

จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างให้มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการวิเคราะห์ ต้องพบสารรบกวนในเครื่อง GC-ECD และ GC-FPD น้อยที่สุด โดยทดลองใช้การเตรียมตัวอย่างหลายวิธีและทดลองใช้ d-SPE หลายชนิด เพื่อกำจัดสารสกัดร่วมจากผักผลไม้ ได้แก่ หอมหัวใหญ่ กระเทียม แครอท และอะโวคาโด ให้ได้สัญญาณรบกวนน้อยที่สุด และต้องไม่รบกวนสัญญานของสารสนใจ เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมแล้วทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี โดยการทดสอบความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) เลือกทดสอบสารกำจัดศัตรูพืช 3 ชนิดที่มีความถี่ในการตรวจพบการตกค้างสูง เป็นตัวแทนของสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัส และสารสังเคราะห์ไพริทรอยด์ ได้แก่ trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos และ cypermethrin ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 ที่ต้องอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานที่กำหนด วิธีที่พัฒนาขึ้นจะถูกใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับงานบริการในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบความปลอดภัยอาหารตามมาตรฐานของประเทศต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos และ cypermethrin

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมี: กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid, AR) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Mallinckrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา, กรดน้ำส้ม (glacial acetic acid, AR), โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรต (sodium acetate trihydrate) และ อลูมิเนียม ออกไซด์ (aluminium oxide 90 active neutral, alumina) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Merck ประเทศเยอรมนี, อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile,

HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของ J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา, แมกนีเซียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (magnesium sulfate anhydrous) และ florisil™ (ชั่ง 4 กรัมในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตรปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์อบที่อุณหภูมิ 130°C อย่างน้อย 16 ชั่วโมงก่อนใช้งาน) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich ประเทศญี่ปุ่น, Dispersive SPE 2ml, Pigment Sample, AOAC (d-SPE, carb) และ Dispersive SPE 2ml, Fat + Pigments, AOAC (d-SPE, C18) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Agilent Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา, เอธิล อะซีเตต (ethyl acetate, HPLC) และ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane, HPLC) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Burdick & Jackson ประเทศเกาหลี, โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, AR) (สำหรับเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว) และ โซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัส (sodium sulfate anhydrous, granular AR) (เผาที่อุณหภูมิ 600°C อย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วเก็บในภาชนะแก้วสีชาปิดสนิท) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Fisher Chemical ประเทศอินเดีย, นอร์มัลเฮกเซน (n-hexane, PR) และ แอซีโทน (acetone, AR) เป็นผลิตภัณฑ์ของ RCILabscan ประเทศไทย และน้ำกลั่นหรือน้ำ reverse osmosis (RO)

สารมาตรฐาน (Standards): สารกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos และ cypermethrin เป็นผลิตภัณฑ์ของ Dr. Ehrenstorfer บริษัท Dr. Ehrenstorfer GmbH ประเทศเยอรมนี ความบริสุทธิ์ (purity) ระหว่าง 98.5-99.0% การเตรียมสารละลายมาตรฐาน (stock solution) เตรียมสารละลายผสมความเข้มข้นประมาณ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแอซีโทน (acetone) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิน้อยกว่า -4°C

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องบดปั่นอาหาร (blender, Warning Commercial Model: HGTWT) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง สำหรับชั่งตัวอย่าง และ 5 ตำแหน่งสำหรับชั่งสารมาตรฐาน เครื่องผสมสาร (homogenizer ultra) เครื่องเขย่า (shaker) เครื่องระเหยสุญญากาศ(rotary evaporator) ไมโครปิเปต (micropipette) พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) บีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร กรวยกรองบุชเนอร์ (Büchner funnel, diameter 13.5 cm) ขวดลดความดัน (vacuum filter flask) ขนาด 1 ลิตร กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 0.5 และ 1 ลิตร คอลัมน์โครมาโตกราฟีสำหรับ florisil™ (22 mm id x 300 mm, teflon stopcock, coarse porosity fritted disc) และสำหรับ sodium sulfate (25 mm id x 250 mm) กระบอกตวงแก้วแบบมีจุกปิด (mixing cylinder) ขนาด 250 มิลลิลิตร เออเลนเมเยอร์ ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดปริมาตรก้นกลม (round-bottomed flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร กรวยแก้ว หลอดเซนติฟิวก์พลาสติก (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ เครื่องระเหยแบบหลายหลอดแก้ว เครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง อลูมิเนียมฟอยล์ ขวดสีชาขนาด 4 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด ช้อนตักสาร กระดาษกรอง No.2 สำลี ต้องล้างโดยแช่ในอะซีโทน จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ชั่วโมง ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -15°C, GC-ECD; Technology 6890N โดยใช้ analytical column: OC-RTX (30 m, 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness), GC-FPD; Agilent Technology 6890N โดยใช้ analytical column: DB-35ms (30 m, 0.25 mm id, 0.25 µm film thickness) และก่อนการใช้งานเครื่องแก้วทุกชนิดให้ล้างด้วยอะซีโทน 2 ครั้ง และนอร์มัลเฮกเซน 2 ครั้ง แล้วผึ่งให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด

ตัวอย่างพืชที่ใช้สำหรับการทดสอบวิธี ได้แก่ หอมหัวใหญ่และกระเทียมเป็นตัวแทนของพืชที่มีกำมะถันสูง (*Allium*) แครอทเป็นตัวแทนของพืชที่มีรงควัตถุสูง และอะโวคาโดเป็นตัวแทนของพืชที่มีไขมันสูง ผักและผลไม้ทั้ง 4 ชนิด จะต้องตรวจไม่พบสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ทดสอบและเป็น sample blank นำตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ประมาณ 500 กรัม มาล้างทำความสะอาดผึ่งให้แห้งใช้เฉพาะส่วนที่รับประทานได้ ยกเว้นอะโวคาโดให้ใช้ทั้งผลยกเว้นเมล็ด จากนั้นใช้มีดตัดหั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (cm^3) แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องบดปั่นอาหาร ชั่งแบ่งตัวอย่างๆ ละ 10 กรัม (±0.1 กรัม) หรือ 5 กรัม (± 0.05 กรัม) ลงใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร

เพื่อใช้เป็นตัวอย่างวิเคราะห์ (analytical portion) ตัวอย่างที่ยังไม่ได้นำมาวิเคราะห์จะถูกเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -15°C (reserved portion)

สำหรับการเตรียมตัวอย่างหอมหัวใหญ่และกระเทียมก่อนการสกัด ให้เตรียมโดยวิธีการดังต่อไปนี้

วิธีที่ 1. ปั่นตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ชั่งตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม

วิธีที่ 2. ปั่นตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็ง (อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C) มาไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง ชั่งปริมาณ 5 กรัม ผสมกับกรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสำหรับหลอดทดลอง (Vortex)

วิธีที่ 3. ปั่นตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็ง (อุณหภูมิต่ำกว่า 0°C) ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง กับกรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ชั่งแบ่งส่วนผสมนี้ 10 กรัม คิดเป็นน้ำหนักตัวอย่าง 5 กรัม

การสกัด (extraction)

นำตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างมาแล้ว มาทำการทดลองซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน (matrix blank) และตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked sample) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผ่านขั้นตอนการสกัดดังนี้

1. วิธี PAM: 302 (Pesticide Analytical Manual) (U.S. Food and Drug Administration, 1994) ใช้ตัวอย่างปริมาณ 50 กรัม มาสกัดโดยการเติม acetone เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 65 โดยปริมาตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ultra 2 นาที จากนั้นกรองด้วย Büchner funnel ลงใน Vacuum filter flask ขนาด 1 ลิตร จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างซ้ำด้วย acetone เจือจางด้วยน้ำร้อยละ 65 โดยปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดใส่ใน Mixing cylinder ขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน ส่วนที่หนึ่งสกัดด้วยวิธี liquid-liquid partition แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย florisil™ column หรือ alumina column เพื่อวิเคราะห์สารกลุ่ม OCs และ SPs ด้วย GC-ECD และอีกส่วนหนึ่งทำการสกัดสารกลุ่ม OPs ด้วยสารผสมของ n-hexane 100 มิลลิลิตร และ dichloromethane 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker เวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นไขสารละลายชั้นล่างทิ้งและนำสารละลายชั้นบน หยดผ่าน sodium sulfate anhydrous ใน chromatographic column ที่บรรจุ sodium sulfate แบบ drop by drop ลงใน round-bottomed flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อแห้งปรับปริมาตรด้วย acetone 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 5 กรัมต่อมิลลิลิตร) ใน graduated tube นำมาวิเคราะห์ด้วย GC-FPD

2. วิธี QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) ใช้ตัวอย่างหอมและกระเทียมที่เตรียมทั้ง 3 วิธี (วิธีที่ 1, 2 และ 3) แครอท และอะโวคาโด ชั่ง 10 กรัม ใน centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อทำ spiked sample เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที เติม glacial acetic acid เจือจางใน acetonitrile ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือแรงๆ 30 วินาที จากนั้นเติม sodium acetate trihydrate 1 กรัม และ magnesium sulfate anhydrous 4 กรัม เขย่าด้วยมือ 30 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (centrifuge) ความเร็วรอบ 4,000 rpm 5 นาที เก็บสารละลายชั้นบนใน centrifuge tube ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

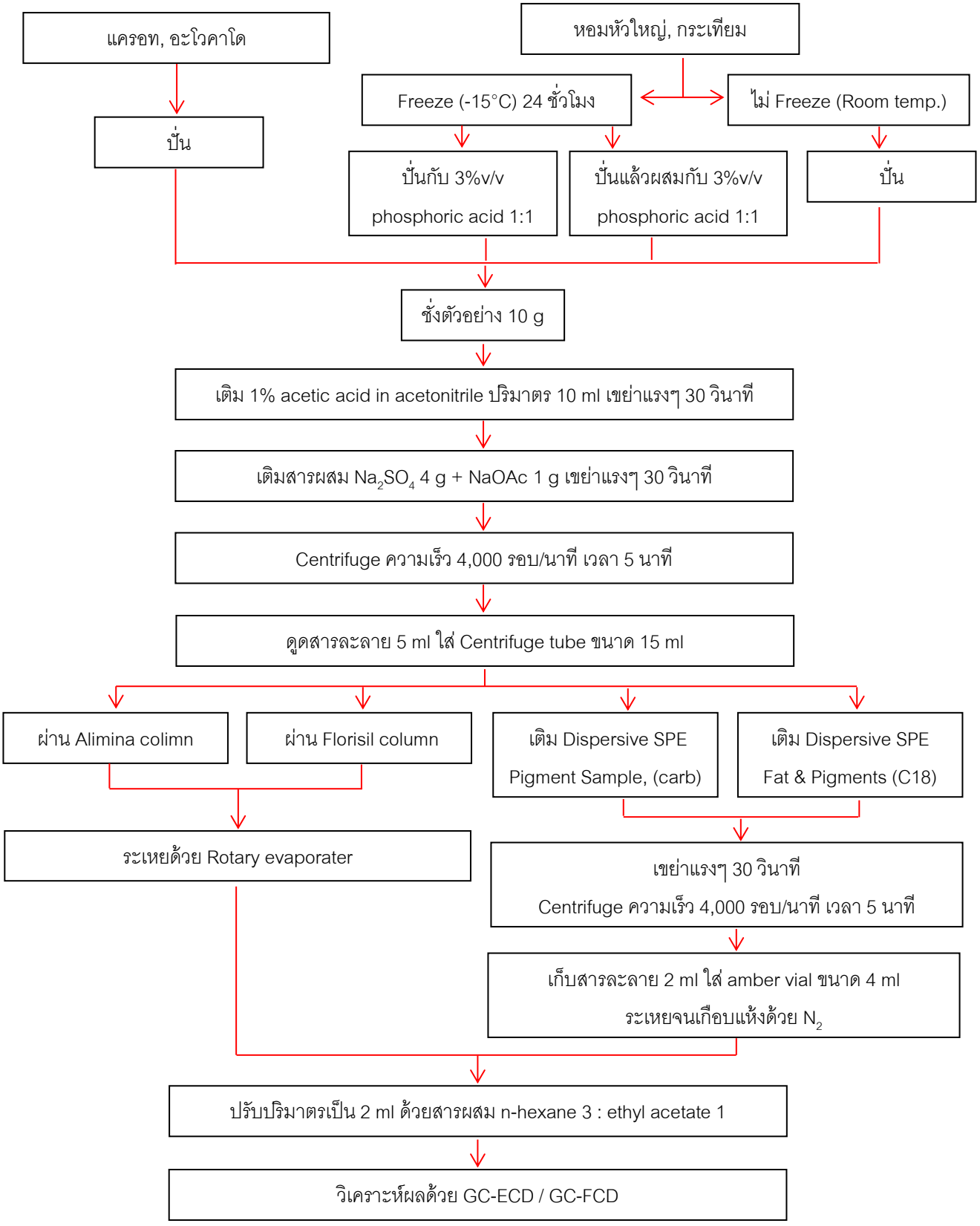
การทำให้บริสุทธิ์ (clean-up)

1. ทำให้บริสุทธิ์ด้วย florisil™ column หรือ alumina column นำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี PAM: 302 และสารละลายจากวิธี QuEChERS ผ่าน column ผ่าน column ทั้ง 2 ชนิด ชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บสารละลายที่ได้ระเหยแห้งปรับปริมาตรด้วย n-hexane 3 ส่วนกับ ethyl acetate 1 ส่วน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วย GC-ECD และ GC-FPD

2. ทำให้บริสุทธิ์ด้วย d-SPE ชนิด carb หรือ d-SPE ชนิด C18 โดยการเติม d-SPE ในสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วย QuEChERS เขย่าด้วยมือ 30 วินาที แล้ว centrifuge ความเร็วรอบ 4,000 rpm 5 นาที อีกครั้ง เก็บสารสกัดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในขวดสีชาขนาด 4 มิลลิลิตร ระเหยจนเกือบแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหลายหลอดแก้ว (evaporator, multiple tube) ปรับปริมาตรด้วยสารผสมระหว่าง n-hexane 3 ส่วนกับ ethyl acetate 1 ส่วน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์ด้วย GC-ECD และ GC-FPD การเตรียมตัวอย่างและการทำให้บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 2

ตารางที่ 1 การเตรียมตัวอย่างและการทำให้บริสุทธิ์แบบต่างๆ

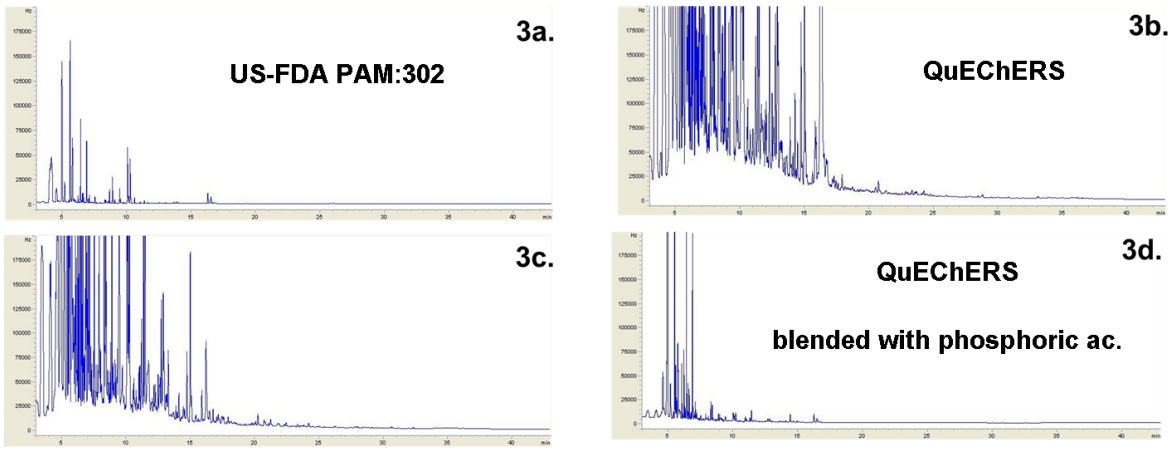
	การเตรียมตัวอย่าง	การทำให้บริสุทธิ์
US-FDA PAM:302	หอมหัวใหญ่ กระเทียม: 25 กรัม + กรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 25 มิลลิลิตร แครอท อะโวคาโด: 50 กรัม - liquid-liquid partition	column chromatography - Alumina column - Florisil^{TM} column
QuEChERS	หัวหอมใหญ่ กระเทียม แครอท อะโวคาโด: 10 กรัม หัวหอมใหญ่ กระเทียม 5 g ผสมกับหรือปั่นกับ กรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณ 5 มิลลิลิตร - เติม กรดน้ำส้มเจือจาง ร้อยละ 1 ในอะซิโตไนไตรล์10 มิลลิลิตร ทำ partitioning (sodium acetate 1 g + magnesium sulfate 4 g)	column chromatography - Alumina column - Florisil column dispersive-SPE - Carb : $MgSO_4$, PSA, GCB - C18 : $MgSO_4$, PSA, GCB, C18



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในหอมหัวใหญ่ กระเทียม แครอท และอะโวคาโด ด้วยวิธี QuEChERS

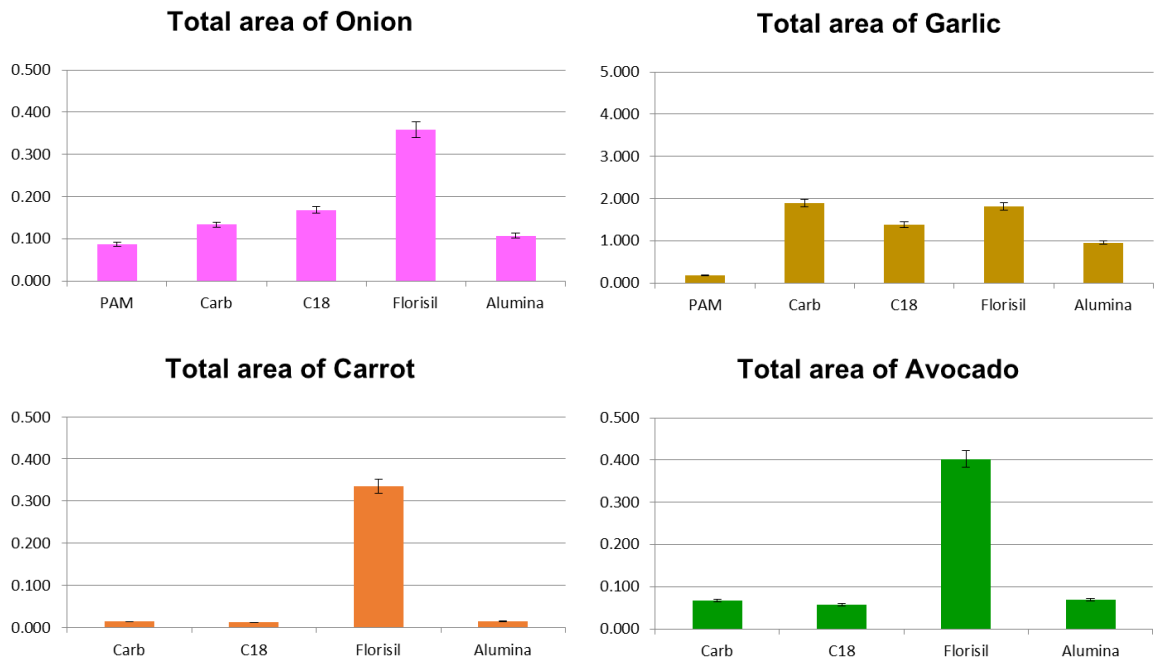
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

หลังจากการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์นำสารสกัดที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง GC-ECD และ GC-FPD แล้ว จะได้โครมาโทแกรมดังตัวอย่างในภาพที่ 3 สำหรับ GC-FPD เป็นตัวตรวจวัดที่จำเพาะเจาะจง (specific detector) ตรวจจับเฉพาะสารกลุ่ม OPs ที่สนใจเท่านั้น จึงไม่เกิดพีครบกวน (interference peak) จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ในพืชตัวแทนทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ หอมหัวใหญ่ กระเทียม แครอท และอะโวคา โดยใช้ Total area sum ซึ่งเป็น function ที่แสดงผมรวมของพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดมีหน่วยเป็นเฮิรตซ์ (Hz) สำหรับ GC-ECD เมื่อพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดมีปริมาณมากแสดงว่ามีพีครบกวนเป็นจำนวนมาก หรือหมายถึงการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพต่ำดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากกระเทียมจากเครื่อง GC-ECD แสดงประสิทธิภาพการทำให้บริสุทธิ์ 3a. คือวิธี US-FDA PAM:302 3b., 3c., และ 3d คือ วิธี QuEChERS ทำให้บริสุทธิ์ด้วย $MgSO_4$, PSA, GCB, C18 3b. ตัวอย่างปกติ 3c. ตัวอย่างที่ผสมกับกรดฟอสฟอริก และ 3d. ตัวอย่างแช่แข็งปั่นกับกรดฟอสฟอริก

สำหรับหอมหัวใหญ่และกระเทียม ทำการเปรียบเทียบวิธี US-FDA PAM:302 กับวิธี QuEChERS ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วย d-SPE ชนิด Carb และ ชนิด C18 และ ด้วย chromatography column ชนิด Florisil™ และชนิด alumina ผลพบว่าวิธี PAM:302 สามารถกำจัดสารรบกวนได้ดีที่สุด การสกัดด้วยวิธี QuEChERS สามารถกำจัดสารรบกวนได้น้อย แม้จะทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใดก็ตาม ในขณะที่แครอทและอะโวคาโด เมื่อใช้วิธี QuEChERS ที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วย d-SPE ทั้งสองชนิดให้ผลเป็นที่น่าพอใจซึ่งใกล้เคียงกับ alumina แต่เมื่อทำให้บริสุทธิ์ ด้วย Florisil™ ไม่สามารถกำจัดสารรบกวนได้ดังภาพที่ 4

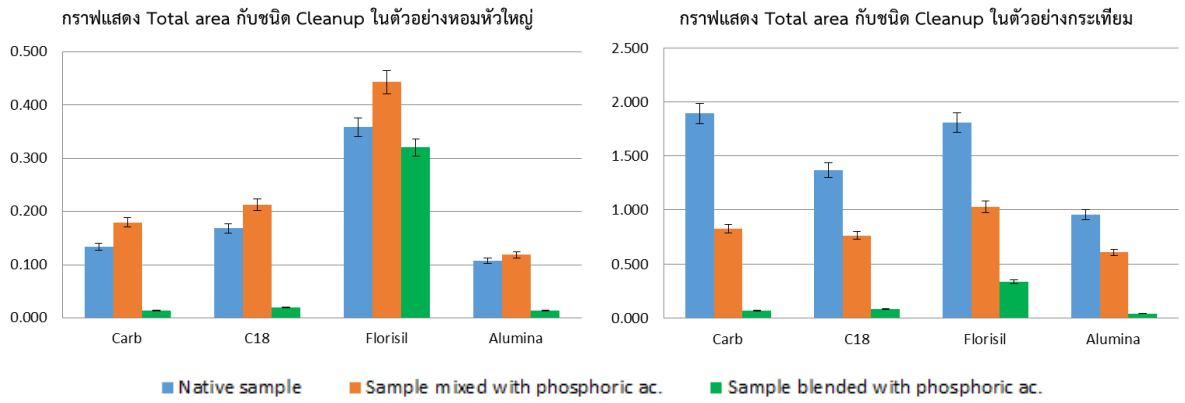


ภาพที่ 4 กราฟแสดง Total area sum ที่ได้จากโครมาโทแกรมสารสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของหอมหัวใหญ่ กระเทียม แครอท และอะโวคาโด

ถึงแม้วิธี US-FDA PAM:302 จะเหมาะกับตัวอย่างหัวหอมใหญ่และกระเทียมมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองทรัพยากร จึงไม่เหมาะที่จะใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างจำนวนมาก จึงทำการพัฒนาการสกัดด้วยวิธี QuEChERS เปรียบเทียบการสกัดที่ใช้ตัวอย่างปกติ ตัวอย่างที่ผสมกับกรดฟอสฟอริก และตัวอย่างแช่แข็งปั่นกับกรดฟอสฟอริก แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารชนิดต่างๆ ทั้ง 4 ชนิด ผลแสดงในภาพที่ 5 พบว่าในตัวอย่างหอมหัวใหญ่ ตัวอย่างปกติมีสารรบกวนน้อยกว่าตัวอย่างที่ผสมกับกรด ในทางตรงกันข้ามตัวอย่างกระเทียมเมื่อผสมกับกรดแล้วสามารถลดสารรบกวนได้ และในทุกสารที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ตัวอย่างหอมหัวใหญ่และกระเทียมแช่แข็งแล้วปั่นกับกรดฟอสฟอริกให้สารรบกวนน้อยกว่าตัวอย่างแบบอื่นมาก โดยรวมสามารถกล่าวได้ว่าการใช้ alumina เพื่อทำให้บริสุทธิ์ให้ผลดีที่สุด ส่วน d-SPE ทั้ง 2 ชนิดให้ผลใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับ alumina ทั้งนี้การใช้ d-SPE เป็นวิธีที่ง่าย ใช้สารเคมีน้อย และประหยัดกว่า alumina จึงสามารถใช้ทดแทนกันได้

เลือกวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ พืชสกุล *Allium* หอมหัวใหญ่และกระเทียม ต้องทำการปั่นตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งกับกรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 โดยน้ำหนักก่อนทำการสกัด สำหรับแครอทและอะโวคาโดใช้ตัวอย่างที่ปั่นปกติ ใช้วิธี QuEChERS สกัดพืชผักทั้ง 4 ชนิด แล้วใช้ d-SPE ที่มีส่วนผสมของ $MgSO_4$, PSA, GCB และ C18 ในการทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสิ่งรบกวนออกจากสารสกัด ทั้งนี้วิธีที่เลือกเป็นวิธีที่มีความสมดุลระหว่างประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ และความคุ้มค่าทางทรัพยากร รวมทั้งต้องเป็นการง่ายในการจัดการสำหรับการวิเคราะห์ในงานประจำ (routine) ด้วย วิธีที่เลือกแล้วนี้จะถูกนำมาทดสอบความใช้ได้เบื้องต้นของการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืช 3 ชนิดที่มีความถี่ในการตรวจพบการตกค้างสูง และใช้เป็นตัวแทนของสารในกลุ่ม ออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสฟอรัส และสารสังเคราะห์ไพริทรอยด์ ได้แก่ trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos และ cypermethrin ตามลำดับ วิเคราะห์ตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked samples) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับที่สามารถตรวจวัดได้ดีจากเครื่อง GC วิเคราะห์ ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ แล้วคำนวณการคืนกลับเฉลี่ย (mean recovery)

เพื่อประเมินความแม่น (accuracy) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เพื่อประเมินความเที่ยง (precision) โดยกำหนดเกณฑ์ยอมรับ ตาม AOAC คือ %recovery อยู่ระหว่าง 60-120% และ RSD น้อยกว่า 20%



ภาพที่ 5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบ Total area sum ของหอมหัวใหญ่และกระเทียมที่ผ่านการเตรียมแบบต่างๆ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่าสารทั้ง 3 ชนิดเมื่อผ่านการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ที่ได้คัดเลือกแล้วให้การคืนกลับและความสามารถในการวัดซ้ำ (%recovery, RSD) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (63.7-119.6%, 0.8-19.8%) ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด สามารถนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานประจำเพื่อการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในผักผลไม้ที่มีคุณสมบัติเหล่านี้ได้

ตารางที่ 2 Accuracy (%recovery) และ precision (RSD) ของการวิเคราะห์ trans-heptachlor epoxide, cypermethrin และ chlorpyrifos ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในหอมหัวใหญ่ กระเทียม แครอท และอะโวคาโด *(n=6)*

	หอมหัวใหญ่		กระเทียม		แครอท		อะโวคาโด	
	%recovery	RSD	%recovery	RSD	%recovery	RSD	%recovery	RSD
t-heptachlor epoxide	84.1	10.0	113.2	4.1	98.9	14.5	81.3	2.0
cypermethrin	110.2	2.2	106.7	4.2	104.9	17.7	63.7	2.2
chlorpyrifos	89.2	0.8	116.9	3.2	119.6	1.5	96.8	19.8

การนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้งานประจำต้องทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีโดยทำการทดสอบตัวแปร (parameters) อื่นๆ ที่จำเป็นให้ครบถ้วน (full validation) เช่น การทำ specificity/selectivity การหา accuracy และ precision อย่างน้อย 2 ระดับความเข้มข้น การทำ linearity of calibration/working range หาค่า LOD/LOQ การทำ matrix effect เป็นต้น parameters เหล่านี้นักวิเคราะห์ต้องพิจารณาว่าต้องทำอย่างไร จำนวนเท่าไหร่ ให้เหมาะสมกับงานของตน ในที่นี้คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์เบื้องต้นพบว่าวิธีสามารถใช้งานได้ นอกจากนี้ยังสามารถขยายขอบข่าย (scope)

ของสารสนใจไปยังสารกำจัดศัตรูพืชที่มีคุณสมบัติทางเคมีอื่นๆ ได้ แต่ต้องทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีก่อนใช้งานเสมอ

สรุปผลการวิจัย

ได้วิธีเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมกับผักผลไม้ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้การสกัดด้วยวิธี QuEChERS ที่ไม่มีการดัดแปลงสำหรับแครอทและอะโวคาโด และต้องปั่นตัวอย่างที่หอมหัวใหญ่และกระเทียมที่ผ่านการแช่แข็งกับกรดฟอสฟอริกเจือจางร้อยละ 3 ก่อนการสกัด สำหรับผักผลไม้ทั้งหมดหลังจากการสกัดและการ partition แล้ว นำสารสกัดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย d-SPE ชนิด C18 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ $MgSO_4$, PSA, GCB และ C18 การทดสอบ accuracy และ precision ของสาร 3 ชนิด ได้แก่ trans-heptachlor epoxide, chlorpyrifos และ cypermethrin ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นจำนวน 6 ซ้ำ (n=6) ให้ผลอยู่ในเกณฑ์ยอมรับตามมาตรฐานของ AOAC ในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชคือ %recovery ระหว่าง 60-120% และ precision RSD น้อยกว่า 20% คุณลักษณะเฉพาะของวิธีสอดคล้องกับการใช้งานตามค่ามาตรฐานของประเทศ วิธีที่ได้เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ในงานประจำในการวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชในผักผลไม้ที่ยากต่อการวิเคราะห์เหล่านี้ได้เป็นไปตามวัตถุประสงค์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางวิชาดา จงมีวาสนา นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ สำหรับคำแนะนำและข้อเสนอแนะ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายสารกำจัดศัตรูพืชและยาสัตว์ตกค้างทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., & Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int., 86,* 412-431.

Chamkasem, N., Ollis, L.W., Harmon, T., Lee, S., & Mercer, G. (2013). Analysis of 136 pesticides in avocado using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem., 61*, 2315-2329.

Gaithersburg, M.D. (2007). Pesticide residues in foods by MeCN extraction and partitioning with magnesium sulfate. Official Methods of Analysis of AOAC International. *AOAC International*, Method 2007.1.

Norli, H.R., Christiansen, A.L., & Stuveseth, K. (2016). Analysis of non-cleaned QuEChERS extracts for the determination of pesticide residues in fruit, vegetables and cereals by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess., 33*(2), 300-12.

Rahman, M.M., Park, J.H., Abd El-Aty, A.M., Choi, J.H, Bae, H.R., Yang, A., Park, K.H., & Shim, J.H. (2013). Single-step modified QuEChERS for determination of chlorothalonil in shallot (Allium ascalonicum) using GC-μECD and confirmation via mass spectrometry. *Biomed Chromatogr., 27*(4), 416-21.

U.S. Food and Drug Administration. (1994). Pesticide Analytical Manual Vol. I, Multiresidue Methods, (3rd Ed), Washington DC: U.S. Department of Health and Human Services.

Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry, 125,* 803–812.

Wittayanan, W. & Chaimongkol T. (2018). Method development of simultaneous determination of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticide residues in some food by gas chromatographic technique. *Bull Dept Med Sci, 60*(1), 29-44.

Wittayanan, W., Chaimongkol, T., & Jongmevasna, W. (2017). Multiresidue method for determination of 20 organochlorine pesticide residues in fruits and vegetables using modified QuEChERS and GC-ECD/GC-MSD. *International Food Research Journal, 24*(6), 2340-2346.